

UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire de Fin d'Etudes
En vue de l'obtention du diplôme de
Master académique

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenté par : Bouziane Kaouther Fatma

Merabti Manel

Thème

**Effet des surnageants actifs des cultures
lactiques sur les bactéries psychrotrophes dans
le lait cru réfrigéré**

Devant le jury :

-M ^{me} . MIMOUNI Yamina	M.C.A	Présidente	UKM Ouargla
-Mr. BOURICHA M'HAMED	M.A.A	Examineur	UKM Ouargla
-M ^{me} . SOUID Wafa	M.A.A	Promotrice	UKM Ouargla
-M ^{me} .BOUDJENEH- HAROUN Saliha	Professeur	Co-promotrice	UKM Ouargla

Année universitaire : 2018/2019



*C'est au titre de l'année universitaire **2018-2019** que le présent Mémoire de Master entre dans le cadre du projet CAMED Dz - **ERANETMED 2-72-367** -*

intitulé :

Roles of Camel Breeding in Modern Saharan Societies - Contributing to their Adaptive Capacities Face to Global Changes-



REMERCIEMENTS

Avant tout propos, nos remerciements infinis sont adressés à Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nos sincères remerciements s'adressent à notre encadreur : M^{me}. Souid Wafa, et notre professeur M^{me}. Boudjeneh- Haroun Saliha, pour leur soutien, conseil et leur aide durant toute la période du travail,

Nous spéciaux remerciements reviennent à membres du jury : M^{me}. Mimouni Yamina et Mr. Bouricha M'hamed pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

nous tenons à remercier particulièrement tous nos enseignants, chacun par son nom qui depuis nos entrée à l'université ont contribué au savoir auquel nous avons acquis, nous leur exprime nos gratitude la plus sincère,

Nos vifs remerciements vont également aux directeur de Laboratoire Algérien de Contrôle de Qualité et de l'Emballage ainsi a tous les ingénieurs et techniciens pour leur très grand aide.

Finalement, nous tenons également à remercier tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

The image features a decorative border of pink roses and petals. On the left side, there is a vertical arrangement of several pink roses in various stages of bloom, from buds to fully open flowers, with green leaves. The top and right sides of the page are framed by a border of scattered pink rose petals. The background is a light, soft pink color.

Dédicace

A mes chers parents

A mon cher mari

A mes frères et ma sœur

Et toute ma famille

MANEL

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers.

♥ A LA MEMOIRE DE MON PERE

Ce travail est dédié à mon père, décédé trop tôt, qui m'a toujours poussée et motivée dans mes études.

J'espère que, du monde qui est sein maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours priée pour le salut de son âme

Puisse Dieu, le tout puissant l'avoir en sa sainte miséricorde.

♥ A MA CHÈRE MÈRE

Aucune dédicace ne serait exprimer mon respect, mon amour éternel et mes considérations pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le très Haut, vous accorder santé, bonheur et long vie.

♥ A mon cher Mari Mustapha et toute sa famille.

♥ A ma chère sœur Khadidja.

♥ A mes frères et mes belles sœurs.

♥ A mon amie Abir.

Kaouther♥

Liste des principales abréviations

BL : Bactérie Lactique

Ln:*Leuconostoc*

Lb:*Lactobacillus*

Lc:*Lactococcus*

FAO:Food and Agriculture Organization

H₂O₂:Peroxyde d'Hydrogène

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Na Cl : Chlorure de Sodium

ATP:AdénosineTriPhosphate

K⁺:Potassium

ARN:AcideRiboNucléique

% : Pourcentage

Min : Minute

pH : Potentiel d'hydrogène

CO₂ : Dioxyde de carbone

N : Normalité

PCA : Plate Count Agar

J : Jour

Liste des photos

N°	Titre des photos	Page
01	Aspect macroscopique des souches bactériennes sur gélose M17	29
02	Observation microscopique (Gr : 10x40) des souches lactiques avec coloration de Gram	30
03	Observation macroscopique du trouble d'une culture lactique dans un bouillon M17	30

Liste des tableaux

N°	Titre des tableaux	Page
01	Bactéries et température de croissance (Leyral G, Vierling E1997).	17
02	Mesure de pH des échantillons de lait cru avec le surnageant dans 12 jours.	48
03	Résultat de dénombrement des psychrotrophes dans les échantillons de lait cru réfrigérée avec le surnageant sur gélose PCA	49
04	Résultats de mesure de pH après traitement de surnageant actif par la chaleur et la pepsine.	50

Liste des figures

N°	Titre des figures	Page
01	Distances phylogénétiques entre les genres principaux constituant les BL basées sur les séquences des ARNr 16S, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible % G+C et les genres Gram positifs non reliés <i>Bifidobacterium</i> et <i>Propionibacterium</i> (Holzapfel et al ; 2001)	07
02	Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques (Desmazeud et De Roissart, 1994).	09
03	Séquence et structure de l'antibiotique de type A (Nisine), B (Mercacidine) et d'un antibiotique « two peptides »	13
04	Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries Gram positif. Schéma proposé par Fernandez (2014) (Essodolom T et al ,2016)	15
05	Protocole d'isolement des souches lactiques pures.	24
06	Protocole de l'étude de la nature inhibitrice de surnageant actif.	27
07	Résultat des mesures de pH des échantillons de lait cru réfrigérée avec le surnageant	32
08	Résultat de dénombrement des psychrotrophes dans des échantillons de lait cru réfrigérée avec le surnageant dans milieu PCA.	34
09	Résultat de pH après traitement du surnageant actif par la chaleur et la pepsine	35

Tables des matières

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des photos	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1-2

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur le lait et les bactéries lactiques

1.1. Généralités sur le lait	4
1.1.1. Définition du lait de chèvre	4
1.1.2. Qualité microbiologique de lait	4
1.1.3. Flore microbiens du lait	4-5
1.2.1. Définition des bactéries lactique	5
1 .2.2. Habitat et l'origine	6
1 .2.3. Classification des bactéries lactiques	6-7
1.2.4. Métabolismes des bactéries lactiques	8
1.2.5. Intérêt industriel des bactéries lactiques.....	8-9
1.2.6. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques.....	9-10-11

Chapitre II : Les bactériocines

2.1. Définition	12
2.2. Classification des bactériocines	12

2.3. Mode d'action des bactériocines.....	14
2.4. Purification des bactériocines	15
2.5. Application des bactériocines	16-17

Chapitre III : Les psychrotrophes

3.1. Définition	18
3.2. Les principaux genres des bactéries psychrotrophes	18-19
3.3. Effet de la flore psychrotrophe sur les aliments réfrigérés	19-20

Etude Expérimentale

Matériels et méthodes

1. Matériels	21
1.1. Matériels biologiques	21
1.2. Milieux de cultures	21
1.3. Produits chimiques et réactifs	21
1.4. Petits matériels	22
1.5. Appareillage	22
2. Méthodes	22
2.1. Vérification de la pureté des bactéries lactiques	22-23
2.2. Pré-identification des souches	23
2.3. Conservation des souches	24
2.4. Préparation des surnageants des bactéries lactiques	25
2.5. Etude de l'effet des surnageants des bactéries lactiques sur la conservation de lait cru de chèvre réfrigéré	25
2.6. Détermination de la nature d'inhibiteur du surnageant actif des bactéries lactiques.....	26

Résultats et discussion

1. Vérification de la pureté des bactéries lactiques	29
1.1 Revivification et purification des souches lactiques	29
1.2. Pré-identification des souches lactiques	29
2. Préparation des surnageants des bactéries lactiques	31
2.1. La culture liquide	31
2.2. Récupération des surnageants	32
2.3. Etude de l'activité antimicrobienne des surnageants des bactéries lactiques sur lait cru de chèvre réfrigéré	32
3. Identification de la nature des substances antimicrobiennes	35-36
Conclusion	38
Références bibliographiques	40-44
Annexes	45-50

Introduction

La conservation des denrées alimentaires par l'emploi de la technique de la réfrigération connaît un important essor. L'intérêt de ce dernier est de ne pas induire de modification organoleptique des produits alimentaires, alors que les autres procédés physiques ne conservent pas toujours aux denrées un aspect de produits frais (**Bornert, 2000**).

Les psychrotrophes sont des micro-organismes qui peuvent se croître à des températures inférieures ou égales à 7°C (**Catteau, 1999; Rozier, 1995**), ce sont des agents de nombreuses altérations des aliments, ou toxi-infections alimentaires. Parmi ces altérations dues à l'action des psychrotrophes, c'est l'altération de lait cru réfrigéré par une sélection microbienne (**Weber, 1985**).

D'autre part, Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des siècles pour fermenter les aliments. Elles sont largement présentées un grand intérêt biotechnologique. Considérées comme inoffensives pour l'homme, leur usage est fréquent dans le monde entier pour fabriquer des produits laitiers fermentés (fromage, yaourt...). Ces microorganismes produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens doués d'une activité bactéricide ou bactériostatique à l'égard de plusieurs germes pathogènes et d'altération (**Cenatiempo et al., 1996**). Il présente un intérêt dans la conservation des denrées alimentaires par leur capacité à réguler la microflore existante dans les produits fermentés et inhibent la croissance des germes pathogènes. En effet grâce à l'activité antimicrobienne de leurs bactériocines, les bactéries productrices ont la capacité de diminuer la charge microbienne d'un aliment et donc de contribuer à leur innocuité (**Delves-Boughton, 1990**).

Dans ce contexte notre étude prend toute son importance, en ce sens qu'elle a pour but d'étudier l'effet inhibiteur des souches lactiques sur la flore psychrotrophe dans le lait cru de chèvre réfrigéré. Dans cette optique le travail comporte 3 parties :

- La première partie, s'agit de rappels bibliographiques sur l'état général des connaissances de lait, des bactéries lactiques, des bactériocines, ainsi des bactéries psychrotrophes.
- La seconde partie concernera l'étude expérimentale.
- La troisième partie est essentiellement consacré à la présentation des résultats obtenus à l'issue de nos recherches.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur le lait et les bactéries lactiques**1.1 Généralités sur le lait**

Le lait est un liquide blanc mat, légèrement visqueux, dont la composition et les caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces animales, et même selon les races (**Ouadghiri,2009**). **Franworth et Mainville (2010)** évoquent que le lait est reconnu depuis longtemps comme étant un aliment bon pour la santé. Source de calcium et de protéines.

1.1.1. Définition du lait de chèvre

Le lait est un liquide physiologique complexe sécrété par les mammifères et destiné à l'alimentation du jeune animal naissant (**Mah, 1996**).

Le lait de chèvre est une émulsion de matière grasse sous forme de globules gras dispersés dans une solution aqueuse (sérum) comprenant de nombreux éléments, les uns à l'état dissous (lactose, protéines du lactosérum, etc.),les autres sous forme colloïdale (caséines) (**Doyon,2005**). En raison de l'absence de β -carotène, le lait de chèvre est plus blanc que le lait de vache. Le lait de chèvre à un goût légèrement sucré Il est caractérisés par une flaveur particulière et un goût plus relevé que le lait de vache (**Zeller, 2005 ; Jouyandah et Abroumand, 2010**).

1.1.2. Qualité microbiologique de lait

Le lait est un aliment de choix : il contient des graisses, du lactose, des protéines, des sels minéraux, des vitamines et 87% d'eau. Son PH est de 6,7. Il va être un substrat très favorable au développement des microorganismes. Le lait est utilisé sous nombreuses formes et il est la matière première de nombreux produits alimentaires.

1.1.3. Les flores microbiennes du lait

On répartit les microorganismes du lait, selon leur importance, en deux grandes classes :

La flore indigène ou originelle et la flore contaminant. Cette dernière est subdivisée en deux sous classe : la flore d'altération et la flore pathogène (**Vignola, 2002**).

➤ **Flore originelle ou indigène**

Le lait contient relativement peu de microorganisme quand il est sécrété partir de la mamelle d'un animal en bonne santé. Il devrait contenir moins de 5000UFC (unités formant colonies). La flore naturelle du lait cru est un facteur essentiel particulièrement à ces propriétés organoleptiques (**Fotou et all, 2011**).

Le Lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées « lacténines » mais leur action est de très courte duré environ 1 heure (**Guiraud, .2003**).

D'autre microorganisme peuvent se retrouver dans le lait cru issus d'un animal malade, ils sont généralement pathogènes et dangereux au point de vie sanitaire.

➤ **Flore de contamination**

Cette flore est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire (**Vignola, 2002**).

1.2. Les bactéries lactiques

1.2.1. Définition des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes unicellulaires, elles forment un groupe hétérogène de coques et de bacilles à coloration de gram positif, généralement immobiles, asporulants, anaérobies facultatifs et ne possédant ni l'enzyme de catalase ni l'oxydase (**Hadef, 2015**).

La flore lactique a été défini pour la première fois par **Orla Jensen en 1919**, elle fermente toujours les glucides en acide lactique (**Orla-Jensen, 1924**) comme produit principale avec d'autre acides organiques (**Boumediene,2013**).

1.2.2. Habitat et l'origine

L'existence de BL dans les sédiments depuis 2,75 milliard d'années avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, Ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (Kahina,2012).

En général, les BL se trouvent partout, elles colonisent les habitats riches en nutriments, tels que les plantes, les produits carnés, les produits laitier, les céréales, les légumes, même aussi chez les humains et l'animales. Généralement, leur présences dépend à des environnements où il y'a leur exigences nutritionnelles (Zergoug, 2017).

1.2.3. Classification des bactéries lactiques

Les BL ont été classées sur la base des critères phénotypique, morphologique, le mode de fermentation du glucose, et la croissance à différentes température (Bouadjaib,2013).

Les genres les plus étudiés sont :

- **Leuconostoc**: les cellules de genre Ln sont asporulés, de forme un peu sphériques, dans un milieu solide peuvent prendre une forme semblable à celle des Lb.

Les Ln sont apparue soit isolées ou associées en paires ou en courtes chainettes (Belchikh,2017). Leur croissances dépend à des conditions optimales de pH égal à 6,5; de température comprise entre 20°C et 30°C où elles transforment le glucose en acide lactique, CO₂ et éthanol où acétate (Bengeulla,2014).

- **Lactobacillus** : le genre *Lb* est formé de bactéries de forme bacille ou coccobacille, fréquemment associés en chainettes et habituellement immobiles mais parfois mobile grâce à leur flagelle péri-triches .leur température de multiplication de 2°C jusqu'au 53°C avec pH optimale de 5,5 à 6,2 (Kouakou *et al.*, 2010).

Selon leur profil fermentaire Kandler et Weiss (1996) a été divisé les *Lb* en 3 groupe :

- **Groupe 1** :il comprend des bactéries thermophiles "*Thermobacterium*"; les espèces de ce groupe sont homo-fermentaire strictes, c'est-à-dire produisant sauf l'acide lactique à partir du glucose.

- **Groupe 2** : les *Streptobacterium*, ce groupe contient les lactobacilles hétéro-fermentaire facultatives mésophiles, elles sont capables d'utiliser la voie hétéro-fermentaire où la concentration de glucose est limitant (Ho Thi,2008).

- **Groupe 3** : les *Betabacterium*, elles utilisent la voie des pentoses phosphates pour fermenter les hexoses et les pentoses, donc se sont des espèces hétéro-fermentaires obligatoires (Ho Thi,2008).
- **Lactococcus**: le genre (*Lc*) est formé des bactéries de forme coques, associés en paires ou en chainettes. Ces cellules sont dépourvues d'enzyme catalase et sont incapable d'exploiter l'oxygène mais elles tolèrent leur présence. Leur croissance optimale est entre 25°C et 35°C et ne peuvent pas de se multiplier en présence de 6,5% de Na Cl ou à pH 9,6 (Bouadjaib ,2013).
- **Pediococcus**: les *Pediococcus* sont des bactéries homo-fermentaires, de forme sphérique, aérobies facultatives, non mobiles et dépourvues de catalase et oxydase. elles produisent l'acide lactique comme un produit principal. Certaines souches présentent une activité pseudo-catalase sur les milieux à faible teneur en glucide (Sampoetal., 2012).

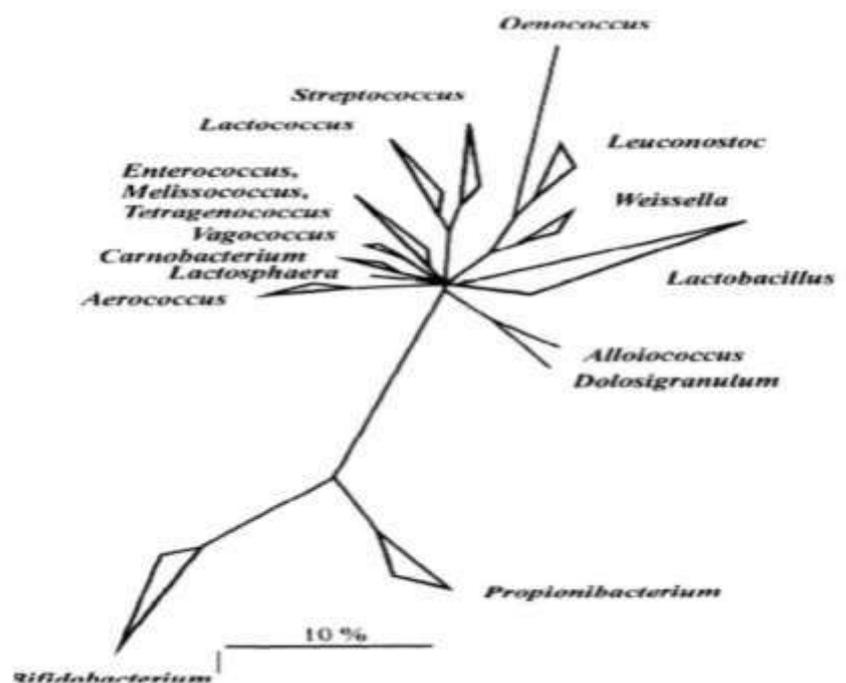


Figure 01 : Distances phylogénétiques entre les genres principaux constituant les BL basées sur les séquences des ARNr 16S, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible % G+C et les genres Gram positifs non reliés *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfelet al ; 2001).

1.2.4. Métabolisme des bactéries lactiques

Après la pénétration des sucres dans la cellule, les BL dégradent ce sucre par 2 voies soit par homo-fermentation ou hétéro-fermentation selon le produit final (Prianka et Prakash, 2009). Pour cela les BL sont regroupés en deux classes :

- **Des espèces homo-fermentaires** : cette classe regroupe les espèces de *Lactobacilles*, de *Streptocoques*, d'*Entérocoques*, de *Lactocoques* et de *Pédiocoques* (Zergoug, 2018), qui transforment presque complètement de glucose en lactate (Savado, 2004).
- **Des espèces hétéro-fermentaires** : les BL appartenant à cette classe sont des *Leuconostocs* et quelques espèces des *Lactobacilles*. Ils convertissent le glucose en acide lactique, éthanol, acétate et CO₂ (Mameche, 2008).

Il existe une autre voie métabolique chez les BL bifidus :

- **Voie shunt bifide** : chez les bifidiobactéries la fermentation de deux moles de molécules de glucose conduit à la formation de deux moles de molécules de lactate et trois d'acétate si le pyruvate est converti en lactate par lactate déshydrogénase (Frédéric, 1997).

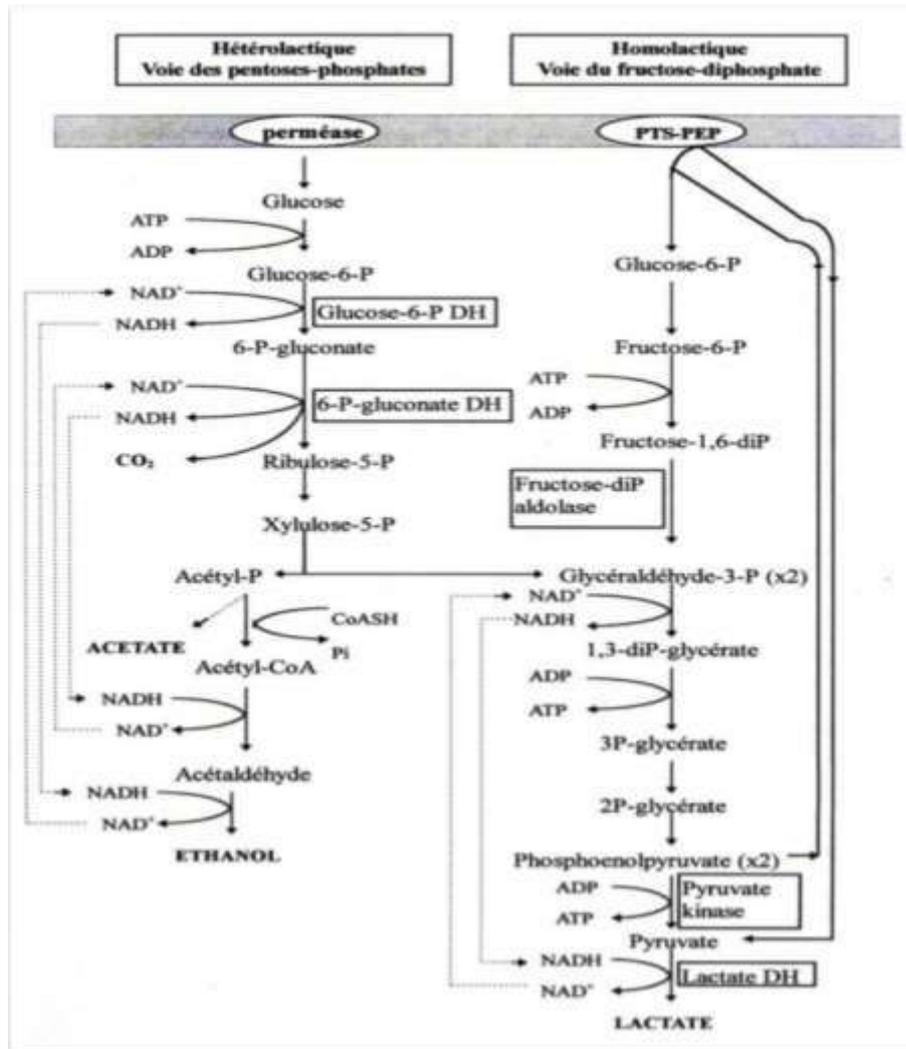


Figure02: Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques (Desmazeud et De Roissart, 1994).

ATP : adénosine triphosphate, ADP : adénosine diphosphate, Pi : phosphate inorganique. NAD^+/NADH , H^+ : couple oxydant/ réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide.

1.2.5. Intérêt industriel des bactéries lactiques

Grâce à la diversité métabolique des BL, elles sont appliquées dans des différents domaines pharmaceutiques, biotechnologies, agriculture, notamment dans l'industrie alimentaire.

1.2.5.1. Propriétés probiotiques

Les aliments additionnés des microbes vivants (probiotiques) ont des effets sur la santé humaine. Selon le FAO, les probiotiques jouent un rôle dans les systèmes immunologiques, digestifs et respiratoires (FAO et WHO, 2001).

Les BL probiotiques existant dans les aliments facilitent la digestion du glucose, l'équilibration de la microflore intestinale, la prévention de la diarrhée, ainsi l'amélioration la maladie inflammatoire intestinale (Yao *et al.*, 2009).

1.2.5.2. Utilisation comme une culture starters

La culture starter est une préparation microbienne d'un grand nombre de cellules d'au moins un micro-organisme qu'il est ajouté à une matière première en accélérant la fermentation afin d'obtenir un aliment fermenté.

Les BL jouent un rôle important dans ces processus, ils provoquent une acidification rapide de la matière première par la production des acides organiques, et leur production d'éthanol, des composés aromatiques, des bactériocines et plusieurs enzymes où améliorent la texture, prolongement durée de conservation (Leroy et De Vuyst, 2004).

1.2.5.3. Préservation

La fermentation est une méthode de conservation naturel au cours de cette processus les BL libèrent des substances antimicrobiennes naturels tels que les acides organiques, CO₂, peroxyde d'hydrogène et d'autre molécules. Alors que la production de ces composés entraîne la diminution de pH qui est accompagné à la formation des bactériocines, ce dernier détermine la stabilité microbienne des produits ainsi que la motilité des bactéries pathogènes (Yao *et al.*, 2009).

1.2.6. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques

Les BL se caractérisent par la production des substances qu'ont un rôle antimicrobien comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

1.2.6.1. Acides organiques

Les BL libèrent des substances organiques notamment l'acide lactique qui a la capacité d'attaquer et d'endommager les cellules nuisibles à partir de deux fonctions antimicrobiennes:

-Grâce à leur forme indissociés, ils traversent facilement la membrane cytoplasmique qui aboutit à l'acidification de milieu intracellulaire à un point où les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire annulé (**Meziani,2011**).

-L'accumulation d'acide organique est directement inhibitrice pour les microorganismes nuisibles qui présentent un seuil bas de résistance aux changements de pH intracellulaire (**Meziani,2011**).

1.2.6.2. Production de peroxyde d'hydrogène

Les BL sont capables de sécréter le H₂O₂ (**Van de Guchteetal., 2001**). La plupart des recherches a affirmé que le H₂O₂ était responsable des effets inhibiteurs (**Price et Lee ,1970**). Cette molécule réagit sur des nombreux composants cellulaires tels que l'ADN, les protéines, les lipides ce qui entraîne la mort cellulaire (**Kentouri,2016**).

1.2.6.3. Production des Bactériocines

Selon **Klaenhammer (1988)** a défini que les bactériocines sont des substances protéiques avec une activité soit bactéricide provoquant la mort de cellule cible soit activité bactériostatique inhibant la croissance bactérienne contre les espèces proches de souche productrice (**Mekhloufi, 2012**).

L'activité de bactériocines est dirigée contre les Gram positifs, aucune bactériocine produite par les BL a une activité contre les Gram négatifs à cause de la présence de la membrane externe qui inhibe les bactériocines d'atteindre la membrane interne (siège de leur activité) (**Dortu et Thonart, 2009**).

Chapitre II: Les bactériocines

2.1. Définition

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique des bactéries lactiques. Les bactériocines présentent un spectre d'activité limité aux bactéries taxonomiquement proches de la bactérie productrices, certaines bactériocines possèdent un large spectre d'activité contre des bactéries éloignées au point de vue phylogénétique (**Taggetal., 1976**).

Sont produites principalement par les différentes souches des bactéries lactiques comme les *Lactococcus*, *lactobacillus*, les *Pédiococcus* (**klaenhammer, 1988 ;Piard et Desmazeaud, 1992**). Elles sont généralement cationiques, hydrophobiques ou amphiphiles, de faible poids moléculaire (2-6 kDa) composées de 20 à 60 acides aminés (**Nes et holo, 2000**).

2.2. Classification des bactériocines

Différentes classifications des bactériocines ont été établies sur la base de leur séquence primaire, la masse moléculaire, ou la stabilité à la chaleur (**Klaenhammer,1993**). La classification de **Klaenhammer** comprend quatre classes de bactériocines.

2.2.1. Classe I : les lantibiotiques ou bactériocines modifiés

Ce sont de petits peptides hydrophobes, possédant une masse moléculaire de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels obtenus par modification post-traductionnelle (**Van Der Meer et al., 1993**): la lanthionine - la P méthyllanthionine et des résidus déshydratés (la déhydroalanine et déhydrobutyrine) (**Carine et al., 2009**) liés par des ponts soufrés intra chaîne, sont synthétisées par plusieurs genres microbiens Gram positif (**Cleveland et al., 2001**). Dans le cas des bactéries lactiques l'exemple type est la nisine produite par *Lactococcus lactis*. Ce groupe de bactériocines se scinde en trois catégories selon la structure des peptides et leurs modes d'action : les linéaires (type A), les globulaires (types B) et les multi-composantes (type C) (**Heng et al., 2006; Jung, 1991**).

Le type A qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés; cette catégorie comprend des bactériocines comme la nisine A, l'épidermine et la lacticine 481. Et le type B globulaires comprennent des peptides de forme sphérique chargés négativement comme la mersacidine et la cinnamycine (McAuliffe, 2001; Nagao *et al.*, 2006).

Les peptides multi-composants sont des bactériocines dont l'activité antibactérienne est le résultat de la combinaison d'au moins deux peptides. La lacticine 3147 (Ryan *et al.*, 1996) et la cytolysine (Coburn *et al.*, 2003), (Figure 3).

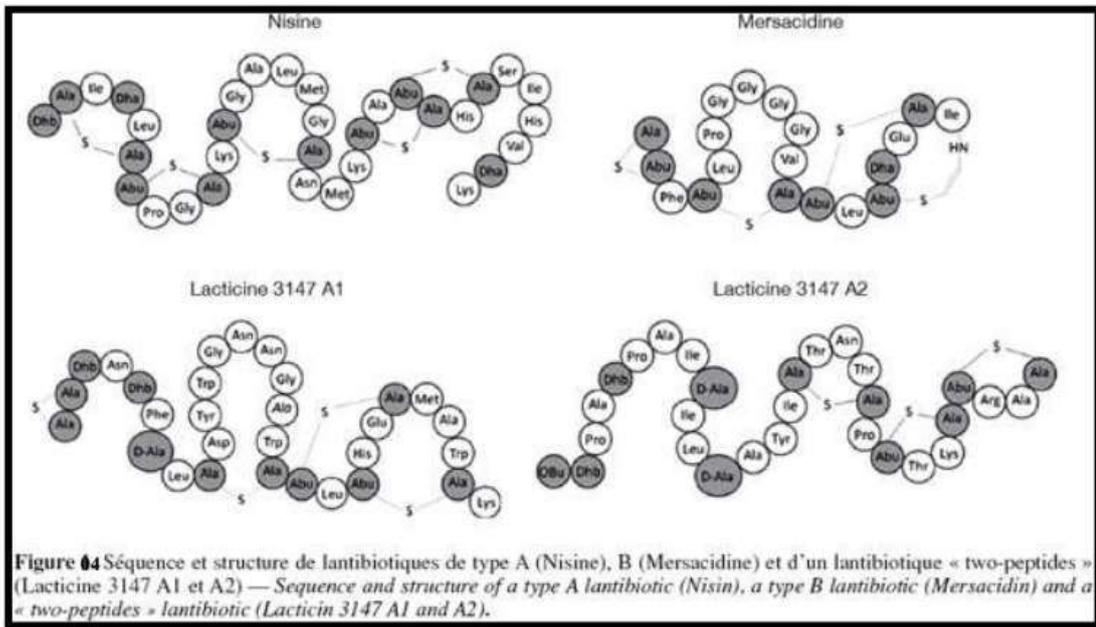


Figure 03 : Séquence et structure de lantibiotique de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two peptides » (McAuliffe *et al.*, 2001).

2.2.2. Classe II : bactériocines ne possédant pas d'acides aminés modifiés

Contient les bactériocines contiennent peptides de taille inférieure à 15 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés, à spectre étroit où leur activité est dirigée contre les bactéries phylogénétiquement différentes, les plus étudiées dans cette classe: la diplococcine qui est produite par plusieurs souches de *lactococcus lactis ssp cremoris*, la lactococcine A, la lactocine 27, la lactacine B et F (Davay et Richardson, 1981).

2.2.3. Classe III : Cette classe concerne les bactériocines de haut poids moléculaire supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces

bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus*A, L'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Nilsenet *al.*, 2003; Papagianni, 2003; Nigutovaet *al.*, 2008).

2.2.4. Classe IV : Comporte les bactériocines couplées à une partie non protéique, sucre ou lipide nécessaire à l'activité inhibitrice, cette classe fut ajoutée suite à l'observation de la perte de l'activité de certaines bactériocines après leur incubation en présence d'enzymes dégradant les sucres et les lipides (Jiménez -Diaz *et al.*, 1993) Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite.

2.3. Mode d'action

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activités contre les bactéries Gram (-), leurs effets sur la cellule cible peut être bactéricide (entraînant la mort cellulaire), bactériostatique (ralentissent la croissance), ou effet bactéricide sans aucune lyse cellulaire.

Selon Taggetal., (1976) le mode d'action des bactériocines comporte deux étapes :

- ❖ **1ere étape :** Consiste en l'adsorption de la bactériocine sur les récepteurs spécifiques ou non spécifiques de la membrane des cellules cibles.
- ❖ **2eme étape :** Phase irréversible impliquant la modification pathologique de la cellule cible.

Chung *et al.*, (2000) ont confirmés que l'action des bactériocines se manifeste par la formation des pores au sein de la membrane plasmique des cellules cibles, et par conséquent la perte des constituants cellulaires (ATP, K+) qui ont un rôle dans le maintien de l'équilibre des réserves énergétiques et du pH intracellulaire. Cette perte de l'intégrité induit la baisse de la synthèse macromoléculaire (ADN, ARN, protéines) (Figure 04).

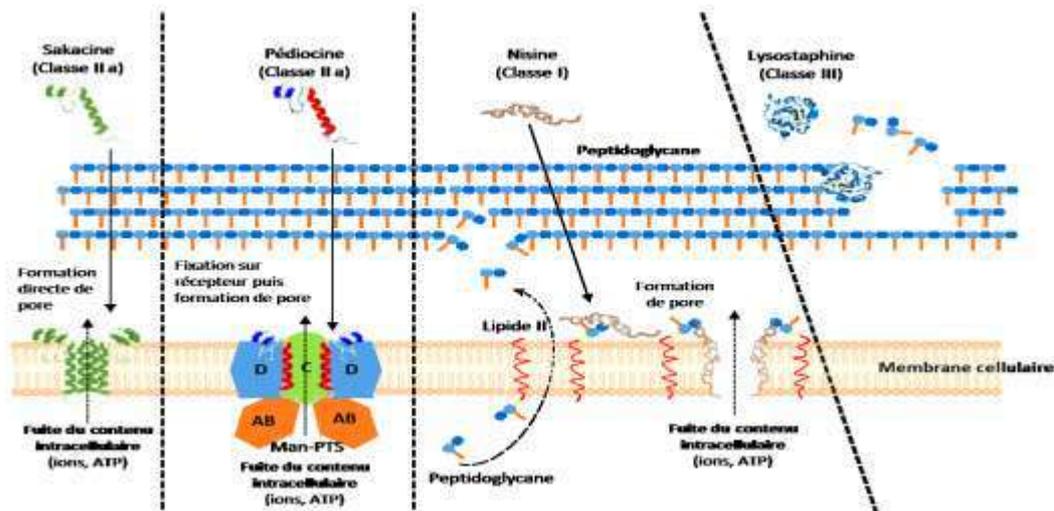


Figure 04: Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries Gram positif. Schéma proposé par Fernandez (2014) (Essodolom T *et al*, 2016)

2.4. Purification des bactériocines

Puisque les bactériocines sont de nature protéiques, leurs méthodes de purification sont les mêmes que les protéines. Beaucoup de protocoles de purification consistent en une série de chromatographies à différents principes, se basant sur les différentes propriétés des protéines (charge, hydrophobie, taille, etc.). Cependant, d'importantes pertes de l'activité est perdue au fur et à mesure des étapes de purification (Tagg *et al.*, 1976 ; Hainquet *et al.*, 2008).

Dans la majorité des cas, la purification des bactériocines se déroule en deux étapes :

- L'une consiste en une pré-purification par précipitation des protéines, par le biais du sulfate d'ammonium, par acidification ou encore par partition différentielle en utilisant des solvants organiques (Van den Berghe *et al.*, 2006).
- Lors de la deuxième étape, les protéines précipitées sont solubilisées et purifiées par un enchainement de techniques plus fines incluant des chromatographies d'exclusion de taille, d'échanges d'ions, d'interactions hydrophobes ainsi que des liquides hautes performances en phase inverse (RP-HPLC) (Parente *et al.*, 1999).

Les techniques de purification des bactériocines utilisées sont nombreuses et variées. Un protocole commun a cependant pu être élaboré, ayant également été utilisé pour la

purification de nombreuses bactériocines (**Tichaczeketal.,1994;Jimenez-Diaz et al., 1995; Benoit et al., 1997; Parada et al., 2007**).

Ce protocole, est composé de quatre étapes : une précipitation au sulfated'ammonium, une chromatographie échangeuse de cations, une chromatographie d'interactions hydrophobes et une chromatographie en phase inverse utilisant le méthanol ou l'acétonitrile comme solvant d'élution (**Tichaczeketal., 1994; Jimenez-Diaz et al., 1995; Benoit et al., 1997; Parada et al., 2007**).

Toutes ces méthodes permettent d'obtenir des bactériocines actives, certes avec un haut degré de pureté, le seul bémol reste les rendements relativement faibles (**Dortu et Thonart, 2009; Smaoui, 2010**).

Il s'en suit également, une caractérisation de ces bactériocines, qui sont considérés comme étant des biomolécules, la détermination de la structure chimique, et ce par le biais de techniques spectroscopiques tel que la détermination du spectre ultraviolet(UV), spectroscopie infra rouge a transformé de fourier (FTIR), une électrophorèse en gel polyacrylamide (SDS-PAGE) afin de connaitre le poids moléculaire (**Smaoui, 2010**).

2.5. Application des bactériocines

2.5.1. Dans le secteur agroalimentaire

La bioconservation des aliments fait l'objet depuis 40 ans de nombreuses études. Elle consiste en une augmentation de la durée de vie et une amélioration de la sécurité sanitaire des produits alimentaires, en utilisant des microorganismes et/ ou leurs métabolites (**Ross et al., 2002 ;Stiles, 1996**).

La nisine(**Rogers, 1928**) est aujourd'hui la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire (additif numéro E234) dans 80 pays. Elle a été évaluée comme sans danger pour l'Homme par l'organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (ONUAA) et l'Organisation Mondiale pour la Santé publique (OMS) en 1969 ainsi que par les autorités sanitaires Européennes en 1983.

La nisine est commercialisée sous une forme semi-purifiée à l'état lyophilisé sous le nom de Nisaplin™(Danisco, France)et de Chrisin™(Christen Hansen, Danemark) (Guinaneet *al.*, 2005).

La nisine est souvent utilisée pour le contrôle de la prolifération de pathogènes tels que *Clostridium botulinum* (*Cl. botulinum*), *Cl. tyrobutyricum* et *Li.monocytogenes* dans les produits laitiers (Davies et Delves-Broughton, 1999). Elle est également utilisée dans d'autres produits alimentaires pasteurisés comme les crèmes glacées, les desserts sucrés à base de lait, les laits aromatisés et de jaune d'œufs (Thomas *et al.*, 2000).

2.5.2. Dans le domaine sanitaire

Le domaine alimentaire n'est pas le seul domaine d'usage des bactériocines. Ils sont utilisés comme agents de thérapie naturelle alternatifs aux antibiotiques (Smaoui, 2010). L'émergence de la résistance aux antibiotiques ces dernières années a orienté la recherche vers la recherche de nouveaux agents antimicrobiens naturels (Makhloufi, 2011). Le mode d'action des bactériocines qui diffèrent de ceux des antibiotiques conventionnels et l'innocuité des bactériocines permettraient leur utilisation en médecine comme alternative aux antibiotiques dans la prévention et/ ou le traitement des infections dues à des bactéries devenues résistantes aux traitements conventionnels (Dicksetal., 2011). Ils ont une activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positives pathogènes comme *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (Drideret *al.*, 2006). Jusqu'à maintenant aucunes bactériocines a été commercialisé comme médicament

Chapitre III : Les Bactéries psychrotrophes

3.1. Définition

Les psychrotrophes sont des micro-organismes qui conservent une activité notable à des températures inférieures ou égales à +7°C (Catteau, 1999 ; Rozier, 1995)(tableau 01). La plus part des bactéries psychrotrophes sont Gram négative, aérobies, et non sporulées (Weber, 1985). Leur croissance est caractérisée par apparitions des colonies sur gélose à 7C° pendant 10 jours (Alain Brangeretal., 2007). Sont des agents d'altération des aliments, ou toxi-infections alimentaires.

Il est noté que le monde des micro-organismes psychrotrophes ne se limite pas aux seules bactéries. On rencontre aussi un nombre très important d'espèces de micromycètes, agents de l'altération au froid des denrées alimentaires (Bornert, 2000).

Tableau 01: bactéries et température de croissance(Leyral et Vierling ,1997).

Groupe	Température minimale	Température optimale	Température maximale
Les psychrotrophes	0 à 5 C°	25 à 35 C°	37 C°

3.2. Les principaux genres des bactéries psychrotrophes

Les psychrotrophes sont classé en fonction de leurs effets : les agents de toxi-infection alimentaire, et les agents d'altérations des aliments.

3.2.1. Agents de toxi-infection alimentaire

Il faut retenir la place prépondérante de *Listeria monocytogenes* en tant que bactérie psychrotrophe pathogène pour l'homme (Bornert, 2000).

Les espèces *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* et *Clostridium botulinum* de type (E) sont impliquées de façon beaucoup plus rare, en Europe, dans des accidents d'origine alimentaire (Bornert, 2000).

D'autres bactéries présentent un intérêt pratique mineur, en particulier *Aeromonas hydrophila* et *Plesiomonasshigel-loides*. Enfin, il faut noter que certaines souches de *Salmonella* et de *Escherichia coli* sont susceptibles de se développer entre +5°C et +7°C, mais que ces souches restent atypiques de sorte que ces micro-organismes ne sont pas considérés parmi les psychrotrophes (Catteau, 1999).

3.2.2. Agents d'altérations des aliments

Les bactéries psychrotrophes agents d'altérations des aliments sont beaucoup plus nombreuses et variées, mais la famille des *Pseudomonadaceae* est souvent la plus représentée (Anonyme, 1986). *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Alteromonas* et *Flavobacterium* sont aussi fréquemment rencontrés dans les denrées alimentaires (Bronert, 2000).

Les bactéries lactiques sont largement représentées au sein du groupe des psychrotrophes. Les lactobacilles présentent une activité jusqu'à une température de +2°C. On rencontre aussi des bactéries des genres *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Pediococcus* (Garry et Leguern, 1999).

3.3. Effet de la flore psychrotrophe sur les aliments réfrigérés

De nombreux types d'altérations des denrées dues à l'action des bactéries psychrotrophes ont été décrits. Ils sont le résultat de l'activité d'enzymes microbiennes exo-cellulaires et affectent, selon les cas, la consistance, la couleur, l'aspect, l'odeur et la saveur du produit (Bornert, 2000).

3.4. Effet de la flore psychrotrophe sur le lait réfrigéré

Le lait est une matière très riche en protéines, vitamines, lactose, sels minéraux, des graisses, et 87% d'eau. Ce qui le rend un milieu très favorable pour le développement des micro-organismes.

Le stockage du lait au froid responsable d'une sélection microbienne et de développement des germes psychrotrophes; provoquant une modification de l'équilibre et de la nature de la flore microbienne de lait. Les psychrotrophes produisent des enzymes lipolytiques et protéolytiques, ces enzymes peuvent être responsables de défauts et d'altérations du lait (Weber, 1985).

Cet aliment est susceptible d'être altéré par deux processus principaux pouvant selon les conditions, être plus ou moins associés :

➤ **Protéolyse :**

La conservation du lait cru, de son recueil jusqu'à sa consommation, est assurée par une réfrigération aux environ 4°C. Cette température sélectionne les groupes bactériens psychrophiles : *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, certains Streptocoques dont l'activité protéolytique peut s'exercer sur la caséine du lait. Il en résulte une altération lente du lait se traduisant par des modifications organoleptiques : saveur amère, saveur de pomme de terre (Leyral et Vierling, 2007).

➤ **Lipolyse :**

De nombreuses espèces psychrophiles protéolytiques sont aussi lipolytiques et dégradent les globules graisseux du lait. C'est le cas de certains *Pseudomonas*, *Bacillus cereus*. Les acides gras insaturés résultant de la lipolyse peuvent être oxydés (rancissement). En marge de ces actions principales de la flore microbienne du lait, il convient de mentionner celle qui conduit au filage. Le filage résulte de la production par certaines bactéries de substances visqueuses. Ces substances sont des polymères de glucose (dextranes) ou de dérivés azotés du glucose. La principale espèce en cause est *Alcaligenes viscosus* (Leyral et Vierling, 2007).

Partie II

Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

L'intégralité de ce travail a été réalisée au niveau de laboratoire de centre Algérien de contrôle de qualité et de l'emballage à Ouargla, ainsi qu'au niveau des laboratoires pédagogiques à la faculté des sciences de la nature et de la vie ; Université Kasdi Merbah Ouargla. Durant la période de février à la fin de mai 2019.

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel biologique

2.1.1.1. Lait

➤ Echantillonnage

Le lait cru de chèvre utilisée lors de cette étude, été prélevé au mois de Mars 2019 à 7 :30 de matin au niveau de la wilaya d'Ouargla. A partir d'une chèvre saine vivant en élevage à domicile, après lavage des mamelles avec l'eau et l'eau de javel le lait est collecté dans une bouteille stérile et transporté immédiatement au laboratoire.

2.1.1.2. Souches bactériennes lactiques

Il s'agit de cinq souches des BL isolées précédemment à partir de lait de chamelle dans la région d'Ouargla et Hassi Messaoud en 2017. Se sont pré-identifiées et conservées à -20°C en présence de glycérol.

2.1.2. Milieux de cultures

Les milieux utilisés au cours de cette étude expérimentale sont les suivants :

Les géloses : M17, milieu PCA.

Les bouillons : bouillon M17.

Autres milieux : Eau peptonée, eau physiologie, lait écrémé.

2.1.3. Produits chimiques et réactifs :

Les colorants : violet de gentiane, la fuschine.

Bases : NaOH (1N).

Alcool et autres : éthanol, Lugol, eau oxygénée, glycérol.

2.1.4. Petit matériel :

Boîtes Pétri, pipettes pasteur, pipettes graduées, tubes à essais, Erlen Meyer, tubes Eppendorf, papier filtre, lames.

2.1.5. Appareillage :

Les appareillages utilisés sont les suivants :

- Agitateur
- Plaque chauffante électronique.
- Autoclave.
- Bain marie.
- Balance.
- Bec-benzène.
- Four pasteur.
- Etuve.
- Centrifugeuse.
- pH mètre(HANNA).
- Incubateur agitateur.
- Réfrigérateur (condor).
- Compteur des colonies.
- Microscope optique.
- Vortex électronique.

2.2. Méthodes

2.2.1. Vérification de la pureté des bactéries lactiques

2.2.1.1. Revivification

Les souches S1, S2, S3, S4, et S5 conservées à -20°C sont revivifiées par ensemencement sur gélose M17. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures (Savadogo, 2004).

2.2.1.2. Purification

La pureté des souches est examinée par le repiquage successif d'une colonie bactérienne sur gélose M17 avec la méthode des stries et suivie par une incubation pendant 24 h à 30°C.

2.2.1.3. Pré-identification des souches bactériennes

Après incubation, la pureté des souches est confirmée par des examens macroscopiques, microscopiques (coloration de Gram), et de test biochimique (catalase). (Dellaglio, 1994 ; Bourgeois *et al.*, 1996 ; Larpent, 2000).

2.2.1.3.1. Examen macroscopique

Il s'agit d'une observation visuelle de la culture des isolats sur gélose et bouillon M17, pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies ainsi, l'aspect du trouble dans le bouillon (Badis *et al.*, 2005).

2.2.1.3.2. Examen microscopiques (Coloration de Gram)

Les isolats ont été soumis à la coloration de Gram qui permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et de nous renseigner sur le mode de regroupement (Singleton, 1999).

2.2.1.3.3. Test de la catalase

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase.

La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte du H₂O₂, à 10 volumes. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz (Marchal *et al.*, 1991).

Les bactéries Gram positifs et catalase négative sont présumées des bactéries lactiques (Belarbi, 2011).

2.2.2. Conservation des souches

➤ Conservation à courte terme

La conservation des souches pures se fait par l'ensemencement d'une colonie sur milieu M17 solide incliné, après l'incubation à 30°C pendant 24h, les cultures sont maintenues à 4°C (**Badiset al.,2005**). Le renouvellement des souches se fait tous les 4 semaines.

➤ Conservation à long terme

À partir des jeunes cultures bactériennes sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 tr/ pendant 10 min (**Mahi, 2010**), après l'élimination du surnageant, le culot est lavé avec l'eau physiologies stérile. L'isolat purifiés a été réalisé dans un milieu contenant 70% de lait écrémé et de 30% de glycérol, puis stockés à une température de -20°C dans des tubes eppendorf(**Badiset al., 2005**).

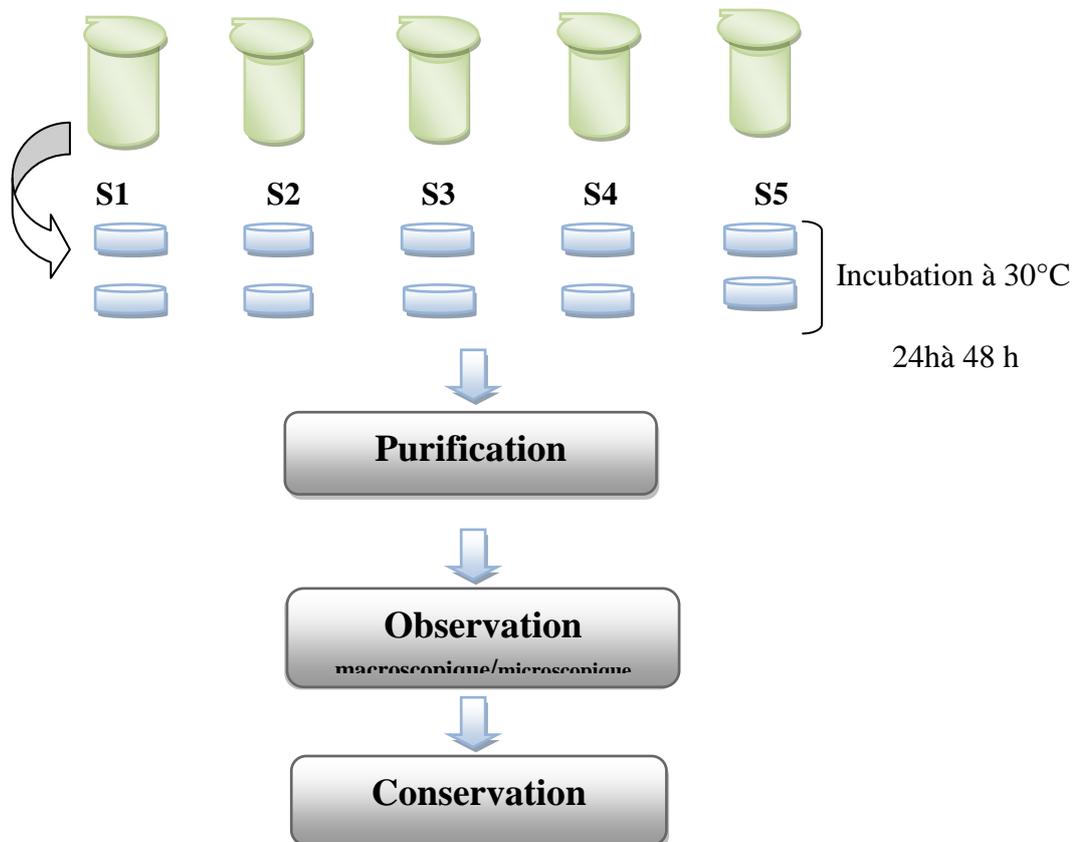


Figure 05 : protocole d'isolement et de conservation des souches lactiques pures.

2.2.3. Préparation des surnageants des bactéries lactiques

2.2.3.1. Pré-culture

Après la confirmation de la pureté des souches bactériennes lactiques S1, S2, S3, S4, et S5 les colonies isolées sont ensemencées dans 10ml d'un bouillon M17 et ensuite incubé dans 30°C pendant 24h. La croissance des bactéries lactiques est expliquée par la présence d'une trouble.

2.2.3.2. Mise en culture liquide

Des volumes de 90 ml de bouillon M17 sont ensemencés par les pré-cultures ainsi préparées dans des Erlen Meyer, suivi par une incubation à 30°C pendant 24h à 48h (Guessas et Bettache, 2006).

2.2.3.3. Récupération des surnageants

Une centrifugation réfrigérée de la culture est réalisée à 4000 tr pendant 10 min (Tabak et Bensoltane, 2011). Le surnageant est récupéré stérilement puis filtré à travers un papier filtre stérile, le pH de surnageant est neutralisé par une solution de NaOH (1N) afin d'éliminer l'effet des acides organiques des BL (Bendali, 2011).

2.2.4. Etude de l'effet des surnageants des bactéries lactiques sur la conservation de lait cru de chèvre au froid

2.2.4.1. Ensemencement des échantillons du lait cru par les surnageants

5 tubes de lait de chèvre cru de 10 ml sont ensemencés par 1 ml du chaque surnageant lactique, avec un tube de lait non ensemencé témoin. Puis les tubes ensemencés et témoin ont été incubés au réfrigérateur à 7°C.

2.2.4.2. Analyse physico-chimique et microbiologique

Des mesures des caractéristiques physico-chimiques des échantillons du lait réfrigéré sont faites chaque les 3 jours de j0 jusqu'à j0+12.

2.2.4.2.1. Mesure de pH

La mesure de pH est faite directement par le pH- mètre, en plongeant l'électrode dans le volume du lait puis on fait la lecture directe de valeur de ph sur l'appareil, on refaire la lecture de ph chaque 3 jours.

2.2.4.2.2. Analyse microbiologique

Les analyses microbiologiques font pour but de voir l'effet du surnageant actif sur les bactéries psychrotrophes qui altère le lait cru après réfrigération à 7°C pendant quelques jours.

A. Préparation des dilutions décimales

La solution mère a été préparée en prélevant 1ml de chaque tube du laitensemencé, ainsi le témoin et ajouté à 9 ml d'eau peptonée stérile, à partir des solutions mères des dilutions séries allant de 10^{-1} à 10^{-4} ont été effectuées.

B. Dénombrement de la flore psychrotrophe

A partir des dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-4} , 0,1ml de chaque dilution est porté aseptiquement estensemencée en surface de gélose PCA dans des boites pétries. L'incubation se fait à 7°C pendant 10 jours. L'ensemencement se refaite chaque les 3 jours de J_0 jusqu'à J_0+12 pour tous les échantillons.

✓ Les résultats de ces analyses permettent de détecter la présence d'une/des substances inhibitrices dans les surnageants des souches lactiques étudiées.

2.2.5. Détermination de la nature des inhibiteurs dans les surnageants actifs des bactéries lactiques

Pour déterminer la nature des molécules antimicrobiennes produites par la souche bactérienne sélectionnée (S4) (le surnageant qui a montré plus d'effet inhibiteur sur la flore psychrotrophe), le surnageant est neutralisé pour éliminer l'effet des acides organiques puis ce surnageant est distribué dans 3 tubes, chaque tube a subi un traitement différent comme suit :

- **Tube 1** : surnageant de S4 + l'enzyme protéolytique la pepsine, cette enzyme est utilisée à une concertation finale de 1mg/1ml de surnageant (Kentouri,2016), ce

mélange est stérilisé par papier filtre et incubé à 37°C pendant 1h à 2h. Puis chauffé à 100°C /2min afin d'inactiver l'enzyme (**Benmouna,2012**).

- **Tube 2** : surnageant de S4 chauffé à 100°C pendant 10 à 30 min (**Leonard,2013**).
- **Tube 3** : tube témoin, contient le surnageant de S4 neutre non traité.

L'activité antimicrobienne de surnageant S4 contre la flore psychrotrophe est testé par la mesure de pH de 3 tubes contenant 10 ml de lait cruensemencé par 1 ml de chaque surnageant traité pendant 12J.

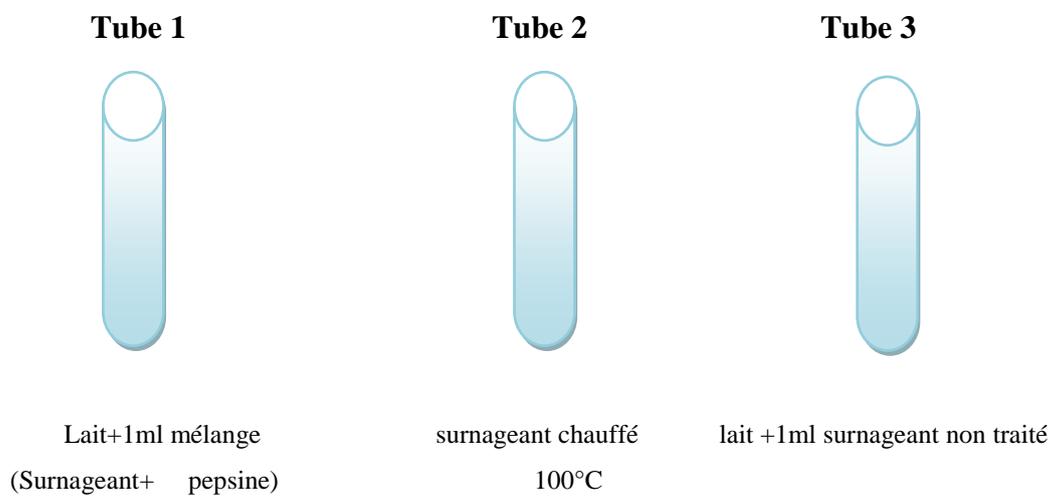


Figure 06 : protocole de l'étude de la nature de substance inhibitrice de surnageant actif.

Partie III

Résultats et discussion

3. Résultats et discussion

3.1. Vérification de la pureté des bactéries lactiques

3.1.1 Revivification et purification des souches

La revivification et la purification des souches bactériennes S1, S2, S3, S4, et S5 sur gélose M17 incubée à 30°C pendant 24 heures permet l'apparition des colonies de petite taille d'un aspect typique et homogènes de couleur blanchâtre, ronde, lisse et de bordure régulier (Benguella,2015) ce qui souligne que les cultures obtenues sont pures, ils ont été gardés pour la suite de l'étude (Photo 1).



Photo 01 : aspect macroscopique des souches bactériennes sur gélose M17

3.1.2. Pré-identification des souches lactiques

3.1.2.1. Etude des caractères morphologiques et biochimique(catalase)

➤ L'aspect macro et microscopique

La pré-identification des isolats consiste à étudier les souches de côté morphologiques, d'un part l'observation à l'œil nu de l'aspect macroscopique pour caractériser la forme, la taille, la couleur des colonies (Badis,2006), les résultats sont présentés précédemment. D'autre part l'étude de l'aspect microscopique après coloration de Gram (photo 02), les résultats sont comme suite :

- L'observation microscopique montre que les cellules de forme cocci isolées ou en chaînettes.
- Ces coques sont disposées en paires ou en chaînettes plus ou moins longues

- Tous les souches sont avérées à Gram positif.

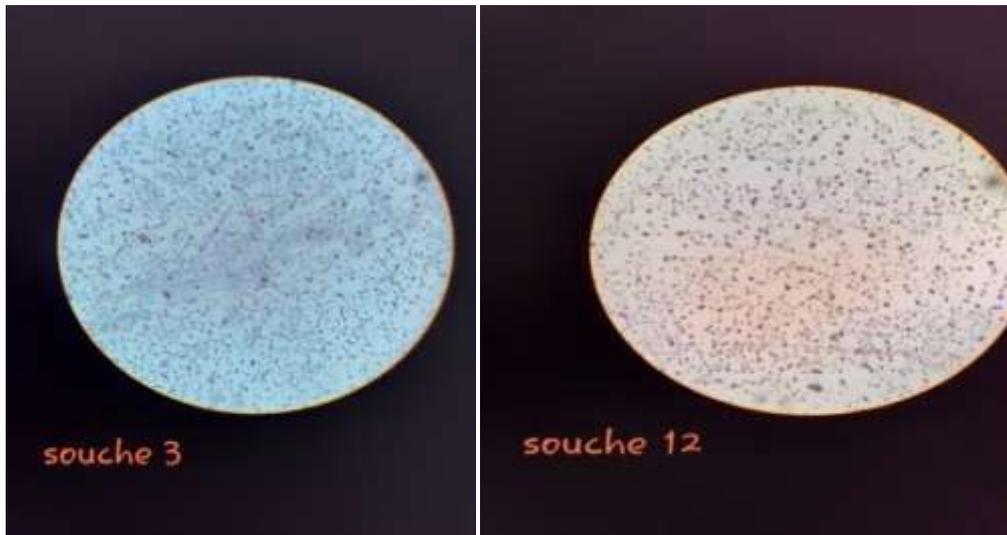


Photo 02 : observation microscopique (Gr:10x40) des souches lactiques après coloration de Gram

➤ **Test de la catalase**

L'analyse de ce résultat a montré que tous les souches lactiques sont avérées à gram positif et catalase négative ceux qui est caractéristique des bactéries lactiques.

❖ A partir des résultats macroscopique, microscopique, et le test de catalase on peut déduire que les souches S1, S2, S3, S4, S5 sont des coques lactiques.

3.2. Préparation des surnageants des bactéries lactiques

3.2.1. La culture liquide

La croissance des BL en bouillon M17 est caractérisée par l'apparition d'une trouble au fond des tubes à essai comparativement au témoin non ensemencé (**photo03**).



Photo03 : Observation macroscopique du trouble d'une culture lactique dans un bouillon M17.

❖ Sur bouillons, les souches présentent un trouble homogène, cette trouble est concentré au fond à la recherche des conditions anaérobiques (**Benguella, 2013**). Les résultats de la culture liquide sont conformés avec les résultats trouvés par (**Ayadi et Kernou, 2016**).

3.2.2. Récupération des surnageants des coques lactiques

3.2.2.1. Neutralisation des surnageants

Après la centrifugation et la filtration des cultures pures des souches lactiques, la mesure de pH des surnageants indique une acidité (pH=5,53) à cause des acides organiques produites par les bactéries lactiques (**Yao et al., 2009**).

L'effet inhibiteur des acides organiques dans les surnageants a été éliminé par une neutralisation de pH de milieu avec une solution de NaOH de 1N jusqu'à un pH neutre (pH=7) (**Tabak et Bensoltane, 2011**)

3.3. Etude de l'activité antimicrobienne des surnageants des bactéries lactiques sur le lait cru de chèvre réfrigéré

3.3.1. Mesure de pH

Le Tableau 02 (**annexe 03**) et la figure 07 représentent les mesures de pH des échantillons (lots) de laitensemencées par les surnageants des souches S1, S2, S3, S4, S5 et réfrigérés à 7°C pendant 12 jours.

A partir de ces résultats on observe que :

-Le ph pour le témoin et les lot1, lot2, lot3, lot4, et lot5 dans le J0 est de 6,68 ce qui indique la fraîcheur de lait cru de chèvre selon **Remeuf et al., (1989)**. Le pH est le paramètre majeur qui juge la qualité et l'état fraîcheur de lait. Le pH de lait de chèvre se caractérise par des valeurs allant de 6,45 à 6,90 (**Remeuf et al., 1989**).

-À partir de troisième jour J_0+3 jusqu'à J_0+12 on remarque une diminution de pH pour le témoin, lot1, lot2, lot3, et lot5 peut-être attribué à la multiplication des bactéries psychrotrophe ainsi que la forte concentration en acides gras issues de l'activité de lipolyse provoquée par les germes psychrotrophes (Rahli, 2015). Concernent le lot4 on observe une stabilisation de pH à 6,68 expliquée par une inhibition de la croissance de la flore psychrotrophe par le surnageant de la souche 4ensemencée dans le lait cru.

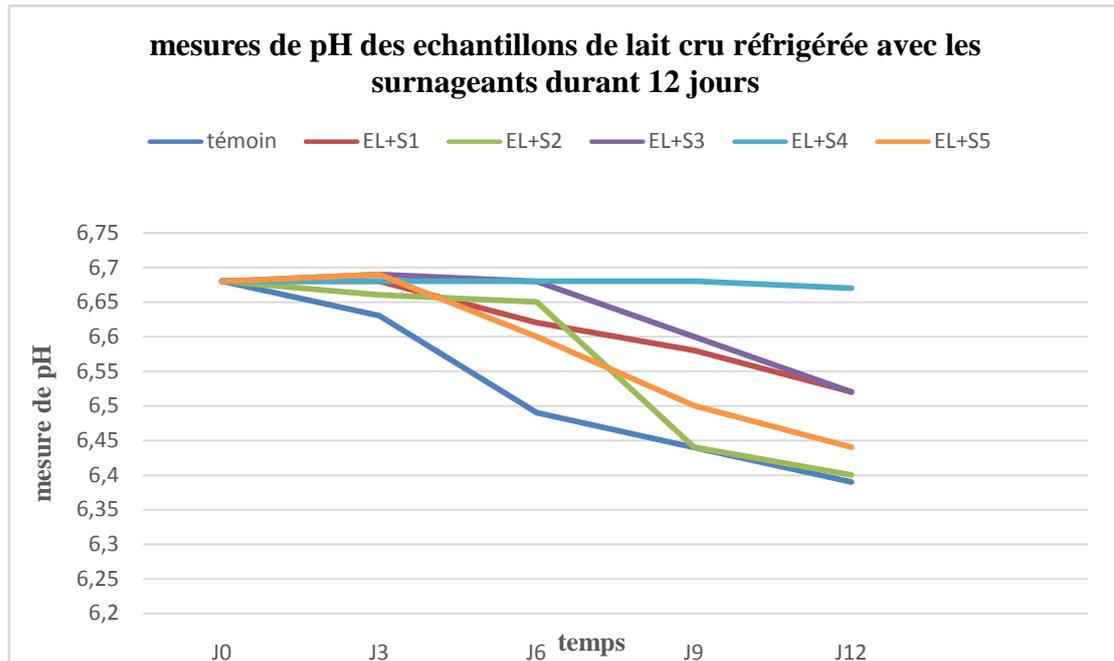


Figure 07 : évolution de pH des échantillons de lait cru réfrigérée avec le surnageant.

3.3.2. Dénombrement des psychrotrophes sur gélose PCA

La croissance des colonies psychrotrophes est détectée après 10 jours d'incubation à 7°C, il s'agit de compter tous les boîtes contenant un nombre des colonies entre 15 et 300 colonies. Les résultats sont montrés dans le Tableau 03 et la figure 08.

-D'après le tableau 03(annexe 03) et la figure 08 qui représentent les résultats de dénombrement des bactéries psychrotrophes sur milieu PCA pour EL+S on observe que :

-Dans le premier jour J_0 la flore psychrotrophe est de 0 UFC/ml pour les 5 lots ainsi le témoin en raison d'absence de croissance des psychrotrophes.

- ❖ À partir de J_0+3 , une augmentation accrue remarquable de nombre des psychrotrophe pour le témoin ; et tous les EL+S avec un pic dans l'échantillon EL+S2 ($1,2.10^5$ UFC/ml) et la valeur la plus basse pour l'échantillon EL+S4 ($2. 10^3$ UFC/ml) tandis que la valeur de témoin ($3,4. 10^3$ UFC/ml), expliquée par une débutde croissance d'une flore d'altération de lait réfrigéré qui signifie absence de l'effet inhibiteur des surnageants sur la flore psychrotrophe.
- ❖ Du J_0+6 à J_0+9 , le nombre de bactéries continue à augmenter dans tous les échantillons sauf que le nombre le plus bas enregistré par l'échantillon EL+S4 ($6,4. 10^5$ UFC/ml)
- ❖ Du J_0+9 à J_0+12 , la plupart des échantillons atteignent un nombre indénombrable de la flore psychrotrophe indicateur de l'altération de lait conservé au réfrigérateur ; contrairement à l'échantillon EL+S4 qui marque une augmentation moindre par rapport au témoin et aux autres échantillons où il atteint le($2,34.10^6$ UFC/ml) dans le J_0+12 .ce résultat est expliqué par un ralentissement de croissance des germes psychrotrophes en raison de surnageant de S4.

On peut déduire a partir des résultats de mesure de Ph et de dénombrement de la flore psychrotrophe que :

- Le surnageant de la souche lactique S4 a un effet inhibiteur résulte de son activité bactériostatique qui ralentisse la croissance des germes psychrotrophes et donc retardé l'altération de lait réfrigéré et augmenté la durée de son conservation au froid, donc le surnageant de S4 est actif. Par contre les autres souches étudiées ne montrent aucun effet inhibiteurremarquable sur la flore psychrotrophe.

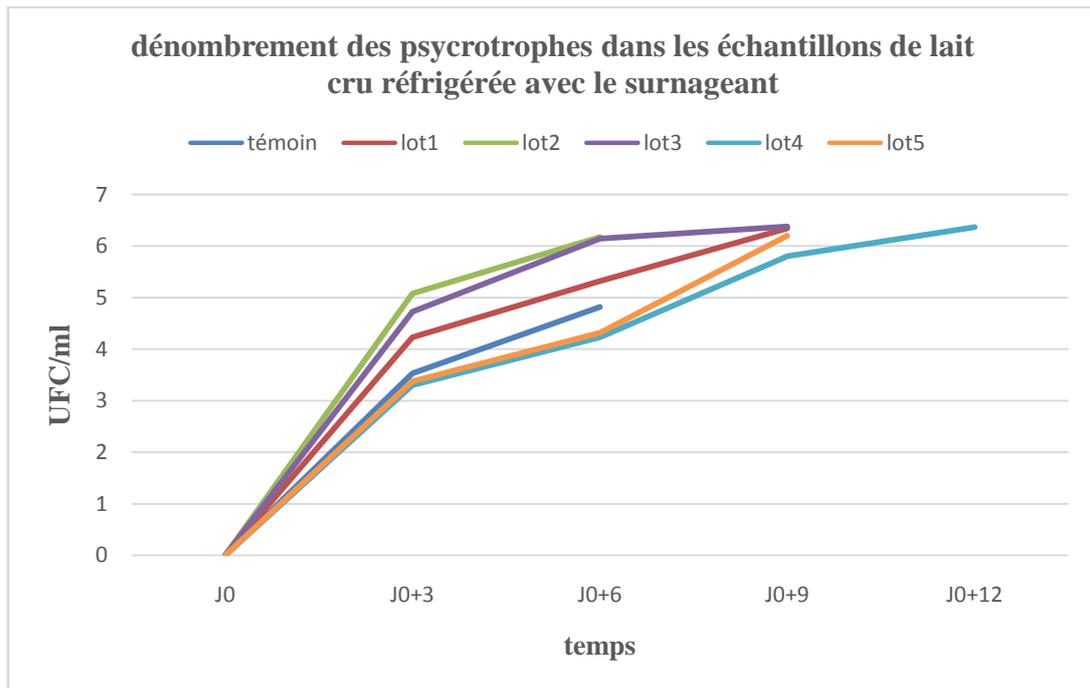


Figure08 : résultat de dénombrement des psychrotrophes dans des échantillons de lait cru réfrigérée avec le surnageant dans milieu PCA.

3.4. Identification de la nature de substances antimicrobiennes

Le surnageant actif de la souche lactique S04 à subi plusieurs traitement. Les résultats sont illustrée dans le tableau 04(**annexe03**) qui représente la mesure de pH des échantillons de lait cru avec le surnageant traité par la chaleur et la pepsine.

La lecture des résultats se fait par comparaison, entre ceux obtenus avec les surnageants traités et le surnageant non traité par la chaleur et la pepsine.

- ✓ Le pH de d'EL+S4 est stable (6,68) lorsque le surnageant ne subi aucun traitement (témoin).
- ✓ Le surnageant actif a été soumise a l'action d'un enzyme protéolytique (pepsine), ce dernier altère complètement l'activité inhibitrice de composé actif par un décroissement de pH de lait jusqu'à 5,83 dans le J₀+12. ce qui indique que la partie biologiquement active de l'inhibiteur est de nature protéique, cette nature suggère que cette substance inhibitrice est considérée comme étant une bactériocine (**Tagg et al, 1976 ; Klaenhammer et al, 1994 ; Zamfir et al, 1999**).

✓ L'effet de traitement thermique a été examiné en traitant le surnageant actif a 100°C pendant 30 min, on constate que le pH diminue rapidement à partir de troisième jour J₀+3 jusqu'à un pH= 4,36 dans J₀+12. Ceci pourrait être expliqué par la dénaturation de la molécule inhibitrice. donc le surnageant de la souche S4 est révélé sensible à la chaleur puisque elle ne conserve qu'une partielle activité après un traitement de 30 min a 100°C, nos résultats sont similaires à ceux trouvées par Doumandji (2008).

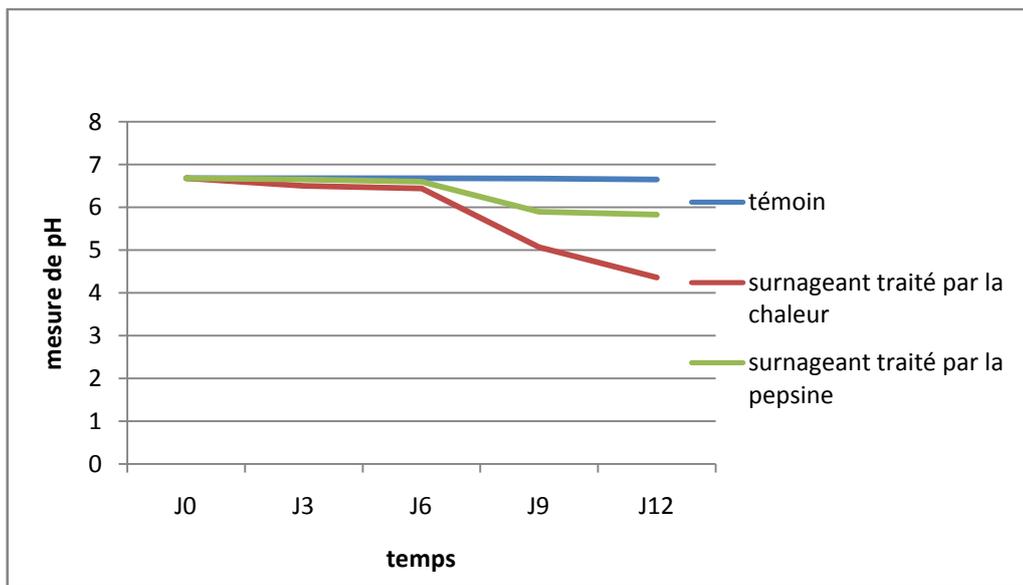


Figure 09: résultat de pH après traitement du surnageant actif par la chaleur et la pepsine.

Conclusion

La bio-conservation compte sur l'inoculation d'un produit par des bactéries sélectionnées pour leur puissance à inhiber le développement des germes peu souhaitable, sans modifier les qualités organoleptiques et sanitaires de ce produit. Les bactéries lactiques sont de bons candidats pour cette technologie grâce à leur métabolites inhibitrice (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, bactériocines).

Dans notre travail, nous avons étudiées la capacité des souches bactériennes lactiques- d'origine cameline- à inhiber les bactéries psychrotrophes gênant lors de la conservation de lait cru de chèvre au froid.

Après la revivification des souches lactiques, on a effectué des tests microscopiques et macroscopiques pour vérifier leurs puretés, les 5 souches obtenue sont des Gram positif et catalase négatif, de forme coccus. Des cultures liquides lactiques ont été également faite afin de récupérer les surnageants actifs.

En comparant les résultats de dénombrement de la flore psychrotrophe et la mesure du pH des échantillons du lait cru de chèvreensemencé par les surnageant des souches lactiques, on a trouvé que le surnageant de la souche S4 ayant une activité antibactérienne contre la flore psychrotrophe du lait réfrigéré par contre les autres souches (S1, S2, S3 et S5) n'ont pas une activité inhibitrice remarquables.

D'après les résultats de la détermination de la nature de l'agent inhibiteur on a constaté que la souche S4 produise une substance thermosensible de nature protéique suggérée d'être une bactériocine, cet agent bactériostatique retarde la croissance des germes nuisibles (flore psychrotrophe).

Nous espérons de donner la suite à ses travaux afin de purifier les substances à activité antimicrobienne avec un grand volume pour avoir un effet inhibiteur très remarquable et d'identifier la souche productrice afin de l'exploiter comme producteur des conservateurs naturels des produits laitiers.

Références bibliographique

Références bibliographiques

- **ALAIN BRANGER, MARI MADELEINE RRICHER, SEBASTIEN ROUSTEL. (2007).** Coordination Microbiochimie et alimentation. Page 75.
- **ANONYME. (1986):** Bergey's manual of systematic bacteriology; volume1, Williams and Wilkins Editeur, Baltimore, 964 pages.
- **BADIS, A., LAOUABDIA-SELLAMI, N., GUETARNI, D., KIHAL, M., & OUZROUT, R. (2005).** caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées a partir de lait cru de chèvre dedeux populations caprines locales" arabia et kabyle". Sciences & Technologie. C, Biotechnologies, (23), 30-37.
- **BELARBI F, 2011 :** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antimicrobiennes, Mémoire de Magistere, Université d'Oran Es Senia
- **BENDDINE.H,DJEBRIT. CH ,2015 .** Etude de l'activité antimicrobienne des quelques souches lactobacilles isolées à partir du lait de chamelle vis-à-vis des quelques souches pathogènes ciblées , Mémoire en vue de l'obtention diplôme de MASTER ACADEMIQUE.p: 5.
- **BENMOUNA, Z. 2012.** Bactériocines des bactéries lactiques: étude biochimique et génétique. Thèse de MAGISTER en biotechnologie, Université d'ORAN
- **BORNERT (2000).** Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. Service Central d'Études et de Réalisations du Commissariat de l'Armée de Terre, B.P. 309, 00447 Armées, Revue Méd. Vét., 2000,151, 11, 1003-1010.
- **BOURGEOIS C. M., MESCLE J. F. et ZOUCCA., (1996).** Microbiologie alimentaire: aspects microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed: Techniques et Documentations, Lavoisier Paris.
- **CARINE.D ; TONART. P. (2009) :** Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. BASE.VOLUME 13.
- **CATTEAU M. (1999).** Pathogènes rencontrés lors de la conservation par le froid. In : La microbiologie prévisionnelle appliquée à la conservation des aliments réfrigérés, Office des publications officielles des Communautés européennes Editeur, Luxembourg, 333 pages.

- **CLEVELAND, J., MONTVILLE, T. J., NES, I. F., & CHIKINDAS, M. L. (2001).** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*, 71(1), 1-20.
- **COTTER, P. D., HILL, C., & ROSS, R. P. (2005).** Food microbiology: bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777.
- **DAVIES, E. A., & DELVES-BROUGHTON, J. (1999).** BACTERIOCINS|nisin.
- **DE VUYST LUC. ET LEROY F. 2004.** Lactic Acid Bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science of Technology* 15:p 67-78
- **DELLAGLIO F., (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Ed: Lavoisier, Paris.
- **DESMAZEAUD M.J. ET DE ROISSART H., 1994.** Métabolisme générale des bactéries lactiques. In *Bactéries lactiques*. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Lavoisier. p: 169-207
- **DORTU CARINE., THORNAT PHILIPPE, T.2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*,13(1):p:143-154
- **DRIDER, D., FIMLAND, G., HECHARD, Y., MCMULLEN, L. M., & PREVOST, H. (2006).** The continuing story of class II bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(2), 564-582.
- **ESSODOLOM T, SAVADOGO A , CHEIKNA Z , FRANÇOIS T , SIMPLICE D. KAROU2 ET ALFRED S. TRAORE ,2016.** Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne : cas des bactériocines , *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 10(1): 384-399.
 - **FOTOU,k.,TZORZ,A.,VOIDAROU,Ch,ALEXOPOULOS,A,PLESSAS,S, AVGERIS, I. , BEZIRTGLOU, E., AKRIDA-DEMERTZI,K., DEMERTZI,P ,G ,.2011.** Isolation of Microbiol pathogens subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene .*Anaerobe* 17, 315, 319
- **GARRY P. et LE GUERN L. (1999) :** Les bactéries lactiques. *Bull. Liaison CTSCCV*. 9, 6, 423-429.

- **GUESSAS, B., 2007.** Les Particularités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le biocontrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat. Université d'Oran Es-senia.
- **GUINANE, C. M., COTTER, P. D., HILL, C., & ROSS, R. P. (2005).** Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1316-1325.
- **GUIRAUD J.P. (2003).** Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. Paris. Pp : 136-139.
- **HENG, N. C., & TAGG, J. R. (2006).** What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2), 160.
- **HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., GEISEN, R., BJORKROTH, J., SCHILLINGER, U. 2001.** Taxonomy and Important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J.Clin. Nutr.*, 73: 36S-73
- **HOTHI NGUYET THU, 2008.** Etude de la flore lactique du Nem chua, produit carné fermenté cru traditionnel du sud Vietnam et maîtrise. Du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit. These de doctorat en sciences des aliments et nutrition. Université Bordeaux 1- France
- **JIMÉNEZ-DÍAZ, R., RUIZ-BARBA, J. L., CATHCART, D. P., HOLO, H., NES, I. F., SLETTEN, K. H., & WARNER, P. J. (1995).** Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(12), 4459-4463.
- **KLAENHAMMER T (1993):** FEMS Microbiology Reviews.
- **KLAENHAMMER T.R., 1988.** Bacteriocins of lactic acid bacteria .*Biochimie* ., 70: 337-349
- **KOUAKOU P., PHILIPPE T. 2011.** Action des cultures protectrices: cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnol. Agron.soc.p*: 339-348
- **LARPENT J. P., (2000).** Introduction à la nouvelle classification .Ed: Techniques et Documentation. Lavoisier Paris.
- **LEONARD, L. 2013.** Evaluation du potentiel bioprotecteur des bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique. Thèse de doctorat en sciences d'alimentation Université de Bourgogne.

- **LEYRAL, G., & VIERLING, E. (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires. Wolters Kluwer France.
- **MAKHOULFI K.M (2011).**caractérisation d'une bactériocine produite par une bactéries lactique *Leuconostoc pseudosenteroides* isolée du bosa. Thèse présenté pour le grade de Docteur en Spécialité : Microbiologie, Biochimie. Université Pierre et Marie Curie.P5, 19,86.
- **MARCHAL N., BOURDON J.L. ET RICHARD, C.L.(1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. 3ème édition, Doinéditeurs, Paris.
- **MCAULIFFE, O., ROSS, R.P. AND HILL, C. (2001)**Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev*25, 285–308.
- **NAGAO, J., ASADUZZAMAN, S.M., ASO, Y., OKUDA, K., NAKAYAMA, J. AND SONOMOTO, K.(2006)**Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm. *J BiosciBioeng*102, 139–149.
- **NIGUTOVÁ, K., SERENČOVÁ, L., PIKNOVÁ, M., JAVORSKÝ, P., & PRISTAŠ, P. (2008).** Heterologous expression of functionally active enterolysinA , class III bacteriocin from *Enterococcus faecalis*, in *Escherichia coli*. Protein expression and purification, 60(1), 20-24.
- **NILSEN, T., NES, I.F. AND HOLO, H. (2003)**Enterolysin A, a cell wall- degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl Environ Microbiol*69, 2975–2984.
- **ORLA-JENSEN,S, 1924.** LA CLASSIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES. P:468,469.
- **PARADA, J. L., CARON, C. R., MEDEIROS, A. B. P., & SOCCOL, C. R. (2007).** Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3), 512-542.
- **PARENTE, E., & RICCIARDI, A. (1999).** Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(5), 628-638.
- **PRICE, R.J, LEE, J.S, 1970.** INIBITION OF *PSEUDOMONAS* SPECIES BY HYDROGEN PEROXIDE PRODUCING LACTOBACILLI. p:14-16.

- **ROGERS, L. A. (1928).** The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of bacteriology*, 16(5), 321.
- **ROZIER F. (1995) :** H.A.C.C.P. de la théorie à quelques contraintes, La Cuisine Collective Editeur, Paris. 80 pages,
- **SAVADOGO.A ,2004 .**Caractérisation biochimique et moléculaire des bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides isolées à partir d'échantillons de lait fermenté du Burkina Faso. Thèse de doctorat de l'université d'OUAGADOUGOU.
- **SINGLETON P. (1999).** Bactériologie.4eme Edition. Dunod, Paris. 317 p.
- **SMAOUI, S., ELLEUCH, L., BEJAR, W., KARRAY-REBAI, I., AYADI, I., JAOUADI, B., ... & MELLOULI, L. (2010).**Inhibition of fungi and gram-negative bacteria by bacteriocin BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), 1132-1146.
- **STILES, M. E. (1996).**Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van leeuwenhoek*, 70(2-4), 331-345.
- **TAGG.JR. ET AL (1976):** *Bacteriology Reviews* .40:722-756.
- **TICHACZEK, P. S., VOGEL, R. F., & HAMMES, W. P. (1994).** Cloning and sequencing of sakP encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH 673. *Microbiology*, 140(2), 361-367.
- **VAN DE GUCHTE. M, EHRLICH.S.D,AND MAGULIN.E ,2001.** Production of growth -inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii* .*Journal of Applied Microbiology*, p: 147.
- **VAN DER MEER, J. R., POLMAN, J., BEERTHUYZEN, M. M., SIEZEN, R. J., KUIPERS, O. P., & DE VOS, W. M. (1993).**Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes nisP, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and nisR, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *Journal of bacteriology*, 175(9), 2578-2588.
- **VIGNOLA C. (2002).** Science et Technologie du Lait Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada. pp. 3-75.
- **WEEBER F. (1985).** Réfrigération du lait à la ferme et organisation des transports. Food and Agriculture Organization of the United Nations Food & Agriculture Org. 126 pages.

- **ZELLER B. (2005).**Le fromage du chèvre : Spécificités technologiques et économiques Thèse de Doctorat de l'Université Paul-Sabatier, Toulouse, France.

Annexes

Annexe 01
Milieux de cultures

- **Gélose M17 (OUADGHIRI, 2009).**

-	Tryptone.....	2,50 g
-	Peptone pepsique de viande	2,50 g
-	Peptone papaïnique de soja	5,00 g
-	Extrait autolytique de levure.....	2,50 g
-	Extrait de viande	5,00 g
-	Lactose	5,00 g
-	Glycérophosphate de sodium	19,00 g
-	Sulfate de magnésium	0,25 g
-	Acide ascorbique	0,50 g
-	Agar bactériologique.....	15,00 g
-	Eau distillée.....	1000 ml

Ph = 7.2

Autoclavage : 120° c pendant 20 minutes.

- **Bouillon M17 (OUADGHIRI, 2009).**

-	Tryptone.....	2,50 g
-	Peptone pepsique de viande	2,50 g
-	Peptone papaïnique de soja	5,00 g
-	-Extrait autolytique de levure.....	2,50 g
-	Extrait de viande	5,00 g
-	Lactose	5,00 g
-	Glycérophosphate de sodium	19,00 g
-	Sulfate de magnésium	0,25 g
-	Acide ascorbique	0,50 g
-	Eau distillée	1000ml

Ph = 7.2

Autoclavage : 120° c pendant 20 minutes.

- **Milieu PCA**

- Tryptone 5,0 g
 - Extrait autolytique de levure 2,5 g
 - Glucose 1,0 g
 - Agar agar bactériologique 12,0 g
 - Eau distillée 1000 ml
- pH =7

Autoclavage : 120° c pendant 20 minutes.

- **Eau physiologique**

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

pH =7

Autoclavage : 120° c pendant 20 minutes.

- **Lait écrémé**

- Lait écrémé 10 g
- Extrait de levure..... 0.5 g
- Eau distillée 100 ml

pH =7

Autoclavage 110°c, 10 min

- **Eaupeptonée**

- Peptone exemple d'indole 10 g
- Chlorure de sodium 5g

Ph=7. Autoclavage 120°c, 20 min.

Annexe 02

Coloration de Gram

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène ;
- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes ;
- Laver l'excès du colorant avec de l'eau ;
- Couvrir de lugol pendant 30 secondes ;
- Laver à l'eau ;
- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone pendant 10 secondes;
- Rincer immédiatement à l'eau ;
- Couvrir avec la fushine et laisser agir de 30 secondes à 1 minute ;
- Laver abondamment à l'eau ;
- Sécher délicatement avec du papier buvard (la lame doit être totalement sèche).
- Observer à l'immersion en pleine lumière: mettre une goutte d'huile à immersion sur la lame. Observer à l'objectif $\times 100$.

Annexe 03

Les tableaux des résultats

Tableau 02 : mesure de pH des échantillons de lait cru avec le surnageant dans 12 jours.

	J0	J₀+3	J₀+6	J₀+9	J₀+12
Témoin	6,68	6,63	6,49	6,44	6,39
Lot 1	6,68	6,68	6,62	6,58	6,52
Lot 2	6,68	6,66	6,65	6,44	6,40
Lot 3	6,68	6,69	6,69	6,60	6,52
Lot 4	6,68	6,68	6,68	6,68	6,67
Lot 5	6,68	6,69	6,60	6,50	6,44

Lot : EL+S. **EL** : échantillon du lait cru de chèvre. **S** : surnageant. **J** : jour.

Tableau 03 : Résultat de dénombrement des psychrotrophes dans les échantillons de lait cru réfrigérée sur gélose PCA

	J₀	J₀₊₃	J₀₊₆	J₀₊₉	J₀₊₁₂
Témoin	0	3,4.10³ UFC/ml	6,6.10⁴ UFC/ml	/	/
Lot 1	0	1,7.10⁴ UFC/ml	2,1.10⁵ UFC/ml	2,2.10⁶ UFC/ml	/
Lot 2	0	1,2.10⁵ UFC/ml	1,5.10⁶ UFC/ml	/	/
Lot 3	0	5,3.10⁴ UFC/ml	1,4.10⁶ UFC/ml	2,4.10⁶ UFC/ml	/
Lot 4	0	2.10³ UFC/ml	1,7.10⁴ UFC/ml	6,4.10⁵ UFC/ml	2,34.10⁶ UFC/ml
Lot 5	0	2,4.10³ UFC/ml	2,1.10⁴ UFC/ml	1,6.10⁶ UFC/ml	/

Lot : EL+S. **EL** : échantillon du lait cru de chèvre. **S** : surnageant. **UFC** : unité fondamentale des colonies. / : Indénombrable.

Tableau 04 :Résultats de mesure de pH après traitement de surnageant actif par la chaleur et la pepsine.

pH Jours	Témoin (EL+S non traité)	EL+ S traité Par chauffage à 100°C	EI+S traité par pepsine
J 0	6,68	6,68	6,68
J₀+ 3	6,68	6,50	6,65
J₀+ 6	6,68	6,44	6,60
J₀+9	6,67	5,07	5,90
J₀+ 12	6,65	4,36	5,83

EL : échantillon du lait cru de chèvre. **S** : surnageant

Résumé

05 souches lactiques isolées à partir de lait de chamelle et conservées à -20°C on fait l'objet de cette étude dont on veut tester leur pouvoir à inhiber les bactéries psychrotrophes dans le lait cru de chèvre conservé au froid. Une revivification et purification des souches a été réalisée sur milieu (M17), et pré-identifiées comme souches lactique pures. Les surnageants de ces bactéries lactiques ont été récupérés et étudiés à l'égard des germes psychrotrophes existents dans un échantillon de lait de chèvre après une conservation au froid pendant 12 jours. Des mesures de potentiel d'hydrogène et dénombrement des bactéries psychrotrophes ont été effectués. Seule la souche lactique S4 est considérée comme une souche productrice des molécules inhibitrices à cause de son pouvoir à retarder la multiplication des bactéries psychrotrophe dans l'échantillon du lait. Une étude de la nature de ces substances par un traitement à la chaleur et à l'enzyme protéolytique (la pepsine) a confirmé que ces substances inhibitrices ont suggérées d'être des bactériocines.

Mots clés : Bactéries lactiques, Bactériocine, lait cru de chèvre, psychrotrophes, substances inhibitrices.

Abstract

05 lactic acid strains isolated from camel milk and stored at -20°C is the subject of this study which we want to test their ability to inhibit the psychrotrophic bacteria in raw goat milk preserved cold. A revivification and purification of the strains was carried out on medium (M17), and pre-identified as pure lactic strains. Supernatants of these BLs were recovered and studied for psychrotrophic germs in a goat milk sample after cold storage for 12 days. Potential hydrogen measurements and enumeration of the psychrotrophic bacteria were carried out. Only lactic strain S4 is considered a strain producing inhibitory molecules because of its ability to delay the multiplication of psychrotrophic bacteria in the milk sample. A study of the nature of these substances by heat treatment and the proteolytic enzyme pepsin confirmed that these inhibitory substances have been suggested to be bacteriocins.

Key words: lactic acid bacteria, bacteriocin, goat raw milk, psychrotroph, inhibitory substances.

ملخص

05 سلالات من بكتيريا حمض اللكتيك المعزولة من حليب الابل لمنطقة حاسي مسعود و ورقلة تم تخزينها في -20°C درجة مئوية، نريد اختبار قدرتها على تعطيل نمو البكتيريا المحبة للبرودة في حليب الماعز الخام المحفوظ في الثلاجة. حيث تم إعادة تنشيط وتنقية هذه السلالات في وسط زرع، بعد التأكد من انها سلالات لاكتيك نقيه، تم استخلاص المواد المفروزة من قبلها اضافتها في حليب ماعز خام ثم تم حفظه في الثلاجة لمدة يوم مع قياس الحموضة وتعداد البكتيريا المحبة للبرودة لثلاثة أيام .

تم التوصل الى أن السلالة اللاكتيكية 4 هي سلالة منتجة لجزينات مثبطة لقدرتها على تأخير نمو البكتيريا المحبة للبرودة في الحليب.

بعد دراسة لطبيعة المادة المثبطة عن طريق المعالجة الحرارية و الانزيمية (بييسين) تبين انها مادة محتمل من انها بكتريوسين .

الكلمات الدالة: بكتيريا حمض اللكتيك، البكتريوسين، حليب الماعز الخام، البكتيريا المحبة للبرودة، المواد المثبطة.