



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTERE DE
L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES

N° d'enregistrement.../.../.../.../



Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat ès Sciences

Filière : Sciences Biologiques Option : Microbiologie Appliquée

Potentiel technologique des souches *Leuconostoc* isolées à partir de différents produits laitiers de la

Présentée par : M^r Bouricha M'hamed

Publiquement le 06/06/2022

Devant le jury :

Président	Boual Zakaria	Professeur	Université Kasdi Merbah Ouargla
Directrice de thèse	Bissati-Bouafia Samia	Professeur	Université Kasdi Merbah Ouargla
Co-directrice de thèse	Hammoudi Roukia	MCA	Université Kasdi Merbah Ouargla
Examineurs	Boumediene Moussa Boudjemaa	Professeur	Université Aboubakr Belkaid Tlemcen
	Derouich Samir	MCA	Université Hamma Lakhdar El Oued
	Hioual- Becila Samira	Professeur	INATA Constantine

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Mon premier remerciement ira au bon Dieu miséricordieux qui m'a donné la santé, le courage, la volonté et la patience pour réaliser ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à ma directrice de thèse, Madame Bissati-Bouafia Samia, professeur à l'université de Ouargla, pour m'avoir encadré et dirigé tout le long de cette thèse, partageant ses connaissances scientifiques et son savoir. Je vous serai toujours reconnaissant pour votre disponibilité, votre soutien continu et votre patience qui m'ont permis de mener à bien mon travail.

En second lieu, mes plus vifs remerciements vont à ma co-directrice de thèse Mademoiselle Hammoudi Roukia, MCA à l'université de Ouargla. Toute ma gratitude pour tous les précieux conseils donnés, votre temps, votre dévouement, et surtout la gentillesse et la disponibilité.

Je tiens à remercier Monsieur Boual Zakaria, Professeur à l'université de Ouargla de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie sincèrement Monsieur Moussa-Boudjamaa Boumediène, Professeur à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Je remercie vivement Monsieur Derouiche Samir, MCA à l'Université d'el Oued, de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie aussi vivement, Madame Hioual-Becila Samira, Professeur à IINATA Constantine, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

J'aimerais témoigner ma gratitude au professeur Mhammed Elhadj Mahfoud ex directeur du laboratoire de Biogéochimie des Milieux Désertiques, Université de Ouargla, qui a accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire, et mis à ma

disposition tout le matériel, produits et connaissances scientifiques nécessaires pour la réalisation de ce travail. Monsieur je vous serai toujours reconnaissant pour votre soutien et l'intérêt porté à mon sujet de recherche

Je tiens tout particulièrement à remercier Dr. Bekhalfa Hakim, directeur du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico – Chimiques (CRAPC) de Ouargla pour m'avoir accueilli et avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour réaliser les expériences nécessaires. J'y ai rencontré une équipe extraordinaire qui m'a beaucoup aidé à réaliser ce travail

Je voudrais également remercier Monsieur Beggari Layech, responsable des laboratoires pédagogiques de la faculté SNV (université de Ouargla).

Je tiens à remercier Monsieur Eddoud Amar, enseignant à la faculté SNV (université de Ouargla) pour ses conseils, son aide et son encouragement. Je remercie infiniment Monsieur Hamdi Aissa Belhadj, professeur à la faculté SNV (université de Ouargla).

Toute ma reconnaissance et remerciements envers Monsieur Henni Abdallah, MCA à la faculté SNV (université de Ouargla), pour son aide, ses encouragements et pour tout ce qu'il a fait pour que ce travail soit réalisé, merci infiniment.

A la mémoire de mon père

**A celle qui a sacrifié tout ce qu'elle a de cher pour me prodiguer
une éducation, un soutien, une assistance et un
encouragement pour enfin devenir ce que je suis maintenant.**

Dieu merci

Ma chère mère

**Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon amour et mon
attachement envers toi. Depuis toujours, tu n'as cessé de me
soutenir et de m'épauler. Tu me voulais toujours le meilleur.**

**Aucun mot ne pourrait exprimer ma gratitude, mon amour,
mon respect et Je remercie le bon dieu qui a croisé nos
chemins. Duisse le bon dieu nous procure santé et longue vie :**

Ma chère épouse

A mes deux enfants, Sidahmed Islam et Hadjer

A mes sœurs, Kheira, Hiziya et Zineb

A mes frères Mohamed et Sidahmed

A Bechar Houari

A mes chers neveux, Abd el Kader et Abd Errahmane

A ma nièce, Nour

A toute les familles Bouricha, Benzineb et Bechar

A ma chère Boudida

Résumé

Potentiel technologique des souches *Leuconostoc* isolées à partir de différents produits laitiers de la région de Ouargla

Certaines espèces de *Leuconostoc* sont très importantes pour les produits laitiers fermentés, car elles contribuent aux caractéristiques organoleptiques du beurre et de la crème, et contribuent également à la formation d'ouvertures dans certains fromages à pâte molle, beaucoup artisanaux ou en fromages à pâte persillée, comme le Roquefort. A partir du présent travail, nous avons pu isoler 38 souches de *Leuconostoc* de différents produits laitiers (lait de chèvre, lait de chamelle, lait de vache et fromage traditionnel). Les tests morphologiques, microbiologiques et biochimiques classiques ont permis l'identification phénotypique des isolats. L'étude de production d'un exopolysaccharide (EPS) mise en évidence sur milieu MSE, a révélé que 30 souches ont montré une production d'EPS par l'apparition de colonies gluantes et gélatineuses. La quantification d'EPS par dosage des sucres totaux a montré des niveaux de production variant entre $0,63 \pm 0,19$ g/l et $2,41 \pm 0,17$ g/l. L'optimisation des conditions nutritionnelles de production (Glucose, extrait de levure et saccharose) a montré que les souches *Leuconostoc* ont une meilleure production dans une concentration de 20g/l de glucose, 3g/l d'extrait de levure et 100g/l de saccharose. L'activité antibactérienne des souches *Leuconostoc* isolées a été mise en évidence vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC43300, *Esherichia coli* ATCC25992, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 et *Salmonella typhi* ATCC14028, en utilisant la méthode directe d'antagonisme sur gélose. Elle a révélé que 24 souches présentaient une activité antibactérienne avec une zone d'inhibition variable. La caractérisation physico-chimique de bactériocines produites chez les souches isolées, sélectionnées antagonistes a montré leur thermo-résistance, et leur sensibilité aux protéases. La purification partielle des protéines actives, produites par les souches testées sur leur pouvoir à produire les bactériocines, a permis de sélectionner 12 souches. L'étude du suivi de croissance des souches pathogènes en présence et en absence des substances antimicrobiennes, a révélé une inhibition considérable de la croissance des souches indicatrices, après l'ajout d'un volume de 1 ml de surnageants des souches Ln sélectionnées. La biosynthèse des nanoparticules d'Argent (AgNps) en utilisant le surnageant d'une croissance de la souche *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteeroides*. La couleur de la solution AgNPs synthétisée est d'une couleur marron foncé, avec une absorbance avec une absorbance maximale 465nm Le microscope électronique à balayage a révélé que la structure des AgNPs est d'une forme sphérique ainsi qu'une analyse par diffraction des rayons X a été effectuée pour identifier les différentes phases de nanoparticules d'Ag biosynthétisées. L'activité photocatalytique des AgNPs a montré que la dégradation des colorants utilisés (bleu de méthylène, rouge Congo et orange de méthyle) se fait après un temps de 40 mn. Les AgNPs biosynthétisé ont une activité antimicrobienne vis-à-vis *Candida albicans* ATCC10237, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Staphylococcus aureus* ATTC43300,) *Salmonella abony* ATCC6017, *Micrococcus luteus* ATCC 9314, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *E. coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC70603. Cette étude met en évidence que les bactéries lactiques adventives peuvent être une excellente source de nouvelles souches avec des caractéristiques technologiques intéressantes qui pourraient être utilisées pour les produits laitiers fermentés.

Mots clés : Produits laitiers, *Leuconosotc*, Exopolysaccharide, Activité antibactérienne, nanoparticules d'Argent

Abstract

Technological potential of *Leuconostoc* strains isolated from different dairy products from the Ouargla region

Some species of *Leuconostoc* are very important for fermented milk products, as they contribute to the organoleptic characteristics of butter and cream, and also contribute to the formation of openings in certain soft cheeses, many artisanal or in blue-veined cheeses, such as Roquefort. From the present work, we were able to isolate 38 strains of *Leuconostoc* from different dairy products (goat's milk, camel's milk, cow's milk and traditional cheese). Standard morphological, microbiological and biochemical tests allowed the phenotypic identification of the isolates. The study of production of an exopolysaccharide (EPS) highlighted on MSE medium, revealed that 30 strains showed production of EPS by the appearance of sticky and gelatinous colonies. Quantification of EPS by dosage of total sugars showed production levels varying between 0.63 ± 0.19 g/l and 2.41 ± 0.17 g/l. The optimization of the nutritional conditions of production (Glucose, yeast extract and sucrose) showed that the *Leuconostoc* strains have a better production in a concentration of 20g/l of glucose, 3g/l of yeast extract and 100g/l of sucrose. The antibacterial activity of the isolated *Leuconostoc* strains was demonstrated against *Staphylococcus aureus* ATCC43300, *Escherichia coli* ATCC25992, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 and *Salmonella typhi* ATCC14028, using the direct agar antagonism method. It revealed that 24 strains exhibited antibacterial activity with a variable zone of inhibition. The physico-chemical characterization of bacteriocins produced in isolated strains, selected as antagonists, showed their heat resistance and their sensitivity to proteases. Partial purification of the active proteins produced by the strains tested on their ability to produce bacteriocins made it possible to select 12 strains. The study of the growth monitoring of the pathogenic strains in the presence and in the absence of the antimicrobial substances revealed a considerable inhibition of the growth of the indicator strains, after the addition of a volume of 1 ml of supernatants of the selected Ln strains. The biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the supernatant of a growth of the strain *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. The color of the synthesized AgNPs solution is a dark brown color, with an absorbance of 465nm. The scanning electron microscope revealed that the structure of AgNPs is of a spherical shape as well as X-ray diffraction analysis was performed to identify the different phases of biosynthesized Ag nanoparticles. The photocatalytic activity of the AgNPs showed that the degradation of the dyes used (methylene blue, Congo red and methyl orange) takes place after a time of 40 min. Biosynthesized AgNPs have antimicrobial activity against *Candida albicans* ATCC10237, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Staphylococcus aureus* ATCC43300, *Salmonella abony* ATCC6017, *Micrococcus luteus* ATCC 9314, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *E. coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC70603. This study highlights that adventitious lactic acid bacteria can be an excellent source of new strains with interesting technological characteristics that could be used for fermented dairy products.

Keywords : Dairy products, *Leuconostoc*, Exopolysaccharide, Antibacterial activity, Silver nanoparticles

المخلص

القدرات التكنولوجية لسلاسلات *Leuconostoc* المعزولة من منتجات الألبان المختلفة من منطقة ورقلة

تعتبر بعض أنواع *Leuconostoc* مهمة جدًا لمنتجات الألبان المخمرة ، حيث إنها تساهم في الخصائص الحسية للزبدة والقشدة ، كما تساهم في تكوين فتحات في بعض أنواع الجبن الطري ، العديد من الجبن المصنوع يدويًا أو في الأجبان ذات العروق الزرقاء ، مثل Roquefort. سمح لنا هذا العمل بعزل 38 سلالة من *Leuconostoc* من منتجات الألبان المختلفة (حليب الماعز وحليب الإبل وحليب البقر والجبن التقليدي). سمحت الاختبارات المورفولوجية والميكروبيولوجية والكيميائية الحيوية القياسية بالتعرف على النمط الظاهري للعزلات . كشفت دراسة إنتاج عديد السكاريد الخارجي (EPS) الذي تم إبرازه على وسط MSE ، أن 30 سلالة أظهرت إنتاج EPS من خلال ظهور المستعمرات اللزجة والجيلاتينية. أظهر القياس الكمي لـ EPS بالجرعة من إجمالي السكريات مستويات إنتاج تتراوح بين 0.19 ± 0.63 جم / لتر و 0.17 ± 2.41 جم / لتر. تم إثبات النشاط المضاد للبكتيريا لسلاسلات *Leuconostoc* المعزولة ضد *Staphylococcus aureus* ATCC43300 و *Escherichia coli* ATCC25992 و *Bacillus subtilis* ATCC6633 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 و *Salmonella typhi* ATCC14028 ، باستخدام طريقة العداء المباشر لأجار. وكشفت أن 24 سلالة أظهرت نشاطا مضادا للبكتيريا مع منطقة متغيرة من التنشيط. أظهر التوصيف الفيزيائي والكيميائي للبكتريوسينات المنتجة في سلالات معزولة ، تم اختيارها كمضادات ، مقاومتها للحرارة وحساسيتها للبروتياز. أتاح التنقية الجزئية للبروتينات النشطة ، التي تنتجها السلالات المختبرة على قدرتها على إنتاج البكتيريا ، إمكانية اختيار 12 سلالة. كشفت دراسة مراقبة نمو السلالات المسببة للأمراض في وجود المواد المضادة للميكروبات وغيابها عن تنشيط كبير لنمو سلالات المؤشر ، بعد إضافة حجم 1 مل من المواد الطافية لسلاسلات Ln المختارة. التخليق الحيوي لجسيمات الفضة النانوية (AgNps) باستخدام طاف لنمو سلالة *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteoides*. لون محلول AgNPs المركب هو لون بني غامق ، بامتصاص 465 نانومتر. أظهر المجهر الإلكتروني الماسح أن بنية AgNPs كروية الشكل وكذلك تحليل حيود الأشعة السينية تم إجراؤه لتحديد المراحل المختلفة للتخليق الحيوي حج الجسيمات النانوية. أظهر النشاط الضوئي لـ AgNPs أن تحلل الأصباغ المستخدمة (أزرق الميثيلين وأحمر الكونغو وبرتقال الميثيل) يحدث بعد وقت قدره 40 دقيقة. AgNPs المُصنَّع بيولوجيًا له نشاط مضاد للميكروبات ضد

(*Candida albicans* ATCC10237, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Staphylococcus aureus* ATTC43300,) *Salmonella abony* ATCC6017, *Micrococcus luteus* ATCC 9314, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC27853, *Peseudomonas aeruginosa* ATTC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *E. coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC70603.

تسلط هذه الدراسة الضوء على أن بكتيريا حمض اللاكتيك العرضية يمكن أن تكون مصدرًا ممتازًا لسلاسلات جديدة ذات خصائص تكنولوجية مثيرة للاهتمام يمكن استخدامها في منتجات الألبان المخمرة.

الكلمات المفتاحية : منتجات الألبان ، *Leuconostoc* ، عديدات السكاريد الخارجية ، نشاط مضاد للجراثيم ، جزيئات الفضة النانوي

Table des matières

Remerciements

Résumé

Abstract

الملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Listes des abréviations

Introduction	1
I. Bactéries lactiques	4
I.1. Généralités	4
1.2. Genre <i>Leuconostoc</i>	5
1.2.1. Définition	5
1.2.2. Ecologie	6
1.2.3. Génome et classification	6
I.3. Intérêts technologiques des leuconostocs	7
I.3.1. Pouvoir acidifiant	7
I.3.2. Pouvoir aromatisant.....	8
I.3.3. Pouvoir texturant	8
I.3.4. Pouvoir antimicrobien.....	8
I.3.5. Bactériocines des leuconostocs	9
I.3.4. Pouvoir probiotique des leuconostocs	13
I.3.5. Pouvoir de production du mannitol.....	13
I.3.6. Pouvoir d'hydrolyser des α -galactosides	13
I.3.7. Production des vitamines	14
II. Dextrane	14
II.1. Définition	14
II.2. Production de dextrane	16
II.3. Conditions de la production de dextrane	17
II.4. Application de dextrane.....	19

III. Biosynthèse de nanoparticules d'argent.....	21
III.1. Définition des nano particules (NPs).....	21
III.2. Synthèse bactérienne de nanoparticules	21
III.3. Nanoparticules d'argent (AgNPs).....	21
III.4. Applications des AgNPs.....	22
III.4.1. Effet antimicrobien des AgNPs	23
III.4.2. Appareils photovoltaïques	24
III.4.3. Catalyseur pour l'hydrolyse/électrolyse de la matrice polymère	24
III.4.4. Filtration et traitement de l'eau.....	25
Materiel et méthodes.....	26
I. Isolement des souches <i>Leuconostoc</i>	26
I.1. Provenance des échantillons	26
I.1.1. Préparation des dilutions	27
I.2. Isolement et purification.....	27
I.2.1. Isolement	27
I.2.2. Purification	27
I.3. Conservation des isolats	28
I.3.1. Conservation à court terme (courte durée).....	28
I.3.2. Conservation à long terme (longue durée).....	28
I.4. Tests d'identification des bactéries lactiques	28
I.4.1. Tests morphologiques.....	28
I.4.2. Recherche de la catalase.....	29
I.4.3. Tests physiologiques	29
I.4.4. Tests biochimiques.....	30
II. Etude du potentiel technologique des isolats.....	32
II.1. Production et optimisation des conditions nutritionnelles de production des EPS	32
II.1.1. Criblage des souches productrices de dextrane	32
II.1.2. Précipitation et extraction du dextrane.....	32
II.1.3. Quantification du dextrane par dosage	32
II.1.4. Optimisation de production de dextrane	33
II.2. Etude de l'activité antimicrobienne des souches <i>Leuconostoc</i> vis-à-vis des bactéries pathogènes	35
II.2.1. Souches pathogènes utilisées	35

II.2.2. Etude de l'activité antimicrobienne des isolats vis-à-vis des bactéries pathogènes	36
II.2.3. Caractérisation de l'agent antagoniste	37
II.2.4. Purification partielle de la bactériocine	38
II.2.5. Mode d'action de la bactériocine.....	39
II.3. Effet des substances antimicrobiennes produites par une souche lactique <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i> sur la qualité microbiologique d'un fromage frais J'ben de chèvre.....	39
II.3.1. Surnageant de la souche.....	39
II.3.2. Collecte du lait de chèvre.....	40
II.4. Biosynthèse des nanoparticules d'argent.....	45
II.4.1. Synthèse de nanoparticules d'argent AgNPS.....	45
II.4. 2. Caractérisation de AgNPs.....	46
II.4. 3. Activité photocatalytique d'AgNPs	47
II.4.4. Activité antimicrobienne des AgNPs	48
Résultats et discussion	49
I. Isolement et purification	49
I.1. Identifications morphologiques des isolats	50
I.1.1. Aspect macroscopique	50
I.1.2. Aspect microscopique.....	51
I.2. Tests physiologiques et biochimiques.....	52
I.2.1. Recherche de la catalase.....	52
I.2.2. Croissance à différentes températures.....	55
I.2.3. Résistance à la salinité	55
I.2.4. Croissance à différents pH	55
I.2.5. Recherche du type fermentaire	55
I.2.6. Recherche de l'Arginine déshydrogénase (ADH).....	56
I.2.7. Test de dégradation des sucres	56
I.2.8. Utilisation du citrate	57
I.2.9. Production de dextrane	58
II. Etude du potentiel technologique des souches <i>Leuconostoc</i> isolées.....	60
II.1. Production de dextrane	60
II.1.1. A partir des isolats.....	60
II.1.2. Optimisation de la production de dextrane.....	62
II.2. Etude des substances antimicrobiennes produites par les isolats	70

II.2.1. Effet antibactérien des souches <i>Leuconostoc</i> isolées	70
II.2. 2. Caractérisation de l'agent antagoniste	72
II.2.3. Purification partielle de la bactériocine	75
III.4. Mode d'action des bactériocines	76
II.3. L'effet d'une substance antimicrobienne produite par une souche <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> sur la qualité microbiologique d'un fromage traditionnel	81
II.3.1. Analyses physicochimiques	81
II.3.2. Analyses microbiologiques.....	82
II.4. Biosynthèse des Ag nanoparticules	86
II.4.1. Caractérisation de AgNPs.....	87
II.4.2. Activité photocatalytique des AgNPs.....	89
II.4.3. L'activité antimicrobienne des AgNPs.....	91
Conclusion.....	95
Références bibliographiques	98

Annexe 1

Milieux de cultures

Annexe 2

appareillage

Liste des tableaux

Tableau 1	Condition d'optimisation de production de dextrane	19
Tableau 2	Provenance des divers produits laitiers collectés	26
Tableau 3	Différentes concentrations de glucose, extrait de levure et saccharose utilisées	34
Tableau 4	Caractéristiques de l'analyse microbiologique	44
Tableau 5	Flore lactique présente dans les différents échantillons isolés sur milieu MRSv	50
Tableau 6	Résultats des tests physiologiques et biochimiques	54
Tableau 7	Production d'EPS par des souches de <i>Leuconostoc</i> isolées sur milieu MSE avec différentes concentrations du glucose et d'extrait de levure	63
Tableau 8	Diamètres d'inhibition des souches pathogènes par les souches de <i>Leuconostoc</i> obtenus par la méthode directe et indirecte	71
Tableau 9	Résultats des analyses physicochimiques du lait et fromage frais	81
Tableau10	Dénombrement des micro-organismes dans le lait de chèvre et des fromages	83

Liste des figures

Figure 1	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques, incluant quelques genres aérobie et anaérobie facultatif de <i>Firmicutes</i>	5
Figure 2	Arbre phylogénétique de la famille des <i>Leuconostocaceae</i> à partir d'ARNr 16S	7
Figure 3	Biosynthèse des bactériocines de classe IIa : système de régulation à trois composants, biosynthèse, sécrétion et immunité. CM : membrane cellulaire. Im : protéine d'immunité. EII t Man : mannose PTS perméase, récepteur des bactériocines de classe IIa. IIC et IID sont deux domaines de EII t Man qui interagissent avec les bactériocines de classe Iia	11
Figure 4	Immunité des bactéries productrices de bactériocines de classe IIa. IIC et IID. Deux domaines de EII t Man interagissent avec les bactériocines de classe Iia	12
Figure 5	Mécanisme d'action des bactériocines de classe IIa	12
Figure 6	Représentation schématique de la structure générale du dextrane	16
Figure 7	Réduction des nanoparticules d'argent dans les micro-organismes	22
Figure 8	Interaction entre les nanoparticules d'argent et les cellules bactériennes	24
Figure 9	Courbe d'étalonnage du D-glucose	33
Figure 10	Représentation schématique de l'interaction entre un faisceau d'électrons et la surface d'un échantillon	47
Figure 11	Aspect des colonies sur milieu MRSv après isolement et 24h d'incubation	49
Figure 12	Aspect de croissance d'une souche de <i>Leuconostoc</i> sur bouillon MRS après 18 h d'incubation à 30°C	51
Figure 13	Aspect des colonies d'une souche de <i>Leuconostoc</i> sur MRS solide après 18 h d'incubation à 30°C	51
Figure 14	Observations microscopiques des espèces <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Ln. Fallax</i> respectivement après une coloration de Gram à grossissement x100	52
Figure 15	Type fermentaire des souches <i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i> isolées sur bouillon MRS glucosé	56
Figure 16	Résultat de test ADH (Hydrolyse de l'arginine)	56
Figure 17	Profil fermentaire de la souche <i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i>	57
Figure 18	Profil fermentaire <i>Ln. mesenteroides subsp cremoris</i>	57
Figure 19	Révélation de l'utilisation de citrate par l'apparition de contour bleu sur gélose KMK	58

Figure 20	Morphologie des colonies productrices de dextrane par les souches de <i>Leuconostoc</i> sur milieu MSE	59
Figure 21	morphologie des colonies productrices de dextrane par les souches de <i>Leuconostoc</i> sp. sur milieu MSE	61
Figure 22	Production d'EPS par des souches <i>Leuconostoc</i> sur milieu MRSs	61
Figure 23	Production de dextrane par la souche LnC2 à différentes concentrations de glucose et d'extrait de levure sur milieu MSE	64
Figure 24	Concentration de dextrane produite par les isolats selon milieu MRS et MSE	65
Figure 25	Effet des différentes concentrations des substrats sur la concentration de dextrane produit par la souche LnC1	66
Figure 26	Effet des différentes concentrations des substrats sur la concentration de dextrane produit par la souche LnC12	66
Figure 27	Effet des différentes concentrations des substrats sur la concentration de dextrane produit par la souche LnF64	67
Figure 28	Effet des différentes concentrations des substrats sur la concentration de dextrane produit par la souche LnF70	67
Figure 29	Activité antibactérienne des souches <i>Leuconostoc</i> vis-à-vis : (A) <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Esherichia coli</i> et (C) <i>Listeria monocytogenes</i>	70
Figure 30	Inhibition bactérienne par les souches <i>Leuconostoc</i> vis-à-vis <i>Pseudomonas aeruginosa</i> selon la méthode indirecte	72
Figure 31	Inhibition bactérienne par la souche LnC1 vis-à-vis <i>listeria monocytogenes</i> en utilisant la méthode indirecte	73
Figure 32	Effet antibactérien du surnageant de la souche LnC1 traité par la température vis-à-vis <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	73
Figure 33	Etude de l'activité antibactérienne des souches isolées vis-à-vis de germes pathogènes (A) <i>E.coli</i> ; (B) <i>S. typhi</i> ; (C) <i>St. aureus</i> par précipitation avec le sulfate d'ammonium et dialyse du surnageant	75
Figure 34	Suivie de croissance de <i>Listeria monocytogenes</i> (a) <i>Staphylococcus aureus</i> (b) <i>Esherichia coli</i> (c) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (d) et <i>Salmonella typhi</i> (e) en présence et en absence de surnageant de la souche LnC1	77
Figure 35	Suivi de croissance de <i>Listeria monocytogenes</i> (a), <i>Staphylococcus aureus</i> (b), <i>Esherichia coli</i> (c), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (d) et <i>Salmonella typhi</i> (e) en présence et en absence de surnageant de la souche LnC34	78

Figure 36	Suivi de croissance de <i>Listeria monocytogenes</i> (a), <i>Staphylococcus aureus</i> (b), <i>Esherichia coli</i> (c), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (d) et <i>Salmonella typhi</i> (e) en présence et en absence de surnageant de la souche LnC10	79
Figure 37	Solutions de nitrate d'argent après exposition au surnageant de culture de la souche <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	86
Figure 38	Spectre UV-visible de l'absorbance des nanoparticules d'argent (AgNPs) synthétisés par la souche <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> traitées à 37°C pendant 24h	87
Figure 39	Images MEB d'AgNPs synthétisés par la souche <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	88
Figure 40	Modèle EDX d'AgNPs synthétisées par la souche <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	89
Figure 41	Les spectres UV indiquent la dégradation photocatalytique du (a) bleu de méthylène, (b) rouge congo et (c) orange de méthyl par les AgNPS	90
Figure 42	Activité antimicrobienne de différentes concentrations de nanoparticules d'argent sur des espèces microbiennes	93
Figure 43	Effet antibactérien indiqué par Zone d'inhibition (mm) de différentes concentrations d'AgNPS sur différentes épices	94

Liste des abréviations

ABC : ATP binding cassette	VF : Viande Foie
ADH : Arginine déshydrogénase	Zi : zone d'inhibition
AgNO ₃ : nitrate d'argent	
AgNPs : Nanoparticules d'argent	
BBT : bleu de bromothymol	
BGP : bouillon de bromocrésol	
BCPL : Bouillon Lactosé au Pourpre de Bromocrésol	
BL : bactéries lactiques	
BM : bleu de méthylène	
CPS : polysaccharide capsulaire	
EDX : Energie dispersive de rayon X	
EPS : exopolysaccharides	
FMAT : flore mésophile aérobie totale	
HPK : protéine histidine kinase	
IF : facteur inductible	
KMK : Kempler et McKay	
Ln : <i>Leuconostoc</i>	
MEB : microscopie électronique à balayage	
MRS : de Man, Rogosa, Sharpe	
MRSs : MRS saccharosé	
MRSv : MRS additionnée à la vancomycine	
MSE : Mayeux Sandin et Elikier	
NPP : nombre le plus probable	
NPs : nanoparticules	
OM : orange de méthyle	
ORFs : Open reading frames	
PCA : Plate Count Agar	
PKP : phosphocétolase	
RC : rouge Congo	

Introduction

Le lait et les produits laitiers contiennent de nombreux nutriments essentiels et sont caractérisés par une microflore lactique riche et diversifiée. Les bactéries lactiques (BL) sont parmi les bactéries les plus utilisées dans les fermentations alimentaires grâce à la production d'une large gamme de métabolites, participant ainsi à l'amélioration du goût et de la texture des produits alimentaires fermentés (**Mokoena, 2017 ; Ruiz Rodríguez et al., 2019**).

La biochimie des produits fermentés est complexe, impliquant une série de nombreuses réactions enzymatiques. Parmi les changements qui se produisent pendant la fermentation des aliments figurent une diminution du pH et l'inhibition d'autres micro-organismes en raison de la production de métabolites tels que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, l'acétaldéhyde, la reutéline et les peptides (**Papagianni, 2012**). De plus, la fermentation conduit à la production de composés antibactériens et d'autres molécules dérivées du métabolisme telles que les enzymes lipolytiques et protéolytiques (**García-Cano et al., 2019**).

L'utilisation des BL dans la transformation des aliments est très ancienne. Toutefois, l'évolution de la recherche en technologie alimentaire a permis de développer ce domaine ayant un impact économique très prometteur. La biotransformation réalisée par les BL est mise en œuvre dans de nombreux procédés industriels telle que l'activité fermentaire lactique pouvant démarrer et/ou moduler la fermentation en produisant des métabolites acides et d'autres biomolécules telles que des enzymes, des antimicrobiens et molécules contribuant à l'arôme et à la texture.

En raison de leurs bienfaits pour la santé, certaines BL sont largement utilisées comme probiotiques comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (**Amrouche, 2005**). En cas d'administration de ces bactéries probiotiques vivantes en quantité suffisante, elles améliorent la santé humaine ou animale.

L'un des principaux défis de l'industrie laitière moderne est de développer une gamme d'une variété de produits pour répondre aux besoins et aux goûts d'une clientèle grandissante dans différents domaines. La population est nombreuse et la demande est forte. La nécessité de faire pousser de nouvelles cultures, les développements avec des attributs sensoriels différents et améliorés nécessitent l'utilisation des souches microbiennes aux propriétés intéressantes pour la fermentation laitière (**Wouters et al., 2002**). Les pays développés manquent de sources de souches

Introduction

BL nouvelles et uniques. Par conséquent, la nouvelle souche doit se trouver dans des matières premières et des produits peu standardisés, et dans produits naturelle avec des conditions environnementales particulières et inhabituelles.

Dans de nombreux produits laitiers, les *Leuconostoc spp.* font partie naturelle des bactéries lactiques non-starter, expliquant le développement de la saveur (Cogan et al., 1994 ; Makarova et al., 2006). *Leuconostoc* est un genre de bactéries anaérobies facultatives à Gram positif, placé dans la famille des *Leuconostocaceae*.

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

En raison de ses caractéristiques de production d'arôme, *Ln. mesenteroides* est connue sous le nom de «bactérie de l'arôme ». *Leuconostoc spp.* se caractérisent par une fermentation hétérolactique par la voie de la phosphocétolase (PKP) (Özcan et al., 2019). En outre, *Leuconostoc spp.* obtenues à partir de produits fromagers traditionnels peuvent être précieuses pour la future production de produits laitiers, en améliorant la qualité du produit, car leurs propriétés affectent en fin de compte les caractéristiques et la qualité des produits finaux (Van Mastrigt et al., 2017).

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

Les nanosciences et nanotechnologies font depuis plus de vingt ans l'objet de travaux nombreux, au sein et à l'interface de disciplines scientifiques multiples, comme la physique, la chimie, la biologie, les sciences de l'ingénieur ou les sciences humaines et sociales. Les recherches sur les nanotechnologies suscitent des espoirs importants en raison des propriétés particulières de la matière à l'échelle nanométrique qui permettent d'envisager de nouvelles fonctions jusqu'ici inimaginables.

Les particules ayant un diamètre inférieur à 100 nm peuvent être définies comme des nanoparticules (NPs). La synthèse de diverses nanoparticules est très importante de la nanotechnologie car son application dans différents domaines tels que les médicaments (administration de médicaments, ciblage de médicaments, imagerie cellulaire et biocapteurs), les

Introduction

sciences alimentaires (nano-composites, nano-émulsions, nano-encapsulation, etc.) et sciences de l'environnement (bio-floculant, surveillance et détection microbiennes et dégradation chimique (**Saravanan et al., 2017 ; Dong et al., 2019**).

La synthèse de NPs peut être réalisée par des méthodes physique, chimiques et biologiques. Les techniques de synthèse chimique ont des effets néfastes sur l'environnement car utilisant des substances chimiques dangereuses (**Monika et al., 2015**). D'autre part, les synthèses biologiques présentent de grands avantages tels que des effets écologiques. Des bactéries, des levures, des algues, des champignons, des plantes sont utilisées pour la fabrication de nanoparticules (**Varshney et al., 2012**). Parmi ces méthodes biologiques, les bactéries ont été plus importantes en raison de leur simplicité et de leur production pure (**Vidhya et al., 2014**).

Les voies extracellulaires et intracellulaires interviennent dans la synthèse des NPs métalliques par les bactéries (**Taran et al., 2016**). Il existe des traitements pour libérer les NPs métalliques qui sont essentielles à la synthèse des NPs intracellulaires comme les ultrasons et la centrifugation (**Ganesh Babu et Gunasekaran, 2009**). La synthèse des NPs extracellulaires a fait l'objet de plus d'attention que celle intracellulaire (**Vidhya et al., 2014**). Les Ag NPs peuvent se former en quelques minutes à partir d'ions Ag⁺ dans le surnageant de culture de microorganismes.

L'objectif principal de cette étude est de sélectionner des souches *Leuconostoc* ayant un potentiel technologique, isolées à partir de différents produits laitiers de la région de Ouargla. Pour cela nous avons adopté les étapes suivantes :

- 1- Isolement des bactéries du genre *Leuconostoc* à partir du lait de chèvre, lait de chamelle, lait de vache, lait de brebis, fromage traditionnel (J'ben) et beurre traditionnel (D'han).
- 2- Caractérisation morphologique, physiologique et biochimique des souches isolées
- 3- Etude du pouvoir technologique des isolats (production des exopolysaccharides type dextrane, production de substances antimicrobiennes et l'étude de la biosynthèse des nanoparticules d'Argent).

CHAPITRE 1 :
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Bactéries lactiques

I.1. Généralités

Les bactéries lactiques (BL) représentent un groupe hétérogène situé dans des habitats riches en nutriments. Elles peuvent coloniser de nombreux produits alimentaires tels que les produits laitiers, y compris le lait maternel (Martín et al., 2003), la viande, les poissons, les végétaux, les légumes, les céréales, les boissons, les eaux et le miel. Les BL font partie de la flore buccale, intestinale, et vaginale humaine ou animale (Lasztity, 2009 ; Rokop et al., 2015 ; Zarour et al., 2017 ; Zheng et al., 2020 ; Lavermicocca et al., 2021).

Ce sont des bactéries Gram positif, asporulées, cocci ou bâtonnets ou coccobacilles, à catalase négative, dépourvues de cytochrome, immobiles, anaérobies mais aérotoles, avec une tolérance élevée pour un pH bas. Elles présentent des exigences nutritionnelles complexes vis-à-vis des acides aminés, des minéraux, des acides gras et des glucides (Holzapfel et al., 2001, Salminen et Von Wright, 2004). Leur métabolisme est strictement fermentaire et l'acide lactique est le principal produit de la fermentation du sucre (Axelsson, 1998). Elles sont classées en micro-organismes homofermentaires et hétérofermentaires à partir des produits des hydrates de carbone fermentés. Les BL homofermentaires produisent de l'acide lactique à partir des sucres, alors que les BL hétérofermentaires produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'alcool et du dioxyde de carbone.

Orla-Jensen, (1921) a établi la première classification de BL, en se basant sur des critères morphologiques et physiologiques (forme, type de fermentation, température optimale de croissance, activité catalase, etc). Elles peuvent être classées en trois groupes essentiels : (i) homofermentaire, (ii) hétérofermentaire facultatif et (iii) hétérofermentaire strict (Mozzi et al., 2015). La taxonomie des BL a été modifiée en introduisant la phylogénie moléculaire, basée sur la séquence des ARN ribosomiques ayant conduit à une reclassification importante de certaines espèces et sous-espèces. Plusieurs méthodes génotypiques, basées sur les acides nucléiques, sont aussi utilisées en classification tel que le pourcentage en GC qui est retenu comme étant un élément principal dans la répartition des BL. Selon de Paula et al., (2015), les BL à faible teneur en G+C, appartiennent au Règne : *Bacteria*, Phylum : *Firmicutes*, Classe : *Bacilli*, Ordre : *Lactobacillales* renfermant 6 familles avec 38 genres, y compris les genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. La famille *Bifidobacteriaceae*, partage le même caractère principal (production d'acide lactique) que les BL. La figure 1 représente l'arbre phylogénétique des BL.

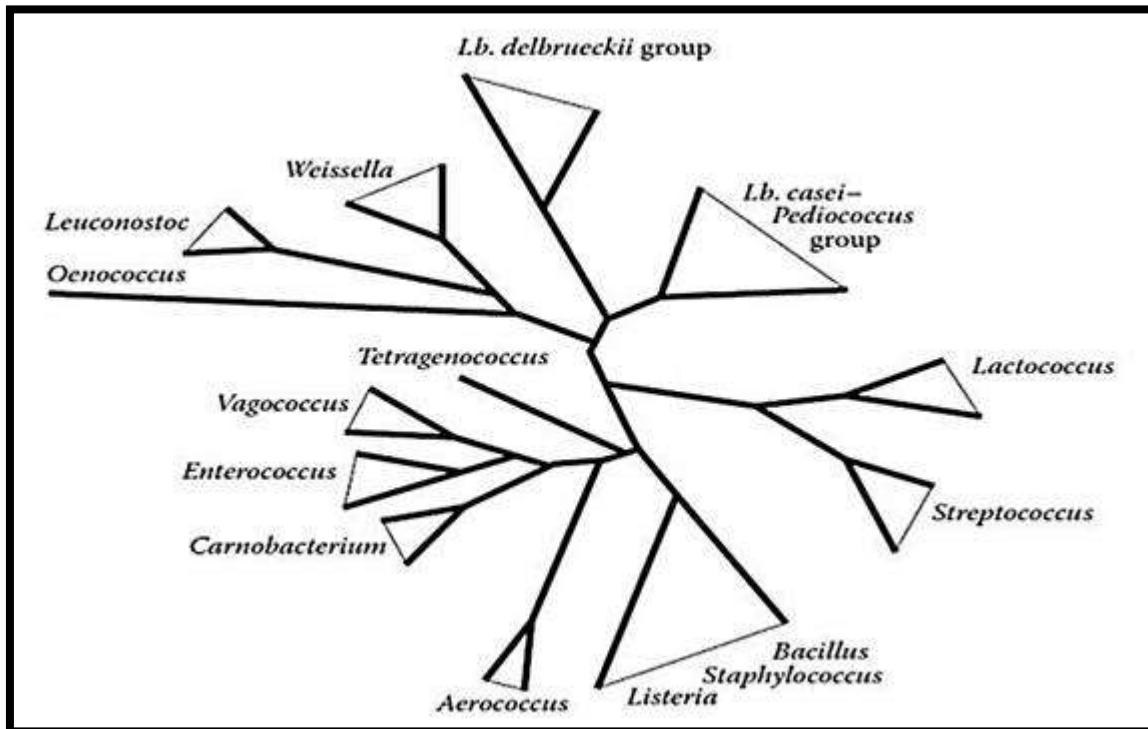


Figure 1 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques, incluant quelques genres aérobie et anaérobie facultatif de *Firmicutes* (Lahtinen et al., 2012)

1.2. Genre *Leuconostoc*

1.2.1. Définition

Le terme *Leuconostoc* provient du mot grec « *Nostoc* » qui est une algue bleue mucilagineuse (cyanobactérie) et *Leuco* signifie blanc. Le genre *Leuconostoc* a été défini en 1878 par **Van Tieghem**. Les premières souches ont été isolées à partir des accidents apparus dans les sucreries (Devoyod et poullain, 1988 ; Tanigawa et al., 2010 ; Kim et al., 2021).

Les tests génétiques ont montré que le groupe des leuconostocs comprend trois lignées : « *Leuconostoc sensu stricto* », « *Leuconostoc paramesenteroides* » et « *Leuconostoc oenos* ». La découverte de ces lignées était la principale raison de deux propositions de reclassements : le genre « *Weissella* » a été associé à « *Leuconostoc paramesenteroides* » et le genre « *Oenococcus* » a été associé à « *Leuconostoc oenos* ». Les anciennes espèces également, *Leuconostoc cremoris* et *Leuconostoc dextranicum* ont été classées comme des sous-espèces appartenant à l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* avec l'ajout d'une troisième sous-espèce *mesenteroides* (Björkroth et Holzappel, 2006).

1.2.2. Ecologie

Les *leuconostocs* sont des bactéries épiphytes, largement retrouvées dans la nature et sont associés aux plantes. Ils ont été isolés à partir des végétaux (**Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004**) et dans divers produits végétaux fermentés, tels que concombre, kimchi, chou et olives (**Kim et Chun, 2005 ; Mäki, 2004**). En plus du matériel d'origine végétale, Les *leuconostocs* sont fréquents dans les aliments d'origine animale (lait cru et produits laitiers, viande, volaille et poisson) (**Björkroth et Holzapfel, 2006**). Ainsi, le lait de chamelle cru ou fermenté qui est considéré comme un biotope favorable pour les *leuconostocs* avec 35% de leurs bactéries lactiques autochtones (**Bellil, 2019**).

1.2.3. Génome et classification

Le genre *Leuconostoc* a été classé dans la famille des « *Streptococaceae* » jusqu'à l'année 2005 où une nouvelle famille « *Leuconostocaceae* » a été proposée dans *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* puis confirmée en 2009 après description de la famille (**Schleifer, 2015**).

Depuis la première classification du genre *Leuconostoc*, la taxonomie n'a pas cessé d'évoluer. Leur classification change au fur et à mesure avec la progression des connaissances, pour s'adapter aux nouvelles connaissances scientifiques. Selon **Hui et Evranuz (2016)**, Le genre *Leuconostoc* renferme 14 espèces (*mesenteroides*, *lactis*, *pseudomesenteroides*, *carnosum*, *gelidum*, *fallax*, *citreum*, *gasicomitatum*, *kimchi*, *garlicum*, *inaha*, *holzapfelii*, *palmae* et *miyukkimchii*). L'espèce *L. mesenteroides* est la plus utilisée en agro-alimentaire, et renferme quatre sous-espèces (subsp. *mesenteroides*, subsp. *dextranicum*, subsp. *Cremoris*) et subsp. *suionicum* qui a été ajoutée par **Gu et al., (2012) (Ruppitsch et al., 2021)**.

Parmi la famille des *Leuconostocaceae*, sept génomes de *Leuconostoc*, ont été complètement séquencés. En outre, Onze génomes sont disponibles mais avec des séquences brutes. La taille du génome des *Leuconostocaceae* varie de 1.4 à 2.2 Mb (**Chelo et al., 2010**), sachant que la plupart des genres contient des plasmides. Les *leuconostocs* présentent de 1 à 6 plasmides (masses moléculaires allant de 1 à 76 MDa), dont la plupart sont cryptiques. Cependant, les gènes impliqués dans le transport et l'hydrolyse du lactose, ainsi que dans la production et la résistance à la bactériocine, sont portés par un plasmide. Chez certaines espèces, la bactériocine (mésentéricine Y105) est codée sur un plasmide dans *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Y105.

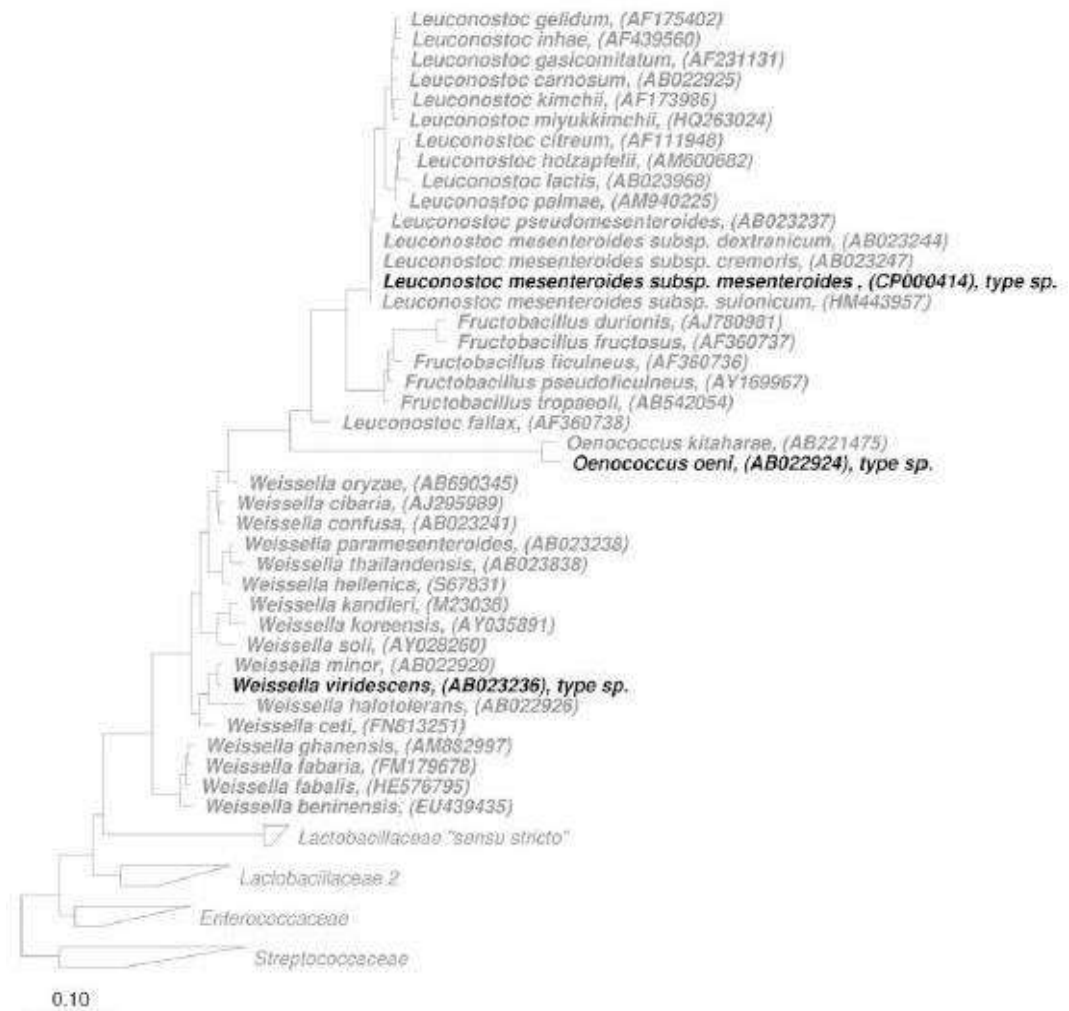


Figure 2: Arbre phylogénétique de la famille des *Leuconostocaceae* à partir d'ARNr 16S (Rosenberg et al., 2014)

I.3. Intérêts technologiques des leuconostocs

I.3.1. Pouvoir acidifiant

La fermentation des hexoses par les espèces de *Leuconostoc*, conduit à un fort abaissement du pH extracellulaire, par la production en grande quantité d'acide lactique au cours de la multiplication bactérienne (Mäyra-Mäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet et al., 2008). Cette propriété est appelée « fonction acidifiante » qui constitue la caractéristique métabolique la plus recherchée dans les industries alimentaires, en particulier des produits laitiers (Sumarsih et al., 2012).

I.3.2. Pouvoir aromatisant

La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate, de l'acétoïne et du diacétyle (**Tamime, 2002**). Les leuconostocs hétérofermentaires sont souvent associés aux Lactocoques dans la production de composants aromatiques (éthanol, acide acétique, diacétyle et acétoïne) (**Mahaut et al., 2000**).

La lipolyse a été largement étudiée dans le domaine alimentaire. Elle joue un rôle important dans la formation des substances aromatiques des produits transformés (**Zalacain et al., 1996**). Les voies métaboliques liées à la lipolyse augmentent significativement et rapidement la concentration en acides gras libres et des précurseurs d'arômes qui entrent dans la saveur globale des produits alimentaires (**Bigret, 1994**).

Le diacétyle qui est l'élément dominant de l'arôme de beurre ~~mais~~ est aussi présent dans bien d'autres produits laitiers tels que les laits, crèmes fermentées et divers fromages (**Otto, 1999**).

I.3.3. Pouvoir texturant

La production des polysaccharides qui se présentent sous forme de composant de la paroi (peptidoglycane) peuvent être libérés de la cellule. Ils sont soit attachés de manière permanente à la surface de la cellule microbienne sous forme de gélules (polysaccharide capsulaire, CPS) ou sécrétés dans l'environnement sous forme d'exopolysaccharides (EPS) (**Chapot-Chartier et al., 2011 ; Castilla-Marroquín et al., 2020**).

I.3.4. Pouvoir antimicrobien

La sélection des bactéries protectrices est basée essentiellement pour leur pouvoir de production de bactériocines, généralement dirigées contre des bactéries pathogènes. Ces souches ont été testées dans l'aliment et de telles propriétés ont été appliquées dans différentes matrices alimentaires (**Todorov et al., 2017**).

Les leuconostocs synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique, tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle, et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la conservation des aliments.

Les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, sont produits au cours de processus de fermentation alimentaire. Ils agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en perturbant le maintien de son potentiel et en inhibant les systèmes membranaires de transport actif (**Alakomi et al., 2000**). L'activité antimicrobienne d'un acide

organique dépend de sa nature (acide fort, acide faible). L'acide acétique, est plus actif que l'acide lactique ; il inhibe les levures, les moisissures et les bactéries (**Blom et Mortvedt, 1991**).

Les leuconostocs sont dépourvues de catalases agissant sur la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène. Pour cela, l'H₂O₂ produit, s'accumule dans le milieu extérieur et peut inhiber certains microorganismes présents (**Condon, 1987**). L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène est principalement due à son fort effet oxydant sur les lipides membranaires et les protéines cellulaires.

Les leuconostocs synthétisent du CO₂ comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Le CO₂ peut aussi, à faible concentration, stimuler la croissance de certaines bactéries.

La production de bactériocines a été signalée pour diverses espèces appartenant au genre *Leuconostoc* et la plupart fait partie des bactériocines de classe IIa, montrant une activité anti-*Listeria* spécifique (**Chang et al., 2007 ; Trias et al., 2008 ; Reina et al., 2010 ; Chang et Chang 2010 ; Cardamone et al., 2011 ; Chang et Chang 2011 ; Pujato et al., 2014 ; de Paula et al., 2015**).

I.3.5. Bactériocines des leuconostocs

I.3.5.1. Bactériocine de classe II

Ce sont des petites molécules de poids moléculaire <10 kDa, thermostables, contenant des peptides cationiques non modifiés et des peptides hydrophobes. Cette classe est subdivisée en trois sous-classes : sous-classe IIa, sous-classe IIb et sous-classe IIc. Tous les gènes sont portés par des plasmides ou chromosomes et parfois sur les deux, ils sont constitués de gène de structure et du gène d'immunité correspondant. Ces gènes peuvent être regroupés avec d'autres gènes de transport de la bactériocine.

Généralement, les bactériocines de cette classe ont besoin un minimum de quatre gènes : un gène du pré-peptide, gène de la protéine d'immunité, gène de la protéine de transport de liaison ATP (système ABC : ATP Binding Cassette) et gène de la protéine d'accessoire liée à la membrane (**van Belkum et Stiles, 2000**).

Sous-classe IIa : ce sont des peptides Anti-*Listeria*, ils ont attiré l'attention des chercheurs pour une utilisation comme bio-conservateurs, comme la pédiocine PA1 et la leucocine A (**Perez et al., 2014**). Près de 50 bactériocines de cette sous classe sont produites par des bactéries isolées

à partir des aliments fermentés, des produits laitiers, du saumon fumé et du tube digestif humain (Mokoena, 2017).

Sous-classe IIb : l'activité antimicrobienne des bactériocines de cette sous classe requière la synergie de deux peptides complémentaires, comme la plantaricine A et l'entérotoxine X (Hu et al., 2010 ; Zacharof et Lovitt, 2012). L'activité de certains peptides de cette sous-classe exhibe une inhibition individuellement, cependant l'ajout du peptide complémentaire améliore l'activité inhibitrice. Les bactériocines de cette sous-classe contiennent des régions amphiphiles et hydrophobes et sont souvent cationiques. Les gènes qui codent pour les deux peptides complémentaires se situent sur le même opéron (Diep et al., 2009).

Sous-classe IIc : les bactériocines de cette sous classe possèdent une séquence signal N-terminale de type "sec" et sont sécrétées via la voie générale de sécrétion alors que pour les autres sous-classes, les bactériocines sont biosynthétisées sous forme inactive contenant un peptide leader et un site protéolytique de type double Glycine. Quelques peptides cycliques dont le N et C terminal sont liés de manière covalente font partie de cette sous-classe (Cotter et al., 2005).

I.3.5.2. Biosynthèse des bactériocines de classe II

Les gènes codant pour les bactériocines de cette classe sont organisés dans un groupe d'opérons et consistent en gène de structure qui code pour le pré-peptide, le gène d'immunité, les gènes qui codent pour le transporteur ABC qui est impliqué dans la translocation de la bactériocine et le gène de la protéine accessoire qui est impliquée, occasionnellement dans le transport de la bactériocine, et le gène de régulation (Ennahar et al., 2000 ; Todorov, 2009).

Le gène de la plantaricine 423 (une bactériocine de classe IIa) a un opéron similaire à la structure de l'opéron de la pédiocine PA-1 avec quatre ORFs (Open reading frames) (plaABCD) composés de gènes de structure, gène d'immunité, gène de la protéine accessoire et le gène du transporteur ABC (ATP binding cassette). De plus, les bactériocines de classe II produisent un facteur inducteur qui active la transcription du gène régulateur (Ennahar et al., 2000 ; Todorov, 2009). Les différentes étapes de biosynthèse sont montrées dans la figure suivante :

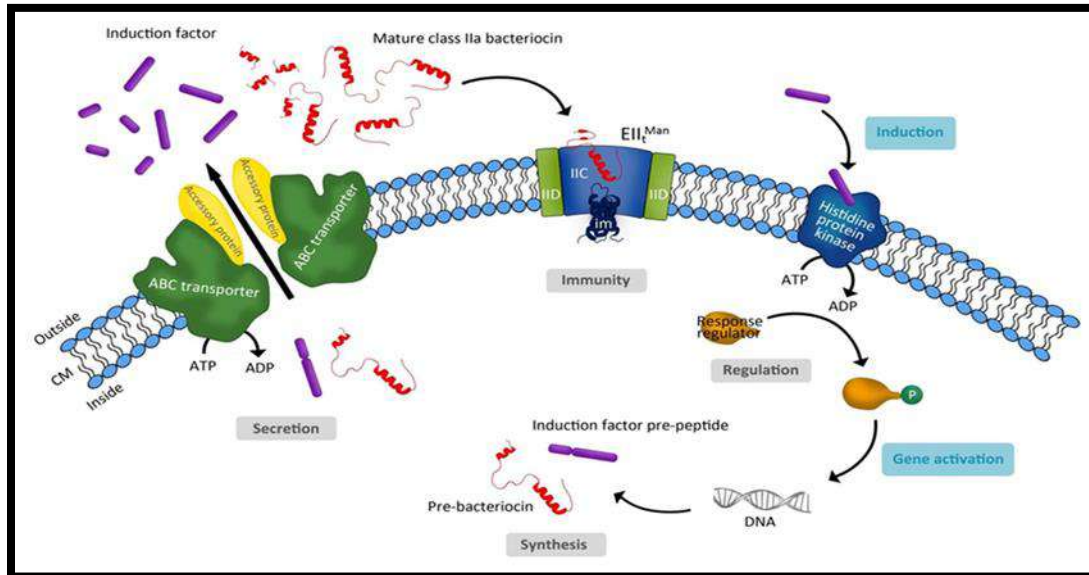


Figure 3 : Biosynthèse des bactériocines de classe IIa : système de régulation à trois composants, biosynthèse, sécrétion et immunité. CM : membrane cellulaire. Im : protéine d'immunité. EII t Man : mannose PTS perméase, récepteur des bactériocines de classe IIa. IIC et IID sont deux domaines de EII t Man qui interagissent avec les bactériocines de classe IIa. D'après Ennahar *et al.*, (2000).

La traduction des gènes de structure conduit à la formation de probactériocine et de facteur inductible (IF), ce dernier sera transporté par le transporteur ABC, conduisant à la libération de bactériocine mature, de facteur IF et de protéine histidine kinase (HPK). et autophosphate. En présence de produit chimique, le groupe phosphoryle P est transféré au système de régulation RR, qui active la régulation des gènes, et le système immunitaire de la bactérie productrice assure qu'il est protégé de ses propres bactériocines.

I.3.5.3. Immunité de la souche productrice

Les bactéries productrices des bactériocines se protègent par l'action de leurs propres bactériocines par la production des protéines d'immunité spécifiques ; les gènes qui codent pour la protéine de l'immunité se trouvent en amont ou en aval des gènes de structure des bactériocines, d'autres gènes d'immunité non directement associés aux mêmes opérons des bactériocines ont également été identifiés (Todorov, 2009).

L'immunité des bactériocines de classe II est beaucoup plus simple, un seul gène code pour la protéine d'immunité qui est situé dans le même opéron en aval du gène de la bactériocine

correspondante, il s'agit souvent, d'une protéine contenant 50 à 150 acides aminés, associée à la membrane. L'étude de l'immunité de la carnobactériocine B2 (une bactériocine de classe IIa), semble située à l'intérieur du cytoplasme, elle peut interagir avec une autre protéine, peut-être un récepteur, du côté cytoplasmique de la membrane cellulaire (Quadri *et al.*, 1997 ; Sprules *et al.*, 2004) en empêchant l'action de la bactériocine (figure 4).

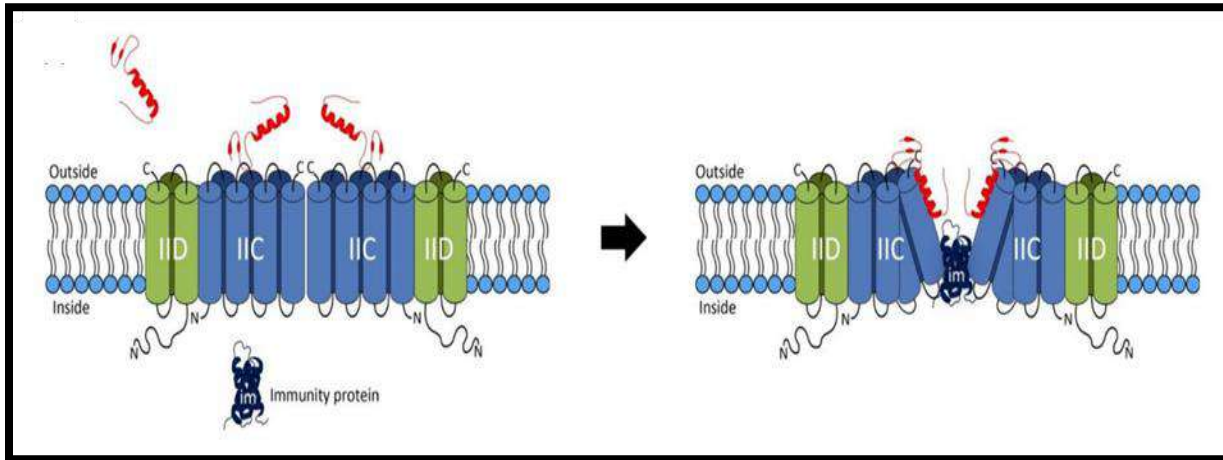


Figure 4 : Immunité des bactéries productrices de bactériocines de classe IIa. IIC et IID. Deux domaines de EII t Man interagissent avec les bactériocines de classe IIa d'après Kjos *et al.*, (2011).

La pédiocine PA-1, une bactériocine de classe IIa, se fixe sur l'unité D du mannose phospho-transférase (enzyme transmembranaire multimérique). Le mécanisme d'action des bactériocines de classe IIa est montré dans la figure ci-dessous :

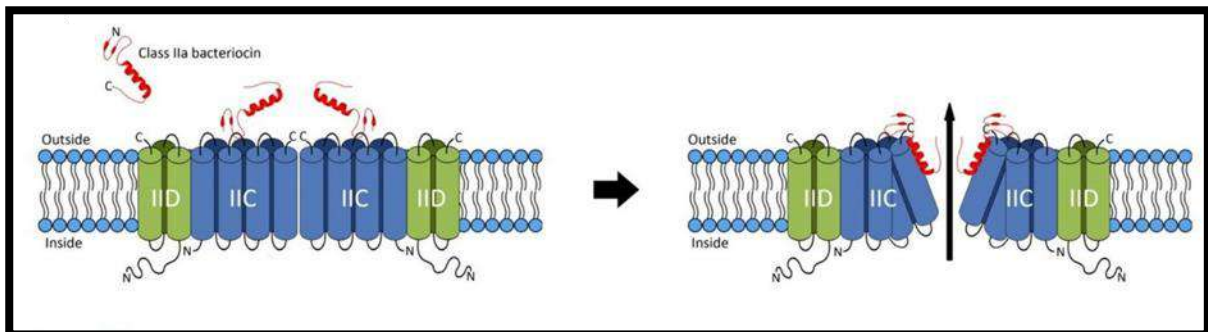


Figure 5 : Mécanisme d'action des bactériocines de classe IIa d'après Kjos *et al.*, (2011).

Le feuillet β N-terminal de la bactériocine (colorée en rouge) se lie à une boucle extracellulaire du domaine EII^t Man IIC (gauche). Ensuite, l'hélice α C-terminale interagit avec des hélices transmembranaires des protéines IIC et/ou IID (à droite) provoquant des changements de la conformation de la membrane, entraînant ainsi la formation de pores et par conséquent la mort cellulaire.

I.3.4. Pouvoir probiotique des leuconostocs

Contrairement à certaines bactéries destinées aux consommateurs, les souches de *Leuconostoc* ne colonisent pas le tractus intestinal mais peuvent survivre pendant le temps limité de transit. On s'attend donc à ce que leur effet sur l'hôte par des actions bactériennes soit faible, sauf lorsqu'elles sont ingérées à des concentrations cellulaires élevées.

L'ajout de la tryptone (100 mg par l) aux laits fermentés par les espèces de *Leuconostoc*, augmente leur valeur thérapeutique liée à une biodisponibilité plus élevée de fer, de zinc, de magnésium et d'acides gras en augmentant leur temps de transit (Shobharani et Agrawal, 2009).

Plusieurs travaux ont confirmé l'appartenance de ce genre au groupe des genres proposés comme probiotiques (Diana et al., 2015 ; Giles-Gómez et al., 2016).

I.3.5. Pouvoir de production du mannitol

Le mannitol ou le sucre de la manne (Bhatt et al., 2013), se retrouve dans les feuilles d'olivier, les algues marines, les fruits et les légumes (Oddo et al., 2002). Ce polyol hexitol est utilisé principalement dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et chimique (Saha et Racine, 2011). Le mannitol, en tant que métabolite commun entre plusieurs microorganismes, contribue aux interactions complexes entre les plantes et les agents pathogènes (Guo et al., 2012) en fournissant aux plantes la défense nécessaire (Patel et Williamson, 2016), ce qui participe dans l'amélioration de la qualité des produits alimentaires à base des plantes. *Ln. pseudomesenteroides* et *Ln. mesenteroides* sont connus par leur capacité à produire ce polyol à partir de la fermentation du fructose (Farinazzo et al., 2020).

I.3.6. Pouvoir d'hydrolyser des α -galactosides

Les α -galactosides, comme le melibiose, le stachyose et la raffinose, sont couramment présents dans les plantes et ne sont pas métabolisés par les mammifères à cause de l'absence de l'enzyme responsable « α -galactosidase » dans la muqueuse intestinale, entraînant par conséquent une flatulence. Pour éviter ces inconvénients et stimuler la consommation des produits alimentaires hautement nutritifs, plusieurs tentatives sont faites pour éliminer les α -galactosides en utilisant

quelques méthodes comme l'addition de l'enzyme α -galactosidase. Il a été proposé d'utiliser les leuconostocs qui possèdent cette enzyme comme une approche biotechnologique afin d'éliminer ces α -galactosides (Spencer et de Spencer, 2004).

I.3.7. Production des vitamines

Les souches de *Ln. mesenteroides* productrices de quantités importantes de ménaquinones (vitamine K2) et la riboflavine qui ont été utilisées comme des starters dans les produits alimentaires, notamment les produits laitiers ou comme des suppléments diététiques afin de prévenir et lutter contre les maladies de carence en vitamine K. La production de folate (vitamine B9) a été également rapportée dans *Ln. lactis* et *Wessella. paramesenteroides* (Hemme, 2012).

II. Dextrane

II.1. Définition

Les exopolysaccharides (EPS) ont attiré de plus en plus l'attention des chercheurs en raison de leurs applications médicales, industrielles ou alimentaires (Ibarburu et al., 2015). De nombreux micro-organismes différents peuvent être utilisés pour synthétiser des EPS, tels que des bactéries, des algues, des levures et des champignons (He et al., 2014 ; Miao et al., 2014 ;). Parmi tous les EPS microbiens, les EPS des BL ont été le plus largement étudié notamment pour la production de ferments alimentaire, attribuent à leur capacité à générer de l'acide lactique et ils sont statut généralement reconnu comme sûr (GRAS) (Rühmkorf et al., 2012 ; du et al., 2018 ; Huang and Huang, 2019).

Le dextrane est un polysaccharide produit de manière extracellulaire par des BL et il possède généralement des chaînes de D-glucose en liaison (1–6) avec différentes ramifications ((1–2), (1–3) ou (1–4)) (Abdel-Rahman et al., 2007 ; Schmid, 2018 ; Díaz-Montes et al., 2020). Le type de dextrane dépend de la souche microbienne car les dextrans peuvent différer par la longueur des chaînes et le degré de ramification. La principale différence sur leurs propriétés physico-chimiques et leurs utilisations (Abdel-Rahman et al., 2007 ; Schmid, 2018), tels que les stabilisants et les hydratants (Heinze et al., 2006). La production de dextrane est principalement réalisée par des bactéries aéro-anaéro-facultatives, Qui sont cultivé dans un milieu saccharosé moyennement riche (Garvie, 1984).

La biosynthèse du dextrane a été mise en évidence chez de nombreuses bactéries, notamment chez les *Streptococcus mutans*, chez les *Ln mesenteroides* et chez les

Lnmesenteroidesssp. dextranicum, *Lactobacillus* et *Weissella*. Parmi tous les micro-organismes producteurs de dextrane, le plus étudié et utilisé est *Ln* (Flórez Guzman et al., 2018). Les *Leuconostocs* produisent l'enzyme, la dextrane-sucrase, et la sécrètent dans le milieu de culture en présence de saccharose. *Lnmesenteroides* et *Lcdextranicum* produisent des dextrans avec un pourcentage élevé (95%) de liaisons α -(1,6) dans sa chaîne principale et différents types de ramifications, principalement α -(1,3), mais aussi α -(1,2) ou α -(1,4) faible pourcentage (5%) (Savado, 2004 ; Purama et al., 2009), la fréquence et le type de liaison dépendent de la nature de l'enzyme et du type de microorganisme. La production de dextrane et d'enzymes est concomitante à la fermentation en présence de saccharose, formant un complexe enzyme-dextrane conduisant à des viscosités élevées et à des agrégats de polymères, rendant plus difficile la purification et la caractérisation du produit (Flórez Guzman et al., 2018). Le dextrane synthétisé par *Ln. mesenteroides* NRRL B-512F a été l'un des premiers biopolymères fabriqués industriellement par diverses applications en biotechnologie et en médecine contenant 95% des liaisons α -(1,6) et 5% des ramifications α - (1,3) (Korakli et Vogel, 2006).

Les gènes d'enzymes responsables de la formation d'homopolysaccharides ne font pas partie d'opérons. Ces enzymes sont extracellulaires ou localisées sur la face externe de la membrane cytoplasmique (Savado, 2004 ; Selvi et al., 2019).

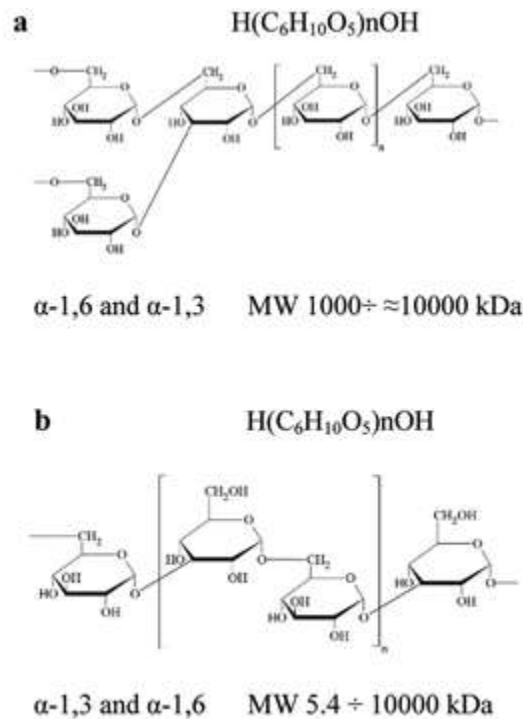


Figure6: Représentation schématique de la structure générale du dextrane (Covis, 2011 ;Harutoshi 2013; Mensink et al.,2015).

II.2. Production de dextrane

La dextrane-saccharase de *Lnmesenteroides* catalyse la synthèse de dextrane, polymère de glucose à partir du saccharose (Dols, 1996 ;Leemhuis et al. 2013 ; Münkkel et al., 2019) au microscope électronique Brooker (1977) a montré que la paroi cellulaire de *Ln. mesenteroides* qui présente la structure classique à trois couches des bactéries Gram-positives lorsque ce microorganisme est cultivé en bouillon MRS est modifiée en présence de saccharose. Après deux heures de contact, il se forme une couche uniforme à la surface de la paroi cellulaire (110 à 130 nm d'épaisseur). Pour 85 à 90% des cellules maintenues en présence de saccharose aucun changement apparent n'est notable, par contre les autres cellules commencent à accumuler des dextrans capsulaires insolubles à la surface de cette couche uniforme. Après 18 heures, ces cellules produisent une capsule (diamètre maximum 6 μ m) composée principalement d'un ample réticulum de filaments fins. La couche extérieure dérive du dextrane globulaire de la capsule selon un processus de dispersion. Cette couche superficielle des cellules croissant en présence de saccharose, représente un complexe dextrane fixé à la cellule. Les cellules ne présentant pas cette

capsule produisent du dextrane relativement soluble ce qui avait été déjà noté par **Devoyod et Poullain** ,(1988).

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

a) de grosses colonies gluantes, devenant rapidement confluentes au fur et à mesure que l'incubation se prolonge ;

b) de petites colonies (2 mm environ de diamètre) bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose.

II.3. Conditions de la production de dextrane

Bien que le dextrane commercial -soit encore principalement- produit en utilisant la méthode de culture entière, sa production peut également être obtenu par voie enzymatique avec des surnageants acellulaires contenant de la dextrane-saccharase en présence de saccharose ou en utilisant une préparation enzymatique purifiée. De cette façon, les conditions peuvent être plus facilement contrôlées et le polymère obtenu est plus uniforme et plus facile à purifier. De plus, le fructose peut être obtenu en tant que coproduit précieux (**Heinze et al., 2006 ; Vettori et al., 2012 ; Leemhuis et al., 2013**).

En outre, le fructose libéré lors de la biosynthèse du dextrane peut également être utilisé comme source de carbone et d'énergie dans d'autres fermentations pour obtenir d'autres produits, par exemple pour une conversion efficace en éthanol par *Zymomonasmobilis* (**Iliev et al., 2018**), ce qui serait à la fois rentable et respectueux de l'environnement. Tant la production de dextrane par fermentation directe de cultures entières que la biosynthèse de dextrane-saccharase pour sa production en utilisant la méthode enzymatique acellulaire dépendent d'un grand nombre de paramètres nutritionnels et environnementaux. À leur tour, les niveaux et les changements de ces paramètres affectent de manière significative le rendement et les propriétés du PSE résultant. Cet ensemble de facteurs pertinents pour la fermentation microbienne se compose de paramètres tels que les sources de carbone, d'azote et de minéraux et leurs concentrations, le pH initial, la durée et la température de fermentation, les niveaux d'inoculation et d'aération (**Kumar et al., 2007 ; Naessens et al., 2005; Vettori et al., 2012**).

La conception réussie du processus de fermentation est basée sur l'obtention du produit selon une certaine spécification, en atteignant la concentration de produit, le rendement et la productivité requis pour un objectif économique spécifique. Cependant, il n'y a pas un seul ensemble de conditions de culture qui garantit des rendements de produits élevés, car les organismes diffèrent dans leurs attitudes envers ces facteurs critiques pour une production maximale d'EPS (**Kumar et al., 2007**). Dans le même temps, la production de la plupart des EPS, y compris le dextrane, peut également être caractérisée par un certain nombre de caractéristiques et de conditions préalables communes, telles que la nature associée à la croissance du processus, où le maximum de produit est atteint au début de la phase stationnaire. , le besoin de rapports C/N élevés et de températures inférieures à l'optimum pour la croissance cellulaire (**Kumar et al., 2007; Vijayendra et SharathBabu 2008 ; Onilude et al., 2013; Lule et al., 2016; Barcelos et al., 2019**). Les relations observées entre la distribution du poids moléculaire du dextrane, la température de réaction, les concentrations de dextrane et de saccharose observé dans la plupart des cas de synthèses enzymatiques acellulaires sont également de nature commune (**Falconer et al., 2011; Kanimozhi i et al., 2019**). À cet égard, des études approfondies ont été menées pour améliorer la production de dextrane dans de nombreux *Leuconostoc* souches utilisant à la fois des méthodes de culture entière et des méthodes enzymatiques, ainsi que diverses techniques d'optimisation (**Angelina et Vijayendra 2015**).

Il est important de se rappeler que la production d'une EPS dépend d'abord de la souche étudiée et peut varier d'une souche à l'autre dans le même genre bactérien, même si la majorité des bactéries mucoïdes peuvent produire des EPS dans n'importe quel milieu, la production peut être optimisée sous certaines conditions dans certains milieux définis, ces conditions sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 01 : Condition d'optimisation de production de dextrane (Vettori et al., 2012 ; Zarour, 2018)

Condition de culture	Production de dextrane
Milieu de culture	Concentration adéquate en saccharose
	Source d'azote (peptone)
	Phosphate
	Oligo-minéraux
	Facteurs de croissance
pH	6,7 – 7,2
Température	25– 30 C°

II.4. Application de dextrane

Le dextrane a diverses applications dans les industries pharmaceutique, chimique et alimentaire (**Florez Guzman et al., 2018**) en raison de leurs propriétés physicochimiques exceptionnelles. Il est notamment utilisé en biochimie comme support pour la chromatographie par filtration sur gel du type Sephadex. De plus, dans le domaine thérapeutique, il est utilisé comme succédané du plasma sanguin, Sa présence dans les aliments améliore les propriétés rhéologiques et organoleptiques des produits fermentés (tels que les produits laitiers) dont ils ont plusieurs usages. Les dextrans ont également été utilisés comme additifs dans des produits tels que les bonbons et les crèmes glacées (**Farinazzo et al., 2020**). L'incorporation de dextrane dans les produits de boulangerie améliore la douceur, la texture des miettes et le volume du pain. Les niveaux d'utilisation ne dépasseront pas 5% sur la base du produit final. Il a été utilisé comme stabilisant pour la confiserie où sa présence empêche la cristallisation, améliore la rétention d'humidité, augmente la viscosité et maintient la saveur. Son utilisation est également proposée dans les boissons gazeuses, les boissons à base de lait et les compositions de glaçage. Ils sont responsables d'une grande diversification des saveurs et des textures des produits alimentaires, c'est pourquoi ils sont principalement utilisés pour produire différents produits fermentés tels que yaourts, fromages, levains, cornichons, saucisses et produits à base de soja (**Díaz-Montes, 2021**).

Comme substance comestible non toxique, le dextrane est considéré comme ayant de nombreux avantages par rapport aux autres stabilisateurs de crème glacée. Des essais effectués sur

des mélanges de crème glacée contenant de 2% à 4% de dextrane ont indiqué qu'ils conféraient des propriétés bénéfiques à la viscosité. Les propriétés favorables du dextrane pour la stabilisation des aliments lyophilisés ou congelés comme les poissons, la viande, les légumes et le fromage. La protection des surfaces avec un film de dextrane pourrait protéger les aliments de l'oxydation et d'autres changements chimiques et aussi aider à préserver la texture et la saveur (**Bhavani et Nisha, 2010**), et utilisé aussi comme un prébiotique, entre autres (**Flórez Guzman et al., 2018**).

Dans le domaine médical, le dextrane est utilisé pour son effet antithrombotique, son activité anticoagulante (le sulfate de dextrane) et antiviral, son usage dans les fluides intraveineux, son rôle dans la cryopréservation pour stocker les organes pour la transplantation et comme porteurs dans des vaccins. En plus, le fer-dextrane est utilisée pour lutter contre l'anémie ferriprive (**Mauray et al., 1998**). En industrie photographique, les fractions de dextrane hautement purifiées sont largement utilisées comme un amplificateur des techniques et la qualité d'imagerie. Dans le domaine de production de cosmétique, le dextrane est aussi impliqué dans la production des crèmes et des produits de soins de la peau comme un agent hydratant et épaississant (**Bhavani et Nisha, 2010 ; Zikmanis et al., 2020**).

III. Biosynthèse de nanoparticules d'argent

III.1. Définition des nano particules (NPs)

La nanotechnologie a atteint une attention remarquable ces dernières années en raison de leurs propriétés physico-chimiques uniques et de leur utilisation intensive dans divers champs. De nombreux scientifiques et économistes ont signalé une augmentation considérable de l'utilisation des nanomatériaux répondre à la demande émergente dans différents domaines d'application avec le développement de nouveaux matériaux (**Maurer-Jones et al., 2013**). Pour les applications environnementales, de nouveaux nanomatériaux aux performances supérieures sont essentiels. Actuellement, la plupart des scientifiques pensent que les nanomatériaux sont l'un des principaux piliers des sciences et technologies émergentes (**Zhu et al., 2019; Wu et al., 2019**). En raison de la plus grande spécification de température, taille de pores réglable, distance de diffusion interparticulaire plus courte, grand nombre de sites d'adsorption associés et chimie de surface différente par rapport à d'autres matériaux, les nanomatériaux sont considérés comme de merveilleux absorbants et catalyseurs remarquables (**Khin et al., 2012 ; Tang et al., 2014; Gong et al., 2018**).

III.2. Synthèse bactérienne de nanoparticules

Les bactéries se sont avérées être un bon candidat pour la synthèse biologique de nanoparticules car elles produisent des nanoparticules de manière extracellulaire par la réduction d'ions métalliques en particules métalliques. De plus, les possibilités exceptionnelles de production de nanoparticules par les bactéries peuvent être dues à un taux de reproduction plus rapide et à une culture relativement plus facile (**Saratale et al., 2018**). Le mécanisme de synthèse de toutes les nanoparticules par les bactéries reste le même, ce qui fait généralement allusion à la synthèse d'enzymes réductases par les bactéries, ce qui contribue au mécanisme de bioréduction.

III.3. Nanoparticules d'argent (AgNPs)

Les bactéries participent généralement à la production de matériaux inorganiques extra et intracellulaires et ceux-ci peuvent être utilisés pour la synthèse de nanoparticules d'argent (**Rafique et al., 2016**). *Pseudomonas stutzeri* La souche AG259 isolée de la mine d'argent a été signalée comme la première preuve de la synthèse d'AgNPs à partir de bactéries (**Jorge de Souza et al., 2019**). Fondamentalement, les AgNPs sont synthétisés en utilisant la biomasse bactérienne et solution de nitrate d'argent (AgNO_3) dans des conditions pertinentes de pression et de

température. Le mécanisme implique la bioréduction par des bactéries dans lesquelles les enzymes réductases réduisent l'Ag⁺ ions aux AgNPs intra ou extracellulaire selon l'emplacement de réduction des ions argent. Il fait allusion au processus simultané d'obtention d'électrons à partir du NADH par l'enzyme réductase dépendante du NADH et à la réduction de l'Ag⁺ ions aux AgNPs (Javaid et al., 2018). Une étude récente a élucidé que *Cupriavidus* souche isolée du sol urbain a médié avec succès la synthèse de nanoparticules d'argent (Ameen et al., 2019). Dans la synthèse d'AgNPs à partir d'extraits acellulaires de *Bacillus brevis* (NCIM2533), les protéines présentes dans l'extrait pourraient agir comme agents coiffants et stabilisants responsables de la réduction des ions d'argent limitant l'agglomération des nanoparticules (Saravanan et al., 2018a,b).

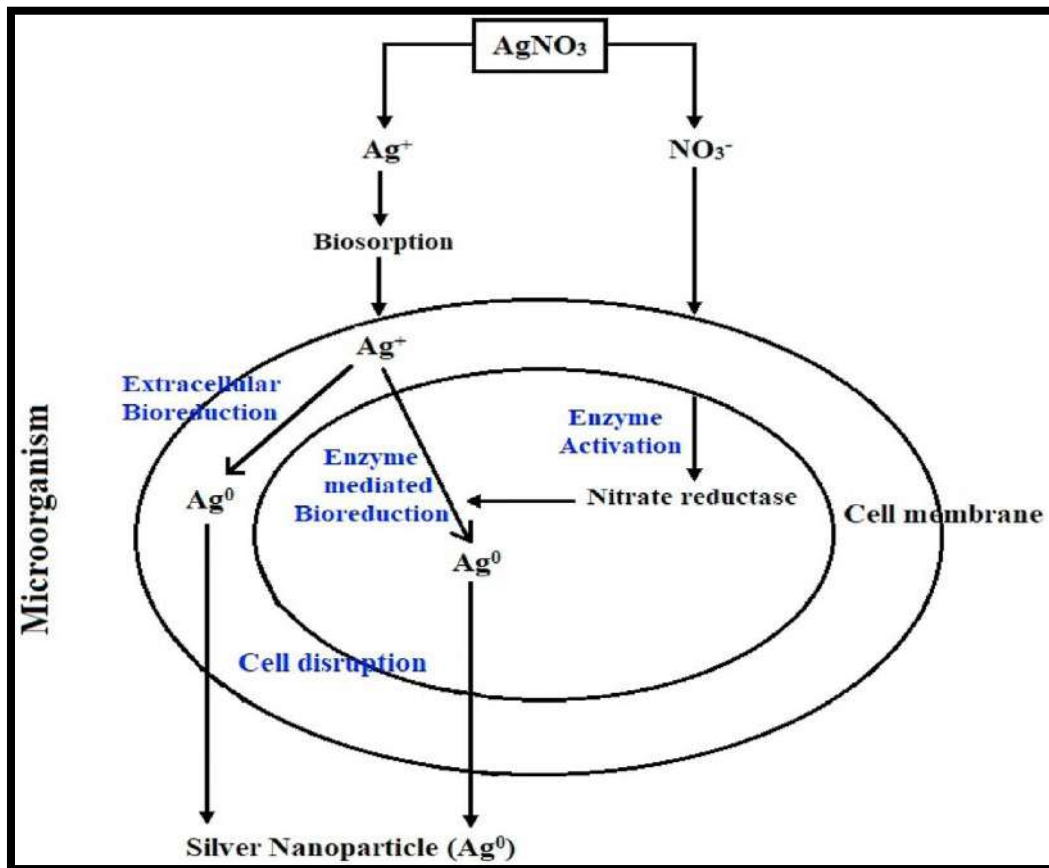


Figure 7 : Réduction des nanoparticules d'argent dans les micro-organismes

III.4. Applications des AgNPs

Les nanoparticules d'argent sont parmi les plus attractives nanomatériaux pour des applications de commercialisation. Ils ont été largement utilisés comme produits électroniques dans l'industrie, agents antibactériens dans l'industrie de la santé, le stockage des aliments, revêtements textiles et un certain nombre d'applications environnementales. En tant qu'agents

antibactériens, les nanoparticules d'argent ont été utilisées pour un large éventail d'applications de la désinfection des dispositifs médicaux et les appareils ménagers au traitement de l'eau (Ahmad et al., 2020). De plus, cela a encouragé l'industrie textile à utiliser les AgNPs dans différents tissus. Dans cette direction, les fibres nanocomposites d'argent ont été préparés contenant des AgNP incorporés à l'intérieur dutissu (Saravanan et al., 2020). Les fibres de coton contenant des AgNPs présentaient une activité antibactérienne élevée contre *Escherichia coli* (Javed et al., 2021).

Les nanoparticules d'argent catalysent la chimiluminescence à partir du système luminol-peroxyde d'hydrogène avec une activité catalytique meilleure que les colloïdes Au et Pt (Ahmad et al., 2020).

III.4.1. Effet antimicrobien des AgNPs

Récemment, la technologie jet d'encre a été utilisée pour produire circuits électroniques souples à faible coût, et de nombreuses études concernant cette application ont été signalés ces dernières années (Ahmad et al., 2020). Pour fabriquer des écrans électroniques flexibles par jet d'encre-impression, il est nécessaire de développer des encres adaptées. Nano-taille les particules métalliques telles qu' Au ou Ag sont utiles pour produire circuits électroniques en raison de l'uniformité du petit particules métalliques dispersées dans les encres et leur haute conductivité.

Le mécanisme de la fonction antibactérienne des nanoparticules d'argent est associé à l'interaction entre l'argent et le composé du groupe thiol dans les cellules fongiques bactériennes et les champignons (**figure 8**). Bien que le mécanisme exact reste inconnu, il a été rapporté que des changements structurels sont trouvés dans les cellules bactériennes et fongiques après le contact avec des nanoparticules d'argent. Par rapport aux particules d'argent ordinaires, les nanoparticules d'argent ont des propriétés antibactériennes et antifongiques favorables en raison de leur surface extrêmement grande qui permet un meilleur contact avec les micro-organismes des bactéries et des champignons. De plus, le gel de nanoparticules d'argent se fixe non seulement sur les membranes cellulaires, mais pénètre également dans les bactéries et les champignons. Une fois que l'argent est entré dans les cellules, il se lie à la paroi cellulaire et à la membrane et inhibe le processus de respiration (Javed et al., 2021). Dans le cas d'*Escherichia coli*, l'absorption de phosphate et la libération de mannitol, de succinate, de proline et de glutamine sont inhibées par la présence d'argent. Par conséquent, les nanoparticules d'argent peuvent être utilisées comme inhibiteur de croissance efficace dans divers micro-organismes et elles sont applicables à différents systèmes de contrôle antibactérien (Saravanan et al., 2020).

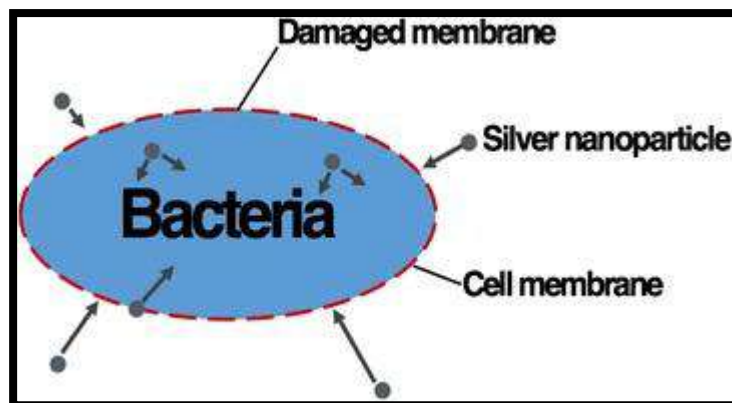


Figure 8 : Interaction entre les nanoparticules d'argent et les cellules bactériennes (Ahmad et al., 2020)

Des études ont évalué les performances antibactériennes des nanofibres contenant de l'argent contre les micro-organismes à Gram positif et à Gram négatif (Javed et al., 2021).

III.4.2. Appareils photovoltaïques

L'effet de résonance des nanoparticules d'argent a été étudié et discuté par un grand nombre de recherches. Lorsque les nanoparticules d'argent sont associées à un matériau diélectrique, les plasmons de surface sont excités avec un caractère combiné d'onde électromagnétique et de charge de surface (Saravanan et al., 2020). En tant qu'éléments de diffusion de lumière puissants, les nanoparticules d'argent diffusent la lumière et la lumière est ensuite collectée et piégée entre les nanoparticules d'argent et les films minces diélectriques (Ahmad et al., 2020).

III.4.3. Catalyseur pour l'hydrolyse/électrolyse de la matrice polymère

Une autre application pour inclure des nanoparticules d'argent dans des nanofibres polymères est d'accélérer l'hydrolyse du matériau en vrac. Les nanoparticules d'argent présentent de fortes propriétés catalytiques pour l'hydrolyse et l'électrolyse des matériaux organiques lorsqu'elles sont fabriquées en composites nanoparticule/polymère d'argent (Javed et al., 2021). De plus, l'activité catalytique peut être adaptée en contrôlant la taille des particules d'argent et de la matrice polymère. Généralement, la plus petite taille de particule présente une activité catalytique plus élevée avec un plus grand nombre de sites de réaction, de sites de pliage par surface (Saravanan et al., 2020). Cette dépendance vis-à-vis de la taille devient encore plus importante lorsque la taille des particules diminue à l'échelle nanométrique. Des études ont synthétisé des nanoparticules d'argent en utilisant une méthode de réduction chimique, suivie de

leur incorporation dans la matrice polymère d'acétate de polyvinyle (PVAc) (Javed et al., 2021), pour préparer un nano-composite de nanoparticules d'argent PVAc. En introduisant des nanoparticules d'argent dans la matrice polymère, l'hydrolyse de ce matériau hybride peut être accélérée.

III.4.4. Filtration et traitement de l'eau

Parmi les différents types de matériaux antibactériens nanométriques, c'est-à-dire ZnO, MgO et TiO₂, les nanoparticules d'argent se sont révélées être l'agent antimicrobien le plus efficace (Javed et al., 2021). Lors de l'épuration avec des multicouches à liaison hydrogène assemblées sur des microsphères magnétiques, elle peut être délivrée et localisée dans une région spécifique sans contaminer l'environnement en utilisant des champs magnétiques (Saravanan et al., 2020). Un composite de Fe₃O₄ bifonctionnel à des nanoparticules d'argent avec des propriétés à la fois super-paramagnétiques et antibactériennes a été préparé et s'est avéré avoir une excellente capacité antibactérienne contre *E. coli*, *Staphylococcus epidermis* et *Bacillus subtilis*. En plus des avantages du super-magnétisme, qui permet d'éliminer facilement le matériau de l'eau, les membranes en nanofibres polymères mésoporeuses peuvent être conçues avec des tailles de pores spécifiques et les propriétés de filtration souhaitées pour améliorer l'efficacité du traitement de l'eau et la recyclabilité. Les nano-composites de super-magnétisme/nanoparticule d'argent/nanofibre de polymère peuvent être un désinfectant de l'eau prometteur (Javed et al., 2021).

CHAPITRE 2 :

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Materiel et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau des laboratoires de microbiologie appliquée et de biochimie appliquée de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université Kasdi Merbah Ouargla) et le Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico – Chimiques (CRAPC) de Ouargla. Il consiste d’une part à isoler puis identifier des souches *Leuconostoc*, à partir de différents produits laitiers (lait de chèvre, lait de chamelle, lait de brebis, lait de vache, fromage traditionnel, Klila et D’hane), et d’autre part, étudier leur potentiel et aptitude technologiques. Nous avons également procédé aux caractérisations morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats.

I. Isolement des souches *Leuconostoc*

I.1. Provenance des échantillons

Les différents produits laitiers collectés dans la région d’Ouargla sont consignés dans le **tableau 2**.

Tableau 2: Provenance des divers produits laitiers collectés

Echantillons	Dates de collection	Provenances
Lait de chamelle	- 11 et 20 /02/2019 - 10/01/2021	Ouargla
Lait de chèvre	- 9, 11, 15,16 et 18 /02/2019	Taibet, Touggourt, Elbour et Ouargla
Lait de vache	- 15/02/2019	Ouargla
Lait de brebis	- 11, 20 et 26/02/2019 - 10/01/2021	Ouargla
Dhan	- 16/02/2019	Taibet, Elbour
Klila	- 15/02/2019	Touggourt
J’ben (fromage traditionnel)	- 16 et 18/02/2019	Ouargla

Le lait cru doit être traité avec un grand soin afin d’éviter tout risque de contamination qui peut influencer sur la flore lactique. En effet, la réalisation du prélèvement nécessite le port de gants et laver les trayons avec une serviette propre, tirer quelques jets de lait pour réduire le nombre de bactéries dans le canal du trayon (**Lévesque, 2004**). Ensuite, il faut désinfecter l’ensemble du trayon avec de l’eau savonneuse, rincer avec l’eau de javel, puis sécher avec du coton hydrophile stérile (**Benazzouz, 2012**). Prélever du lait dans des flacons en verre de 250

ml, stériles puis les placer dans la glace, au fond d'une glacière pour conserver le lait au cours du transport vers le laboratoire à une température de 4°C (Lévesque, 2004).

Les échantillons de Dhan, klila et J'ben ont été préparés traditionnellement dans les fermes où ils ont été collectés.

I.1.1. Préparation des dilutions

I.1.1.1. Lait

Après homogénéisation de l'échantillon de lait, prélever aseptiquement 1ml et l'introduire dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique peptonée, agiter bien puis transférer 1ml de cette première dilution et l'introduire dans un deuxième tube. De même façon sont effectuées les dilutions décimales jusqu'à 10^{-3} (Benazzouz, 2012).

I.1.1.2. Fromage, Dhan et Klila

Une quantité de 5g de chaque échantillon est broyée avec 45ml d'eau physiologique peptonée stérile. Après homogénéisation, des dilutions décimales jusqu'à 10^{-3} sont réalisées (Guiraud, 1998).

I.2. Isolement et purification

I.2.1. Isolement

Pour l'isolement des souches *Leuconostoc*, nous avons utilisé le deMan, Rogosa, Sharpe (MRS) avec l'addition d'un antibiotique (la vancomycine 30mg/l). Nous avons ensuite ensemencé en masse à partir des dilutions (1ml de chaque dilution), puis placé les boîtes en incubation à 30°C jusqu'à la croissance. Les techniques d'isolement sont basées sur l'obtention d'un clone, c'est-à-dire une culture issue d'une seule cellule (Mathot et al., 1994 ; Khedid et al., 2006 ; Benazzouz, 2012).

I.2.2. Purification

Pour l'obtention de souches pures, nous avons effectué des repiquages successifs sur milieu MRS liquide et MRS solide, utilisés alternativement jusqu'à l'obtention de colonies bien distinctes et identiques (Zarour et al., 2013). La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode des stries (Badis et al., 2005).

I.3. Conservation des isolats

La conservation d'une souche pure a pour principal but de la maintenir viable. Dans cette étude, deux types de conservation ont été adoptés :

I.3.1. Conservation à court terme (courte durée)

Suite à un ensemencement effectué sur gélose MRS incliné, l'échantillon est incubé à 30°C. Après l'apparition des colonies, les cultures ont été conservées à une température de 4°C (**Badis et al., 2005**).

I.3.2. Conservation à long terme (longue durée)

A partir des cultures sur milieu liquide et après une centrifugation à 8000 tours pendant 10 min, les cellules ont été récupérées et rincées à l'eau distillée stérile, suivi d'une autre centrifugation. Le surnageant a été éliminé et un milieu de culture de conservation (03 ml de glycérol + 06 ml de bouillon MRS) a été ajouté au culot. Cette conservation a été effectuée dans des tubes Eppendorf à une température de -20°C (**Badis et al., 2005**).

I.4. Tests d'identification des bactéries lactiques

L'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques, phénotypiques et biochimiques des bactéries.

I.4.1. Tests morphologiques

I.4.1.1. Examen macroscopique

Ce test est basé sur une simple observation visuelle d'une croissance des isolats sur milieu MRS solide et liquide. L'étude se base sur la forme, la taille, la couleur, le contour et la position des colonies sur milieu MRS solide (en profondeur, au milieu ou à la surface) (**Badis et al., 2004**). L'aspect trouble dans le milieu liquide est également pris en considération.

Généralement, la morphologie des colonies des *Leuconostoc* est caractérisée par un diamètre compris entre 0.5 et 1 mm, lisse, d'une forme circulaire, blanche à grisâtre (**Holzappel et al., 2009 ; Säde, 2011**) et à contour régulier (**Badis et al., 2005**).

I.4.1.2. Coloration de Gram

C'est une étape fondamentale pour l'identification du genre (**Badis et al., 2004**). Elle permet de déterminer le type de ces bactéries et la morphologie des cellules (**Larpent et Larpent, 1990**).

I.4.2. Recherche de la catalase

L'intérêt de ce test est de faciliter la distinction entre les bactéries lactiques qui sont dépourvues de catalase, des autres souches non lactiques.

La catalase est une enzyme respiratoire qui permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène :



La recherche de la catalase est effectuée avec une goutte de peroxyde d'hydrogène (sur une lame de verre) sur une colonie bien séparée. Une réaction positive provoque la libération immédiate de bulles et vice versa (**Marchal et al., 1991**). Seules les bactéries à catalase négative ont été gardées. Par la suite, pour assurer une bonne continuité du travail, les souches doivent être conservées dans des conditions adéquates (température 4°C et dans un milieu MRS).

I.4.3. Tests physiologiques

I.4.3.1. Croissance à différentes températures

La croissance bactérienne est évaluée par l'apparition d'un trouble dans le milieu MRS liquide après 5 jours d'incubation à 4°C, 10°C, 37°C et 42°C (**Guessas et Kihal, 2004**). La thermorésistance des bactéries est testée au bain Marie à 63°C pendant 30 minutes, suivie d'une incubation à 30°C/24h à 48h (**Guiraud, 1998**).

Ces tests ont pour but de distinguer les souches mésophiles des thermophiles ainsi que les thermorésistantes.

I.4.3.2. Croissance à différents pH

A partir d'une culture jeune des isolats (culture de 18h à 30°C), nous avons réalisé un ensemencement dans le milieu MRS liquide à différents pH : 4 ; 6,8 et 9,6 puis incubé à 30°C pendant 48 à 72 h (**Guessas et Kihal, 2004**).

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

I.4.3.3. Croissance à différentes concentrations de NaCl

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

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

I.4.4. Tests biochimiques

I.4.4.1. Recherche de type fermentaire

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

Les souches isolées ont été inoculées dans du bouillon MRS contenant les cloches des Durhams, puis incubées à 30°C pendant 48h. L'absence de gaz dans les cloches indique le métabolisme homofermentaire ; tandis que la présence de gaz montre qu'il s'agit d'un métabolisme hétérofermentaire (Boumediene, 2013).

I.4.4.2. Test du profil fermentaire

La dégradation de différents sucres, permet de mieux différencier entre les espèces et sous espèces de *Leuconostoc*. L'utilisation des carbohydrates a été étudiée sur milieu MRS, d'extrait de viande, sans sucre et additionné de bleu de bromothymol (BBT) comme indicateur de pH (Badis et al., 2004).

La source de carbone testée est représentée par les sucres suivants : glucose, saccharose, lactose, maltose, fructose, galactose, esculine, mannitol, rhamnose, xylose, arabinose et sorbitol.

Des solutions sucrées ont été préparées à partir de 1g de chaque sucre dans 10 ml d'eau distillée stérile. Une homogénéisation puis une stérilisation à 100°C pendant 15 min au bain marie ont été effectuées.

Deux jeunes cultures de chaque souche sont préparées, puis centrifugées dans des tubes Eppendorf (5000 tours pendant 10 min). Le culot est récupéré et additionné d'un tampon phosphate (pH7) stérile puis soumis à une autre centrifugation afin d'éliminer les déchets du milieu de culture et d'obtenir un culot cellulaire pur. Un double rinçage est également effectué. Ensuite, 01 ml de bouillon MRS.BCP est ajouté sur le culot récupéré et bien homogénéisé **(Hansal, 2015)**.

L'ensemencement est réalisé dans des tubes Eppendorf contenant 1ml du milieu MRSBCP, additionné à 100µl de la solution sucrée et 100µl de la suspension bactérienne. L'ensemble est recouvert par une couche d'huile de paraffine **(Badis et al., 2005)**.

Les tubes sont incubés à 30°C pendant 72h **(Guessas, 2006)**. Le résultat dépend du virage de couleur du milieu, du vert au jaune indiquant que la souche a fermenté la source de carbone présente lors de sa croissance **(Bauer et al., 2005)**.

I.4.4.3. Recherche de l'Arginine déshydrogénase (ADH)

L'arginine déshydrogénase (ADH) est une enzyme capable de dégrader l'arginine en produisant l'ammoniac et des amines (composés basiques) **(Hansal, 2015)**.

Les souches sont ensemencées sur milieu M16 BCP, puis incubées à 30°C pendant 24h en anaérobiose. Le virage du milieu vers la couleur jaune indique l'absence d'hydrolyse de l'arginine. Par contre les colonies de couleur blanche et la couleur pourpre du milieu, indique l'hydrolyse de l'arginine **(Boumediene, 2013)**.

I.4.4.4. Utilisation du citrate

La production de substances aromatiques est l'un des caractères importants et spécifiques des bactéries lactiques pour lesquels le lactose, le citrate, les acides aminés ou les matières grasses sont utilisés comme substrats. Cette capacité est très intéressante lors de la fermentation des laits ou l'élaboration de fromages frais, crèmes et beurre **(Dhouib, 2017)**.

L'utilisation de citrate a été étudiée sur gélose KMK **(Kempler et McKay, 1980)** dont la seule source de carbone est le citrate qui va alcaliniser le milieu après son utilisation par les bactéries. L'ensemencement est réalisé par des stries sur la surface à partir d'un milieu solide, puis incubé à 30°C/24h **(Guiraud, 1998)**.

I.4.4.5. Production de dextrane

Le dextrane est un exopolysaccharide (EPS) produit par certaines espèces du genre *Leuconostoc* et d'autres genres bactériens. La production du dextrane à partir du saccharose a été étudiée sur milieu solide MSE (Mayeux et al., 1962). Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes. Ce test est également utilisé comme clé d'identification des souches *Leuconostoc* productrices et non des EPS. Nous avons effectué des ensemencements sur milieu MSE à partir de précultures de 18h des isolats, puis mis en incubation à 30°C pendant 48h (Sanchez et al, 2006).

II. Etude du potentiel technologique des isolats

II.1. Production et optimisation des conditions nutritionnelles de production des EPS

II.1.1. Criblage des souches productrices de dextrane

La production de dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu solide MSE. Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation de grandes colonies visqueuses et collantes. A partir de précultures, nous avons effectué un ensemencement sur le milieu de culture MSE et incubé à 30°C pendant 24 à 48 heures (Sanchez et al, 2006).

II.1.2. Précipitation et extraction du dextrane

A partir de jeunes cultures des souches ayant montré une bonne croissance et une bonne production d'EPS, 100 µl sont ensemencés dans des tubes contenant 10 ml de milieu MRSs (MRS saccharosé), puis les tubes sont incubés à 30°C pendant 48 heures. Après avoir éliminé les cellules par centrifugation (4000 rpm) pendant 20 min, les EPS présents dans le surnageant sont précipités dans trois volumes d'éthanol froid 95% (v/v) à 4°C pendant une nuit. Une seconde centrifugation est réalisée à 12000 rpm/10 min à froid (4°C). Après deux rinçages à l'acétone, une autre centrifugation à 12000 rpm/10 min, à froid (4°C) a été effectuée. Les EPS ont été séchées à l'air libre et à la fin, la quantité de dextrane produite a été pesée (Du et al., 2018 ; Salman et al., 2021).

II.1.3. Quantification du dextrane par dosage

La teneur totale en sucres a été déterminée par la méthode phénol-sulfurique (Dubois et al., 1956). Le principe de cette méthode repose sur le fait que les sucres en milieu acide et à chaud sont hydrolysés en dérivés du furfural qui se combinent avec le phénol en donnant une coloration orangée. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de sucre présent et

directement mesurable par spectrophotométrie. La réaction est sensible dont de petites quantités de carbohydrates peuvent être détectées.

Les EPS extraits sont mis en suspension dans l'eau distillée ultrapure et chauffés pendant 10 min à 30°C pour leur solubilisation. 1 ml de solution d'EPS, 1 ml de phénol à 5% et 2,5 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré sont ajoutés séquentiellement dans chaque tube (Nacher-Vazquez *et al.*, 2015). Les tubes sont placés au bain marie à 100°C pendant 15 min puis mis à l'obscurité durant 15 min (Xu *et al.*, 2010).

Pour effectuer la quantification, l'absorption a été mesurée à 490 nm et les valeurs obtenues sont comparées avec celles de la courbe d'étalonnage à concentrations connues de D-glucose (figure9).

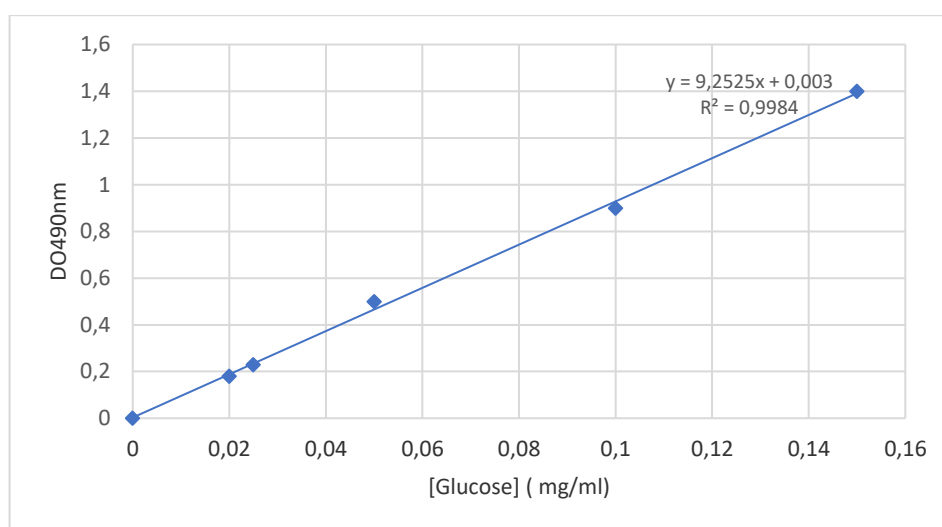


Figure 9: Courbe d'étalonnage du D-glucose.

II.1.4. Optimisation de production de dextrane

L'objectif de cette étude est d'obtenir des conditions nutritionnelles favorisant une bonne production d'EPS à partir des souches *Leuconostoc*. Trois substrats ont été choisis, le glucose (source de carbone et d'énergie), l'extrait de levure (source d'azote, de vitamines et d'acides aminés) et le saccharose (précurseur de production de dextrane). Nous avons également comparé entre deux milieux de culture, MRS et MSE.

II.1.4.1. Etude de production qualitative sur milieu solide

De jeunes cultures d'isolats (cultures de 18h à 30°C), ont étéensemencées dans un milieu MSE solide à différentes concentrations de glucose (5g/l, 3g/l, 1g/l) et dans un autre milieu avec différentes concentrations d'extrait de levure (5g/l, 3g/l, 1g/l), les boîtesensemencées sont incubées à 30°C pendant 48h.

II.1.4.2. Etude de production quantitative sur milieu liquide

Dans un premier temps, une comparaison de production de dextrane a été réalisée entre le milieu MRSs et le milieu MSE liquide, en effectuant une précipitation de l'EPS, en suivant les étapes mentionnées dans la partie (II.2.3).

Pour mieux étudier l'effet du glucose, de l'extrait de levure et du saccharose, une autre quantification d'EPS est réalisée sur milieu MRSs avec différentes concentrations des trois substrats choisis (**tableau3**). Pour cette étude nous avons choisi les souches qui montraient une bonne production d'EPS, à savoir Lnc1 et LnC12, et les souches à faible production (LnC15 et LnF70).

Tableau 3: Différentes concentration de glucose, extrait de levure et saccharose utilisées

Cas	Saccharose g/l	Glucose g/l	Extrait de levure g/l
1	10	1	3
2	100	1	3
3	10	5	3
4	100	5	3
5	10	3	1
6	100	3	1
7	10	3	5
8	100	3	5
9	50	1	1
0	50	1	3
11	50	1	5
12	50	5	5
13	50	3	3
14	50	3	5
15	50	3	1
16	10	10	1
17	10	15	1
18	10	20	1
19	10	10	3
20	10	15	3
21	10	20	3
22	10	10	5
23	10	15	5
24	10	20	5
25	50	10	1
26	50	15	1

27	50	20	1
28	50	10	3
29	50	15	3
30	50	20	3
31	50	10	5
32	50	15	5
33	50	20	5
34	100	10	1
35	100	15	1
36	100	20	1
37	100	10	3
38	100	15	3
39	100	20	3
40	100	10	5
41	100	15	5
42	100	20	5

II.2. Etude de l'activité antimicrobienne des souches *Leuconostoc* vis-à-vis des bactéries pathogènes

Les BL et leurs métabolites tels que divers acides organiques, acides gras ou acide phényle-lactique, éthanol, peroxyde d'hydrogène, bactériocine et antibiotiques tels que la reutéricycline sont connus pour jouer un rôle important dans la conservation des aliments en contribuant à la saveur, la texture et valeur nutritionnelle des produits alimentaires. Les bactériocines sont un groupe de peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire synthétisés par les ribosomes ayant un effet bactéricide ou bactériostatique sur les micro-organismes apparentés et non apparentés. Cette caractéristique en fait un conservateur alimentaire efficace pour le lait, les produits laitiers, la viande et les produits alimentaires fermentés.

II.2.1. Souches pathogènes utilisées

Les souches de références utilisées dans cette étude ont été collecté du laboratoire de microbiologie de l'école nationale des sciences el Couba.

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC43300
<i>Esherichia coli</i>	ATCC25992
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC14028
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCH0009
<i>Listeria monocytogene</i>	ATCC 14028
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923

II.2.2. Etude de l'activité antimicrobienne des isolats vis-à-vis des bactéries pathogènes

Le principe de la détection de l'activité antimicrobienne, est basé sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans des milieux de culture solides ou semi-solides et l'inhibition de la croissance des micro-organismes indicateurs sensibles. Le milieu Mueller Hinton (MH), est utilisé pour l'étude de l'activité antagoniste des souches *Leuconosctoc* isolées, vis-à-vis des bactéries pathogènes.

La recherche de substances antimicrobiennes produites par les isolats est réalisée selon la méthode de la double couche (méthode directe) (**Tagg et al., 1971**). La recherche de l'activité inhibitrice est mise en évidence en milieu liquide (surnageant). La méthode de diffusion en puits (méthode indirecte) a été utilisée par **Tagg et Mac Given (1971)**. Dans les deux cas, les bactéries pathogènes ont été utilisées comme des souches indicatrices. L'inhibition de la bactérie indicatrice est mise en évidence par la production de substances antimicrobiennes par les bactéries productrices. L'interaction entre les mêmes espèces lactiques permet de détecter la présence d'un antagonisme par la présence d'une zone d'inhibition autour des souches productrices, ce qui nous oriente vers la présence d'une substance antimicrobienne.

II.2.2.1. Test des interactions directes (par spots)

La méthode de détection du pouvoir antimicrobien selon **Tagg et al., (1971)** et **Fleming et al., (1975)**, est utilisée pour la détection des inhibitions. Ce test consiste à ensemencer par spot de la culture fraîche de 18h de chaque souche sur une gélose MRS. Les boîtes sont laissées à température ambiante pour permettre le séchage des spots, avant de les incuber à 30°C pendant 24h. Les géloses sont ensuite recouvertes avec un volume de 7 ml de gélose molle MH, préalablement ensemencée avec un volume de 0.1 ml de la suspension bactérienne de la souche indicatrice de l'activité inhibitrice. La densité optique est ajustée à 0.2 ± 0.05 , mesurée à une longueur d'onde de 600 nm puis incubées à 37°C pendant 24heures. L'activité antimicrobienne est révélée par la formation de la zone autour des colonies des isolats.

II.2.2.2. Test de détection indirecte (Méthode des puits)

La méthode de **Barefoot et al., (1983)**, a permis de mettre en évidence l'activité antagoniste du surnageant de la souche productrice de substance antimicrobienne avec la souche indicatrice de l'activité inhibitrice.

Dans un premier temps, les souches *Leuconostoc* isolées sont cultivées dans du milieu MRS liquide puis incubées pendant 18 heures. Le surnageant est ensuite récupéré par centrifugation à une vitesse de 4000 trs/mn pendant 10 min.

Sur une gélose MH, la souche indicatrice est ensemencée par inondation ou par écouvillonnage à partir d'une préculture fraîche, à une densité optique ajustée à 0.2 ± 0.05 , mesurée à une longueur d'onde de 600 nm. Après séchage des géloses, des puits sont réalisés et remplis avec 50µl de surnageant des souches productrices.

Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm (**Thompson et al, 1996**). La mesure du diamètre d'inhibition (Z_i) est effectuée selon la formule suivante:

$$Z_i \text{ (mm)} = D_1 \text{ (mm)} - D_2 \text{ (6 mm)}$$

D_1 : diamètre de la zone d'inhibition obtenue

D_2 : diamètre du puits

II.2.3. Caractérisation de l'agent antagoniste

L'inhibition de la multiplication des souches cibles est due à plusieurs facteurs tels que la diminution du pH du milieu (production d'acides organiques) (**Liu, 2003**), à la production de peroxyde d'hydrogène (**Strus et al., 2006**), ou à la production de substances protéiques, type bactériocines (**Klaenhammer, 1988**).

II.2.3.1. Inhibition due au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Pour éliminer l'effet du H_2O_2 dans l'inhibition des souches indicatrices pathogènes, le surnageant est récupéré à partir des précultures des souches *Leuconostoc* incubées à 30°C en condition d'anaérobiose stricte pour qu'il n'y ait pas de production de H_2O_2 .

II.2.3.2. Inhibition due à la production d'acides organiques

Pour éliminer l'activité antimicrobienne des acides produits, notamment l'acide lactique et l'acide acétique, le surnageant est neutralisé à pH 6,5 par une solution de NaOH 0,1N, filtré à l'aide d'un filtre millipore stérile ($\varnothing = 0,22 \mu\text{m}$). Si la substance antimicrobienne

est produite, elle exprimera son action sur les souches pathogènes (Fleming et al., 1975 ; Diop et al., 2016).

II.2.3.3. Effets des enzymes protéolytiques

Pour déterminer la nature des composés responsables de l'activité antagoniste, les surnageants des cultures lactiques sont traités par deux enzymes protéolytiques, la pepsine et la trypsine. Les surnageants des souches isolées, récupérés par centrifugation sont ajoutés aux enzymes à des concentrations de 1mg/ml, ajustés à un pH de 6,5, puis incubés à 37°C pendant 1h. La réaction enzymatique est stoppée par un traitement thermique à 65°C pendant 10 mn (Vinod Kumar et al., 2006).

II.2.3.4. Détermination de la thermorésistante

Dans le but de déterminer la stabilité thermique de l'agent responsable de l'activité antagoniste, les surnageants sont traités à différentes températures, 70 et 90°C pendant 30 mn et à 120°C pendant 20 mn (Hammami et al., 2012). Après refroidissement, l'activité antagoniste est mise en évidence vis-à-vis des bactéries indicatrices. La lecture des résultats se fait par la comparaison entre ceux obtenus par les surnageants traités et le surnageant non traité thermiquement.

II.2.4. Purification partielle de la bactériocine

Les souches *Leuconostoc* sélectionnées, productrices de substances antimicrobiennes sont cultivées dans un bouillon MRS à une température de 30°C pendant 24 heures. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse 4000 trs/mn, à une température de 4°C pendant 15 min.

Le surnageant est par la suite saturé à 60% par l'ajout progressif de 36.1% (P/V) de sulfate d'ammonium, avec une agitation modérée à 4°C pendant 2 heures. Une seconde centrifugation est réalisée à 10000 trs/mn. Le culot obtenu est dissout dans une solution tampon de 20 mmole de phosphate de sodium puis ajusté au pH 6,0. La solution obtenue est soumise à une dialyse (à l'aide d'une membrane) à 4°C avec agitation contre de l'eau distillée pendant 24h pour éliminer les sels. La stérilisation de la solution est effectuée par filtration sur membrane (0.22 µm) (Abbabsa, 2012 ; Lahiri et al., 2020).

L'effet antagoniste des protéines purifiées est mis en évidence en utilisant la méthode de diffusion par disque. De ce fait, chacun des disques de papier Wattman (n°3, Ø6 mm) stérile

est imprégné par 10 µl de la solution protéique et placé à la surface du milieu de la boîte de pétri contenant du MH,ensemencé par une bactérie indicatrice (Abdallah et al., 2014).

II.2.5. Mode d'action de la bactériocine

Dans le but d'explorer l'effet des bactériocines partiellement purifiées sur la croissance des germes indicateurs de l'activité antagoniste, deux cultures de la souche indicatrice sont inoculées sur bouillon nutritif et incubées à une température de 37°C avec agitation.

Un volume de 1 ml du surnageant des souches *Leuconostoc* sélectionnées antagonistes, est neutralisé par une solution de NaOH 1N, filtré à l'aide d'un filtre millipore stérile (Ø 0,22 µm) est ajouté à une culture de germes indicateurs 4h après l'incubation. Des prélèvements à des intervalles de temps réguliers (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 24h) sont effectués pour l'évaluation de la croissance bactérienne par la mesure de la densité optique à 600nm.

II.3. Effet des substances antimicrobiennes produites par une souche lactique *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris* sur la qualité microbiologique d'un fromage frais J'ben de chèvre

Le développement de la saveur du lait cru au « J'ben » est due principalement à sa communauté microbienne naturellement existante, qui contribue également à l'inhibition de la croissance bactérienne pathogène d'origine alimentaire.

Cette étude a pour objectif de contribuer à la préservation de la qualité et la conservation du fromage frais préparé à partir du lait de chèvre. A travers ce travail on vise la recherche de l'effet de l'incorporation des substances antimicrobiennes produites d'une souche lactique *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum* productrice de substance antimicrobienne, et l'influence des substances d'affinage naturelles (sel, l'ail et le romarin) sur la qualité du fromage traditionnel affiné.

II.3.1. Surnageant de la souche

A partir d'une préculture de 18h de la souche LAB13 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris*) dans un milieu liquide MRS, une centrifugation de 10000 trs/mn à 4°C pendant 10m est effectuée. Le surnageant est ensuite récupéré et filtré en utilisant un filtre millipore de 2 mm.

II.3.2. Collecte du lait de chèvre

Un échantillon de lait de chèvre (20 litres) a été collecté d'une ferme localisée dans la région d'Ouargla « Sidi Bensaci ». Le lait cru a été traité manuellement avec un grand soin, afin d'éviter toute contamination pouvant modifier la flore lactique. Pour cela, les mains de l'éleveur et les mamelons ont été désinfectés avec de l'eau javellisée. Le lait a été recueilli dans des récipients stériles (flacons de 250ml) placés tout près du mamelon puis transportés directement au laboratoire dans des glacières à 4°C.

II.3. 2.3. Analyses physicochimiques du lait

a. Mesure du pH

Le pH est déterminé par la technique électro-métrique ou potentiométrique en utilisant un pH-mètre : un appareil qui mesure la différence de potentiel entre deux électrodes.

Le but est de mesurer l'acidité du lait en utilisant un pH-mètre.

b. Acidité titrable

Un échantillon de 10 ml de lait est placé dans un Bécher en présence de 0,1 ml de phénolphthaléine à 1% dans l'alcool à 95% comme indicateur. On mesure l'acidité du lait par le titrage du volume de NaOH (0.1N) rajouté à la Burette jusqu'au virage vers la couleur rose. La coloration rose doit persister au moins 10 secondes (Guiraud, 1998).

c. Mesure de la teneur en matière sèche totale

On entend par « matière sèche » du lait, le produit résultant de sa dessiccation dans les conditions décrites par la norme. Dans une capsule séchée et tarée, on introduit à l'aide d'une pipette 3ml de lait, puis incubé dans l'étuve réglée à $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durant 3 heures. La capsule est ensuite placée dans le dessiccateur puis laissée refroidir jusqu'à la température ambiante. On pèse ensuite à l'aide d'une balance analytique le résidu.

La matière sèche est exprimée en pourcentage comme suit :

$$\boxed{[(M_1 - M_0) / (M_2 - M_0)] \times 100}$$

M_0 : masse en grammes de la capsule vide.

M_1 : masse en grammes de la capsule et du résidu après dessiccation et refroidissement.

M_2 : masse en grammes de la capsule et de l'échantillon avant dessiccation.

II.3.2.4. Analyse microbiologique de lait

Les analyses microbiologiques du lait sont basées sur le dénombrement de la F.M.A.T (**Flore Mésophile Aérobie Totale**) des coliformes totaux et fécaux, des streptocoques fécaux et la recherche de microorganismes pathogènes (*Salmonella*, staphylocoques et *Clostridium* sulfito-réducteurs). La recherche des levures et moisissures est également préconisée (**Guiraud, 1998**).

a. Préparation des dilutions décimales du lait

Une gamme de dilutions est réalisée à partir de l'échantillon primaire à l'aide d'une pipette pasteur stérile. 1 ml de l'échantillon est prélevé et introduit dans un tube contenant 9 ml de diluant et de l'eau peptonée (dilution 10^{-1}). Cette étape est répétée jusqu'à la dilution 10^{-6} (**Guiraud, 1998**).

b. Recherche et dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (F.M.A.T.)

La F.M.A.T. est un bon indicateur de la qualité générale et de la stabilité des produits ainsi que la propreté des installations (**Guiraud, 1998**). Leur dénombrement est effectué par la méthode classique en milieu gélosé Plate Count Agar (PCA) dont les ensemencements sont réalisés en surface, à partir des dilutions 10^{-4} à 10^{-6} dans deux boîtes. L'incubation se fait à 30°C pendant 24h. Tous les ensemencements se font en double (**Guiraud, 1998**).

c. Recherche et dénombrement des Levures et moisissures

Elle est effectuée sur le milieu Sabouraud avec une incubation de 5 jours à 25°C. A partir des dilutions décimales 10^{-2} et 10^{-3} , 0,1ml sont portées aseptiquement dans une boîte de Pétri et est étalés à l'aide d'un râteau stérile, puis incubés. (**Lebres et al., 2002**).

d. Recherche et dénombrement des coliformes

La numération des coliformes (totaux, fécaux) est réalisée par ensemencement de 1 ml de ses dilutions (10^{-1} à 10^{-6}) dans un milieu liquide BCPL (Bouillon Lactosé au Pourpre de Bromorésol) par technique du NPP (Nombre le Plus Probable) (**Guiraud, 1998**). 6 tubes pour chaque dilution et chaque tube est préalablement muni d'un petit tube renversé (cloche de DURHAM) destiné à piéger la formation éventuelle de gaz. Après ensemencement, les tubes sont incubés à 37°C pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes fécaux pendant 72h. Sont considérés comme positifs, les tubes dans lesquels il y a croissance et une production notable de gaz (1/10 au moins du volume de la cloche) et virage du milieu au jaune (**Niang et al., 2020**).

e. Recherche des Streptocoques fécaux

Les Streptocoques fécaux sont recherchés et dénombrés en milieu liquide par la technique du nombre le plus probable (NPP) qui fait appel à deux tests, à savoir : (i) le test de présomption, réservé à la recherche des Streptocoques sur milieu de Rothe et (ii) le test de confirmation dont les tubes positifs sur milieu Rothe (présence d'un trouble) sont repiqués sur milieu Eva Litsky. Après 24h d'incubation à 37°C, la présence d'un trouble dans les tubes nous confirme la présence des Streptocoques fécaux (**Lebres et al., 2002**).

f. Recherche des Staphylocoques

Staphylococcus aureus est recherchée sur milieu Chapman par étalement de 0.1 ml des dilutions de 10^{-1} et 10^{-2} en surface, puis incubées à 37°C pendant 24 h. La détection est faite par la présence et l'apparition de colonies dorées avec un changement de couleur du milieu (**Benhedane, 2012**).

g. Recherche et numérations des anaérobies sulfito-réducteurs

Ces microorganismes se développent dans un milieu Viande Foie (VF) additionné d'alun de fer. Leur ensemencement est effectué en profondeur par introduction de 1 ml de dilution 10^{-1} et 10^{-2} dans un tube après un chauffage pendant 10 minutes à une température de 90°C ou 20 minutes à une température de 80°C, puis en rajoute 20 ml de VF, incubé à 37°C pendant 24 heures. Leur dénombrement est réalisé grâce à la présence ou l'absence de colonies entourées par des halos noirs (**Benhedane, 2012**).

h. Recherche des salmonelles

Un pré-enrichissement dans une eau peptonée est réalisé, en portant 25 ml de lait dans 225 ml d'eau peptonée avec incubation à 37°C/ 24 h. S'en suit un enrichissement en repiquant 1 ml du milieu de pré-enrichissement (trouble) dans 9 ml de bouillon au sélénite de sodium (SFB, Institut Pasteur, d'Algérie) stérile et incubation à 37°C /24 h. Enfin, un isolement est effectué en stries, à la surface de la gélose Hektoen avec incubation à 37°C/24-48 h (**J.O.R.A., 2017**).

II.3.2.5. Préparation du fromage

La préparation du fromage traditionnel (J'ben), consiste en trois étapes essentielles (**Randazzo et al., 2002**) : la coagulation ou la fermentation à température ambiante ; l'égouttage ou l'élimination de la phase liquide (le lactosérum) et l'affinage. Cette dernière constitue l'étape

principale dans ce travail où nous avons réparti le fromage en cinq morceaux, dont quatre ont subi un affinage par différentes substances et un témoin (sans affinage) :

E1: fromage sans additif (témoin)

E2: fromage affiné avec du sel (2%);

E3: fromage affiné avec du romarin (2%);

E4: fromage affiné avec de l'ail (2%);

E5: fromage affiné avec le surnageant actif de la souche lactique (2%).

Les cinq échantillons sont conservés à 4°C.

Après égouttage, le fromage est placé dans un pot puis pesé à l'aide d'une balance électronique.

II.3.2.6. Analyses physico-chimiques du fromage

a. Détermination du pH

Mélanger 10g de J'ben avec 90 ml d'eau distillée, puis homogénéiser. Le pH de l'échantillon est déterminé après une 1 heure en utilisant un pH-Mètre numérique où l'électrode a été introduite directement dans l'échantillon. La valeur est lue directement sur l'écran de l'appareil avec deux répétitions.

b. Détermination de l'acidité titrable

90 ml d'eau distillée stérile et chauffée à une température de 40°C sont ajoutées à 10 g de fromage. Le mélange est bien homogénéisé, puis filtrer 10 ml de cette suspension par la soude 1/9N en présence de phénolphtaléine qui indique la limite de neutralisation par changement de couleur (rose pâle). Le résultat est exprimé en degré Dornic par gramme de fromage (°D/g) (AFNOR, 1998).

c. Détermination de la matière sèche

La méthode consiste à placer 5 g de fromage dans une capsule d'étuvage dans une étuve à une température comprise entre 101°C et 105°C pendant 3h. Les capsules sont ensuite transférées dans un dessiccateur pendant quelques minutes, le temps qu'elles refroidissent et atteignent la température ambiante et les peser par la suite. (Dahou et al., 2015).

$$EST = (P3 - P1) / (P2 - P1) * 100$$

Avec :

P1 : le poids de la capsule vide ;

P2 : le poids de la capsule + poids du fromage avant étuvage

P3 : le poids de la capsule plus celui du fromage après étuvage et dessiccation

I.7.1.5-Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité (Hm) est ensuite calculé selon la formule suivante (**Dahou et al., 2015**)

$$Hm = 100 - EST$$

II.3.2.7. Analyse microbiologique du fromage

- Préparation de la solution mère et des dilutions décimales du fromage

La solution mère (10^{-1}) a été obtenue en homogénéisant 10 g de fromage dans 90 ml d'eau peptonée (**J.O.R.A, 2017**). Ensuite, une série de dilutions décimales a été préparée en prélevant 1 ml de la solution mère dans 9 ml d'eau peptonée, ce qui constitue la dilution 10^{-2} . La même opération a été répétée pour l'obtention de dilutions successives afin de préparer le nombre de dilutions décimales approprié pour le dénombrement de chaque flore bactérienne (**J.O.R.A, 2017**).

Le **tableau 4** représente les principales caractéristiques de l'analyse microbiologique du fromage préparé.

Tableau4 : Caractéristiques de l'analyse microbiologique

Microorganismes	Milieux de culture	Températures et Temps d'incubation	Dilutions
F.M.A.T.	PCA	30°C /48 h	10^{-4} à 10^{-6}
Coliformes totaux	Bouillon BCPL	37°C/72 h	10^{-1} à 10^{-6}
Coliformes fécaux	Bouillon BCPL	44°C/72 h	-
Streptocoques fécaux	milieu de Rothe milieu de Litsky	37°C/48 h 37°C/48 h	10^{-1} et 10^{-2}
<i>Salmonella</i>	Eau peptonée tamponnée Bouillon sélénite cystine Gélose Hektöen	37°C/24 h 37 et 43°C/24 à 48 h 37°C/48 heures	10^{-1} et 10^{-2}
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chapman	37°C/48 heures	10^{-1} et 10^{-2}
<i>Clostridium sulfito-réducteurs</i>	Viande foie additionné au sulfite de sodium et le citrate de fer	Bain marie à 80°C/10mn puis incubation à 37/48 h	10^{-1}
Levures et moisissures	Extrait de malt	25°C/7 jours	10^{-2} et 10^{-3}

FMAT : Flore Mésophile Aérobie Totale ; BCPL : poupre de romocrésol lactosé

Les analyses des fromages sont réalisées le jour de la préparation (J₀), et après conservation à 4°C : pendant quatre jours après l'affinage (J₄) et sept jours après l'affinage (J₇), pour évaluer l'influence des substances ajoutées.

II.4. Biosynthèse des nanoparticules d'argent

Les nanoparticules d'argent (AgNPs) ont des propriétés remarquables avec des applications polyvalentes comme antimicrobiennes, larvicides, anticancéreuses et cicatrisantes. La synthèse biogénique des AgNPs utilisant des micro-organismes est apparemment et déduite de ses récompenses garanties, y compris les applications pharmacologiques et autres potentielles. L'utilisation de bactéries et de champignons pour la synthèse d'AgNPs est nettement avantageuse en raison de la formation d'une grande quantité de protéines, d'une manipulation simple, d'une moindre toxicité et d'un rendement élevé. De plus, la stabilité de l'activité biologique des AgNPs est également grandement améliorée car ces AgNPs sont facilement enrobés par des biomolécules issues de ces microorganismes. Ce chapitre fournit des informations précieuses sur la synthèse bactérienne et fongique des AgNPs et ses applications remarquables dans différents domaines.

Le but de cette étude était de biosynthétiser les nanoparticules d'argent (AgNPs) en utilisant la souche (LnC1). *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Des caractérisations physico-chimiques des AgNPs synthétisés ont été effectuées par le Uv-Vis, MEB et l'EDX. Ainsi l'étude de l'activité photocatalytique et l'effet antimicrobien contre les micro-organismes pathogènes de ces nanoparticules.

II.4.1. Synthèse de nanoparticules d'argent AgNPS

Une culture bactérienne non contaminée de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* (LnC1) (9×10^8 CFU/ml) a été inoculée dans du bouillon de MRS, puis incubée à 30°C pendant 24h. Une centrifugation à 4000 rpm /10 minutes à 4°C est réalisée. Le surnageant est récupéré dans des flacons de 200 ml.

Une solution de nitrate d'argent 0,8 mM est préparée après sa dissolution dans de l'eau distillée. La solution préparée est ajoutée au surnageant V/V puis le mélange est incubé une nuit à 30°C dans un agitateur orbital à 120 rpm (Irvani et al., 2014 ; Ahmad et al., 2020).

La synthèse de nanoparticules d'argent (AgNps) se manifeste par le changement de couleur de la solution en brun foncé. AgNPs est récupéré par centrifugation à 12000trs/min, le culot est récupéré et rincé deux fois avec l'eau ultrapure.

II.4. 2. Caractérisation de AgNPs

II.4. 2.1. La spectrophotométrie UV-Visible

Le principe du spectromètre UV/Visible consiste en une source munie de deux lampes qui permettent un continuum d'émission sur toute la gamme de longueur d'onde UV-Visible : Lampe au deutérium qui émet des longueurs d'ondes λ de 200 à 600 nm (UV). Lampe au tungstène qui émet des longueurs d'ondes λ de 400 à 800 nm (Visible). Un monochromateur (prisme, ou réseau ou les deux à la fois) permet de n'envoyer à travers la cuve qu'un faisceau monochromatique, il sert à sélectionner les longueurs d'ondes et donc de faire un balayage de la gamme en déplaçant ce monochromateur. Le faisceau de photons à la longueur d'onde λ sélectionnée traverse un miroir qui synchronise le mouvement du monochromateur, puis le faisceau traverse l'échantillon ou la référence, puis un amplificateur permet de comparer l'intensité en sortie par rapport à l'intensité d'émission. (Wang et Ni, 2014 ; Muthusamy et al., 2017)

La synthèse des Ag-NPs a été principalement contrôlée par spectrophotomètre UV-Vis (UV-2300 Shimadzu). Une suspension d'Ag-NPs à 0,1% a été préparée avec de l'eau ultrapure et soniquée pendant 5 min. Le pic d'absorbance a été enregistré de 250 à 600 nm à une résolution de 2 nm.

II.4.2.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique capable de produire des images de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière (**Figure 10**). Un faisceau d'électrons est focalisé sur la surface du matériau observé à l'aide d'un jeu de lentilles électromagnétiques entraînant l'émission d'électrons depuis le matériau irradié. Un détecteur va capter ces électrons émis et retranscrire un signal modulé par le nombre d'électrons reçus depuis un point d'impact du faisceau. Pour former une image, le faisceau va balayer une zone de l'échantillon afin que les différents points d'impact forment chacun un point de l'image obtenue (Muthusamy et al., 2017). La microscopie électronique à balayage nous informe sur la morphologie de surface des films (babu Maddinedi et al., 2017).

Les images de microscopie électronique à balayage, présentées dans ce travail ont été réalisées au PTAPC CRAPC Ouargla avec un microscope de type Zeiss Supra 40VP avec une tension d'accélération variant entre 1 et 30 kV.

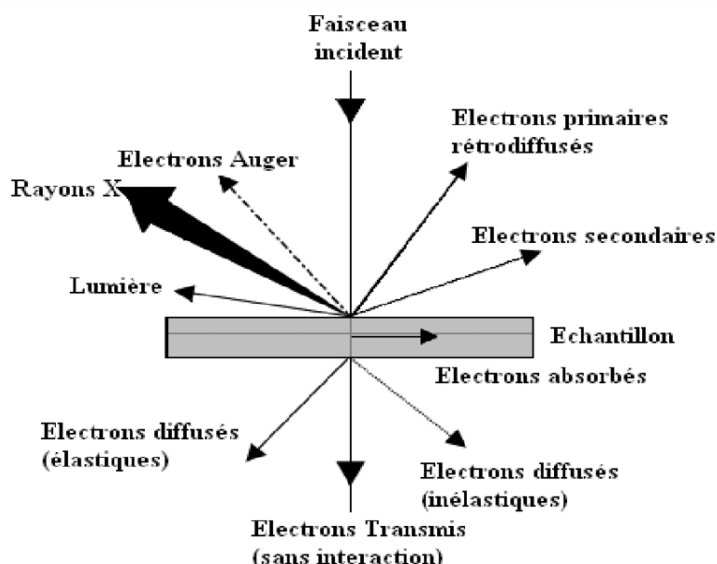


Figure 10 : Représentation schématique de l'interaction entre un faisceau d'électrons et la surface d'un échantillon (Dadi, 2021)

II.4.2.3. Energie dispersive de rayon X (EDX)

Pour l'étude des surfaces et des structures fines, le MEB est associé à la microanalyse par Energie Dispersive de rayons X (EDX) qui permet une analyse locale ou globale des matériaux les plus divers. De plus, cette technique EDX permet de réaliser une analyse quantitative aussi bien sur échantillons massifs de quelques centimètres carrés que sur des fragments, particules ou résidus de quelques dixièmes de millimètre. L'échantillon à étudier est placé sous vide, un faisceau d'électrons est balayé à travers la surface et une image de la surface est produite, en plus, une microanalyse chimique élémentaire de la surface de l'objet par la méthode EDX (babu Maddinedi *et al.*, 2017 ; Muthusamy *et al.*, 2017).

II.4. 3. Activité photocatalytique d'AgNPs

Les nanoparticules d'Ag biosynthétisées ont été étudiées pour la dégradation photocatalytique des colorants : bleu de méthylène (BM), orange de méthyle (OM) et rouge Congo (RC). Principalement, la solution de colorant a été préparée en dissolvant 1 mg de poudre de bleu de méthylène (BM), d'orange de méthyle (OM) et de rouge Congo T (RC) dans 100 ml d'eau distillée. On ajoute 10 mg des AgNPs dans 50 ml de la solution de colorant et le mélange est agité magnétiquement pendant 30 min à l'obscurité avant d'être exposé au soleil. À l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, l'intensité d'absorption du mélange réactionnel du colorant a été contrôlée à différents intervalles de temps. La vitesse de décoloration des colorants vers leur forme réduite incolore en présence de nanoparticules d'Ag a été observée par spectrophotomètre UV-visible pendant un certain intervalle de temps à des longueurs d'onde de

350 nm pour OM, 664 nm pour BM et 530 nm pour RC (Roy et al., 2015). Le pourcentage de dégradation du colorant a été estimé par la formule suivante :

$$E (\%) = 100 \times (C_0 - C) / C$$

Où C_0 est la concentration initiale de la solution de colorant et C est la concentration de la solution du colorant après dégradation photocatalytique.

II.4.4. Activité antimicrobienne des AgNPs

Les nanoparticules dissoutes dans de l'eau distillée et stérilisées à 100°C pendant 10 minutes ont été testées pour leur activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque d'agar. Dix souches bactériennes ont été utilisées comme souches indicatrices pour cette analyse (Gram positif) : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Micrococcus luteus* (ATCC 9314), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, (Gram-négatif) *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella abony* ATCC 6017, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et la souche fongique *Candida albicans* ATCC 10237.

La préparation de la suspension a été réalisée par la méthode précédemment décrite par (Nikolić et al., 2014). Les colonies de bactéries et de levures ont été prélevées directement de la gélose nutritive et mises en suspension dans 9 ml de sérum physiologique stérile à 0,85%, puis nous avons ajusté la turbidité de la suspension initiale en la comparant à 0,5 Mc Farland (Andrews et al., 2005). Des dilutions au dixième de la suspension initiale ont été en outre préparées dans une solution saline stérile à 0,85%. Des suspensions de cellules microbiennes ont été inoculées aux plaques de gélose Muller Hinton (BIO-RAD). Des disques de cellulose standard stériles de 9 mm de diamètre ont été imprégnés de 10µl de différentes concentrations d'AgNPs - DS (C1=30 µg/ml, C2=15 µg/ml, C3=7.5 µg/ml, C4= 3.75 µg/ml, C5=1.875 µg /ml, et C6 = 0,937 µg/ml.) et placé à la surface des plaquesensemencées. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 24h. Les zones d'inhibition ont été estimées en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de croissance.

CHAPITRE 3 :
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Résultats et discussion

I. Isolement et purification

L'isolement des bactéries réalisé sur milieu sélectif MRSv, à partir de différents produits laitiers (lait de chèvre, lait de chamelle, lait de Brebis, lait de vache, Dhan, J'ben et klila), nous a permis de sélectionner 201 souches. Celles-ci présentent l'aspect des colonies recherchées, à savoir de forme lenticulaire ou circulaire, de petite taille et de couleur blanchâtre. (**figure 11**).



Figure 11 : Aspect des colonies sur milieu MRSv après isolement et 24h d'incubation.

Après la réalisation de quelques tests phénotypiques (coloration de Gram, test de catalase, test de dégradation de l'arginine et production de CO₂ à partir du glucose), nous avons constaté que 105 isolats font partie principalement de deux genres de bactéries lactiques, connus par leur résistance à la vancomycine, "*Leuconostoc*" et "*Lactobacillus*". Le tableau 5 montre la répartition des isolats selon le produit primaire.

Tableau 5: Flore lactique présente dans les différents échantillons isolés sur milieu MRSv

Sources	Genres		
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactobacillus</i>	Autres genres de bactéries
Lait de chèvre	14	12	4
Lait de chamelle	14	10	16
Lait de vache	1	12	17
Lait de brebis	0	12	28
Dhan	0	10	20
J'ben	9	12	10
Total	38	68	95
Nombre total	201		

Les résultats du **tableau 5** montrent l'absence totale des leuconostocs dans le Dhan et le lait de brebis. Ils sont compatibles avec ceux décrits par **Zadi-Karam et Karam (2006)** ; **Hansal, (2015)** ; **Zarour (2018)** qui ont isolé les souches *Ln* à partir du lait de chamelle et du lait de chèvre. Il en est de même pour le J'ben et le lait de vache selon les résultats de **Meghoufel (2019)**. Par contre, nos résultats relatifs au lait de brebis sont différents de ceux obtenus par **Mahi (2010)** ; **Boumediene (2013)** et **Zarour (2018)** qui ont pu isoler des *Ln* à partir de ce lait. Le résultat d'isolement à partir du Dhan est similaire à celui de **Tantaoui-Elaraki et El Marrakchit, (1987)** qui ont mentionné l'absence de *Ln* et la présence de *Lb* et autres germes.

La présence des micro-organismes dans le lait est influencée par différents facteurs du milieu, tels que le pH, la température, la quantité d'eau libre, la concentration en nutriments ou la composition du lait. Celle-ci est affectée par plusieurs facteurs comme l'âge de l'animal, les stades de lactations, l'alimentation et la race (**Ueli Wyss, 2014**), ainsi que la présence de substances antimicrobiennes et les interactions entre micro-organismes.

La présence de microorganismes dans les produits dérivés du lait (Dhan et J'ben) est influencée par la composition du lait d'origine ainsi que par la méthode de préparation. En effet, parfois le produit doit subir un traitement thermique, ainsi que la méthode de conservation du produit final, car l'ajout de substances tels que le sel ou les herbes (persil, thym, ail ou coriandre) peuvent influencer négativement sur la croissance des microorganismes (**Guiraud, 1998**).

I.1. Identifications morphologiques des isolats

I.1.1. Aspect macroscopique

Après la purification des souches sur le milieu MRS (solide et liquide alternativement) à partir des colonies isolées des milieux MRS, nous obtenons:

a. Sur Milieu liquide: après 24h d'incubation, le milieu est trouble (**figure 12**). Ceci est dû à la croissance des bactéries qui se concentre au fond du tube à la recherche des conditions anaérobiques. (**Kihal et al., 1996**). Après agitation, nous constatons le dégagement de CO₂.

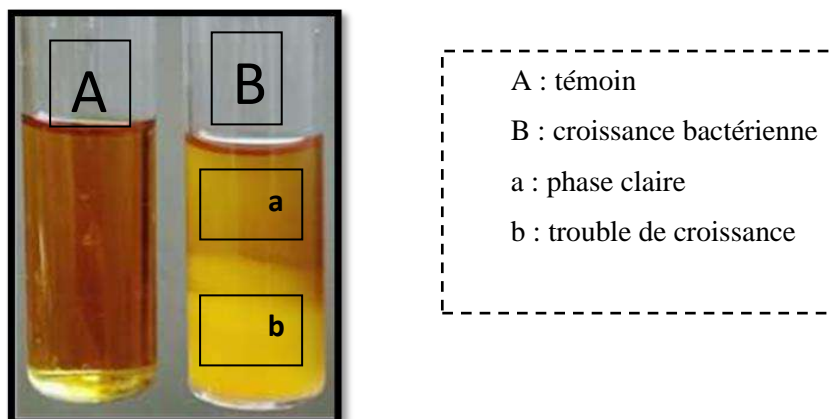


Figure 12 : Aspect de croissance d'une souche de *Leuconostoc* sur bouillon MRS après 18 h d'incubation à 30°C

b. Sur Milieu solide : l'étude de l'aspect macroscopique des souches sur milieu MRS solide après 24h d'incubation nous a permis de distinguer des colonies de couleur blanchâtre, forme lenticulaire ou circulaire (**figure 13**). Ces colonies présentent environ 0.5 à 1 mm de diamètre.

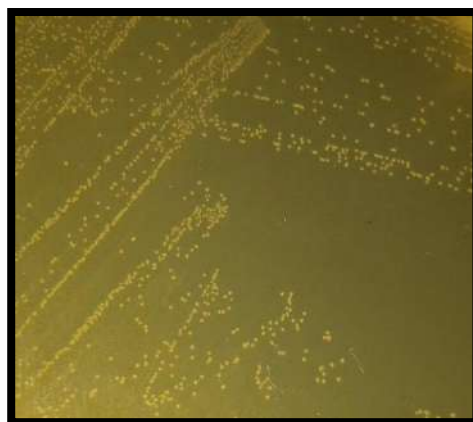


Figure13 : Aspect des colonies d'une souche de *Leuconostoc* sur MRS solide après 18 h d'incubation à 30°C

I.1.2. Aspect microscopique

L'observation microscopique des bactéries isolées, pures après coloration de Gram (**figure 14**), a révélé que ces souches sont Gram positive. Elles présentent des formes variées (petites coques, coccobacilles ou ovoïdes) dont le mode d'association des cellules est souvent en paires ou en chaînettes, incurvées et de nombre pair (**Lihal et al., 1996**) ce qui donne une pré-identification du genre recherché : *Leuconostoc* (**figure 14**).

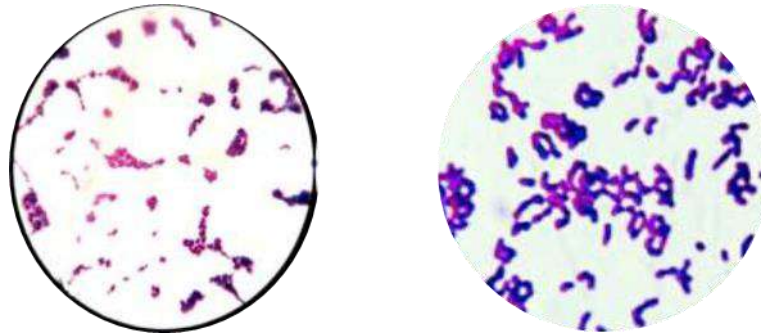


Figure 14 : Observations microscopiques des espèces LnC1 et LnC12 respectivement après une coloration de Gram à grossissement x100

Après l'observation microscopique, toutes les souches Gram+ sous forme ovoïde ou cocobacille ont été retenues comme *Leuconostoc* (Hansal, 2015). Nous avons éliminé toutes celles apparaissant Gram- et les formes de bacille.

1.2. Tets physiologiques et biochimiques

Les résultats des tests phénotypiques, physiologiques et biochimiques sont reportés dans le **tableau 6**.

1.2.1. Recherche de la catalase

Le test catalase a révélé l'absence de l'enzyme, ce qui reflète l'incapacité des souches à dégrader le peroxyde d'hydrogène.

Tableau 6 : Résultats des tests physiologiques et biochimiques

Échantillon	Lait de chèvre							Lait de chamelle			Lait de vache	J'ben			
Isolats	LnC1, LnC2, LnC13, LnC15	LnC10	LnC12, LnC18, LnC23	LnC16, LnC41	LC21, LnC39	LnC34	LnC43	LnH81, LnH83, LnH86, LnH92, LnH95	LnH82, LnH84, LnH85, LnH88, LnH90.	LnH87, LnH91, LnH93, LnH98	LnV67	LnF49, LnF69	LnF65 ,, LnF70, LnF71	LnF55, LnF63, LnF64	LAB13
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production de CO₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dégradation de l'arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production de Dextrane	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
Utilisation du citrate	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+
Utilisation d'esculine	+	+/-	-	+/-	-	-	+/-	-	+	-	+	-	-	-	-
NaCl 3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 6.5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T° 4°C	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
T° 15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T° 30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

T° 37°C	+	+	+	+	+/-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+/-
T° 42°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T ° 63°C / 30mn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 9.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
Lactose	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Fructose	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Saccharose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
Mannose	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+

(+) résultat positif

(-) résultat négatif

I.2.2. Croissance à différentes températures

Les tests physiologiques nous indiquent que la plupart des bactéries peuvent croître entre 10°C et 37°C. Par contre, aucune croissance n'est constatée à 4°C et à 42°C, sauf quelques souches (tableau6). Toutes les souches ne sont pas thermorésistantes, où nous observons une absence de croissance sur le bouillon MRS, après un traitement thermique pendant 30 minutes à 63°C.

Nos résultats sont identiques à ceux annoncés par **Bekhouché (2006)**, **Moumene (2015)** et **Zaarour (2018)**. Selon **Badis et al., (2005)** les leuconostocs sont généralement mésophiles, avec une température optimale de croissance de 25 à 30°C.

I.2.3. Résistance à la salinité

Les isolats testés ont révélé une résistance aux à 3% de NaCl mais pas à 6.5% de NaCl. Ces résultats sont semblables à ceux trouvés par **Danilovic et al., (2011)** et **Wang et al., (2013)**.

I.2.4. Croissance à différents pH

Après une incubation à 30°C, les résultats obtenus montrent que tous les isolats peuvent supporter un pH de 6.8. La moitié présente une croissance sur milieu MRS à pH 9.6 et la plupart n'a pu se développer dans un milieu MRS à pH 4, ce qui a été démontré par **Rivollierm et Christieanss, (2009)** et **Bellil, 2019**

I.2.5. Recherche du type fermentaire

Ce test constitue la première clé d'orientation phénotypique des bactéries lactiques et a pour objectif de différencier entre les souches hétérofermentaires et les souches homofermentaires (**Hansal, 2015**).

Les espèces appartenant au genre *Leuconostoc* sont toutes productrices de CO₂ (hétérofermentaires). Après une incubation à 30°C, les résultats montrent l'apparition d'un trouble, au fond des tubesensemencés, avec un dégagement de gaz (CO₂). Ceci est provoqué par la fermentation du glucose (bouillon MRS glucosé) au niveau de la cloche de Durham et son flottement dans le milieu. Les isolats ont révélé un métabolisme hétérofermentaire (**figure15**), ce qui caractérise le genre de *Leuconostoc*.

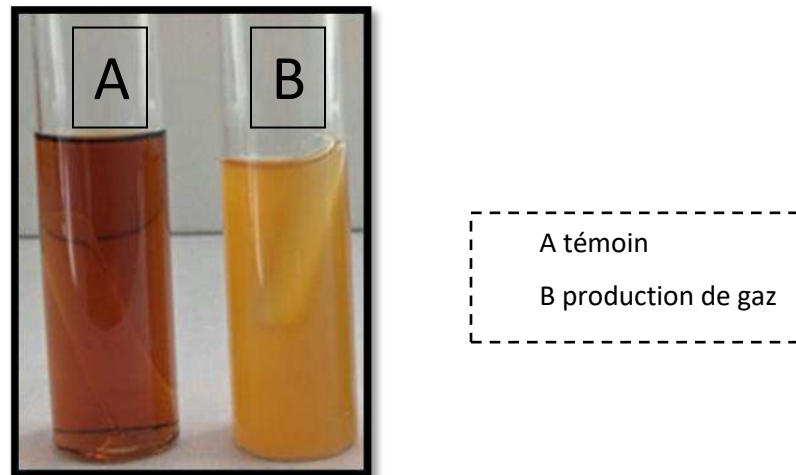


Figure 15: Type fermentaire des souches *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides* isolées sur bouillon MRS glucosé.

I.2.6. Recherche de l'Arginine déshydrogénase (ADH)

Après 48h d'incubation sur gélose M16.BCP à 30°C, 38 souches isolées utilisent le lactose en produisant de l'acide lactique. Ce dernier va baisser le pH en changeant la couleur du vert au jaune. Toutefois, les souches sont incapables d'hydrolyser l'arginine contenue dans le milieu M16 BCP, car les *Leuconostocs* ne possèdent pas l'ADH (arginine déshydrogénase) donc ADH(-). Ce caractère est exigé dans l'industrie alimentaire car il empêche l'émergence d'un goût amer, dû à l'ammoniac émis lors de la fermentation du lait (Khedid et al., 2006)



Figure 16: Résultat de test ADH (Hydrolyse de l'arginine).

I.2.7. Test de dégradation des sucres

Le profil fermentaire de 23 souches isolées sur onze sucres a montré un virage au jaune révèle la fermentation des carbohydrates, provoquant une acidification du milieu. L'arabinose constitue le sucre « clé » pour différencier entre les espèces du genre *Leuconostoc*. L'utilisation de ce critère phénotypique permet de conclure la pré-identification et de mieux identifier les isolats au niveau de l'espèce. Les résultats obtenus sont représentés sur le **tableau 6 et figures 17 et 18**

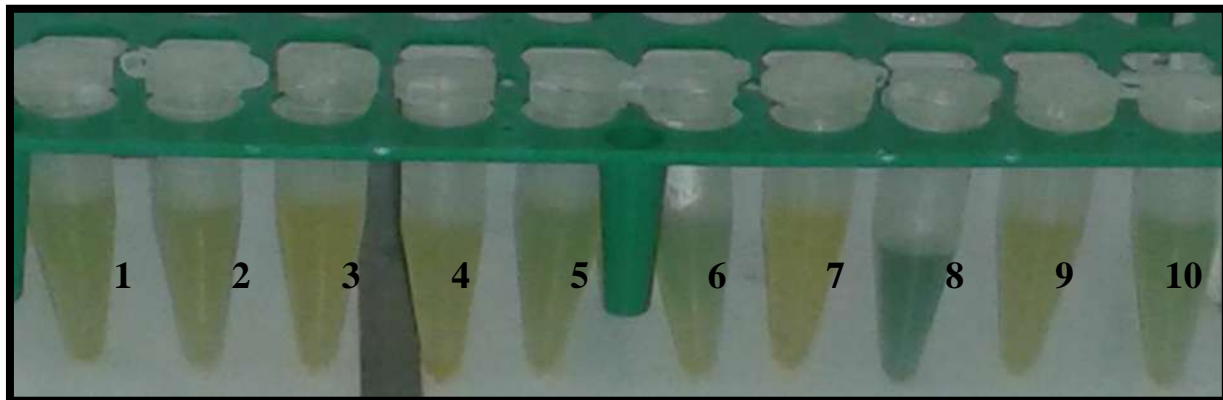


Figure 17 : Profil fermentaire de la souche *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*

1 glucose, 2 lactose, 3 fructose, 4 saccharose, 5 arabinose, 6 mannitol, 7 xylose, 8 maltose, 9 mannose, 10 galactose

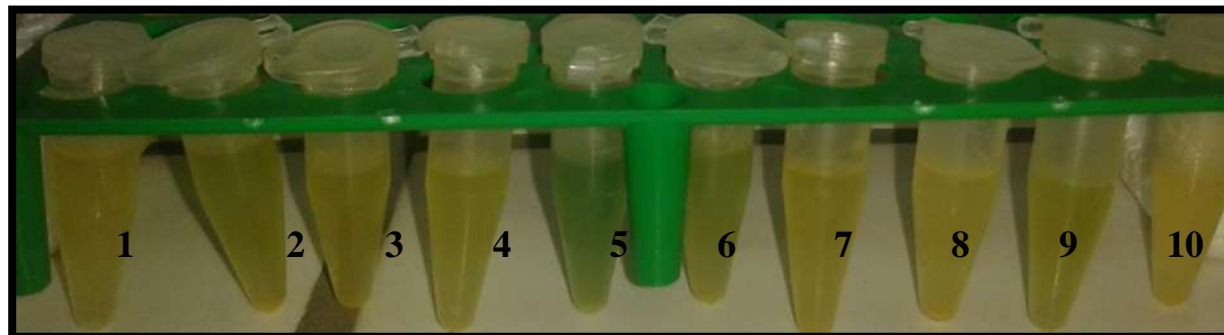


Figure 18 : Profil fermentaire *Ln. mesenteroides subsp cremoris*

1 glucose, 2 lactose, 3 fructose, 4 saccharose, 5 arabinose, 6 xylose, 7 mannitol, 8 maltose, 9 mannose, 10 galactose

Selon les **figures 17 et 18**, les isolats sont capables d'utiliser différents sucres. En effet, le virage du bleu de bromothymol dans le milieu MRS BCP, confirme que les souches ont dégradé la plupart des sucres additionnés dans le milieu, ces résultats sont identiques à ceux de **Mimouni et Centouf, (2015)**.

I.2.8. Utilisation du citrate

Le milieu KMK permet de différencier entre les souches utilisant le citrate pour donner des substances aromatiques et celles qui ne l'utilisent pas. Dans le premier cas les résultats se

traduisent par la présence de colonies de couleur bleue, contrairement au résultat négatif révélé par la présence de colonies de couleur blanche (figure 19).



Figure 19: Révélation de l'utilisation du citrate

Le tableau 6 montre que la plupart des souches utilisent le citrate et d'autres sont incapables. Cette perte du pouvoir de dégrader le citrate est peut être due à une perte de plasmide codant pour la citrate perméase (**Kihal et al ., 1996**). Le métabolisme du citrate par les souches *Leuconostoc* est un facteur indispensable dans la production de composés aromatiques chez les espèces aromatisantes dans les produits laitiers (**Sanchez et al., 2006**).

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par **Bekhouche (2006)** ; **Moumene (2015)** et **Zaarour (2018)**.

I.2.9. Production de dextrane

Le milieu sélectif MSE permet de vérifier la production de dextrane par les souches *Leuconostoc* dans le lait, les produits laitiers et les aliments sucrés. Le tableau 6 indique que la majorité des souches utilise le saccharose du milieu pour synthétiser le dextrane (exopolysaccharide). Cette production se caractérise par la formation de colonies à aspect gélatineux (**figure 20**).



Figure 20 : Morphologie des colonies productrices de dextrane par les souches de *Leuconostoc* sur milieu MSE

Ce caractère important nous a aidé à différencier entre les espèces de *Leuconostoc* et de supposer leur appartenance à l'une des deux espèces productrices de dextrane: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Ceci a été également mentionné par **Mayeux et Elliker, (1962)** ; **Garvie, (1984)**; **Badis et al ., (2005)**.

➤ L'identification des espèces a été conduite selon les résultats des tests physiologiques et biochimiques tels que la croissance à différentes températures, à différents pH et différentes concentrations de NaCl. Il en est de même pour certains caractères biotechnologiques comme l'utilisation du citrate, en se basant sur la comparaison avec les tableaux et les schémas d'identification des espèces de *Leuconostoc* (**Milliere et al., 1989** ; **Björkroth et Holzappel, 2006**). La confirmation de l'identification phénotypique a été réalisée aussi par l'étude du profil fermentaire en présence de différentes sources hydrocarbonées. Ainsi, nous avons pu identifier les 38 isolats comme suit:

- ***Ln. gelidum***: LnC10 isolées à partir du lait de chèvre.
- ***Ln. carnosum***: LnC16 et LnC41, isolées à partir du lait de chèvre.
- ***Ln. citreum***: LnC43, isolées à partir du lait de chèvre.
- ***Ln. fallax***: LnC12, LnC18 et LnC23, isolées à partir du lait de chèvre. LnF55, LnF63 et LnF64 isolées à partir du J'ben.
- ***Ln. mesenteroides subsp mesenteroides***: LnC1, LnC2, LnC13 et LnC15 isolées à partir du lait de chèvre, LnH82, LnH84, LnH85, LnH88, LnH90 isolées à partir du lait de chamelle et LnF65, LnF70, LnF71 isolées à partir du J'ben

- *Ln. mesenteroides subsp dextranicum*: LnC34 isolées à partir du lait de chèvre, LnH81, LnH83, LnH86, LnH92, LnH95 isolées à partir du lait de chamelle, LnF49, LnF69, isolées à partir du J'ben et V67 isolées à partir du lait de vache.
- *Ln. mesenteroides subsp cremoris*: LnC21 et LnC39, isolées à partir lait de chèvre, LnH87, LnH91, LnH93, LnH98 isolées à partir du lait de chamelle et LAB13 isolées à partir du J'ben.
- Ces résultats sont conformes à ceux de **Benmechernen et al., (2013)** qui ont isolé les *Leuconostoc* à partir du lait de chamelle, **Sonar et al., (2014)** ; **Zarour, (2018)** ; **Misra et al., (2019)** et **Benhouana et al., (2019)** qui ont isolé les souches *Leuconostoc* à partir de différents produits laitiers.

II. Etude du potentiel technologique des souches *Leuconostoc* isolées

II.1. Production de dextrane

Les EPS produits par BL possèdent de nombreuses propriétés technologiques (Agissant principalement comme épaississants, stabilisants et émulsifiants) qui ont conduit à l'utilisation de bactéries productrices pour améliorer les propriétés rhéologiques et organoleptiques des produits fermentés par la production de ces biopolymères (**Werning et al., 2012** ; **Pérez-Ramos et al., 2015**).

II.1.1. A partir des isolats

Les souches *Leuconostoc* isolées de différents produits laitiers ont été caractérisées pour leur capacité à produire des EPS dans des conditions de culture à forte concentration de saccharose (100g/l) sur milieu MSE. Parmi les 38 souches isolées, 8 isolats n'ont montré aucune production, mais 30 ont pu produire des colonies gluantes, larges et visqueuses caractérisant le dextrane. Cette activité a été mise en évidence par l'observation macroscopique de colonies collantes sur des plaques d'agar **la figure 21**.

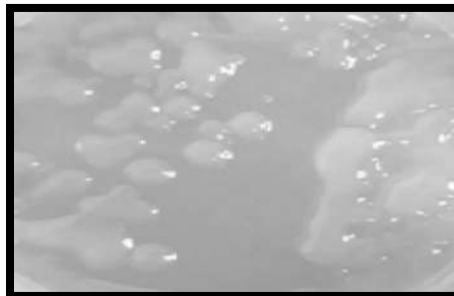


Figure 21: Morphologie des colonies productrices de dextrane par les souches de *Leuconostoc* sp. sur milieu MSE

La quantification de l'EPS par dosage des sucres totaux, à l'aide de la courbe d'étalonnage du glucose, a révélé des niveaux de production variant entre $0,63 \pm 0,19$ g/l et $2,41 \pm 0,17$ g/l des souches LnF70 et LnC1, respectivement. (Figure 22).

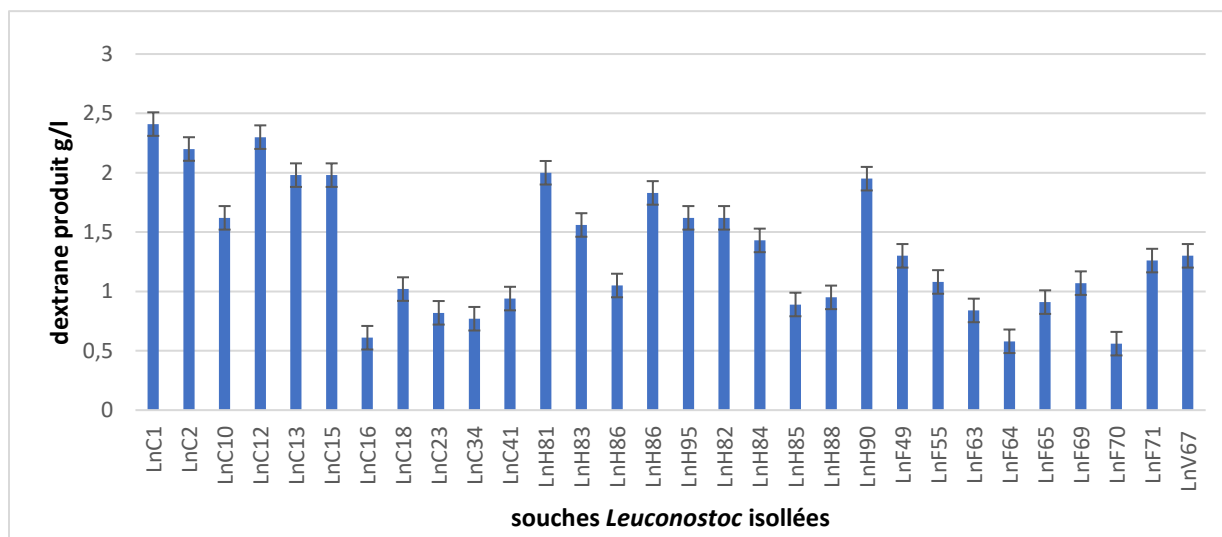


Figure 22 : Production d'EPS par des souches *Leuconostoc* sur milieu MRSs

Les résultats obtenus ont permis de classer les souches en trois groupes, selon la quantité d'EPS produits, en présence de 2% de saccharose :

(i) Espèces fortement productrices pour celles présentant des niveaux de production entre 2 et 2.5 g/l : LnC1, LnC2 et LnC12

(ii) Espèces moyennement productrices pour celles présentant des niveaux de production entre 1 et 2 g/l : LnC10, LnC13, LnC15, LnH81, LnH83, LnH86, LnH92, LnH95, LnH82, LnH84, LnH90, LnF49, LnF55, LnF69, Ln71 et LnV67.

(iii) Espèces faiblement productrices pour celles présentant des niveaux de production inférieurs à 1 g/l : LnC16, LnC18, LnC34, LnC41, LnH85, LnH88, LnF63, LnF64, LnF65 et LnF70.

Ces résultats concordent avec ceux de **Notararigo et al. (2013)** qui ont étudié les EPS produits par différentes souches de bactéries lactiques (*Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* et *Lactococcus*), et **Nacher-Vazquez et al. (2015)** qui ont étudié l'activité antivirale du dextrane produit par *Leuconostoc mesenteroides* RTF10 et *Lactobacillus sakei* MN1 et qui ont trouvé que le niveau élevé de production de dextrane est 2 g/l.

Il convient de noter que bien que les niveaux de production des EPS dépendent du type de polymère, de la production bactérienne et des conditions de culture ; en général les valeurs très élevées sont caractéristiques des α -glucanes. En effet, la production d'autres homopolysaccharides (HoPS) comme β -glucanes et hétéropolysaccharides) HePS est beaucoup plus faible, dans la gamme de 100-200 mg/l et 20-500 mg/l respectivement (**Ruas-Madiedo, 2009 ; Werning et al., 2012 ; Notararigo et al., 2013**).

II.1.2. Optimisation de la production de dextrane

Pour mieux étudier l'influence des conditions nutritionnelles sur la production de dextrane par les souches *Leuconostoc* isolées, nous avons réalisé un ensemencement sur milieu MSE des souches, en changeant la concentration de glucose et de l'extrait de levure. Les résultats sont représentés dans le **tableau 7 et la figure 23**.

Tableau 7: Production d'EPS par des souches de *Leuconostoc* isolées sur milieu MSE selon les concentrations de glucose et d'extrait de levure.

Souches	Milieu MSE	Glucose		Extrait de levure	
		1 g/l	3 g/l	1 g/l	3 g/l
LnC1	++	-	-	+	+++
LnC2	++	-	+	+	+++
LnC10	++	-	-	+	+++
LnC12	++	-	+	++	+++
LnC13	++	+	+	+++	++
LnC15	+	-	-	+	-
LnC16	+	-	-	+	+++
LnC18	+	-	-	+	+++
LnC21	-	-	-	-	-
LnC23	+	-	-	+++	++
LnC34	+	-	-	++	++
LnC39	-	-	-	-	-
LnC41	++	+	+	+	+++
LnC43	-	-	-	-	-
LnF49	+	-	-	+	+++
LnF55	+	+	+	+	++
LnF63	+	-	-	+	++
LnF64	+	-	-	++	+++
LnF65	+	-	+	-	+++
LnF69	+	-	-	+	+++
LnF70	+	+	+	+	+
LnF71	+	+	+	++	+
LnV67	+	-	-	+++	++
LAB13	-	-	-	-	-

(-) pas de production, (+) faible production, (++) production moyenne, (+++) forte production.

Le tableau 7 indique que la plupart des isolats ont produit du dextrane avec une concentration de 3g/l d'extrait de levure sur milieu MSE. Cette production est supérieure à celle en présence de 1g/l d'extrait de levure, 1g/l et 3g/l de glucose chez la plupart des isolats.

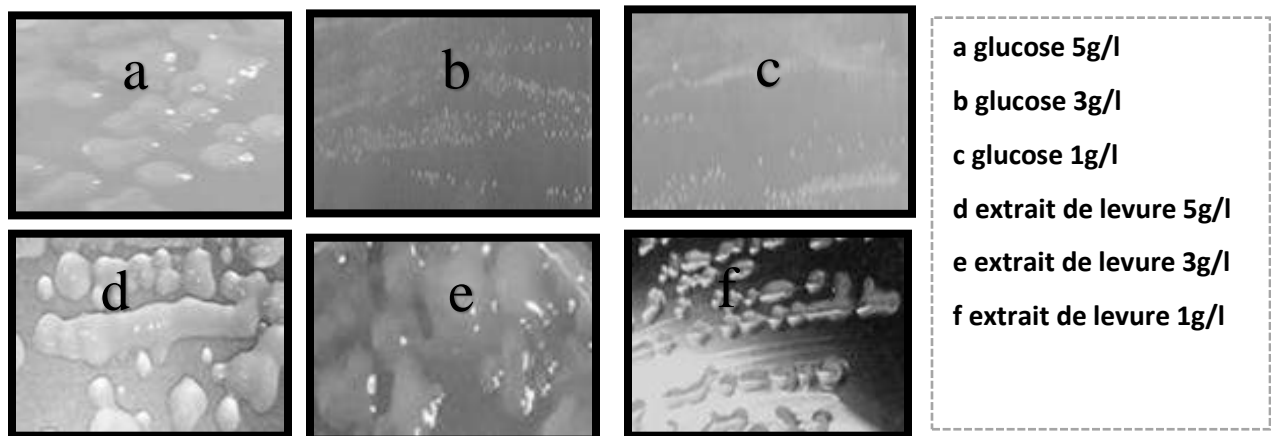


Figure 23 : Production de dextrane par la souche LnC2 à différentes concentrations de glucose et d'extrait de levure sur milieu MSE

Nous constatons à partir des résultats des niveaux de production variables, avec des formes différentes (**figure 23**) :

Les souches fortement productrices montrant des colonies grandes, gélatineuses d'aspect liquide.

Les souches à production moyenne, forment des colonies gluantes d'aspect rigide, fortement liées à l'agar.

Les souches à basse production constituent de petites colonies de 2 mm environ de diamètre, bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose. Ce niveau de production est observé chez 07 souches dans tous les milieux.

Les souches non productrices (LnC21, LnC39 et LnC43) possèdent des petites colonies blanches et lenticulaires, ou absence de croissance.

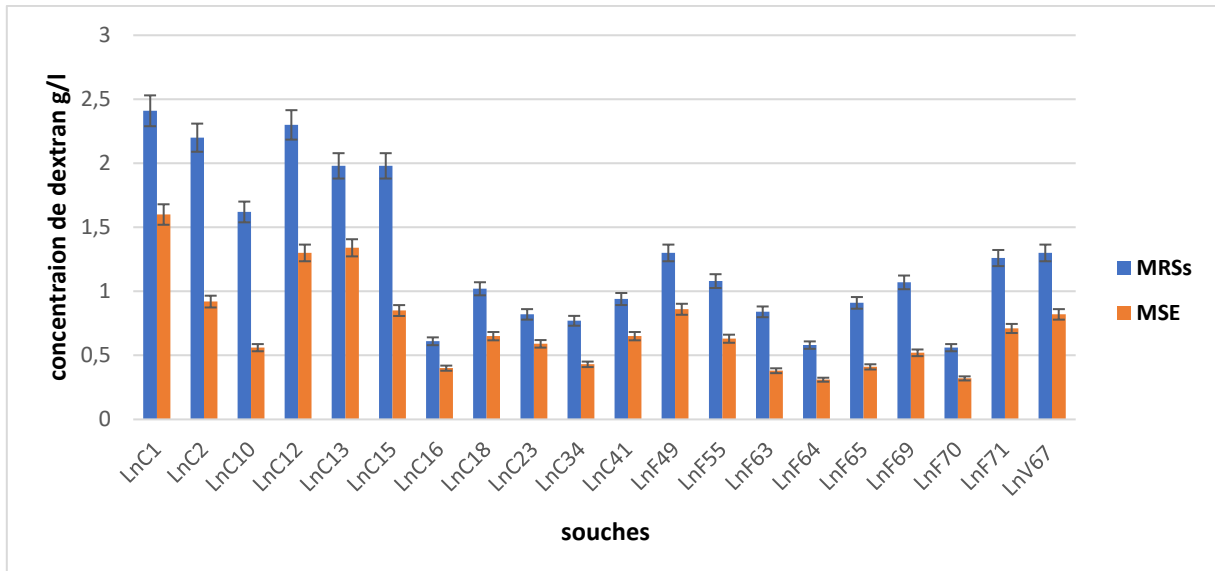


Figure 24 : Concentration de dextrane produite par les isolats selon le milieu (MRS et MSE)

Pour toutes les souches, la production de dextrane sur milieu MRSs est meilleure que sur milieu MSE, avec un maximum de 1,6 g/l pour la souche LnC1.

A partir de ces résultats, quatre souches ont été choisies pour compléter l'étude d'optimisation, à savoir deux souches ayant montré une bonne production *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et *Ln. fallax* (LnC1 et LnC12 respectivement) et deux à faible production *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et *Ln. fallax* (LnF65 et LnF70 respectivement).

Les résultats de l'optimisation de la production de dextrane à partir des quatre souches choisies sur milieu MRS avec différentes concentrations de glucose, extrait de levure et saccharose sont présentés dans les **figures 25, 26, 27 et 28**.

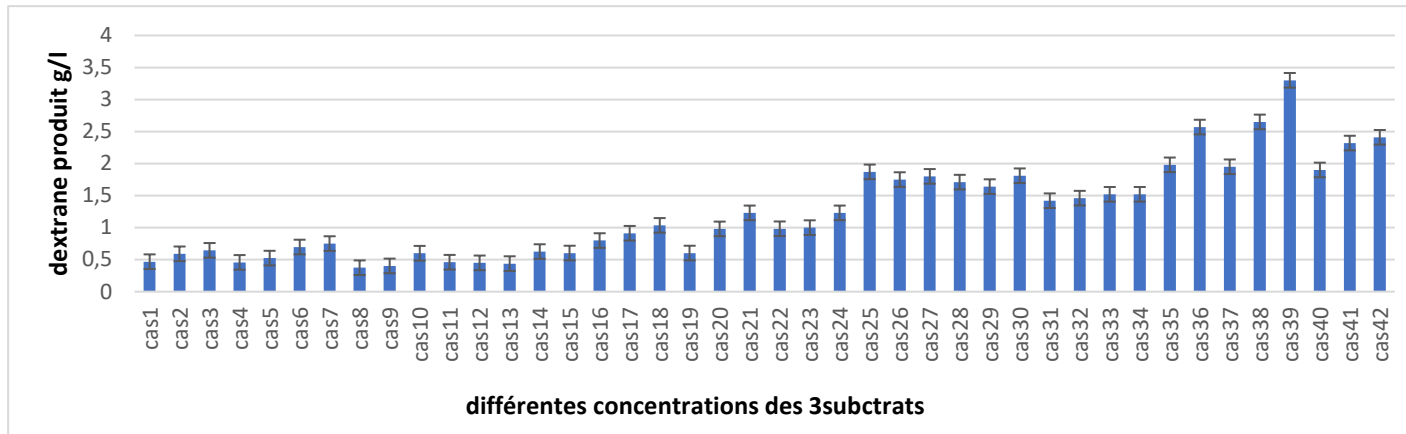


Figure 25 : Effet des différentes concentrations des substrats sur la quantité de dextrose produit par la souche LnC1

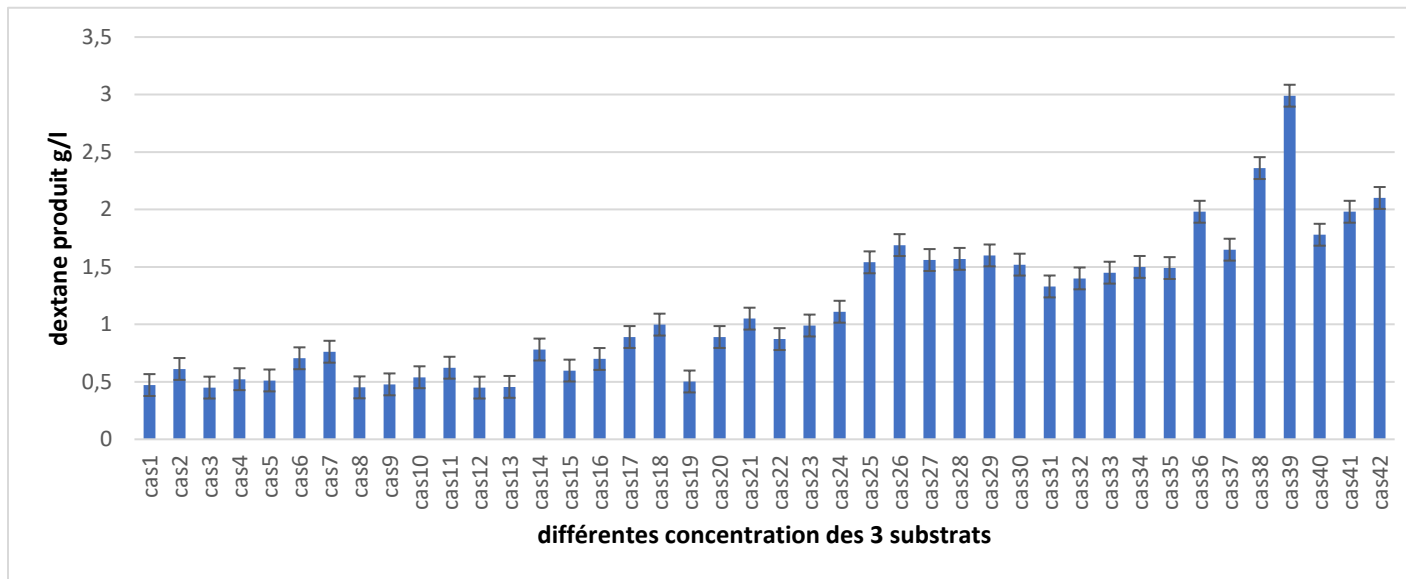


Figure 26 : Effet des différentes concentrations des substrats sur la quantité de dextrose produit par la souche LnC12

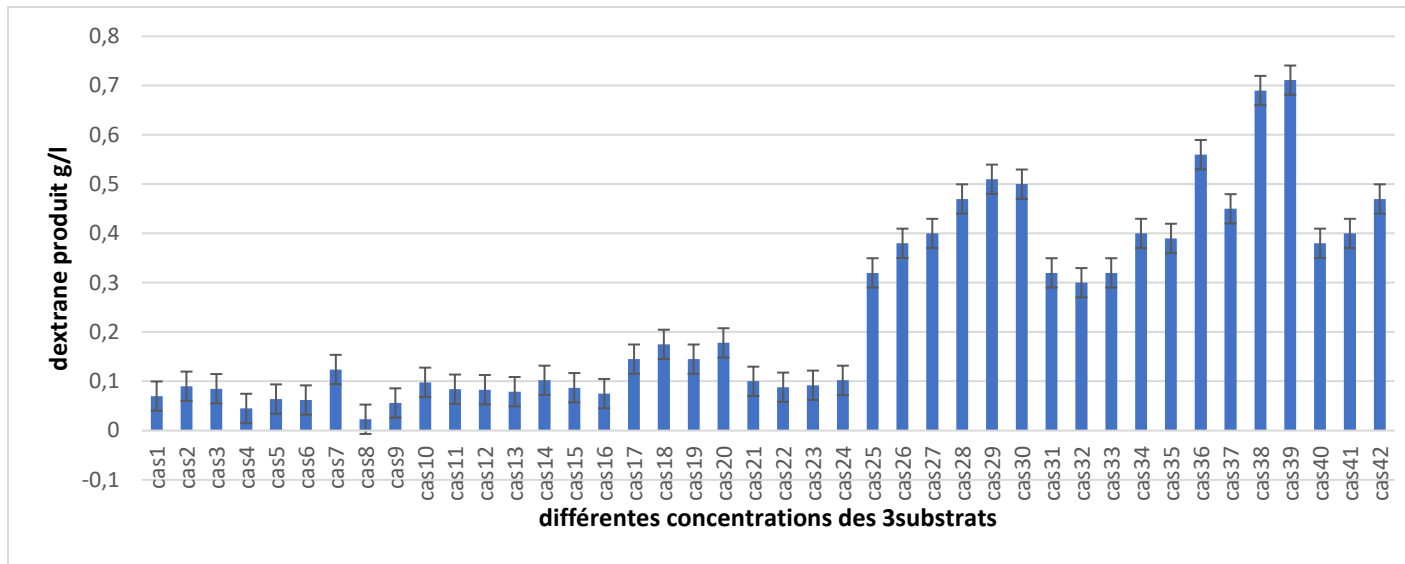


Figure 27 : Effet des différentes concentrations des substrats sur la quantité de dextrane produit par la souche LnF64

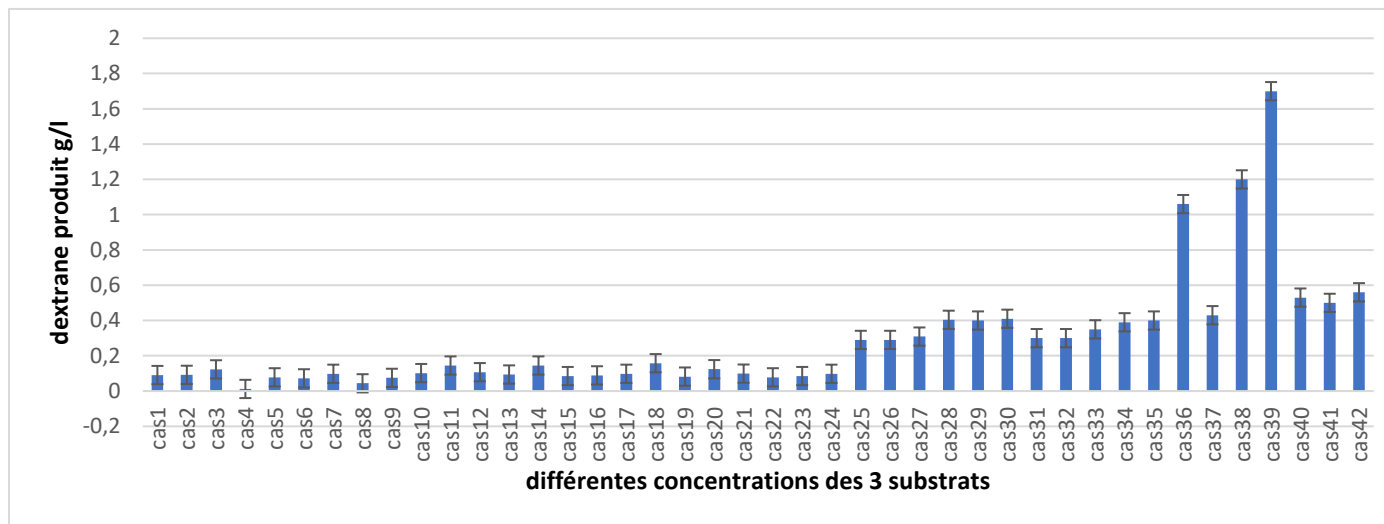


Figure 28 : Effet des différentes concentrations des substrats sur la quantité de dextrane produit par la souche LnF70

En utilisant diverses concentrations de saccharose, une production maximale a été observée à 10% pour toutes les souches, ainsi qu'à une concentration de 2% de glucose et 0,3% d'extrait de levure. Par contre, une faible production d'EPS a été obtenue en minimisant la concentration de glucose et de saccharose.

Les EPS produits par les micro-organismes, tels que les bactéries lactiques, ont un potentiel en tant qu'ingrédients alimentaires ou en tant que molécule produite in situ, avec des fonctionnalités pour la santé et des avantages économiques. La production d'EPS par les souches est très variable et dépend de la phase de croissance, des conditions de culture des bactéries, de la composition du milieu (source de carbone et d'azote), du pH et de la température (**Florez Guzman et al., 2018 ; Díaz-Montes, 2021**).

II.1.2.1. Effet du glucose

L'effet de la concentration en glucides a été vérifié en utilisant différentes concentrations de glucose dans le milieu MRS, à savoir 1g, 3g, 5g, 10g, 15g et 20g/l. la production d'EPS a été obtenue à 5g/l de glucose avec un niveau de production moyen conduisant à des colonies collantes de taille moyenne. La production de dextrane dans le milieu contenant 20 g de glucose a été maximale par rapport aux autres concentrations. Ainsi, la concentration optimale de glucose dans le milieu MRSs pour une production maximale de dextrane est de l'ordre de 20g, à une température de 30°C, durant 48 heures et un pH initial de 6,5.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Hennane et Kari (2013)** qui ont montré que la plus grande quantité d'EPS synthétisée était de l'ordre de 959 mg/l, obtenue à la plus forte concentration de glucose (20g/l), tandis que **Benasla (2012)** a trouvé une production maximale d'EPS (157,5 mg/l) sous concentration croissante de glucose (40 g/l) qui stimule la production d'EPS.

Nous avons identifié des souches productrices d'EPS (voire très fortement) et des souches non productrices sans que ce caractère entraîne des disparités de croissance.

Parmi plusieurs travaux établis, **Nácher-Vázquez et al. (2017)** et **Benhoua, (2019)** ont montré que les souches de *L. mesenteroides* n'ont pu produire des EPS en présence de glucose, comme seule source de carbone. Et ce qui explique le faible rendement des isolats en dextrane sur milieu MSE liquide (5g/l de glucose).

II.1.2.2. Effet de l'extrait de levure

Les composants de milieux complexes, tels que la peptone ou l'extrait de bœuf ou de levure, permettent une bonne croissance des BL et souvent même une bonne production d'EPS.

L'effet de la source d'azote et de vitamines a été étudié en utilisant différentes concentrations d'extrait de levure dans le milieu MSE, à savoir 1g, 3g et 5g/l. Les résultats obtenus indiquent que 3g/l d'extrait de levure sont adéquats pour la production d'EPS chez la plupart des souches avec des niveaux variables. En effet, différentes formes ont été détectées, à l'exception de la souche LnF65 qui ne produit qu'à une concentration de 5g/l avec un faible niveau de production.

Les travaux de **Welman et Maddox (2003)** ont également montré que la plupart des espèces de *Leuconostoc* sont auxotrophes, car incapables de produire des acides aminés et des vitamines. C'est pourquoi les différents milieux de culture ont été utilisés pour étudier la production qualitative et quantitative de dextrane et pour déterminer l'influence des substrats nutritionnels sur la croissance des souches productrices et sur la biosynthèse des dextrans.

Zarour et al., (2013) ont conclu que la croissance de *Leuconostoc* est influencée par la concentration d'extrait de levure ajoutée dont le développement est stimulé par l'ajout de ce facteur de croissance. A ce titre la propriété principale recherchée chez les bactéries lactiques, utilisées comme levains dans l'alimentation industrielle, est leur capacité à acidifier le lait et à se développer de manière régulière. Dans le lait, ils doivent trouver un certain nombre de nutriments nécessaires à leur croissance et notamment des acides aminés et des vitamines qui peuvent être apportés par l'extrait de levure. Ces résultats sont cohérents avec les travaux rapportés par **Kihal et al., (2006)**.

II.1.2.3. Effet du saccharose

Le dextran est un glucane bien connu produit par les souches *Leuconostoc*. Il n'est produit que lorsqu'il est cultivé dans un milieu contenant du saccharose, puisque le saccharose est le seul précurseur de l'enzyme.

La bonne production de dextrane a été obtenue à 10% de saccharose ensemencé (**figures 25, 26, 27 et 28**)

Selon **De Belder (1990)**, la concentration initiale en saccharose est l'un des principaux facteurs influençant la sécrétion de dextrane-saccharase et la biosynthèse de dextrane.

Thiyagarajan et al., (2017) constatent que l'activité enzymatique maximale a été observée à une concentration de saccharose de 20%, et le milieu est apparu très visqueux, montrant la

production maximale de dextrane. Et **Farwa et al., (2008)**, qui ont montré que *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 a produit le maximum de dextrane après 20 heures d'incubation à 30°C à une concentration de 15% de saccharose. **Farinazzo et al., (2021)**, ont trouvé une meilleure production de dextrane par *Ln pseudomesenteroides* est en présence de 180g/l de saccharose et pH 7,3 à une température de 20°C.

Farwa et al., (2008) dans leurs travaux ont observé qu'à une concentration de saccharose supérieure à 20% (25%), il y avait une diminution de conversion du saccharose en dextrane, ce qui a affecté le rendement.

II.2. Etude des substances antimicrobiennes produites par les isolats

II.2.1. Effet antibactérien des souches *Leuconostoc* isolées

L'activité antibactérienne des souches *Leuconostoc* isolées a été testée vis à vis de *Staphylococcus aureus* ATCC43300 (St1), *Esherichia coli* ATCC25992 (*E.coli*), *Bacillus subtilis* ATCC6633 (Bs), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 (Pa), *Salmonella typhi* ATCC14028 (Sa), *Enterococcus faecalis* WDCH0009 (Ef), *Listeria monocytogenes* ATCC 14028 (Lm) et *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (St2), en utilisant la méthode directe d'antagonisme sur gélose.

Les résultats obtenus ont montré que 24 souches possèdent une activité antibactérienne avec une zone d'inhibition différente (**figure 29**). Les zones d'inhibitions formées autour des colonies, apparaissent claires avec des diamètres de zones d'inhibitions variables de 06 à 27 mm.

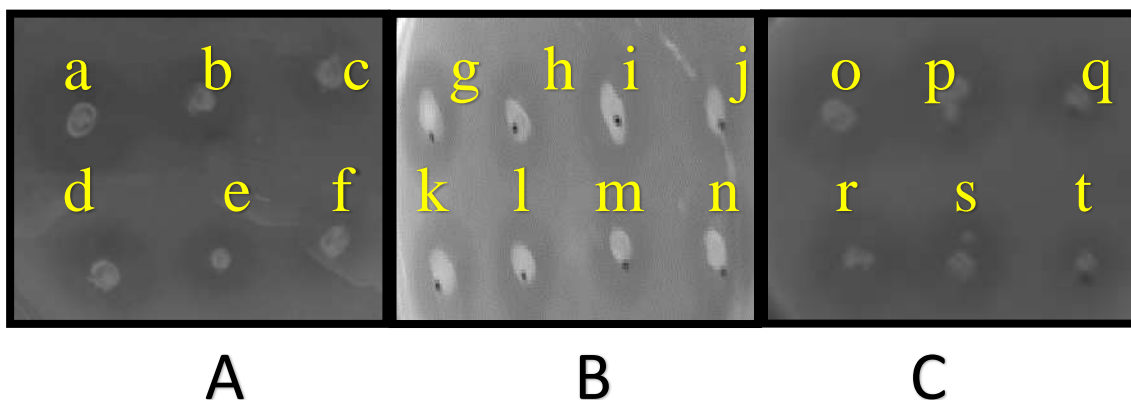


Figure 29 : Activité antibactérienne des souches *Leuconostoc* vis-à-vis : *Staphylococcus aureus*(A), *Esherichia coli* et (B) *Listeria monocytogenes* (C)

(a, o) LnC1 ; (b, p) LnC12 ; (c) LnC13 ; (d, K) LnC16 ; (e) LnC10 ; (f, r) LnC15 ; (g) LC21 ; (h) LnC39 ; (i) LnF49 ; (j) LnF69 ; (l) LnC34 ; (m) LnC43 ; (n) LnV67 ; (q) LnC18 ; (s) LnC23 ; (t) LnF70.

Les diamètres des zones d'inhibitions des isolats vis-à-vis des bactéries pathogènes sont représentés dans le **tableau 8**.

Tableau 8 : Diamètres d'inhibition (en mm) des souches pathogènes par les souches de *Leuconostoc* obtenus par la méthode directe et indirecte.

	Méthode directe								Méthode indirecte							
	St1	<i>E. coli</i>	Bs	Pa	Sa	Ef	Lm	St2	St1	<i>E. coli</i>	Bs	Pa	Sa	Ef	Lm	St2
LnC1	23	25	22	24	27	20	20	27	17	16	14	15	12	15	17	14
LnC2	21	24	22	26	24	25	23	21	09	13	12	13	14	12	12	15
LnC10	21	25	24	23	22	24	21	20	12	13	14	13	11	10	11	11
LnC12	24	22	24	23	21	20	25	21	08	09	08	10	09	09	08	09
LnC13	10	09	08	09	07	07	09	08	0	0	0	0	0	0	0	0
LnC15	24	26	24	25	23	20	21	23	15	14	12	14	13	12	11	12
LnC16	22	21	20	23	24	27	23	24	10	11	10	13	08	13	12	10
LnC18	06	09	11	08	09	10	07	06	04	02	05	05	04	03	02	03
LC21	17	15	20	22	18	19	13	14	07	06	08	08	07	07	06	07
LnC23	12	17	14	15	13	13	11	09	07	04	04	05	04	03	05	06
LnC34	15	16	20	13	15	18	14	13	11	10	11	09	10	11	06	05
LnC39	10	09	09	14	13	12	10	12	0	0	0	0	0	0	0	0
LnC41	08	06	10	09	10	11	10	09	0	0	0	0	0	0	0	0
LnC43	10	12	08	10	09	11	10	08	04	03	05	07	06	06	03	08
LnV67	10	10	13	10	12	13	12	12	07	05	06	02	05	07	07	08
LnF49	18	12	14	22	18	19	21	17	12	13	10	12	12	11	12	12
LnF55	08	09	06	10	08	07	09	09	0	0	0	0	0	0	0	0
LnF63	13	17	14	15	13	13	11	09	10	10	12	09	08	07	07	08
LnF64	08	09	10	13	12	11	10	09	04	07	08	08	07	06	08	04
LnF65	21	25	24	23	22	24	21	20	14	15	15	16	12	13	14	12
LnF69	08	06	10	09	10	11	10	09	0	0	0	0	0	0	0	0
LnF70	20	21	20	17	21	18	23	24	12	14	13	14	15	13	14	13
LnF71	12	13	11	08	09	10	07	10	0	0	0	0	0	0	0	0
LAB13	15	14	15	18	20	18	15	17	12	11	13	14	12	10	12	13

Ce tableau indique que les souches LnC1, LnC2, LnC10 et LnC12 ont montré une activité antibactérienne importante avec des diamètres élevés tandis que les souches LnC39, LnC41, LnF55, LnF69, LnF71 ont montré une faible inhibition vis-à-vis les souches pathogènes utilisées comme souches indicatrices.

II.2. 2. Caractérisation de l'agent antagoniste

L'effet antibactérien peut être attribué à n'importe quel facteur inhibiteur, produit par les souches *Leuconostoc* isolées. Nous citerons principalement l'acide lactique et/ou une substance protéique comme les bactériocines ou bien la présence du H₂O₂ qui est un produit intermédiaire des BL en présence d'O₂. Pour cela, nous avons opté pour la méthode indirecte afin de sélectionner (plus au moins) la nature de l'agent antimicrobien. Cette méthode permet de détecter l'activité antagoniste dans les surnageants de culture des souches inhibitrices. C'est-à-dire de détecter seulement les inhibitions dues à la production d'agents antibactériens sécrétés et d'éliminer celles dues au contact cellulaire. Il est souvent admis que le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques est très lié à leur pouvoir acidifiant.

Dans le but d'éliminer la possibilité d'antagonisme par les acides organiques et H₂O₂, nous avons utilisé un surnageant neutralisé par NaOH d'une préculture en anaérobiose, en utilisant la méthode directe et la méthode de diffusion en puits. 17 souches ont montré une activité antibactérienne avec un diamètre plus réduit (**tableau 8, figure 30**)

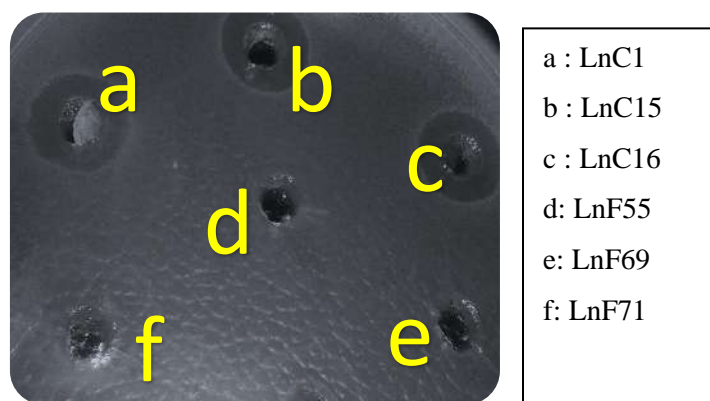


Figure 30 : Inhibition bactérienne par les souches *Leuconostoc* vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* selon la méthode indirecte.

Ces résultats montrent que les souches LnC1, LnC2, LnC10, LnC12, LnC15, LnC16, LnC18, LC21, LnC23, LnC34, LnC43, LnV67, LnF49, LnF63, LnF64, LnF69, LnF70 et LAB13

possèdent la capacité de produire d'autres substances inhibitrices, principalement protéiques, en plus de la production des acides organiques (**figure 31**).

La mise en évidence de la nature protéique de l'agent inhibiteur a été effectuée à l'aide d'un surnageant neutralisé, en présence d'enzymes protéolytiques de type pepsine. Les agents inhibiteurs produits par les souches sélectionnées, engendrent des halos d'inhibition dans les puits témoins non neutralisés et neutralisés, respectivement. Cette activité a disparu après traitement par la pepsine (**figure 31**). Ces résultats permettent de conclure que les substances antibactériennes produites par nos souches sont de nature protéique et sont donc selon toute vraisemblance des bactériocines.

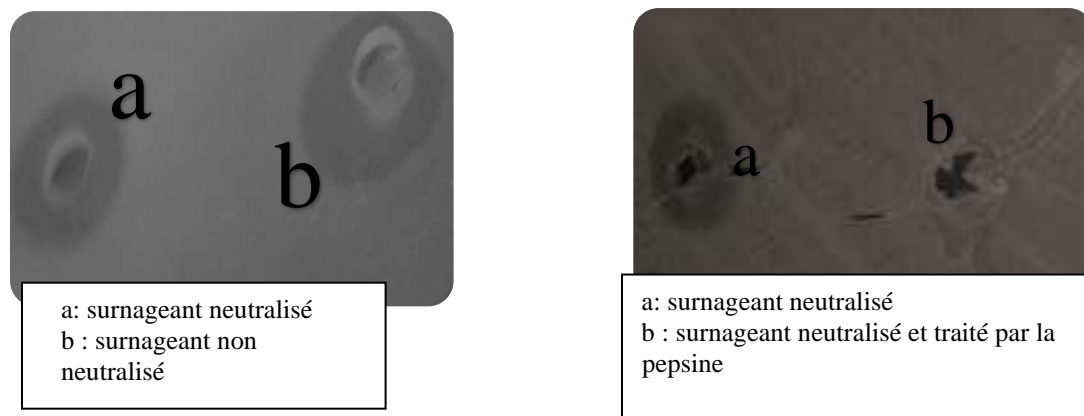


Figure 31: Inhibition bactérienne par la souche LnC1 vis-à-vis *Listeria monocytogenes* en utilisant la méthode indirecte.

Pour étudier la stabilité de la substance à la température, les surnageants neutralisés sont traités par différentes température (70°C, 90°C et 120°C) et les résultats permettront de sélectionner les souches productrices de bactériocines.

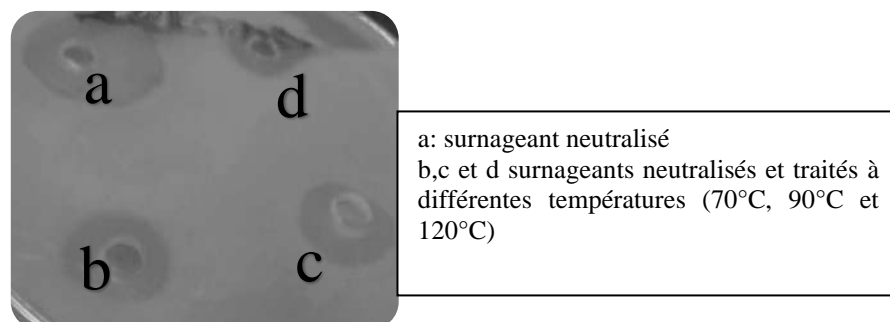


Figure 32 : Effet antibactérien du surnageant de la souche LnC1 traité par la température vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

La résistance des souches au traitement thermique est un caractère intéressant lors des procédés de pasteurisation ou de stérilisation utilisés dans les industries alimentaire et pharmaceutique.

Les BL ont la capacité de produire une gamme de substances antimicrobiennes tels que les acides organiques, le diacétyl, le peroxyde d'hydrogène et d'autres substances de nature protéique, toutes ayant des propriétés antibactériennes ou bactériostatiques. Ces métabolites jouent, non seulement le rôle d'une barrière naturelle contre les agents pathogènes et la détérioration des aliments en augmentant leur durée de conservation, mais aussi possèdent un effet positif sur le goût, l'odeur, la couleur et la texture des aliments (**García et al., 2010 ; Zacharof et Lovitt, 2012**).

Plusieurs recherches ont été réalisées dans cet axe. Les souches de *Ln* mises en test dans cette partie d'étude, ont été détectées comme étant des bactéries productrices de substances antimicrobiennes. Les souches testées ont montré une activité inhibitrice contre les souches indicatrices pathogènes. Cette activité peut être due, généralement, à un certain nombre de facteurs : (1) les acides lactiques et/ou l'acide acétique qui diminuent le pH en créant un environnement acide, ce qui élimine la présence des bactéries non tolérantes, (2) la compétition pour les substrats et (3) la production de substances à action bactéricide ou bactériostatique, y compris les bactériocines (**Parente et Ricciardi, 1999 ; Silva et al., 2018**).

L'étude des bactériocines produites par les isolats doit prendre en compte la grande quantité d'acides organiques produite au cours du métabolisme bactérien et devrait écarter l'inhibition due à ces acides organiques (**Sorrells et Speck, 1970**). C'est la raison pour laquelle le surnageant est neutralisé par le NaOH (**Labioui et al., 2005**).

Afin de s'assurer de la nature protéique de la substance produite par les souches isolées, nous avons traité le surnageant des cultures de *Ln* par une enzyme protéolytique, la pepsine. Nous avons constaté l'absence totale de zones d'inhibitions. Ces composés pourraient être des bactériocines. Selon **Daba et al., (1993)** ces substances antimicrobiennes ne sont pas forcément des bactériocines, des expériences sont indispensables pour connaître la nature exacte de ces composants.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Ghita et al. (2015)** qui ont également signalé que les souches de *Ln. mesenteroides* ont eu des activités antibactériennes élevées contre *Bacillus cereus* ATCC 33018 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 par rapport aux autres souches de *Bifido bacterium*. Cependant, **Shehata et al. (2016)** ont montré que plusieurs BL isolées de Zabady

et des échantillons de fromage ont montré une activité inhibitrice contre plusieurs agents pathogènes, y compris *S. aureus* et *E. coli*.

Plusieurs travaux employant les souches de *Ln. mesenteroides*, isolées de différents écosystèmes, ont montré leurs caractéristiques probiotiques souhaitables qui leur qualifie d'être utilisé en industrie agroalimentaire (Zhang *et al.*, 2013; Diana *et al.*, 2015 ; Giles-Gómez *et al.*, 2016 ; Yadav *et al.*, 2016 ; Emmanuel *et al.*, 2017).

Aussi les travaux de Lahiri *et al.*, (2020) qui ont étudié la production de bactériocines à partir une souche de *ln. Lactis* vis-à-vis, *Bacillus subtilis* (ATCC 23857), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas putida* (ATCC 47054), *Klebsiella* (ATCC 700721) et *Serratia sp.*(ATCC 27137).

II.2.3. Purification partielle de la bactériocine

Plusieurs méthodes de purification des bactériocines existent telles que l'ultrafiltration par des filtres Millipore et précipitation avec le sulfate d'ammonium (Piva et Headon, 1994 ; Gao *et al.*, 2010). La précipitation des protéines au sulfate d'ammonium est un procédé de séparation basé essentiellement sur le degré de solubilité de la protéine (Osterlund et Janson, 1997).

Les résultats obtenus ont montré que la purification des bactériocines par le fractionnement partiel du surnageant avec le sulfate d'ammonium, des souches isolées vis-à-vis des bactéries pathogènes sont indiqués dans la figure 33.

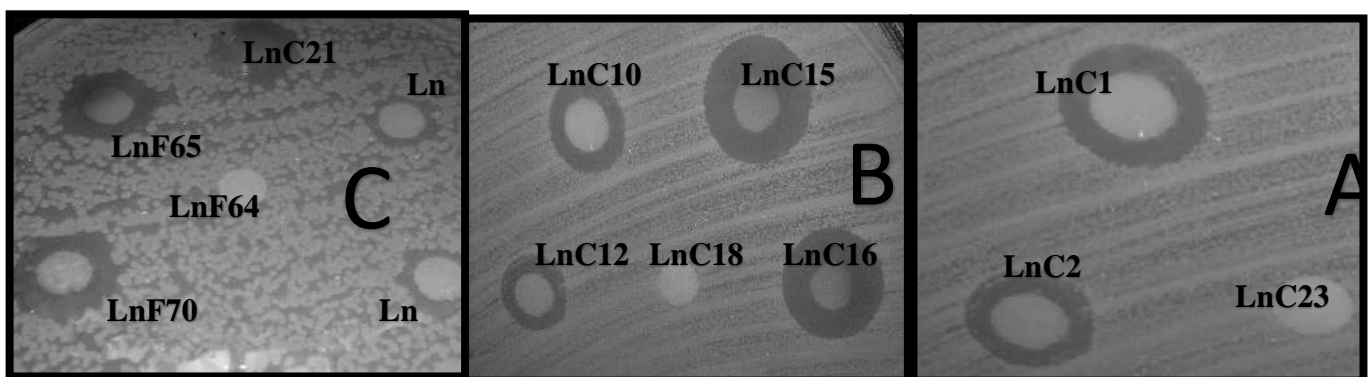


Figure 33 : Activité antibactérienne des souches isolées vis-à-vis de germes pathogènes (A) *E.coli* ; (B) *S. typhi*; (C) *St. aureus* par précipitation avec le sulfate d'ammonium et dialyse du surnageant.

La purification partielle des protéines actives produites par les souches testées concernant leur pouvoir de produire les bactériocines, a permis de sélectionner 12 souches : LnC1, LnC2, LnC15, LnC10, LnC12, LnC16, LnC21, LnC34, LnF49, LnF65, LnF70 et LnF63. Tandis que les souches LnC18, LnC23, LnC43, LnV67 et LnF64 n'ont montré aucune zone d'inhibition après la précipitation et la purification.

Maurya (2012) a purifié une bactériocine produite par *Leuconostoc mesenteroides* CHBY46, isolée à partir du Lait de dromadaire algérien.

Par ailleurs, **Novotny et al., (1992)** ; **Ohmomo et al., (2000)** ; **Deraz et al., (2005)** et **Bellil et al., (2018)** ont réalisé la précipitation des bactériocines avec une saturation de 60-65% de sulfate d'ammonium, extraite du filtrat de culture de *Bacillus thermoleovorans*, de l'entéroïne ON-157 produite par *Enterococcus faecium* NIAI 157, l'acidocine D20079 produite chez *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 et produite chez *Lactococcus lactis subsp. lactis* LL171 respectivement.

Lahiri et al., (2020) qui ont étudié l'optimisation de production de bactériocine par *Leuconostoc lactis* SM2 isolée à partir du lait de vache, ont utilisé différentes concentrations de sulfate d'ammonium et ils ont trouvé une meilleure production à une concentration de 60%.

III.4. Mode d'action des bactériocines

Les souches sélectionnées pour cette étude sont LnC1 *Ln. mesenteroides* subsp *mesenteroides*, LnC10 *Ln. geldium*, et LnC34 *Ln. mesenteroides* subsp *dextranicum*, vis-à-vis des souches pathogènes : *Staphylococcus aureus* ATCC43300, *Escherichia coli* ATCC25992, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Listeria monocytogenes* ATCC 14028 et *Salmonella typhi* ATCC14028. Les résultats sont montrés dans les figures suivantes.

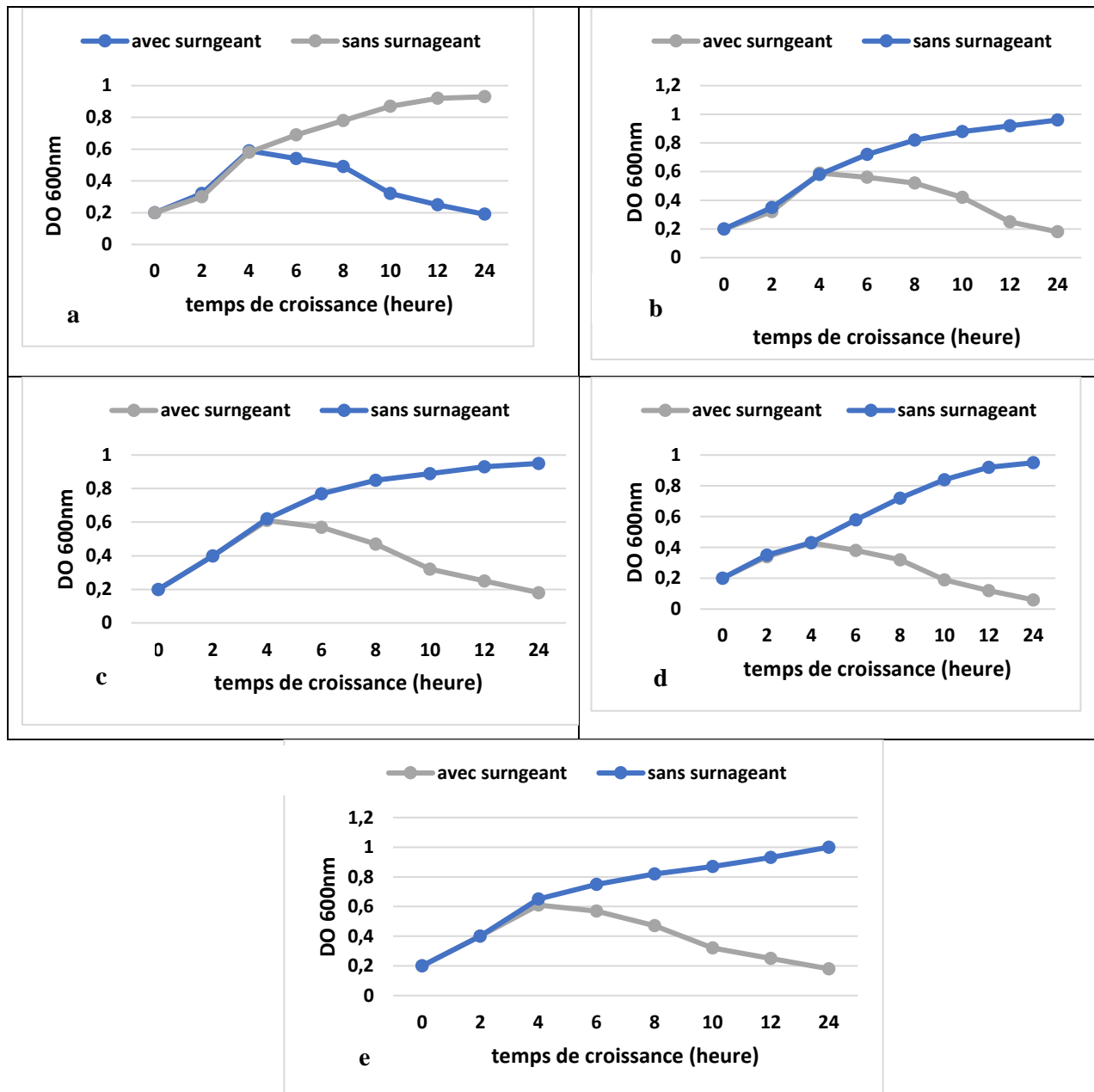


Figure34 : Suivre de croissance de *Listeria monocytogenes* (a) *Staphylococcus aureus* (b) *Escherichia coli* (c) *Pseudomonas aeruginosa* (d) et *Salmonella typhi* (e) en présence et en absence de surnageant de la souche LnC1

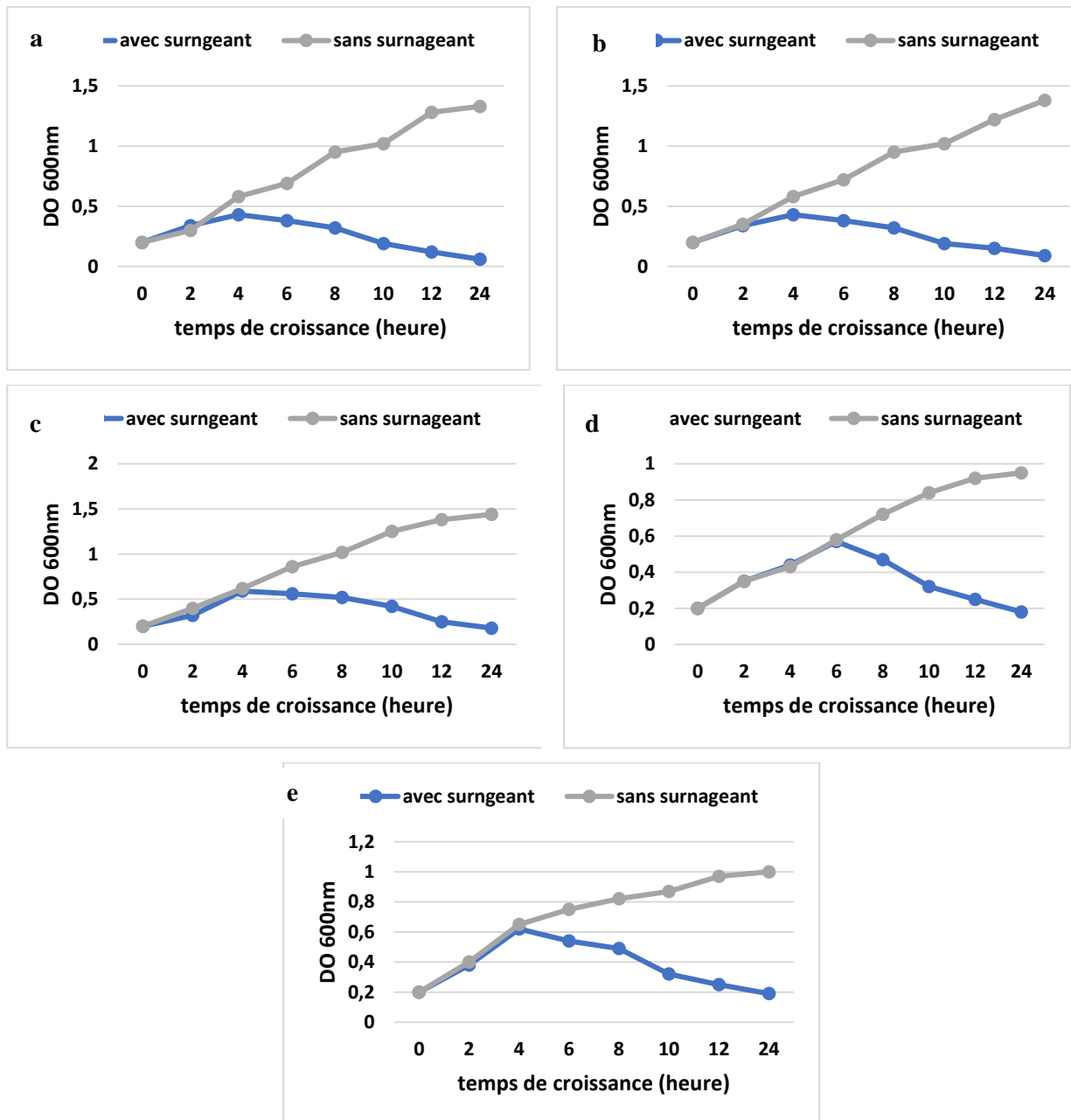


Figure 35 : Suivi de croissance de *Listeria monocytogenes* (a), *Staphylococcus aureus* (b), *Esherichia coli* (c), *Pseudomonas aeruginosa* (d) et *Salmonella typhi* (e) en présence et en absence de surnageant de la souche LnC34

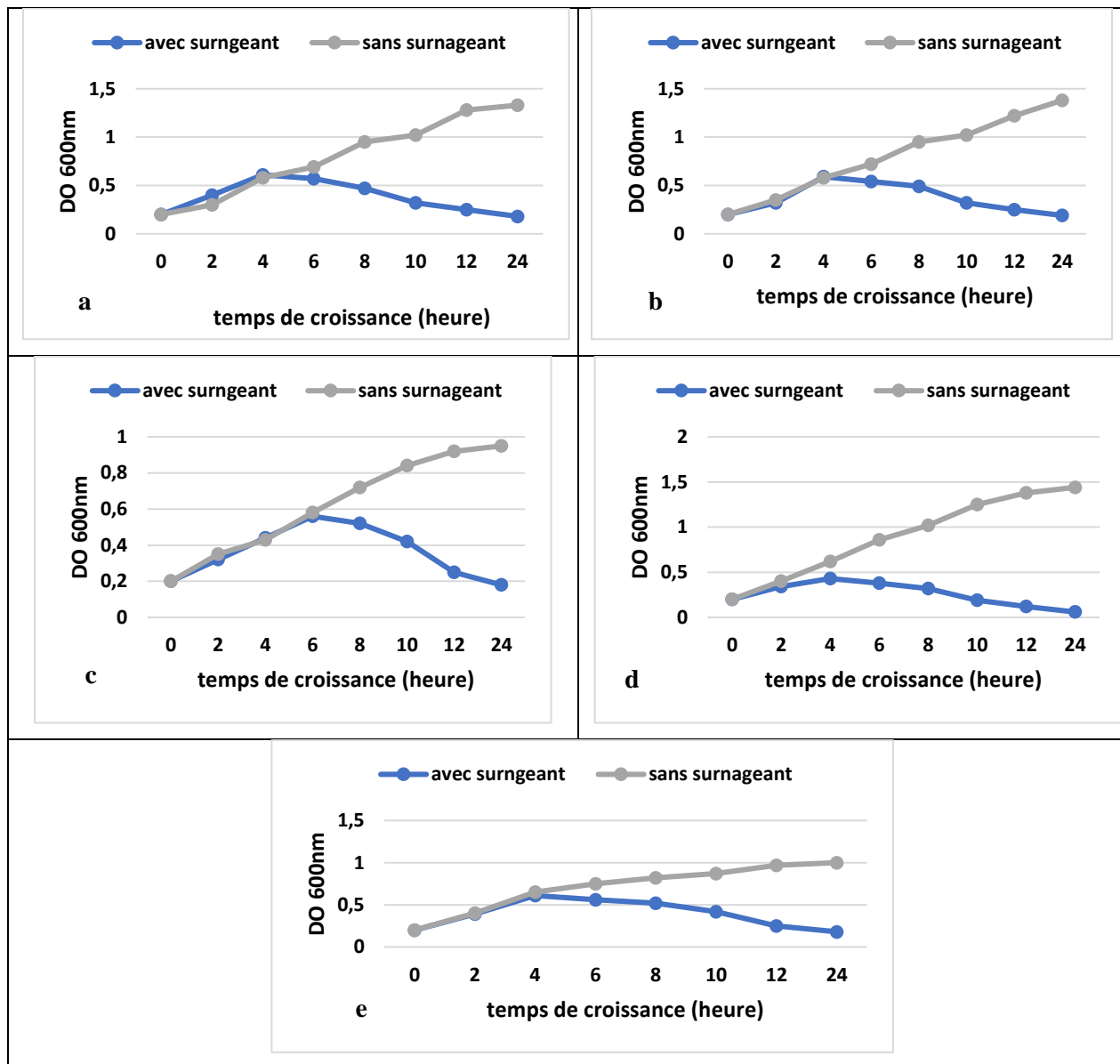


Figure 36 : Suivi de croissance de *Listeria monocytogenes* (a), *Staphylococcus aureus* (b), *Esherichia coli* (c), *Pseudomonas aeruginosa* (d) et *Salmonella typhi* (e) en présence et en absence de surnageant de la souche LnC10

Les résultats obtenus (**figures 34, 35 et 36**) ont montré une inhibition considérable de la croissance des souches indicatrices, après l'ajout d'un volume de 1 ml des surnageants des souches Ln sélectionnées. Cette inhibition est expliquée par l'arrêt de la division cellulaire des bactéries pathogènes (une croissance déséquilibrée), en comparaison avec la biomasse non traitée (croissance équilibrée). Pendant les premières 4h on remarque une croissance stable des souches indicatrices dans le milieu de culture utilisé, et une augmentation considérable de la biomasse ($DO > 0.8$) la culture non traitée (contrôle). Ensuite, la biomasse des bactéries indicatrices a diminué dans la culture traitée avec le surnageant des souches Ln.

Piard et Desmazeaud (1992) et Casla et al., (1996), ont rapporté que les bactéries ayant des pouvoirs antibactériens peuvent avoir trois types d'effets : un effet bactériostatique qui se manifeste par un ralentissement ou arrêt de la croissance, effet bactéricide qui se traduit par une perte de la viabilité avec une lyse cellulaire, ou alors un effet bactéricide sans lyse cellulaire.

Les résultats obtenus ont montré une importante activité bactéricide des molécules antibactériennes produites chez les souches isolées (LnC1, LnC10 et LnC34) vis-à-vis les souches pathogènes.

Des résultats similaires sont observés chez l'entérocyne MR99, qui exerce un effet bactéricide contre *L. monocytogenes*, *S. aureus* et contre des agents de la mammite bovine, et présente une activité bactériostatique contre la bactérie *E.coli* (**Sparo et al., 2006**).

Le mode d'action des bactériocines dépend des bactéries cibles utilisées et leur concentration.

Zamfir et al., (1999) ont montré que l'acidophiline 801 a manifesté des effets bactériostatiques lorsque sa concentration est inférieure à 250AU/ml.

Van Belkum et al., (1992), ont rapporté que la lacticine produite chez *Lc. lactis* à une activité antibactérienne vis-à-vis *Escherichia* et *Salmonella*.

Par ailleurs, les travaux réalisés par **Ryan et al. (1996) et Dougherty et al. (1998)** ont montré que la lacticine 3147, bactériocine produite chez *Lc. lactis* DPC 3147, possède un large spectre d'inhibition contre *Escherichia*, *Acetobacter*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Listeria*.

II.3. L'effet d'une substance antimicrobienne produite par une souche *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* sur la qualité microbiologique d'un fromage traditionnel

II.3.1. Analyses physicochimiques

Les résultats des tests physicochimiques du lait et du fromage frais avant et après conservation sont montrés dans le **tableau 9**.

Tableau 9: Résultats des analyses physicochimiques du lait et fromage frais

Test	Lait	Fromage (J0)	Fromage (J7)				
			E1	E2	E3	E4	E5
pH	6,7±0,07	4, 21±0,07	4,0±0,07	4,1±0,035	3,9±0,07	4,0±0,035	3,9±0,07
Acidité titrable °D	18±1,41	43±1,41	44±1,52	43±2,12	45±1,63	43±2,82	44±0,21
Matière sèche%	15,4±0,0	44,1±1,34	39,4±0	42,2±0,35	44±0,21	43,7±0	43±0,07

E1: fromage sans additif (témoin); E2: fromage affiné avec du sel; E3: fromage affiné avec du romarin; E4: fromage affiné avec de l'ail; E5: fromage affiné avec le surnageant actif de la souche lactique, °D: degré Dornic; (J0) jour de la préparation; (J7) sept jours après l'affinage.

II.3.1.1. Mesure de pH

On a mesuré un pH de 6.7 pour le lait, Le pH du J'ben est de 4.21, peuvent être dues à l'activité de la flore microbienne lactique qui produit l'acide lactique d'une quantité importante (**Ouadghiri, 2009**). Le suivi de l'évolution de pH des fromages au cours de conservation a montré des allures similaires entre le fromage témoin et les fromages affinés. Ces résultats de pH pour le lait et le fromage sont en accord avec ceux enregistrés **Hatzikamari et al., (1999)** ; **Franco et al., (2003)**, **Leclercq-Perlat et al., (2019)** et **Niang et al., (2020)**.

II.3.1.2. L'acidité Dornic

Le résultat de l'acidité titrable du lait est 18 °D. Cette valeur est proche de celles rencontrées (15-18 °D) par **Ouadghiri, (2009)**. On distingue l'acidité naturelle, celle qui caractérise le lait frais, d'une acidité développée issue de la transformation du lactose en acide lactique par divers microorganismes. La teneur en acide lactique dans l'échantillon de j'ben est de 45 °D. nos résultats sont identiques à ceux de **Leclercq-Perlat et al., (2019 et Tadjine et al., (2020)**. L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques. Les bactéries lactiques provenant des matières premières du lait ou de l'environnement sont responsables de la production d'acide lactique résultant de l'utilisation des hydrates de carbone (**Terzić-Vidojević et al., 2015**).

Nous avons remarqué après la conservation des fromages des valeurs similaires de l'acidité dornique entre le fromage témoin et les fromages affinés.

II.3.1.3. Extrait sec

La teneur en matière sèche totale de lait cru de chèvre analysée est égale à 15.4%. Celle-ci semble dans la norme **AFNOR (1998)**. Elle dépend de l'alimentation, le climat et de la race également (**Seydi , 2004**).

Selon **Alais (1984)**, le taux d'extrait sec varie d'un type de fromage à un autre. Il dépend d'une part de la composition initiale du lait et d'autre part de la manière dont sont effectués la coagulation et l'égouttage. Le poids sec de fromage est de 44.1%. Même après la conservation nous avons remarqué des valeurs similaires entre les fromages. Ces résultats sont similaires à ceux de **Niang et al., (2020)** et **Tadjine et al., (2020)**.

II.3.2. Analyses microbiologiques

Les résultats des analyses microbiologiques du lait et des fromages sont représentés dans **le tableau 10**.

Tableau 10 : Dénombrement des micro-organismes dans le lait de chèvre et des fromages.

Microorganismes (UFC/ml)	Lait	Fromage J0	Fromage J4					Fromage J7				
			E1	E2	E3	E4	E5	E1	E2	E3	E4	E5
FMAT	1,7×10 ³	1,2×10 ⁴	1,4×10 ⁴	1,5×10 ³	1,4×10 ³	1,8×10 ³	1,6×10 ³	1,7×10 ⁴	1,2×10 ⁴	1,3×10 ³	1,6×10 ²	0,5×10 ²
Coliformes totaux	1,7×10 ²	1,3 ×10 ⁴	1.5×10 ⁴	1,7×10 ³	1,3×10 ²	1,4×10 ²	1,2×10	1,2×10 ²	1,4×10 ²	1.2×10	0,5×10	-
Coliformes fécaux	1,3×10	1,12×10 ³	1.7×10 ⁴	1,4×10 ³	1,7×10 ²	1,7×10 ²	1,3×10	1,2×10 ²	1,7×10	1,4×10	-	-
Streptocoque fécaux	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>St. aureus</i>	-	0,9×10	1,7×10 ²	1,1×10	-	-	-	1,4×10	-	-	-	-
<i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Levures et moisissure	0,2×10 ³	1,4×10 ⁵	1,5×10 ⁴	1,3×10 ³	1,2*10 ³	1,4×10 ³	1,2×10 ³	1,5×10 ³	1,5×10	1,24×10	1,2×10	0,3×10

UFC: Unité Formant la Colonie; E1: fromage sans additif (témoin); E2: fromage affiné avec du sel; E3: fromage affiné avec du romarin; E4: fromage affiné avec de l'ail; E5: fromage affiné avec le surnageant actif de la souche lactique ; J0: premier jour de préparation du fromage; J4: quatre jours après l'affinage du fromage; J7: sept jours après l'affinage du fromage.

Les résultats microbiologiques du lait montrent des différences quantitatives des germes présents. On note la présence élevée de la FMAT ($1,7 \times 10^3$ UFC/ml) et les champignons ($0,2 \times 10^3$ UFC/ml) dans le lait. La FMAT est composée généralement de la flore de contamination banale (**Guiraud, 1998**). En revanche, on observe l'absence de *Salmonella* sp et de *St. aureus*. Les Staphylocoques sont fréquemment détectés dans le lait. L'origine de la contamination est la mamelle malade (mammite) mais aussi l'Homme. Les Staphylocoques produisent une toxine thermostable engendrant des intoxications, de gravités variables, pouvant être mortelles chez l'enfant.

Aussi l'absence des *Clostridium* sulfito-réducteurs et les Streptocoques fécaux, a été détecté dans le lait de chèvre. Mais les coliformes totaux et fécaux sont présents avec des valeurs acceptables (3×10 et $1,7 \times 10^2$ UFC/ml respectivement). Ces résultats sont similaires à ceux de **Feknous et al., (2018)**. Ils indiquent que les conditions aseptiques de prélèvement ont été respectés et qu'aucune contamination du lait n'a eu lieu avec la bonne santé des animaux. Cela illustre l'application d'une bonne méthode d'hygiène d'élevage.

Concernant les fromages affinés après conservation et le fromage témoin avant et après conservation, nous remarquons l'absence de salmonella et *Clostridium* sulfito-réducteurs et les Streptocoques fécaux.

En revanche, nous avons remarqué la présence d'une charge de *St. aureus* ($0,9 \times 10$ UFC/ml) dans le fromage témoin. Ce qui peut s'expliquer par une contamination pendant la préparation, car les Staphylocoques font partie de la flore commensale chez l'homme. Cette charge est réduite après la conservation des fromages affinés par le sel et ceux non affinés. On note aussi, une disparition totale des staphylocoques dans les fromages affinés par l'ail, le romarin et le surnageant contenant des substances antimicrobiennes de la souche LAB13.

Pour ce qui est des coliformes fécaux ($1,7 \times 10^4$ UFC/ml) et des coliformes totaux ($1,5 \times 10^4$ UFC/ml) ainsi les moisissures et levures ($1,5 \times 10^4$ UFC ml), nous avons remarqué une augmentation de leur nombre dans le fromage témoin. Cette charge est réduite après la conservation des fromages affinés par l'ail et le surnageant où nous avons remarqué l'absence totale des coliformes après sept jours de conservation.

Dans notre étude, la recherche de l'effet inhibiteur des bactéries pathogènes, par le surnageant de la souche LAB13, a permis de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien de cette souche, et par l'addition des différentes substances aromatiques. En comparant l'effet des substances produites par la souche lactique LAB13 ajoutée et les substances d'affinages, nous avons remarqué que le surnageant de la souche lactique a un impact sur la flore d'altération, nettement meilleur que les autres substances.

Les résultats obtenus ont montré que la souche LAB13 secrète des substances antimicrobiennes qui agissent sur les bactéries pathogènes et d'altération, à savoir les bactériocines de classe II (Daouadji et al., 2020). Ils agissent en perméabilisant les membranes cibles, ce qui provoque un déséquilibre de la balance ionique et une fuite des phosphates. La cellule cible fragilisée, finit par mourir (Hécharde et al., 2001). C'est pour cette raison que nous constatons l'absence de la plupart des germes d'altération dans le fromage additionné au surnageant. La diminution de la charge microbienne du fromage frais, peut être expliquée par des changements dans le milieu, notamment la diminution du pH et la présence de certains inhibiteurs existant dans le surnageant de la souche LAB13. et l'effet des substances aromatiques Le diacétyle, dont le citrate est le précurseur, est le principal composé aromatique recherché dans les produits laitiers frais, tels que le beurre, le fromage frais et la crème fraîche. Cependant, d'autres composés issus de l'hétérofermentation, tels que l'acétate et l'éthanol, contribuent à la texture et à la flaveur de ces produits laitiers.

Le fromage frais additionné des substances aromatiques, révèle une diminution de la charge microbienne. Dans le cas du fromage frais salé, la charge des coliformes totaux a diminué, donc le salage limite la croissance et détruit les bactéries. Le sel a ainsi des effets multiples sur la qualité finale du fromage. D'une part, le NaCl offre une protection contre les microorganismes dangereux, en réduisant l'activité de l'eau, et d'autre part, il donne un goût relevé au fromage (Guinee et O'Kennedy, 2007). En outre, le romarin a un effet non négligeable, grâce à sa richesse en polyphénols, notamment les flavonoïdes qui sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions, pour désactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999)

En comparant les substances d'affinage, l'ail a la meilleure activité antimicrobienne contre un grand nombre de micro-organismes. Il a montré une activité puissante à large spectre contre les

bactéries pathogènes à Gram positif et Gram négatif (Menacer et al., 2017). L'ail agit, au niveau de la membrane cellulaire, en inhibant particulièrement les réactions de phosphorylation oxydative, alors que d'autres sont des inhibiteurs de certaines enzymes extracellulaires secrétées par les microorganismes (Thomas-Berbaran et al., 1990).

II.4. Biosynthèse des Ag nanoparticules

La biosynthèse des nanoparticules d'argent (AgNPs) a été réalisée par le surnageant d'une culture de la souche bactérienne *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (LnC1). La réduction du nitrate d'argent en AgNPs est suivie d'un changement de la couleur du clair au brun foncé (figure 37). L'intensité de la couleur a augmenté après 24h d'incubation résultant de la formation élevée de nanoparticules.

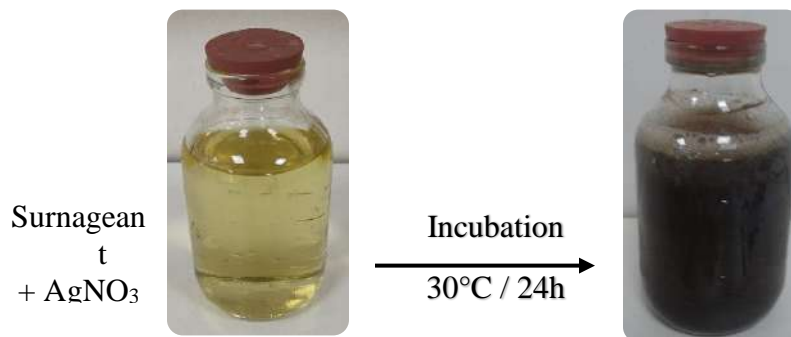


Figure 37 : Solutions de nitrate d'argent après exposition au surnageant de culture de la souche *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*

Le changement de couleur est expliqué par la réduction des ions Ag^+ en particules d'argent (Ag^0) en présence du surnageant de la souche lactique. Le surnageant de la souche bactérienne *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* réagit comme agent réducteur pour la synthèse des AgNPs en raison de la présence de grandes quantités d'enzymes spécifiques. Cette synthèse extracellulaire présente plus d'avantages pratiques par rapport à la synthèse intracellulaire (en raison du nombre réduit d'étapes de purification). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par (Kumar et al., 2011) qui ont synthétisé des AgNPs à partir de *Pseudomonas aeruginosa*. Kumar et al., (2014) ont utilisé une plante (*Boerhaavia diffusa*) pour synthétiser des AgNPs et Pugazhendhi et al., (2018) à partir de microalgues (*Gelidium amansii*). Matei et al., (2020) qui ont remarqué le changement de couleur vers le brun foncé après la biosynthèse des AgNPs à partir de cultures de bactéries lactiques.

II.4.1. Caractérisation de AgNPs

II.4.1.1. Spectroscopie UV-Visible

Le pic d'absorption maximal est observé à une longueur d'onde de 465 nm (**figure 38**). Des valeurs proches ont été trouvées par **Roy et al., (2016)** relatives à la synthèse des AgNPs à partir de *Saccharomyces cerevisiae*. En fait, la couleur brune des AgNPs, résulte de la vibration concomitante d'électrons libres de l'argent métallique qui sont en résonance avec l'onde lumineuse. Cela explique l'origine de l'absorption par résonance plasmonique de surface (SPR), souvent observée avec des NPs métalliques. **Ranganath et al., (2012)** et **Thiruneelakandan et al., (2013)** ont trouvé 430 nm comme absorbance maximale des AgNPs synthétisés à partir de *Lactobacillus spp.* Des valeurs inférieures (416-420 nm) ont été obtenues par **Wang et al., (2016)**, en utilisant *methylophilicus* et **Matei et al., (2020)** en utilisant les bactéries lactiques. Cette différence est liée à la taille des nanoparticules synthétisées.

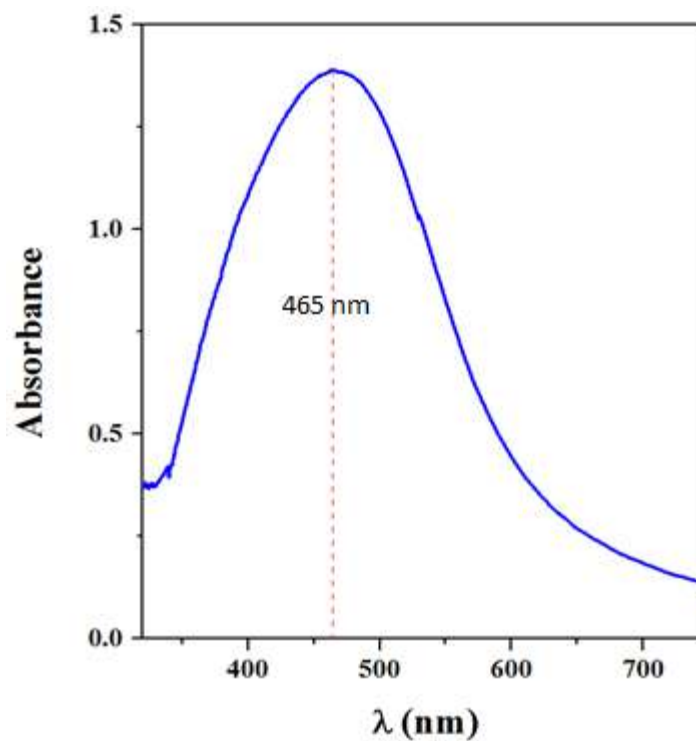


Figure 38 : Spectre UV-visible de l'absorbance des nanoparticules d'argent (AgNPs) synthétisés par la souche *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* traitées à 37°C pendant 24h.

II.4.1.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

L'analyse par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) a montré que les AgNPs synthétisées sont homogènes, denses et formées de particules sphériques. Les images MEB (**figure 39**) mettent en évidence la taille des particules (30-40 nm) d'AgNPs. Les résultats obtenus sont similaires à ceux de **Bhainsa et D'souza (2006)**; **Kumar et Mamidyala, (2011)**; **Mondal et al., (2020)** et **Kandiah et Chandrasekaran (2021)**.



Figure 39 : Images MEB d'AgNPs synthétisés par la souche *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*

II.4.1.3. Analyse élémentaire et quantitative des dépôts par EDX

La spectroscopie EDX est un outil potentiel utilisé pour révéler les constituants élémentaires. Dans la **Figure 40** il est clairement montré que l'échantillon synthétisé est composé d'Ag (argent), de C (carbone) et d'O (oxygène). Aucune autre impureté élémentaire n'a été trouvée dans l'EDX, ce qui renforce la pureté de l'échantillon.

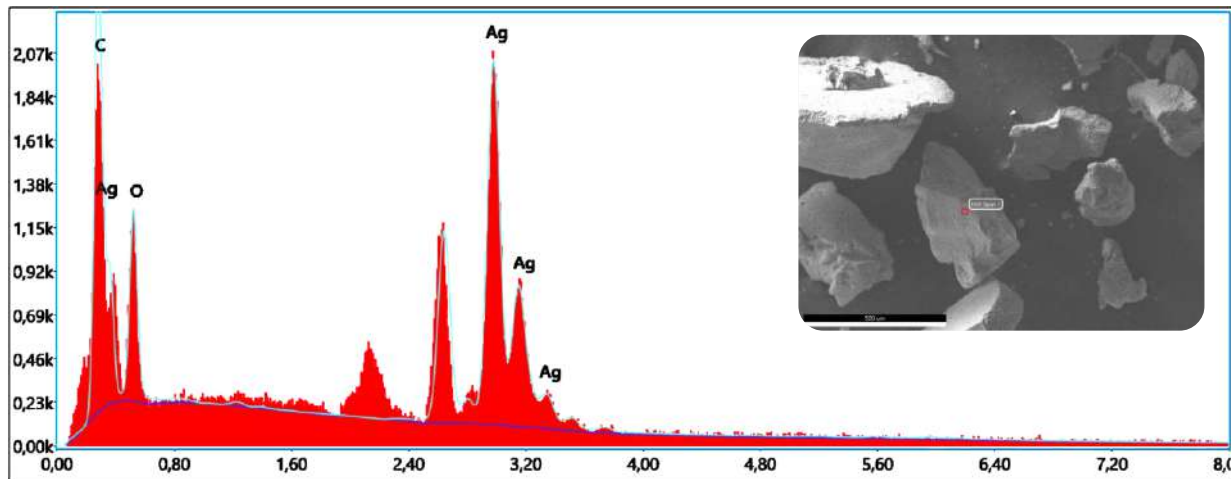


Figure 40: Modèle EDX d'AgNPs synthétisées par la souche *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

II.4.2. Activité photocatalytique des AgNPs

L'activité catalytique des AgNPs synthétisés sur la dégradation des colorant est démontré en utilisant le bleu de méthylène (BM), orange de méthyle (OM) et rouge Congo (RC) par la technique d'irradiation solaire à différents intervalles de temps. Le pic d'absorption caractéristique du BM, RC et OM ont été trouvés à 660 nm, 490 nm et 470 nm respectivement (**figure 41**). Sous irradiation par lumière, on observe une diminution progressive de λ_{\max} en présence des AgNPs avec le temps pour les trois colorants. La dégradation complète s'est produite après 30 mn pour le BM et le RC et 40 mn pour le OM.

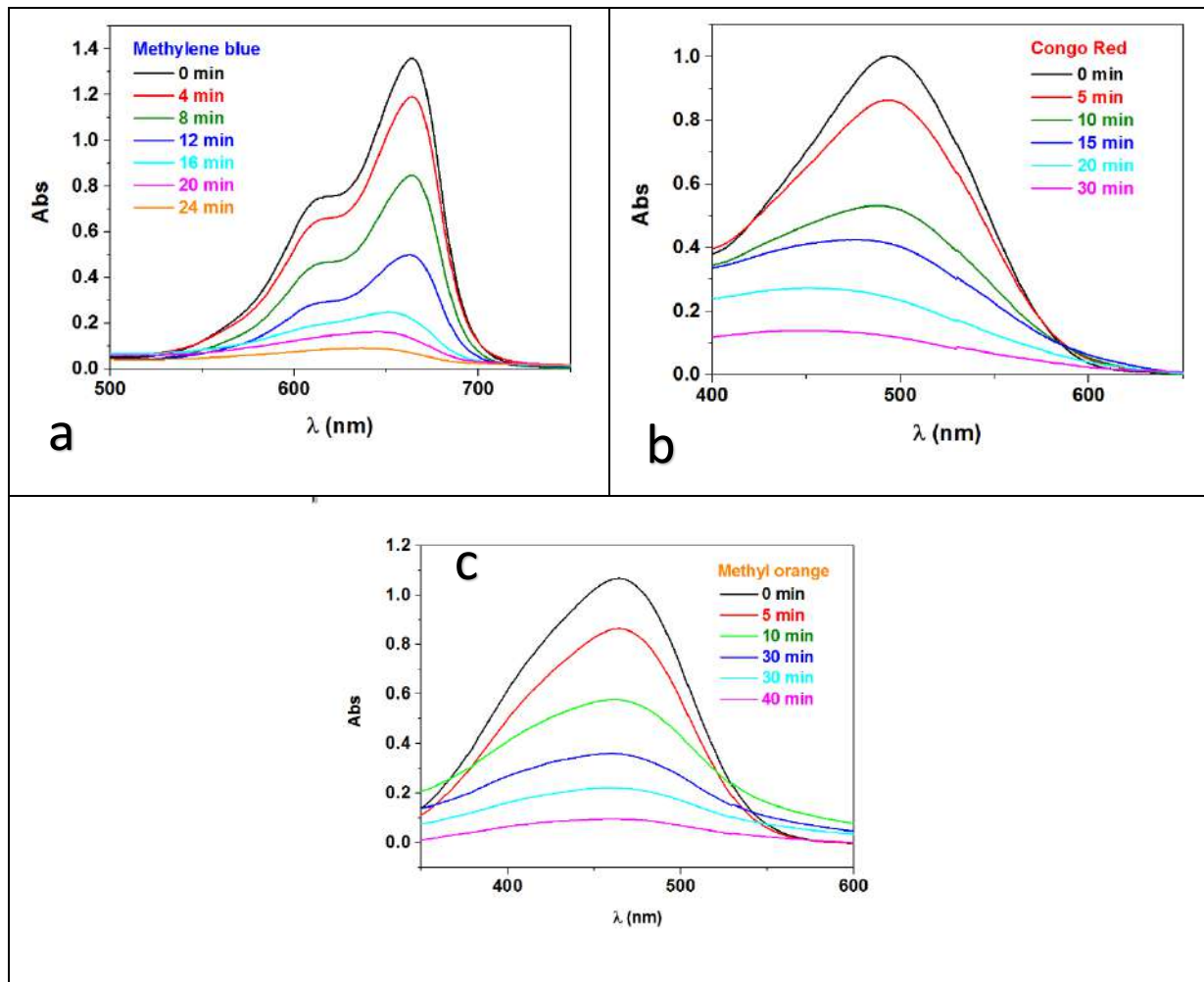


Figure 41 : Les spectres UV indiquent la dégradation photocatalytique du (a) bleu de méthylène, (b) rouge congo et (c) orange de méthyl par les AgNPs

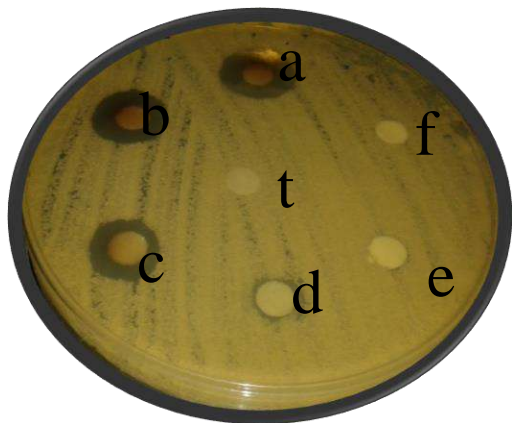
Les résultats obtenus sont très remarquables, car la plupart des travaux relatifs à l'activité photocatalytique des AgNP, ont été trouvés pour une durée de dégradation des colorants plus longue. **Roy et al., (2015)** ont annoncé une durée de 6h pour la dégradation du BM par des AgNPs synthétisée à partir de *Saccharomyces cerevisiae* ; **Keskin et al., (2016)** ont observé que la dégradation du BM à partir des cyanobactéries a eu lieu après 4h. **Thomas et al., (2019)** ont remarqué un temps de 24 h pour la dégradation de BM et OM par des AgNPs synthétisés, en utilisant une plante : *Passiflora edulis* ; tandis que **Rahman et al., (2019)** ont trouvé que la dégradation du bleu de méthylène avait lieu après 20 mn par des AgNPs synthétisées à partir d'une plante : *Arisaema flavum*.

Selon **Poornima et Valivittan (2017)**, les nanoparticules d'Argent sont de bons photocatalyseurs, très efficaces et stables à une température ambiante et sous irradiation par la lumière visible pour dégrader les composés organiques et les colorants. Ces résultats suggèrent que les AgNPs synthétisées par cette méthode peuvent favoriser catalytiquement la dégradation des colorants en présence de lumière visible et ouvrent la voie à la bioremédiation environnementale. Ils peuvent être considérés comme méthode très efficace pour la dégradation des colorants. Le mécanisme de la stratégie d'irradiation solaire a été expliqué par le fait que les photons solaires frappent les nanoparticules présentes dans un mélange réactionnel. Lors de l'exposition au soleil, les électrons à la surface des particules sont excités et réagissent avec les molécules d'oxygène dissoutes dans le milieu réactionnel et convertis en radicaux anions oxygène. Ces radicaux cassent le colorant organique en molécules organiques plus simples, conduisant à la dégradation rapide du colorant.

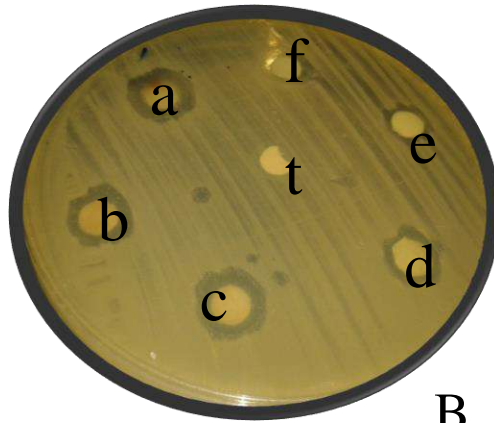
II.4.3. L'activité antimicrobienne des AgNPs

L'activité antimicrobienne de l'argent, dépend du contact superficiel dans la mesure où ce métal peut inhiber différents systèmes enzymatiques de la chaîne respiratoire et altérer la synthèse de l'ADN (**Perez et al., 2007**). En raison de leur petite taille, les nanoparticules présentent une grande surface de contact par rapport aux autres sels, ce qui offre un meilleur contact avec les micro-organismes en se liant à la membrane cellulaire et en pénétrant également à l'intérieur.

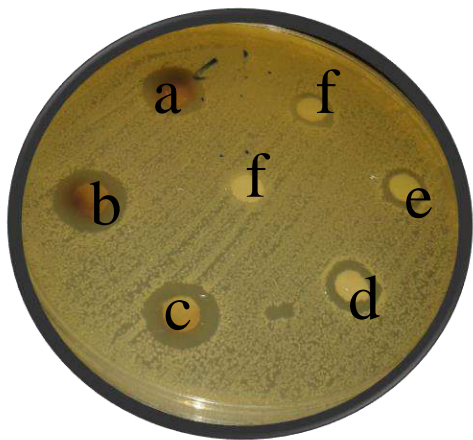
L'activité antibactérienne des Ag-NPs a été testée contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* (ATCC 9314), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Escherichia coli* ATTC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* 700TCA, et *Candida albicans* ATTC 10237 (**figure 42**). Le diamètre des zones d'inhibition des échantillons est indiqué sur la **figure 43**. Les résultats ont montré une activité antibactérienne importante des AgNPs biosynthétisés. Une zone d'inhibition d'environ 10 à 23 mm a été observée. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Kora et Arunachalam, (2011)** et **Salomoni et al., (2017)** qui ont testé le pouvoir antimicrobien de l'AgNPS synthétisé par *Pseudomonas aeruginosa* ; ainsi que **Taran et al., (2016)** qui ont utilisé les AgNPs synthétisés par *Bacillus sp.* HAI4.



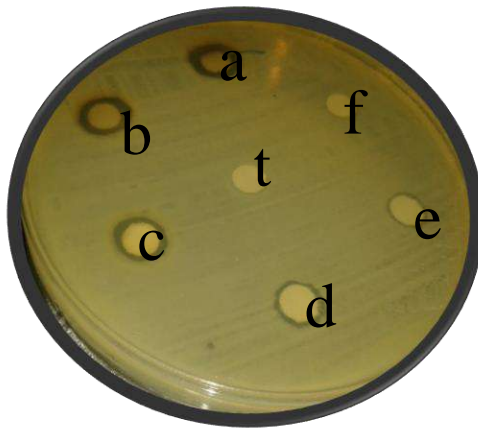
A



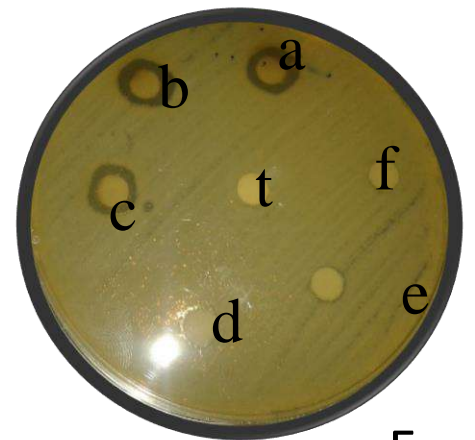
B



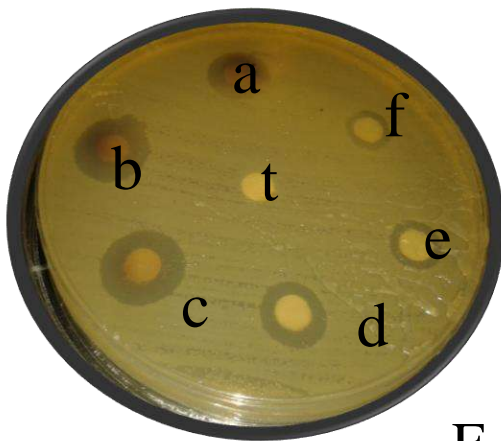
C



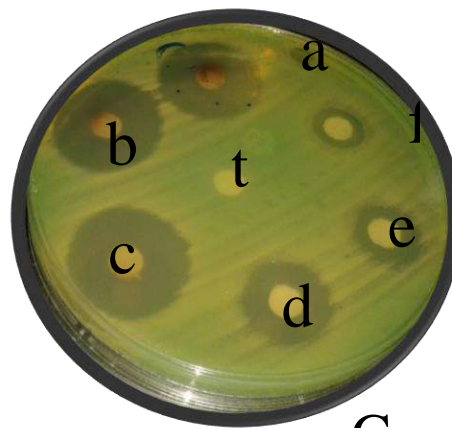
D



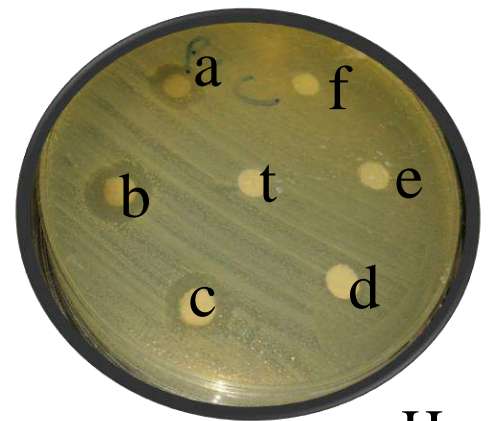
E



F



G



H

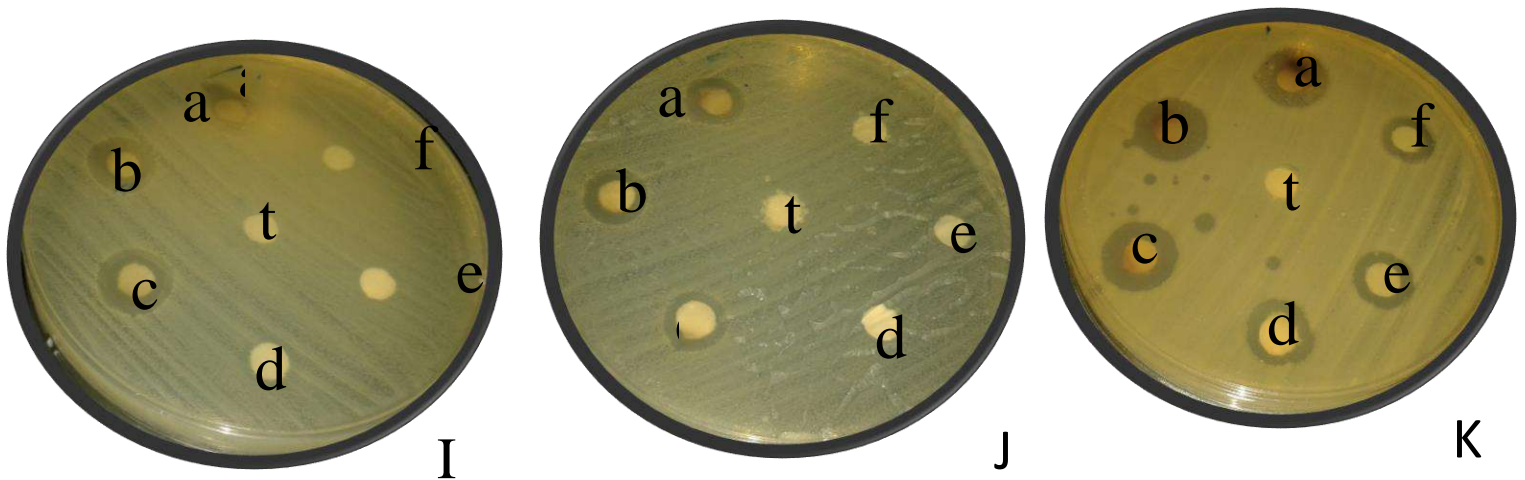


Figure 42: Activité antimicrobienne de différentes concentrations de nanoparticules d'argent sur des espèces microbiennes

(A) *Candida albicans* ATCC10237, (B) *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, (C) *Staphylococcus aureus* ATCC43300, (D) *Salmonella abony* ATCC6017, (E) *Micrococcus luteus* ATCC 9314, (F) *Bacillus subtilis* ATCC 6633, (G) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, (H) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, (I) *Staphylococcus aureus* ATCC25923, (J) *E. coli* ATCC25922, (K) *Klebsiella pneumoniae* ATCC70603.

• (a) C1=30 μ g/ml, (b) C2=15 μ g/ml, (c) C3=7.5 μ g/ml, (d) C4= 3.75 μ g/ml, (e) C5=1.875 μ g/ml, (f) C6=0.937 μ g/ml. (t) eau distillée.

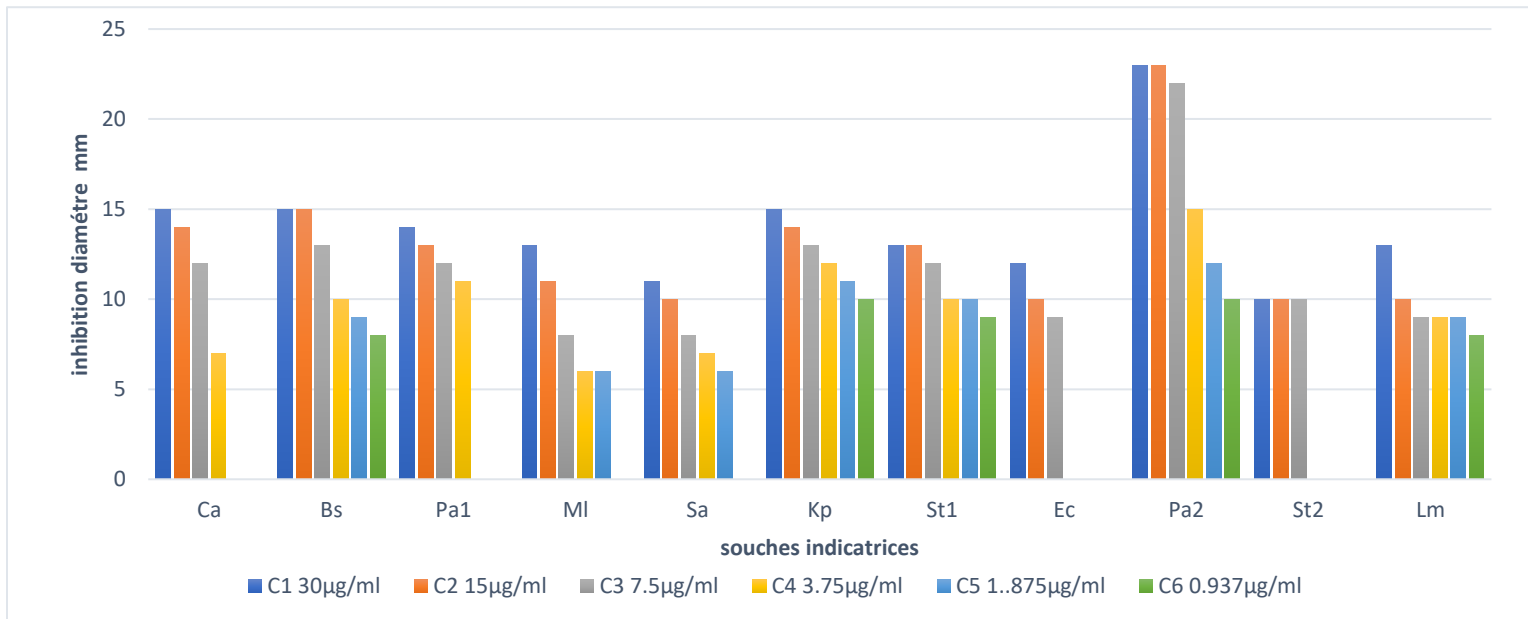


Figure 43: Effet antibactérien indiqué par Zone d'inhibition (mm) de différentes concentrations d'AgNPS sur différentes espèces

(Ca) *Candida albicans*, (Bs) *Bacillus subtilis*, (Pa1) *Pseudomonas aeruginosa*, (MI) *Micrococcus luteus*, (Sa) *Salmonella abony*, (Kp) *Klebsiella pneumoniae*, (St1) *Staphylococcus aureus*, (Ec) *E. coli*, (Pa2) *Pseudomonas aeruginosa*, (St2) *Staphylococcus aureus*, (Lm) *Listeria monocytogenes*.

Les résultats montrent qu'avec la diminution de la concentration, une absence de l'activité antimicrobienne envers les espèces *Candida albicans* ATCC10237 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 à une concentration de 1,875 µg/ml. Il en est de même contre *E. coli* ATCC25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC25923 à 3,75 µg/ml. Lorsque la concentration de nanoparticules augmente, l'effet antibactérien augmente également.

Le mécanisme antimicrobien des AgNPs est actuellement mal compris. Cependant, plusieurs auteurs ont supposé que la capacité de réplication de l'ADN bactérien est perdue et que les protéines cellulaires deviennent inactivées après le traitement aux ions d'argent (Kumar et al., 2008).

CONCLUSION

Conclusion

Ce travail a visé l'étude du potentiel technologique des souches *Leuconostoc* (Ln) isolées à partir de différents produits laitiers dans la région de Ouargla. Un isolement de 201 souches a été réalisé, à partir du lait de chèvre, lait de chamelle, lait de brebis, lait de vache, beurre traditionnel (D'hane) et fromage traditionnel (J'ben). La caractérisation morphologique a permis de sélectionner 38 souches.

La caractérisation phénotypique en se basant sur les tests physiologiques et biochimiques des isolats nous a permis d'identifier les souches isolées :

Ln. gelidum: isolées à partir du lait de chèvre, *Ln. carnosum*: isolées à partir du lait de chèvre, *Ln. citreum*: isolées à partir du lait de chèvre, *Ln. fallax*: isolées à partir du lait de chèvre et à partir du J'ben, *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*: isolées à partir du lait de chèvre, , à partir du lait de chamelle et à partir du J'ben, *Ln. mesenteroides subsp dextranicum*: isolées à partir du lait de chèvre, à partir du lait de chamelle, et à partir du lait de vache et *Ln. mesenteroides subsp cremoris*: isolées à partir lait de chèvre, à partir du lait de chamelle et à partir du J'ben.

La caractérisation des fonctionnalités technologiques des souches a été basée sur l'étude de la production d'un exopolysaccharide (EPS) de type dextrane, en utilisant le milieu MSE. A ce titre, nous avons sélectionné 30 souches qui ont montré une production de dextrane par l'apparition de colonies gluantes et gélatineuses. Par la suite une quantification de dextrane a été réalisée, par dosage des sucres totaux, à l'aide de la courbe d'étalonnage du glucose. Des niveaux de production variant entre $0,63 \pm 0,19$ g/l et $2,41 \pm 0,17$ g/l des souches LnF70 et LnC1, respectivement. Ces résultats nous ont permis de choisir 4 souches, celles ayant montré une bonne production et celles à faible production (LnC1 et LnC12, LnF65 et LnF70) afin d'envisager une optimisation. Celle-ci était basée sur les conditions nutritionnelles portant sur le glucose (source de carbone) l'extrait de levure (source d'azote) et le précurseur de production : le saccharose. Une bonne production a été obtenue dans le milieu contenant 2% de glucose, 0,3% d'extrait de levure et 10% de saccharose.

Par ailleurs le pouvoir antimicrobien des souches Ln vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC43300 (St1), *Esherichia coli* ATCC25992, *Bacillus subtilis* ATCC6633 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Salmonella typhi* ATCC14028, *Enterococcus faecalis* WDCH0009, *Listeria monocytogenes* ATCC14028 et *Staphylococcus aureus* ATCC25923, en utilisant la méthode directe d'antagonisme sur gélose, a montré que 24 souches possèdent une activité

Conclusion

antibactérienne avec différentes zones d'inhibition. Les zones d'inhibition formées autour des colonies, apparaissent claires avec des diamètres variables, de 06 à 27 mm.

La caractérisation physico-chimique de bactériocines produites chez les souches isolées, sélectionnées antagonistes (LnC1, LnC2, LnC10, LnC12, LnC15, LnC16, LnC18, LC21, LnC23, LnC34, LnC43, LnV67, LnF49, LnF63, LnF64, LnF69, LnF70 et LAB13) a révélé leur thermo-résistance, et leur sensibilité aux protéases.

La purification partielle des protéines actives, produites par les souches testées relatives à leur pouvoir de produire des bactériocines, a permis de sélectionner 12 souches : LAB 13, LnC1, LnC2, LnC15, LnC10, LnC12, LnC16, LnC21, LnC34, LnF49, LnF65, LnF70 et LnF63. Tandis que les souches LnC18, LnC23, LnC43, LnV67 et LnF64 qui n'ont montré aucune zone d'inhibition après la précipitation et la purification.

En comparant l'effet des substances produites par une souche lactique LAB 13 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris*) avec différentes substances d'affinages (sel, romarin et ail), sur la qualité microbiologique d'un fromage frais, préparé à partir du lait de chèvre, a permis de constater que le surnageant de la souche lactique a un effet sur la flore d'altération, nettement meilleur que les autres substances. Cela indique que cette souche présente la capacité de produire des substances antimicrobiennes vis-à-vis des bactéries d'altération et de ce fait, peut être utilisée dans la conservation des produits alimentaires.

L'utilisation de surnageant d'une souche *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (LnC1), pour synthétiser des nanoparticules d'Argent (AgNPs) en présence d'AgNO₃, a été confirmée par le changement de couleur et spectroscopie UV-Visible avec une absorbance à 465 nm. La structure des AgNPs en utilisant la microscopie électronique à balayage, a indiqué des formes sphériques d'une taille de 30 à 40 nm. L'application des AgNPs dans la dégradation de certains colorants, à savoir le bleu de méthylène, l'orange de méthyle et le rouge Congo, sous irradiation par la lumière, a montré des pics d'absorption à 660 nm, 490 nm et 470 nm respectivement, caractéristiques de ces trois colorants.

L'activité antibactérienne des Ag-NPs vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9314, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Escherichia coli* ATTC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 9027, *Pseudomonas*

Conclusion

aeruginosa 700TCA, et *Candida albicans* ATTC 10237, a été remarquable, avec des zones d'inhibitions variant entre 10 mm à 23 mm.

En perspectives :

- Une identification moléculaire des isolats, en utilisant les méthodes de PCR et séquençages.
- Les souches isolées sont de bonnes « candidates » pour une étude plus approfondie afin d'élucider leurs avantages potentiels pour la santé humaine comme une culture protectrice et comme un starter dans les produits alimentaires afin d'évaluer leurs caractéristiques technologiques pour des applications à partir du lait cru de chamelle en Algérie
- La purification et caractérisation structurale du dextrane produit
- La purification et la caractérisation structurale des bactériocines dont la détermination de la séquence peptidique
- Le développement de levains lactiques spécifiques, contenant des combinaisons de souches dotées de pouvoirs antimicrobiens pour d'éventuelles applications dans des modèles des produits fermentés traditionnels.
- Biosynthèse d'autres nanoparticules, tels que Zn, Mg, Mn... et essai de leur application dans le domaine de l'environnement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. **ABBABSA A., 2012.** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. Mémoire de Magister en Génie microbiologique *Université Ferhat Abbas Setif*.
2. **ABDALLAH M., CHATAIGNE G., FERREIRA-THERAND P., BENOLIEL C., DRIDER D., DHULSTER P., CHIHIB N.E., 2014.** Effect of growth temperature surface type and incubation time on the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(6) 2597-2607.
3. **ABDEL-RAHMAN E.-S., SCHICK R., KURZ T., 2007.** Influence of dextran on sucrose crystallization. *Zuckerindustrie* 132,453–460.
4. **AFNOR N., 1998.** Recueil des normes françaises X06 X60. X50. AFNOR.
5. **AHMAD S. A., DAS S. S., KHATOON A., ANSARI M. T., AFZAL M. HASNAIN M. S., NAYAK A. K., 2020.** Bactericidal activity of silver nanoparticles: a mechanistic review. *Materials Science for Energy Technologies*.
6. **ALAIS C., 1884.** La micelle de caséine et la coagulation du lait. In science du lait : principes des techniques laitières. Ed. Sepaic Paris 764 p.
7. **ALAKOMI H. L., SKYTТА E., SAARELA M., MATTLA-SANDHOLM T., LATVA-KALA K., HELANDER I. M., 2000.** Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology* 66(5) 2001-2005.
8. **AMAN A., SIDDIQUI N. N., QADER S. A. U., 2012.** Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. *Carbohydrate Polymers* 87(1) 910-915.
9. **AMEEN F., ALYAHIA S., GOVARTHANAN M., ALJAHDALI N., AL-ENAZI N., ALSAMHARI K., ALSHEHRI W.A., ALWAKEEL S.S., ALHARBI S.A., 2019.** Soil bacteria *Cupriavidus* sp. mediates the extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles. *J. Mol. Struct.* 1202 127233.
10. **AMROUCHE T., 2005.** Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries: analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués.
11. **ANDREWS J., M., 2005.** BSAC standardized disc susceptibility testing method. *J. Antimicrob. Chemother.* 56 pp. 60.
12. **ANGELINA VIJAYENDRA S.V.N., 2015.** Microbial biopolymers: the exopolysaccharides. In: Kalia V (ed) Microbial factories. *Springer New Delhi* pp 113–125.

13. **AXELSSON L., 1998.** Lactic acid bacteria classification and physiology in lactic acid bacteria; Microbiology and functional aspects. Revised and Expanded Edited by S. Salminen and A. Von Wright 1-72. *Marcel Dekker Inc.* New York.
14. **babu MADDINEDI S., MANDAL B. K., MADDILI S., K., 2017.** Biofabrication of size controllable silver nanoparticles—a green approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 167 236-241.
15. **BADIS A., GUETARNI D. KIHAL M., ET OUZROUT R., 2005.** Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Scien &Tech* 23 PP 30-37.
16. **BADIS A., GUETARNIB D. MOUSSA BOUDJEMAA 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 PP 579– 588.
17. **BARCELOS M.C.S., VESPERMANN K.A.C., PELISSARI F.M. MOLINA G., 2019.** Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Crit Rev Food Sci Nutr* 60:1475– 1495.
18. **BAREFOOT S.F., KLAENHAMMER T.R., 1983.** Detection and activity of lactacin B bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 :1808- 1815.
19. **BAUER R., ET DICKS L., M., 2005.** Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol. Rev.* 101: 201-216.
20. **BEKHOUCHE F., 2006.** Bactéries lactiques du lait cru de vache et microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes.
21. **BELKHEIR K. CENTENO J. A., ZADI-KARAM H., KARAM N. E., CARBALLO J., 2016.** Potential technological interest of indigenous lactic acid bacteria from Algerian camel milk. *Italian Journal of Food Science* 28(4) 598.
22. **BELLIL Y., 2019.** Caractérisation et évaluation des aptitudes technologiques des *Leuconostocs* isolés du lait de chamelle Algérien et leurs applications. Thèse de doctorat *Université Ahmed Benbella Oran.*
23. **BELLIL Y., BENMECHERNE Z., BELLIL W.C., KIHAL M., 2018.** Antibacterial and antibiofilm activity of the bacteriocin-producing strain *Leuconostoc mesenteroides* CHBY46 isolated from Algerian dromedary milk against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *South Asian Journal of Experimental Biology* 8(4): 120- 131.

24. **BENASLA A., 2012.** Production d'exopolysaccharides Par Des Souches De *Lactobacilles*. Thèse de doctorat en Biotechnologie. *Uni. D'Oran* P16-80.
25. **BENAZZOUD D., 2012.** Isolement et caractérisation des bacteries lactiques productrices d'arômes (diacétyle. Ecole nationale supérieure d'Agronomie EL-Harrach Alger P13.
26. **BENHEDANE-NEE BACHTARRZI N., 2012.** Qualité microbiologique du lait crus destiner à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est Algérien. Thèse Doctorant. Université MENTOURI Constantine 36-41.
27. **BENHOUNA I. S., HEUMANN A., RIEU A., GUZZO J., KIHAL M., BETTACHE G., WEIDMANN S., 2019.** Exopolysaccharide produced by *Weissella confusa*: Chemical characterisation rheology and bioactivity. *International Dairy Journal* 90 88-94.
28. **BENMECHERNENE Z., CHENTOUF H. F., YAHIA B., FATIMA G., QUINTELA-BALUJA M., CALO-MATA P., BARROS-VELAZQUEZ J., 2013.** Technological aptitude and applications of *Leuconostoc mesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. *BioMed research international* 2013.
29. **BHAINSA K. C., D'SOUZA S. F., 2006.** Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 47(2) 160-164.
30. **BHATT S. M., MOHAN A., SRIVASTAVA S. K., 2013.** Challenges in enzymatic route of mannitol production. *International Scholarly Research Notices: Biotechnology* 914187..
31. **BHAVANI A. L., NISHA J., 2010.** Dextran - the polysaccharide with versatile uses. *International Journal of Pharmacology & Biotechnological Sciences* 1(4) PP 569-573.
32. **BIGRET M., 1994.** Lactic acid bacteria and organoleptic propreties of foods in: Novel G et Le Querler JF. Les bacteries lactiques. Actes du colloque Lactic 94 Caen 7-9 septembre pp 25-27. Presses universitaire de Caen. France.
33. **BJÖRKROTH J., HOLZAPFEL W., 2006.** Genera *Leuconostoc* *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin M. Falkow S. Rosenberg E. Schleifer K. H. & E. Stackebrandt (Eds.) *The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes Cyanobacteria*. *Springer New York*. 4 267-319.
34. **BOUMEDIENE K., 2013.** Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes. Memoire en vue de l'obtention du diplôme de *Magister en Biologie*. Université Abou Bekr Belkaïd- Tlemcen PP 30-38.

35. **BROOKER B. E., 1977.** Ultrastructural surface changes associated with dextran synthesis by *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of bacteriology* 131(1) 288-292.
36. **BUDDE B.B. HORNBAEK T., JACOBSEN T., BARKHOLT V., KOCH A.G., 2003.** *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation bacteriocin identification and meat application experiments. *Int. J. Food Microbiol.* 83 171–184.
37. **CARDAMONE L., QUIBERONI A., MERCANTI D.J., FORNASARI M.E., REINHEIMER J.A., GUGLIELMOTTI D.M., 2011.** Adventitious dairy *Leuconostoc* strains with interesting technological and biological properties useful for adjunct starters. *Dairy Sci Technology* 91: 457–470.
38. **CASLA D., REQUENA T., GOMEZ R., 1996.** Antimicrobiol activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus carvatus* IFPL 105. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 1 35 – 41.
39. **CASTILLA-MARROQUÍN J. D., HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ R., DE LA VEQUIA H. D., RÍOS-CORRIPIO M. A., HERNÁNDEZ-ROSAS J., LÓPEZ M. R., HERNÁNDEZ-ROSAS F., 2020.** Dextran synthesis by native sugarcane microorganisms. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 19(Sup. 1) 177-185.
40. **CHANG J. Y., LEE H. J., CHANG H. C., 2007.** Identification of the agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI464 that enhances bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* GJ7. *Journal of applied microbiology* 103(6) 2504-2515.
41. **CHANG J.Y., CHANG H.C., 2010.** Improvements in the quality and shelf life of kimchi by fermentation with the induced bacteriocin-producing strain *Leuconostic citreum* GJ7 as a starter. *J Food Sci* 75 103–110. 1111/j.1750-3841.2009.01486. x.
42. **CHANG J.Y., CHANG H.C., 2011.** Growth inhibition of foodborne pathogens by kimchi prepared with bacteriocin-producing starter culture. *J Food Sci* 76 72–78. 1111/j.1750-3841.2010.01965. x.
43. **CHAPOT-CHARTIER M.-P. V., MONNET L., De VUYST., 2011.** Cell walls and exopolysaccharides of lactic acid bacteria. Pages 37–59 in the 10th LAB Symposium-Thirty Years of Research on Lactic Acid Bacteria.

44. **CHELO I.M., ZE-ZE L., TENREIRO R., 2010.** Genome diversity in the genera *Fructobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* determined by physical and genetic mapping. *Microbiology* 156: 420–
45. **COGAN T. M., JORDAN K. N., 1994.** Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *Journal of Dairy Science* 77(9) 2704-2717.
46. **CONDON A. G., RICHARDS R. A., FARQUHAR G. D., 1987.** Carbon isotope discrimination is positively correlated with grain yield and dry matter production in field-grown wheat 1. *Crop Science* 27(5) 996-1001.
47. **COTTER P.D., HILL C., ROSS R.P., 2005.** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.* 3:777-788.
48. **COVIS R., 2011.** Synthèse de polysaccharides amphiphiles à partir de dextrane et application à la stabilisation d'émulsions directes et inverses. *Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Lorraine Spécialité : Génie des procédés et des produits* P36.
49. **COWAN N. M., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology Reviews.* Vol. 12(4): 564-58.
50. **DABA H., LACROIX C., HUANG J., SIMARD R. E., 1993.** Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocine 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39 166-173.
51. **DADI R., 2019.** Synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques et leur activité antibactérienne. Thèse de doctorat. *Université de Paris.*
52. **DAHOU A., HOMRANI A., BENSALAH F., MEDJAHED M., 2015.** La microflore lactique d'un fromage traditionnel Algérien « type J'ben »: connaissance des écosystèmes microbiens laitiers locaux et de leurs rôles dans la fabrication des fromages. *Afrique Science* 11(6) 1-13.
53. **DANILOVIC B., JOKOVIC N., PETROVIC L., VELJOVIC K., TOLINACKI M., SAVIC D., 2011.** The characterisation of lactic acid bacteria during the fermentation of an artisan Serbian sausage (Petrovska Klobasa. *Meat Sci* 88: 668–674.
54. **DAOUADJI S. D., ABBOUNI B., BOURICHA M., LAMINE M., BENINE K. K., KHALDI A., 2020.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from milk and traditional fermented dairy products of south Algeria against multidrug resistance pathogenic bacteria. *South Asian Journal of Experimental Biology* 10(5) 322-331.

55. **de PAULA A., T. JERONYMO-CENEVIVA A. B., SILVA L. F., TODOROV S. D., FRANCO B. D. G. M., PENNA A. L. B., 2015.** *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Annals of microbiology* 65(2) 899- 910.
56. **DERAZ S.F., KARLSSON E. N., HEDSTRÖM M., ANDERSSON M.M., MATTIASSON B., 2005.** Purification and characterization of acidocin D20079 a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Elsevier. Journal of Biotechnology.* 117 : 343-354.
57. **DEVOYOD J. J., POUILLAIN F., 1988.** Les *Leuconostocs*. Propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Lait* 68(3) 249-279.
58. **DEVOYOD J. J., POUILLAIN F., 1988.** Les *Leuconostocs*. Propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Lait* 68(3) 249-279.
59. **DHOUB A., 2017.** Mise en évidence de la production des substances d'intérêt technologique par quelques bactéries lactiques isolées de lait de brebis. Mémoire en vue de l'obtention d'un diplôme de master académique en Analyses Biologiques et Biochimiques P 30.
60. **DIANA C.-., HUMBERTO H.S., JORGE Y. F., 2015.** Probiotic properties of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from aguamiel of agave salmiana. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 7(2) 107-117.
61. **DIAZ-MONTES E., 2021.** Dextran: Sources Structures and Properties. *Polysaccharides* 2(3) 554-565.
62. **DIAZ-MONTES E., YAÑEZ-FERNANDEZ J., CASTRO-MUÑOZ R., 2020.** Microfiltration-mediated extraction of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* SF3. *Food and Bioproducts Processing* 119 317-328.
63. **DIEP D.B., STRAUME D., KJOS M., TORRES C. NES I.F., 2009.** An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides* 30:1562-1574.
64. **DIOP M., ALVAREZ V., GUIRO A., THONART P., 2016.** Efficiency of Neutralized Antibacterial Culture Supernatant from Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria Supplemented with Salt in Control of Microorganisms Present in Senegalese Artisanally Handled Fish by Immersion Preservative Technology During Gueldj Seafood Processing at 10° c and 30° c. *International Journal of Food Microbiology* 1(1).

65. **DOLS M., 1996.** Etude de la dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B- 1299 production et application à la synthèse d'oligosides. Thèse de doctorat en Biologie et génétique moléculaires et cellulaires. *Biotechnologie Toulouse INSA P1*.
66. **Dong, Y., Zhu, H., Shen, Y., Zhang, W., Zhang, L. (2019).** Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against *Vibrio Natriegens*. *PLoS One*, 14(9), e 0222322.
67. **DOUGHERTY B.A., HILL C., WEIDMAN J.F., RICHARDSON D.R., ROSS R.P., 1998.** Sequence and analysis of the 60 kb conjugative bacteriocin producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Molecular Microbiology*.29: 1029 -1038.
68. **Du R., QIAO X., ZHAO F., SONG Q., ZHOU Q., WANG Y., PAN L., YE HAN Y., ZHOU Z., 2018.** Purification characterization and antioxidant activity of dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* from homemade wine. *Carbohydrate polymers* 198 529-536.
69. **DUBOIS M., GILLES K. A., HAMILTON J. K., REBERS P. A., SMITH F., 1956.** Colorimandric mandhods for dandermination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(3) PP 350-356.
70. **EMMANUEL C. K., KALPY-JULIEN C., LESSOY T., ERIC A. E., BERNADANDTE G. G., LAMINE N. S., MIREILLE D., 2017.** Probiotic profiling of *Leuconostoc* species isolated from a traditional fermented cassava product. *African Journal of Microbiology Research* 11(10) 408-413.
71. **ENNAHAR S., DESCHAMPS N., 2000.** Anti- *Listeria* effect of enterocin A produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01 relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol*. 88:449-457.
72. **EOM H.J., SEO D.M., HAN N.S., 2007.** Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* spp. Producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. *Int. J. Food Microbiol*. 117 61–67.
73. **FALCONER D.J., MUKERJEA R., ROBYT J.F., 2011.** Biosynthesis of dextrans with different molecular weights by selecting the concentra- tion of *Leuconostoc mesenteroides* B- 512FMC dextransucrase the sucrose concentration and the temperature. *Carbohydr Res* 346:280–284.
74. **FARINAZZO F. S., VALENTE L. J., ALMEIDA M. B. SIMIONATO A. S., FERNANDES M. T. C., MAURO C. S. I, GARCIA S., 2020.** Characterization and antioxidant

activity of an exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 from juçara fruits (*Euterpe edulis* Martius. *Process Biochemistry* 91 141-148.

75. **FARWA S., SHAH A.Q., AFSHEEN A., NUZHAT A., 2008.** Production et Characterization of a Unique Dextran from an Indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *Int. J. Biol. Sci.* 4 PP 379-386.

76. **FEKNOUS N., BOUMENDJEL M., MEKIDECHE F. DALICHAOUCHE N. ZAAFOUR M., MEKHANCHA D.E., TOUAFCHIA L., FEKNOUS I., ZENKI R., 2018.** Exploration de la qualité microbiologique de certains laits de chèvre du Nord-est algérien

77. **FLEMING H.R., ETCHELL G.L., COSTILOW R.N., 1975.** Microbial inhibition by isolate of *Pediococcus* from cucumber brine. *Appl and Microbiology* 30:104-1042.

78. **FLOREZ GUZMAN G. Y., HURTADO G. B., OSPINA S. A., 2018.** New dextransucrase purification process of the enzyme produced by *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 91.2. 98 based on binding product and dextransucrase hydrolysis. *Journal of biotechnology* 265 8-14.

79. **FRANCO O., PRIETO B., BERNARDO A., GONZÁLEZ PRIETO J., CARBALLO J., 2003.** Biochemical changes throughout the ripening of a traditional Spanish goat cheese variety (Babia-Laciana. *International Dairy Journal* 13(2) 221-230.

80. **GARCÍA P., RODRÍGUEZ L., RODRÍGUEZ A., MARTÍNEZ B., 2010.** Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology* 21(8) 373-382.

81. **GARCÍA-CANO I., ROCHA-MENDOZA D., ORTEGA-ANAYA J., WANG K. KOSMERL E., JIMÉNEZ-FLORES R., 2019.** Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic proteolytic and antibacterial proteins. *Applied microbiology and biotechnology* 103(13) 5243-5257.

82. **GARVIE E.I., 1984.** Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostocs* from other lactic acidbacteria. In: Gurtler V. Ball A.S. Soni S.,Eds.) *Methods in Microbiology. Elsevier Ltd. Berkshire UK* pp. 147–178.

83. **GHITA I., AZZAM A. M., EL SAYED N. E L., SADEK Z. I., ABDEL-KHALEK A. B., EMARA A. M., 2015.** Probiotic characteristics of some *Bifidobacteria* and *Leuconostoc* strains and growth behavior of the selected strains with different prebiotics. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences* 6(6) 789-802.

84. **GHOREISHI S. M., SHAHRESTANI R. G., 2009.** Innovative strategies for engineering mannitol production. *Trends in Food Science & Technology* 20(6) 263-270.
85. **GILES-GOMEZ M., SANDOVAL GARCIA J. G., MATUS V., CAMPOS QUINTANA I., BOLIVAR F., ESCALANTE A., 2016.** In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque a mexican traditional alcoholic beverage. *Springer Plus* 5(1) 1-10.
86. **GONG X., HUANG D. LIU Y., PENG Z. ZENG G., XU P., CHENG M., WANG R., WAN J., 2018.** Remediation of contaminated soils by biotechnology with nanomaterials: biobehavior applications and perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38 455e468.
87. **GU R.X., YANG Z.Q., LI Z.H., CHEN S.L., LUO Z.L., 2012.** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan Xinjiang and Bama Guangxi China. *Anaerobe* 14: 313-317.
88. **GUESSAS B., ET KIHAL M., 2004.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone: raw goats'milk. *African Journal of biotechnology.* 3(6) PP 339-342.
89. **GUESSAS B., 2006.** *Potentialité métabolique des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le biocontrol des Staphylococcus aureus.* Thèse de doctorat d'Etat Université d'Oran Algérie.
90. **GUINEE T.P., O'KENNEDY B.T., 2007.** Reducing salt in cheese and dairy spread dans Reducing salt in food: pratical strategies D. Kilcast et F. Angus (eds.) *Woodhead Publishing Limited Cambridge:* 316- 357.
91. **GUIRAUD J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. Technique et ingénierie. Série Agroalimentaire Eds. *Dunod Paris* P652.
92. **GUO M., BLOCK A., BRYAN C. D., BECKER D. F., ALFANO J. R., 2012.** *Pseudomonas syringae* catalases are collectively required for plant pathogenesis. *Journal of Bacteriology* 194(18) 5054-5064.
93. **HANSAL N., 2015.** Isolement purification identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de *Leuconostoc mesenteroides* isolé à partir du lait cru de chèvre. Mémoire en vue de l'obtention d'un diplôme magister en microbiologie fondamentale et appliquée *Université d'Oran* P17 108.

94. **HARUTOSHI T., 2013.** Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications. Biochemistry genetics and molecular biology. In: Kongo ML (ed) Lactic acid bacteria: R and D for food health and livestock purposes. *Rijeka InTech* pp 222–238.
95. **HATZIKAMARI M., LITOPOULOU-TZANETAKI E., TZANETAKIS N., 1999.** Microbiological characteristics of AnevatoI: a traditional Greek cheese. *Journal of Applied Microbiology* 87(4) 595-601.
96. **HE Y. L., YE M., DU Z. Z., WANG H. Y., WU Y. N., YANG L., 2014.** Purification characterization and promoting effect on wound healing of an exopolysaccharide from *Lachnum* YM405. *Carbohydrate Polymers* 105 169–176.
97. **HEINZE T., LIEBERT T., HEUBLEIN B., HORNIG S., 2006.** Functional polymers based on dextran. In: Klemm D., Ed.) Polysaccharides II. *Springer Berlin Heidelberg* pp. 199–291.
98. **HEMME D., 2012.** *Leuconostoc* and Its Use in Dairy Technology. In: Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology 2ème Edition. *CRC Press.* 73-108.
99. **HEMME D., FOUCAUD-SCHEUNEMANN C., 2004.** *Leuconostoc* characteristics use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal* 14(6) 467-494.
100. **HENNANE M., KARI L., 2013.** Optimisation de la production des exopolysaccharides (EPS) par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DZ en fonction de la source de carbone. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Alimentaire et Sanitaire. uni de Béjaia.
101. **HOLZAPFEL W. H., HABERER P., GEISEN R., BJÖRKROTH J., SCHILLINGER U., 2001.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition–. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73 365s-373s.
102. **HOLZAPFEL WH., BJORKROTH J., DICKS LM., 2009.** Genus I. *Leuconostoc* van Tieghem 1878 198 emend mut. char. Hucker and Pederson 1930 66AL. In: De Vos P. Garrity GD. Jones NR. Krieg W. Ludwig FA. Rainey K. Schleifer WB. *Whitman (Eds)* .
103. **HU C.B., MALAPHAN W., ZENDO T., NAKAYAMA J., SONOMOTO K., 2010.** Enterocin X a novel twopeptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5 has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Appl Environ Microbiol.* 76:4542-4545.
104. **HUANG S., HUANG G., 2019.** Preparation and drug delivery of dextran-drug complex. *Drug Deliv.* 26(1): 252-261.

105. **HUI Y. H., EVRANUZ E. Ö., 2016.** Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology 2^{ème} Edition: CRC Press.
106. **IBARBURU I., PUERTAS A. I., BERREGI I., RODRÍGUEZCARVAJAL M. A., PRIETO A., DUEÑAS M. T., 2015.** Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider. *International Journal of Biological Macromolecules* 214 54–62.
107. **ILIEV I., VASILEVA T., BIVOLARSKI V., SALIM A., MOREL S., RABIER P., GABRIEL V., 2018.** Optimization of the expression of levansucrase L17 in recombinant *E. Coli*. *Biotechnol Biotechnol Equip* 32:477–486.
108. **IRAVANI S., KORBKANDI H., MIRMOHAMMADI S.V., ZOLFAGHARI B., 2014.** Synthesis of silver nanoparticles: chemical physical and biological methods. *Curr. Res. Pharm. Sci.* 9 385e406.
109. **JAVAID A., OLOKETUYI S.F., KHAN M.M., KHAN F., 2018.** Diversity of bacterial synthesis of silver nanoparticles. *Bionanoscience* 8 43e59. *BioNanoScience* 8 (1) 43e59.
110. **JAVED B., IKRAM M., FAROOQ F., SULTANA T., MASHWANI Z. U. R., RAJA N. I., 2021.** Biogenesis of silver nanoparticles to treat cancer diabetes and microbial infections: A mechanistic overview. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105(6) 2261-2275.
111. **JORGE DE SOUZA T.A., ROSA SOUZA L.R., FRANCHI L.P., 2019.** Silver nanoparticles: an integrated view of green synthesis methods transformation in the environment and toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 171 691e700.
112. **JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE. 2017.** N° 746 Rabie Ethani 1439 25.
113. **KANDIAH M., CHANDRASEKARAN K. N., 2021.** Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Catharanthus roseus* Flower Extracts and the Determination of Their Antioxidant Antimicrobial and Photocatalytic Activity. *Journal of Nanotechnology* 2021.
114. **KANIMOZHI J., SIVASUBRAMANIAN V., GANESHMOORTHY I., SIVASHANKAR R., 2019.** Influence of Dextranucrase of *Weissella Cibaria* Nitcsk4 on low molecular weight Dextran yield: a statistical approach using mixed level taguchi design and artificial neural network. *Int J Innov Technol Explor Eng* 9:657–664.

115. **KEMPLER G. M., MCKAY L.L., 1980.** Improved medium for dandection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacandylactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 39(4) PP 926-927.
116. **KESKIN S., OYA N., KOÇBERBER KILIÇ N., DÖNMEZ G., TEKINAY T., 2016.** Green synthesis of silver nanoparticles using cyanobacteria and evaluation of their photocatalytic and antimicrobial activity. In *Journal of Nano Research* (Vol. 40 pp. 120-127. Trans Tech Publications Ltd.
117. **KHEDID K., FAID M., MOKHTARI A., SOULAYMANI A., ZINEDINE A., 2006.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Moroco. *Microbial.Res.10* PP 10-16.
118. **KHEDID K., FAID M., MOKHTARI A., SOULAYMANI A., ZINEDINE A., 2006.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Moroco. *Microbial.Res.10* PP 10-16.
119. **KHIN M.M., NAIR A.S., BABU V.J., MURUGAN R., RAMAKRISHNA S., 2012.** A review on nanomaterials for environmental remediation. *Energy Environ. Sci.* 5 8075e8109.
120. **KIHAL M., PREVOST H., LHOTTE M. E., HUANG D. Q., DIVIÈS C., 1996.** Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *Letters in applied microbiology* 22(3) 219-223.
121. **KIM M., CHUN J., 2005.** Bacterial community structure in Kimchi a Korean fermented vegetable food as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Int J Food Microbiol* 103: 91–96.
122. **KIM S. Y., KIM S. A., JANG Y. J., SEO S. O., HAN N. S., 2021.** Screening of endogenous strong promoters of *Leuconostoc citreum* EFEL2700 based on transcriptome analysis and its application for food-grade production of β -galactosidase. *Journal of Biotechnology* 325 1-6.
123. **KJOS M., NES I.F., DIEP D.B., 2011.** Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Appl Environ Microbiol.* 77:3335-3342.
124. **KLAENHAMMER T.R., 1988.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70:** 337-349.
125. **Koirala, P., Maina, N. H., Nihtilä, H., Katina, K., Coda, R. (2021).** Brewers' spent grain as substrate for dextran biosynthesis by *Leuconostoc pseudomesenteroides* DSM20193 and *Weissella confusa* A16. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1-13.

126. **KORA A. J., ARUNACHALAM J., 2011.** Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(5) 1209-1216.
127. **KORAKLI M., VOGEL R. F., 2006.** Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesized glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71(6) PP 790-803.
128. **Kothari, D., Das, D., Patel, S., Goyal, A. (2014).** Dextran and food application. *Polysaccharides*, 1-16.
129. **KUMAR A., VEMULA P. K., AJAYAN P.M., JOHN G., 2008.** Silver nanoparticle embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *Nature materials* 7(3) p.236.
130. **KUMAR A.S., MODY K., JHA B., 2007.** Bacterial exopolysaccharides— a perception. *J Basic Microbiol* 47:103–117.
131. **KUMAR C. G., MAMIDYALA S., K., 2011.** Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 84(2) 462-466.
132. **KUMAR P. V., PAMMI S. V. N., KOLLU P., SATYANARAYANA K. V. V., SHAMEEM U., 2014.** Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their anti-bacterial activity. *Industrial Crops and Products* 52 562-566.
133. **LABIOUI H., ELMOUALDI L., EL YACHIOUI M., OUHSSINE M., 2005.** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin-societe de pharmacie de bordeaux*. 144 237.
134. **LAHIRI D., CHAKRABORTI S., JASU A., NAG M., DUTTA B., DASH S., RAY R. R., 2020.** Production and purification of bacteriocin from *Leuconostoc lactis* SM 2 strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 30 101845.
135. **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 éd.*
136. **LARPENT J. P., LARPENT MG., 1990.** Memento technique de microbiologie. *Second Ed. Technique et Documentaire Lavoisier*. P 417.
137. **LASZTITY R., 2009.** Food quality and standards - Volume III: *EOLSS Publishers Company Limited*.

138. **LAVERMICOCCA P., REGUANT C., BAUTISTA-GALLEGO J., 2021.** Lactic Acid Bacteria Within the Food Industry: What Is New on Their Technological and Functional Role. *Frontiers in Microbiology* 12.
139. **LEBRES A. D., HAMZA A., 2002.** Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments (Microbiologie des laits et produits laitiers), *Institut Pasteur d'Algérie*. Pp : 704-706.
140. **LECLERCQ-PERLAT M.N., SAINT-EVE A., LE JAN E., RAYNAUD S., MORGE S., LEFRILEUX Y., PICQUE D., 2019.** Physicochemical and sensory evolutions of the lactic goat cheese Picodon in relation to temperature and relative humidity used throughout ripening. *Journal of Dairy Science* 102(6) 5713-5725.
141. **LEEMHUIS H., PIJNING T., DOBRUCHOWSKA J.M., VAN LEEUWEN S.S., KRALJ S., DIJKSTRA B.W., DIJKHUIZEN L., 2013.** Glucansucrases: three- dimensional structures reactions mechanism α -glucan analy- sis and their implications in biotechnology and food applica- tions. *J Biotechnol* 163:250–272.
142. **LEVEAU J.Y., BOUIX M., 1980.** "LA FLORE LACTIQUE" dans "technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro- alimentaire". Bourgeois C M Leveau JY. *A.p r i a. Paris*. PP 3-106.
143. **LIU S., 2003.** Practical implication of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of food Microbiology*. 83(2): 115-131.
144. **LULE V.K., SINGH R., POPHALY S.D., POONAM S.K., TOMAR S.K., 2016.** Produc- tion and structural characterisation of dextran from an indigenous strain of *Leuconostoc mesenteroides* BA08 in whey. *Int J Dairy Tech* 69:520–531.
145. **MAHAUT M., JEANTET R., BRULE G., 2000.** Initiation à la technologie fromagère. *Tec & Doc Lavoisier* 194p.
146. **MAKAROVA K., SLESAREV A., WOLF Y., SOROKIN A., MIRKIN B., KOONIN E., MILLS D., 2006.** Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(42) 15611-15616.
147. **MÄKI M., 2004.** Lactic acid bacteria in vegetable fermentations. In: Salminen S von Wright A Ouwehand A (eds) Lactic acid bacterium. Microbiological and functional aspects 3rd edn. *Marcel Dekker New York/Basel* pp 419–430.

148. **MARCHAL N., BOURDON J. L., RICHARD C., 1991.** Les milieux de culture : pour l'isolement and l'identification biochimique des bactéries. *Lavoisier. Paris.*
149. **MARTIN R., LANGA S., REVIRIEGO C., JIMINEZ E., MARIN M. L., XAUS J. FERNANDEZ L., RODRIGUEZ J. M., 2003.** Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics* 143(6) 754-758.
150. **MATEI A., MATEI S., MATEI G. M., COGĂLNICEANU G., CORNEA C. P., 2020.** Biosynthesis of silver nanoparticles mediated by culture filtrate of lactic acid bacteria characterization and antifungal activity. *The EuroBiotech Journal* 4(2) 97-103.
151. **MATHOT A.G., KIHAL M., PREVOST H., DIVIES C., 1994.** Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar medium. *Int. J. Dairy* 4 PP 459-469.
152. **MAURAY S., DE RAUCOURT E., CHAUBAND F., MAÏGA-REVEL O., STERNBERG C., FISCHER A. M., 1998.** Comparative anticoagulant activity and influence on thrombin generation of dextran derivatives and of a fucoidan fraction. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 9(4) PP 373-387.
153. **MAURER-JONES M.A., GUNSOLUS I.L., MURPHY C.J., HAYNES C.L., 2013.** Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Anal. Chem.* 85 3036e3049.
154. **MAURYA A.P., THAKUR R.L., 2012.** Inhibition spectrum purification and characterization of bacteriocin from *Leuconostoc* NT-1. *Current Science* .103(12): 1405 1407.
155. **MAYEUX J.V., SANDINE W.W.E., ELLIKER P.R., 1962.** "A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures" *J. Dairy. Sci.* 45 PP. 655-656.
156. **MAYEUX J.V., SANDINE W.W.E., ELLIKER P.R., 1962.** "A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures" *J. Dairy. Sci.* 45 PP. 655-656.
157. **MÄYRÄ-MÄKINEN A., BIGRET M., 2004.** Industrial use and production of lactic acid bacteria. *In: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects* (Salminen S. Wright A.V. et Ouwehand A. *3e Ed. Marcel Dekker Inc.* New York. 73-102.
158. **MEGHOUFEL N. L., 2019.** Etude de la diversité taxinomique et technologique des bactéries lactiques isolées au cours de la production de Jben et approche moléculaire de leurs interactions au microcosme fromager (*Doctoral dissertation Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis.*

159. **MENACER A., SAIDI F., BENHELAL A., 2017.** In vitro evaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits d'*Allium triquetrum* L. espèce algérienne spontanée. *Rev. ElWahat pour les Rech. les Etudes* vol. 10 p. 152-161.
160. **MENSINK M.A., Frijlink H.W., van der VOORT MAARSCHALK K., Hinrichs W.L.J., 2015.** Inulin a flexible oligosaccharide I: review of its physicochemical characteristics. *Carbohydr Polym* 130:405–419.
161. **MIAO M., BAI A., JIANG B. SONG Y., CUI S. W., ZHANG T., 2014.** Characterisation of a novel water-soluble polysaccharide from *Leuconostoc citreum* SK24.002. *Food Hydrocolloids* 36(5) 265–272.
162. **MILLIERE J. B., MATHOT A. G., SCHMITT P., DIVIES C., 1989.** Phenotypic characterization of *Leuconostoc* species. *Journal of Applied Bacteriology* 67 529-542.
163. **MISRA V., MALL A. K., SHRIVASTAVA A. K., SOLOMON S. SHUKLA S. P., ANSARI M. I., 2019.** Assessment of *Leuconostoc* spp. invasion in standing sugarcane with cracks internode. *Journal of Environmental Biology* 40(3) 316-321.
164. **MOKOENA M. P., 2017.** Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules* 22(8) 1255.
165. **MONDAL A. H., YADAV D., ALI A., KHAN N., JIN J. O., HAQ Q. M. R., 2020.** Anti-bacterial and anti-candidal activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Citrobacter* spp. MS5 culture supernatant. *Biomolecules* 10(6) 944.
166. **MONIKA A., ROMUALD S., JOANNA K., GRAZYNA BP., 2015.** Accumulation of Platinum Nanoparticles by *Sinapis alba* and *Lepidium sativum* Plants. *Water Air Soil Poll* 226: 1-7.
167. **MONNET V., LATRILLE E., BEAL C., CORRIEU G., 2008.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M. *Tec & Doc Lavoisier. Paris* 512-592.
168. **MOUMENE M., 2015.** Isolement et identification des bactéries lactiques et étude de l'effet antagoniste vis-à-vis des germes pathogènes (Doctoral dissertation).
169. **MOZZI F., RAYA R. R., VIGNOLO G. M., 2015.** Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Wiley.
170. **MÜNDEL F., BECHTNER J., ECKEL V., FISCHER A., HERBI F. JAKOB F., WEFERS D., 2019.** Detailed structural characterization of glucans produced by glucansucrases

from *Leuconostoc citreum* TMW 2.1194. *Journal of agricultural and food chemistry* 67(24) 6856-6866.

171. **MUTHUSAMY G., THANGASAMY S., RAJA M., CHINNAPPAN S., KANDASAMY S., 2017.** Biosynthesis of silver nanoparticles from *Spirulina* microalgae and its antibacterial activity. *Environmental Science and Pollution Research* 24(23) 19459-19464.

172. **NACHER-VAZQUEZ M., BALLESTEROS N., CANALES A., RODRIGUEZ SAINT-JEAN S., PEREZ-PRIANDO S. I., PRIANDO A., AZNAR R., LOPEZ P., 2015.** Dextrans produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses. *Carbohydrate Polymers* 125 PP292-301.

173. **NAESSENS M., CERDOBBEL A., SOETAERT W., VANDAMME E.J., 2005.** *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production properties and applications. *J Chem Technol Biotechnol* 80:845–860.

174. **NIANG I., AYEISSOU N., NDIAYE M. A., BEYE C., DIOP A., 2020.** Qualité microbiologique des fromages de chèvre au Sénégal. *Afrique SCIENCE* 16(4) 114-122.

175. **NIKOLIC M. V., MIJAJLOVIC M. Ž., JEVTIC V. V., RATKOVIC Z. R., RADOJEVIC I. D., ČOMIC LJ. R., NOVAKOVIC S. B., BOGDANOVIC G. A., TRIFUNOVIC S. R., RADIC G. P., 2014.** Synthesis characterization and antimicrobial activity of copper (II) complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper (II) complex with S-methyl derivative of thiosalicylic acid. *Polyhedron* 79 80–87.

176. **NOTARARIGO S., NÁCHER-VÁZQUEZ M., IBARBURU I., WERNING M. L., DE PALENCIA P. F., DUEÑAS M. T., PRIETO A., 2013.** Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Carbohydrate polymers* 93(1) 57-64.

177. **NOVOTNY J. F., PERRY J. J., 1992.** Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans* a thermophilic hydrocarbon-utilizing species. *Applied and environmental microbiology*. 58(8): 2393-2396.

178. **NURAIDA L., 2015.** A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Science and Human Wellness* 4(2) 47-55.

179. **ODDO E., SAIANO F., ALONZO G., BELLINI E., 2002.** An investigation of the seasonal pattern of mannitol content in deciduous and evergreen species of the *Oleaceae* growing in northern Sicily. *Annals Botany* 90(2) 239-243.

180. **OHMOMO S., MURATA S. KATAYAMA N., NITISINPRASART S., KOBAYASHI M. NAKAJIMA T., YAJIMA M., NAKANISHI K., 2000.** Purification and some characterization of enterocin ON-157 a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 81-89.
181. **ONILUDE A.A., OLAOYE O., FADAHUNSI I.F., OWOSENI A., GARUBA E.O., ATOYEBI T., 2013.** Effects of cultural conditions on dextran production by *Leuconostoc* spp. *Int Food Res J* 20:1645–1651.
182. **ORLA-JENSEN S., 1921.** The main lines of the natural bacterial System. *Journal of Bacteriology* 6(3) 263-273.
183. **OSTERLUND B., JANSON J. C., 1997.** A strategic approach to protein purification [Description des strategies de purification methodes de Management.] Part 1. *Pharm. Biotech* 2 8-10.
184. **OTTO K. ELWING H., HERMANSSON M., 1999.** Effect of ionic strength on initial interactions of *Escherichia coli* with surfaces studied on-line by a novel quartz crystal microbalance technique. *J Bacteriol* 181: 5210–18.
185. **OUADGHIRI M., 2009.** Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés «Lben» et «J'ben» d'origine marocaine.
186. **ÖZCAN E. SELVI S. S., NIKEREL E., TEUSINK B., ÖNER E. T., ÇAKIR T., 2019.** A genome-scale metabolic network of the aroma bacterium *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Applied microbiology and biotechnology* 103(7) 3153-3165.
187. **PAPAGIANNI M., 2012.** Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. *Microbial cell factories* 11(1) 1-13.
188. **PARENTE E., RICCIARDI A., 1999.** Production recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52(5) 628-638.
189. **PATEL T. K., WILLIAMSON J. D., 2016.** Mannitol in plants fungi and plant–fungal interactions. *Trends in plant science* 21(6) 486-497.
190. **PEREZ F. HUJER M.A., HUJER K.M., DECKER B.K., RATHER P.N., BONOMO RA., 2007.** Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.*;51(10):3471–3484.
191. **PEREZ R. H., ZENDO T., SONOMOTO K., 2014.** Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial cell factories* 13(1) 1-13.

192. **PÉREZ-RAMOS A. NÁCHER-VÁZQUEZ M., NOTARARIGO S., LÓPEZ P., MOHEDANO M., L., 2015.** Current and future applications of bacterial extracellular polysaccharides. Probiotics Prebiotics and Synbiotics. Eds. Preedy VR Watson RR ISBN: 9780128021897.
193. **PIARD J. C., MURIANA P. M., DESMAZEAUD M. J., KLAENHAMMER T. R., 1992.** Purification and partial characterization of lacticin 481 a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology* 58(1) 279-284.
194. **PIVA A., HEADON D. R., 1994.** Pediocin A bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. *Microbiology* 140(4) 697-702.
195. **POORNIMA S., VALIVITTAN K., 2017.** Degradation of malachite green (dye) by using photo-catalytic biogenic silver nanoparticles synthesized using red algae (*Gracilaria corticata*) aqueous extract. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 6 62-70.
196. **PUGAZHENDHI A., PRABAKAR D., JACOB J. M., KARUPPUSAMY I., SARATALE R. G., 2018.** Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Gelidium amansii* and its antimicrobial property against various pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis* 114 41-45.
197. **PURAMA R.K. GOSWAMI P., KHAN A.T., GOYAL A., 2009.** Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Carbohydr Polym* 76:30–35.
198. **QUADRI L. KLEEREBEZEM M., KUIPERS O.P., DE VOS W.M., ROY K.L., VEDERAS J.C., 1997.** Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J Bacteriol.* 179:6163-6167.
199. **RAFIQUE M., SADAF I., RAFIQUE M.S., TAHIR M.B., 2016.** A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.* 45 (7) 1272e1291.
200. **RAHMAN A. U., KHAN A. U., YUAN Q., WEI Y., AHMAD A., ULLAH S., AHMAD W., 2019.** Tuber extract of *Arisaema flavum* eco-benignly and effectively synthesizes silver nanoparticles: Photocatalytic and antibacterial response against multidrug resistant engineered *E. coli* QH4. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 193 31-38.

201. **RANDAZZO C.L., TORRIANI S., AKKERMANS A.D., DE VOS W.M., VAUGHAN E.E., 2002.** Diversity dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and environmental Microbiol.* 68 1882-1892.
202. **RANGANATH E., RATHOD V., BANU A., 2012.** Screening of *Lactobacillus* spp for mediating the biosynthesis of silver nanoparticles from silver nitrate. *IOSR Journal of Pharmacy* 2(2) 237-241.
203. **REINA A., TANAKA A., UEHARA A., SHIZATO I., TORIDE Y., USUI N., HIRAKAWA K., TAKAHASHI J., 2010.** Effects of protease-resistant antimicrobial substance produced by lactic acid bacteria on rumen methanogenesis. *Asian-Aust J Anim Sci* 23 700–707. 90444.
204. **RIVOLLIER M., CHRISTIEANS S., 2009.** Etude de la thermorésistance des souches de *Leuconostoc* majoritairement responsables des altérations observées dans le jambon cuit prétranché. *Viande Prod. Carné.* 27 :89-93.
205. **ROKOP Z. P., HORTON M. A., NEWTON I. L. G., 2015.** Interactions between cooccurring lactic acid bacteria in honey bee hives. *Applied and Environmental Microbiology* 81(20) 7261-7270.
206. **ROSENBERG E., DELONG E.F., LORY S., STACKEBRANDT E., THOMPSON F., 2014.** The prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes 4Ed *Springer* pp 215-228.
207. **ROY K., SARKAR C. K., GHOSH C. K., 2015.** Photocatalytic activity of biogenic silver nanoparticles synthesized using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) extract. *Applied Nanoscience* 5(8) 953-959.
208. **RUAS-MADIEDO P. N., SALAZAR C.G., de los REYES-GAVILAN., 2009.** Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In: Matthias U.,ed.) *Bacterial Polysaccharides. Current Innovations and Future Trends. Caister Academic Press Norfolk UK.* 16,279-310.
209. **RÜHMKORF C., RÜBSAM H., BECKER T., BORK C., VOIGES K., MISCHNICK P., 2012.** Effect of structurally different microbial homoexopolysaccharides on the quality of gluten-free bread. *European Food Research & Technology* 235(1) 139–146.
210. **RUIZ RODRÍGUEZ L. G., MOHAMED F., BLECKWEDEL J., MEDINA R., DE VUYST L., HEBERT E. M., MOZZI F., 2019.** Diversity and functional properties of lactic acid

bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. *Frontiers in microbiology* 10 1091.

211. **RUPPITSCH W., NISIC A., HYDEN P., CABAL A., SUCHER J., STÖGER A., MARTINOVIĆ A., 2021.** Genetic Diversity of *Leuconostoc mesenteroides* Isolates from Traditional Montenegrin Brine Cheese. *Microorganisms* 9(8) 1612.

212. **RYAN M. P., REA M. C., HILL C., ROSS R. P., 1996.** An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin lacticin 3147. *Applied and environmental microbiology*. 62(2): 612-619.

213. **SÄDE E., 2011.** *Leuconostoc* spoilage of refrigerated packaged foods. Thèse de Doctorat. University of Helsinki. *Faculty of Veterinary Medicine. Finland* P57.

214. **SAHA B. C., RACINE F. M., 2011.** Biotechnological production of mannitol and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89(4) 879-891.

215. **SALMAN J. A. S., KAREEM A. J., 2021.** Antibacterial and Anti virulence factors of Purified Dextran from *Lactobacillus gasseri* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Jordan Journal of Biological Sciences* 14(1).

216. **SALMINEN S., VON WRIGHT A., 2004.** Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional Aspects *CRC Press* 798 USA.

217. **SALOMONI R., LÉO P. MONTEMOR A. F., RINALDI B. G., RODRIGUES M. F. A., 2017.** Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotechnology science and applications* 10 115.

218. **SANCHEZ J.I., MARTINEZ B., GUILLEN R., JIMENEZ D.R., RODRIGUEZ A., 2006.** Culture Conditions Determine the Balance between Two Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *App. Envirenm. Micro. Vol. 72 N° 12.* P 7495–7502.

219. **SARATALE R.G., KARUPPUSAMY I., SARATALE G.D., PUGAZHENDHI A., KUMAR G., PARK Y., GHODAKE G.S., BHARGAVA R.N., BANU J.R., SHIN H.S., 2018.** A comprehensive review on green nanomaterials using biological systems: recent perception and their future applications. *Colloids Surf. B* 170 20e35.

220. **SARAVANAN A., KUMAR P. S., KARISHMA S., VO D. V. N., JEEVANANTHAM S., YAASHIKAA P. R., GEORGE C. S., 2020.** A review on biosynthesis of metal nanoparticles and its environmental applications. *Chemosphere* 128580.

221. **SARAVANAN C., RAJESH R. KAVIARASAN T., MUTHUKUMAR K., KAVITAKE D., SHETTY P., H., 2017.** Synthesis of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its application for degradation of azo-dyes. *Biotechnology Reports* 15 33-40.
222. **SARAVANAN M., AROKIYARAJ S., LAKSHMI T., PUGAZHENDHI A., 2018a.** Synthesis of silver nanoparticles from *Phenerochaete chryso sporium* (MTCC-787) and their antibacterial activity against human pathogenic bacteria. *Microb. Pathog.* 117 68e72.
223. **SARAVANAN M., BARIK S.K., MUBARAKALI D., PRAKASH P., PUGAZHENDHI A., 2018b.** Synthesis of silver nanoparticles from *Bacillus brevis* (NCIM 2533) and their antibacterial activity against pathogenic bacteria. *Microb. Pathog.* 116 221e226.
224. **SAVADOGO A., 2004.** Caractérisation biochimique et : Moléculaire des bactéries Lactiques productrices d'exopolysaccharides isolées à partir d'échantillons de lait fermenté du Burkina faso. *Doctorat en sciences biologique appliquée spécialité biochimie et biotechnologie P* 26.
225. **SCHLEIFER K. H., 2015.** *Leuconostocaceae* fam. nov. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria: *John Wiley & Sons Ltd. UK.*
226. **SCHMID J., 2018.** Recent insights in microbial exopolysaccharide biosynthesis and engineering strategies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 53 130–136.
227. **SHEHATA M.G., EI SOHAIMY S.A., EI_SAHN M.A., YOUSSEF M.M., 2016.** screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *AOAS.* 61: 65-75.
228. **SHOBHARANI P., AGRAWAL R., 2009.** Supplementation of adjuvants for increasing the nutritive value and cell viability of probiotic fermented milk beverage. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60(6) 70-83.
229. **SILVA C.C.G., SILVA S.P.M., RIBEIRO S.C., 2018.** Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Front. Microbiol.* 9: 594.
230. **SONAR N. R., HALAMI P. M., 2014.** Phenotypic identification and technological attributes of native lactic acid bacteria present in fermented bamboo shoot products from North-East India. *Journal of food science and technology* 51(12) 4143-4148.
231. **SORRELLS K. M., SPECK M. L., 1970.** Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*. *Journal of dairy science* 53(2) 239-241.

232. **SPARO M.D., CASTRO M.S., ANDINO P.J., LAVIGNE M.V., CERIANI C., GUTIEERREZ G.L., 2006.** Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Appl Microbiol.* 100:123-134.
233. **SPENCER J. F. T., de SPENCER A. L. R., 2004.** Environmental Microbiology: Mandhods and Protocols: Humana Press. Totowa NJ.
234. **SPRULES T., KAWULKA K.E., VEDERAS J.C., 2004.** NMR solution structure of ImB2 a protein conferring immunity to antimicrobial activity of the type IIa bacteriocin carnobacteriocin B2. *Biochemistry* 43:11740-11749.
235. **STRUS M., GOSIEWSKI T., KOCHAN P., HECZKO P.B., 2006.** The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. *FEMS Immunology Medical and Microbiology.* 48:56-63.
236. **SUMARSIH S., SULISTIYANTO B., SUTRISNO C. I., 2012.** Characteristics stability and antimicrobial activity of lactic acid bacteria (*Leuconostoc* sp) isolated from broiler's caecum during storage. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture* 37(1) 70-76.
237. **TADJINE D., BOUDALIA S., BOUSBIA A., GUEROUI Y., SYMEON G., MEBIROUK BOUDECHICHE L., TADJINE A., CHEMMAM M., 2020.** Milk heat treatment affects microbial characteristics of cows' and goats' "Jben" traditional fresh cheeses. *Food Science and Technology* 41 136-143.
238. **TAGG J.R., MCGIVEN A.R., 1971.** Assay system for bacteriocins. *J. Appl. Microbiol.* 21: 943.
239. **TAGG J. R., READ R. S. D., MCGIVEN A. R., 1971.** Bacteriocine production by group A streptococci. *Pathology* 3(4) 277-278.
240. **TAMIME A.Y., 2002.** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K. 3e Ed. *John Wiley and Sons Inc. New York* 261-366.
241. **TANG W.W., ZENG G.M., GONG J.L., LIANG J. XU P., ZHANG C., HUANG B.B., 2014.** Impact of humic/fulvic acid on the removal of heavy metals from aqueous solutions using nanomaterials: a review. *Sci. Total Environ.* 468 1014e1027.
242. **TANIGAWA K., KAWABATA H., WATANABE K., 2010.** Identification and typing of *Lactococcus lactis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 76 4055-4062.

243. **TANTAOUI-ELARAKI A., EI MARRAKCHIT A., 1987.** Study of Moroccan dairy products: *Iben and smen*. *MIRCEN Journal* 3: 211-220.
244. **TARAN M., RAD M., ALAVI M., 2016.** Characterization of Ag nanoparticles biosynthesized by *Bacillus* sp. HAI4 in different conditions and their antibacterial effects. *J Appl Pharm Sci* 6(11) 094-099.
245. **TERZIĆ-VIDOJEVIĆ A., TONKOVIĆ K., PAVUNC A. L., BEGANOVIĆ J., STRAHINIĆ I., KOJIĆ M., TOPISIROVIĆ L., 2015.** Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. *LWT-Food Science and Technology* 63(1) 298-306.
246. **THIYAGARAJAN P., THIRUMALAISAMY R., THANGASAMY S., CHINNAPPAN S., SENGOTTAIYAN A., PALANISAMY S., PRIYA G., NISHA JC., 2017.** Optimization of dextran production from cabbage waste using *Leuconostoc mesenteroides*. *International Journal of Advances in Interdisciplinary Research*.4: 24-31.
247. **THOMAS B., VITHIYA B., PRASAD T., MOHAMED S. B., MAGDALANE C. M., KAVIYARASU K., MAAZA M., 2019.** Antioxidant and photocatalytic activity of aqueous leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 19(5) 2640-2648.
248. **THOMPSON J.K., COLLINS M.A., MERCER W.D., 1996.** Characterisation of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ 450. *J. Appl. Bacteriol* 80 338– 348.
249. **TODOROV S.D., 2009.** Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*: production genetic organization and mode of action. *Braz J Microbiol.* 40:209-221.
250. **TODOROV S.D., STOJANOVSKI S., ILIEV I., MONCHEVA P., NERO L.A., IVANOVA I.V., 2017.** Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian fermented meat product “lukanka”. *Br J Microbiol* 48(3): 576-586.
251. **TRIAS R., BADOSA E., MONTESINOS E., BAÑERAS L., 2008.** Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. *Inter J Food Microbiol* 127(1): 91-98.
252. **UELI WYSS., 2014.** Qualité du lait Du lait avec plus d’herbe et moins de concentrés. *Institut des sciences production animale. Département fédéral de l’économie de la formation et de la recherche DEFR Agroscope P3.*

253. **Van BELKUM M.J., STILES M.E., 2000.** Nonlantibiotic antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Nat Prod Rep.* 17:323-365.
254. **van MASTRIGT O., ABEE T., SMID E. J., 2017.** Complete genome sequences of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. diacetylactis FM03 and *Leuconostoc mesenteroides* FM06 isolated from cheese. *Genome announcements* 5(28) e00633-17.
255. **Van TIEGHEM M. P., 1880.** Sur Quelques Bactéries Agrégées. *Bulletin de la Société Botanique de France* 27(5) 148-153.
256. **VETTORI M.H.P.B., BLANCO K.C., CORTEZI M. DE LIMA C.J.B., CONTIERO J., 2012.** Dextran: effect of process parameters on production purification and molecular weight and recent applications. *Dialogos Ciencia* 31:171–186.
257. **VETTORI M.H.P.B., FRANCHETTI S. M. M., CONTIERO J., 2012.** Structural characterization of a new dextran with a low degree of branching produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B dextransucrase. *Carbohydrate Polymers* 88 1440– 1444.
258. **Vidhya L.D., Roshmi T., Rintu T.V., Soniya E.V., Jyothis M., Radhakrishnan E.K., (2014).** Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area. *3 Biotech*; 4(2): 121-126.
259. **VIJAYENDRA S.V.N., SHARATH BABU R.S., 2008.** Optimization of a new heteropolysaccharide production by a native isolate of *Leuconostoc* sp. CFR-2181. *Lett Appl Microbiol* 46:643–648.
260. **VINOD KUMAR J., SOMESH S., NEERJA S., 2006.** « Production purification stability and efficacy of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables ». *Food technology and Biotechnology.* 44 (3):435- 439.
261. **WANG Y., AMETAJ B.N., AMBROSE D.J., GÄNZLE M.G., 2013.** Charcterization of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocinproducing *Pediococcus acidilactic*. *BMC Microbiology* 13: 19-25.
262. **WANG Y., NI Y., 2014.** New insight into protein–nanomaterial interactions with UV-visible spectroscopy and chemometrics: human serum albumin and silver nanoparticles. *Analyst* 139(2) 416-424.
263. **WELMAN A. D., MADDOX I. S., 2003.** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology* 21 PP 269-274.

264. **WERNING M. L., NOTARARIGO S., NACHER M., FERNANDEZ DE PALENCIA P., AZNAR R., LOPEZ P., 2012.** Biosynthesis purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In: El-Samragy Y.,Ed.. *Food additives. Intech Croacia*:. 83-114.
265. **WOUTERS E., 2002.** Chronic obstructive pulmonary disease• 5: Systemic effects of COPD. *Thorax* 57(12) 1067.
266. **WU Y., PANG H. LIU Y., WANG X., YU S., FU D., CHEN J., WANG X., 2019.** Environmental remediation of heavy metal ions by novel-nanomaterials: a review. *Environ. Pollut.* 246 608 e 620.
267. **XU R., MA S., WANG Y., LIU L., LI P., 2010.** Screening identification and statistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT. *African Journal of Microbiology Research.* 4(9) PP 783-795.
268. **YADAV R., PUNIYA A. K., SHUKLA P., 2016.** Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an indigenous fermented beverage raabadi. *Frontiers in Microbiology* 7 1683.
269. **ZACHAROF M. P., LOVITT R. W., 2012.** Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *Apcbee Procedia* 2 50-56.
270. **ZADI-KARAM H., KARAM N-E., 2006.** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie : mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie Uni. d'Oran-Sénia 31000 Oran Algérie.* PP 153-156.
271. **ZALACAIN I., ZAPELENA M.J., ASTIASARAN I., BELLO J., 1996.** Addition of lipase from *Candida cylindracea* to a traditional formulation of a dry fermented sausage. *Meat science* 42: 155-163.
272. **ZAMFIR M., CALLEWAERT R., CORNEA P.C., SAVU L., VATAFU I., De VUYST L., 1999.** Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *J Appl Microbiol.* 87:923-931.
273. **ZAROOR K., BENMECHERNENE Z., HADADJI M., MOUSSA-BOUDJEMAA B., BENHENNI J.E., KIHAL M., 2013.** Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Revue « Nature & Technologie ».* B- Sciences Agronomiques et Biologiques n° 08 PP 39 – 47.

274. **ZAROOR K., LLAMAS M. G., PRIETO A., RUAS-MADIEDO P., DUEÑAS M. T., De PALENCIA P. F., AZNAR R., KIHAL M., LOPEZ P., 2017.** Rheology and bioactivity of high molecular weight dextrans synthesised by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers* 174 646-657.
275. **ZAROOR K., PRIETO A., PÉREZ-RAMOS A., KIHAL M., LÓPEZ P., 2018.** Analysis of technological and probiotic properties of Algerian *L. mesenteroides* strains isolated from dairy and non-dairy products. *Journal of functional foods* 49 351-361.
276. **ZHANG W., LIU M., DAI X., 2013.** Biological characteristics and probiotic effect of *Leuconostoc lactis* strain isolated from the intestine of black porgy fish. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(3) 685-691.
277. **ZHENG J., WITTOUCK S., SALVETTI E., FRANZ C. M., HARRIS H. M., MATTARELLI P., 2020.** A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901 and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70 2782–2858.
278. **ZHU Y., LIU X., HU Y., WANG R., CHEN M., WU J., WANG Y., KANG S., SUN Y., ZHU M., 2019.** Behavior remediation effect and toxicity of nanomaterials in water environments. *Environ. Res.* 174 54e60.
279. **ZIKMANIS P., BRANTS K., KOLESOV S., SEMJONOV S., 2020.** Extracellular polysaccharides produced by bacteria of the *Leuconostoc* genus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36(11) 1-18.

ANNEXES

Annexe 1

Milieux de cultures

Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	10g
Polypeptone	10g
citrate de sodium	2g
acétate de sodium	5g
Glucose	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0.25g
MnSO ₄	0.05g
Agaragar	15g
Eau distillée	1000ml
pH 6.8	
Autoclavage 120°C/ 20 minutes	

Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)

Extrait de levure	2.5g
Extrait de viande	5g
Peptone	10g
Acide ascorbique	0.5g
Lactose	2g
L-arginine	4g
Bleu de bromothymol	0.05g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH 6.8 / Autoclavage 120°C/20minutes	

Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)

Tryptone	20g
Gélatine	2.5g
Extrait de levure.	5g
Saccharose	100g
Glucose	5g
Citrate de sodium	1g
Azide de sodium	0.075g
Agar-agar.	15g
Eau distillée	1000ml
pH 6.8	
Autoclavage 120°C/20minutes	

Milieu KMK (Kempler et Mc Kay, 1980)

Extrait de levure	3g
Biopolytone	2.5g
Glucose	5g
Agar-agar	
Eau distillée	15g
pH 6.8	1000ml
Autoclavage 121°C/15minutes	

Milieu MRS BCP

MRS (milieu liquide) moins l'extrait de viande et sans sucre	1000ml
Bleu de bromothymol.	0.025ml
pH 7	
Autoclavage 120°C/20minutes	

Gélose PCA (Plant Count Agar)

Tryptone	5g
Extrait autolytique de levure	2.5g
Glucose	1g
Agar bactériologique	12g
Autoclaver pendant 15 min à 121°C	
pH 7	

Gélose Chapman

Extrait de viande	3g
Extrait de levure	3g
Tryptone	5g
NaCl	7g
Peptone bactériologique	10g
Eau distillée	1000ml
Autoclaver pendant 15 min à 121°C	
pH 7	

Milieu Mueller-Hinton

Infusion de viande de bœuf	3000 cm ³
	17,5 g
Peptone de caséine	
Amidon de maïs	
Agar-agar	1,5 g
Eau distillé	17 g

pH 7.4 1000ml
Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Milieu BCPL

Extrait de viande 1g
Peptone de caséine 7g
Lactose 5g
PCB 1% 0,03
Eau distillée 1000ml
Autoclaver pendant 15 min à 121°C
pH 6.7±0.2

Milieu Roth

Extrait de viande 1,5g
Peptone de caséine. 20g
Glucose. 0,4g
Chlorure de sodium 4g
Phosphate dipotassique 2,7g
Phosphate monopotassique 2,7g
Acide de sodium 0,2g
Eau distillée 1000ml
Autoclaver pendant 15 min à 121°C
PH6.7±0.1

Milieu Listsky

Peptone 20g
Glucose 5g
Chlorure de sodium 5g
Phosphate dipotassique 2,7g
Phosphate monopotassique 2,7g
Eau distillée 1000ml
Autoclaver pendant 15 min à 121°C
pH. 6,8 à 7.

Milieu viande foie

Viande digérée dans la peptone tryptique 10 g
Extrait de viande 10 g
Extrait de levure 1,5 g
Amidon 1 g
Acétate de sodium hydraté 5 g
Glucose 1 g
Chlorhydrate de L - cystine 0,5 g

Eau distillée	1000 ml
pH 7	
Autoclavage 120°C/20 min	

Réactifs à additionner : sulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), solution à 4 % (m/m). Dissoudre 4 g de sulfite de sodium anhydre dans 100 ml d'eau. Stériliser par filtration. Conserver entre 2 et 5 °C.

Il est conseillé de préparer une nouvelle solution tous les 14 jours. Citrate de fer (III) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$), solution à 7% (m/m). Dissoudre 7 g de citrate de fer (III) dans 100 ml d'eau, stériliser par filtration.

Conserver entre 2 et 5 °C. Il est conseillé de préparer une nouvelle solution tous les 14 jours.

Eau Physiologique péptonée

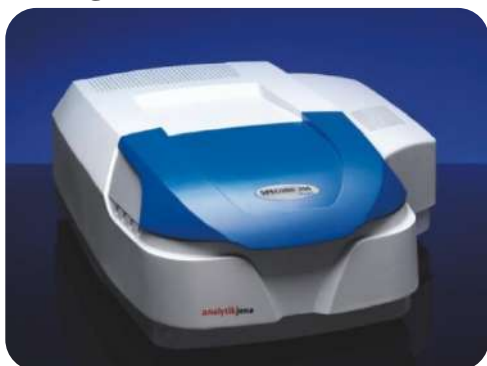
Chlorure de sodium	8.5g
Peptone	0.5g
Eau distillée	1000ml
pH 7	
Autoclavage 120°C/20 min	

Solution de NaOH 0,1N

Eau distillé	1000ml
NaOH	40g

Annexe 2

Appareillage



UV Visible



Four pasteur



Microscope Optique



Bain marie



Incubateur bactériologique



Balance très haute précision



Microscope électronique à balayage



Centrifugeuse

**REGULAR ARTICLE**

Optimization of dextran production from *Leuconostoc* strains isolated from different dairy products from Ouargla region Algeria

M'hamed Bouricha^{1*}, Roukia Hammoudi¹, Soumia Djelloul Daouadji², Samia Bissati Bouafia³, Mahfoud Hadj Mohammed¹, Abdellah Henni^{4*}

¹Biogeochemistry of Desert Environments Laboratory, Faculty of Natural Science and Life, University of Kasdi Merbah Ouargla, Algeria

²Laboratory of Molecular Microbiology Proteomics and Health, Department of Biology, Faculty of Natural Science and Life, University of Djillali Liabes Sidi Bel Abbes, Algeria

³Saharian Bio-Resources Laboratory, Faculty of Natural Science and Life, University of Kasdi Merbah Ouargla, Algeria

⁴Lab. Dynamic Interactions and Reactivity of Systems, Kasdi Merbah University, Ouargla 30000, Algeria

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 22 Aug 2021

Revised: 25 Nov 2021

Accepted: 26 Nov 2021

***Corresponding Author:**

Email: bouricha.mhamed@yahoo.fr

Telephone:

Keywords: Exopolysaccharide; dextran; *Leuconostoc*; optimization, Dairy products

ABSTRACT

Leuconostoc (Ln) sp. belongs to a group of lactic acid bacteria, which has the capacity to produce dextran (an exopolysaccharides) in the presence of sucrose. Dextran is industrially important, it was the first microbial exopolysaccharide affirmed for commercial use. This study aimed to optimize the production of the synthesized dextran by Ln strains species isolated from different dairy products. Morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics were employed to identify 23 isolated strains. We have identified the species: *Ln. gelidum*, *Ln. carnosum*, *Ln. citreum*, *Ln. fallax*, *Ln. mesenteroides* subsp *mesenteroides*, *Ln. mesenteroides* subsp *dextranicum*, *Ln. mesenteroides* subsp *cremoris*. 20 strains had the capacity to produce dextran from sucrose. The precipitation and quantification of EPS on MRSs (Mark Rogosa et Sharpe sucrose) medium revealed a difference between the strains, by the total sugars assay method, the amount of EPS varied between 0.63 ± 0.19 and 2.41 ± 0.17 g / L of strains LnF70 and LnC1 (isolated from goat's milk), respectively. The dextran production from MRSs medium was better than from liquid MSE. The optimization of production on MRSs medium with different concentration of glucose, yeast extract and sucrose showed that the strains had good production with a concentration of 2% glucose, 0.3% yeast extract and 10% sucrose.

1. Introduction

Different species of lactic acid bacteria synthesize polysaccharides (EPS), which can be used as a bio-ingredient that replaces polysaccharide agents such as carrageenans, alginates or gelatin (Periyasamy et al., 2017; Zhou et al., 2019). A large number of EPS-producing Lactic Acid Bacteria (LAB), including the species of *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*,

Streptococcus, *Lactococcus*, *Pediococcus* and *Bifidobacterium* have been isolated from a variety of fermented foods, such as sourdough, yogurt, sausages, cheese and sauerkraut (Ibarburu et al., 2015; Kanamarlapudi et Muddada, 2017; Tang et al., 2017).

Microbial EPS are biosynthetic polymers or biopolymers defined as being "extracellular polymeric sub-

stances of biological origin which participate in the formation of microbial aggregates" (Periyasamy et al., 2017; Lynch et al., 2018; Zikmanis et al., 2020).

Among LAB, the most used in the dairy industry, heterofermentative bacteria of the genus *Leuconostoc* (*Ln*), are known to produce lactic acid, acetate or ethanol and carbon dioxide from lactose. These bacteria are considered to be essential biotechnological attributes in the formation of openings in blue cheese such as Roquefort (Kihal et al., 2009; Kim et al., 2021).

Some species of *Leuconostoc*, in particular *Ln. mesenteroides*, are used for the production of a biodegradable glucose polymer known as dextran which has several targeted industrial applications in the food, cosmetic, pharmaceutical and oil drilling industries (Sutherland et al., 1996; Hamsan et al., 2019; Salman et al., 2021).

Dextran is produced industrially by the fermentation of media rich in sucrose. Several researchers have optimized the fermentation conditions for maximum dextran production Periyasamy et al. (2017). It has been reported previously that the molecular weight and yield of dextran production depends on process variables such as temperature, sucrose and acceptor concentration (Pereira et al., 1998).

The production of EPS is directly related to growth. On other hand, several factors influence the growth and production of EPS, in particular average composition (Duboc and Mollet, 2001), presence of casein hydrolyzate (Ceming et al., 1986), co-cultures (Ceming et al., 1994) and quantity of glucose (Ceming et al., 1994).

According to Levander et al. (2002), the biosynthesis of EPS is linked to the primary metabolism of carbohydrates in producing cells. Production should take place during active consumption of sugar, since it requires a large number of activated nucleotide sugars, energy necessary for the construction of recurrent units, for polymerization and transmembrane translocation.

The amount of the produced EPS can vary considerably from one strain of lactic acid bacteria to another. The studies of Yuksekdag and Aslim (2008); Sanchez et al. (2006) have also shown that the production of EPS by *Leuconostoc* depends to the carbon source and its concentration in the medium. Glucose has been reported as the best carbon source for the EPS production by the strains stud-

ied (Periyasamy et al., 2017). A better conditions production of dextran by *Leuconostoc* strains was noticed in the presence of 20% of sucrose and 2% of glucose and 05% of yeast extract in a temperature of 30 ° C and an incubation time of 48H (Farwa et al., 2008).

In the concept of studying the nutritional conditions that influence the production of dextran produced by *Leuconostoc* strains isolated from different dairy products, it is necessary to optimize the conditions for enhanced production of extran. Therefore, this work aimed on the one hand to optimize dextran production, by modifying the concentration of three nutritional sources: glucose (Carbon source), yeast extract (nitrogen source) and sucrose (precursor of the enzyme dextranase); and on the other hand, the comparison of the production of dextran on sucrose MRS medium and MSE medium.

2. Material and Methods

2.1. Samples collection

A total of 14 samples of camel's milk, goat's milk, cow's milk, sheep's milk, traditional better (Dhan), and traditional cheeses (J'ben and Klila), were collected from three different regions (Hassi Ben Abdallah, Elbour, Taibet) in the province of Ouargla located in the south-east from Algeria. The samples were transported to the laboratory under aseptic conditions.

The production of dextran from sucrose is demonstrated on solid MSE medium. Dextran producing strains are characterized by the formation of large, viscous, sticky colonies. From precultures, we made a seeding on the culture medium MSE and incubated at 30°C for 24 to 72 h (Sanchez et al, 2006).

2.2. Phenotypic identification of bacterial strains

The identification of bacterial strains was carried out according to the diagram of the dichotomous approach of the species by *Leuconostoc* sp. proposed by Carr et al. (2002), and according to classification proposed by Bjorkroth et al. (2006). Based on the morphological characters, macroscopic tests were used to describe the bacterial colonies on solid medium; their color, edge, elevation, aspect, pigmentation, opacity and diameter were also evaluated. Microscopic examination defined cell morphological appearance such as shape, pairing mode and type isolates of Gram staining. A total of 23 strains were isolated from four different animal

species milk samples, which were observed as cocci in different forms. Gram staining and catalase activity were observed with the selected isolates. The isolates were tested for various parameters, namely the production of CO₂ from glucose, hydrolysis of arginine, the growth capacity at different temperatures (4°C, 10°C, 37 °C and 42 °C), the thermoresistance at (63.5 °C/30 min) (Guiraud, 1998) and, the ability to survive in the presence of NaCl (3% and 6.5%) and at pH 4.8, 6.8 and 9.6.

The production of dextran was detected on MSE medium, through the formation of slimy colonies. The hydrolysis of esculin was tested on 0.5% esculin agar medium. The use of citrate, in the presence of glucose, was studied on KMK medium.

The sugar fermentation test was carried out on MRS-BCP broth (BCP 0.17 g /l) without meat extract. Carbon source has been added in the middle sterile at a final concentration of 3%. The sugars tested were: arabinose, glucose, galactose, lactose, fructose, sucrose, manitol, maltose, xylose, mannose and esculin (Bjorkroth and Holzapfel, 2006). The use of carbohydrates was evaluated after 24 and 48 h. To ensure anaerobic conditions, two drops of sterile paraffin oil were added in each tube after inoculation (Badis et al., 2005).

2.3. Screening of EPS-producing strains

The production of dextran from sucrose is demon-

strated on solid MSE medium. Dextran producing strains are characterized by the formation of large, viscous, sticky colonies. From precultures, we made a seeding on the culture medium MSE and incubated at 30°C for 24 to 72 h (Sanchez et al, 2006).

2.4. Precipitation of dextran

From the young cultures of the strains which showed good growth and production of EPS, 100 µl were inoculated in tubes containing 10 ml of MRSs medium, then incubated the tubes at 30 °C for 48 h. After removing the cells by centrifugation at 4000 rpm for 20 min, the EPS present in the supernatant were precipitated in three volumes of cold ethanol 95% (v/v) and incubating the samples at 4 °C overnight. A second centrifugation was carried out at 12000 rpm/10 min at cold 4 °C, rinsed twice with acetone and centrifuged again at 12000 revs/10 min at cold 4 °C. EPS then dried in the open air, at the end weighed the quantity of dextran produced. (Du et al., 2018; Salman et al., 2021).

EPS sediment resuspended in sterile distilled water and heated for 10 min at 30°C to facilitate solubilization. The total sugar content was determined by the phenol-sulfuric method, 1 ml of solutions EPS, 1 ml of 6% phenol and 2.5 ml of concentrated sulfuric acid (H₂SO₄) were added sequentially in each tube (Nacher-Vazquez et al., 2015). The tubes were placed in a water bath at 100 °C for 15 min then

Case	Sucrose g/l	Glucose g/l	Yeast extract g/l	Case	Sucrose g/l	Glucose g/l	Yeast extract g/l
1	10	1	3	22	10	10	5
2	100	1	3	23	10	15	5
3	10	5	3	24	10	20	5
4	100	5	3	25	50	10	1
5	10	3	1	26	50	15	1
6	100	3	1	27	50	20	1
7	10	3	5	28	50	10	3
8	100	3	5	29	50	15	3
9	50	1	1	30	50	20	3
10	50	1	3	31	50	10	5
11	50	1	5	32	50	15	5
12	50	5	5	33	50	20	5
13	50	3	3	34	100	10	1
14	50	3	5	35	100	15	1
15	50	3	1	36	100	20	1
16	10	10	1	37	100	10	3
17	10	15	1	38	100	15	3
18	10	20	1	39	100	20	3
19	10	10	3	40	100	10	5
20	10	15	3	41	100	15	5
21	10	20	3	42	100	20	5

Table 1: Different concentrations of the three substrates glucose, yeast extract and sucrose

placed in the dark for 15 min. To perform the quantification, the absorption was measured at 490nm.

2.5. Optimization of dextran production

The objective of this study was to obtain nutritional conditions favoring a good production of EPS from the *Leuconostoc* strains for which three substrates were chosen, glucose (source of carbon and energy), yeast extract (source of nitrogen, vitamins and amino acids) and sucrose. Also, the comparison

between two culture media MRSs and MSE was carried out.

Firstly, a comparison was made between the MRSs medium and the liquid MSE medium, by performing a precipitation of the EPS by following the steps mentioned in the part 2.4.

To better study the effect of glucose, yeast extract and sucrose, another quantification of EPS was carried out on MRS medium with different concentra-

Sample	Goat's milk							Cow's milk	J' ben		
	LnC1, LnC2, LnC13, LnC15	LnC10	LnC12, LnC18, LnC23	LnC16, LnC41	LC21, LnC39	LnC34	LnC43		LnV67	LnF49, LnF69	LnF65, LnF70, LnF71
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO ₂ production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Degradation of arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextran production	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Use of citrate	+	+	-	-	+	+	+	+	+/-	+	+
Esculin hydrolysis	+	+/-	-	+/-	-	-	+/-	+	-	-	-
NaCl 3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 6.5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T ° 4 °C	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
T ° 15 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T ° 30 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T ° 37 °C											
T ° 42 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T ° 63 °C / 30mn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH9.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Scharose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Mannose	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-

Table 2: Physiological and biochemical tests and fermentation profile of isolated strains from milk and fermented milk products.

+: Positive reaction, -: Negative reaction, +/-: variable reaction

tions of the three chosen substrates (table 1). For this study, we chose the strains that showed good production of EPS and the strains showing a low production Lnc1, Lnc12, Lnc15 and LnF70.

3. Results and Discussion

3.1. Isolation of *Leuconostoc*

The isolation of *Leuconostoc* carried out on MRSv selective medium from different dairy products (goat's milk, camel's milk, sheep's milk, cow's milk, Dhan, J'ben et klila), allowed us to select 155 strains having the appearance of colonies lenticular or circular in small size in color whitish.

After carrying out some phenotypic tests, we noticed that the 155 isolates belong mainly to two genera (*Leuconostoc* and *Lactobacillus*) of lactic acid bacteria and were known by their resistance to vancomycin. Table 2 shows the distribution of isolates according to the primary product where we notice the total absence of *Leuconostoc* sp. in camel milk, Klila and sheep's milk.

The growth of microorganisms in milk can be influenced by various environmental factors such as pH, temperature, amount of free water, nutrient concentration or composition of milk which is affected by several factors, such as the age of the animal, stages of lactation, diet, race, presence of antimicrobial substances and interactions between microorganisms. This explains the absence of *Leuconostoc* in certain products and their presence in other.

3.2. Phenotypic identification of strains

The study of the macroscopic appearance of the strains on MRS medium revealed small, round, white and lenticular colonies. The microscopic appearance revealed that the cells are Gram positive with an ovoid shape associated in pairs or in short, curved chains. All strains are catalase negative, able to produce CO₂ from glucose, unable to hydrolyze arginine, therefore these strains were considered to be *Leuconostoc* sp.

The isolated and purified strains were able to grow at 15 and 37 °C but not at 42 °C, which confirmed that they were mesophilic bacteria. All the strains were able to resist a concentration of 3% NaCl. The isolates were able to grow at pH 6.5 and not at pH 4. The heat resistance was tested at a temperature of 63.5 °C/30 min which the strains could not resist.

Microbiological identification revealed that 4 strains (LnC1, LnC2, LnC13 and LnC15) isolated

from goat's milk and 3 strains (LnF65, LnF70 and LnF71) isolated from cheese, belonged to the sub-species *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroids* while one strain (LnC34) isolated from goat's milk, 2 strains (LnF49, LnF69) isolated from cheese and a strain LnV67 isolated from cow's milk belonged to the *Ln. mesenteroids* subsp. *dextranicum*. These results are similar to the work carried out by earlier workers (Carr et al., 2002; Bjorkroth et al., 2006; Zaarour et al., 2012).

3.3. Dextran production

The production of dextran was verified on MSE medium in which this kind of bacteria use the medium sucrose to synthesize exopolysaccharides (dextran) which give the colonies a gelatinous appearance.

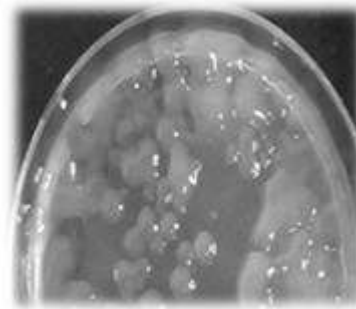


Figure1: Morphology of dextran-producing colonies by strains of *Leuconostoc* on MSE medium.

The production of dextran from the degradation of sucrose has been observed in most strains isolated from goat's milk, cow's milk and cheese, the results are shown in the Table 2 which indicates 20 isolates were capable of producing exopolysaccharides with the exception of 3 isolates, LnC21, LnC39, LnC43 which were unable to produce dextran which allowed us to classify them into two species which are: *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* (LnC21, LnC39), and *Ln. citreum* (LnC43).



Figure 2: Appearance of dextran produced by *Leuconostoc* after extraction from MRSs medium.

3.4. Precipitation and quantification of the EPS produced by the strains isolated on MRSs medium

After precipitation with ethanol, dextran was obtained in two forms. One has been obtained in a gelatinous form of whitish yellow color. It was rather sticky and had great elasticity. The other was obtained in powder or amorphous form, not exhibiting viscoelastic property, it was pure white.

The quantification of EPS by the determination of total sugars, using the glucose calibration curve,

revealed production levels varying between 0.63 ± 0.19 g/ L and 2.41 ± 0.17 g/ L of strains LnF70 and LnC1, respectively (Figure 3).

3.5. Optimization of exopolysaccharide production

After 48 h of incubation at 30 °C, in MRSs and MSE broth medium, variations in growth and dextran production is shown in the following Figure 4.

For all the strains, it was noted that the production of dextran on MRSs medium was better than on MSE medium, with a maximum of 1.6 g / l for the

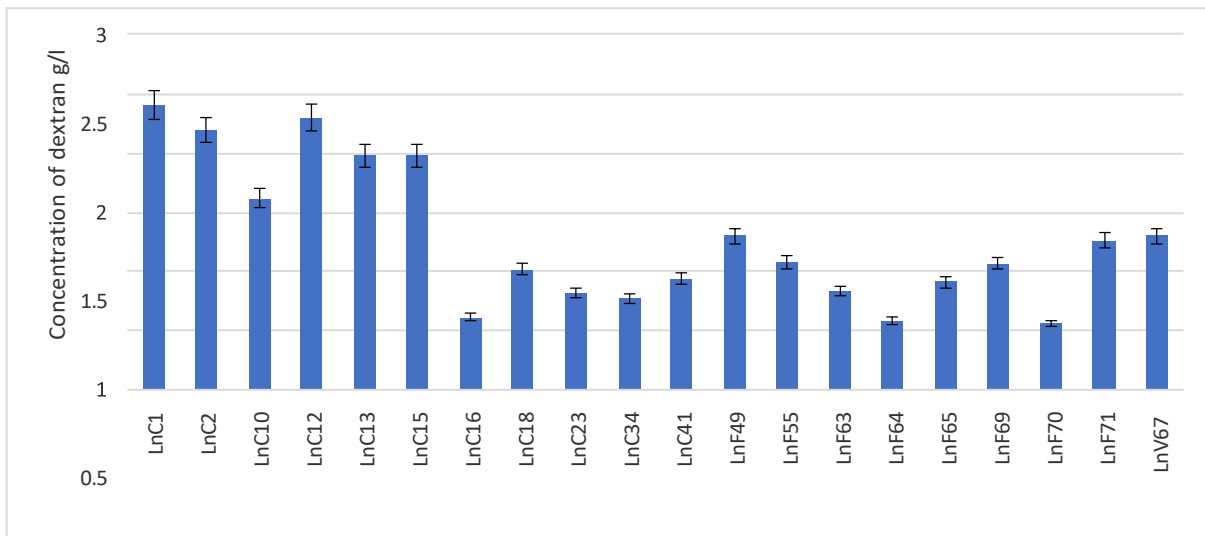


Figure 3: Production of EPS by *Leuconostoc* strains on MRSs medium.

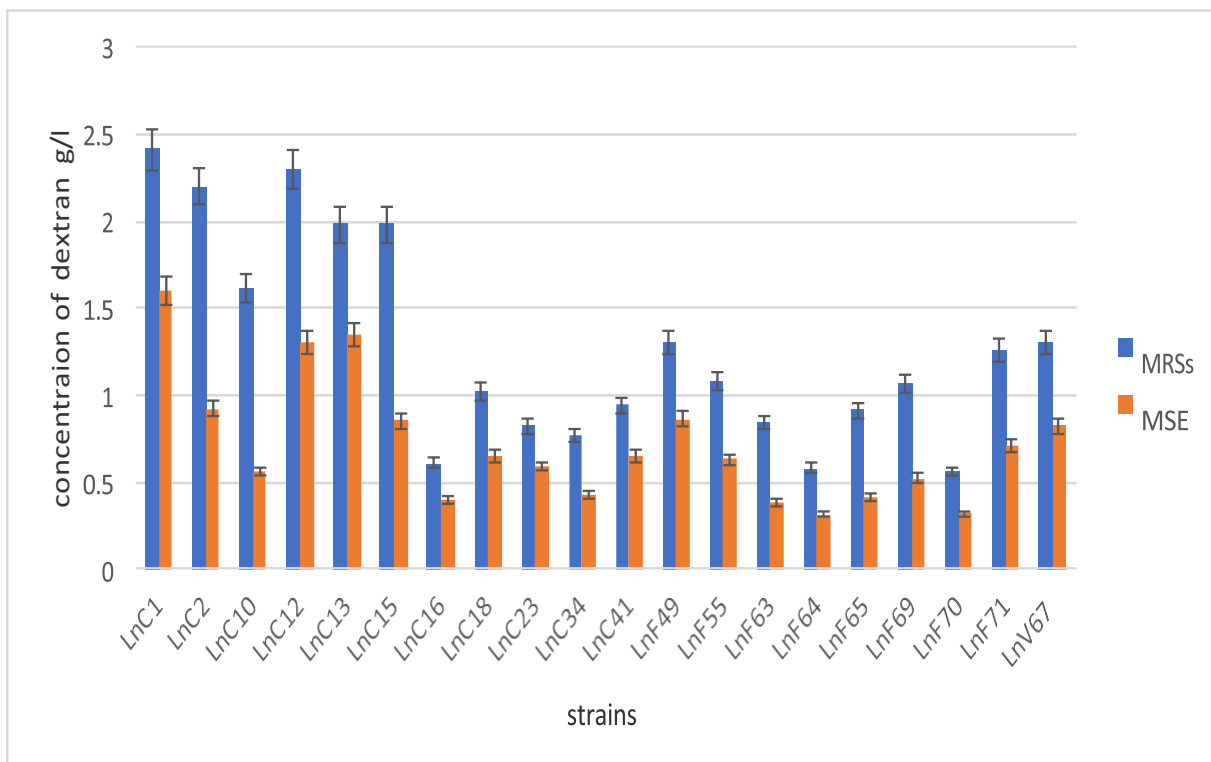


Figure 4: Comparison between the concentration of dextran produced by the isolates on MRSs and MSE medium.

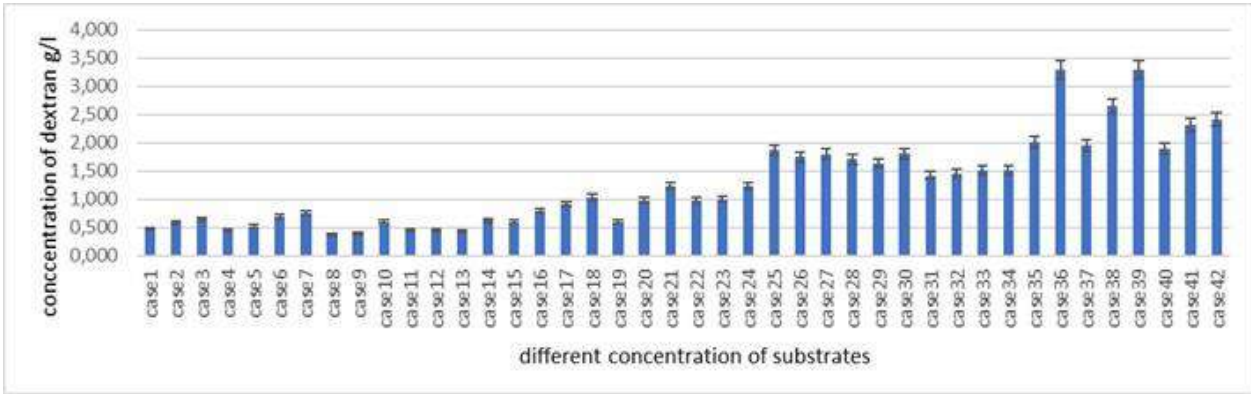


Figure 5: Effect of the different concentrations of the substrates on the concentration of dextran produced by the strain LnC1.

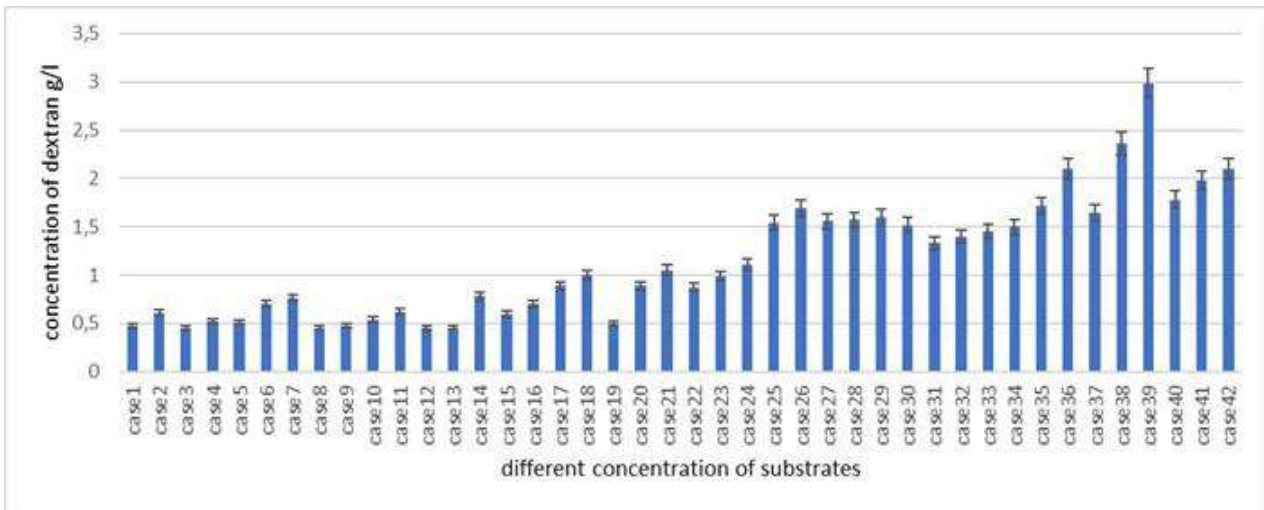


Figure 6: Effect of the different concentrations of the substrates on the concentration of dextran produced by the strain LnC12.

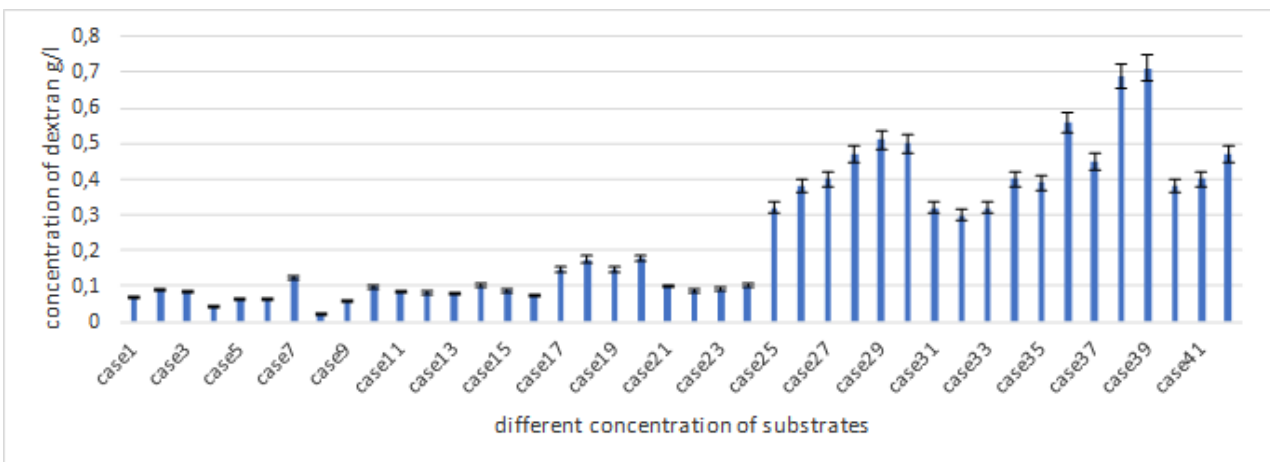


Figure 7: Effect of the different concentrations of the substrates on the concentration of dextran produced by the strain LnF64.

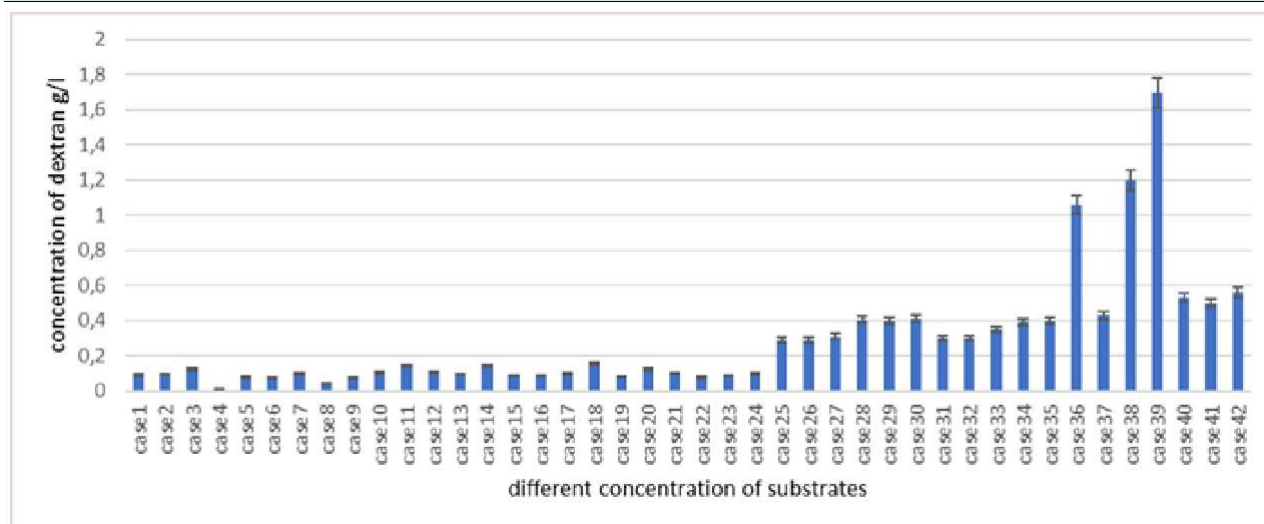


Figure 8: Effect of the different concentrations of the substrates on the concentration of dextran produced by the strain LnF70.

LnC1 strain.

From these results the four strains were chosen to complete the optimization study. two strains which showed good production, LnC1 and LnC12, and two which showed the lowest production LnF65 and LnF70.

The results of the optimization of dextran production from the four strains chosen on MRS medium with different concentrations of glucose, yeast extract and sucrose is shown in the Fig. 5-8.

Using various concentrations of sucrose, maximum production was observed at a sucrose concentration of 10% for all strains and also, a good production was noted at a concentration of 2% glucose and 0.3% yeast extract, on the other hand, we noticed a low production of EPS by minimizing the concentration of glucose and sucrose.

EPS from microorganisms such as LAB have potential as food ingredients or as a molecule produced in situ, with health functionality and economic benefits. The production of EPS by producer strains varies greatly and depends on the growth phase and culture conditions of the bacteria, the composition of the medium (carbon and nitrogen source), pH and temperature. In this work we studied the production of dextran from 20 strains of Ln isolated from goat milk, cow's milk and traditional cheese.

3.6. Effect of Glucose

The effect of carbohydrate concentration was verified using different glucose concentrations in MRS medium, namely 1g, 3g, 5g, 10g, 15g and 20g/l. the production of EPS was obtained at 5g/l of glucose

with an average level of production resulting in sticky colonies of average shape. Our results agree with those obtained by Hennane and Kari, (2013) who showed that the greatest quantity of EPS synthesized was of the order of 959 mg / l obtained at the highest concentration of Glucose (20%), and by Benasla (2012) a maximum production of EPS (157.5 mg/l) is always obtained with the increasing concentration of glue (40%) which stimulates the good production of EPS.

The production of dextran with the medium containing 20 g of glucose concentration was better than other concentration of glucose, that is to say the optimal concentration of glucose in MRS medium for a maximum production of dextran is the order of 20g under the conditions of the study, namely MRS medium, temperature of 30°C, duration of 48 hours and an uncontrolled pH (initial pH of 6.5).

We have identified EPS-producing strains (or even very strongly) and non-producing strains without this character causing growth disparities.

3.7. Effect of yeast extract

Components of complex media, such as peptone or beef or yeast extract, allow good growth of LAB and often even good production of EPS.

The effect of the nitrogen and vitamin source has been investigated by the use of different concentration of yeast extract in MSE medium, namely 1g, 3g and 5g and as nitrogen is only required for growth of the organism, 0.3% yeast extract was found to be adequate for the production of EPS in most strains with varying production levels were

detected by different forms, except strain LnF65 which produces only in a concentration of 5g with a low production level.

The reports of Welman and Maddox, (2003) have also shown that most species of *Leuconostoc* are auxotrophic, as they are unable to produce amino acids and vitamins. This is why the different culture media have been used to study the qualitative and quantitative production of dextran and to determine the influence of nutrients on the growth of producing strains and on the biosynthesis and genetics of dextrans.

Zarour et al. (2013) concluded that the growth of *Leuconostoc* is influenced by the addition of yeast extract whose development is stimulated by the addition of this growth factor, because the main property sought in lactic acid bacteria, used as sourdoughs in the food industry, is their ability to acidify milk and develop on a regular basis. In milk, they must find a number of nutrients necessary for their growth and in particular, amino acids and vitamins which can be provided by yeast extract. these results are consistent with the work reported by Kihal et al. (2006).

3.8. Effect of Sucrose

Dextran is a well-known glucan produced by the *Leuconostoc* strains. It is only produced when cultured in a medium containing sucrose, since sucrose is the only precursor of the enzyme.

To study the effect of sucrose on the production of EPS, a volume of 100 µl of the strains of *Leuconostoc* is inoculated with a different concentration of sucrose (1%, 5% and 10%). the good production of dextran was obtained at 10% of seeded sucrose.

According to De Belder (1990), the initial sucrose concentration is one of the main factors influencing dextran-sucrase secretion and dextran biosynthesis.

Our results are consistent with those obtained by Periyasamy et al. (2017), they find that the maximum enzymatic activity was observed at a sucrose concentration of 20%, and the medium appeared very viscous, showing the maximum production of dextran. And Farwa et al. (2008), who show that *Ln. mesenteroides* CMG713 produced the maximum dextran after 20 hours of incubation at 30 ° C at a concentration of 15% sucrose. Farinazzo et al. (2021), found a better production of dextran by *Ln. pseudomesenteroides* is in the presence of 180g / l

of sucrose and pH 7.3 at a temperature of 20 ° C.

Farwa et al. (2008) in their work noticed that when the concentration of sucrose was more than 20% (25%) there was a decrease in the percentage of conversion of sucrose to dextran, which ultimately affected the yield. They studied the effects of sucrose concentration, pH and temperature on dextran yield by a mutant strain of *Ln. mesenteroides* B512 FMCM. Increasing the concentration of sucrose (0.5 to 5.0%) resulted in an increase in the yield of dextran.

4. Conclusion

Using MRS medium supplemented with vancomycin, *Leuconostoc* strains were isolated from goat milk, cow milk and traditional cheese. The microbiological and biochemical characteristics of the isolates made it possible to identify: *Ln. gelidum*. *Ln. carnosum* *Ln. citreum*. *Ln. fallax*. *Ln. mesenteroides* subsp *mesenteroides*. *Ln. mesenteroides* subsp *dextranicum*. *Ln. mesenteroides* subsp *cremoris*.

The production of dextran studied on MSE medium revealed that 20 isolates have the capacity to produce this exopolysaccharide. The quantification of dextran on MRS medium showed a difference between the strains, this quantity was better than that produced by the strains on MSE liquid medium. The optimization of dextran production by changing the concentration of three different substrates (glucose, yeast extract and sucrose) has shown that four selected strains have good production in the presence of 2% glucose and 0.3% extract of yeast and 10% of sucrose.

References

- Asfour HA, Gamal IM, Darwish SF (2016) Phenotypic characterization and molecular identification of some lactic acid producing bacteria in raw milk of different animal species. Assiut Veterinary Medical Journal 62: 47-59.
- Badis A, Guetarni D, Kihal M, Ouzrout R (2005) Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle ". Sciences & Technologie. C, Biotechnologies 23 : 30-37.
- Benasla A (2012) Production d'exopolysaccharides Par Des Souches De *Lactobacilles*. Thèse de doctorat en Biotechnologie. Université D'Oran : 16-80.
- Bjorkroth J, Holzapfel. WH (2006) Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella* in : The Prokaryotes. Springer 4: 267-319.
- Carr FJ, Hill D, Maid N (2002) The lactic acid bacteria: A literature survey. Critical Reviews in Microbiology 28: 281-370.
- Ceming J, Bouillanne C, Desmazeaud MJ, Landon M (1986) Isola-

- tion and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Letters* 8 (9): 625-628
- Ceming J, Renard Cmgc, Thibault JF, Bouillanne C, Landon M, Desmazeaud MJ, Topisirovic L (1994) Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG 11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (11): 3914-3919.
- De Belder AN (1990) Dextran. *Pharmacia LEO Therapeutics, Uppsala, Sweden*.
- Du R, Qiao X, Zhao F, Song Q, Zhou Q, Wang Y, Pan L, Ye Han Y, Zhou Z (2018) Purification, characterization and antioxidant activity of dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* from homemade wine. *Carbohydrate polymers* 198: 529-536.
- Duboc P, Mollet B (2001) Applications of exopolysaccharides in the dairy industry *International Dairy Journal* 11(9): 759-768.
- Farinazzo FS, Fernandes MTC, Mauro CSI, Garcia S (2021) Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 from native Atlantic Forest juçara fruit. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*: 1-8.
- Farwa S, Shah AQ, Afsheen A, Nuzhat A (2008) Production et Characterization of a Unique Dextran from an Indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *International Journal of Biological Sciences* 4: 379-386.
- Guiraud JP (1998) *Microbiologie alimentaire*. DUNOD, Paris : 282- 290.
- Hamsan MH, Shukur MF, Aziz SB, Kadir MFZ (2019) Dextran from *Leuconostoc mesenteroides*-doped ammonium salt-based green polymer electrolyte. *Bulletin of Materials Science* 42(2): 1-8.
- Hennane M, Kari L (2013) Optimisation de la production des exopolysaccharides (EPS) par *Lactococcus lactis ssp.lactis* DZ en fonction de la source de carbone. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Alimentaire et Sanitaire. uni de Béjaia.
- Ibarburu I, Puertas AI, Berregi I, Rodríguez-Carvajal MA, Prieto A, Dueñas MT (2015) Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider. *International Journal of Food Microbiology* 214: 54-62.
- Kanamarlapudi S, Muddada S (2017) Characterization of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CC30. *BioMed Research International* 2017.
- Kihal M, Henni DE, Prevost E, Diviès C (2006) A new manometric method for measuring carbon dioxide production by dairy starter culture: a case of *Leuconostoc mesenteroides*. *African Journal of Biotechnology* 5 (4): 378-383.
- Kihal M, Prevost H, Henni DE, Benmechernene Z, Diviès C (2009) Carbon Dioxide Production by *Leuconostoc mesenteroides* Grown in Single and Mixed Culture with *Lactococcus lactis* in Skimmed Milk. *Scientific Research and Essay* 4 (11): 1348-1353.
- Kim SY, Kim SA, Jang YJ, Seo SO, Han NS (2021) Screening of endogenous strong promoters of *Leuconostoc citreum* EFEL2700 based on transcriptome analysis and its application for food-grade production of β -galactosidase. *Journal of Biotechnology* 325: 1-6.
- Levander F, Svensson M, Radstrom P (2002) Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2): 784-790.
- Lynch KM, Coffey A, Arendt EK (2018) Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products. *Food Research International* 110: 52-61.
- Nacher-Vazquez M, Ballesteros N, Canales A, Rodriguez Saint-Jean S, PerezPriando SI, Priando A, Aznar R, Lopez P (2015) Dextrans produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses. *Carbohydrate Polymers* 125: 292-301.
- Pereira AM, Costa FAA, Rodrigues MI, Maugeri F (1998) In vitro synthesis of oligosaccharides by acceptor reaction of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnology Letters* 20 (4): 397-401.
- Periyasamy T, Rathinavel T, Selvankumar T, Sudhakar C, Arumugam S 1, Srinivasan P, Priya Gand Nisha JC (2017) Optimization of dextran production from cabbage waste using *Leuconostoc mesenteroides*. *International Journal of Advances in Interdisciplinary Research* 4: 24-31.
- Salman JAS, Kareem, AJ (2021) Antibacterial and Anti virulence factors of Purified Dextran from *Lactobacillus gasseri* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Jordan Journal of Biological Sciences* 14(1): 191-197
- Sanchez JI, Martinez, B, Guillen R, Jimenez DR, Rodriguez A (2006) Culture Conditions Determine the Balance between Two Different Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Applied and Environmental Microbiology* 72(12): 7495-7502.
- Sutherland IW, Reh HJ, Reed G, Puhler A, Stadler P (1996) *Biotechnology* (2nd ed.). New York: VCH.
- Tang W, Dong M, Wang W, Han S, Rui X, Chen X, Mei J, Qiuqin Z, Junjun W, Li W (2017) Structural characterization and antioxidant property of released exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* SRFM-1. *Carbohydrate polymers* 173: 654- 664.
- Welman AD, Maddox IS (2003) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology* 21: 269-274.
- Yuksekdag Zn, Aslim B (2008) Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (b3, g12) and *Streptococcus thermophilus* (w22). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51 (3): 581-585.
- Zarour K, Benmechernene Z, Hadadji M, Moussa-Boudjemaa B, Henni JE, Kihal M (2013) Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Revue « Nature & Technologie ». B-Sciences Agronomiques et Biologiques* 08 : 39 – 47.
- Zhou Y, Cui Y, Qu X (2019) Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydrate Polymers* 207: 317-332.
- Zikmanis P, Brants K, Kolesovs S, Semjonovs P (2020) Extracellular polysaccharides produced by bacteria of the *Leuconostoc* genus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36 (11): 1-18.