

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie Alimentaire Santé



Réf

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Isolement de souches de
lactobacilles performantes**

Présenté par :

BENNAI Tiziri & TEMINE Sara

Soutenu le : 20 juin 2017

Devant le jury composé de :

Mme. BENDALI F.

MCB

Présidente

Mme. FARADJI S.

MCA

Promotrice

Mme. IDRES N.

MAA

Examinatrice

Année universitaire :2016/2017

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience pour accomplir ce modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre promotrice M^{me} FARADJI pour sa gentillesse et sa sympathie, ses précieux conseils et son aide et assistance durant toute la période du travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury, BENDALI Farira et IDRES Nacera, pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À mon frère ARIS et mes sœurs NIMAD et la petite benjamine RANIA qui m'ont soutenu tout au long de mon cursus.

À mon très cher mari NABIL. Tes sacrifices, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance.

À toute ma famille, ma belle famille, à ma binôme TIZIRI, à mes amies HOUDA et SISSA et toute la promotion 2017 de microbiologie alimentaire et santé.

À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

SARA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

Aux deux personnes qui comptent le plus pour moi, à ceux qui m'ont soutenu tout le long de ma vie et de mes études, à mes chers parents.

Que Dieu leur procure bonne santé et longue vie.

À ma sœur Dilia, mes frères Micipssa et Aris qui m'ont soutenu pendant tout ce temps.

À toute ma famille, mes amis, ma binôme Sara et toute la promotion 2017 de microbiologie alimentaire et santé.

Et à tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin, je vous dis merci.

TIZIRI

Liste des abréviations

E: *Escherichia*.

FAO: Food and Agriculture Organization.

GRAS: Generally Regarded As Safe.

GC%: Pourcentage en Guanine et Cytosine.

Lb: *Lactobacillus*.

MRS: de Man- Rogosa et Sharp.

S: *staphylococcus*.

sp: species.

ssp: Sub-species.

Liste des figures

Figure n°	Titre	Page
1	Schéma illustratif des étapes de l'isolement.	13
2	Série de tubes ensemencés.	17
3	Test de la thermorésistance.	18
4	Etude du pouvoir protéolytique.	19
5	Schéma de la réalisation du test des spots.	21
6	Aspect macroscopique des isolats bacilles sur gélose MRS.	22
7	Aspect d'une culture pure dans un milieu liquide.	23
8	Aspect microscopique de quelques isolats de forme bacille.	24
9	Exemple d'un résultat négatif du test de catalase.	24
10	Test de production de gaz.	26
11	Exemple de résultat positif du test de fermentation des sucres.	27
12	Résultat de la thermorésistance.	31
13	Exemple positif d'activité protéolytique	32
14	Exemple d'absence d'activité protéolytique (d'absence de zone claire)	33
15	Résultats de l'activité protéolytique	34
16	Aspect des pathogènes sur milieu solide (A) et liquide (B).	35
17	Exemple de résultats positifs du test de spots.	36
18	Résultats de l'activité antibactérienne.	36

Liste des figures en annexe I

Figure n°1	Titre
1	Schéma succinct des principales voies métaboliques des lactobacilles.
2	Standardisation des inocula des souches de <i>Lactobacillus</i> .
3	Standardisation des inocula souches pathogènes.

Liste des tableaux

Tableau n°	Titre	Page
I	Quelques espèces de lactobacilles utilisées en industrie laitière	7
II	Origine des souches pathogènes	12
III	Résultats de l'étude microscopique et du test de la catalase des isolats retenus	25
IV	Profile fermentaire des isolats	28
V	Résultats du test de croissance à différentes températures	29
VI	Résultats du test de croissance à différents pH	30
VII	Résultats du test de croissance à différentes concentrations de NaCl	31
IIIX	Résultats de la thermorésistance.	32

Liste des tableaux en annexe II

Tableau n°	Titre
I	Origine des échantillons.
II	Caractéristiques physiologiques des souches isolées.
III	Diamètre des zones protéolytique des souches isolées.
IV	Aspect microscopique des souches pathogènes.
V	Résultats de la standardisation des souches de bactéries testées.
VI	Résultats de la standardisation des souches cibles.
IIIX	Diamètres de zones d'inhibition des 15 souches isolées vis-à-vis des souches pathogènes (test des spots).

Partie I : Synthèse bibliographique

Introduction..... 1

1.Description générale des bactérielactiques2

2. Les Lactobacilles..... 3

 -2.1. Généralités 3

 -2.2. Caractères morphologiques et culturaux..... 4

3. Exigences nutritionnelles 5

 -3.1. Exigences en vitamines 5

 -3.2. Exigences en bases azotés..... 5

4. Caractères biochimiques et physiologiques 5

5. Identification des lactobacilles 7

6. Propriétés et critères de sélection des lactobacilles à potentiel probiotique et technologique 7

 -6.1. Pouvoir antimicrobien..... 7

 -6.2. Effet probiotique 9

 -6.3. Rôle des lactobacilles dans l'industrie agroalimentaire9

7. Les lactobacilles comme agents contaminants des aliments 10

8. Les lactobacilles dans la bioconservation des aliments..... 11

Partie II : Partie pratique

Chapitre1: Matériel et méthode

1.Objectif et lieu de travail.....	12
2. materiels biologiques.....	12
3. Isolement et purification des isolats	12
4. Identification	14
4.1. Caractères morphologiques et culturaux	14
4.2. Caractères biochimiques :	14
-4.2.1.Test catalase.....	14
-4.2.2. Production de gaz.....	15
-4.2.3. Fermentation des sucres	16
4.3. Caractères physiologiques.....	17
4.3.1Croissance à différentes températures.....	17
-4.3.2. Croissance à différents pH.....	17
-4.3.3. Croissance en présence de différentes concentrations de Na Cl	17
4.4. Caractères technologiques.....	18
-4.4.1. Thermorésistance	18
-4.4.2. Activité protéolytique	18
-4.4.3. Activité antibactérienne	19

Chapitre 2 : Résultats et discussion

1. Isolement et purification.....	22
2. Identification	22
2.1. Etude des caractères morphologique et culturaux	22
-2.1.1. Aspect macroscopique des lactobacilles	22
-2.2.2. Aspect microscopique	23
2.2. Caractère biochimique.....	24

-2.2.1. Test catalase	24
-2.2.2. Production de gaz.....	26
-2.2.3. Fermentation des sucres	27
2.3. Caractères physiologique	28
-2.3.1. Croissance à différentes températures	28
-2.3.2. Croissance à différents pH	29
-2.3.3. Croissance à différentes concentration de NaCl	30
3. Caractères technologiques.....	31
-3.1. Etude de la thermorésistance.....	31
-3.2. Activité protéolytique	32
-3.3. Activité antibactérienne.....	34
-3.3.1. Observation macroscopique des souches pathogènes	35
- 3.2.2. Observation microscopique des souches pathogènes	35
-3.3.2. Standardisation des inocula.....	35
Conclusion et perspectives.....	39

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

De nos jours, la fermentation lactique est une activité grandissante tant industrielle qu'artisanale. Plusieurs microorganismes participent à la fabrication de produits laitiers fermentés (**Johnson et Steele, 2001**).

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation des aliments (**Chammas et al., 2006 ; Zamfir et al., 2006**), car elles sont généralement reconnues comme étant saines, de statut "GRAS" (**Generally Recognized As Safe**) (**O'Sullivan et al., 2002**).

Dans l'industrie laitière, les souches lactiques sont sélectionnées sur la base de leur propriétés technologiques (production d'acide lactique, production d'arômes, activité protéolytique et cinétique de croissance), et leur caractéristiques fonctionnelles (activité antibactérienne) (**Tamime, 2002 ; Molin, 2008**). Ce qui permet de satisfaire les besoins de point de vue sanitaire en industrie alimentaire et d'inhiber la prolifération des microorganismes pathogènes (**Ross et al., 2002**).

Les lactobacilles sont ajoutés dans le but d'accélérer le processus de fermentation, d'améliorer les qualités organoleptiques et de réduire les accidents de fabrication (**Larpent et Bourgeois, 1989**).

Des efforts considérables ont été consacrés pour affermir la compréhension de la physiologie, de la biochimie et de la génétique des bactéries lactiques (**Bourel et al., 2001 ; Djadouni et Kihal, 2013**). Toutes ces recherches ont permis aux microbiologistes et aux industriels de sélectionner les meilleures souches et d'améliorer le rendement de la productivité, la qualité, et la sécurité des produits finis.

Notre travail s'inscrit dans ce contexte qui consiste à isoler des souches de lactobacilles à partir de différents produits laitiers et d'étudier quelques caractéristiques morphologiques, culturales et biochimiques et d'en sélectionner les souches les plus performantes en étudiant leurs croissance à différents pH et à différentes concentrations de NaCl, leur propriétés protéolytiques et antibactériennes.

1. Description générale des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimiotrophes (**de Roissart et Luquet ,1994**). Elles sont ubiquistes, sont retrouvées dans différentes niches écologiques, et peuvent être isolées de certains aliments tel que le lait et le fromage (**Hogg, 2005**).

Ce groupe de bactéries a été défini par Orla-Jensen (1919) et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Leveau et Bouix, 1993**).

Du fait des exigences nutritionnelles des bactéries lactiques, leurs milieux de cultures doivent être riches en sucres, en matières azotées et facteurs de croissance (acides aminés, peptides et vitamines) (**Aguirre et Collins, 1993 ; Federighi et al., 2005**).

Selon le type de fermentation préférentiellement utilisée, les bactéries lactiques sont dites :

homofermentaires ou hétérofermentaires (**Leveau et Bouix ,1993 ; Sutra et al ., 1998 ; Federighi et al., 2005**)

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, oxydase négative, généralement nitrate réductase négative. Leur capacité de biosynthèse est faible, elles sont anaérobies facultatives : microaérophiles, elles sont capables de réaliser la fermentation en anaérobiose comme en aérobiose (**Leveau et Bouix ,1993 ; de Roissart et Luquet, 1994**).

Du point de vue phylogénétique, les bactéries lactiques ont un pourcentage de G+C% inférieur à 55% (**Federighi et al., 2005**).

Selon le Bergey's manuel de la taxonomie (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des *Firmicutes*, la classe des *Bacilli* et ordre des *Lactobacillales* et renferment trente-cinq genres (**Devos et al., 2009**).

Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles forment un ensemble très disparate. (**De Vos et al., 2009**).

2. Les Lactobacilles

2.1. Généralités

L'historique de *Lactobacillus* (*Lb*) commence par la proposition de ce genre par Beijerinck (1901). Ensuite Horla-Jensen (1919) avait proposé de classer les espèces de ce genre, selon leurs métabolismes et leurs température de croissance, en trois sous genres (**Holzpfel et al., 2001 ; Gatti et al., 2004**). Néanmoins, les travaux de taxonomie et de la phylogénétique menés par Kandler et Weiss (1989) ont poussé la communauté scientifique à abandonné cette classification en sous genres tout en maintenant la subdivision en trois groupes.

Le genre *Lactobacillus* fait partie du phylum des *Firmicutes*, classe des *Bacilli*, la famille des *Lactobacellaceae*, ordre des *Lactobacillales*. Il regroupe des espèces présentant des caractères phénotypiques très hétérogènes, cette hétérogénéité est due à un GC% allant de 32-55% (**Axelsson, 2004 ; Felis et Delaglieo, 2007**).

A partir de 1980, la systématique du genre *Lactobacillus* (*Lb*) a connue beaucoup de modifications (**Felten et al., 1999**).

En 2009 le genre *Lb* a été divisé en sept groupes phélogénétiques : *Lb. casei*, *Lb. debrueekii*, *Lb. buchleri*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. sakei* et *Lb. salivarius* (**Hammes et Hertel, 2009**).

Les lactobacilles présentent le groupe des bactéries lactiques le plus ubiquitaire qui colonisent tous les habitats : cavité buccale, tractus digestif, organes génitaux chez l'homme, produits végétaux, les produits laitiers, poissons marinés ou fumés, produits carnés, sol, eaux usées... (**Federighi et al., 2005**).

L'Homme, les animaux et les plantes sont quotidiennement en contact avec les lactobacilles, soit parce qu'ils sont leurs hôtes naturels, ou parce qu'ils produisent et consomment une gamme étendue d'aliments d'origine animale ou végétale fermentés par les lactobacilles (**de Roissart et Luquet, 1994**).

2.2. Caractères morphologiques et cultureux

Les lactobacilles sont des bactéries asporulées, généralement immobiles, en forme bacille souvent allongées, groupées en paires ou en chaînes (**Laprent, 2000 ; Guiraud et Rosec, 2004**).

Les colonies des lactobacilles sont généralement de petites tailles, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques. Dans les cas rares, certaines espèces comme *Lb. plantarum* donnent des colonies jaunâtres ou rougeâtres. Les lactobacilles cultivent également, bien que plus difficilement, sur gélose enrichie en sang frais ou cuit donnent de petites colonies sans zones d'hémolyse (**Denis et al., 2007**).

Ils sont anaérobies facultatifs, mais poussent mieux sous atmosphère enrichie de 5 à 10% de CO₂ (**Laprent, 2000**), leur pH optimum de croissance est de 5,5 mais ils poussent aussi à pH neutre contrairement à *Carnobacterium*. Leur température optimale de croissance est généralement comprise entre 30 et 40°C, elle est de 37°C pour la plupart des espèces. Néanmoins, une culture peut être observée à des températures allant de 2 à 53°C chez certaines espèces. Le caractère Gram positif peut être perdu dans les cultures âgées (**Collins et al., 2009**).

La longueur des cellules peut varier à l'extrême, allant des formes longues jusqu'au formes coccoïdes. Cette particularité rend parfois difficile la distinction entre les lactobacilles hétérofermentaires et les *Leuconostoc* (**Euzeby, 2006**).

Le milieu de culture et d'isolement de base le plus connu est le milieu Man Rogosa et Sharpe (MRS) (**Guiraud et Rosec, 2004**), sur ce milieu, ils donnent généralement des bacilles longs et fins (parfois légèrement incurvés) ou des coccobacilles isolés ou en chaînette. leur longueur et leur degré de courbure dépend de l'âge de la culture, de la composition du milieu et du taux d'oxygène (**Axelsson, 2004**).

Ces bactéries ont des exigences nutritionnelles complexes, variables d'une espèce à une autre (**de Roissart et Luquet, 1994**).

3. Exigences nutritionnelles

En plus de la source de carbone et d'azote, les lactobacilles sont caractérisés par des exigences nutritionnelles nombreuses qui peuvent être classées selon **(De Man et al., 1960 ; De Vos et al., 2009)** comme suite :

3.1. Exigences en vitamines

Toutes les espèces ont un besoin absolu en vitamine. Les déficiences en vitamines (B12) peuvent induire une diminution à la synthèse de l'ADN et entraîner des changements morphologiques et les cellules deviennent filamenteuses. Une telle élongation cellulaire a été observée avec *Lb. helveticu sssp jugurti* lors de déficience en cobalamine (B12) ou en acide folique **(De Man et al., 1960 ; De Vos et al.,2009)**.

3.2. Exigences en bases azotés

Les ions Mg^{2+} ou Fe^{2+} sont nécessaires pour la croissance de *Lb*. Il a été démontré que le manganèse et le magnésium interviennent comme activateurs d'un grand nombre de réactions enzymatiques et comme stabilisateur de la structure des acides nucléiques, de l'intégrité des ribosomes et de la membrane cellulaire de *Lb* **(De Man et al., 1960 ; De Vos et al., 2009)**.

4. Caractères biochimiques et physiologiques

Le métabolisme énergétique des lactobacilles est exclusivement saccharolytique et le lactate, généralement non fermenté, représente au moins, 50% des métabolites finaux produites à partir des sources de carbone assimilées **(Hammes et Hertel, 2009)**.

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes **(Guiraud et Rosec, 2004)** :

Groupe I : comprend les espèces homofermentaires obligatoires thermophiles, qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Produisent uniquement de l'acide lactique à partir du glucose et qui sont incapables de fermenter les pentoses ou le gluconate. Ce groupe est constitué majoritairement d'espèces présentes chez l'homme et les animaux et qui participent à l'équilibre de la microflore de l'organisme.

Partie I: Synthèse bibliographique

Groupe II : ce sont des espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capable d'utiliser la voie hétérofermentaire à partir du glucose, dans certaines conditions comme une concentration du glucose limitée.

Ces lactobacilles sont mésophiles qui se développent à 15°C et comportent l'espèce *Lb. casei* qui est également le lactobacille dominant du lait.

Groupe III : comprend les Lactobacilles hétérofermentaires obligatoires qui forme des quantités équimolaires de CO₂, d'acide lactique et acétique et /ou éthanol

Ce groupe rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, dont certaines font partie de la flore des levains de panification (**Guiraud, 2003 ; Guiraud et Rosec, 2004 ; Federighi et al., 2005; De vos et al., 2009**). La figure1, annexe I illustre les principales voies métaboliques des lactobacilles.

Dans les conditions standards les espèces de ce genre sont anaérobies facultatives ou aérotolérantes. Elles sont catalase négative à l'exception de *Lb. kunkeei*, et quelques souches de *Lb. mali*, mais possèdent une peroxydase, leur permettant de pousser en présence d'O₂ (**Amantidou et al., 2001**).

Ces caractères biochimiques sont fortement influencés par les conditions de culture. Ainsi, en présence d'hème (gélose au sang) certaines espèces de *Lb* peuvent synthétiser une vrai catalase et tous les cytochromes de la chaîne respiratoire, tout en se comportant comme des aérobies-anaérobies facultatives (**Coudeyras et al., 2008**) (**TableauI**).

Partie I: Synthèse bibliographique

Tableau I : Quelques espèces de lactobacilles utilisées en industrie laitière (**Kandler et Weiss, 2013**)

Espèces	Fermentation du lactose	croissance		
		A 15°C	A 45°C	
<i>Lb.helveticus</i>	Hmofermentaire	-	+	Thermophile
<i>Lb.acidophilus</i>		-	+	
<i>Lb.casei</i>		+	-	Mésophile
<i>Lb.brevis</i>	Hétérofermentaire	+	-	
<i>Lb.fermentum</i>		-	+	Thermophile

5. Identification des lactobacilles

L'identification d'espèce de *Lb* peut être difficile à réaliser par les méthodes biochimiques en raison du très grand nombre d'espèces existantes. Elle repose essentiellement sur des tests de fermentation des sucres.

La galerie APIC50 CH avec l'utilisation du milieu pour *Lb*, est la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable (**de Roissart et Luquet, 1994 ; Ozgan et Vural, 2011**).

L'utilisation des outils de taxonomie moléculaire comme hybridation quantitative ADN/ADN et le séquençage des gènes d'ADNr 16s ont permis de lever des ambiguïtés et de nommer précisément les espèces de *Lb* d'intérêt en santé et en alimentation humaine (**Délaglio et Felis, 2005**).

6. Propriétés et critères de sélection des lactobacilles à potentiel probiotique et technologique

6.1. Pouvoir antimicrobien

Les lactobacilles, peuvent produire des substances antimicrobiennes, actives *in vivo* et *in vitro* vis à vis des pathogènes. Ces substances sont les acides organiques (acide lactique,

Partie I: Synthèse bibliographique

acide acétique et le diacétyle), le peroxyde d'hydrogène et des substances de nature protéiques appelées bactériocines (Servin, 2004).

➤ **Production d'acides organiques**

Les lactobacilles sont les microorganismes les plus fréquents pour la production d'acide lactique (Djdel, 2007).

Les acides lactiques et acétiques sont produits lors de la fermentation lactique. Leurs activités antimicrobiennes contre les germes pathogènes s'expriment de deux manières:

Le premier effet de l'acide lactique correspond à une diminution du pH, qui est préjudiciable à de nombreux microorganismes, le second effet est lié aux activités spécifiques dissociés et non dissociés des acides organiques (Raibaud, 1994).

➤ **Production de H₂O₂**

Le H₂O₂ est un agent majeur de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques, en particulier celle de *Lb*, son effet inhibiteur peut s'exercer même sur les bactéries à catalase positive comme *Pseudomonas aerogenosa* et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Ammor, 2004).

Le principal effet antimicrobien du H₂O₂ est la contribution au blocage de la glycolyse. (Ouwehaud et Vesterlund, 2004 ; Zalan et al., 2010).

➤ **Dioxyde de carbone (CO₂)**

La formation de CO₂ crée un milieu anaérobie et son accumulation dans la bicouche lipidique provoque un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire. Les bactéries à Gram négatif sont plus sensibles au CO₂ que les bactéries à Gram positif (Ouwehaud et Vesterlund, 2004 ; Zalan et al., 2010).

➤ **Production de bactériocines**

Le mode d'action des bactériocines de *Lb* est bactericide et leur spectre d'activité est restreint à des espèces voisines (Leveau et Bouix, 1993).

Partie I: Synthèse bibliographique

Les bactériocines agissent généralement sur la membrane cytoplasmique par la formation des pores membranaires (**Luquet et Courrieu, 2005**).

6.2. Effet probiotique

Les bactéries lactiques sont utilisées dans de nombreuses fermentations et les lactobacilles qui sont souvent cités pour leur caractère non pathogène, leur absence de toxicité, ... (**Leveau et Bouix, 1993**).

-Il ressort de certaines études de la diarrhée des voyageurs, que la souche *Lb. GG* est efficace en prévention des diarrhées survenant chez les touristes (**Fedorak et Madsen, 2004**).

Dans la diarrhée associée aux antibiotiques, il y'a une forte évidence d'efficacité pour *Lb. rhamnosus GG* chez l'adulte et l'enfant avec thérapie antibiotique (**FAO/OMS, 2001, 2002**).

- L'ingestion de lait contenant *Lb. acidophilus* par des personnes intolérantes au lactose améliorerait la digestion chez ces derniers (**Leveau et Bouix, 1993**).

-Les lactobacilles probiotiques inhibent l'adhésion des pathogènes aux cellules intestinales (**Kim et Ho, 2010**). Certains lactobacilles auraient la capacité de bloquer physiquement l'accès des pathogènes aux entérocytes (**Lebeer et al. 2010**).

6.3. Rôle des lactobacilles dans l'industrie agroalimentaire

Les lactobacilles sont très utilisés dans l'industrie, en laiterie, fromagerie, dans la fabrication de choucroutes et interviennent dans les saumures et charcuteries (**Giraud et Rosec, 2004 ; Giraffa et al., 2010**).

➤ Les lactobacilles dans l'industrie laitière

Dans les yaourts *Lb. delbreuckii subssp bulgaricus* forme des peptides utilisés par *Streptococcus thermophilus* qui forme de l'acide formique qui est capable de le stimuler (synergie). L'arôme du yaourt est dû à l'acétaldéhyde formé à partir de thréonine par l'aldolase de *Lb. delbreuckii subssp bulgaricus*. Divers lactobacilles (*Lb.casei*, *Lb.plantarum*...) interviennent pendant l'affinage des fromages (**Giraud et Rosec, 2004; Giraffa et al., 2010**).

➤ Les lactobacilles dans les végétaux fermentés

Le rôle de *Lb* est également important dans les végétaux fermentés. Dans les ensilages, il y'a d'abord intervention des coliformes qui utilisent l'oxygène, puis de leuconostocs et d'enterocoques, enfin de pediocoques et de lactobacilles (*Lb.plantarum*, *Lb.casei*, *Lb.brevis*)

Dans les cornichons, on trouve *Lb.plantarum*, *Lb.brevis* à côté de *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus cerevisiae*. (Giraud et Rosec, 2004 ;Giraffa et al., 2010).

➤ Les lactobacilles dans le vin et le pain

Dans certains pains les lactobacilles homofermentaires et hétérofermentaires (*Lb.delbreuckii*, *Lb.acidophilus*,*Lb.plantarum*...) interviennent à côté des levures.

Dans le vin, les lactobacilles participent à la fermentation malolactique (*Lb.plantarum*, *Lb.brevis*, *Lb.casei*,.....) et à la dégradation de l'acide tartrique : *Lb.plantarum*, *Lb.brevis* (Guiraud et Rosec, 2004; Giraffa et al., 2010).

7. Les lactobacilles comme agents contaminants des aliments

Dans toutes les denrées où la flore lactique est présente, son activité métabolique peut également se manifester par des effets négatifs sur la qualité des aliments du fait des altérations provoquées par la production de métabolites.

Certaines souches de *Lb* hétérofermentaires ont un effet sur la qualité des viandes conservées sous vide, où la production de CO₂ par ces bactéries provoquent des défauts d'aspect (gonflement des conditionnements) (Federighi et al., 2005). Elles provoquent aussi le verdissement des viandes par action de H₂O₂ qui transforme l'hémoglobine en choléglobine.

Dans le cidre, un mauvais gout dû à l'acétate est provoqué par *Lb.brevis*, *Lb.plantarum*, *Lb.mali*... (Guiraud et Rosec, 2004).

8. Les lactobacilles dans la bioconservations des aliments

Beaucoup de travaux ont été menés dans le but de trouver des applications agroalimentaires potentielles de *Lb* douées d'activités antibactériennes.

L'ajout de *Lb. plantarum* FST1.9 au Levin de panification *Saccharomyces cerevisiae*, inhibe la prolifération de *Fusarium culmorum* et *Penicillium roqueforti* ; sur le pain, aussi permet d'obtenir un pain de qualité supérieure et d'une durée de conservation plus longue (**Dalié et al., 2010**).

Dans le domaine des produits laitiers, *Lb rhamnosus* LC705, associé à *Propioni bacterium freudenreichii subsp. shermanii* JS, inhibe la prolifération de *Rhodotorubra* RHO dans le yaourt et augmente de 5 semaines la durée de conservation de ce dernier (**Suomalainen et Mayra-Makinen, 1999**).

L'utilisation de *Lb.plantarum*, *Lb.reuteri* et *Lb.brevis* associées à *Saccharomycess cerevisiae* a permis de diminuer de 50% la quantité du propionate de calcium utilisée comme antifongique dans les produits de panification tout en augmentant de huit jours la durée de conservation du pain (**Grez et al., 2009**)

L'inoculation superficielle de concombre par *Lb. plantarum* CUK501 augmente de huit jours la durée de stockage (**Sathe et al., 2007**). D'un autre côté, *Lb.acidophilus* ATCC 20552 a été proposée comme un bioconservateur de graines de céréales, du fait de son effet antifongique contre *Aspergillus fumigatus* (**Elsanhoty, 2008**).

*Matériel et
méthodes*

1-Objectif et lieu de travail :

L'étude a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie 1 bloc 9 de l'université Abderrahmane Mira Bejaia, durant la période, du mois de Février jusqu'au mois de Mai 2017.

Cette étude a pour objectif d'isoler des souches de lactobacilles et d'en sélectionner les plus performantes.

2. Matériels biologiques

➤ Échantillonnage

L'isolement des souches a été effectué à partir de différents produits laitiers : deux échantillons artisanaux de Lben de chèvre, un échantillon de Lben artisanal de vache, un échantillon de Raib artisanal de vache, un échantillon de lait de vache, fromage frais industriel et un échantillon de fromage artisanal nommé « Alatig »(Tableau I, annexe II).

➤ Souches pathogènes

Les souches pathogènes utilisées appartiennent à la collection du laboratoire LMA. Cinq souches ont été utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne (Tableau II)

Tableau II: l'origine des bactéries pathogènes

Souches	L'origine	Code
<i>Staphylococcus aureus</i>	Lait cru	S 5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Souche de référence	ATCC25922
<i>Proteus sp</i>	Urine	157 BB
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urine	6060 TT
<i>Enterobacter cloacae</i>	Urine	5168 TT

3. Isolement et purification des isolats

➤ Isolement :

L'isolement des souches a été effectué sur le milieu MRS à pH 6,5 incubés à différentes températures pendant 48h à 72h.

1 ml (ou 1g/fromage) du produit a été transféré dans un tube stérile contenant de l'eau physiologique.

Partie II : Matériel et méthodes

À partir de cette solution et à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, des isolements en stries ont été réalisés sur boîtes de Pétri contenant le milieu MRS.

Au terme de l'incubation, un prélèvement d'une colonie de chaque boîte est déposé dans un tube contenant le bouillon MRS puis chaque tube est réincubé pendant 48h (Figure 1).

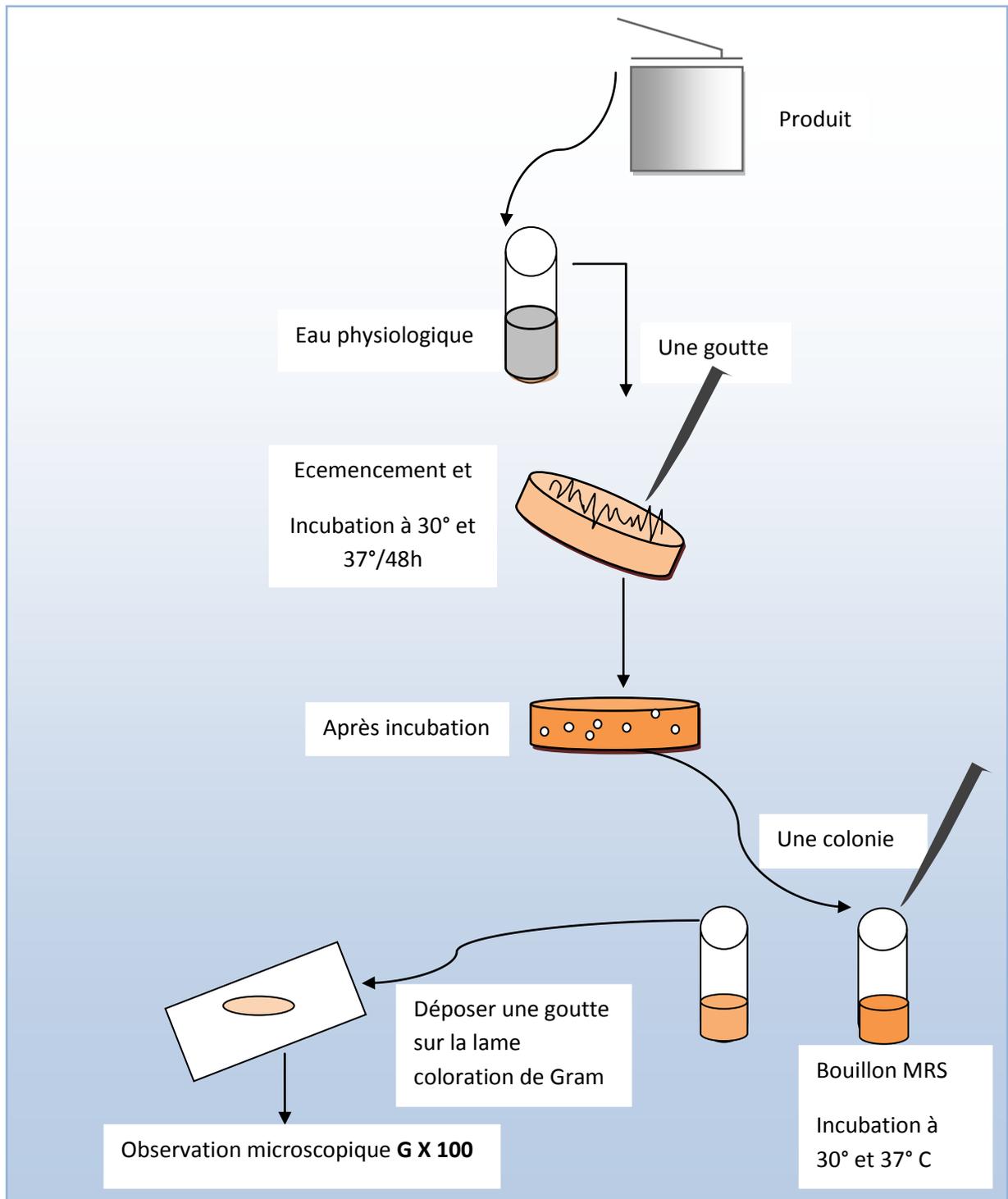


Figure 1: Schéma illustratif des étapes de l'isolement.

➤ Purification :

Des repiquages successifs et alternes bouillon/gélose sont effectués pour purifier les souches et des colorations de Gram sont réalisées afin de vérifier leurs puretés.

Les souches considérées comme pures et qui possèdent les caractéristiques des lactobacilles (petite colonies blanchâtres, Gram +, forme bacilles) sont conservées.

Les souches qui n'ont pas été pures ont été réisolées sur boîte et les mêmes étapes citées précédemment ont été suivies.

Aussi, les cultures purifiées seront conservés pour des études macroscopique et microscopique (coloration de Gram, catalase).

➤ La conservation à court terme :

La conservation des bactéries a été réalisée dans des tubes de gélose MRS inclinée. Après incubation à 30 °C et 37 °C selon leur température optimale de croissance pendant 48h, les tubes sont conservés à +4 °C (Saidi *et al.*, 2002).

4. Identification

4.1. Caractères morphologiques et cultureux

L'étude macroscopique a permis de décrire l'aspect, la forme, le contour, la surface et la couleur des colonies.

Les prélèvements ont été réalisés sur gélose MRS solide pour les lactobacilles. Après coloration de Gram, une observation microscopique a été réalisée afin d'examiner la forme, le mode d'association et le Gram de ces bactéries.

4.2. Caractères biochimiques :

4.2.1. Test catalase

L'enzyme catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée (H₂O₂) qui résulte de l'oxydation mise en évidence par contact de la culture bactérienne avec l'eau oxygénée.

Une goutte de H₂O₂ est déposée sur une lame qui contient une colonie prélevée à partir de la gélose MRS. La décomposition de H₂O₂ est traduite par un dégagement gazeux sous forme de mousse et de bulles, selon la réaction suivante (Guiraud, 2003):



4.2.2. Production de gaz

Le but de ce test est de classer les bactéries selon le type respiratoire ; homofermentaires et hétérofermentaires.

Les tubes de 10ml de bouillon MRS, contenant une cloche de Durham ont été ensemencés avec une colonie bien distincte, puis incubés à 30° et à 37°C pendant 48h.

Au terme de cette étude macroscopique et microscopique seules, les souches à Gram positif de forme bacille et à catalase négative sont retenues pour le reste du travail.

4.2.3. Fermentation des sucres

Les lactobacilles possèdent la capacité de dégrader différentes sources de carbone et ceci constitue un critère indispensable dans l'identification. Le test est réalisé en cultivant les souches (une colonie) dans 2ml de bouillon MRS sans extrait de viande et sans glucose additionné d'un indicateur de pH (le rouge de phénol).

Le glucose est remplacé par le sucre à tester introduit en solution à une concentration finale de 1%. Les carbohydrates utilisés sont : le mannose, le L. arabinose, le fructose, le maltose et le sorbitol. Le choix et le nombre des sucres ont été effectués selon leur disponibilité.

Les solutions de sucres sont préparées en ajoutant 1gramme de sucre dans 100 ml d'eau désalée, ensuite les solutions sont stérilisées au bain marie pendant 30 minutes à 100°C.

Après inoculation du milieu MRS à 1% de sucre, il est recouvert d'une fine couche de l'huile de paraffine afin d'assurer les conditions d'anaérobiose.

Après incubation pendant 48h, la fermentation des sucres se traduit par un trouble du milieu accompagné par le virage de couleur du pourpre vers le jaune. Dans le cas

d'absence de virage de couleur, on en déduit que le sucre testé n'est pas fermenté par la souche (Tourneur, 1972; Samelis et al., 1994).

4.3. Caractères physiologiques

4.3.1 Croissance à différentes températures

Ce test permet de distinguer les lactobacilles thermophiles des lactobacilles mésophiles (Man et al., 1960; Leveau et al., 1991). Les différentes cultures sont incubées à des températures différentes : 30 °, 37° et à 44°C pendant 48h sur bouillon MRS. La croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (figure 4) (Hassaine, 2013).



Figure 2 : Présentation d'une Série de tubes ensemencés.

4.3.2. Croissance à différents pH

Trois milieux MRS ont été préparés dont le pH est ajusté à 4, 5 et à pH 9,6. La présence d'un trouble signifie une croissance (Guiraud, 1998).

Pour chaque souche, une série de tubes contenant 5 ml du milieu MRS à différents pH ont été ensemencés par une colonie de 48h sur milieu MRS, puis incubés à la température optimale de croissance de cette souche.

4.3.3. Croissance en présence de différentes concentrations de Na Cl

Ce test permet de déterminer la résistance des souches au stress salin. (Larpent et al., 1990 ; Samelis et al., 1994).

Partie II : Matériel et méthodes

Pour chaque souche, quatre tubes stériles contenant 5 ml de bouillon MRS à 2%, 4%, 6,5% et 10% de Na Cl ont été ensemencés par une colonie de *Lb*, incubé à 30 °C ou 37 °C pendant 48h.

La croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (Guiraud, 2003).

4.4. Caractères technologiques

4.4.1. Thermorésistance

Ce test permet de sélectionner les espèces thermorésistantes. Des colonies de 48h sur gélose MRS de *Lb* ont été inoculées dans des tubes contenant le bouillon MRS, ensuite ces tubes ont été déposés dans un bain marie à une température de 60,5°C pendant 30min. Puis soumis à un choc thermique, ensuite, incubés selon la température de croissance des souches pendant 48h (figure 5) (Badis et al., 2004).

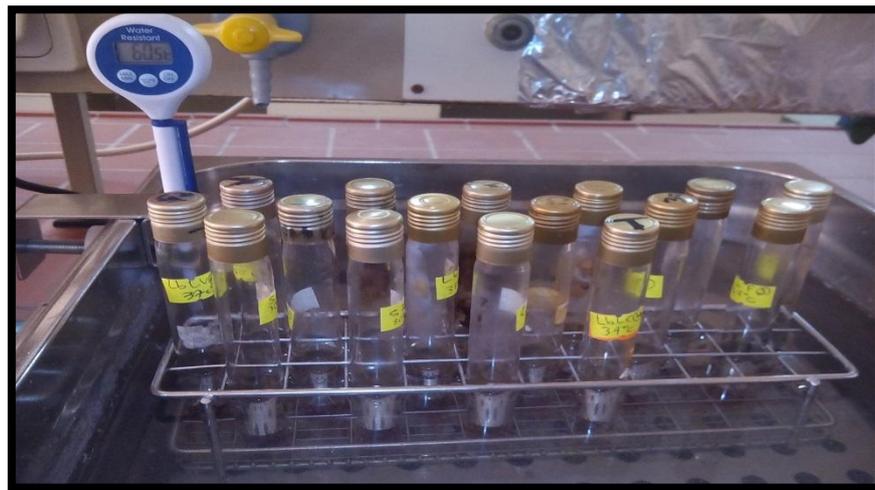


Figure 3 : Test de la thermorésistance.

4.4.2. Activité protéolytique

Selon Van den berg et al. (1993), l'activité est recherchée en milieu MRS gélosé additionné de lait écrémé à 1% et 2% .

En effet 5µl de la culture fraîche (6 colonies/9ml de MRS) de chaque souche a été déposé en spot sur gélose MRS additionnée de 1% et de 2% de lait écrémé puis incubé à 30°, 37°C pendant 48h (figure 6).

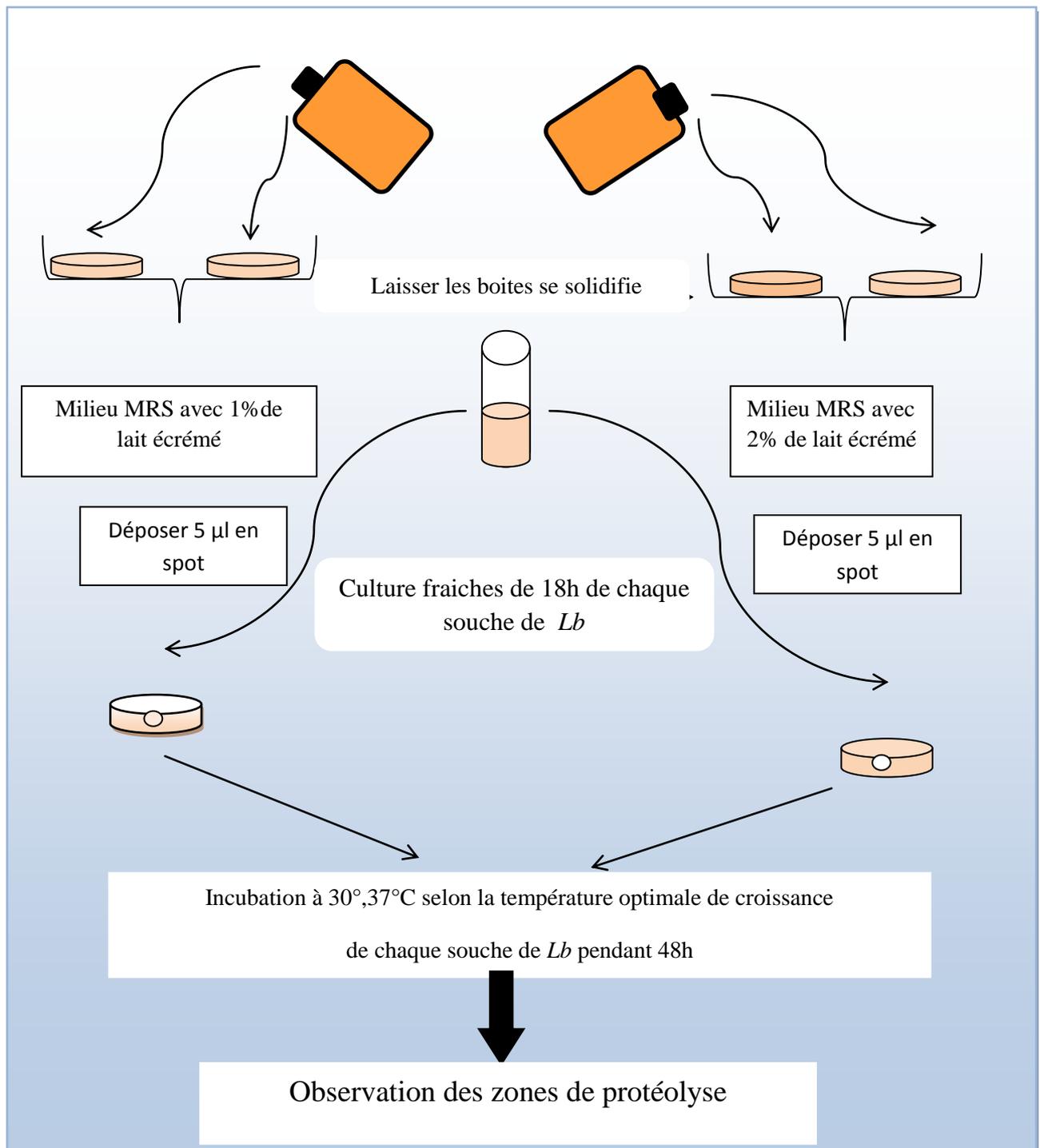


Figure 4 : Etude du pouvoir protéolytique.

4.4.3. Activité antibactérienne

Ce test permet d'étudier la capacité des lactobacilles à inhiber les souches pathogènes par la méthode de double couche.

Partie II : Matériel et méthodes

Cette activité est mise en évidence par le test de spots. On observe l'apparition de zones d'inhibition dont le diamètre est mesuré en (mm) (**Fleming et al., 1975**).

Au préalable, une revivification des souches pathogènes, et une standardisation des souches cibles testées a été réalisée.

La revivification des souches consiste à transférer 1ml de chaque culture des souches pathogènes dans des tubes contenant 9 ml de bouillon nutritif. Ces bouillons ont été incubés à 37°C pendant 18h à 24h. Le but de cette opération est d'obtenir des cultures fraîches.

Standardisation des inocula

Le but de la standardisation de l'inoculum bactérien, est d'avoir le même nombre de cellules bactériennes dans 1 ml de culture durant toute l'expérimentation.

La standardisation a été réalisée par l'isolement de chaque souche de *Lb* sur gélose MRS. Après incubation à 30°C et à 37°C selon la souche durant une période de 48h, six colonies identiques et bien isolées de chaque souche ont été repiquées dans 9ml de bouillon MRS.

Ces dernières ont été incubées à 30°C et à 37°C selon la souche durant 18h. La même procédure a été répétée avec les souches pathogènes en repiquant une colonie (après 24h d'incubation sur gélose nutritive) chaque souche dans le bouillon nutritif incubé à 37°C pendant 18h. Au terme de l'incubation des dilutions décimales jusqu'à 10⁻¹⁰ ont été réalisées pour toutes les souches (cibles et testées) dans de l'eau physiologique.

Un dénombrement des colonies a été réalisé respectivement sur gélose MRS pour les bactéries testé et sur gélose nutritive pour les bactéries cibles (**Figure 2et 3, annexe I**).

Réalisation du test des spots

5µl de la culture de lactobacilles fraîche (18h) à raison de 10⁹ UFC/ml ont été déposés en spot sur la gélose MRS. Les spots sur gélose ont été séchés 10 min devant le bec benzène. Les boîtes sont incubées à la température de croissance de chaque souche (30° ou 37°C) pendant 18h.

Partie II : Matériel et méthodes

Au terme de l'incubation les spots sont recouverts par 9ml de gélose nutritive en surfusion ensemencée à raison de 10^9 UFC/ml des souches cibles. Une fois solidifiées, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18h à 24h (figure 7).

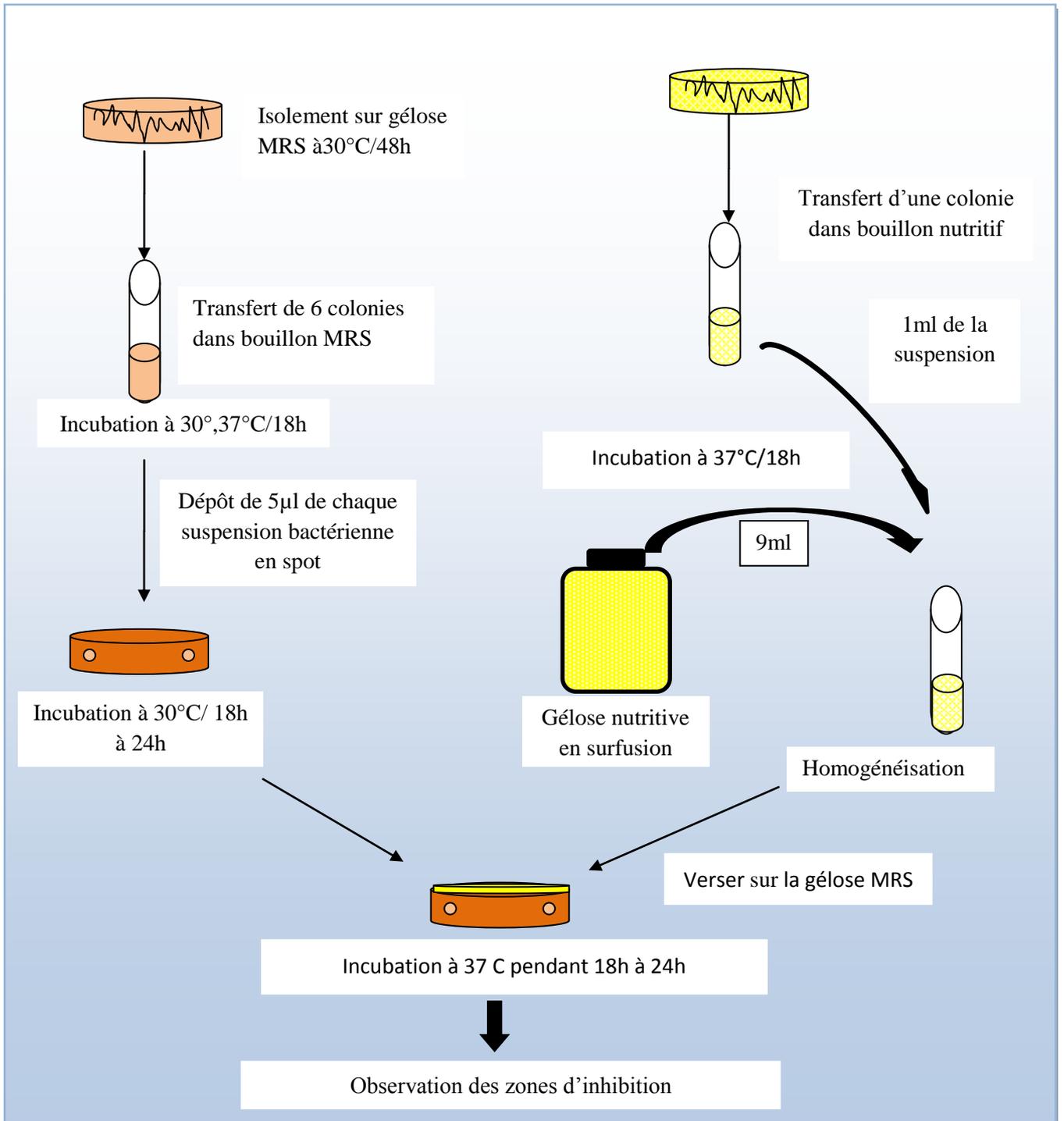


Figure 5 : Schéma de la réalisation du test des spots.

*Résultats et
discussion*

1. Isolement et purification

Des isolats ont été isolés à partir de sept échantillons de produit laitier (deux échantillons artisanaux de Lben de chèvre, un échantillon de Lben artisanal de vache, un échantillon de Raib artisanal de vache, un échantillon de lait de vache, fromage frais industriel et un échantillon de fromage artisanal de Boussaâda nommé « Alutig ») sur milieux MRS (**Tableau I, annexe II**).

La purification des souches lactiques isolée par plusieurs repiquages successifs sur milieux MRS (alternation sur milieux liquide), a permis d'obtenir trente trois isolats purs de bactéries lactiques dont vingt bacilles et treize cocci.

Les vingt isolats de forme bacilles ont été retenus pour la suite de l'étude.

2. Identification

2.1. Etude des caractères morphologique et culturaux

2.1.1. Aspect macroscopique des lactobacilles

- Sur milieu solide

Les cultures obtenues par isolement sur milieux MRS sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies (**Badis et al., 2005**).

Sur milieu MRS solide, les cultures obtenues sur boîtes Pétri des isolats bacilles, apparaissent sous forme de petites colonies lisses, plus au moins blanchâtres, crémeuses, à bord arrondi et bombé (**Figure 8**).



Figure 6 : Aspect macroscopique des isolats bacilles sur gélose MRS.

D'après **Denis et al. (2007)**, les colonies de *Lb* sont généralement de petites taille, lisses brillantes non pigmentées et souvent opaques. Dans les cas rares certaines espèces comme *Lb. plantarum* donnent des colonies jaunâtres ou rougeâtres.

En effet, ces critères macroscopiques des isolats bacilles correspondent aux propriétés culturales décrites pour les lactobacilles (**Badis et al., 2005 ; Mami, 2013**).

- **Sur milieu liquide**

La croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble homogène et fumeux dans le milieu MRS liquide, dans certains tubes ce trouble est concentré au fond du tube à la recherche des conditions anaérobiques (**figure 9**). Ce qui a été observé par **Kihal (1996)** et **Carr et al. en 2002**.

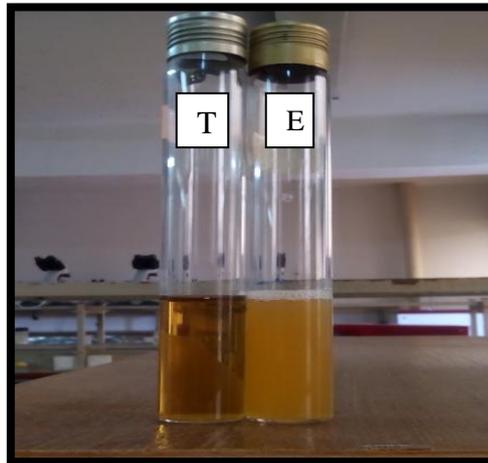


Figure 7 : Aspect d'une culture pure dans un milieu liquide (T : témoin ; E : ensemencé)

2.2.2. Aspect microscopique

L'étude microscopique est basée sur la coloration de Gram qui a rapporté une forme de bacille en bâtonnet et parfois coccobacille d'une couleur violette dont le mode d'association varie d'une souche à une autre.

Ces observations permettent de classer initialement les isolats selon le Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association (**Joffin et Leryal, 1996**).

L'examen microscopique des isolats, nous a permis d'éliminer les souches aux formes cocci. Par conséquent, sur les trente trois souches de bactéries lactiques isolées,

vingt souches seulement étaient de Gram positif et de forme bacillaire. Ces dernières ont été retenues pour plus d'investigations (**Figure10, tableau II**).

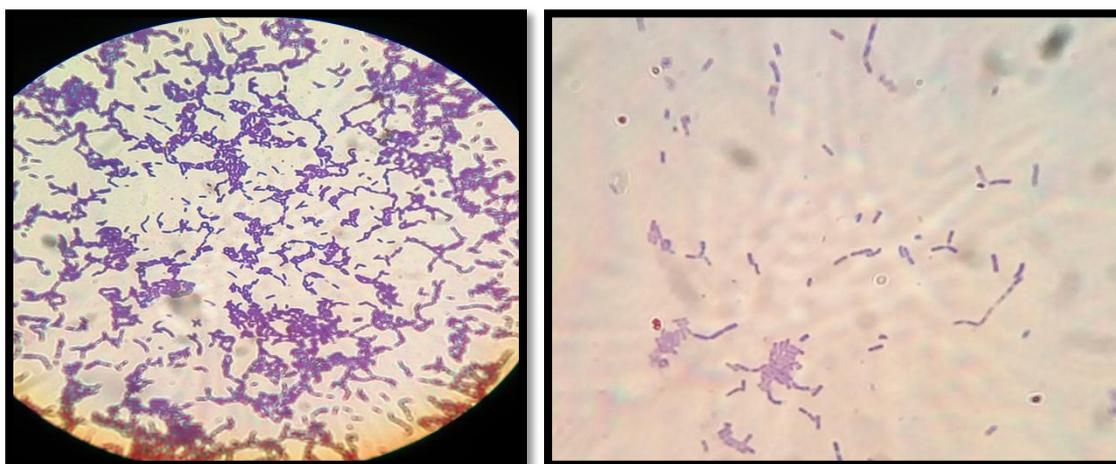


Figure 8 : Aspect microscopique de quelques isolats de forme bacille.

D'après **Axelsson (1993)** et **Euzeby (2006)**, les souches de lactobacilles sont constituées de bacilles longs et fins souvent regroupées en chaîne (parfois incurvées), ou de coccobacilles (coccoïde).

Selon **Laprent (2000)** et **Guiraud et Rosec (2004)**, les lactobacilles sont des bactéries, en forme bacillaire souvent allongées, groupées en paires ou en chaînes.

2.2. Caractères biochimiques

2.2.1. Test catalase

Sur les vingt isolats de bacilles, quinze souches sont catalase négative (absence d'effervescence) (**Figure 11, tableau II**) (**Carr et al., 2002**), ce qui nous laisse déduire que les souches isolées sont des bactéries lactiques.



Figure 9 : Exemple d'un résultat négatif du test de catalase.

Toutes les souches catalase positives sont éliminées, seule les quinze souches à catalase négative sont retenues et conservées pour la suite de l'étude.

Tableau III : Résultats de l'étude microscopique et du test de la catalase des souches retenues.

Souche	Forme et mode d'association	Gram	Catalase
S1	Gros bacilles en amas	+	-
S2	Diplo coccobacilles	+	-
S3	Gros bacilles en amas	+	-
S4	Coccobacilles isolés	+	-
S5	Gros bacilles isolés	+	-
S6	Coccobacilles en chaînette	+	-
S7	Bacilles long isolés	+	-
S8	Coccobacilles en chaînette	+	-
S9	Bacilles fins isolés	+	-
S10	Bacilles fins en amas	+	-
S11	Coccobacilles en chaînette	+	-
S12	Diplo coccobacilles	+	-
S13	Coccobacilles en chaînette	+	-
S14	Coccobacilles en chaînette	+	-
S15	Bacilles en amas	+	+
S16	Petit bacilles en chaînette	+	+
S17	Bacilles fin	+	+
S18	Bacilles en chaînette	+	+
S19	Petits bacilles isolés	+	-
S20	Cocco bacilles isolés	+	+

Après avoir effectué l'examen de la recherche de la catalase et la coloration de Gram, toutes les bactéries à Gram positif et à catalase négative sont présumées comme bactéries lactiques (**Kihal, 1996 ; Carr et al., 2002**).

Certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène (**Condon, 1996**) et selon le Bergey's Manuel de la Systématique Bactérienne « les *Firmicutes* », les lactobacilles sont catalase négative (**de Vos et al., 2009**).

Les résultats de l'examen macroscopique sont similaires à ceux décrits pour le genre *Lactobacillus* par **Sutra et al. (1998)** et **De Vos et al. (2009)**. D'après **Mami (2013)**, les résultats microscopiques des quinze souches correspondent à ceux du genre *Lactobacillus*.

2.2.2. Production de gaz

Un des critères d'identification des espèces de lactobacilles est l'étude du type fermentaire. Le métabolisme énergétique des lactobacilles est exclusivement fermentaire (**Leveau et Bouix ; 1993**).

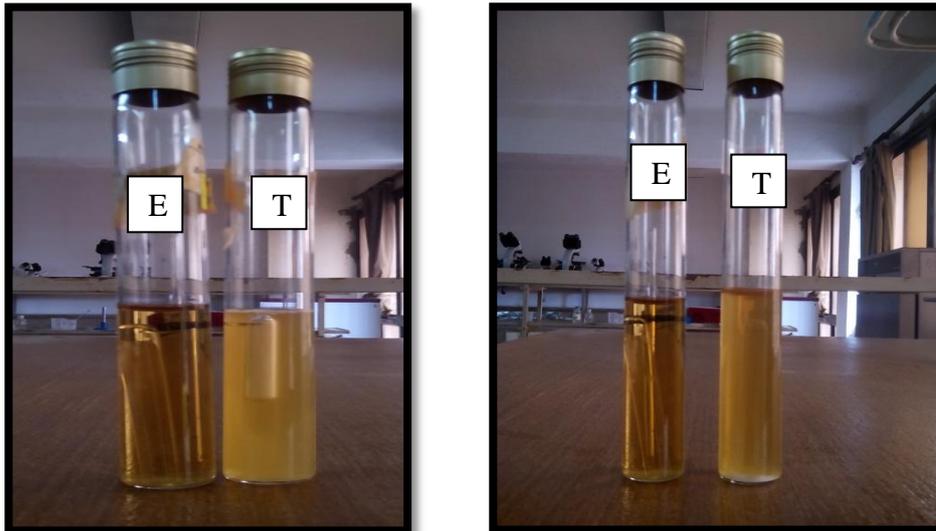
Certaines espèces sont homofermentaires (homolactiques) ne produisant que l'acide lactique, d'autres hétérofermentaires (hétérolactiques) produisant de l'acide acétique, de l'acétaldéhyde, de l'éthanol et du dioxyde de carbone (CO₂) à côté de l'acide lactique (**De Vos et al., 2009 ; Nanatani et Abe, 2011**).

Le développement d'une souche homofermentaire conduit à l'apparition d'un trouble sans production de gaz, par contre, dans le cas d'un métabolisme hétérofermentaire, la croissance se manifeste par l'apparition d'un trouble avec production de gaz recueilli dans la cloche de Durham (**Dicks et Van Vuvren, 1987 ; Axelsson, 2004**).

La production de gaz se manifeste par le flottement de la cloche qui est vider du milieu (**Kheddid et al., 2006**).

La plupart des souches sont homofermentaires, en effet douze souches parmi les quinze retenues ne produisent pas de gaz.

Les **figures (12 (A-B))** ci-dessous présentent le résultat de la production de gaz.



(A) : Exemple de souche hétérofermentaire

(B) : Exemple de souche homofermentaire

Figure 10 : Test de production de gaz (T: témoin, E : ensemencé).

2.2.3. Fermentation des sucres

La caractérisation des différentes espèces du genre *Lactobacillus* repose essentiellement sur leur capacité à fermenter les carbohydrates (**Carr et al., 2002**).

L'analyse des profils fermentaires révèle une diversité métabolique des carbohydrates chez les isolats retenus, la figure 12 illustre un exemple de résultat positif.

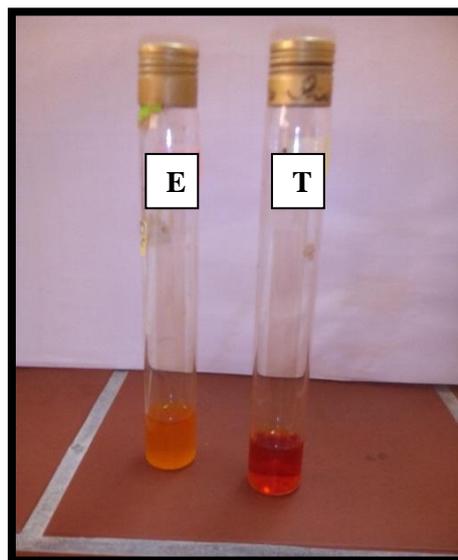


Figure 11 : Exemple de résultat positif du test de fermentation des sucres

(T : témoin ; E : ensemencé)

Toutes les souches fermentent le fructose, le mannose et le maltose sauf la souche LbV1 qui ne fermente pas le mannose.

Les cinq sucres testés sont tous fermentés par les deux souches S7 et S8.

Le sorbitol est fermenté par huit souches et le L. arabinose est fermenté par cinq souches (**Tableau III**).

Tableau IV : Profile fermentaire des isolats.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S19
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L.arabinose	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+

(+ : dégrade le sucre ; - : ne dégrade pas le sucre)

Cependant, le nombre de sucres utilisés ne permet pas de déterminer l'espèce des souches étudiées.

L'identification des espèces repose sur la comparaison de divers caractères phénotypiques de la souche à étudier vis-à-vis de ceux d'une souche de référence (**Carr et al, 2002**) et les caractères étudiés durant notre travail sont insuffisant pour pouvoir identifier les souches sélectionnées à l'échelle espèce.

2.3. Caractères physiologique

2.3.1. Croissance à différentes températures

Ce test permet de faire la différence entre la flore thermophile et mésophile (**Carr et al., 2002**).

Dans cette étude, trois températures ont été testées 30°, 37° et à 44°C.

Résultats et discussion

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches poussent à 30 et 37°C. Cependant, huit souches poussent même à 44°C :

Les sept souches (S2, S3, S5, S6, S10, S12, S14) qui poussent à 30°, 37° et non à 44°C sont considérées comme des souches de type mésophiles.

Les huit souches (S1, S4, S7, S8, S9, S11, S13, S19) qui poussent à 30° et 37°C et à 44°C sont qualifiées comme des souches thermophiles (**Tableau IV**).

Tableau V : Résultats du test de croissance à différentes températures.

Température	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S19
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44°C	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+

La température optimale de croissance des lactobacilles est généralement comprise entre 30 et 40°C, elle est de 37°C pour la plupart des espèces (**Collins et al., 2009**) et selon **Larpent et Bourgeois (1989)**, les souches du genre *Lb* se cultivent à 7, 15, 30 et 45°C.

D'après **de Roissart et Luquet (1994)**, **Collins et al. (2009)**, une culture de lactobacille peut être observée à des températures allant de 2 à 53°C.

L'emploi des tests (croissance à différentes températures, recherche du type fermentaire) nous ont permis d'établir une pré-identification pour les souches, nous avons subdivisé ces dernières en deux groupes (groupe 1 : homofermentaires et hétérofermentaires, groupe 2 : mésophiles et thermophiles).

La classification des lactobacilles pourrait être mieux menée si nous avions pu entamer la recherche de la production de gaz à partir du gluconate, en plus du test de production de gaz à partir du glucose. Cela nous aurait sans doute permis de classer plus facilement les lactobacilles isolés selon leur type fermentaire (lactobacilles

homofermentaires, lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et lactobacilles hétérofermentaires obligatoires) (Demarigny *et al.*, 1996).

2.3.2. Croissance à différents pH

Toutes les souches de lactobacilles présentent une très bonne croissance à pH 5, mais aucune ne croit à pH 9,6. En effet, les lactobacilles ne poussent pas à pH 9 (Larpent, 2000) et le pH optimum de leur croissance est de 5,5 mais poussent aussi à pH neutre (Collins *et al.*, 2009).

À pH 4, la croissance diffère d'une souche à une autre, trois souches (S7, S8, S9) présentent une très bonne croissance. Cependant une faible croissance est notée pour les dix souches (S1, S2, S3, S5, S6, S11, S13, S12, S14, S19) et seule deux souches S4 et S10 qui ne présentent aucune croissance à ce pH. Effectivement, les lactobacilles croient à pH 4,5 (Larpent, 2000) et sont des acidotolérants dont de nombreuses espèces sont impliquées dans des fermentations alimentaires (Federighi *et al.*, 2005). Selon Leveau et Bouix (1993), les lactobacilles résistent à des pH acides allant jusqu'à 3,5 (Tableau V).

Tableau VI : Résultats du test de croissance à différentes pH

Souche		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S19
		pH	4	+	+	+	-	+	+	++	++	++	++	+	+	+
5	++		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
9,6	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.3.3. Croissance à différentes concentration de NaCl

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches étudiées présentent une très bonne croissance en présence de 2%, 4% et 6,5% de NaCl.

Cependant, en présence de 10% de NaCl, seules les deux souches S5 et S9 présentent une bonne croissance, les souches S1, S2, S6, S7, S13, S12, S14 présentent une

faible croissance. Une très faible croissance est notée pour cinq souches (S3, S4, S14, S8, S11). La souche LbRV1 ne présente aucune croissance à ce taux de NaCl (**Tableau VI**).

Tableau VII : Résultats du test de croissance à différentes concentration de NaCl.

Souche		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S19
Concentration de Na Cl	2%	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +
	4%	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +
	6,5 %	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +
	10 %	+ +	+ +	+/- +	+/- +	+ +	++ +	+ +	++ +	+/- +	- +	++ +	+ +	+ +	+/- +	+ +

En effet, les lactobacilles peuvent résister à des concentrations de 4, 6 et 10% de NaCl (**Larpen et Bourgeois ,1989**), ce qui induit leur utilisation dans les saumures et charcuteries (**Giraud et Rosec, 2004 ;Giraffa et al .,2010**).

Les résultats des caractères physiologiques étudiés dans cette partie sont résumés dans le tableau III, annexe II.

3. Caractères technologiques

3.1. Etude de la thermorésistance

La majorité des souches sont thermorésistantes (**Figure 14**), où nous avons observé une croissance sur bouillon MRS après un traitement thermique pendant 30 minutes à 60,5°C.



Figure 12: Résultat de la thermorésistance

Cependant, seules deux souches (S5 et S14) parmi les quinze sont dépourvues de la thermorésistance (**Tableau VII**).

Tableau IIX : résultats de la termorésistance.

Souche	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S19
Thermorésistance	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Afin de sélectionner des souches de *Lb* performantes douées de quelques propriétés technologiques, des tests d'activités ont été réalisés.

3.2. Activité protéolytique

L'activité protéolytique est une caractéristique technologique importante chez les bactéries lactiques puisqu'elle leur confère la capacité de croître efficacement dans le lait (**Maghnia, 2011**).

L'activité protéolytique des souches isolées a été traduite par la présence d'un halo clair d'hydrolyse de la protéine du lait (caséine) sur boîte de MRS additionnée de lait écrémé à des concentrations de 1% et 2% (**Maghnia, 2011 ; Hassaine, 2013**) (**Figure 14**).

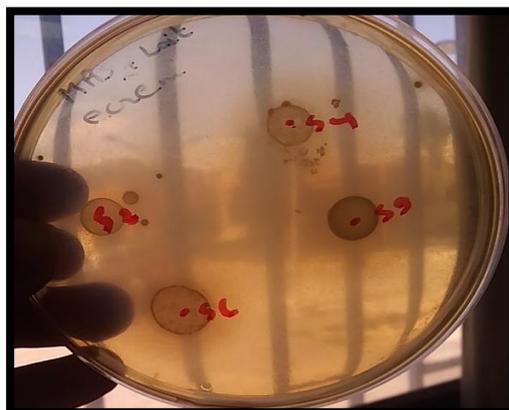


Figure 13 : Exemple positif d'activité protéolytique

Les résultats obtenus (**Tableau IV, annexe II**) montrent que seules deux souches (S10 et S5) qui ne présentent pas d'activité protéolytique (pas de zone claire) dans les deux concentrations (1% et 2% de lait écrémé) (**Figure 15**).

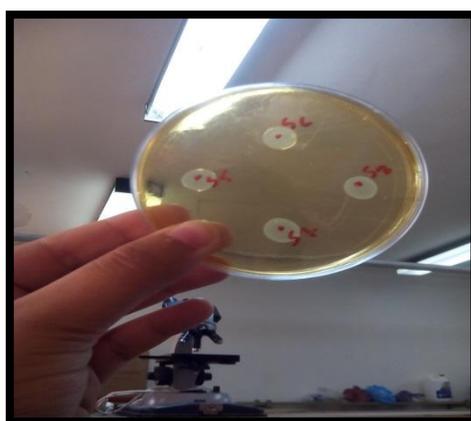


Figure 14 : Exemple d'absence d'activité protéolytique (absence de zones claires).

Huit souches (S1, S2, S3, S4, S6, S12, S7, S19) possèdent une activité protéolytique dans le milieu MRS à 1et à 2% de lait écrémé, dont le diamètre de la zone claire varie entre 2 à 10 mm.

Le diamètre est plus important au niveau du milieu MRS à 2% de lait écrémé où la souche LbLC4 a montré le plus important diamètre de protéolyse (10 mm).

Les souches (S1 et S2) présentent une activité protéolytique importante dans les deux concentrations (1% et 2% de lait écrémé) avec un spectre de 4 à 8 mm.

Ces résultats (**Figure 16**) nous permettent de confirmer d'une part le caractère protéolytique ou non des souches isolées et d'autres parts la présence d'une protéase de paroi comme il a été rapporté par les travaux de **Desmazeaud (1992)**.

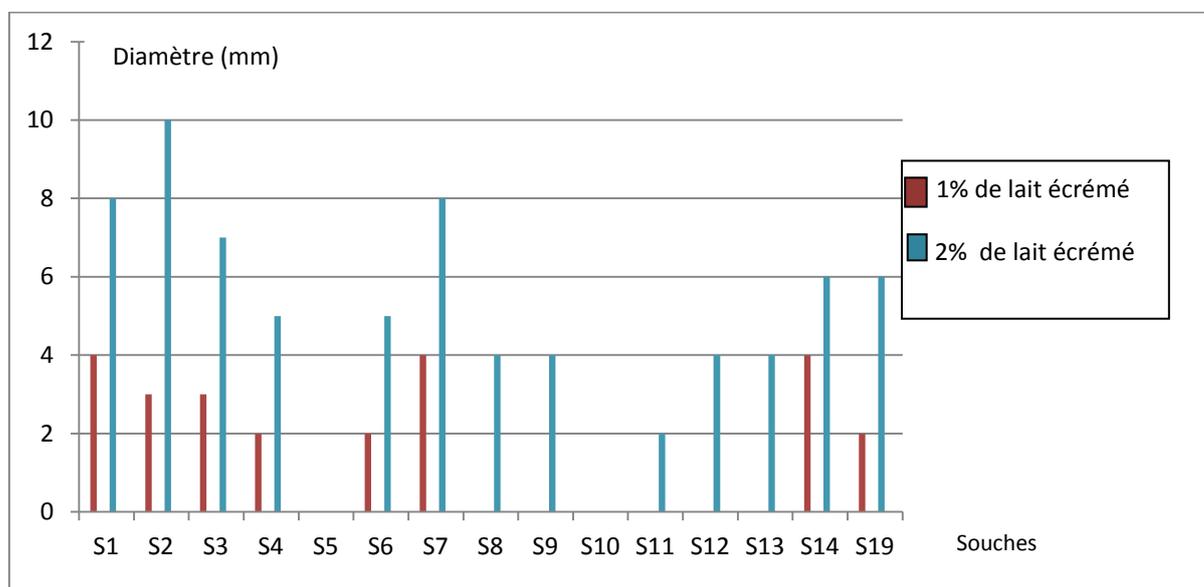


Figure 15: Résultats de l'activité protéolytique

Les espèces du genre *Lactobacillus* ont besoin d'un système de protéolyse pour tirer le maximum d'acides aminés de la caséine (**Chen et al., 2004**).

Selon **Castberg et Morris (1976)**, les lactobacilles produisent généralement des protéinases neutres actives sur le α -, β - et κ -caséine mais l'intensité de leur activité est extrêmement variable d'une espèce à une autre. Les travaux de **Litopoulo –Tzanet et Tzanetakis (2011)**, ont montré que les activités d'aminopeptidase sont largement dues aux lactobacilles.

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est essentielle pour leur croissance dans le lait ainsi que pour le développement des propriétés organoleptiques des différents produits laitiers (**Savoy et Hébert, 2001 ; Hassaine et al., 2007**).

3.2. Activité antibactérienne

Pour l'étude de l'activité antibactérienne des souches de *Lb*, cinq souches pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*) ont été utilisées .

Au préalable, une revivification des souches pathogènes et une standardisation pour les souches cibles et les souches testées ont été effectuées.

3.2.1. Observation macroscopique des souches pathogènes

L'ensemencement des souches pathogènes sur milieu nutritif solide et liquide nous a permis d'obtenir des colonies à différents aspects, selon la souche, sur la gélose nutritive (**Figure 18-A**), et la croissance apparait sous forme de trouble homogène sur le bouillon nutritif (**Figure 18-B**).

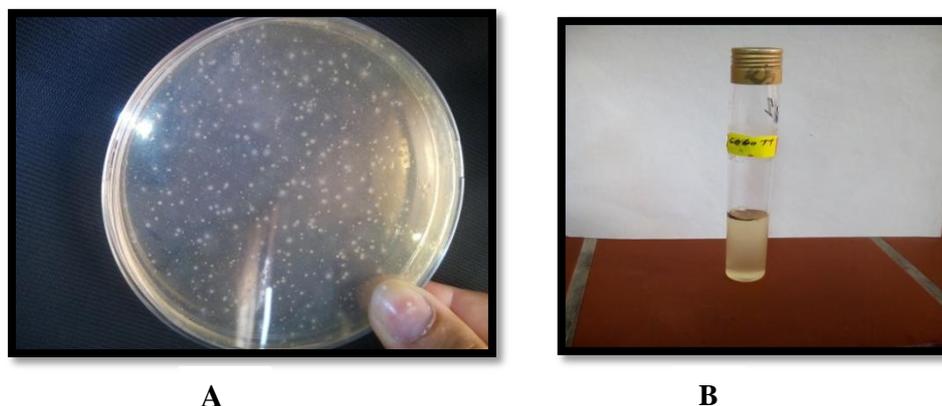


Figure 16 : Aspect des pathogènes sur milieu solide (A) et liquide (B).

3.2.2. Observation microscopique des souches pathogènes

Les résultats de l'observation microscopique des souches pathogènes sont illustrés dans le tableau V, annexe II.

3.2.3. Standardisation des inocula

Afin de travailler toujours avec un nombre bien déterminé de culture bactérienne, une standardisation des inocula a été réalisée.

Après le dénombrement effectué pour les lactobacilles et pathogènes, le nombre de cellules viables obtenu après ensemencement de six colonies de *Lb* dans 9 ml de bouillon MRS est d'environ de 10^9 UFC/ ml. Cependant, les pathogènes donnent un nombre qui se situe entre 10^7 et 10^9 UFC/ml à partir d'une colonie ensemencée dans le bouillon nutritif (**Tableau VI et VII, annexe II**)

Les quinze souches sélectionnées ont été testées pour leur capacité à inhiber des bactéries pathogènes à savoir (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Kalebsiella pneunoniae*, *Proteus sp.*, *Enterobacter cloacae*) (**Figure 19**).



Figure 17 : Exemple de résultats positifs du test de spots.

Les résultats obtenus (**Tableau IIX, annexe II**), montrent que les cultures bactériennes des souches sélectionnées ont des activités antibactériennes très intéressantes (**Figure 20**).

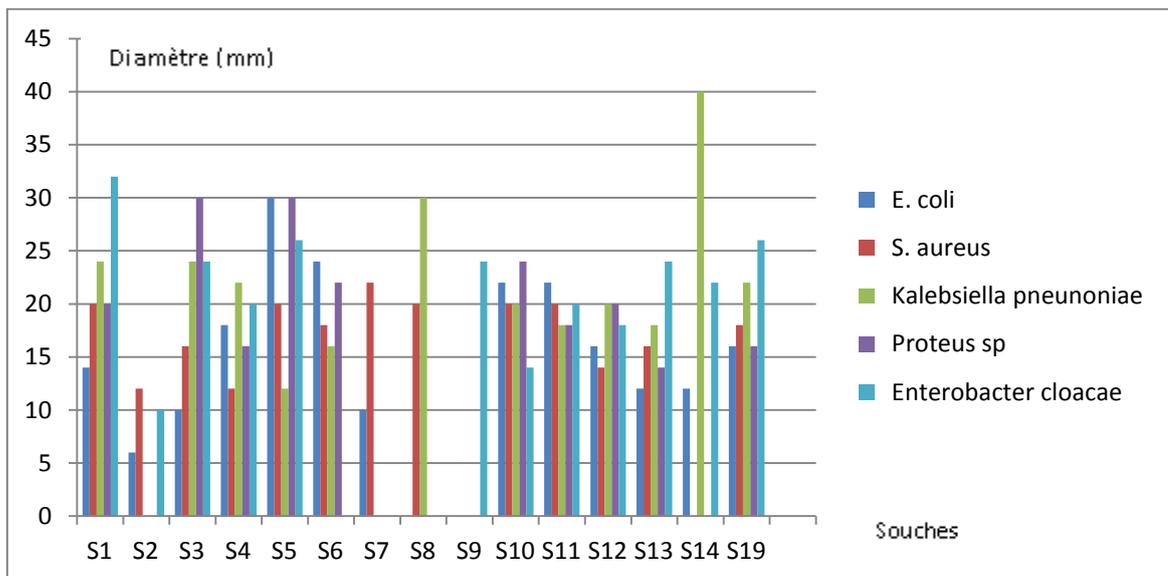


Figure 18 : Résultat de l'activité antibactérienne.

Le plus important diamètre d'inhibition est obtenu par la souche LbLC4 vis-à-vis *Kalesiella pneumoniae*.

Les *Lb* possèdent un spectre d'activité inhibiteur très varié. Neuf souches (S1, S3, S4, S5, S10, S11, S13, S12, S19) ont présenté une activité inhibitrice vis-à-vis de tous les pathogènes où la zone d'inhibition a atteint un diamètre de 40mm.

Les deux souches (S1 et S5) présentent l'activité inhibitrice la plus importante avec des zones d'inhibitions qui varient entre 12 et 32mm.

Seule la souche S9 a montré une activité antagoniste à l'égard d'une seule souche pathogène (*Enterobacter cloacae*).

Les souches présentant une zone claire d'extension latérale supérieure à 0,5 mm sont considérées comme productrices de substances antibactériennes (**Fleming et al., 1975**)

L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1mm (**Schillinger et Lucke, 1989**).

Un diamètre maximal de 30 mm a été obtenu avec la souche S5 à l'égard d'*E. coli* et de 22 mm à l'égard de *S. aureus* par la souche LbFR1.

Ces résultats sont supérieurs à ceux rapportés par **Belarbi (2011)** où la croissance de *S. aureus* et la croissance d'*E. coli* sont inhibées par le genre *Lactobacillus* avec un diamètre de 10 mm.

L'inhibition des souches de *S. aureus* par des souches de *Lb. plantarum* a été déjà décrite par **Mami et al. (2008)** qui ont mentionné que des souches de *Lb. plantarum* isolées du lait cru de chèvre inhibent des souches de *S. aureus*.

L'inhibition des souches d'*E. coli* par certaines souches de *Lb. plantarum* a été décrite par plusieurs travaux (**Todorov et al., 2004 ; Karthikeyan et Santosh, 2009**).

Hamed et Elattar (2013), ont trouvé des valeurs comprises entre 31 à 38mm en étudiant l'effet antibactériens de souches de *Lb. plantarum* isolées à partir de lait de chamelle vis-à-vis d'*E. coli*. Ces résultats sont supérieurs aux notre, où les diamètres obtenus se situent entre 6 et 30mm.

Les résultats retrouvés montrent que certaines souches de lactobacilles sont dotées d'une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de la souche *Proteus* sp. Cependant, ces résultats ne sont pas similaires à ceux publiés par **Labioui et al. (2005)** qui ont rapporté

que les souches de *Lb* présentent une faible activité à l'égard de *Proteus mirabilis*, cette différence pourrait être liée aux espèces de *Proteus*.

L'activité inhibitrice des lactobacilles peut avoir deux origines :

La première est la production de l'acide lactique et/ou acétique ; en effet les lactobacilles sont connues pour avoir une grande résistance au pH acide contrairement aux autres genres de bactéries lactiques (**Wong et Chen, 1988 ; Podolak et al., 1996, Wilson et al., 2005**).

La deuxième provient de la production de substances organiques et probablement des bactériocines (**Oyetayo et al., 2003, Avila et al., 2005, Cocolin et al., 2007**).

Généralement, les espèces du genre *Lb* sont catalase-négative et certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène (**Condon, 1987**). Le peroxyde d'hydrogène est toxique et capable d'inhiber de nombreux germes pathogènes qui ne peuvent pas le dégrader (**Otero et Nader-Macias, 2006; Pridmore et al., 2008**).

Malgré que les bactéries Gram+ sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques (**Onda et al., 2003**) et les bactériocines sont surtout actives sur les pathogènes à Gram+ (**Biswas et al., 1991**), la plupart des souches *Lb* retenues possèdent une activité antagoniste à l'égard des bactéries pathogènes Gram négatives en plus de celles présentées à l'égard de *S. aureus*.

D'après **Federighi (2005)**, le diacétyl produit du métabolisme du citrate par plusieurs *Lb* est capable d'inhiber des bactéries à Gram négatif.

En général, les résultats des caractères physiologiques et des tests technologiques de certaines souches sont satisfaisants pour quelques caractères et non pour d'autres. La souche S1 est thermorésistante, possède une bonne activité protéolytique et antibactérienne et résiste au stress salin. Cette souche pourrait être utilisée comme ferment ou auxiliaire de fermentation dans différents produits fermentés et comme bioconservateur. D'autres souches, tel que S1, S10, S13 présentent une bonne activité antibactérienne mais une faible activité protéolytique.

Conclusion

Au cours de cette étude réalisée au niveau du Laboratoire de Microbiologie Générale, les objectifs fixés étaient d'isoler et de sélectionner des souches de lactobacilles performantes.

A l'issue de ce travail, des souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir des échantillons de quelques produits laitiers sur milieu MRS et purifiées.

Les souches isolées ont subies une série de tests biochimiques, physiologiques et d'activités.

Les résultats de l'étude des caractères morphologiques et cultureux (étude macroscopique et microscopique) et des caractères biochimiques (recherche de la catalase, production de gaz) ont montré que sur trente trois souches isolées, seules quinze souches correspondent aux caractéristiques de lactobacilles (forme bacille ou cocobacille, Gram+, catalase négative). Ces dernières ont été retenues pour la suite de l'étude.

Les tests physiologiques (température, pH, NaCl) ont révélé que 14 souches (sauf LbRv10 qui ne poussent pas à pH) poussent à pH 4 et 5 et résistent aux fortes concentrations de NaCl allant jusqu'à 10%, avec huit souches thermophiles.

Les résultats des tests technologiques ont montré que 13 souches (sauf LbF1 et LbLC5) sont thermorésistantes. Les zones de protéolyse obtenues sur gélose au lait écrémé ont montré que huit souches (S1, S2, S3, S4, S6, S7, S12, S19) présentent une bonne activité, en présence de 2% de lait écrémé, d'un diamètre qui varie entre 5 et 10 mm. Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne ont montré que les quinze souches de *Lactobacillus* sont douées d'activité antibactérienne vis-à-vis de l'ensemble des pathogènes testés (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*). En effet des zones d'inhibitions de 6 à 40 mm ont été obtenues. Le plus important diamètre d'inhibition est obtenu par la souche (S2) vis-à-vis *Klebsiella pneumoniae* (40 mm).

Pour conclure, les résultats obtenus suggèrent l'utilisation des souches sélectionnées appartenant au genre *Lactobacillus* dans l'industrie agroalimentaire dans la fabrication des produits laitiers fermentés. Ces dernières, peuvent être utilisées comme bioconservateurs. Cependant le travail effectué est insuffisant pour confirmer ces résultats.

Il faudrait alors en perspective :

- Répéter ces tests plusieurs fois afin de confirmer les résultats obtenus
- Etablir une identification des souches isolées en réalisant plus de tests biochimiques ou en utilisant des galeries biochimiques (la galerie APIC50 CH).
- Etudier d'autres propriétés technologiques tel que : le pouvoir acidifiant, aromatisant, texturant, épaississant...
- Élargir la gamme des bactéries cibles de l'activité antibactérienne et chercher l'origine de cette activité.
- Etude des propriétés technologiques des souches isolées en cultures mixtes.
- Utilisation de ces souches dans la mise au point de produits laitiers fermentés.

*Références
bibliographiques*

-A-

- ✓ **Amanatidou A., Bennik M.H., Gorris L.G. et Smid E.J. (2001).** Superoxide dismutase plays an important role in the survival of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen. *Arch Microbiol.*, 176:79-88.
- ✓ **Ammor M.S. (2004).** Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison : Identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de Doctorat en Physicochimie et Qualité de Bioproduit. Université de Rennes 1, France, P21
- ✓ **Avila M., Garde S., Medina M., et Nunez M. (2005).** Effects of milk inoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture. *J. Food Prot.* 68: 1026-1033.
- ✓ **Axelsson L. (1993).** Lactic acid bacteria : classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Salminen S and Von Wright A. pp: 1-63 .Marcel Dekker Inc. New York.
- ✓ **Axelsson L. (2004).** Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology. *In* Lactic acid bacteria, Microbiological and Functional Aspect. Third Edition. Marcel Dekker , New York, 1-66.

-B-

- ✓ **Badis A., Guetarni, D., Moussa- Boudjema. B., Henni, D. E., Tornadijo.M. E., et Kihal, M. (2004).** Identification of cultivable of lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiol.* 3: 72-78.
- ✓ **BADIS A., LAOUABDIA-SELLAMII, N., GUETARNI, D., KIHAL, M. ET OUZROUT, R., (2006):** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Tech.* 23, 30-37.
- ✓ **Belarbi F. (2011) :** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes, Mémoire de Magistère, *Université d'ORAN Es Senia (2011)- 69,84,97*

- ✓ **Biswas S.R., Ray P., Johnson M.C., Ray B. (1991).** Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. - *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(4), 1265-1267.
- ✓ **Bourel B., Hedouin V., Martin-Bouyer L., Becart A., Tournel G., Deveaux M. et Gosset D. (2001).** Effects of morphine in decomposing bodies on the development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J. Forensic Sci.* 44: 354-358.

-C-

- ✓ **Carr F. J., ChilL, D. et Maida N. (2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey *Critical Rev. Microbiol.* 28: 281-370.
- ✓ **CARR FRANK J., CHILL DON, and MAIDA NINO, 2002.** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4): 281–370
citrate permease in *Leuconostoc*. *J. Appl. Microbiol.* 22: 219-2
- ✓ **CASTBERG H.B. and MORRIS H.A., 1976.** Degradation of milk proteins by enzymes from lactic acid bacteria used in cheese-making. *A review. Milchwissenschaft* 31: 85-90.
- ✓ **Chammas, G.I., Saliba, R. and Béal, C. (2006).** Characterization of the fermented milk—Labanl with sensory analysis and instrumental measurements. *J. Food Sci.* 71: S156–S162
- ✓ **Chen Y. S., Yanagida F. et Shinohara T., 2004 :** Isolated and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 195-200.
- ✓ **Cocolin, L., Foschino, R., Comi, G., et Fortina, M.G., 2007.** Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiol.* 31:753-758
- ✓ **Condon S (1987).** Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS. Microbiol. Lett.*46:269-280.
- ✓ **Coudeyras S., Jurie G., Vermerie M. et Forestier C. (2008).** Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis- associated pathogènes. *Infect.Dis. Obstet. Gynecol.*, 7: 549-640.

-D-

- ✓ **Dalié D.K.D., Deschamps A.M et Richard – Forget F. (2010).** *Lactic acid bacteria – potential for control of mould growth and mycotoxins : A review . Food control*, 21: 370-380.
- ✓ **Dellaglio F, Felis, GE (2005).** Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *In :* « Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects». Caister Academic Press éd. Norfolk, UK. pp. 25-49.
- ✓ **De Man, JC, Rogosa M, Sharpe, ME (1960).** A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *J. App. Bacteriol.* 23 (1): 130-135.
- ✓ **Demarigny Y., Beuvier E., Dasen A., et Duboz G. (1996).** Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheese. Evaluation of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Le lait*, 76: 371-387.
- ✓ **Denis F., poly M.C., Bengen E., et. Quentin R. (2007).** Bactériologie médicale, techniques usuelles. 2^{ème} Ed. , Elsevier Masson, paris : p.417
- ✓ **De Roissart H et Luquet F.M. (Janvier 1994).** Bacteries lactiques Lorica Uriage. 1 ; 6-1
- ✓ **Desmazeaud M. (1983).** comment les bactéries lactiques se comportent elles dans le lait .technique laitière .976 :11-14.
- ✓ **De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitmanet WB (2009).** Genus *Lactobacillus, Bacillus and Listeria*. *In :* « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes » Vol 3. Springer éd., New York.pp.19-511.
- ✓ **De vuyst L. et Vandamme E. J. (1994).** Antibacterial potential of Lactic acid bacteria. Dans: Bactériocin of Lactic acid bacteria. Ed. Blackiacademic & profetionel, Londre, p 91-190.
- ✓ **Dicks L. M. T., Van vuuren H.J.J. (1987).** A modification of the hot-tube method for the detection of carbon dioxide produced by heterofermentative *lactobacillus* strains. *J. Microbiol. Meth.* , 6: 273-275.
- ✓ **Djadouni F. et Kihal M. 2012.** Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria and the Spectrum of their Biopeptides against Spoling Germs in Foods. *Braz. Arch. Biol and Biotechnol.* 55. (3): 435-443.

- ✓ **Djidel A. (2007).** Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. Rhamnosus sur jus de date: Cinétique et optimization en cultures discontinues, semi-continues et continues. Thèse de Doctorat de Génie Chimique. Institut National Polytechnique de Lorraine. 217p.

-E-

- ✓ **Elsanhoty R.M (2008).** Screening of somme *lactobacillus* strains for their antifungal activities against aflatoxin producing *aspergilla in vitro* maize. J. Food Agric. Environ., 6: 35-40.
- ✓ **Euzèby J.P. (2006).** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. < <http://www.bacterio.cict.fr/bactico/II/apodemi.html>>, consulté le 02 mai 2017.

-F-

- ✓ **FAO/OMS (2001).** Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé (OMS)).*Working Group Report*. Cordoba, Argentina.
- ✓ **FAO/OMS (2002).** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS).*Working Group Report*. London, Ontario, Canada.
- ✓ **Federighi M., Magras C., Pilet M F.(2005).** Bactériologie alimentaire: compendium d'hygiène des aliments. 2^{ème} édition. Paris : 220 p.
- ✓ **Fedorak RN, Madsen KL (2004).** Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders.*Curr. Opin. Gastroenterol.* 20:146–55.
- ✓ **Felis G.E. et Delloglio F. (2007).** Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Caar. Insues International Microbiol.*, 8: 44-61.
- ✓ **Fleming H.P, Etchells. J. L, et Costilow. R. N (1975).** Microbiol Inhibition by an Isolate of pediococcus from Brines. *Applied Microbiology*.vol. 30, N°. 6. p. 1040-1042.

-G-

- ✓ **Gatti M., Trivisiano C., Fabrizi E., Nerviant E., et Gardini F. (2004).** Biodiversity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from different natural whey starter cultures as revealed by classification trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (1): 182-190.
- ✓ **Guiraud J. P. 1998.** Microbiologie. 1^e Ed. , Dunod. Paris.
- ✓ **Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, paris : 91, 92,292 p.
- ✓ **Guiraud J.P., Rosec J.P. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR : 241 p.

-H-

- ✓ **Hamed E et Elattar A. (2013).** Identification and some probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Egyptian Camels Milk. *J Life Science.* **10** Supp 1: 1952-1961.
- ✓ **Hammers W.P et Hertel C. (2006).** The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Dans: The prokaryotes Vol 3, Ed Springer Science- Business Media, LLC, Singapore, 4: 320-403.
- ✓ **Hammers W.P et Hertel C. (2009).** Genus I. *Lactobacillus*: Dans: Bergey's manuel of Systematic Bactériology second edition, vol. 3 (The firmicutes). Springer Sciences.Busines Media, New York, p. 465-511.
- ✓ **Hassaine O., Zadi-Karam H. et Karam N.E., 2007.** Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). *Afr. J. Biotechnol.* **6** (14) : 1720-172
- ✓ **Hassaine O.(2013).** caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien
- ✓ **Hogg T. (2005).** Essentiel Microbiology. *John Wiley & sons.* 14:188-190.
- ✓ **Holzappel W. H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. et Schillinger U.(2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 3655-735.

-J-

- ✓ **Joffin J. N. et Leryal G.(1996).** Microbiologie technique. Centre Regional de documentation Pédagogique d'Aquitaine Boreaux, France, pp. 219-223.

-K-

- ✓ **Karthikeyan V. et Santash S. W. (2009).** Isolation and partial characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. African Journal of Microbiology Research Vol. 3 (5) pp. 233-239.
- ✓ **Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A et Zinedine, A.(2006).**Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco.Microbiol.Res.10 : 10-16.
- ✓ **KIHAL, M,** (1996). Etude de la production du dioxyde de carbone par leuconostoc mesentéroïdes, élément d'application en technologie fromagère type fromage bleu thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Oran.
- ✓ **Kim YS, Ho SB** (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12: 319-330.

-L-

- ✓ **Labioui H., Elmoudali L., El Yachioui M. et Ouhssine M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactérienne. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2005, 144, 237-250
- ✓ **Larpent J.P.** Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens : p180
- ✓ **Larpent J.P. et Bourgois C.M. (1989).** Microbiologie alimentaire. Les fermentations alimentaires.
- ✓ **Larpent J. P. et Larpent G. M., 1990:** Mémento technique de microbiologie 2^{ème} Ed. technique et documentaire Lavoisier, P : 417.
- ✓ **LAW B.A. and KOLSTAD J.(1983).** Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 225-245.

- ✓ **Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC (2010).** Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:171-184.
- ✓ **Lee YK, Mazmanian SK (2010).** Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science.* 330: 1768-1773.
- ✓ **Leveau J-Y. , Bouivenrielle, De Roissart H.(1991).** La flore lactique In technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires Bourgeois C.M., Leveau J-Y. *Tec & Doc*, Lavoisier, 152 p
- ✓ **Leveau J.Y, Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle : les uorg d'intérêt industriel.
- ✓ **Leveau J-Y et Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle : les uorg d'intérêt industriel. Edition : Tec&dac-Lavoisier : 170.171.181.
- ✓ **Luquet FM ; Correiu G (2005).** Bactériocines de Bactéries lactiques. *In:* « Bactéries lactique et probiotiques ». TEC 1 DOC éd., Paris. France. pp. 113-194.

-M-

- ✓ **Maghnia, D. (2011).** Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentes traditionnels algériens.
- ✓ **Mami A., Henni J. E. et Khihal M. (2008).** Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* species Isolated from Alrgenian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*. *World journal of Dairy and Food sciences* 3 (p): 39-49.
- ✓ **Mami A., 2013.-** Recherche des bactéries lactiques productrice des bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des impliqués dans les toxi-infections alimentaire en Algérie. Thèse de doctorat de l'université d'Oran : 25, 77.
- ✓ **Marchal, N., Bourdon, J.L.et Richard, CL. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris.
- ✓ **Molin G. (2008).** *Lactobacillus plantarum* The Role in Foods and in Human Health. In the Handbook of Fermented Functional Foods. Second Eition EDITED BY Edward R. Farnworth. CRC Press.

-N-

- ✓ **Nanatani K, Abe K (2011).** Energy generation coupled with decarboxylation reaction in lactic acid bacteria. In « *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research* » Sonomoto and Yokota/ Caister Academic Press éd., Norfolk.United kingdom. pp. 67-88

-O-

- ✓ **OMAR HASSAINE ,(2013).** caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien.
- ✓ **Onda T., Yanagida F., Tsuji M., Shinohara T., Yokotsuka K. (2003).** Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. *Int. J. Food Microbiol.*, **87**(1-2), 153-159.
- ✓ **O'Sullivan, L., Ross, R.P et Hill, C. (2003).** Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.* **84**: 593-604.
- ✓ **Otero MC, Nader-Macias ME (2006).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Anim. Reprod. Sci*96: 35-46.
- ✓ **Ouwehand. A. C. and Vesterlund. S. (2004).** Antimicrobiol components from Lactic Acid Bacteria in Lactic acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspect. Third Edition Marcel Dekker.
- ✓ **Oyetayo, V.O., Adetuyi, F.C. et Akinyosoye, F.A.(2003).** Safety and oral pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 90 : 172- 179
- ✓ **Ozgun D, Vural HC (2011).** Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. *J.M.G.G.3* (3): 46-49.

-P-

- ✓ **Paul Ross, R., Morgan, S. and Hill, C. (2002).** Preservation and Fermentation: present and future. *Int. J. Food. Microbiol.*, **79**: 3 – 16.
- ✓ **Perry JJ, Staley JT, Lory S (2004).** Bactéries Gram-Positives: Firmicutes et Actinobacteria. *In: « Microbiologie »*. Dunod éd., Paris. France. pp. 471-50.
- ✓ **Pilet M.R., Magras C. et Fedirighi M. (2005).** Bactériologie alimentaire : compendium d'hygiène des aliments. Edition : Economica. paris : 219-220.
- ✓ **Podolak, P. K., Zayas, J. F., Kastner, C. L. et Fung, D.Y.C. (1996).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59: 370-373.
- ✓ **Pridmore RD, Pittet AC, Praplan F, Cavadini C (2008).** Hydrogen peroxide production (by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity. *FEMS.Microbiol. Lett.* 283: 210-215.
- ✓ **Prioult G. (2003):** Effet des probiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la B- Lacto globine chez la souris et étude de leurs mécanismes d'action. Thèse Ph. D. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université Laval, Québec, PQ, Canada.

-R-

- ✓ **Raibaud P. (1994).** Interaction bactériennes dans le tractus digestif. Dans : Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques Ed. II, Loriga, Paris, 391-436.

-S-

- ✓ **Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D. E, Prcrost H. et Kihal M. (2002).** Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du lait cru de chèvre des régions arides d'Algérie. *Journal Algérien des régions arides.* , 01 : 01-14.

- ✓ **Samelis, J. Maurogenakis, F & Metaxopoulos, J. (1994).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int Food Microbiol* 23, 179-196.
- ✓ **Sath S. J., Nawani N. N., Dhakephalkar P.K et Kapadnis B. P. (2007).** Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf – life fresh vegetables. *J.Appl. Microbiol.*, 103: 2622-2628.
- ✓ **Savoy de Giori G. et Hébert M.(2001).** Methods to determine proteolytic activity of lactic acid bacteria. *Methods in biotechnology*, Vol. **14**: *Food Microbiol. Protocols. Humana Press.* Totowa. 197-202.
- ✓ **Schillinger U. et Lucke F-K,(1989).** Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology*. 4: 199-208.
- ✓ **Servin AL (2004).** Antagonistic activity of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS. Microbiol. Rev.* 28: 405-440.
- ✓ **Suomalainen T.H. et Mayra-Makinen en A.M.(1999).** Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. *Lait*, 79: 165-174.

-T-

- ✓ **Tailliez P. (2004).** Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Actualités microbiologiques*. 35-41.
- ✓ **Tamine A. Y. (2002).** Microbiology Of Starter Cultures. Dairy Microbiology Handbook Third Edition, Edited by Richard K. Robinsona John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- ✓ **THOMPSON J.K, M.A COLLINS. ET W.D. MERCER, (1994)** Characterisation of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ 450. *J. Appl. Bacteriol*, 80 338– 348
- ✓ **Todorov S. D., Van Reenen C. A. et Dickr L. M. (2004).** Optimization of bacteriocin-production by *Lactobacillus plantarum* ST 13BR, a strain isolated from barely beer. *J. Gen APPL. Microbiol.*, 50, 149-157.
- ✓ **Tourneur, C. (1972).** Aptitude à la protéolyse des bacilles présents dans les fromages et les lactoserums de fromage. *Lait* 52, 149-174.

-V-

- ✓ **Van Den Berg J. C., Smith A., Pot B., Ledeeboer A. M., Keresters K., Verbakel J.M.A. et Verrips C. T. (1993).** Isolation, screening and identification of lactic bacteria from traditional food, fermentation processes and culture collection. *Food Biotechnology*, 7, 183-205.
- ✓ **Vuilleumard J.C. (1986).** Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 3 : 1-65.

-W-

- ✓ **Wilson, A.R., Sigeo, D. et Epton, H.A.S. (2005).** Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1516-1522.
- ✓ **Wong, H.-C., et Chen, Y.-L. (1988).** Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2179-2184.

-Z-

- ✓ **Zalan. Z, Hudacek. J, Stetina. J, chumchalova. J et Halasz. A. (2010).** Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *Eur Food Res Technol* 203: 395-404.
- ✓ **Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vanningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J. and De Vuyst, L. (2006).** Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 487-495.

Annexes

Annexe I

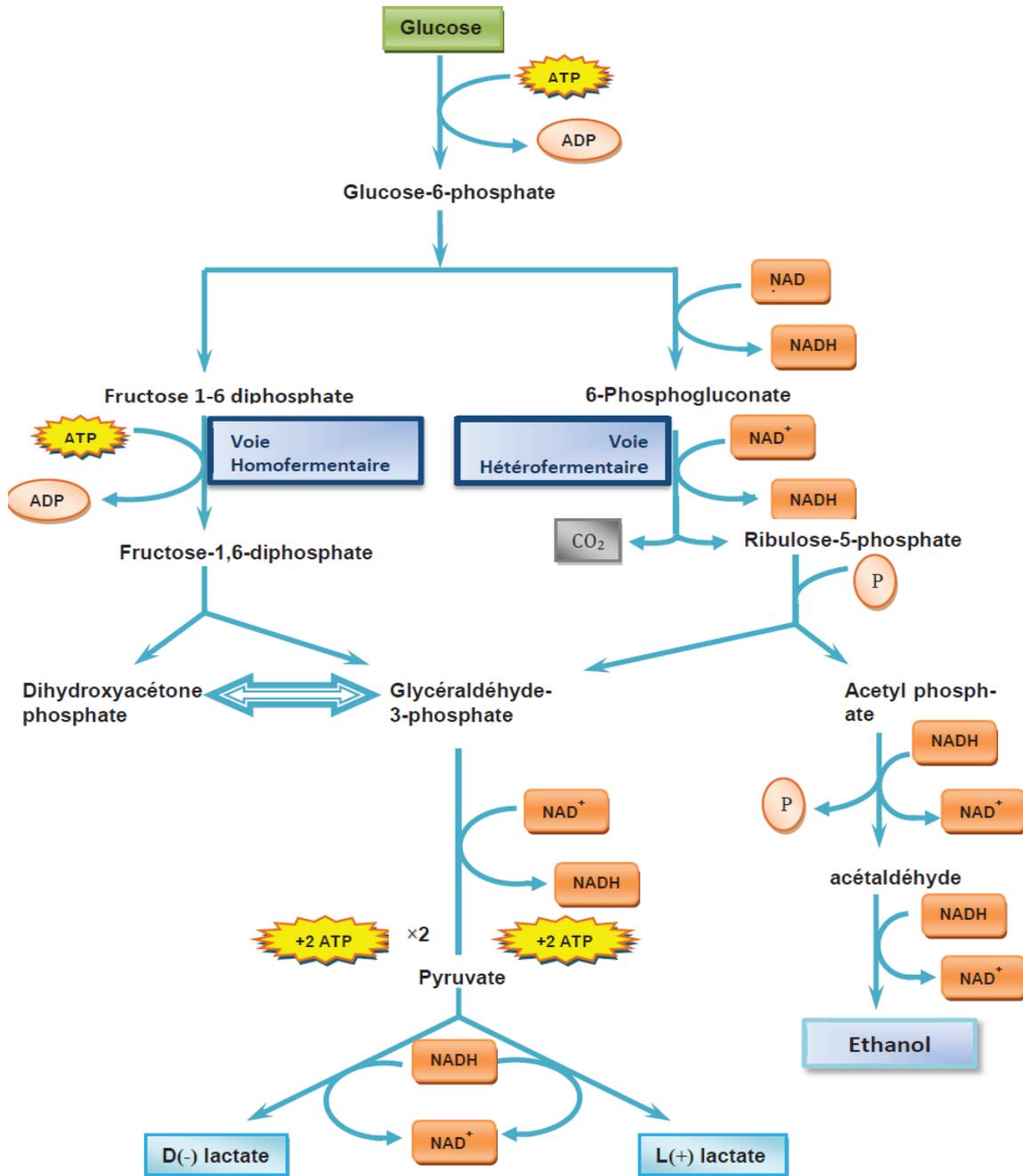


Figure 1 : Schéma succinct des principales voies métaboliques des lactobacilles (Perry et al., 2004).

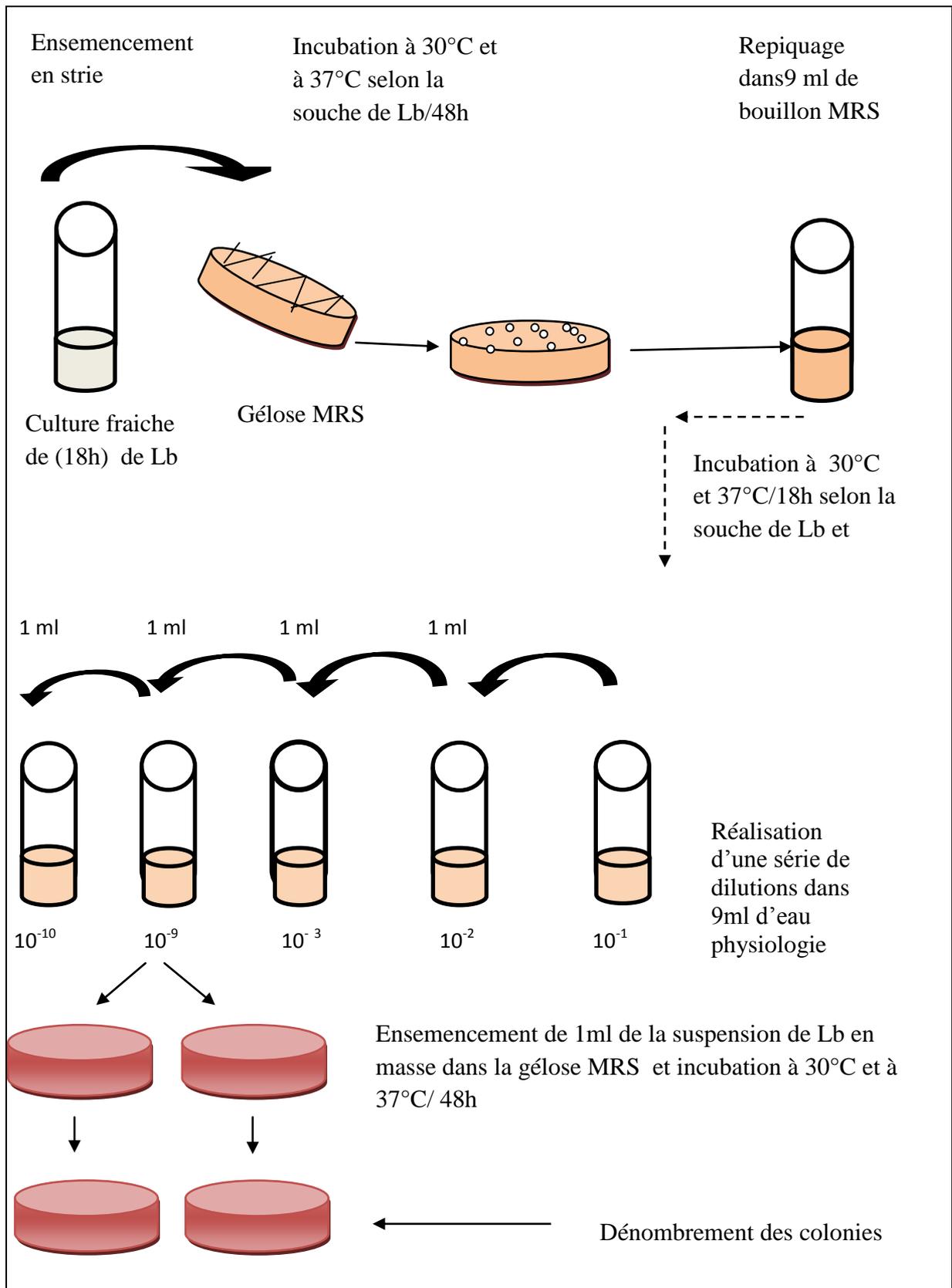


Figure 2: Standardisation des inocula des souches de *Lactobacillus*.

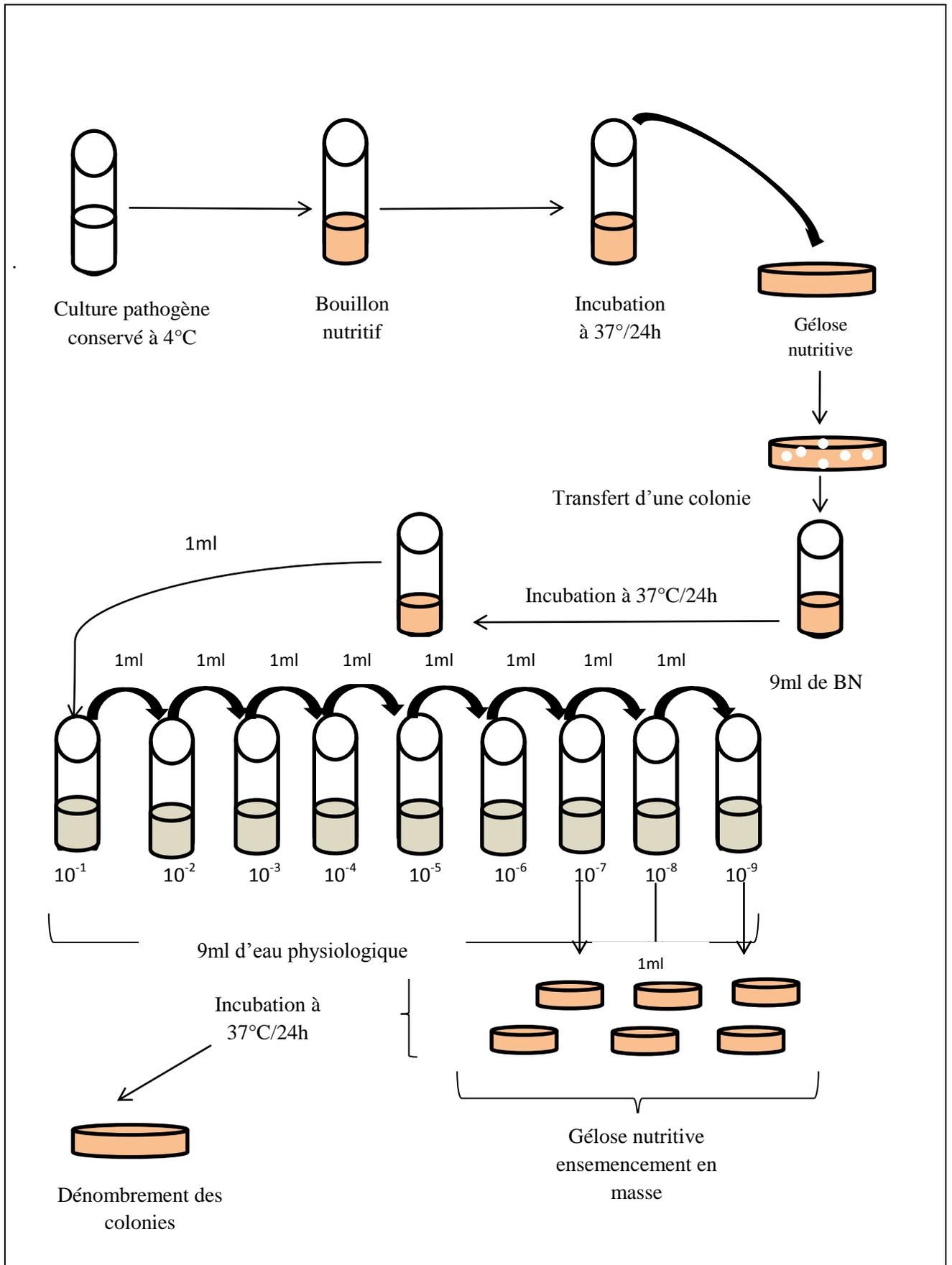


Figure 3 : Standardisation des inocula des souches pathogènes.

Annexe II

Tableau I : L'origine des échantillons laitiers.

Echantillon	2 échantillons de Lben artisanal de chèvre	Lben artisanal de vache	Raib artisanal de vache	Fromage frais industriel	Fromage artisanal (Alatig)	Lait de vache traditionnel
Provenance	Ain sekhoun, Béjaia	Aokas, Béjaia	Amtik, Béjaia	Akbou, Bejaia	Boussaâda	Souk el tenin, Béjaia

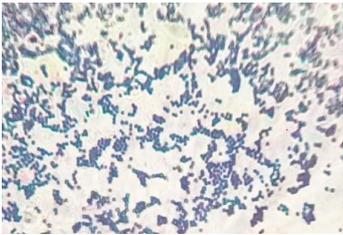
Tableau II : Caractéristiques physiologiques des souches isolées.

Souche		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S19
Production de Gaz		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Température	30° C	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37° C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	44° C	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
pH	4	+	+	+	-	+	+	++	++	++	++	+	+	+	+	+
	5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	9,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[Na Cl]	2%	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	4%	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	6,5 %	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	10 %	+	+	+/-	+/-	+	++	+	++	+/-	-	++	+	+	+/-	+

Tableau III: Diamètre des zones protéolytique des souches isolées.

Souche		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S19
Gélose MRS à																
Diamètre (mm)	1% du lait écrémé	4	3	3	2	0	2	4	0	0	0	0	0	0	4	2
	2% du lait écrémé	8	10	7	5	0	5	8	4	4	0	2	4	4	6	6

Tableau V: Aspect microscopique des souches pathogènes

souches pathogènes	Observation microscopique	Gram	Aspect microscopique
<i>E.coli</i> ATCC 25922		Négatif	Bacilles isolés ou en amas
<i>Staphylococcus aureus</i>		Positif	Coques en amas (grappe de raisin)
<i>Proteus sp</i>		Négatif	Petits bacilles isolés

<i>Klebsiella pneumoniae</i> (CTX-M-15)		Négatif	Petits bacilles isolés ou diplocoque
<i>Enterobacter cloacae</i> (CTX-M-15)		Négatif	Bacilles isolés

Tableau IV: Résultats de la standardisation des souches de souches testées.

Souche bactérienne	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S19
L'inoculum standard 10^9 UFC/ml	2	2,6	3	2,3	3,6	3,5	3,2	5	2,6	4	3	2,3	1,8	2,6	3

Tableau V: Résultats de la standardisation des souches de bactéries cibles.

Souches bactériennes	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus sp</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
L'inoculum standard (UFC/ml)	$4,5 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$	$1,7 \times 10^{10}$	10^9	10^9

Tableau VI : Diamètre de zones d'inhibitions des 15 souches isolées vis-à-vis des souches pathogènes (test des spots)

souches testées / souches cibles		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S19
		Diamètre d'inhibition (mm)	<i>E. coli</i>	14	6	10	18	30	24	10	0	0	22	22	16	12
<i>S. aureus</i>	20		12	16	12	20	18	22	20	0	20	20	14	16	0	18
<i>Kalebsiella pneunoniae</i>	24		0	24	22	12	16	0	30	0	20	18	20	18	40	22
<i>Proteus sp</i>	20		0	30	16	30	22	0	0	0	24	18	20	14	0	16
<i>Enterobacter cloacae</i>	32		10	24	20	26	0	0	0	24	14	20	18	24	22	26

Annexe III

Composition des milieux de culture et des solutions utilisées

Tableau I : Composition de bouillon nutritif (Guirand, 2003)

Composant	Quantité
Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml
pH final	7,2
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

- ❖ La composition de la **gélose nutritive** : Bouillon nutritif plus 15 g d'agar.

Tableau III : Composition de bouillon MRS (Guiraud, 2003)

Composant	Quantité
Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 ml
Phosphate bipotassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,2 g
Sulfate de manganèse, 4H ₂ O	0,05 g
Eau distillée	1000 ml
pH final	6,5 +/- 0,1
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

❖ La composition de la **gélose MRS** : Bouillon MRS plus 15 g d'agar

Tableau IX : Eaux physiologie (Guiraud, 2003)

Composant	Quantité
NaCl	9g
Eau distillé	1000 ml
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

Résumé

Au cours de cette étude réalisée les objectifs fixés étaient d'isoler et de sélectionner des souches de lactobacilles performantes .A l'issue de ce travail, des souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir des échantillons de quelques produits laitiers sur milieu MRS puis purifiées. Les résultats obtenus par l'étude des caractères morphologiques et culturaux et des caractères biochimiques ont permis de retenir 15 souches présumées appartenant au genre *Lactobacillus*. Les résultats fournis par l'étude des caractères physiologique semblent plus au moins intéressant car la plupart des souches résistent aux conditions hostiles (température, pH, NaCl) avec huit souches thermophiles.

Néanmoins, Seules deux souches (S1 et S2) présentent une activité protéolytique importante (3 à 10 mm) dans les deux concentrations (1% et 2% de lait écrémé). Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne ont montré que les souches de lactobacilles testées sont capables de synthétiser des substances inhibitrices. En effet, les quinze souches de *Lactobacillus* sont douées d'activité antibactérienne vis-à-vis de l'ensemble des pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus sp*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacae*), avec des zones d'inhibitions de 6 à 40 mm.

En résumé, les résultats obtenus suggèrent l'utilisation des souches sélectionnées appartenant au genre *Lactobacillus* dans l'industrie agroalimentaire peuvent être utilisé comme bioconservateurs. Cependant, ce travail doit être poursuivi afin de confirmer ces résultats.

Mots clés : Isolement, lactobacilles, pouvoir protéolytique, activité antibactérienne.

Abstract :

During this study realized in the laboratory of microbiology the objectives set were to isolate and to select performing strains of lactobacillus. At the end of this work, strains of lactic bacteria were isolated from some samples of dairy products then purified. Results of the study of morphological ,cultural and biochemical characteristics Have allowed to select 15 strains presumed to belong to Lactobacillus's genus. The study of physiological characteristics has shown that most of the strains are resistant to hostile conditions (temperature, PH , NaCl) , and eight of those strains are thermophilic.

However, only two of the strains isolated (S1 and S2) exhibit significant proteolytic activity (3 to 10 mm) in both concentrations (1% and 2% of skimmed milk). The study of the antibacterial activity showed that the strains of lactobacilli tested can synthesize inhibitory substances.

Indeed, The fifteen strains of Lactobacillus have an antibacterial activity against the pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus sp*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae*), zones of inhibition vary between 6 to 40 mm.

To recapitulate, the results obtained suggest the use of selected strains belonging to the Lactobacillus's genus in the agri-food industry where they can be used as bioconservatives, however this word has to be continued in order to confirm these results.

Keywords : Isolation, lactobacilli, proteolytic activity, antibacterial activity.