



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Khemis-Miliana

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des sciences biologiques

Filière: Biologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

En

Spécialité: Analyses biologiques et biochimiques

Thème

*L'effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir des selles d'enfants*

Soutenu le: 20/06/2017

Présenté par :

Melle Noura Rebiha

Melle Ghoul Meriem

Soutenu devant le jury :

Mme Zaouadi. N	Présidente	MAA	UDB Khemis-Miliana
Mme SAADI. F	Promotrice	MAA	UDB Khemis-Miliana
Mme. Brahimi.S	Examinatrice	MAA	UDB Khemis-Miliana
Mme. Didouh.N	Examinatrice	MCB	UDB Khemis-Miliana

Année universitaire 2016/2017.

## *Remerciements*

*Avant tous nous remercions « Allah » tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Nous adressons nos plus vifs remerciements à madame Saadi Fadhila, la promotrice de mémoire pour nous avoir proposées ce sujet, pour ses conseils scientifiques judicieux et son suivi durant la période de la réalisation de ce travail.*

*Nous sommes particulièrement reconnaissantes à M<sup>me</sup> Zaouadi d'avoir accepté de juger ce travail en tant que présidente ainsi que, M<sup>me</sup> Brahimi et M<sup>me</sup> Didouh, de bien vouloir évaluer et examiner ce mémoire.*

*Nous plus sincères Gracitutes à M<sup>e</sup> le Docteur Zibouche et surtout Yassine et Asma pour nous avoir accueillis au sein de son laboratoire et nous avoir données les moyens de mener à bout cette étude.*

*Nous plus vifs remercierons à toute l'équipe de laboratoire de Microbiologie en particulier : Aicha, Wassila, Afef, Nadjiba.*

*Nos très spécieux remerciements reviennent à nos familles et nos amies pour leurs encouragements.*

*Finalement, nous remercierons tout ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.*

*A vous tous, un grand Merci.*



## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à ma famille qui m'a encouragé et soutenu durant mes études et particulièrement à :*

*A l'être le plus chère à mon cœur, ma mère, qui a toujours cru a moi et m'encouragée.  
A mon cher père qui ma fait la confiance et ma donne tous les moyennes pour étudier,  
à qui je dois le grand amour et le profond respect.*

*A mon grand-père (que dieu lui fasse miséricorde) qui nous a toujours encouragés à enrichir notre « savoir », et à ma grand-mère que dieu la protège.*

*A mes oncles et mes tantes paternels et maternels en particulier ; Sara et son mari Racem qui m'ont beaucoup aidé et soutenu durant mon travail et leurs enfants (Kaouthar et Yasser), je les souhaite tout le bonheur durant leurs vie.*

*A mes cousins et cousines, et ma petite sœur Maria.*

*A toutes la famille Ghoul et Aichouini.*

*A mon nouveau prince Badis et ma nouvelle princesse Basma*

*Que dieu les protège.*

*A mon binôme Noura Rebiha.*

*A mes meilleurs ami(e)s : Fella, Houda, Sara, Fatima, Aicha, Mohamed, Abdelhadi, Houcine, Abdelhak, avec qui j'ai partagé des moments très agréables.*

*A mes chères collègues : Amina, Imen C, Dalia, Houda, Meriem, Imen, Assai, Leila, Malek, Kheira, Yassine*

*A toutes la promotion de la deuxième année master ABB 20016-20017.*

*A tous ceux qui de près ou de loin, ont collaboré à la réalisation de ce travail.*

*A tous ceux que je porte dans mon cœur.*



*Meriem*



*Dédicace*

*Je dédie ce travail*

*A ma chère maman qui ma fait toujours le courage et ma donne tous l'amour de monde*

*A mon chère père qui ma fait la confiance et ma donne tous les moyennes pour étudier*

*A ma grande mère qui je l'aime trop et mes sœurs Kheira, Farida, Djihane, Kawther, Meriem  
et ma jumelle Imene qui m'ont fait la confiance et le courage pour travailler*

*A mon frère Naim, Raouf et mes beaux frères Samir et walid*

*A mes tantes et toutes la famille Noura et Khimda*

*A mes princesses Fatima zahra Raghda et Ratil et a mon neveu Mohamed*

*A ma binôme Meriem et mes copines proches Houda et Fella A mes amis Mohamed Saifi,  
Mohamed et Samir bouacheria*

*A mes collègues Liella, Imene C, Dalia, Assia, Ahlame, Kheira, Malek goreçerse, Amina  
, Imene*

*A tout es les personnes qui ont aidé a la réalisation de ce travail et les membres de laboratoire  
de microbiologie Wassila, Aicha, Afafe, Nadjiba, et Nadia.*

*Et a toutes la promotion deuxième année master ABB 2016- 2017*

*Avec souhaites d'une langue vie plein de bonheur et de succès.*

*Rebiha*



## ***Liste des abréviations***

- °C : degré Celsius
- **µm**: micromètre
- **g** : gramme
- **mm** : millimètre
- **µg** : microgramme
- **mg** : milligramme
- **L** : litre
- **ml** : millilitre
- **%** : pourcentage
- **DO** : Densité optique
- **min** : minute
- **S** : Seconde
- **h** : heure
- **nm** : nanomètre
- $\lambda$  : Longueur d'onde
- **N** : Normalité
- **T** : temps
- **TSI**: Three sugar Iron
- **MH** : Muller Hinton
- **MSE** : Mayeux Sandine et Elliker
- **KMK** :Milieu Kempler Mc Kay
- **MRS** : Milieu Man Rogosa an Sharpe
- **MRS-BCP** : Milieu MRS additionné de pourpre de Bromocrésol
- **Man** : Mannitol
- **Mann** : Mannose
- **Sor** : Sorbitol
- **Fru**: Fructose
- **Ami** : Amidon
- **Mal**: Maltose
- **Sac**: Saccharose
- **Xyl**: Xylose
- **Lac**: Lactose

- **NaOH** : Hydroxyde de Sodium
- **HCL** : Acide Chlorhydrique
- **NaCl** : Chlorure de Sodium
- **pH** : Potentiel hydrogène
- **NR** : Nitrate réductase
- **VP**: Voges-proskauer
- **ADH**: Arginine Dihydrolase
- **CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : L'eau oxygénée
- **O<sub>2</sub>** : Oxygène
- **Hété** : hétérofermentaire
- **Homo** : homofermentaire
- **R** : résistance
- **S** : sensibilité
- **G et C** : Guanine et Cytosine
- **Aw** : Activité of water
- **FBA** : Fructose-6-p-phosphocétolase
- **PTS** : Synthèse Phosphotransferase Phosphoénolpyruvate
- **Sp** : espèce non précisée
- **ARC** : acidification réduction coagulation
- **AC** : acidification coagulation
- **G** : grossissement
- **P** : Pénicilline
- **AMC** : Amoxicilline+Acide Clavulanic
- **GEN** : Gentamicine
- **AK** : Amikacine
- **FO** : Fosfomycine
- **CIP** : Ciprofloxacine
- **CTX** : Céfotaxime
- **CZ** : Cefozoline
- **CFM** : Céfixime
- **CTO** : Co-trimoxazole
- **NA** : Acide Nalidixic

- **AX** : Amoxicilline
- **NIT** : Nitroxoline
- **BL** : bactérie lactique
- **Lc** : *Lactococcus*
- **Lb** : *Lactobacillus*
- **En** : *Enterococcus*
- **St** : *Streptococcus*
- **Leu** : *Leuconostoc*
- **Ped** : *Pediococcus*

# Liste des tableaux

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Présentation des échantillons.....	23
<b>Tableau 2 :</b> Aspect microscopique et macroscopiques des bactéries isolées.....	34
<b>Tableau 3 :</b> Résultats des caractères physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques.....	41
<b>Tableau 4 :</b> Profil fermentaire des sucres.....	44
<b>Tableau 5 :</b> Résultats des caractères technologiques des bactéries lactiques.....	48-49
<b>Tableau 6 :</b> Résultats de test de la résistance aux antibiotiques.....	50
<b>Tableau 7 :</b> Activité antibactérienne.....	51
<b>Tableau 8 :</b> Effet des surnageant.....	52

# Liste des figures

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Différente forme microscopique de bactéries lactiques obtenues au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran.....	4
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques.....	10
<b>Figure 3</b> : Colonisation microbienne du tractus gastro-intestinal humain.....	15
<b>Figure 4</b> : Aspect des isolats ensemencés sur gélose MRS après 24h d'incubation à 37°C...33	33
<b>Figure 5</b> : Observation microscopique des isolats après une coloration de Gram (G×100)...34	34
<b>Figure 6</b> : Résultat de nitrate réductase après 24h d'incubation à 37°C.....36	36
<b>Figure 7</b> : Résultat de mannitol-mobilité.....37	37
<b>Figure 8</b> : Résultat de la croissance en présence de NaCl.....37	37
<b>Figure 9</b> : Résultat de la résistance au tellurite.....38	38
<b>Figure 10</b> : Résultat de lait de Scharman.....38	38
<b>Figure 11</b> : Résultat de l'ADH.....39	39
<b>Figure 12</b> : Résultat de type fermentaire.....39	39
<b>Figure 13</b> : Résultat de lait tournesolé.....40	40
<b>Figure 14</b> : Résultat d'acétoïne.....40	40
<b>Figure 15</b> : Résultat de la gélatinase.....40	40
<b>Figure 16</b> : Résultat de l'utilisation de citrate.....42	42
<b>Figure 17</b> : Exemple de résultat de fermentation des sucres.....45	45
<b>Figure 18</b> : Répartition des souches lactiques isolées.....46	46
<b>Figure 19</b> : Résultat de l'activité protéolytique.....46	46
<b>Figure 20</b> : Activité lipasique (a) et lecithinasique (b).....47	47
<b>Figure 21</b> : Résultat des colonies large sur gélose hypersaccharosé.....47	47

<b>Figure 22 :</b> Résultat de test de la résistance aux antibiotiques.....	49
<b>Figure 23:</b> Résultat d'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolées vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i> .....	51
<b>Figure 24 :</b> Variation de DO de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis le surnageant des bactéries lactiques testées en fonction du temps.....	53
<b>Figure 25 :</b> Variation de DO de <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis le surnageant des bactéries lactiques testées en fonction du temps.....	53

# Sommaire

## Table des matières

Remercîments

Dédicaces

Liste d'abréviations

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction .....1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les bactéries Lactiques

1. Bactéries lactiques .....2

1.1. Généralité .....2

1.2. Origine et Habitat .....2

1.3. Caractéristiques.....3

1.3.1. Caractères morphologiques.....3

1.3.2. Caractères physiologiques et biochimiques .....4

1.3.3. Caractères immunologiques.....4

1.3.4. Caractères structuraux.....4

1.4. Classification et Taxonomie.....5

1.4.1. Caractéristiques des principaux genres .....5

1.4.1.1. *Lactobacilles* .....5

1.4.1.2. *Carnobacterium* .....5

1.4.1.3. *Streptococcus* .....7

1.4.1.4. *Enterococcus* .....7

1.4.1.5. *Lactococcus* .....7

1.4.1.6. *Leuconostoc, Oenococcus et Weissella* .....8

1.4.1.7. *Pediococcus et Tetragenococcus* .....8

1.4.1.8. *Bifidobactérium* .....9

1.5. Voies de fermentation..... 9

1.5.1. Homofermentation.....9

1.5.2. Hétérofermentation .....9

1.6. Propriétés technologiques .....11

1.6.1. Rôle sur la structure et la texture.....11

1.6.1.1. Activité acidifiante.....11

1.6.1.2. Production des polysaccharides.....	11
1.6.2. Rôle sur les caractéristiques organoleptiques .....	11
1.6.2.1. Production d'aromes.....	11
1.6.2.2. Activité protéolytique.....	12
1.6.2.3. Activité lipolytique.....	12
1.6.3. Rôle sur la conservation .....	12
1.6.3.1. Production des bactériocines.....	12
1.6.3.2. Production d'acides.....	13
1.6.3.3. Production d'autres substances inhibitrices.....	13
1.7. Bactéries lactiques dans la flore intestinale.....	13
1.8. Adhésion des bactéries lactiques chez l'humain .....	15
<b>2. Activité antibactérienne.....</b>	<b>16</b>
2.1. Phénomènes antibactériens.....	16
2.2. Composés antibactériens produits par les Bactéries lactiques .....	16
2.2.1. Acides organiques.....	17
2.2.2. Acides gras.....	18
2.2.3. Peroxyde d'hydrogène.....	18
2.2.4. Dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> ).....	18
2.2.5. Diacétyle.....	19
2.2.6. Acétaldéhyde.....	19
2.2.7. Reutéline.....	19
2.2.8. Bactériocines.....	20
2.2.8.1. Définition et caractéristiques principales .....	20
2.2.8.2. Propriétés.....	21
2.2.8.3. Mode d'action des bactériocines.....	21
<b>Etude Expérimentale</b>	
<b>Chapitre II : Matériel et méthode</b>	
1. Collection des échantillons .....	23
2. Isolement et purification des bactéries lactiques .....	24
3. Identification des bactéries lactiques .....	24
3.1. Examen macroscopique.....	24
3.2. Examen microscopique .....	25
3.3. Coloration de Gram .....	25
4. Tests physiologiques et biochimiques .....	25

4.1. Test de la catalase .....	25
4.2. Test d'oxydase.....	25
4.3. Recherche du nitrate réductase.....	26
4.4. Croissance à différentes températures .....	26
4.5. Test mannitol-mobilité.....	26
4.6. Tests de croissance dans des conditions hostiles .....	26
4.6.1. Croissance en présence de NaCl (2%, 4%, 6,5%).....	26
4.6.2. Croissance à différentes pH.....	27
4.6.3. Test de thermo-résistance .....	27
4.6.4. Test de thermo-résistance .....	27
4.6.5. Résistance au tellurite.....	27
4.6.6. Culture sur lait de Scharman .....	27
4.6.7. Recherche de type fermentaire .....	27
4.7. Culture au lait tournesolé .....	28
4.8. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH) .....	28
4.9. Fermentation des sucres .....	28
4.10. Recherche de la réductase .....	28
4.11. Production d'acétoine .....	29
4.12. Hydrolyse de la gélatine.....	29
4.13. Production de CO <sub>2</sub> à partir du citrate.....	29
4.14. Utilisation du citrate.....	29
5. Etude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées .....	30
5.1. Pouvoir protéolytique.....	30
5.2. Pouvoir lipolytique.....	30
5.2.1. Recherche des lipases.....	30
5.2.2. Recherche de lécithinase.....	30
5.3. Pouvoir texturant.....	30
6. Résistance aux antibiotiques .....	31
7. Activité antibactérienne (Test de l'antagonisme) .....	31
7.1. Effet de surnageant.....	31
7.2. Confirmation de la présence des bactériocines.....	32
<b>Chapitre III : Résultats et discussions</b>	
1. Isolement et purification des bactéries lactiques.....	33
2. Identification des bactéries lactiques isolées .....	33

2.1. Aspect microscopique et macroscopique.....	33
2.2.1. Test de la catalase .....	36
2.2.2. Test d'oxydase.....	36
2.2.3. Recherche du nitrate réductase .....	36
2.2.4. Croissance à différentes températures et thermo-résistance .....	36
2.2.5. Test mannitol-mobilité.....	37
2.2.6. Tests de croissance dans des conditions hostiles .....	37
2.2.6.1. Croissance en présence de NaCl (2%, 4%, 6,5%).....	37
2.2.6.2. Croissance à différentes pH.....	38
2.2.6.3. Résistance au tellurite.....	38
2.2.6.4. Culture sur lait de Scharman.....	38
2.2.6.5. Test de l'ADH.....	39
2.2.6.6. Type fermentaire .....	39
2.2.6.7. Culture au lait tournosolé .....	40
2.2.6.8. Production d'acétoine.....	40
2.2.6.9. Gélatinase .....	42
2.2.6.10. Recherche de la citratase.....	42
2.2.6.11. Profil fermentaire.....	43
3. Caractères technologiques.....	46
3.1. Pouvoir protéolytique.....	46
3.2. Activité lipasique.....	47
3.3. Production des EPS .....	47
4. Résistance aux antibiotiques.....	49
5. Activité antibactérienne .....	51
5.1. Détection de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques.....	52
5.2. Effet des surnageants.....	52
5.3. Confirmation de la présence des bactériocines.....	52
<b>Conclusion</b> .....	<b>55</b>

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

# Résumé

## Résumé

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments grâce à la production des acides organiques et d'autres substances antibactériennes telles que les bactériocines en inhibant certaines souches pathogènes.

Notre étude a conduit à l'isolement et l'identification de quarante souches de bactéries lactiques à partir des selles d'enfants sains. Selon les critères morphologiques, physiologiques, et biochimiques, les isolats sont probablement apparentés aux six genres qui sont : *Lactococcus* (32%), *Lactobacillus* (6%), *Leuconostoc* (22%), *Enterococcus* (24%), *Pediococcus* (8%) et *Streptococcus* (8%).

Les résultats de l'évaluation des aptitudes technologiques indiquent que l'ensemble des souches présentent un très bon pouvoir protéolytique, texturant, avec un faible pouvoir lipolytique, caractéristique connue chez les bactéries lactiques.

Dans le but de mettre en évidence l'effet inhibiteur de ces bactéries, nous avons étudié le pouvoir antagoniste de ces souches isolées vis-à-vis deux souches pathogènes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*). Cinq souches (*Lb. fermentum* E2 B2, *Lb. plantarum* E3 B11, *Ln. lactis* E3 B7, *St. Sp* E2 B4, *Lc. Sp* E1 B2) ont montré une activité plus ou moins importante avec des zones d'inhibition de 7 à 14 mm.

Les résultats de confirmation de la présence d'autres substances que l'acide lactique indiquent que nos bactéries sont capables de les synthétiser et peuvent être les bactériocines ou le peroxyde d'hydrogène.

**Mot clés :** Bactéries lactique, isolement, identification, aptitudes technologiques, pouvoir antagoniste.

## Abstract

Lactic bacteria are used in food's fermentation and bioconservation due to the production of acids and other anti bacterial substances.

The present study led to the isolation and identification of forty species of lactic bacteria from stools of safe children. According to the morphologic, physiological and biochemical criteria, the isolates are probably related to the six following types: *Lactococcus* (32%), *Lactobacillus* (6%), *Leuconostoc* (22%), *Enterococcus* (24%), *Pediococcus* (8%) and *Streptococcus* (8%).

The results of the technological aptitudes evaluation show that the whole strains have a high proteolytic capacity texturazing with a low lipolytic capacity; which is known as a characteristic of lactic bacteria.

In order to prove the inhibiting effect of these bacteria, we have studied the antagonist power of the isolated stains against to pathogenic types (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*). Five stanes (*Lb. fermentum* E2 B2, *Lb. plantarum* E3 B11, *Ln. lactis* E3 B7, *St. Sp* E2 B4, *Lc. Sp* E1 B2) have shown more or less important activity with inhibiting areas from 7 to 14 mm.

The results which confirm the presence of other substances as Lactic Acid indicate that our bacteria are capable to synthesize these substances and can be Hydrogen Peroxide and bacteriocins.

**Key words:** Lactic bacteria, Isolation, Identification, technological aptitudes, antagonist power.

## ملخص

تستخدم البكتيريا اللبنية في التخمير المواد الغذائية **bioconservation** من خلال إنتاج الأحماض العضوية والمواد المضادة للبكتيريا أخرى، مثل **bacteriocins**، ومنع بعض السلالات المسببة للأمراض.

وقد أدت دراستنا إلى عزل وتحديد أربعين سلالة من البكتيريا اللبنية من براز الأطفال الأصحاء. وفقا للمعايير المورفولوجية والفسولوجية، والكيمياء الحيوية، والمعزولة من المرجح تتعلق بالأجناس الستة وهي : *Lactococcus* (32%), *Lactobacillus* (6%), *Leuconostoc* (22%), *Enterococcus* (24%) *Pediococcus* (8%) et *Streptococcus* (8%)

وتشير نتائج تقييم القدرات التكنولوجية أن جميع السلالات لديها قوة بروتينية جيدة جدا، ولديها تركيب مع انخفاض تحلل الشحومات، ولديها سمة معروفة في البكتيريا اللبنية.

من أجل إظهار تأثير كابح من هذه البكتيريا، درسنا قوة معادية من هذه السلالات وجها اتجاه كل من السلالات المسببة للأمراض (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) وأظهرت خمس سلالات *Lb. Fermentum* أهمية مع مناطق تثبيط 7 ل 14 ملم. *E2 B2*, *Lb. plantarum* *E3 B11*, *Ln. lactis* *E3 B7*, *St. Sp* *E2 B4*, *Lc. Sp* *E1 B2*

وتشير النتائج إلى تأكيد وجود مواد أخرى مثل حمض اللبنيك أن البكتيريا اللبنية لدينا قادرة على تصنيعه ويمكن أن تكون **bactériocines** أو بيروكسيد الهيدروجين.

الكلمات الدالة : البكتيريا اللبنية، والعزلة، وتحديد والمهارات والتكنولوجيا، وقوة معادية.

# Introduction

# Introduction

---

## Introduction

Les selles sont des excréments, résultat de ce que le corps humain, lors du phénomène de digestion via l'intestin, n'a pu éliminer, suite à la consommation de différents aliments. Les selles contenant une population de microorganismes complexe et diversifiée appelée microbiote, l'un des principaux effets bénéfiques de cette dernière est la protection et l'amélioration de la résistance aux maladies infectieuses de l'organisme hôte (**Hsieh, 2008**).

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi bonne sécurité alimentaire, cette sécurité est favorisée grâce à la production des acides organiques (acides lactiques et acétiques), qui font baisser le pH dans le milieu, et par la synthèse de bactériocines qui renforce l'activité antibactérienne et la conservation (**Bekhouche et Boulahrouf, 2005**).

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens inhibant la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes. Les souches les produisant peuvent donc également être utilisées dans des produits non fermentés en tant que culture protectrice. Une culture protectrice est une culture antagoniste ajoutée à un produit alimentaire pour inhiber les bactéries pathogènes ou altérantes et ainsi prolonger sa durée de vie en changeant ses propriétés organoleptiques le moins possible (**Rodgers, 2001 ; 2003 ; Vermeiren et al., 2004**).

Dans ce travail nous avons essayé d'isoler, identifier, et étudier les caractères biochimiques et technologiques des bactéries lactiques à partir des selles d'enfants. Et déterminer leur effet antagoniste vis-à-vis deux souches pathogènes (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922).

# Chapitre I

## Synthèse bibliographique

## Chapitre I : Revue bibliographique

### 1. Bactéries lactiques

#### 1.1. Généralités

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par **(Orla-jensen, 1919)**. Les bactéries lactiques sont des Coques ou des Bâtonnets Gram positive, immobiles, non sporulées, catalase négative, oxydase négative, nitrate réductase négative. Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. Lorsque l'acide lactique est le seul produit terminale, il s'agit des bactéries lactiques homofermentaires (certaines espèces peuvent produire au moins 18 moles d'acide lactique par mole de glucose fermenté). Parfois, en plus de l'acide lactique, d'autres composés constitués principalement d'acide acétique, d'éthanol et de gaz carbonique sont produits ; c'est le cas des hétérofermentaire (produisent uniquement 1 mole d'acide lactique par mole de glucose fermenté) **(Larpent, 1989)**.

Les bactéries lactiques sont aéro-anaérobies facultatives ou micro-aérophiles. En présence d'oxygène, elles sont incapables de phosphorylation oxydative car elles ne peuvent synthétiser les cytochromes et les enzymes à noyau hème **(Hardie, 1986 ; Zarour et al., 2013)**. Elles ont des besoins complexes en facteurs de croissance, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques, des vitamines B et des acides gras. C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait **(Larpent ; 1989 ; Novel ; 1993)**.

Les bactéries lactique regroupent 13 genres dont les : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *pediococcus*, *Streptococcus*, *Bifobacterium*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* et *Aerococcus* **(Dortu, 2009)**.

Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes. Cependant, parmi elles quelques espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme pathogènes opportunistes **(Aguirre et Collins, 1993)**.

## 1.2. Origine et Habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, on les trouve dans différents niches écologiques comme le lait, qui, par sa composition riche en substances nutritionnelles et en facteurs de croissance constitue un excellent milieu de culture pour les bactéries lactiques aptes à assimiler ses constituants par différents voies microbiennes (Alais, 1984). Ces bactéries, peuvent coloniser, grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique, d'autres milieux très différents, du point de vue physicochimique et biologique, riche en principaux nutriment indispensables à leur croissance.

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature, on les rencontre dans les végétaux (ensilage, choucroute, fruit, graines) sur la peau, dans le tractus digestif humain et animal, muqueuse vaginale ou elles accomplissent de nombreuses fonctions. Elles survivent dans un milieu à faible  $A_w$  et résistent à l'éthanol (10-15%) et au  $CO_2$  (Ho, 2008).

Elles ont été également trouvées dans les produits carnés frais et matures, dans les poissons conservés et dans les produits laitiers (Romeo et al., 2001).

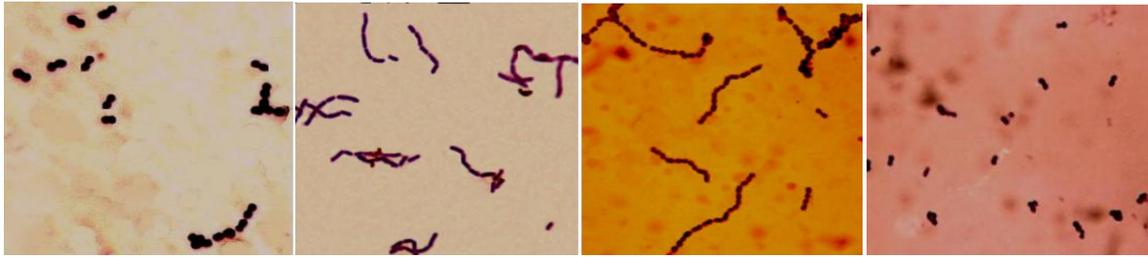
Les bactéries lactiques sont également utilisées dans la transformation des viandes et la production des boissons alcooliques et des légumes fermentés (Carr et al., 2002). Ces aliments incluent les saucisses, les jambons, les vins, les bières et les conserves de légumes acidifiés.

En technologie laitière, leur principale caractéristique est leur capacité à coaguler le lait par la production de quantité importante d'acide lactique.

## 1.3. Caractéristiques

### 1.3.1. Caractères morphologiques

- La forme : des cellules microbiennes représentent souvent un caractère distinctif de l'espace et du genre bactériens (coques ou bâtonnets) (figure 1).



**Figure 1:** différente forme microscopique de bactéries lactiques obtenues au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran par **Saidi, (2005)**. De gauche- droite, Diplocoques (*Leuconostoc sp.*), (*Lactobacillus sp.*), streptocoques et diplocoques (*Lactococcus lactis sp.*).

- Le diamètre cellulaire : est un caractère plus stable que la longueur cellulaire.
- La mobilité : est une caractéristique rare chez les bactéries lactiques qui sont généralement non mobiles, sauf dans certains cas ou elles possèdent des flagelles péritriches.
- La sporulation : toutes les bactéries lactiques sont non sporulées.
- La présence d'inclusions cellulaires, corpuscules métachromatiques ou de volutine, est un caractère distinctif de certaines espèces du genre *Lactobacillus* homofermentaires strict.

### 1.3.2. Caractères physiologiques et biochimiques

Regroupent : La quantité et la configuration de l'acide lactique produit, la température de croissance minimale, optimale et maximale, la tolérance à l'oxygène et au chlorure de sodium, production de gaz et d'arôme, la production d'ammoniaque à partir de l'arginine, la capacité d'hydrolyser l'esculine ou de résister aux sels biliaires et à différentes valeurs de pH (**Luquet et De Roissard., 1994**).

### 1.3.3. Caractères immunologiques

La réaction immunologique se traduit par l'agglutination des cellules bactériennes ou par la précipitation à l'interface antigène-antisérum (**de Roissard et Luquet, 1994**).

La sérologie a été utilisée pour la classification et l'identification des Streptocoques, depuis que (**Lancefield., 1933**), propose les premiers groupements. Les groupes sérologiques comme le cas des streptocoques lactiques qui sont rangés dans le groupe sérologique N.

#### 1.3.4. Caractères structuraux

L'analyse de ces composés cellulaires est en train de devenir un instrument essentiel non seulement pour la classification mais aussi pour l'identification des bactéries ;

Les recherches chimiotaxonomiques réalisées sur les bactéries ont contribué de façon fondamentale à expliquer les relations génétiques intra et inter spécifiques (**Stiles et Holzapfel, 1997**).

#### 1.4. Classification et Taxonomie

Le groupe des bactéries lactiques a été systématique, ensuite plusieurs travaux dans ce domaine ont été repris par (**Orla-Jensen, 1919; collin et al., 1987; collin et al.,1993; Davies et Law, 1984; Gilliland, 1995; Stiles et Hotzapfel, 1997; Sneath et al., 1986; Leveau et Bouix, 1983 et cité dans de Roissard et Luquet, 1994**) dont le classement est complété par la classification moderne qui a permis de distinguer différents genres.

##### 1.4.1. Caractéristiques des principaux genres

###### 1.4.1.1. *Lactobacilles*

Les lactobacilles sont naturellement dans la nature et sont rarement pathogènes. Ce sont dans cellules allongées, régulières en forme de bâtonnets ou coccobacilles isolés ou en chaînettes de taille variable, asprogènes, immobiles ou mobiles grâce à des flagelles péritriches, anaérobies facultatifs. Leurs exigences nutritionnelles complexes et leurs températures de croissance (2 à 53°C) sont très variables d'une espèce à l'autre mais elles sont toutes acidophiles avec un PH optimal de croissance de 5,5 à 6,2. Leur GC% sont de 36 à 47. Leur mode de fermentation est à la base de la subdivision en trois groupes : (**Orla-Jensen, S., 1919**).

**Groupe I : « *Thermobacterium* » :** Forme de lactobacilles homofermentaires stricts qui ne fermentent que les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof en produisant presque exclusivement du lactate. Ce groupe comprend notamment *Lb. acidophilus*, *Lb. Farcilinis*, *Lb.johnsonii*, *Lb. amylovorus*, *Lb.paralimentarius* (Cai et al., 1999), *Lb delbrueckii subsp.delbrueckii*, *Lb. Delbrueckii subsp. Lactis*, *Lb.delbrueckii subsp. Bulgaricus* (Torriani et al., 1999), *Lb. Nantensis* (Valcheva et al., 2006).

**Groupe II : « *Streptobacterium* » :** Renferme les Lactobacilles homo-hétérofermentaires facultatifs qui fermentent les hexoses mais aussi les pentoses en lactate et acétate par la voie D'Embden- Meyerhof. Il s'agit en particulier de *Lb. alimentarius*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. graminis*, *Lb.paracasei*, *Lb paraplantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. sakei* (Stiles et al., 1997). Ces espèces bactériennes sont présentes dans les végétaux fermentés comme l'ensilage et dans les produits carnés et laitiers fermentés.

**Groupe III : « *Betabacterium* » :** Forme de Lactobacilles hétérofermentaires stricts qui fermentent les hexoses en lactate, acétate (ou éthanol) et CO<sub>2</sub>. Les pentoses aussi sont fermentés en lactate et en acétate. Ces Lactobacillus ont un faible pouvoir acidifiant et produisent des substances aromatiques. Il s'agit notamment de *Lb. bervis*, *Lb. burchneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. hilgardii*, *Lb. fructivorans*, *Lb. panis* (Wieses et al., 1996), *Lb. reuteri*, *Lb. hammesii* (Valcheva et al., 2005), *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. spicheri*, *Lb . kimchii* et *Lb. frumenti* (Muller et al., 2000).

#### 1.4.1.2. *Carnobacterium*

Il s'agit d'un genre proche des *Lactobacillus* qui se présente sous forme de bacilles isolés ou en courte chaîne, mobiles ou non. Ils sont catalase négative et nitrate réductase négative ils ont un métabolisme hétérofermentaire et développent à 10°C et non à 45°C. En ce sens, ils sont proches des « *Bétabacterium* » on les trouve essentiellement sur les produits carnés et les poissons. (Guiraud, 1998).

#### 1.4.1.3. *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *S.pyogenes* et *S.agalactiae* ; d'autres sont

impliqués dans la formation de la plaque dentaire (*S.mutans*). L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène. Du fait de ses propriétés technologiques, c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique (Sutra, 1998).

#### 1.4.1.4. *Enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type  $\gamma$  et  $\beta$  et qui appartiennent au groupe **D**. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. Faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C.

#### 1.4.1.5. *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe **N**) représente les streptocoques dits « lactique », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Ils sont mésophiles, mais se développent jusqu'à 10°C. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers. Certaines espèces isolées de poissons et d'eau douce (Walbanks et al., 1990) et qui possèdent la particularité d'être mobiles, ont été répertoriés dans le nouveau genre *Vagococcus* (Sutra, 1998).

Les *Lactocoques* se présentent sous forme de coques et forment des chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique **L**(+), anaérobies facultatives à micro-aérophiles. Leur température de croissance optimale est proche de 30°C. Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6.5% de NaCl, ou lorsque le pH est supérieur à 9.6 (Dellaglio et al., 1994). Le genre *Lactococcus* comporte plusieurs espèces et sous espèces dont les trois types suivants sont utilisés en fabrication fromagère : *Lactococcus lactis ssp. Lactis*, *Lactococcus lactis ssp. Cremoris* et *Lactococcus lactis ssp. Lactis biovar. Diacetylactis*.

#### 1.4.1.6. *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils ressemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique, de CO<sub>2</sub> et d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différentes pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al., 1998; Ho et al., 2007).

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend 14 espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigent au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente.

Le développement des *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les leuconostoc principalement *Ln.mesentrroides ssp. cremoris* et *Ln. Lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO<sub>2</sub>, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hassan et Frank., 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008).

Récemment, l'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été classée dans un nouveau genre, *Oenococcus oeni* et certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesonteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzappel, 1997).

#### 1.4.1.7. *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapables d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces de distinguent par leur capacité à teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les *Pediocoques*

sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (**Guiraud et Rosec., 2004 ; Tosukhowong et al., 2005**).

#### 1.4.1.8. *Bifidobactérium*

Les cellules de *Bifidobactérium* se caractérisent par leur forme très irrégulière, souvent en V, mais pouvant être coccoïde. Elles se différencient des bactéries lactiques par leur caractère anaérobie, leur G+C% élevé, et la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase (**Scardovi, 1986**).

### 1.5. Voies de fermentation

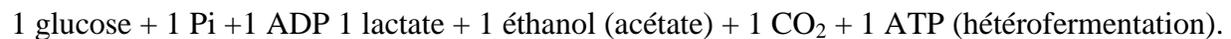
#### 1.5.1. Homofermentation

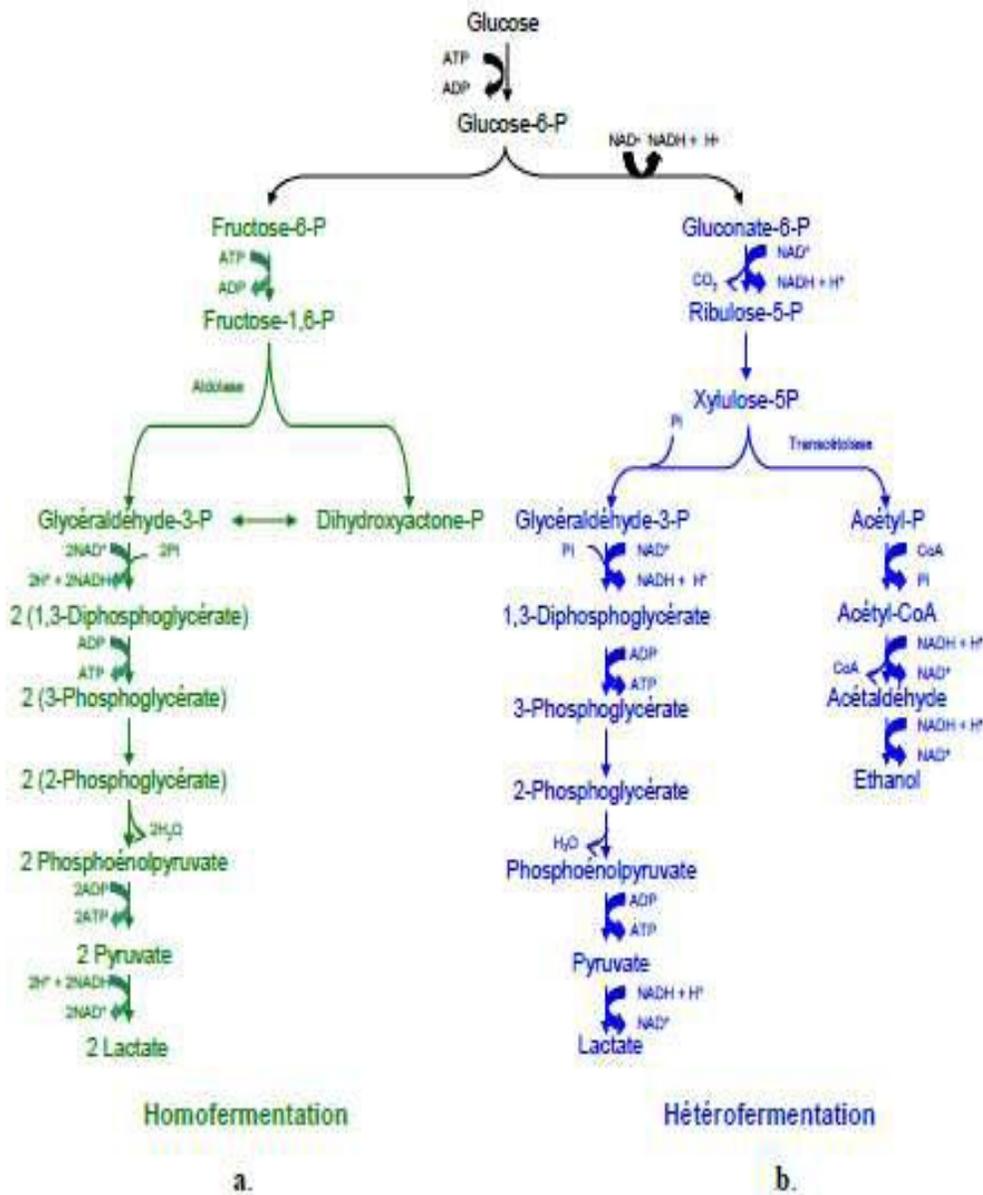
Les bactéries lactiques entrent dans la glycolyse pour dégrader les hexoses (glucose) qui est subi une différente étape de transformation pour donner le pyruvate qui est réduit en acide lactique qui est le produit unique (**figure 2**). Dans les conditions défavorables ces bactéries produisent également l'acide formique l'acide acétique, éthanol et/ou le CO<sub>2</sub> par la voie de fermentation des acides mixtes (**Mazzi et al., 2010**).



#### 1.5.2 Hétérofermentation

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> sont dites hétérofermentaire. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *leuconostoc* et certains *lactobacilles*. Ces micro-organismes sont dépourvus d'une FBA et le système de transport PTS (**Thompson et Gentry-Weeks, 1994**).





**Figure 2 :** Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (Makhloufi, 2011).

## 1.6. Propriétés technologique

La plupart des produits obtenus par fermentation résultent de procédés traditionnels, dont l'objectif initial était la conservation ou la valorisation des matières premières. La participation de la flore lactique aux caractéristiques organoleptiques, technologiques, nutritionnelles et sanitaires de ces produits s'exerce par différentes propriétés métaboliques (Sutra, 1998).

### 1.6.1. Rôle sur la structure et la texture

#### 1.6.1.1. Activité acidifiante

L'activité acidifiant est une des principales fonctions des bactéries lactiques elle peut être caractérisée par :

- Le pH final ou la production d'acide lactique.
- La cinétique d'acidification.
- La post-acidification.

#### 1.6.1.2. Production des polysaccharides

Certaines souches de BL produisent des polysaccharides. Les polysaccharides excrétés par les BL sont appelés exopolysaccharides (EPS). Au moins trois produits utilisent des souches productrices d'EPS : le yogourt, les fromages à teneur réduite en gras et certaines fromage de type mozzarella (Carole, Vignola., 2002).

### 1.6.2. Rôle sur les caractéristiques organoleptiques

#### 1.6.2.1. Production d'aromes

Les BL synthétisent un certain nombre d'arômes, le d'acétyle et l'acétaldéhyde étant considérés comme les plus importants (Carole; Vignola, 2002).

#### 1.6.2.2. Activité protéolytique

La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines. Les bactéries lactiques

démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatiques, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les **lactobacilles** présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les **lactocoques** (Donkor et al., 2008 ; Roudj et al., 2009).

### 1.6.2.3. Activité lipolytique

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les **lactocoques** sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les **Lactobacilles**. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Béal et al., 2008).

### 1.6.3. Rôle sur la conservation

Ce rôle est lié aux propriétés d'inhibition des bactéries lactiques qui s'exercent de différentes manières (Piard et Desmazeaud; 1992).

#### 1.6.3.1. Production des bactériocines

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de (Klaenhammer, 1988). Qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactéries représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988). Toutes les bactériocines produites par des bactéries décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram positive. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram négative n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram négative ne permettant pas que bactériocines d'attendre la membrane interne, siège de leur activité (Dortu ; Thonart, 2008).

#### 1.6.3.2. Production d'acides

Le métabolisme principal des BL a pour effet une production importante d'acide lactique conduisant à une acidification rapide et durable (Sutra, 1998).

### 1.6.3.3. Production d'autres substances inhibitrices

Le peroxyde d'hydrogène ou les dérivés de l'oxygène produit par les BL peuvent exercer un effet inhibiteur sur certaines flores pathogènes (Sutra, 1998).

## 1.7. Bactéries lactiques dans la flore intestinale

In utéro, le fœtus est stérile et en état axénique. La colonisation microbienne commence après la naissance par : la flore de sa mère et de l'environnement. Le mode d'accouchement le type d'allaitement (maternel ou artificiel) et le degré d'exposition à l'environnement hospitalier. Une flore bactérienne dite « Normale », physiologique ou saprophyte s'installe : le **Streptocoque** alpha-hémolytique au niveau de la gorge ; le **Staphylocoque** blanc au niveau de la peau, du rhinopharynx et de l'ombilic. La flore bactérienne digestive est cependant plus complexe, constituée essentiellement de **Bifidobactéries**, de Lactobacilles, d'Entérobactéries (**Colibacilles et Klebsielles**), de Streptocoques et de bactéroïdes. L'installation de cette flore est régulée par des mécanismes permettant la colonisation de certains micro-organismes, aboutissant à un « équilibré écologique » (figure 3):

- Les mécanismes d'adhérence bactérienne aux surfaces par une sorte d'affinité bactérie-cellule épithéliale.

- Les facteurs de croissance dans l'environnement colonisé (pH, nutriments, oxygène..).

La compétition entre les bactéries aboutissant ainsi à l'inhibition de l'une d'elles.

Certains facteurs exogènes influencent la constitution de cette flore en favorisant l'établissement de certaines bactéries. Parmi ces facteurs (Guediche, 1990).

- Le type d'alimentation

- \*Les nouveau-nées nourris au sein présentent une prédominance des **Bifidobactéries** : En présence de lait maternel (riche en lactose), ces **Bifidobactéries** induisent une fermentation lactique, diminuant le pH des selles à 4 qui inhibe la prolifération des Colibacilles.

- \*Les nouveau-nées nourris au lait artificiel ont une flore intestinale contenant moins de **Bifidobactéries** et plus d'*E. coli*, de Bactéroïdes et d'autres anaérobies.

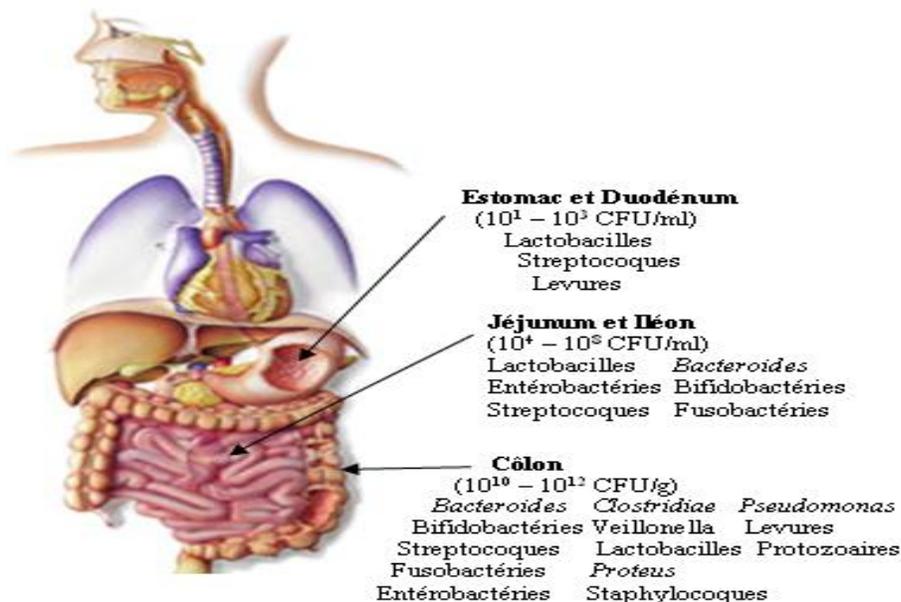
\*L'environnement a une influence indiscutable sur la composition de la flore bactérienne du nouveau-né.

\*A partir de la flore fécale et vaginale maternelle, le nouveau-né sera colonisé par les **Entérobactéries**, les **Streptocoques** et les anaérobies.

\*L'envahissement de la peau à partir du milieu environnant est rapide, se faisant par des micro-organismes à Gram négative, du **Staphylocoque** et des **Corynébactéries**.

\*A l'hôpital, lieu privilégié rencontres des germes les plus divers à hautes concentrations et sélectionnés par les traitements antimicrobiens, le nouveau-né s'expose à une contamination par des germes particulièrement antibiorésistante (*Staphylococcus aureus* et bacilles Gram négatif).

\*L'antibiothérapie : l'utilisation abusive perturbe qualitativement et quantitativement la flore du nouveau-né sélectionnant progressivement des micro-organismes devenus résistants aux antibiotiques (origine de contaminations nosocomiales redoutables). Ils supplantent alors les autres composants de la flore bactérienne.



**Figure 3 :** Colonisation microbienne du tractus gastro-intestinal humain. Adapté de (Holzapfel et al., 1998).

## 1.8. Adhésion des bactéries lactiques chez l'humain

Le système digestif chez l'humain en santé pourrait contenir plus de 200 espèces bactériennes différentes. Le rôle biologique de ces bactéries est important pour la régulation de la transition intestinale, la protection contre les bactéries pathogènes qui se trouvent dans l'intestin, la stimulation de système immunitaire et la production des vitamines. Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité d'adhésion aux cellules épithéliales de l'homme, cette adhésion apparait chez les *Lb. acidophilus* et les Bifidobactéries. Ces souches sont connues pour leur forte capacité d'adhésion à la surface de l'intestin, ceci peut les aider à résister aux conditions défavorables de l'intestin. De l'autre côté, les bactéries lactiques peuvent empêcher l'adhésion de plusieurs bactéries par la sécrétion d'inhibiteurs d'adhérence. Cette capacité se retrouve chez plusieurs bactéries lactiques telle que les *Lactobacillus*, *S. thermophilus* et Bifidobactéries (Matto et al., 2006).

## 2. Effet antagoniste

### 2.1. Phénomènes antibactériens

La fermentation est historiquement utilisée comme un mode de conservation des aliments. Durant la fermentation du lait, différents agents antimicrobiens ayant la capacité d'inhiber le développement de bactéries pathogènes et/ou d'une flore de dégradation de l'aliment sont produits par les bactéries lactiques. Cependant, lorsqu'ils atteignent une certaine concentration, ces composés peuvent interrompre la croissance des souches productrices, il s'agit d'autoinhibition, et/ou des autres souches constituant le levain (Rodger , 2004 ; Deegan et al., 2006 ; Galvez et al., 2007).

Ces interactions négatives faisant intervenir la production de substances inhibitrices sont connues sous le nom d'amensalisme. C'est notamment le cas des acides organiques issus des mécanismes homofermentaire et hétérofermentaire des bactéries lactiques (Rodgers, 2004 ; Deegan et al., 2006 ; Galvez et al., 2007).

L'inhibition peut aussi résulter de la production de peroxyde d'hydrogène car contrairement à d'autres genres bactériens, les bactéries lactiques sont dépourvues de catalase capable de dégrader ce composé toxique. L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène peut

être renforcée par le système lactoperoxydase-thiocyanate présent naturellement dans le lait (**Gilliland, 1985**). Les phénomènes de compétition constituent la deuxième catégorie des interactions négatives fréquemment rencontrées lors de la fermentation du lait par une culture mixte (**Rorgers, 2004 ; Deegan et al., 2006 ; Galvez et al., 2007**). Ont ainsi observé que la croissance d'une souche de lactocoques dans le lait ayant déjà préalablement servi à la préculture de la souche était inférieure à celle réalisée dans du lait frais. Ce phénomène s'explique par l'épuisement de la fraction azotée de faible poids moléculaire durant la préculture (**Juillard et al., 1990**).

## 2.2. Composés antibactériens produits par les Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques produisent divers composés tels que les acides organiques, le diacétyle, le peroxyde d'hydrogène, le CO<sub>2</sub> et/ou les bactériocines pendant les fermentations lactiques (**Zhennai, 2000; Oyetayo et al., 2003 et Deegan et al., 2006**). Les mécanismes antimicrobiens spécifiques des bactéries lactiques exploitées dans la biopréservation des nourritures incluent la production des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, de l'anhydride carbonique, du diacétyle, des antimicrobiens à large spectre tels que la reutéline et la production de bactériocines (**de Vuyst et Vandamme, 1994 b; Stiles, 1996; Ja Cobsen et al., 2003**). Les composés antimicrobiens produits par les BL peuvent empêcher la croissance des bactéries pathogènes; contaminants possibles des produits fermentés (**Gill et Halley, 2003 et Guessas et al., 2006**).

### 2.2.1. Acides organiques

L'acide lactique est le métabolite principal des BL causant la réduction du pH qui inhibe largement de microorganismes (**Eklund, 1989 et Schnurer , et Magnusson., 2005**). La forme non dissociée et plus hydrophobe de l'acide se répand au-dessus de la membrane des cellules et se dissocie à l'intérieur de la cellule, libérant les ions H<sup>+</sup> qui acidifient le cytoplasme (**Piard et Desmazeaud, 1991**). En plus de l'effet du pH, l'acide non dissocié fait chuter le gradient électrochimique de proton, entraînant la bactériolyse et finalement la mort des bactéries sensibles (**Eklund, 1989**). Les BL hétéro fermentaires produisent en plus, de l'acide acétique qui possède un plus haut pKa que l'acide lactique, ont donc une proportion plus élevée d'acide non dissocié à un certain pH semblable avec l'acide lactique. Les acides acétiques et

propioniques agissent l'un sur l'autre sur les membranes de cellules pour neutraliser le gradient électrochimique de proton, mais l'effet de l'acide acétique et propionique dépend souvent de la diminution du pH provoqué par l'acide lactique (Eklund, 1989).

L'acide propionique réduit la croissance fongique, particulièrement à un pH inférieur, et affecte les membranes fongiques aux valeurs de pH en dessous de 4,5. L'acide propionique et acétique empêchent également l'assimilation d'acide aminé (Freese et al., 1973 et Eklund, 1989). L'acide lactique produit pendant la croissance des BL et l'acétate de sodium contenu dans le MRS (De Man et al., 1960), peuvent avoir des effets antifongiques synergiques (Cabo et al., 2002).

La fermentation par les BL est caractérisée par l'accumulation d'acides organiques qui s'accompagne d'une réduction du pH (Gould, 1991 et Podolak et al., 1996). Les niveaux et les types d'acides organiques produits pendant les fermentations dépendent de l'espèce, de la composition du milieu et des conditions de croissance (Lindgren et Dobrogosz, 1990). Le pH bas externe cause l'acidification du cytoplasme des cellules, alors que l'acide non dissocié étant lipophile, peut se répandre passivement à travers la membrane (Kashke, 1987).

### 2.2.2. Acides gras

Dans certaines conditions, quelques lactobacilles et lactocoques possédant des activités lipolytiques peuvent produire des quantités significatives d'acides gras, par exemple dans la fermentation du lait fermenté (Rao et al., 1984) et des saucisses sèches (Sanz et al., 1988). L'activité antimicrobienne des acides gras a été identifiée pendant plusieurs années. Les acides gras insaturés présentent une activité contre les bactéries à Gram+, et l'activité antifongique des acides gras dépend de la composition, de la concentration, et du pH du milieu (Gould, 1991).

### 2.2.3. Peroxyde d'hydrogène

En général, les bactéries lactiques sont capables de transformer l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) en superoxyde excité ( $O_2^-$ ), en peroxyde ( $H_2O_2$ ) ou en eau ( $H_2O$ ). Ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques généralement en présence d'un substrat à oxyder. Ces enzymes ont été trouvées chez des souches de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Condon, 1987). L'effet antimicrobien de  $H_2O_2$  peut résulter de

l'oxydation des groupes sulfhydryliques causant la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes, et de la peroxydation des lipides de membrane; de ce fait provoque l'augmentation de la perméabilité de la membrane (**Kong et Davison., 1980**). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut également agir comme précurseur pour la production de radicaux libres bactéricides tels que le superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et radicaux d'hydroxyle (OH) qui peuvent endommager l'ADN (**Byczkowski et Gessner., 1988**).

#### 2.2.4. Dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>)

Il est principalement produit par les BL hétérofermentaires. Le mécanisme précis de son action antimicrobienne est toujours inconnu. Cependant, le CO<sub>2</sub> peut jouer un rôle antimicrobien en créant un environnement anaérobique, qui empêche les décarboxylations enzymatiques, et l'accumulation de CO<sub>2</sub> dans le milieu peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Eklund., 1984**). Le CO<sub>2</sub> peut aussi empêcher la croissance de beaucoup de microorganismes de détérioration, particulièrement les bactéries psychrotrophes à Gram- (**Farber, 1991 et Hotchkis et al., 1999**). Le degré d'inhibition par le CO<sub>2</sub> varie considérablement selon les espèces. Un taux de CO<sub>2</sub> de 10% pourrait diminuer la population bactérienne de 50% (**Wagner et Moberg., 1989**), et entre 20 et 50%, il a une forte activité antifongique (**Lindgren et Dobrogosz., 1990**).

#### 2.2.5. Diacétyle

Il est produit par des souches de *Lc. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* par la fermentation du citrate (**Lindgren et Dobrogosz., 1990 ; Cogan et Hill., 1993**). Il est responsable des quelques autres produits laitiers fermentés. Les niveaux sensoriels acceptables du diacétyle sont de 2 à 7 µg/ml (**Earnshaw., 1992**). Beaucoup de bactéries lactiques comprenant des souches de *Leuconostoc*, de *Lactococcus*, de *Pediococcus* et de *Lactobacillus* peuvent produire le diacétyle bien que la production soit réprimée par la fermentation des hexoses (**Cogan., 1986**). Son utilisation pratique en tant que conservateur est limitée. Cependant, le diacétyle peut agir synergiquement avec d'autres facteurs antimicrobiens (**Jay., 1992**) et contribuer aux systèmes combinés de conservation en nourritures fermentées.

#### 2.2.6. Acétaldéhyde

Chez *Lb. delbrueckii subsp. Bulgaricus*, l'action d'une thréonine aldolase, clive la thréonine en acétaldéhyde et en glycine. L'acétaldéhyde à une concentration de 10 à 100 ppm empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhimurium* et d'*E. Coli* dans les produits laitiers (Piard et Desmazeaud, 1991). Les quantités d'acétaldéhyde produites par les lactocoques oscillent entre 2,60 et 6,50 mg/ml (Bottazzi et Dellaglio, 1967). La contribution de l'acétaldéhyde à la biopréservation est mineure puisque le seuil de saveur est beaucoup inférieur aux niveaux qui sont considérés nécessaires à l'inhibition de microorganismes (Kulshresth et Marth, 1974).

### 2.2.7. Reutérine

La reutérine est produite par *Lactobacilles reuteri*, une espèce hétérofermentaire dont la niche écologique est l'appareil gastro-intestinal des humains et des animaux (Axelsson et al., 1989).

La reutérine montre un large spectre d'activité antimicrobienne contre certaines bactéries à Gram+ et à Gram-. Les organismes de détérioration sensibles à la reutérine comprennent *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida*, et *Trypanosoma* (Axelsson et al., 1989).

### 2.2.8. Bactériocines

#### 2.2.8.1. Définition et caractéristiques principales

La définition qui était la plus acceptée donnée aux bactériocines est celle de **Klaenhammer** qui les définit en tant que protéines ou complexes de protéines ayant une activité bactéricide contre les espèces étroitement liées à la souche productrice (Dortu et Thonart, 2009 ; Xie et al., 2011). Cependant, des études récentes ont démontré qu'il existe certaines qui sont actives également contre des bactéries à Gram négatif (Mami et al., 2008 ; Gong et al., 2010 ; Naghmouchi et al., 2010). Ces substances protéiques biologiquement actives sont synthétisées au niveau du ribosome et codées par des gènes, leur sécrétion dans le milieu extracellulaire étant conférée par un système de transfert (Gálvez et al., 2007; Riley et Chavan, 2007; Khalil et al., 2009 ; Tabasco et al., 2009 ).

Les bactériocines se différencient par leur poids moléculaire, leurs propriétés biochimiques, leur origine génétique, ainsi que par leur spectre et mode d'action (**Ben Omar et al., 2006 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Ruiz-Barba et al., 2010**).

Les bactériocines des bactéries lactiques sont des protéines ou des complexes de protéines constituées généralement de 30 à 60 acides aminés. Ces substances peuvent être des protéines simples comme elles peuvent être associées à une partie lipidique ou glucidique. Certaines d'entre elles renferment des acides aminés inhabituels tels la lanthionine et la  $\beta$ -méthylelanthionine (**Kotelnikova et Gelfand, 2002 ; Ammor et al., 2006**).

Elles sont généralement petites, cationiques (**excès en résidus lysyl et arginyl**), amphiphiles et thermostables. Leur poids moléculaire est relativement petit (**2-6 kDa**) ce qui leur permet d'accéder aux cellules cibles et perméabiliser la membrane en se liant à des récepteurs de surface (**Moll et al., 1999; Gillor et al., 2008; Anthony et al., 2009; Simova et al., 2009 ; Hartmann et al., 2011 ; Todorov et al., 2011**). Ces substances antagonistes, produites par la plupart des bactéries lactiques, se différencient des antibiotiques du fait qu'elles sont synthétisées au niveau du ribosome et leur spectre d'action est relativement étroit, alors que les antibiotiques sont généralement des métabolites secondaires et possèdent un spectre d'action plus large (**Ghrai et al., 2008**).

#### **2.2.8.2. Propriétés**

Certains critères des bactériocines produites par les bactéries lactiques justifient leur choix comme bioconservateurs (**Gálvez et al., 2007 ; Thakur et Roy, 2009**) :

- Considérées comme 'GRAS' (**Generally Recognized As Safe**).
- inactives et non toxiques contre les cellules eucaryotes ;
- généralement thermostables et tolérantes aux variations du pH ;
- possèdent un spectre d'activité relativement large ;
- mode d'action généralement bactéricide (membrane cytoplasmique) ;
- déterminants génétiques codés par les plasmides ;
- sensibilité aux protéases et digestibilité dans le tractus intestinal.

### 2.2.8.3. Mode d'action des bactériocines

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram-. Cependant, les mécanismes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés

Les antibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II (undecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un précurseur de peptidoglycanes. Suite à cette liaison, les antibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. L'interaction avec le lipide II permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de réduire la concentration du antibiotique nécessaire à la formation des pores, mais peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (Mcauliffe *et al.*, 2001 ; Twomey *et al.*, 2002 ; Bauer *et al.*, 2005 ; Patton *et al.*, 2005).

# Chapitre II

## Matériel et méthode

## Chapitre II : Matériel et méthodes

Ce travail expérimental à pour objectif d'étudier l'effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir des selles d'enfants de 5 à 10 ans. Notre travail à été réalisé au laboratoire de Microbiologie de l'Université de Djilali Bounaama à Khemis-Miliana, ainsi au niveau de laboratoire D'analyses Médicales du docteur ZIBOUCHE au niveau de wilaya d'Ain-Defla, durant la période de Mars 2017 jusqu'à le mois de Mai 2017.

### 1. Matériel

Pour la réalisation des différentes parties expérimentales, on s'est servi du matériel suivant :

#### 1.1. Matériel biologique

- ❖ **Echantillons** : Les échantillons des selles sont utilisés directement afin d'isoler quelques bactéries lactiques y présentes.
  
- ❖ **souches indicatrices pour l'effet antagoniste** : Il s'agit de deux souches indicatrices fournies par le laboratoire D'analyses Médicales de Dr. Zibouche, représentées par les espèces suivantes : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922.

#### 1.2. Milieux de cultures

Plusieurs milieux de cultures ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants :

- **Gélose** : MRS (de Man-Rogosa et Sharp), Mueller-Hinton, gélose au tellurite, gélose semi-solide au lait citraté, gélose blanche, gélose Agar au lait, gélose Tween 80, gélose ordinaire, hypersaccharosée, KMK (Kempler et McKay, 1980).
  
- **Bouillon** : MRS, bouillon nutritif, bouillon hypersalé à 2% et à 4% et à 6,5% de NaCl, bouillon Moeller à arginine, bouillon nitraté, lait écrémé tournesolé, lait de Sherman à 0,1% et à 0,3% de bleu de méthylène, milieu Clarck et Lubs.

### 1.3. Produits chimiques et réactifs

- **Colorants :** Violet de Gentiane, fuschine, teinture de tournesol, bleu de méthylène, phénolphtaléine à 1%.
- **Acide et bases :** l'acide chloridrique (HCl), le chlorure de sodium (NaCl).
- **Réactifs :** Oxydase, Acide sulfanilique et Alpha naphtylamine (NRI et NRII), réactifs de Vogues Proskawar (VPI et VPII), huile de vaseline, poudre de zinc.
- **Alcool et autres :** Ethanol, lugol, eau oxygénée, sulfate de potassium.
- **Sucres:** lactose, xylose, mannose, sorbitol, saccharose, fructose, mannitol, amidon.
- **Disques d'antibiotiques :** Pour étudier le comportement des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques, treize disques ont été utilisés pour réaliser un antibiogramme sur milieu solide, il s'agit de : **Pénicilline(P)**, **Fosfomycine(FO)** 200mcg, **Gentamicine (GEN)** 10µg, **Amikacine(AK)** 30µg, **Céfixime(CFM)**, **Acide Nalidixic(NA)** 30µg, **Amoxicilline(AX)** 25µg, **Céfotaxime(CTX)** 30µg, **Co-trimoxazole(CTO)** 25µg, **Nitroxoline(NIT)** 100mcg, **Ciprofloxacine(CIP)** 5µg, **Cefozoline(CZ)** 30µg, **Amoxicilline+Acide Clavulanic (AMC)** 20µg+10µg .

## 2. Méthodes

### 2.1. Collection des échantillons

La niche écologique utilisée pour l'isolement des bactéries lactiques est les selles d'enfants âgés de 5 à 10 ans. L'étude a été conduite sur 3 échantillons collectés dans la région de Khemis Miliana. Les échantillons des selles d'enfants ont été collectés dans des pots propres et acheminés dans des glacières directement au laboratoire pour être analysés le jour même (tableau 1).

**Tableau 1 :** Présentation des échantillons

	<b>Echantillon 1</b>	<b>Echantillon 2</b>	<b>Echantillon 3</b>
<b>Age</b>	5 ans	7 ans	9 ans
<b>Date de prélèvement</b>	01-03-2017 à 8h :00	01-03-2017 à 8h :00	02-03-2017 à 9h :00
<b>Etat sanitaire</b>	Bonne santé	Bonne santé	Boone santé
<b>Région</b>	Hay el salam	Hay el wiam	Hay el wiam
<b>Sexe</b>	Femelle	Mal	Mal
<b>Aspect des selles</b>	Homogène et jaune verdâtre	Homogène et jaunâtre	Homogène et verdâtre

## 2.2. Isolement et purification des bactéries lactiques

Pour isoler les bactéries lactiques, des dilutions décimales ont été préparées à partir des selles d'enfants comme suit : un gramme de chaque échantillon de selles a été pesé et déposé dans 9 ml d'eau peptonée stérile, c'est la solution mère. Après homogénéisation, 1ml de cette solution mère a été transféré dans 9 ml d'eau peptonée, c'est la dilution  $10^{-1}$ . De la même manière, les dilutions suivantes ont été préparées jusqu'à la dilution  $10^{-7}$ . Un ml de chaque dilution  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  a été ensemencé sur gélose MRS. Et incubées en anaérobiose à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h à 72h.

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS, avec une incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h jusqu'à l'obtention des colonies de même taille, même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches (**Idoui et al., 2009**).

## 2.3. Conservation des bactéries lactiques

La conservation à long terme des isolats purifiés est réalisée dans un milieu contenant 70% de lait écrémé (enrichi par 0,05% d'extrait de levure et 0,05% de glucose) et 30% de glycérol et stockés à une température de  $-20^{\circ}\text{C}$  (**Samelis et al., 1994**).

## 2.4. Identification

Généralement, il existe plusieurs critères pour identifier les bactéries lactiques au niveau phénotypique: la forme des cellules bactériennes, la température de la croissance, la fermentation des sucres, les activités physiologiques et biochimiques, la production des exopolysaccharides (**Wood et Holzappel, 1995**).

L'identification des souches a été réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Toutes les techniques d'identification ont été décrites par **Larpent (1997)** ; **Idoui et Karam (2008)** ; **Gusils et al., (2010)**.

### 2.4.1. Examen macroscopique

Cet examen est basé sur l'observation à l'œil nu des colonies des isolats et déterminer la forme, la couleur, la morphologie des colonies.

### 2.4.2. Examen microscopique

L'observation microscopique au grossissement ( $G \times 100$ ) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (**Joffin et Leyral, 1996**).

**La Coloration de Gram :** Nécessaire à l'observation microscopique car elle nous oriente suite aux forme observées vers les démarches à suivre pour les autres tests. Cette étape sert à colorer les bactéries Gram<sup>-</sup> en rose et les Gram<sup>+</sup> en violet.

### 2.4.3. Tests physiologiques et biochimiques

#### 2.4.3.1. Test de la catalase

La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée, sa présence est mise en évidence en déposant, à l'aide d'une pipette Pasteur, quelques gouttes d'eau oxygénée à 10% sur une colonie isolée (**Guiraud et al., 2003**). La décomposition de l'eau oxygénée se traduit par un dégagement de bulles de gaz selon la réaction suivantes :



#### 2.4.3.2. Test d'oxydase

L'activité oxydase a été déterminée selon le protocole décrit par (**Kovacs et al., 1995**). Une colonie pure prise de chaque milieu gélosé est mise sur papier Wattman imprégné de réactif oxydase (N, N, N, N' N'-tétraméthyl-1,4-phénylènediamine). Les bactéries produisant l'enzyme oxydase oxydent ce réactif pour former un composé violet, l'indophénol ; la suspension devient alors violette après 20 à 60 secondes et la couleur persiste pendant 15 minutes.

#### 2.4.3.3. Recherche du nitrate réductase

Cette enzyme est capable de catalyser la réaction de réduction de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ). A une culture en milieux nitraté ensemencé et incubé à 37°C, on rajoute le réactif nitrate I (acide sulfanilique), puis le réactif nitrate II ( $\alpha$ -naphtylamine). La coloration en rouge indique que le nitrate est dégradé par la bactérie.

Si il y'a une absence de coloration on ajoute la poudre de zinc, après environ 5 minutes, l'absence de coloration la bactérie a nitrate positive, la bactérie réduit les nitrites jusqu'à stade

azote gazeux et la coloration en rouge ou rose indique que la bactérie ne possède pas le nitrate réductase (Larpent, 1997).

#### 2.4.3.4. Croissance à différentes températures

Elle a été testée par ensemencement d'une culture jeune de 24h dans le bouillon MRS. Les tubes étaient incubés à 10°C et à 45°C pendant 24h. Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles aussi, pour différencier les lactobacilles des carnobactéries qui sont incapables de croître à 45°C (Carr et al., 2002 ; Badis et al., 2003).

**Lecture :** Le développement des souches est apprécié après 24h par comparaison avec un tube de milieu non ensemencé, incubé à la même température (apparition visuelle de la turbidité) (Guiraud, 2003 ; Bjorkroth et al., 1998).

#### 2.4.3.5. Test mannitol-mobilité

Selon Guiraud, (2003), la mobilité des bactéries repose sur l'ensemencement de la souche par piqure centrale d'un milieu semi-solide. L'incubation est réalisée durant 24h à 37°C. La gélose semi solide mannitol mobilité permet de vérifier la mobilité des souches.

**Lecture :**

- Souche mobile : envahissement du milieu.
- Souche immobile : pas d'envahissement de milieu.

#### 2.4.3.6. Croissance dans des conditions hostiles

##### a. Croissance en présence de différentes concentrations NaCl (2%, 4%, 6,5%)

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les cultures à tester ont été ensemencées sur des bouillons hypersalés à 2%, 4% et à 6,5% de NaCl. Après une incubation à 37°C pendant 24h. L'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble (Idoui et Karam, 2008).

**b. Croissance à différentes pH**

La croissance est étudiée sur le bouillon MRS : ajuster le pH à 4,5 à l'aide d'une solution de HCl (ou à l'aide d'une solution de soude 1N pour le pH 8), puis ensemencer les souches et incuber à 37°C pendant 24h . L'apparition trouble indique la croissance.

**c. Thermo-résistance**

C'est un critère de classification qui permet d'étudier la résistance à certain traitement thermique. Pour chaque souche, ensemencer un tube de milieux MRS et incuber à 65°C pendant 30 min. Refroidir ensuite sous l'eau de robinet, et ré-incuber 24h à 30°C.

**Lecture :** L'apparition d'un trouble indique une thermo-résistance (**Guiraud, 2003**).

**d. Résistance au tellurite**

La tolérance au tellurite a été recherchée par ensemencement, en stries serrées, la gélose à 0,4% de tellurite de potassium par les souches lactiques à tester. Après une période de 24h d'incubation à 37°C, les souches résistants donnent des colonies noires (**Idoui et Karam ; 2008**).

**e. Culture sur lait de Sherman**

Ce test indique l'apparition des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène qui est bleu en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit. Chaque culture à tester a été ensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0,1% et à 0,3%. Le bleu de méthylène capte et fixe les molécules d'hydrogène transportées par la chaîne respiratoire bactérienne en présence de la réductase bactérienne ; il vire alors le bleu à l'incolore. La décoloration du bleu de méthylène est d'autant plus rapide que le nombre de bactérie est élevé (**Delarras, 2007**).

**Lecture :** Après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h, en notes les observations à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait.

**2.4.3.7. Recherche de type fermentaire**

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé. Il consiste à mettre en évidence la formation de gaz (CO<sub>2</sub>). Chaque souche jeune de 18 à 48h était cultivée dans le bouillon MRS modifié (sans citrate d'ammonium et l'extrait de

viande) additionné de glucose et muni d'une cloche de Durham. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h à 7 jours.

**Lecture :** la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (**Harrigan et Mc Cane, 1976 ; Garvie, 1984 ; Schillinger et Lucke, 1987**).

#### 2.4.3.8. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

Pour chaque souche, on ensemence un tube de bouillon Moeller avec arginine et un tube témoin (bouillon Moeller sans arginine). Les deux tubes sont recouverts avec 4 à 5 mm de paraffine stérile. L'incubation se fait à 37°C pendant au moins 4 jours. La culture dans le milieu de base se manifeste par un virage au jaune du au métabolisme du glucose. Les souches qui possèdent l'ADH (Arginine dihydrolase) vont acidifier le milieu en fermentent le glucose (virage au jaune). Cette acidification favorise l'activité de l'arginine dihydrolase qui va dégrader l'arginine et libérer l'ammoniac ce qui entraîne une alcalisation du milieu qui se manifeste par un virage de l'indicateur de pH au violet (**Moeller, 1995 ; Gelman et al., 2000**).

#### 2.4.3.9. Fermentation des sucres

Il s'agit d'apprécier l'aptitude des souches à métaboliser divers composés carbonés, en particulier des sucres. Dans ce cas, le milieu de base utilisé est le bouillon MRS (sans glucose et sans extrait de viande) additionné de 40 mg/l pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH (MRS-BCP) (**Mannu et al., 2000**). Ce test a été réalisé sur les sucres suivant : lactose, mannose, maltose, fructose, saccharose, xylose, sorbitol, mannitol, amidon.

**Lecture :** Après 24h d'incubation, le développement de la culture et le virage de l'indicateur coloré au jaune traduit la fermentation du sucre testé.

#### 2.4.3.10. Recherche de la réductase

Le milieu est préparé à partir du lait écrémé stérile préparé lui-même à raison de 12% additionné de teinture du tournesol jusqu'à l'obtention d'une couleur violette, le pH est ajusté à 7,3. L'ensemencement est effectué à partir d'une culture dense de la souche étudiée. Suivie d'une incubation à 37°C pendant 3 à 5 jours (**Idoui et Karam ; 2008**). Ce milieu permet d'observer plusieurs types de réaction :

- Une décoloration de l'indicateur traduit une réduction (R).
- Une coagulation de lait (activité protéolytique) (C).
- Attaque du lactose avec acidification (A).

#### 2.4.3.11. Production d'acétoïne

Le milieu Clarck et Lubs est ensemencé et incubé à 37 ° C pendant deux jours. Après l'incubation on ajoute 0,5 ml d'une solution alcoolique d'alpha-naphtol à 6% dans l'alcool à 90° (VP1) et 0,5 ml d'une solution de soude à 16% dans l'eau distillée (VP2). Les tubes sont soigneusement agités et chauffés avec précaution sur la flamme d'un bec bunsen jusqu'à commencement de l'ébullition. Après agitation pendant 30 secondes sur un agitateur vibreur de type vortex, une coloration rouge cerise franche indique une réaction de VP positive (**King, 1984**).

#### 2.4.3.12. Hydrolyse de la gélatine

Elle est étudiée par ensemencement des souches bactériennes isolées, sur un milieu gélatiné en culot (**Guiraud, 1998**). Prendre les tubes de gélatine solidification (en culot), ayant séjournés préalablement dans de l'eau froide, les ensemencer par piqure centrale dans le culot avec les souches bactériennes à étudier. Incuber les tubes à 37°C pendant 48h puis les placer pendant une heure environ à 4°C.

**Lecture :** Observation après passage au froid.

-**Milieu liquide :** gélatine hydrolysée : **Gélatine<sup>+</sup>**

-**Milieu solide :** gélatine non hydrolysée : **Gélatine<sup>-</sup>**

#### 2.4.3.13. Production de CO<sub>2</sub> à partir du citrate

Une série de tubes de lait écrémé stérile (10%) est préparée. on ajoute 0.5 ml d'une solution de citrate de sodium (10%) dans chaque tube. Après agitation, on laisse reposer 30 minutes. Chaque tube est inoculé par 1 ml d'une culture jeune et additionné de 4 ml d'une gélose blanche fondue et refroidie. Après mélange et solidification on incube à 37°C pendant aux moins 3 jours. La production de gaz se traduit par la fragmentation de la gélose dans le tube (**Kempler et Mc Kay, 1980**).

#### 2.4.3.14. Utilisation du citrate

Elle est testée par culture sur milieu gélosé incliné de KMK (**Kempler et Mc Kay, 1980**). Le citrate est la seule source de carbone : son utilisation se traduit par une alcalinisation du milieu. L'ensemencement se fait par stries à partir d'un milieu solide et incubé durant 24h à 37°C (**Guiraud, 1998**).

**Lecture :** La dégradation de citrate se traduit par un virage du milieu du vert au bleu.

### 2.5. Etude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées :

#### 2.5.1. Pouvoir protéolytique

Pour déterminer l'activité protéolytique des bactéries lactiques, la gélose MRS additionnée de lait écrémé à 10 % a été coulé, solidifiée et séchée puis des disques **de papier Wattman** stérile ont été déposés en surface de la gélose. Chaque disque reçoit un volume de 20µl d'une culture jaune. Après une incubation à 37°C pendant 24h, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des disques (**Veullemard, 1986**).

#### 2.5.2. Pouvoir lipolytique

- **Recherche des lipases :** Les lipases ont été recherchées selon la méthode de **Leuschner et al., (1997)**. Un milieu gélosé au tween 80 est coulé en boîte de pétri et ensemencé par touches. Après une incubation à 37°C pendant deux jours, l'activité se traduit par un halo opaque autour des colonies.
- **Recherche de lécithinase :** La lécithinase est une enzyme qui hydrolyse la lécithine. Cette dernière est détectée par une technique qui consiste à enrichir une gélose ordinaire par l'incorporation d'un jaune d'œuf, le milieu est présenté en boîte de pétri ensemencées par touches ou faire une strie centrale à la surface du milieu, incubé à 37°C pendant 24h ou plus. Des Opacifications autour de la colonie indiquent la présence de l'enzyme (**Guiraud, 2003**).

#### 2.5.3. Pouvoir texturant

Les souches à tester ont été ensemencées en stries sur gélose hypersaccharosée (MSE) déjà coulée et solidifiée. Après incubation à 37°C pendant 24h, la production des

exopolysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies large et gluantes (Leveau *et al.*, 1991).

## 2.6. Résistance aux antibiotiques

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide a été appliquée, chaque souche bactérienne a été ensemencé par inondation (1ml) de la surface de la gélose Mueller-Hinton déjà coulée et solidifiée, les boîtes en été laissées sécher à température de laboratoire. Chaque boîte reçoit six (13) disques d'antibiotiques à savoir : **Pénicilline(P)**, **Fosfomycine(FO)** 200µg, **Gentamicine(GEN)** 10µg, **Amikacine(AK)** 30µg, **Céfixime (CFM)**, **Acide Nalidixic(NA)** 30µg, **Amoxicilline(AX)** 25µg, **Céfotaxime(CTX)** 30µg, **Cotrimoxazole(CTO)** 25µg, **Nitroxoline(NIT)** 100mcg, **Ciprofloxacine(CIP)** 5µg, **Cefozoline(CZ)** 30µg, **Amoxicilline+Acide Clavulanic(AMC)** 20µg+10µg.

Après incubation à 37°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (Leroy *et al.*, 2007).

## 2.7. Activité antibactérienne (Test de l'antagonisme)

Ce test consiste à étudier l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des souches indicatrices. Il s'agit de deux souches : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; *Escherichia coli* ATCC 25922.

La méthode des disques décrite par (Tedesse *et al.*, 2004) a été appliquée : elle consiste à inonder en surface le milieu Mueller-Hinton par la souche indicatrice ( $DO_{660}$  varie entre 0,08 et 0,1). Après incubation pendant 30 min à 37°C, des disques stériles (de 9 mm de diamètre) ont été déposés à la surface de la gélose. Chaque disque reçoit 50µl d'une culture lactique jeune. Une fois les boîtes sont séchées à température ambiante, elles sont incubées à 4°C pendant 4h, par la suite incubées à 37°C pendant 24h. L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques.

### 2.7.1. Effet de surnageant

Un volume du milieu Mueller-Hinton agar est coulé dans des boîtes de pétri stériles. Après solidification du milieu, les boîtes sont ensemencées en surface par la souche pathogène puis les disques stériles sont remplis par 60 à 80µl de surnageant filtré et neutralisé, obtenue après

centrifugation à 4 000 tours pendant 15 min d'une culture de la souche lactique (**Labioui, H et al., 2005**). Les disques sont ensuite déposés sur le milieu de culture, la diffusion des agents antimicrobiens dans le milieu gélosé est améliorée par une incubation des boîtes à 37°C pendant 24h. L'activité antimicrobienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques (**Achemchem et Abrini, 2005**).

Les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des disques seront mesurés, le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 2 mm (**Tabak, S, 2007**). La mesure du diamètre d'inhibition  $Z_i$  est effectuée selon la formule suivante :

$$Z_i \text{ (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre de puits 9 (mm)}$$

### 2.7.2. Confirmation de la présence des bactériocines

Les bactéries lactiques peuvent produire des substances inhibitrices. Pour s'assurer de la présence de ces dernières, nous avons pris une culture jeune de 18h de chaque souche qui a été cultivée ensuite dans 50 ml de bouillon MRS et incubée à 37°C pendant 18h. Après l'incubation, les tubes ont été centrifugés à 4 000 tours pendant 15 min afin de récupérer le surnageant. Pour éliminer l'effet des acides organiques notamment des acides lactiques et acétiques, le surnageant a été neutralisé (pH=7) par l'ajout d'une solution de NaOH à 0,1 N en présence d'une goutte d'une solution méthanoïque de phénophtaléine à 1% utilisée comme indicateur coloré et dépourvue de catalase (**Labioui et al., 2005**).

Un tube de prés culture de la souche indicatrice est ensemencée dans le bouillon nutritive et incubée à 37°C pendant 18h a été préparée avant. La mesure de la croissance bactérienne de la souche pathogène est réalisée par la mesure de la densité optique toutes les deux heures.

Après la 6<sup>ème</sup> heure, 1 ml du surnageant neutralisé est ajouté dans le tube et on détermine la mesure de la densité optique jusqu'à 12 heure. Ainsi, la courbe  $DO = f(t)$  peut être tracée.

# Chapitre III

## Résultats et discussions

## Chapitre III : Résultats et Discussion

### 1. Isolement et purification des bactéries lactiques

Dans cette étude, pour isoler les BL le milieu MRS a été utilisé comme milieu sélectif. Le pH final du milieu MRS préparé est de pH = 6.2

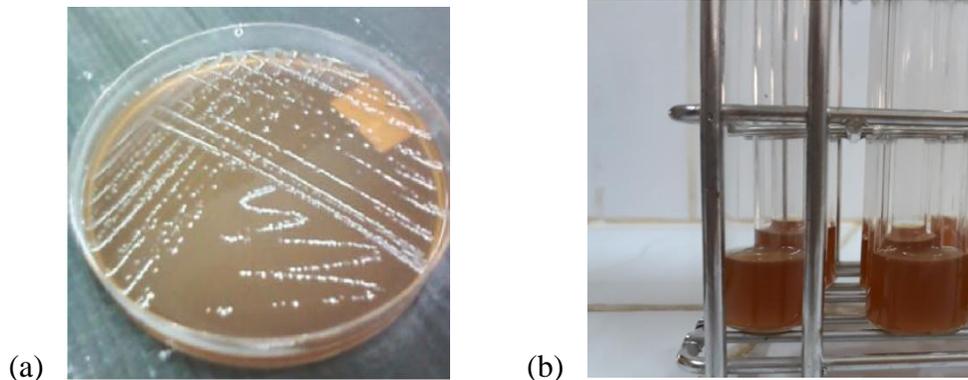
Les trois échantillons des selles sont dilués à  $10^{-7}$ , les trois dilutions  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  sont ensemencées par stries sur la gélose MRS.

Après les différentes étapes d'isolement et de purification, nous avons obtenus 40 isolats.

### 2. Identification des bactéries lactiques isolées

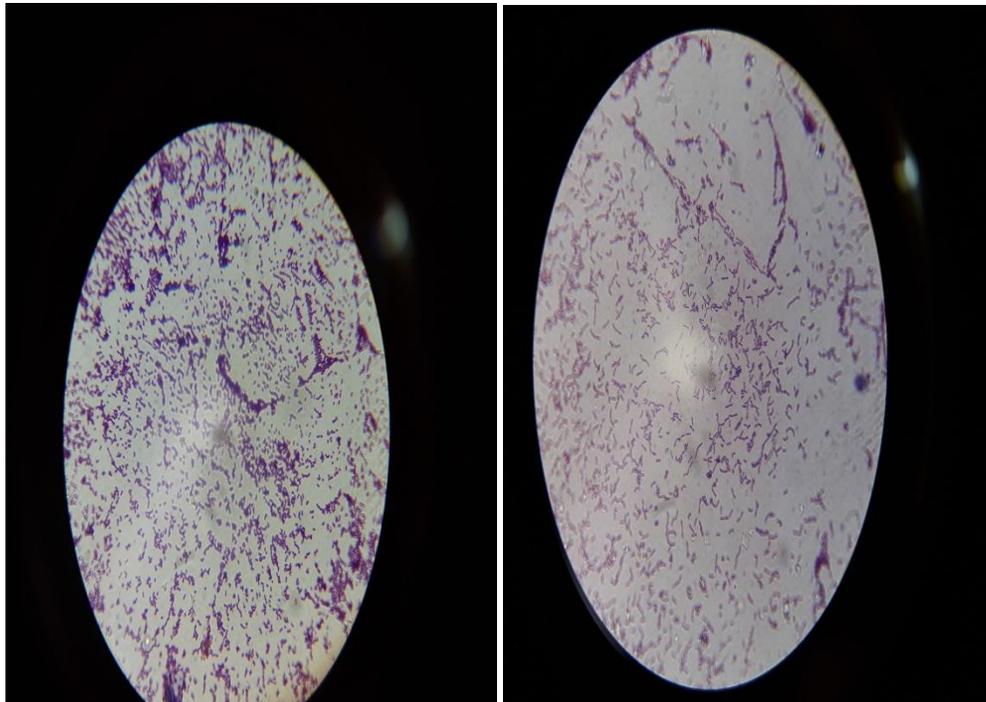
#### 2.1. Aspect microscopique et macroscopique

Un total de quarante bactéries ont été isolées et purifiées sur milieu MRS gélose, les isolats sont apparus de taille variable, de forme circulaire et de couleur blanchâtre. Sur bouillon, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques (Guiraud, 2003). (figure 04).



**Figure 4 :** Aspect des isolats ensemencés sur gélose et bouillon MRS après 24h d'incubation à 37°C.

Après la coloration de Gram, l'observation microscopique a révélé deux formes de cellules (Coque et Bacille) Gram positif, et la taille des cellules étaient généralement très petites (figure 05). Ces cellules étaient souvent disposées en courtes ou longues chainettes, ou tétrades, cependant des structures isolées et des diplocoques étaient également observés.



(a) Coque Gram+

(b) Bacille Gram+

**Figure 05 :** Observation microscopiques des isolats après une Coloration de Gram ( $G\times 100$ ).

Le tableau 02 résume les différentes observations microscopiques et macroscopiques des isolats.

Tableau 02 : Aspect microscopique et macroscopique des souches isolées.

Bactérie	Coloration Gram	de	Forme	Regroupement	Aspect macroscopique
E1 B1	+		Coque	Amas	Petite taille blanchâtre
E1 B2	+		Coque	Chainettes	
E1 B3	+		Coque	Chainettes	
E2 B1	+		Coque	Chainettes	
E2 B2	+		Bacille	Amas	
E2 B3	+		Coque	Chainettes	
E2 B4	+		Coque	Chainettes	
E2 B5	+		Coque	Chainettes	
E2 B6	+		Coque	Chainettes	
E2 B7	+		Coque	Paires	
E2 B8	+		Coque	Chainettes	
E2 B9	+		Coque	Chainettes	
E2 B10	+		Coque	Paires	
E2 B11	+		Coque	Chainettes	
E2 B12	+		Coque	Paires	
E2 B13	+		Coque	chainettes	
E2 B14	+		Coque	Paires	
E2 B15	+		Coque	Chainettes	
E2 B16	+		Coque	Chainettes	
E2 B17	+		Coque	Paires	
E2 B18	+		Coque	Amas	
E2 B19	+		Coque	Paires	
E3 B1	+		Coque	Chainettes	
E3 B2	+		Coque	Chainettes	
E3 B3	+		Coque	Chainettes	
E3 B4	+		Coque	Amas	
E3 B5	+		Coque	Chainettes	
E3 B6	+		Coque	Amas	
E3 B7	+		Coque	Diplocoque	
E3 B8	+		Coque	Diplocoque	
E3 B9	+		Coque	Amas	
E3 B10	+		Coque	Diplocoque	
E3 B11	+		Bacille	Chainettes	
E3 B12	+		Coque	Paires	
E3 B13	+		Coque	Paires	
E3 B14	+		Coque	Chainettes	
E3 B15	+		Coque	Chainettes	
E3 B16	+		Coque	Amas	
E3 B17	+		Coque	Chainettes	
E3 B18	+		Coque	Chainettes	

E : Echantillon

## 2.2. Caractères physiologiques et biochimiques

Les caractéristiques communes aux bactéries lactiques sont : catalase négative, oxydase négative, immobiles, asporulées et ne réduisent pas les nitrates en nitrites (**Guiraud, 2003**).

### 2.2.1. Test de catalase

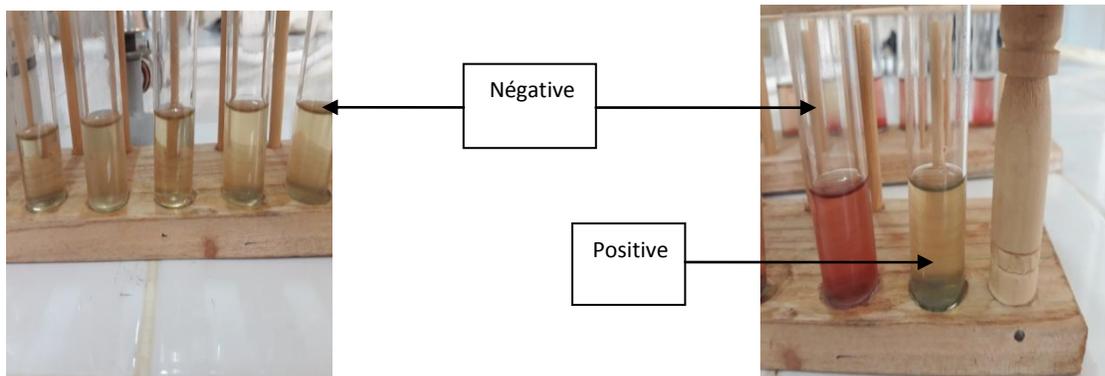
La recherche de la catalase constitue une étape importante dans l'identification des bactéries lactiques, le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y'a production de l'enzyme catalase et que le test est positif (**Bourgeois et Larpent, 1996**). Pour toutes les colonies testées le test catalase est négatif.

### 2.2.2 Test d'oxydase

Ce test était négatif pour toutes les colonies testées, les disques d'oxydase sont restés incolores (pas de coloration violette) (**Gunter et al., 1998**)

### 2.2.3. Recherche du nitrate réductase

Après l'incubation, les isolats n'utilisent pas les nitrates comme accepteur final de la respiration à la place de l'oxygène qui conduisent à la formation de nitrites, donc elles ne sont pas capables de dégrader le nitrate, parmi les isolats quatre présentent une activité nitrate réductase (**E1 B1, E3 B2, E3 B4, E3 B6**), (figure 06). Alors, ces isolats sont écartés.



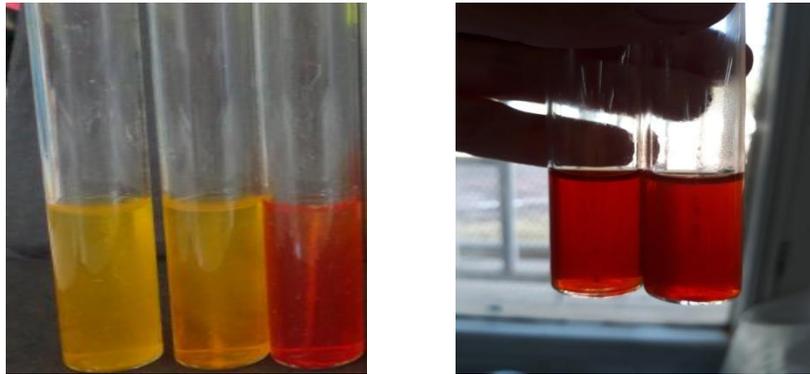
**Figure 06** : Résultats de nitrate réductase après incubation 24h à 37°C.

#### 2.2.4. Croissance à différentes températures et thermoresistance

Tous les isolats ont la capacité de croître à 10°C et 37°C. Sauf (**E3 B5, E3 B7, E3 B11, E3 B15, E3 B17, E3 B18**) qui ne peuvent pas se développer à 45°C. tous les isolats résistent au traitement thermique à 65°C pendant 60 min.

#### 2.2.5. Test manitol de mobilité

Toutes les bactéries isolées ont été développées sur tout au long de la pique sans envahissement du milieu, généralement elles sont immobiles (figure 07). Le virage de la coloration du rouge vers le jaune est dû à la fermentation du mannitol par les bactéries (**E2 B3, E2 B11, E2 B12, E2 B13, E3 B10, E3 B11, E3 B12, E3 B13**).

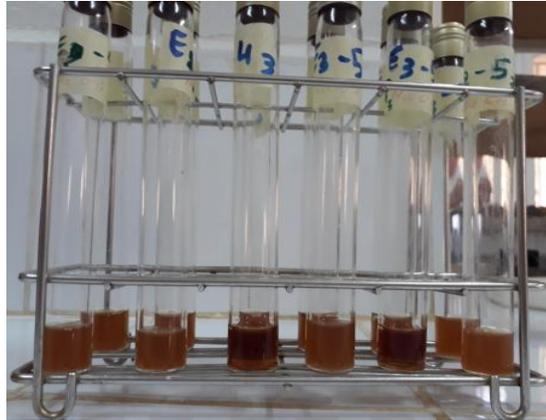


**Figure 07** : Résultat de manitol mobilité après incubation 24h à 37°C.

#### 2.2.6. Croissance dans des conditions hostiles

##### 2.2.6.1. Croissance en présence de NaCl

Toutes les souches isolées peuvent se développer en milieu contenant des concentrations de 2% de NaCl, par ailleurs les bactéries (**E2 B4, E2 B5, E2 B10, E3 B3, E3 B5, E3 B7, E3 B8, E3 B10 et E3 B11**) ne poussent pas à 6.5% de NaCl (figure 08).



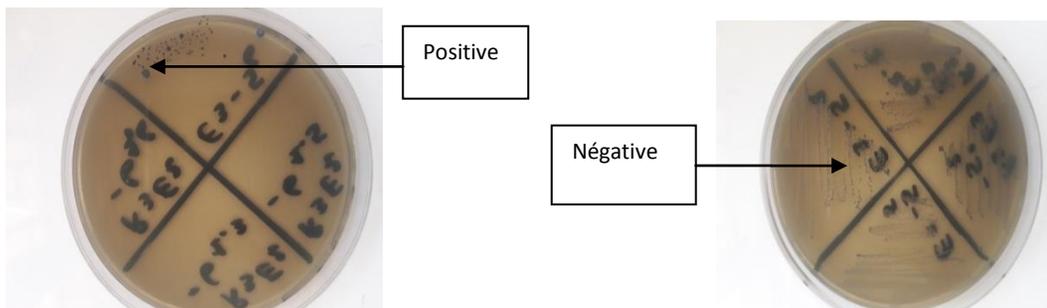
**Figure 08 :** Résultats de la croissance en présence de NaCl après incubation 24h à 37°C.

### 2.2.6.2. Croissance à différents pH

Toutes les isolats sont capables de se développer à pH 9.6 sauf (**E3 B3**), par ailleurs, les bactéries ne peuvent pas survivre au pH 4.5 sauf (**E2 B2, E2 B15 et E3 B13**).

### 2.2.6.3. Résistance au tellurite

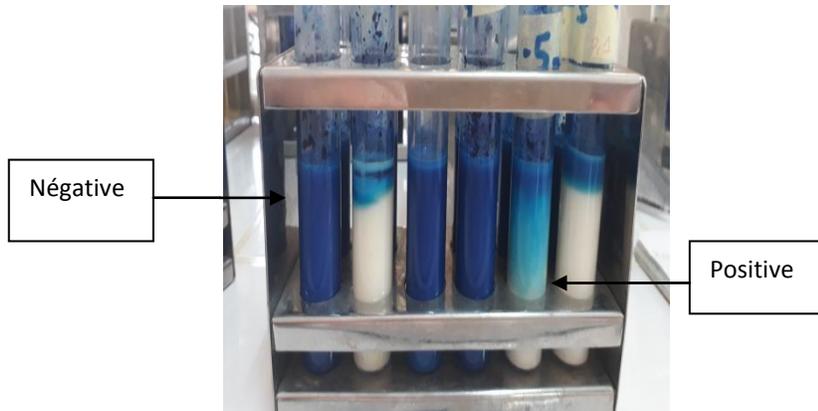
La majorité des isolats présentent des colonies noires sur la gélose au tellurite de potassium, sauf (**E3 B5, E3 B7, E3 B15, E3 B17, E3 B18**). (figure 09).



**Figure 09 :** Résultats de résistance au tellurite après incubation 24h à 37°C.

#### 2.2.6.4. Culture sur lait de Sherman

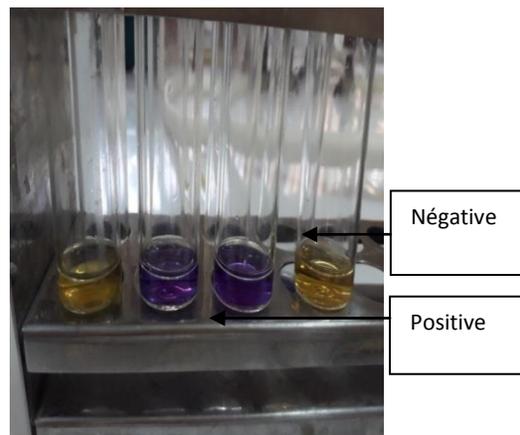
La coagulation du lait et remarquée chez certains isolats étudiés. Mêmes résultats ont été remarqués pour la réduction de bleu de méthylène. Cette dernière (à 0.1%) a été enregistrée chez (**E1 B3, E2 B18, E3 B1, E3 B3, E3 B5, E3 B7, E3 B9, E3 B10, E3 B11, E3 B12**). Par ailleurs celle de (0.3%) a été enregistrée que chez (**E1 B2, E3 B5, E3 B10, E3 B11**) (figure 10).



**Figure 10** : Résultats de lait de scharman après incubation 24h à 37°C.

#### 2.2.6.5. Test de l'ADH

Ce test est réalisé sur milieu Moeller, les résultats positifs se traduisent par une couleur violette qui signifie la présence de dihydrolase et de décarboxylase. Tous les isolats sont ADH positifs sauf (**E2 B4, E2 B5 et E3 B5**). (figure 11).



**Figure 11** : Résultats de l'ADH après incubation 24h à 37°C.

### 2.2.6.6. Type fermentaire

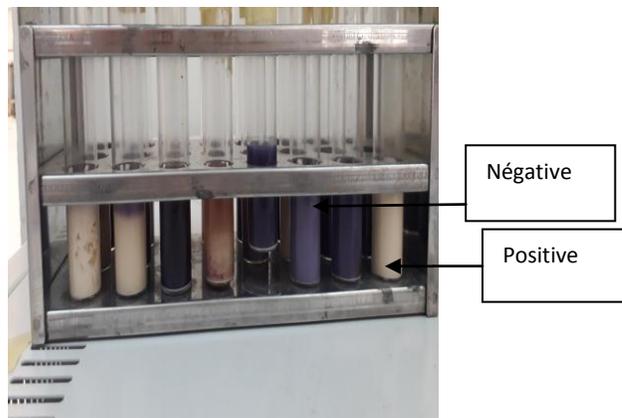
D'après les résultats obtenus la majorité des isolats ont un caractère Homofermentaire sauf (E3 B5, E3 B7, E3 B11, E3 B15, E3 B17, E3 B18) (figure 12).



**Figure 12 :** Résultat de type fermentaire après incubation 24h a 37°C.

### 2.2.6.7. Culture au lait tournosolé

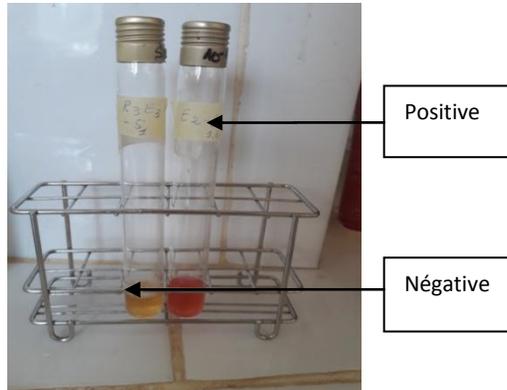
Une coagulation a été enregistrée chez toutes les isolats et une décoloration et réduisent la teinture de tournosol chez les bactéries (figure 13).



**Figure 13 :** Résultats de lait ternosolé après incubation 5j a 37°C.

### 2.2.6.8. Production d'acétone

Toutes les bactéries produisent de l'acétone sauf (**E3 B7, E3 B9, E3 B10, E3 B15, E3 B17**). elles sont caractérisé au début par la présence des troubles dans le milieu et ensuite par la formation d'un anneau rouge sur la surface du milieu après l'ajout des deux réactifs VP1 et VP2 (figure 14).



**Figure 14** : Résultats d'acétone après incubation 24h à 37°C.

Tableau 03: Résultats des caractères physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques.

Souches	Catalase	Oxydase	Nitrate réductase	Type fermentaire	pH		T°		NaCl			ADH	VP	Tellurite	Lait de Scharman		Lait Tournesolé
					4.5	9.6	10	45	2%	4%	6.5%				0.1 %	0.3 %	
E1 B2	-	-	-	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	ACR
E1 B3	-	-	-	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	ACR
E2 B1	-	-	-	Homo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	AC
E2 B2	-	-	-	Homo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	ACR
E2 B3	-	-	-	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	ACR
E2 B4	-	-	-	Homo	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	AC
E2 B5	-	-	-	Homo	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	AC
E2 B6	-	-	-	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	ACR
E2 B7	-	-	-	Homo	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	AC
E2 B8	-	-	-	Homo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	ACR
E2 B9	-	-	-	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	AC
E2 B10	-	-	-	Homo	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	AC
E2 B11	-	-	-	Homo	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	AC
E2 B12	-	-	-	Homo	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	ACR
E2 B13	-	-	-	Homo	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	ACR
E2 B14	-	-	-	Homo	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	ACR
E2 B15	-	-	-	Homo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	ACR
E2 B16	-	-	-	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	AC
E2 B17	-	-	-	Homo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	AC
E2 B18	-	-	-	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	ACR
E2 B19	-	-	-	Homo	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	ACR
E3 B1	-	-	-	Homo	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	AC
E3 B3	-	-	-	Homo	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	ACR
E3 B5	-	-	-	Hété	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	ACR
E3 B7	-	-	-	Hété	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	ACR
E3 B8	-	-	-	Homo	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	ACR
E3 B9	-	-	-	Homo	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	ACR
E3 B10	-	-	-	Homo	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	AC
E3 B11	-	-	-	Hété	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	ACR
E3 B12	-	-	-	Homo	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	AC
E3 B13	-	-	-	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	ACR
E3 B14	-	-	-	Homo	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	ACR
E3 B15	-	-	-	Hété	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	ACR
E3 B16	-	-	-	Homo	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	AC
E3 B17	-	-	-	Hété	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	ACR
E3 B18	-	-	-	Hété	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	AC

Hété : hétérofermentaire / Homo : homofermentaire / + : test positif / - : test négatif.

ACR : Acidification, Coagulation, Reduction / AC : Acidification, Coagulation.

### 3.2.6.9. Gélatinase

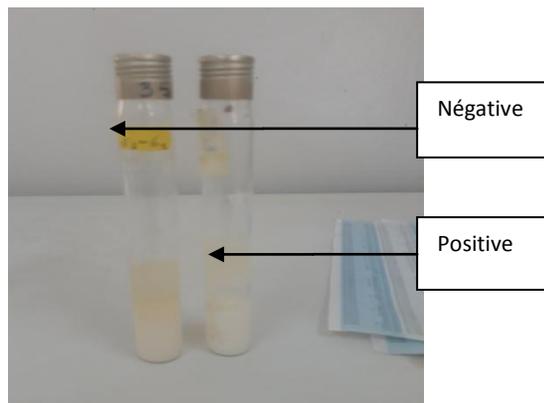
L'hydrolyse de la gélatine se traduit par une liquéfaction de ce produit associée à un développement de trouble comparé à un témoin, ainsi nous avons pu constater que toutes les souches isolées n'hydrolysent pas la gélatine (figure 15).



**Figure 15 :** Résultat de gélatinase après incubation 24h a 37°C.

### 3.2.6.10. Recherche de la citratase

La décomposition du citrate se manifeste par la production du gaz dans la masse du milieu (**Idoui et Karam, 2008**). L'utilisation du citrate apparait chez les souches (**E3 B5, E3 B7, E3 B15, E3 B17, E3 B18**) par la production du gaz, par contre les autres bactéries ne possèdent pas de citratase (figure 16).



**Figure 16:** Résultats de l'utilisation de citrate après incubation 24h à 37°C.

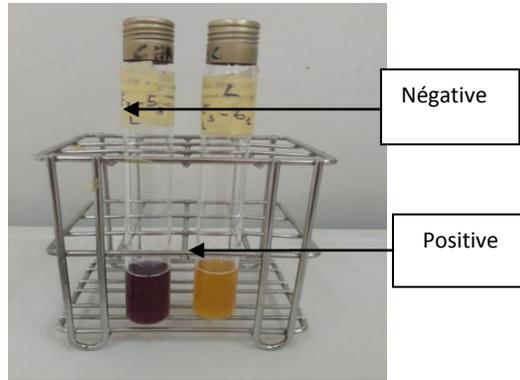
## 3.2.6.11. Profil fermentaire

Le virage de l'indicateur coloré au jaune dû à l'acidification du milieu, traduit la fermentation du sucre (**Guiraud, 1998**). Les différentes fermentations des sucres son illustrées dans la figure17 et résumées dans le tableau 04.

**Tableau 04** : Profil fermentaire des sucres.

Isolats	Mann	Sac	Malt	Xyl	Mani	Lac	Sor	Fru	Amid
E1 B2	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E1 B3	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E2 B1	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E2 B2	+	+	+	+	-	+	+	+	-
E2 B3	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E2 B4	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E2 B5	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E2 B6	+	+	+	+	-	+	+	+	-
E2 B7	+	+	+	+	-	+	-	+	-
E2 B8	+	+	+	+	-	+	-	+	-
E2 B9	+	+	+	+	-	+	+	+	-
E2 B10	+	+	+	+	-	+	-	+	-
E2 B11	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E2 B12	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E2 B13	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E2 B14	+	+	+	-	-	+	+	+	-
E2 B15	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E2 B16	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E2 B17	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E2 B18	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E2 B19	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E3 B1	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E3 B3	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E3 B5	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E3 B7	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E3 B8	+	+	+	+	-	+	-	+	-
E3 B9	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E3 B10	+	+	+	-	+	+	-	+	-
E3 B11	+	+	+	-	+	-	+	+	-
E3 B12	+	+	+	-	+	+	-	+	-
E3 B13	+	+	+	-	+	+	-	+	-
E3 B14	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E3 B15	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E3 B16	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E3 B17	+	+	+	-	-	+	-	+	-
E3 B18	+	+	+	-	-	+	-	+	-

**Glu** : Glucose, **Lac** : Lactose, **Xyl** : Xylose, **Fru** : Fructose, **Man** : Mannitol, **Mal** : Maltose, **Sor** : Sorbitol, **Ami** : Amidon, **Mann** : Mannose



**Figure 17 :** Exemple de Résultats de fermentation des sucres après incubation 24h à 37°C

D'après les résultats de l'identification obtenus, et suite de la comparaison avec la littérature (Guiraud, 1998, 2003). Les bactéries étudiées possèdent des caractères communs aux bactéries lactiques et sont apparentées aux :

- E2 B4, E2 B5, E3 B5 : *Streptococcus sp*
- E2 B2 : *Lactobacillus fermentum*
- E3 B8 : *Pediococcus acidolactici*
- E3 B7, E3 B10 : *Pediococcus Pentosaccus*
- E3 B11 : *Lactobacillus Plantarum*
- E3 B14, E3 B7, E3 B15, E3 B17, E3 B18, E3 B13, E3 B9: *Leconostoc lactis*
- E2 B7, E2 B10, E2 B11, E2 B12, E2 B13, E2 B14, E2 B15, E2 B19, E3 B8: *Enterococcus sp*
- E3 B1, E3 B3, E2 B16, E2 B18, E2 B9, E2 B6, E2 B3, E1 B2, E1 B3 : *Lactococcus sp.*

Nous pouvons noter que les souches des bactéries lactiques isolées des selles d'enfant les plus abondantes sont représentées par *Lactococcus sp* à un pourcentage de 32% suivi par *Enterococcus sp*, 24% *Leuconostoc sp*, 22% les *Pediococcus sp*, *Streptococcus sp* 8% et *Lactobacillus sp* à un faible pourcentage 6% (figure 18).

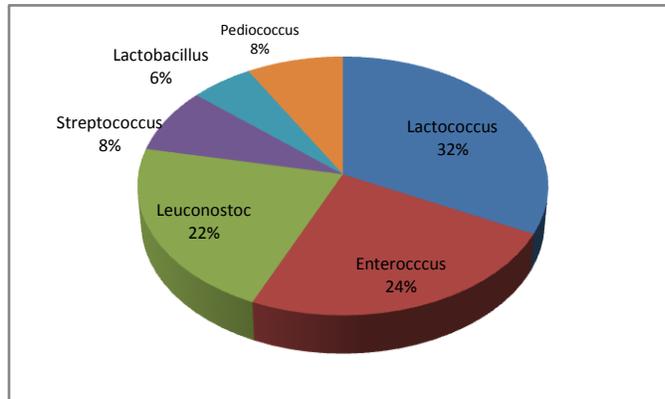


Figure 18 : Répartition des souches lactiques isolées.

### 3. Caractères technologiques

#### 3.1. Pouvoir protéolytique

Les bactéries utilisent les protéines du lait principalement la caséine comme leur source primordial d'acides aminés essentiels (Blanc *et al.*, 2002). Cette activité qui est d'abord nécessaire au métabolisme azoté de bactéries lactiques intervenant sur les caractéristiques des produits laitiers fermentés (Desmazeaud., 1996).

Les résultats obtenus sur gélose au lait montrent que les bactéries (E3 B5, E3 B7, E3 B11, E3 B15, E3 B17, E2 B2) possèdent une activité protéolytique remarquable (figure 19).

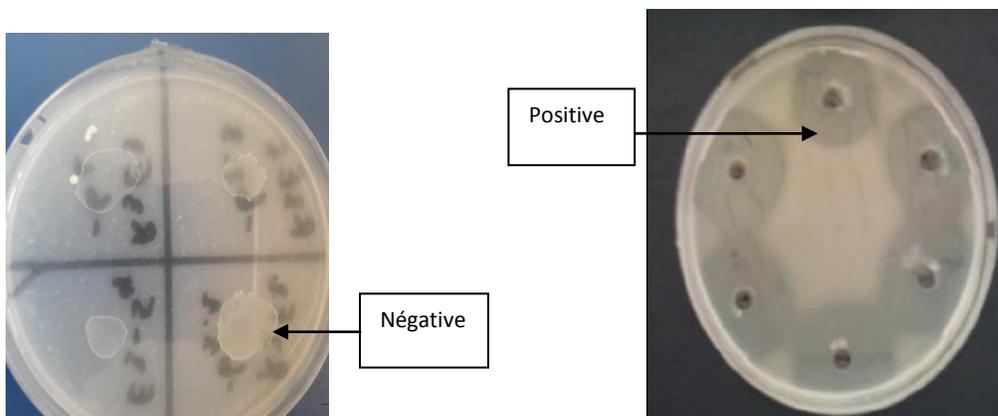
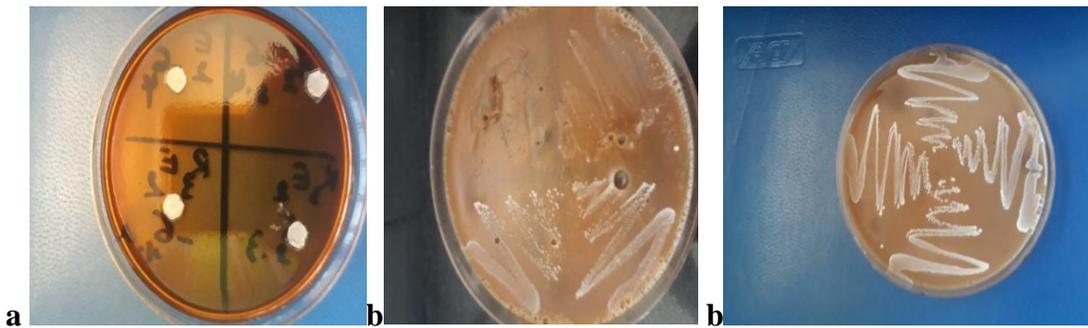


Figure 19 : Résultats de l'activité protéolytique après incubation 24h à 37°C

### 3.2. Activité lipasique

Selon (St-Gelais et Collet., 2002) les bactéries lactiques ont une faible activité lipolytique et agissent plus facilement sur une matière grasse déjà partiellement hydrolysées. L'activité lipasique consiste à la recherche des lipases et de lécithinase qui se traduisent par l'apparition d'une zone claire autour des colonies. Les résultats obtenues ont permis de conclure que nos bactéries ne sont pas lipolytiques. Contrairement, elles possèdent une lécithinase sauf (**E3 B5, E3 B7, E3 B11, E3 B15, E3 B17, E3 B18**) (figure 20).



**Figure 20:** Activité lipasique (a) et lécithinasique (b) après incubation 24h à 37°C.

### 3.3. Production des EPS

La production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition des colonies larges et gluantes sur gélose hypersaccharosé (Leveau et al., 1991). La majorité des bactéries ont été positives via ce test sauf (**E3 B5, E3 B7, E3 B11, E3 B15, E3 B17, E3 B18**). (figure 21).



**Figure 21:** Résultats des colonies larges sur gélose hypersaccharosé  
Après incubation 24h à 37°C

Tableau 05 : Résultats des caractères technologiques des bactéries lactiques.

Caractère	Gélatinase	Activité lipasique		Protéolytique	Citratase	Dextrane
Souches		Lps	Lctn			
E1 B2	-	-	+	-	-	+
E1 B3	-	-	+	-	-	+
E2 B1	-	-	+	-	-	+
E2 B2	-	-	+	-	-	+
E2 B3	-	-	+	-	-	+
E2 B4	-	-	+	-	-	+
E2 B5	-	-	+	-	-	+
E2 B6	-	-	+	-	-	+
E2 B7	-	-	+	-	-	+
E2 B8	-	-	+	-	-	+
E2 B9	-	-	+	-	-	+
E2 B10	-	-	+	-	-	+
E2 B11	-	-	+	-	-	+
E2 B12	-	-	+	-	-	+
E2 B13	-	-	+	-	-	+
E2 B14	-	-	+	-	-	+
E2 B15	-	-	+	-	-	+
E2 B16	-	-	+	-	-	+
E2 B17	-	-	+	-	-	+
E2 B18	-	-	+	-	-	+
E2 B19	-	-	+	-	-	+
E3 B1	-	-	+	-	-	+
E3 B3	-	-	+	-	-	+
E3 B5	-	-	-	+	+	-
E3 B7	-	-	-	+	+	-
E3 B8	-	-	+	-	-	+
E3 B9	-	-	+	-	-	+
E3 B10	-	-	+	-	-	+
E3 B11	-	-	-	+	+	-
E3 B12	-	-	+	-	-	+
E3 B13	-	-	+	-	-	+
E3 B14	-	-	+	-	-	+
E3 B15	-	-	-	+	+	-
E3 B16	-	-	+	-	-	+
E3 B17	-	-	-	+	+	-
E3 B18	-	-	-	+	+	-

Lps : lipase.

Lctn : lécithinase.

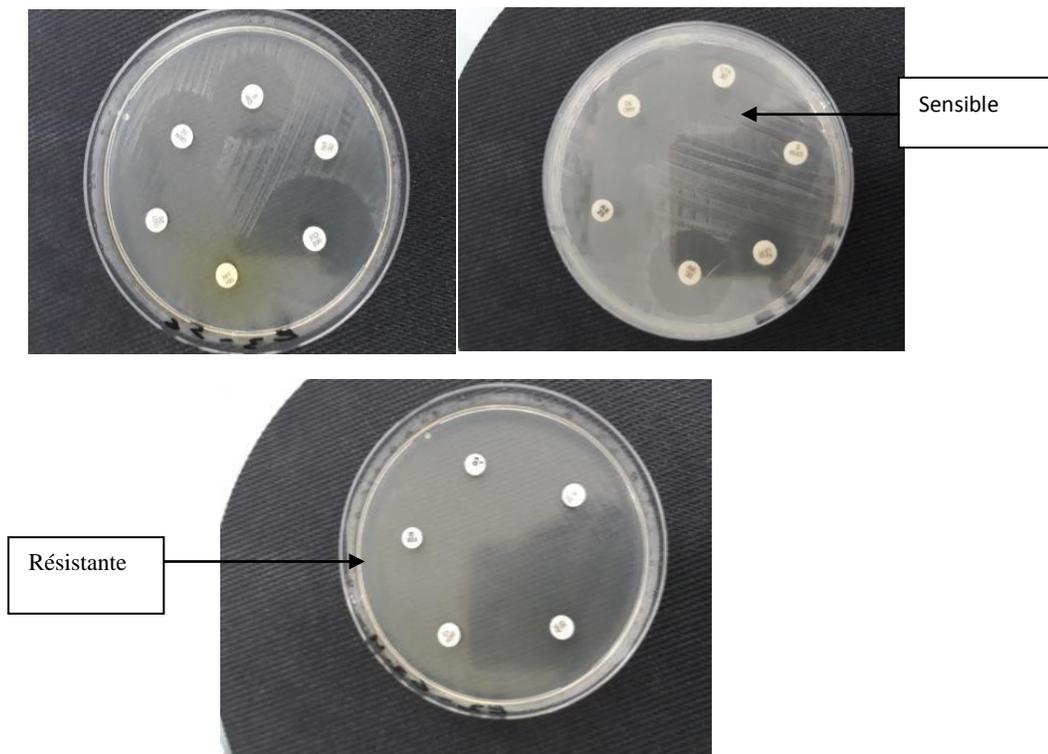
Looijesteijn et al., (2001) ont rapporté qu'au sein d'une même espèce de bactéries lactiques, les résultats peuvent être différents. La production des EPS par les bactéries

lactiques est un phénomène favorable à de nombreux processus industriels alimentaires (Walling et al., 2001). Le principal intérêt de l'utilisation de bactéries lactiques productrices d'EPS dans les ferments lactiques lors de la production de laits fermentés est l'amélioration de la texture et la diminution de la synérèse. Il a été montré que Les EPS produits par *St. salivarius* et *St. mutans* sont impliqués dans la colonisation bactérienne et la formation de plaque dentaire (Cerning, 1990).

#### 4. Résistance aux antibiotiques

La sensibilité des souches vers les antibiotiques est détectée par formation des zones d'inhibition de la croissance de bactérie en présence de différents antibiotiques.

D'après les résultats obtenus de l'antibiogramme, la majorité des bactéries sont résistantes (figure 22) (tableau 06).



**Figure 22 :** Résultats de test de la résistance aux antibiotiques après incubation 24h à 37°C.

**Tableau 6** : résultats de test de résistance aux antibiotiques.

Souche	CIP	GEN	COT	NIT	FO	NA	AMC	CTX	CFM	CZ	AK	AX	P
E1 B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E1 B3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2 B19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E3 B1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E3 B3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E3 B5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E3 B7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E3 B8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E3 B9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E3 B10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E3 B11	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R
E3 B12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E3 B13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E3 B14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E3 B15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E3 B16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E3 B17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E3 B18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

**GEN** : Gentamicine, **CIP** : Ciprofloxacine, **P** : Penicilline, **CTX** : Céfotaxime, **FO**: Fosfomycine, **AK** : Amikacine, **CZ** : Cefozoline, **CFM** : Céfixime, **AMC** : Amoxicillin + Acide Clavulanic, **CTO** : Cotrimoxazole, **NA** : Acide Nalidixic, **AX** : Amoxicilline, **NIT** : Nitroxoline.

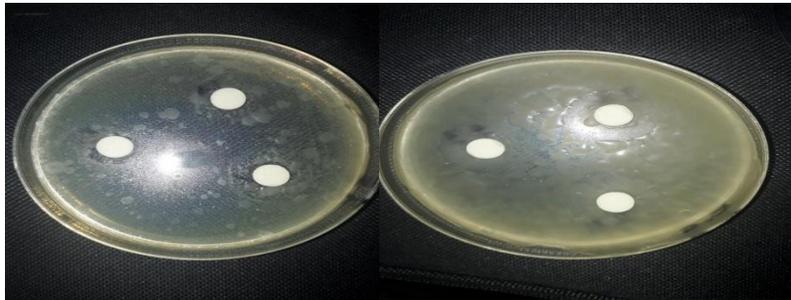
## 5. Activité antibactérienne

### 5.1. Détection de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques

Ce test permet de mettre en évidence les caractéristiques qui possèdent certaines souches de bactéries lactiques à simuler ou inhiber d'autres souches une fois mises en contact. Les résultats relatifs à ce test sont présentés dans le tableau 7 et illustrés dans la figure 23.

D'après ces résultats, les souches *Lb. fermentum* E2 B2, *Lb. plantarum* E3 B11, *Ln. lactis* E3 B7, *St. Sp* E2 B4, *Lc. Sp* E1 B2 présentent une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée, sur les deux bactéries pathogènes avec des diamètres des zones d'inhibition de 7 à 14 mm.

Les souches *Lb. fermentum* E2 B2, *Lb. plantarum* E3 B11, *Ln. lactis* E3 B4, *St. Sp* E2 B4, *Lc. Sp* E1 B2 présentent une activité inhibitrice vis-à-vis *E coli* ATCC 25922 avec un diamètre d'inhibition de 07 à 14 mm. Les souches *Lb. fermentum* E2 B2, *St. Sp* E2 B4, *Ln. Lactis* E3 B7 présentent une nette inhibition vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, par ailleurs les deux souches *Lc. Sp* E1 B2, *Lb. plantarum* E3 B11, ont une activité antibactérienne avec des diamètres d'inhibition de 11 mm.



**Figure 23** : Résultats d'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolés vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Tableau 7** : Activité antibactérienne (mm).

	<b>E1 B2 (mm)</b>	<b>E2B2 (mm)</b>	<b>E3B11 (mm)</b>	<b>E2 B4 (mm)</b>	<b>E3 B7 (mm)</b>
<b><i>S.aureus</i> ATCC 25923</b>	11	00	11	11	00
<b><i>E. coli</i> ATCC 25922</b>	09	13	07	14	08

Ces résultats indiquent que nos bactéries sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne. La majorité des souches sont actives sur les bactéries à Gram positif mais pas tous sur les bactéries à Gram négative. **Onda et al., (2003)** Suggèrent que les bactéries Gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques. Par ailleurs, les bactéries lactiques sont connues par la production d'une multitude de composés antimicrobiens: les acides organiques, les bactériocines, le diacétyl, et le peroxyde d'hydrogène (**Aslam et Qazi., 2010**).

## 5.2. Effet de surnageant

Les résultats du tableau 8 illustrent la résistance et la sensibilité des souches testées (*E coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) aux composants des surnageant des souches pures. Nous avons constaté que l'activité antibactérienne des surnageant des souches pures n'était pas semblable envers les deux souches cibles. En effet, les diamètres des zones d'inhibitions étaient compris entre 7 et 17mm.

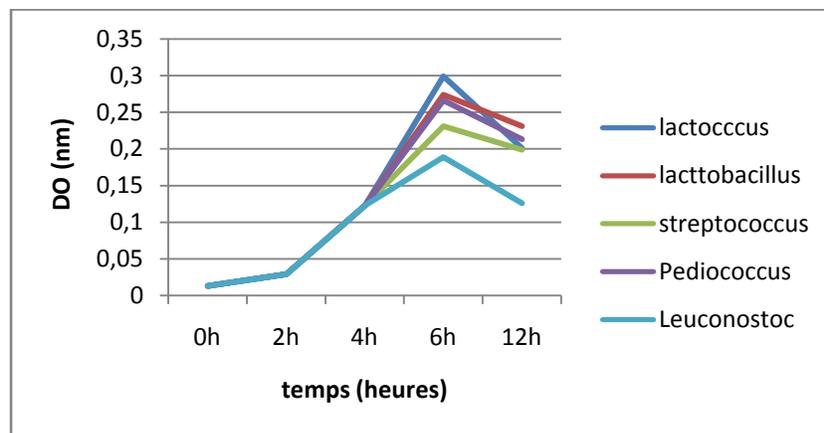
La fraction extracellulaire correspondant au surnageant présente un fort pouvoir antibactérien, ce qui confirme la production d'agent antimicrobien par les souches lactiques dans le milieu. Plusieurs études ont montré que la fraction extracellulaire contient des substances responsables de cette interaction (**Metlef et Bouras, 2009**).

**Tableau 8 :** Effet des surnageants.

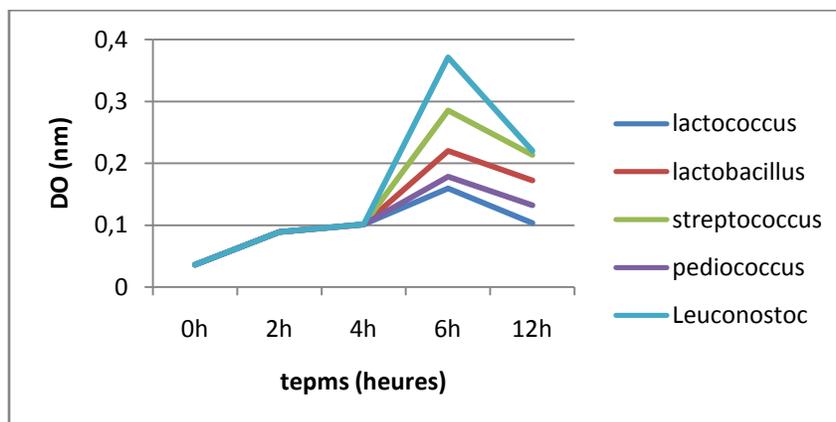
	E1 B2 (mm)	E2B2 (mm)	E3B11 (mm)	E2 B4 (mm)	E3 B7 (mm)
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	12	00	11	11	00
<i>E coli</i> ATCC 25922	10	14	07	17	09

### 5.3. Confirmation de la présence des bactériocines

Après élimination de l'effet des acides organiques, les surnageants neutres ont été testés pour leur l'activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries pathogènes. Et après une incubation à 37°C pendant 20 heures, la croissance bactérienne est suivie par la mesure de la densité optique. Nous avons calculé la croissance bactérienne à l'aide des valeurs de la densité optique afin de connaître l'existence de bactériocine et son effet sur la croissance des souches indicatrice. Les résultats sont traduits par une courbe qui montre une décroissance des bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *E coli*). Ces résultats s'expliquent par la présence de bactériocines produite par les souches bactérienne pures. (figure 24 et 25).



**Figure 24:** Variation de DO de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Vis-à-vis le surnagent des bactéries lactiques testées en fonction du temps.



**Figure 25:** Variation de DO de *E coli* ATCC 25922 Vis-à-vis le surnagent des bactéries testées en fonction du temps.

L'apparition de l'activité antibactérienne, après élimination de l'effet de l'acide lactique, confirme l'existence des autres substances antibactériennes telles que les bactériocines. L'intervention du peroxyde d'hydrogène dans les phénomènes d'inhibition par les bactéries lactiques a été établie. Lorsqu'il est libéré à des concentrations suffisantes, il peut provoquer l'auto inhibition ou inhiber d'autres contaminants de leur environnement (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

Conclusion

## Conclusion

---

### Conclusion

Cette étude nous a permis d'avoir une idée sur la composition de la flore microbienne en bactéries lactiques isolées des selles d'enfants sains. Les selles montrent une diversité d'espèces qui dépend de type de nutrition.

Au cours de notre travail et dans le but d'isoler, identifier et de mettre en valeur l'activité antibactériennes des bactéries lactiques, les résultats obtenus montrent que la charge de la flore mésophile totale est très élevée dans les trois échantillons de selles.

Selon les tests biochimiques classiques, d'identification des bactéries, réalisés et à l'aide des tests physiologiques, nos souches isolées peuvent être probablement apparentées aux cinq espèces : *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus sp*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaccus*, *Leuconostoc lactis*, *Lactococcus sp*, *Enterococcus sp*.

Les bactéries lactiques sont principalement sélectionnées par leur pouvoir protéolytique, aromatisant et épaississant dans le cadre technologique, d'autres propriétés doivent être étudiées dans le cadre probiotiques comme l'inhibition de la prolifération de micro-organismes par la production de composés inhibiteurs tels que les bactériocines.

Le test des interactions entre les cinq souches lactiques isolées (*Lb. fermentum* E2 B2, *Lb. plantarum* E3 B11, *Ln. lactis* E3 B7, *St. sp* E2 B4, *Lc. sp* E1 B2) présente des zones d'inhibition bien distinctes avec un diamètre de 07 à 14 mm vis-à-vis *E coli* ATCC25922.

Les trois souches (*Lb. fermentum* E2 B2, *St. sp* E2 B4, *Ln. lactis* E3 B7) présentent une nette inhibition vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC25923, par ailleurs les deux autres souches (*Lc. sp* E1 B2, *Lb. plantarum* E3 B11) ont une activité antibactérienne avec des diamètres d'inhibition de 11 mm.

D'après les tests de confirmation nos bactéries capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne et qui peuvent être sont des bactériocines ou bien le peroxyde d'hydrogène.

## Conclusion

---

Notre étude ouvre les axes de recherche suivants :

- Pousser l'identification des souches isolées par le biais de la biologie moléculaire ;
- Pousser l'étude des caractères technologiques par des méthodes plus sophistiquées, par exemple la nature des enzymes métaboliques notamment celles de la protéolyse ;
- Suivre l'étude de l'effet antagoniste avec d'autres microorganismes, et étudier la nature des substances inhibitrices.

# Références Bibilgraphique

**Adams, M.R. et Hall, C.J., (1988).** Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and aceticacids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23: 287-292.

**Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I., (2000).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1 Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* 17, 454–461.

**Aslam. A et Qazi. H., (2010).** Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Specificity of Binding and Structure pp: 87: 219-225.

**Anderssen, E.L., Dip B.D., NES I.F., Eijsik V.G.H. et Nissen-Meryer J., (1998).** Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2269-2272.

**Andersson, R., (1986).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of gram-negativebacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. *Int. J.Food Microbiol.* 3:149-160.

**Anthony, Martin Peter L. Bartlett., (2009).** Neural Network Learning: *Theoretical Foundations.* 2009: 22-297.

**Aguirre, M. and Collins, M.D., (1993)** Lactic acid bactéria and human clinical infection *J Appl bacterial*, 75: 95-107.

**Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J. et Lildgren, S.E., (1989).** Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri.*, *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 2:131-136.

**Berry, E.D., Liewen, M.B., Mandigo, R.M. et Hutkins, R.W., (1995).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during manufacture of fermented semi-dry sausage. *J. Food Protect.* 53: 194-197.

**Bekhouche, F., Boulahrouf, A. (2005).** Etude quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d'élevage de Constantine. *Science & technologie*. Vol. 23, pp. 38-45.

**Blanc., (2002).** Les protéines du lait à activité enzymatique et hormonale. *Lait*.62 : 350 -395.

**Bourgeois, C.M. et Larpent, J.P., (1996).** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 432-704.

**Bourgeois C.M. Larpant J.P., (1996).** **Microbiologie alimentaire Tome 2**  
Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Pp : 523-524.

**Bottazzi, V. et Dellaglio, F., (1967).** Acetaldehyde and diacétyle production by *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococci. *J. Dairy Res.* 34: 109-113.

**Byczkowski J. et Gessner T., (1988).** Biological role of superoxide ion radical. *Int. J. Biochem.*20: 569-580.

**Carr, F.J., Chill D. et Maida, N., (2002).** The Lactic Acid Bacteria A Literature Survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, 28: 4, 281-370.

**Cabo, M.L., Braber, A.F. et Koenraad P., (2002).** Apparent antifungal activity of several lactic Acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the Medium. *J. Food Prot.*65: 1309-1316.

**Cars, F. J. Chill, D et Maida, N., (2002).** The lactic acid bacteria: literature survey critical reviews in microbiology. 33.370-313.

**Cerning, J., (1990).** Exocellular polysaccharide produced by lactic acid bacteria. *Microbiol. Rev.* 87:113-130.

**Cintas, L.M., Herranz, C., Hernandez, P.E., Casaus, M.P., NES, I.F. et Hernandez , P.E., (2001).** Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 7: 4, 281-305.

**Cogan, T.M. et Hill, C., (1993).** Cheese starter cultures. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1, Second Edition, *Chapman and Hall, London*, pp. 193-255.

**Condon, S., (1987).** Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46: 269-280.

**Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J. et Wallbanks S. 1993.** Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 595-603.

**Davies, F.L. et Law, B.A., (1984).** *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. Elsevier. App. Sc. Publication. New York, USA.*

**De Man, J.C., Rogosa, M. et Sharpe, M.E., (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.

**Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. et Ross, P., (2006).** Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058-1071.

**Dellaglio, F., de Roissard, H., Torriani, S., Curk, M.C. et Janssens, D., (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.) Ed : Loriga, Uriage. pp 25-116.

**Desmazeaud, M.J. et Vassal, L., (1996).** Activité protéolytique intracellulaire de streptocoques lactiques mésophiles : Rôle au cours de l'affinage des fromages. *Lait.* (587) : 327-344.

**Dortuc ; Thonart, P., (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêt pour la bio-conservation des produits alimentaires biotechnologiques Agron- sac. *Environ* 13 : 143-154

**Eklund, T., (1989).** Organic acids and esters. In: Gould, G.W. (Ed.), *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures, Elsevier Applied Science, London*, pp. 161- 200.

**Farber, J.M., (1991).** Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology: a review. *J. Food Prot.* 54: 58-70.

**Freese, E., Sheu, C.W. Et Galliers, E., (1973).** Function of lipophilic acids as antimicrobial foodadditives. *Nature*. 241: 321-325.

**Gálvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Omar, N., (2007).** Bacteriocin-based strategies for food biopréservation *Int J Food Microbiol*. 2007 Nov 30; 120(1-2):51-70.

**Ghraiiri, T., Hani, K., (2008).** Enhanced bactericidal effect of enterocin in combination with thyme essential oils against *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7. *J Food Sci Technol*. 2008 Apr; 52(4):2148-56.

**Gilliland, S.E., Nelson, C.R., Maxwell, C., (1985)..** Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Feb*; 49(2):377-81.

**Gill, A.O. et Halley R.A., (2003).** Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *Int. J.Food Microbiol*. 80: 251-259.

**Giller, K. E., C. Leeuwis, J. A. Andersson, W. Andriesse, A. Brouwer, P. Frost, P. Hebinck, I. Heitkönig, M. K. van Ittersum, N. Koning, R. Ruben, M. Slingerland, H. Udo, T. Veldkamp, C. van de Vijver, M. T. van Wijk, and P. Windmeijer., (2008).** Competing claims on natural resources: what role for science?. *Ecology and Society* **13**(2): 34.

**Gong, et Naghmouchi., (2010).** Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications, Lactic Acid Bacteria and Malolactic Fermentation in Wine, 2010: 216-231.

**Gould G.W. (1991).** Antimicrobial compound. In: Biotechnology and Food Ingredientseds. Goldberg I. et Williams R. *Van Nostrand Reinhold*, New York.pp. 461- 483.

**Guessas B., Hadadj M., Saidi N. et Kihal M., (2006).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *Dirasat, Agricultural Sci*. 32: 3, 304-312.

**Guiraud, J.P. et Galzy, P., (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Les éditions de l'usine nouvelle. 1-239.

**Guiraud J.P., (1998).** Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agro-alimentaire, EDS. Dunod paris, 652 p.

**Guiraud, J.P., (2003).** Microbiologie alimentaire. Technique d'analyse microbiologique Ed, Dunod paris, 2003,651, p

**Guiraud, J.P., et Rosec, J.P., (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire Ed : AFNOR. Pp 237-251.

**Gusil, c., Chaia, A. P ., Olivier, G., et Gonzalez, S., (2010).** Microtechnique for identification of lactic acid bacteria, Méthode in molecular biology, public Health microbiology: methods and protocols. Ed Humana press.Totowa. pp 453-458.

**Hardie, J. M., (1986).** Methods for the Isolation and identification of anaerobes. *Soc Appl bacterial sympser.* 13: 397-410.

**Hartmann, B., Castelo, R., Miñana, B., Peden, E., Blanchette, M., Rio, D.C., Singh, R., Valcárcel, J., (2011).** Distinct regulatory programs establish widespread sex-specific alternative splicing in *Drosophila melanogaster*. *RNA* 17(3): 453--468.

**Ho., (2008).** Etude de flore lactique du Nen chua, produit carné fermenté cru traditionnel du sud Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifique du produit, thèse doctorat refiserted food wiy Microbiol cultur. T

**Hotchkiss, J.H., Chen, J.H. et Lawless, H.T., (1999).** Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. *J. Dairy Sci.* 82: 690-695.

**Holzappel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. et Huis in't Veld J.H. 1998.** Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 85-101.

**Hsieh MH, Versalovic J (2008).** The Human Microbiome and Probiotics: Implications for Pediatrics. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health. Care.* 38:309-327.

**Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et Karam N.E., (2009).** Lactic acid bacteria from “Sheep’s Dhan”, a traditional butter from sheep’s milk Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites.* 60(2): 177-183.

**Jay M.J., (1992).** Modern Microbiology, Van Nostrand Reinhold, 4th Ed., New York. 371-409.

**Juillard, V. et Richard, J., (1990).** Indirect interaction in milk between proteolytic and isogenic non proteolytic strains of *Lactococcus lactis*. I. Effect of : bacteria part L.oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* 71: 525-541.

**Kandler, O , and Weiss ., (1986).** GENUS lactobacillus beiserinc 1901, 212L . in : Sneath, P. H .A, Mair, N. S. Sharpe, M. E., and Holo, J. G .(EDS).

**Kotelnikova, E. A. M. S. Iannee.** Gelfand: Bacteriocin Production by Gram-Positive Bacteria and the Mechanisms of Transcriptional Regulation: 38-628.

**Karthikeyan, V and Samrshosh, S.W., (2009).** study of bacteriocin as food preservative and the *L acidophilus* strain probiotic, 8: 335-440.

**Kashket, E.R., (1987).** Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 233-244.

**Khalil, A.M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Rivea Morales, D., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B.E., van Oudenaarden, A., Regev, A., Lander, E.S., Rinn, J.L., (2009).** Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jul 14;106(28):11667-72.

**Kong, S.T., Davison, A.J., (1980).** The role of interactions between O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, OH and O<sub>2</sub> in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 204: 13-29.

**Kuldhresth, D.C. et Marth, E.H. (1974).** Inhibition of bacteria by some volatile and nonvolatile compounds associated with milk. I. *Escherichia coli*. *J. Milk Food Technol.* 37: 510-516.

**Lancefield R.C. 1933.** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57: 571-595.

**Law, J. et Kolstad, A., (1988).** Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. *Appl. Sci.* 1: 365-365.

**Larpent. 1989 ; Novel., (1993).** Microbiologie alimentaire .Tec & .doc . Lavoisiers, Paris 10-72.

**Larpent, J.P., (1997).** techniques de laboratoire : microbiologie alimentaire Ed : Lavoisier. Paris (France). 1073p.

**Leveau , K. et Bouix, M., (1983).** Milk Coagulation and the Development of Cheese Texture. In: Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk, Davies, F.L. and B.A. Law (Eds.). *Elsevier Applied Science Publishers Ltd.*, New York, USA.

**Leveau, J.Y., Boiux M. et De Roissart, H.B., (1993).** La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires. *2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 3- 40.

**Lindgren, S.E. et Dobrogosz, W.J. (1990).** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-164.

**Lonvard-funel A., 2001.** La biosynthèse d'exo polysaccharide par des souches de *pediococcus damnosus* Isolées du vin : mis au point de d'outils moléculaires de détection. Pp 224-230.

**Looijesteijn, P.J., Trapel, L., de Vries, E., Abee, T. et Hugenholtz, J., (2001).** Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* (64) :71-80.

**Magusson, J. et Schnurer, J., (2001).** *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1-5.

**Metlef. S et A. Dilmi Bouras., (2009).** Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, Souches extrêmophiles locales sur des espèces de la flore intestinale résidente. pp : 25-42.

**Milind, A., Chavan., Margaret, A. Riley.** *Journal of Molecular Evolution of Bacteriocins in Gram-Negative Bacteria.* 19-43.

**Moll, I., Gillardon, F., Waltering, S., Schmelz, M., Moll, R., (1996).** Differences of bcl-2 protein expression between Merkel cells and Merkel cell carcinomas *J Cutan Pathol.* 1996 Apr;23(2):109-17.

**Mozi, F., Torino, M I. et Valde,z G.F., (2001).** Identification of exopolysaccharides producing lactic acid bacteria. *Méthode in biotechnology. food. microbiology. Protocols hamana.* Press 42(3):147-153.

**Orla-Jensen, S., (1919).** The lactic acid bacteria. A.F. Høst and son, Koenigsholm Hof-Boghandel, Copenhagen.

**Ouwehand, A.C. et Vesterlund, S., (2004).** 11 Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S., Ouwehand A., Von Wright A. (eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd ed. *Marcel Dekker, New York.* 375–395.

**Onda. T., (2010).** Time series analysis of aerobic bacterial flora during Miso fermentation: pp: 1000-1046.

**Oyetayo, V.O., Adetuyi, F.C. et Akinyosoye, F.A., (2003).** Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent *in vivo.* *Afr. J. Biotech.* 2: 448-452 .

**Piard, J.C. et Desmazeand, M., (1991).** Inhibiting factors produced by lactic and preculturing by a non–proteolyticvariant. *Lait*.70: 425-438.

**Pilet, M.F., Magras, C., Federigh, M., (1998).** Bactéries lactiques In manuel de bactériologie alimentaire (Surta L., Federighi M., et Jouve J.L., (1998). Manuel de bactériologie alimentaire.Ed : *Polytechnica. In. J. Food microbiol.*pp 235-260.

**Podolak, P.K., Zayas, J.F., Kastner, C.L. et Fung D.Y.C., (1996).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59: 370-373.

**Raccach, M., M.C Grath, R. ET Daftarian, H., (1989).** Antibiosis of some lactic acid bacteria including *Lactobacillus acidophilus* to ward *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*

**Rodgers S. Vermeir, M Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires** 1370-6233

**Romeo, Y. Bouvir, J et Gutierre, Z., (2001).** La réponse an stress osmotique des BL *lactococcus lactis* et *lactobacillus plantarum*. *Lait*. 81. 49-55.

**Roissard et Luquet. 1994.** Les bactéries lactiques édition Lorisa, volume 1, Luquet F. M, lait et produits laitères, *Tec et Doc*, édition Lavoisier, Paris, p362-400-402.

**Sanz, B., Selgas, D., Parejo, I. et Ordonez, J.A., (1988).** Characteristics of lactobacilli isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 199-205.

**Scardovi, V. (1986).** In Bergy., Manuel of systematic Bactériology (Willliamms & Wilkins). Û8Pp 1418-1443.

**Sholeva, Z., Stefanova, S. et Chipeva, V., (1998).** Screening of antimicrobial activities among Bulgarian *lactobacilli* strains. *J. Culture Collections.* 2: 15-20.

**Stiles ME, Holzapfel WH., (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 63(1):1-29.

**Sinova. A., (2009).** Influence of source of soybean meal and lysine content of the diet on performance and total tract apparent retention of nutrients in broilers from 1 to 36 days of age. *J. Anim. Sci.* 109(7): 1440-1450.

**Smith, L. et Palumbo, M., (1983).** The Bacterias Lacticas: Novel approaches for the development of lactic acid bacteria resistant to phages. *Aniverario. Tecnologia Lactea Latino americana*. 7.

**Stiles, M.E. (1996).** Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*. 70: 33-45.

**Smulders, F.J.M., Barendsen, P., Van Logtestijn, J.G., Mossel, D.A.A.**

**et Van Der Marel, G.M., (1986).** Review: Lactic acid: considerations in favor of its acceptance as a meat decontaminant. *J. Food Technol.* 21: 419-436.

**Stiles M.E. (1996).** Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*. 70: 33-45.

**Surta, L., Federighi, M., et Jouve, J.L., (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. **Ed :** *Polytechnica. In. J. Food microbiol.* pp 235-259.

**Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. et Holt J.G. 1986.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins.

**Talarico, T.L. et Dobrogosz, W.J., (1989).** Chemical characterization of an Antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 674-679.

**Thakur, S. S, Roy .P.K., Ghoshal., (2009).** reactive power dispatch nature & biologically inspired compaign: 10-1109.

**Thompson et Gentry-Weeks., (1994).** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. IN: *Bactéries lactiques (De roissart H. et Lunuet FM.). Loriga. Uriage* :1pp :239-290.

**Todorov, A., Motiv Emot., (2012).** The role of the amygdala in face perception and evaluation Mar;36(1):16-26. Epub (2011) Aug 2.

**Valcheva . H et al., (2006).** Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology, Second Edition p 499-501.

**Vandamme P., Pot B., Gillis M., Devos P., KerestersK. et Swings, J., (1996).** Polyphasictaxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* **60** : 407.

**Vermeir, M, Boens N, Heirwegh KP.Biochem J.Interaction .,(1992).** Modelling of interaction of basic lipophilic ligands with cytochrome (Pt 2):483-90.

**Wagner, M.K. et Moberg, L.J., (1989).** Present and future use of traditional antimicrobials.*Food Technol.* 1: 143-147.

**Walling, E.G., Indreau, E. et Lonvaud-Funel, A., (2001).** La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus damnosus* isolées du vin : mise au point de d'outils moléculaires de détection. *INRA.* 289-300.

**Walbanks S. et al., (1990).** Int. J. Syst. Bacterial. Pp 224-230.

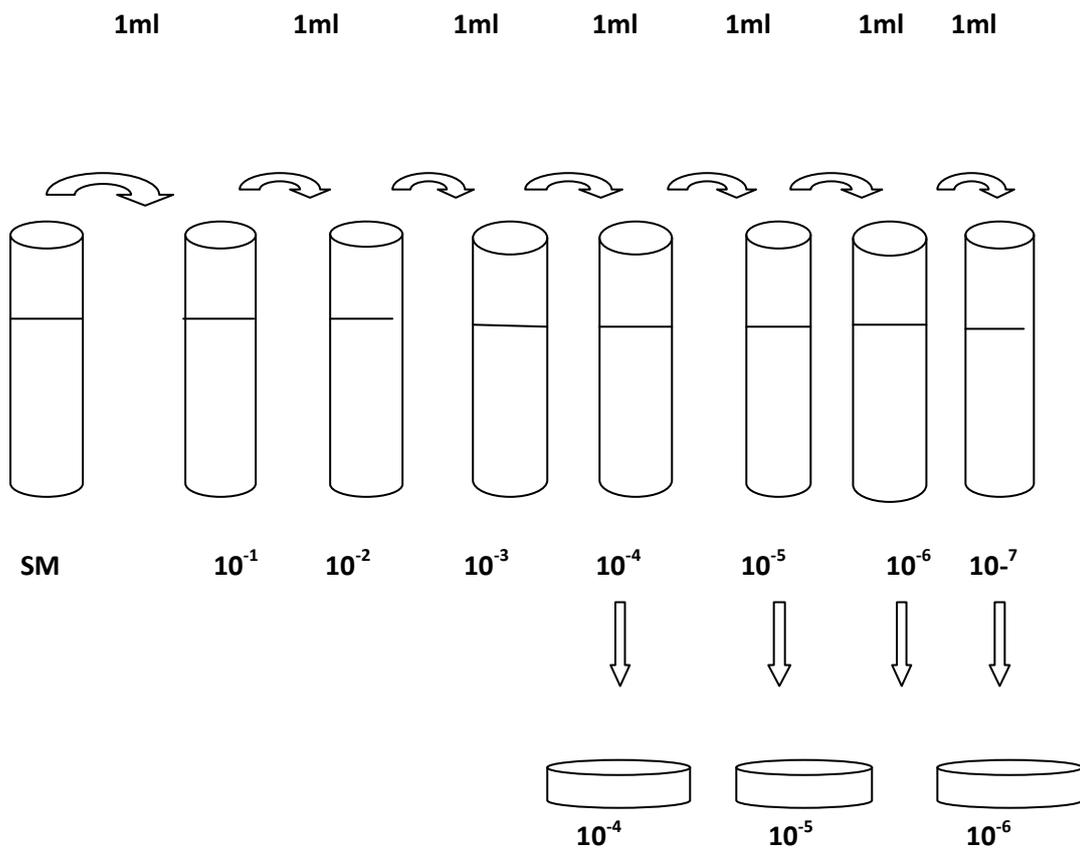
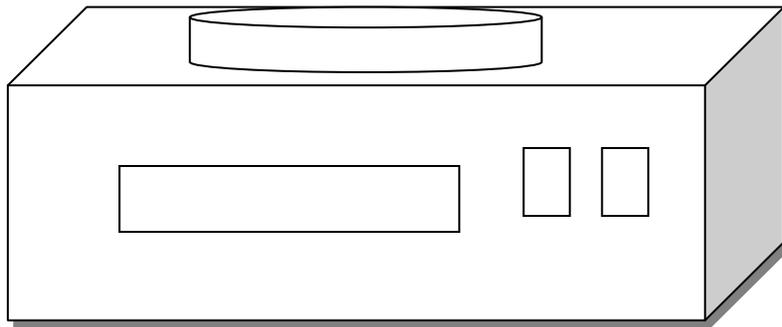
**Wood, B.J. B et W. H Holzapfel., (1995).** The lactic acid bacteria. The genera of lactic acid bacteria, **Ed: Bkackie academie & Professional London.**

**Zarour AM., (2013).** Presentations and outcomes in patients with traumatic diaphragmatic injury: a 15-year experience. P 450.

**Annexe**

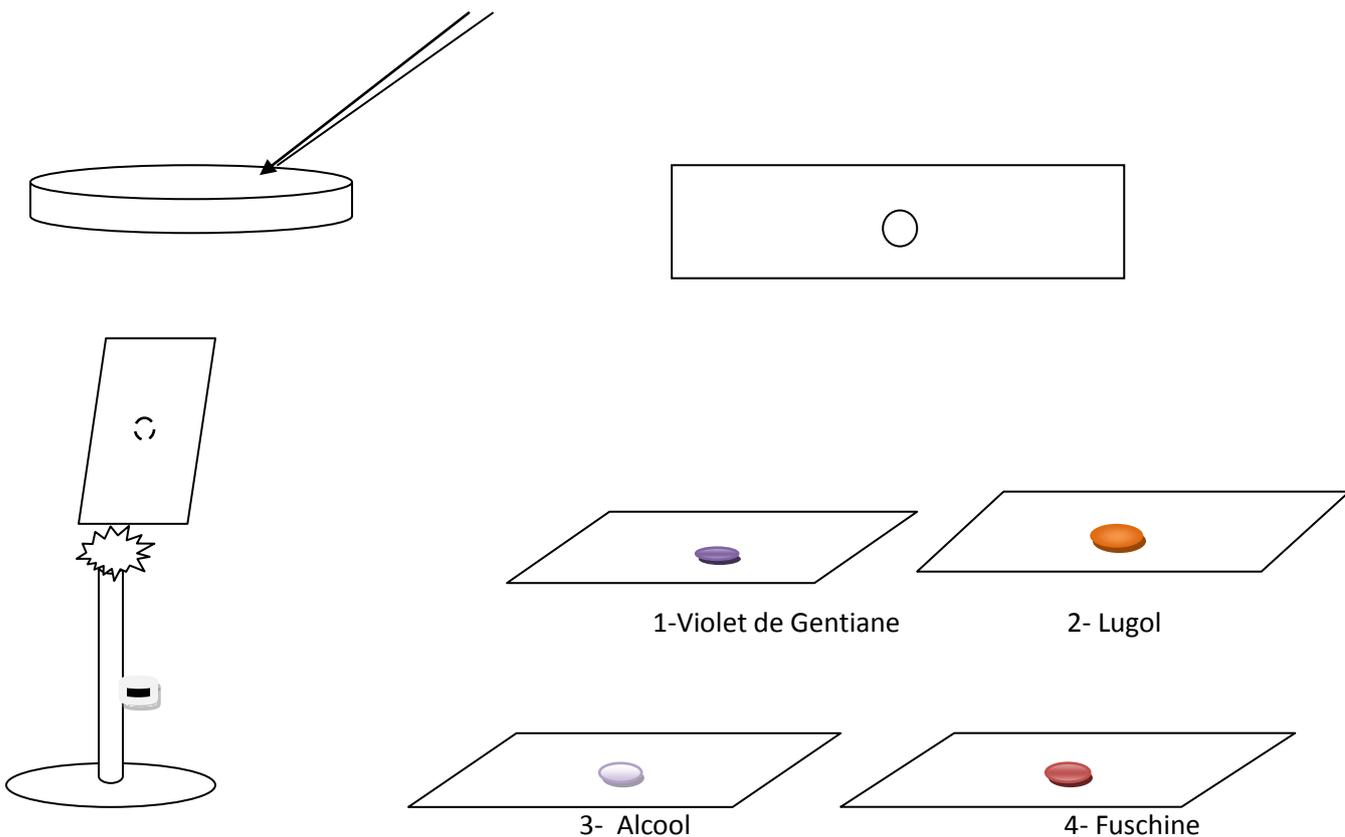
## Annexe 1 : Dilutions décimal

Un gramme de chaque échantillon de selles a été pesé et déposé dans 9 ml d'eau péptonée stérile ; c'est la solution mère. Après homogénéisation, 1ml de cette solution mère a été transféré dans 9 ml d'eau péptonée ; c'est la dilution  $10^{-1}$ . De la même manière, les dilutions suivantes ont été préparées jusqu'à la dilution  $10^{-7}$ .



## Annexe 2 : Coloration de Gram

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre;
- Prélever un ose d'une colonie et mélanger avec la goutte d'eau physiologique, strier et fixer à la chaleur par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène;
- Ajouter le Violet de Gentiane pendant 1min, jeté le colorant, rincer très brièvement en faisant couler de H<sub>2</sub>O sur la lame au dessus de frottis (pas directement sur le frottis)
- Ajouter le Lugol pendant 1min ; rincer avec H<sub>2</sub>O
- Décolorer avec de l'alcool pendant 30 secondes ; rincer avec H<sub>2</sub>O
- Ajouter le deuxième colorant, la Fuschine et laisser 1 min puis laver à l'eau;
- Sécher la lame et mettre une goutte d'huile à immersion puis passer à l'observation microscopique au grossissement X100.



### Annexe 3 : Les composants des Milieux de culture

#### 1. Milieu MRS gélose (De Man ; Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de Levure	05g
Extrait de Viande	10g
Peptone	10g
Acétate de Sodium	05g
Citrate d'ammonium	02g
Glucose	20g
Phosphate di-potassique (K <sub>2</sub> Hpo <sub>4</sub> )	02g
Sulfate de magnésium (MgSo <sub>4</sub> )	0.25g
Sulfate de manganèse (MnSo <sub>4</sub> )	0.05g
Tween 80	1ml
Agar-agar	18g
Eau distillée	1000ml
pH=6.8 stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 15 minutes	

#### 2. Milieu MRS bouillon (De Man ; Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de Levure	05g
Extrait de Viande	10g
Peptone	10g
Acétate de Sodium	05g
Citrate d'ammonium	02g
Glucose	20g
Phosphate di-potassique (K <sub>2</sub> Hpo <sub>4</sub> )	02g
Sulfate de magnésium (MgSo <sub>4</sub> )	0.25g
Sulfate de manganèse (MnSo <sub>4</sub> )	0.05g
Tween 80	01ml
Eau distillée	1000ml
pH=6.8 stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 15 minutes	

#### 4. Lait écrémé 10%

Lait écrémé	100g
Eau distillée	1000ml
stérilisation à l'autoclave 110°C pendant 10 minutes	

#### 5. Milieu KMK (Kempner et McKay, 1980)

Extrait de Levure	03g
Peptone tryptique de caséine	2.5
Glucose	05g
Agar-agar	18g
Eau distillée	1000ml
pH= 6.6 stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 15 minutes	

**Solution 1 : Solution aqueuse contenant de 10% de ferrocyanure de potassium**

**Solution 2 : Elle est composée de 1g de citrate de sodium dihydrogène et 1g de citrate de fer dans 40ml d'Eau distillée**

**Les deux solutions sont chauffées dans eau bouillante pendant 30 minutes et par la suite filtres sur des unités de filtration millipore 0.45 µm (conserver en flacon opaque au réfrigérateur).**

**6. Milieu Mueller Hinton**

<b>Infusion de viande de bœuf déshydratée</b>	<b>06g</b>
<b>Hydrolysate acide de caséine</b>	<b>17.5g</b>
<b>Amidon de maïs</b>	<b>1.5g</b>
<b>Agar-agar</b>	<b>10g</b>
<b>pH=7.74 stérilisation à autoclave 15 minutes à 120°C</b>	

**7. Lait bleu de Scharman 1%**

<b>Lait écrémé stérile</b>	<b>09ml</b>
<b>Bleu de méthylène à 1%</b>	<b>01ml</b>
<b>pH=7 stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 15 minutes</b>	

**8. Lait bleu de Scharman 3%**

<b>Lait écrémé stérile</b>	<b>07ml</b>
<b>Bleu de Méthylène</b>	<b>03ml</b>
<b>pH=7 stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 15 minutes</b>	

**9. MRS bouillon Hypersalé 2% 4% et 6.5% NaCl**

<b>MRS Bouillon</b>	<b>100ml</b>
<b>NaCl</b>	<b>2g 4g et 6.5g</b>
<b>Stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes</b>	

**10. MRS bouillon Hypercalcin NaOH**

<b>MRS Bouillon</b>	<b>100ml</b>
<b>NaOH</b>	<b>02g</b>
<b>pH=8.2 Stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes</b>	

**11. Milieu Clark et Lubs**

<b>Peptone</b>	<b>06g</b>
<b>Glucose</b>	<b>05g</b>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>05g</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>pH=7 stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes</b>	

---

**12. Bouillon Nutritif**

Extrait de viande	01g
Extrait de Levure	02g
Peptone	05g
Chlorure de Sodium	05g
pH= 7.5 Stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes	

---

**13. Gélose Nutritif**

Extrait de viande	01g
Extrait de Levure	02g
Peptone	05g
Chlorure de Sodium	05g
Agar –agar	15g
pH= 7.5 Stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes	

---

**14. MRS gélose au Tween 80**

MRS gélose	100ml
Tween 80	03ml
pH=7 stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes	

---

**15. Eau Physiologique**

Chlorure de Sodium	8.5g
Peptone	0.5g
Eau distillée	1000ml
pH= 7 Stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes	

---

**16. Gélose au tellurite**

Extrait de viande	10g
Extrait de levure	03g
Peptone	05g
NaCl	05g
Glucose	05g
Agar-agar	20g
Tellurite de potassium à 0.8%	50ml
pH=7 stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes	

---

**17. Milieu gélatine**

Peptone	10g
Extrait de viande	04g
Gélatine	120g
NaCl	2.5g
Eau distillée	1000ml
pH=7 stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes	

---

---

**18. Gélose au lait**

Peptone	05g
Glucose	01g
Lait écrémé	05g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH= 7 stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes

---

---

**19. Bouillon nitraté**

Nitrate de sodium	
Eau distillée	1000ml

pH=6 Stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes

---

**20. Milieu TSI (Triple Sugar Iron)**

Peptone de caséine	15g
Peptone de viande	05g
Extrait de viande	03g
Peptone de Levure	03g
NaCl	05g
Lactose	10g
Saccharose	10g
Glucose	01g
Citrate ammoniacale de fer(III)	0.5g
Thiosulfate de sodium	0.5g
Rouge de phénol	0.024g
Agar-agar	12g
Eau distillée	1000ml

pH=7.2 stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes

---

---

**21. L'eau Pèptonée**

Peptone exempte d'indole	10g
Chlorure de sodium	05g
Eau distillée	1000ml

pH=7.2 stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20minutes

---

---

**22. Gélose semi solide au lait citrate**

Lait écrémé à 10%	10.5ml
Citrate de Sodium	05ml

pH=7.4 stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes

---

---

**23. Lait Tournesolé**

Teinture de tournesol à 4%	10ml
Lait écrémé à 10%	1000ml

Stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes

---

---

**24. ADH (Milieu pour mise en évidence de l'arginine d'hydrolase**

Arginine	05g
----------	-----

---

Extrait de levure	03g
Chlorure de Sodium	05g
Glucose	01g
Pourpre de Bromocrésol	16ml
Eau distillée	1000ml
pH =7.1 Stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes	

<b>25. Bleu de méthylène 1%</b>	
Bleu de méthylène 1%	0.1g
Eau distillée	100ml
Stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes	

<b>26. Fuschine</b>	
Fuschine basique	01g
Acide phénique cristallisé	5g
Alcool à 95°	10ml
Eau distillée	100ml

<b>27. Lugol</b>	
Iode	01g
Iodure de potassium	02g
Eau distillée	300ml