

République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة محمد السادس بن يحيى
كلية علوم الطبيعة والحياة
المكتبة
رقم الجرد : 1438.....



Université de JIJEL

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

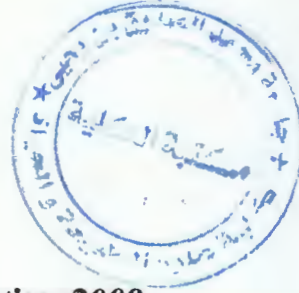
Mémoire de fin d'Etudes en vue de l'Obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures en Biologie
Option : Microbiologie.

Thème

*Isolement et identification de quelques souches des bactéries lactiques à partir de tube digestif de *Larus michahellis**

Membres de jury :
Examinatrice : M^{me} .Tahiri Nacira
Encadreur : Dr .Boudjerda Djamel

Réalisé par :
- Benzeghioua Hadjer
- Zemamouche Fadila
- Bensayoud Sarah



Promotion 2009

Remerciement

Nous tenons à remercier tout d'abord Allah le tout puissant et maître de l'univers qui nous a donné la capacité nécessaire, la forte volonté et la patience afin d'accomplir ce travail et qui nous a toujours guidé vers le bon chemin.

Puis, nous tenons à coeur à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur Mr Boudjerda djamal qui nous a suivis tout au long de ce travail et à la remercier infiniment pour ses conseils avisés, pour sa disponibilité continuelle et pour son encadrement déterminé. Merci de nous partager vos connaissances avec tant d'enthousiasme, de patience et de gentillesse.

Nous remercions vivement notre examinateur Mme Tahiri nacira d'avoir accepté de faire partie de notre jury et qui a sacrifié de son temps afin d'examiner et d'évaluer ce travail. Nous lui témoignons toutes nos reconnaissances.

Notre plus vif remerciement au chef de département de biologie moléculaire et cellulaire de l'université de Jijel Mr IDOUI TAYEB pour son aide et ses conseils précieux.

Et à tout les enseignants en particuliers ceux qui nous ont transmis leur savoir durant les quatre ans.

Nous ne serions bien sûr jamais arrivée là sans l'aide et le soutien de nos familles. Merci à nos parents pour avoir toujours cru en nous, merci de nous avoir soutenue dans cette voie, merci de votre présence, de vos encouragements, de vos conseils, de vos attentions constantes, merci pour tout j'espère vous rendre le bonheur que vous m'apportez.

SOMMAIRE

Introduction	01
Premier partie : Analyse bibliographique.	
Chapitre I : Notion générales sur les bactéries lactiques	02
I.1. Définition	02
I.2. Propriétés générales	02
I.3. Origine	02
I.4. Classification	03
I.4.1. Genre <i>Lactobacillus</i>	06
I.4.2. Genre <i>Streptococcus</i>	06
I.4.3. Genre <i>Lactococcus</i>	07
I.4.4. Genre <i>Pediococcus</i>	07
I.4.5. Genre <i>Leuconostoc</i>	08
Chapitre II : Biochimie des bactéries lactiques	09
II.1. Métabolisme du sucre	09
II.2. Métabolisme du citrate	11
II.3. Métabolisme de l'oxygène	11
II.4. Métabolisme des protéines	11
Chapitre III : Rôles et intérêt des bactéries lactiques	12
III.1. Role en industries laitière	12
1.1. Production de l'acide lactique	12
1.2. Production de polysaccharide	12
1.3. Production d'acétaldéhyde	12
1.4. Production des composées carbonylées à partir de citrate ..	12
1.5. Le rôle de la protéolyse	13
1.6. Role des bactéries lactiques dans la production de gaz	13
1.7. Production de composés d'aromes	13
1.8. Role dans la production de facteurs antimicrobiens	13
1.9. Role probiotique	14
Chapitre IV : Notions générale sur <i>Larus michahellis</i>	15
1. Classification	15
2. Généralité	15
3. Habitat	15
4. Comportement	15
5. Régime alimentaire	16
6. Nidification	16
7. Anatomie	16

Deuxième partie : Etude expérimentale

I. Matériel et méthodes	17
I.1. Matériel	17
I.1.1. Matériel biologique	17
I.1.2. Milieu de culture	17
I.1.3. Les sucres	17
I.1.4. Autres produits	17
I.2. Méthode de travail.....	19
-L'origine des souches des bactéries lactiques.....	19
-Autopsie des poussins de <i>Larus michahellis</i>	19
I.2.1. Technique d'isolement, purification et identification des souches des bactéries lactiques.....	19
a- Mise en culture et enrichissement	19
b- Isolement	19
c- Purification	20
d- Identification des souches utilisées	20
d-1- Examen macroscopique	20
d-2- Examen microscopique.....	20
d-3- Identification physiologique et biochimique	21
-Recherche de la catalase	21
-Recherche de l'oxydase	22
-Recherche de la réductase.....	22
-Recherche de citratase.....	22
-Dégradation des acides aminés	23
-Recherche de l'arginine déshydrogénase	23
-Recherche de l'ornithine décarboxylase	23
-Recherche de la lysine décarboxylase.....	24
-Recherche de l'acétoïne	24
-Profil fermentaire des sucres.....	25
-Test de croissance à différents températures	25
-Test de croissance en milieux hostiles	26
-Lait de SHERMAN	26
-Bouillon hypersalé.....	26
-Recherche de type fermentaire.....	27
-Hémolyse	27
I.2.2. Etudes de quelques propriétés technologiques.....	28
a. Recherche de l'activité protéolytique	28
b. Etude du pouvoir acidifiant	28
c. Production de polysaccharide	29
d. Les interactions bactériennes.....	29
III. Résultat et discussion.....	31
III.1. Isolement, purification et identification des bactéries lactiques.....	31
III.2. Aptitude technologique des bactéries lactiques	36
III.3. Les interactions bactériennes.....	41

Conclusion générale	43
References bibliographiques	
Annexes	

LISTE DES ABREVIATIONS :

ADH : Arginine déshydrogénase.
ADN : acide dicarboxy-nucléique.
ARN : acide ribonucléique.
ARNr : acide ribonucléique ribosomique.
C : cytosine.
CO₂ : dioxyde de carbone
G : guanine.
g : gramme.
h : heure.
H₂O : eau.
KOH : hydroxyde de potassium.
L : litre.
LDC : lysine décarboxylase.
ml : millilitre.
mn : minute.
NaCl : chlorure de sodium.
NaOH : hydroxyde de sodium.
O₂ : oxygène.
ODC : ornithine décarboxylase.
OX : oxydase.
pH : potentiel d'hydrogène.
sp : espèce.
ssp : sous espèce.
V : volume.
VpI : α-naphtol à 6% dans l'alcool absolu.
VpII : solution de potasse à 15% d'eau distillé.
°C : degré celsius.
°D : degré dornic.

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : classification des bactéries lactiques.....	5
Figure 2: la fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voie homofermentaire et voie hétérofermentaire	10
Figure 3 : Examen microscopique.....	31
Figure 4 : les résultats des testes d'identification.....	35
Figure 5 : le pourcentage des espèces	36
Figure 6 : Pouvoir acidifiant de <i>Bifidobacterium</i>	38
Figure 7 : l'interaction bactérienne entre les bactéries lactiques et <i>E.coli</i>	41

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 : Principaux espèces des groupes du genre <i>Lactobacillus</i>	6
Tableau 2 : Les différents genres des bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques	8
Tableau 3 : Principaux caractères physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques isolées	33
Tableau 4 : Profil fermentaire des sucres	34
Tableau 5 : Les noms des espèces identifiées	35
Tableau 6 : Pouvoir acidifiant des bactéries lactiques	37
Tableau 7 : Activité protéolytique des bactéries lactiques identifiées	39
Tableau 8 : Production des polysaccharides par les bactéries lactiques identifiées	40
Tableau 9 : Les interactions bactériennes	42

Introduction

Introduction :

Depuis l'aube de l'humanité, les bactéries lactiques sont employées pour la fabrication et la conservation d'aliment [1].

De très nombreux produits alimentaires subissent une fermentation lactique avant leur consommation, ce qui leur assure des caractéristiques bien particulières d'arômes sécurité alimentaire grâce aux acides organiques produits. Les bactéries qui en responsables sont toutes regroupées sous la même appellation de « bactéries lactiques » [2].

La caractéristique qui fonde l'unité de groupe bactérienne, défini au début du siècle, est la production d'acide lactique à partir de différents sucres [3].

En dehors de ce point commun, les nombreux genres et espèces qui constituent ce groupe présentent une grande diversité des caractéristiques morphologiques et physiologiques qui se traduit par des utilisateurs multiples [3].

Le principal secteur d'utilisation des bactéries lactiques est La technologie laitière. Cependant l'ensemble des souches bactériennes utilisées dans ce domaine sont isolées des différentes niches écologiques comme les tubes digestifs des animaux, les produits fermenté d'origine animale ou végétale et même parfois des produits non fermentés.

Dans le but d'une contribution à l'enrichissement de la banque des données dans ce domaine nous somme proposer un travail qui se divise en deux partie, une partie bibliographique et partie expérimentale et qui a pour objectif, l'isolement et l'identification des bactéries lactiques qui peuvent héberger le tube digestif d'un animal sauvage appartenant à l'espèce *Larus michahellis* avec détermination de leur pouvoir probiotique.

**Chapitre I:
Notions générales
sur les bactéries
lactiques**

I.1. Définition :

Le terme « bactéries lactiques » désigne des bactéries produisant de l'acide lactique par fermentation des sucres [4].

Les bactéries lactiques ont été définies par ORLA-JENSEN (1919) [1]. Elles forment un groupe hétérogène de microorganismes composé des cocci et des bacilles [5].

Sur la base des caractéristiques de fermentation, ce sont des homofermentaires si l'acide lactique est le seul produit formé et des hétérofermentaires si plus de l'acide lactique sont produits de l'acide acétique, de l'éthanol, de l'acide formique, CO₂... [6].

I.2. Propriétés générales des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques présentent des caractéristiques communes qui expliquent leur regroupement [1-7].

-Elles sont non pigmentées, aérobies-anaérobies facultatives, Gram positif, catalase négatif à l'exception de certains genres à pseudocatalase et tolérantes à des pH acides, non sporulées, généralement mésophiles, oxydase négatif, nitrate réductase négatif [1-6].

-Leur capacité de biosynthèse est faible, elles possèdent de ce fait une exigence élevée en facteurs de croissance : acides aminés, bases nucléiques, acides gras, vitamines... [8] (Polyauxotrophie) mais aussi leur métabolisme fermentaire :

Incapable de synthétiser le noyau hème des porphyrines, elles sont normalement dépourvues de cytochromes et en conséquence inaptées à toute respiration aérobie ou anaérobie.

-Ce sont des bactéries anaérobies facultatives : microaérophiles, uniquement capables de fermentation en aérobiose comme en anaérobiose [1].

-Elles peuvent être sous formes de bâtonnet (*Lactobacillus*) ou sous formes sphériques (streptocoques) [9].

I.3. Origine :

D'une manière générale, les bactéries lactiques peuvent être isolées du lait, des végétaux ou des alimentsensemencés par les végétaux [1].

La plupart des espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans le lait et les produits laitiers, mais un grand nombre a été isolé chez l'homme et les animaux (tractus digestif, organes génitaux) et participe à l'équilibre de la microflore de l'organisme [8].

Les espèces des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* ou *Leuconostoc* se rencontreront plutôt chez les hommes, les animaux et les oiseaux, on peut les isoler de la peau des animaux, des matières fécales et des poussières, mais aussi de l'ensilage du foin ou des grains [10].

Les espèces des genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* sont présents dans la bière, le vin, les produits (ensilages) et les saumures (anchois salés) [8].

I.4. Classification:

Les bactéries lactiques sont représentées par plusieurs genres [1].

Elles sont possibles de les classer suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides [11].

Il y a onze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques :

- *Aerococcus*
- *Alloicoccus*
- *Carnobacterium*
- *Enterococcus*
- *Lactobacillus*
- *Lactococcus*
- *Leuconostoc*
- *Pediococcus*
- *Streptococcus*
- *Tetragenococcus*
- *Vagococcus*



Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage se répand en industrie laitière [11].

Le rassemblement de ces genres dans un même groupe est confirmé par la taxonomie moléculaire ; l'analyse de la séquence nucléotidique de leur ARN ribosomiaux (ARNr) permet de réunir dans un même grand groupe phylogénétique [1-8].

Les genres principaux constituent le groupe des bactéries lactiques [8]:

-*Lactobacillus*(Lb).

-*Streptococcus*(Sc).

-*Lactococcus*(Lc).

-*Pediococcus*(Pc).

-*Leuconostoc*(Ln).

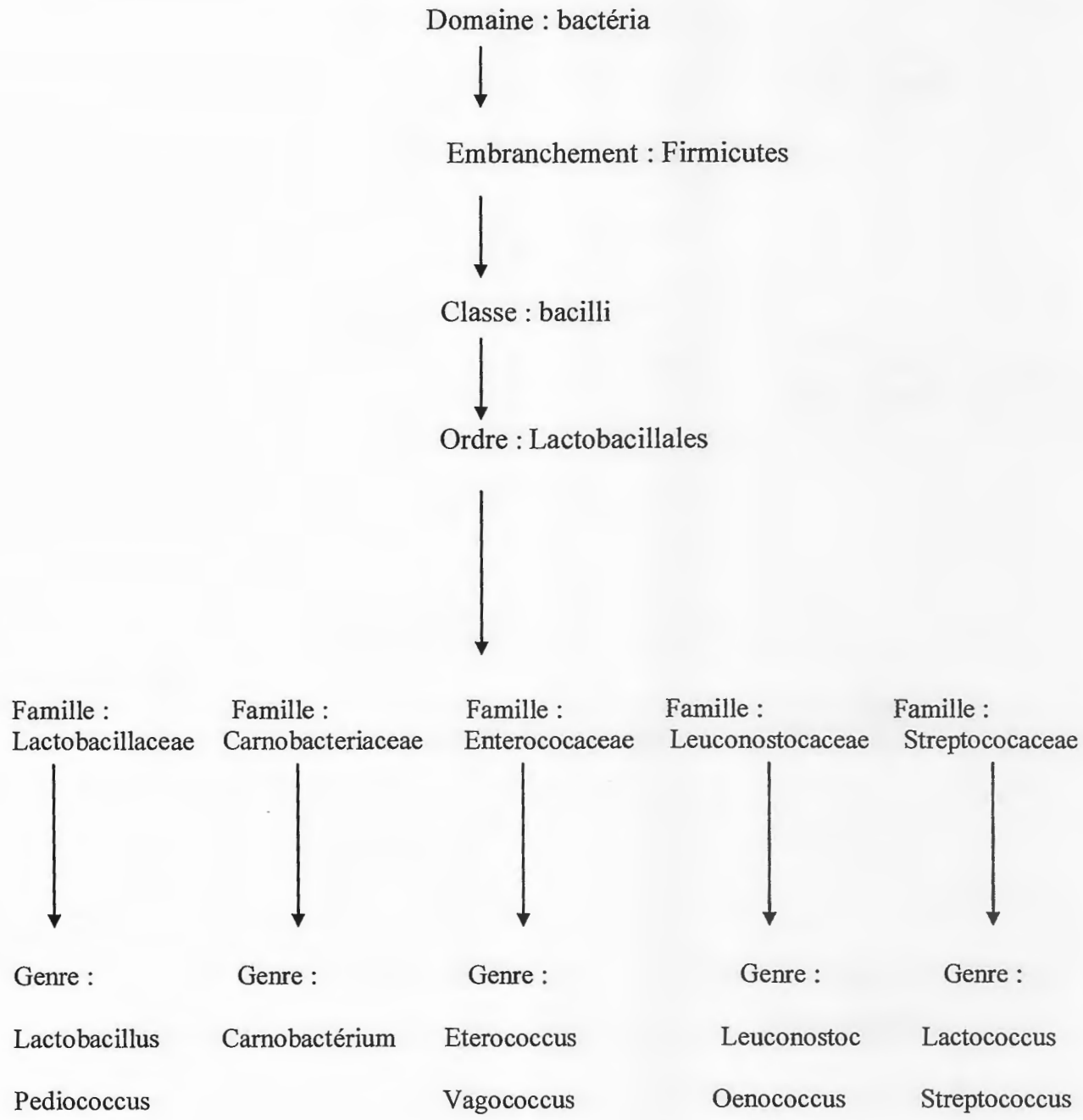


Figure 01 : Classification des bactéries lactiques [12]

I.4.1. Le genre *Lactobacillus*:

Lactobacillus est le genre principal de la famille des Lactobacillaceae [17].

Il a des aspects variés : bacille long et fin, bâtonnet court ou légèrement flexueux, coccobacille fréquemment en chainettes. Il a un métabolisme fermentatif, produisant au moins 50g/l d'acide lactique et d'autres métabolites comme les acides acétique, formique, succinique, l'éthanol et le CO₂ [14].

Il regroupe des nombreuses espèces dont l'hétérogénéité est illustrée par la variation du G+C% : 32 à 53% [8].

ORLA-JENSEN (1919) a proposé une classification fondée sur les caractères biochimiques et physiologiques. Il subdivise le genre *Lactobacillus* en trois groupes [13] :

Groupe « thermobactérium »

Il comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C.

Groupe « Streptobactérium »

Il regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles qui se développent à 15°C.

Groupe « bêtabactérium »

Il comprend les lactobacilles hétérofermentaires.

Tableau 1 : Principaux espèces des groupes du genre *Lactobacillus* [13].

groupes	Espèces
Thermobactérium	<i>L.helveticus</i> , <i>L.jugurti</i> , <i>L.bulgaricus</i> , <i>L.lactis</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>L.leichamni</i> , <i>L.delbrueckii</i> , <i>L.kefirifaciens</i> , <i>L.mali</i> .
Streptobactérium	<i>L.casei</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>L.curvatus</i> , <i>L.sake</i> , <i>L.acetotolerans</i> , <i>L.graminis</i> , <i>L.rhamnosus</i> .
Bêtabactérium	<i>L.fermentum</i> , <i>L.buchneri</i> , <i>L.brevis</i> , <i>L.viridiscene</i> , <i>L.kefir</i> , <i>L.fructivorans</i> , <i>L.hilgardii</i> , <i>L.sanfrancisco</i> .

I.4.2. Le genre *Streptococcus* :

Les bactéries du genre *Streptococcus* sont des cellules ovoïdes, sphériques ou quelque fois allongées en fuseaux. Elles se divisent sur un seul plan pour former des paires ou des chainettes [14-15].

Elles ont un métabolisme anaérobie, mais peuvent cultiver en présence d'air. Leur

culture nécessite habituellement des milieux riches [16].

Le pourcentage en base G et C de l'ADN de *Streptococcus* est entre 34-46% [1].

Le genre *Streptococcus* a fait l'objet de la classification ancienne de SHERMAN (1937) qui est restée commode durant de nombreuses années dans l'attente de critères de classification plus rigoureux. Celle-ci basée sur les caractères hémolytiques et cultureux [14].

Ils ont été classés en quatre groupes [13-14] :

-le groupe pyogens représenté par des espèces β -hémolytique et pathogène pour l'homme.

-le groupe viridans comprenant des espèces α -hémolytique, hôtes habituels de la cavité orale humaine.

-le groupe lactique avec des espèces communes du lait de vache.

-le groupe entérocoque qui rassemble les espèces d'origine intestinale.

La plupart des espèces des *Streptococcus* sont thermophiles, l'espèce *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produit laitiers) et son caractère non pathogène. Du fait de ses propriétés technologiques, c'est la seule espèce considérée comme un Streptocoque lactique [8].

I.4.3. Le genre *Lactococcus* :

Ce genre représente les streptocoques dits « lactiques », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène [8]. Ce sont des cellules sphériques, peuvent quelque fois s'allonger [1], mésophiles mais se développent jusqu'à 10°C.

Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers.

Les *Lactococcus* n'ont jamais été identifiés au cours de maladies infectieuses [14].

I.4.4. Le genre *Pediococcus* :

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le groupement en tétrades ou en paires, mésophiles [8].

Ils fermentent les sucres en produisant de l'acide lactique DL ou L (+) leurs exigences nutritionnelles, leur faible activité protéolytique et chez la plupart des espèces leur incapacité d'utiliser le lactose ne leur permet pas d'acidifier et de coaguler le lait. Ils sont aussi caractérisés par le G+C de leur ADN (34-42%) [1].

Les *Pediococcus* causent des altérations (viscosité) dans les produits végétaux (choucroute, olives, etc.) et par fois les viandes et les poissons [13].

I.4.5. Le genre *Leuconostoc* :

Les cellules de *Leuconostoc* sont des coques en paires ou en chaînes comme les streptocoques [1].

Les leuconostocs sont capables de fermenter le lactose et le citrate (composant salin du lait) par voie hétérofermentaire d'où production d'éthanol (alcool) et de CO₂ [17].

La plupart sont des bactéries utilisées dans l'industrie alimentaire mais certaines souches sont pathogènes opportunistes pour l'homme d'un point de vue médical, les infections à *Leuconostoc* sont rares et intéressent plutôt les patients immunodéprimés (sida, cancers, ...) [18].

Tableau 02 : les différents genres des bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques [8].

Genre	Morphologie	Fermentation	T ^{opt}	N ^b espèces
<i>Lactobacillus</i>	bacilles	Homo ou hétéro	thermophiles ou mésophiles	GI : 23 GII : 16 GIII : 22
<i>Lactococcus</i>	coques	homo	mésophiles	5
<i>Streptococcus</i>	coques	homo	mésophiles ou thermophiles	19
<i>Enterococcus</i>	coques	homo	mésophiles	13
<i>Pediococcus</i>	coques en tétrades	homo	mésophiles	7
<i>Leuconostoc</i>	coques	hétéro	mésophiles	11

T^{opt} : température optimale de développement

Homo : homofermentaires **hétéro :** hétérofermentaires

N^b espèces : Nombre d'espèces connues.

Chapitre II: Biochimie des bactéries lactiques

II. Biochimie des bactéries lactiques

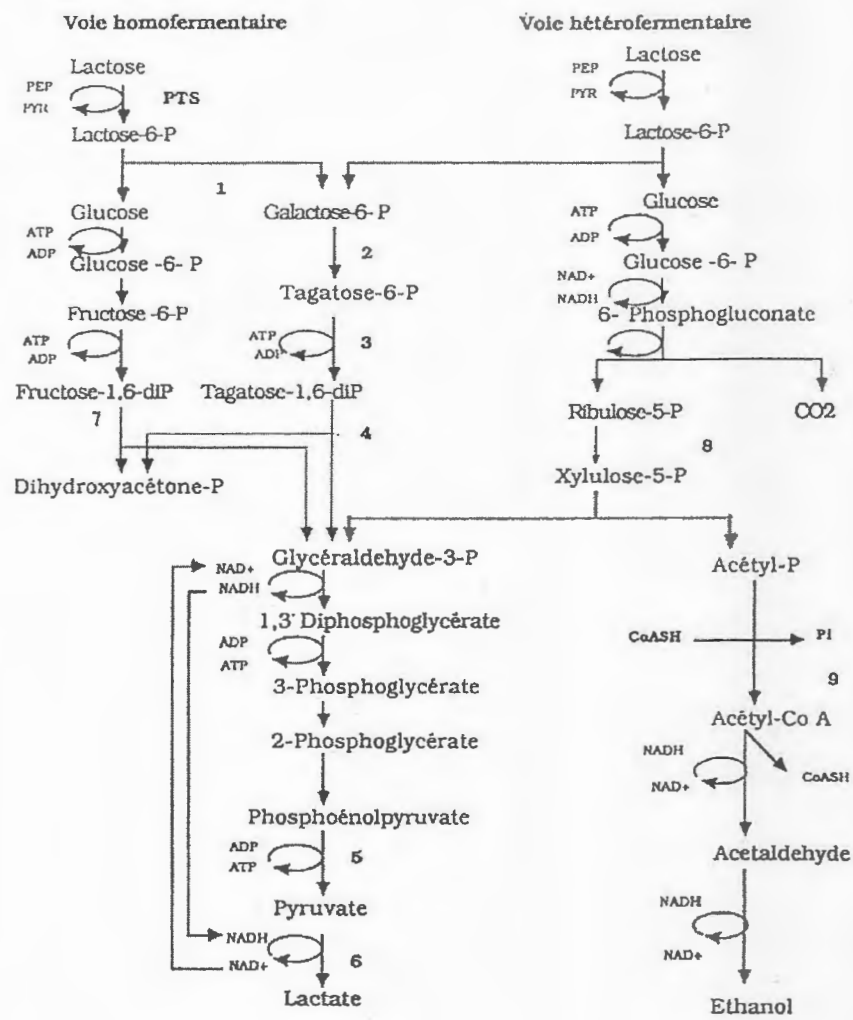
Le métabolisme de la cellule bactérienne comprend tout un ensemble des réactions chimiques qui se déroulent selon deux voies, liées et opposées : la voie de dégradation des aliments apportés par le milieu de culture (glucides, protéines et éventuellement lipides), c'est le catabolisme, qui correspond à un métabolisme énergétique et la voie de synthèse des nouvelles substances ou macromolécules (protéines, enzymes,...), c'est l'anabolisme, qui est un métabolisme de synthèse [19].

II.1. Métabolisme du sucre :

Les sucres sont fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tel que des hexoses (glucose, galactose) des pentoses (xylose, ribose,...) des hexitols et pontitols (mannitol, sorbitol) ou des disaccharides (lactose, saccharose,...). La capacité de métaboliser les sucres est souvent fonction des souches [20].

Lorsque la fermentation est homolactique, la production de lactate passe par la voie d'Embden-Meyerhof-PARNAS (EMP), et lorsque la fermentation est hétérolactique la voie employée est celle des pentoses-phosphate et aboutit à la production de lactate, d'éthanol et éventuellement d'acétate (Figure 2) [1].





■ Fig. 2 La fermentation du lactose chez les bactéries lactiques :
 voie homofermentaire et voie hétérofermentaire
 (1) : phospho-β-galactosidase ; (2) : tagatose-6-phosphate isomérase ;
 (3) : tagatose-6-phosphate kinase ; (4) : tagatose-1,6-diphosphate aldolase ;
 (5) : pyruvate kinase ; (6) : lactate déshydrogénase ; (7) : fructose-1,6-
 diphosphate aldolase ; (8) : pentose-5-phosphate cétolase ;
 (9) : éthanol déshydrogénase

II.2. Métabolisme de l'acide citrique :

Le métabolisme de l'acide citrique a un rôle physiologique important chez les bactéries lactiques en permettant par exemple une génération indirecte ou la synthèse des composés cellulaires [20].

Le citrate pénètre dans la cellule via la perméase (citrate perméase) à l'intérieur des cellules, le citrate est transformé en acétate et en oxaloacétate par le citrate lyase. L'acétate produit par l'action du citrate lyase est accumulé par les cellules alors que l'oxaloacétate est converti en pyruvate et CO_2 par une oxaloacétate decarboxylase. Chez certains Lactobacilles, on peut aussi observer une production du succinate à partir de l'oxaloacétate [20].

Deux voies différentes conduisent au diacetyl où à l'acétoine par l'acétoine réductase, on obtient le 2,3-butylén glycol à partir de l'acétoine. Le citrate réprime la synthèse de cette enzyme, ainsi que celle du diacetyl-réductase ce qui explique l'accumulation de diacetyl ou l'acétoine chez *Lactococcus* sp [2].

II.3. Utilisation d'oxygène :

Les bactéries lactiques sont souvent appelées bactéries anaérobies facultatives, mais ce terme cache une grande variété de comportement de ces germes vis-à-vis de l'oxygène. Certaines y sont très sensibles (*Bifidobacterium* sp), d'autre beaucoup moins (*Lactobacillus plantarum*). Dans les conditions d'aérobiose, chez la plupart des bactéries lactiques les molécules de NAD réagissent avec l'oxygène pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou une molécule d'eau grâce à des NADH : H_2O_2 oxydases. De plus, diverses enzymes conduisent généralement à l'accumulation de peroxyde d'hydrogène qui est plus au moins toxique pour la bactérie lactique productrice [2].

II.4. Métabolisme des protéines :

Les bactéries lactiques ne satisferont qu'une partie de leurs besoins par les acides aminés libres [2]. Leur croissance dans le lait reposé en grande partie sur leur système protéolytique [20].

Les protéines et les oligopeptides du lait ne peuvent traverser la membrane cytoplasmique des bactéries. Leur hydrolyse nécessite la présence de protéase et de peptidases bactériennes extracellulaires ou liée à l'enveloppe bactérienne grâce aux ions de calcium qui réaliser la première étape du processus de dégradation des protéines, ces derniers seront hydrolysés jusqu'aux stades acide aminé par différentes peptidases membranaires et cytoplasmique, après leurs transport dans le cytoplasme [1-2].

**Chapitre III:
Rôle et intérêt
des bactéries
lactiques**

III. Rôle et intérêt des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques peuvent avoir un effet sur les produits alimentaires.

- Un rôle bénéfique : il s'exerce principalement sur les produits fermentés lors des Processus technologiques. L'action des bactéries lactiques peut améliorer l'aspect et la qualité des produits [21].
- Un rôle négatif : il se traduit essentiellement par l'altération des denrées concernées, qu'elles soient fermentées ou non [8].

III.1. Rôle et intérêt en industries laitières :

III.1.1. Production de l'acide lactique :

Le métabolisme principal des bactéries lactiques a pour effet une production importante d'acide lactique conduisant à une acidification rapide et durable. Le pH final atteint dépend de la matière première fermentée et des souches utilisées [8].

III.1.2. Production de polysaccharide :

Les exopolysaccharides sont des polymères de carbohydrates produites par les bactéries lactiques, ont des propriétés épaississantes et gélifiantes qui modifient fortement la texture des milieux où ils sont excrétés.

Des nombreuses espèces des bactéries lactiques sont capables de produire des exopolysaccharides : les lactocoques, les *Leuconostoc*, *Streptococcus thermophilis*, *Lactobacillus* [20].

III.1.3. Production d'acétaldéhyde :

L'acétaldéhyde est réduit par le métabolisme chez les bactéries lactiques mésophiles donc il n'apparaît que très peu dans le milieu.

Mais, il peut en être autrement chez les bactéries lactiques thermophiles, en effet, les germes du yaourt ne possèdent pas l'alcool déshydrogénase et l'acétaldéhyde intracellulaire de ces microorganismes, ne sera pas réduit en éthanol, mais sera excrète comme produit final [10].

III.1.4. Production des composées carbonylées à partir de citrate :

La fermentation des citrates est accompagnée de la production de CO₂, sur tout abondante en présence de lactose et de galactose, en particulier sous l'action de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Cette propriété est utilisée dans les fromages à pâte persillée pour les quels il est recherché la formation de cavité dans le fromage qui servent d'habitat à *Penicillium roqueforti* [20].

III.1.5. Le rôle de la protéolyse :

Les bactéries lactiques ne peuvent utiliser que des acides aminés libres ou des peptides courts et qui sont peu abondants dans le lait. Leur nutrition azotée exige donc l'hydrolyse des grandes protéines de lait et notamment les caséines par des enzymes (les protéases situées dans la paroi extérieure de la cellule) [20].

III.1.6. Rôle des bactéries lactiques dans la production de gaz :

Certains ferments sont capables de produire du CO₂ à partir d'une source de carbone, participant ainsi à la formation d'ouvertures dans les fromages [20].

III.1.7. Production des composés d'arômes :

Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurres, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne [20].

III.1.8. Rôle dans la production des facteurs antimicrobiens :

Les travaux de Georges ont montré que certains ferments sont capables de produire des bactériocines ou d'autres inhibiteurs de microorganismes indésirables ; ces molécules sont particulièrement intéressantes pour l'élaboration de produits à partir de lait cru, donc susceptibles de contenir des microorganismes indésirables [20].

III.1.8.a. L'acide lactique et le pH :

Les bactéries lactiques ont un rôle fondamental dans l'inhibition des flores non lactiques, dont certaines sont pathogènes à la qualité des fromages. Cette action est due à l'abaissement du pH (qui inhibe la croissance de la plupart des germes non lactiques), à la toxicité propre de l'acide lactique [3].

III.1.8.b. Les bactériocines et la nisine :

Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre des souches des bactéries lactiques. Ils sont généralement thermorésistants actifs uniquement sur des bactéries lactiques à Gram positif [8-22].

Le rôle de la nisine dans la protection des produits laitiers est renforcé par le fait qu'elle possède une solubilité maximale aux pH acides rencontrés dans ces produits. Elle est commercialisée comme additif alimentaire, utilisable dans les fromages fondus [8-22].

III.1.9. Rôle probiotique :

Les probiotiques reconnus actuellement pour la plupart à la famille très réponde des bactéries lactiques que l'on trouve naturellement dans de nombreux produits alimentaires : les produits laitiers mais aussi dans la viande, le saucisson, les légumes, les poissons... [23-24]

Les probiotiques auraient des effets nutritionnels sur l'organisme, si les bactéries du yaourt semblent augmenter la concentration des vitamines du groupe B, elles appauvrissent globalement le lait en vitamines.

La croissance de *Lactobacillus acidophilus* dans le lait augmente la concentration des nombreuses vitamines [8].

Les Bifidobactéries produisent diverses vitamines dans le colon mais on ignore leur rôle dans la nutrition de l'enfant [8].

L'ingestion des probiotiques peut avoir un impact dans les domaines suivants : renforcement du système immunitaire, protection contre les infections gastro-intestinales, barrière contre les inflammations intestinales, les maladies allergiques, les allergies alimentaires, l'activité hépatique, participent à la prévention du cancer de la vessie et des candidoses vaginales [25].

Des autres rôles bénéfiques des probiotiques : production des bactériocines, antibiotiques et diminution de cholestérolémie [2].

Chapitre IV:
Notions générales
sur Larus michahellis

IV. Notions générales sur *Larus michahellis* :**IV.1. Classification :** (DERTORT et Al, 2003).

Règne	Animalia
Embranchement	Chordata
Sous Embranchement	vertebrata
Ordre	Cicon informe
Famille	Laridae
Sous Famille	Larinae
Tribu	Larini
Genre	Larus
Espèce	Larus michahellis

IV.2. Généralité :

Le Goéland leucopnée (*Larus michahellis*) fait partie de la famille des Laridés, dont il est en taille, le plus gros représentant en méditerranée [27]. Cet oiseau est appelée aussi « gabian » en provence. Il est souvent confondu avec la nouvelle rieuse, quoique de plus grande taille [26]. Il se reconnaît, en plumage adulte, à son dos gris, ses pattes jaune comportant une tache orange. Les jeunes volants de l'année font la même taille que l'adulte, mais ils arborent un plumage entièrement brun avec un bec sombre et des pattes souvent roses [26-27].

IV.3. Habitat :

Larus michahellis niche en colonies par milliers sur les falaises côtières et les îles rocheuses du littoral méditerranéen, par fois atlantique, et également à l'intérieur des terres, jusqu'aux centres urbains [28].

IV.4. Comportement :

Larus michahellis a su s'adapter à l'activité humaine, il se nourrit souvent dans les décharges publiques. Il devient commun en ville où il tente de niche sur les monuments. A la fin de leur reproduction, certains quittent la méditerranée migrant en atlantique ou mer du nord [28].

IV.5. Régime alimentaire :

Le régime alimentaire de l'espèce est très varié. S'il est à la fois pêcheur, chasseur (prédation sur les oiseaux aquatique et micromammifères), cueilleur (invertébrés terrestres tels que les vers de terre à la mise en eau des rizières ou dans les labours) et charognard dans les milieux naturels, il tire de nos déchets la plus large part de son alimentation : consommation des poissons non commercialisables rejetés derrière les chalutiers, et des déchets divers sur les décharges d'ordures ménagères [27].

IV.6. Nidification :

Le Goéland leucopnée (*Larus michahellis*) niche en colonies à terre, sur et entre les rochers, le sable et les galets. Dans un creux gratté au sol, il dispose un assemblage d'herbes, de branchettes, d'algues et de débris divers. La femelle pond fin mars/avril, 2 à 3 œufs. L'incubation dure 25 jours, peu après l'éclosion, les poissons picorent instinctivement la tache rouge du bec des parents, afin de provoquer la régurgitation des aliments du gosier [28-29].

Le poussin recouvert d'un duvet gris avec des marques foncées, il est semi nidifuge et vole au bout de 42 à 78 jours [28].

IV.7. L'anatomie :

L'appareil digestif comprend la cavité buccale, avec la langue et les glandes salivaires, l'œsophage, l'estomac, l'intestin, et les glands annexes. L'œsophage est un tuberon que présente par fois un renflement plus au moins accentué. L'estomac est divisé en deux parties, l'estomac glandulaire, et l'estomac musculaire, l'intestin aboutit au cloaque qui communique avec l'extérieur par l'anus. Ils ont un foie très volumineux, un pancréas, les reins qui filtrent les impuretés charriées par le sang, sont volumineux et situés contre la colonne vertébrale dans l'abdomen. L'urine très concentrée, a l'aspect d'une pâte blanche [27].

Etude Expérimentale

I. Matériel et méthodes :

Notre travail a été réalisé au niveau de laboratoire de microbiologie de l'université de JIJEL.

I.1. Matériel :**I.1.1. Matériel biologique :**

- **Lait écrémé** : c'est du lait utilisé pour la fabrication du lait pasteurisé et du yaourt, fourni par l'unité DIOROLAIT.

I.1.2. Milieux de cultures :

Au court de notre étude, nous avons utilisé les milieux suivants :

- Milieu M17 (TERZAGHI et SANDINE ,1975) : il convient bien à la culture des Streptocoques (lactocoque, Leuconostoc et Pediocoques).
- Milieu MRS (MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960) : liquide et gélose proposé pour la culture de Lactobacilles.
- Milieu GIBSON ABD-EL-MALEK : pour la recherche de type fermentaire (préparé au laboratoire).
- Milieu YMA (YEAST MILK AGAR) : pour la recherche de l'activité protéolytique (préparé au laboratoire).
- Milieu hypersaccharosé : pour la recherche de la production de polysaccharides (préparé au laboratoire)
- Bouillon hypersalé (préparé au laboratoire) à 4% de NaCl, et 6,5% de NaCl pour éliminer les streptocoques fécaux.
- Lait de SHARMAN : à 1% et 3% de bleu de méthylène pour étudier la sensibilité aux colorants (préparé au laboratoire).
- Lait tournesolé : préparé au laboratoire pour le test de réductase.
- Milieu citrate de SIMMONS : l'utilisation de citrate comme seul source de carbone.
- Milieu M.E.V.A.G sans sucre (milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides). Pour la réalisation des profils de fermentation des sucres.
- Milieu CLARK et LUBS : pour la recherche de l'acétoïne.
- ADH : pour la recherche de l'arginine dehydrolase.
- LDC : pour la recherche de la lysine décarboxylase.
- ODC : pour la recherche de l'ornithine décarboxylase.
- Le sang de cheval : pour la caractérisation du type d'hémolyse.
- Gélose nutritive.

I.1.3. Les sucres :

Pour établir le profil fermentaire des souches on a utilisé 12 sucres suivants : Amidon, Galactose, Dulcitol, Mannose, Saccharose, Lactose, Xylulose, Dextrine, Lévilose, Adonitol, Arabinose, Ribose.

I.1.4. Autre produits :

Au cours de notre travail nous avons utilisé :

- Violet de gentiane.
- Fushine.
- Lugol.
- Alcool.
- Huile de cèdre.
- Eau physiologique
- Bleu de méthylène.
- La soude (NaOH) N/9.
- Eau distillée stérile.
- Phénol phtaléine.
- VpI solution alcoolique d'naphtol.
- VpII solution aqueuse de soude 16%.
- Teinture de tournesole.
- Eau oxygénée (H₂O₂) pour le test de catalase.
- Chlorure de sodium (NaCl).
- Tween 80 additionné au milieu MRS.
- Les disques de papier WATMAN N° 4.
- Agitateur magnétique (MEIDOLPH, MR 3001).
- Boite de PETRI.
- Pipette graduée.
- Pipette pasteur.
- Anse de platine.
- Flacons stériles.
- Tubes à essai stérile.
- Les lames.
- Bec bunsen.
- Microscope optique, marque : OLYMPUS opticolco, LTD Model, CHK2, F-GS.
- Balance (DENYER intrement XP-600).
- Four pasteur (marque : furnace, Model N° F 601033).
- Bain marie (marque: Gerhad Boru, type SV24).
- Réfrigérateur (marque : ENIEM).
- Burette.
- pH mètre (MICROPROCESSOR pH mètre, pH 211).
- Autoclave (marque : SVI mortpllier, model, AVX 130 E).
- Etuve bactériologique (marque : Memert, type INB 500).

I.2. Méthode de travail :

I.2.1. Origine des souches des bactéries lactiques :

Lors de notre expérimentation les souches étudiées des bactéries lactiques sont isolées à partir du tube digestif de *Larus michahellis*.

I.2.2. Autopsie des poussins de *Larus michahellis* :

Cinq poussins de 6 semaines d'âge de *Larus michahellis* ont été sacrifiés et autopsiés (quatre en 2008 et un en 2009).

Les organes prélevés sont : le proventricule, le gésier et l'intestin grêle.

I.2.3. Techniques d'isolement, purification et identification des souches des bactéries lactiques :

I.2.3.1. Mise en culture et enrichissement :

- **But :**

L'enrichissement est souvent nécessaire pour la mise en évidence des germes pathogènes, en effet leur nombre peut être très réduit [13].

- **Principe :**

L'enrichissement consiste à mettre l'échantillon à la culture dans un milieu suffisamment sélectif et favorisant le développement des bactéries lactiques [13].

- **Technique :**

Après nettoyage des muqueuses, nous avons procédé à un raclage de la muqueuse des organes prélevés.

Les produits obtenus sont transférés dans un bouillon MRS et incubés à 37°C pendant 24 heures.

I.2.3.2. Isolement :

- **But :**

L'isolement des bactéries permet la séparation des bactéries d'un mélange et d'obtenir des souches bactériennes pures qui seront possibles d'identifier [19].

- **Principe :**

L'isolement des bactéries lactiques est de préférence réalisé en anaérobiose, l'incubation est réalisée à une température adéquate et aussi les milieux de culture doivent être riches en sucres, matières azotées et surtout les facteurs de croissance [19].

- **Technique :**

L'isolement a été réalisé par la technique décrite par Carbonnelle et al, 1987 et consiste à effectuer une culture par épuisement en plusieurs plans sur la surface des géloses solides [31]

L'isolement a été effectué sur gélose M17 et MRS pour chaque tube d'enrichissement.

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

I.2.3.3. Purification :

La purification a été réalisée par la technique décrite par (Carbonnelle et al, 1987). Il est effectué pour chaque isolement précédemment réalisé [30].

-on prend une seule colonie bactérienne cultivée sur milieu MRS et M17.

-on réalise l'ensemencement par épuisement en quatre plans sur gélose MRS et M17.

-on incube les boîtes à 37°C pendant 24 heures.

I.2.3.4. Identification des souches isolées :**I.2.3.4.a. Examen macroscopique :**

Pour l'examen macroscopique des colonies bactériennes, les souches doivent être cultivées sur gélose MRS ou M17. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures [19].

I.2.3.4.b. Examen microscopique :**➤ Coloration de Gram :**

- **But :**

Cette coloration permet de déterminer le mode de regroupement, la morphologie l'affinité tinctoriale des bactéries et la pureté des souches [32].

- **Principe :**

La coloration de Gram dépend de la structure particulière de la paroi cellulaire de chacun des deux groupes de bactéries.

Les bactéries à Gram négatif sont composées d'une couche peptidoglycane peu épaisse et d'une couche très riche en lipides, alors que les bactéries à Gram positif possèdent uniquement une couche de peptidoglycane [32].

Les colorants (violet de gentiane et lugol) pénètrent dans les deux types de cellules en formant des complexes qui peuvent être solubilisés par l'alcool, chez les bactéries à Gram négatif, ces complexes formés par le violet de gentiane sont alors perdus, donc les cellules décolorées absorbant la fushine qui les recolorent, en rose, par contre la paroi des bactéries à Gram positif leur coloration initiale violette [32-33].

- **Technique :**

La technique de coloration de Gram que nous avons adopté décrite par LAMBIN et GERMA en 1969 [32-33].

- utiliser des lames propres dégraissées par trempage à l'alcool, suivi de rinçage.
- déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame.
- prélever une colonie de culture bactérienne puis l'étaler sur la lame.
- laisser sécher en flambant légèrement jusqu'au séchage.
- recouvrir la lame par la solution de violet de gentiane.
- laisser agir une minute et rincer par l'eau.
- ajouter le lugol et laisser agir pendant une minute puis rincer par l'eau.
- décolorer par l'alcool et rincer par l'eau.
- colorer la préparation par la fushine et laisser agir pendant une minute puis rincer par l'eau.
- sécher, mettre l'huile de cèdre et observer à l'objectif x100 [19].

- **Lecture :**

Les cellules bactériennes sont colorées :

- violet : Gram positif.
- rose : Gram négatif.

I.2.2.4.c. Identification physiologique et biochimique :

➤ **Recherche de la catalase :**

- **But :**

Ce test permet de déterminer la présence ou l'absence de l'enzyme de catalase chez les souches bactériennes étudiées [34].

- **Principe :**

La catalase ayant la propriété de décomposer l'eau oxygéné avec dégagement d'oxygène, c'est l'action direct de l'enzyme qui mise en évidence dans la masse bactérienne, elle leur permettant de vivre en présence d'O₂ et en présence de la production de peroxyde d'hydrogène lors du phénomènes respiratoire [34-35].

Ces enzymes décomposent l'eau oxygénée en H₂O avec dégagement d'oxygène selon la réaction :



- **Technique :**

Sur une lame propre déposer une goutte d'eau oxygénée, à l'aide d'une pipette pasteur émulsionné une quantité suffisante d'une culture bactérienne de 24 heures [19].

Lecture :

- apparition du bulle d'air catalase positif.
- absence du bulle d'air catalase négatif.

➤ Recherche de l'oxydase :**• But :**

Ce test de déterminer la présence ou l'absence de l'enzyme oxydase chez les souches bactériennes étudiées [13].

• Principe :

Les oxydases misent en évidence par leurs propriétés de catalyser les réactions d'oxydations d'un substrat organique par l'oxygène de l'air [13].

• Technique :

Déposer sur une lame porte objet propre un disque « OX » et l'imbiber avec une goutte d'eau distillé, prélever une partie de la colonie à étudier à l'aide d'une pipette pasteur stérile et l'étaler sur le disque [19].

• Lecture :

L'apparition d'une coloration violette foncée sur le disque en quelque second, test oxydase positif [19].

➤ Recherche de réductase :**• But :**

Ce test permet la mise en évidence par le teinture de tournesol la présence d'une réductase [13].

• Technique :

On a préparé des tubes contenant le lait écrémé stérile et à un pH 7 additionné de teinture de tournesol de façon à obtenir une coloration bleue, on a ensemence le milieu par les souches a tester. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures [13,19].

• Lecture :

-La décoloration du lait indique la présence d'une réductase [19].

➤ Recherche de citratase :**• But :**

Ce test permet d'identifier les souches qui sont capable d'utiliser le citrate comme seul source de carbone et d'énergie [19].

- **Technique :**

Cette technique décrit par SIMMONS en 1926 et modifiée [19]. On ensemence la pente de ce milieu gélosé en stries longitudinales à l'aide d'une pipette pasteur, préalablement stérilisée à la flamme, à partir d'une colonie cultivée sur gélose MRS. Incubation à 37°C pendant 24 heures [19].

- **Lecture :**

-le virage de la couleur vert au bleu avec croissance bactérienne indique que les souches possèdent une citratase [19].

-la couleur ne change pas et absence de croissance bactérienne, citratase négatif [19].

➤ **Dégradation des acides aminés :**

-Recherche de l'arginine déshydrogénase :

- **But :**

Ce test permet de déterminer les souches qui sont capables de dégrader l'arginine [34].

- **Principe :**

La mise en évidence de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques, cette enzyme libère l'ammoniac, et la citruline à partir de l'arginine [34-35].

- **Technique :**

On ensemence chaque tube contenant le milieu MOELLER avec l'arginine par une souche à étudier, incubation à 37°C pendant 24 heures [34].

- **Lecture :**

-le milieu reste violet avec un trouble indique que la souche est ADH positif [35].

-le virage de la couleur au jaune indique que la souche est ADH négatif [35].

-Recherche de l'ornithine décarboxylase :

- **But :**

Ce test permet de déterminer les souches qui sont capables de dégrader l'ornithine [35].

- **Principe :**

La mise en évidence de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques, cette enzyme libère la putricine à partir de l'ornithine [34-35].

- **Technique :**

On ensemence chaque tube contenant le milieu MOELLER avec l'ornithine par le germe à étudier, incubation à 37°C pendant 24 heures [35].

- **Lecture :**

- le milieu reste violet avec un trouble indique que la souche est ODC positif [34].
- le virage de couleur violet au jaune indique la souche est ODC négatif [34].

-Recherche de la lysine décarboxylase :

- **But :**

Ce test permet d'identifier les souches qui sont capables d'utiliser la lysine [35].

- **Principe :**

La mise en évidence de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques, cette enzyme libère la cadavrine à partir de la lysine [34-35].

- **Technique :**

On ensemence les tubes qui contenant le milieu MOELLER avec la lysine par les souches à tester, incubation à 37°C pendant 24 heures [34].

- **Lecture :**

- milieu reste violet avec trouble, la souche est LDC positif [35].
- virage de couleur violet au jaune, la souche est LDC négatif [35].

➤ **Recherche d'acétoïne :**

- **But :**

La réaction de voges-proskauer permet de révéler la présence d'acétyl-méthyl-carbinol ou l'acétoïne chez les souches à étudier [35].

- **Technique :**

Ensemencer les milieux de CLARK et LUBS (peptone, phosphate bipotassique, glucose, pH7, 5) par les souches à tester, puis incubé 24 heures à 37°C [35]. Après l'incubation ajouter 0,5 ml de KOH ou NaOH (réactif VpI) et 0,5 ml d'alpha naphthol (réactif VpII) [35].

- **Lecture :**

- présence d'acétoïne (bactérie Vp positif) se traduit par une coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu [35].

➤ **Profil fermentaire des sucres :**

- **But :**

Ce test permet d'apprécier la capacité des souches à fermenter quelque sucre (amidon, saccharose, galactose,...) [34].

- **Principe :**

Ce test recherche la capacité d'un germe à utiliser par voie oxydative ou fermentative un substrat carboné (sucre) avec production de métabolites acides [34].

- **Technique :**

Ce test réalisé sur milieu M.E.V.A.G (milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides) dans des épindoufs. Pour effectuer ce test, on ajoute au milieu fondu et refroidi à 37°C quelque gouttes (cinq gouttes) du sucre à tester. Nos souches bactériennes sont ensemencées par piqueur central. Incubation à 37°C pendant 24 heures [34].

- **Lecture :**

- la virage de la couleur au jaune indique l'utilisation du substrat carboné (le sucre). (La fermentation commence dans la partie inférieure de l'épindouf) donc réaction positive [34].

-La couleur ne change pas (reste rouge) est le signe d'une réaction négative [34].

➤ **Test de croissance à différente température :**

- **But :**

Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles et les bactéries lactiques thermophiles [13].

- **Principe :**

La manipulation consiste à effectuer plusieurs cultures sur un milieu liquide bouillon MRS qui assurent une bonne croissance de la souche étudiée, l'incubation se fait à différentes températures (20°C et 45°C) [13].

- **Technique :**

A l'aide d'une anse de platine, nous avons ensemencés des souches à testés. Les tubes sont incubés à 45°C et à 20°C pendant 24 heures [13].

- **Lecture :**

-la croissance est appréciée par examen des milieux ; le trouble de bouillon témoigne d'une croissance [13].

➤ **Test de croissance en milieux hostiles :**

-Lait de SHERMAN :

- **But :**

Ce test donne l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène et de coaguler le lait [13].

- **Technique :**

Pour obtenir un lait à 0,1% de bleu de méthylène, nous avons ajouté au moment de l'emploi à 9 ml de lait stérilisé en tube 1 ml de bleu de méthylène à 1% et on ensemence par les souches à étudier. Ce test est surtout intéressant pour différencier les Streptocoques et les Lactocoques. Même procédé avec 0,3% de bleu de méthylène. Ainsi *Lactococcus lactis* est capable de pousser sur le lait de SHERMAN à 0,3% de bleu de méthylène. Les Streptocoques fécaux ne se développent qu'en présence de 0,1% de bleu de méthylène quant à *Streptococcus thermophilus*. Il est très sensible au colorant utilisé [13].

- **Lecture :**

-La décoloration du bleu de méthylène témoigne de la réaction positive [13].

-Bouillon hypersalé :

- **But :**

Ce test a pour but d'identifier les souches qui sont capable de croître dans un milieu hostile (différent concentration de NaCl) [13].

- **Principe :**

La croissance en présence de différente concentration de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Pour cela nous avons préparé le bouillon hypersalé à 4% et 6,5% de NaCl [13].

- **Technique :**

Les souches à tester sont inoculés dans les deux milieux à l'aide d'une anse de platine et incubés à 37°C pendant 24 heures [13].

- **Lecture :**

- La croissance est appréciée par l'apparition de trouble dans le milieu [13].
- L'absence du trouble signifie l'absence de la croissance [13].

- **Recherche de type fermentaire :**

- **But :**

Ce test permet de classer les espèces en hétérofermentaires ou homofermentaires [13].

- **Principe :**

Ce test permet d'apprécier le type fermentaire ou métaboliques par le quel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la fermentation des gaz (CO₂). Ce test est réalisé sur le milieu GIBSON ABD-ELMALEK [13].

- **Technique :**

Nous avons ensemencé des tubes contenant la gélose GIBSON ABD-EL-MALEK par piqueur centrale puis nous avons ajouté un bouchon de la gélose nutritive à la surface. L'incubation est faite à 37°C pendant 24 à 48 heures [13].

- **Lecture :**

-le développement des bactéries lactiques homofermentaire ne provoque pas de discontinuité entre le milieu de culture et le bouchon de la gélose nutritive (absence de CO₂). Le gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire [13].

- **Hémolyse :**

- **But :**

Ce test permet de mettre en évidence le pouvoir hémolytique des souches à étudier [36].

- **Principe :**

Lorsque on cultive les colonies pures des bactéries sur les milieux préparés avec le sang, les bactéries produisent des enzymes qui lysent les érythrocytes ou le milieu est modifié et deviennent transparent, ce phénomène s'appelle l'hémolyse et due à l'action les substances hémolytiques libérées par les bactéries [36].

- **Technique :**

Une ampoule de sang de cheval a été additionnée à un flacon de gélose MRS que l'on couler sur les boites de PETRI, après solidification de la gélose, on ensemence en strie et on incube à 37°C pendant 24 heures [36].

- **Lecture :**

Les colonies peuvent présenter l'un ou l'autre des aspects suivants [36]:

- colonies entourées d'une zone franche d'hémolyse, il s'agit de streptocoques beta-hémolytique (β).
- le milieu entourant la colonie verdâtre ce qui résulte la production de peroxyde d'hydrogène donc présence d'une hémolyse alpha (α).
- En fin le milieu n'est pas modifié : c'est une hémolyse gamma (γ).

I.2.4. Etude des aptitudes technologiques des souches :

Dans cette partie on va étudier quelques propriétés technologiques des souches identifiées tel que : l'aptitude d'acidification, le pouvoir protéolytique, la production de polysaccharides et les interactions bactériennes.

I.2.4.1. Pouvoir protéolytique :

- **But :**

Ce test consiste à étudier la capacité des bactéries à dégrader les protéines [37].

- **Principe :**

L'activité protéolytique est déterminée de façon rapide par un test de dégradation de la caséine pour ce la nous avons utilisé le milieu YMA pour tester les souches [37].

- **Technique :**

On a testés cette activité sur le milieu YMA qu'on a préparé au laboratoire, des disques de papier WATMAN N°4 sont imbibés dans la suspension bactérienne qu'on a purifiée préalablement, puis on a déposés sur la gélose YMA déjà coulée et solidifiée sur les boîtes de PETRI. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures [37].

- **Lecture :**

-Le pouvoir protéolytique se manifeste par d'une zone claire autour du disque [37].

I.2.4.2. Etude du pouvoir acidifiant :

- **But :**

Le but de ce test est la détermination de l'acidité du lait et d'apprécier la quantité d'acide produite par les bactéries lactiques au cours du temps [38].

- **Principe :**

L'acidité du lait est mesurée par une base forte (la soude dornic en présence de phénol- phtaléine). Cette activité est pratiquement due uniquement à l'acide lactique [38].

- **Technique :**

Chaque souche estensemencée dans un flacon de 120ml de lait écrémé stérile et incubée à 37°C [38].

Les mesures répétées se font à 0h, 2h, 4h, 6h, 8h et 24h [38].

- Mesure du pH :**

Pour l'évaluation de l'évolution de pH, on plonge l'électrode de pH mètre dans 10ml de lait inoculé par la souche et en note la valeur du pH enregistrée sur l'écran [38].

- Pouvoir acidifiant :**

Le pouvoir acidifiant est déterminé par titration d'un échantillon de 10ml de lait fermenté par la soude dornic en présence de 4 à 5 gouttes d'indicateur coloré (phénol phtaléine) jusqu'à virage à la couleur rose palle. La coloration rose doit persister au moins 10 secondes.

-L'activité en degré dornic est donnée par la formule :

$$\text{Acidité (°D)} = V \text{ NaOH} \times 10$$

V NaOH : volume de NaOH utilisé pour titrer l'acidité de l'échantillon [38].

I.2.4.3. Production de polysaccharides :

- **But :**

Ce test permet de déterminer les souches qui ont la capacité de produire des polysaccharides [37].

- **Technique :**

Pour étudier la capacité de nos bactéries lactiques à produire ces composés, nous avons utilisé la gélose hypersaccharosée [37].

L'ensemencement des souches se fait par des stries sur du milieu. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures [37].

- **Lecture :**

-la production de polysaccharide se manifeste par la présence des colonies larges et gluantes [37].

I.2.5. Etude des interactions bactériennes :

- **But :**

Ce test permet mettre en évidence les interactions entre les bactéries lactiques et d'autres souches bactériennes (*E. coli*, *streptococcus* et *staphylococcus*) et la mesure des diamètres de la zone d'inhibition au tour de la culture [38].

- **Principe :**

Le principe repose sur l'aptitude des souches des bactéries lactiques de produire des substances antibactériennes, ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide qu'on incube préalablement avec une souche cible [13].

Technique :

Après avoir coulé la gélose MRS dans des boîtes de PETRI et après solidification on ensemence la souche à tester par étalement et laisser sécher. L'ensemencement des souches se fait par touche en surface. L'incubation à 37°C pendant 24 heures [38].

- **Lecture :**

-La lecture est en rapport avec l'apparition des zones d'inhibition au tour des souches [38].

Resultats et discussion

III.1. Isolement, purification et identification des bactéries lactiques :

- Isolement, purification et l'examen macroscopique :

On a observé les colonies de différentes tailles, bien isolées, de couleur branchâtre et jaunâtre brillante, à pourtour régulier, certaines ont des formes circulaires et lenticulaires (convexe). Toute fois sur chaque boîte, on à observe des colonies de même couleur et même taille témoignent de la pureté des souches.

-coloration de Gram :

L'observation au microscope optique révèle deux formes de bactéries :

- Des bâtonnets disposés en chaîne plus au moins longues: ce sont des lactobacilles et *Bifidobacterium* qui présentent: 87,5% de la collection lactique.
- Des coques par paires (diplocoques): ce sont des lactocoques qui représentent 12,5%de la collection lactique.

Toutes les souches isolées sont de couleur bleue violette.

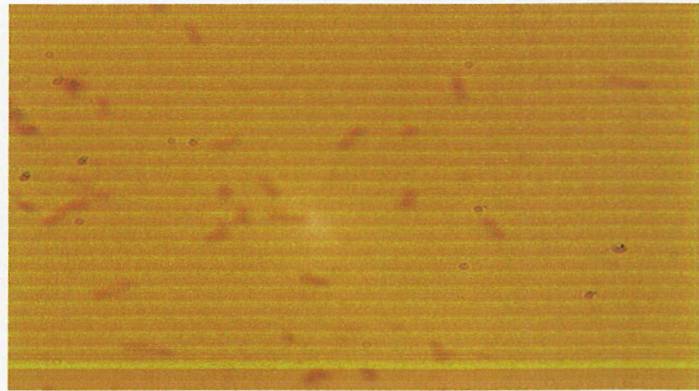


Figure 3 : Examen microscopique.

-L'identification physiologique et biochimique :

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques d'identification révèlent les résultats suivants :

Les seize souches sont à catalase négative (pas l'apparition des bulles d'air).

Les seize souches sont à oxydase négative (pas l'apparition de couleur violette).

Toute fois la recherche de la réductase a révélé que les seize souches sont incapables de réduire et de coaguler le lait tournesolé.

La recherche du citratase a révélé que les seize souches sont incapables d'utiliser le citrate comme seul source de carbone.

D'après les résultats du test ADH, on a remarqué que deux souches donnent des résultats positifs, donc les deux souches sont capables de dégrader l'arginine et libérer l'ammoniac (couleur violet avec trouble), le reste donnent des résultats négatifs (couleur jaune).

D'après les résultats du test LDC, on a remarqué que une seule souche S₈P donne un résultat positif, donc capable de dégrader la lysine, une souche A₁ donne un résultat intermédiaire (plus au moins), le reste donnent des résultats négatifs (couleur jaune).

D'après les résultats du test ODC, on a remarqué que une seule souche S₂P donne un résultat positif (couleur violet avec trouble), il est capable d'utiliser ou dégrader l'ornithine, le reste donnent des résultats négatifs (couleur jaune).

Pour la recherche de l'acétoïne, les résultats étaient négatifs chez les seize souches (absence de la couleur rose).

Le test de croissance à différentes températures montre que sept souches sont capables de croître à 45°C, mais le reste des souches ne croître pas à 45°C et montre que neuf souches sont capables de croître à 20°C et le reste de souches ne croître pas à 20°C.

Le test de la recherche d'une réductase (développement et décoloration du lait de SHERMAN) montre que les seize souches donnent un résultat positif à 0,1% de bleu de méthylène, donc il y a une réduction de bleu de méthylène avec coagulation du lait.

Les seize souches donnent un résultat négatif sur le lait de SHARMAN à 0,3% de bleu de méthylène (absence de réduction de bleu de méthylène et coagulation du lait).

Dix souches donnent un résultat positif (présence d'un trouble) sur le bouillon hypersalé à 6,5% de NaCl, les autres souches donnent un résultat négatif (absence d'un trouble).

Onze souches donnent un résultat positif (présence d'un trouble) sur le bouillon hypersalé à 4% de NaCl, mais le reste des souches donne des résultats négatifs (absence d'un trouble).

Sur le milieu GIBSON ABD-EL-MALEK, il y a un déplacement du bouchon de la gélose chez une seule souche et production de gaz, donc la souche est hétérofermentaire. Pour le reste des souches, il n'y a aucun développement du bouchon de la gélose, donc ce sont des homofermentaires.

Le résultat du test d'hémolyse montre que les seize souches sont gamma hémolytiques (le milieu de culture n'est pas modifié).

Les résultats des tests physiologique et biochimique sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Principaux caractères physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques isolées.

	A ₁	A ₂	A ₃	A ₂ '	A ₂ S ₂	A ₄ S ₂	S ₁ P	S ₂ P	S ₁₈ P	S ₁₀ G	S ₁₁ G	S ₁₃ G	S ₁₄ G	S ₁₅ G	S ₁₆ C	S ₁₇
Forme	co	ba	ba	ba	ba	ba	ba	ba	ba	ba	ba	ba	ba	co	ba	ba
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Réductase	R- C-	R- C-	R- C-	R- C-	R- C-	R- C-	R- C-	R- C-	R- C-	R- C-	R- C-	R- C-	R- C-	R- C-	R- C-	R- C-
Culture à 45°C	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Culture à 20°C	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
Culture en NaCl 4%	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
Culture en NaCl 6,5%	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
Lait de SHERMAN à 1% BM	r+ c+	r+ c+	r+ c-	r+ c-	r+ c-	r+ c-	r+ c+	r+ c+	r+ c+	r+ c+	r+ c+	r+ c+	r+ c+	r+ c+	r+ c+	r+ c+
Lait de SHERMAN à 3% BM	r- c-	r- c-	r- c-	r- c-	r- c-	r- c-	r- c-	r- c-	r- c-	r- c-	r- c-	r- c-	r- c-	r- c-	r- c-	r- c-
ADH	±	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
LDC	±	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétoïne	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citratase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Type fermentaire	ho	ho	ho	ho	ho	ho	ho	ho	ho	ho	ho	ho	ho	ho	hété	ho
hémolyse	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ

co: coques
ba: bacillesho : homofermentaire
hété : hétérofermentairer : réduction
c : coagulation+ : test positif
- : test négatif

Tableau 4: Profil Fermentaire des sucres.

	A ₁	A ₂	A _{2'}	A ₃	A ₂ S ₂	A ₄ S ₂	S ₁ P	S ₂ P	S ₈ P	S ₁₀ G	S ₁₁ G	S ₁₃ G	S ₁₄ G	S ₁₅ G	S ₁₆ C	S ₁₇
Amidon	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Galactose	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Mannose	++	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Lactose	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Xylose	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Dextrine	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Levulose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	±	+	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
Arabinose	-	-	-	+	-	-	±	±	±	+	+	+	+	±	+	+
Ribose	+	-	-	+	+	-	-	±	-	+	+	-	+	-	+	+

- : négatif.

+ : positif.

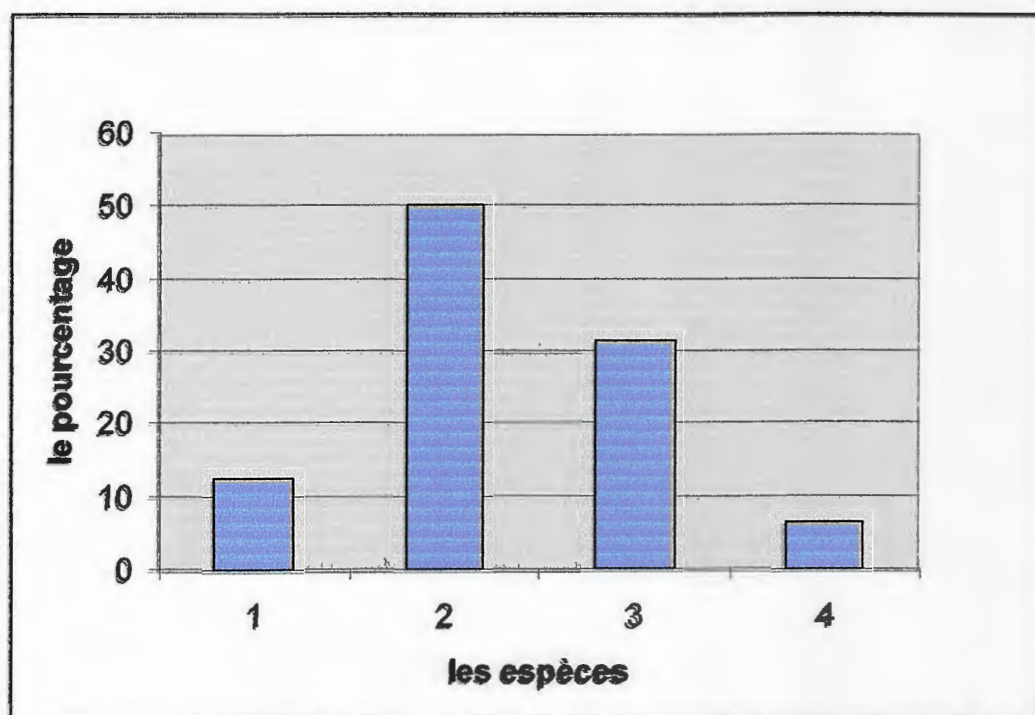
± : résultat douteuse.



Figure 4 : Les résultats des testes d'identification.

Tableau 5: Les noms des espèces identifiées

Codes	Noms d'espèces identifiés
A ₁	<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>
A ₂	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i>
A _{2'}	<i>Lactobacillus casei</i>
A ₃	<i>Lactobacillus casei</i>
A ₂ S ₂	<i>Lactobacillus casei spp tolerens</i>
A ₄ S ₂	<i>Lactobacillus casei spp tolerens</i>
S ₁ P	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i>
S ₂ P	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp</i>
S ₈ P	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp</i>
S ₁₀ G	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
S ₁₁ G	<i>Lactobacillus casei</i>
S ₁₃ G	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp</i>
S ₁₄ G	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis</i>
S ₁₅ G	<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>
S ₁₆ C	<i>Bifidobacterium sp</i>
S ₁₇	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>



- 1 : *Lactococcus lactis*.
2 : *Lactobacillus delbrueckii*.
3 : *Lactobacillus casei*.
4 : *Bifidobacterium*.

Figure 5: Le pourcentage des espèces.

III.2. Aptitude technologique des bactéries lactiques :

-Pouvoir acidifiant :

Les résultats de l'étude de pouvoir acidifiant montrant que les souches identifiées ont un pouvoir acidifiant dont la qualité d'acide lactique exprimé en degré dornic compris entre 80°D et 90°D pendant 24 heures sauf quelques souches comme *Bifidobacterium*, *Lactococcus lactis ssp cremoris* et *Lactobacillus casei* dont le degré dornic atteint 96°D après 24 heures d'incubation ont une performance acidifiante plus au moins intéressante (tableau 6).

La vitesse de la production d'acide lactique est un critère important en technologie ou l'on cherche les souches les plus acidifiantes.

En fin, il apparaît que la majorité des souches coagulent le lait en un temps économique moins de 24h. Ces souches sont dites « Fast acid producer » [37].

Tableau 6 : Pouvoir acidifiant des bactéries lactiques.

souches	0h		2h		4h		6h		8h		24h	
	pH (M)	°D	pH (M)	°D	pH (M)	°D	pH (M)	°D	pH (M)	°D	pH (M)	°D
A ₁	6,03	25	6,06	27	5,94	33	5,81	38	5,55	50	4,84	86
A ₂	6,03	23	6,05	24	5,96	32	5,79	39	5,77	56	4,90	86
A ₂ '	6,03	23	6,01	24	5,93	34	5,81	37	5,77	50	4,93	87
A ₃	6,06	23	5,99	24	5,96	33	5,78	39	5,60	54	4,79	90
A ₂ S ₂	6,10	24	6,01	28	5,87	36	5,70	40	5,52	58	4,82	87
A ₄ S ₂	6,12	24	6,11	26	6,01	29	5,97	36	5,80	49	4,94	84
S ₁ P	6,11	25	6,10	26	5,99	32	5,94	35	5,79	50	4,80	90
S ₂ P	6,11	25	6,10	27	5,83	34	5,81	38	5,68	51	4,83	87
S ₈ P	6,09	24	6,06	25	5,80	36	5,69	39	5,46	60	4,78	92
S ₁₀ G	6,05	24	6,04	26	6,01	28	5,95	32	5,80	48	4,79	90
S ₁₁ G	6,14	23	6,07	28	5,71	38	5,60	42	5,43	66	4,61	94
S ₁₃ G	6,09	24	6,16	23	6,02	30	5,96	34	5,81	48	4,92	84
S ₁₄ G	6,14	23	6,13	24	6,05	29	5,97	31	5,79	46	4,98	88
S ₁₅ G	6,14	23	6,13	24	5,99	31	5,86	33	5,67	54	4,59	95
S ₁₆ C	6,13	24	6,11	25	6,03	28	5,94	32	5,77	50	4,51	98
S ₁₇	6,14	23	6,08	26	5,91	34	5,79	39	5,56	58	4,82	90

°D : degré dornic.

h : heure.

M : moyenne.

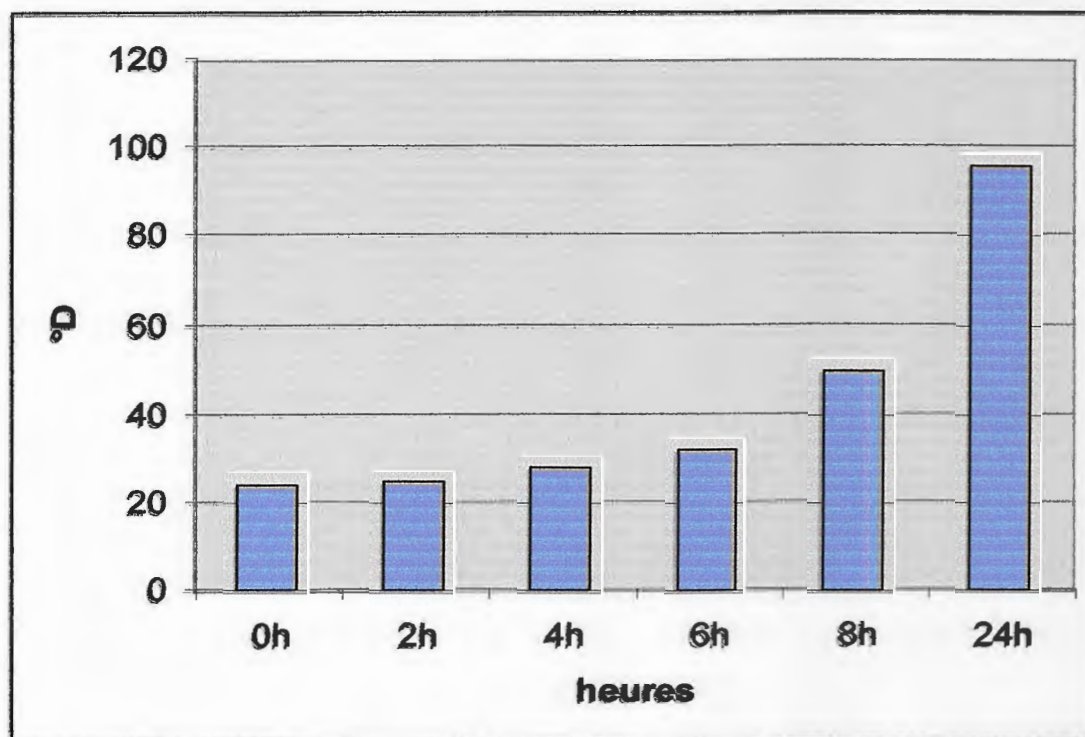


Figure 6 : Pouvoir acidifiant de *Bifidobacterium*.

-Résultat de l'étude du pouvoir protéolytiques des souches des bactéries lactiques :

Pour les résultats de l'étude de l'activité protéolytique des souches, nous avons constatées que les coques lactiques isolées, ne sont pas protéolytiques malgré qu'ils ont la capacité de croître sur milieu YMA.

Egalement pour les souches de *Lactobacillus*, elles ne sont pas protéolytiques, ces dernières ont la capacité de se développer sur le milieu YMA sans produire des zones de protéolyse.

La souche *Bifidobacterium* possède un faible activité protéolytique, caractériser par l'apparition d'une zone de protéolyse résulte d'une activité protéolytique de la souche (dégrade les protéines) donc la plupart des souches n'ont pas le pouvoir protéolytique, ce ci est confirmé par LARETA et al.,1997) qui rapportent les bactéries lactiques sont peu protéolytique [39].

Cette incapacité à hydrolyser les protéines chez les souches étudié est probablement liée a la perte ou l'absence du gène ou plasmide codant pour cette activité car les propriétés technologique des bactéries lactiques sont portées par les plasmides [40]. La présence d'une zone de protéolyse indique la présence du gène ou plasmide codant pour cette activité [40].

En fin, les résultats obtenus indique 93,75% des souches ne possèdent pas une activité protéolytique.

La protéolyse due aux bactéries lactiques sera surtout conduite à des peptides courts et à des acides aminés libres, ces derniers sont des précurseurs pour de nombreux produits d'arômes (tableau 7).

Tableau 7 : Activité protéolytique des bactéries lactiques identifiées.

Codes	Noms d'espèces identifiés	Evaluation du test	Diamètre (mm)	Observation
A ₁	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	-	0	Croissance sans protéolyse
A ₂	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>	-	0	Croissance sans protéolyse
A _{2'}	<i>Lactobacillus casei</i>	-	0	Croissance sans protéolyse
A ₃	<i>Lactobacillus casei</i>	-	0	Croissance sans protéolyse
A ₂ S ₂	<i>Lactobacillus casei</i> spp <i>tolerens</i>	-	0	Croissance sans protéolyse
A ₄ S ₂	<i>Lactobacillus casei</i> spp <i>tolerens</i>	-	0	Croissance sans protéolyse
S ₁ P	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>	-	0	Croissance sans protéolyse
S ₂ P	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp	-	0	Croissance sans protéolyse
S ₈ P	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp	-	0	Croissance sans protéolyse
S ₁₀ G	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	-	0	Croissance sans protéolyse
S ₁₁ G	<i>Lactobacillus casei</i>	-	0	Croissance sans protéolyse
S ₁₃ G	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp	-	0	Croissance sans protéolyse
S ₁₄ G	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>lactis</i>	-	0	Croissance sans protéolyse
S ₁₅ G	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	-	0	Croissance sans protéolyse
S ₁₆ C	<i>Bifidobacterium</i> sp	+	6	Croissance avec protéolyse
S ₁₇	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	-	0	Croissance sans protéolyse

-Production des polysaccharides :

Les résultats montre que tout les lactocoques et les lactobacilles ont la capacité de se développer sur milieu hypersaccharosé, mais n'ont pas la capacité de les produire des exopolysaccharides qui pouvait être influencé par les conditions de cultures comme ils montrent GAMAR-NOURANIL et al [41] et qui demontrent que les conditions de culture influe sur la production des exopolysaccharides (sucres utilises, T°, pH, O₂) il faut noter que la souche *Bifidobacterium* à la capacité de croître sur le milieu hypersaccharosé et la capacité de produire des exopolysaccharides ce qui la qualifie que cette bactérie pouvant être utiliser comme levain epicissant.

Tableau 8 : Production des polysaccharides par les bactéries lactiques identifiées.

Codes	Noms d'espèces identifiés	Evaluation du test	Observation
A ₁	<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides
A ₂	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides
A _{2'}	<i>Lactobacillus casei</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides
A ₃	<i>Lactobacillus casei</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides
A ₂ S ₂	<i>Lactobacillus casei spp tolerans</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides
A ₄ S ₂	<i>Lactobacillus casei spp tolerans</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides
S ₁ P	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides
S ₂ P	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides
S ₈ P	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides
S ₁₀ G	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides
S ₁₁ G	<i>Lactobacillus casei</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides
S ₁₃ G	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides
S ₁₄ G	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides
S ₁₅ G	<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides
S ₁₆ C	<i>Bifidobacterium sp</i>	-	Croissance avec production des polysaccharides
S ₁₇	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	-	Croissance sans production des polysaccharides

III.3. Les interactions bactériennes :

Ce test va mettre en évidence les caractéristiques qu'elles possèdent certaines souches des bactéries lactiques à stimuler ou inhiber d'autres souches une fois mis en contact.

Dans l'étude des interactions nous avons étudiés l'effet des souches lactiques isolées à partir de tube digestif *Larus michahellis* sur les souches : *Streptococcus*, *Staphylococcus* et *E.coli*.

D'après les résultats obtenus, et parmi les seize souches des bactéries lactiques étudiées on a onze souches ont une inhibition de la croissance de *Streptococcus* (apparition des zones d'inhibition donc ces souches ont une activité antibactérienne contre *Streptococcus* mais cette activité inhibitrice est moyen peu active).

Ces résultats permettent de dire que nos souches ont la capacité de produire des composés antibactériens. Ces résultats sont confirmés par plusieurs travaux, SAVADOGO et al [42], aussi on a que les bactéries à Gram positif sont généralement plus sensible à l'effet bactéricide des bactéries lactiques [43]. Les bactériocines sont surtout actives sur les pathogène Gram positif et agissent par formation des pores dans la membrane cytoplasmique entraînant des perturbations des fonctions cellulaires [44].

Une symbiose entre les cinq souches restant et la souche de *Streptococcus*.

L'étude des interactions entre les seize souches lactiques et *Escherichia coli* ont une activité inhibitrice, les résultats montre que six souches ont une activité inhibitrice fort sur le développement d'*Escherichia coli* avec des zones d'inhibition de plus 15mm. Ces bactéries lactiques peuvent produire des différents types des bactériocines comme la nisine qui est produite par *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, cette molécule à la capacité d'inhiber le développement des autres germes comme *Escherichia coli*.

Le reste des souches n'ont pas la capacité antibactérienne (absence des zones d'inhibition).

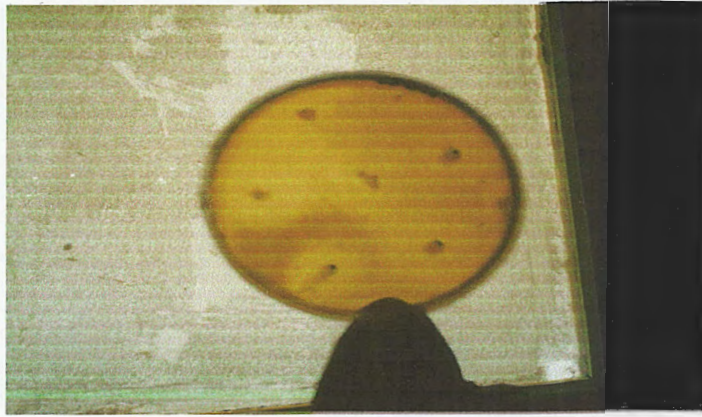


Figure 7: l'interaction bactérienne entre les bactéries lactiques et *E.coli*.

Tableau 9 : les interactions bactériennes.

Noms d'espèces identifiés	Code	<i>Streptococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>E.coli</i>
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	A ₁	+	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>	A ₂	+	-	+
<i>Lactobacillus casei</i>	A ₃	+	-	+
<i>Lactobacillus casei</i>	A _{2'}	+	-	+
<i>Lactobacillus casei</i> spp <i>tolerens</i>	A ₂ S ₂	+	-	+
<i>Lactobacillus casei</i> spp <i>tolerens</i>	A ₄ S ₂	+	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>	S ₁ P	+	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp	S ₂ P	+	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp	S ₈ P	+	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	S ₁₀ G	+	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	S ₁₁ G	+	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp	S ₁₃ G	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>lactis</i>	S ₁₄ G	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	S ₁₅ G	-	-	-
<i>Bifidobacterium</i> sp	S ₁₆ C	+	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	S ₁₇	-	-	-

Conclusion

CONCLUSION GENERALE

L'étude relative à l'isolement, purification et identification des bactéries lactiques locales dans le tube digestif de *Larus michahellis* permis d'obtenir une collection de seize souches, cette collection renferme quatre espèces appartenant aux trois genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Bifidobacterium*. 12,5% de la collection représentée par l'espèce *Lactococcus lactis ssp cremoris*, 50% représentée par *Lactobacillus delbrueckii*, 31,25% est représentée par *Lactobacillus casei* et 6,25% est représentée par l'espèce *Bifidobacterium*.

Les résultats des aptitudes technologiques a révélé que la majorité de nos souches sont acidifiantes avec un maximum de 9,6g/L d'acide lactique est représentée par *Bifidobacterium* sp, par ailleurs la recherche de l'activité protéolytique a montré que une seule espèce possède cette aptitude technologique, la production des exopolysaccharides est importante chez l'espèce : *Bifidobacterium* sp alors que les autres souches n'avaient pas cette propriété.

L'étude des interactions bactériennes et l'activité antibactérienne ont montré que les souches étudiées ont la capacité d'inhiber le développement d'autres souches des bactéries lactiques et les bactéries Gram négatif. Au vu des résultats obtenus, nos souches présentent un grand intérêt pour l'industrie laitière.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE :

- [1] : **LEVEAU J.V ., BOUIX M ,1993.**Microbiologie industrielle .Ed. technique et documentation .Lavoisier , p 170-308.
- [2] : **DESMAZEAUD M ,1996 .**Alimentation et santé cahiers agricultures . INRA . France. p 331-343.
- [3] : **DESMAZEAUD M ,1998.** Bactéries lactiques et qualité des fromages INRA Jouy-en-Josas.
- [4] : **DESMAZEAUD M ,1983.** L'état de connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. Lait 63, p 267-316.
- [5] : **LAOUABDIA –SELLAMIN., BADIS A .,GUETARNI D ., KIHAL M ., OUZROUT R , 2005 .** caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales .S ciences technologie p 30-37 .
- [6]: **FREYNEY J., RENAUD F., HANSEN W., BOLLET C, 2000.** Précis de bactériologie clinique. Ed ESKA.p1692.
- [7]: **LIEBEFELD, 2002.**Microbiologie des cultures. Jh, frc.p2.
- [8]: **SUTRA L ., FEDERIGHI M ., JOUVE J. L, 1998.** Manuel de bactériologie alimentaire. polytechnica, p 235-243 .
- [9] : **BOURGOIS C. M .,Lrpent J .p, 1998.** microbiologie alimentaire . TEC et DOC Lavoisier , p 7-16 .
- [10] : **LENOIR J ., HERNIES J., WEBER F, 1992 .**Les groupes microbiens d'intérêt laitier CIPIL ,p 9-4 .
- [11] : **CHAMPAGNE CP, 1998.** Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. La fondation des gouverneurs et edisem (ed). Saint-Hyacinthe, canada. p257-275.
- [12] : **TORTORA G .J .,FUNKE B. R ., Case C. L, 2003 .** Introduction à la microbiologie ,édition de renouveau pédagogique INC , Saint – LANRENT, Québec ,CANADA.
- [13] : **GUIRAUD J. P ,1998 .** Microbiologie alimentaire .Donod , p 89-292.
- [14]: **LECLERC H., GAILLARD J .L .,SIMONET M, 1995 .** Microbiologie générale .Doin Editeurs .p440-445.

- [15] : **AVRIL J. L., DABERANT H ., DENIS F .,MONTEIL H , 1992** .Bactériologie clinique copyrigat ,p31.
- [16] : **NAUCIEL C ., VILDE J .L ., 2005.** Bactériologie médicale.Masson .p 82-87.
- [17] : **TAILLEIZ P,2001** .Les bactéries lactiques INRA ,EDP sciences p 1-11 .
- [18]: **CARIP C ,2008** . Microbiologie Hygiene , Lavoisier 2008 .
- [19] : **DELARRAS C, 2007** . Microbiologie pratique pour le laboratiore d' analyses ou de contrile sanitaire . Editions TEC et DOC .Lavoisier .p 88-157 .
- [20] : **CORRIEU G., LUQUET F.M, 2008.** bactéries lactiques de la génétique aux ferments lavoisir, p291-792.
- [21] : **LEROY S ., LEBERT I ., CHACORNAC J. P ., CHEVALLIERI, TALON R, 2007.** INRA, ENITA de clermont. Ferrand.P171-175.
- [22]: **NOUT M., ROMBOUT S.F., HAVELAAR A , 1989.** Effet of accelerated natural lactic fermentation of infant food ingredient on pathogenic microorganisms. INT, Food microbial. p 268-269.
- [23] : **QUILLIEN G ,2001.** Les probiotiques INRA .France. p 4-11 .
- [24] : **GOURNIER CHATEAU N ., LARPENT J -P , CASTELANONS M-I ,1994** . Les probitiques en alimentation animale et humaine , Edition TEC et DOC .p285-321.
- [25] : **DERACHE C., SEGRIA V, 1999** . Les probiotiques : qu'est -ce que c'est et a quoi ca sert .EFISA .
- [26] : **DERTORT .C ., AZEMARD G, 2003** .Petits animaux - gros problèmes.p2-8.
- [27] : **BOUBRAIN DUBOURG, 2007.** Les Goélands dans les villes. P5-6.
- [28] : **DIDIER C ,2003.** Goéland leucophée .
- [29] : **FRANK N , 2006.** Nidification du Goéland leucophée larus michahellis le long de la loire. Crex .p71-74.
- [30] : **CARBONNELLE B ., DENIS F ., MARMONIER A ., ANON G .,VARGUES R , 1987** .Bactériologie médicale techniques usuelles .ed SIMEP . Paris p 329-330.
- [31] : **LABIOUI H .,ELMOUALDI L ., EL YACHIOUI M .,OUHSSINE M, 2005** . Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. p237-248.

[32] : **BOUSSEBOUA H ,2002** . Element de microbiologie générale , Edition de l'université menterie constantine . p152 .

[33] : **BOISONNET B ., BOISONNET G., LARPENT J.P ,1998**. Abrégé de bacteriologie générale appliquée .Ed . Marketein Ellipse. p12-51.

[34] : **MARCHAL N ., BOURDON J.L ., RICHARD C , 1982** . Les milieux de culture pour l'isolemant et l'identification biochimique des bactéries .Doin éditeurs ,Paris .p 482 .

[35] : **FRENEY J ., RENAUD F ., LECLERQ R ., RIEGEL P , 2007** . Précis de bactériologie clinique ,2 ème éd . Editions ESKA , Paris . p. 1764 .

[36] : **PRESCOTT., HARLEY –KALEIN ,2003** . Microbiologie ,2 ème édition FRANCOISE . P 531 .

[37] : **LEVEAU Y. J .,BOUIX M ., ROISSORT H , 1991** .La flore lactique , technique d'analyse et de contrôle dans IAA . 2 eme éditions . TEC et DOC . lavoisier . Paris pp152-177 .

[38] : **GUIRAUD J.Y,1998**. Microbiologie alimentaire, édition DUNOD , Paris ,pp288-294 .

[39] : **LARRETA G. V, 1997** . Enzymes en alimentation .édition TEC et DOC Lavoisier, paris .p56 .

[40] : **LEVEVEAU J .Y ., BOUIX M., DEROISSART H , 1991** . Technique d'analyse et de contrôle dans les I.A.A. 2eme édition .Volume III .TEC et DOC, Lavoisier. P160-214.

[41] : **GAMAR N .L ., BLODEAU K ., SIMONET J. M , 1998** .Influence of culture condition on exopolysaccharides production by lactobacillus rhamnosus strain .c83 , Journal of applied microbiology. p664-672 .

[42] : **SALVADOGOA., CHEIKA T., QUATTRA IMOEL N., ALFRED S.T, 2004**. Artimicrobiol activities of lactic acid bactéria strains isolated from BARKINA FASO fermented milk .Pakistan journal of nutrition p174-179 .

[43] : **BISWAS S.R., RAY P., JOHNSON M.C., RAY B, 1991**. Influence of growth conditions on the productio of a bacteriocin , Pediocin ACH by pediococcus acidolactich -Appl. Enovison –Microbiol .p 247.

[44] : **ONDA T., YANAGIDA F., TSUJI M ., SHINOHARA T ., YOKOTSUKA K, 2003** . FOOD MICROBIOL .P153-159 .

ANNEXES

1. MILIEUX D'ISOLEMENT ET DE PURIFICATION :

-MRS (bouillon et gélose) :

Peptone	10g
Extrait de viande	4g
Acétate de sodium	5g
Phosphate bipotassique	2g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,2g
Sulfate de manganèse, 4H ₂ O	0,2g
Glucose.....	20g
Tween 80	1ml
Agar (dans le cas de gélose)	15g
Eau distillée qsp	1000ml

pH final 6,2

Stérilisation 15 mn à 120°C.

-M17 (gélose) :

Milieu complet

-milieu de bas préalablement fondu et ramené à 48-50°C

-solution de lactose chauffée à 48°C

Mélangé par agitation, incubation deux (2) jours à 37°C

Milieu de base :

Peptone tryptique de caséine	2,5g
Peptone pepsique de viande	2,5g
Peptone papainique de soja	5g
Extrait de levure déshydrate.....	2,5g
Extrait de viande	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,25g
Acide ascorbique	0,5g
Agar	8à18g
Eau distillée qsp	1000ml

pH final 7,2

Stérilisation 20 mn à 120°C

2. MILIEU D'IDENTIFICATION :**-Réductase :**

Lait écrémé en tube (15%)
Teinture de tournesol

-Lait de SHERMEN :

-9ml de lait écrémé (0%) stérilisé en tube
1ml de bleu de méthylène à 1%
-7ml de lait écrémé (0%) stérile en tube
3ml de bleu de méthylène

-Milieu hypersalé :

Gélose 5g
Extrait de viande..... 5g
Peptone 15g
NaCl 65g
Eau distillée 1000ml

pH final 7,5

Stérilisation 20mn à 120°C

C'est le milieu hypersalé à 6,5% de NaCl.

On change la concentration en NaCl (40g) pour obtenir le milieu hypersalé à 4% de NaCl.

-Arginine dehydrolase (ADH) :

Le milieu de base est le suivant :

Peptone 5g
Extrait de viande 5g
Pyridoxal 0.005g
Solution aqueuse de pourpre 5ml
de bromocrésol à 2%
Glucose 0.5g
Eau distillée 1000ml

pH final 6,5

Milieu à l'arginine est obtenu en ajoutant 10g d'arginine, la répartition est faite en tubes stérilises 15mn à 120°C.

-Ornithine décarboxylase (ODC):

Ornithine (L) 5g
Extrait de levure 3g
Chlorure de sodium 5g
Glucose 1g
Pourpre debromocrésol 16g

pH final 6.3

Autoclaver 15mn à 120°C.

-Lysine décarboxylase (LDC) :

Lysine	5g
Extrait de levure	3g
Glucose	1g
Chlorure de sodium	5g
Pourpre de bromocrésolé.....	16g
pH final 6.3	
Autoclaver 15mn à 120°C.	

-Citrates de SIMMONS:

Sulfate de magnésium	0.2g
Citrate de sodium	2g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate d'ammonium	0.2g
Phosphate d'ammonium monosodique	0.8g
Bleu de bromothymol.....	0.08g
Agar.....	15g
Eau distillée qsp	1000ml
pH final 7	

-Acétoïne :**-Milieu CLARK et LUBS :**

Peptone tryptique	10g
Glucose.....	10g
Phosphate bi potassique	2g
Eau distillée qsp	1000g
pH final 6.5	
Stérilisation 15mn à 120°C	

-Milieu GIBSON ABD-EL-MALEK :

Lait écrémé à 0.01%.....	800ml
Glucose	55g
Peptone.....	2g
Extrait e viande	2g
Extrait de levure	2.8g
Na Cl	1g
Agar.....	4g
Jus de tomate	100ml
Eau distillée qsp	100ml
pH final 7	
Stérilisation à 120°C pendant 15mn	

3. MILIEU POUR L'ETUDE DES APTITUES TECHNOLOGIQUE :**-milieu YMA (Yeast Milk Agar):**

Peptone	5g
Extrait e levure	3g
Lait écrémé.....	1g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH final 7.1

Stérilisation à 120°C pendant 20mn

-milieu hypersaccharosé :

Extrait de viande	10g
Extrait de levure	3g
Bactropeptone	2.5g
Saccharose.....	150g
K ₂ HPO ₄	2g
NaCl	1g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

pH final 6.8 ~7

Stérilisation à 120°C pendant 20mn

Thème

Isolement, purification et identification des quelques souches des bactéries lactiques à partir de tube digestif de *Larus michahellis*

Nom et prénom:

Benzeghioua Hadjer.
Zemamouche Fadila.
Bensayoud Sarah.

Date de soutenance :

04/07/2009

RESUME

L'étude relative à l'isolement, purification et identification des souches des bactéries lactiques à partir de tube digestif de *Larus michahellis*, nous a permis d'avoir 16 souches représentées par 4 espèces appartenants aux genres : *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

Les aptitudes technologiques étudiées montrent que les souches sont pour la majorité bonnes acidification (*Bifidobacterium* produit 9,6g d'acide lactique/ L de lait), certaines souches de ces bactéries lactiques ont la capacité de produire des polysaccharides et à faible activité protéolytiques.

L'étude des interactions bactériennes nous a permis de voir les effets de stimulation et d'inhibition, ainsi la mise en évidence de la production des substances inhibitrices.

Mots clés : bactéries lactiques, aptitudes technologiques, interactions.

SUMMARY

The relative survey to the isolation, purification and identification of the lactic bacteria to partire of digestive tract of *Larus michahellis*, allowed us to have 16 stumps represented by 4 species apartments in the *Lactococcus* kinds, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.

The studied technological faculties show that the sumps are for the majority housemaids' acidification (*Bifidobacterium* produces 9,6g of lactic acid /L of milk), some have the capacity to produce the polysaccharides and weak activity proteolytic.

The survey of the bacterial interactions allowed us to see the effects of stimulation and inhibition, so the setting in evidence of production of inhibitory substances.

Key Words: lactic bacterial, technological, interactions

ملخص

إن الدراسة المتعلقة بعزل، تنقية، وتعريف البكتيريا اللبنية انطلاقا من الأنبوب الهضمي لـ *Larus michahellis* سمحت لنا با حصول على 16 سلالة ممثلة بـ 4 أنواع تنتمي إلى أجناس: *Lactococcus*، *Lactobacillus*، *Bifidobacterium*.

الخصائص التكنولوجية المدروسة يدل على أن أغلبية السلالات ذات قدرة على إنتاج حمض اللبن (*Bifidobacterium* التي تنتج 9,6غرام من حمض اللبن/ل من الحليب). بعضها لها القدرة على إنتاج السكريات المتعددة، وفعالية ضعيفة لتحليل البروتينات.

إن دراسة التفاعلات البكتيرية تسمح لنا بمشاهدة نتائج التحريض و التثبيط، أيضا تبين بشكل واضح إنتاج المواد المثبطة.

الكلمات المفتاح: البكتيريا اللبنية، الخصائص التكنولوجية، التفاعلات.