

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de RELIZANE

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences Biologiques



En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en :
Microbiologie et contrôle de qualité
Intitulé

**Caractérisation de quelques activités d'intérêt
technologique chez des souches de bactéries lactiques**

Présenté par :

Mlle : BAHRI CHAIMAA

Mlle : BELKHODDAM KELTOUM

Mlle : MEDJADJI AICHA

Devant les membres de jury :

Président : Mr REGUIEG YSSAAD Athman

Encadreur : Mlle GHALOUNI ESSMA

Examineur : Mme BELHAMRA ZINEB

Maître de conférence (A) (U. Relizane)

Maître de conférence (B) (U. Relizane)

Maître de conférence (B) (U. Relizane)

Année universitaire : 2023/2024

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude :

*A notre promotrice **Mme GHALOUNI**, pour l'honneur qu'elle nous a fait de nous encadrer, pour ses multiples et sincères efforts, ces observations enrichissantes ainsi que pour ses conseils, ses orientations et son soutien tout au long de ce mémoire. On lui dit merci pour tous les moments qu'on a passé avec vous, ils sont gravés à jamais.*

Nos plus vifs remerciements vont aussi aux membres du jury :

***Mr REGUIEG** Un grand merci monsieur de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury et de juger notre travail. On vous présente nos respects les plus profonds.*

***Mme BELHAMRA**, nos sincère remerciement à vous d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et de contribuer à améliorer sa qualité. On vous présente nos respects les plus profonds.*

Nous adressons également nos remerciements à tous les enseignants qui ont contribués à notre formation de la première année à ce jour.

Nos remerciements vont également au personnel de laboratoire de microbiologie

Mme Boudéfir .M, Mme Draï. S, Boutmra. F, Kabel .M et Mr Benabdallah. Y

A vous tous, un grand Merci !

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail réalisé grâce à Allah le tout-puissant.

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, ma vie et mon bonheur que Dieu lui donne la santé et la vie, Aucune dédicace ne saura exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai pour toi, mon cher père **Bachir***

*A la femme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et la source de joie et de bonheur, la flamme de mon cœur, celle qui s'est toujours sacrifiée pour me voir réussir, que Dieu la garde pour moi, ma chère mère **Halima***

A mes très chères sœurs et leurs enfants

Souhila, Linda, Asmaa, Saïda

*Au mari de ma sœur **Ibrahim***

*Mes chères amies **Bohra, Keltoum, Fatima, Aïcha**, pour tous les bons moments que nous avons partagés.*

*Mes chères partenaires **Keltoum** et **Aïcha**, on a formé un trinôme formidable, je suis très contente de notre amitié, je vous adore.*

Chaïmaa

Dédicace

*Je ne saurais commencer sans pour autant remercier tout d'abord
Allah, le tout puissant de m'avoir accordé la paix, la santé et le
courage de continuer mes études, et arriver à cette étape.*

*A ma plus belle étoile qui puisse exister dans l'univers ma mère
Halima et mon père Mhamed et surtout ma grand-mère Aïcha qui
m'a tant encouragé.*

A mes chère sœurs et frère

Karima. Hakima. Houria. Nabawiya. Ibrahim. Abdelkader

A ma famille sans exception

À mon trînomme

keltoum. Chaïmaa

A toutes mes amies

Imen, Halima, Fatima Zohra, Hayet

Aïcha

Dédicace

Avec l'aide de Dieu

J'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À :

Ce travail n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limites de mes chers parents qui ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Que Dieu leurs accorde Une longue vie

*A mon cher Papa **Mohamed** pour ses précieux conseils et encouragements. Aucune dédicace ne saura exprimée l'amour, l'estime et le respect que j'ai pour toi.*

*L'étoile de ma vie Ma mère **Howaria** qui m'a entouré d'amour, d'affection et qui fait tout pour ma réussite, Qu'Allah l'a guérie et la garde.*

*À mon cher frère **Mokhtar**, qui est un soutien indéfectible quel que soit la situation.*

*À mon très cher Mari **Hafid**, sans qui rien n'aurait été possible, qui a toujours été là pour moi et qui m'a toujours soutenue et encouragée dans les décisions que j'ai prises. Merci pour ta patience je t'en serai éternellement reconnaissante.*

*À mes grands-parents **Sebaa Djilali** et **Abd EL Kader** merci pour votre soutien, j'espère que vous êtes fier de moi*

*A mon ange **Soumia***

*À ma tante **AICHA** et **Rachida**, merci pour tous le soutiens, votre présence a changé ma vie pour le mieux.*

À toute ma famille sans exception

*À mes amies de toujours **Zoubida**, **Chaïma**, **Bohra**, **Fatima**, **aïcha**.*

Merci à tous ceux qui ont contribué à ma réussite.

Keltoum

Sommaire

Résumé	
Liste des abréviations.....	I
Listes des tableaux.....	III
Listes de figures	IV
Introduction	1
1. Synthèse bibliographique	2
1.1 Les bactéries lactiques	3
1.1.1 Généralités sur les bactéries lactiques.....	3
1.1.2 Habitat.....	3
1.1.3 Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques	3
1.1.3.1 Le genre <i>Lactobacillus</i>	3
1.1.3.2 Le genre <i>Lactococcus</i>	4
1.1.3.3 Le genre <i>Streptococcus</i>	4
1.1.3.4 Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	5
1.1.3.5 Le genre <i>Enterococcus</i>	5
1.1.3.6 Le genre <i>Bifidobacterium</i>	6
1.1.3.7 Le genre <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	6
1.1.4 Identification des bactéries lactiques	7
1.1.4.1 Caractères morphologies et structuraux	7
1.1.4.2 Caractères physiologiques et biochimiques	7
1.1.4.3 Caractères immunologiques	7
1.1.5 Culture des bactéries lactiques.....	8
1.1.6 Principales voies fermentaires	8
1.1.6.1 La voie homofermentaire	8
1.1.6.2 La voie hétérofermentaire	9
1.1.7 Métabolisme des bactéries lactique.....	9
1.1.7.1 La glycolyse	9
1.1.7.2 La lipolyse	10
1.1.7.3 La protéolyse	10
1.1.8 Exigences nutritionnelles	11
1.1.8.1 Exigences en acides aminés	11
1.1.8.2 Exigences en bases azotées	11

1.1.8.3 Exigences en sels minéraux.....	11
1.1.8.4 Exigences en cations	12
1.1.8.5 Exigences en vitamines	12
1.1.8.6 Exigences en glucides	12
1.1.9 Intérêt des bactéries lactiques	12
1.1.9.1 Dans l'industrie alimentaire	13
1.1.9.2 Dans le domaine thérapeutique	13
1.1.10 Applications des bactéries lactiques	13
1.1.10.1 Dans le secteur agronomique	14
1.1.10.2 Dans le domaine d'alimentaire.....	14
1.1.10.3 Dans le domaine de la santé	15
1.2 La croissance bactérienne.....	16
1.2.1 Description de la cinétique de croissance	16
1.3 Les activités technologiques des bactéries lactiques	18
1.3.1 L'activité acidifiante	18
1.3.2 L'activité protéolytique.....	18
1.3.3 Le pouvoir aromatisant	18
1.3.3.1 Le diacétyle	19
1.3.4 L'activité texturante	19
1.3.5 L'activité lipolytique.....	19
1.3.6 L'activité antimicrobienne	20
1.4 La résistance des bactéries lactiques aux antibiotiques	20
1.4.1 Les mécanismes biochimiques de résistance	21
1.4.1.1 Interférence avec le mécanisme de transport de type imperméabilité.....	21
1.4.1.2 Interférence avec le mécanisme de transport de type efflux	21
1.4.1.3 Inactivation ou détoxification enzymatique	21
1.4.1.4 Modification d'affinité de la cible	21
1.4.1.5 Substitution de la cible	21
1.4.2 Les mécanismes génétiques de résistance.....	22
1.4.2.1 Les mutations	22
1.4.2.2 L'acquisition d'ADN.....	22
2. Matériels et méthodes	23
2.1 L'objectif de l'étude	24

2.2 Lieu du travail.....	24
2.3 Origine des souches	24
2.4 Confirmation de la pureté des souches	25
2.4.1 Examen macroscopique	25
2.4.2 Examen microscopique	25
2.4.3 Test catalase	25
2.5 Conservation des souches	26
2.6 Evaluation de la croissance.....	26
2.7 Etude de l'activité acidifiante	26
2.8 Mesure du pH	27
2.9 Evaluation de la production du diacétyle.....	27
2.10 Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	27
3. Résultats et discussion.....	29
3.1 Confirmation de la pureté des souches	30
3.1.1. Examen macroscopique	30
3.1.3 Examen microscopique	30
3.1.3 Recherche de la catalase	31
3.2 Evaluation de la croissance bactérienne	31
3.3 Etude de l'activité acidifiante	32
3.4 Evaluation de la production du diacétyle.....	33
3.5 Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	34
Conclusion.....	37
Références bibliographiques	39
Annexe	50

Résumé

Les bactéries lactiques ont acquis une grande importance par leur présence dans l'industrie agro-alimentaire et ce depuis longtemps.

L'objectif de notre étude était d'évaluer quelques activités d'intérêt technologique notamment l'activité acidifiante et aromatisant, chez sept souches de bactéries lactiques appartenant au genre *Enterococcus* ainsi que leur cinétique de croissance lors de leur culture sur milieu lait ; une détermination de leur sensibilité vis-à-vis à quatre antibiotiques testés (Ampicilline, Érythromycine, Tétracycline et Ceftazidime) a été également étudiée.

Les résultats obtenus ont montré une croissance optimale des sept souches dans le lait ; un potentiel d'acidification qui varie selon la souche, en effet la quantité maximale d'acide lactique produite en fin de croissance (après 24h d'incubation) a pu atteindre 90°D. Les sept souches se sont révélées comme capables de produire le diacétyle et ont montré une sensibilité vis-à-vis des antibiotiques testés.

Mots clés : Bactéries lactiques, *Enterococcus*, croissance, activités technologiques, antibiotiques.

Abstract

Lactic acid bacteria have gained significant importance due to their presence in the agri-food industry for a long time. The objective of our study was to evaluate several technologically relevant activities, notably acidifying and flavoring activities, among seven strains of lactic acid bacteria belonging to the *Enterococcus* genus, as well as their growth kinetics when cultured in milk medium. Additionally, their sensitivity to four tested antibiotics (Ampicillin, Erythromycin, Tetracycline, and Ceftazidime) was determined. The obtained results showed an optimal growth of all seven strains in milk, with varying acidification potential depending on the strain. Indeed, the maximum quantity of lactic acid produced at the end of growth (after 24 hours of incubation) could reach 90 °D. The seven strains were found to be capable of producing diacetyl and exhibited sensitivity to the tested antibiotics.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Enterococcus*, growth, technological activities, antibiotics.

ملخص

اكتسبت بكتيريا حمض اللاكتيك أهمية كبيرة بفضل وجودها في الصناعات الغذائية وهذا منذ فترة طويلة.

كان هدف دراستنا تقييم عدة أنشطة تكنولوجية ذات أهمية بما في ذلك نشاط التخمض والنكهة، لسبع سلالات من البكتيريا اللاكتيكية التابعة لجنس *Enterococcus* ، بالإضافة إلى حركة نموها عند زراعتها في وسط الحليب. بالإضافة إلى ذلك تم تحديد حساسيتها تجاه أربع مضادات حيوية مختبرة (الأمبيسيلين، الإريثرومايسين، التتراسيكلين، والسيفتازيديم). أظهرت النتائج نموًا مثاليًا لجميع السبع سلالات في الحليب مع إمكانية التخميض المتفاوتة تبعًا للسلالة. في الواقع، يمكن أن تصل الكمية القصوى لحمض اللاكتيك المنتجة في نهاية النمو (بعد 24 ساعة من التحضير) إلى 90 درجة دورنيك وثبت أن السبع سلالات قادرة على إنتاج الدياسيتيل وأظهرت حساسية تجاه المضادات الحيوية المختبرة.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك، *Enterococcus*، نمو، الأنشطة التكنولوجية مضادات حيوية.

Liste des abréviations

% : pourcent

°C : degré Celsius

°D : Degré Dornic

µl : microlitre

ATP : adénosine tri phosphate

DO : Densité optique

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

EMP : Embden-Meyerhof, Parnas

EPS: Exopolysaccharides

g : Gramme

g/l : gramme par litre

G+C : Guanine + Cytosine

GRAS: Geneally Recognized As Safe.

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

h : heure

KOH : Hydroxyde de potassium

LAB : bactéries lactiques

Lb : *Lactobacillus*

Mg : magnésium

ml : milliliter

MRS: Man-Rogosa et Sharp

NaOH: Hydroxyde de sodium

nm : nanomètre

PBP : Pénicilline Binding Protéine

pH : potentiel d'hydrogène

PLP: Protéines de liaison aux pénicillines

sp : Espèce non précisée

ssp : Sous espèce

V : volume

t : temps

PTS : système phosphotransférase

NaCl : Chlorure de sodium

HNR : haut niveau de résistance

BNR : bas niveau de résistance

CO₂ : dioxyde de carbone

Listes des tableaux

Tableau 1 : Identification et codes des souches.....	24
Tableau 2 : les variations de DO à t_0 et t_{24}	31
Tableau 3 : Les variations de l'acidité ($^{\circ}$ D) et pH des souches	32
Tableau 4: Profils antibiorésistances des souches.....	35

Listes de figures

Figure 1 : Le genre <i>Lactobacillus</i>	4
Figure 2 : Le genre <i>Lactococcus</i>	4
Figure 3 : Le genre <i>Streptococcus</i>	5
Figure 4 : Le genre <i>Enterococcus</i>	6
Figure 5 : Le genre <i>Bifidobacterium</i>	6
Figure 6 : Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques.....	9
Figure 7 : Principales voies de la lipolyse.....	10
Figure 8 : Système protéolytique des bactéries lactiques	11
Figure 9 : Les différentes phases de croissance bactérienne en milieu liquide	16
Figure 10 : Principaux mécanismes de résistance intrinsèque et acquise aux antibiotiques...	22
Figure 11 : Aspect macroscopique des colonies des souches des LAB sur milieu MRS solide.....	30
Figure 12 : Exemple de l'aspect microscopique des cellules de la souche LBO2, LBO9 et LBR1 sous microscope optique au G10x100.	30
Figure 13 : Mise en évidence de la production du diacétyle par les souches	33
Figure 14 : Exemple de la sensibilité de la souche LB09 vis-à-vis des quatre ATB testés...	35

Introduction

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, en tant que starters dans les procédés de fermentations afin de répondre aux exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités et exempts de conservateurs chimiques. Leurs apports bénéfiques consistent en l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans altérer ni le goût ni l'odeur, et en augmentant leur durée de conservation.

Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009 ; Moraes et al, 2010**).

En industrie laitière, les souches de bactéries lactiques sont sélectionnées sur la base de leurs propriétés technologiques (production de l'acide lactique, production d'arome, activité protéolytique et cinétique de croissance), et leurs caractéristiques fonctionnelles (activité antibactérienne, résistance au passage gastro-intestinal et résistance aux antibiotiques). bien qu'il existe d'autres paramètres à prendre en considération (**Tamime, 2002 ; Molin, 2008**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude qui a pour objectif l'évaluation de la croissance et la caractérisation de quelques aptitudes technologiques notamment : l'acidification et l'aromatisation chez des souches de bactéries lactiques isolées à partir d'un lait fermenté de type « l'ben » de fabrication traditionnelle ; ces souches ont fait également l'objet d'une détermination de leurs sensibilités vis-à-vis aux antibiotiques.

1. Synthèse bibliographique

1.1 Les bactéries lactiques

1.1.1 Généralités sur les bactéries lactiques

On appelle bactéries lactiques des microorganismes assez hétérogènes sur les plans morphologie et physiologie qui se caractérisent par une production de quantités importantes d'acide lactique résultant du métabolisme des glucides (**Desmazeaud, 1983**).

Elles sont des cocci ou des bâtonnets à Gram positif, asporulantes, généralement immobiles, dépourvues de catalase et d'oxydase, aéro anaérobie facultatives et acidotolérantes. Toutefois, leurs caractéristiques peuvent être changées sous certaines conditions (**König et Fröhlich, 2009**).

Les LAB ont la réputation d'avoir des exigences nutritionnelles nombreuses et complexes rendant parfois leur culture fastidieuse en laboratoire. Elles ont en général une faible capacité de biosynthèse et de nombreuses auxotrophies ont été décrites en ce qui concerne les acides aminés, les vitamines, les bases puriques ou pyrimidiques et les cofacteurs (**Corrieu et Luquet, 2008**).

1.1.2 Habitat

Les bactéries lactiques sont très abondantes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, de végétaux. Exemple de la sensibilité de la souche LB09 vis-à-vis des quatre ATB testés. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux. Cela a conduit à la reconnaissance de leur statut comme GRAS (Generally Recognized As Safe) (**Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001 ; Hadaf, 2012**).

1.1.3 Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

1.1.3.1 Le genre *Lactobacillus*

Le genre principal de la famille des Lactobacillaceae est le genre *Lactobacillus*. Ce genre contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique et interviennent dans de nombreuses industries, notamment la production d'aliments fermentés. Les lactobacilles sont également souvent rencontrés comme contaminants. Ils sont caractérisés par les propriétés suivantes :

Bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, Immobiles, asporulés, Catalase négative, Optimum de température de développement situé entre 30 et 40°C, Exigences nutritionnelles complexes en acides aminés, vitamines, acides gras, nucléotides, glucides et minéraux (**Menad, 2018**).



Figure 1 : Le genre *Lactobacillus*

1.1.3.2 Le genre *Lactococcus*

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique, seul *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température de croissance est proche de 30°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines (**Tamime, 2002**).



Figure 2 : Le genre *Lactococcus*

1.1.3.3 Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogène comme *S. pyogenes* et *S. agalactiae* ; d'autre sont impliquées dans la formation de la plaque dentaire (*S.mutans*), ces espèces étant rarement rencontrées dans les aliments. *Streptococcus thermophilus* est la seule espèce de

streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et les produits laitiers) et son caractère non pathogène (fedrighi, 2005).



Figure 3 : Le genre *Streptococcus*

1.1.3.4 Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production de l'acide lactique.

Le genre *Leuconostoc* inclut des coccobacilles hétérofermentaires, produisant uniquement de l'acide lactique, et ne produisant pas d'ammoniac à partir de l'arginine. En général, les leuconostocs sont utiles dans différents types de fromages. Ils interviennent aussi dans l'industrie laitière (beurre et crème) principalement *Ln. Mesenteroides* et *ssp. Cremoris* (Negadi et al., 2017).

1.1.3.5 Le genre *Enterococcus*

Les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type α et β sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *Enterococcus Faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (Rakhis et al., 2016).



Figure 4 : Le genre *Enterococcus*

1.1.3.6 Le genre *Bifidobacterium*

Traditionnellement, le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu G+C supérieur à 50% et affecté au phylum des Actinobacteria.

Elles ont généralement un PH optimal de croissance autour de 6.5 à 7 et une température de croissance comprise entre 37°C et 41°C. Elles ont la forme irrégulière d'un V ou une morphologie bifide en forme de Y (figure 5). Elles sont hétérofermentaires et dégradent les hexoses en produisant de l'acide lactique et acétique (**Aibeche et al., 2020**).



Figure 5 : Le genre *Bifidobacterium*

1.1.3.7 Le genre *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le groupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapables d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sel très élevées, comme

Pediococcus halophilus, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (**Pilet et al., 2005**).

1.1.4 Identification des bactéries lactiques

1.1.4.1 Caractères morphologies et structuraux

- **La forme** : des cellules microbiennes représentent souvent un caractère distinctif de l'espèce et du genre bactérien (coques ou bâtonnes) (**Hamidi, 2017**).
- **Le diamètre cellulaire** : est un caractère plus stable que la longueur cellulaire.
- **La mobilité** : est une caractéristique rare chez les bactéries lactiques qui sont généralement non mobiles, sauf dans certains cas où elles possèdent des flagelles péritriches.
- **La sporulation** : toutes les bactéries lactiques sont des non sporulés.
- **L'analyse des composants cellulaires** est entrain de devenir un instrument essentiel non seulement pour la classification mais aussi pour l'identification des bactéries.
- **Les recherches chimio taxonomiques** : réalisées sur les bactéries ont contribué de façon fondamentale à expliquer les relations génétiques intra et inter spécifique.

1.1.4.2 Caractères physiologiques et biochimiques

Regroupent la quantité et la configuration de l'acide lactique produit, la température de croissance minimale, optimale et maximale, la tolérance de l'oxygène et au chlorure de sodium, la production de gaz et d'arômes, la production d'ammoniaque à partir de l'arginine, la capacité d'hydrolyse de l'esculine ou de résister aux sels biliaires et à différentes valeurs de pH (**Luquet et Roissard 1985**).

1.1.4.3 Caractères immunologiques

Les bactéries lactiques peuvent être sensibles à leurs propres substances de défense comme la bactériocine, elles se prémunissent à l'aide d'une protéine qualifiée « d'immunité ». C'est une lipoprotéine d'immunité codée par le gène LanI : Cette protéine s'attache à la surface externe de la membrane et interagit avec la bactériocine afin d'empêcher son insertion dans la membrane et ainsi former des pores. La structure de ces protéines est très variable (**Dortu, 2008**).

1.1.5 Culture des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont besoin d'un milieu riche en nutriments (sucres, acides aminés, acides gras, sels, vitamines), pauvre en oxygène (**Hertel, 2006**). Elles sont essentiellement cultivées sur milieu Man Rogosa Sharpe (MRS). Le MRS est un milieu riche qui fournit une variété de sources de carbone et d'azote telles que la peptone, le glucose et le Tween80, pour les bactéries difficiles à cultiver. Le Tween 80 était à l'origine utilisé comme émulsifiant dans la préparation des milieux avant d'être considéré comme une source de carbone pour les bactéries (**Kahina, 2012**).

1.1.6 Principales voies fermentaires

Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle. Hétérotrophes, elles tirent leur énergie de la fermentation de substrats carbonés. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylol) ou des disaccarides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose). La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (**Atlan et al., 2008**) :

- Le transport du sucre à travers la membrane cellulaire.
- Le catabolisme intracellulaire du sucre.
- Formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux. Selon le genre ou espèce, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres. Il s'agit des voies homofermentaire (Embden-Meyerhof Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (**Atlan et al., 2008**).

1.1.6.1 La voie homofermentaire

Ou voie d'Embden-Meyerhof Parnas (EMP) Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de Lactocoques, Pediocoques, ainsi que certains Lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécules de glucose consommée. Le fructose 1-6-bis phosphate aldolase est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (**Thompson et Gentry-Weeks, 1994**).

1.1.6.2 La voie hétérofermentaire

Ou voie des pentoses phosphate. Les bactéries lactiques qui fermentant le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaire. Les principaux groupes de bactéries présentant ce type de métabolisme sont du genre *Leuconostoc* et certains Lactobacilles. Ces microorganismes sont dépourvus de système de PTS (**Thompson J. et Gentry-Weeks, 1994**)

1.1.7 Métabolisme des bactéries lactique

1.1.7.1 La glycolyse

Les bactéries lactiques synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. On distingue deux groupes biochimiques : les homofermentaires et les hétérofermentaires. Les homofermentaires produisent deux molécules d'acide lactique (C3) par glucose (C6) consommé. Chez les hétérofermentaires, seule une molécule d'acide lactique est produite à partir du glucose. Une autre molécule en C2 est produite (en général soit de l'éthanol soit de l'acide acétique) et une molécule d'oxygène. La différence entre ces deux groupes est détectable par le dégagement de CO₂ (**Bourfeois et al., 1996**).

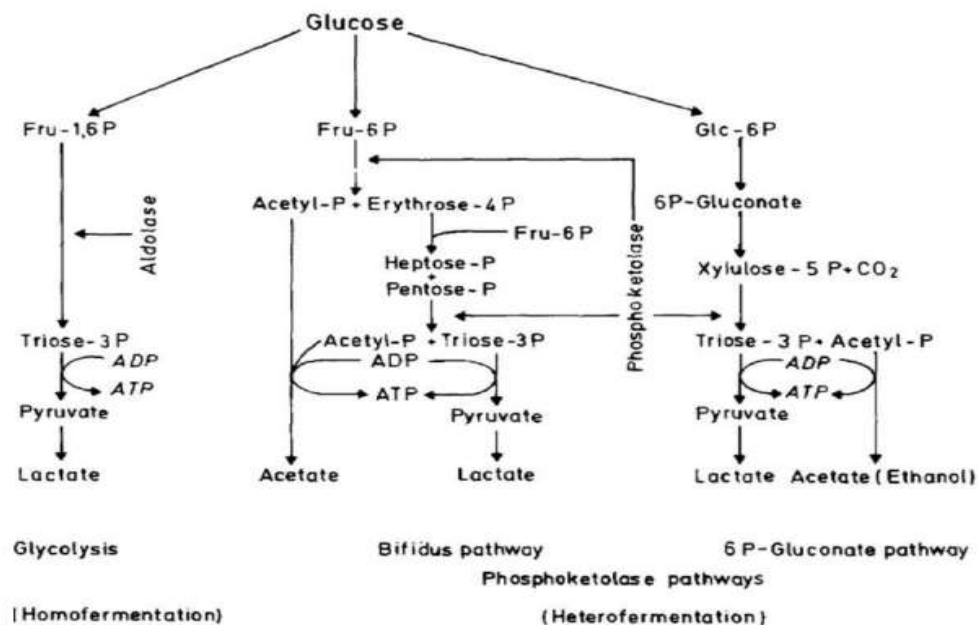


Figure 6 : Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques (**Kandler, 1983**).

1.1.7.2 La lipolyse

Les lipases bactériennes catalysent en partie la production des acides gras à longues chaînes à partir des mono et di glycérides, alors que les estérases permettent la libération des acides gras volatils. Les acides gras, dont la concentration augmente pendant l'affinage, seraient responsables en partie de la flaveur typique des fromages à pâte pressée cuite. Ils sont également des précurseurs pour la formation de méthylcétones, alcools, lactones et esters (Siegumfeldt *et al.*, 2000).

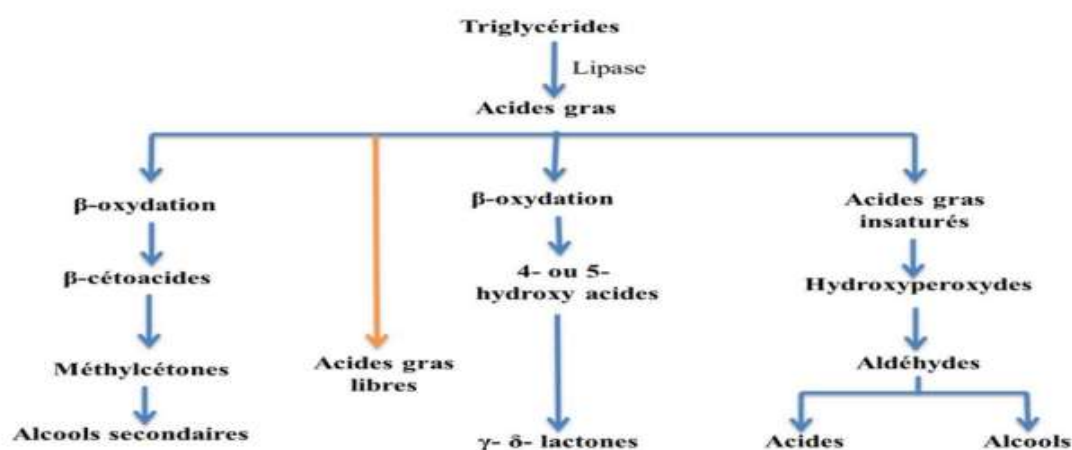


Figure 7 : Principales voies de la lipolyse (Siegumfeldt *et al.*, 2000).

1.1.7.3 La protéolyse

L'incapacité des bactéries lactiques à synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique nécessite un fonctionnement actif de leur système protéolytique dans les environnements où les protéines constituent la principale source d'azote (Law et Haandrikman, 1997). Ces systèmes sont complexes de par le nombre et la nature des protéases et peptidases présentes, mais également de par leur localisation cellulaire. Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse des protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés (Law et Haandrikman, 1997).

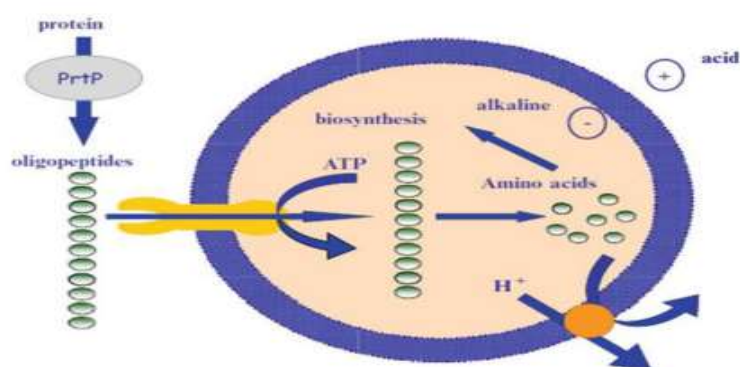


Figure 8 : Système protéolytique des bactéries lactiques (Kunji *et al.*, 1996).

1.1.8 Exigences nutritionnelles

Les bactéries lactiques ont un besoin particulier pour leur nutrition car elles sont incapables de synthétiser un certain nombre d'éléments qui sont variables d'une espèce à une autre, vu leur faible biosynthèse, elles sont donc auxotrophes. Elles sont par conséquent considérées comme le groupe de bactéries le plus exigeant de point de vue nutritionnel (Dridet et Prevost, 2009).

1.1.8.1 Exigences en acides aminés

Les bactéries lactiques sont en principes incapables d'effectuer la synthèse des acides aminés, et doivent par conséquent faire appel à des sources exogènes pour assurer leur métabolisme (Luquet, 1986). Les exigences en acides aminés des *Streptococcus* sont différentes de celles des *Lactobacillus*, ils ont besoin d'acide glutamique d'histidine, de cystéine, de méthionine et aussi de valine, de leucine et de tryptophane ou de tyrosine. Les lactobacilles ont besoin d'aspartate, d'histidine, de lysine, de leucine, de méthionine et de valine (Lenoir *et al.*, 1992).

1.1.8.2 Exigences en bases azotées

Les bases puriques et pyrimidiques ne sont pas vraiment essentielles au métabolisme des bactéries lactiques (Desmazeaud, 1983).

1.1.8.3 Exigences en sels minéraux

Les besoins en éléments minéraux des bactéries lactiques ne sont encore partiellement connus. Les principaux éléments tel que le magnésium et le manganèse sont généralement

requis (**Imbert et Blandeau, 1998; Letrot et Juillard, 2001; Corrieu et al., 2008**), jouent un rôle important dans la nutrition des *Lactobacillus* (**Ledesma et al., 1977; Mazali, 1992**), alors que les besoins en calcium et en potassium sont moins systématiques. Les besoins en fer dépendant des micro-organismes (**Pandey et al., 1994 ; Impert et Blandeau, 1998**). Le zinc présente un effet positif pour la croissance de certains lactobacilles, mais il est toxique à fort concentration. A l'opposé, le sodium, le cadmium, et le cuivre démontrent un effet inhibiteur (**Corrieu et al., 2008**).

1.1.8.4 Exigences en cations

Le rôle principal des cations est dans la nutrition des bactéries lactiques ; ils interviennent dans différentes réactions métaboliques (**Boyaval et al., 1988**). La forme ionique entraîne une activation de la fermentation lactique par une meilleure utilisation des sucres, par exemple **Amouzou et al. (1985)** ont montré le rôle du Mg^{2+} sur *Streptococcus thermophilus*.

1.1.8.5 Exigences en vitamines

Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser les vitamines qui jouent un rôle irremplaçable de coenzymes dans le métabolisme cellulaire. *Streptococcus thermophiles* a une exigence absolue en acide pantothénique (B5), en riboflavine (B2), à moindre degré en thiamine (B1), en nicotinamide ou en acide nicotinique (B3) et en biotine (B8). La pyridoxine ou ses dérivés (B6) stimulent fortement sa croissance (**Desmazeaud, 1983**).

1.1.8.6 Exigences en glucides

Les bactéries lactiques ont la capacité de fermenter des glucides (**Wood et Holzapfel, 1995 ; Bazo, 2011**), par exemple *S. thermophilus* peut fermenter et transformer rapidement du lactose en lactate, et utilise différentes sources tel que : lactose, saccharose, glucose, galactose, fructose. *S. thermophilus* a été adapté à s'alimenter et croître en présence de lactose comme source de carbone (**Vaillancourt et al., 2002 ; Vanden Bogaard et al., 2004**).

1.1.9 Intérêt des bactéries lactiques

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

1.1.9.1 Dans l'industrie alimentaire

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bio-conservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem *et al.*, 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis *et al.*, 2005). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu et Thonart, 2009). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth et Steele, 2001).

1.1.9.2 Dans le domaine thérapeutique

Etant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem *et al.*, 2008). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (Mkrtychyan *et al.*, 2010). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish *et al.*, 2011).

1.1.10 Applications des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques font partie de l'alimentation humaine depuis l'antiquité. Elles participent à la fermentation de nombreux aliments d'où le changement de la saveur de l'aliment et de sa texture. D'autre part, les bactéries lactiques produisent des peptides et des molécules comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le diacétyl ou l'éthanol. L'industrie laitière est, sans doute, le plus grand consommateur de ferments lactiques commerciaux, pour la production de laits fermentés, fromages, crèmes et beurres. La fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de nombreux produits, chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité (Hugenholtz *et al.*, 2002).

Les bactéries lactiques sont aussi utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical et dans l'industrie comme des additifs alimentaire (**Wisselink et al., 2002**)

1.1.10.1 Dans le secteur agronomique

Les bactéries lactiques sont utilisées comme agents biologiques de conservation du fourrage par fermentation acidifiante. L'utilisation des bactéries lactiques dans les ensilages, permet de limiter ou d'inhiber certaines voies métaboliques indésirables telles que l'acétogénèse (**Salawu et al., 2001 ; Khuntia et Chaudhary, 2002**).

L'étiologie des effets bénéfiques engendrés par les souches lactiques dans les ensilages reste encore très peu élucidée mais des équipes suggèrent un effet probiotique affectant favorablement l'écosystème et le pH ruminal (**Weingerg et al., 2004 ; Gollop et al., 2005**).

1.1.10.2 Dans le domaine d'alimentaire

Les bactéries lactiques sont aussi responsables de l'ouverture des fromages par production de CO₂, de la texture produite fermentés, par production des exo-polysaccharides ainsi que la production de peroxyde d'hydrogène ou de bactériocines qui inhibent la croissance de bactéries indésirables (**Doleyres, 2003**).

La bio préservation consiste à ajouter sur un aliment un ou des microorganismes et/ou leurs métabolites, sélectionnés pour leurs capacités à inhiber le développement des microorganismes indésirables, afin d'augmenter les durées de vie des denrées alimentaires et/ou de limiter la croissance des germes pathogènes. Ce concept s'inscrit dans l'utilisation des technologies de barrière, en complément à d'autres méthodes de conservation comme la réfrigération, la conservation sous vide ou sous atmosphère modifiée (**Pilet et al., 2009**).

En outre, elles sont impliquées dans la fermentation et la bio-conservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (**Yateem et al., 2008**). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (**Badis et al., 2005**).

L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans

l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (**Dortu et Thonart, 2009**).

Selon **Marth et Steele. (2001)**, l'application de ces souches bénéfiques doit répondre à certains critères :

- Absence de pathogénicité ou activité toxique ;
- Capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques ;
- Facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage.

1.1.10.3 Dans le domaine de la santé

Certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques ; c'est-à-dire micro-organismes vivants capables d'exercer un effet bénéfique sur l'homme ou l'animal par amélioration des propriétés de la flore intestinale. Les espèces couramment utilisées sont *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. johsonii*, *Lb. delbruecki*, *sub sp bulgaricus* (**Salminen et al., 2004**). Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement de certaines affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires, l'intolérance au lactose et l'hypercholestérolémie (**Salminen et al., 2004**).

Les bénéfices potentiels des probiotiques vont de la suppression de l'activité de certains pathogènes à l'amélioration de l'utilisation du lactose, de la réduction du cholestérol sanguin et du niveau de substances carcinogènes, l'inactivation de composés toxiques ainsi que la stimulation du système immunitaire ; donc ces micro-organismes sont bénéfiques pour la santé de l'hôte (**Ninane et al., 2009**). Ces spécificités correspondent essentiellement à des propriétés de résistance lors du passage dans l'estomac, dans le duodénum et dans l'intestin (**Wildman, 2007 ; Remacle et Reusens, 2004**).

1.2 La croissance bactérienne

Il existe plusieurs méthodes expérimentales pour mesurer l'évolution des populations de micro-organismes.

- Mesure des produits du métabolisme : cette méthode consiste à étudier la corrélation entre les produits du métabolisme et la croissance bactérienne. Par exemple, la croissance du *Lactobacillus* est proportionnelle à la production d'acide lactique.
- Mesure des variations physicochimiques du milieu : cette méthode examine la corrélation entre les variations des paramètres physicochimiques du milieu et la croissance bactérienne. Par exemple, la croissance des bactéries lactiques est accompagnée d'une diminution du pH du milieu. Ces méthodes permettent de comprendre les interactions entre les micro-organismes et leur environnement, ainsi que les effets de ces interactions sur la croissance et le développement de ces organismes.

1.2.1 Description de la cinétique de croissance

Lorsque les conditions de milieu sont favorables (présence de nutriments, température, activité de l'eau, pH, absence d'antiseptiques ou d'antibiotiques), la croissance microbienne suit la courbe de la figure 9, établie par **Buchanan en 1918**. Cette courbe décrit les différentes phases de la croissance bactérienne, qui sont généralement divisées en sept phases.

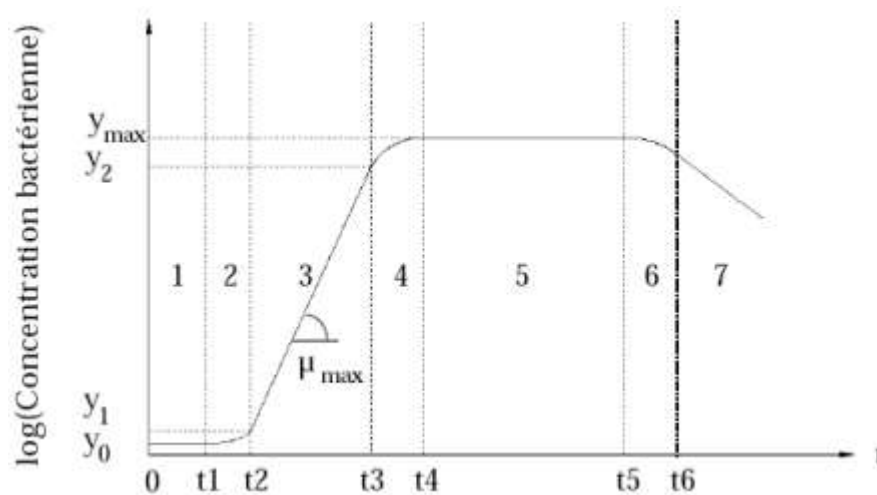


Figure 9 : Les différentes phases de croissance bactérienne en milieu liquide décrites par **Buchanan (1918)**.

De manière traditionnelle, les six phases successives suivantes sont généralement identifiées (De Roissart, 1986 ; Augustin, 2005).

- **La phase de latence ($\mu=0$)**, elle suit immédiatement l'ensemencement du milieu par l'inoculum bactérien. Cette phase correspond à une période d'adaptation de l'inoculum à son nouvel environnement de croissance et sa durée dépend de la nature du milieu d'accueil, de l'état physiologique des cellules inoculées et éventuellement de la taille de l'inoculum.
- **La phase d'accélération (μ augmente)**, pendant laquelle le métabolisme cellulaire reprend et la croissance démarre.
- **La phase exponentielle ($\mu=\mu_{\max}$ constant)**, au cours de laquelle toutes les bactéries se trouvent dans leur état physiologique optimal et se multiplient à leur taux de croissance maximum. Cette phase se présente sous la forme d'une portion linéaire lorsque l'on représente l'évolution du logarithme de la concentration bactérienne ou de la biomasse en fonction du temps.
- **La phase de ralentissement (μ diminue)**, elle est due à l'épuisement d'un ou de plusieurs substrats limitant (sucres, acides aminés...), à l'accumulation de produits toxiques (acide lactique, acide acétique, peroxydes...) ou simplement à l'abaissement du pH.
- **La phase stationnaire ($\mu=0$)** qui correspond à un arrêt de la croissance, la culture atteint alors sa densité maximale.
- **La phase de déclin (μ négatif)**, qui correspond à la mort des bactéries et éventuellement à leur lyse par manque des réserves énergétiques ou par intoxication.

1.3 Les activités technologiques des bactéries lactiques

1.3.1 L'activité acidifiante

La fonction acidifiante est la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production des métabolites qui améliorent la conservation des produits alimentaires en diffusant à travers les couches lipidiques de la membrane bactérienne, ils provoquent un abaissement de pH interne par libération de protons, déstabilisant, ainsi le fonctionnement de la cellule bactérienne. Parmi ces métabolites, on cite par exemple le peroxyde d'hydrogène, produit en présence d'oxygène, s'accumule en l'absence de catalase ; son pouvoir oxydatif provoque l'oxydation des lipides et la libération des acides nucléiques. Aussi l'acide lactique produisant à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne. Il est utilisé comme acidulant, aromatisant, un très bon conservateur et un inhibiteur de l'altération bactérienne dans une grande variété d'aliments transformés. *L.lactis subsp. lactis*, *ssp. cremoris* et *biovar. diacetylactis*, sont les trois bactéries les plus fréquemment citées pour leurs rôles majeurs différents, respectivement pour l'aptitude acidifiante (Ayachi, 2022 ; Boullouf, 2016).

1.3.2 L'activité protéolytique

Les bactéries lactiques dépendent principalement de l'activité fonctionnelle du système protéolytique dans les environnements où les protéines sont la principale source d'azote en raison de leur incapacité à synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines. Le système protéolytique des bactéries lactiques est constitué de protéases liées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse des protéines en peptides contenant de 7 à 16 acides aminés. Ces peptides sont ensuite hydrolysés par l'endopeptidase ou les exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides. Des études comparatives de la protéolyse du fromage cheddar fabriqué avec ou sans levure lactique ont montré l'efficacité de ces bactéries dans la libération de petits peptides et d'acides aminés libres lors de l'affinage du fromage. Les lactobacilles présentent en général une activité protéique plus prononcée que les lactobacilles (Boullouf, 2016).

1.3.3 Le pouvoir aromatisant

Les bactéries lactiques participent au développement de la saveur et de l'arôme des produits laitiers (Schmidt *et al.*, 1994). En plus de la production de l'acide lactique, les

bactéries lactiques produisent une quantité plus ou moins importante de composés secondaires, tel que : le diacétyle, acétaldéhyde, l'éthanol, le gaz carbonique et l'acide formique.

1.3.3.1 Le diacétyle

Est un produit issu du métabolisme du citrate par plusieurs BL bien que la production puisse être réprimée par la fermentation des hexoses. Les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures sont plus sensibles au diacétyle que les bactéries à Gram positif et son mode d'action serait dû à une interférence avec l'utilisation de l'arginine (**De Vuyst et Vandamme, 1994**). Le diacétyle est rarement présent dans les fermentations alimentaires à des niveaux suffisants pour apporter une contribution majeure à l'activité antibactérienne (**Caplice et Fitzgerald, 1999**).

1.3.4 L'activité texturante

Les bactéries lactiques grâce à leur capacité de synthétiser des exo-polysaccharides (EPS) jouent un rôle important dans la consistance et la rhéologie des produits transformés. Ces macromolécules sont généralement considérées comme des épaississants naturels dans l'industrie alimentaire. Les souches de *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* producteurs d'EPS sont utilisés comme starters fonctionnels dans la fabrication de yaourts pour améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis. L'utilisation d'EPS obtenus à partir de *Lactococcus lactis ssp.crémoirs* est très prometteur pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (**Boullouf, 2016**).

1.3.5 L'activité lipolytique

Les enzymes produites par les bactéries lactiques sont d'une grande importance dans l'industrie alimentaire. La lipolyse joue un rôle important dans le vieillissement du fromage car les acides gras sont convertis en méthylcétones, lactones et thioesters qui, avec les acides gras, contribuent à la saveur du produit fermenté. Bien que les bactéries lactiques possèdent une variété d'enzymes lipolytiques capables d'hydrolyser de nombreux esters d'acides gras et les substrats tri-, di- et monoacylglycérols, elles sont généralement considérées comme faiblement lipolytiques par rapport aux autres microorganismes tels que *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium* et *Candida*. De plus, Les lipases de *Pseudomonas* et *Bacillus* sont extracellulaires, par contre les bactéries lactiques produisent une lipase

intracellulaire. Les enzymes lipolytiques sont produites pendant la phase exponentielle de la croissance, et la production est fortement influencée par les conditions de croissance **(Belhamra, 2017)**.

1.3.6 L'activité antimicrobienne

On reconnaît depuis longtemps, aux bactéries lactiques, la propriété de produire des substances antimicrobiennes 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, diacétyle, et les bactériocines **(Leveau *et al.*, 1991, Klaenhammer *et al.*, 1994)**.

1.4 La résistance des bactéries lactiques aux antibiotiques

Puisque les bactéries lactiques sont présentes dans l'appareil gastro-intestinal en grand nombre et sont également intentionnellement ajoutées à notre régime, les soucis ont été augmentés au sujet de la résistance aux antibiotiques dans ces espèces bactériennes réputées bénéfiques pour la santé humaine.

Par exemple, les bactéries lactiques résistantes à certains antibiotiques pourraient aider à maintenir l'équilibre gastro-intestinal dans le cas de la diarrhée provoquée par un traitement antibiotique. Cependant, il y a un risque lié à la capacité de ces bactéries lactiques résistantes de transmettre leurs facteurs de résistance (gènes) horizontalement aux bactéries pathogènes **(Teuber *et al.*, 1999 ; Salyers *et al.*, 2004 ; Maria *et al.*, 2010)**.

Récemment, ces craintes ont été renforcées par des études qui montrent que les gènes de résistances aux antibiotiques trouvés chez les agents pathogènes de l'homme sont identiques à ceux portés par les bactéries lactiques **(Perreten *et al.*, 1997 ; Salyers *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2006 ; Maria *et al.*, 2010)**.

Les espèces des bactéries lactiques peuvent donc agir comme des « réservoirs » de gènes de résistance transmissibles aux bactéries colonisant le tractus gastro-intestinal humain via la chaîne alimentaire **(Mathur and Singh, 2005 ; Ammor *et al.*, 2007)**.

Les tests de sensibilité bactérienne les plus répandus ont pour but d'étudier l'effet bactériostatique ou bactéricide des antibiotiques **(Chengappa *et al.*, 1990 ; Eberlin *et al.*, 1994 ; Jorgensen *et al.*, 1999)**.

1.4.1 Les mécanismes biochimiques de résistance

Les bactéries se défendent contre l'action des antibiotiques en se rendant imperméables à leur pénétration, en produisant des enzymes capables de les inactiver ou en modifiant la structure de leurs cibles. Les mécanismes biochimiques impliqués dans la résistance bactérienne aux antibiotiques sont brièvement expliqués ci-dessous (SCAN, 2003 ; EFSA, 2008).

1.4.1.1 Interférence avec le mécanisme de transport de type imperméabilité

Défaut d'entrée de l'antibiotique dans la bactérie (Gram -) provoqué par le dysfonctionnement ou la perte d'une porine qui sont des canaux aqueux ou hydrophiles constitués de trois molécules de protéines qui laissent diffuser diverses molécules de faible masse moléculaire comme des substrats ou encore des antibiotiques. Exemple: β -lactamines.

1.4.1.2 Interférence avec le mécanisme de transport de type efflux

Extrusion de l'antibiotique de la bactérie (Gram + ou Gram -). Exemple: Quinolones.

1.4.1.3 Inactivation ou détoxification enzymatique

Le mécanisme de résistance naturelle ou acquise par inactivation ou détoxification enzymatique est important et très varié. Exemple: les β -lactamases (au moins 350 enzymes maintenant identifiées). La résistance par ce type de mécanisme à d'autres familles d'antibiotiques est bien connue comme pour les aminoglycosides avec les enzymes impliqués.

1.4.1.4 Modification d'affinité de la cible

Ce mécanisme est en relation avec une modification d'affinité d'une ou plusieurs cibles de type PLP (Protéines de liaison aux pénicillines) ou PBP (Penicillin Binding Protein) comme chez *Streptococcus pneumoniae* définissant une résistance de niveau variable: bas niveau de résistance (BNR) et haut niveau de résistance (HNR).

1.4.1.5 Substitution de la cible

Ce mécanisme est de moindre importance dans le monde bactérien. Cependant, l'exemple majeur est la résistance intrinsèque de *Staphylococcus aureus* qui est liée d'une part, à la présence d'une nouvelle PLP de faible affinité, dénommée PLP2a et d'autre part à son

hyperproduction. La conséquence clinique est importante, car il y aura résistance croisée entre β lactamines.

1.4.2 Les mécanismes génétiques de résistance

1.4.2.1 Les mutations

Les mutations chromosomiques peuvent conduire à une résistance accrue aux antibiotiques de différentes manières. Les plus fréquents sont des mutations dans les gènes codant pour les molécules cibles d'antibiotiques, généralement par une modification sur le site de liaison de l'antibiotique. Un exemple bien étudié est celui des mutations dans le gène de la protéine de liaison de la pénicilline ce qui se traduit par une résistance élevée à la pénicilline. Des mutations de l'ARNr 16S ou 23S rend *Helicobacter pylori* et *Streptococcus pneumoniae* résistantes à la tétracycline et l'érythromycine, respectivement. La résistance par mutation des gènes chromosomiques présente un faible risque de diffusion horizontale toutefois (Efsa, 2008).

1.4.2.2 L'acquisition d'ADN

Trois principaux mécanismes de résistance antimicrobienne ont été décrits: (i) l'inactivation directe de la molécule active, (ii) la perte de susceptibilité bactérienne à l'antibiotique par la modification de la cible et (iii) la réduction de la concentration de l'antibiotique qui atteint la molécule cible sans modification du composé (SCAN, 2003). Les mécanismes de résistance intrinsèque sont dans la plupart des cas relatives à une basses affinité de la cible, l'absence de cibles, une basse perméabilité ou flux d'antibiotiques (Figure 10).

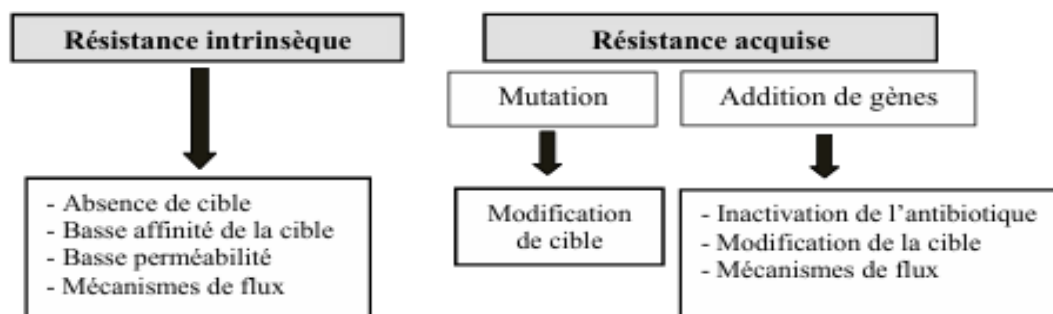


Figure 10 : Principaux mécanismes de résistance intrinsèque et acquise aux antibiotiques (Efsa, 2008)

2. Matériels et méthodes

2.1 L'objectif de l'étude

Dans ce travail différentes analyses ont été réalisées afin d'étudier quelques activités d'intérêt technologiques chez sept souches de bactéries lactiques ainsi qu'une évaluation de leur aptitude à croître dans le lait ; leur capacité à produire un composé d'arôme (le diacétyl) et leur sensibilité vis-à-vis d'un certain nombre d'antibiotiques.

2.2 Lieu du travail

La totalité de notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences et de la technologie, Université Ahmed Zabana Relizane.

2.3 Origine des souches

Les sept souches utilisées dans notre étude font partie de la collection du Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie (LBMB), Université Oran 1 Ahmed Ben Bella, Oran Algérie. Elles ont été isolées à partir d'échantillons de Lben de fabrication artisanale.

Les souches sont codées et identifiées à l'échelle de l'espèce comme présenté dans le tableau suivant :

Tableau 1: Identification, codage et origines des souches

Code	Genre et espèce	Origine
LBO1	<i>Eterococcus faecalis</i>	Lben d'Oran
LBO2	<i>Eterococcus faecalis</i>	
LBO4	<i>Eterococcus faecalis</i>	
LBO9	<i>Eterococcus avium</i>	
LBO14	<i>Eterococcus faecium</i>	
LBO20	<i>Eterococcus avium</i>	
LBR1	<i>Eterococcus faecalis</i>	Leben de Relizane

2.4 Confirmation de la pureté des souches

Il est essentiel de vérifier la pureté des souches avant leur utilisation en laboratoire. Pour ce faire, les souches de bactéries lactiques (LBO1, LBO2, LBO4, LBO9, LBO14, LBO20 et LBR₁) qui avaient été préalablement conservées, ont été réactivées en les cultivant sur milieu solide MRS par la technique des stries d'épuisement. Ces cultures ont été par la suite incubées à 37°C pendant 48 heures.

La pureté des souches a été confirmée par un processus de repiquage successif sur le même milieu gélosé jusqu'à ce que des colonies bien isolées, présentant une homogénéité de taille, de forme et de couleur ont été obtenues attestant ainsi la pureté des souches.

Un examen microscopique par coloration de Gram ainsi qu'un test de catalase ont été effectués pour compléter cette évaluation de la pureté.

Les souches qui se sont avérées être Gram positives et catalase négatives témoignant ainsi leur pureté ont été retenues pour les étapes subséquentes du travail.

2.4.1 Examen macroscopique

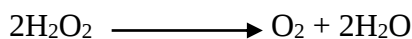
L'examen macroscopique permet de visualiser les isolats obtenus sur la gélose MRS après incubation. Ce processus implique de décrire plusieurs caractéristiques telles que la forme, la taille, la couleur, l'aspect (collant, muqueux), l'odeur, la transparence et le contour des colonies.

2.4.2 Examen microscopique

Il consiste en la préparation d'un frottis suivi d'une coloration de Gram (**voir l'annexe 1**) et une observation au microscope optique des souches. Cela va permettre de déterminer le type de Gram des cultures jeunes, la forme cellulaire ainsi que le mode d'association.

2.4.3 Test catalase

Le test de la catalase est utilisé pour déterminer si une bactérie possède l'enzyme catalase, qui est responsable de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) généré lors de l'oxydation. Cette enzyme est détectée en émulsionnant une colonie de l'isolat à tester dans une solution d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame propre. L'observation d'un dégagement gazeux important indique la présence de la catalase dans le métabolisme bactérien, ce qui témoigne de la dégradation du H₂O₂ sous l'action de l'enzyme testée, selon la réaction suivante :



2.5 Conservation des souches

Les souches ont été conservées pour une longue durée comme suit : des cryotubes stériles contenant du MRS additionné d'un cryoprotecteur qui est le glycérol à (80%) ont été inoculés par des cultures jeunes des souches. Le mélange est homogénéisé et conservé au congélateur à -20 °C pendant plusieurs mois.

2.6 Evaluation de la croissance

La croissance des sept souches a été évaluée aux points : initial (t_0) et final (t_{24} , obtenu après 24h d'incubation) et cela par mesure de la densité optique en utilisant le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm.

Pour chaque souche, 1ml de la culture jeune a servi d'inoculum pour 5 ml de lait écrémé stérile. Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, des flacons de 200 ml contenant du lait écrémé sontensemencés avec la culture lactique à raison de 1%.

A noter que ; nos cultures ont été réalisées dans le lait ce qui implique (pour mesurer la DO) une étape de clarification du lait ; réalisée dans notre étude au moyen d'une solution d'EDTA (1%, pH= 12) comme décrit par **Boutrou et al . (1998)**.

2.7 Etude de l'activité acidifiante

La mesure de l'activité acidifiante a consisté à déterminer les valeurs du pH des différentes cultures et à doser simultanément l'acidité totale et cela aux points (initial et final) de la croissance (**Larpent, 1997**).

Pour doser l'acide lactique : 200µl d'une culture jeune réalisée sur milieu MRS a étéensemencée dans 5 ml de lait écrémé stérile. Après une incubation à 37°C pendant 24 h, des flacons contenant 200ml de lait écrémé stérile ont étéensemencé par une la culture lactique a raison de 1%.

10 ml de chaque culture a été prélevé aux temps (t_0 et t_{24}) puis titrée par la soude Dornic (N/9) en présence de 5 gouttes de phénolphthaléine, jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins 10 secondes (**Larpent, 1997**).

Les résultats sont exprimés selon la relation :

$$\text{Acidité en } ^\circ\text{D} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

V_{NaOH}: Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.

1°D correspond à l'acidité apportée par 0,1 g d'acide lactique dans un litre de lait.

2.8 Mesure du pH

Selon **Larpent. (1997)**, la valeur du pH est fonction de la concentration des ions hydronium présents dans la solution.

La mesure des valeurs de pH a été réalisée directement au moyen d'un pH-mètre, en plongeant l'électrode dans 10 ml de la culture réalisée sur milieu Lait. Le pH a été déterminé à chaque fois qu'on procède au dosage de l'acide lactique.

2.9 Evaluation de la production du diacétyle

Il s'agit de l'une des principales substances volatiles susceptibles de jouer un rôle dans l'arôme du Leben.

La mise en évidence du diacétyle a été réalisée comme suit : A 1ml d'une pré-culture de chaque souche, réalisée sur milieu MRS et placée dans un tube à hémolyse stérile, a été additionné 0,5ml du réactif α -naphtol à 1% (préparé dans de l'alcool absolu) et 0,5ml de KOH à 16%. Après agitation et incubation du mélange réactionnel à 30°C pendant 10 mn, la production du diacétyle se traduit par l'apparition d'un anneau rouge à la surface du mélange (**King, 1948**).

2.10 Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des souches lactiques vis-à-vis des antibiotiques est réalisée par la méthode classique de l'antibiogramme par diffusion en utilisant des disques d'antibiotiques sur milieu MRS solide selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie (**CA-SFM, 2012**).

Des cultures fraîches de 24h des 7 souches de bactéries lactiques préparées dans du bouillon MRS ont été utilisées pour ensemer des boîtes de Pétri contenant de la gélose MRS préalablement coulée et solidifiée à l'aide des écouvillons stériles, de façon à réaliser des stries serrées sur la totalité de la surface gélosée. Les boîtes seront par la suite laissées sécher à une température ambiante.

Matériels et méthodes

Par la suite, les quatre disques d'antibiotiques (Ampicilline, Érythromycine, Tétracycline et Ceftazidime) ont été déposés stérilement à la surface du milieu à l'aide d'une pince stérile, en appuyant légèrement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu. Afin d'éviter le chevauchement des zones d'inhibition, une distance de 15mm entre le bord de la boîte et les disques périphériques et de 25 mm entre deux disques est à respecter.

3. Résultats et discussion

3.1 Confirmation de la pureté des souches

3.1.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des colonies des sept souches, réalisé après 24h d'incubation sur milieu MRS gélosé révèle que les colonies présentent les caractéristiques typiques suivantes : elles sont de petite taille, de forme circulaire, à aspect lisse, à relief plus ou moins bombé avec un contour régulier et une couleur blanchâtre, comme présenté dans la **figure 11** ci-dessous :

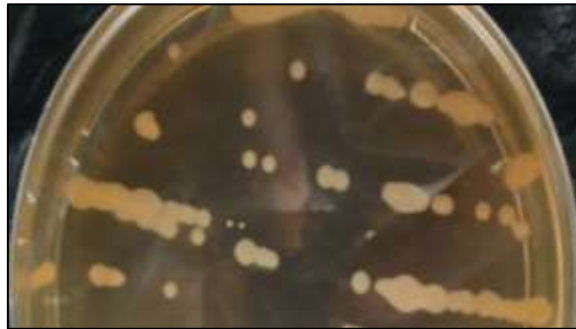


Figure11 : Aspect macroscopique des colonies des souches des LAB sur milieu MRS solide.

3.1.3 Examen microscopique

L'étude microscopique des cellules de bactéries lactiques examinées sous microscope optique au grossissement : G10x100 (**La figure 12**) nous a permis de révéler la morphologie et la disposition des cellules après une coloration de Gram. Toutes les cellules étudiées sont colorées en violet donc à Gram positif et présentant une seule forme: des coques, disposées en paires ou en petites chainettes, en amas, parfois isolées.

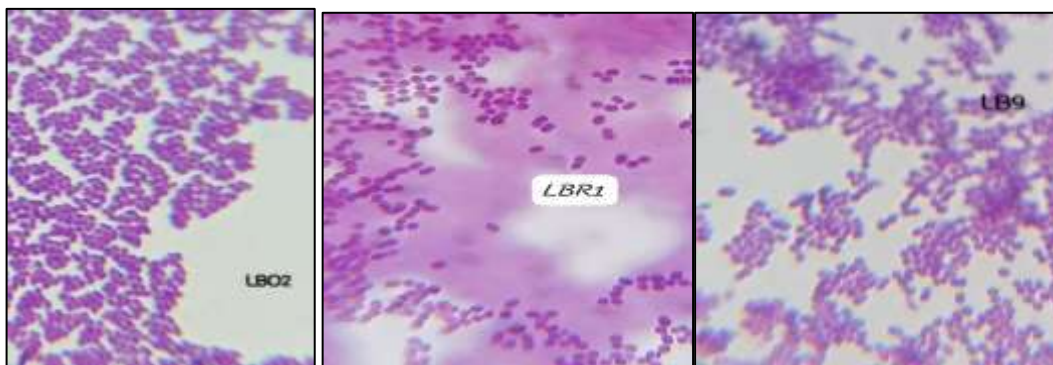


Figure 12 : Aspect microscopique des cellules des souches LBO2, LBO9 et LBR1 sous microscope optique au G10x100.

3.1.3 Recherche de la catalase

Les résultats de ce test ont révélé que les 7 souches examinées sont catalase négatives, car aucun dégagement des bulles de gaz n'a été observé.

Ces constatations confirment la pureté des souches étudiées, qui se sont révélées comme Gram positif et catalase négatif, et donc leur appartenance aux groupes des bactéries lactiques.

3.2 Evaluation de la croissance bactérienne

L'évolution de la croissance des souches sur lait écrémé stérile a été déterminée par suivi de l'évolution de la densité optique mesurée à t_0 et t_{24} après clarification du lait par l'EDTA à $\lambda=600$ nm. Les résultats chiffrés sont résumés dans le **tableau 2**

Tableau 2 : les valeurs de la densité optique obtenues à t_0 et t_{24}

Les souches	DO	
	t_0	t_{24}
LBO1	0,018	0,065
LBO2	0,013	0,069
LBO4	0,002	0,093
LBO9	0,029	0,122
LBO14	0,028	0,108
LBO20	0,016	0,120
LBR1	0,006	0,100

Les résultats obtenus montrent une croissance optimale des souches dans le lait, en particulier la souche LBO9 qui a présenté un maximum de croissance de 0,122. Cela est probablement lié au sein de ce groupe d'entérocoques à l'activation des enzymes du métabolisme et celles impliquées dans les réactions de production d'énergie et par conséquent une augmentation de la concentration cellulaire en fin de croissance.

A noter que la croissance des entérocoques dans le lait reste faible en comparaison avec les lactocoques qui peuvent présenter des densités cellulaires finales importantes dépassant le 1.

D'un point de vue économique, la production d'un maximum de biomasse est l'un des critères pris en compte dans la sélection des bactéries lactiques pour des applications industrielles.

3.3 Etude de l'activité acidifiante

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques, elle demeure l'une de leurs propriétés métaboliques les plus recherchées vu son intérêt en technologie laitière.

La coagulation du lait par les bactéries lactiques est provoquée par la transformation progressive du lactose du lait en acide lactique qui provoque l'abaissement du pH et la coagulation du lait.

Le suivi de l'activité acidifiante des souches étudiées a été réalisé sur le milieu lait écrémé stérile. Les résultats de l'évolution du pH et d'acidité sont résumés dans le **tableau3**.

Tableau 3 : Les valeurs de l'acidité titrable en (°D) et de pH des sept souches

Les souches	L'acidité (°D)		pH	
	t ₀	t ₂₄	t ₀	t ₂₄
LBO1	25	89	7,45	6,95
LBO2	27	90	7,27	6,81
LBO4	24	90	7,26	6,87
LBO9	26	83	7,27	6,87
LBO14	28	85	7,40	6,75
LBO20	22	69	7,26	6,84
LBR1	22	85	7,40	6,74

L'examen des résultats obtenus a permis de mettre en évidence des différences notables dans l'aptitude à l'acidification du lait entre les sept souches. En effet les trois souches LBO1, LBO2 et LBO4 se distinguent des souches restantes par leur production maximale d'acide lactique, avoisinant les 90°D au bout de 24 heures d'incubation accompagnée d'un abaissement du pH du milieu. Le seuil maximal de production de cet acide varie considérablement entre le reste des souches.

La différence de la concentration d'acide produit entre les souches lactiques est influencée selon **Albenzino et al. (2001)** par une différence dans le système de transport des composés fermentescibles du milieu vers le cytoplasme cellulaire. Il existe principalement deux types de systèmes de transport chez les bactéries lactiques (PEP et PTS), les

composantes de ces systèmes sont différentes au sein des bactéries lactiques, elles varient d'un genre bactérien à un autre, voire même au niveau de l'espèce.

L'évolution de l'acidité et les variations de pH au cours de la croissance des souches testées sur le lait écrémé démontrent une différence entre les genres, les espèces et même entre les souches d'une même espèce, vérité scientifique et logique rapportée par **Luquet et Corrieu (2005)**.

Pendant l'acidification du lait, les BL produisent principalement de l'acide lactique par la fermentation du lactose. En outre, elles peuvent aussi fermenter des monosaccharides (galactose, xylose, arabinose, ribose), des hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccharides (saccharose, cellobiose, maltose, tréhalose) (**Belkheir, 2017**). **Cogan et al. (1997)**, ont rapporté que la capacité de produire rapidement de l'acide était probablement la propriété la plus importante des bactéries utilisées en tant que cultures starter. Ceci aboutit à la diminution du pH, qui en retour augmente l'expulsion du lactosérum du caillé et diminue la teneur en humidité. Un pH bas et une humidité diminués sont des facteurs importants dans la réduction de la dégradation microbienne des produits laitiers. De plus, la présence de l'activité peptidase est essentielle pour le renforcement de la protéolyse dans le fromage ainsi que le développement des arômes et saveurs dans les produits laitiers (**Hannon et al, 2003 ; Nieto-Arribas et al, 2009**).

3.4 Evaluation de la production du diacétyl

Les 7 souches se sont révélées ; dans notre étude, capables de produire le diacétyl comme présenté dans **la figure 13** ci-dessous.

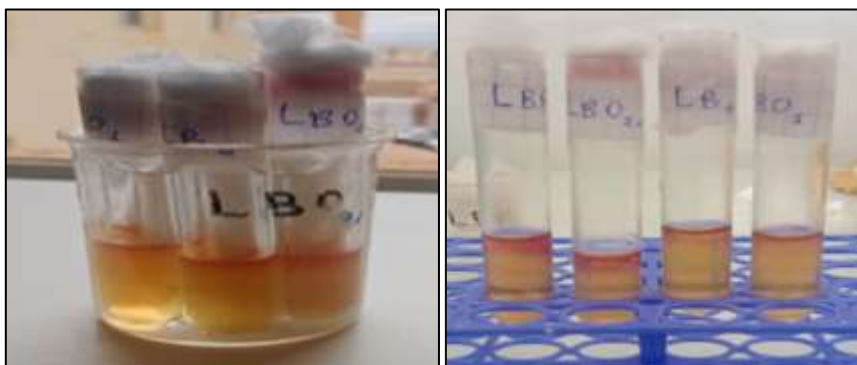


Figure 13 : Mise en évidence de la production du diacétyl par les souches.

En présence de diacétyle, le réactif α -naphtol réagit pour former un composé rouge qui se concentre à la surface du mélange, formant un anneau coloré. Cette réaction colorimétrique permet de détecter qualitativement la production de diacétyle par la souche bactérienne testée.

Les travaux de **Harvey et Collins** réalisés en **1961** et de **Seitz, Sandine et al**, entrepris la même année montrèrent que les citrates sont métabolisés par les bactéries lactiques aromatiques et contribuent à la synthèse du diacétyle. En présence de citrate et de lactose, les bactéries lactiques aromatiques produisent plus de pyruvate qu'il est nécessaire pour régénérer le coenzyme réduit. Cet excès de pyruvate, toxique pour la cellule, est éliminé sous forme de produits neutres tels que le diacétyle (**Harvey et collin, 1963**)

L'association entre les bactéries acidifiantes et les bactéries aromatiques est nécessaire pour la production de composés aromatiques. En effet, des études physiologiques ont montré que la production d'acide par les LAB est nécessaire avant que les bactéries aromatiques puissent convertir le citrate en composés aromatiques (**Foster et al, 1957 cité par Baron, 1998**).

Ainsi, l'arôme d'un produit alimentaire est un critère essentiel de la qualité organoleptique déterminant les choix et les préférences des consommateurs (**Atlan, 2007**).

3.5 Etude de la sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme a été réalisé pour les sept souches vis-à-vis de quatre antibiotiques de différentes familles.

Selon (**CA-SFM, 2012**), La procédure et les critères de catégorisation des souches pour interpréter un antibiogramme se basent sur les diamètres critiques et le diamètre d'action d'un antibiotique sur l'activité des souches à tester, exprimé phénotypiquement par une zone de lyse autour de l'antibiotique. La mesure du diamètre des zones d'inhibition de chaque souche pour chaque antibiotique testé permet de caractériser les souches comme étant sensibles (S), intermédiaires (I) ou résistantes (R).

- **Souches sensibles** : les souches catégorisées S sont celles pour lesquelles correspond un diamètre mesuré supérieur ou égale au diamètre critique D.
- **Souches résistantes** : les souches catégorisées R sont celles pour lesquelles le diamètre mesuré est inférieur au diamètre critique d.

Résultats et discussion

- **La catégorie intermédiaire (I) :** Les souches catégorisées I sont celles pour lesquelles le diamètre mesuré de l'antibiotique testé est compris entre les deux diamètres critiques.

Les résultats de ce test sont présentés dans le **tableau 4** et la **figures 14**

Tableau 4: Profils d'antibiorésistances des souches.

	Ampicilline 10	Érythromycine 15	Tétracycline	Ceftazidime 30
LBO1	S	S	S	S
LBO2	S	S	S	S
LBO4	S	S	S	S
LBO9	S	S	S	S
LBO14	S	S	S	S
LBO20	S	S	S	S
LBR1	S	S	S	S

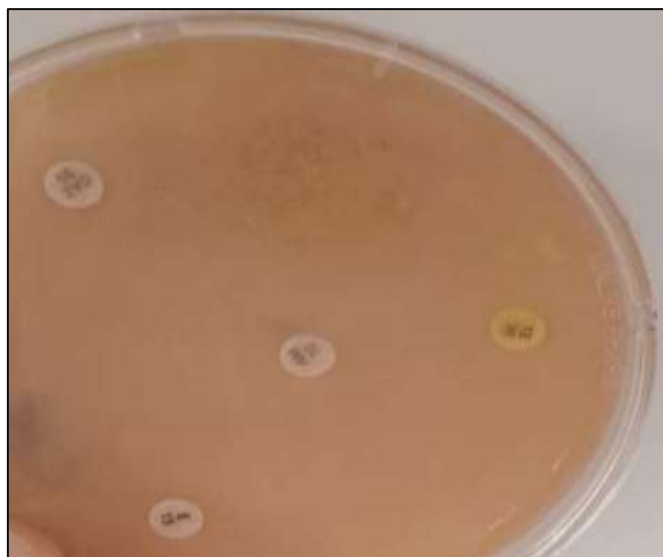


Figure 14 : exemple de la sensibilité de la souche LBO9 vis-à-vis des quatre ATB testés.

Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques affirment que les sept souches sont sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés. Cela peut présenter un avantage lors d'une éventuelle utilisation de ces souches à l'échelle industrielle comme agents de transformation des produits laitiers puisqu'elles ne présentent aucun risque de propagation et de transmission

des déterminants de la résistance aux antibiotiques dans les matrices alimentaires et dans le tractus gastro-intestinale (**Teuber *et al.*, 1999; Ammor *et al.*, 2007**).

Les bactéries lactiques participent à la production et la conservation des aliments fermentés et des aliments destinés aux animaux, elles sont soit ajoutées entant que ferments ou probiotiques. Toutefois, ces bactéries peuvent servir de réservoirs de gènes de résistance aux antibiotiques semblables à ceux trouvés dans les pathogènes humains. Beaucoup d'antibiotiques sont utilisés dans la production laitière pour traiter les mammites, et ils sont excrétés dans le lait des vaches traitées (**Stoltz et Hankinson, 1952 ; Sozzi et Smiley, 1980**);). Les bactéries résistantes sont potentiellement transmissibles à l'homme via les denrées alimentaires (**Châtaigner et Stevens, 2005 ; Fabre *et al.*, 2006**);). La principale menace associée à ces bactéries, c'est qu'elles peuvent transférer des gènes de résistance aux bactéries pathogènes voyant que le tractus gastro-intestinal est un environnement idéal pour le transfert de gènes entre les bactéries de différents types (**Kelly, 2009**).

Conclusion

Conclusion

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire afin d'exploiter leur pouvoir acidifiant et aromatisant (fabrication de fromages). Ces bactéries ont la capacité de synthétiser des substances à effet inhibiteur, ce qui a attiré l'attention des chercheurs dans les dernières années afin de les utiliser comme bio conservateurs et d'augmenter la durée de conservation des denrées alimentaires.

Notre travail nous a permis d'étudier quelques activités d'intérêt technologiques (pouvoir acidifiant et aromatisant) chez sept souches de bactéries ainsi que leur cinétique de croissance lors de leur culture sur milieu lait et la détermination de leur sensibilité vis-à-vis à quatre antibiotiques testés.

Le suivi de la cinétique de croissances a montré que la croissance des entérocoques est optimale dans le lait mais reste faible en comparaison avec les lactocoques.

L'étude de l'activité acidifiante a montré que trois souches LBO1, LBO2 et LBO4 se distinguent de l'ensemble par leur production maximale d'acide lactique, avoisinant les 90°D au bout de 24 heures d'incubation accompagnée d'un abaissement du pH du milieu.

L'étude de l'activité aromatisante a révélé que les citrates sont métabolisés par nos souches d'où la contribution à la synthèse du diacétyle.

Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques ont montré que toutes les souches sont sensibles aux antibiotiques testés (Ampicilline, Érythromycine, Tétracycline et Ceftazidime).

L'évaluation de ces aptitudes va permettre de placer les souches étudiées à l'échelle industrielle pour d'éventuels applications comme agents de transformation ; conservateurs ; capables de participer également dans l'aromatisation des produits laitiers fermentés avec un caractère sûr vu qu'elles ne présentent aucun risque de propagation des gènes de résistance aux antibiotiques.

Références bibliographiques

- Aibeche, A & Bellounes, N. (2020). Etude du pouvoir protéolytique des bactéries lactiques, mémoire de master. Université Djilali Bounaama -Khemis Miliana, Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre Département de biologie, 44p.
- Albenzino, M., Corbo, M.R., Rehman, S.U., Fox, P.F., De Angelis, M., Corsetti, A., Sevi, A., Gobetti, M. (2001). Microbiological and biochemical characteristics of Cane Strato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *International Journal of Food Microbiology*. 67, 35–48.
- Ammor M S, Flórez A B, Van Hoek A H, De Los Reyes-gavilán C G, Aarts H J, Margolles A, Mayo B. 2007. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 14(1-3),6-15
- Ammor M.S. et Mayo B., 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science*. 76 : 138-146.
- Amouzou K S., Prevost H., Divies G.R., 1985 - Effect of magnesium supplementation of milk on lactic fermentation by streptococcus lactic and streptococcus thermophilus. *Lait*: 65: pp 21-34.
- Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Coccagn-Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M., 2008. Métabolisme et ingénierie métabolique. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 271-447.
- Atlan S, 2007. Modélisation de la libération des composés d'arôme à partir de matrices alimentaires dans des systèmes expérimentaux et en détermination des propriétés et des mécanismes de transfert de matière. Thèse doctorat. Agro Paris Tech 202p
- Ayachi A, Benziane O, Benlaiter A. (2022). Isolement et identification des nouvelles souches lactiques productrices de bactériocines à partir d'un produit laitier traditionnel (leben) à la région de M'Sila. Université Mohamed Boudiaf M'Sila

- Badis A, D. Guetarni, M. Kihal et M.W. Naceur., 2004. Etude physiologique des bactéries lactique isolées du lait cru de chèvre de la race Ouled Djellal. Journal algérien des zones arides. PP: 15-19.
- Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, 23: 30-37
- Baron M, 1998. Étude de l'impact de l'ajout des bifidobactéries sur les cinétiques de fermentation des bactéries lactiques mésophiles utilisées dans la production de fromage frais. Thèse de maîtrise. Université Laval, Québec. 108p
- Belhamra, Z. (2017). Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires, Thèse Doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 147p.
- Belkheir, K. 2017. Caractérisation technologique de nouvelles souches de bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle d'Algérie. Réalisation de ferments lactiques. Thèse de doctorat, Université d'Oran 1.
- Boukerouaz, A et Benhehidi R, 2017. Profil bactériologique des bactériémies à bacilles Gram négatif. Mémoire de Master en Microbiologie générale et Biologie moléculaire des microorganismes. Université des Frères Mentouri Constantine.
- Boullouf, A. (2016). Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel Bouhezza, thèse de Magister. Université des frères Mentouri Constantine, institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A.), 135p.
- Boutrou, R., Sépulcre, A., Gripon, J. C., Monnet, V. (1998). Simple tests for predicting the lytic behaviour and proteolytic activity of lactococcal strains in cheese. *Journal of dairy science*. 81, 2321-2328.
- Boyaval P., Terré S et Corre C., 1988 - Production d'acide lactique à partir de perméat de lactosérum par fermentation continu en réaction à membrane lait : 1: pp 65-84.
- Buchanan, R. E. (1918). Life phases in a bacterial culture. *Journal of Infections diseases*. 98, 1271-1273.

Références bibliographiques

- Caplice, E. T. Fitzgerald, G. (1999) food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation international journal of food microbiology. 50(1-2). 131 -149.
- Châtaigner B. et Stevens A., (2005). Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à Dakar, Institut Pasteur de Dakar, 9 p. conservation of fermented foods. Trends in Food Sci. Technol., 22: 509-516.
- Chengappa, M. M., (1990). Antimicrobial agents and susceptibility testing, in Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology, Academic Press. p. 479-492.
- Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G. & Ledda, A. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. Journal of Dairy Research, 64, 409-421.
- Comité de l'antibiogramme-Société française de microbiologie, communiqué. (2012). http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/Casfm_2012.pdf.
- Corrieu G., Luquet F M., 2008 - bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Ed. Lavoisier. Paris. France : pp 472 -676.
- Corrieu G., Luquet, F. M. (2008). Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Lavoisier, deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». Sci. Technol 23: 30-37.
- De Roissart, H. B et Luquet, F. M. (1986). Les bactéries lactiques, T1. Lorica, Lavoisier (Ed.).
- De Vuyst, L, L. ET Vandamme, E. J (1994) bacteriocins of lactic bacteria: microbiology, genetics and applications blackie academic and professional. 191-142.
- Desmazeaud M. J. 1983 - L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. Le Lait, 63, 629-630 : 267 - 316.
- Doleyres, y., (2003). Production en continu de ferments probiotiques par la technique des cellules immobilisées. Faculté des études supérieures de l'université de Laval Quebec Pp :5-8 765 : 1-87. 977 - A synthetic medium for comparative nutritional studies of Lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. Vol 42: pp123-133. Agents, 35: 255-260.

- Dortu, C. (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaire. Thèse de doctorat en science agronomique et ingénierie biologique .Université de Gembloux .
- Dortu, C. et Thonart, P., (2009). « Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiqueset intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires ». Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 13 : 143-154.
- Drider D., Prevost H., 2009 - Bacteries lactique Physiologie, Métabolisme, Génomique et Application industrielle. Ed, Economisa 49 rue Harica 75015 Paris : pp 381- 427.
- Eberlin T., and Renaud F., (1994). Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. In Manuel de bactériologie clinique. Edition Scientifiques Elsevier. p. 431-452.
- El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El-Mecherfi, K.E., Bazukyan, I., Choiset, I., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y. G., Kuliev, A. A., Mozzi, F., Chobert, J. M., Haertlé, T. (2011). Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. Trends in Food Sci. Technol., 22: 509-516.
- European Food Safety Authority (2008). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. EFSA Journal, 765 : 1-87.
- Fabre J-M., Petit C. et Bosquet G., (2006). Extrait du livre : Comprendre et prévenir les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale.
- Federighi, M. (2005). Bactériologie Alimentaire compendium d'hygiène des aliments.2ème Edition, Economica. 292 pages.
- Geoffrey C.P. (2011): Food Science and Technology. Ed: John wiley & Sons. USA. P 520.
- Gollop N., Zakin V et Weinberg Z.G., (2005). Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and treated with these inoculants. Jouanal of Applied Microbiology 98, 662-666.
- Hadef S. (2012). Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de Magister. Université Kasdi Merbah Ouargla.

- Haertlé, T. (2011). Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented food .Trends in food sci. technol, 22, 509-516
- Hamidi, C. (2017).Isolement et pré-identification des bactéries lactiques du lait de chèvre et de chamelle de wilaya de LAGHOUAT. Université Dr Tahar Moulay Saida
- Hannon, J., Wilkinson, M., Delahunty, C., Wallace, J., Morrissey, P. & Beresford, T. 2003 Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. International Dairy Journal, 13, 313-323.
- Harvey (R. J.) and Collins (E. B.) (1961). Role of citritase in acetoin forma- tion by Streptococcus diacetylactis and Leuconostoc citrovorum. J. Bacte- riol., 82, 954-959.
- Harvey R. J et Collins E. B, 1963. The citratase of Streptococcus diacetylactis. Substrate Products and Equilibrium. J. Biol. Chem., 238, 2648-2653
- Hassan A. N. and Frank J. F. 2001. Starter Cultures and their use. Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J. L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.
- Hugenholtz J., Sybesma W., Groot M. N., Wisseelink W., Ladero V., Burgess K., Vansinderen D., Piard J.C., Eggink G.J., Smid E., Savoy G., Sesma F., Jansen T., Hols P., (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. Antonie Van Leeuwenhoek, vol. 82, p. 217-235.
- Imbert M., Bondaue R., 1998 - On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically de fined medium. Curr. Microbiol. 37: pp 64-66.
- Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington JA. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. Dans : Murray PR, Pfaller MA, Tenover FC, Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC, ed. Manual of clinical microbiology, 7 th ed. Washington, DC: ASM Press; 1999: 1526-1543.
- Kahina. M, (2012). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique Leuconostoc pseudomesenteroides isolée du boza. Bactériologie. Université Pierre et Marie Curie – Paris VI
- Kandler O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 49: 209-224

- Kelly B. G., Vespermann A. et Bolton D. J., (2009). Gene transfer events and their occurrence in selected environments. *food and chemical toxicology*. 47, 978-983.
- Khuntia A et Chaudhary L.C., (2002). Performance of male crossbred calves as influenced by substitution of grain by wheat bran and the addition of lactic acid bacteria to diet. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 15, 188-194
- King, N. (1948). Modification of Voges-Proskauer test for rapid colorimetric determination of acethyl methyl carbinol plus diacetyl in butter. *Dairy Industry*. 13, 860-866.
- Klaenhammer, T. R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70: 337- 349.
- König, H., Fröhlich, J. (2009). Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine.
- Kunji E.R., Mierau I., Hagting A., Poolman B. and Konings W. N., 1996. The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:187–221.
- Larpent J.Pet M. Larpent-Gourgaud., 1997. *Mémento technique de microbiologie*. 3ème édition. ED : Tec et Doc, Lavoisier, Paris.PP: 76-492.
- Law J. et Haandrikman A. 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J*. 7: 1-11.
- Ledesma O V., De Ruiz Holgado A P., Olivier G., De Giori G S., Raibaud P., Galpin J V., 1977 - A synthetic medium for comparative nutritional studies of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol*. Vol 42: pp123-133.
- Lenoir J., Hermier J., Weber F., 1992 - Les groupes microbiens d'intérêt, Ed Cidil : pp 30-50.
- Letrot C., Juillard V., 2001 - Development of a minimal chemically. Defined medium for the exponential growth of streptococcus thermophilus. *J. APPL. Microbiol*: 91: pp 1023-1029.
- Leveau J. Y. et Bouix M., 1993. *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel*. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 85-87.
- Luquet F M., 1986 - Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre, T3., qualité, énergie et tables décomposition). Ed .Technique et Documentation. Paris : pp 343- 442
- Luquet F. M. et Corrieu G., 2005. *Bactéries lactiques et probiotiques*. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3-37.

- Maria E., Hans L., Johan O., Stefan R. (2010). Transferability of tetracycline resistance gene from probiotic *Lactobacillus reuteri* to bacteria in the gastrointestinal tract of humans. *Antonie van Leeuwenhoek*. 97, 189-200.
- Marth, E. H. et Steele, J. L. (2001). *Applied dairy microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Mathur S. and R. Singh, 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria: a review *International Journal of Food Microbiology*, 105,281-295.
- Menad, N. (2018). Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis à vis de salmonella sp.thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie ,196p.
- Mkrtchyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K. (2010). Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an *antimicrobial* peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents*., 35: 255-260
- Molin. G. (2008). *Lactobacillus plantarum* the Role in Foods sand in Health. In the Handbook of Fermented Functional Foods. Second Edition EDITED By Edward R. Farnworth.CRC.
- Moraes, M. P., Perin, L. M., Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., Nero, L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *Food Sci.Technol.*, 43: 1320-1324
- Negadi, N.-E, & Mekelleche, A. (2017). Isolement et identification de certaines souches de bactéries lactiques de lorge de la région de Hadjadj (Wilaya de Mostaganéme), mémoire de master. Université abdelhamid ibn badis mostaganem faculté de science de la nature et de vie, 74p.
- Nieto-Arribas P, Seseña S, Poveda JM, Chicón R, Cabezas L, Palop L. Enterococcus populations in artisanal Manchego cheese: biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiol*. 2011 Aug;28(5):891-9. doi: 10.1016/j.fm.2010.12.005. Epub 2010 Dec 25. PMID: 21569931.

- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Chicón, R., Cabezas, L. & Palop, L. 2011. Enterococcus populations in artisanal Manchego cheese: biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiology*, 28, 891-899.
- Ninane V., Mukandayambaje R. et Berben G., (2009). Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *Biotechnol Agron Soc Environ*. 13(3) : 459–466
- P PILET M.F., Magras C., Federigh M., 2005. Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.
- Pandey A., Bringel F., Meyer J M., 1994 - Iron requirement and research for siderophores in lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*: 40: pp 735-739 Paris.
- Perreten V., Kollöffel B., Teuber M., (1997). Conjugal transfer of Tn916-like transposon TnF01 from *Enterococcus faecalis* isolated from cheese to other Gram-positive bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. 20, 27-38.
- Pilet M.F., Magras C., Federigh M., 1998. Bactéries lactiques. In : Manuel de bactériologie alimentaire (Sutra L., Federighi M., Jouve J.L.). Polytechnica. Paris. 235-260.
- Rakhis, S., & Ladjal, H. (2016). Etude de quelques propriétés probiotiques des quelques souches *Lactobacillus* isolées de lait chamelle et de chèvre, mémoire de master. Université Abd El Hamid Ibn Badis mostaganeme, faculté de science de la nature et de vie, 74p.
- Salawu M.B., Warren E.H et Adesogan A.T., (2001). Fermentation characteristics, aerobic stability and ruminal degradation of ensiled pea/wheat bi-crop forages treated with two microbial inoculants, formic acid or quebracho tannins. *Journal of the science of food and Agriculture* 81, 1263-1268.
- Salminen S., Gorbach S., Yuan-kun Let Benno Y., (2004). Human studies on probiotics : What is scientifically proven today ? In *Lactic Acid bacteria : Microbiological and functional Aspects*. Eds Salminen, S., von Wright, A. and Ouwerhand A., New York Dekker M. pp 515-530.

- Salyers A.A., Gupta A., Wang Y., (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.* 12, 412-416.
- Schmidt. J. L, Tourneur. C, et Lenoir. J, 1994 : Fonction et choix des bactéries lactique laitières in « bactéries lactique ». Vol II. Ed. Loriga, paris, pp 37 .
- Seitz (E. W.), Sandine (W. E.), Day (E.A.) and Elliker (P. R.) (1961). Studies on factors affecting diacetyl production by *Streptococcus diace tilactis*. *J. Dairy Sci.*, 44, 1159.
- Siegumfeldt H., Rechinger K. B. et Jakobsen M. 2000. Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2330-2335.
- Sozzi T. et Smiley M. B., (1980). Antibiotic Resistances of Yogurt Starter Cultures *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*, *Applied and environmental microbiology*, 40(5) :862-865. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Stoltz E. I. et Hankinson D. J., (1952). Antibiotics and Lactic Acid Starter Cultures, Department of Dairy sur des matrices alimentaires Wallonie-Europe. Doctorat : 155
- Tamime A.Y., 2002. Microbiology of starter cultures. In: *Dairy microbiology handbook* (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.T
- Teuber M, Meile L, Schwarz F. 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76(1-4): 115-137. the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *EFSA Journal*,
- Thompson J. et Gentry-Weeks C. R., 1994, Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : *Bactéries lactiques*. Edited by H De Roissart, & F. M Luquet. 239-290.
- Vaillancourt K., Moineau S., Frenette M., Lessard C. and Vadeboncoeur C., 2002 -Galactose and Lactose Genes from the Galactose-Positive Bacterium *Streptococcus salivarius* and the Phylogenetically Related Galactose-Negative Bacterium *Streptococcus thermophilus*: Organization. Sequence. Transcription. and Activity of the gal Gene Products. *Journal of Bacteriology*: 184: pp 785-793.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. and Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* 60 : 407

- Wang H.H., Manuzon M., Lehman M., Wan K., Luo H., Ittum T.E., (2006). Food commensal microbiol. Lett. 254, 226-231.
- Weinberg Z.G., Muck R.E., Weimer P.J., Chen Y et Gamburg M., (2004). Lcatic acid bacteria used in inoculants for silage as probiotics for ruminants. Applied Biochemistry and biotechnology 118, 1-9.
- Wildman R. E. C., (2007). Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods, Second Edition, CRC Press .
- Wisselink H.W., Weusthuisn R. A., Eggink G., Hugenholtz J., Grobber G.J. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria. A review. International Dairy J, vol.12, p. 151-161. Y
- Wood BJ B. et Holzapfel W H (éditeur), 1995 - The Lactic acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria 2nd Ed, Blackie Academic and Professional London: 2: pp 40-90.
- Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R., (2008). « Isolationof lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk ». Int. J. Dairy Sci., 3 : 194-199.
- Yvon M., 2008. Métabolisme et ingénierie métabolique In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 271 - 477.

Annexes

- **Milieu MRS (pH 6.2)**

Peptone	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure	..5g
Glucose	20g
Tween 80.....	1ml
Phosphate bipotassique.....	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium,	0.2g
Sulfate de manganèse.....	0.5g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml
Autoclavable à 120°C pendant 20 min	

- **Milieu lait** : lait écrémé stérile (UHT) commercialisé sous le nom de Candia Silhouette

- **Réactifs** :

α -naphtol à 1% (préparé dans de l'alcool absolu)

α -naphtol	1 g
Éthanol absolue	100 ml

Hydroxyde de sodium (NaOH) à 1/9 N

Hydroxyde de sodium.....	4,44 g
Eau distillée	1000 ml

Hydroxyde de potassium à 16%

KOH	16 g
Eau distillée	100 ml

Acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA à 1 %)

EDTA1g

Eau distillée100 ml

• **Protocole de la coloration de gram :**

La coloration de Gram a été réalisée selon le protocole décrit par (**Joffin et Leyral, 2006**).

- Réaliser un frottis bactérien et le fixer.
- Colorer au violet de gentiane durant environ 1 min.
- Laver à l'eau distillée.
- Faire agir la solution de Lugol durant environ 30 secondes.
- Laver à l'eau distillée.
- Faire agir l'éthanol à 10 secondes ou faire couler l'éthanol sur la lame jusqu'à la décoloration.
- Laver à l'eau distillée.
- Colorer à la fuchsine de quelques secondes à 1 min selon sa concentration.
- Laver à l'eau distillée.
- Observer après séchage à l'immersion (objectif x100) et à pleine lumière.

Les bactéries à Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement à celles à Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.