

MAST-BIO-197 / 03

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
FACULTE DES SCIENCES ET DE LA NATURE
ET DE LA VIE ET SCIENCE DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

Mémoire de fin d'études Pour l'obtention du diplôme Master

Option : Microbiologie



Thème :

*Antagonisme entre les bactéries pathogènes et les bactéries lactiques
du genre lactobacillus « recherche de bactériocine »*

Présenté par :

M^{lle} Boussouar Imène

06021
26-01-2012

Le jury composé de :

Président : M^r *Mousse Boudjamaa*

Professeur

Examinatrice : M^{me} *Malek.F*

Maitre assistante classe A

Promotrice : M^{me} *Bendimerad. N*

Maitre assistante classe A

Année universitaire 2010-2011

Dédicace

Je dédie ce travail à

Mon père Mr. Boussouar Mohamed

*Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon parcours,
que Dieu te donne santé et longue vie*

*Ma mère Mme. Boussouar Yamina Que ce travail soit pour toi le
témoignage de mon infinie reconnaissance pour ton aide précieuse et
toutes ces années de compréhension*

*A mes sœurs Ikrame et Houria pour tes compréhensions et tes aide
précieuses dans les moments difficiles.*

Mon petit cher frère Ebd- elkader.

Mon frère Youcef et sa marie Salima

*A mon moitié et mon cher mari Youcef, pour ton soutien et ta
compréhension*

A mes chères amies Nassira, Fayza, Sanaa, Narimene, Amira , Fatima

A mes camarade de la promotion Master Microbiologie 2010 /2011

Et à tous ceux qui ne sont chers de près et de lion



Introduction

Les bactéries lactiques ont été traditionnellement utilisées dans la conservation de nombreux aliments sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité. Ces bactéries jouent un rôle important dans la fabrication des fromages et des produits fermentés. Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques. (**Labioui et al., 2005**)

Les lactobacilles représentent un genre important des bactéries lactiques tant au niveau industriel qu'au niveau de la flore commensale intestinale. Ce genre est très hétérogène, aussi bien sur le plan génétique que sur le plan des habitats colonisés.

Actuellement, les scientifiques exploitent les interactions microbiennes pour assurer la salubrité des aliments et pour lutter contre les microorganismes indésirables. La pasteurisation, la fermentation et la réfrigération ne constituent pas une garantie suffisante pour lutter contre la contamination microbienne. L'emploi excessif et non contrôlé des additifs chimiques peut engendrer des risques sanitaires pour le consommateur. (**Mami, 2010**)

En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacétyl et les bactériocines. Comme la nisine sont des peptides antimicrobiens inhibant la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes. (**Zamfir et al., 2006**).

Dans ce contexte que nous avons mené notre étude :

- Dans une première partie : à confirmer la pureté des bactéries pathogènes tout en étudiant la morphologie, la respiration et la recherche de la catalase.
- La deuxième partie c'est l'étude des interactions. C'est-à-dire l'étude de l'effet antagoniste des bactéries lactiques du genre *Lactobacilles* vis-à-vis des bactéries pathogènes ou d'altération par production de bactériocines en utilisant la méthode de Fleming et al. 1975.
- Puis nous allons voir si l'effet des bactériocines est bactéricide ou bactériostatique.
- En fin nous allons étudier l'effet inhibiteur de la nisine sur les bactéries pathogènes ou d'altérations.

Chapitre I

I. Les bactéries lactiques :

I.1. définition :

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique. Ce sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio organotrophes. C'est-à dire qui requiert des molécules organiques complexes comme source d'énergie (Saad, 2010)

I.2. Caractères généraux:

Découvertes en 1782 par le chimiste suédois Scheele (Thonart, 1997), les bactéries lactiques sont généralement Gram positives, immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes, et ne possédant pas de catalase (certaines souches possèdent un pseudo catalase). Elles ont des exigences nutritionnelles nombreuses (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) pouvant présentés en coque ou en bacille (Holzapfel et al., 2001 ; Gevers 2002).

Les bactéries lactiques sont pour la plupart mésophiles ; certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent à des pH compris entre 4 et 6,5 et certaines sont encore actives à pH 9,6 ou à pH 3,2. (Joseph, 2003)

Les bactéries lactiques colonisent de nombreux produits alimentaires tels que les produits laitiers, la viande, les végétaux, et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (Dortu et Thonart, 2009)

Sur la base de leur profil fermentaires, les bactéries lactiques peuvent être classées en deux grands groupes : les homofermentaires et les hétérofermentaires.

- Les bactéries lactiques homofermentaires utilisent la voie de la glycolyse pour produire à partir du glucose deux molécules d'acide lactique.
- Les souches hétérofermentaires, en utilisant la voie de 6- phosphogluconate, fermentent les hexoses pour former l'acide lactique, le dioxyde d'oxygène et l'éthanol (ou l'acide l'acétique) comme produits finaux (Ström et al., 2005). La différence entre ces deux groupes est détectable par dégagement de CO₂.
- Certaines bactéries lactiques homofermentaires dans les milieux pauvres en hexoses, peuvent fermenter les pentoses pour produire de l'acide lactique et de l'acide acétique comme produits finaux. Ces bactéries sont qualifiées d'hétérofermentaires facultatives (Axelsson, 2004).



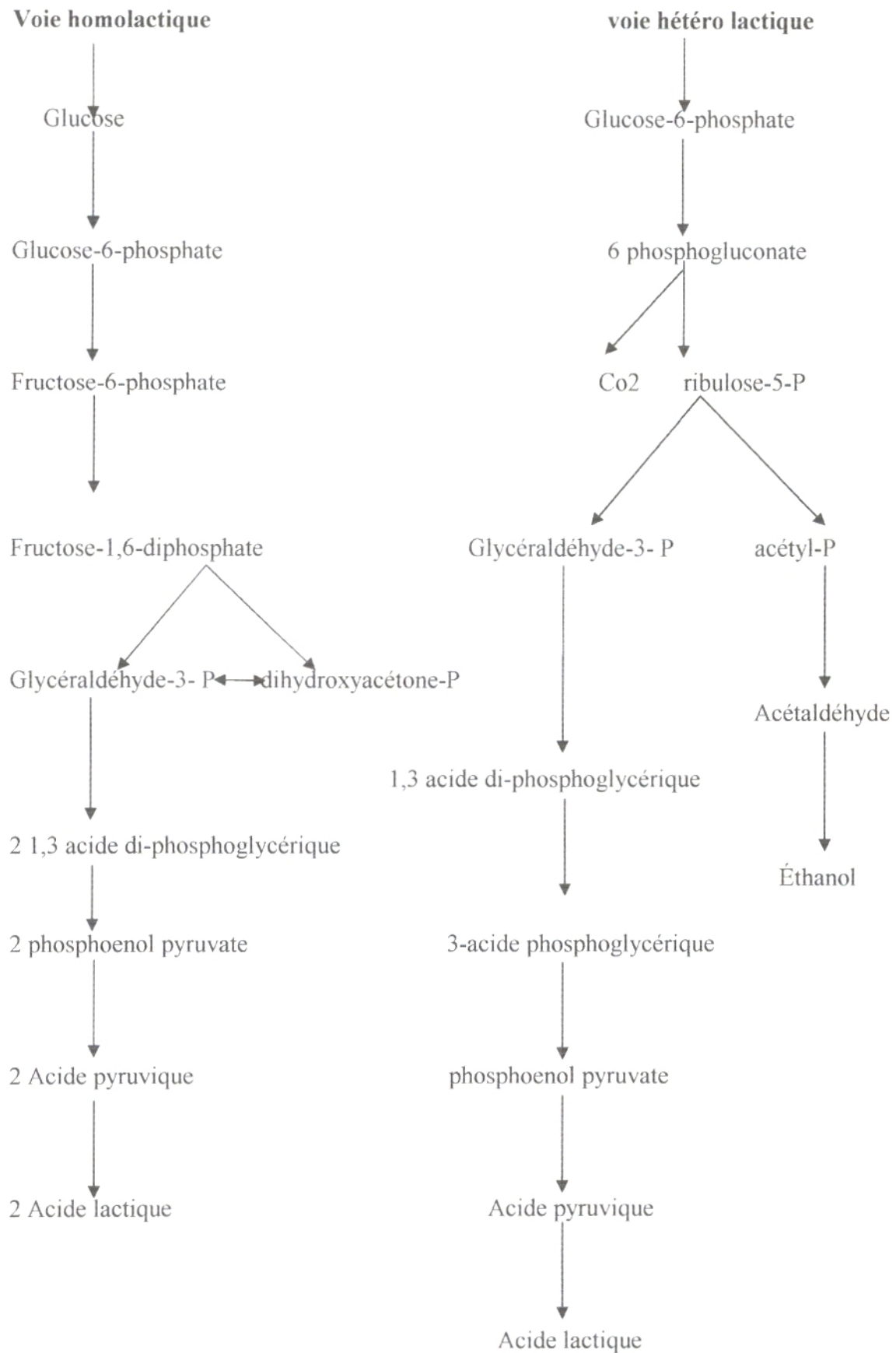


Figure 1 : Dégradation du glucose par les bactéries lactiques (De Roissart et Luquet, 1994)

I.3. Classification:

La première classification des bactéries lactiques basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen (**Krieg, 2001**).

La classification s'appuie sur des données moléculaires telles que la comparaison des séquences codant pour les ARN 16 S ribosomiaux.

Les bactéries lactiques appartenant au phylum *Firmicutes* et à la classe des *Bacilli*, les bactéries lactiques sont divisées en trois grandes familles

- Lactobacillaceae : regroupe les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.
- Leuconostocaceae comprend les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weisella*.
- Streptococcaceae contient les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*

Les révisions taxonomiques des bactéries lactiques indiquent que ces micro-organismes peuvent comprendre environ une quarantaine de genres. Les révisions récentes de la taxonomie des bactéries lactiques sont présentées dans le manuel Bergey –Trust (**Garrity et al., 2008**).

I.4. Exigences nutritionnelles:

Les bactéries lactiques ont une faible aptitude biosynthétique et sont en principe incapables d'assimiler directement les principaux précurseurs de leur environnement. Elles sont considérées comme un groupe bactérien le plus exigeant du point de vue nutritionnel, car elles requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligoéléments dont le rôle des coenzymes est plus important (**Gevers, 2002**).

I.5. Intérêts des bactéries lactiques :

Grâce à leurs effets bénéfiques, les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs secteurs d'activités, notamment dans le domaine de la santé et de l'industrie agroalimentaire.

I.5.1. Domaine agro-alimentaire :

I.5.1.1 Rôles dans la conservation :

Les bactéries lactiques sont employées pour aider à la fois à la fabrication et à la conservation des produits à partir de certaines matières premières telles que le lait, la viande, le poisson, les végétaux et les céréales. Cette conservation peut être due à la :

❖ Production d'acide lactique :

Les bactéries lactiques sont utilisées dans le domaine de l'agriculture comme agents biologiques de conservation du fourrage par fermentation acidifiante. L'utilisation des bactéries lactiques dans les ensilages, permet de limiter ou d'inhiber certaines voies métaboliques indésirables telles que l'acétogénèse et la protéolyse, conduisant à

l'amélioration de la qualité nutritive du fourrage. (**Khuntia et Chaudhary, 2002; Salawu et al., 2001**)

❖ **Production de bactériocines :**

Les bactériocines représentent un intérêt dans la conservation des denrées alimentaires par leur capacité à réguler la microflore existant dans les produits fermentés et inhibent la croissance des germes pathogènes. (**Dortu et Thonart, 2009**)

I.5.1.2- Rôle sur la structure et la texture :

Dans les produits laitiers, ces micro-organismes assurent plusieurs fonctions telles que la coagulation du lait, la protéolyse pour donner aux fromages leurs caractères rhéologiques et la production d'agents épaississants pour améliorer la texture du fromage (**Doguiet, 2010**).

I.5.1.3 Rôles sur les caractéristiques organoleptiques :

Par production en dehors de l'acide lactique, d'autres produits tels que le diacétyl et l'acétaldéhyde, qui sont responsables des saveurs caractéristiques. Pour optimiser les caractéristiques organoleptiques du lait, les bactéries lactiques sont souvent utilisées en association. C'est le cas de *Streptococcus thermophilus* et *Lb delbrueckii ssp. bulgaricus*, utilisées dans la fabrication du yoghourt. (**Doguiet, 2010**).

I.5.2. Domaine de la santé :

Les bactéries lactiques assurent :

- ❖ L'amélioration de la digestibilité du lactose;
- ❖ Des effets sur l'activation du système immunitaire;
- ❖ L'inactivation de composés toxiques et la protection contre certaines infections intestinales (**Laurent et al., 1998**)
- ❖ utilisées dans le traitement de certaines affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires, l'intolérance au lactose et l'hypercholestérolémie.
- ❖ Certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire des micro-organismes vivants dont l'application à l'homme ou à l'animal exercent un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinale. Les espèces couramment utilisées sont *Lb. Acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri*, *Lb. delbruecki, subsp bulgaricus* (**Salminen et al., 2004**). .

I.6 Innocuité des bactéries lactiques:

Les bactéries lactiques colonisent naturellement plusieurs matrices alimentaires. Elles sont depuis des siècles associées à l'alimentation humaine et animale. Ces micro-organismes sont tolérés par l'homme et les animaux, ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut **GRAS** (*Generally Recognized As Safe*) (**Klaenhammer et al., 2005**). Les bactéries lactiques peuvent donc être considérées comme des micro-organismes dépourvus de toute toxicité pour le consommateur et sont particulièrement appropriées pour être utilisées comme des agents de biopréservation.

Pour être applicables dans les produits alimentaires, les additifs alimentaires doivent être incapables de provoquer chez le consommateur des affections et de transférer à celui-ci la résistance à certains antibiotiques (**Ström et al., 2005**). Or, bien que les bactéries lactiques soient naturellement résistantes à certains antibiotiques elles sont incapables de transférer cette résistance à l'hôte (**Donohue, 2004**).

Cependant, quelques rares cas d'infections par des souches lactiques ont été rapportées en milieux hospitaliers (**Canon et al., 2005**) mais, la majorité de ces infections ont été uniquement détectées chez des patients immunodéprimés.

Finalement, les souches lactiques sont donc des micro-organismes d'une très grande innocuité, bénéfiques pour l'alimentation humaine et animale. Ainsi, considérant la demande des consommateurs qui exigent de plus en plus des produits naturels sains dépourvus de toute nocivité. (**Doguiet, 2010**)

I.7. Les lactobacilles :

I.7.1. Caractères généraux :

Ils représentent le groupe le plus important des bactéries lactiques, contenant plus de 120 espèces et 20 sous espèces. Ce nombre évolue régulièrement, treize nouvelles espèces ont été proposées en 2005, neuf en 2006 et sept autres en 2007 (Lee et Salminen, 2009).

Les lactobacilles se présentent sous forme de bacilles Gram positif, isolés ou en chaînettes, non sporulés et immobiles avec un pourcentage G+C inférieur à 50%.

Ces bactéries sont catalase négatif, micro aérophile ou anaérobies. Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique, certain espèces sont homolactique d'autres hétérolactiques produisant des acides volatils, de l'ethanol et du CO₂ à côté de l'acide lactique. Les lactobacilles exigent pour leurs développements des milieux bien adaptés, riche en acide aminées, vitamines et acide gras : ils sont acidophiles. Ils sont généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques. (Joseph, 2003)

Les lactobacilles appartiennent au groupe des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae*. (Prescott et al., 2010)

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel :

- ✓ Groupe « *Thermobactérium* » il comprend les lactobacilles homofementaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C les espèces les plus fréquents dans l'alimentation (lait, yaourts, fromages) sont *L. helveticus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. delbrueckii*, ect.
- ✓ Groupe « *Streptobactérium* » il regroupe les lactobacilles homofementaires mésophiles qui se développent à 15°C. Il comporte les espèces *L. casei* qui est le lactobacille prédominant du lait *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sake*.
- ✓ Groupe « *Betabactérium* » il comprend les lactobacilles hétérofermentaires les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. cellobiosus*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. kéfir*. (Joseph, 2003)

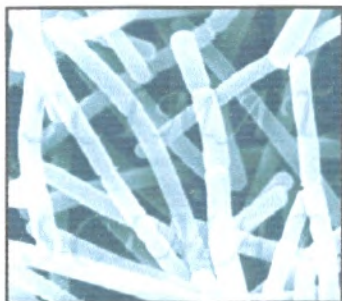


Figure 2 : *Lactobacillus bulgaricus*

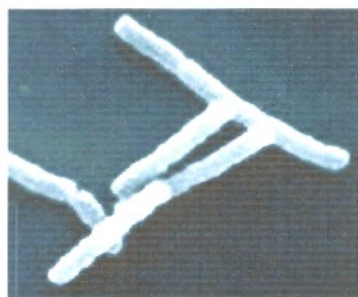


figure 3 : *L. acidophilus* (Playne, 2002)

I.7.2. Habitat de lactobacille :

Les lactobacilles sont isolés de diverses niches écologiques telles que les plantes, le sol, l'eau, les produits laitiers, carnés ou végétaux fermentés ou en décomposition. Les lactobacilles sont des habitants naturels des tractus gastro-intestinaux et urogénitaux de l'homme et de l'animal. (Saad, 2010)

I.7.3. Rôle de lactobacille

Étant donné la diversité des propriétés métaboliques présentées par les membres du genre *Lactobacillus* ces bactéries ont été trouvées dans un certain nombre de produits alimentaires fermentés. Dans ces produits, les lactobacilles contribuent principalement à leur conservation et leur saveur de nutrition. Ces souches sont ajoutées en tant que démarreurs délibérés ou participent à la fermentation en raison de leur présence en tant que contaminants naturels des substrats.

Une autre propriété des lactobacilles qui est devenue plus appréciée est leur capacité de produire des bactériocines. Les bactériocines ont probablement évolué pour fournir à la souche productrice un avantage sélectif dans une place microbienne complexe.

Beaucoup d'attention a été orientée sur leur rôle potentiel comme probiotiques. Les souches qui ont été examinées pour leurs effets probiotiques. Les effets cliniques rapportés et attribués à la consommation de *Lactobacillus* se composent de l'amélioration de l'immunité, d'une diminution de l'activité enzymatique fécale, empêchant des désordres intestinaux et réduisant la diarrhée virale. (Givry, 2006)

Groupe	<i>Betabactérium</i>						<i>Streptobactérium</i>						<i>Thermobactérium</i>						
	<i>L. brevis</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fructivorans</i>	<i>L. hilgardii</i>	<i>L. kefir</i>	<i>L. casei casei</i>	<i>L. casei pseudoplantarum</i>	<i>L. casei rhamnosus</i>	<i>L. casei tolerans</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sake</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. delbrueckii bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii/lactis</i>	<i>L. helveticus</i>
Co2 sur le glucose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Culture à 15°C	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Culture à 45°C	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	v	.	+	+	+	+	+	+
Arginine (NH3)	+	+	+	+	+	v	+	-	-	-	-	-	.	-	-	v	v	-	-
Arabinose	+	+	-	-	-	-	+	-	-	v	-	-	+	-	-	-	.	.	.
Gluconate	v	v	v	v	v	v	v	+	v	+	v	+	+	-	-	-	-	-	-
Lactose	v	v	v	+	-	v	v	v	+	+	+	v	+	-	+	-	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	v	+	-	-	-	-	+
Raffinose	v	v	+	+	-	v	-	-	-	-	-	-	+	-	v	-	-	-	+
Ribose	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Saccharose	v	v	+	+	v	v	-	+	+	+	-	v	+	+	-	+	+	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	v	+	-	-	-	-	-
Sérotype	.	.	F	F	.	.	.	B	.	-
Auxotrophie	F	R	-	-	.	.	R	P	.	p	.	.	-	R	R	R	R	R	R
														F	B		B	P	F

R : réboflavine, V : variable, P : pyridoxal, F : acide folique, B : vitamine B12, non déterminé(.).

Tableau 1 : caractéristiques de lactobacille (Joseph, 2003)

Chapitre II

II. Les interactions entre les microorganismes :

Chaque écosystème est composé d'une grande diversité de micro-organismes. La complexité de l'écosystème est fortement liée à cette diversité, ainsi qu'aux interactions microbiennes qui en résultent. **(Bonaïti *et al.*, 2005).**

L'importance des interactions microbiennes a été mise en évidence lors de la fabrication (vin, fromage, yogourt). Dans les produits laitiers, l'évolution des conditions physico-chimiques et la disponibilité en nutriments influencent fortement le développement des micro-organismes. Ainsi, tout au long du processus on observe une dynamique particulière à chaque population : certains micro-organismes se multiplient activement tandis que d'autres tendent à disparaître. **(Howell *et al.*, 2006)**

De ce fait les scientifiques exploitent les interactions microbiennes pour assurer la salubrité des aliments et pour lutter contre les microorganismes indésirables. Les interactions observées dans des cultures mixtes peuvent être classées en cinq catégories qui seront décrites de la plus néfaste à la plus bénéfique dans les paragraphes suivants. **(Agnès, 2010)**

II.1. La compétition :

La compétition s'installe lorsque différents microorganismes d'une population ou d'une communauté cherchent à s'approprier une même ressource, qu'il s'agisse d'occuper un endroit physique ou de consommer un aliment limitant particulier. **(Prescott *et al.*, 2010)**

Par exemple dans les produits laitiers, les acides aminés sont essentiellement sous forme de caséines. L'accessibilité à la source d'azote est donc souvent limitante, et les micro-organismes se retrouvent en compétition pour la faible fraction d'acides aminés et de peptides libres **(Siewverts *et al.*, 2008).**

II.2. L'amensalisme ou antagonisme

L'amensalisme (du latin « pas à la même table ») **(Prescott *et al.*, 2010).** On parle d'amensalisme lorsque la croissance d'un micro-organisme inhibe celle des autres sans en obtenir de bénéfices. Cette inhibition résulte en général de la production de certains métabolites tels que le lactate, l'acétate et certains agents antimicrobiens (bactériocines) **(Siewverts *et al.*, 2008).**

II.3. Le parasitisme

Il s'agit d'une relation qui est très bénéfique que pour l'un des partenaires qui est hébergé par l'autre. Le parasitisme est généralement nuisible et souvent nocif. (Guiraud, 2003)

II.4. Commensalisme :

Commensalisme (du latin *cum*, avec et *mensa*, table) est une relation dans laquelle le commensal tire un avantage alors que l'autre n'est ni affecté, ni aidé, il s'agit d'un processus unidirectionnel. Souvent, l'hôte et le commensal « mange à la même table » (Prescotte *et al.*, 2010)

Les bactéries lactiques sont capables d'excréter des métabolites servant de substrats aux bactéries de surface contribuant au développement de la flore bactérienne (Toelstede et Hofmann, 2009). Dans les fromages à pâte pressée cuite, les bactéries propioniques se développent grâce à l'utilisation de l'acide lactique produit par les bactéries lactiques (Sieuwerts *et al.*, 2008).

II.5. Le mutualisme

On distingue deux phénomènes : le mutualisme (symbiose) et le synergisme (protocoopération) durant lesquels chaque micro-organisme est stimulé par la présence de l'autre. Dans le mutualisme, la présence de chaque micro-organisme est indispensable pour la survie de l'autre alors que dans la proto-coopération l'interaction n'est pas nécessaire à la survie des populations mais la présence des deux micro-organismes ensemble entraîne une amélioration de leur développement (Nehme 2008).

Par exemple l'interaction entre *S. thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, peut être classée dans le mutualisme. Les hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène sont récapitulées.

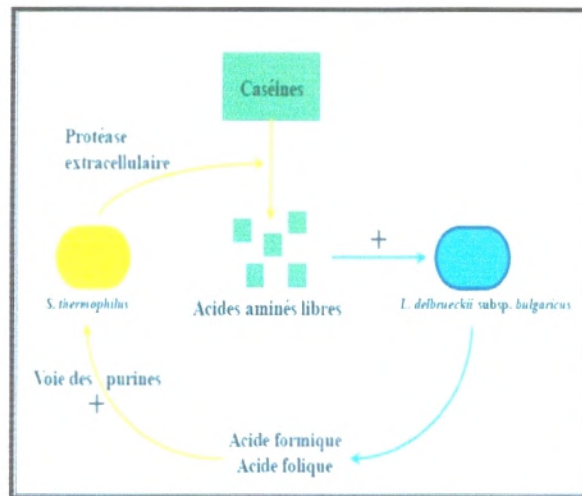


Figure 4 : Exemple de mutualisme entre *S. thermophilus* et *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (Agnès, 2010).

II.6. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques.

II.6.1 acides organiques et diminution de pH :

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques, qui sont obtenus soit par la voie homofermentaire (uniquement d'acide lactique), soit par la voie hétérofermentaire (d'acide lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone) (Liu, 2003). Grâce à cette production d'acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe.

Outre la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération du proton, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (Janssen *et al.*, 2007).

II.6.2 Le peroxyde d'hydrogène :

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Le peroxyde d'hydrogène peut s'accumuler et être inhibiteur de différents microorganismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Zalan *et al.*, 2005).

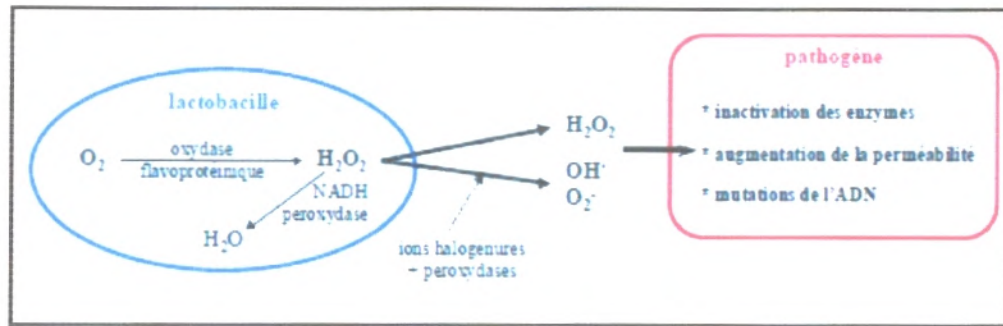


Figure 5 : Modes d'action sur les pathogènes du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés produits par les lactobacilles (Rousseau, 2004).

II.6.3 Le dioxyde de carbone :

Celui-ci est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (Ammor *et al.*, 2006).

II.6.4. Le diacétyl :

Le diacétyl ($C_4H_6O_2$) est un des composants aromatiques. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (El Ziney *et al.*, 1998).

II.6.5. La reutérine :

La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* (El-Ziney *et al.*, 1998). La reutérine a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les bactéries (Gram-positif ou Gram-négatif). Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (Vollenweider, 2004).

II.6.6. Les bactériocines :

II.6.6.1. Définition:

Les bactériocines de bactéries lactiques ont l'objet d'une attention toute particulière depuis une dizaine d'années en raison de l'intérêt tant fondamental qu'appliqué qu'elles suscitent dans le domaine de la protection contre les infections bactériennes. (Ninane *et al.*, 2009).

Elles sont des peptides produits puis excrétés à l'extérieur des cellules productrices. Ils présentent une activité bactéricide ou bactériostatique. Leur spectre

d'activité peut être plus ou moins large, quelque fois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices (**H. Chen *et al.*, 2003**)

II.6.6.2. Caractérisations des bactériocines

Dans leur grande majorité, les bactériocines peptidiques de bactéries lactiques sont :

- Thermorésistantes (120°C pendant 10 minutes),
- Stables dans des zones de pH de 3 à 8
- Sensibles à l'action d'enzymes protéolytiques (présentes dans le tractus intestinal).
- Elles ont des sites de liaisons spécifiques dans la membrane des bactéries cibles.
- Leur synthèse est associée à la synthèse d'une protéine d'immunité qui évite de provoquer la mort de la cellule excrétrice.
- Elles ont un spectre d'activité étroit. (**Dridner, 2006**)
- Ne présentent pas de nocivité apparente pour l'homme et les animaux domestiques, ce qui implique une utilisation potentielle dans les domaines agro-alimentaire et thérapeutique (**Morisset, 2003**)
- N'ont pas d'effet négatif sur la qualité organoleptique du produit.
- Représentent un intérêt dans la conservation des denrées alimentaires par leur capacité à réguler la microflore existant dans les produits fermentés et inhibent la croissance des germes pathogènes (**Dortu et Thonart, 2009**).

II.6.6.3. Classification :

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993). Selon leur structure primaire, poids moléculaire, stabilité à la chaleur. Ces quatre classes sont :

❖ Classe I : Les lantibiotiques

Se sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, comme la lanthionine, la β - méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Les lantibiotiques peuvent être divisés en deux types :

- la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés
- la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (**Twomey *et al.*, 2002**).

❖ Classe II : Bactériocines peptidiques :

Se sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoléctrique varie entre 8 et 10. Cette dernière est subdivisée en trois sous-classes.

- *La sous-classe IIa.* Ces bactériocines contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (**Richard et al., 2006**). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*.
- *La sous-classe IIb.* Elle comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués :
 - le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre
 - le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires.
- *La sous-classe IIc.* Toutes les autres bactériocines de classe II ne pouvant pas être classées dans les sous-classes a et b. (**Carine et Thonart, 2009**)

❖ Classe III : Bactériocines protéiques

Se sont des protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques (**Nigutova et al., 2007**).

❖ Classe IV : Bactériocines complexes

Se sont des peptides requérant une partie carbo-hydratée ou lipidique pour avoir une activité. (**Carine et Thonart, 2009**).

Type	Structure	Stabilité à la chaleur	Spectre antimicrobien	exemples
Lantibiotiques	Petite taille (> 5 kDa), acide aminés inusuels, dont la lanthionine	+	Moyen à large	Nisine Lactinine 841
Bactériocines peptidiques	Petite peptides (< 15 kDa), sans lanthionine	+	Moyen à large	Pediocine AcH Sakacine A Leucocine UAL 187
Bactériocines protéiques	Grand taille (> 15 kDa), sans lanthionine	-	Etroit	Helveticin J Caséicine 80
Bactériocines complexes	Composants glucidiques ou lipidiques	+	Moyen	Leuconocine S Pediocine SJ-1

Tableau2 : Classement de Bactériocines des bactéries lactiques (**Dacosta, 2000**).

II.6.6.4. Mécanisme d'action de bactériocine :

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

- Fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible. C'est durant cette étape que le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle permettant l'expression de son activité.
- L'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique : plusieurs peptides antibactériens sont recrutés pour former un pore
- La formation du pore : ce dernier conduit à des fuites de composés intracellulaires vitaux. Leur perte entraîne donc des effets néfastes pour la cellule, allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne à la mort cellulaire. (**Champak 2005**)

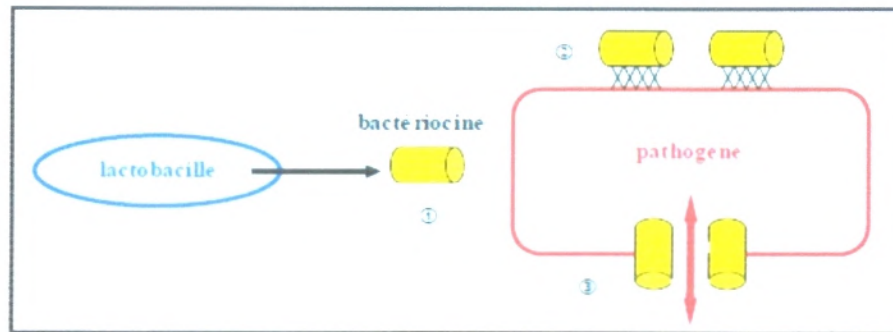


Figure 6 : Mode d'action sur les pathogènes des bactériocines produites par les lactobacilles (Rousseau, 2004).

II.6.6.5. Domaines d'applications des bactériocines :

❖ Le typage bactérien :

Le pouvoir des bactériocines à inhiber certaines souches de la même espèce productrice et parfois des souches des autres espèces a été largement utilisé pour l'identification d'espèces de différents genres bactériens. La plupart des méthodes est basée sur l'inhibition d'une souche dite indicatrice ou sensible aux bactériocines. Cette méthode a été utilisée avec succès pour certaines bactéries Gram-négatif, telles que *Pseudomonas aeruginosa* (Pitt et Gaston, 1995). L'utilisation des bactériocines a permis aussi à Merino *et al.*, 2000 de différencier les souches de *Shigella*.

❖ Domaine alimentaire :

L'utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire est avantageuse non seulement à cause de leur large spectre d'activité, mais aussi parce qu'elles sont non toxiques, facilement dégradables par les enzymes digestives et ne compromettent pas la prise des médicaments (Ryan *et al.*, 1998).

Du fait qu'elles sont des substances naturelles, l'emploi des bactériocines permettrait d'avoir des produits plus sains et réduirait l'utilisation des agents chimiques de conservation (Galvarez *et al.*, 2007).

Ces dernières années, l'application des bactériocines dans la technologie a gagné une grande attention. En effet, plusieurs bactériocines montrent des effets synergiques ou additionnels lorsqu'elles sont utilisées en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens, incluant des conservateurs chimiques, des composés phénoliques naturels (Grande *et al.*, 2007).

❖ Domaines de la médecine humaine :

L'utilisation des bactériocines n'est pas restreinte au domaine alimentaire, plusieurs études ont démontré que l'utilisation répandue des antibiotiques pour traiter et prévenir les infections, engendrait de sérieux problèmes de toxicité et de résistance.

Les bactériocines ont été énormément appréciées comme étant des agents de thérapie naturelle, alternative aux antibiotiques, puisque l'effet inhibiteur des bactériocines pourrait réduire les effets nocifs engendrés par l'antibiothérapie.

Un lantibiotique est utilisé dans la thérapie pour remplacer l'usage habituel de l'érythromycine et de la vitamine A. Cette application montre plusieurs avantages tels que l'absence de résistance aux lantibiotiques. (Smaoui, 2010)

Trois bactériocines produites par *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus amylovorus* montrent une activité inhibitrice contre l'agent pathogène gastrique humain *Helicobacter pylori* qui cause des ulcères gastriques. (Avonts et De Vuyst, 2001).

II.6.7. exemple de bactériocine : la nisine.

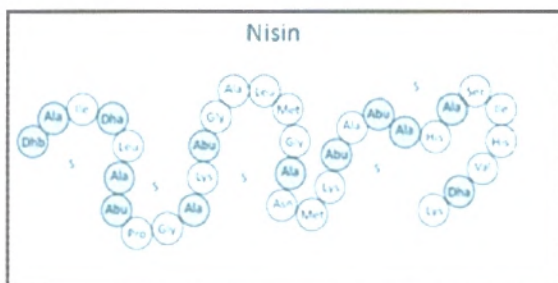


Figure 7 : Séquence et structure de la nisine (Dortu *et al.* 2009).

II.6.7.1. Définition :

La nisine est un peptide antibactérien polycyclique de 34 résidus acide aminé et est utilisée comme conservateur alimentaire. C'est une lantibiotique produite par fermentation à l'aide de bactérie *Lactococcus lactis*. (Daoudi, 2000).

II.6.7.2. Caractéristiques de la nisine :

Commercialement, elle n'est pas chimiquement synthétisée mais est obtenue de cultures de *Lactococcus lactis* sur de substrats naturels comme le lait ou du dextrose.

Internationalement reconnue comme agent antimicrobien alimentaire hautement efficace et bien défini, de faible toxicité et aux antécédents bien établis quant à son emploi sans risque, la nisine est actuellement approuvée pour emploi dans une grande variété de

produits, y compris les fromages et les produits à base de fromage, les desserts lactés, les légumes et les soupes en boîte et les produits de boulangerie dans différents pays dans le monde (**Codex alimentaire 2010**).

A ce jour, plus de 45 pays ont approuvé l'utilisation de la nisine comme agent de conservation, ce qui fait de la nisine la bactériocine la plus utilisée à travers le monde (**Riley et Wertz, 2002**).

La nisine est efficace contre la bactérie Gram-positive et a aussi montré son efficacité contre la bactérie Gram-négative quand elle est utilisée en tant que barrière technologique supplémentaire (dans l'application simultanée de plusieurs procédés ou barrières) pour la sécurité sanitaire des aliments et leur préservation. La nisine inhibe les microorganismes détériorasse, dont la bactérie détériorant de l'acide lactique, permettant ainsi de prolonger la durée de conservation et de préserver la qualité des aliments. Elle est également de plus en plus utilisée en tant qu'intervention primaire de l'inactivation ou l'inhibition de la croissance des microorganismes alimentaires pathogènes comme *Listeria*, *Staphylococcus*, et *Mycobacterium*, et des bactéries sporulées, *Bacillus* et *Clostridium* (**Codex alimentaire 2010**).

En raison de son spectre d'activité naturel sélectif, elle est également employée comme agent de sélection dans les milieux microbiologiques pour isoler des bactéries à Gram-négatif, des levures ou des moisissures.

Le niveau de nisine nécessaire pour obtenir l'effet désiré dépend de plusieurs facteurs dont les conditions de transformation et d'entreposage, des matières premières utilisées, la charge bactérienne et la formulation du produit. Généralement, en raison du coût relativement élevé de la nisine, les niveaux d'application sont économiquement autolimitatifs (**Daoudi, 2000**).

La nisine, quant à elle, peut être utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vu sa stabilité aux pHs acides et son activité contre *Helicobacter pylori* (**Avonts et De Vuyst, 2001**).

II.6.7.3. Mode d'action :

La nisine, un lantibiotique de type A interagit avec la membrane cellulaire par liaison à de récepteur spécifique le lipide II (undecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un précurseur de peptidoglycanes. (**Willey et al., 2007**).

Suite à cette liaison, la nisine peut former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés

cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule.

Cette interaction avec le lipide II permet de réduire la concentration du lantibiotique nécessaire à la formation des pores, mais peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (**Patton et al., 2005**).

Chapitre III

III. Les microorganismes pathogènes :

Les bactéries contaminent de nombreux produits alimentaires et peuvent constituer un grave danger pour leur qualité et leur conservation. Plusieurs espèces présentent un danger au point de vue sanitaires. (Joseph, 2003)

Les bactéries pathogènes sont à l'origine de toxi-infection alimentaire (intoxication) et les maladies infectieuses d'origine alimentaire. (Isaac, 2009)

III.1. *Salmonella* :



Figure 8 : *Salmonella*

357 × 114 – 75KB PNG

www.e-sante.be

Les salmonella appartiennent à la famille des *enterobactériaceae*. Ce sont des bactéries gram négatif, anaérobie facultatives, capable de se multiplier à des températures comprises entre 5 et 45°C et des valeurs de pH de 4,5 à 9. Elles sont à l'origine de salmonellose qui l'une des toxi-infections alimentaires les plus courantes et les plus répandues (Jomaa, 2007)

III.2. *Listeria monocytogenes* :



Figure 9 : *Listéria monocytogènes*

350 × 268 -64KB - JBG

sciencephoto.com

Listeria monocytogenes appartient à la famille des listériaceae. Est un bacille (0.4 à 0.5 µm de diamètre et 0.5 à 2µm de longueur) à gram positif non asporulé et non capsulé. Aérobie-anaérobie facultative. Elle est catalase positive et oxydase négative.

L.monocytogenes est un pathogène pour l'homme et les animaux. La listériose atteint préférentiellement les personnes dont le système immunitaire est déficient, les femmes enceintes les nouveau-nés, et les personnes âgées (**Vazquez et al., 2001**).

III.3. *Staphylococcus aureus* :



Figure 10 : *Staphylococcus aureus*

www.infonosocomiale.com

Se sont des coques de 0,8 à 1 µm de diamètre, Gram positif, qui se regroupent généralement en grappes de raisin. *S. aureus* est immobile et non sporulé (**Leclerc et al., 1995**). Aérobie anaérobie facultatif, *S. aureus* se cultive sur des milieux ordinaires et s'accommode à de grandes variations de températures de pH.

S. aureus est catalase (+), oxydase (-), nitrate réductase (+) et fermente le glucose et le mannitol (**Prescott et al., 2010**). Sont toxigènes. Le staphylocoque doré est l'une des bactéries pathogènes le plus fréquemment rencontrées en milieu hospitalier. Ses infections peuvent être mortelles, d'autant plus si la souche est résistante aux antibiotique (la méthicilline et à la vancomycine) (**Joseph; 2003**)

III.4. *Escherichia coli*



Figure 11 : *Escherichia coli*

www.ehagroup.com



Les entérobactéries sont des bacilles ou coccobacilles Gram-, oxydase- catalase+ , asporulés. Ils réduisent les nitrates en nitrites, ils fermentent le glucose ils sont anaérobies facultatives. L'espèce type est *Escherichia coli*

Il s'agit du lactose+, gazogène, réalisant une fermentation en acide mixte ; elle produit de l'indole. Se multiplie facilement sur milieu ordinaire à pH neutre à une température de 37 °C. C'est un contaminant alimentaire très fréquent (contamination fécale directe ou indirecte). C'est un hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux qui est très abondant dans les matières fécales. Cette espèce peut être responsable d'intoxication à cause d'un développement abondant (Joseph; 2003)

III.5. *Pseudomonas aeruginosa* :

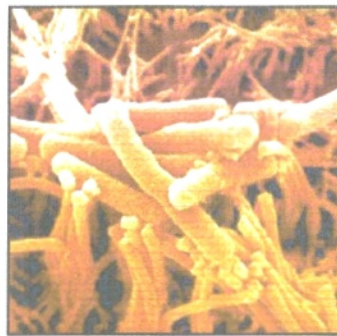


Figure 12 : *Pseudomonas aeruginosa*

305 × 245-17KB JPG

archive.microbelibrary.org

Se sont des bacilles ou coccobacilles gram- saprophytes, oxydase+ ou oxydase- mais fermentation de glucose – (aérobies), généralement mobile. Elles contaminent les produits alimentaires qu'elles peuvent dégrader de façon importante. Ils se multiplient bien sur milieu ordinaires étant mésophiles ou psychrophiles (20à 30°C)

Pseudomonas aeruginosa est exceptionnellement l'agent de gastro-entérites (vomissement, diarrhées, crampes abdominales). A partir d'aliments contaminés par des lésions cutanées ou plus rarement des fèces et elle est parfois rencontrée dans l'eau conditionnée. Elle possède au moins six toxines (Joseph; 2003)

- **Agnès Hebert., 2010** Ecosystème fromager : de l'étude du métabolisme du soufre chez *Kluyveromyces lactis* et *Yarrowia lipolytica* à l'interaction entre *Kluyveromyces lactis* et *Brevibacterium aurantiacum*. *Thèse Doc L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement.* (AgroParisTech).
- **Ammor S., Tauveron G., Dufour E. and Chevallier I. (2006)** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control* **17**: 454-468.
- **Avonts L. and De Vuyst L. (2001)** Antimicrobial potential of probiotic lactic acid bacteria Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwk Toegep Biol. Wet. **66**: 543-50.
- **Avonts L. and De Vuyst L. (2001)** Antimicrobial potential of probiotic lactic acid bacteria Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwk Toegep Biol. Wet. **66**: 543-50
- **Axelsson, L. (2004).** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects.*, Eds Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A., New York: Marcel Dekker., pp1-66
- **Bonaïti, C., Irlinger, F., Spinnler, H. E. & Engel, E. (2005).** An iterative sensory procedure to select odor-active associations in complex consortia of microorganisms: application to the construction of a cheese model. *Journal of Dairy Science* **88**(5), 1671-84.
- **Canon, P., Lee, T., Bolanos, J. & Danziger, L. (2005).** Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of 200 cases. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease* **24**, 31-40.
- **Carine Dortu, Philippe Thonart. 2009.** Biotechnol. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. 2009 **13**(1), 143-154
- **Chammas, G.I., Saliba, R. and Béal, C. (2006).** Characterization of the fermented milk —Laban|| with sensory analysis and instrumental measurements. *J. Food Sci.* **71**: S156–S162.

- **Champak C., Moushumi P., Lili X., W. A. van der Donk. 2005.** *Biosynthesis and mode of action of lantibiotics.* Chemical review 105, 633-683.
- **Commission du codex alimentaire., 2010.** Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires comité du codex sur les additifs alimentaires Observations sur le projet l'avant-projet des disposition relatives aux additives alimentaires de Langaa
- **Drider .D, Fimland, G, Hechard, Y. Mc Mullen L.M., Prevost H. 2006.** The continuing story of Class IIa bacteriocins. Microbiology and molecular biology review, June 2006, p.564-582
- **Dacosta Y, 2000.** La bioprotection des aliments. L'antagonisme microbien au service de la sécurité et de qualité microbiologie. Rappel de données indispensables. Edition YVES DOCOSTA, Paris.
- **De Roissart, H. et Luquet, F.M. (1994).** Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. pp. 1-286
- **Doguiet K.Denis dalie, 2010,**Biocontrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtones de maïs caractéristique principale des bactérie lactique. Thèse doc ecol doctorat science de la vie et de la nature. Uni Bordeaux I. France.
- **Donohue, D. (2004).** Some considerations for the safety of novel probiotic bacteria in Lactic Acid Bacteria, 3rd rev. ed edn. New York Marcel Dekker.pp 531-546.
- **Dortu, C. & Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **13**, 143-154.
- **El-Ziney M.G., Uyttendaele M., Debevere J. and Jakobsen M. (1998)** Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Lett.* **20(10)**: 913-916.
- **Galverz A., Abriouel H., Lopez R. L. and Omar N.B. (2007)** Bacteriocin-based strategies for food bioservation. *Int. J. Food Microbiol.* **120** (1-2):51-70.
- **Garrity, G., Brenner, D., Krieg, N. & Staley, J. (2008).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology , Volume3 : The Firmicutes, Originally published by Williams and Wilkins,1984, 2nd ed, Hardcover, 1450p

- **Gevers, D. (2002).** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium
- **Givry Sébastien, 2006.** Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifementans*. Thèse de Doc. Uni de Reims Champagne- Ardenne. Laboratoire de Microbiologie Industrielle, UMR FARE 614
- **Grande M. J., Lopez R. L., Abriouel H., Valdivia E., Ben Omar N., Maqueda M., Martinez- Canamero M. and Galvez A. (2007)** Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or a combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* **70**: 405-11.
- **Guiraud J-P. 2003.** Microbiologie Alimentaire. Pouvoir pathogène- notion d'immunologie. Relation microorganismes êtres vivants. Edition DUNOD. Paris 2003, pour la nouvelle présentation. Pp : 37-38.
- **H. Chen, D.G. Hoover, 2003.** Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety*, 2 (2003) 82–100
- **Hammes, W. P. & Hertel, C. (1998).** New developments in meat starter cultures. *Meat Science* **49**, S125-S138.
- **Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**(suppl): 365S–73S.
- **Howell, K. S., Cozzolino, D., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H. & Henschke, P. A. (2006).** Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. *FEMS Yeast Research* **6**(1), 91-101.
- **Isaac Budjulobo., 2009** Analyse bactériologie des saucissons vendus dans les alimentations de la ville de Kisangani.
- **Janssen M., Geeraerd A.H., Cappuyns A., Garcia-Gonzalez L., Schockaert G., Houteghem N.V., Vereecken K.M., Debevere J., 0.** and lactic acid concentration on *L. innocua* inactivation: Development of a predictive model and assessment of Experimental Variability. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(5): 1601-1611.

- **Jomaa Alomar 2007**, Etude propriétés physiologique de *Lactococcus lactis* et *Lactococcus garvieae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagerie. Les microorganismes pathogènes du lait et de fromage. thèse Doc. Toulouse
- **Joseph- Pierre Guiraud, 2003**.microorganisme intervenant dans l'industrie alimentaire, microbiologie alimentaires application à l'étude des principaux groupes microbiens. 1^{ère} Eds 91-294.
- Joseph-Pierre Guiraud ; 2003 microbiologie alimentaire. Les microorganismes intervenant dans l'industrie alimentaire. P 80-82-85
- **Khuntia, A. & Chaudhary, L. C. (2002)**. Performance of male crossbred calves as influenced by substitution of grain by wheat bran and the addition of lactic acid bacteria to diet. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **15**, 188-194.
- **Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A. & Altermann, E. (2005)**. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* **29**, 393-409.
- **Krieg, N. R. (2001)**. Volume I: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Eds Garrity, G., Boone, D., Castenholz, W., The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Originally published by Williams and Wilkins, 1984, 2nd ed , Hardcover, 721p.
- **Laboui Hicham , Elmoualdi Laaroussi , Elyachioui Mohammed , Oussine Mohammed, 2005** sélection de souche de bactérie lactique antimicrobienne. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2005, **144**, 237-250.
- **Laurent S., Federighi M., Jouve J. L., 1998**.Manuel de bactériologies alimentaire, polytechnica, Paris, 308p
- **Lee Y.K., Salminen S. 2009**. Handbook of probiotics and prebiotics. 2nd Ed. A John Wiley and Sons, Inc, Publication
- **Liu, S. (2003)** Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **83**(2) : 115-131.
- **Loubna Daoudi. 2000**, Purification, développement d'anticorps monoclonaux spécifique et détection immunoenzymatique de la nisine z une bactériocine produite par *Lactococcus lactis ssp lactis biovar. Diacytil lactis UL719*.

Faculté des études supérieures de l'uni Laval pour l'obtention du grade de maître ès science (MSc.)

- **Maligoy Mathieu, 2008** Analyse post-génomique des interactions cellulaires dans des écosystèmes modèles. Les interactions cellulaires thèse doc L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- **Mami Anas, Hamedi Amine Rizek, Henni Jamel Eddine Kerfouf Ahmed & Kihl Mebrouk;2010.** Activité Anti-Bactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis à vis de *Staphylococcus aureus*. Les technologie de laboratoire, Volume 5, N°21
- **Morisset Dany 2003** Etude des relations structure/fonction d'une bactériocine anti-*Listeria*, la mésentéricine Y105. Les bactériocine des bactéries lactiques ; intérêt de bactériocine. Thèse Doc, Ecole Doctorale d'Ingénierie Chimique, Biologique et Géologique Discipline: Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie. Uni Poitier
- **Nehme Nancy 2008.** Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni* : impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes. Etudes des interactions levures/bactéries. Thèse Doc. Génie des procédés et Environnement. Toulouse
- **Nigutova K. et al., 2007.** Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enl A homologues among ruminal Gram+ cocci. *J. Appl. Microbiol.*, 102(2), 563-569.
- **Ninane V., Mukandayambaje R. et Berben G. 2009** - Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir: le point sur la situation règlementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(3), 459-466.
- **Patton G.C. & Van Der Donk W.A., 2005.** New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8, 543-551.
- **Pitt T. L. and Gaston A.M. (1995)** Bacteriocin typing. *Methods in molecular biology*. Edited by Haward, J. et Whitecombe, D.M. Edition: Human press.Inc. Totowa, New Jersey (NJ). **46:** 5-14.
- **Playne M. and Salminen S. (2002)** Health benefits of probiotics : human studies and clinical trials. *Nutrafoods* 1(1):5-11
- **Prescotte W. harly S. Klein W, 2010.** Microbiologie Eds de boeck.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
FACULTE DES SCIENCES ET DE LA NATURE
ET DE LA VIE ET SCIENCE DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

Mémoire de fin d'études Pour l'obtention du diplôme Master

Option : Microbiologie



Thème :

*Recherche des substances antagonistes produites par une souche lactique appartenant au genre *Leuconostoc* (S28) : Bactériocines*

Présenté par :

M^{lle} Boussouar Imène

Soutenu le 4 Juillet 2011, devant le jury composé de :

President : M^r *Abdelouahed D*

Professeur

Examinatrice : M^{me} *Malek, F*

Maitre assistante classe A

Examinatrice : M^{me} *Ghenbaza née Boublenza L*

Maitre assistante classe A

Promotrice : M^{me} *Bendimerad, N*

Maitre assistante classe A

Année universitaire 2010-2011

- **Richard C. et al., 2006.** Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class lia bacteriocins. *Food Microbiol.*, 23(2), 175-183.
- **Riley M. A. and Wertz J. E. (2002)** Bacteriocin diversity: ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* 7: 129-133.
- **Rousseau Virginie, 2004.** Evaluation d'oligosaccharides à effet probiotique vis-à-vis de la microflore vaginale. Actions des lactobacilles vis-à-vis des microorganismes potentiellement pathogènes. Thèse de Doc, Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bio ingénieries 34, Toulouse
- **Ryan M.P., Meaney W.J., Ross R.P. and Hill C. (1998)** Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ Microbiol.* 64: 2287-2290
- **Saad Naima, 2010.**Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum* 299v avec l'hôte : approche *in vitro*. thèse doc. Ecole doctorale Biologie – Santé Fac des Sciences et Techniques. Univ de Limoges.
- **Salawu, M. B., Warren, E. H. & Adesogan, A. T. (2001).** Fermentation characteristics, aerobic stability and ruminal degradation of ensiled pea/wheat bi-crop forages treated with two microbial inoculants, formic acid or quebracho tannins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 1263-1268.
- **Salminen, S., Gorbach, S., Yuan-Kun, L. & Benno, Y. (2004).** Human studies on probiotics: What is scientifically proven today , In *Lactic Acid bacteria : Microbiological and functional Aspects*.Eds salimen, S., von Wright, A. and Ouwerhand A., New york Dekker M. pp515-530
- **Sieuwert, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J. & van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008).** Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 74(16), 4997-5007.
- **Smaoui Salim, 2010** Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Domaines d'applications les bactériocines. Thèse Doc. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse). Sciences Biologiques.

- **Ström, K. (2005).** Fungal inhibitory lactic acid bacteria- Characterization and application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- **Ström, K., Schnurer, J. & Melin, P. (2005).** Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *FEMS Microbiology Letters* **246**, 119-124.
- **Thonar, P. (1997).** Les applications des bactéries lactiques. In : Séminaire sur la sélection, la production et le conditionnement des ferments lactiques. Tunis.
- **Toelstede, S. & Hofmann, T. (2009).** Kokumi-active glutamyl peptides in cheeses and their biogenesis by *Penicillium roquefortii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(9), 3738-3748.
- **Twomey D., Ryan M., Meaney B. & Hill C., 2002.** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**, 165-185
- **Vazquez-Boland, C., Meyrand, A., Mazuy, C., Delignette-Muller, M.L., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C. And richard, Y. (1998).** Behaviour and enterotoxin production by *staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats' milk lacticcheeses. *Journal of Dairy Desearch* **65**, 273-281
- **Vollenweider S. (2004)** 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.* **64**: 16-27.
- **Willey J.M. & van der Donk W.A., 2007.** Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.*, **61**, 477-501.
- **Zalan Z., Barath A. and Halasz A. (2005)** Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technol. Biotech.* **43**(3): 219- 225.
- **Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, 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.

Remercîment

C'est grâce à Dieu le tout puissant qui m'a donné la force, le courage, la patience et qui m'a permis d'accomplir ce travail. Je tiens tout à remercier chaleureusement M^{me} Bendimered .N Maitre Assistante de classe A pour sa patience, son aide, sa gentillesse, ses conseils et sa disponibilité. Je lui dois aussi un grand merci pour sa confiance, sa compréhension et pour tout le temps qu'elle a dédiée à mon travail.

Mes remerciements et mes gratitudes à Mr Abdeouahed D professeur qui nous à fait l'honneur de présider le jury de notre travail.

Je tiens à remercier M^{me} Malek .F Maitre Assistante de classe A, pour sa disponibilité à jury ce travail.

Je remercie M^{me} Ghenbaza née Boublenza . L Maitre Assistante de classe A, a accepté de jury ce Modest travail.



Résumé

Cette étude consiste à détecter si la souche S28 appartenant à la sous espèce *Leuconostoc mesenteroide subsp dextranicum* produit une substance de nature protéique inhibitrice des germes nuisibles appelé bactériocine.

En effet la présence des zones d'inhibitions surtout pour *Bacillus cereus* (22.5mm) et *Staphylococcus aureus* (15mm) détecté par la méthode de Barefoot, (1983) confirme l'existence d'une ou plusieurs bactériocines sécrétés par S28.

La mesure de la densité optique des bactéries nuisibles montre qu'après une croissance rapide, le nombre de bactéries diminue rapidement après avoir ajouté le surnageant de la bactérie lactique qui contient au moins une bactériocine.

La méthode de Fleming et al, 1985 confirme que ces substances antagonistes sécrété par S28 sont de nature glucoprotéique ou lipoprotéique, et sont sensible à l'action enzymatique de la pepsine et de la protéinase K.

Cette action est de nature bactéricide pour *Bacillus cereus* ou bactériostatique pour les autre bactéries nuisibles.

La nisine testé agit que sur *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes*.

L'antagonisme entre les bactéries lactiques se réalise sauf pour S28. L'auto inhibition n'est possible que pour S26, S 91, S97.

Mots clés : Bactéries lactiques, *Leuconostoc*, Bactéries indésirables, antagonisme, bactériocine, nisine



Abstrac

This survey consists in detecting if the original S28 belonging to the under species *Leuconostoc mesenteroide subsp dextranicum* produces a substance of nature inhibitory protéique of the germs harmful named bactériocine.

Indeed the presence of the of inhibitions especially for *Bacillus cereus* (22.5mm) and *Staphylococcus aureus* (15mm) to detect by the method of Barefoot, 1983 confirm the existence of one or several bactériocines secreted by S28.

The measure of the optic density of the bacteria harmful watch that after a fast growth the numbers bacteria decrease quickly after having added it remaining of the lactic bacterium who can contains at least a bactériocine.

The method of Fleming and al, 1985 confirm that these antagonistic substances to secrete by S28 is of nature glucoprotéique or lipoprotéique, and are sensitive to the enzymatic action of the pepsine and the K. protéinase

This action is of bactericidal nature for *Bacillus cereus* or bactériostatique for the another one harmful bacteria.

The tested nisine acts that on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*.

The antagonism between the lactic bacteria achieves itself safe for S28, the auto inhibition is only possible for S26, S 91, S97.

Words key: lactic bacteria, *Leuconostoc* pathogenic bacterium, antagonism, bactériocine, nisine,

Liste d'abréviations

-: négative.

+ : positive

Bc : *Bacillus cereus*

BP : Bactéries Pathogènes

Ec : *Escherichia coli*

Ef : *Enterococcus faecalis*

GRAS: Generally Regarded As Safe.

kDa : kilo-Dalton.

Lis : *Listeria monocytogenes*

MRS : Mac-Rogosa sharpe.

pH: potentiel Hydrogène.

st : *Staphylococcus aureus*

Subsp ou ssp : Sous espèce.

trs : tours

µg : microgramme

µl: microlitre

Liste des figures

Figure 1: Zones d'inhibitions formées par les bactériocines du surnageant de S28 ...	4
Figure 2: Zones d'inhibitions formées par le surnageant de S28	7
Figure 3: Cinétique de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> en présence ou en absence des bactériocines produites par S28	8
Figure 4: Cinétique de croissance d' <i>E. coli</i> en présence ou en absence de bactériocines produite par S28	9
Figure 5 : Cinétique de croissance de <i>Listeria monocytogenes</i> en présence ou en absence des bactériocines produite par S28	9
Figure 6: Cinétique de croissance d' <i>Enterococcus faecalis</i> en présence ou en absence de bactériocines produite par S28	10
Figure 7 : Cinétique de croissance de <i>Bacillus cereus</i> en présence ou en absence de bactériocines produites par S28	10
Figure 8 : Activité inhibitrice de S28 en présence ou en absence d'enzymes protéolytiques	11
Figure 9: Zones d'inhibitions formées par les bactériocines de S28	12
Figure 10 : Effet bactéricide chez <i>Bacillus cereus</i>	13
Figure 11 : Effet de la nisine sur <i>Bacillus cereus</i>	14
Figure 12 : Zones d'inhibitions formées entre les bactéries lactique	14

Liste de tableau

Tableau 1 : Caractéristiques de lactobacille.....	8
Tableau2 : Classement Bactériocines des bactéries lactiques.....	15

Liste de figure

Figure 1 : Dégradation du glucose par les bactéries lactiques.....	2
Figure2 : <i>Lactobacillus bulgaricu</i>	7
Figure3 : <i>L. acidophilus</i>	7
Figure 4 :Exp de mutualisme entre <i>S. thermophilus</i> et <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricu</i> ...	11
Figure 5 : Modes d'action sur les pathogènes du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés produits par les lactobacilles.....	12
Figure 6 : Mode d'action sur les pathogènes des bactériocines produites par les lactobacilles	16
Figure 7 : Séquence et structure de la nisine	17
Figure 8 : <i>Salmonella</i>	20
Figure 9 : <i>Listeria monocytogenes</i>	20
Figure 10 : <i>Staphylococcus aureus</i>	21
Figure 11 : <i>Escherichia coli</i>	21
Figure12 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22



Sommaire

Chapitre I : les bactéries lactiques.

I.1.Définition	1
I.2. Caractères généraux.....	1
I.3.Classification:.....	3
I.4. Exigences nutritionnelles:.....	3
I.5 Intérêts des bactéries lactiques	3
I.5.1.Domaine agro-alimentaire.....	3
I.5.1.1. Rôles dans la conservation	3
❖ Production d'acide lactique.....	4
❖ Production de bactériocine.....	4
I.5.1.2. Rôle sur la structure et la texture.....	4
I.5.1.3. Rôles sur les caractéristiques organoleptiques.....	4
I.5.2.Domaine de la santé.....	4
I.6 Innocuité des bactéries lactiques.....	5
I.7 Les lactobacilles.....	6
I.7.1Caractères généraux.....	6
I.7.2 Habitat.....	7
I.7.4 Rôles des lactobacilles.....	7

Chapitre II : Les interactions entre les microorganismes .

II.1.Compétition.....	9
II.2.Antagonisme	9
II.3.Parasitisme.....	10
II.4 Commensalisme.....	10
II.5 Mutualisme.....	10
II.6 Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques.....	11
II.6.1.Les acides organiques	11
II.6.2. Le peroxyde d'hydrogène	11
II.6.3.Le dioxyde de carbone.....	12

II.6.4. Le diacétyle	12
II.6.5 La reutérine	12
II.6.6 Bactériocine.....	12
II.6.6.1. Définition des bactériocines	12
II.6.6.2. Caractérisation des bactériocines.....	12
II.6.6.3. Classification des bactériocines.....	13
❖ La classe I : Les lantibiotiques	13
❖ Classes II : Bactériocines peptidiques.....	13
❖ Classes III : Bactériocines protéiques.....	14
❖ Classe IV : Bactériocines complexes.....	14
II.6.6.4.Mécanisme d'action de bactériocine	15
II.6.6.5 : Domaines d'applications des bactériocines	16
❖ Le typage bactérien	16
❖ Domaine alimentaire.....	16
❖ Domaines de la médecine humaine	17
II.6.7. Exemple de bactériocine : La nisine	
II.6.7.1Définition.....	17
II.6.7.2.Caractéristiques de la nisine	18
II.6.7.3. Mode d'action de la nisine	19

Chapitre III : Les bactéries pathogènes.

III.1. Salmonella	20
III.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	20
III.3. <i>Le Staphylococcus aureus</i>	21
III.4. <i>Escherichia Coli</i>	21
✓ III. 5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22

Méthode de travail :

L'objectif de ce travail consiste est de rechercher les bactériocines si elles sont produits ou non par nos bactérie lactique du genre *Lactobacillus*.

Ainsi notre étude consiste à mettre en antagonisme des bactéries lactiques avec des bactéries d'altération ou pathogènes. Pour cela le travail sera partagé en quatre parties :

La première partie : consiste à confirmer la pureté des bactéries pathogènes (*Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) en étudiant: la morphologie (coloration de gram), type respiratoire, et la recherche de la catalase.

La deuxième partie : c'est la recherche de bactériocine en appliquant la méthode de Fläming *et al* 1975. Qui consiste :

- Ensemencer les bactéries lactiques dans un bouillon MRS à 30 °C pendant 48h. ces derniers sont centrifugées 10.000 tour pendant 7 min. Puis onensemencer le surnagent des bactéries lactiques par touche et incubé pendant 24h à 30 °C.
- En parallèle les bactéries pathogènes sont ensemencées dans bouillon nutritive.
- 7 ml d'une gélose semi solide contenant 500µl d'un mélange de bouillon nutritif de 24h et des enzymes protéolytiques sont coulés en nappe.
- Des géloses ne contient pas des enzymes sont utilisées comme témoins.
- La production de bactériocine sera traduite par des zones d'inhibitions.

La troisième étape :

Vérifier si cette bactériocine a un effet bactéricide ou bactériostatique : un fragment de la gélose pris dans la zone d'inhibition est ensemencé dans un bouillon et étalé sur la surface d'une gélose nutritive. L'apparition des microorganismes dans la gélose et d'un trouble dans le bouillon confirme l'effet bactériostatique.

Quatrième étape :

Mettre en interaction la nisine avec les bactéries pathogènes par :

- Méthode des disques.
- Méthode des puits.

Introduction



I.3 Confirmation de la pureté des bactéries pathogènes :

- Test morphologique

Coloration de Gram et observation microscopique sert à identifier à la fois la forme (cocci ou bacille) des bactéries et leur Gram.

- Test biochimique :

- ✓ Type respiratoire : Des géloses viande foie (VF) en tube Prévot sont ensemencées par la souche.
- ✓ Recherche de l'enzyme catalase : une colonie bactérienne est mise en contact avec une goutte d'eau oxygénée. La présence de la catalase se traduit par un dégagement des bulles d'oxygène.

I.4 Mise en évidence des inhibitions par les bactéries lactiques : Recherche des bactériocines.

Les inhibitions peuvent être causées par plusieurs agents tels que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, les phages et les bactériocines, La recherche de la production des bactériocines, est réalisée selon les méthodes suivantes :

I.4.1 Méthode de Barefoot, (1983) :

Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique productrice de substances antimicrobiennes avec la souche pathogène.

La souche lactique est cultivée dans un bouillon MRS liquide. Après une incubation de 24h à 37°C, le milieu est centrifugé à 10000 trs/min pendant 7 min. La souche pathogène est ensemencée en nappe sur une gélose MRS en boîte de Pétri, Des puits sont creusés dans la gélose avec l'extrémité plate de la pipette pasteur, en parallèle des disques en papier Wattman sont déposés à la surface de la gélose. Les puits et les disques reçoivent 50 µl de surnageant de la culture lactique, les boîtes sont incubées pendant 24 h à 30°C. Les zones claires et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive.

I.4.2 Densité optique :

Chaque souche pathogène est ensemencée dans un tube contenant 5 ml de bouillon nutritive puis étuvées à 37°C pendant 24h. La densité optique est mesurée toutes les deux heures. À la quatrième heure, le surnageant de bactérie lactique est neutralisée par NaOH à pH 6.5, puis ajouté aux cultures et la mesure de la densité optique continue.

I.4.3. Méthode de Fleming *et al* ; 1985

Les souches lactiques sont inoculées dans 5ml d'un bouillon MRS, puis étuvées à 37°C. Une centrifugation est réalisée à 10000 trs/min pendant 7 min. Le surnageant est neutralisé par NaOH à 0.1N pour obtenir un pH égale à 6.5 .Le surnageant neutralisé estensemencé par touche à la surface de la boite de pétri contenant le milieu MRS solide. Les boites sont laissées 15min pour le séchage. Après 24h d'incubation à 30°C, un volume de 500 µl de chaque culture pathogène pris d'un bouillon nutritif de 24h est mélangé à 400µl de solution d'enzymes (protéinase K ou pepsine) puis ajouté à 7ml de gélose semi solide. Le mélange est coulé à la surface des boites pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne. Les boites sont laissées quelques minutes avant l'incubation à 37°C pendant 24h.

Les boites témoins sont celles dont la gélose semi solide ne contient pas d'enzymes.

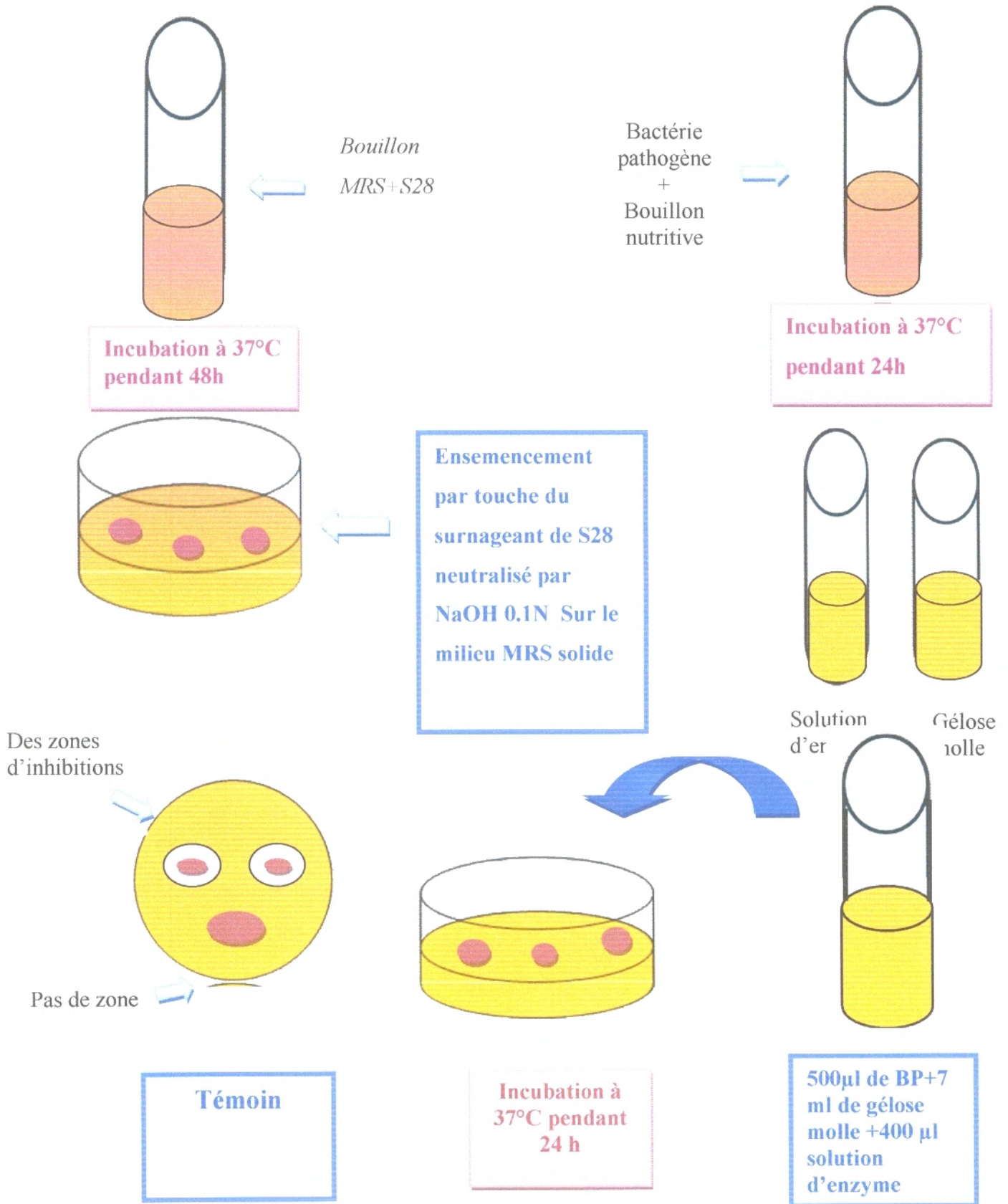
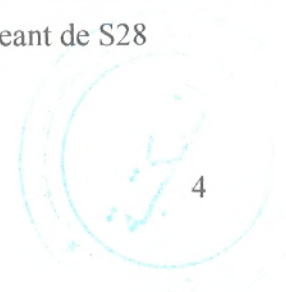


Figure 1 : Zones d'inhibitions formées par les bactériocines du surnageant de S28



I.4.4 Effet bactéricide ou bactériostatique :

Pour détecter l'effet des bactériocines s'il est bactériostatique ou bactéricide deux méthodes sont appliquées:

- La première consiste à mettre dans des tubes contenant 5 ml de bouillon nutritif, un fragment de gélose pris dans la zone d'inhibition, puis les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h. L'apparition de trouble dans le tube permet de déduire que les bactéries pathogènes sont toujours vivantes, donc l'effet inhibiteur est bactériostatique. Mais si le contenu du tube reste clair ceci confirme que l'effet est bactéricide.
- La deuxième méthode : de la même manière un fragment de gélose est pris de la zone d'inhibition, mais cette fois ci, il est étalé à la surface de la boîte de pétri. Le développement des colonies se traduit par un effet bactériostatique.

I.4.5 Action de la nisine sur les bactéries nuisibles :

La nisine (peptide amphiphile cationique produit par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) est la seule bactériocine autorisée comme additif alimentaire et conservateur par la FAO et l'OMS sous le code d'E 234 (Dean *et al.*, 1996).

I.4.5.1 Test de sensibilité :

Ce test consiste à vérifier l'action de la nisine sur les bactéries pathogènes et d'altérations. Pour cela les deux méthodes des disques et des puits sont appliquées :

Chaque bactérie pathogène estensemencée en nappe dans une boîte de pétri contenant une gélose nutritive. Des disques de papier wattman imbibés de la solution de nisine sont déposés et des puits sont formés pour recevoir 50 µl de la solution de nisine, à la surface de la gélose. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

I.4.6 Interaction entre les bactéries lactiques :

L'interaction entre les bactéries lactiques permet de détecter s'il ya antagonisme entre elles.

Toujours la méthode des disques et des puits est appliquée c'est-à-dire une souche lactique indicatrice estensemencée en nappe et quelques gouttes d'une autre culture considérée comme inhibitrice sont mis dans les puits.

Résultats et interprétations

II.1 Caractéristiques des bactéries pathogènes

Le tableau suivant résume les résultats des caractères phénotypiques trouvés :

Tableau 2 : Caractères phénotypiques des souches pathogènes et d'altérations

Caractéristique BP	Observation microscopique	Type respiratoire	Coloration de Gram	Catalase
<i>E coli</i>	bacille	Aéro- anaerobie facultative	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	bacille	Aéro- anaerobie facultative	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	bacille	Aéro- anaerobie facultative	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	cocci	Aéro- anaerobie facultative	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	cocci	Aéro- anaerobie facultative	+	-

BP : Bactérie pathogène ; + : présence ; - : absence

Bacillus cereus et *Listeria monocytogenes* sont des bacilles à Gram positifs; *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* sont des cocci à Gram positifs. *E coli* est un bacille à Gram négatif.

Toutes ces bactéries pathogènes et d'altérations sont aéro-anaerobie facultative et possèdent une catalase, à l'exception d'*Enterococcus faecalis* qui possède une pseudo catalase.

II.2 Recherche des bactériocines :

II.2.1 Méthode de Barefoot, (1983):

La figure suivante montre les résultats trouvés en appliquant la méthode de Barefoot, (1983) :

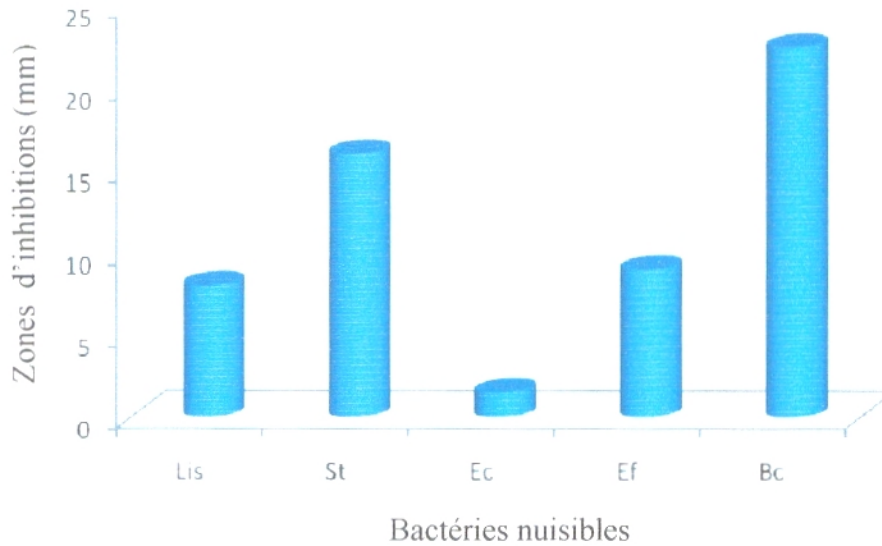


Figure2 : Zones d'inhibitions formées par le surnageant de S28

Lis : *Listeria monocytogenes*

St : *Staphylococcus aureus*

Ec : *E coli*

Ef : *Enterococcus faecalis*

Bc : *Bacillus cereus*

Toute les bactéries nuisibles sont inhibées par le surnageant de la bactérie lactique S28 qui contient la bactériocine.

Le diamètre des zones d'inhibitions varie de 1.20 mm (pour *E.coli*) à 22.5 mm (*Bacillus cereus*).

II.2. 2 Mesure de la densité optique des bactéries nuisibles :

Le développement de bactéries pathogènes et d'altérations est contrôlé toutes les deux heures en absence ou en présence du surnageant qui est additionné à la quatrième heure. Les résultats sont mentionnés dans les graphes suivants :

❖ *Staphylococcus aureus* :

La densité optique varie en fonction du temps dans le graphe suivant :

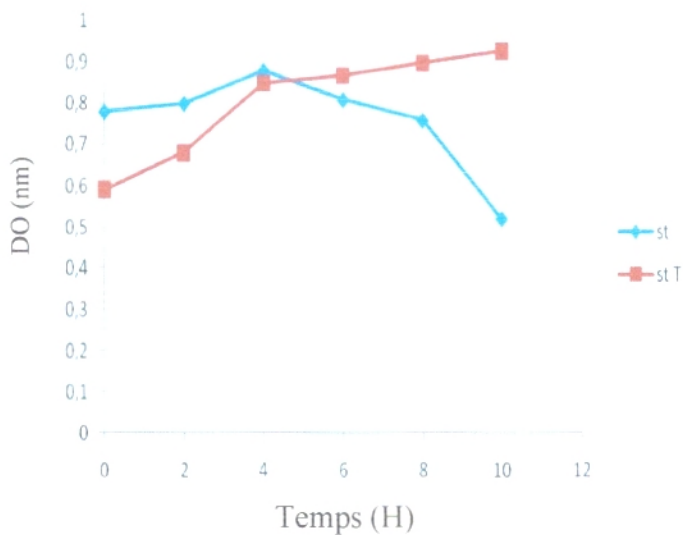


Figure 3 : Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* en présence ou en absence de bactériocines produites par S28

st : *Staphylococcus aureus*

st T : *Staphylococcus aureus* témoin

DO : densité optique

Après une croissance de, *Staphylococcus aureus* il y a une décroissance rapide à la quatrième heure une fois le surnageant de S28 ajouté. Sans surnageant la bactérie continue à se développer.

❖ *Escherichia coli* et *Listeria monocytogenes*

Les graphes suivants montrent la variation de la densité optique en fonction du temps.

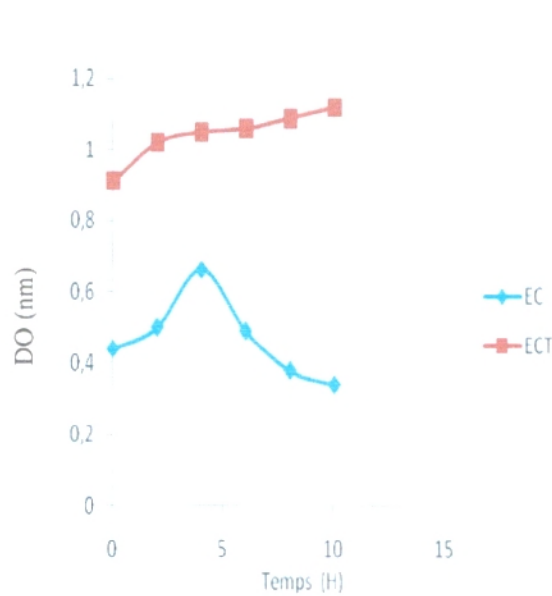


Figure 4 : Cinétique de croissance d'*E. coli* en présence ou en absence de bactériocines produites par S28

EC : *E. coli*

EC T : *E. coli* témoin

DO : densité optique

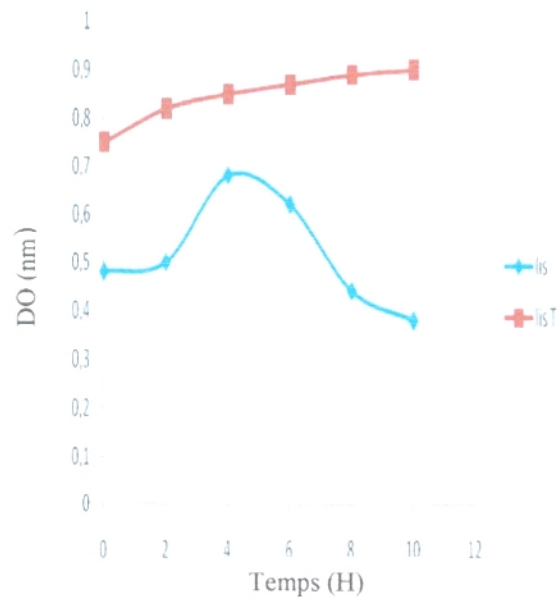


Figure 5 : Cinétique de croissance *Listeria monocytogenes* en présence ou en absence de bactériocines produites par S28

Lis : *listeria monocytogene*

Lis T : *listeria monocytogene témoin*

DO : densité optique

Au début, la croissance d'*E. Coli* et *Listeria monocytogenes* est lente puis s'accroît. Après avoir ajouté le surnageant de S28 aux bactéries, il y a une décroissance rapide de la densité optique. Alors que les témoins croissent sans s'arrêter.

❖ *Enterococcus faecalis* et *Bacillus cereus*

Les figures suivantes montrent l'évolution de la croissance en fonction du temps.

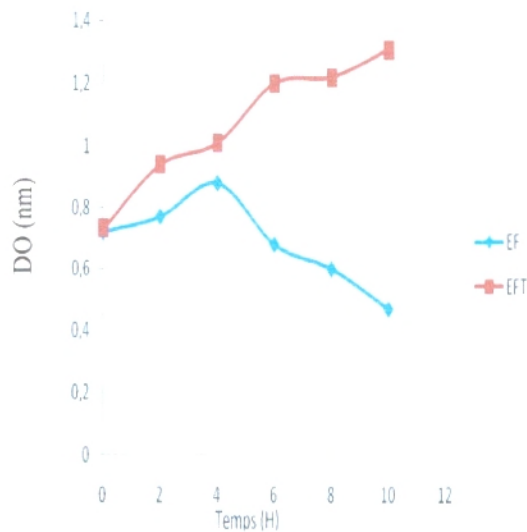


Figure 6 : Cinétique de croissance d'*Enterococcus faecalis* et en présence ou en absence de bactériocines produite par S28

DO : densité optique
 EF : *Enterococcus faecalis*
 EFT : *Enterococcus faecalis* témoin

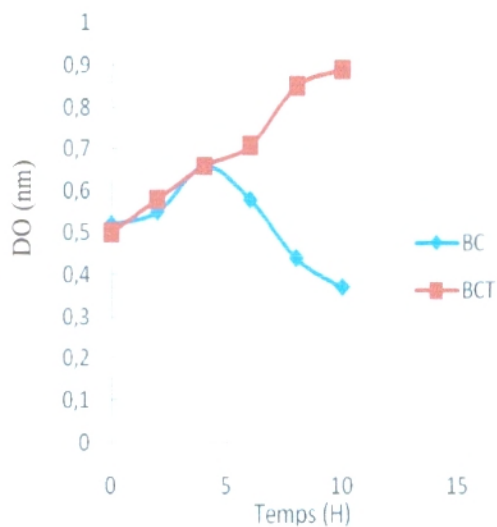


Figure 7 : Cinétique de croissance de *Bacillus cereus* en présence ou en absence de bactériocines produite par S28

DO : densité optique
 BC : *Bacillus cereus*
 BC T : *Bacillus cereus* témoin

La Cinétique de croissance pour *Enterococcus faecalis* et *Bacillus cereus* est presque la même. Une fois le surnageant ajouté à la quatrième heure une décroissance rapide de la densité optique des deux bactéries nuisibles se réalise. Pour les témoins la croissance continue.

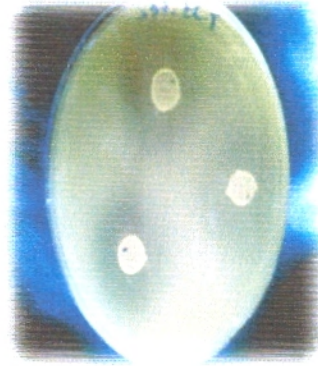
II.2.3. Méthode de Fleming *et al* ; 1985

L'effet de l'acide est éliminé en neutralisant le surnageant à pH 6.5. Comme les bactériocines sont de nature protéique, les réponses obtenues après l'action des enzymes protéolytiques (pepsine et protéinase K) sont mentionnés dans la figure suivante :

Des témoins sans enzymes sont testés aussi.



St en présence de pepsine



BC avec le surnageant neutralisé



BC en présence de protéinase k

Figure 9: Zones d'inhibitions formées par les bactériocines de S28

II.2.4 Nature de l'effet des bactériocines et d'autres facteurs inhibiteurs :

L'effet inhibiteur de S28 peut être bactéricide ou bactériostatique vis à vis des bactéries nuisibles testées.

Tableau 5 : Effet bactéricide ou bactériostatique

BP BL	<i>E coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
S28	Bactériostatique	bactéricide	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique

La souche S28 a un effet bactériostatique pour toutes les bactéries mésophile à l'exception de *Bacillus cereus* qui subit un effet bactéricide puisqu'il y a absence de trouble dans le tube et absence de croissance bactérienne sur la boîte.



Figure 10 : Effet bactéricide chez *Bacillus cereus*

II.2.5 Action de la nisine sur les bactéries pathogènes et d'altérations :

La nisine est une bactériocine produite par *Lactococcus lactis*, la seule utilisée comme additif alimentaire. Le tableau suivant montre son action sur les bactéries nuisibles

Tableau 6 : Les zones d'inhibitions formées par la nisine

Les souches pathogènes	Zones d'inhibition (mm)
<i>E coli</i>	1.5
<i>Bacillus cereus</i>	15
<i>Listeria monocytogene</i>	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	00
<i>Enterococcus faecalis</i>	01

La nisine agit seulement sur *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogene* avec des zones de 15mm et 9mm respectivement.



Figure 11 : Effet de la nisine sur *Bacillus cereus*

II.2.6 Interaction entre les bactéries lactiques :

Les résultats obtenus montrent les inhibitions des bactéries lactiques entre elles qui sont mentionnées dans la figure suivante :

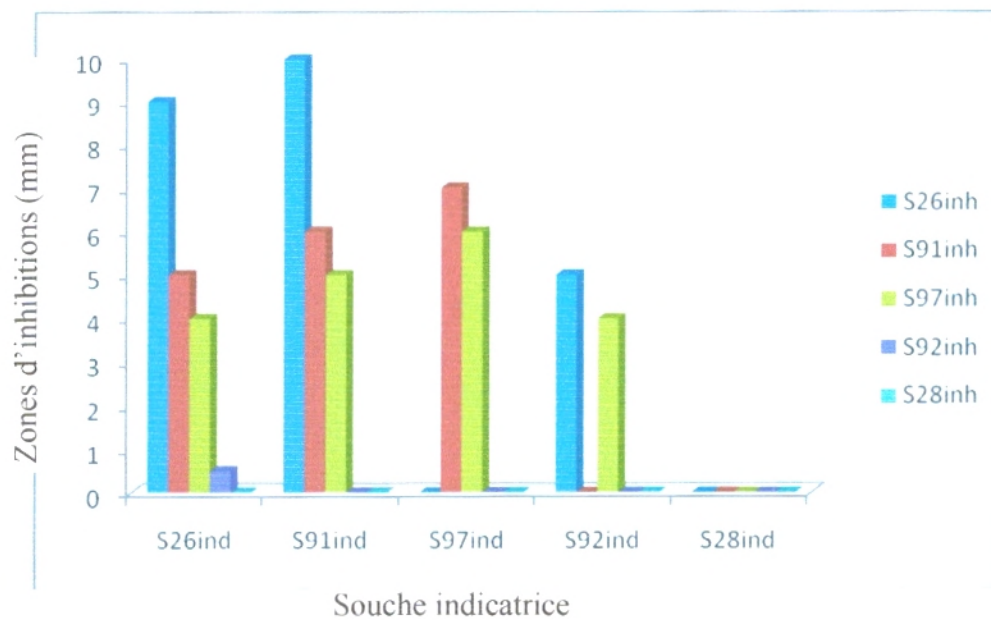


Figure 12: Zones d'inhibitions formées entre les bactéries lactiques

inh : inhibitrice

ind : indicatrice

Toutes les bactéries s'inhibent entre elles à l'exception de S28 qui n'inhibe aucune autre souche. L'auto inhibition est réalisée pour les souches S26, S91, S97.

Discussions

Discussion

Ces dernières années les bactériocines produites par les bactéries lactiques ont attiré une grande attention due à leur application dans les aliments comme conservateur contre certains micro-organismes indésirables tels que *Listeria monocytogenes* et *Clostridium spp* (Nda, et al ;2003)

Dans la présente étude, la production des substances antagonistes notamment les bactériocines, par une souche lactique : *Leuconostoc mesenteroide subsp dextranicum* (S28) est détectée par la méthode de Barefoot (1983) qui montre que les bactériocines produites par S28 agissent surtout sur *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* dont les zones d'inhibitions sont de 22 et 16mm (figure1). Les résultats se rapprochent de ceux cités dans les travaux DüNDAR ;(2006).

Le surnageant de la souche lactique ajouté aux cultures nuisibles à la quatrième heure, engendre une diminution rapide de la croissance de ces bactéries qui est déterminée par la mesure de la densité optique (figure3,4 ;5 ;6 ;7).

Les travaux de Bhunia *al.* (1991), O'Sullivan *et al.* (2002) montrent aussi une augmentation de la densité optique puis une diminution de celle-ci après l'ajout du surnageant. Rodriguez *et al.* (2000) montre aussi qu'après quelques heures d'incubation, la croissance de *Staphylococcus aureus* diminue après l'addition du surnageant de *Lactococcus lactis*.

L'application de la technique de Fleming *et al.*, 1985 déduit que les bactériocines présentes dans le surnageant de la souche lactique sont sensibles à l'action des enzymes protéolytiques, la pepsine et la protéinase K, ce qui indique que la biomolécule en question est de nature protéique (figure 8).

Les travaux de Boutrif et Diop, (2011) indiquent aussi l'existence de deux bactériocines produites par une souche de *Lactococcus lactis*, l'une sensible à l'action de la pepsine et l'autre à la protéinase K.

La diminution des zones d'inhibitions par rapport aux témoins montrent que les bactériocines produites par S28 sont de nature lipoprotéiques ou glycoprotéiques et que d'autres facteurs inhibiteurs peuvent exister, c'est surtout *Bacillus*, *Listeria* qui sont les plus sensibles (figure 8). Ces résultats sont similaires avec les travaux de Halil 2006. Lazouni et Nouara, (2011) montrent aussi l'existence d'une bactériocine de

nature glycoprotéique produite par une souche de *Leuconostoc* et sensible à une protéinase K.

Les travaux de Morisset *et al.*, 2003 ont montré aussi que des bactériocines produites par *Leuconostoc sp* ont une activité contre *Listeria*.

Schillinger, Becker et Holzappel, 1997 ont testé l'effet de la carnocin 54 contre *Listeria monocytogenes*.

D'après Kalchayanand *et al.* (1992) toutes les bactériocines ont une activité dirigée contre les bactéries à Gram positifs puisque la membrane externe des bactéries à Gram négatifs ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne. L'incapacité de bactériocine à traverser la membrane de ces bactéries est due à leur poids moléculaire ou à leurs propriétés hydrophobes. Ceci confirme la résistance *E.coli* à l'égard des bactériocines produites par S28 (la figure8).

Song et Richard (1997) ont montré chez *Listeria*, que les cellules résistantes aux bactériocines ont une membrane de composition différente de celle des cellules sensibles.

Les bactériocines, sont produites puis excrétés à l'extérieur des cellules productrices pour présenter une activité bactéricide ou bactériostatique (**Chen, et al 2003**). Dans ce travail les bactériocines et autres facteurs inhibiteurs produites par la souche S28 ont un effet bactériostatique vis-à-vis des bactéries indésirables à l'exception de *Bacillus cereus* qui subit un effet bactéricide (tableau3).

Sachant que l'utilisation des bactériocines dans les aliments fut introduite par Hirsh en 1951 lorsqu'il démontra que la nisine était en mesure d'inhiber la croissance de *Clostridium* dans un fromage fabriqué à partir du lait pasteurisé. (**Doumandji et al., 2010**). Aujourd'hui, la nisine considéré comme substance saine et sans danger (GRAS : *generally recognized as safe*) est acceptée par l'organisation mondiale de la santé comme étant un conservateur alimentaire dans plus de 40 pays (**Cleveland et al., 2001**)

La nisine testé sur les cinq bactéries nuisibles agit sur seulement sur *Bacillus* et *listéria* (tableau 4). La résistance d'*E.coli* à la nisine confirme les travaux de Kalchayanand *et al.*, (2008).

Selon Flynn *et al.*, (2002) les bactéries lactiques montrent des inhibitions vis-à-vis des souches taxonomiquement proches. Les résultats des interactions entre les bactéries lactiques indiquent que les souches sont inhibées entre elles à l'exception de la souche S28. Les auto-inhibitions se réalisent pour S26 et S91, S97. Ceci est

Conclusion

Conclusion

Ce travail permet de déduire que la souche lactique S28 appartenant à la sous espèce *Leuconostoc mesenteroide subsp dextranicum* sécrète au moins une bactériocine sensible à des enzymes protéolytiques comme la pepsine et la protéinase K.

Cette substance antimicrobienne de nature glucoprotéique ou lipoprotéique agit surtout sur *Bacillus cereus* par effet bactéricide. L'action sur les autres bactéries est bactériostatique.

La nisine testé sur les bactéries nuisibles inhibe seulement *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes*.

Les bactéries lactiques s'inhibent entre elles sauf S28. L'auto inhibition se manifeste pour S26, S 91, S97.

Cette étude laisse entre voir plusieurs perspectives notamment

- L'extraction et la purification des bactériocines détectées afin de pouvoir les appliquer en industries agro-alimentaire comme conservateur.
- Tester l'effet de ces bactériocines sur les champignons.



- ❖ **Aslim B., Yuksekdağ Z. N., Sarıkayab E. and Beyatlı Y. 2005** - Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT*, 38: 691 – 694.
- ❖ **Bhunia, A.K., Johnson, M. C. and Ray, B. 1991.** Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 25-33.
- ❖ **Boutrif O et Diop E, 2011.** Sécurité microbienne : recherche des bactériocines produit par *Lactococcus lactis* (S94). Mémoire d'ingénieur en biologie, option C.Q.A Université de Tlemcen.
- ❖ **Boyaval P., Bhugaloo-Vial P., Duffes F., Merivier A., Dousset X et Marrion D. 1998** - Réacteurs à haute densité cellulaire par production de solution concentrée de bactériocine. *Lait*, 78: 129 –133.
- ❖ **Cenatiempo Y., Berjeaud J. M. Biet F., Fremaux C., Héchard Y. et Robichan D. 1996** – Bactériocine des bactéries lactiques: données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leur déterminant génétique. *lait*, 76: 169 – 177.
- ❖ **Cleveland J., Montville T.F et Chikindas M.L. 2001.** Bactériocins : safe natural antimicrobials for food preservation. *Intern. J. Food Microbiol.* 71 :1-20
- ❖ **Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., Simard, R. 1993.** Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 166-173
- ❖ **Dean J.P., Zottola E.A., 1996.** Use of nisin in ice cream and effect on the survival of *Listeria monocytogenes* », *Journal of Food Protection*, vol. 59, 1996, p. 476-480.
- ❖ **Deip D.B. et Nes I.F 2002.** Ribosomally synthesized antibacterial peptides in gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3 : 107-2
- ❖ **Delves-Broughton J. 1990** - Nisin and its application as a food preservative. *J. Soc. Dairy Tec.*, 43: 73 - 76.
- ❖ **Dortu C. et Thonart P. 2009** - Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(1), 143 – 154.

- ❖ **Doumandji, a. Hellal et n. Saidi 2010**, purification de la bacteriocine a partir de *Lactobacillus acidophilus* 11 Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 4, N°2, p : 25-47 Algeria
- ❖ **H. Chen, D.G. Hoover 2003**, Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety, 2 (2003) 82–100.
- ❖ **Halil DüNDAR ; 2006** characterization and purification of a bacteriocin produced by *leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy in biotechnology. Thesis submitted to The graduate school of natural and applied sciences Of Middle east technical university SENEGAL.
- ❖ **Kalchayanand N., Hanlin M.B. and Ray B. 2008** - Sublethal injury makes Gramnegative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Letters in Applied Microbiology*, 15: 239 – 243.
- ❖ **Lazouni A et Naouara A ,2011** : Inhibition de bactériocine par une souche du genre *leuceunostoc* S26 Mémoire d'ingénieurat biologie, option C.Q.A Université de Tlemcen.
- ❖ **Maqueda M., Gálvez A Martinez Bueno M., Sanchez Barrena M.J Gronález C., Albert A., Rico M. and Valdivia E .2004** . peptide AS-48 prototype of a new class of cyclic bacteriocins Current Protien and peptide Science (sous press). Biotechnologie ;c 91, p
- ❖ **Maria A, Papachanasopoulos, François Krier, Marie Revol- junelles ; Gerand Lefebvre, Jean Pierre, 1997** Multiple bacteriocin production by *Leuconostoc Mesenteroides* TA33a and Other *Leuconostoc / Weissella* strains. *cienc. Tecnol ; Aliment. Vol.26 No.1*
- ❖ **Mendoza, F., Maqueda, M., Gálvez, A., Martinez-Bueno, M. and Valdivia, E. 1999.** Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48-adapted strain of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 618-625.
- ❖ **Morisset, D.; Frère, J. 2003.** L'expression hétérologue de bactériocines utilisant le système de transport mésentéricine Y105 dédié par *Leuconostoc mesenteroides*, *Biochimie*, c. 84, p.
- ❖ **Nda, SI; Holo H, 2003.** Classe II peptides antimicrobiens des bactéries d'acide lactique, biopolymères, c. 55, p.

- ❖ **Ninane V., Mukandayambaje R. et Berben G. 2009** - Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir: le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(3), 459-466.
- ❖ **O' Sullivan, L., Morgan, S. M., Ross, R. P. and Hill, C. 2002.** Elevated enzyme produced by *Lactococcus lactis* DPC5552. *J. Dairy Sci.* 85: 2130-2140. release from Lactococcal starter cultures on exposure to the lantibiotic Lacticin 481,
- ❖ **Rodríguez E., B. Gonzáles B., P. Gaya, M. Nuñez and M. Medina. (2000).** Diversity of bacteriocins produced by Lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 10: 7-15.
- ❖ **Ross R.P., Morgan S. et Hill C.2002.** Préservation and fermentation : past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79 :3-16.
- ❖ **Schaafsma G. 1996** - State of the art concerning probiotic strains in milk product. *Int. Dairy Fed. Nutr. Newsl.* 5: 23 - 24.
- ❖ **Schillinger, V.; Becker, B.; Holzappel, WH 1998,** Antilisterial activité de carnocin 54, une bactériocine de *Leuconostoc carnosum*, de l'Alimentation Microbiol, c. 12, p.
- ❖ **Song (H.J.), Richard (J.)** - Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. - *Int. J. Food Microbiol.*, 1997, **36**(2), 155-161.

Annexe 1

Tableau 1: Zones d'inhibitions formées par le surnageant de S28
Méthode de Barefoot, (1983)

BP	<i>Listéria</i>	<i>S aureus</i>	<i>E coli</i>	<i>E faecalis</i>	<i>B cereus</i>
Diametre d'inhibition (mm)	8	16	1.5	9	22.5

Tableau 2 : Mesure de la densité optique des bactéries nuisibles en présence du surnageant de S28

BP Heur	<i>Listéria</i>	<i>S aureus</i>	<i>E coli</i>	<i>E faecalis</i>	<i>B cereus</i>
0	0.48	0.78	0.44	0.72	0.52
2	0.50	0.80	0.49	0.77	0.55
4	0.68	0.88	0.66	0.84	0.66
6	0.62	0.81	0.49	0.68	0.58
8	0.44	0.76	0.38	0.60	0.44
10	0.38	0.52	0.34	0.47	0.37

Tableau 3 : Mesure de la densité optique en absence du surnageant de S28

B.P Heurs	<i>Listéria</i>	<i>S aureus</i>	<i>E coli</i>	<i>E faecalis</i>	<i>B cereus</i>
0	0.75	0.59	0.91	0.73	0.50
2	0.82	0.68	0.99	0.94	0.58
4	0.85	0.85	1.05	1.09	0.66
6	0.87	0.87	1.06	1.10	0.68
8	0.89	0.90	1.09	1.20	0.70
10	0.90	0.93	1.12	1.22	0.75

**Tableau 4 : Zones d'inhibitions formées par le surnageant de S28
méthode de Fleming et *al* ; 1985**

Souches pathogènes	Diametre D'inhibition (mm)		
	T	E ₁	E ₂
<i>E coli</i>	5	1.5	2.5
<i>Bacillus cereus</i>	37	23	17
<i>Listeria monocytogene</i>	33	18	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	15	12
<i>Enterococcus faecalis</i>	15	7	2.5

Tableau 5 : Zones d'inhibition formées entre les bactéries lactiques

inh \ ind	S26	S91	S97	S92	S28
S26	9	10	00	5	6
S91	5	6	7	00	00
S97	4	5	6	4	4
S92	0.5	00	00	00	00
S28	00	00	00	00	00

ind : souche indicatrice.

inh : souche inhibitrice.

Annexe 2**❖ Milieu MRS (Mac- Rogosa Sharpe)**

Peptone	10g
Extrait de viande	5g
Extrait de levure	5g
D (+) Glucose	10g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0.1g
MnSO ₄	0.05g
Agar	12g
Tween 80	1ml
Eau distillée	1000ml
PH	6.5±0.2

Autoclavage à 121°C pendant 15min

❖ Gélose nutritive (GN)

Peptone	15g
Extrait de levure	3g
D(+) Glucose	1g
NaCl	6g
Agar	23g
Eau distillée	1000ml
PH	7.5±0.2

Autoclavage à 121°C pendant 15min

❖ **Solution de la nisine**

Poudre de nisine	3.7g
Eau distillée	1000ml
Tween 80	0.2%
PH	0.2% (0.2ml)

Mise au congélateur à l'abri de la lumière

❖ **Solution tampon**

Solution A : 27,8g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ + 1000ml d'eau distillée

Solution B : 53,65g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ + 1000ml d'eau distillée