



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Populaire



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master

Thème



Isolement des bactéries lactiques à partir des produits fermentés



Présenté par :

- ❖ M^{elle} kacher amina
- ❖ M^{elle} Tiboune fatima zahra

Soutenu devant les jurys :

Présidente	Mme Aiza A	MAB	UDBKM
Examineurs	Mme Lissaoui A	MCB	UDBKM
	Mr Ansel S	MAB	UDBKM
Promotrice	Mme Bensehaila S	MAB	UDBKM

Remerciements

*Nous remercions en premier lieu le **Créateur** des cieux et des terres, notre **Grand Dieu** Tout Puissant qui m'a guidé sur le droit chemin et m'a donné le courage et la volonté d'affronter les difficultés rencontrées et aboutir à la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions en deuxième lieu notre promotrice **Mme Benshaila S Maitre** Assistante Classe B pour la proposition de ce thème ainsi que pour sa compréhension, pour sa patience, ses précieux conseils, la rigueur et l'orientation dont j'ai pu bénéficier. et pour l'aide qu'il m'a prodigué*

Nous remercions aussi tous les autres membres du Jury,

***Mme Aiza A Maitre** Assistante Classe B à l'Université de Khemis Miliana qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury, je la remercie profondément.*

*Nous exprimons notre gratitude à **Mme Lissaoui A Maitre** de conférence classe B à l'université de Khemis Miliana d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous remercions aussi **Mr Ansel S Maitre** Assistante Classe B à l'Université de Khemis Miliana qui pour nous avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de mémoire, d'examiner ce travail*

Nos remerciements à nos très chers parents pour l'amour qu'elle nous a porté et pour leurs soutiens et leur patience

Nous remercions également tous les membres des laboratoires pédagogiques de l'université de Khemis Miliana, qui nous ont bien aidés pour réaliser notre étude dans des bonnes conditions.

Nous sentiments de reconnaissance et nous remerciments vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicace :

Nous rendons grâce à Allah le tout puissant. Nous vous prions de nous guider sur le droit chemin qui est le vôtre et qui nous mène à votre Paradis. Amen.

Je dédie ce modeste travail à :

A la prunelle de mes yeux, celle qui a les clefs du paradis, a toi tendre Maman que ce travail soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ton aide précieuse et toutes ces années de compréhension. Sans toi que serais-je?

A celui a qui je dois mon amour pour la science, mon très cher père. Tu as toujours su me motiver, Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon parcours, que Dieu te donne santé et longue vie.

*Mes chères frères et mes chères sœurs : Sofiane,
Samira, Idriss, Nassima Abd Salam, Sanaa*

Tous les enfants de ma famille : Abd bssat, Hiba,

Asmaa, Mariya,

Ma copine et collègue de ce travaille Fatima Zahra

Mes très chères amies : Imane, Khayra, Fatiha, Nassira,

Fouziya, Djamila, fatiha, sara,

amina

Dédicace

Je dédie ce travail :

A celle qui attend mon retour a chaque jour

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

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

A mes sœur : Zinab, Khaira, Zahra, Nacira Et Aicha et ces enfants.

A mes frères : Mohamed, Belgasem, Yahya , Alwani, Ali Et Arbi et ces enfants

Mon épouse ; merci parce que tu es dans ma vie J'espère que nous restons toujours ensemble.

Ma copine et collègue de ce travaille Amina .

Fatima zahra

Liste des tableaux

Tableau 01 :	Les genres de BL utilisés en biotechnologie alimentaire et leurs caractéristiques différentielles (Lahtinem et al, 2012).	08
Tableau 02 :	Caractéristiques des genres <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i>	21
Tableau 03 :	Exemple des produits végétaux fermentés consommés dans le Monde.	33
Tableau 04 :	Bactéries lactiques impliquées dans différents produits alimentaires à base de fruits et légumes obtenue par fermentation lactiques.	36
Tableau 05 :	Résumé de l'observation macroscopique des isolats du carotte et concombre fermentés.	54
Tableau 06 :	Critères morphologiques des bactéries lactiques isolées à partir de carotte et concombre fermentés	56
Tableau 07 :	Résultat de la Croissance à différentes températures et thermorésistantes.	58
Tableau 08 :	Croissance à différent PH et le lait bleu de sherman.	60
Tableau 09 :	Représentation des résultats des tests physiologique et biochimique.	65
Tableau 10 :	Profils fermentaires des isolats.	67
Tableau 11 :	Les résultats de l'antibiogramme des souches	68
Tableau 12 :	Diamètres des zones d'inhibition (mm) suite à la diffusion sur puits en gélose.	70
Tableau13:	Les variations de pH des souches isolées, durant 24h d'incubation	71

Liste des figures

Figure 01 :	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques, incluant quelques genres aérobie et anaérobie facultatif de Firmicutes (Lahtinem et al, 2012).	08
Figure 02 :	Arbre phylogénétique représentant les relations entre les espèces de <i>Lactobacillus</i> basée sur les séquences des gènes ARNr 16S (Zhang et Cai, 2014).	11
Figure 03 :	Les relations phylogénétiques entre le genre <i>Leuconostoc</i> et d'autres genres de bactéries lactiques sur la base du séquençage des ARNr 16S (Zhang et Cai,2014).	15
Figure 04 :	Arbre phylogénétique représentant les relations entre les espèces de <i>Weissella</i> basée sur le séquençage des gènes ARNr 16S (Zhang et Cai,2014).	16
Figure 05:	Les relations phylogénétiques entre les espèces du genre <i>Lactococcus</i> basé sur le séquençage des ARNr 16S (Zhang et Cai, 2014).	18
Figure 06 :	Les relations phylogénétiques entre les espèces du genre <i>Pediococcus</i> et quelques espèces du genre <i>Lactobacillus</i> basé sur le séquençage des ARNr 16S (Zhang et Cai, 2014).	22
Figure 07 :	Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques. (Makhloufi., 2012).	28
Figure 08 :	Les étapes de fabrication de la carotte et concombre fermentée.	42
Figure 9 :	Isolement, purification et conservation des isolats des bactéries lactiques.	50
Figure 10 :	Aspect des cultures pures des colonies des bactéries lactiques sur gélose MRS (1) et gélose M17 solide (2) après 48h d'incubation à 30°C et 37°C.	51
Figure 11:	Aspect macroscopique des isolats sur milieu MRS (A) et sur milieu M17 (B) après 24h d'incubation. Et sous la loupe (C), (D).	52
Figure 12 :	Aspect macroscopique des isolats sur MRS(a) et M17 liquide(b).	53
Figure 13 :	Observation microscopique des bacilles(A) et des coques (B) après coloration de Gram (G x100).	55

Liste des figures

Figure 14 :	Les résultats de croissance à différentes températures et la thermorésistance.	57
Figure 15 :	Résultats de la croissance à différents pH	59
Figure 16 :	Les résultats de lait bleu de Sherman obtenus après ensemencement et incubation pendant 24h à 30°C.	60
Figure 17 :	Résultats de la mobilité sur milieu mannitol après incubation 24h à 30°C.	61
Figure 18 :	Représente les résultats de type fermentaire des isolats.	62
Figure 19 :	Résultats de l'hydrolyse d'arginine sur milieu sur milieu Moeller.	62
Figure 20:	Résultat de la recherche de l'acétone.	63
Figure 21 :	Aspect des colonies des bactéries lactiques sur milieu MSE.	63
Figure 22 :	Résultat de Test de résistance au tellurite.	64
Figure 23 :	Résultat de type respiratoire.	64
Figure 24 :	Résultats de fermentation des hydrates de carbone.	66
Figure 25 :	Inhibitions obtenues par les souches isolées.	69
Figure 26:	Evolution de pH des souches isolées de carotte à différents intervalles de temps.	72
Figure 27 :	Evolution de pH des souches de concombre isolées à différents intervalles de temps.	72
Figure 28 :	Répartition des isolats isolés à partir de la carotte et le concombre fermenté	73

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH	: Arginine dihydrolase
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNr	: Acide désoxyribonucléique ribosomique.
PAD	: La phenolic acide décarboxylase.
AG	: Acide Gras.
ARN	: Acide ribonucléique
ARNr	: Acide ribonucléique ribosomique.
ATP	: Adenosine triphosphate.
BL	: Bactérie lactique.
Ca	: Calcium.
CoA	: Coenzyme A.
EMP	: Embden Meyerhoff Parnas.
EPS	: Exopolysaccharides.
FBA	: Fructose 1-6 phosphate aldolase.
FBP	: Fructose 1-6 biphosphate
GC %	: Pourcentage guanine + cytosine de l'ADN.
H₂O₂	: Peroxyde d'hydrogène.
Hét	: Hétérofermentaire.
HNO₃	: Acide Nitrique.
Hom	: Homofermentaire.
LDH	: Lactate Deshydrogénase.
MH	: Muller Hinton.
NaCl	: Chlorure de sodium.
MRS	: Man <i>Rogosa Sharp</i> .
MSE	: Mayeux Sandine et Eliker.
NaCl	: Chlorure de sodium.
NAD	: Nicotinamide adénine dinucléotide.
NADH, H⁺	: Nicotinamide adénine dinucléotide hydroxyperoxydase.

LISTE DES ABREVIATIONS

NaOH	: Hydroxyde de Sodium.
ND	: Non déterminé.
NH₃	: Ammoniaque.
OH	: Hydroxyde.
PCR	: Polymérase chaine réaction.
PH	: Potentiel d'Hydrogène.
Pi	: Phosphore.
REP	: Repetitive Extragenic Palindromic
T	: Témoin
VP	: Voges-Proskauer.
TM	: Thermoresistante
DHAP	: Dihydroxyacétone phosphate.
GAP	: Glycéraldéhyde phosphate.

Résumé

Les bactéries lactiques jouent un rôle très important dans la fermentation des produits végétaux .Elles peuvent synthétiser des substances antibactériennes qui sont utilisées dans la bioconservation des ces produits. Comme tous les légumes fermentés, le concombre et la carotte représente un habitat naturel pour les bactéries lactiques. Au cours de notre travail, nous avons procédé à l'isolement, la purification et l'identification des isolats lactiques de carotte et concombre préparé traditionnellement Après, nous avons étudié quelques aptitudes technologiques des souches identifiées.

Différentes méthodes basées sur les critères morphologiques, physiologiques et biochimiques on été utilisées.

Nous avons isolé à partir de carotte et concombre fermentés, 20 souches de bactéries lactiques et de les classer en plusieurs genre dont le genre *Leuconostoc* est la plus dominantes par 25%

L'étude de l'antagonisme a montré l'effet inhibiteur des souches isolées vis-à-vis *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* avec des zones d inhibitions allant 7 à18mm.

Les résultats obtenus indiquent que la plut part des souches présentent un bon pouvoir acidifiant.

Mots clés : bactérie lactique, isolat, identification, carotte, concombre, fermentation.

الملخص

تلعب بكتيريا اللبنية دوراً مهماً للغاية في تخمير المنتجات النباتية ، حيث يمكنها إنتاج المواد المضادة للبكتيريا المستخدمة في حفظ هذه المنتجات مثل كل الخضروات المخمرة ، يمثل الخيار والجزر طبيعياً لبكتيريا حمض اللاكتيك خلال عملنا ، شرعنا في عزل وتنقية وتحديد العزلات اللبنية للجزر والخيار المعدة تقليدياً بعد ذلك ، درسنا بعض القدرات التكنولوجية للسلاسل المحددة تم استخدام طرق مختلفة تعتمد على المعايير المورفولوجية والفيزيولوجية والبيوكيميائية

لقد عزلنا من الجزر والخيار المخمر ، 20 سلالة من بكتيريا حمض اللاكتيك وصنفناها إلى عدة جنس منها جنس *leuconostoc* و هو الأكثر غالبية بنسبة 25 %.

أظهرت دراسة التضاد التأثير المثبط للسلاسل المعزولة تجاه *Escherichia coli* و *Basillus subtilist* مع مناطق تثبيط تتراوح بين 7 إلى 18 ملم.

تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن معظم السلالات لديها قوة جيدة في رفع الحموضة

الكلمات المفتاحية: بكتيريا اللبنية ، عزل ، تحديد ، الجزر ، الخيار ، التخمر.

Abstract

Lactic acid bacteria play a very important role in the fermentation of plant products. They can synthesize antibacterial substances that are used in the bioconservation of these products. Like all fermented vegetables, cucumber and carrot represent a natural habitat for lactic acid bacteria.

In the course of our work, we proceeded to the isolation, the purification and the identification of lactic isolates of carrot and cucumber prepared traditionally. After, we studied some technological aptitudes of the identified strains.

Different methods based on morphological, physiological and biochemical criteria have been used.

We have isolated from fermented carrots and cucumbers, 20 isolate of lactic acid bacteria and classify them into several genus of which the genus *leuconostoc* is the most dominant by 25%.

The antagonism study showed the inhibitory effect of strains isolated from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* with zones of inhibition ranging from 7 to 18 mm.

The results obtained indicate that most of the strains have a good acidifying power.

Key words: lactic acid bacterium, isolate, identification, carrot, cucumber, fermentation.

Tables des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

Introduction

1

Synthèse bibliographique

3

Chapitre I: Bactéries lactique

3

1. Historiques

3

2. Généralités

3

3. Définition

4

4. Habitat

4

5. Taxonomie des bactéries lactiques

5

6. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

9

6.1. Le genre *Lactobacillus*

9

6.2. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et *Fructobacillus*

12

6.2.1. Le genre *Leuconostoc*

12

6.2.2. Le genre *Weissella*

15

6.2.3. Le genre *Oenococcus*

16

6.3 Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*

17

6.3.1. Le genre *Lactococcus*

17

6.3.2. Le genre *Enterococcus*

18

6.3.3. Le genre *Streptococcus*

20

6.4 Les genres *Pediococcus*, et *Tetragenococcus*

21

6.5. Le genre *Bifidobacterium*

23

6.6. Le genre *Aerococcus*

25

6.7. Le genre <i>Carnobacterium</i>	26
6.8. Le genre <i>Vagococcus</i>	26
7. Les voies du métabolisme des sucres chez les BL	26
7.1. Voie homofermentaire ou EMP	26
7.2. La voie hétérofermentaire	27
7.3. La voie bifide	27
8. Rôle et intérêt des bactéries lactiques	29
8.1. domaine alimentaire	29
8.2. Domaine de thérapeutique	29
Chapitre II: Les produits fermentés	30
1. Définition de carotte et concombre	30
2. Les variétés	30
3. Historique	32
4. Bénéfices nutritionnels et effet santé des aliments végétaux fermentés	33
4.1. L'amélioration des propriétés sensorielles	33
4.2. L'amélioration de la digestibilité	34
4.3. Augmentation de la capacité antioxydant	34
4.4. La préservation et la durée de conservation	34
5. les microorganismes impliqués dans la fermentation	35
Chapitre III : Matériel et méthodes	37
1. Matériel	37
1.1. Source de légumes	37
1.2. Milieux de culture	37
1.3. Souches de référence	38
2. Méthodes	38
2.1. Fabrication de carotte et concombre fermenté	38
2.2. Isolement des bactéries lactiques	40
2.3. Purification des isolats	40
2.4. Conservation des isolats	40
2.5. Identification des souches	43
2.5.1. Critères morphologiques	43

2.5.1.1. Caractérisation macroscopique	43
2.4.1.2. Caractérisation microscopique	43
2.5.2. Critères physiologiques et biochimiques	44
2.5.2.1. Test de la catalase	44
2.5.2.2. Teste de oxydase	44
2.5.2.3. Croissance à différentes températures et thermorésistance	44
2.5.2.4 Croissance à pH 4,4 / 4,9 et 9 / 9,6	44
2.5.2.5 Croissance sur le lait bleu de Sherman (1937)	45
2.5.2.6 Test mannitol-mobilité	45
2.5.2.7 Production de dextrane	45
2.5.2.8 Résistance au téllurite	45
2.5.2.9 Production d'acétoïne	46
2.5.2.10 Hydrolyse de l'arginine (ADH)	46
2.5.2.11 Type fermentaire	46
2.5.2.12 Type respiratoire	46
2.5.2.13 Fermentation des hydrates de carbones	47
2.5.2.14 L'antibiogramme	47
2.5.2.15 Etude de l'activité antibactérienne des souches	48
2.5.3. Caractérisation technologique des souches	49
Chapitre IV: Résultats et Discussion	51
1. Isolement	51
2. Purification	51
3. Identification	52
3.1. Critère morphologique	52
3.1.1 Aspect macroscopique	52
3.2.1. Aspect microscopique	54
4. Critère physiologique et biochimique	56
4.1. Test de la catalase	56
4.2. Teste de oxydase	57
4.3. Croissance à différentes températures et thermorésistance	57

4.4. Croissance à pH 4,4 / 4,9 et 9 / 9,6	58
4.5. Croissance sur le lait bleu de Sherman (1937)	59
4.6. Test mannitol-mobilité	61
4.7. Type fermentaire	61
4.8. Hydrolyse de l'arginine (ADH)	62
4. 9. Production d'acétoïne	63
4.10. Production de dextrane	63
4.11. Résistance au téllurite	64
4.12. Type respiratoire	64
4.13. Fermentation des hydrates de carbones	66
4.14. L'antibiogramme	68
4.15. Etude de l'activité antibactérienne des souches	69
5. Caractérisation technologique des souches	70
6. Discussion	73
6.1. Identification des isolats	73
6.1.1. Les lactoque	73
6.1.2. Les lactobacille	75
6.2. Activité antibactérien	76
6.3. L'antibiogramme	77
Conclusion	78
Références bibliographies	
Annexes	

Introduction

Introduction

Introduction :

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer et de conserver un nombre très importants d'aliments. Ces bactéries sont déjà reconnues par la production des acides organiques qui abaissent le pH des aliments ce qui empêche la prolifération des germes nuisibles. La production du CO₂ par les bactéries lactiques réduit le potentiel d'oxydoréduction et inhibe les germes aérobies tels que les moisissures **(Desmazeaud., 1992)**.

Les bactéries colonisent des milieux naturels variés tel que la surface des végétaux et les muqueuses des mammifères (intestin, bouches, vagin et surface de la peau). Leur utilisation est apparue, depuis des millénaires, dans la fabrication des aliments comme les fromages, les charcuteries, les boissons fermentées, le pain au levain, les sauces, les saumures, les légumes fermentés, les ensilages etc. **(Badis et al., 2005)** Ce n'est que pendant la deuxième moitié du dix-huitième siècle que des scientifiques découvrirent le rôle des bactéries lactiques dans la fermentation naturelle d'aliments crus tel que le lait, les viandes ou encore les végétaux **(Burguière., 1999)**. Les bactéries lactiques possèdent les atouts technologiques essentiels pour l'obtention d'une bioconversion optimale et d'une texture caractéristique des produits fermentés et transformés, comme les produits laitiers, les dérivés de matières premières agricoles, les produits alcoolisés, les viandes, des végétaux etc... **(Novel., 1994)**.

La présence des bactéries lactiques dans différents écosystèmes, peut assurer, d'une part, le bon déroulement des étapes de production d'un aliment fermenté, ses qualités organoleptiques, et d'autres part, sa conservation naturelle (ou bioconservation), en réduisant ou éliminant l'addition des conservateurs chimiques et en les remplaçant par d'autres qui sont naturels **(O'Sulvan., 2003)**.

La bioconservation des aliments, est due aux pouvoirs antagonistes des bactéries lactiques. En effet, elles ont la particularité de synthétiser des substances inhibitrices, principalement les acides organiques (acide lactique et acide acétique), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et les bactériocines. Ces dernières ont fait l'objet de nombreuses études **(Deegan et al., 2006)**.

Introduction

L'intérêt de ce travail est isolement et d'identifier et des bactéries lactiques isolées à partir de carotte et concombre fermenté, provenant de la grande marchés d'alimentation de la région Ain de fla.

La présentation des résultats de ce travail sera précédée d'une synthèse bibliographie reprenant des connaissances actuelles sur les bactéries lactiques et les légumes fermentés. La seconde partie du manuscrit présente le matériel et les méthodes utilisés pour réaliser ce travail. Les résultats obtenus au cours de ce travail sont alors exposés et discutés dans la troisième partie. Une conclusion générale résumera les principaux acquis de ce travail avec ouvrira les perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique de recherche. À travers cette étude nous contribuons à :

- ✓ Mettre en place un aliment fermenté
- ✓ Isolement des bactéries lactiques à partir de différents échantillons de légume fermenté : la carotte et le concombre
- ✓ L'étude des caractéristiques phénotypiques, physiologiques et biochimiques des isolats.
- ✓ L'identification phénotypique, physiologique, et biochimique des bactéries lactiques thermophiles et mésophiles à partir du carotte et concombre fermentés.

Chapitre I

Les bactéries lactiques

1. Historique

Les bactéries lactiques ont été retrouvées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie. De plus, des études sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries. (Quiberoni et al., 2001). La première culture pure était des *Bacterium lactis* – probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par Lister en 1873. Historiquement, les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* ont été les premiers à être décrits. D'un point de vue technologique, les genres cités ci-après sont considérés comme les principaux des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella*. Le terme de bactéries lactiques est intimement associé aux bactéries impliquées dans la fermentation des aliments pour l'homme et l'animal. (Klein et al., 1998 ; Guiraud et al., 2003 ; Axelsson., 2004 ; Limsowtin et al., 2004).

L'utilisation de la fermentation par l'Homme remonte à des temps très anciens. Les premières preuves de l'existence des produits laitiers fermentés remontent à 8000 ans avant J-C dans le croissant fertile au Moyen Orient (plaines du Nil, du Jourdain, de l'Euphrate et du Tigre), (Fox et al., 2004 ; Herve-Jimenez et al., 2009). La fermentation des végétaux et la production de levain apparaissent entre 4000 et 2000 ans avant J-C chez les Egyptiens. La fermentation est réalisée à partir de différents types d'alimentation. Des végétaux (concombre, bettraves, dattes jus de fruits, soja,ect.....) des produits d'animaux (viande,lait) ou du poisson. De nos jours les bactéries lactiques représentent le deuxième plus grand marché de production de biomasse, après les levures. Principalement utilisées lors d'applications dans l'industrie alimentaire, comme la fabrication de fromages, des laits fermentés, de certains légumes et produits carnés fermentés et certains vins, elles interviennent aussi dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique et de biopolymères et acquièrent, depuis quelques années, un rôle croissant en santé animale et humaine (Streit., 2008)

2. Généralités

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (Deroissart., 1986), appartiennent à un groupe hétérogène de microorganismes (Dortu et al., 2008), ce sont des bactéries Gram-positives, non pigmentées, asporulées, généralement immobiles (Doguiet Koffi- Denis., 2010), ne possèdent ni nitrate réductase, ni

catalase, ni cytochrome oxydase mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène. L'absence de catalase est caractéristique, mais certaines espèces acquièrent cette activité sur des milieux riches en hème (**Bourgeois et al., 1996 ; Larpent et al., 1997**). Elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (**Dellaglio et al., 1994 ; Salminen et al., 2004 ; Zhang et Cai., 2014**). Ces bactéries ont la capacité de fermenter les sucres (glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose) en acide lactique (**Kandler et Weiss., 1986**). En plus de l'acide lactique et des autres acides organiques qui empêchent le développement des microorganismes indésirables par diminution du pH du milieu, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutéline, le dioxyde de carbone et les bactériocines (**Dortu et Thonart., 2009**).

3. Définition

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. (**Novel., 1993**). Ce sont des coques ou bâtonnet. Il existe d'autres bactéries produisant de l'acide lactique mais qui ne sont pas considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques. C'est le cas, par exemple, de *Bacillus* et *Sporolactobacillus* qui sont des bactéries Gram (+) sporulées (**Axelsson., 2004**).

4. Habitat

Les bactéries lactiques sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'Homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (**Klein et al., 1998**).

➤ Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement

Dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages, ...). Les différentes espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*) et/ ou *Lc. garvieae*, les plus rencontrées dans le lait et le fromage, sont communément utilisées comme ferments (« starter culture ») par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers. Un ferment désigne un microorganisme, bactérie ou champignon, responsable de la fermentation. Aussi, les bactéries lactiques sont à l'origine de

la fermentation utilisée pour la préparation de boissons à partir de plantes (boza, cidre, ...). Parmi elles, on distingue des espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc*. Acidotolérantes, les bactéries lactiques sont capables de survivre dans des milieux très acides en raison de leur production d'acide lactique. De plus, l'acidification du milieu participe à l'inhibition de la croissance de certains microorganismes pathogènes, tels que *Listeria monocytogenes* (*Li. monocytogenes*). Cette espèce bactérienne pathogène présente dans les aliments (lait, fromage, boissons) est responsable d'infections graves comme la listériose chez l'Homme, qui affectent en particulier la femme enceinte (**Gálvez et al., 2011**).

➤ **Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte**

Les bactéries lactiques peuvent vivre en symbiose entre elles et avec un hôte. La symbiose est une association intime et durable entre deux organismes hétérospécifiques (espèces différentes), parfois plus.

Le tractus gastrointestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), pathogène responsable de la trichomonase vaginale et/ ou *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (**Pirotta et al., 2004 ; Björkroth et Holzapfel., 2006 ; Falagas et al., 2006 ; Ruiz et al., 2009**)

5. Taxonomie des bactéries lactiques

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle (1919), les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique (**Lahtinem et al., 2012**).

La monographie d'Orla- Jensen (1919) a constitué la base de la classification actuelle des BL.

Les critères utilisés (morphologie cellulaire, types fermentaire, les températures de croissance et l'utilisation des sucres) sont toujours très importants pour la classification des BL, bien que l'avènement d'outils taxonomiques plus modernes, les méthodes biologiques en particulier moléculaires, ont considérablement augmenté le nombre de genres de BL à partir des quatre initialement reconnue par Orla-Jensen (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*) (**Lahtinem et al., 2012**).

Une importante étape a été franchie en 1977 par Woese et Fox qui ont introduit la

phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques. Cette méthode a révolutionné la taxonomie des bactéries et la classification des BL a été profondément modifiée. D'autres méthodes génotypiques (basés sur les acides nucléiques) sont aussi utilisées en classification, comme le pourcentage en GC de l'ADN ou l'hybridation ADN:ADN. (Salminen et al., 2004).

Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot., 2008). L'ancien genre *Streptococcus* était divisé au début en trois groupes : *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* sensu stricto, mais aujourd'hui, certaines bactéries lactiques qui étaient mobiles, ressemblant aux *Lactococcus*, ont formé un autre genre séparé ; c'est les *Vagococcus*.

Les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont globalement restés inchangés, mais quelques bactéries lactiques, auparavant incluses dans le genre *Lactobacillus*, forment maintenant le genre *Carnobacterium* qui regroupe des lactobacilles atypiques isolés de différents produits carnés. De plus, des souches de l'ancienne espèce *Pediococcus halophilus* ont été incluses dans le genre *Tetragenococcus* du fait de leur insensibilité à la Vancomycine. Quelques espèces de *Lactobacillus* et *Leuconostoc* ont formé un nouveau genre, les *Weissella*, en raison de leurs différences phylogénétiques avec les autres lactobacilles hétérofermentaires. Les *Leuconostoc oenos*, les « *Leuconostoc* du vin », ont formé le genre *Oenococcus* (Axelsson., 2004).

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme appartenant aux bactéries lactiques (du fait de son effet probiotique sur l'organisme et son utilisation dans les aliments) mais il est phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières (Vandamme et al., 1996 ; Gevers., 2002 ; Patrignani et al., 2006).

Les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement du point de vue morphologique en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella* est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins et al., 1993 ; Ho et al., 2007).

Selon la dernière édition de **Bergey's manual of systematic bacteriology**., 2009. les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des **Firmicutes**, la Classe des **Bacilli** et l'Ordre des **Lactobacillales** renfermant trente cinq genres (*Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*,.....

(Pot., 2008), répartis sur six familles. Parmi ces genres, seulement douze sont importants d'un point de vue biotechnologique (tab.1) (Fig.1) (Guiraud et al., 2003 ;Axelsson., 2004 ; Limsowtin et al., 2004).

D'autres genres, par exemple : *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les bactéries lactiques (Broadbent., 2001 ; Axelsson., 2004).

Les nombreux genres et espèces qui constituent ce groupe présentent une grande diversité de caractéristiques physiologiques. Cela se traduit par l'existence entre genres, espèces et au sein des espèces, de nombreuses souches possédant des propriétés technologiques différentes

Tableau 01 : les genres des bactéries lactiques utilisés en biotechnologie alimentaire et leurs caractéristiques différentielles (Lahtinem et al., 2012).

Family	Genera	Characteristics								
		Shape	CO ₂ from Glucose	Growth at 10°C	Growth at 45°C	Growth in 6.5% NaCl	Growth in 18% NaCl	Growth at pH 4.4	Growth at pH 9.6	Type of Lactic Acid
Aerococcaceae	<i>Aerococcus</i>	Cocci (tetrads)	-	+	-	+	-	-	+	L
Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium</i>	Rods	-	+	-	ND	-	ND	-	L
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	Cocci	-	+	+	+	-	+	+	L
	<i>Tetragenococcus</i>	Cocci (tetrads)		+	-	+	+	-Variable	+	
	<i>Vagococcus</i>	Cocci		+	-	-	-		-	
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	Rods	Variable	Variable	Variable	Variable	-	Variable	-	D, L, DL
	<i>Pediococcus</i>	Cocci (tetrads)	-	Variable	Variable	Variable	-	+	-	L, DL
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	Cocci ^a	+	+	-	Variable	-	Variable	-	D
	<i>Oenococcus</i>		+	+	-	Variable	-	Variable	-	D
	<i>Weissella</i>		+	+	-	Variable	-	Variable	-	D, DL
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i> ^b	Cocci	-	+	-	-	-	Variable	-	L
	<i>Streptococcus</i>		-	-	Variable	-	-	-	-	L

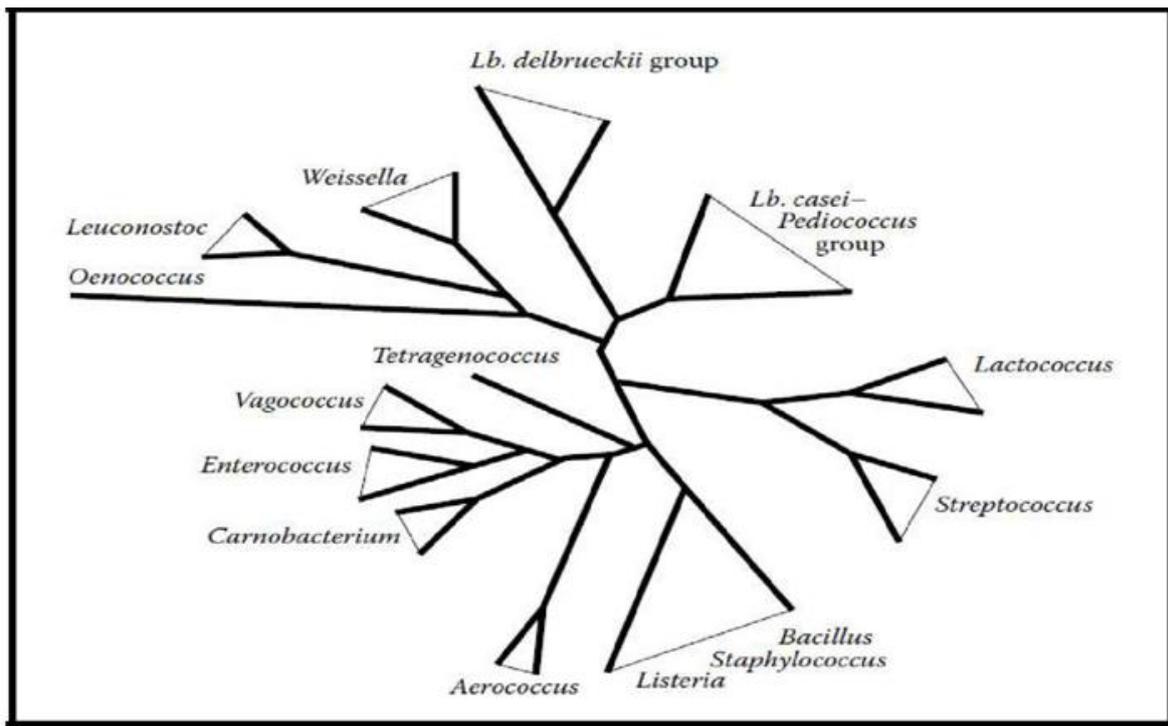


Figure 01 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques, incluant quelques genres aérobie et anaérobie facultatif de Firmicutes (Lahtinem et al., 2012).

6. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

a. Le genre *Lactobacillus*

En 1896, le genre *Lactobacillus* a été décrit pour la première fois par Beijerinck, et l'espèce type était *Lactobacillus delbrueckii*.

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal et de loin le plus grand et le plus diversifié de la famille des Lactobacillaceae, il comprend actuellement 158 espèces, sept de ces espèces sont constituées de 18 sous-espèces (fig.2)

Il est également très hétérogène, englobant les espèces avec une grande variété phénotypique, biochimiques et physiologiques. L'hétérogénéité se traduit par la gamme du pourcentage GC de l'ADN des espèces incluses dans ce genre. Cette gamme est de 32 à 55% (Zhang et Cai., 2014).

Nombreuses d'entre elles sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants (Dworkin et al., 2006). Ils sont immobiles, asporulés et catalase négative. On rencontre chez les lactobacilles une variabilité de forme (fins, incurvés, coccobacilles,...) et de longueur.

La longueur des bacilles et le degré de courbure dépend de l'âge de la culture, la composition du milieu (par exemple, la disponibilité des esters d'acide oléique) et le taux d'oxygène.

Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, vitamines, acides gras, nucléotides, glucides et en sels minéraux. La température de croissance est comprise entre 20 et 53 ° C, avec un optimum entre 30 et 40 ° C (**De Vos et al., 2009**).

À l'origine, les espèces du genre *Lactobacillus* ont été regroupés en fonction de leur température de croissance et leurs capacité à fermenter les hexoses, et par la suite en fonction de leur potentiel homo ou hétérofermentaire.

Orla-Jensen (1919) a subdivisé ce groupe d'une manière similaire à celle des coques lactiques. Ainsi, les sous-genres de *Lactobacillus* ont été créés: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium*. Remarquablement, cette division est toujours valide à un degré considérable, bien que les désignations aient été abandonnées et quelques modifications dans les définitions des sous-groupes ont été faites

Ces subdivisions étaient revisitées par **Pot et ses collègues en 1994**, mais la définition acceptée « moderne » si on peut le dire comme ca, est celle donnée par Hammes et Vogel en 1995 et qui divise le genre en 3 sous-genres sur la base du type des sucres fermentés et le processus de fermentation utilisé (**Salminen et al., 2004; Zhang et Cai., 2014**).

Groupe I : formé des lactobacilles homofermentaires stricts qui regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Thermobacterium* ne produisant presque exclusivement que de l'acide lactique à partir de la fermentation des hexoses par glycolyse. Ils ne peuvent fermenter ni les pentoses ni les gluconates.

Groupe II : formé de lactobacilles heterofermentaires facultatifs qui regroupent les espèces de l'ancien sous genre *Streptobacterium* et qui fermentent les hexoses en acide lactique par glycolyse, et peuvent fermenter les pentoses en acide lactique et en acide acétique grâce à une phosphocetolase inductible.

Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la Fermentation du gluconate

Groupe III : formé de lactobacilles hétérofermentaires stricts qui regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Bêtabacterium*, qui fermentent les hexoses en acide lactique, acide acétique (ou éthanol) et CO₂ (voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase), et qui fermentent les pentoses en acide lactique et acide acétique (voie hétérofermentative de la glycéraldéhyde-3- phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase) (Salminen et al ;2004 ; Bakhouché ; 2006; Zhang et Cai., 2014).

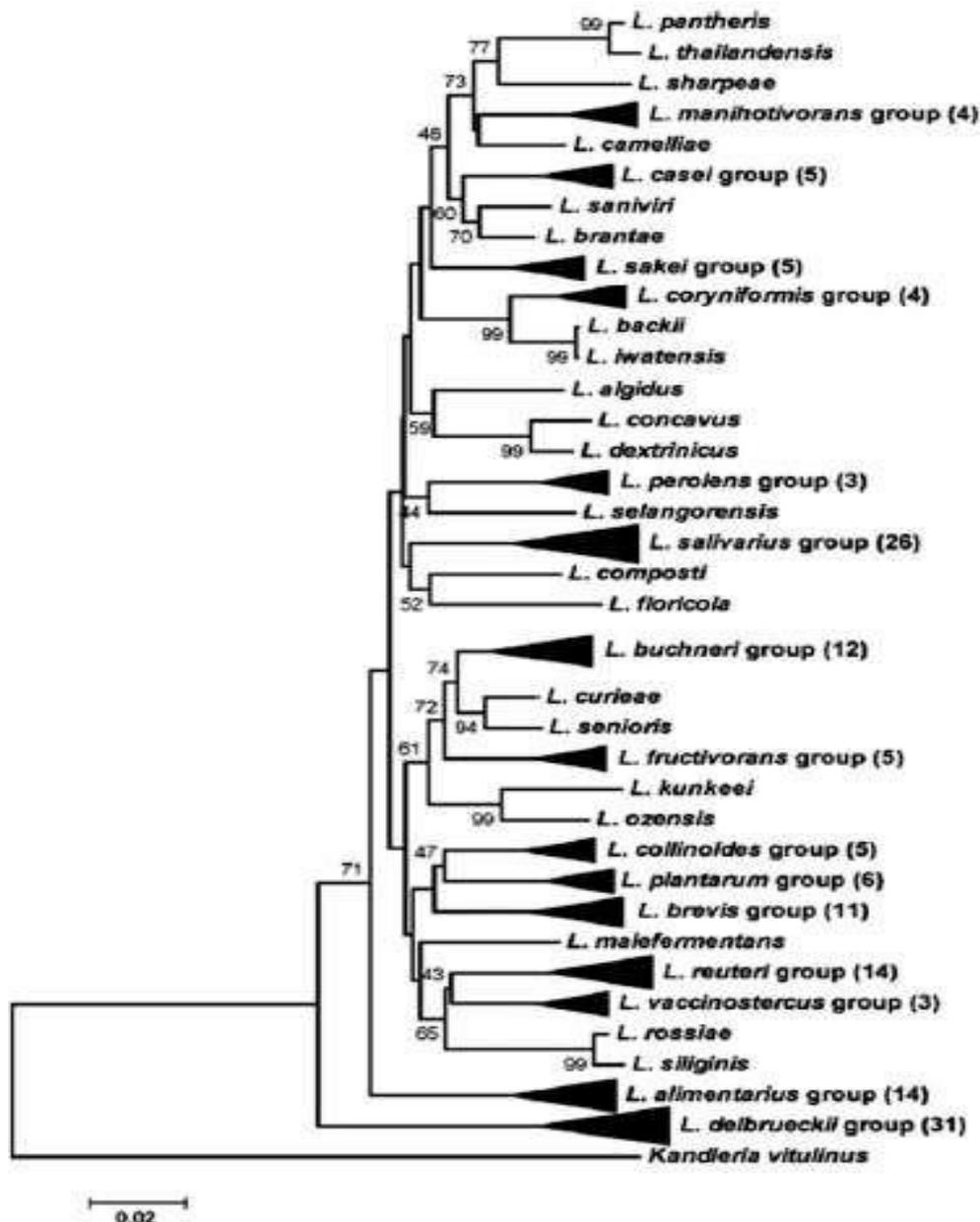


Figure 02 : Arbre phylogénétique représentant les relations entre les espèces de *Lactobacillus* basée sur les séquences des gènes ARNr 16S (Zhang et Cai., 2014).

b. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol ou d'acétate. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et températures, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al., 1998 ; Ho et al., 2007).

➤ **Le genre *Leuconostoc***

Le terme *Leuconostoc* vient du mot « Nostoc » qui est une algue bleue mucilagineuse et « Leuco » veut dire blanc (Säde., 2011).

Ces bactéries lactiques sont apparues à l'origine, sous forme de chaînes, d'aspect mucilagineux, non pigmentés. Les premières souches ont été isolées à partir d'accidents apparus dans les sucreries. Les *Leuconostocs* responsables de ces accidents produisent du dextrane en milieu saccharosé (entourées d'une gaine comme celle des *Nostocs*) (Zarour., 2010).

Les *Leuconostocs* sont des bactéries à Gram positif, immobiles, asporulées, anaérobies facultatives avec une forme ovoïde, associées en paires ou en chaînes courtes (Lahtinem et al., 2012).

Elles sont exigeantes du point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Leur optimum de croissance est de 20 à 30°C (Bjorkroth et al., 2009).

Elles sont chimioorganotrophes, nécessitant pour se développer des milieux riches comportant des facteurs de croissance complexes et des acides aminés. La croissance ne se fait qu'en présence d'un sucre fermentescible (Lahtinem et al., 2012).

Elles ne possèdent ni catalase, ni cytochromes, elles ne produisent pas du NH₃ à partir de l'arginine car elles ne possèdent pas l'enzyme arginine déshydrolyase, ne produisent pas d'indole et ne réduisent pas les nitrates en nitrites, non hémolytiques et non pathogènes (Kihal., 1996 ; Bjorkroth et al., 2009).

Les *Leuconostocs* principalement *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris* et *Leuc. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et du CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hadeif., 2012).

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont semblables aux Lactobacilles hétérofermentaires, surtout *Lb. confusus* et *Lb. viridescens*. *Leuconostoc* et *Lactobacillus* sont souvent isolés du même habitat et partagent de nombreuses caractéristiques. Hucker et Pederson (1931) ont suggéré que les *Leuconostoc spp.* sont des formes intermédiaires entre les lactobacilles et les streptocoques.

L'arbre phylogénétique construit a révélé que le genre *Leuconostoc* (et genres apparentés) ont été subdivisés en deux groupes. Le premier groupe comprend le genre *Leuconostoc*, trois espèces *Fructobacillus*, trois espèces et *Weissella* deux espèces de *Lactobacillus*. Ces souches sont phylogénétiquement étroitement liées et réunies en trois sous-groupes (fig.3) (Zhang et Cai., 2014).

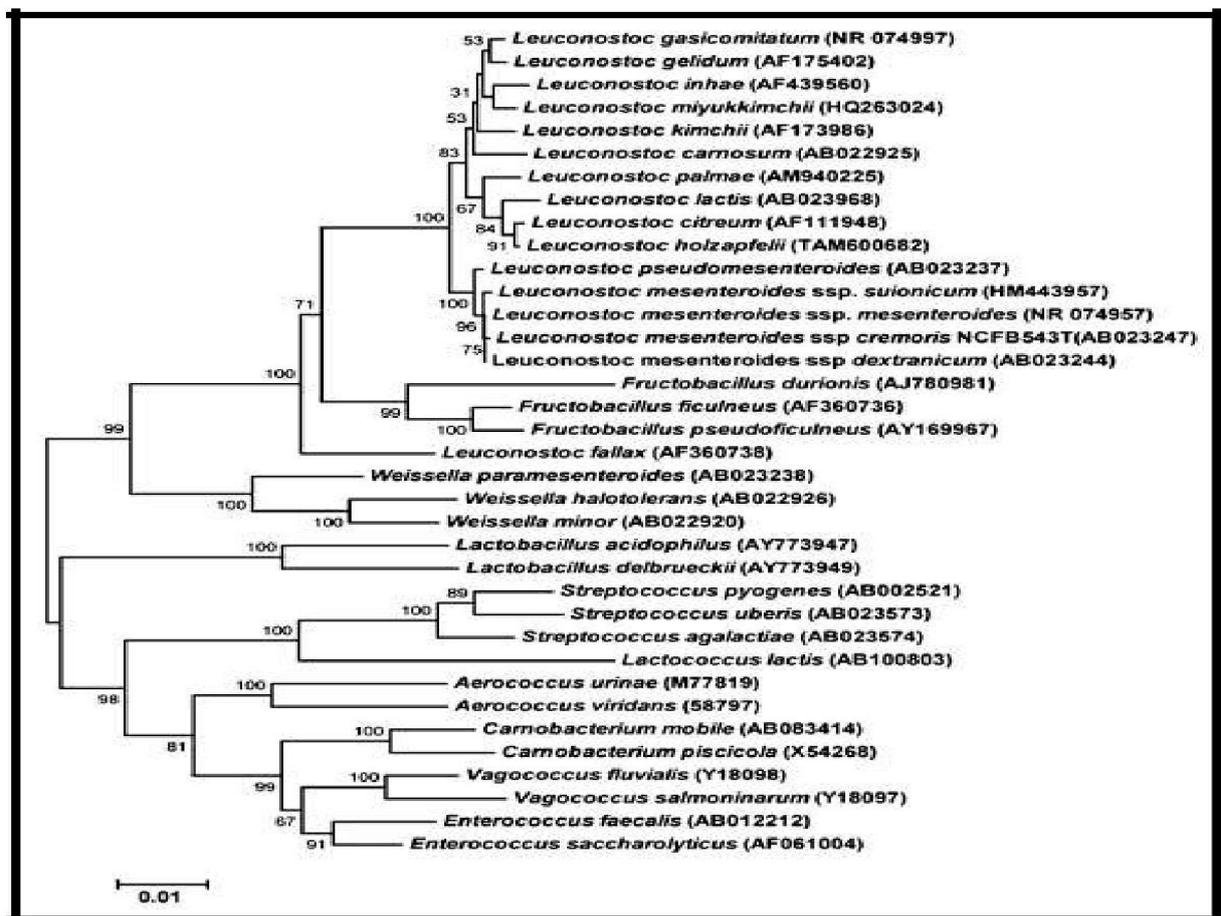


Figure 03 : Les relations phylogénétiques entre le genre *Leuconostoc* et d'autres genres de bactéries lactiques sur la base du séquençage des ARNr 16S (Zhang et Cai., 2014).

➤ Le genre *Weissella*

Les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont hétérofermentaires et sont généralement immobiles. Cependant, une nouvelle espèce mobile avec flagelles péritriches, *Weissella beninensis*, a récemment été décrite par Padonou et al en 2010. Les espèces du genre *Weissella* sont connues pour produire divers EPS (Lahtinem et al., 2012).

La température optimale de croissance est de 15°C, mais quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 45°C (Bjorkroth et Holzapfel., 2006; Lahtinem et al., 2012).

Les souches *W. beninensis*, *W. cibaria* et *W. thailandensis* peuvent pousser à 10% de NaCl (Zhang et Cai., 2014)

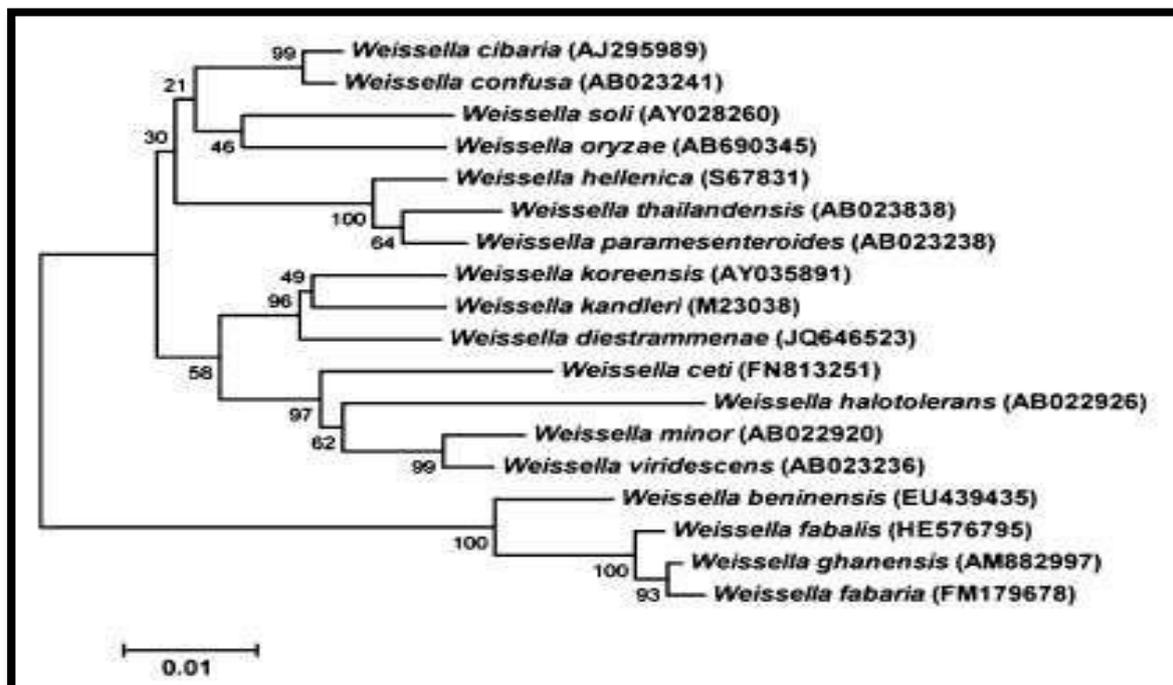


Figure 04 : Arbre phylogénétique représentant les relations entre les espèces de *Weissella* basée sur le séquençage des gènes ARNr 16S (Zhang et Cai., 2014).

➤ Le genre *Oenococcus*

Ce sont des bactéries immobiles, asporulées de forme ellipsoïdale à sphérique, avec un arrangement en paires ou en chaînes, non hémolytiques et généralement non protéolytiques. Elles exigent un milieu riche en acides aminés et en facteurs de croissance. Leur température optimale est de 20°C à 30°C, acidophiles poussant à un pH initial de 4,8.

Elles ont pour habitat le vin; par conséquence, elles tolèrent l'éthanol et se développent dans des milieux contenant 10% d'éthanol (**Bjorkroth et Holzapfel., 2006 ; Zhang et Cai., 2014**).

c .Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*

Ils étaient anciennement groupés en un seul genre *Streptococcus*. Ils sont très fréquents dans l'industrie alimentaire comme contaminant et surtout comme agents de fermentation homolactique (avec production d'acide lactique de type dextrogyre). Ils sont très exigeants sur le plan nutritionnel (**Salminen et al., 2004**).

➤ Le genre *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. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (**Pilet et al., 2005**). Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable.

Ce sont des bactéries anaérobies facultatives, homofermentaires, ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C ; certaines espèces peuvent pousser à des températures aussi basses que 7°C lors d'une incubation prolongée de 10 à 14 jours. Les cultures se développent typiquement dans 4,0% de NaCl; Toutefois, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ne tolère que 2,0% de NaCl, qui se trouve être la seule exception connue. Les Lactocoques poussent mieux à des valeurs de pH quasi-neutre et cessent de croître à un pH d'environ 4,5 (**Salminen et al., 2004 ; Teuber et Geis ., 2006 ;Schleifer et al., 2009 ; Lahtinem et al., 2012 ;Zhang et Cai., 2014**)

Elles ne poussent pas au pH 9,6 ou en présence de 6,5% de NaCl. Exepté l'espèce *Lactococcus garviae*, elles ne sont pas hémolytiques (Alomar., 2007).

Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime., 2002).

Le pourcentage GC de la l'ADN des espèces incluses dans ce genre est de 34 à 43% (Schleifer et al., 2009).

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend 11 espèces et sous-espèces reconnues: *Lc. chungangensis*, *Lc. fujiensis*, *Lc. garviae*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *hordniae*, *Lc.lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *tructae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum*, *Lc.raffinolactis* et *Lc. taiwanensis* (Fig.5) (Zhang et Cai., 2014).

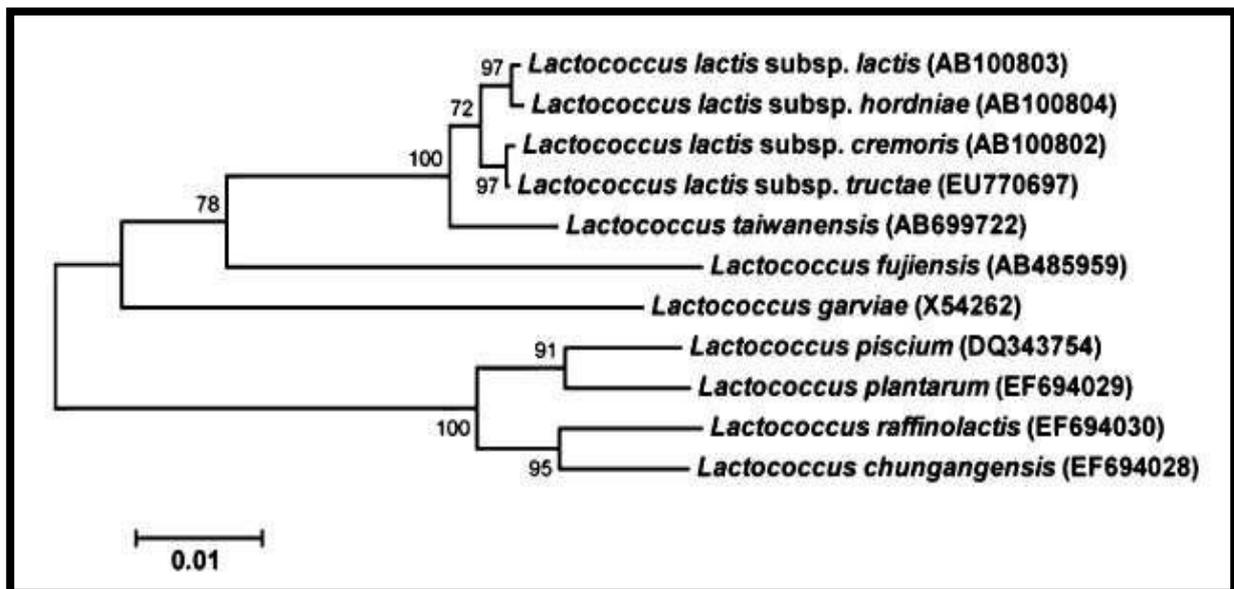


Figure 05: Les relations phylogénétiques entre les espèces du genre *Lactococcus* basé sur le séquençage des ARNr 16S (Zhang et Cai., 2014).

➤ Le genre *Enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes, homofermentaires. Quelques espèces sont mobiles par des petits flagelles et d'autres possèdent une pseudo-catalase. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6.5% de NaCl, au pH : 9,6 et par la croissance à 10°C et 45°C avec une température optimale de croissance de 35°C à 37°C (Tamime., 2002 ; Ho et al ., 2007 ; Devriese., 2006).

Actuellement le genre *Enterococcus* comprend 46 espèces validées dont l'un est composé de deux sous-espèces: *E. alcedinis*, *E. aquimarinus*, *E. asini*, *E. avium*, *E. caccae*, *E. camelliae*, *E. canintestini*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. devriesei*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. eurekensis*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hermannienseis*, *E. hirae*, *E. italicus*, *E. lactis*, *E. lemanii*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. oococcusvillorum*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. plantarum*, *E. pseudoavium*, *E. quebecensis*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. rivorum*, *E. rotai*, *E. subsp. saccharolyticus*, *E. subsp. taiwanensis*, *E. silesiacus*, *E. sulfureux*, *E. termitis*, *E. thailandicus*, *E. ureasiticus*, *E. ureilyticus* et *E. viikkiensis*. (Zhang et Cai., 2014).

Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *E. faecalis* et les espèces proches. Généralement les espèces sont différenciées par la fermentation de l'arabinose et du sorbitol (Tamime ., 2002 ; Ho et al., 2007).

➤ Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *S. salivarius*, *S. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer., 1987).

La seule espèce de streptocoque qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (Stiles et Holzappel., 1997).

Streptococcus thermophilus se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *S. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Haddie., 1986 ; Pilet et al ., 2005).

Tableau 02 : Caractéristiques des genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* d'après (Guiraud., 1998).

	<i>Enterococcus</i>			<i>Lactococcus</i>			<i>Streptococcus</i>					
	<i>Ec.durans</i>	<i>Ec.faecalis</i>	<i>Ec.faecium</i>	<i>Lc.lactis ssp cremoris</i>	<i>Lc.lactis ssp lactis</i>	<i>Lc. « diacetylactis »</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. loris</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. thermophilus</i>
Groupe sérologique	D	D	D	N	N	N	B	D	R	(B)	A	(B)
Hémolyse	aβ	β	(B)	γ	γ	γ	(B)	(B)	(B)	(B)	α	(B)
Croissance à 10°C	V	+	+	+	+	+	V	-	-	+	-	-
Croissance à 45°C	+	+	+	-	-	-	-	V	-	V	-	+
Croissance à pH 9.6	+	+	+	+	-	+	-	V	-	V	-	-
Croissance à 6% Na Cl	+	+	+	-	-	-	V	-	-	-	-	-
Croissance sur milieu bilie	+	+	+	-	-	-	V	+	-	V	-	-
Résistance 30min 60°C	V	+	+	V	V	V	-	+	-	-	-	+
Résistance à l'optochine	-	-	-	-	-	-	+	+	+	V	+	V
Croissance sur lait	V	+	+	+	V	+	-	-	-	-	-	-
Arginine	+	+	+	+	-	+	+	-	+	V	+	V
Résistance au tellurite	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse de l'hippurate	V	V	+	-	V	V	+	-	-	-	-	-
Réduction du TTC	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
Lait tournesolé	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	-	AC	-	-	A	AC
Lactose	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+
Maltose	(+)	(+)	(+)	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Acétoïne (VP)	V	V	V	+	-	-	V	V	-	-	-	V*
B-glucuronidase	-	-	-	-	-	-	(+)	+	+	-	(-)	-
Gélatinase	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-
Esculine	+	+	+	V	V	V	-	+	-	V	V	-

V: Variable; (+) positive pour la plupart des Souches ; A : Acidification ; R : Réduction ; C : Coagulation ; (.) : Non signalé; * : + sur citrate ; - : négative

d .Les genres *Pediococcus*, et *Tetragenococcus*

Ce sont des coques uniformément sphériques ou ovoïdes mais jamais allongés, dont la particularité est le regroupement en tétrade du a une division dans les deux directions perpendiculaires. Ainsi, ils ne forment jamais de chaînes typiques des autres genres de coques : *Leuconostoc*, *Lactococcus* et *Streptococcus*, qui forment des chaînes en raison de la division dans un seul plan. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs très élevées en sels, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

Les espèces du genre *Pediococcus* sont mésophiles, leur métabolisme est Homofermentaire, ne produisant pas de CO₂ à partir du glucose, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de

croissance. Poussant a un pH de 5 mais ne poussent pas à 9. Leur température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C. Ils ne sont pas en mesure de réduire le nitrate

Actuellement, le genre *Pediococcus* comprend 11 espèces : *P. acidilactici*, *P. argentinicus*, *P. cellicola*, *P. clausenii*, *P. damnosus*, *P. ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. siamensis* et *P. stilesii*

Ils possèdent un pourcentage en G+C de l'ADN compris entre 35 et 44% (Zhang et Cai., 2014). Ils appartiennent à la famille des Lactobacillaceae. La position phylogénétique du genre *Pediococcus* a été établie à l'aide de l'analyse de l'ARNr 16S et a montré que les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont étroitement liés (Fig.6) (Holzapfel et al., 2006 ;Holzapfel et al., 2009; Lahtinem et al ., 2012).

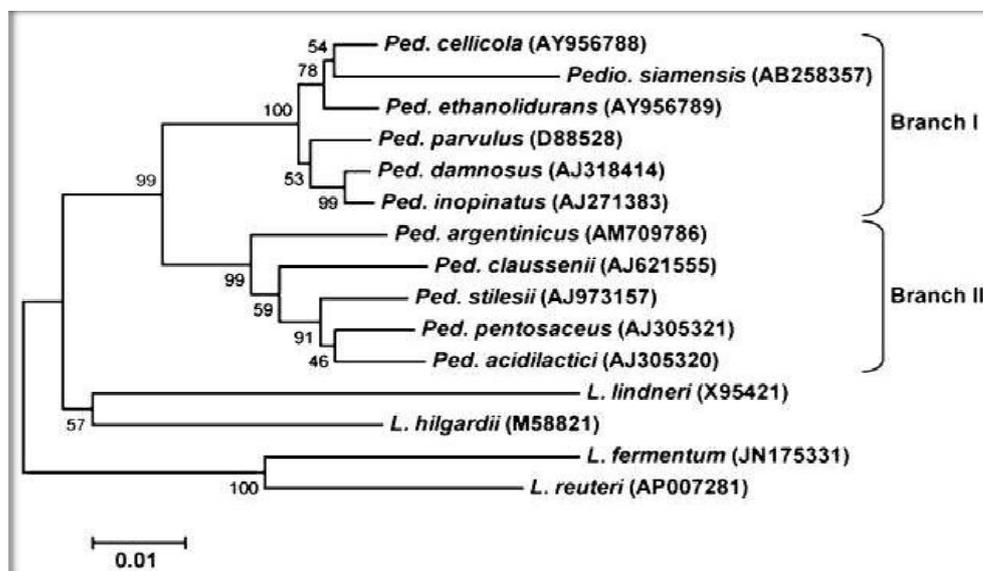


Figure 06: Les relations phylogénétiques entre les espèces du genre *Pediococcus* et quelques espèces du genre *Lactobacillus* basé sur le séquençage des ARNr 16S (Zhang et Cai., 2014).

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

e. Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa

présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*)

Les bifidobactéries ont été découverts pour la première fois dans les fèces de bébés nourris au lait maternel par Tissier (1900), qui a isolé une bactérie avec une forme étrange et caractéristique en « Y » (**Zhang et Cai ., 2014**). Ce sont des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage en G +C (46-67%). Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière en forme de V, X ou Y ressemblant a des branches mais pouvant être coccoïdes (**Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al ., 2007**).

Leur morphologie est généralement appelée bifide. La raison réelle pour la forme irrégulière de bifidobactéries n'est pas encore clairement comprise. Cependant, quelques études ont révélé que l'absence ou la faible concentration du N-acétylamino « impliqué dans la synthèse des peptidoglycanes », les ions Ca^{2+} ou des acides aminés dans les milieux de croissance peut induire a la forme bifide (**Zhang et Cai ; 2014**).

La présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. (**Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007**).

Actuellement, le genre *Bifidobacterium* comprend 41 espèces et neuf sous-espèces. Celles-ci ont été isolées à partir du tractus gastro-intestinal des humains, des animaux et des insectes mais aussi de caries dentaires humaines et des produits laitiers.

La majorité des espèces sont anaérobies stricts, mais certaines espèces, telles que *B.psychraerophilum*, *B. scardovii* et *B. tsurumiense*, peuvent tolérer l'oxygène et croître dans des conditions aérobies. La température optimale de croissance est de 37 à 41° C pour la plupart des espèces avec une température minimale de croissance de 25°C et maximale de 45°C. Il est à noter que *B. psychraerophilum* peut croître à 8° C et *B. thermacidophilum* à 49,5°C. Le pH optimal de croissance est de 6,5 à 7,0 (**Zhang et Cai., 2014**).

Traditionnellement, les espèces de *Bifidobacterium* ont été identifiés sur la base de l'hôte à partir duquel ils ont été isolé, leur morphologie cellulaire, le type fermentaire ou par leur capacité à utiliser divers sucre. Malheureusement, toutes ces méthodes phénotypiques manquent de reproductibilité car ils varient en fonction de la culture et des conditions utilisées

dans les différents laboratoires et même entre les isolats de la même espèce (**Zhang et Cai., 2014**).

Au cours de la dernière décennie, le développement des outils de biologie moléculaire a conduit à des modifications profondes dans les méthodes d'identification de ces bactéries et a donné lieu à divers ajustements dans leur classification. L'identification génotypique, méthodes utilisant les gènes 16S et 23S de l'ARNr sont plus précises, même si elles ne peuvent pas distinguer clairement entre toutes les espèces de *Bifidobacterium*, par exemple, *B. Catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*,

B. adolescentis, *B. stercoris*, *B. coryneforme* et *B.indicum*, ont montré plus de 99% d'homologie (**Zhang et Cai., 2014**).

Une analyse phylogénétique basée sur le séquençage des gènes de l'ARNr 16S des 46 espèces et sous-espèces actuellement reconnues du genre *Bifidobacterium* a abouti à un arbre phylogénétique qui est en accord avec les analyses taxonomiques décrites précédemment. Selon leur relations phylogénétiques, les 46 espèces et sous-espèces du genre *Bifidobacterium* pourrait être divisé en 8 groupes phylogénétiques et 11 espèces simples (**Zhang et Cai ., 2014**).

f. Le genre *Aerococcus*

Les cellules de ce genre sont de forme ovoïde (1-2µm de diamètre), immobiles, anaérobies facultatifs, catalase-négative, oxydase négative, α- hémolytiques, homofermentaires, arginine(-), pouvant croître à une concentration de 6,5% de NaCl, la division se déroule sur deux plans formant ainsi des tétrades. Cependant, des cellules isolées ou en paires peuvent être observées au milieu de la phase exponentielle (**Collins et Falsen., 2009**)

g. Le genre *Carnobacterium*

Ce genre est constitué de bâtonnets courts parfois incurvés isolés ou en paires, psychrotolérants, pouvant se développer à pH : 9 mais pas à 4,5 incapables de croître à 8% de NaCl ; quelques espèces sont catalase (+) en présence d'hème (**Hammes et Hertel., 2006**).

h. Le genre *Vagococcus*

Les cellules sont ovoïdes isolées, en paires ou en chaînes. La plupart des espèces sont mobiles par des flagelles péritriches. Elles sont capables de croître à 10°C mais pas à 45°C, homofermentaires et ADH (-) (Collins.,2009).

6. Les voies du métabolisme des sucres chez les BL

Le terme BL regroupe des micro-organismes appartenant aux différents genres ayant l'aptitude à fermenter les carbohydrates en acide lactique. Ces carbohydrates peuvent être des monosaccharides tels que les hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), des hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccharides (lactose, saccharose, cellobiose, maltose, tréhalose). Le catabolisme des sucres fournit l'énergie nécessaire à l'anabolisme sous forme d'ATP et génèrent des coenzymes réduits sous forme de NADH essentiellement (Loubière et Bousquet., 2009).

Deux systèmes de transport actifs des sucres sont présents chez les BL : le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS), qui couple le transport et la phosphorylation du glucide et le système perméase énergie dépendant, qui fait pénétrer les glucides sous forme de sucres libres (Konings et al., 1994). L'une des caractéristiques principales des BL est qu'elles ne sont pas capables d'utiliser qu'un nombre plutôt réduit de source de carbone *via* des voies métaboliques linéaires relativement simples. Suivant les genres ou les espèces, trois voies du métabolisme des sucres sont utilisées : la voie homofermentaire, la voie hétérofermentaire et la voie bifide (fig.7). (Thomson et Gentry-Weeks., 1994).

❖ Voie homofermentaire ou EMP

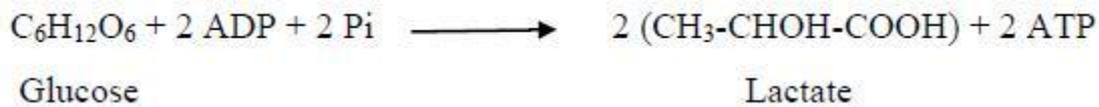
Toutes les bactéries lactiques à l'exception des genres : *Leuconstoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et certaines espèces du genre *Lactobacillus*, entravent la voie de la glycolyse pour dégrader les hexoses (ex : glucose)

La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA), est une enzyme clé présente chez toutes les espèces homofermentaires et indispensable au fonctionnement de la voie EMP.

Après son transfert vers la cellule, le glucose subit une phosphorylation pour se transformer en fructose qui est à son tour phosphorylé en fructose 1-6 biphosphate (FBP) puis

clivé en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et glycéraldéhyde phosphate (GAP). Ces deux derniers sont convertis en pyruvate.

Le pyruvate est dans une dernière étape réduit en acide lactique qui est le produit unique: c'est la fermentation homolactique (**Mozzi et al ; 2010**).



Dans les conditions défavorables telles la limitation du glucose, ces bactéries produisent également l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol et/ou le CO₂ par la voie de fermentation des acides mixtes (**Mozzi et al ; 2010**).

❖ La voie hétérofermentaire

Les bactéries lactiques hétérofermentaires utilisent les voies du tagatose-6-phosphate, de la glycolyse et des pentoses phosphates. Le résultat de la fermentation lactique aboutit à la formation de quantité équimolaire de lactate, d'éthanol et de gaz carbonique. Une production de formate et d'acétate peut avoir lieu, notamment en aérobiose (**Desmazeaud ; 1996**).

Le métabolisme hétérofermentaire est deux fois moins énergétique que le métabolisme homofermentaire puisqu'une mole de glucose conduit à la production d'une mole de lactate, d'éthanol, de CO₂ et d'un seul ATP (**Raynaud ; 2006**).



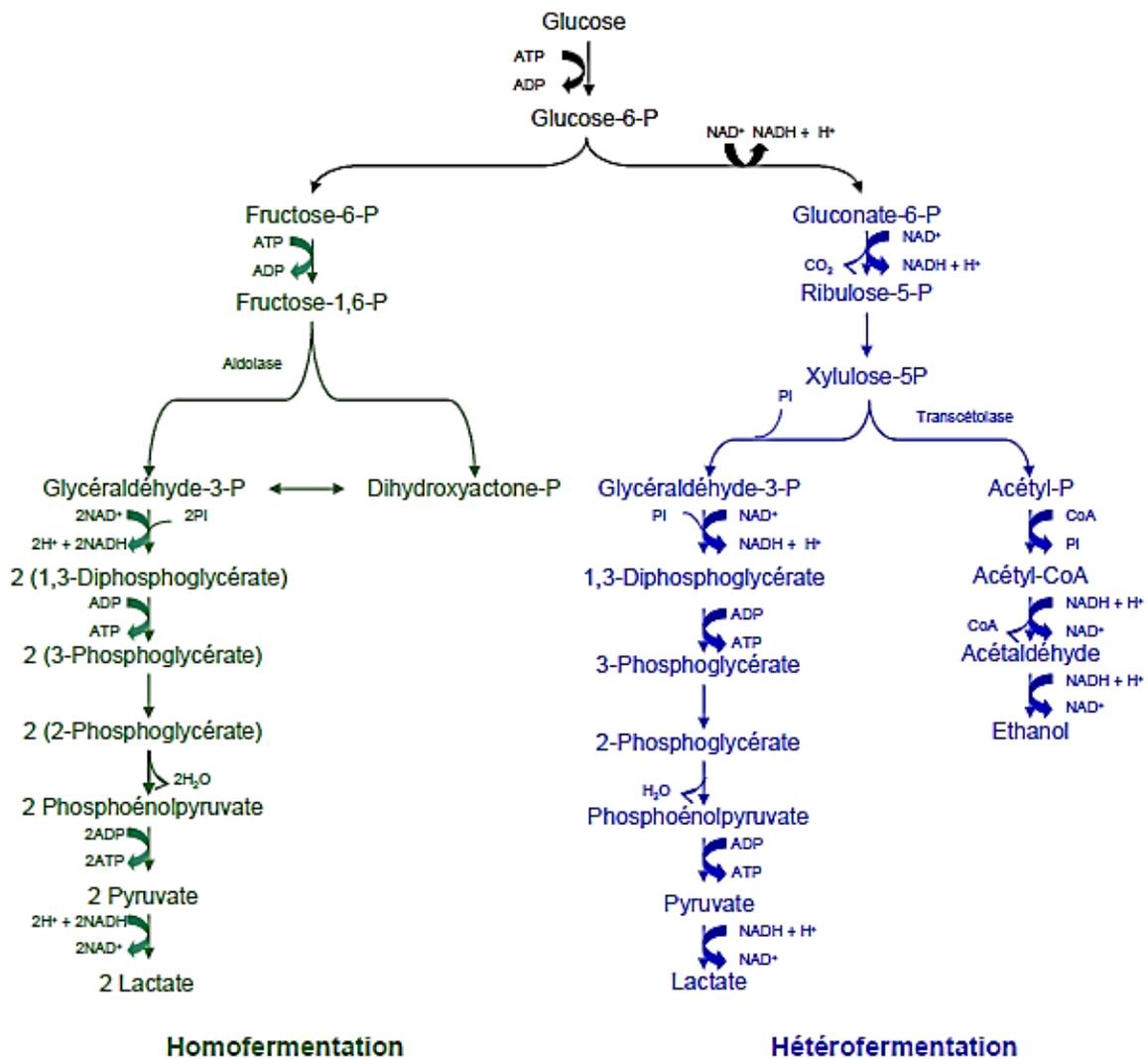


Figure 07 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques. (Makhloufi, 2012).

ATP : adénosine triphosphate.

ADP : adénosine diphosphate.

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

Pi : phosphate inorganique

7. Rôle et intérêt des bactéries lactiques

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

➤ Dans le domaine alimentaire

L'implication des bactéries lactiques dans la fermentation et la bioconservation des aliments est connue depuis la nuit des temps. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés. Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain sont entre autres des produits de fermentation des bactéries lactiques (Yateem *et al.*, 2008). A la capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques par production en dehors de l'acide lactique, d'autres produits tels que le diacétyl et l'acétaldéhyde, qui responsable des saveurs caractéristiques. (Boudjemaa., 2008). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, innocuité, facilité de culture, de conservation, et maintenance des propriétés désirables lors du stockage (Marth et Steele., 2001).

➤ Domaine de thérapeutique

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff, selon lui les *Lactobacillus sp* pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant la flore intestinale. Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques. Les bienfaits des bactéries lactiques sont de plus en plus étudiés, certains sont bien établis d'autres restent encore controversés (Calvez *et al.*, 2009). Différentes études ont démontré aussi bien le rôle préventif que curatif de ces bactéries sur différents types de diarrhées (Mkrtychyan *et al.*, 2010). D'autres ont cité leur capacité à diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish *et al.*, 2011). Cependant depuis quelques années l'usage des bactéries lactiques dans d'autres écosystèmes (vaginal, mammaire) est évalué, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques (contre les métrites ou les mammites), également dans l'élaboration des vaccins (Calvez *et al.*, 2009).

Chapitre II

Produits fermentés

La conservation des légumes et fruits par fermentation remonte à l'antiquité et trouve son origine en orient. Ce procédé a longtemps été le principal mode de conservation dans différentes parties du monde. Appliquée essentiellement à la choucroute, aux concombres et aux olives, elle devrait également permettre de créer de nouveaux produits à partir d'autres légumes. Cette pratique est la richesse de différents pays à travers le monde en matière de nutrition. (**Latifa Bousmaha et al., 2009**)

1. Définition

1.1 Concombre :

Le concombre est une plante potagère de la famille cucurbitacées. Espèce originaire de l'inde. Très répandu dans les régions littorales et sub-littorales, mais il est également cultivé dans les zones intérieures et sahariennes, la température de culture sont comprises entre 20 à 35 °C. La caractéristique de ce légume est qu'il représente un nombre de graines au gramme de 30 à 35, il a une température de germination optimum de 28-30 C°, la longévité moyenne de la graine est de 8 à 10 ans et enfin sont cycle végétatif est de 60 à 70 jours. (**ITCM., 2010**)

1.2 Carotte :

La carotte (*Daucus carota* L.) est le principal légume racine cultivé dans le monde après la pomme de terre (**Villeneuve et al., 1992**). Appartenant à la vaste famille des Apiaceae (ou Umbellifères), elle est répandue sous sa forme primitive dans toute l'Europe, le bassin méditerranéen, l'Afrique du Nord, l'Asie centrale et l'Asie du Sud-Est (**Heywood., 1983**). Contrairement à la forme sauvage, les variétés cultivées accumulent des réserves sous la forme d'une racine principale tubérisée, pigmentée, pivotante et non ramifiée, correspondant à la partie consommée appréciée pour ses qualités gustatives et nutritionnelles exceptionnelles. La forme recherchée pour le marché de frais actuel est le type « nantais » (racines cylindriques, boutées, lisses et bien colorées). La carotte est présente sous forme (**Villeneuve et al., 1992**). e de fleur en ombelle, caractérisée par la présence de bractées qui sont des petites feuilles sous l'ombelle pouvant être absentes dans certains genres. Présente d'une racine pivotante et de canaux sécréteurs et /ou résines (**Carbiener., 2010**).

2. Les variétés :

2.1 Concombre :

Sur les étals, on en distingue deux ou trois types : le concombre dit « hollandais » (le plus courant), le concombre épineux et le mini-concombre.

2.1.1 Le concombre « hollandais »

Comme son nom l'indique, ce concombre est apparu aux Pays-Bas, après la Seconde Guerre mondiale. Dépourvu d'amertume, il fut aussitôt plébiscité. Aujourd'hui, il représente 80 % de la production française. Généralement cultivé sous abri, il est droit, long et lisse.

2.1.2 Le concombre épineux

Le concombre épineux doit son nom aux quelques épines isolées (et complètement inoffensives) qui garnissent une partie de sa peau. Court, trapu, il ressemble au cornichon. Sa chair granuleuse, légèrement amère, a une saveur très marquée. Il est surtout apprécié dans le midi de la France où il pousse en plein champ.

2.1.3 Le mini-concombre

Le mini-concombre est goûteux et très pratique à l'apéritif. Il reste cependant assez confidentiel.

2.1.4 Les autres variétés :

A côté de ces variétés classiques, on trouve aussi d'autres concombres plus « exotiques ». Parmi eux, citons :

- Le concombre Arménien ou concombre serpent (long et recourbé à la saveur de melon)
- Le Ti-concombre Antillais (appelé aussi massici, il est vert pâle, petit, rond et épineux)
- Le concombre porte-corne ou métulon, plus connu sous sa marque commerciale néo-zélandaise de kiwano. Sa peau est orange et sa chair verte et très granuleuse. **(Les fruits et légumes frais interfal)**

2.2 Carotte :

La carotte est cultivée pratiquement partout sur la planète. Et elle fait partie des légumes les plus consommés dans le monde. Aujourd'hui, on ne dénombre pas moins de 500 variétés

de carotte dans le monde (FAO., 2016). Les variétés actuelles sont dominées pour le marché de frais par le type demi-longueur naitaise en carotte de primeur. Les variétés de saison nous citons Napoli. Presto. Premia. Carlo.....etc(Reduron., 2007).

3. Un peu historique :

3.1 Concombre :

Le concombre originaire de l'Inde, il est cultivé depuis très longtemps dans ce pays. Le concombre connu en France depuis le 6^{ème} siècle puis s'est très tôt propagé vers la Chine et le Moyen-Orient. Il est ensuite cultivé sur les bords du Nil par les Égyptiens, qui en consomment beaucoup et le remettent en offrandes à leurs dieux. Les Hébreux l'importent également en Terre promise, où il devient l'un de leurs mets préférés.

Durant l'Antiquité, Grecs et Romains apprécient aussi beaucoup le concombre, malgré sa forte amertume. Pline rapporte même que l'empereur Tibère s'en régalaient quotidiennement, et que les jardiniers le faisaient pousser sous cloche pour accélérer sa croissance. En France, on trouve mention officielle de sa présence dès le 9^{ème} siècle, lorsque Charlemagne en ordonne la culture dans ses domaines. Au 17^{ème} siècle, Louis XIV en est également très friand. Pour le lui servir en « primeur », La Quintinie, le jardinier en chef de Versailles, développera alors la production sous serre.

3.2 Carotte :

Les habitants du bassin méditerranéen ont commencé à consommer la carotte bien longtemps avant notre ère. Mais Grecs et Romains ne semblaient guère l'apprécier. Il faut dire qu'à cette époque, les carottes avaient une couleur blanchâtre, une peau assez coriace, et un cœur très fibreux.

À la Renaissance, on parviendra à améliorer l'espèce et à rendre la carotte plus savoureuse. Mais ce n'est qu'à partir du milieu du 19^{ème} siècle que la carotte va acquérir sa belle couleur rouge orangé, et devenir enfin le tendre légume que nous connaissons. **(Les fruits et légumes frais interfal)**

Tableau 03 : exemple des produits végétaux fermentés consommés dans le Monde (Amandine., 2017).

Produit fermenté	Pays	Fruit/ légume/ légumineuse/ végétal
Almagro	Espagne	Aubergine
Choucroute	Monde entier	Chou
Concombres	Europe, Etats-Unis	Concombre
Dhamuoi	Vietnam	Chou et autre légume
Fu-tsai	Taiwan	Moutarde
Fufu	Nigéria	Manioc
Jiang –gua	Taiwan	Concombre
Khalpi	Népal	Concombre
Kanji (boisson)	Inde	Racine de betterave et carotte
Tursu	Turquie	Concombre, chou, tomate vertes, poivrons verts et autre légumes
Pickles	Concombre, cornichons	Monde entier

5. Bénéfices nutritionnels et effet santé des aliments végétaux fermentés :

5.1 L'amélioration des propriétés sensorielles :

Les produits fermentés sont caractérisés par des textures, des saveurs, des odeurs et des goûts uniques. Les propriétés sensorielles des aliments fermentés résultent des molécules et

des métabolites produits pendant la fermentation (EPS, composés aromatiques, acide organiques etc). Les composés aromatiques formés pendant la fermentation peuvent être alcools, des aldéhydes, des cétones, des esters, des acides gras ou des composés sulfurés. (smid EJ *et al.*, 2014)

5.2 L'amélioration de la digestibilité

Certaines bactéries lactiques possèdent plusieurs enzymes intracellulaires et extracellulaires permettant de mieux digérer des aliments comme les α -amylase, les pectinases, les phytases et les protéinases. Ces bactéries lactiques utilisent l' α -amylase pour hydrolyser l'amidon, et transforment les molécules de glucose ainsi libérées en acide lactique au cours de la fermentation. Les protéases permettent d'hydrolyser les protéines végétales pendant la fermentation et certains composés indigestes comme les composés sulfurés. (Reddy G *et al.*, 2008)

5.3 Augmentation de la capacité antioxydant

L'augmentation de l'activité antioxydante observée pendant la fermentation lactique est principalement due à la dépolymérisation de composés phénolique. (Hur SJ *et al.*, 2014). Pendant la fermentation lactique des végétaux, les bactéries lactiques sont capables d'hydrolyser les composés phénoliques présents sous forme de polymères, libérant ainsi des molécules bioactives en augmentant leur biodisponibilité. Plusieurs enzymes impliquées dans ces mécanismes d'hydrolyses ont été caractérisées, telles que la féruloyl estérase, la glucosidase, la tanase et la phenolic acid decarboxylase (PAD). (Rodrigues *et al.*, 2009). après la fermentation lactique, plusieurs nouveaux composés phénolique qui n'étaient pas présent à l'origine dans le produit frais, sont apparus tels que tyrosol et la quercétine dans la fermentation lactique du nièbé (ou cornille, espèce végétal originaire de d'Afrique). De plus, la teneur de certains glycosides de quercétine a diminué. (Duenas *et al.*, 2005)

5.4 La préservation et la duré de conservation

La durée de conservation d'un aliment est définie comme la période pendant laquelle l'aliment reste consommable, sûr pour santé, sans aucun risque pathogène (innocuite) et gardant l'ensemble de ses propriétés sensorielles et nutritionnelles (salubrité). Plusieurs facteurs peuvent affecter la durée de conservation d'un aliment comme le PH, l'activité de l'eau, la quantité d'oxygène disponible et la microflore de l'aliment. D'autre part, les fruits et

les légumes frais sont associés à plusieurs dangers pathogènes, tels que les salmonelles ou E.coli.

L'augmentation de la durée de conservation est le principal objectif de la fermentation lactique. La production d'acide pendant la fermentation diminue le PH et crée un environnement acide non propice à la croissance des autres microorganismes contaminants et pathogènes. **(Di Cagno et al., 2016)**. De plus, la production des bactériocines par certaines bactéries lactiques joue un rôle considérable dans la préservation du produit Elle est utilisée la fermentation lactique pour la biopréservation des produits car elle augmente la durée du stockage ainsi que la qualité finale du produit en utilisant la microflore naturelle ainsi que les produits antibactériens produits. **(Latifa Bousmaha et al., 2009)**. La biopréservation appelée aussi bioconservation, est une méthode de préservation des aliments par des microorganismes appelés protectrices. **(Leroi et al., 2015)**. Les bactéries lactiques sont de potentiels candidats pour la biopréservation des aliments. **(Ghanbari et al., 2013)**.

6. les microorganismes impliqués dans la fermentation

Les BL dominent les fermentations spontanées de fruits et légumes (légumes à feuilles, chou, chou-fleur, radis, olives, concombre, brocoli etc) car elles sont caractérisées par un plus fort taux de croissance et sont plus tolérantes au sel que les autre microorganismes, les genres *lactobacillus*, *pediococcus*, *leuconostoc*, *weissella*, *enterococcus* et *lactococcus* sont les plus majoritairement retrouvés. **(Tamang et al., 2016)** Mais les *lactobacillus* restent prédominante. *Lc.mesenteroides* est généralement l'espèce prédominante au début des fermentations de végétaux, généralement les bactéries lactiques terminent les fermentations des végétaux, car ilsont plus tolérant à un faible P H **(Tab.04)**. **(Tamang et al., 2010)**

Tableau 04 : bactéries lactiques impliquées dans différents produits alimentaires à base de fruits et légumes obtenue par fermentation lactiques

produits fermentés	Ingrédients crus	Mico-organismes fermentant	Référence
Almagro	Aubergines	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lb.brevis</i> , <i>Lb.plantarum</i> , <i>Lb.pentosus</i>	Sanchez I et al ; 2000
Khalpi	Concombre	<i>Lc. Fallax</i> , <i>Lb.brevis</i> , <i>Lb.plantarum</i> ,	Tamang B et al ; 2010
Jiang-gua	Concombre	<i>W. cibaria</i> , <i>W.hellenica</i> , <i>lc lactis</i> , <i>Ec.casseliflavus</i> <i>Lb.plantarum</i>	Chen YS et al ; 2012
Pickles	Concombres, cornichons	<i>Lb.plantarum</i> , <i>Pc.</i> <i>Cerevisiae</i>	Caplice et Fitzgerald ; 1999
Olives	Olives vertes	<i>Leuconostoc Cerevisiae</i> , <i>Lb.plantarum</i>	Montet D et al ; 2014
Ekung	Pousses de bambou	<i>Lb.brevis</i> , <i>Lb.plantarum</i> , <i>Lb .casei</i>	Tamang JB et al ; 2016
Choucroute	chou	<i>Lb.brevis</i> , <i>Lb.plantarum</i> , <i>Lb. Rhamnosus</i> , <i>Lc.</i> <i>mesentersoide</i>	Caplice et Fitzgerald ;1999

Chapitre III

Matériel et méthodes

Objectif

Les objectifs de cette étude se basent autour des points suivant :

- Isolement des bactéries lactiques à partir de différents échantillons de légume fermenté : la carotte et le concombre
- L'étude des caractéristiques phénotypiques, physiologiques et biochimiques des isolats.
- L'identification phénotypique, physiologique, et biochimique des bactéries lactiques thermophiles et mésophiles à partir du carotte et concombre fermentés.

Lieu et période d'étude

L'intégralité de ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie et de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre de l'université Djilali Bounaama, Khemis Miliana. Durant une période de deux mois allant du 14 Avril jusqu'au 25 juin 2019.

1. Matériel

Source de légumes

Tous les légumes de carotte et concombre ont été cultivés dans la région Ain Defla et provenaient des récoltes de 2019. Afin d'obtenir des données représentatives, les légumes ont été achetés dans les grands marchés d'alimentation de la région Ain defla.

Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale dont les principaux sont les suivants :

- Le milieu MRS à pH=6,8 a été utilisé pour la croissance de la microflore lactique totale, les lactobacilles sont énumérés sur milieu MRS acidifié à pH=5,4 (**De Man et al ; 1960**).
- Milieu M17 Gélosé et en bouillon
- Milieu MRS en bouillon

La stérilisation des milieux est réalisée par autoclave à 120°C pendant 20 min.

Souches de référence

Pour les tests de l'activité antibactérienne, nous avons testé deux microorganismes pathogènes : *Escherichia coli* isolée cliniquement du laboratoire d'analyses médicales de docteur ZIBOUCHE, Ain Defla et la souche de référence *Bacillus subtilis*

2. Méthodes

2.1 Fabrication de carotte et concombre fermentés

1. Lavez vos légumes et pelez ceux qui le nécessitent. Râpez ou émincez finement vos légumes. Pesez-les et pesez le sel à raison d'un 30g de sel pour 1kg de légumes et 1L d'eau (si vous souhaitez des légumes plus croquants augmentez un peu le sel).

2. Remplissez vos bocaux jusqu'en haut en tassant bien les légumes et en laissant seulement 1 cm d'espace entre le haut des légumes et le couvercle. Si le ou les légumes ne sont pas assez aqueux ajoutez un 1L de saumure (1L de l'eau distillés et 30g de sel). Fermez le pot.

3. Entreposez autour de 20° pendant 5 jours (la température idéale se situe entre 18° et 22°, au départ il est important que la température soit supérieur à 15° pour que la fermentation puisse démarrer rapidement) puis dans un endroit plus frais autour de 12° pendant 2 semaines. Lors de la première phase placez votre pot sur une assiette et à l'abri de la lumière. Au bout de 2 à 3 jours, la fermentation très active fera certainement sortir un peu d'eau mousseuse par le joint tout en évacuant le gaz carbonique produit par la fermentation. L'important étant que l'air ne rentre pas dans le pot puisque la fermentation doit se faire en anaérobie.

4. Le stockage pour une période plus longue jusqu'à plus d'un an doit se faire dans un endroit frais en dessous de 10° et à l'abri de la lumière.

Les étapes de fermentation de carotte et concombre

Concombre

Carotte



Rinçage



Découpage



Salage



Encuvage



Conditionnement



2.2 Isolement des bactéries lactiques

❖ Préparation dilutions décimales

Après homogénéisation du bocal, 1ml de l'échantillon est pipeté aseptiquement dans 9ml d'eau physiologique et des dilutions décimales sont réalisées de 10^{-1} à 10^{-6} .

❖ Ensemencement et isolement des souches lactiques

L'ensemencement a été réalisé à partir de quatre dilutions décimales: 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} , 10^{-5} , par la technique d'ensemencement en masse. Chaque dilution a été ensemencé sur deux milieux gélosés MRS et M17. L'incubation est faite à 37°C pendant 48h .et 30°C (**Kacem et Karam., 2006 ; Cheriguene et al., 2007 ; Idoui et al ., 2009**).

Après incubation, les colonies obtenues ont été sélectionnées après analyse macroscopique, coloration de Gram et test de catalase. Seules ceux qui présentent un aspect typique des colonies de bactéries lactiques, et qui ont Gram + et catalase -, ont été présumées comme étant des bactéries lactiques, et ont été pris et mis isolément dans des tubes contenant le bouillon MRS ou M17 pour leur enrichissement.

2.3 Purification des isolats

La purification des souches isolées a été réalisée par repiquages successifs sur gélose MRS et M17 par la méthode des stries. La pureté des souches est révélée par la présence sur gélose de colonies homogènes ayant le même aspect, la même couleur, la même taille et la même forme (**Guiraud., 2004**).

L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une culture pure dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram (**Heleni et al., 2006**) et l'aspect caractéristique de la culture des bactéries lactiques en bouillon.

2.4 Conservation des isolats :

❖ A court terme

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

❖ A longue durée

A partir des cultures jeunes (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot.

les cellules des isolats purifiés sont congelée à -20°C dans un milieu contenant 70% de lait écrémé (enrichi par 0.05 % d'extrait de levure) et 30% de glycérol (Samelis *et al.*, 1994) . En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé à 0,5% d'extrait de levure, avant utilisation (fig.8)

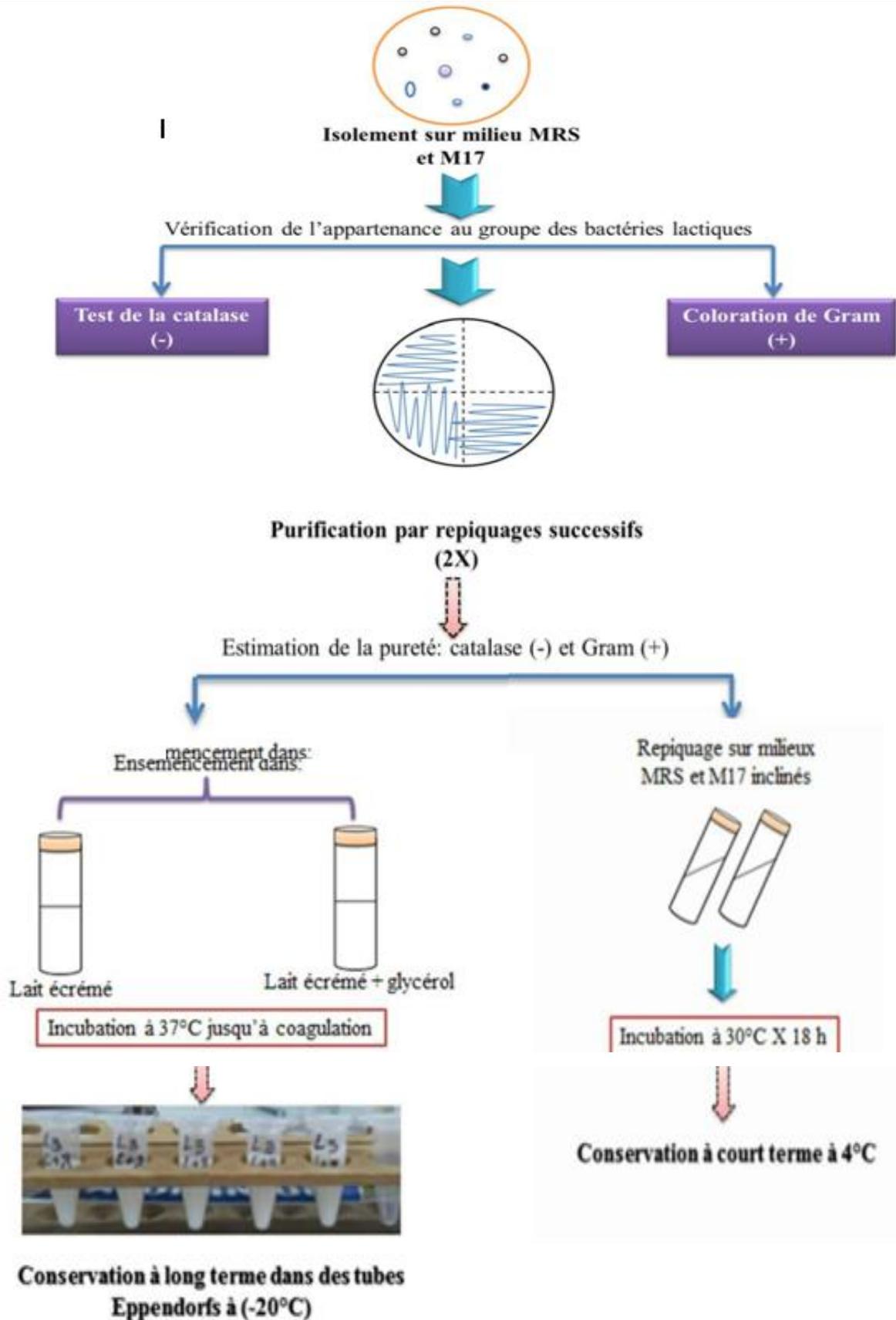


Figure 08: Isolement, purification et conservation des isolats des bactéries lactiques.

2.5 Identification des souches

Suite à la purification des isolats, 20 souches ont été retenues, dont nous avons étudié les genres conformément au protocole de (Carr *et al.*, 2002).

2.5.1 Critères morphologique

❖ Caractérisation macroscopique

C'est une observation visuelle des colonies sur la surface des milieux MRS et M17 solides, pour caractériser leurs formes, leurs tailles, leurs contours et leurs couleurs (Badis *et al.*, 2005)

❖ Caractérisation microscopique

Ce test permet de mettre en évidence la morphologie de colonie obtenue sur des milieux solides, il s'agit d'une observation à l'œil nu qui consiste à déterminer les paramètres suivants (Taille, couleur et forme des colonies).

❖ La coloration de Gram

C'est une coloration classique en microbiologie. Elle permet de distinguer deux (2) types de bactéries, les bactéries Gram négatifs (G^-) et les bactéries Gram positives (G^+). Celles-ci diffèrent de par la composition de leur paroi, notamment par l'épaisseur du peptidoglycane, ou la présence d'une membrane externe (Larpent., 1997).

Technique

- La première étape de la coloration consiste à réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune (sur un milieu solide) et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette stérile) puis on étale sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame.
- La seconde étape nécessite le séchage et la fixation par la chaleur (pour tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique, et les faire adhérer à la lame).
- La troisième étape nécessite quelques gouttes de violet de gentiane sur un frotti fixé pendant une minute, après rinçage, on ajoute de Lugol (solution aqueuse d'iode et D'iodure de potassium) pendant 30 secondes.
- La quatrième étape, à savoir le bain d'alcool 90°, (ne va traverser que la paroi de certaines bactéries « les Gram⁻ », et décolorer leur cytoplasme). Puis on rince avec de l'eau distillée.
- En fin, quelques gouttes de fuchsine de Ziehl sont versées sur la lame qu'on laisse agir une minute. La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique.

2.5.2 Critères physiologiques et biochimiques

❖ Test de la catalase

La catalase permet la décomposition de l'eau oxygénée selon la réaction :



L'activité catalasique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en déposant une à deux colonies de l'isolat de la souche à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée (**Guiraud., 2003**).

Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) des autres bactéries.

❖ Test d'oxydase

Il consiste à prendre une partie d'une colonie pure du milieu MRS ou M17 gélosé et la mettre en contact avec un disque « Ox ». Le développement d'une couleur violette signifie que le test est positif et que l'isolat possède l'enzyme cytochrome oxydase (**Kovacs et al., 1995**).

❖ Croissance à différentes températures et thermorésistante

Ce test est important de point de vue taxonomique, car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermotolérantes (**Leveau et al., 1991**).

La croissance bactérienne est évaluée par un trouble en milieu MRS après 5 jours d'incubation à 4°C, 15°C, 37°C, 30°C et 45°C (**Guessas et Kihal., 2004**).

Alors que la thermorésistance des bactéries a été testée au bain- marie à 63.5°C/30 minutes puis ré-incubée à 30°C/24h à 48h (**Guiraud., 2003**).

❖ Croissance à pH 4,4 / 4,9 et 9 / 9,6

Ce test a été réalisé sur bouillon MRS, dont le pH est ajusté à **pH 4,4 / 4,9 et 9/9,6** sont ensemencées et incubées à 30°C avec un témoin MRS liquide pendant 5 jours (**Guessas et Kihal., 2006**).

La croissance des bactéries est appréciée par l'apparition d'un trouble dans les tubes (**Rouisset Et Bensoltane., 2006**).

❖ Croissance sur le lait bleu de Sherman (1937)

Tester le développement en présence 1% et 3% de bleu de méthylène. Du lait écrémé additionné de 0,1% et/ou 0,3% de bleu de méthylène (1ml de solution à 1% et/ou 3% par tube de 9ml de lait) est ensemencé et incubé durant une période de 24 à 48h à 30°C. *Lactococcus lactis* est capable de pousser en présence de 0,3% de bleu de méthylène (**Leveau et al., 1991**).

Le bleu de méthylène tire sa couleur grâce à l'oxygène, ce test porte toujours sur le système respiratoire des *Lactocoques*, car vu que se sont des microaérophiles, ils ne vont utiliser qu'une partie de l'oxygène présent dans le méthylène (0.1%) et de ce fait la couleur du lait (bleu) virera vers le blanc. Seul certaines espèces sont capables de ce développer (**Guiraud., 1998**).

❖ Test mannitol-mobilité

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 30°C. La gélose semi solide mannitol mobilité permet de vérifier la mobilité des souches (**Guiraud., 2003**).

La fermentation du mannitol se traduit par virage de la couleur du milieu du rouge au jaune. Les bactéries mobiles se déplacent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble dans le milieu, alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement (**Gerhardt et al., 1994**).

❖ Production de dextrane

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

❖ Résistance au téllurite

La résistance au téllurite a été recherchée en utilisant la gélose MRS additionné à 0.4 % de téllurite. Les souches ont été ensemencées par strie sur la surface du milieu, ensuite elles ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Celles qui donnent des colonies noires après l'incubation sont considérées résistantes aux téllurite (**Facklam., 1972**).

❖ Production d'acétoïne

La production d'acétoïne est testée sur milieu Clark et Lubs (**Guiraud., 2003**) qui est inoculé par les souches à tester et incubé à 30°C. Après 24h et dans un tube à hémolyse on dépose 2ml de cette culture avec 0.5ml de réactif α naphthol à 6% dans l'alcool absolu (VP1) et 0.5ml d'une solution de soude (NaOH) à 16% dans l'eau distillée (VP2) pour assurer la réaction de Voges-Proskauer dite réaction de VP, on agite soigneusement les tubes et on les laisse en contact avec l'air libre pendant 5 à 10 min à température ambiante. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu.

❖ Hydrolyse de l'arginine (ADH)

Elle est mise en évidence sur un milieu de Moëller (**Moëller., 1955; Harrigan et McCance.,**

1976), pour chaque souche isolée ensemencé ; un tube de bouillon Moëller arginine et un tube témoin (Moëller sans arginine) recouvrir le milieu avec 4 à 5 mm d'huile de paraffine (V/V) stérilisé. Après 2 à 6 jours d'incubation à 30°C la culture dans le tube témoin se manifeste par un virage au jaune dû à l'acidification du milieu (métabolisme du glucose) (**Larpent-Gourgaud *et al.*, 1997; Carr *et al.*, 2002**). La dégradation de l'arginine aboutissant à la formation d'ammoniaque est révélée par alcalinisation du milieu qui devient violet.

❖ Type fermentaire

Ce test permet de classer les bactéries en hétérofermentaire ou homofermentaire. Il est effectué dans un milieu dépourvu de citrate pour éviter la formation de CO₂ liée à ce métabolisme particulier (**Dicks et Van Vuuren., 1987**). On Ensemence abondamment un tube de 10 ml de bouillon MRS (sans citrate) ou M17 dans le milieu on introduit une cloche de Durham, le CO₂ dégagé par les bactéries hétérofermentaires s'accumule dans la cloche après l'incubation à 30°C pendant 24 à 48 h.

❖ Type respiratoire

L'étude du type respiratoire des bactéries lactique permet de définir ses rapports avec l'oxygène (certaines bactéries nécessitent O₂, d'autres l'absence d'O₂).

Pour cela, on utilise un milieu de culture, type gélose MRS .on ensemence un tube de 10 ml de gélose MRS par la méthode de piqûre centrale.

La lecture :

- Culture en surface du milieu uniquement Culture uniquement en aérobiose : **Souche aérobie stricte.**
- Culture sur toute la hauteur du milieu Culture en aérobiose et anaérobiose : **Souche aéro-anaérobie facultative.**
- Culture dans la profondeur de la gélose, absence de culture en surface Culture en anaérobiose : **Souche anaérobie stricte**
- Culture uniquement dans une zone intermédiaire Culture en présence de faible concentration en dioxygène : **Souche micro-aérophile**

❖ Fermentation des hydrates de carbonés

Il s'agit d'apprécier l'aptitude des souches à métaboliser divers substrats carbonés en

particulier les sucres. Ce test est réalisé en galeries classiques de tubes sur bouillon MRS sans extrait de viande et sans glucose additionné d'un indicateur de pH (pourpre de bromocrésol à 0.05 g/l) (Leveau *et al.*, 1991). Le glucose du milieu MRS est remplacé par l'hydrate de carbone à tester, les solutions de sucres (mannitol, maltose, fructose, glucose, lactose, saccharose, sucrose, sorbitole).

Les solutions sucrées sont préparées dans 100 ml d'eau distillé à raison de 20% des différents sucres. La croissance est appréciée par le virage de l'indicateur de pH.

Les conditions d'anaérobiose sont assurées par l'addition d'une couche d'huile de paraffine stérile à la surface de milieu de culture (Samelis *et al.*., 1994). L'acidification est appréciée après 18 à 72h d'incubation à 30°C par virage au jaune du milieu.

❖ L'antibiogramme :

L'antibiogramme des souches est déterminé par la technique standardisée de diffusion (D'après le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, 2004) sur milieu gélosé (MRS gélosé). A partir d'une culture de 18h en milieu liquide MRS (Dalache *et al.*, 2003) et à l'aide d'un écouvillon stérile, on aensemencé toute la surface du milieu. Après le séchage, on a déposé les disques des antibiotiques sur les boîtes (maximum 6 disques sur grande boîte de pétri) et on les a incubé à 37°C pendant 18h à 24h.

Le test est effectué sur milieu MH (Muller *et Hinton.*, 1941).

Nous avons étudié le comportement des 20 souches bactériennes vis-à-vis de 06 antibiotiques commercialisés .

Les antibiotiques utilisés sont : oxacilline, pénicilline, tétracycline, vancomycine, imipenem et piperacillin.

Après incubation à 37°C pendant 24h, des zones d'inhibitions peuvent être observées autour de certains disques.

La lecture des résultats consiste à mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de croissance provoquée par l'antibiotique. Nous avons considéré par convention, que pour un diamètre inférieur à 15 mm la souche est résistante (R) à l'antibiotique et que pour un diamètre supérieur ou égale à 25mm elle est sensible (S) et l'intermédiaire pour diamètre supérieur à 15mm.

❖ Etude de l'activité antibactérienne des souches :

Cette étude est réalisée par deux méthodes :

➤ Méthode de double couche (méthode de Fleming *et al.*, 1975) :

Pour mettre en évidence les zones d'inhibition, les souches lactiques ont été ensemencées en

touche (à l'aide d'un inoculateur multipoint stérile) à la surface d'un milieu MRS ou M17 solide à partir d'une culture de 24h, les boîtes sont séchées sous la température ambiante pendant 2h. Après 24 h d'incubation chaque spot est recouvert avec une goutte de gélose nutritive maintenue en surfusion (50°C). Cela permet de fixer les colonies et d'éviter leur dispersions (**Larpent-Gourgaud *et al.*, 1997**). Une couche de gélose moelle (0,7%) contenant 0,1 ml d'une culture en milieu liquide de 18h d'une souche indicatrice (pathogène), est coulée au-dessus de la première couche de gélose.

La lecture des boîtes s'effectue après 24h d'incubation à 37°C en aérobiose, les souches présentant une zone transparente sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes. La taille des zones d'inhibition produites a été mesurée en mm.

➤ **Méthode des puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer ; 1983) :**

Cette méthode est réalisée sur les bactéries lactiques inhibitrices possédant les plus grande zones d'inhibition montrant la présence de substances inhibitrices, ces substances peuvent diffuser dans un milieu de culture solide.

Les bactéries lactiques sont repiquées dans du milieu MRS ou M17 liquide et incubées pendant une période de 18h à 30°C. Après incubation une centrifugation réfrigérée (4°C) est réalisée à 4000 tr/min pendant 15 min.

Des puits de 5 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce (cloche de Durham) sur la gélose nutritive inoculé par la souche indicatrice (pathogène) et seront remplis avec 100 µL du surnageant de culture ou d'extrait cellulaire. Les boîtes de Petri sont mises à une température de +4°C/4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (**Doumandji *et al.*, 2010**). Les boîtes sont incubées à 37°C et la présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 24h d'incubation (**Hwanhlem *et al.*, 2011**).

2.5.3 Caractérisation technologique des souches :

❖ Etude du pouvoir acidifiant des isolats :

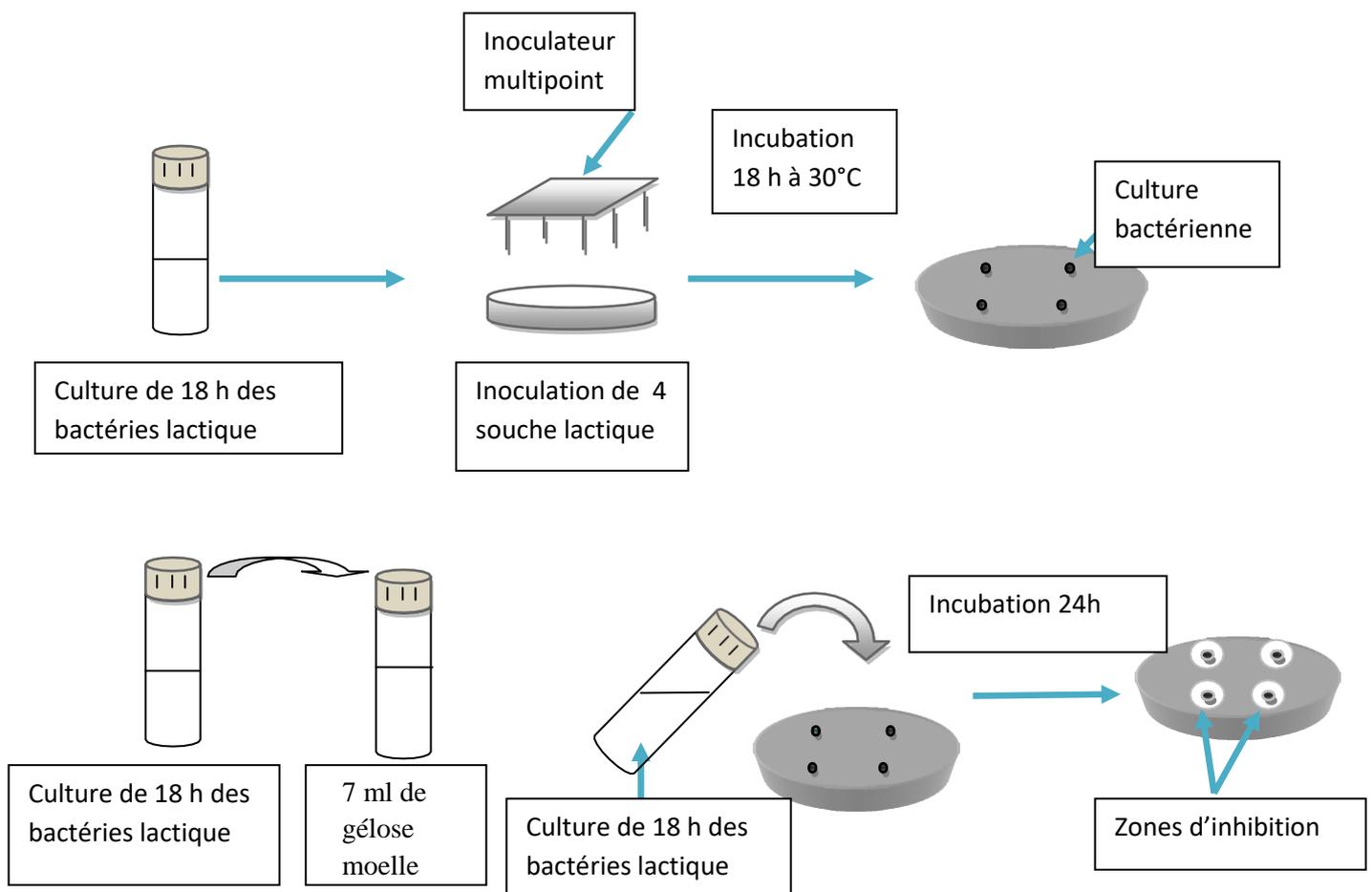
L'un des critères technologiques les plus importants chez les bactéries lactiques, c'est leur cinétique de production d'acide lactique. L'étude de cette cinétique permet de différencier ces souches et de les classer selon leurs potentialités à produire de l'acide lactique, qui s'avère le critère de base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

➤ Mesure de pH :

Les souches lactiques isolées, sont ensemencées dans des tubes contiennent 10ml de bouillon MRS, et incubées à 30°C durant 18 h. Après homogénéisation, on vers le contenu de chaque tube dans des flacons 90ml de bouillon MRS. Puis on les incube à 30°C.

La lecture s’effectuées à différentes périodes d’incubation : 0h, 2h, 4h, 6h et 24h. La mesure de ph et le dosage s’appliquent de la manière suivante : On prélève 10ml du flacon, puis on mesure le ph. (Badis *et al.*, 2004).

Méthode de Fleming *et al.*, 1975



Méthode de Barefoot et Kaenhammer ; 1983

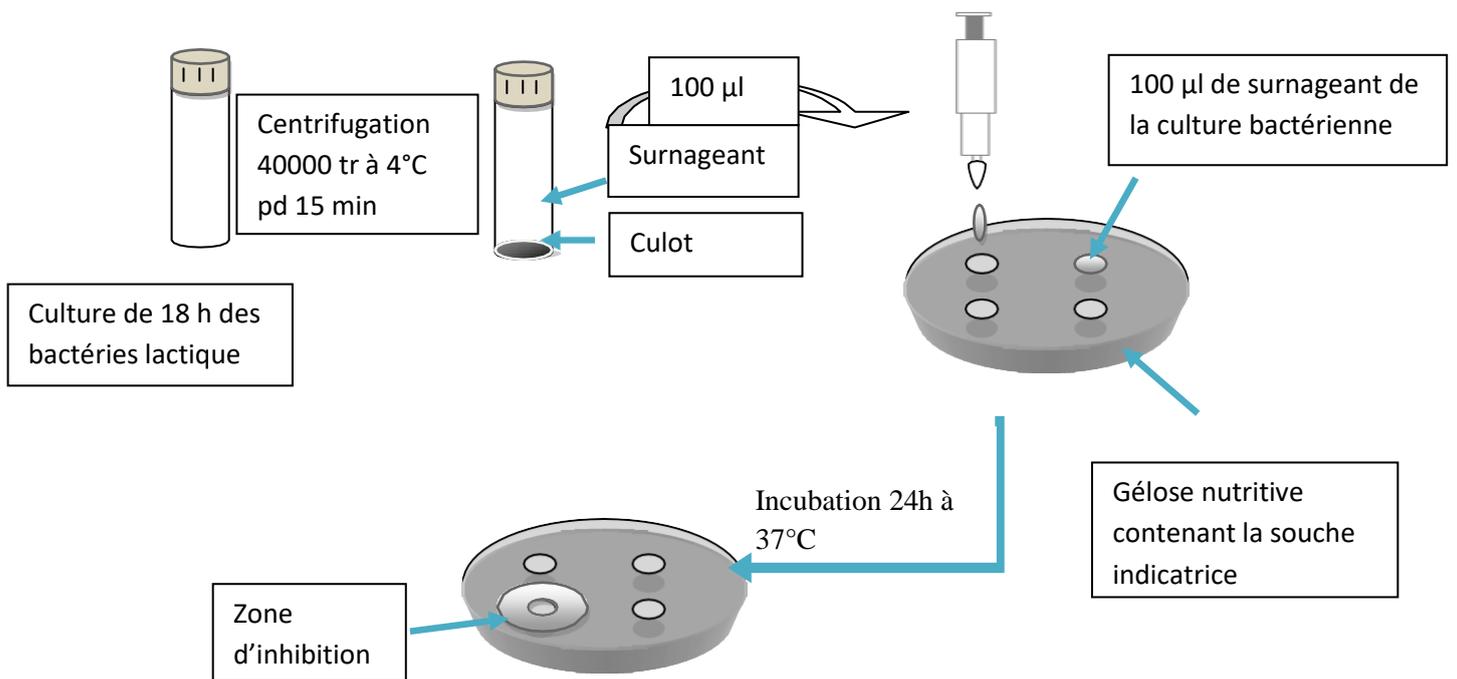


Figure09: Les différentes méthodes utilisées pour la recherche de substances

Chapitre IV

Résultats et discussion

1. Isolement

Vingt isolats bactéries ont été isolées sur gélose MRS et M17 à partir du Carotte et concombre fermentés, seule les bactéries Gram(+) et catalase (-), Oxydase(-), ont été retenues. C'est t'a dire vingt colonies isolées sont de taille variable, de forme circulaire avec un pourtour régulier ou irrégulier et de couleur blanche, crèmes ont subit une série de purification pour l'objet d'une identification phénotypique.

2. Purification :

Après incubation, une colonie est prélevée de la surface puis réensemencée dans un bouillon MRS et M17 à 30C° et 37C° pendant 24 à 48h. Des passages successifs et alternes bouillon /gélose sont effectuées pour purifier les isolats(**fig 10**)

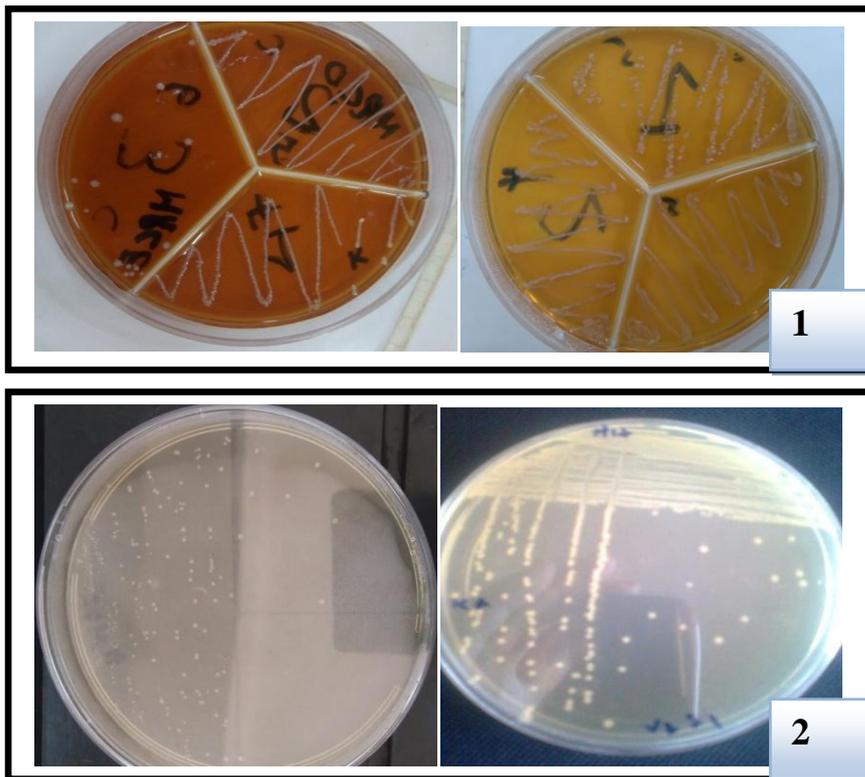


Figure 10: Aspect des cultures pures des colonies des bactéries lactiques sur gélose MRS (1) et gélose M17 solide (2) après 48h d'incubation à 30°C et 37°C°.

3. Identification :

Dans le but de sélectionner uniquement les bactéries lactiques, nous avons procédé à la vérification des différents aspects :

3.1.Critère morphologique

a. Aspect macroscopique

➤ Sur milieu solide

L'aspect macroscopique, permet de décrire les colonies obtenues sur milieu solide après incubation, les comparant ainsi aux critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (contour, taille, pigmentation, aspect...) (Zergoug., 2017). (Tab.5)

Concernant nos isolats testés, nous avons constaté sur milieu solide des colonies de petite taille d'environ 1 à 3 mm de diamètre, de forme circulaire, et de couleur blanc ou crème, avec une surface lisse (fig.11)

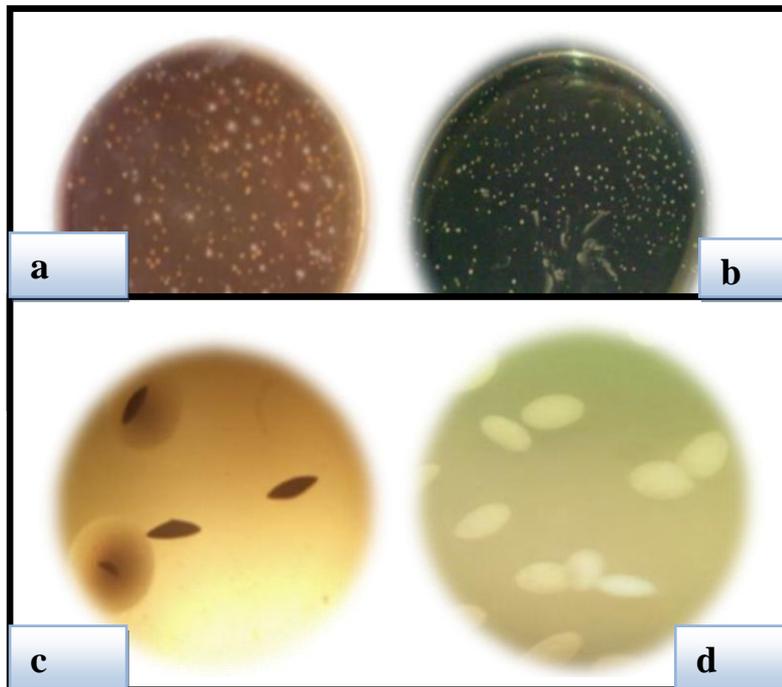


Figure11: Aspect macroscopique des isolats sur milieu MRS (a) et sur milieu M17 (b) après 24h d'incubation. Et sous la loupe (c), (d)

➤ Sur milieu liquide

Dans le milieu MRS liquide la croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble .Et pour une isolat pure cette trouble est concentrée au fon du tube à la recherche des conditions anaérobiques de ces bactéries avec une zone transparente de 5mm à la surface milieu liquide (fig.12) (Kihal., 1996 ; Carr *et al.*, 2002) .



Figure12: Aspect macroscopique des isolats sur MRS(a) et M17 liquide(b)

T : Témoin

Tableau 05: Résumé de l'observation macroscopique des isolats du carotte et concombre fermentés

Echantillon	souche	forme	couleur	porteur	aspect	viscosité
La carotte	MRCa	circulaire	Crème	Régulier	Lisse	Crémeuse
	MRCb	circulaire	Blanchatre	Régulier	Lisse	laiteuse
	MRCc	circulaire	Blanchatre	Régulier	Lisse	Gluante
	MRCd	circulaire	Crème	Régulier	Lisse	Crémeuse
	MRCe	circulaire	Blanchatre	Régulier	Lisse	Gluante
	Mca	circulaire	Crème	Régulier	Lisse	Gluante
	MCb	circulaire	Crème	Régulier	Lisse	Crémeuse
	MCc	circulaire	Crème	Régulier	Lisse	Crémeuse
	MC ₁	circulaire	crème	Régulier	Lisse	Crémeuse
	MC ₂	circulaire	Blanchatre	Régulier	Lisse	laiteuse
Le concombre	MK ₁	circulaire	Crème	Régulier	Lisse	Gluante
	MK ₄	circulaire	Crème	Régulier	Lisse	Gluante
	Mk ₂	circulaire	Crème	Régulier	Lisse	Crémeuse
	Mka	circulaire	Blanchatre	Régulier	Lisse	Crémeuse
	MRKa	circulaire	Crème	Régulier	Lisse	Crémeuse
	MRKb	Circulaire	Crème	Régulier	Lisse	Crémeuse
	MRKc	Circulaire	Crème	Régulier	Lisse	Crémeuse
	MRKd	circulaire	Blanchatre	Régulier	Lisse	Crémeuse
	MRKe	circulaire	Crème	Régulier	Lisse	Gluante
	MRKf	circulaire	Crème	Régulier	Lisse	Crémeuse

b. L'aspect microscopique

Les isolats MRCa ,MRCb,MRCd ,Mca, MCb, MCc, MC1,MC2, MK1 ,MK4 ,Mk2, Mka MRKb,MRKc ,MRKd ,MRKe sont des cocci, par contre, les isolats MRCe, MRCc, MRKf , MRKa sont des bâtonnets Gram positif (**fig.13**) et catalase négative, le mode d'association varie d'une souche à l'autre. Il est expliqué dans le (**Tab.6**) ces observations permettent de classer initialement les isolats selon le Gram, leurs morphologies cellulaires et leur mode d'association (**Zergoug ., 2017**).

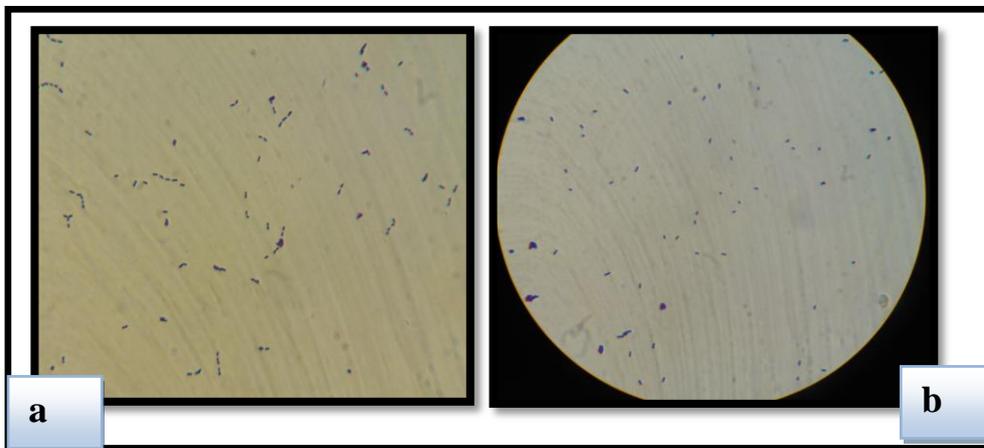


Figure 13 : Observation microscopique des bacilles (**a**) et des coques (**b**) après coloration de Gram (**G x100**).

Tableau 06 : critères morphologiques des isolats

Echantillon	Souche	Forme	Mode de regroupement	Catalase	Oxydase
La carotte	MRCa	coque	Isolé + diplocoque	-	-
	MRCb	coque	Diplocoque + petites chainette	-	-
	MRCc	bacille	Tétrade + petite chainette	-	-
	MRCd	coque	En chainette	-	-
	MRCe	bacille	En chainette	-	-
	Mca	coque	diplocoque	-	-
	MCb	coque	Diplocoque + Petite chainette	-	-
	MCc	coque	Isolé + diplocoque	-	-
	MC ₁	coque	Diplocoque + en chainette	-	-
	MC ₂	coque	Diplocoque + petite chainette	-	-
Le concombre	MK ₁	coque	En chainette	-	-
	MK ₄	coque	Diplocoque + petite chainette	-	-
	Mk ₂	coque	En paire + petite chainette	-	-
	Mka	coque	en chainette plus ou moins longue	-	-
	MRKa	bacille	Diplocoque + en chainette	-	-
	MRKb	coque	Isolé + diplocoque	-	-
	MRKc	coque	Diplocoque + en tétrade	-	-
	MRKd	coque	Diplocoque + en chainette	-	-
	MRKe	coque	Diplocoque	-	-
MRKf	Bacille	Isolé + petites colonie en chainette	-	-	

3.2.Critère physiologique et biochimique

❖ Test catalase :

Conformément aux bactéries lactiques, toutes les isolats étudiées ne possèdent pas la catalase

❖ Test oxydase

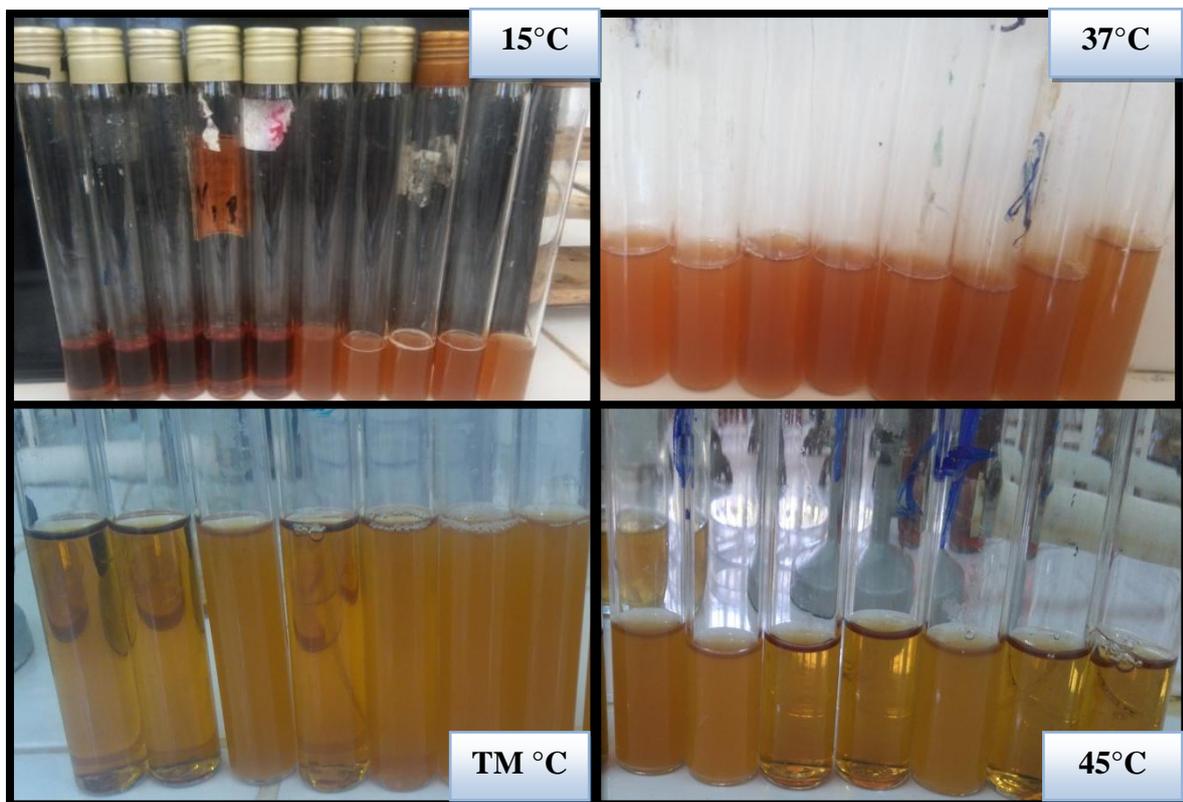
Les résultats de ce test ont révélé que toutes les isolats sont oxydase négatives.

❖ **Croissance à différentes températures et thermorésistante**

Cette étude Permet de faire la différence entre la flore thermique et mésophile et de sélectionner les souches thermorésistantes (Badis et al., 2004) .(Tab.7)

Dans cette étude, la majorité des isolats sont signalées mésophiles, elles ne poussent pas à 45°C après 05 jours d'incubation sauf les isolats MRC_D, MCa, MCc, MC₁, MK₂,MKa ,MRKb ,MRKc .(fig.14)

Figure14 : Les résultats de croissance à différent températures et la thermorésistante



TM : Thermoresistante

Tableau 07 : résultat de la Croissance à différentes températures et thermorésistantes

Code	Culture à 4°C	Culture à 15°C	Culture à 30°C	Culture à 37°C	Culture à 45°C	Le caractère	Thermorésistance 63,5°C
MRCa	-	+	+	+	-	Mésophile	-
MRCb	-	+	+	+	-	Mésophile	+
MRCc	-	+	+	+	-	Mésophile	-
MRCd	-	-	+	+	+	Thermophiles	+
MRCe	-	-	+	+	-	Mésophile	-
MCa	-	+	+	+	+	Thermophiles	+
MCb	-	-	+/-	+	-	Mésophile	-
MCc	ND	+	+	+	+	Thermophiles	ND
MC ₁	-	+	+	+	+	Thermophile	+
MC ₂	-	-	+/-	+	-	Mésophile	-
MK ₁	-	-	+	+	-	Mésophile	-
MK ₄	-	+	+	+	-	Mésophile	+
Mk ₂	-	-	+	+	+	Thermophile	-
Mka	-	-	+	+	+	Thermophile	+
MRKa	-	-	+	+	-	Mésophiles	-
MRKb	-	-	+	+	+	Thermophile	+
MRKc	-	-	+	+	+	Thermophile	+
MRKd	-	-	+	+	-	Mésophile	+
MRKe	-	-	+	+	-	Mésophile	+
MRKf	-	+	+	+	-	Mésophile	-

ND : non déterminé /+ : positive /- : négative/

❖ Croissance à différentes pH 4,4 / 4,9 et 9 / 9,6

Nous avons remarqué que la plus parts les isolats sont capables de croitre sur milieu MRS liquide à pH 4,4. 4,9. 9,6 et 9 (fig.15) sauf

- A PH 4.4 MRC_b, MRC_d, MC_C, MRK_F
- A PH 4,8 MRC_d,MRC_C, MC₁,MRK_D
- A PH 9 MK₂, MRKe, PH 9,6 MRK_d,MCA résultats dans le (Tab 6)

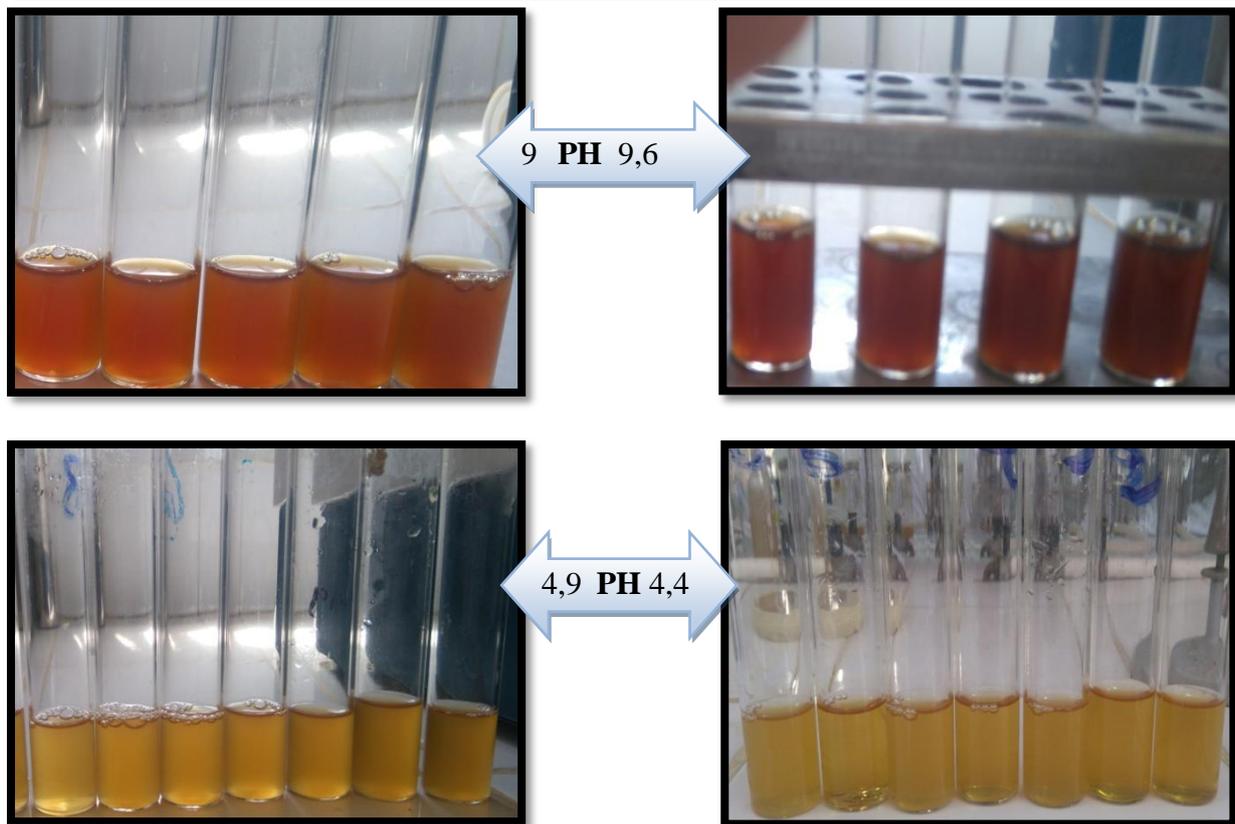


Figure 15 : résultats de la croissance à différente Ph

❖ Test du lait bleu de sherman

Ce test porte toujours sur le système respiratoire des *Lactocoques*, car vu que ce sont des micro-aérophiles, ils ne vont utilisés qu'une faible partie de l'oxygène présent dans le bleu de méthylène (3 %) et de ce fait la couleur du lait (bleue) ne virera que légèrement vers le blanc et ce contrairement aux entérocoques (aérobies) qui utilisent tout l'oxygène du bleu de méthylène (Larpent *et al.*, 1990).(Tab.8)

La plupart des isolats n'ont coagulé pas le lait et n'ont réduit pas le bleu de méthylène pour les deux concentrations (Fig.16) sauf isolats MRCc,Mka ont réduit le bleu de méthylène à 1 %.et 3 % et isolat MRKb pause seulement à 3%

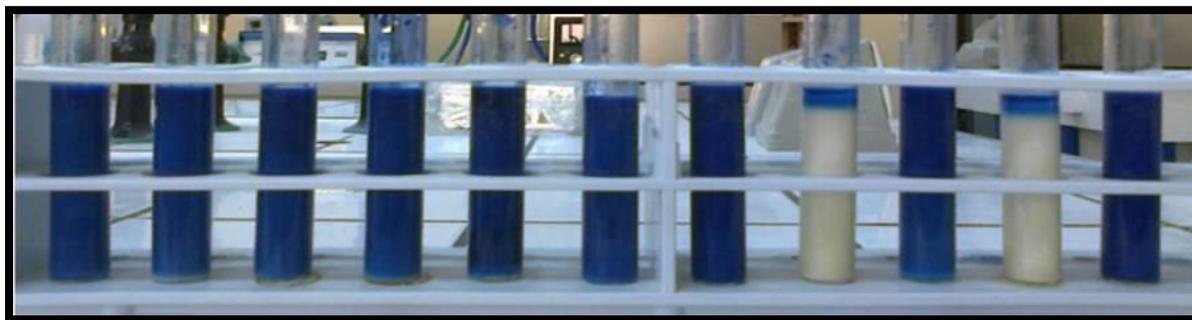


Figure 16 : les résultats de lait bleu de sherman obtenus après ensemencement et incubation pendant 24h à 30°C.

Tableau 08: croissance à différent Ph et le lait bleu de sherman

Teste	Croissance à différent pH				Lait bleu de sherman	
	PH : 4,4	PH : 4,9	PH : 9	PH : 9,6	1%	3%
MRCa	+	+	+	+	-	-
MRCb	-	+	+	+	V	V
MRCc	+	+	+	+	+	+
MRCd	-	-	+	+	-	-
MRCe	+	+	+	+	-	-
MCa	+	+	+	+	-	-
MCb	+	+	+	+	-	-
MCc	-	-	+	+	-	-
MC ₁	-	-	+	+	-	-
MC ₂	+	+	+	+	-	-
MK ₁	+	+	+	+	-	-
MK ₄	+	+	+	+	-	-
Mk ₂	+	+	-	+	-	-
Mka	+	+	+	+	+	+
MRKa	+	+	+	+	-	-
MRKb	+	+	+	+	-	+
MRKc	+	+	+	+	-	-
MRKd	+	-	+	-	-	-
MRKe	+	+	-	-	-	-
MRKf	-	+	+	+	-	-

❖ Mannitol mobilité

Toutes les isolats ont été développées sur tout au long de la pique sans envahissement du milieu, généralement elles sont immobiles (**fig.17**)

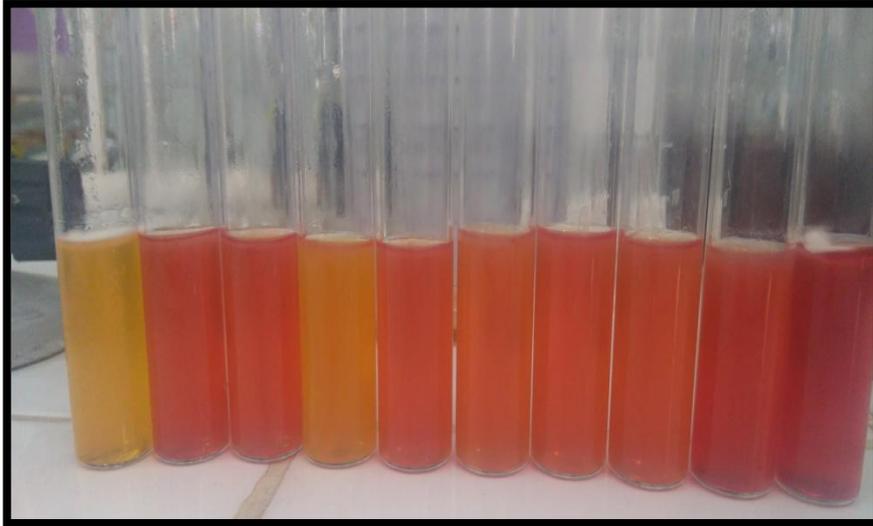


Figure 17 : Résultats de la mobilité sur milieu mannitol après incubation 24h à 30°C.

❖ Type fermentaire

L'utilisation de cloches de Durham dans un milieu liquide contenant du glucose est une méthode pour la détection de la formation de gaz, et déduire ainsi le type fermentaire (**Schillinger et Lücke ., 1989 Badis et al., 2004**).

Ce test nous a permis de différencier les isolats homofermentaires des isolats hétérofermentaires (**Fig.18**) présence de gaz dans la cloche de Durham indique un métabolisme hétérofermentaire (**Kihal et al., 1996**). Aucune production du gaz (CO₂) à partir de glucose n'a été observée chez les isolats MRCa, MRCb, MRCc, MC2, MRKc, MRKd, MRKe, MRKf (**Tab.9**)

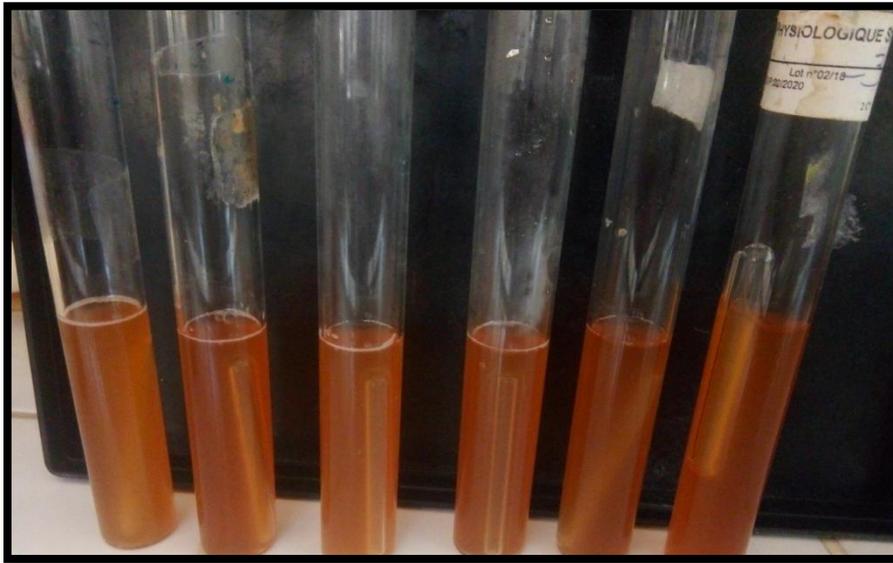


Figure 18 : représente les résultats de type fermentaire des isolats

❖ Test de l'Arginine dihydrolase (ADH)

Les bactéries qui fermentent le lactose entraînent une acidification du milieu et une coloration jaune du milieu en présence de pourpre de bromocrésol (indicateur de pH). L'enzyme ADH, dont l'action est favorisée en milieu acide, forment des substances alcalines à partir des acides aminés et l'alcalinisation du milieu ce qui provoque le virage au violet. Après ensemencement de chacun de nos souches sur le milieu Moller. Incuber à 30° C. (Kheddid *et al.*, 2006).

La plupart des isolats sont ADH négative sauf Mka, MRKa, MRKb, MRKc, MRKd, MC1. (fig 19)

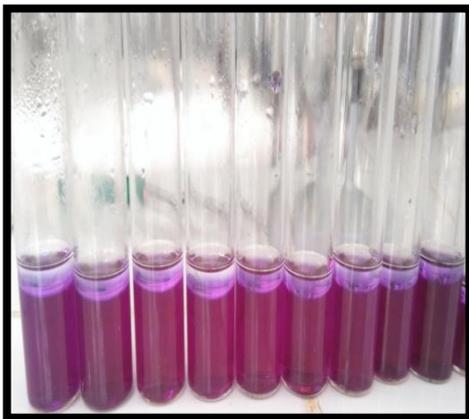


Figure 19: Résultats de l'hydrolyse d'arginine sur milieu sur milieu Moeller.

❖ La production d'acétoïne

La production d'acétoïne est testée sur milieu Clark et Lubs (**Fil., 1996**).

A partir des résultats, on constate que tous nos isolats ne produisent pas l'acétoïne sauf les souches MRCc, Mca, MC1, MRKc. Les résultats obtenus sont présentés dans le (**fig.20**) et (**Tab.9**)

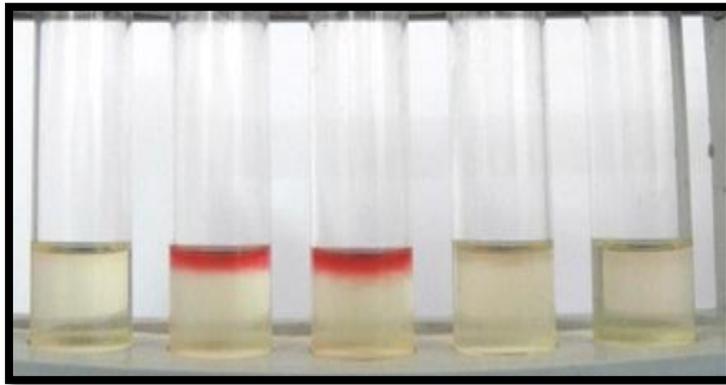


Figure 20 : Résultat de la recherche de l'acétoïne.

❖ Production de dextrane

La production de dextrane à partir du saccharose a été observée chez la plupart des souches de *Leuconostoc* (**Fig.21**) Ce caractère permet la distinction entre les sous espèces *Ln.mesenteroides* subsp *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp *dextranicum* et les autres espèces.



Figure 21 : Aspect des colonies des bactéries lactiques sur milieu MSE

❖ Résistance au tellurite

Les souches résistantes apparaissent sous forme de colonies noires sur la surface de la gélose MRS additionné de 0.4% de tellurite de potassium. Ce test permet de sélectionner *Enterococcus faecalis* (résistante au tellurite) des autres *Enterococcus*.

Les résultats obtenus de ce test pour les isolats sont résumés dans le (Tab.9)

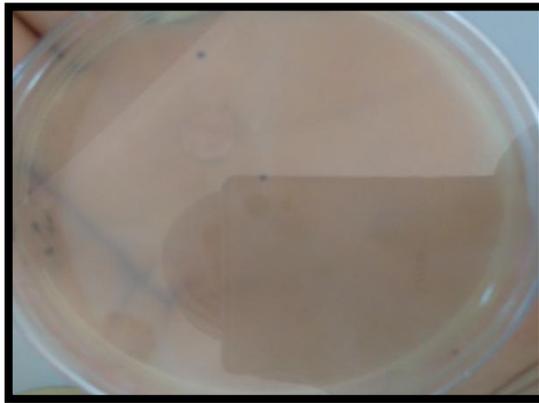


Figure 22 : Résultat de Test de résistance au tellurite

❖ Type respiratoire

Les résultats de ce test ont constaté que la plus part des isolats sont aéro-anaérobie facultative.(fig 23)



Figure 23 : Résultat de type respiratoire

Tableau 09 : représentation des résultats des tests physiologique et biochimique

Code	Mannitol mobilité	de Production dextrane	ADH	Type fermentaire	Résistance au tellurite	Type respiratoire	Acétoine
MRCa	Imm	+	-	Hétérofermentaires	-	Aeroanaérobie facultative	-
MRCb	Imm	+	-	Homofermentaires	+	Aeroanaérobie facultative	-
MRCc	Imm	+	-	Homofermentaires	-	Aeroanaérobie facultative	+
MRCd	Imm	-	-	hétéro fermentaires.	-	Aeroanaérobie facultative	-
MRCe	Imm	-	-	hétéro fermentaires.	+	Aeroanaérobie facultative	-
MCa	Imm	+	-	homofermentaires.	+	Anaérobie stricts	-
MCb	Imm	-	-	hétéro fermentaires.	+	Anaérobie stricts	-
MCC	Imm	+	-	Homofermentaires	+	Miroaérophile	+
MC ₁	Imm	+	+	hétéro fermentaires	-	Aeroanaérobie facultative	+
MC ₂	Imm	+	-	Homofermentaires	+	Aeroanaérobie facultative	-
MK ₁	Imm	-	-	hétéro fermentaires.	+	Anaérobie stricts	+
MK ₄	Imm	-	-	hétéro fermentaires	+	Aeroanaérobie facultative	-
Mk ₂	Imm	+	-	hétéro fermentaires	-	Aeroanaérobie facultative	-
Mka	Imm	+	+	Homofermentaire	+	Aeroanaérobie facultative	-
MRKa	Imm	+	+	Hétérofermentaires	-	Anaérobie stricts	-
MRKb	Imm	+	+	Homofermentaire	-	Miroaérophile	+
MRKc	Imm	+	+	Homofermentaires	-	Anaérobie stricts	+
MRKd	Imm	+	+	Homofermentaires	-	Anaérobie stricts	-
MRKe	Imm	+	-	Homofermentaires	-	Aeroanaérobie facultative	-
MRKf	Imm	+	-	Homofermentaires	-	Aeroanaérobie facultative	-

❖ Fermentation des hydrates de carbones

L'identification est complétée avec l'étude de la fermentation des hydrates de carbones par les souches isolées.

La fermentation des sucres par les souches isolées et leur identification ont été présentées dans le (Tab 10)

L'identification des isolats est basée sur les profils des souches de référence selon les travaux de : (Devoyod . et Poullain F., 1988 ;Leveau *et al.*, 1991 ; Larpent., 1996 ; Bjökroth. et Holzapfel ., 2006 ; Teuber et Geis ., 2006 ; Hammes et Hertel., 2006 et *bergey's manual.*, 2009.)

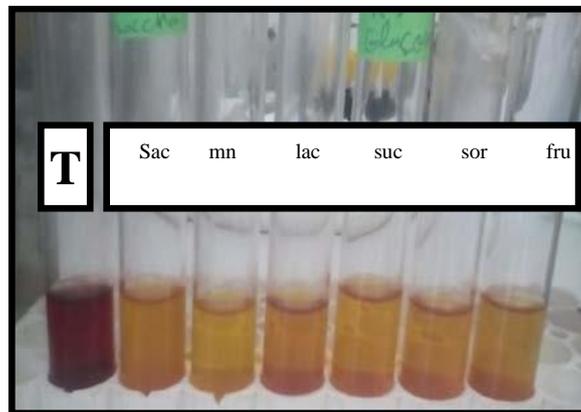


Figure 24 : Résultats de fermentation des hydrates de carbure.

T : Témoin. **Sac** : Saccharose. **Mn** : mannitol. **Lac** : lactose. **Suc**: sucrose.

Sor : Sorbitol. **Fru** : Fructose

Tableau 10 : Profils fermentaires des isolats

soushe	Lactose	Fructose	Mannitole	sucrose	Sorbitol	Saccharose
MRCa	+	+	-	+	+	+
MRCb	+	+	+	+	+	+
MRCc	-	+	+	-	-	+
MRCd	+	+	+	+	-	+
MRCe	+	+	-	-	+	+
MCa	+	+	+	+	+	+
MCb	-	+	-	+	-	+
MCc	+	+	+	+	+	+
MC ₁	+	+	-	-	-	+
MC ₂	+	+	-	+	-	+
MK ₁	-	-	+	-	-	+
MK ₄	+	+	+	-	+	+
Mk ₂	+	+	-	-	+	- ⁺
Mka	+	-	-	+	+	+
MRKa	+	+	-	+	-	+
MRKb	+	-	+	+	-	+
MRKc	+	+	+	-	-	+
MRKd	-	+	+	+	-	+
MRKe	+	+	+	+	-	+
MRKf	+	+	-	-	+	+

❖ L'antibiogramme :

L'antibiogramme a été effectué sur 20 souches .On a utilisé 06 antibiotiques, le teste a été effectué sur milieu MH.

Après une culture de 24h, on a mesuré les diamètres des auréoles (zones d'inhibition de croissance de la souche microbienne). Nos isolats lactiques, ont exprimé différentes résistances vis-à-vis des antibiotiques utilisés, ils ont été pour certains sensibles et pour d'autres intermédiaires Ces résultats sont représentés dans les (Tab.11)

Tableau 11. : Les résultats de l'antibiogramme des isolats

échantillon	code	VA30	PRL100	P10	IPM10	TE30	OX
La carotte	MRCa	7	15	0	20	22	0
	MRCb	9	5	0	14	24	0
	MRCc	11	23	7	25	30	9
	MRCd	3	10	5	20	25	10
	MRCe	6	20	12	30	33	11
	Mca	25	13	11	0	0	14
	MCb	8	13	11	25	18	12
	MCc	12	22	2	25	30	0
	MC ₁	10	15	6	0	0	0
	MC ₂	9	9	10	0	0	4
Le concombre	MK ₁	11	10	17	25	20	0
	MK ₄	9	5	9	11	S	0
	Mk ₂	0	0	0	0	25	0
	Mka	14	3	13	13	R	8
	MRKa	20	11	13	11	0	11
	MRKb	13	25	0	17	20	14
	MRKc	12	16	9	27	27	11
	MRKd	15	10	12	9	18	10
	MRKe	0	20	11	17	20	9
	MRKf	0	17	0	0	0	0

R : Résistante (<15mm) **S** : Sensible (>25mm) **I** : Intermédiaire (>15mm)

❖ Activité antibactérienne

Les souches isolées de la carotte et concombre ont été testées pour leur capacité à inhiber les bactéries pathogènes Gram négatif et les Gram positif ou nous avons pris comme exemple type *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis ssp.*

Notre choix s'est donc porté sur une technique largement décrite dans la littérature notamment celle de (**Barfoot et Kaenhammer ., 1983**) qui nous a permis de faire une première sélection des souches lactiques antibactériennes.

Les résultats de l'interaction obtenue, révèlent la présence d'une zone claire au tour des puits ensemencés par les souches lactiques de notre collection (**fig 25**).

La présence d'une zone d'inhibition n'est pas essentiellement due à la production de bactériocines. Cette inhibition peut avoir plusieurs origines parmi lesquelles, la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène, de phages et/ou de bactériocines (**Rodriguez et al., 2009**)

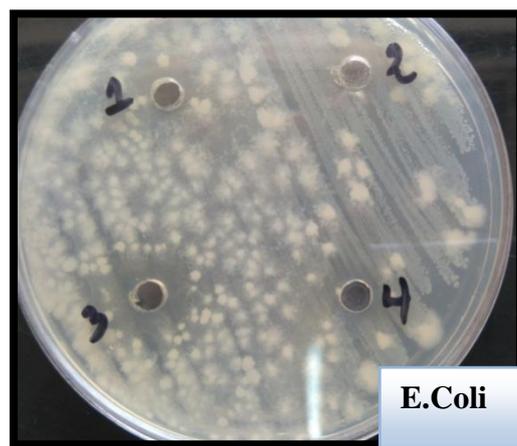


Figure 25 : Inhibitions obtenues par les souches isolées

E.Coli : *Escherichia coli*

Il est bien clair que toutes les souches testées ont montré une activité inhibitrice contre les bactéries pathogènes (*E. coli* et *Bacillus subtilis ssp.*). L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1mm (**Schillinger et Lucke ., 1989**). (**Tab.12**)

Tableau 12 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) suite à la diffusion sur puits en gélose

Code	Diamètre de la zone d'inhibition en mm		Code	Diamètre de la zone d'inhibition en mm	
	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus subtilis ssp</i>		<i>E. coli</i>	<i>Bacillus subtilisssp</i>
MRCa	12	11	MK ₁	12	12
MRCb	11	14	MK ₄	15	11
MRCc	13	15	Mk ₂	18	14
MRCd	10	15	Mka	15	12
MRCe	09	15	MRKa	12	10
MCa	11	09	MRKb	15	16
MCb	07	10	MRKc	13	15
MCc	10	13	MRKd	16	14
MC ₁	13	11	MRKe	14	13
MC ₂	15	10	MRKf	12	10

3.4 Critère technologique :

➤ Etude de la capacité d'acidification des souches isolées :

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques. Les résultats de suivi de l'activité acidifiante des isolats, sont illustrés par les **fig 26 et 27**. Les résultats chiffrés de l'évolution du ph

Après deux heures d'incubation, les valeurs de ph varient entre Ph 5.71 et PH 5,88.

Au bout de 24h d'incubation ces valeurs de ph diminuent et se trouvent situées entre PH 4,20 et 4,80 ph.

Tableau 13 : Les variations de ph des souches isolées, durant 24h d'incubation

La carotte										
	MRCa	MRCb	MRCc	MRCd	MRCe	MCA	MCb	MCC	MC₁	MC₂
T0	5,73	5,88	5,73	5,77	5,75	5,71	5,75	5,80	5,65	5,85
T1	5,64	5,80	5,68	5,70	5,71	5,70	5,70	5,75	5,63	5,83
T2	5,66	5,74	5,67	5,68	5,70	5,68	5,68	5,74	5,60	5,70
T3	5,63	5,70	5,63	5,65	5,67	5,60	5,61	5,70	5,55	5,68
T4	4,50	4,38	4,26	4,41	4,37	4,83	4,59	4,37	4,40	4,47
T5	4,43	4,30	4,23	4,39	4,32	4,80	4,53	4,33	4,40	4,45
T6	4,40	4,27	4,20	4,37	4,30	4,77	4,50	4,30	4,40	4,41
Le concombre										
	MK₁	MK₄	Mk₂	Mka	MRKa	MRKb	MRKc	MRKd	MRKe	MRKf
T0	5,72	5,10	5,12	5,77	5,70	5,80	5,72	5,74	5,70	5,76
T1	5,69	5,08	5,10	5,72	5,68	5,72	5,70	5,71	5,67	5,73
T2	5,68	5,06	5,08	5,71	5,68	5,71	5,69	5,72	5,65	5,72
T3	5,62	5,00	5,06	5,70	5,67	5,68	5,67	5,70	5,61	5,62
T4	4,78	4,87	4,90	4,60	4,65	4,52	4,49	4,54	4,43	4,50
T5	4,73	4,74	4,86	4,53	4,41	4,50	4,48	4,53	4,41	4,47
T6	4,70	4,70	4,80	4,45	4,40	4,50	4,40	4,50	4,40	4,46

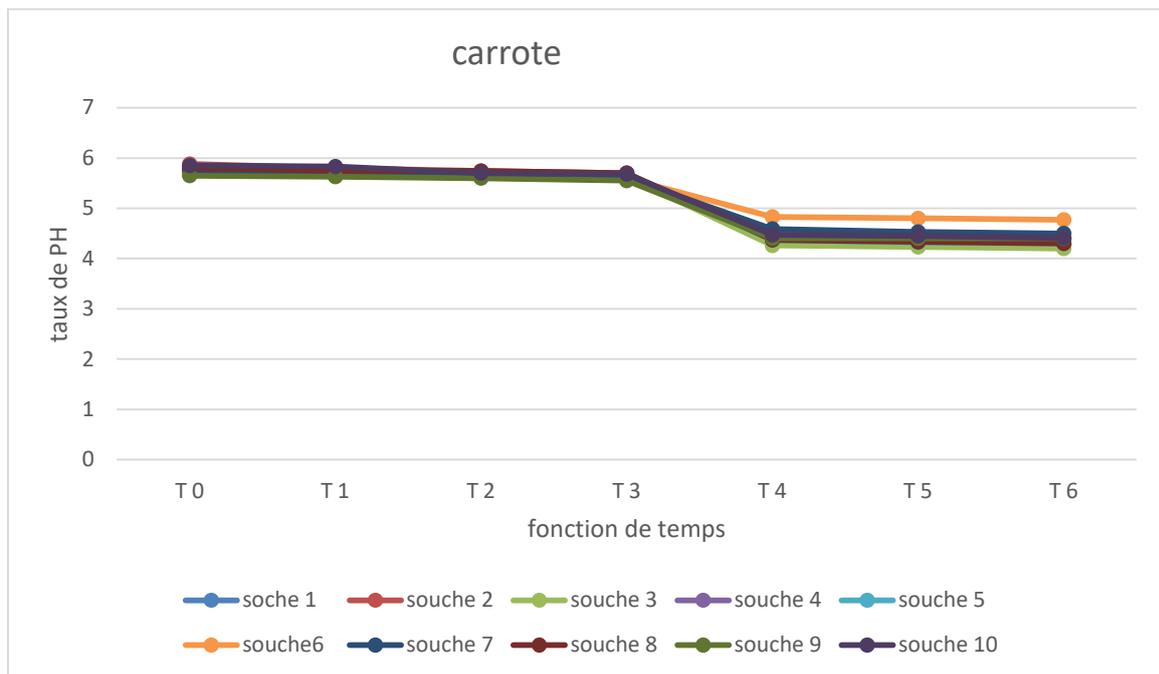


Figure 26 : Evolution de ph des souches isolées de carotte à différents intervalles de temps.

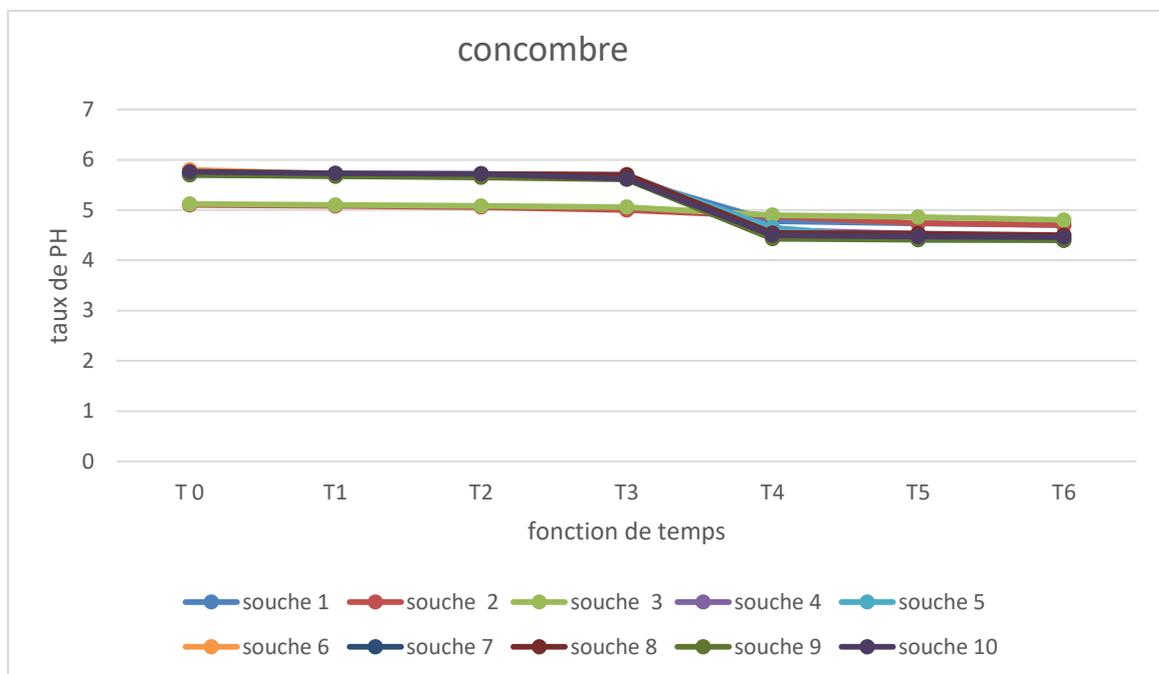


Figure 27 : Evolution de ph des souches de concombre isolées à différents intervalles de temps.

Discussion

20 isolats des bactéries lactiques ont été isolées du carotte et concombre fermenté. Elles ont été cultivées et isolées sur milieu MRS et M17. Du fait des exigences nutritionnelles des bactéries lactiques, les milieux de culture doivent être très riches en sucres en matières azotées et surtout en facteurs de croissance. (Pilet *et al.*, 2005)

La présence des divers genres des bactéries lactiques dans la carotte et le concombre fermenté était prévisible car les bactéries lactiques ont été trouvées dans la microflore de tous les végétaux fermentés étudiés.

Les résultats de l'identification de cette étude montrent une présence majoritaire de coques avec 80% par rapport les bâtonnets et ont été retrouvées à des faible pourcentages 20%. Le même type de résultats est apporté par (Cherigune., 2008 ; franciosi *et al.*, 2009.). (fig 28)

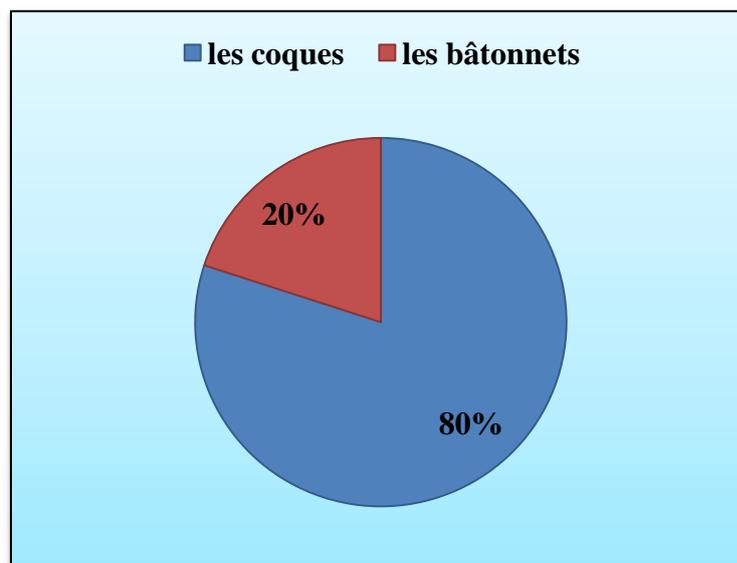


Figure 28 : Répartition des isolats isolés à partir de la carotte et le concombre fermenté

❖ Identification des isolats :

✓ Les lactoqcue

Les *Leuconostoc* se rencontrent dans la nature et font partie de la microflore de la plupart des champs cultivés. On les retrouve souvent sur les plantes et dans divers aliments comme le lait et les produits laitiers fermentés (fromages, kéfir), les végétaux fermentés (vin, cidre, olives, choucroute, concombre et la viande) (Wilhem *et al.*, 2012)

Les souches de *Leuconostoc* développées sur milieu MSE (Mayeux *et al.*, 1962) forment des colonies brillantes transparentes, gluantes (1 à 5 mm) ne devenant muqueuses

qu'après séjour à la température du laboratoire à cause de la production de dextrane (Larpen *et al.*, 1997), L'observation après coloration de Gram, indique qu'il s'agit des coques ovoïdes Gram positif en paires ou en chainettes (Novel G., 1993), selon (Garvie., 1986) les corps cellulaires des *Leuconostoc* peuvent être sphériques, mais souvent lenticulaires, surtout lorsqu'ils sont cultivés sur milieu gélosé. Les *Leuconostoc* sont hétérofermentaires, ces souches produisent aussi du CO₂ à partir du citrate, ne produisent pas l'acétoïne, n'hydrolysant pas l'arginine, développant à 37°C, présence

(Larpen *et al.*, 1997 ; Novel G., 1993 ; Larpen., 1996 ; Ogier *et al.*, 2008 ; Bjökroth et Holzapfel ., 2006 ; Badis *et al.*, 2004)

À partir de ces tests on trouve que toutes les souches de ce genre appartiennent à l'espèce : *Leuconostoc mesenteroides*.

Pour identification : Pour le genre *Leuconostoc* sont identifiées *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* par la dégradation de mannitol, ne Produise pas acétoïne (Larpen ., 1996 ; Devoyod *et al.*, 1988 ; Bjökroth et Holzapfel ., 2006 ; Milliere *et al.*, 1989) *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dixtranicum* se distingue aisément de *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* parce qu'il ne fermente pas le mannitol, et *mesenteroides* subsp *cremoris* parce qu'il ne produise pas le dextrane et Produise acétoïne (Milliere *et al.*, 1989 ; Badis *et al.*, 2005). *leuconostoc lactis* ne produise pas ni le dextrane ni acétoïne (Badis *et al.*, 2005)

Les isolats MK1, *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris*.MK2, *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dixtranicum*.MK4, MRCd, *leuconostoc lactis*. MRCa, *Leuconostoc mesenteroides*

Trois autres isolats semblent avoir le phénotypique des entérocoques, car se sont révélés capable de croitre à 45°C et à PH 9.6 ces bactéries sont aussi capable de survivre après leur exposition à 63.5°C pendent 15 min et produisent du NH₃ à partir de arginine (14201203)

Pour identification : Pour le genre entérocoques sont identifiées *Entérocooccus durans* par la dégradation de mannitol, lactose, production de l'acétoïne. (Guiraud., 2003) L'isolat MRKb, *Entérocooccus durans*

La souche codées MCa caractérisées homofermentaires et capables à se développer à 15°C, à 45°C et à pH 9,6, ADH négative et acétoïne négative. Elle fermente le sucrose, le lactose et le mannitol, identifiée comme étant *E. avium* (Collins *et al.*, 1987)

La souche MCc se rapproche de l'espèce *E. mundtii* caractérisée par sa capacité de développement à 45°C. Elle dégrade le sucrose, le lactose et le mannitol. Elle est ADH- et acétoïne+. Selon (collins *et al.*, 1987).

Aspects macroscopiques a montré que les Lactocoques développent sur le milieu M17 de petites colonies à contour régulier de couleur blanchâtres, lisses et légèrement bombées. Microscopiquement sont des Gram positif, de forme cocci sphérique, associé en paire, groupées en chaînettes plus aux moins longues (Teuber et Geis ., 2006).

Par ailleurs, nous distinguons par nos isolats, des souches typiques et d'autres sont atypiques car certains de leurs caractères ne correspondent pas au données rapportées par (Stiles et Holzapfel., 1997 ;Teuber et Geis ., 2006). Selon ces auteurs, les Lactocoques sont des bactéries homofermentaires, ne poussent pas à 45°C Cependant au cours de cette étude, nous avons isolé des souches atypiques qui poussent à 45°C même résultat a été obtenu par (Franciosi *et al.*, 2009) Des résultats similaires sont été rapportés par (Kacem *et al.*, 2002 ; Zadi Karam *et al.*,2006).

Ces souches atypiques résistent aussi à 63°C pendant 30 min (Bensalah ., 2006). Selon le tablau de Guiraud, 2003. Les souches MKa présentent un développement positif sur lait bleu de sherman, ADH et Ph 9,6. Et MRKd ne pousse pas sur lait de sharmen, ne dégrade pas ADH et ne croitre pas à Ph 9,6
Les souches MKa ,MRCb *Lactococcus lactis subsp lactis* et MRKd *Lactococcus lactis subsp diacetylactis*.

En se basant sur le test d'ADH négative, d'actéoïne négative, la sensibilité au bleu de méthylène et le profil fermentaire des sucres qui a été positif avec le lactose, MC₂ cette espèce est identifiée en tant que *Lactococcus piscium*

Trois espèces de *Pediococcus* ont été isolées. L'observation sur microscope révèle une forme caractéristique de cocci en tétrade. Les trois souches identifiées sont :

La MC1 *Pediococcus pentosaceus* se diffère à la souche de référence de **Bergy's et manual ; 2009 et Guiraud ; 2003**, par la croissance à 45°C, PH 9,6. La MRKc est une *Pediococcus dextrinicus* se diffère par la fermentation de saccharose. La MRKe *Pediococcus damnosus* ne croitre pas à 45°C ni à PH 9,6

Une seul souche de weissella ont été isolées. L'observation sur microscope révèle une forme caractéristique de cocci. (**Collins et al ., 1993 ;Bjorkroth et al., 2014**) il sont obligtoirement hétérofermentaire, ADH négative, production dextane négative par contre il fermente le fructose et le saccharose la souche MCb est classés parmi l'espèce *weissella paramesenteroides* (**Oh et al., 2013 ; Nisiotouet al ., 2014**)

✓ Les lactobacilles

Dans cette étude nous avons isolé quatre souches *Lactobacillus*. D'après l'observation macroscopique faite sur les souches de *Lactobacillus* développée sur milieu MRS (Man *et al.*, 1960), on remarqué que les colonies sont colonie irrégulière, de couleur crème et de 1 à 3 mm de diamètre, et l'observation sous microscope après coloration de Gram, indique qu'il s'agit de bacilles apparents Gram positif (**Klein et al., 1998; Axelsson ; 2004; Hammes et Hertel ., 2006**).

Selon le tableau de **Guiraud 2003**. Seul La souche, MRKa est classés dans le groupe C hétérofermentaire obligatoire par la production de CO₂ sur milieu glucosé, ne développent pas à 45 °C et fermente l'ensemble des sucres testés est classés parmi l'espèce *Lactobacillus brevis*. Le reste des lactobacillus sont des homofermentaire qui diffère du précédent par le non production de gaz. Les souches MRKf et MRKe fermenté le lactose et pas le mannitol sont classés parmi l'espèce *Lactobacillus plantarum*. La souche MRCC fermenté le mannitol et pas le lactose est classés parmi l'espèce *Lactobacillus casei subsp casei*

❖ Activité antibactérien :

Les bactéries lactiques métabolisent le lactose en acide lactique, abaissant ainsi le pH et créant un environnement défavorable au développement des bactéries pathogènes et des microorganismes d'altération.

Parmi les 20 souches purifiées, nous avons sélectionné que tous les souches ont donné un effet inhibiteur vis-à-vis les bactéries suivantes : *Bacillus subtilis* et *E. coli* sur milieu solide, Par la suite, nous avons recherché l'effet inhibiteur des souches productrice dans leurs surnagent de culture, ceci est réalisé par la méthode de diffusion à partir des puits. Nous avons remarqué que cette activité inhibitrice est présente dans le surnagent.

La zone d'inhibition est en générale plus large lorsque on utilise *Bacillus subtilis* car les bactéries lactiques sont surtout actives sur les bactéries pathogènes à Gram positives (O'sullivan *et al.*, 2002) et que Les bactéries à Gram positives sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques . Mais pas tous sur les bactéries à Gram négative (Biswas *et al.*, 1991)

Les souches MK1, *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris*.MK2, *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dixtranicum*.MK4, MRCd, *Leuconostoc lactis*. MRCa, *Leuconostoc mesenteroides* présentent une meilleure activité inhibitrice contre les deux bactéries pathogènes avec un diamètre entre 10 et 18 mm

Les souches restes ont également montré une bonne activité inhibitrice contre les bactéries pathogènes (*E. coli* et *B. subtilis*) avec un diamètre entre 7 à 16 mm. Ces résultats indiquent que nos bactéries sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne.

❖ L'antibiogramme

La majorité des bactéries lactiques ont une résistance contre les antibiotiques. Cette résistance est intrinsèque et non transmissible (Klein *et al.*, 1998).

L'antibiogramme a été effectué sur les différentes souches isolées; après la mesure des diamètres des zones d'inhibition de croissance, les résultats montrent que la plupart des souches sont résistant à la majorité des antibiotiques

Tous les isolats ont montré une résistance totale à l'oxacillin Pour ce qui est du reste des antibiotiques utilisé, il a été remarqué également des sensibilités et résistances en passant par des intermédiaires pour nos isolats.

Tableau : Résultats d'identification des souches de bactéries lactiques isolées.

Echantillon	Code de l'isolat	Espèces identifiées
Le concombre	MK ₁	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp cremoris</i>
	MK ₄	<i>leuconostoc lactis</i>
	MK ₂	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp dixtranicum</i>
	MKa	<i>Lactococcus lactis subsp diacetylactis.</i>
	MRKa	<i>Lactobacillus brevis.</i>
	MRKb	<i>Entérocooccus durans</i>
	MRKc	<i>Pediococcus dextrinicus</i>
	MRKd	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
	MRKe	<i>Pediococcus damnosus</i>
	MRKf	<i>Lactobacillus plantarum.</i>
La carotte	MRCa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	MRCb	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
	MRCc	<i>Lactobacillus casei subsp casei</i>
	MRCd	<i>leuconostoc lactis.</i>
	MRCe	<i>Lactobacillus plantarum.</i>
	Mca	<i>Entérocooccus avium</i>
	MCb	<i>weissella paramesenteroides</i>
	MCc	<i>Entérocooccus mundtii</i>
	MC ₁	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	MC ₂	<i>Lactococcus piscium</i>

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Les bactéries lactiques sont les microorganismes les plus dominants retrouvés au cours de la fermentation des aliments, leurs principales fonctions comprennent la production d'acides organiques, d'alcool, et des composés aromatiques ainsi que d'autre effet tel que l'inhibition des levures, et des microorganismes pathogènes, l'amélioration de la qualité nutritionnelle. Ce sont des microorganismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières notamment végétales d'où on s'est intéressée, et pour la première fois en Algérie, à : fermenter des légumes très répandus caractériser ces flores lactiques et évaluer ces valeurs nutritionnelles.

La recherche des bactéries lactiques présentées dans un produit fermenté est effectuée. De ce fait, 16 isolats bactériens sont obtenus répondant aux formes cocci et 04 bacilles à Gram (+) ont été sélectionnés dans ce travail par rapport à leurs aspect macroscopique et microscopique

Après isolement, purification et détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques (identification). Nous avons pu obtenir 20 isolats apparentées à six genres *Leuconostoc*, *Lactococcus* et *Lactobacillus*, *Pediococcus* *Enterococcus*, *Wiessella*.

Au cours de ce travail, différentes caractéristiques des souches isolées ont été appréciées et se sont montrées satisfaisantes pour une utilisation en agro-alimentaire à savoir la thermorésistante, la production de dextrane sur milieu MSE, la production d'acétoïne

La capacité de produire des substances inhibitrices contre des souches pathogènes, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* a été également déterminé. L'antagonisme a montré l'effet inhibiteur de nos souches vis-à-vis les souches pathogènes avec des zones d'inhibitions allant de 10 et 18 mm

D'après les résultats de l'étude des aptitudes technologiques, nous avons pu déduire que, même au sein d'une même espèce, il existe des variations entre les souches autant au niveau de l'activité acidifiante. Cependant, les souches avaient de bonnes fonctionnalités technologiques.

Ces observations ouvrent des perspectives futures :

- Application du génie génétique pour l'identification des souches isolées.
- Réaliser une culture de légume (carotte et concombre) biologique
- Pousser l'identification des souches à l'échelle moléculaire
- Il est intéressant de faire une caractérisation plus poussée et une purification des substances inhibitrices produites par les souches lactiques

L'enjeu à long terme, surtout pour l'agro-industrie

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- ❖ **Alomar J ; 2007.** Etude de propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et *Lactococcus garvieae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique DeLORRAINE. *avoisier*. Paris. **3**:2-40.
- ❖ **Amandine F ;2017.** Recherche de bactéries lactiques autochtones capables de mener la fermentation de fruits tropicaux avec une augmentation de l'activité antioxydante. Thèse de doctorat. Spécialité : Agroalimentaire, Biotechnologies alimentaires et Sciences des aliments L'Université de La Réunion. P 33
- ❖ **Axelsson L; 2004.** Lactic Acid Bacteria, Classification and Physiology In Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Salminen S., Wright A.v., Ouwehand A.3e Ed., Marcel Dekker : 1-66
- ❖ **Badis A., Guetarni D., Moussa Boudjema B., Henni D.E., Kihal M., 2004.** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21: 579-588
- ❖ **Badis, A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R ; 2005.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « arabia et kabyle ». *Science and Technologie*, **23**:30-37.
- ❖ **Barefoot S.F. et Klaenhammer T.R ; 1983.** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1808-1815.
- ❖ **Bekhouche F ; 2006 :** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes (1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase).Thèse de doctorat. Université De MentouriConstantine.
- ❖ **Bensalah F ;2006.** Identification et caractérisation moléculaire des bactéries lactiques basées sur les techniques d'amplification de séquences spécifiques d'ADN par la méthode PCR. Thèse de Doctorat en Biologie Moléculaire et Génétique. Université d'Oran Es- Senia
- ❖ **Bergey's manual ; 2009.** Systematic of bacteriology. Second Edition. Volume three the firmicutes. Edition springer

biochemical activities of aerobic bacteria and lactic acid bacteria from the air of cheese

biotechnological studies of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk of Algerian
- ❖ **Björkroth J., Holzapfel W., 2006.** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *Prokaryotes.*, 4: 267-319

- ❖ **Björkroth J ;Holzapfel W ;2006.** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community (3rd edition)*. Springer Verlag. New York, USA. pp 267-319
- ❖ **Bjorkroth J., Holzapfell W.H ; 2006.** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella* in : *The Prokaryotes. Vol 4.* Springer, pp 267-319.
- ❖ **Bjorkroth J.A., Holzapfell W.H. and Dicks L.M ; 2009.** Genus *Leuconostoc*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The firmicutes. Second Edition. Volume Three. Springer.
- ❖ **Boudjemaa K ; 2008 .**Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactisérum par streptococcue thermophilus. Mémoire de magister. option biochimie et microbiologie appliquées. Université M'HmedBougara -Boumerdés
- ❖ **Bourgeois C.M ; Larpent J.P ; 1996.** Microbiologie alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome 1. 2e Ed. Tec & Doc., 704p. BOURGEOIS C.M., LARPENT J.-P. Microbiologie alimentaire - Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2. Tec & Doc. 1996,704p.
- ❖ **Broadbent J.R ; 2001.** Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.). 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New
- ❖ **Calvez S ; Belguesmia Y ; Kergourley G ; 2009.** in bactériocines : de la synthèse aux applications in bacteries lactiques : physiologique, métabolisme, génomique et applications industrielles edition : Economica .2009. p 100-122.
- ❖ **Caplice E. et Fitzgerald G.F ; 1999.** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131-149.
- ❖ **Carbiener ; 2010.** Une histoire des carottes 05 juillet 2010 (première publication) 19 octobre 2010 (dernière mise à jour)
- ❖ **Carr F J., Chill D. et Maida N ; 2002.** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, 28: 4,281-370.
- ❖ **Chen YS ; Wu H, Lo H ; Lin W ; Hsu W ; Lin C ; et al ; 2012.** Isolation and characterisation of lactic acid bacteria from jiang-gua (fermented cucumbers), a traditional fermented food in Taiwan. *J Sci Food Agric* 2012;92:2069–75. doi:10.1002/jsfa.5583.
- ❖ **Cheriguene Abderrahim ; 2008.** Caractérisation et Etude du Potentiel Technologique des Bactéries Lactiques isolées à Partir du Lait de Chèvre de l'Ouest Algérien. Thèse de Doctorat en Microbiologie Alimentaire et Industrielle. Université d'Oran Es-Senia
- ❖ **Collins M.D ;2009.** Genus *Vagococcus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The firmicutes. Second Edition. Volume Three. Springer.

- ❖ **Collins M.D. and Falsen E ; 2009.** Genus *Aerococcus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Second Edition. Volume Three. Springer.
- ❖ **Collins M.D., Farrow J.A.E., Phillips B.A., Feresu S. et Jones D., 1987.** Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 310-316.
- ❖ **Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J. and Wallbanks S ; 1993.** Taxonomic studies of 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.
- ❖ **De Man J. C., Rogosa M. and Sharpe M. E ; 1960.** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. appl. Bacteriol.*, 23, 130-135.
- ❖ **Deegan L.H., Cotter ; P .D. and Hill C ; 2006.** Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *Int Dairy J.* 16: 1058-1071.
- Dellaglio F ; De Roissart H ; Torriani S ; Curk M.C ; Janssens D ;1994.** Caractéristiques générale des bactéries lactiques in « Bacterielactique », de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris.
- ❖ **Deroissart H. B., 1986.** Les Bactéries Lactiques .Lait Et Produits Laitiers Vaches, Brebis, Chèvres .Vol : Iii. Ed : Apria.
- ❖ **Desmazeaud, M., 1992.** Les bactéries lactiques In : les groupes microbiens d'intérêt laitier.
- ❖ **De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K. H. and Whiteman W. B ; 2009.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Second Edition. Volume Three. Springer.
- ❖ **Devoyod J.J. et Poullain F., 1988.** Les *Leuconostocs* Propriétés: leur rôle en technologie laitière, *Le Lait*, 68 (3) : 249-280
- ❖ **Di Cagno R, Filannino P, Vincentini O, Lanera A, Cavoski I, Gobbetti M ; 2016.** Exploitation of *Leuconostoc mesenteroides* strains to improve shelf life, rheological, sensory and functional features of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L.) fruit puree. *Food Microbiol.* 59:176–89. doi:10.1016/j.fm.06.009
- ❖ **Dicks L.M.T., Van Vuuren H.J.J., 1987.** A modification of the hot-tube method for the detection of carbon dioxide produced by heterofermentative *Lactobacillus* strains. *J. Microbiol. Meth.*, 6: 273-275
- ❖ **Doguetkoffi- denis D ; 2010.** biocontrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtones de maïs. thèse de doctorat, université bordeaux 1, 185.
- ❖ **Dong X., Xin Y., Jian W., Liu X. and Ling D ;2000.** *Bifidobacterium thermacidophilum* sp.

nov., isolated from an anaerobic digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 119-125.

- ❖ **Dortu, C ; Thonart P ; 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques .caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* , **13**: 143-154.
- ❖ **DoumandjiA.,Hellala.,SaidiN.,2010.**Purificationdelabactériocineapartirde *Lactobacillus acidophilus*11, *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 4: 25-47
- ❖ **Dueñas M ; Fernández D ; Hernández T ; Estrella I ;MuñozR ;2005.**Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vignasinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *J Sci Food Agric*185;85:297–304. doi:10.1002/jsfa.1924.
- ❖ **Dworkin I. and Gibson G ; 2006.** Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-beta signaling contributes to variation for wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 173:1417–1431.
- ❖ **FacklamR ; 1972.** Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Apple. Microbiol*, **23** :1131-1139.
- factories. *Int. J. Dairy Technol.* vol. 59, no3, pp. 200-208.
- ❖ **FalagasM.E ;Betsi G I ; Athanasiou S ; 2006.** Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother.***58**: 266-272.
- ❖ **FAO ; 2016.** Food and Agriculture Organisation (FAO) Institution spécialisée des Nations Unies.
- ❖ **Fox P.F., McsweeneyP.L.H ; 2004.** Cheese: an overview. In: p.l.h.m.t.m.c. atrick f. Fox & timothy p.g. (eds.) *Cheese: chemistry, physics and microbiology.* Academicpress.
- ❖ **Franciosi E, Settanni L, Cavazza A, Poznanski E ; 2009.**Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal.*, 19: 3-11
- ❖ **Gálvez A., Abriouel H., Ben Omar N, Lucas R ; 2011.** Food Applications and Regulation
- ❖ **Garvie E.I., 1986.** Gram positive cocci - Genus*Leuconostoc*. In: *Bergeys'Manual*, 9th edit., the Williams and Wilkins Co., *Baltimore*, pp: 1071-1075
- ❖ **Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. & Krieg, N. R. (1994).** Method for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology. 518P.
- ❖ **GeversD ; 2002.** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doctorat. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent.Belgium.
- ❖ **GhanbariM ; Jami M ; Domig KJ ; Kneifel W ; 2013.** Seafood biopreservation by lactic acid bacteria - A review. *LWT - Food SciTechnol* 2013;54:315–24.doi:10.1016/j.lwt.2013.05.039.

Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *Dirasat, AgruiculturalSci.* 32: 3, 304-312.

- ❖ **Guessas B., Hadadji M., Saidi N. et Kihal M ; 2006.** Inhibition of *Staphylococcus aureus*
- ❖ **Guiraud J.P ; 2003.** Microbiologie Alimentaire. *Tec & Doc, Dunod.* Paris. 90-292.
- ❖ **Guiraud J.P ; 1998.** Microbiologie alimentaire. 1e Ed., Dunod. Paris. 136-144.
- ❖ **Guiraud J.-P ; 2003.** Microbiologie alimentaire. Dunod–RIA., 696.

- ❖ **Guiraud J.P., Rosec J.P ; 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Afnor. Saint-Denis la plaine, Paris. 300 p.
- ❖ **Haddie J.M ; 1986.** Other streptococci. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). **1** :1070.
- ❖ **Hadef S ; 2012.** Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de Magister. Université KasdiMerbahOuargla.
- ❖ **Hammes W.P. and Hertel C ; 2006.** The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *The Prokaryotes.* Vol 4. Springer. pp320–403.

- ❖ **Heleni S., Lefki P., Nikolaos T. and Evanthia L.T., 2006.** Populations, types and
- ❖ **Herve-Jimenez L., Guillouard I., Guedon E., Boudebouze S., Hols P., Monnet V., Maguin E., Rul, F., 2009.** Postgenomic analysis of streptococcus thermophilus cocultivated in milk with lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. *Appl environ microbiol.*, 75 (7): p. 2062-2073.
- ❖ **Holzappel W.H., Franz C.M., Ludwig W. and Dicks L.M.T ; 2009.** Genus *Pediococcus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes.* Second Edition. Volume Three. Springer.
- ❖ **Hur S.J ; Lee S.Y ; Kim Y.-C ; Choi I ; Kim G.-B ; 2014.** Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chem*;160:346–56. doi:10.1016/j.foodchem..03.112.
- ❖ **Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S., Tani A., Maneerat S., 2011.** Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control.*, 22: 401-407
- ❖ **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
- ❖ **ITCMI., 2010.** fiche techniques valorisées des cultures maraîchères et industrielles.

- ❖ **Kacem M. et Karam N ; 2006.** Physicochemical and microbiological study of «Shmen», a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeast. *Grasas y Aceites*, Vol 57, No 2. pp 192-197.

- ❖ **Kacem M., Zadi-Karam H., Karam N-E., 2002.**Bactéries lactiques isolées de lait de vaches, de brebis et de chèvre de l'Ouest Algerien. *Renc. Rech. Ruminants*, 9:375
- ❖ **Kandler O ; Weiss N ; 1986.** Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: Sneath P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology (8nd ed.)*. Baltimor. pp 208-1234.
- ❖ **Kihal M ; 1996.** Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides*, éléments d'application en technologie fromagère type fromage bleu. Thèse de Doctorat. Université d'Oran.
- ❖ **Klein G ; Pack A ; Bonaparte C ; Reuter G ; 1998.** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria International. *Journal of Food Microbiology.*, 41: 103-125
- ❖ **Konings W.N., Lolkema J.S., Bolhuis H., van Veen H.W., Poolman B. et AJMI D ; 1994.**Mécanisme du transport des nutriments dans bactéries lactiques In : De Roissart, H. et Luquet, F. M., Bactéries lactiques. *Lorica, uriage1* : 209-238
- ❖ **Kovacs L.G., Ballati P.A., Kroshman H. B. & Pueppke S. G; 1995).** Transcriptional organisation and expression of nol XWBTUV. A locus that regulate cultivar-specific nodulation soybean by *Rhizobium fredii* USDA275. *Molecular Microbiology*, 17:923-933.
- ❖ **Lahtinen S ; Ouwehand A.C ; Salminen S ; Wright A.V ; 2012.** Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects Fourth edition Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York
- ❖ **Larpent G.M ; Michaux O ; Lrpent J.P ; Desmasures N ; Desmazeaud M ; Mangin I ; Masson F ; Montel M.C. et Tailliez Patrick., 1997.** Les ferments lactiques et bactéries apparentées In Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire. Larpent J-P. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 199-255
- ❖ **Larpent J-P., 1996.** Les bactéries lactiques In Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires. Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 4-33
- ❖ **Larpent J-P., Copin M-P., Germonville A., Jaquet M., Thétas J-L., 1997.** Microbiologie du lait et des produits laitiers In Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire. Larpent J-P. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 704-805
- ❖ **Larpent S P ; 1997.** Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire. *Ed. Tech et Doc*, Lavoisier, Paris.
- ❖ **Larpent-gourgaud M, Michaux O, Larpent JP, Desmasures N, Desmazeaud M, Larpent-Gourgaud Monique, Michaux odile, Lrpent J.P, Desmasures Nathalie, Desmazeaud Michel, Mangin Irène, Masson Florence, Montel M.C et Tailliez Patrick ; 1997.** Les

ferments lactiques et bactéries apparentées In Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire. Larpent J-P. Tec & Doc, Lavoisier : 199-255□.

- ❖ **Leroi F ; Cornet J ; Chevalier F ; Cardinal M ; Coeuret G ; Chaillou S. et al ; 2015.** Selection of bioprotective cultures for preventing cold-smoked salmon spoilage. *Int J Food Microbiol*;213:79–8 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.005.

- ❖ **Les fruits et légumes frais interfel;** association interprofessionnelle nationale agricole par le droit rural français
Leuconostoc mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Science*, 45: 655-656

- ❖ **Leveau J Y., Bouix Mrielle. Et De Roissart H ;1991.** La flore lactique In Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Bourgeois C.M., Leveau J-Y. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 152-186

- ❖ **Leveau J-Y., Bouix Mrielle, De Roissart H., 1991.** La flore lactique In Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Bourgeois C.M., Leveau J-Y. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp:152-18

- ❖ **Lmosowtin G.K.Y ;Broom M.C et Powell L.B ;2004.** Lactic acid bacteria, taxonomy. In encyclopedia of dairy science. Roginski H. Oxford, elsevier, 1470-1478

- ❖ **Loubière P. et Cocaign-Bousquet M ; 2009.** Métabolisme des bactéries lactiques. In Drider, D. et Prévost, H., Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles. *Economica*: 29-46.

- ❖ **Makhloufi K. M ; 2012.** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité : microbiologie, biochimie (école doctorale iviv)

- ❖ **Marth et Steele ; 2001.** In Zergoug A ; 2017. Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires. Thèse de doctorat. Spécialité : Microbiologie appliquée. Université Abdelhamid Benbadis – Mostaganem

- ❖ **Matsumoto M. and Benno Y ; 2004.** Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM 512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutation Research* 568 :147-153.

- ❖ **Mayeux, J.V., Sandine, W.E., Elliker, P.R.** 1962. A selective medium for detecting

- ❖ **Milliere J.B., Mathot A-G, Schmitt P., Divies C., 1989.** Phenotypic characterization of *Leuconostoc* species. *Journal of Applied Bacteriology.*, 67: 529-542

- ❖ **Moëller V ; 1955.** Simplified tests of some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 36: 158-172

- ❖ **Montet D ; Ray R ; Zakhia-Rozis N ; 2014.** Lactic acid fermentation of vegetables and fruits. Ferment
 - ❖ **Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M ; 2010.** Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. *Blackwell. Publishing.*13.
 - ❖ **Novel G ; 1993.** Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. et Doc. Lavoisier Paris, pp: 170-374.
 - ❖ **O'Sulvan L., Ross R.P. et Hill C ; 2003.** Potential of bacteriocin- producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.* 84: 593-604.
 - ❖ **Ogier J.-C., Casalta E., Farrokh C., Saïhi A ; 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int J Food Microbiology.*, 126: 286-290
 - ❖ **Patrignani F ; Lanciotti R ; Mathara J. M ; Guerzoni M. E ; Holzapfel W.H ; 2006.** Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the fermented food. *Dairy Products.*32-45-01.
 - ❖ **Pilet M.F., Magras C. et Federighi M ; 2005.** Bactéries lactiques. *In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica.* Paris.219-240.
 - ❖ **Pilet M.F., Magras C. et Federighi M ; 1998.** Bactéries lactiques. *In : Manuel de bactériologie alimentaire (Sutra L., Federighi M., Jouve J.L.). Polytechnica.* Paris. 235- 260.
 - ❖ **Pirotta M.G.J ; Chondros P ; Grover S ; O'Malley P ; Hurley S ; Garland S ; 2004** Effect of *Lactobacillus* in preventing post-antibiotic vulvovaginal candidiasis: a randomised controlled trial. *BMJ.*329: 548.
 - ❖ **Pot B ; 2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria. *In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier.* Paris.1-106.
- Prevost H. et Kihal M., 2002.** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de Chèvre des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides.* 1: 1-11.
- ❖ **Quiberoni A ; Rezaiki L., El karoui M ; Biswas I ; Tailliez P. and Gruss A ; 2001.** Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. *Res Microbiol.* 152 :131-139.
 - ❖ **Raynaud S ; 2006.** Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de Doctorat, Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries Toulouse N° d'ordre : 826 pages : 309
 - ❖ **Reddy G ; Altaf M ; Naveena BJ ; Venkateshwar M ; Kumar EV ; 2008.** Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. *Biotechnol Adv;*26:22–34. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.07.004.

- ❖ **Reduron J.P., 2007.** Ombellifères de France 2. Bull. de la SBCO, NS, Numéro spécial 27
- ❖ **Rodríguez H ; Curiel JA ; Landete JM ;de las Rivas B ; de Felipe FL ;Gómez-Cordovés C ; et al.**Food phenolics and lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol 2009;132:79–90.188doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025.
- ❖ **Rouissat L. And Bensoltane A., 2006.** Physicochemical, microbiological and
- ❖ **Ruiz F.O ; Gerbaldo G ; Asurmendi P ; Pascual L.M ; Giordano W, ;Barberis I.L ; 2009.**Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens,

and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol.* **59**: 497-501

- ❖ **Säde E ; 2011.** *Leuconostoc* Spoilage of refrigerated, packaged foods. doctoral thesis. University of Helsinki Finland.
- ❖ **Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E., Salminen S ; Gorbach S ; Lee Y.K ; Benno Y ; 2004.** Human studies on probiotics: what is scientifically proven today. *In* : Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 515-530.
- ❖ **Salminen S ; Wright A.V ; Ouwehand A. ; 2004.** Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects Third edition Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York
- ❖ **Salminen S., Gorbach S., Lee Y.K. and Benno Y ; 2004.** Human studies on probiotics: what is scientifically proven today. *In*: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 515-530.
- ❖ **Samelis J., Maurogenakis F. et Metaxopoulos J., 1994.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami, *Inter. J. Food. Microbiol.*, **23**: 179-196
- ❖ **Sánchez I ; Palop L ; Ballesteros C ; 2000.** Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of “Almagro” eggplants. *Int J Food Microbiol* **2000**; **59**: 9–17. doi:10.1016/S0168-1605(00)00256-7.
- ❖ **Schillinger U.1., Lücke F.K ; 1989.** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol.* **55**(8) : 1901-6.
- ❖ **Schleifer K.H ; 1987.** Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters.* **46** : 201-203.
- ❖ **Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Balz R., Collins M.D. and Fischer R ; 1985.** Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus*. *gen. Novsystematic and applied Microbiology.* **6**, 183-195.
- ❖ **Smid E.J ; Kleerebezem M ; 2014.** Production of aroma compounds in lactic fermentations. *Annu Rev Food Sci Technol* **2014**; **5**: 313–26. doi:10.1146/annurev-food-030713-092339.
- ❖ **Stiles M.E. and Holzappel W.H ; 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36** : 1-29.
- Streit F ; 2008.** Influence des conditions de récolte et de concentration sur l'état physiologique et la cryotolérance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CF11.

Thèse de Doctorat. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement(Agro Paris Tech).

- ❖ **Tamang B, TamangJP ; 2010.** In situ fermentation dynamics during production of gundruk and khalpi, ethnic fermented vegetable products of the Himalayas. *Indian J Microbiol*2010;50:93–8. doi:10.1007/s12088-010-0058-1.
- ❖ **TamangJP ; Watanabe K ; Holzapfel WH ; 2016.** Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Front Microbiol*;7:377.doi:10.3389/fmicb.00377.
- ❖ **TamimeA.Y ; 2002.** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). *3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York.*261-366.
- ❖ **Teuber M. and GeisA ; 2006.** The genus *Lactococcus*. Chapter 1.2.7. The Prokaryotes. Vol 4.Springer, pp4:205-207.
- ❖ **Thompson J. et Gentry-Weeks C.R ; 1994.** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. *In : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). Loric, Uriage. 1 : 239- 290.*
- ❖ **Thompson J., Gentry-Weeks C.R ; 1994.** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques, Vol. I, p 239-290 (Editeurs : De Roissart H.,Luquet tow breeds (Ouled Djellal and El Hamra). *Egypt. J. App. Sci. 21: (2b), 567-582.*
- ❖ **Vandamme P ; Pot B ; Gillis M ; DeVos P ; Keresters K ; Swings J ; 1996.** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* 60 : 407.
- ❖ **Villeneuve F ; Le Cam B ;Rouxel F., 1992.**Analyse de la ore fongique de la carotte conservée au froid : prépondérance de Mycocentrospora acerina.
- ❖ **Yateem et al., 2008. In Zergoug A ; 2017.** Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires. Thèse de doctorat. Spécialité : Microbiologie appliquée. Université Abdelhamid Benbadis – Mostaganem
- ❖ **Zadi Karam H., Karam N-E., 2006.**Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicultura.*, 24(3): 153-156
- ❖ **Zarour K ; 2010.** Contribution à l'étude microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées de différents écosystèmes. Mémoire de Magister. Université D'Oran Es-Senia.
- ❖ **Zergoug A ; 2017.** Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires. Thèse de doctorat. Spécialité : Microbiologie appliquée. Université Abdelhamid Benbadis – Mostaganem. P82

❖ **Zhang H ;Cai Y ; 2014.** Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice.Springer[□]DordrechtHeidelbergNewYorkLondonP:535.

Annexes

Milieux de culture**1. Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe,1960)**

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Polypeptone	10 g
Citrate de sodium	2 g
Acétate de sodium	5 g
Glucose	20 g
KH₂PO₄	2 g
MgSO₄	0,25g
MnSO₄	0,05 g
Agar-Agar	15 g
Eau distillée	100 ml
PH	6,2

➤ **Autoclavage : 120°C/ 20minutes.**

2. Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

Peptone papainique de soja	5g
Peptone trypsique de caséine	2,5 g
Peptone pepsique de viande	2,5 g
Extrait de levure	2.5 g
Extrait de viande	5 g
Glycérophosphate de sodium	19 g
Sulfate de magnésium	0.25 g
Acide ascorbique	0.5 g
Agar	15g
Eau distillée	950ml
pH	7,1 ± 0.2

ANNEXES

➤ **Autoclavage** :120°C/ 20minutes.

3. Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker,1962)

Tryptone	20 g
Gélatine	2.5 g
Extrait de levure	5 g
Saccharose	100 g
Glucose	5 g
Citrate de sodium	1 g
Azide de sodium	0.075 g
Agar-Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
PH	6,8

➤ **Autoclavage** : 120°C/ 20minutes.

4. Clark et Lubs:

Peptone	5g
Phosphate dipotassique	5g
Glucose	5g
Eau distillée	950ml

➤ **La réaction de VogesProskauer (VP) :**

- Ajouter 10gouttes de VP1 et le même volume de VP2;
- Incliner le tube pour permettre une bonneoxygénation.
- Attendre quelques min à 1heure.
- **Réactif VP1** : alpha naphthol (6g) +100ml alcool éthylique à 60%(conservé en flacon opaque au réfrigérateur). **Réactif VP2** : Soude concentrée (ou depotasse).

5. Gélose nutritif (GN)

Peptone	5 g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
NaCl	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml
PH	7

➤ **Autoclavage** : durant 15 min à 121°C.

6. Milieu de Moëller (Moëller,1955)

Peptone	5g
Extrait de viande	5g
Glucose	0,5g
Pridaxal	5mg
Pourpre de bromocrésol	0,1g
Rouge de crésol	5mg
Eau distillée	1000ml
pH	6,4

➤ Le milieu à l'arginine est obtenu en ajoutant 10g d'arginine. Stériliser 15 min à 120°C.

7. Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton,1941)

Infusion de viande de bœuf	3000 cm³
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar-agar	17 g
pH	7,4

➤ **Autoclavage** : 120°C, 20min.

ANNEXES

8. Lait bleu de Scharman1%

Lait écrémé stérile	09ml
Bleu de méthylène à 1%	01ml
PH	7

- Stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 15 minutes.

9. Lait bleu de Scharman3%

Lait écrémé stérile	07ml
Bleu de Méthylène	03ml
PH	7

- Stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 15 minutes.

10.Lessucres

Sucre	20g
Eau distillé	100 ml

- Tyndallisation « 70°C pendant 30 minutes à trois reprises »

11.Gelose Au Tellurite(Ph=7.1)

Extraitdeviande	10g
Extraitdelevure	03g
Peptone	05g
NaCl	05g
Glucose	05g
Agar	20g

- Ajouter 50 ml de téllurite de potassium.

12. Eau Physiologique

Chlorure de sodium	8,5 g
Peptone	0,5 g
Eau distillée	1000 ml
PH	7,0

➤ Autoclavage 120°C pendant 20minutes.

13. Bouillon MRS

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
Glucose	20 g
KH₂PO₄	2 g
MgSO₄	0,25 g
MnSO₄	0,05 g
Eau distillée	1000 ml
pH	6,8

➤ Autoclavage :120°C, 20min.