



**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université KASDI MERBAH OUARGLA**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du diplôme de**

**MASTER ACADEMIQUE**

**Domaine : Science de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences biologiques**

**Spécialité : Qualité des produits et sécurité alimentaire**

**Présenté par : Mlle BAAFOU Zahrat El-oula  
Mlle BOURDACHE Tinhinane.**

**Thème :**

**Pouvoir antimicrobien des souches lactiques  
thermorésistantes isolées à partir de lait de chamelle  
fermenté vis-à-vis des bactéries pathogènes**

**Soutenu publiquement Le : 30/09/ 2020**

**Devant le jury :**

<b>Présidente :</b>	<b>BOUDERHEM Amel</b>	<b>MCB</b>	<b>Univ. K. M. Ouargla</b>
<b>Encadreur :</b>	<b>MOSBAH Said</b>	<b>MCB</b>	<b>Univ. K. M. Ouargla</b>
<b>Co-Encadreur :</b>	<b>BOURICHA M'hamed</b>	<b>MAA</b>	<b>Univ. K. M. Ouargla</b>
<b>Examineur :</b>	<b>SOUID Wafa</b>	<b>MAA</b>	<b>Univ. K. M. Ouargla</b>

**Année Universitaire 2019/2020**

## **Remerciements**

*On remercie Allah le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et*

*De terminer ce mémoire, car sans lui rien n'est possible.*

*Nous voudrions exprimer nos remerciements les plus vifs à Madame Boudershem Amel, Maître de Conférences B à l'Université K.M. Ouargla, pour l'honneur qu'elle nous a fait d'accepter de présider le jury, d'évaluer et d'examiner ce mémoire*

*Mes plus sincères remerciements vont également à Madame SOUID Wafa, Maître Assistant A à l'Université K.M. Ouargla, pour l'honneur qu'il nous a fait d'accepter d'examiner ce travail*

*Nous remercions notre encadreur Monsieur MOSBAH Said, Maître de Conférences B à l'Université K.M. Ouargla, pour nous avoir proposé ce sujet si intéressant et avoir accepté de nous encadrer et pour l'honneur qu'il nous a fait en dirigeant ce travail, pour ses aides, ses conseils, c'est grâce à sa compétence et indulgence que ce travail a pu être réalisé.*

*Le co- encadreur BOURICHA M'hammed, Maître Assistant A à l'Université K.M de nous diriger au cours de notre travail expérimental.*

*Enfin on adresse nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*A Ma très chère maman pour laquelle aucune dédicace ne saurait exprimer l'affection et le respect que j'éprouve pour elle. Puisse ce travail constituer une légère compassion pour tous les nobles sacrifices qu'elle s'est imposés pour assurer mon éducation et mes études.*

*A ma très chère sœur : Nour El Houda.*

*A mes chères grans parents.*

*A me chères amis.*

*Aux familles : BABRAHIM et BAAFOU.*

*\* Zahra \**

*Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail aux êtres qui me sont les plus chère:*

*A mon papa qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années  
d'études.*

*Et à ma maman qui m'a guidé Dans le droit chemin, qui m'a appris que rien n'est  
impossible.*

*A ma très chers sœur kahina merci pour ton soutien indéfectible.*

*et mes frère idhir et syphax et koussila*

*A mes très chères amies*

*A tous mes collègues et mes camarades*

***\*Tinhinane\****

## *Liste des tableaux*

		<b>Page</b>
<b>Tableau 1</b>	Qualité physico-chimique du lait de chamelle en comparaison avec le lait de vache (MOSBAH, 2019)	4
<b>Tableau 2</b>	Classification de bactériocine produit par les bactéries lactiques (BHARTI et al, 2015)	16
<b>Tableau 3</b>	les résultats des échantillons (test de catalase et coloration de gram)	28

## *LISTE DES FIGURES*

		<b>Page</b>
<b>Figure 1</b>	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques, incluant quelques genres aérobie et anaérobie facultatif de Firmicutes (LAHTINEM et al, 2012).	9
<b>Figure 2</b>	Formation de pores membranaires par le complexe Nisine-lipide II selon CHATTERJEE et al, (2005).	17
<b>Figure 3</b>	Méthode des spots (Fleming et al., 1975)	24
<b>Figure 4</b>	méthode des puits (BAREFOOT et KLAENHAMMER, 1983)	26
<b>Figure 5</b>	Aspect macroscopique des colonies de Bactérie lactique sur milieu MRS	27
<b>Figure 6</b>	Aspect macroscopique des colonies de Bactérie lactique sur milieu MRS liquide	27
<b>Figure 7</b>	Aspect Microscopique de la Coloration de Gram	28
<b>Figure 8</b>	test de catalase	28

## *Liste des abréviations*

**ADH** : Arginine dihydrolase

**BN/GN** : Bouillon nutritif et la gélose nutritive

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**G<sup>-</sup>** : Gram négatifs

**G** : Grossissement

**G<sup>+</sup>** : Gram positives

**KMk** : Kempler et Mc Kay

**LAB** : Bactéries lactiques

**MH** : Mueller et Hinton

**mPa.s** : Milli pascal-seconde

**MRS** : Man Rogosa et Sharpe

**MSE** : Mayeux, Sandine et Elliker

**Zi** : Zone d'inhibition

## Résumé

Pendant de nombreuses années, le lait de chamelle a été la principale source de nourriture des peuples nomades. Cependant, le lait se distingue par une teneur élevée en vitamine C et en niacine et par la présence d'un puissant système protecteur. Dans ce travail nous avons axé notre recherche sur les espèces thermorésistantes de bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle de la région d'Ouargla. Après une fermentation spontanée de deux échantillons du lait de chamelle collectés à partir des troupeaux appartenant à deux élevages différents de la région d'Ouargla.

Les résultats des études précédentes montrent que les espèces identifiées appartiennent aux genres (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Leuconostoc*).

La capacité de ces souches à inhiber un groupe de bactéries pathogènes est confirmée par les résultats des interactions entre les souches lactiques isolées et pathogènes utilisées dans cette étude. Qui sont *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas auroginosa*.

**Mots clés:** lait de chamelle, fermentation spontanée, bactéries lactiques, bactéries pathogènes, thermorésistance.



## Summary

For many years, camel milk was the main food source for nomadic peoples. However, milk is distinguished by a high content of vitamin C and niacin and the presence of a strong protective system. In this work we focused our research on heat-resistant species of lactic acid bacteria isolated from the camel milk of Ouargla region. After spontaneous fermentation of two samples of camel milk collected from herds belonging to two different herds in the Ouargla region.

The results of previous studies show that the identified species belong to the genera (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Leuconostoc*).

The ability of these strains to inhibit a group of pathogenic bacteria is confirmed by the results of interactions between isolated and pathogenic lactic acid strains used in this study. Which are *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas auroginosa*.

**Key words:** camel milk, spontaneous fermentation, lactic acid bacteria, pathogenic bacteria, heat resistance.

## الملخص

لسنوات عديدة ، كان حليب الإبل المصدر الغذائي الرئيسي للبدو الرحل. ومع ذلك ، يتميز الحليب باحتوائه على نسبة عالية من فيتامين ج والنياسين ووجود نظام وقائي قوي. في هذا العمل ، ركزنا بحثنا الأنواع المقاومة للحرارة من بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من حليب الإبل المخمر من منطقة ورقلة. بعد التخمير التلقائي لعينتين من حليب الإبل تم جمعهما من قطعان تنتمي إلى قطيعين مختلفين في منطقة ورقلة. تظهر نتائج الدراسات السابقة أن الأنواع المحددة تنتمي إلى الأجناس (*Lactococcus* ، *Lactobacillus* ، *Enterococcus* و *Leuconostoc*). تم تأكيد قدرة هذه السلالات على تثبيط مجموعة من البكتيريا المسببة للأمراض من خلال نتائج التفاعلات بين سلالات حمض اللاكتيك المعزولة والممرضة المستخدمة في هذه الدراسة. وهي *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* و *Pseudomonas auroginosa*.

**الكلمات المفتاحية :** حليب الإبل ، التخمير التلقائي ، بكتيريا حمض اللاكتيك ، البكتيريا المسببة للأمراض ، مقاومة الحرارة.

## SOMMAIRE

**Remerciement**

**Dédicace**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Abréviations**

**Résumé**

**Abstract**

**ملخص**

**Introduction**

.....1

**Chapitre I : Lait de chamelle**

1. Présentation générale..... 3

3

1.2. Caractéristiques du lait de chamelle .....

1.2.1 Caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques ..... 3

1.2.2 Caractéristiques biochimiques ..... 4

1.2.3 Caractéristiques microbiologiques ..... 5

1.3 Microflore de lait camelin ..... 5

1.3.1 Bactéries saprophytes..... 6

1.3.1.1 Flore lactique..... 6

1.3.1.2 Flore d'altération..... 6

1.3.1.3 Bactéries pathogènes ..... 7

## Chapitre II : Bactéries lactiques

2. bactéries lactiques .....	8
2.1. Caractéristiques générales .....	2
2.2. Habitat et origine .....	8
2.3. Classification.....	9
1.3.1. <i>Lactococcus</i> .....	9
1.3.2. <i>Lactobacillus</i> .....	10
1.3.3. <i>Leuconostoc</i> .....	10
1.3.4. <i>Streptococcus</i> .....	11
1.3.5. <i>Pediococcus</i> .....	11
1.3.6. <i>Enterococcus</i> .....	11
2.4 Bactéries thermorésistantes.....	12

## Chapitre III : Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

3. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques.....	13
3.1. Acides organiques.....	13
3.2. Peroxyde d'hydrogène.....	13

3.3. Dioxyde de carbone .....	13
3.4. Diacétyle .....	14
3.5. Reutérine.....	14
3.6. Bactériocines.....	14
3.6.1. Définition et caractéristique.....	14
3.6.2. Classification.....	15
• Nisine.....	16
3.6.3. Mode d'action.....	17

## **Partie expérimentale**

### **Matériel et Méthodes**

Lieu de l'étude

1. Matériel .....	18
1.1. milieux de culture utilisés.....	18
1.2. Produits chimique.....	18
2. Méthodes .....	19
2.1. Echantillonnage.....	19
2.1 Isolement et purification des bactéries lactiques.....	19
2.1.1 Fermentation du lait .....	19
2.1.2. Préparation des dilutions décimales.....	19
2.1.3. Conservation des isolats.....	19

2.1.4. Pre-identification des souches lactiques .....	20
2.1.4.1. Identification morphologique .....	20
2.1.4.2. Observation macroscopique.....	20
2.1.4.3. Observation microscopique .....	20
2.1.4.4. Identification physiologique et biochimique .....	20
2.1.4.4.1. Test catalase .....	20
2.1.4.4.2 Thermoresistance .....	21
2.1.4.4.3. Croissance à différentes Températures, pH et concentrations de NaCl.....	21
2.1.4.4.4. Type fermentaire.....	21
2.1.4.4.5. Test de bleu de Sherman .....	21
2.1.4.4.6. Recherche de l'arginine déshydrolyase.....	22
2.1.4.4.7. Utilisation du citrate .....	22
2.1.4.4.8. Profil fermentaire (Utilisation des sucres).....	22
2.1.4.4.9. Production des exo-polysaccharides (dextrane).....	23
2.1.5. Test technologique.....	23
2.1.5.1 Etude de Pouvoir antimicrobien.....	23
2.1.5.1.1. Méthode des spots.....	23
2.1.5.1.2. Méthode de diffusion par puits.....	24
<b>Résultats et discussions</b>	
1. Pré identification phénotypique des isolats.....	27
2.1. Observation macroscopiques et microscopiques.....	28

2. Caractéristiques biochimiques et physiologiques des isolats.....	27
2.1. Test de catalase .....	28
2.2. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches.....	29
2.3. Détermination de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques.....	34
2.5. Interactions entre les souches lactiques et les souches pathogènes.....	36
2.6. Thermorésistantes.....	37
Conclusion.....	39

## **References bibliographiques**

## **Annexes**

# Introduction



# Introduction

---

## Introduction

Le lait de chamelle est un produit fortement identitaire pour les populations élevant des dromadaires. Il joue un rôle important dans l'alimentation des nomades et les populations du sud algérien, (ALLOUILOMBARKIA *et al.*, 2002).

Cette espèce peut produire un lait particulièrement riche et équilibré en nutriments de base (lipides, protides et glucides), en éléments minéraux et en vitamines (BOUDJENAH-HAROUN, 2012)

Même s'il présente une composition physico-chimique relativement similaire à celle du lait bovin, ce lait se distingue par la présence d'un puissant système protecteur produit par les bactéries lactiques (RAHLI, 2015)

Les bactéries lactiques jouent un rôle important dans la fermentation et la conservation des aliments, que ce soit en tant que microflore naturelle ou comme cultures ajoutées sous des conditions contrôlées. Elles sont largement employées dans la préparation de nombreux aliments fermentés (MACHAI, 2009).

La capacité des bactéries lactiques à produire des composés antagonistes qui constituent des facteurs majeurs qui inhibent la croissance des autres microorganismes concurrents.

Ces composés sont une variété de peptides ou des protéines ayant une activité antibactérienne, parmi ces molécules : les bactériocines (BEKHOUCHE et BOULAHROUF, 2005 et BENHAMOUCHE *et al.*, 2012).

Les bactériocines sont des substances protéiques produites puis excrétées à l'extérieur des cellules productrices, présentant une activité bactéricide ou bactériostatique contre d'autres bactéries mais surtout contre des pathogènes majeurs. (ALLOUCHE, 2010 et GALVEZ *et al.*, 2011).

Ces substances bioactives présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Tous ces critères suggèrent que les bactériocines peuvent être un substituant idéal des conservateurs chimiques (DORTU et THONART, 2009).

# Introduction

---

Tous les produits alimentaires transformés ou non peuvent être contaminés par des micro-organismes. Ce qui provoque une altération des produits alimentaires, des changements biochimiques et cette croissance microbienne modifieront la couleur, la texture, la saveur. L'altération microbienne des alimentaire dépend de plusieurs facteurs environnementaux, de la nature de l'aliment et des micro-organismes responsables (DJIODA, 20 10 ; DUPIN *et al.*, 1992).

La bio-conservation par les bactéries lactiques est due à leurs capacités à produire plusieurs métabolites antimicrobiens, tels que les acides organiques (acide lactique, acide acétique...), le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, le diacétyl, la reutéline, le dioxyde de carbone et les bactériocines (HAMMI, 2016).

Les bactéries lactiques thermotolérantes sont des microflores naturelles peuvent être utilisées comme souches bioprotectrices en les inoculant avant traitement thermique dans des produits comme produits carnés (NORMA *et al.*, 2010)

A cet effet, le but de cette étude consiste à isoler des bactéries lactiques thermorésistantes présente un pouvoirs antibactériens pour les utiliser comme des bio-conservateurs alimentaires.

Pour la réalisation de ce but, plusieurs objectifs ont été entrepris :

- En premier lieu d'isoler et identifier les bactéries lactiques thermorésistantes à partir du lait de chamelle fermenté
- Et on deuxième lieu étudier l'activité antibactérienne des bactéries lactiques thermorésistantes isolées vis-à-vis des bactéries pathogènes.

Etude

bibliographique

# **Chapitre I**

## *Lait de chamelle*

## 1. Présentation générale :

Le lait de chamelle constitue depuis des temps très lointains, la principale ressource alimentaire pour les peuples nomades qui le consomment habituellement à l'état cru ou fermenté. Il est considéré comme l'aliment de base pendant toute l'année, dans la plupart des zones pastorales sahariennes. (SBOUI *et al.*, 2016)

Il est apprécié traditionnellement pour ses propriétés anti infectieuse, anti-cancéreuse, antidiabétique et plus généralement comme reconstituant chez les malades convalescents, (KONASPAYEVA, 2007).

Ce lait se singularise par une teneur élevée en Vitamine C et en molécules antibactériennes (lysozymes, protéines de reconnaissance du peptidoglycane, lactoperoxydase, lactoferrine et etc). (SIBOUKEUR, 2007) Ce qui confère au lait de chamelle une capacité particulière à se conserver quelques jours à des températures relativement élevées (YAGIL *et al.*, 1994)

Le lait de chamelle peut être consommé cru, pasteurisé ou fermenté ou transformé en produits dérivés laitiers. (HALEMRANA, 2015)

Malgré sa richesse et sa production non négligeable demeure un produit relativement peu consommé et peu transformé, car insuffisamment étudié et mis en valeur. (SIBOUKEUR, 2007)

## 1.2. Caractéristiques du lait de chamelle

### 1.2.1 Caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques

Le lait de chamelle est de couleur blanche, opaque en raison notamment de la structure et de la composition de sa matière grasse. Il est légèrement sucré avec un goût acide, parfois même salé et/ou amer. Les changements de goût sont principalement causés par le type de fourrage et la disponibilité de l'eau potable (AL HAJ *et al.*, 2010).

Les principales propriétés physico-chimiques qui intéressent l'industrie laitière sont la densité, le point de congélation, l'acidité et le pH (VIGNOLA, 2002).

Le pH se situe autour de  $6,68 \pm 0,12$  (tableau I) et l'acidité est de l'ordre de  $15^\circ$  Dornic (GHENNAM *et al.*, 2007), la densité moyenne de lait de chamelle est  $1,028 \pm 0,002$  g.cm<sup>-3</sup> (BOUSSOUAR, 2017), et son point de congélation varie entre  $-0,53$  °C à  $-0,61$ °C(HASSAN

*et al.*, 1987) tandis que la viscosité à 20 °C est de 1,72 mPa.s (OMAR *et al.*, 2010) et sa conductivité électrique varie de 4.6 à 7.7 mS/cm (El-AGAMY, 2006 ; EBERLEIN, 2007).

**Tableau I** : Qualité physico-chimique du lait de chamelle en comparaison avec le lait de vache (MOSBAH, 2019)

Origine du lait	Constituants									Références
	pH	Acidité (°D)	Densité	Eau %	MS T %	Lactose %	M G %	TP %	Cendres	
Lait de chamelle	---	---	---	87.8	12.2	5.2	3.1	3.1	0.8	FARAH et RUEGG (1989)
	6.77	18	1.015	90.2	9.74	3.6	2.6	2.5	0.94	KHASKHELI <i>et al.</i> , (2005)
	6.45	26	1.033	85.6	14.4	3.0	5.9	3.4	---	KONUSPAYEVA (2007)
	6.57	20	---	90.2	9.78	4.4	2.3	2.0	0.94	Omer et ELTINAY (2009)
	6.41	17.2	1.020	88.1	11.9	4.2	3.7	3.4	0.75	SBOUI <i>et al.</i> , (2009)
	---	16	1.030	88.7	11.3	4.9	2.9	2.5	1.3	MEILOUD <i>et al.</i> , (2011)
	6.31	18.2	1.023	88.7	11.3	4.3	2.8	3.5	0.72	SIBOUKEUR (2011)
	6.6	13.3	---	88.9	11.0	4.6	3.2	3.8	0.88	BAHOBAIL <i>et al.</i> , (2014)
	6.50	16.57	1.027	88.1	11.89	---	2.2	2.68	0.78	SBOUI <i>et al.</i> , (2015)
Lait de Vache	6.7	19.1	1.025	88.8	11.2	---	3.0	2.4	0.71	SBOUI <i>et al.</i> , (2015)
	6.5	16.7	1.030	88.3	11.7	4.3	3.1	---	---	LABIOUI <i>et al.</i> , (2009)

Toutefois, ces valeurs dépendent de certains facteurs, tels que le rang et le stade de lactation, la race, le type d'élevage, la saison de lactation. Cependant, l'alimentation reste le facteur le plus déterminant (RAMET, 1993 ; WANGOH *et al.*, 1998 ; MEHAIA *et al.*, 1995)

### 1.2.2 Caractéristiques biochimiques

Le lait de chamelle est presque similaire au lait vache de par sa composition en eau, en lactose, en protéines et en matière sèche totale. (Tableau I) (SOUID, 2011).

Le lait de chamelle a une faible teneur en caséine, les protéines sont responsables de la consistance du lait caillé et son équilibre minéral spécial exacerbe sa capacité à coaguler. Les caséines (CN) constituent la fraction protéinique majeure du lait. Elle varie entre 52 et 87 % des protéines totales du lait de chamelle (KHASKHELI *et al.*, 2005)

Les sels minéraux présent dans le lait de chamelle sont aussi diversifié que ceux rencontrés dans le lait de vache. On y dénombre en effet des macros et des oligo-éléments qui

se trouvent sous forme de sels (phosphates, chlorures et citrates) ou de métaux divers (sodium, potassium, magnésium, calcium, fer, cuivre, zinc...etc) (BEDJAOUI et KERIREM, 2016).

Les minéraux comme Na, K, Fe, Cu et Mn dans le lait de chamelle sont sensiblement plus élevé que ceux rapportés pour le lait de vache (AL HAJ et Al KANHAL, 2010).

Le lait de chamelle contient des teneurs plus faibles en vitamines A, E, B1, B2, B3, B4, B6, B5 (acides pantothénique), B9 (acide folique) et B12 (cyanocobalamine) et des teneurs plus élevées en niacine et en vitamine C que le lait de vache (SAWAYA *et al.*, 1984; MEHAÏA, 1994).

La richesse particulièrement élevée en vitamine C du lait de chamelle (3 fois plus que sa teneur dans le de lait de vache) lui confère une valeur nutritionnelle intéressante du faite de la rareté des produits (fruits et légumes) contenant cette vitamine dans les régions désertiques. Elle expliquerait également l'utilisation du lait de dromadaire comme « médicament » dans certains pays pour stimuler les fonctions du foie et lutter contre la fatigue générale associée au magnésium (FARAH *et al.*, 1992).

### **1.2.3 Caractéristiques microbiologiques**

La qualité d'un aliment n'est pas uniquement définie par les différentes teneurs en nutriments qu'il contient, ni par sa composition en matières premières, ni même par son apparence ou ses caractéristiques sensorielles, mais aussi et surtout par son état hygiénique (GAFNER, 2012).

Le lait est un substrat renfermant des concentrations satisfaisantes en protéines, en glucides, en lipides, en sels minéraux et en vitamines. Les microorganismes existant vont donc trouver dans ce bioproduit un substrat idéal pour leur développement (LARPENT *et al.*, 1997)

Les microorganismes se multiplient, se nourrissent, s'adaptent et sécrètent des déchets ou sous-produits de leur métabolisme qui pourront être utiles, nuisibles ou dangereux pour l'Homme (VIGNOLA, 2002).

On les répartit 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).

### **1.3 Microflore de lait camelin**

Le lait de chamelle peut être ensemencé par de nombreuses espèces microbiennes. Pour certaines, il constitue un bon milieu de culture, ce qui leur permet de s'y développer. Pour d'autres germes banals ou pathogènes, il n'est qu'un véhicule occasionnel. En raison de la grande diversité des bactéries présentes dans le lait, et en se basant sur un certain nombre de propriétés importantes qu'elles ont en commun, on les divise en deux catégories : les bactéries saprophytes et les bactéries pathogènes (ARBIA et CHIHEB, 2018).

Le lait renferme inévitablement une microflore dont la nature et l'importance sont conditionnées par l'état sanitaire de l'animale, les conditions de traite, la température, la durée de conservation ...etc. (LARPENT *et al.*, 1997).

Si la microflore du lait bovin a fait l'objet de nombreuses études cela est loin d'être le cas du lait camelin où quelques travaux seulement lui sont consacrés. L'une des raisons principales de cette carence est la relative absence des moyens matériels et humains (laboratoires, chercheurs...) tout près des lieux de collecte ce qui éviterait à recourir à la congélation ou à l'utilisation d'agents antimicrobiens, comme c'est généralement le cas des études physico-chimiques (RAHLI, 2015).

### **1.3.1 Bactéries saprophytes**

Elles peuvent avoir un intérêt hygiénique, technologique ou être indifférentes. On peut citer :

#### **1.3.1.1 Flore lactique**

Les bactéries lactiques sont des cellules gram-positif, ayant une forme de coques, de bacille ou de coccobacille. Les cellules sont généralement immobiles, non-sporulées et micro-aérophiles. Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase. Les bactéries lactiques constituent un groupe de micro-organismes, assez hétérogènes sur les plans physiologiques et morphologiques, qui ont la particularité de produire, des quantités importantes d'acide lactiques à partir de l'hydrolyse du lactose et de la fermentation du glucose et/ou du galactose. Ces bactéries montrent des exigences nutritionnelles complexes en glucides fermentescibles, en acides aminés, en peptides, en vitamines et en sels. Leur classification est réalisée en fonction de leur morphologie, de leur type de fermentation et de leur température optimale de croissance (CINTAS *et al.*, 2001; RENAULT, 2002; NAIR et SURENDRAN, 2005; PATIL *et al.*, 2009)

#### **1.3.1.2 Flore d'altération**



Ce sont des bactéries et champignons indésirables apportés par la contamination, elle causera des défauts sensoriels de goût, d'arôme, d'apparence ou de texture et réduira la vie de tablette du produit laitier. Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, les coliformes soit principalement les genres *Escherichia* et *Enterobacter*, les sporulées telle que *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.* et certaines levures et moisissures (VIGNOLA, 2002).

### **1.3.1.3 Bactéries pathogènes**

La présence de microorganismes pathogène dans le lait peut avoir trois sources : l'animal, l'environnement et l'homme. Les principaux microorganismes pathogènes associés aux produits laitiers sont : *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* et *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yarcinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei* et certaines moisissures (VIGNOLA, 2002).

# *Chapitre II*

## *Bactéries lactiques du lait*

## 2. Bactéries lactiques

### 2.1. Caractéristiques générales

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres (HADEF, 2012).

Elles sont à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négative, oxydase négative, généralement nitrate réductase négative. Selon les espèces et les conditions de culture, les bactéries lactiques peuvent être aéro anaérobie facultatives ou micro-aérophiles (BALIARDA., 2003). Elles sont mésophiles ou thermophiles qui peuvent se développer à des températures comprises entre 10°C et 45°C. Elles tolèrent des pH acides (entre 4 et 4.5) (SALMINEN *et al.*, 2004; KONIG et FROHLICH, 2009 ; PRINGSULAKA *et al.*, 2011).

Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (DELLAGLIO *et al.*, 1994 ; HOGG, 2005).

### 2.2. Habitat et origine

Les bactéries lactiques sont des germes ubiquitaires. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande et des végétaux (plantes et fruits) (KONIG et FROHLICH, 2009).

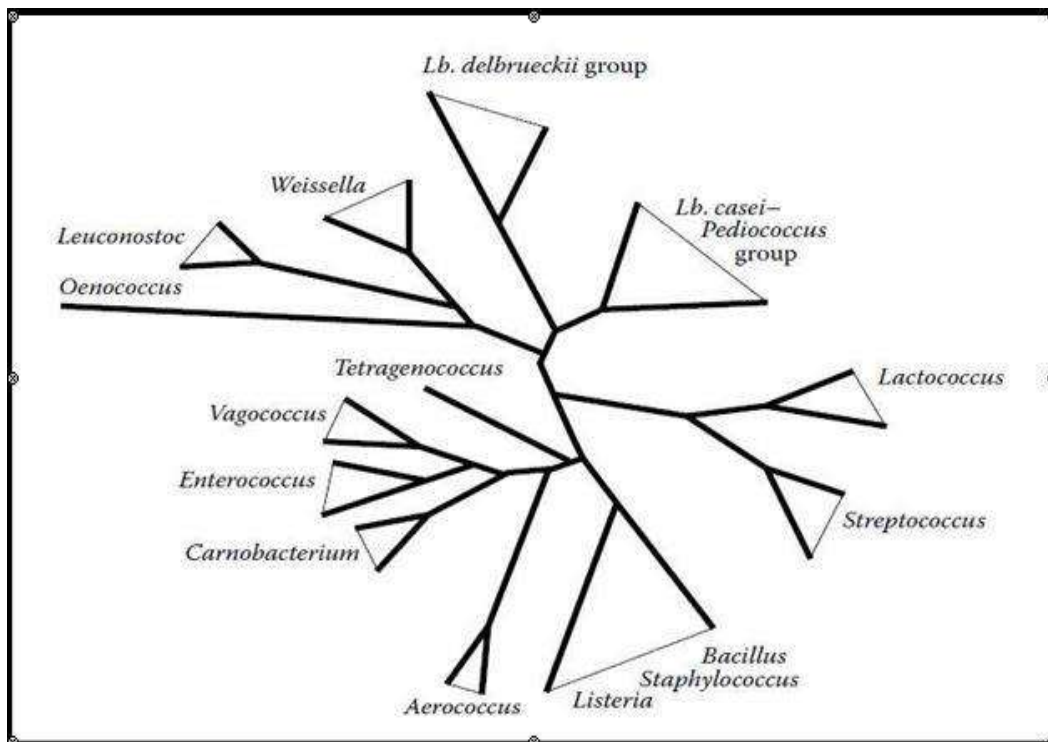
Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'Homme et on peut les trouver aussi dans les cavités buccales, vaginales et dans les fèces (LEVEAU et BOUIX, 1993 ; HASSAN et FRANK, 2001).

Certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ils ne sont guère trouvés ailleurs que dans leurs habitats naturels (BEKOUICHE, 2006).

### 2.3. Classification

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (De ROISSART et LUQUET, 1994; HOLZAPFEL *et al.*, 2001).

La classification moderne basée sur les protéines et les acides nucléique a permis de construire un arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques comme montre la figure suivante :



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

Les genres les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Pediococcus* (DROUAULT et CORTIER, 2001).

#### 1.3.1. *Lactococcus*

Les *lactocoques* sont des cocci ou ovoïdes dont la taille varie de 0.5 à 1.5 µm en paires ou en chainettes. Elles sont des homo-fermentaires qui produisent l'acide lactique L(+) à partir de glucose. Elles sont toutes mésophiles avec une température optimale de croissance variant de 28 à 34°C et leur pH optimal varie de 6.0-6.5 aussi elles se développent généralement à 4% de NaCl (BOUADJAIB, 2013).

Le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces : *Lc. raffinolacti*, *Lc. garviae*, *Lc. plantarum*, *Lc. piscium*, *Lc. chungangensis* et *Lactococcus lactis*. Cette dernière est la plus connue avec ses quatre sous espèces : *Lactococcus. Lactis ssp. Lactis* (y compris le *biovardiacetylactis*, *Lc. Lactis ssp. cremoris*. et *Lc. Lactis ssp. Hordniae* et *Lc. Lactis ssp. Tructuae* (KHEMARIYA *et al.*, 2016).

Une étude réalisée par (KARAM, 2006) a montré la présence dans le lait camelin des espèces *lactococcus lactis ssp lactis* et *lactococcus lactis ssp cremoris* ayant une capacité inattendue de résister à une concentration de 6.5% de NaCl.

### 1.3.2. *Lactobacillus*

*Lactobacillus* est le genre principal de la famille des Lactobacillaceae. Les cellules de ce genre sont soit des bacilles longs, parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes. Elles sont généralement immobiles à l'exception de quelques espèces qui possèdent des flagelles péritriches. Les souches sont acidophiles qui peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2.

La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais elles peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C jusqu'à 53°C (ABABSA, 2012).

la présence de *Lb. plantarum* a été montrée par (KARAM, 2006) comme seule espèce de lactobacilles retrouvée dans des échantillons de lait de chamelle étudiés.

### 1.3.3. *Leuconostoc*

Les cellules de *Leuconostoc* sont des cocci, souvent allongées, en paires ou en chaînes. Elles sont toutes des hétéro-fermentaires obligatoires produisant de l'acide D(-) lactique de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>. Elles sont mésophiles avec une température optimale comprise entre 20-30°C (GUIRAUD, 2003).

En production fromagère, ces bactéries sont particulièrement utilisées pour leur capacité de formation des composés aromatiques et de production de CO<sub>2</sub> à partir du métabolisme du citrate. Le CO<sub>2</sub> produit par ces bactéries contribue à la formation des yeux typiquement retrouvés dans certains fromages. Les espèces les plus utilisées pour la fermentation des produits laitiers sont : *Ln. mesenteroides* et *Ln. lactis* (IDDER, 2014).

(KARAM, 2006) a signalé la présence des espèces, *Leuconostoc lactis* et *Leuconostoc dextranicum*, a été signalée dans le lait de chamelle.

### 1.3.4. Streptococcus

Ce genre est essentiellement constitué des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *S. pyogenes* et *S. agalactiae*, d'autres sont impliquées dans la formation de la plaque dentaire (*S. mutans*) non pathogène.

L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène. Du fait de ses propriétés technologiques, c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique (BOUADJAIB, 2013).

### 1.3.5. Pediococcus

Les cellules de ce genre sont immobiles de forme sphérique parfois ovoïde. Elles sont isolées ou en paires qui se divisent dans deux directions perpendiculaires formant des tétrades. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 35°C (ABABSA, 2012). Elles sont mésophiles et le plus souvent incapables d'utiliser le lactose.

### 1.3.6. Enterococcus

Les espèces de ce genre sont des aéro-anaérobies facultatives, généralement micro aérophiles et très exigeantes au point de vue nutritionnel (GUIRANDETAL, 2004).

Leurs cellules sont immobiles, sphériques ou ovoïdes, qui ont un diamètre inférieur à 2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La température optimale de leur croissance est 37°C (ABABSA, 2012).

La plupart des espèces sont en général non capsulées, leur fermentation est homolactique, (GUIRAND *et al.*, 2004). Elles sont dépourvues de la catalase et du nitrate (AIT ABDELOUAHAB, 2001).

Plusieurs entérocoques sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes (GUIRAND *et al.*, 2004)

### 2.4 Bactéries thermorésistantes

Un certain nombre de bactéries est capable de résister aux traitements thermiques usuels utilisés dans le but d'assainir ou de conserver le lait. Elles sont dites thermorésistantes. Leur développement ultérieur peut altérer les produits et, parfois, être dangereux pour la santé (RAHLI, 2015).

On distingue:

- La flore thermorésistante totale, définie comme la flore résiduelle après un traitement à 63 °C pendant 30 minutes ou un traitement équivalent tel que la pasteurisation (72 °C pendant 15 secondes).
- La flore moyennement thermorésistante, qui n'est pas détruite par chauffage à 75 °C pendant 12 secondes.
- La flore fortement thermorésistante, qui n'est pas détruite par chauffage à 80 °C pendant 10 minutes. Elle comprend les spores bactériennes, qui nécessitent des températures supérieures à 100 °C. (FAO, 1995)

Les composantes de cette flore sont: *Micrococcus*, *Microbacterium* et *Bacillus* dont l'espèce *Bacillus cereus* produit une entérotoxine stable après pasteurisation. Le genre *Bacillus* réalise en, outre, des activités enzymatiques lactiques pouvant être responsables de l'acidification, la coagulation ou la protéolyse des laits de longue conservation (FAO, 1995).

# *Chapitre III*

## *Pouvoir antibactériens des bactéries lactiques*



### 3. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont connues et utilisées pour leurs effets antagonistes qu'elles peuvent avoir. Ceux-ci résultent de la production de différents composés organiques et non organiques capables d'inhiber ou de limiter la croissance de certains germes pathogènes (HAMMI, 2016).

Les bactéries lactiques ont la propriété de produire des substances antibactériennes leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes.

L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due aux métabolites excrétés : l'acide lactique et autres acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl et les bactériocines (LEVEAU *et al.*, 1991 ; KLAENHAMMER *et al.*, 1994 ; De VUYST et LEROY, 2007).

#### 3.1. Acide organique

Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation. Les principaux acides produits sont: l'acide lactique, l'acide acétique et propionique. (MAMI, 2013)

Ces acides, sous leur forme dissociée ou non dissociée, agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en perturbant le maintien du potentiel de membrane et en inhibant les systèmes membranaires de transport actif. (HASNAL, 2015)

L'activité antimicrobienne d'un acide organique dépend de sa nature (acide fort, acide faible). L'acide acétique, par exemple, est plus inhibiteur que l'acide lactique ; il inhibe les levures, les moisissures et les bactéries (BLOM et MORTVEDT, 1991).

#### 3.2. Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est produit par les bactéries lactiques en présence d'oxygène à la suite de l'action des oxydases ou des flavoprotéine dinucléotide (NADH), le nicotinamide adénine peroxydase. L'effet antimicrobien de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut résulter de l'oxydation de groupes sulfhydryle provoquant la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes, et de la peroxydation des lipides membranaires qui augmentent la perméabilité de la membrane. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut être aussi un précurseur pour la production des radicaux libres bactéricides tels que les superoxydes (O<sub>2</sub>) et les radicaux hydroxyles (OH) qui peuvent endommager l'ADN (AMMOR *et al.*, 2006).

#### 3.3. Dioxyde de carbone

Intermédiaire de fermentation de certains substrats par les bactéries lactiques hétérofermentaires, le CO<sub>2</sub> crée des conditions anaérobies dans le milieu, pouvant conduire à l'élimination de bactéries aérobies strictes. Ceci peut en revanche aussi favoriser dans le même temps le développement de flores anaérobies qui peuvent être parfois néfastes (PAPA ABDOULAYE, 2011).

### 3.4. Diacétyle

Le diacétyle (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) est un composé aromatique produit par les bactéries lactiques (LAB) par fermentation du citrate. Cette molécule est caractérisée par une large activité antimicrobienne (LANCIOTTI *et al.*, 2003). La production de diacétyle par les différentes souches de LAB dépend du milieu, du pH et de la température d'incubation.

Le mécanisme d'action du diacétyle n'est pas encore connu précisément, néanmoins il est possible qu'il interagisse avec les résidus arginine des enzymes fonctionnelles (LEONARD, 2013).

### 3.5. Reutéline

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

La reutéline a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les procaryotes Gram positif ou Gram-négatif, les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires. Elle interfère avec la réplication de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (VOLLENWEIDER, 2004).

### 3.6. Bactériocines

#### 3.6.1. Définition et caractéristique

La définition qui était la plus acceptée donnée aux bactériocines est celle de Klaenhammer qui les définit en tant que protéines ou complexes de protéines ayant une activité bactéricide contre les espèces étroitement liées à la souche productrice (DORTU et THONART, 2009 ; XIE *et al.*, 2011). Cependant, des études récentes ont démontré qu'il existe certaines qui sont actives également contre des bactéries à Gram négatif. (BENGUELLA, 2015).

## Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Ces substances protéiques sont synthétisées au niveau de ribosome généralement par les bactéries à Gram positif appartenant au groupe des bactéries lactiques. Elles peuvent subir ou non des modifications post-traductionnelles avant d'être excrétées dans le milieu extracellulaire (JASNIEWSKI, 2008).

Les bactériocines se différencient par leur poids moléculaire, leurs propriétés biochimiques, leur origine génétique, ainsi que par leur spectre et mode d'action (BENOMAR *et al.*, 2006 ; DORTU et THONART, 2009 ; RUIZ-BARBA *et al.*, 2010).

La formation de bactériocine est une caractéristique des organismes génétiques, Est-ce que toutes les souches ont la capacité de synthétiser une ou plusieurs Cancérogènes bactériens strictement définis et spécifiques (ALEXANDER *et al.*, 2017).

### 3.6.2. Classification

Les bactériocines présentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (KLAENHAMMER, 1988).

Il existe différentes classes de bactériocines produites par les bactéries lactiques et elles peuvent être classées en fonction de leurs caractéristiques génétiques et biochimiques (dont la stabilité thermique) (KLAENHAMMER *et al.*, 1994 ; DORTU et THONART, 2009) Tableau II.

**Tableau II.** Classification de bactériocine produit par les bactéries lactiques (BHARTI et al, 2015)

Classe	Sous classe	Caractères	Exemple	PM (Da)	Souche productrice
Classe I		Peptides linéaires ou globulaires post-traductionnellement modifiés contenant de la lanthionine, de la $\beta$ -méthyl, lanthionine et des acides aminés déshydratés.	Nisin A	3352	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactic</i>
			Nisin U	3029	<i>Streptococcus uberis</i>
			Nisin Z	3029	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactic</i>

## Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

<b>Classe II</b>	Classe IIa	Stable à la chaleur, non modifié Bactériocines ne contenant pas de lanthionine, classe hétérogène de petits peptides, bactériocines de type Pediocine PA-1	Pediocine PA-1	4629	<i>Pediococcus acidilactici</i>  <i>PAC-1</i>
	Classe IIb	Composé de deux peptides	Lactacin F	4755	<i>Lactobacillus spp.</i>
	Classe IIc	peptide circulaire	Enterocin AS-48	7149	<i>Enterococcus faecalis</i>
	Classe IId	Linéaire, sans pédiocine,  Monopeptide.	Lactococin A	5778	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>
<b>Classe III</b>		Grandes protéines thermiques instable.	Caseicin80 Helveticin J	42000 37511	<i>Lactobacillus casei</i> B80  <i>Lactobacillus Helveticus</i> 481

Les bactériocines de classe IV présentée par KLAENHAMMER (1993) a été contestée par la suite par de nombreux auteurs, puisque aucun de ces peptides n'a été incorporé avec sa partie glucidique ou lipidique.

- **La nisine**

La nisine est le lantibiotique le plus étudié (NES et al, 2007). Composé de 24 acides aminés, elles diffèrent par un ou plusieurs acides aminés (CENATIEMPO et al, 1996; NES et al., 2007).

Les quatre variantes, nisine A, F, Q et Z ont été isolées chez *L. lactis*, les deux autres appelées nisine U et U2 ont été isolée chez *S. sp* (PIPER et al., 2011).

La nisine U présente une similitude de 78% avec la nisine A, la différence étant le manque des trois résidus Cterminaux (WESCOMBE et al., 2006). La plus récente variante, la nisine H est isolée quant à elle d'une souche de *Streptococcus* (O'CONNOR et al., 2015).

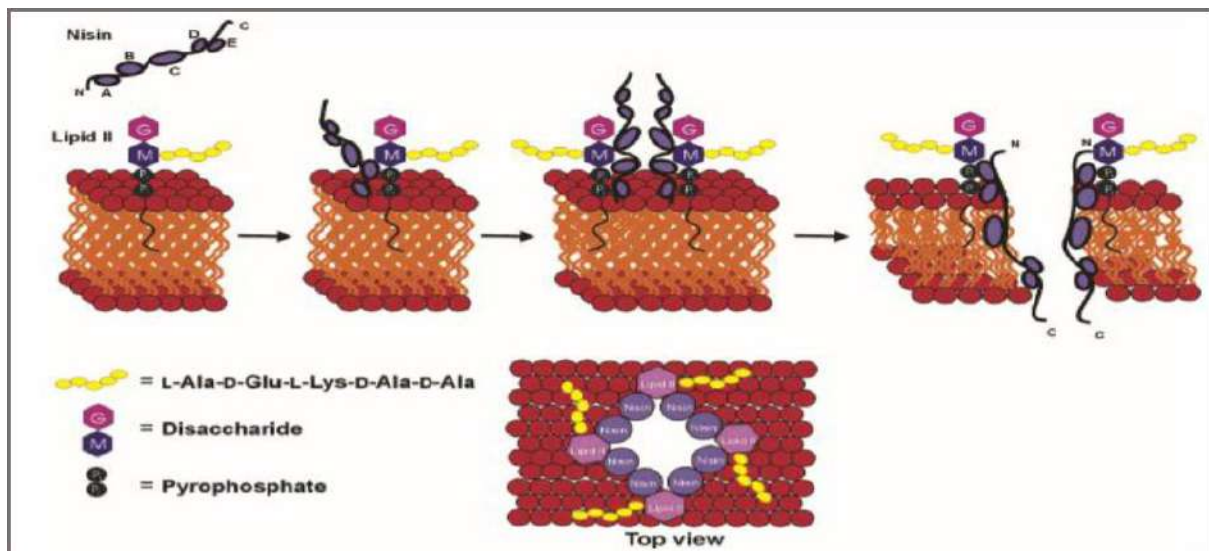
Les bactériocines, comme la nisine, sont acceptées sans danger comme conservateur Alimentaire dans les légumes (BHARTI *et al.*, 2015).

### 3.6.3. Mode d'action

Le mécanisme d'action des bactériocines est largement étudié. Il est admis qu'il se décompose en trois étapes :

- La première consiste en la fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible. C'est durant cette étape que le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle permettant l'expression de son activité (PARADA *et al.*, 2007; JASNIEWSKI, 2008).
- La seconde étape est l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique.
- La dernière étape est la formation du pore (figure 1).

Ce dernier conduit à des fuites de composés intracellulaires vitaux. Leur perte entraîne donc des effets néfastes pour la cellule, allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne à la mort cellulaire (SMAOUI, 2010 ; SIBOUKEUR, 2011 ; MAKHLOUFI, 2012).



**Figure 2.** Formation de pores membranaires par le complexe Nisine-lipide II selon CHATTERJEE *et al.*, (2005).

Matériel

Et méthodes

### Matériel et Méthodes

#### Lieu de l'étude

Le travail expérimental a été effectué au sein des laboratoires pédagogiques de la faculté SNV, Université Kasdi Merbah, Ouargla.

Les principaux objectifs de notre étude sont :

- Isolement et pré-identification des bactéries lactiques thermorésistantes à partir du lait de chamelle fermenté spontanément.
- Étude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques thermorésistantes isolées vis-à-vis des bactéries pathogènes.

#### 1. Matériel

Le matériel utilisé dans cette étude, comme appareillage, verrerie et petit matériel sont cités dans l'annexe N° 1

##### 1.1. Milieux de culture utilisés

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants : (la composition est citée dans l'annexe N°3)

➤ Les milieux d'isolement et purification :

L'eau peptonée (pour la dilution)

MRS solide et liquide (Man Rogosa et Sharpe)

➤ Les milieux d'identification des souches lactiques :

KMk (Kempner et Mc Kay,)

MSE (Mayeux, Sandine et Elliker,)

M16BCP (Thomas,)

MH (Mueller et Hinton,)

➤ Les milieux pour la recherche de l'activité antimicrobienne :

BN et GN (Bouillon nutritif et la gélose nutritive)

ADH (Moeller/ Arginine dihydrolase)

##### 1.2. Produits chimiques

Colorants de la réaction de Gram: (fushine, violet de gentiane, lugol), bleu de méthylène, l'eau oxygénée, l'éthanol à 0.95

## 2. Méthodes

### 2.1. Echantillonnage

Deux échantillons du lait cru de chamelle ont été collectés à partir des troupeaux appartenant à deux élevages différents de la région d'Ouargla, une de Hassi Sayeh, l'autre d'Ainbayda. La traite est fait manuellement dans des conditions hygiéniques à approprié dans le mois de février.

Le lait est mis dans des bouteilles en verre stériles et acheminé au laboratoire dans le jour même.

### 2.1 Isolement et purification des bactéries lactiques

#### 2.1.1 Fermentation du lait

L'ensemble des échantillons sont fermentés spontanément à la température ambiante du laboratoire pendant 4 jours jusqu'à la séparation des deux phases, caséique et lacto-sérique. La fermentation a été réalisée en laissant le flacon du lait de chamelle sur la paille à une température ambiante pendant 4 jours jusqu'à la séparation des deux phases, caséique et lacto-sérique. Après la fermentation on met notre flacon dans le bain marie à 63° pendant 30 min pour préserver les bactéries thermorésistantes.

#### 2.1.2. Préparation des dilutions décimales

L'isolement des bactéries thermorésistantes a été fait après la réalisation d'une série de dilutions décimales par le transfert d'un volume de 1ml du lait fermenté prés chauffer dans 9ml de solution d'eau peptone stérile pour l'obtention d'une dilution initiale de  $10^{-1}$ , elle est utilisée par la suite pour réaliser une série de dilutions jusqu'à  $10^{-6}$ .

A partir des deux dernières dilutions, un volume de 1ml a été étalé sur des boites contenant le milieu MRS solide (deux boites pour chaque dilution). Elles sont incubées en anaérobie à 30°C pendant 24 à 72h.

Après incubation, les colonies individuelles sont prélevées et transférées dans des tubes contenant 5ml de milieu MRS liquide et incubées à nouveau à 30° pendant 24h.

La purification a été faite par des repiquages répétés sur le milieu MRS (solide et liquide) jusqu'à l'obtention des isolats homogènes (LORE *et al.*, 2005).

La pureté des bactéries isolées est confirmée par un examen macroscopique et par examen microscopique après une coloration de Gram (THAPA *et al.*, 2006).



### 2.1.3. Conservation des isolats

Les souches présumées comme LAB (Gram positive et catalase négative) sont conservées a court terme sur la gélose MRS inclinée ; après ensemencement et croissance a la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les quatre semaines sur bouillon MRS.

### 2.1.4 Identification des souches lactiques

#### 2.1.4.1. Identification morphologique

#### 2.1.4.2. Observation macroscopique

Afin de déterminer leurs caractères cultureux (taille, forme et couleur), les colonies obtenues sont observées à la loupe binoculaire (JOFFIN et LEYRAL, 2006).

#### 2.1.4.3. Observation microscopique

##### - Coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration classique en microbiologie. Elle permet de distinguer deux (2) types de bactéries, les bactéries Gram négatifs (G-) et les bactéries Gram positives (G+). Celles-ci diffèrent de par la composition de leur paroi, notamment par l'épaisseur du peptidoglycane, ou la présence d'une membrane externe. (HASNA *et al.*, 2015) (Annexe N°4)

#### 2.1.4.4 Identification physiologique et biochimique

##### 2.1.4.4.1. Test catalase

La catalase est une enzyme catalysant la décomposition de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène selon la réaction suivante :



Cette enzyme est produite par plusieurs microorganismes et utilisée pour l'identification des bactéries. Une colonie isolée est prélevée de la gélose est déposée dans une goutte d'eau

oxygénée sur une lame de verre propre. L'apparition de bulles d'air indique une réponse positive (BOUBEKRI et OHTA, 1996). (Annexe N° 8).

Les bactéries retenues sont celles dépourvues de catalase.

#### 2.1.4.4.2. Thermoresistance

Le but de cette opération était de faciliter la caractérisation des souches lactiques thermorésistantes dans le but de savoir qu'elles appartiennent aux bactéries probiotiques ou aux enterocoques sans oublier les lactocoques, on ensemence une colonie sur le milieu MRS liquide, ensuite il va subir à un chauffage (62°C/30min) et mettre à l'étuve 30°C/24h (TEUBER et GEIS, 2006).

Un résultat positif se distingue par la présence d'un trouble. Pour notre étude on ne sélectionne que les souches thermorésistantes.

**Remarque :** les étapes expérimentales suivantes n'ont pas été réalisées à cause de la crise endémique Covid-19.

#### 2.1.4.4.3. Croissance à différentes températures, pH et à différentes concentration de NaCl

Les bactéries purifiées ont été testé pour leur pouvoir à se croitre à différentes températures, pH et à différentes concentration en NaCl.

Température				[NaCl]			pH		
4°C	15°C	37°C	42°C	2%	4%	6.5%	4	6.8	9.6

#### 2.1.4.4.4. Type fermentaire

Ce test permet de classer les bactéries en Hétérofermentaire ou homofermentaire. On ensemence abondamment un tube de 10 ml de bouillon MRS dans le milieu on introduit une cloche de Durham, le dégagé par les bactéries hétérofermentaires s'accumule dans la cloche après l'incubation à 30°C pendant 24h à 48h (BERRADIA, 2016).

#### 2.1.4.4.5. Test de bleu de Sherman (1937)

Ce test se fait à évaluer l'aptitude des souches lactiques à décolorer le bleu de méthylène à différentes concentrations dans le lait écrémé (1 et 3%), ce test sert à se différencier entre les lactocoques et les enterocoques. Donc nous avons préparé le lait écrémé mélangé avec l'indicateur coloré le bleu de méthylène à différentes concentrations (1% et 3%) ont été mis dans un tube à essai qui est autoclavés pendant 15 min à 110 °C. Après refroidissement, les tubes ont été inoculés par 0,5 ml d'une culture jeune de l'isolat, incubé à 24h/30°C. La réaction positive est remarquée par la réduction de bleu de méthylène vers le transparent et coagulation du lait (HADJ-ABDERRAHMAN, 2015).

#### **2.1.4.4.6. Recherche de l'arginine déshydrolase (ADH)**

Le test arginine déshydrolase sert à déterminer si la bactérie transforme l'arginine par l'arginine déshydrolase, la réalisation de test se fait comme de la manière suivante : A l'aide d'une pipette de Pasteur, on ensemence le milieu M16 BCP (milieu M16 solide avec un indicateur de PH : le pourpre de bromocrésol), avec l'inoculum de la bactérie à identifier (préparé à partir d'une culture de 18 à 24 h avec de l'eau physiologique), on ajoute quelques gouttes d'huile minérale stérile, on incube à 30°C pendant 24 à 48 h. A la suite de l'incubation, on lit la réaction obtenue : -réaction positive : si le milieu demeure rose -réaction négative : si le milieu devient jaune orangé (JOFFIN et LEYRAL, 2006)

#### **2.1.4.4.7. Utilisation du citrate**

L'utilisation du citrate est étudiée sur milieu Kempler et MC KAY (KMK) (1980). Ce milieu contient une solution de ferricyanide de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le ferricyanide de potassium. Les colonies qui fermentent le citrate lancent la réaction entre ces ions il en résulte la formation de colonies bleues ou ayant un centre bleu foncé (après 18 h-72 h d'incubation à 30°C). Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches (HAMAR, 2018).

#### **2.1.4.4.8. Profil fermentaire (Utilisation des sucres)**

Certainement les bactéries lactiques dégradent différentes sources de carbone. Ce test a été réalisé sur le bouillon MRS BCP dépourvu de l'extrait de viande et sans glucose réparti dans des tubes eppendorf à raison de 1ml ajouté à chaque fois un type de sucre. Les sucres que nous avons utilisés sont : Glucose, Saccharose, Lactose, Maltose, Melibiose, Mannitol, Tréhalose, Sucrose, Rhamnose, Xylose, Arabinose et Sorbitol.

Après incubation à 30°C/24h à 48h, nous distinguons le virage de milieu du violet au jaune et cela indique que la souche lactique a pu utiliser cette source de carbones lors de sa croissance (BAUER *et al.*, 2009).

### **2.1.4.4.9. Production des exo-polysaccharides (dextrane)**

A Partir du saccharose est mise en évidence sur milieu solide MSE (MAYEUX *et al.*, 1962). Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation des colonies larges, visqueuses et gluantes.

## **2.1.5. Test technologique**

### **2.1.5.1 Etude de Pouvoir antimicrobien**

Pour l'étude du spectre d'action des bactéries lactiques et leur substances antimicrobiennes vis-à-vis des micro organismes pathogènes et/ou d'altération, trois souches de différents genres bactériens ont été utilisées comme indicatrices.

Les nombreuses méthodes décrites pour la détection de souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible.

Les souches de bactéries lactiques après culture sur milieu MRS à 30°C sont testées pour leur pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion en milieu gélosé (TAGG et MCGIVEN, 1971).

#### **2.1.5.1.1. Méthode des spots (FLEMING et al, 1975)**

Cette méthode consiste à mettre en évidence les inhibitions des bactéries lactiques testées comme inhibitrices contre des bactéries indicatrices. Elle est réalisée comme décrit par FLEMING *et al.*, 1975).

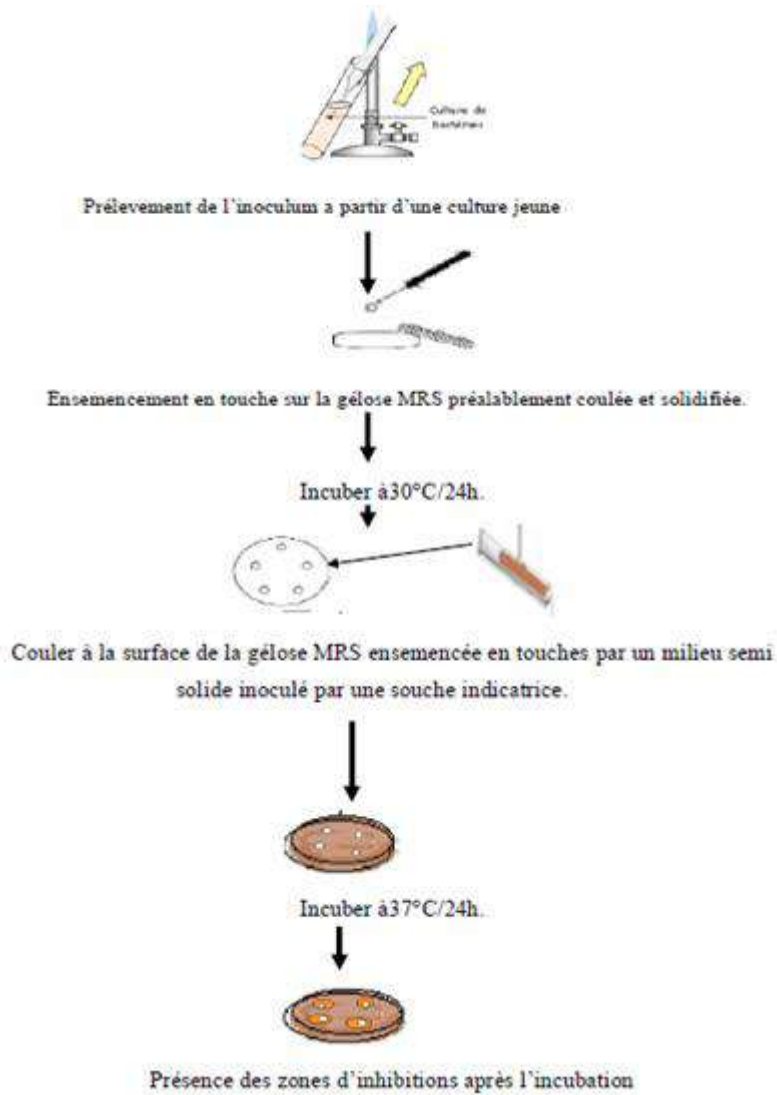
Préparation des cultures de 18h pour les souches utilisées à 37°C en MRS liquide. Sur des boites de Pétri contenant du MRS solide, ensemencement en touche des isolats considérées comme inhibitrices à l'aide d'une micropipette. Après séchage à température ambiante, les boites sont pré-incubées à 37°C pendant 24h.

Couvrir les cultures de gélose molle de MRS en surfusion à (45°C), pré-ensemencés avec de la souche indicatrice.

Après solidification, les boites sont incubées à 30°C pendant 24h.

L'inhibition se révélera par la présence d'une zone transparente autour des souches ensemencées en touches.

- La lecture des résultats est réalisée par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions.



\*t

**Figure 3:** Méthode des spots (FILEMING *et al.*, 1975)

### 2.1.5.1. Méthode de diffusion par puits (BAREFOOT et KLAENHAMMER, 1983)

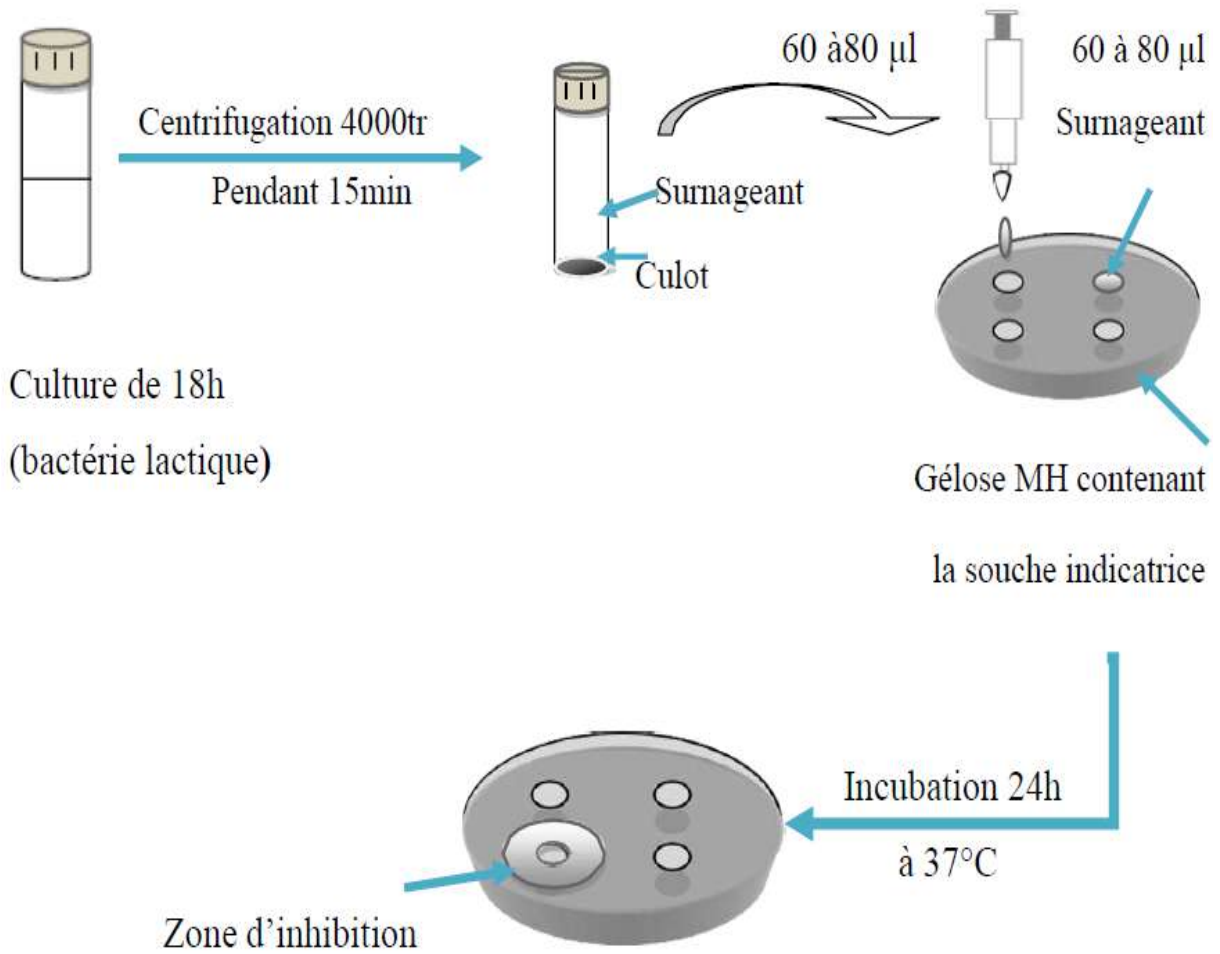
Afin de déterminer la nature de la substance inhibitrice produite par les bactéries lactiques, il est impératif de réaliser une série de tests en utilisant la méthode indirecte.

Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant des souches lactiques productrices de substance antimicrobienne avec la souche et test (TAGG et MCGIVEN, 1971).

- Les souches déjà sélectionnées pour leur production de substances antimicrobienne sont utilisés dans ce test où sont immergé dans le milieu MRS et laisser sécher.
- Préparation de surnageant : on centrifuge 15 ml de la suspension bactérienne préparé la veille afin d'obtenir une culture jeune 4000 tours/ 30min ensuite on neutralise le surnageant par NaOH 1/9N de façon à obtenir un pH de 6,8 (l'élimination de l'effet de l'acide lactique).
- Après solidification du milieu, les boîtes sont ensemencées en surface par la suspension de la souche pathogène (100 µl, DO= 0.1 à 0.08), puis des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce (cloche de Durham) sur la gélose et seront remplis par 60 à 80µl de surnageant les boîtes seront mises à 4°C pendant 2heures pour permettre une bonne diffusion du surnageant.
- Les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37°C.
- Les puits entourés d'une zone claire d'inhibition de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive. (YILDIRIM et YILDIRIM. 2001).

La mesure du diamètre d'inhibition (Zi) est effectuée selon la formule suivante:

$$\text{Zi en (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre de puits (8 mm)}$$



**Figure 4:** méthode des puits (BAREFOOT et KLAENHAMMER, 1983)

# Résultats et discussions



### Résultats et discussions

#### 1. Pré identification phénotypique des isolats

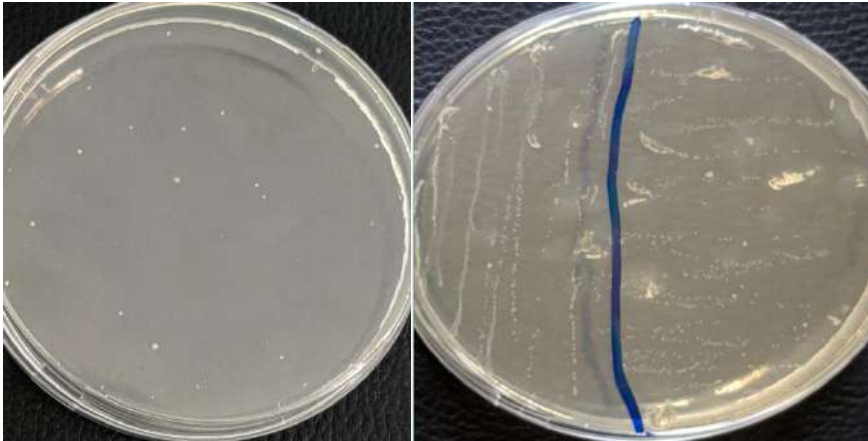
##### 1.2.Observation macroscopiques et microscopiques

###### 1.2.1. macroscopiques

###### ➤ Sur milieu solide

Les colonies apparaissent en petite taille environ 0,1 à 1 mm de diamètre, blanches, lisses, rondes et bombées (KIHAL, 1996 ; CARR *et al.*, 2002)

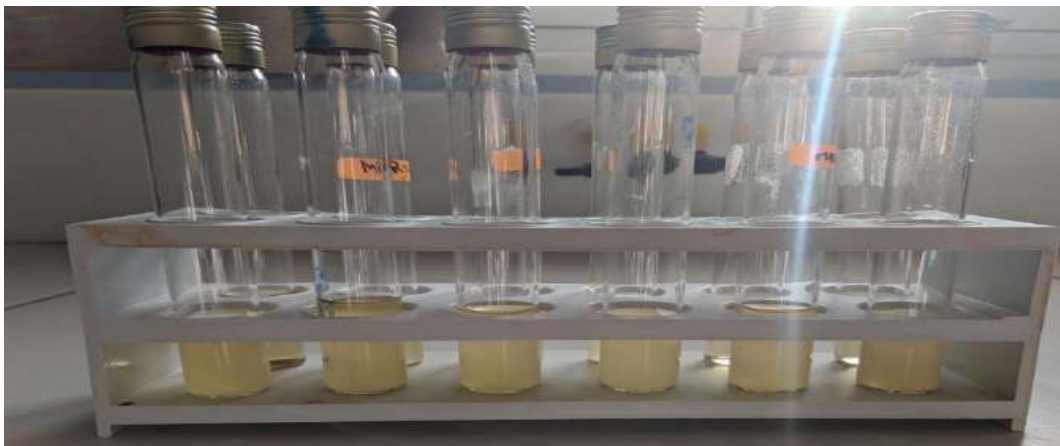
**Figure 5 :** Aspect macroscopique des colonies de Bactérie lactique sur milieu MRS



###### ➤ Sur milieu liquide

La croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble dans le milieu MRS liquide.

**Figure 6 :** Aspect macroscopique des colonies de Bactérie lactique sur milieu MRS liquide

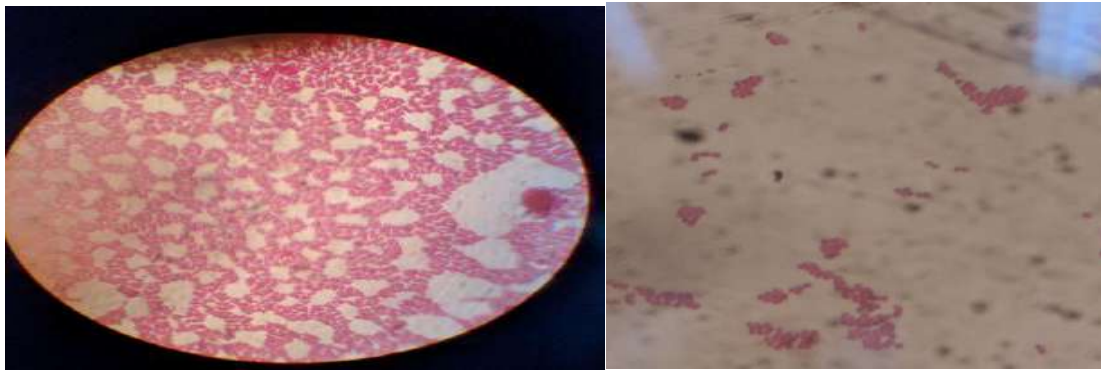


### 1.2.2. Microscopiques

Après la coloration de Gram, nous avons passé à l'observation microscopique aux Grossissements (G: 10x10), (G: 10x40) et (G: 10x100) avec l'huile à immersion, où nous avons pu observer que les bactéries étaient Gram positif apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'associations.

L'observation microscopique a montré que y'a des formes variées de petites coques, coccobacille et ovoïde.

**Figure 7 :** Aspect Microscopique de la Coloration de Gram



Les résultats des tests morphologiques ont montré que toutes les souches possèdent un Gram positif et catalase négative sont des bactéries lactiques (tableau III et IV)

## 2. Caractéristiques biochimiques et physiologiques des isolats

### 2.1. Test de catalase

L'analyse de ces résultats a montré que tous les isolats se sont avérés à Gram positif et catalase négative ce qui est caractéristique des bactéries lactiques. (Tableau III IV)

**Figure 8 :** test de catalase



**Tableau III** : les résultats des échantillons (test de catalase et coloration de gram)

Souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+

- Dans les 9 premières souches de l'échantillon 1 qui présentes catalase négative et gram positives reste que 2 souches thermorésistantes après le test de confirmation.
- Dans les (du S10 a S15) de l'échantillon 2 on 'a 2 souches gram positive et catalase négatives mais on 'a pas pu faire le test de confirmation de thermorésistantes à cause de l'épidémie covid-19

A côté de ce test, d'autres ont été réalisés (ADH, croissance à 0.1% de bleu de méthylène, thermorésistance, résistance à l'éthanol et la production de dextranses) afin d'identifier les isolats jusqu'au stade espèce. Toutefois, les tests appliqués dans cette étude restent insuffisants.

## **2.2. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches de bactéries lactiques**

### **➤ genre *Lactococcus***

BOUGERRA ASMA (2012) : les isolats identifiés comme *lactococcus* sont homofermentaires résistent à une concentration de 4% d'NaCl mais non à 6.5%. Ils croissent à 10°C, mais non à 45°C. ils ne peuvent pas se développer dans un milieu dont le pH égal à

## Résultats et discussions

---

4.5 (à l'exception d'une seule souche) comme ils ne résistent pas à un pH 9.6. Néanmoins tous les isolats croissent à pH 9.2 et en présence d'une concentration de 0.1% de bleu de méthylène. Tous les isolats ne sont pas thermorésistants.

BELLAL IBTISSAM (2018) : le genre *Lactococcus* a été signalées comme homofermentaire, il n'hydrolyse pas l'arginine (ADH-) et fermente le citrate. Les isolats ont pu se développer à pH 4.5 et 6.5 et à des concentrations de 4.5% et 6.5% d'NaCl mais non à 18%.

Ils n'ont pas cru ni à 4°C ni à 45°C cependant elles ont cru à 20°C et 40°C, et n'ont pas résisté à 63.5°C /30min mais ils ont été résisté à 55°C/30min.

Après l'incubation dans le lait de Sherman pour 0.1% et 0.3% bleu de méthylène, il y a une forte coagulation observés dans le milieu de lait de Sherman mais il n'y pas de réduction de bleu de méthylène qui justifier par l'absence de décoloration de milieu c'est de réaction négative.

Le genre *lactococcus* fermente le glucose, lactose, galactose et le fructose, et ne fermente pas l'amidon, le glycérol, l'adonitol et le maltose.

SOLTANA (2017) a trouvé 15 souches de lactocoque homofermentaires dont 11 ADH+ et 4 ADH-, elles sont toutes capable de croître à 10°C et 40°C mais non capable de croître à 45°C et non thermorésistantes à 63.5°C. Seul 5 des souches poussent à 4% de NaCl et toutes ne poussent pas à 6.5% de NaCl, et ne poussent pas à pH 4 et 9.6. 8 souches produisent l'acétone et 7 souches produisent de l'acétone. Toutes les souches ne fermentent pas le citrate sauf 3 souches.

OMAR HASSAINE (2013) les isolats suggérés comme *lactococcus* sont capable de croître à 10° et 37°C et non pas à 45°C et non plus à pH 9.6 à l'exception d'une souche. Ces isolats poussent en présence de 4% de NaCl et non pas à 6.5%, Elles ne survivent pas après leur exposition à 60°C pendant 30 min et produisent du NH<sub>3</sub> à partir de l'arginine.

En présence de différentes sources hydrocarbonés, ces isolats utilisent le lactose et le ribose, tandis que l'utilisation du mannitol, saccharose et xylose semble être dépendante des souches.

D'après RAHLI FOUZIA (2015), 62 isolats homofermentaire présentent des cellules sphérique ou de forme ovoïde, se développent à 10°C et non pas à 45°C. La distinction des espèces est basée sur l'hydrolyse de l'arginine, la production d'acétone, la

## Résultats et discussions

---

présence du citrate, la croissance à 4 et 6.5% de NaCl et à pH 9.6 d'après les résultats obtenus, les espèces suivantes ont été déterminées :

- 61.8% des souches sont ADH<sup>+</sup>, ne produisent pas d'acétone, poussent à 10°C et non pas à 45°C. certaines souches supportent une concentration de 6.5% de NaCl. Elles fermentent le ribose, le mannose, la salicine, le maltose, le cellobiose, le fructose et le tréhalose. L'arabinose, le raffinose, le xylose, le sorbitol, le melibiose, le rhamnose et le sorbose ne sont pas fermentés. Ces souches peuvent s'appartenir à *Lactococcus lactis subsp. Lactis*.

- 28.2% des souches sont ADH<sup>-</sup>, Citrate<sup>-</sup>, certaines produisent l'acétone, ne poussent pas à 45°C et en présence de 0.1 et 0.3% de bleu de méthylène. Elles fermentent le galactose, le mannose, le cellobiose, alors qu'elles ne fermentent pas le fructose ni le maltose ni le tréhalose. Ces souches sont pré-identifiées à *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

- 9.9% des souches hydrolysent l'arginine, produisent de l'acétone, résistent à 4% de NaCl et peuvent croître à pH 9.6. Certaines souches possèdent la catalase qui donne des colonies bleues sur milieu KMK. Ces souches fermentent le xylose, le mannose et le sorbitol, elles sont pré-identifiées à *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*.

### ➤ genre *Lactobacillus*

BOUGERRA ASMA (2012) a isolé des bâtonnets homofermentaire, ADH<sup>-</sup>, ils croissent tous à 4% d'NaCl et certains à 6.5%. tous les souches peuvent se développer à 10°C, certains à 45°C et certains isolats survivent après un chauffage de 60°C pendant 30min. Elles sont toutes des acidophiles (croissance à pH 4.5) mais ne peuvent pas croître à pH 9.6.

OMAR HASSAINE (2013) a trouvé que les *Lactobacillus* poussent à 15°C et ne produisent ni de CO<sub>2</sub> à partir du glucose ni du NH<sub>3</sub> à partir d'arginine. Deux des 11 isolats sont classés comme étant *Lb. Paracasei subsp. Paracasei*, car incapables d'utiliser l'arabinose, melibiose, raffinose et rhamnose (BALOWS et al, 1991 ; COLLINS et al, 1991). Cinq autres souches correspondent à *Lb. Plantarum*, comme l'indiquent leur profils fermentaires des sucres, car l'ensemble de ces 5 souches fermentent l'arabinose, cellobiose, lactose, maltose, melibiose, raffinose, ribose, saccharose et tréhalose (SHARP, 1979 ; BALOWS et al, 1991). Ces souches sont incapables d'utiliser le rhamnose, tandis que l'utilisation du sorbitol et xylose est variable et semble être dépendante des souches.

Les 4 dernières souches sont classées comme étant *Lb. Rhamnosus*, car elles fermentent le rhamnose mais se sont révélées incapables de fermenter le melibiose, raffinose, xylose, saccharose et arabinose

BELLAL IBTISSAM (2018) a identifié le genre *Lactobacillus* comme homofermentaire, il n'hydrolyse pas l'arginine (ADH-) et fermente le citrate. Les isolats ont pu se développer à pH 4.5 et 6.5 et à des concentrations de 4.5% et 6.5% d'NaCl mais non à 18%.

ils n'ont pas cru ni à 4°C ni à 45°C cependant elles ont cru à 20°C et 40°C, et n'ont pas résisté ni à 63.5°C /30min ni à 55°C/30min.

Après l'incubation dans le lait de Sherman pour 0.1% et 0.3% bleue de méthylène, il Ya une forte coagulation observés dans le milieu de lait de Sherman mais il n'y pas de réduction de bleue de méthylène qui justifier par l'absence de décoloration de milieu c'est de réaction négative.

Le genre *Lactobacillus* fermentent le glucose, lactose, adonitol, xylose, maltose, galactose et fructose, et ne fermente pas l'amidon.

### ➤ genre *Leuconostoc*

RAHLI FOUZIA (2015) a trouvé 10 isolats *Leuconostoc*, hétérofermentaire, ADH-, poussent à 10°C mais pas à 45°C, ne produisent pas l'acétone. Subdivisé en 2 groupe :

- 60% fermentent l'arabinos, le melibiose, lr tréhalose et produisent du dextrane. Ces souches rapprochent particulièrement de *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides*.

- 40% ne fermentent pas l'arabinose ni le tréhalose et ne produisent pas le dextrane. Ces souches peuvent être rattachées à *Leuconostoc lactis*.

BELLAL IBTISSAM (2018) à montrer que les *Leuconostoc* sont des hétérofémentaires , incapables d'hydrolyser l'arginine et fermentent le citrate. Elles poussent à pH4.5 et 6.5, à des concentrations de NaCl (4.5% et 6.5%) et à 20°C et 40°C. mais ne poussent pas au milieu halin a 18% NaCl ni à 4°C ni à 45°C, ne résistent pas 63.5°C /30min mais elles résistent à 55°C/30min.

BOUGERRA ASMA (2012) a rapporté que le genre *Leuconostoc* ont cru à 4% d'NaCl, certains ont développé meme à 6.5%. La plupart ont pu croitre à 10°C, mais aucun

isolat n'a pas résisté à une température de 45°C. Tous les isolats ont toléré aux pH acide (4.5 et 4.8), mais non à pH 9.6. ils n'ont pas produit les dextrans, ni résisté à 10% d'éthanol et aucune croissance n'est remarquée après un chauffage à 60°C pendant 30min.

ZAROOUR et al (2012) ont trouvé que le genre *Leuconostoc* est capable de produire le CO<sub>2</sub> à partir du glucose, incapable d'hydrolyser l'arginine. Les souches isolées et purifiées ont pu croître à 15 et à 37°C mais non à 4 et 45°C, ce qui confirme qu'elles sont des bactéries mésophiles. Cinq souches ont pu résister à une concentration de 3% de NaCl, tandis qu'aucune souche n'a poussée à 6,5 %. Les isolats sont capables de croître à pH 6,5 et non pas à pH 4. Elles sont non protéolytiques. La thermorésistance a été testée à deux températures, la première est de 63,5°C/30 min à laquelle les souches n'ont pas pu résister, et la seconde à 55°C/15 min ou elles ont pu croître.

La production de dextrane sur milieu saccharosé MSE a montré que les isolats sont capables d'hydrolyser le saccharose et de produire le dextrane.

Le profile fermentaire des isolats de *Leuconostoc* était « Glu+ , Lac+ , Gal+ , Sac+ , Frc+ , Mal+ , Xyl+ , Mnt- , Rha- , Ara- , Sorb<sup>-</sup> , Esc-».

Les isolats sont capables d'utiliser le citrate en formant des colonies bleues sur milieu KMK sauf une souche qui n'utilise pas le citrate.

Toutes les souches sont incapables de produire l'acétoïne. L'hydrolyse de l'esculine étudiée sur milieu gélosé a révélé le même résultat trouvé sur milieu liquide MRS-BCP.

### ➤ genre *Enterococcus*

BOUSSOUAR NACEUR (2017) ils ont la capacité de croître en présence de 65 g de NaCl / l, à pH 9,6 et à 10 et 45 ° C. alors que la croissance à 10 ° C n'a pas été observée dans 23 des 123 isolats.

RAHLI FOUZIA (2015) 28 isolats homofermentaires, ADH+, acétoïne variable, citraate variable, poussent à 10 et 45°C, en présence de 4 et 6.5% de NaCl et à pH 9.6, hydrolyse l'esculine, poussent à 0.1% de bleu de méthylène et non pas à 0.3%. Ces isolats ont été rattachés au genre *Enterococcus*.

Selon la fermentation des sucres nous avons distngué deux espèces :

71.4% fermentent l'arabinose, le melibiose, le raffinose, le mannose, le ribose et le mannitol. Ces souches sont pré-identifiées à *Enterococcus faecium*.

25.6% fermentent le sorbitol, le rhamnose, et le ribose mais ne fermentent pas le melibiose, l'arabinose, le xylose. Ces souches sont pré-identifiées à *Enterococcus faecalis*.

Les résultats de BOUGERRA ASMA (2012) montrent que les entérocoques sont homofermentaires, capables de croître à 4% d'NaCl mais non à 6.5%, thermosensibles, ADH+ et résistent à 0.1% de bleu de méthylène. Elles peuvent se développer à 10°C et à 45°C, mais n'ont pas toléré le pH acide (4.5) néanmoins, une légère croissance a été obtenue au pH alcalin (9.6).

### 2.2.Détermination de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques

Afin d'évaluer leur potentiel antimicrobien, le spectre d'activité de ces souches a été élargi à une gamme des souches des bactéries pathogènes et/ou altérantes à Gram positif et à Gram négatif (POLAK BERECKA et al. 2009).

L'évaluation de l'effet antagoniste des souches purifiées a été réalisée par des tests directs et indirects. Le premier test est un contact direct entre les bactéries à tester et les bactéries indicatrices. Il permet la réalisation d'un criblage des bactéries possédant un effet antimicrobien. Le deuxième test est indirect et permet l'analyse du surnageant des cultures productrices par la méthode des spots. Il confirme l'activité inhibitrice des souches testées et permet la sélection des plus performantes. (HAMMI, 2016)

RODRIGUEZ *et al.*, (2000) ont caractérisé des substances antimicrobiennes isolées à partir du lait cru produite par des lactocoques et des entérocoques ces substances antimicrobiennes ont un effet contre les micro-organismes d'altération.

BENKERROUM *et al.*, (2004) ont démontré que le lait de chamelle a un effet bactériostatique sur les germes pathogènes *Listeria monocytogenes* et *Echerichia.coli*  
Lü *et al.* (2014) ont purifié et caractérisé une nouvelle bactériocine produite par *Lactobacillus casei* isolée à partir de lait de chamelle, qui a été désigné comme caseicin TN-2 qui pourrait inhiber à la fois les souches pathogènes.



## Résultats et discussions

---

D'après les résultats obtenus par BOUGERRA ASMA (2012) : un diamètre minimum égal à 7 mm obtenu par *Leuconostoc* sp contre *S. aureus*; et un diamètre de 32 mm maximum obtenu par la souche *Lactobacillus* sp. Contre *E. coli*. la meilleure inhibition totale a été obtenue par *Lactobacillus* suivi par *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*.

Le genre *Enterococcus* a montré un effet inhibiteur *E. coli* dont le diamètre d'inhibition est (16mm), et a présenté aussi un effet moindre contre *S. aureus* (13mm).

Et pour les résultats de BOUDERSA et NEKKAA (2017) constate que les bacilles lactiques (BL) présentent l'activité inhibitrice la plus forte. Elle est dirigée contre *E. coli* avec une moyenne de 11 mm, une activité toutefois supérieure à celle observée contre *S. aureus* (9.67mm).

Et que Les coques lactiques (CL) possèdent également une activité inhibitrice variant de 08 à 12.5mm vis à vis *E. coli* avec une moyenne de 9.63 mm, et une activité caractérisée par une zone de 07 à 10 mm contre *S. aureus*.

BELARBI (2011) qui constate que les coques lactiques, principalement les genres *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus*, ont une activité antagoniste élevée vis-à-vis *E. coli* (de 0 à 24mm) contre *S. aureus* (0 à 16mm).

ALLOUCHE *et al.*, (2010) qui ont constaté que les lactobacilles sont plus actifs contre les souches Gram positives notamment *S. aureus* avec une zone de 12 contre 0 et 19 mm pour les souches Gram négatives représentées par *E. coli*

Alors que MAMECHE (2008) qui a constaté que les lactobacilles ont une activité inhibitrice sur les bactéries à Gram négatif nettement supérieure à celle observée contre les pathogènes à Gram positif.

Et que les coques lactiques ont une activité inhibitrice sur les bactéries à Gram négatif élevée (25mm) comparativement à celle obtenue à l'égard des Gram positives (23mm).

Les résultats de RAHLI FOUZIA (2015) indiquent que les bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne. L'ensemble des souches ne présente pas le même spectre d'action vis-à-vis des bactéries pathogènes. La majorité des souches sont actives sur les bactéries à gram positif mais pas tous sur les bactéries à gram négatif.

D'après ces résultats, la majorité des souches présentent une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée, sur toutes les bactéries pathogènes.

(ONDA *et al.*, 2003) suggèrent que les bactéries gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques. Cette activité antibactérienne des souches lactiques est probablement due à la production de plusieurs agents antibactériens. L'acide lactique par son pouvoir acidifiant du milieu inhibe plusieurs types de bactéries. A cela s'ajoute aussi l'effet du diacétyl connu également par son pouvoir d'inhibition. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> libéré par les souches lactiques inhibe les bactéries qui ne possèdent pas des défenses contre le stress oxydatif. Plusieurs études ont montré l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes suite à la libération de substances de nature protéique, les bactériocines (TABAK et BENSOLTANE 2011 ; LABIOUI *et al.*, 2005; MAMI *et al.*, 2010)

### 2.3. Interactions entre les souches lactiques et les souches pathogènes

Les résultats de BELLAL IBTISSAM (2018) montrent la présence de zones d'inhibition autour des spots traduisant ainsi une activité inhibitrice des souches lactiques testées contre la totalité des souches cibles utilisées. Le tableau représente des diamètres d'inhibitions exprimées en millimètres obtenues pour chaque souche.

GUEDDA et BEN KHELIFA 2017 a trouvé que Les deux souches isolées de lait camelin ont formé des zones d'inhibition de 3 à 10mm de diamètre

La souche1 : 4mm avec *E.coli* / 6mm pour *Staphylococcus*/ 7mm pour *pseudomonas* et *Candida*.

La souche2 : 3mm pour *E.coli*/ 7mm pour *Staphylococcus*/ 10mm pour *Pseudomonas* et *candida*.

Selon RAMEH *et al.*, (2019) les isolats représentatifs de chaque genre identifié ont été testés pour leur activité antimicrobienne contre huit pathogènes d'origine animales et agents étiologiques à l'origine de maladies animales.

Les activités antimicrobiennes de ces isolats allaient de zones d'inhibition de 6 à 35 mm. De nombreux isolats présentaient de fortes activités antimicrobiennes contre les pathogènes

testés. les résultats démontrent que l'activité antimicrobienne du LAB contre les agents pathogène dépend de l'espèce et de la souche.

CHARLIER *et al.*, (2009) ont montré que *Lactococcus sp.* et *Leuconostoc sp.* présentent une inhibition à spectre élargie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* qui est induite par l'effet de l'acide lactique et des bactériocines.

LABIOUI *et al.*, (2005) ont rapporté que le diamètre de la zone d'inhibition des bactéries lactiques à l'égard de *Staphylococcus aureus* varie entre 23,3 et 32,5mm.

BAATOUT AYOUB (2019) les résultats du test de spot ont révélé des zones d'inhibitions vis-à-vis de toutes les souches pathogènes testées. Les souches lactiques sélectionnées présentent un spectre d'activité qui varie entre 0 mm et 23 mm sans compter les spots à l'égard des bactéries pathogènes. D'après les résultats obtenus, les trois souches lactiques possèdent un effet inhibiteur vis-à-vis *Escherichia coli* ATCC 8737, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Listeria innocua* CLIP 74915.

### 2.6. Thermorésistantes :

Lait de chamelle :

Les résultats de MERZOUK YAMINA (2015) : Aucune souche n'était thermorésistante. Et même chose pour SOLTANA ZOHRA (2017) absence des troubles pour tous les isolats testés.

BEN GUEHZA-MOKNINE Il y a aucune souche qui a été poussée à 63°C. Donc il n'y avait pas des bactéries thermorésistantes dans les souches. Et leurs résultats semblent à ceux trouvés par GARVIE (1984) et DELLAGLIO *et al.*, (1994).

BOUGERRA ASMA (2012) y'a certain isolats survivent après un chauffage de 60°C pendant 30min c'est le genre *Lactobacillus*.

ZAROOUR *et al.* (2012) *Leuconostoc* ont pu croître à 55°C/15 min.

Lait de vache :

BATTAH et BOUHAMDANI (2017) Les résultats montrent que ces 6 souches sont des souches thermorésistantes, *Enterococcus phoeniculicola*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus phoeniculicola*, *Enterococcus moraviensis*, *Enterococcus sulfureus*.

## Résultats et discussions

---

BENNAI & TEMINE (2017) La majorité des souches sont thermorésistantes seules deux souches parmi les quinze sont dépourvues de la thermorésistance.

ABID ZOULIKHA (2015) a montré que 93.75% des souches isolés sont thermorésistantes, ou elle a observé une croissance sur le bouillon MRS après un traitement thermique pendant 30 minutes à 63.5°C à l'exception d'une seule souche parmi les autres qui est dépourvue de la thermorésistance.

# Conclusion

### Conclusion

Le lait camelin est un aliment un peu oublié dans des différents pays, bien qu'il soit riche en éléments nutritifs, notamment en protéines protectives et en vitamine C comparativement aux autres types de lait. Il possède des propriétés anti-infectieuses, anticancéreuses, antidiabétiques, etc. Ces allégations santé peuvent être attribuées à certains de ses composants tant sur le plan quantitatif que qualitatif. Parmi ceux, les métabolites antimicrobiens, tels que le peroxyde d'hydrogène, les acides organiques, les bactériocines, etc., synthétisés par les bactéries lactiques qui se trouvent en abondance dans les laits fermentés. Ces bactéries sont employées depuis des millénaires dans la fabrication des aliments. Elles permettent, de part leur métabolisme, d'augmenter la qualité nutritionnelle, organoleptique et la durée de conservation des denrées alimentaires.

Le but de cette recherche était d'isoler des bactéries lactiques thermorésistantes à partir de lait de chamelle fermenté, les identifier en s'appuyant sur les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques et de rechercher des substances antimicrobiennes par la méthode des interaction de ces souches productrices et les germes pathogènes.

L'importance de ce travail est d'employer les bactériocines des bactéries lactiques comme un bio conservateur au lieu des additifs chimiques utilisés dans les industries agro- alimentaire et de montrer l'efficacité de ces composés vis-à-vis les bactéries pathogènes.

Nous espérons donner suite à cette étude afin d'identifier les souches lactiques thermorésistantes de lait de chamelle fermenté et leurs substances antimicrobiennes, ainsi que la réalisation d'une série de test est à savoir le peroxyde, le phage, et l'effet des enzymes protéolytiques ce qui peut confirmer que la nature de cette substance pourrait être une bactériocine afin de l'intégrer dans le domaine pharmaceutiques ou agroalimentaires.

# Références bibliographiques

**ABABSA A. (2012) :** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. Mémoire de Magister en Génie microbiologique, université ferhat abbas- setif faculte des sciences de la nature et de la vie.

**ABDERRAHMAN H. (2015) :** Recherche des substances à activité antimicrobiennes produites par des souches bactériennes isolées à partir du lait bovin. Mémoire de master en Biologie. Université kasdi Merbah Ouargla.

**ABID Z. (2015) :** Étude de l'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées d'un produit laitier traditionnel Algérien « Jben ». Mémoire de Master en Biologie Option Sciences des aliments. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.

**AIT ABDELOUAHAB N. (2001) :** Microbiologie alimentaire. Office des Publications Universitaires. Ed N°1.04.4362. Université de Constantine. Algérie.

**AKHMETSADYKOVA S.H.BAUBEKOVA A. KONUSPAYEVA G. AKHMETSADYKOVA N. FAYE B. LOISEAU G. (2015) :** Lactic acid bacteria biodiversity in raw and fermented camel milk, African Journal of Food Science and Technology ((ISSN: 2141-5455) Vol. 6(3) pp. 84-88.

**AL HAJ O.A. AL KANHAL HAMAD A. (2010) :** Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk – review. International Dairy Journal xxx. P. 1-11.

**ALEXANDERY. PROSEKOV O. BABICH S. MILENTEVA I. (2017) :** Development of recombinant peptide technology with antimicrobial properties of a broad action spectrum. *Science Evolution*, 2(2), 4-15.

**ALLOUCHE F. N. HELLAL A. LARABA A. (2010) :** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. Nature et Technologie.

**ALLOUI-LOMBARKIA O. LACHKHAB S. YUCEF L. (2002) :** Influence de taux de réfrigération sur la qualité bactériologique et biochimique du lait ; département agronomie, faculté des sciences, Université de Batna Aust. J. Dairy Techn.

**AMMOR S. TAVERON G. DUFOUR E. CHEVALLIER I. (2006) :** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility.

**ARBIA TA. CHIHEB A.E. (2018) :** Caractérisation physico-chimique, bactériologique et authentification du lait camelin collecté dans la région de Oued Souf au Sud Est Algérien.



Mémoire de magister en science alimentaires option Production et Transformation Laitières. Université 8 Mai 1945 Guelma.

**AXELSSON L.T. CHUNG T.C. DOBROGOSZ W.J. LINDGREN S.E. (1989) :** Production Of A Broad Spectrum Antimicrobial Substance By *Lactobacillus Reuteri*. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 2:131-136.

**BAATOUT A, (2019).** Exploitation des potentialités technologiques des bactéries lactiques isolées à partir du lait camelin. Mémoire de master académique en biochimie appliquée. UNIVERSITE ECHAHID HAMMA LAKHDAR D'EL-OUED.

**BATTAH A. BOUHAMDANI K. (2017) :** Isolement et essais d'identification de quelques bactéries lactiques à partir d'un fromage artisanal, mémoire master en microbiologie alimentaire santé, université de Bejaïa.

**BAHOBAIL A.S. ALI A.A. ALYAN A.A. (2014) :** Effect of Fermentation Process on the Improvement of Nutrition Value of Camel Milk. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research* 2(1): 78–82.

**BALIARADA A. (2003) :** Évaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactococcus* et *Lactobacillus* approches physiologiques et génétique. Thèse de doctorat en sciences des aliments et Nutrition. Université bordeaux 1

**BAREFOOT S.F. ET KLAENHAMMER T.R. (1983) :** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *App. Env. Microbiol.*

**BAUER R. & DICKS L.M.T. (2005) :** Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol.*

**BEDJAOUI N. KERIREM K. (2016) :** Composition biochimique et caractérisation physicochimique et microbiologique du lait cru de chamelle et de vache. Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, 9.

**BEKHOUCHE F. (2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. These de doctorat d'état en MICROBIOLOGIE et ENZYMOLOGIE Option : GENIE ALIMENTAIRE. Université de mentouri Constantine. Institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro- alimentaires.

**BEKHOUCHE F. BOULAHROUF A. (2005) :** Etude Quantitative Et Qualitative Des Bactéries Lactiques De Lait Cru Produits Par Des Vaches Locales Appartenant A Six Stations D'élevage De Constantine. Science &Technologie. Vol. 23, Pp. 38-45.

**BELARBI F. (2011) :** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes, Magistère : Microbiologie alimentaire et industrielle, Faculté des sciences, université d'Oran.

**BELKHEIR K. (2017) :** Caractérisation technologique de nouvelles souches de bactéries lactiques isolées du lait de chamelle d'Algérie. Réalisation de ferments lactiques, these doctorat biotechnologie génie microbiologique, l'Université d'Oran.

**BELLAL I. (2018).** L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle vis-à-vis les souches pathogènes. Mémoire de master en microbiologie appliquée. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.

**BEN OMAR N. ABRIOUEL H. LUCAS R. MARTINEZ-CANAMERO M. GUYOT J. P. GALVEZ A. (2006) :** Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saagla, a traditional fermented gruel from Burkina Faso. *Int. J. Food Microbiol.*

**BENGUELLA N. (2015) :** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques isolées du lait de chamelle, mémoire de master en agronomie, université de Tlemcen.

**BENHAMOUCHE N. TALHI M. KIHAL M. (2012) :** Selection of lactic acid bacteria producing antimicrobial strain such the genus lactococcus isolated from Algerian raw goat's milk. *Inter J of Nut and F Scie* . 1(1) : 23-32.

**BENKERROUM N. MEKKAOUI M. BENNANI N. HIDANE K. (2004) :** Antimicrobial activity of camel's milk against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Inter Jof Dairy Techn* .57 :39-43.

**BEENKERROUM N. TAMIME, A.Y. (2004) :** Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol.*

**BENNAI T. TEMINE S. (2017) :** Isolement de souches de *lactobacilles* performantes, mémoire master en microbiologie alimentaire santé, université de Bejaïa.

**BERRADIA A, (2016).** Isolement, purification et identification des bactéries lactiques à partir de lait cru de chèvre. Mémoire de master en microbiologie fondamentale et appliquée. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.

- BHARTI V. MEHTA A. SINGH S. JAIN N. AHIRWAL I. MEHTA S. (2015) :** Bacteriocin: Anovel approach for preservation of food. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
- BLOM, H. MORTVEDT C. (1991) :** Anti-microbial substances produced by food associated micro-organisms, journal article [portlandpress.com](http://portlandpress.com).
- BOUADJAIB S. (2013).** Etude physico chimique du produit laitier traditionnel du Sud algérien «Jben» recherche du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques. Mémoire Master. Université de Tlemcen. P 80.
- BOUBEKRI K. OHTA Y. (1996) :** Identification of lactic acid bacteria from Algerian traditional cheese, el-klila. *Journal of Science and Food Agriculture*, **70**: 501-505.
- BOUDERSA W. NEKKA R. (2017) :** Étude de l'activité antibactérienne de bactéries lactiques isolés à partir d'un produit laitier fermenté: le yaourt brassé, master en microbiologie, Université de Constantine.
- BOUDJENAH-HAROUN S. (2012) :** Aptitudes à la transformation du lait de chamelle en Produits dérivés : effet des enzymes coagulantes extraites de caillettes de dromadaires, Thèse doctorat en Biochimie, université de tizi ousou, a tizi ousou.
- BOUGUERRA A. (2012) :** Caractérisation des bactéries lactiques du lait de chamelle, MAGISTER En Microbiologie, UNIVERSITE de SETIF.
- BOUSSOUAR N. (2017) :** Caractérisation technologique et sanitaire des enterocoques isolés à partir de lait de chamelle du SUD-OUEST ALGERIEN. These de doctorat en Microbiologie. Université de Tlemcen.
- CARR F.J. CHILL D. MAIDA N. (2002) :** The Lactic Acid Bacteria: A Liter Survey. *Crit Rev in Microb*.
- CENATIEMPO Y. BERJEAUD J.M. BIET F. FREMAUX C. (1996) :** Bactériocines de bactéries lactiques : données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques, *Le Lait*.
- CHARLIER C. CRETENET M. EVEN S. LE LOIR Y. (2009) :** Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *International journal of food microbiology*.
- CHATTERJEE C. PAUL M. XIE L. et VAN DER DONK W.A. (2005) :** Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev*, 105: 633-684.

**CINTAS L.M. CASAUS M.P. HERRANZ C. NES I.F. HERNANDEZ P.E. (2001) :** Review: bacteriocins of lactic acid bacteria Int. J. Food Sci. Technol.

**DE ROISSART H.B. LUQUET F.M. (1994) :** Bactéries lactiques, I, II. Lorica Chemin saint Georges, F-38410 France.

**DE VUYST L. LEROY F. (2007) :** Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.

**DELLAGLIO F. DE ROISSART H. TORRIANI S. CURK M.C. JANSSENS D. (1994) :** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. DeRoissart, H. et Luquet, F. M., Lorica Uriage, France.

**DIARRA M.S. PETITCLERC D. LACASSE P. (2002) :** Effect of lactoferrin in combination with Penicillin on the Morphology and the Physiology of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis. J. of Dairy Sci. 85, 1141-1149.

**DJIODA T. (20 10) :** Amélioration de la conservation de la mangue 4<sup>ème</sup> gamme par application de traitement thermiques et utilisation d'une conservation sous atmosphère modifiée, Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur de l'université d'Avignon et des pays de Vaucluse, Spécialité science agronomiques. Montpellier, université d'Avignon.

**DORTU C. THONART P. (2009) :** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc.*

**DROUAULT S. CORTHIER G. (2001) :** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. Vet. Res., 32 :101 -117.

**DUPIN H. DUPIN H. CUQ J.L. MALEWIAK M.I. LEYNAUD-ROUAUD C. BERTHIER A.M. (1992) :** Alimentation et nutrition humaines. Paris : ESF éditeur. pp 1533

**EBERLEIN V. (2007) :** Hygienic status of camel milk in Dubai (United Arab Emirates) under two different milking management systems. Thesis of doctora in Veterinary Medicine, the Veterinary Faculty Ludwig-Maximilians München University.

**EI AGAMY E.I. RUPPANNER R. ISMAIL A. CHAMPAGNE C.P. ASSAF R. (1996) :** Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme and immunoglobulins from camel's milk. Int. Dairy J., 6, 129-145.

**EL-AGAMY E. (2006) :** Camel milk. In: Park YW et Haenlein GF (Eds), Handbook of

milk of non-bovine mammals. pp 297-344. Blackwell Publishing, Iowa, USA.

**FAO. (1995) :** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO: Alimentation et nutrition. Rome. N°28 ISBN 92-5-203534-6.

**FARAH Z. ATKINS D. (1992) :** Heat coagulation of camelmilk. Journal of Dairy Research, 59, 229 - 231.

**FARAH Z. RÜEGG M.W. (1989) :** The size distribution of casein micelles in camel milk. Food microstructure, 8: 211-216.

**FLEMING H.P. ETCHELLS J.L. COSTILOW R.N. (1975) :** Microbiol Inhibition by an Isolate of pediococcus from ucumber Brines. Applied Microbiology.

**GAFNER J-L. (2012) :** La qualité microbiologique des aliments pour animaux, Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, 1725 Posieux.

**GALVEZ A. ABRIOUEL H. BEN OMAR N. LUCAS R. (2011) :** Food Applications and Regulation In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp 253-390.

**GHALEMRAHA. (2015) :** Etude des caractéristiques physico-chimiques, Biochimiques du lait camelin pasteurisé, en comparaison avec le lait camelin cru. Université Abou Baker Belkaid-Tlemcen.

**GHENNAM .E.H. ALLOUI .L.O. GHENNAM .A. (2007) :** Evolution de quelques grands camélidés (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius* et hybrides) au Kazakhstan.

**GUEDDA Z et Ben KHELIFA B. (2017) :** L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées à partir de différents types de lait. Mémoire de Master Académique en biochimie. Université echahid Hamma Lakhdar el-oued.

**GUIRAUD JP. (2003) :** Microbiologie Alimentaire. Edition : Dunod, Paris, 652p.

**GUIRAUD P J. PHILIPPE. ROSEC. J. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Édition : saint-denis la plaine AFNOR DL 2004 93-saint-denis la plaine Impr. Par AFNOR.

**H. DIB E. HAJJ SEMAAN R. MRAD J. AYOUB L. CHOURIRY H. MOUSSA G. Bitar (2010) :** Identification et évaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans

des fromages caprins traditionnels. Faculté d'agronomie, Université libanaise, Dekwaneh, Liban.

**HADDADIN M.S.Y. GAMMOH S.I. ROBINSON R.K. (2008) :** Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan. *Journal of Dairy Research* 75 (1), p. 8-12.

**HADEF S. (2012) :** Évaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de Magister de microbiologie appliquée. Université Kasdi Merbah-Ouargla, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. 135p.

**HAMAR H, (2018).** Potentialité technologique des lactocoques isolés du lait cru de chèvre. Mémoire de magister en microbiologie appliquée. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.

**HAMMI I. (2016) :** Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français, Thèse doctorat microbiologie Microbiologie - biologie moléculaire, l'Université de Strasbourg, France.

**HANSAL N. (2015) :** Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de *Leuconostoc mesenteroides* isolé à partir du lait cru de chèvre et de chamelle. Thèse magister microbiologiste non publiée, Université d'Oran, Oran.

**HASAN A. AZHAR M. LUBNA M.I.E. (2015) :** Effect of lactic acid producing bacteria on some potential pathogens in sausages, Assiut vet, med.

**HASSAN A.H. HAGRASS A.I. SORYAL K.A. & EL-SHABRAWY S.A. (1987) :** Physicochemical properties of camel milk during lactation period in Egypt. *Egyptian Journal of Food Science* 15, 1–14.

**HASSAN A.N. FRANK J.F. (2001) :** Starter Cultures and their use. In: *Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.

**HOGG T. (2005) :** *Essential microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd. 188-190.

**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 Nutri.* 73: 3655-3735.

**HOLZAPFEL, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. et Schillinger, U (2000).** Taxonomy and important feature of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutri* . 73: 3655-3735.

**Idder,Z .(2014) :** Etude du pouvoir acidifiant des bactéries lactiques appartenant au genre *Leuconostoc*. Mémoire de master en microbiologie. Université abobaker belkaid Tlemcen.

**JASNIEWSKI J. (2008) :** Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous-classe IIa. Thèse de Doctorat. Laboratoire de Science et Génie Alimentaires. Nancy, 9-55.

**JOFFIN J. N. LEYRAL G. (2006) :** Microbiologie technique, centre régional de documentations pédagogique (CRDP) d'Aquitaine. Bordeaux.

**KHASKHELI M. AEAIN MA. CHAUDHRY S. SOOMRO AH. QURESHI TA. (2005) :** Physico-chemical quality of camel milk. *J Agri Soc Sci* 1: 164-166.

**KHEMARIYA P. SINGH S. JAISWAL N. CHAURASIA SNS. (2016) :** Isolation and identification of *L. plantarum* from vegetable samples. *Food Biotechnol* 30, 49-62.

**KIHAL M. PREVOST H. LHOTTE ME. HUANG DQ. DIVIES C. (1996) :** Instability of plasmid- encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *J. Appl. Microbiol*

**KLAENHAMMER T.R. (1988) :** Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337–349.

**KLAENHAMMER T.R. (1993) -** Genetics Of Bacteriocins Produced By Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12(1-3), 39-85.

**KLAENHAMMER T.R. FREMAUX C. HECHARD Y. (1994) :** activité antimicrobienne des bactéries lactiques in bactéries lactiques. De ROISSART h. LUQUET F.M.

**KONUSPAYEVA G. (2007) :** Variabilité physico-chimique et biochimique du lait des grands camélidés (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius* et hybrides) au Kazakhstan. Thèse de doctorat en science des aliments. Université de Montpellier II, France.

**KONUSPAYEVA G. FAYE B. LOISEAU G. LEVIEUX D. (2007) :** Lactoferrin and immunoglobulin contents in camel's milk (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius*, and Hybrids) from Kazakhstan. *Journal of Dairy Science* 90 : 38-46.

**KÖNIG H. et FRÖHLICH J. (2009) :** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. SpringerVerlag, Berlin Heidelberg.

- LABIOUI H. LAAROUSSI E.M. El yachoui M. Ouhssine M. (2005) :** Sélection de souche des Bactéries lactiques antibactérienne, *Bull. Soc Pharm, Bordeaux, France.*
- LABIOUI H. ELMOUALDI L. BENZAKOUR A. EI YACHIOUI M. BERNY E. OUHSSINE M. (2009) :** Etude physicochimique et microbiologique de laits crus. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 148 : 7-16.*
- LANCIOTTI R. PATRIGNANI F. BAGNOLINI F. GUERZONI M. E. et GARDINI F. (2003) :** Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology, 20: 537-543.*
- LARPENT J.P., (1997).** *Microbiologie alimentaire, techniques de laboratoire.* Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris.
- LÉONARD L. (2013) :** Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique, Thèse : Sciences de l'Alimentation, Université de Bourgogne, France.
- LEVEAU J.Y, BOUIX (1993) :** *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel.* Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 612p.
- LEVEAU J-Y. BOUIXMRIELLE. De ROISSART H. (1991) :** La flore lactique In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire.* Bourgeois C.M., Leveau J-Y. Tec & Doc, Lavoisier.
- LORE T.A. MBUGUA S. K. WANGO J. (2005) :** Enumeration and identification of microflora in suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *Lebensm.-Wissenschaft undTechnology.*
- Lü X. YI 1 L DANG J. DANG Y. LIU B. (2014) :** Purification of novel bacteriocin produced by *Lactobacillus coryniformis* MXJ 32 for inhibiting bacterial foodborne pathogens including antibiotic-resistant microorganisms, *journal of the European Federation of Food Science and Technology.*
- MAHA ALAOU I. JAMILA Gu. ABED H. BOUCHTA S. MOHAMED Z. (2016) :** Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *the international journal of multi-disciplinary sciences.*
- MAKHILOUFI K.M. (2012) :** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biochimie. France, 33.



**MAMECHE-DOUMANDJI A. (2008) :** Purification et caractérisation de bactériocine produite par des bactéries lactiques autochtones isolées, thèse : sciences alimentaires, institut national agronomique, Algérie,

**MAMI A, HAMED AMINE R, HENNI J.E, KERFOUF A et KIHAL M, (2010) :** Activité Anti-Bactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis à vis de *Staphylococcus aureus*. LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE- 2010, Volume 5, N°21.

**MAMI A. (2013) :** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines a large spectre d'action vis-a-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algerie, Thèse : Microbiologie appliquée, université d'Oran, Algérie, p25.

**MAYEUX J. SANDINE W. ELLIKER P. (1962) :** A sélective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures. J. Dairy Sci.

**MEHAIA M A. HABLAS M A. ABDEL-RAHMAN K M . ELMOUGY SA. (1995) :** Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in SaudiArabia. Food Chem., 52, 115-122, cité par siboukeur (2007).

**MEHAIA M.A. (1995) :** The fat globule size distribution in camel, goat, ewe and cow milk. *Milchwissenschaft*, 50, 260-263.

**MEILOUD G.M. OULD BOURAYA I.N. SAMB A. HOUMEIDA A. (2011) :** Composition of Mauritanian camel milk: results of first study. Int. J. Agric. Biol. 13 (1): 145-147.

**MOSTEFAOUIA. HAKEM A. YABRIR B. BOUTAIBA S. BADIS A. (2015) :** Evaluation of biofilm formation by exopolysaccharides-producer strains of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Algerian camel milk. Emerates Journal of Food and agriculture.

**NAIR P.S SURENDRAN P.K. (2005) :** Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. Division of Microbiology, Fermentation and Biotechnology, Central Institute of Fisheries Technology, Matsyapuri. P. O. Kochi, Kerala- 682 029, India. Journal of culture collections. p 48-25.

**NES I. F. S.S YOONL. D.B DIEP. (2007) :** Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria, *Review Food Sci Biotechnol* 16, 675-690.

- O'CONNOR P.M. al. (2015):** Nisin H Is a New Nisin Variant Produced by the Gut-Derived Strain *Streptococcus hyointestinalis* DPC6484, *Appl Environ Microbiol* 81, 3953-3960.
- OMAR A.A. & HAMAD A.A. (2010).** Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal* 20. pp : 811-821.
- OMAR HASSAINE. (2013) :** caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien.
- OMER R.H. ELTINAY A.H. (2009) :** Changes in chemical composition of camel's raw milk during storage. *Pakistan Journal of Nutrition*. 8(5): 607-610.
- ONDA T. YANAGIDA F. TSUJI M. SHINOHARA T. YOKOTSUKA K. (2003) :** Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. *Int. J. Food Microbiol*.
- PAPA ABDOULAYE FALL. (2011) :** Études des interactions entre une bactérie bioprotectrice, *Lactococcus piscium* CNCM I-4031, et *Brochothrix thermosphacta* et *Listeria monocytogenes* dans la crevette tropicale ». Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ DE NANTES 239-246
- PARADA J.L. CARON C.R. BIANCHI P.A. RICARDO SOCCOL M. et RICARDO SOCCOL C. (2007) :** Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification and use as Biopreservatives. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 50(3): 521-542.
- PATIL M.M. PAL A. ANAND. RAMANA K.V. (2009) :** Isolation and caractérisation of lactic acid bacteria from curd and cucumber. *Ind. J of biotech*. 9:166-172.
- PIPER C HILL C. P D COTTER P D. ROSS R.P. (2011) :** Bioengineering of a Nisin A-producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z, *Microb Biotechnol* 4 375–382.
- POLAK-BERECKA M. WASKO A. KOSTON D. (2009) :** Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *Annales Universitatis Mariae Curie – Sklodowska Lublin–Polonia*.
- PRINGSULAKA O. THONGAM N. SUWANNASAIN. ATTHAKOR KOR W. POTHIVEJKUL K. RANGSIRUJI A. (2011) :** Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control*, 23: 547-551.

**RAHLI F. (2015) :** Valorisation du lait de chamelle par exploitation des potentialités technologies des bactéries lactiques isolées localement .Thèse doctorat contrôle microbiologique non publiée, Université d'Oran, Oran.

**RAHMEH R. HUSAM A. ABRA A. JIWAN S. (2019) :** Composition and Properties of Camel Milk. Milk Production, Processing and Marketing.

**RAMET J.P. (1993) :** La technologie des fromages au lait de dromadaire (*Camelus dromedarius*). Etude F.A.O., Production et santé animales, 113.

**RENAULT P. (2002) :** Genetically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment. Bioch 84.

**RODRIGUEZ M. C. A. FROGER J. P. ROLLAND D. THOMAS J. AGUERO C. DELAMARCHE. J. M. GARCIA-LOBO. (2000) :** A functional water channel protein in the pathogenic bacterium *Brucella abortus*. Microbiology.

**RUIZ-BARBA J. L. CABALLERO-GUERRERO B. MALDONADO-BARRAGAN A. JIMÉNEZ-DIAZ R. (2010) :** Coculture with specific bacteria enhances survival of *Lactobacillus plantarum* NC8, an autoinducerregulated bacteriocin producer, in olive fermentations. *Food Microbio*.

**Saidi N, Guessas B, Bensalah F, Badis A, Hadadji M, Henni D.E,Provest H et Kihal M,(2002).** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides d'algerie. Journal algérien des régions arides. N°01 juin 2002.

**SALMINEN S. WRIGHT A. V. OOWEHAND A. (2004) :** Lactic acid bacteria microbiological and functional Aspects. Marcel Dekker, Inc., U.S.A.

**SAWAYA W. N. KHALIL J. K. AL-SHALHAT A. and AL-MOHAMMAD H. (1984):** Chemical composition and nutritional quality of camelmilk. Journal of Food Science, 49, 744- 747. Cité par (BEDJAOUI et KERIREM, 2016).

**SBOUI A. ARROUM S. HAYEK N. MEKRAZI H. Khorchani T. (2015) :** Etude comparative de l'effet de la pasteurisation et de l'ébullition sur la composition physicochimique des laits camelin et bovin. Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology, JS-INAT. 18: 943-947.

**SBOUI A. DJEGHAM M. BELHADJ O. KHORCHANI T. (2016) :** Le lait de chamelle: qualités nutritives et effet sur les variations de la glycémie. Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 115. p 487- 492.

- SBoui A. KHORCHANI T. DJEGHAM M. BELHADJ O. (2009) :** Comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du Sud tunisien; variation du pH et de l'acidité à différentes températures. *Afrique Science* 05(2): 293 – 304.
- SIBOUKEUR A. (2011) :** Etude de l'activité antibactérienne des bactériocines (type nisine) produites par *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, isolée à partir du lait camelin. Mémoire de Magister en Biologie. Université de Kasdi Merbah. Ouargla, 15.
- SIBOUKEUR O .K. (2007) :** Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques aptitudes à la coagulation.thèse de doctorat en Sciences Agronomiques université INA EL Harrach-Alger.
- SIBOUKEUR O. (2011) :** Potentiel nutritif du lait collecté localement à partir de chamelle « Population Sahraoui » : un atout pour la sécurité alimentaire de la population locale. « L'effet du Changement Climatique sur l'élevage et la gestion durable des parcours dans les zones arides et semi-arides du Maghreb » Université KASDI MERBAH - Ouargla- Algérie, du 21 au 24 Novembre 2011. 66–74.
- SMAOUI S. (2010) :** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat. Génie de procédés et environnement. Toulouse, 47.
- SOLTANA Z. (2017) :** Isolement et identification des lactocoques isolés à partir du lait cru de chamelle. Mémoire de master en Exploitation des Ecosystèmes microbiens laitiers. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.
- SOUID W. (2011) :** Effet des bactériocines (type nisine) produites par une souche lactique isolée a partir du fromage camelin, sur une souche psychrotrophe. Université Kasdi Merbah- Ouargla, 4-6, 8, 52.
- TABAK S. BENSOLTANE A. (2012) :** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. Laboratoire de microbiologie alimentaire et industrielle, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université d'Oran 31100. Algérie.
- TAGG J.R. MC GIVEN A.R. (1971) :** Assay system for bacteriocins, *J appl microbiol*, 21 : 943-949.

**TEUBER M. GEIS A. (2006) :** The Genus Lactococcus. Prokaryotes 4: 205-228 Twomey D., Ryan M., Meaney B., Hill C., 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. Antonie van Leeuwenhoek.

**THAPA N. PAL J. TAMANG J. P. (2006) :** Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. International Journal of Food Microbiology, 107: 33-38.

Thèse de doctorat en science des aliments. Université de Montpellier II, France.

**VIGNOLA C. L. (2002) :** Science et technologie du lait. Ed. Ecole polytechnique de Montréal. Canada.

**VOLLENWEIDER S. (2004) :** 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. Appl. Microbiol. Biotech. 64, 16-27

**WANGO J. FARAH Z. PUHAN Z. (1998 b) :** Composition of Milk from 3 Camels (*Camelus dromedarius*) Breeds in Kenya during Lactation. *Milchwissenschaft*, **53**, 136-139.

**WESCOMBE, P.A, et al. (2006):** Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral streptococci and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva, *Appl Environ Microb* 72, 1459-1466.

**YAGIL R. ETZION Z. (1980) :**Effect of drought conditions on the quality of camelmilk. J. Dairy. Res., 47, 159-166.

**YAGIL R. ZAGORSKI O. VAN CREVELD C. (1994) :** Science and Camel's Milk Production. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26- octobre, Nouakchott, Mauritanie.

**YILDIRIM Z. YILDIRIM M. (2001) :** Characterization of buchnericin Ib produced by *Lactobacillus buchneri* LB. Turkish Journal of Biology. 25: 73-82.

**ZADI KARAM H. KARAM N. E. (2006) :** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie : mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicultura*, 24 (3):153- 156.

**ZAROOR K. BENMECHERNE Z. HADADJI M. MOUSSA-BOUDJEMAA B. HENNI D. J. KIHAL M. (2012) :** Bioprospecting of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from Algerian raw camel and goat milk for technological properties useful as adjunct starters. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(13), pp. 3192-3201, 9.

## Références bibliographiques

---

# Annexe

# Annexe

---

## Annexe 1 : Appareillage

Bec Bunsen / Microscope optique / Bain Marie / Four pasteur/ Autoclave / Agitateur / Etuve / Réfrigérateur / Balance de paillasse /Micropipettes.

Pipettes Pasteur / Flacons en verre / Tubes à essais en verre / Pipettes graduées (1ml, 0,1ml) / Boîtes de pétri / Bêchers / Anse de platine / Baro magnétique.

## Annexe 2 : Composition des diluants (g/l)

### • Eau physiologique peptonée

Peptone	1g
Chlorure de sodium	8,5g
Eau distillée	1000 ml

### • Eau physiologie 9 /ml:

NaCl	9g
Eau distillée	1000 ml

## Annexe 3 : Composition des milieux de cultures (g/l)

### ➤ Milieux solides

#### • Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	5g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Glucose	20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g
MgSO <sub>4</sub>	.0.1g
MnSO <sub>4</sub> .	0.05 g
Agar	12g
Tween80	1 ml
Eau distillée	1000 ml
pH=6.5±0.2 à 37°C	Autoclavage : 121°C /15min.
MRS semi solide : agar	7g

#### • Milieu M-17

Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5g
Peptone de caséine	2, 5g



## Annexe

---

Peptone de viande	2, 5g
Peptone de soja	5g
Peptone de soja	5g
Acide ascorbique	0, 5g
B-glycérophosphate de sodium	19g
Agar	. 12, 75g
Sulfate de magnésium	0.25g
Eau distillée	1000 ml
pH=7.1±0.2 à 37°C	Autoclavage : 121°C pendant 15min.

- **Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)**

Tryptone	20 g
Gélatine	2.5 g
Extrait de levure	5 g
Saccharose	100 g
Glucose	5 g
Citrate de sodium	1 g
Azide de sodium	0.075 g
Agar-Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH 6,8	Autoclavage 120°C/ 20 minute

- **Milieu KMK (Kempler et Mc Kay, 1980)**

Extrait de levure	3 g
Biopolytone	2,5g
Glucose	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH 6.6	

- **Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)**

Extrait de levure	2,5 g
Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Acide ascorbique	0,5 g
Lactose	2 g
L-arginine	4 g
Pourpre de Bromocrésol	0,05 g
Agar-Agar	15 g

## Annexe

---

Eau distillée 1000 ml  
pH 6,8 Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

- **Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)**

Infusion de viande de bœuf 3000 cm<sup>3</sup>  
Peptone de caséine 17,5 g  
Amidon de maïs 1,5 g  
Agar-agar 17 g  
pH 7.4 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

- **Gélose nutritive**

Extrait de viande 1 g  
Extrait de levure 2 g  
Peptone 5 g  
Chlorure de sodium 5 g  
Agar-agar 15 g  
Eau distillée 1000 ml  
pH 7,4 Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

➤ **Milieux liquides**

- **Milieu MRS BCP**

MRS (milieu liquide) moins l'extrait de viande et sans sucre 1000 ml  
Bromocrésol pourpre 0,025 mg  
pH 7.0 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

- **Bouillon nutritif**

Extrait de viande 1 g  
Extrait de levure 2 g  
Peptone 5 g  
Chlorure de sodium 5 g  
Eau distillée 1000 ml  
pH 7,4 Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

## Annexe

---

### Annexe 4 : Coloration de Gram

. La coloration de Gram a été réalisée selon le protocole suivant :

- Réaliser un frottis bactérien et le fixer.
- Colorer au violet de gentiane phénol durant environ 1 minute.
- Laver à l'eau distillée (ou à l'eau de robinet).
- Faire agir la solution de lugol durant environ 30 secondes.
- Laver à l'eau distillée (ou à l'eau de robinet).
- Faire agir l'éthanol à 0.95 durant 10 secondes ou faire couler l'éthanol sur la lame jusqu'à la décoloration.
- Laver à l'eau distillée (ou à l'eau de robinet).
- Colorer à la fuchsine phénolé quelques secondes à 1 minute selon sa concentration.
- Laver à l'eau distillée (ou à l'eau de robinet).
- Observer après séchage à l'immersion (objectif  $\times 100$ ) et à pleine lumière.