I.Materiel et methodes

I.1. Lieu de stage :

La réalisation de cette étude a été faite au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université Cheikh Làarbi Tebessi Tébessa). Pendant 4 mois.

I.2. Matériels et milieux de culture utilisés :

La composition des différents milieux de culture est représentée dans l'annexe 1

Le matériel utilisé dans le cadre de cette étude est cité dans l'annexe 2

I.3. Méthodologie :

I.3.1. Echontillonnage :

Les échantillons ont été pris à partir des régions différentes de la wilaya de Tébessa, et ils ont tous été préparés à partir du lait de vache et lait de berbis (Planche1).

L'étude pratique a porté sur 9 échantillons :

- Klila séchée (5 échantillon)
- Klila fraiche (2 échantillons)
- Lait de vache (1 échantillon)
- Raib (1 échantillon)



A. Klila séchée



B. Klila fraiche

Planche 1 : Photos des échantillons : ***A.*** Klila séchée, ***B.*** Klila fraiche.

I.3.2. Isolement des bactéries lactiques :

I.3.2.1. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales :

- **Klila :**

Dix grammes de chaque échantillon (Klila) ont été homogénéisés avec 90 ml de l'eau péptonée salée (annexe 1). A partir de la solution mère considérée 10^0 préalablement homogénéisée à l'aide d'un vortex, 1 ml de la solution mère est prélevé aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile et Introduit dans un tube à essai contenant 9ml d'eau péptonée salée on obtient ainsi la dilution 10^{-1} et ainsi de suite jusqu'à 10^{-4} (Figure 2) **(Guiraud, 2003)**. Pour assurer la répartition des bactéries, une agitation pendant 3 à 5 minutes par un vortex a été réalisée **(Sakili et Issouel, 2003).** Pour chaque dilution un volume de 0,1 ml a été étalé en surface sur les milieux d'isolement **(Kacem et Karam, 2006; Cheriguene et *al.*, 2007)**.

- **Le lait et Raib (lait caillée) :**

Une série de dilutions est réalisée à partir du lait que l'on aura homogénéisé par au moins 10 secondes d'agitation au vortex. La première dilution est préparée de façon classique en prélevant 1mL du lait cru dans 9mL d'eau physiologique stérile **(Guiraud, 2003)**.

I .3.2.2. Ensemencement et isolement des souches lactiques :

L'isolement des bactéries lactiques a été réalisé sur le milieu de Man Rogosa et Sharpe (MRS) contenant le vert de bromocrésol (25mg/L) et M17 solide. L'ensemencement se fait en surface. Les boites sont incubées pendant 72 heures à 30 °C **(Eric, 2011)**.

Le milieu MRS au vert de bromocrésol :

- ✓ **Caractéristique :**

Une base nutritive enrichie en extrait de levure source de vitamines et acides aminés.

Du tween 80 source d'acide gras.

Du glucose sucre fermentescible.

Divers composés minéraux.

Deux inhibiteurs de nombreux germes : l'acétate de sodium et le citrate d'ammonium.

Indicateur de pH : le vert de bromocrésol.

pH final est ajusté à 6,2.

- ✓ **Intérêt :**

Ce milieu est utilise pour l'isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers et autres aliments .il sert également au repiquage des souches.

Le milieu M17

- ✓ **Intérêt :**

Ce milieu est utilise pour l'isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers et autres aliment. Il sert également au repiquage des souches.

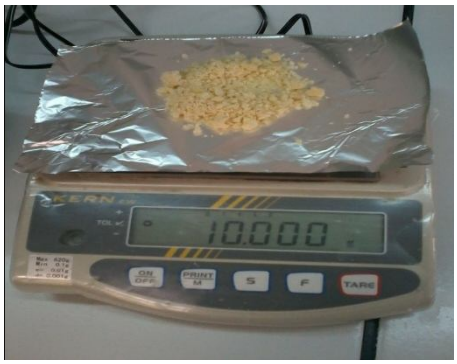
Ensemencement :

0.1ml des dilutions décimales (10^0 jusqu'à 10^{-4}) sont étales à la surface du milieu par la technique d'étalement en râteau en utilisant une pipette Pasteur. Chaque dilution a été ensemencé sur deux milieux gélosés MRS et M17, préalablement coulés dans des boites de Pétri stériles. Ensuite, elles ont été incubées dans une jarre d'anaérobiose à 30°C pendant 48h à 72 h (Figure2).

Lecture :

En basant sur les aspects morphologiques (taille, couleur, surface, profondeur…) **(Kacem et Karam, 2006 ; Cheriguene et *al,* 2007)**.

- **Milieu MRS:** Présence des colonies vertes, colonies vertes lumineuses, colonies transparentes à centre vert. L'acidification du milieu qui est due à la production d'acides par les bactéries lactique ce traduit par le virage du milieu au jaune.
- **Milieu M17 :** Présence des colonies blanches et colonies écrémeuses et jaunes blanchâtres.



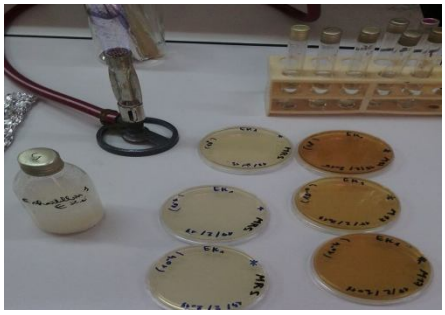
A)Peser 10 g de klila



B).préparation de solution mère



C).préparation des dilutions décimale



D).ensemencement



E).Incubation dans les jarres d'anaérobiose

Figure 2: Méthode d'isolement des bactéries lactiques à partir de klila séchée.

I.3.2.2.1. Etude macroscopique :

C'est une observation visuelle des colonies sur la surface des milieux MRS et M17 solides, pour caractériser leurs formes, leurs tailles, leurs contours et leurs couleurs **(Badis et *al,* 2005)**.

I.3.2.2.2. Etude microscopique :

Cette étude permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement **(Singleton, 1999)**.

La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par Delarras (2007) (Annexe 3).

I.3.2.2.3. Test de catalase :

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase, celle-ci décompose l'eau oxygénée selon la réaction suivante :

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2\ H_2O + O_2$$

La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte de H_2O_2 à 10 volumes. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz **(Zinedine, 2004)**.

I.3.2.3. Purification des isolats :

La purification des souches isolées est réalisée par repiquages successifs alternant sur milieux sélectifs MRS liquide et solide (par la méthode des stries), et l'incubation à 30°C. **(Kacem et Karam, 2006 ; Cheriguene et *al.,* 2007)**.

La pureté des souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur (couleur, taille et forme) **(Guiraud, 2004)**.Ces colonies pures sont retenues pour la suite de l'étude.

I.3.2.3. Conservation des souches lactiques :

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu solide incliné. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines. La conservation à long terme des isolats purifiés est réalisée dans un milieu contenant 70% de lait écrémé (enrichi par 0.05 % d'extrait de levure et 0.05 % de glucose) et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tube éppendorfs à -20°C**. (Badis et *al.*, 2005)**.

I.3.3. Identification biochimique et physiologique des bactéries lactiques :

Des tests physiologiques simples, tels que la croissance à différentes températures, la tolérance aux acides et au sel ainsi que la production de gaz sont utiles pour la différenciation des genres (**Axelsson, 2004)**.

I.3.3.1. Type fermentaire :

Ce test permet de différencier les isolats homolactiques des hétérolactiques après une incubation à 30°C pendant 24 heures jusqu'à 72 heures **(Hassaine, 2013)**.

Technique :

-prendre des tubes stériles renfermant des cloches de Durham.

- y ajouter 10 ml de bouillon MRS, puis ensemencer avec la souche a étudies.

- homogénéiser en prendre soin de remplir la cloche de bouillon en évitant l'introduction des bulles d'air.

- incuber à 37°C pendant trois jours.

Lecture :

La présence du gaz dans la cloche indique un métabolisme, heterofermentaire **(Hariri et *al* ; 2009)**. Alors que leur absence indique les bactéries homofermentaires.

I.3.3.2. Culture en différentes températures (4, 15, 30 et 44°C) :

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles, ce test est réalisé en bouillon MRS. La croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24 heures à 4, 15, 30 et 45°C en comparaison avec un tube témoin non ensemencé **(Hassaine, 2013)**.

I.3.3.3. Culture différents concentration de NaCl 3%, 7% et 10% :

La culture des isolats est réalisée dans des tubes de bouillon MRS à 3% ,7% et 10% de NaCl, l'incubation se fait à 30°C pendant 72 heures **(Hassaine, 2013).** La croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin non ensemencé.

I.3.3.4. Culture à pH 3,9 :

La croissance au pH 3.9 a été testée dans du bouillon MRS ajusté à pH 3.9 **(Lucke et Schillinger, 1987)**. La croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24 heures à 30C ° **(Hassaine ,2013)**.

I.3.3.5. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH) :

Cette enzyme libère l'ammoniac à partir de l'arginine. Pour réaliser ce test, chaque souche est ensemencée dans un tube de bouillon Möeller avec arginine. Les tubes sont recouverts avec de l'huile de vaseline stérile. L'incubation est faite à 30°C pendant au moins 4 jours. Les souches possédant l'ADH vont acidifier le milieu en fermentant le glucose (virage au jaune). Cette acidification favorise l'activité de l'arginine dihydrolase qui va dégrader l'arginine et libérer l'ammoniac d'où virage de la couleur au violet **(Gelman et *al,* 2000)**.

I.3.3.6. Test de l'attaque des sucres :

Les bactéries lactiques dégradent différemment les sources de carbone. L'étude de la fermentation des sucres est réalisée sur le milieu spécifique bouillon MRSS (MRS sans sucre), additionné de vert de bromocrésol comme indicateur de pH **(Mannu et *al.,* 2000 ; Bekhouche et Boulahrouf, 2005ée modifi)**.

Le test de l'attaque des sucres constitue une étape clé pour l'identification des bactéries lactiques et vue le manque d'API 50 CHL qui permet l'identification par 49 sucres nous avons essayé de rassembler le maximum des sucres selon leur disponibilité.

Les sucres que nous avons testés sont: Glucose, Lactose, Sorbitol, Sucrose Xylose, Tyrosine, Aspargine, Fructose.

Ce test a été réalisé afin de déterminer la capacité des souches à fermenter quelques sucres, Pour cela, le milieu MRSS(MRS sans sucre) a été additionné chaque fois d'un sucre à 1%, puis il a été ensemencé par les souches à étudier et incubé à 30°C pendant 72 h . Une couche de vaseline a été ajoutée avant l'incubation dans chaque tube pour créer des conditions d'anaérobiose. L'apparition de trouble, et le virage de la couleur du milieu du vert au jaune indique la fermentation du sucre donc la souche a dégradé le sucre testé (résultat positif), si non le résultat est négatif.

I.4. Détermination de la sensibilité des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques :

Les antibiotiques sont des substances dont l'action antibactérienne s'exprime :

- Soit en inhibant la multiplication des bactéries : c'est l'effet bactériostatique ou bactériostase.
- Soit en les détruisant : c'est l'effet bactéricide ou bactéricidie **(Dellaras, 1998)**.

❖ **Intérêt de l'antibiogramme :**

Il permet de dresser un relevé des caractères de sensibilité ou de résistance qui se surajoutant à l'identification, constitue une véritable carte d'identité du micro-organisme.
Les antibiotiques utilisés sont sous forme de disques imprégnés d'antibiotique pure à une concentration définie.

❖ **Technique :**

Pour chaque souche testée, une colonie de morphologie typique a été sélectionnée et repiquée sur milieu MRS liquide, et incubé pendant 24 h. les souches sont étalées sur milieu MRS à l'aide d'écouvillon. Appliquer les disques à l'aide de pince en appuyant légèrement.

Mettre à l'étuve pendant 24 h à 30°C. Les sont obtenue par mesure du diamètre de la zone d'inhibition qui est comparée au tableau de référence (tableau 2), et sont exprimés comme sensibles (S), intermédiaire (I), résistantes (R). **(Zhoua et *al,* 2005 et Taheri et *al.* 2009)**

Tableau 2 : Antibiotiques utilisés et leur diamètre critiques d'inhibition (Communiqué 1998, du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, Xavier et Emmanuel, 2002) :

Antibiotiques	**Charge du disque**	**Sigle du disque**	**Diamètre critique (mm)** **S I R** **…..I ……I…..**
Tétracycline	**30 µ g**	**TE**	**19 17** **….. I……**
Chloramphénicol	**30 µ g**	**C**	**23 19** **…..I……**
Ampicilline	**10 µ g**	**AMP**	**ND**
Amikacine	**30 µ g**	**K**	**17 15** **…..I……**
Erythromycine	**15 µ g**	**E**	**ND**
colistine	**10 µ g**	**CS**	**ND**
Amoxicillin	**30 µ g**	**AML**	**ND**
ND	**75 µ g**	**TI**	**ND**
ND	**30 µ g**	**AK**	**ND**
Gentamicine	**10 µ g**	**CN**	**ND**

ND : non déterminé

I.5. Mise en évidence de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques :

I.5.1. Activité antagoniste :

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que se soit dans la bio conservation des aliments ou dans la biothérapie grâce à leur pouvoir d'inhiber les bactéries pathogènes et altérantes **(Uehara et *al,* 2006 ; Dortu et Thonart, 2009 ; El-Ghaish et *al,* 2011).**

Cette inhibition est conférée soit par la diminution du pH suite à la production d'acides organiques, ou par la production de différents autres métabolites tels le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, le dioxyde de carbone, la reutérine et les bactériocines **(Albano et *al* ., 2007 ; Anas et al., 2008)**.

L'activité antibactérienne est déterminée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition. Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance ont été mesurés après 16 h de culture **(Duquesne, 2007; Makhloufi, 2011)**.

Pour la détermination de cette activité inhibitrice, on a réalisé des interactions entre les souches isolées de produits laitiers et cinque souches de bactéries indicatrices pathogènes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli, Micrococcus luteus ,Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus subtils.*

I.5.2. La technique des puits :

La méthode utilisée est celle de la diffusion du surnageant de culture à partir des puis, décrit par **(Tagg et Given, 1971)** modifiée.

Cette méthode consiste à :

- Les souches productrices de substances inhibitrices sont cultivées dans du milieu MRS liquide, Après incubation, le milieu est centrifugé (13000 tr/min, 5 min) à 4°C
- La souche indicatrice est ensemencée par écouvillonnage à la surface du milieu de Muller Hinton on boite de Pétri.
- des puits de 7 mm de diamètre sont creusés dans la gélose, chaque puit est rempli par 100 µl du surnageant brut de la culture lactique à tester.
- les boites sont placées à 4°C pendant 1 heure puis incubées pendant 24 h à 37°C.
- Les puits entourés d'une zone claire d'inhibition de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 8 mm sont considérées comme positive.