



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بو عريريج
Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi B.B. A
كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences
قسم العلوم البيولوجية de la Terre et de l'Univers
Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé :

Étude des interactions entre des bactéries lactiques et des
souches pathogènes : évaluation in vitro
des effets Bacteriocinogenes

Présenté par :

Melle Belazzoug Nour El-houda & Melle Lalami Wissem

Soutenu le __/06/ 2024, Devant le Jury :

Nom & Prénom	Grade	Affiliation / Institution
Présidente : Mme BOUGUERRA ASMA.....	MC- A.	Université de Bordj Bou Arreridj
Examinatrice : Mme ZERROUG AMINA.....	MC- A.	Université de Bordj Bou Arreridj
Encadrant : M. MERIBAI Abdelmalek	MC- A.	Université de Bordj Bou Arreridj

Année Universitaire 2025/2026

Remerciements

Avant tous, on remercie le Grand Dieu de nous avoir prêté vie et de nous donner la force, le courage, la sante et la patience le long de ce cycle universitaire.

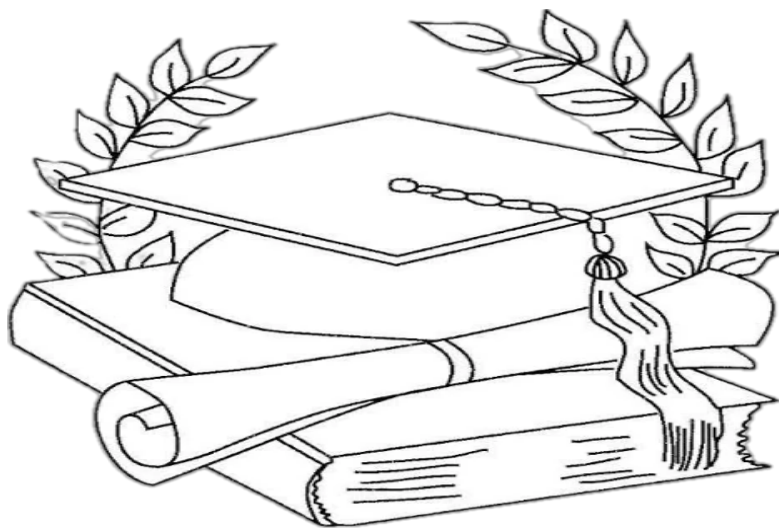
Je tiens à exprimer nos sincères remerciements à tous ceux qui nous ont soutenues et accompagnées tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous remercions tout particulièrement notre encadrant Dr. Meribai.A pour ses conseils avisés, sa patience et son soutien constant, qui ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail.

*Nos remerciements vont également aux membres du jury de soutenance:
Au Dr A. Bouguerra présidente de jury, de nous avoir fait l'honneur de présider le jury
A Mme A. Zerroug, d'avoir accepté d'examiné ce modeste travail.*

Nous remercions également notre famille bien-aimée pour son amour, ses encouragements continus et son soutien indéfectible tout au long de ce parcours.

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réussite de ce projet...



Dédicace

"Celui qui ne remercie pas les gens, ne remercie pas Dieu."

En signe de respect et de profonde gratitude, je dédie ce modeste travail à :

*À celui qui a toujours été mon soutien, qui m'a encouragé malgré toutes les épreuves,
Et qui a toujours tenu ma main sur le chemin,
Mon cher père Abd-elhamid, je te dois tant.*

*À celle qui m'a donné la vie, qui habite mon cœur par ses prières sincères,
À la source inépuisable de tendresse et de générosité,
Ma chère mère Sabira, que Dieu te récompense pour tout.*

*À mon cher fiancé, Younes Kerrache merci pour ton soutien qui a été mon
réconfort et mon appui à chaque étape de ce parcours.*

À mes sœurs bien-aimées, je vous remercie profondément pour votre précieux soutien.

À mon frère Hamza, dont l'appui constant a été pour moi une source de force.

*À tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'accomplissement de ce travail,
Et à tous ceux qui me sont chers et que je n'ai pas cités,
Recevez ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.*

Nour El-houda



Dédicace

*À la meilleure de toutes les mamans,
Celle qui m'a soutenue, encouragée et accompagnée durant toutes ces années d'études.
Merci pour ton amour infini, ta bienveillance de chaque instant,
Ta patience, ton courage et tes sacrifices silencieux.
Tu m'as appris la valeur du travail, le respect, et la force de continuer même dans les
moments les plus difficiles.
Ce mémoire est aussi le tien.
À mes frères, mes grands-parents, et tous ceux qui ont partagé avec moi les moments
d'émotion, de doute et de joie pendant ce parcours.
Merci pour votre présence, votre chaleur et vos encouragements sincères.
À toute ma famille, mes proches,
Et à ceux qui me donnent de l'amour, de la force et de la volonté.
À tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de
Succès.
À tous ceux que j'aime, Merci.*

Wissem



Sommaire

Abstract

Résumé

ملخص

Liste des abréviations

Liste de figures

Liste des tableaux

1. Introduction	01
2. Matériel et Méthode	03
2.1. Matériel et machines.....	03
2.1.1. Matériel et milieux de cultures, récifs et produits chimiques	03
2.1.2. Matériel biologique	03
a. Souches indicatrices	03
b. Souches lactiques (Bacteriocinogene).....	03
2.2. Méthodes.....	03
2.2.1. Exploration des effets bacteriocinogene des bactéries lactiques	03
A. Réactivation des souches lactiques	03
1) Réactivation des lactobacilles sur MRS	03
2) Réactivation des lactocoques sur M17.....	03
A.1.1. Inspection macroscopique	03
A.2.2. La coloration de Gram.....	04
B. Réactivation des souches indicatrices	04
1) Souches Gram négatif sur boillon nutritif.....	04
2) Souches Gram positif sur boillon cœur crevalle.....	04
2.2.2. Isolement des souches lactiques	04
2.2.3. Réalisations des interactions	04
2.2.4. Caractère biochimiques, morphologiques et culturels des LAB.....	06
2.2.4.1. Caractères biochimiques	06
a) Test catalase	06
b) Production des gaz	06
2.2.4.2. Caractères physiologiques	06
a) Croissance différentes températures	06
b) Production dioxyde de carbone	07
3. Résultat.....	08

3.1. Purification et isolement des souches lactiques et les souches	
Indicatrices (SI).....	08
3.1.1. La purification des souches lactiques.....	08
a) La purification des lactobacilles.....	08
b) La purification des lactocoques	08
3.1.2. La purification des souches indicatrices.....	08
3.1.3. Étude des caractère morphologiques et culturaux.....	09
3.1.3.1. Aspecte macroscopiques des lactobacilles.....	09
a) Sur milieu MRS solide.....	09
b) Sur milieu MRS liquide.....	10
3.1.3.2. Aspecte macroscopique des lactocoques.....	10
a) Sur milieu M17 solide.....	10
b) Sur milieu M17 liquide.....	11
3.1.3.3. Aspecte microscopique.....	11
a) Observation à l'état frais.....	11
b) Coloration à bleu méthylène.....	12
c) Coloration de Gram.....	12
3.2. Antagonisme des LAB conter certaine souches indicatrices.....	13
3.3. Les tests.....	19
3.3.1. Teste catalase.....	19
3.3.3. Production de CO2.....	20
3.3.3. La croissance à différent température.....	21
4. Discussion	22
5. Conclusion	28

Références bibliographiques.

Annexe.

Abstract

The study aimed at the evaluation of bacteriocinogenic effects for 12 lactic strains (LAB), initially isolated from fermented table olives collected in Algeria (6 *Lactococcus* on M17+ and 6 *Lactobacillus* on MRS media). After revivification, purification, and identification, such as lactococci and lactobacilli, strains were partially identified, by conventional bacteriological methods, at the genus level (because of logistics). The antagonism of isolates leads, *in vitro*, on bacteriological Muller Hinton medium, directed against target positive and negative Gram strains. Conducted by two different methods: diffusion on soaked disks and diffusion on agar wells. Results showed that among LAB strains, isolates were bacteriocinogenic, with bactericidal effects directed much more against Gram (+) target strains, with inhibition areas (I.A.). By discs: *Klebsiella sp.*, I.A. measured respectively (Lb1 40 mm, Lb2 58 mm, Lb3 36 mm, Lb4 38 mm). *Listeria sp.* (32 mm) *Salmonella sp.* (29 mm). LB4 *Staphylococcus sp.* (17 mm). LB2 *Listeria sp.* (49 mm). LB2 *Staphylococcus sp.* (28 mm). LC3 and *Klebsiella sp.* (50 mm) and LC1 *Salmonella sp.* (50 mm). By wells, inhibition areas, as follows: LB2 *Staphylococcus sp.* (15 mm), LB2 *Enterococcus sp.* (20 mm). Lab: LB2 (25 mm), LB3 (55 mm), LB4 (32 mm). And for LC (LC1 and LC2), *Klebsiella sp.* (45 mm and 25 mm), respectively. Considered as a strain having inhibited (by bactericidal effect) the growth of the siderophores—indicators with a positive Gram. For both methods, the antagonism results appear to be LAB strain dependent and are not extrapolable/transposable. The best method for exploring antagonism seems to be that of discs.

Keywords : Identification, Interaction, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, Purification.

Résumé

L'objectif de l'étude vise l'évaluation des effets bacteriocinogènes pour 12 souches lactiques (LAB), initialement isolées des olives de table noires d'Algérie (6 Lactocoques sur M17+ 6 Lactobacilles sur MRS), cryoconservées. Après revivification, purification l'identification souches *Lactococcus* et *Lactobacillus* par méthodes bactériologiques classiques s'est abolie au niveau du genre (cause de logistique). L'antagonisme des isolats, conduit *in vitro*, sur milieu gélose Muller-Hinton, dirigé contre souches indicatrices à Gram positif et négatif, par deux méthodes : (celle de diffusion sur disque, diffusion sur puits creusés). Les résultats ont donné des souches LAB, bacteriocinogènes, avec effets bactéricides, dirigées beaucoup plus contre les S.I. à Gram (+), avec zones d'inhibition (Z.I) : Par disques : *Klebsiella sp*, contre (Lb1=40mm, Lb2=58mm, Lb3=36mm, Lb4=38mm), contre *Listeria sp* (32mm), *Salmonella sp* (29mm). Entre Lb4 et *Staphylococcus sp* (17 mm), entre Lb2 et *Listeria sp* (49 mm) et *Staphylococcus sp* (28 mm). Entre LC3 et *Klebsiella sp* (50 mm) et LC1 contre *Salmonella sp* (50mm). Sur les puits, les résultats des zones d'inhibitions étaient : Lb2 contre *Staphylococcus sp* (15mm), Lb2 contre *Enterococcus sp* (20mm). Large spectre bactéricide. Contre *Klebsiella sp* LAB : Lb2(25mm), Lb3(55mm), Lb4(32mm). Pour les Lc (Lc1 et Lc2) contre *Klebsiella sp* (45mm et 25mm). Pour les deux méthodes, les résultats d'antagonisme semblent souches LAB dépendantes et ne sont pas transposables. La meilleure méthode pour l'exploration d'antagonisme semble être celle des disques.

Mots clés : Cryoconservation, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, Purification, Interaction

هدف الدراسة هو تقييم التأثيرات الناتجة عن إنتاج المواد المثبطة للبكتيريا (البكتيريوسينات) من قبل 12 سلالة من البكتيريا اللبنية، تم عزلها مبدئيًا من الزيتون المصبر في الجزائر. تتكوّن هذه السلالات من ست سلالات من المكورات اللبنية تُميت على وسط تغذية خاص، وست سلالات من العصيات اللبنية تُميت على وسط غذائي مختلف، وقد تم حفظها سابقًا بطريقة الحفظ بالتجميد. بعد الإحياء والتنقية، جرى التعرف على السلالات وتأكيد انتمائها إلى الجنس المكون المكورات اللبنية والعصيات اللبنية باستخدام طرق بكتريولوجية تقليدية، إلا أن التعرف اقتصر على مستوى الجنس فقط نتيجةً لقيود لوجستية. تم اختبار النشاط التثبيطي لهذه السلالات في ظروف مخبرية، باستخدام وسط زراعي مناسب، ضد مجموعة من السلالات المستهدفة موجبة وسالبة لصبغة غرام، وذلك باستعمال طريقتين مختلفتين: طريقة الانتشار بواسطة أقراص ورقية مشبعة، وطريقة الانتشار عبر أبار محفورة في الوسط الصلب. أظهرت النتائج أن جميع السلالات اللبنية (الست من العصيات اللبنية والست من المكورات اللبنية) كانت قادرة على إنتاج مواد مثبطة للبكتيريا، وكان تأثيرها أقوى تجاه السلالات موجبة غرام، وفقًا لما يلي من مناطق تثبيط: ضد بكتيريا كليبسيلا: العصيات اللبنية 1 (40 ملم)، 2 (58 ملم)، 3 (36 ملم)، 4 (38 ملم)، ضد ليستيريا: 32 ملم (للعصية 4)، ضد سالمونيلا: 29 ملم (للعصية 4)، ضد العنقودية: 17 ملم (للعصية 2)، ضد ليستيريا: 49 ملم، وضد العنقودية: 28 ملم (للمكورة 3)، ضد كليبسيلا وسالمونيلا: 50 ملم (للمكورة 1). وباستخدام طريقة الأبار: العصية 2 ضد العنقودية: 15 ملم، العصية 2 ضد المعوية: 20 ملم، بكتيريا كليبسيلا كانت حساسة لـ: العصية 2 (25 ملم)، العصية 3 (55 ملم)، العصية 4 (32 ملم)، المكورة 1 والمكورة 2 ضد كليبسيلا: 45 ملم و25 ملم على التوالي. تشير هذه النتائج إلى أن السلالات المدروسة تملك قدرة على تثبيط نمو البكتيريا المستهدفة، لا سيما موجبة غرام، من خلال إفرازها لمواد ذات تأثير قاتل للبكتيريا، وقد تبين أن طريقة الانتشار بواسطة الأقراص الورقية المشبعة هي الأكثر فعالية في الكشف عن هذا النشاط التثبيطي.

الكلمات المفتاحية: الحفظ بالتجميد، العصيات اللبنية، المكورات اللبنية، الإحياء، التنقية

Liste des Abréviations

Liste des Abréviations

ATB : Antibiotique

BBA : Bordj Bou Arreridj

BN : Bouillon nutritif

Bt :Batonnêt.

Cc : Cocci.

CO₂ : Dioxyde de carbone

E. coli : *Escherichia Coli*.

K. pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*

E. aerogenosa : *Enterobacter aerogenes*

S. enterica : *Salmonella enterica*

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

E. faecalis : *Enterococcus faecalis*

S. epidermidis : *Staphylococcus epidermidis*

S. pyogenes : *Streptococcus pyogenes*

EFSA FEEDAP: European Food Safety Authority Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed.

ATCC: American Type Culture Collection.

EMP : Embden-Meyerhof-Parnas (voie métabolique)

FDA : Food and Drug Administration.

FSNV : Faculté des sciences de la nature et de la vie

GLU: Glucose.

Gx100 :Grosissement fois 100.

HFM : Homofermentaires

IND : Indole.

kDa : kilo Dalton.

L. : Lactobacillus

LAB : Lactic Acid Bacteria (Bactéries lactiques)

Lb : Lactobacilles

Lc : Lactocoques

LDC : Lysine Décarboxylase.

M17 : Milieu M17 Gélose pour les lactocoques.

Man : Mannose-fructose-sorbose (famille de transporteurs)

MH : Mueller-Hinton

MRS : De Man, Rogosa, Sharpe Gélose pour les lactobacilles.

ODC :Orthinine Décarboxylase.

OMS : Organisation mondiale de santé.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

S. Paratyphi : *Salmonella paratyphi*.

SAM : Société Algérienne de Microbiologie.

SBA : Surnageant Brut Actif

Liste des Abréviations

PCR-RT : Réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse

SI: Souches Indicatrices

T : Témoin.

TR : Type Respiratoire.

UFC : Unité Formant Colonie

V/V : Volume/Volume

ZI : Zone d'inhibitions

Liste de figures :

Figure 1 : Aspects des lactobacilles après purification sur gélose MRS.	8
Figure 2 : Aspects lactocoque après purification sur gélose M17.	8
Figure 3 : Aspects des souches indicatrices sur milieu GN	9
Figure 4 : Aspect des colonies-A) Lb1- B) Lb2- C) Lb 3.	10
Figure 5 : Aspect cultures un milieu MRS liquide (La sédimentation des lactobacille).....	10
Figure 6 : Aspects des colonies lactocoque sur milieu M17.....	11
Figure 7 : Aspects culture lactocoque sur M17 liquide.	11
Figure 8 : vue microscopique l'état frais	12
Figure 9 : vue microscopique -A) souche lactique lactobacille-B) lactocoque après coloration au bleu de méthylène (100x)	12
Figure 10 : Vue microscopique-A) Lactocoque- B) Lactobacille (100x).	13
Figure 11 : Histogramme des effets du lactobacillus sur défèrent S.I.....	14
Figure 12 : Résultat Antagonisme des lactobacilles conter des souches indicatrices :	14
Figure 13 Histogramme des effets des lactocoques sur différentes S.I	15
Figure 14 : Résultat Antagonisme des lactocoques conter des SI :	16
Figure 15 : histogramme des effets des lactobacillus sur défèrent SI.	17
Figure 16 : résultat Antagonisme des lactobacilles conter des SI.....	17
Figure 17 : histogramme des effets des lactocoques sur défèrent SI.....	18
Figure 18 : Résultat Antagonisme des lactocoques conter des SI.....	19
Figure 19 : Résultat de test catalase pour les LAB A) Lactobacille B) Lactococcus	20
Figure 20 : résultat de test production CO2 A) Lactobacille B) Lactocoque	21
Figure 21 : résultat de croissance à défèrent températures de souches lactiques	21

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Antagonisme des lactobacilles conter certaines S.I.....	14
Tableau 2 : Antagonismes lactocoques conter souches S.I à G⁻	15
Tableau 3 : Antagonismes lactobacilles conter certaine S.I à G⁺	16
Tableau 4 : Antagonismes lactocoques conter certaine SI.	18
Tableau 5 : les observations microscopiques et les résultats de test catalase effectuées sur les souches sélectionnées.	20
Tableau 6 : résultat de production CO2	20

Introduction

Introduction

Il existe des souches de bactéries lactiques qui sont bénéfiques pour la santé humaine. Ces organismes ont la capacité de persister dans le tractus intestinal humain, voire de le coloniser, ce qui leur permet de jouer un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre de la flore intestinale. Grâce à ces propriétés, certaines souches sont aujourd'hui utilisées dans le traitement des diarrhées et d'autres troubles digestifs.

Des recherches récentes ont mis en évidence des caractéristiques immunostimulantes chez certaines souches, capables notamment d'atténuer les réactions allergiques alimentaires, en particulier celles liées aux protéines du lait (Salminen & Wright, 1998). En parallèle, l'utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs vivants pour l'administration orale de vaccins représente un domaine de recherche innovant et prometteur (Szatraj et al., 2017 ; Le Cureux & Dean, 2018).

Sur le plan de la sécurité alimentaire, les traitements thermiques tels que l'autoclavage, la pasteurisation, la fermentation ou encore la congélation sont généralement appliqués pour prolonger la durée de conservation des aliments. Toutefois, ces méthodes peuvent avoir un impact négatif sur les qualités nutritionnelles et organoleptiques des produits. Par ailleurs, malgré les efforts d'hygiène et de conservation, des intoxications et infections alimentaires persistent, causées par des bactéries pathogènes d'origine alimentaire, telles que *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sp. et *Salmonella* sp. (Sindi et al., 2020).

Dans ce contexte, l'intérêt pour les bactéries lactiques s'est élargi au-delà de leur rôle fermentaire et probiotique. En effet, elles sont aujourd'hui reconnues pour leur potentiel antimicrobien, notamment à travers la production de composés tels que les bactériocines, les acides organiques, et le peroxyde d'hydrogène. Ces mécanismes confèrent aux BAL une capacité naturelle à inhiber ou à réduire la croissance des agents pathogènes, ce qui ouvre la voie à leur utilisation comme agents de biocontrôle dans l'industrie agroalimentaire.

En Algérie, les recherches sur l'antagonisme des bactéries lactiques d'origine végétale, en particulier celles isolées à partir d'olives de table, restent limitées. Pourtant, les olives représentent une source fermentée riche en souches potentiellement intéressantes du point de vue biotechnologique et sanitaire.

Ainsi, la présente étude vise à évaluer *in vitro* les effets antimicrobiens (antagonismes) de souches de bactéries lactiques cryoconservées, initialement isolées à partir d'olives noires de table, vis-à-vis de diverses souches indicatrices à Gram positif et Gram négatif, elles-mêmes isolées de denrées alimentaires.

Pour atteindre cet objectif, plusieurs étapes expérimentales ont été réalisées :

- La revivification des souches lactiques et des souches indicatrices ;
- L'évaluation des interactions *in vitro* par la méthode des disques, puis par celle des puits ;
- La sélection et la caractérisation partielle des souches présentant un pouvoir inhibiteur.

Partie Expérimentale

Matériel et méthodes

1. Lieu de réalisation de la partie expérimentale

La présente étude a été réalisée au sein de laboratoire relevant de la Faculté Sciences de la Nature & de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

2. Matériel et méthode :

2.1. Matériel et machines

Voir l'Annexe I.

2.1.1. Matériel et milieux de cultures, réactifs et produits chimiques

Voir l'Annexe I.

2.1.2. Matériel biologique

a. Souches indicatrices.

a) Origine des souches indicatrices (tableau N°1) voir l'Annexe II.

b. Les souches lactiques (bacteriocinogenes).

b) Origine des souches lactiques (tableau N°2) voir l'Annexe II.

2.2. Méthodes

A. Réactivation des souches lactiques

1) Réactivation des souches lactobacilles sur MRS

Les souches de *Lactobacillus* ont été réactivées dans un bouillon MRS (Man Rogosa Sharpe) frais (De Man *et al.*, 1960). Pour ce faire, 9 ml de suspension bactérienne ont été inoculés dans 9 ml de bouillon MRS dans un tube stérile. Après une agitation manuelle douce pour assurer une homogénéisation complète, les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 24–48 heures, jusqu'à formation d'un coagulum visible (Annexe III).

2) Réactivation des souches lactocoques sur M17

Les souches *Lactococcus* ont été réactivées dans du bouillon M17 fraîchement préparé (Terzaghi & Sandine, 1975). Pour chaque culture, 9 ml de suspension cellulaire ont été inoculés dans un tube stérile contenant 9 ml de bouillon M17. Après une agitation douce pour homogénéiser le mélange, les tubes ont été incubés à 37 C° pendant 24 à 48 h, jusqu'à apparition d'un coagulum dense (voir Annexe III).

A.1.1. Inspection macroscopique

Ce procédé est fondé sur l'examen visuel des isolats cultivés sur un milieu MRS solide et liquide ; afin de décrire la dimension, la forme et la teinte des colonies présentes sur le milieu MRS solide (Badis *et al.*, 2005). Et la perturbation dans le fluide. L'examen à grande échelle

nous a donné l'occasion d'observer le diamètre, la coloration et l'apparence des colonies. (Hassaine.O, 2013).

A.2.2. La coloration de Gram

Est une méthode traditionnelle de coloration en microbiologie. Elle offre la possibilité de différencier deux catégories de bactéries, à savoir les bactéries Gram négatives (G-) et les bactéries Gram positives (G+). Ces dernières présentent des différences liées à la structure de leur paroi, en particulier concernant l'épaisseur du peptidoglycane ou l'existence d'une membrane externe. (Larpen *et al.*, 1990).

B) Réactivation des souches indicatrices (SI)

1) Souches Gram négatif sur boillon nutritif

Les souches indicatrices (SI), d'origine alimentaire, ont été enrichies dans tube stérile contenant 5 ml milieu liquide : le bouillon nutritif (BN). Après incubé à 37 C° pendant 24 à 48 h. (voir Annexe III).

2) Souches Gram positif sur boillon cœur crevalle

Les souches indicatrices (SI), impliquées dans altération des aliments, ont été enrichies dans tube stérile contenant 9ml milieux liquides : le bouillon cœur cervelle (BCC). Après incubations à 37C° pendant 24 à 48 h.

2.2.2. Isolement des souches lactiques

Les souches lactiques réactivées sont purifiées en les ensemencant par stries sur des milieux gélosés MRS et M17, suivis d'une incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures. Cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une culture pure, présentant une morphologie bactérienne homogène, permettant d'observer leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques, telles que leur taille, leur forme et leur couleur des colonies.

2.2.3. Réalisation des interactions

Pour évaluation de l'activité antimicrobienne des souches lactiques réactivées, dirigée contre les souches indicatrices à Gram (-) et Gram (+), nous avons utilisé la gélose MH comme support d'interaction (Boukhatem *et al.*, 2014; J. Tagg & McGiven, 1971; J. R. Tagg, Read, R. S., & Mc Given, A. R. , 1973).

Pour la réalisation des interactions, nous avons utilisé des souches alimentaires et/ou des souches d'altération des aliments à Gram négatif : (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Salmonella* sp, *Pseudomonas* sp) puis des souches à Gram positif (*Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Bacillus* sp., *Listeria* sp.).

On utilise méthode de division sur agar :

1) Par les disques

Après une revivification des souches alimentaire pendant 24 heures, 1 ml de chaque culture a été étalé sur des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture Mueller-Hinton (MH). Les boîtes ont été laissées à température ambiante pendant 30 minutes afin de permettre une diffusion homogène des bactéries sur toute la surface du milieu.

Chaque boîte a ensuite été divisée en quatre quadrants. Dans chaque quadrant, un disque de papier filtre stérilisé (préparé à l'avance et stérilisé à l'autoclave) a été placé. Trois disques superposés ont été utilisés afin d'assurer une bonne absorption. À l'aide d'une micropipette, 20 µL d'un surnagent brute active des bactéries lactiques (*Lactococcus* spp. et *Lactobacillus* spp.) ont été déposés sur chaque disque.

Les boîtes ont été de nouveau laissées au repos pendant 30 minutes pour permettre une pré-diffusion, puis incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures

2) Par les puits

La même méthode mais après la solidification du milieu, quatre puits également espacés ont été creusée au centre de la boîte Pétri à l'aide d'un poinçon stérile (pipette pasteur). Chaque puits a été chargé avec 20 µL de la surnagent brute active.

Les boîtes ont été de nouveau laissées au repos pendant 30 minutes pour permettre une pré-diffusion, puis incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

L'apparition de zones d'inhibition autour des disques a été ensuite observée pour évaluer l'activité antimicrobienne des souches lactiques.

- Un antagonisme est considéré comme positif lorsqu'un halo clair apparaît autour des souches de *Lactobacilles* et de *Lactocoques*, avec un diamètre supérieur à 2 mm (Abeet *et al.*, 1995 ; Guessas, 2007). Les zones d'inhibition (Zi) ont été mesurées en millimètres selon la formule suivante :

$Zi \text{ (mm)} = \text{Diamètre total de la zone inhibitrice} - \text{Diamètre du disque (6 mm)}$ (Bentoura *et al.*, 2017).

Les résultats sont interprétés selon la classification suivante (Siroli *et al.*, 2017) :

- Zi > 16 mm : ++++
- Zi > 10 mm : +++
- Zi entre 6 et 10 mm : ++
- Zi entre 3 et 6 mm : ++
- Zi entre 1 et 3 mm : +
- Aucune inhibition : -

- Sélection des souches LAB bacteriocinogènes

Uniquement les souches lactiques ayant donné des résultats (+) effets inhibiteurs bacteriocinogène contre les souches indicatrices, on fait objet à des caractérisations macroscopiques, microscopique et culturelle.

A ce titre il est à rappeler que l'identification des souches LAB bacteriocinogènes, s'est abolie au rang de genre.

2.2.4. Caractère biochimiques, morphologique et culturels des LAB

2.2.4.1 Caractères biochimiques

a) Teste de catalase

L'enzyme catalase joue un rôle dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Lorsqu'une goutte de H_2O_2 est déposée sur une lame contenant une colonie prélevée à partir du milieu MRS, une réaction est observée, se manifestant par un dégagement gazeux sous forme de mousse et de bulles, ce qui indique la décomposition du peroxyde d'hydrogène (Delarras, 2007 ; Guiraud, 2003 ; Marchal *et al.*, 1991).

b) Production de gaz

Production de gaz Ce test catégorise les bactéries selon leur mode de fermentation : homofermentaires (HFM) et hétérofermentaires (HTM). On inocule des éprouvettes de 9ml de bouillon MRS contenant une cloche de Durham avec une colonie distincte, puis on les incube à 37°C pendant 48 heures. Suite à cette observation, on retient uniquement les souches de type bacillaire, Gram positif et catalase négative pour la poursuite de l'étude (Garvie, 1984).

2.2.4.2. Caractères physiologiques

a) Croissance à différentes températures

Ce test facilite la différenciation entre les lactobacilles thermophiles et mésophiles (Man *et al.*, 1960 ; Le veau *et al.*, 1991). On incube les cultures à diverses températures : 37 et 40°C, 4°C, -20°C pendant 48 heures dans du bouillon MRS. La croissance est évaluée par l'émergence d'un trouble en contraste avec un tube témoin sans ensemencement (Hassaine, 2013).

b) Production de dioxyde de carbone

Pour déterminer la production de CO_2 de la fermentation de glucose par les souches de *Lactobacillus*, nous avons ensemencé des colonies d'une culture pure dans le bouillon MRS contenant une cloche de Durham et incubé à 30°C pendant 24 à 48 h en aérobiose et

anaérobie. La présence de gaz dans la cloche indique qu'il y a production de CO₂ (Garvie, 1984).

Résultats

3. Résultats

3.1. Purification des souches lactiques (BL) et Indicatrices (SI)

3.1.1. La purification des souches lactiques (BL)

La purification des souches lactiques, des isolats a été récupérés de 12 échantillons (6 lactocoques et 6 Lactobacilles) conservait avant par Cryo protection. Les souches, après revivification, lactiques isolée par varié repiquages successifs sur milieux MRS et M17.

Les figures relatives se trouvent dans (l'annexes IV).

a) La purification de lactobacilles

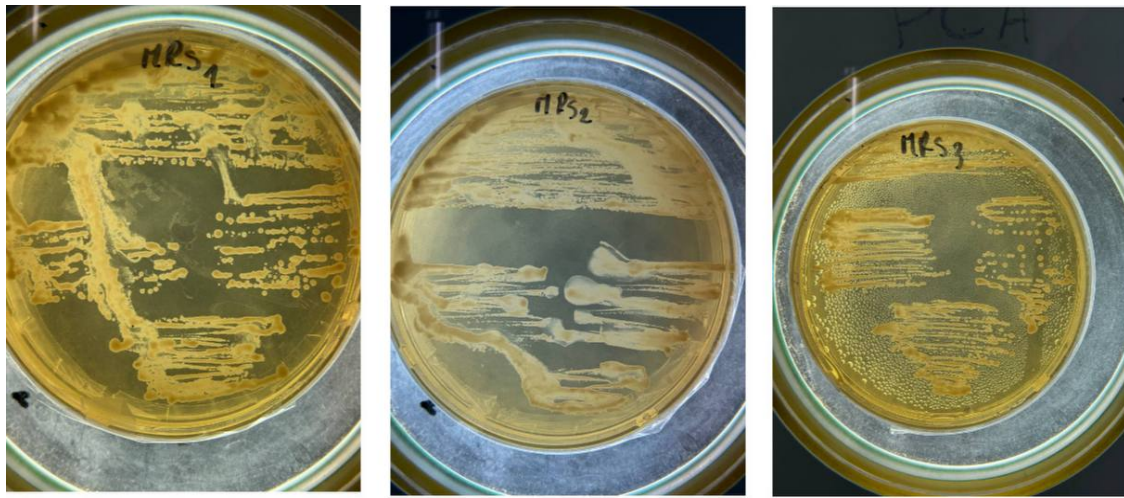


Figure 1 : Aspects des lactobacilles après purification sur gélose MRS.

b) La purification de lactocoques

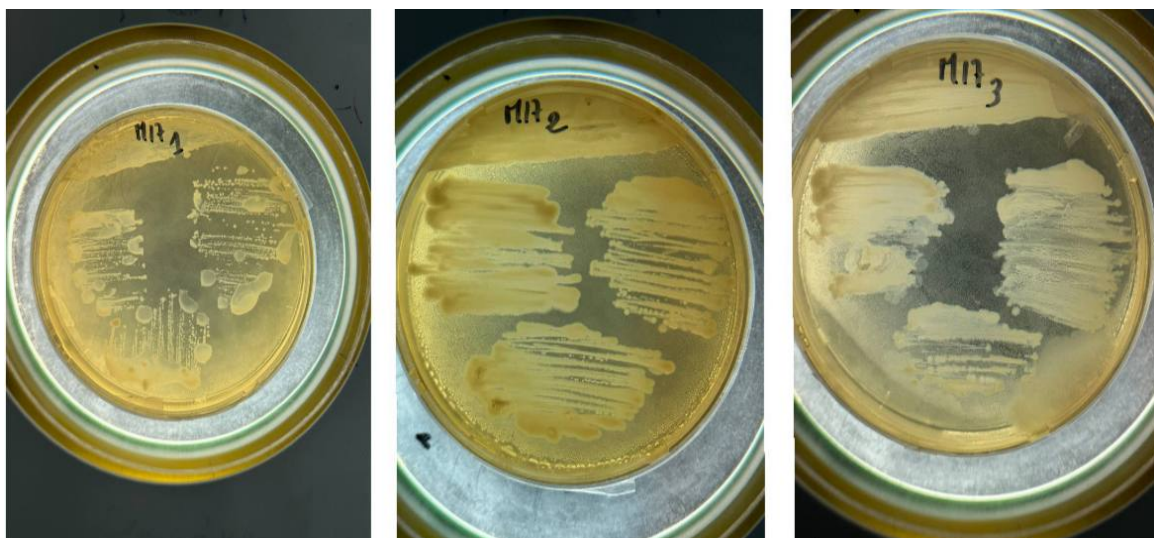


Figure 2 : Aspects lactocoque après purification sur gélose M17.

3.1.2. La purification des souches Indicatrices (SI)

Des colonies ont été récupérées à partir des souches indicatrices, après la revivification par plusieurs repiquages successifs sur milieu boillon nutritif (BN) a permis d'obtenir des isolats purs

Les figures restantes se trouvent dans (l'annexe IV).

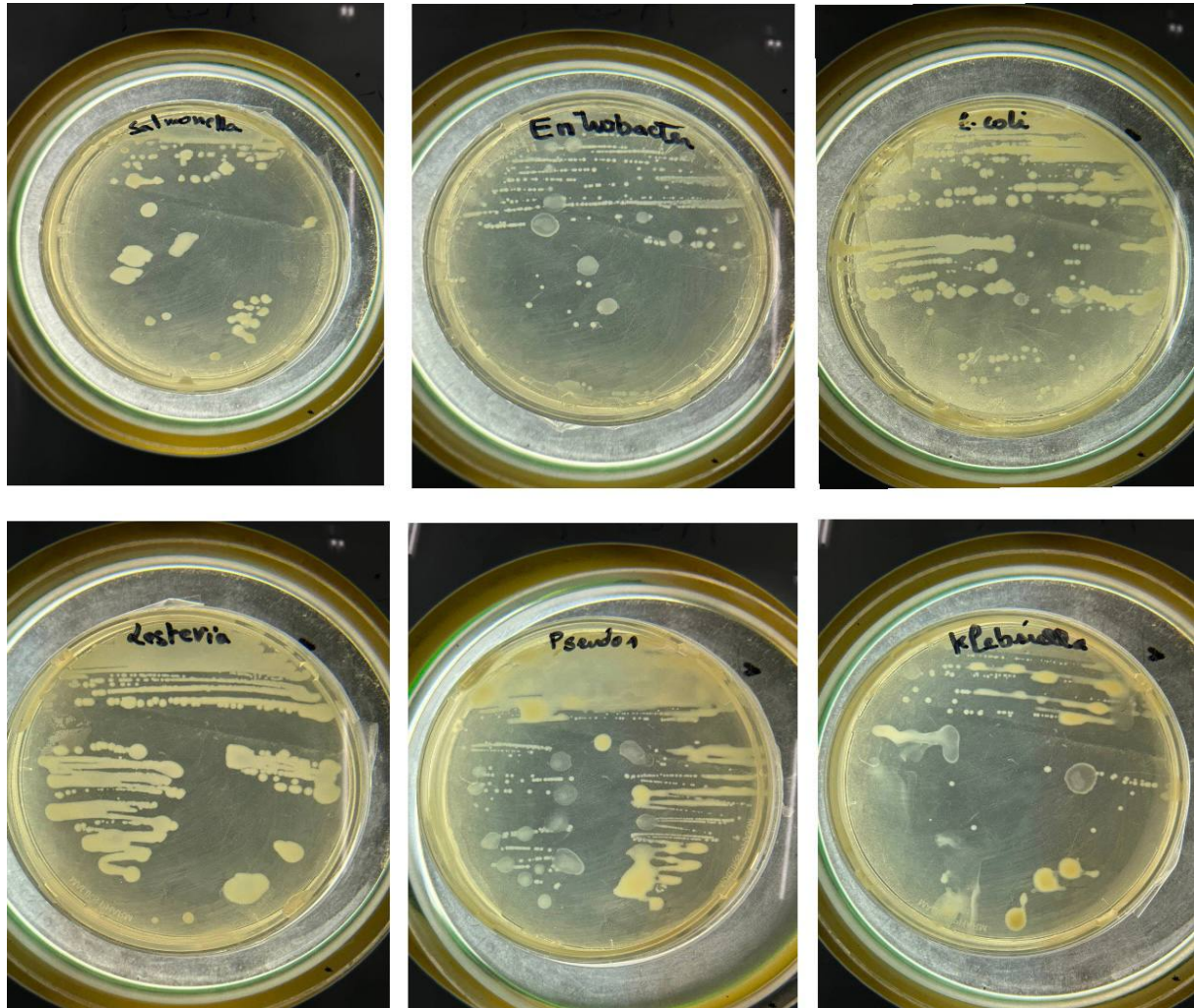


Figure 3 : Aspects des souches indicatrices sur milieu GN

3.1.3. Étude des caractères morphologiques et culturels

3.1.3.1. Aspect macroscopique des lactobacilles

a) Sur milieux MRS solide

L'aspect macroscopique a permis de décrire des colonies de lactobacilles sur milieux MRS solide sont généralement petites (1-5mm) avec des bords entiers, convexes, lisses, brillantes et souvent opaques sans pigment. Certaines colonies peuvent présenter une coloration jaunâtre en raison de la production de pigments caroténoïdes.

Certaines souches forment des colonies rugueuses. Les zones de lyse causées par des exo-enzymes ne sont généralement observées que lorsque les bactéries sont cultivées sur des milieux contenant des protéines ou des lipides.

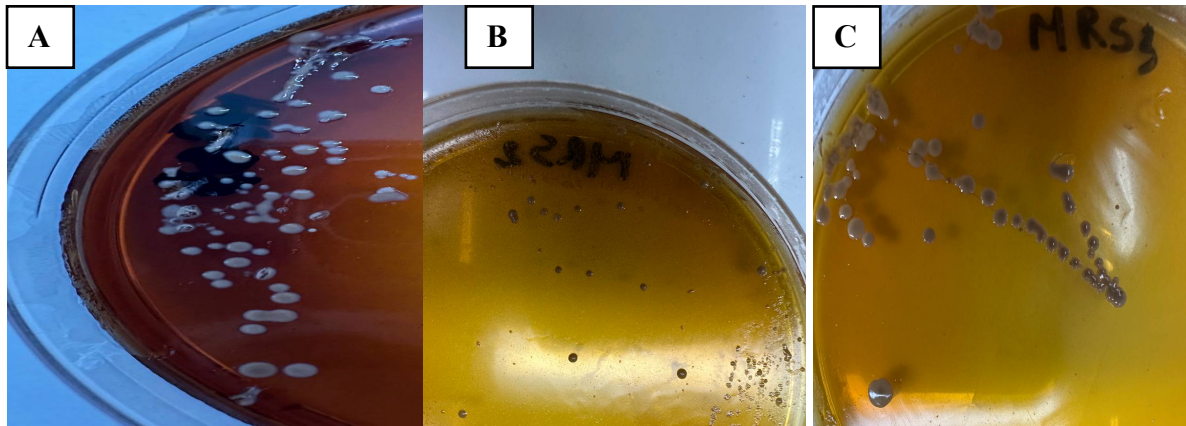


Figure 4 : Aspect des colonies-A) Lb1- B) Lb2- C) Lb 3.

b) Sur milieu MRS liquide

La En milieu liquide, la croissance se manifeste de manière homogène dans tout le volume. Cependant, les cellules se déposent rapidement après l'arrêt de la croissance Figure 5. Les sédiments sont généralement lisses et homogènes, et rarement granuleux ou visqueux. L'agrégation des cellules dans la culture pourrait être médiée par des facteurs de nature protéique.

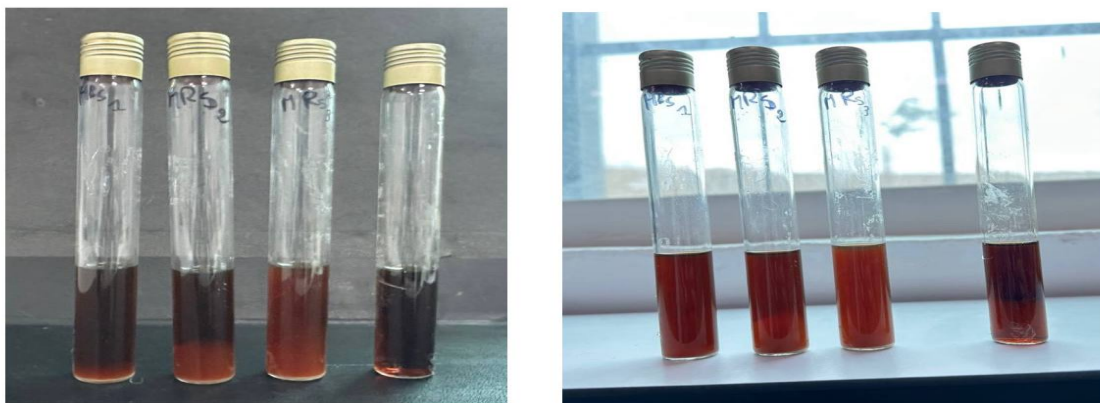


Figure 5 : Aspect cultures un milieu MRS liquide (La sédimentation des lactobacille).

3.1.3.2. Aspect macroscopique lactocoques

a) Sur milieu M17 solide

Les colonies de lactocoques se présentent généralement sous forme de petites à moyennes, rondes, aux contours bien définis. Leur surface est lisse, avec une texture uniforme. Elles sont le plus souvent opaques, de couleur blanche à crémé.

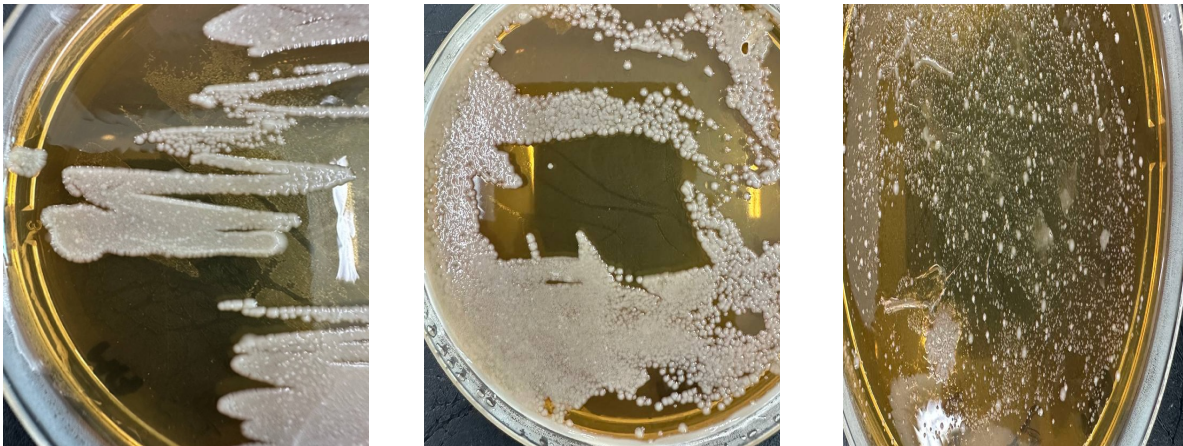


Figure 6 : Aspects des colonies lactocoque sur milieu M17

b) Sur milieu M17 liquide

Lactococcus présente un aspect macroscopique caractéristique d'une croissance homogène. Après incubation, le milieu devient trouble, signe de la multiplication des bactéries dans l'ensemble du liquide.

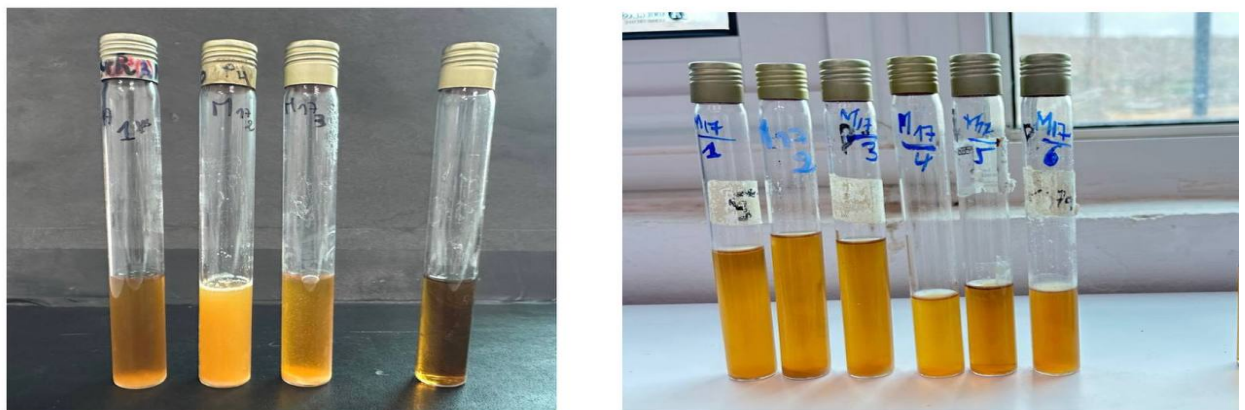


Figure 7 : Aspects culture lactocoque sur M17 liquide.

3.1.3.3. Aspect microscopique

L'observation microscopique repose sur la coloration de Gram, qui a révélé une morphologie cellulaire de type bacille, parfois coccobacille, avec une coloration violette caractéristique des bactéries à Gram positif. Le mode d'association cellulaire varie selon les souches observées. Ces données morphologiques et structurales permettent une première classification des isolats en fonction de leur réaction à la coloration de Gram, de leur forme Cellulaire et de leur agencement.

a) Observation à l'état frais

Observation en état brut. L'examen microscopique à l'état frais révèle des isolats qui sont purs, immobiles et parfois disposés en longues chaînes. (Annex V)

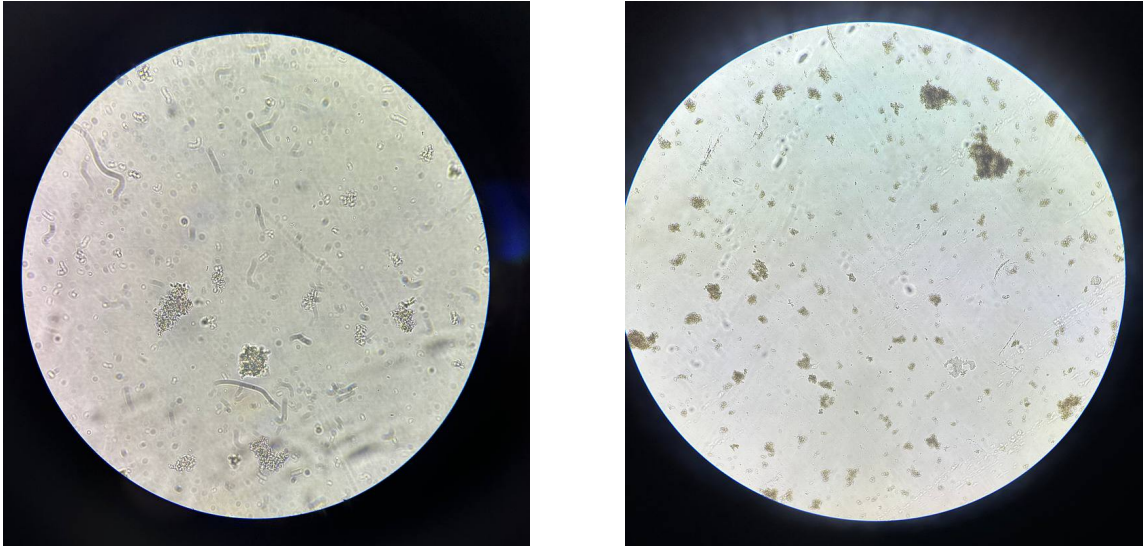


Figure 8 : vue microscopique l'état frais

b) Coloration au bleu de méthylène

À l'observation microscopique du frottis bactérien a révélé la présence de lactobacilles, sous forme de bâtonnets bleus, isolés ou regroupés en courtes chaînettes, parfois disposés en forme de V.

En parallèle, des Cocci, correspondant aux critères morphologiques attendus, ont été observés formant des chaînettes de longueur variable. (Annex V)

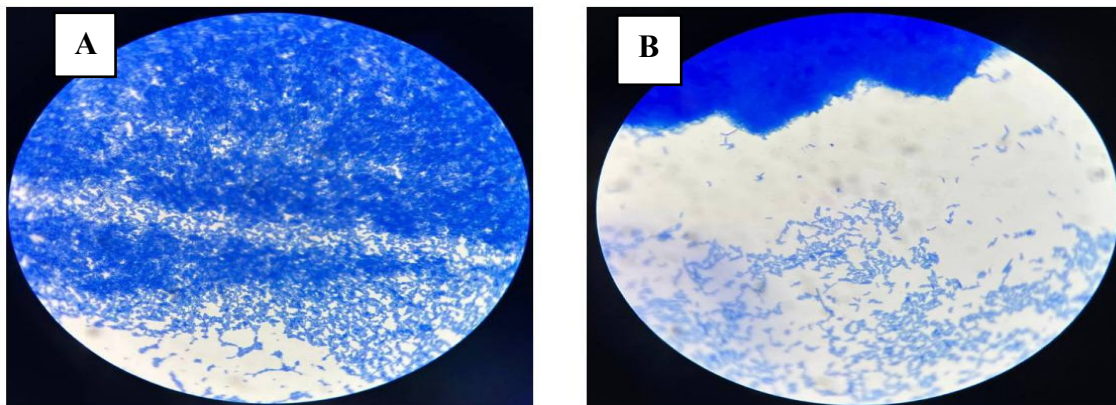


Figure 9 : vue microscopique -A) souche lactique lactobacille-B) lactocoque après coloration au bleu de méthylène (100x)

C) Coloration de Gram

Les isolats ont répondu, positivement à la coloration de Gram (violette). La figure 10 montre des lactobacilles isolés, courtes chaînettes. De même, les lactocoques présentés dans la figure 10, ont répondu, Positivement à la coloration de Gram (violette).

Une fois que les isolats ont été colorés à Gram, on peut observer sous microscope des formes de cellules coques et bâtonnes de couleur violette. (Annex V)

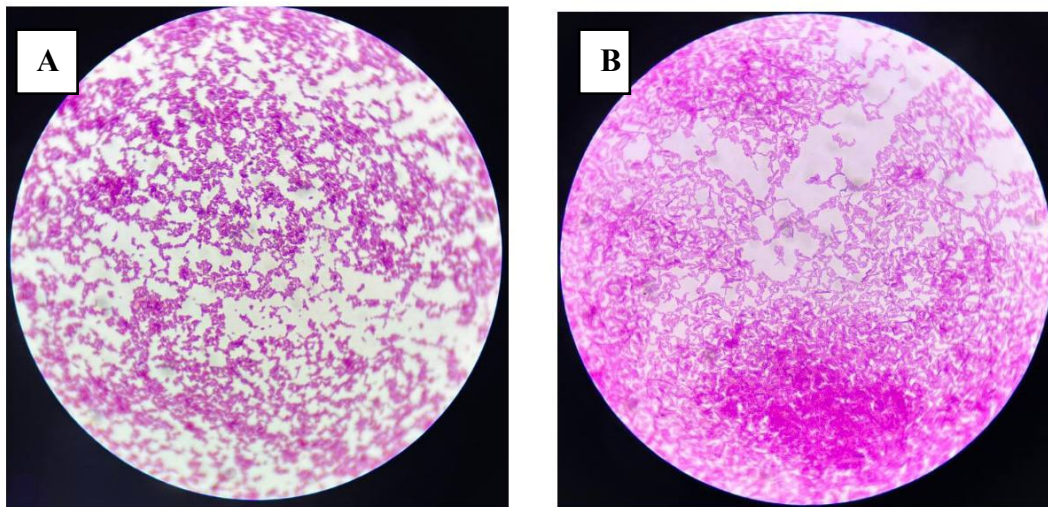


Figure 10 : Vue microscopique-A) Lactocoque- B) Lactobacille (100x).

3.2. Antagonisme des LAB contre certaines souches indicatrices

Les résultats obtenus mettent en évidence une activité antagoniste variable des bactéries lactiques (LAB) vis-à-vis de différentes souches indicatrices, pathogènes ou d'altération. Cette inhibition, mesurée par la formation de zones claires autour des puits d'inoculation sur milieux MRS et M17, reflète la capacité des LAB à produire des composés antimicrobiens actifs.

Par les disques

Les résultats en mm

- *Bacillus* sp conter Lc4 = 10mm
- *Salmonella* sp conter Lb4= 29mm, Lb5= 09mm, Lb6= 06mm
Lc4=50mm, Lc6=08mm
- *Lesterai* sp conter Lc2=09mm, Lc4=49mm, Lc5=11mm
Lb1=16mm, Lb4=32mm, Lb5=06mm, Lb6=07mm
- *Pseudomonase* sp1 conter Lc5=06mm, Lc6=08mm
Lb2=06mm, Lb4=06mm, Lb5=07mm, Lb6=08mm
- *Staphylococcus* sp1 conter Lc4=28mm, Lc5=08mm
Lb2=17mm, Lb6=06mm
- *Klebsiella* sp conter Lc1=53mm, Lc4=40mm
Lb&=40mm, Lb2=58mm, Lb 3=36mm, Lb4=38mm
- *Enterococcus* sp conter Lb1=06mm, Lb2=08mm, Lb3=12mm
- *Enterobacter* sp conter Lb1=10mm
- *E. coli* conter Lb1=10mm

Tableau 1 : Antagonisme des lactobacilles contre certaines Souches indicatrices

S. I	Lactobacilles					
	Lb1	Lb2	Lb3	Lb4	Lb5	Lb6
Gram⁺						
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria</i>	-	++	-	++++	-	+
<i>Staphylococcus 1</i>	-	+++	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus 2.</i>	-	-	-	-	-	-
Gram⁻						
<i>Enterobacter</i>	+++	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas 1</i>	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i>	++	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	++++	++++	++++	++++	-	-
<i>Salmonella</i>	-	-	-	++++	+	-
<i>Pseudomonas 2</i>	-	-	-	-	-	-

Zone d'inhibition >16 (++++); entre 10 et 16 mm (+++); diamètre entre 6 et 10 mm (++); diamètre entre 3 et 6 mm (+); diamètre entre 1 et 3 mm (+); pas d'inhibition (-).

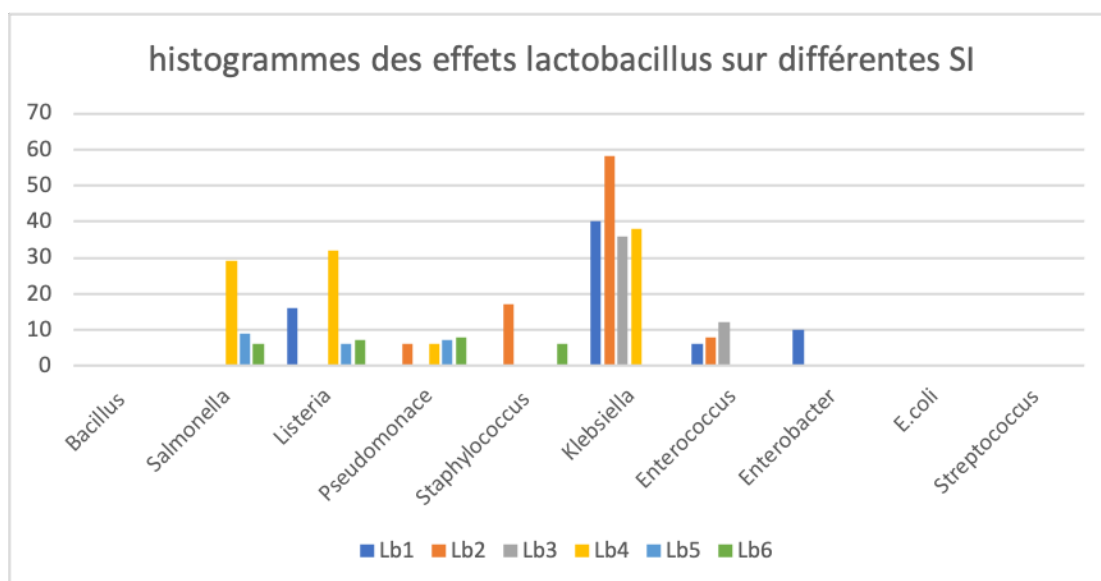


Figure 11 : Histogramme des effets du lactobacillus sur différentes Souches indicatrices

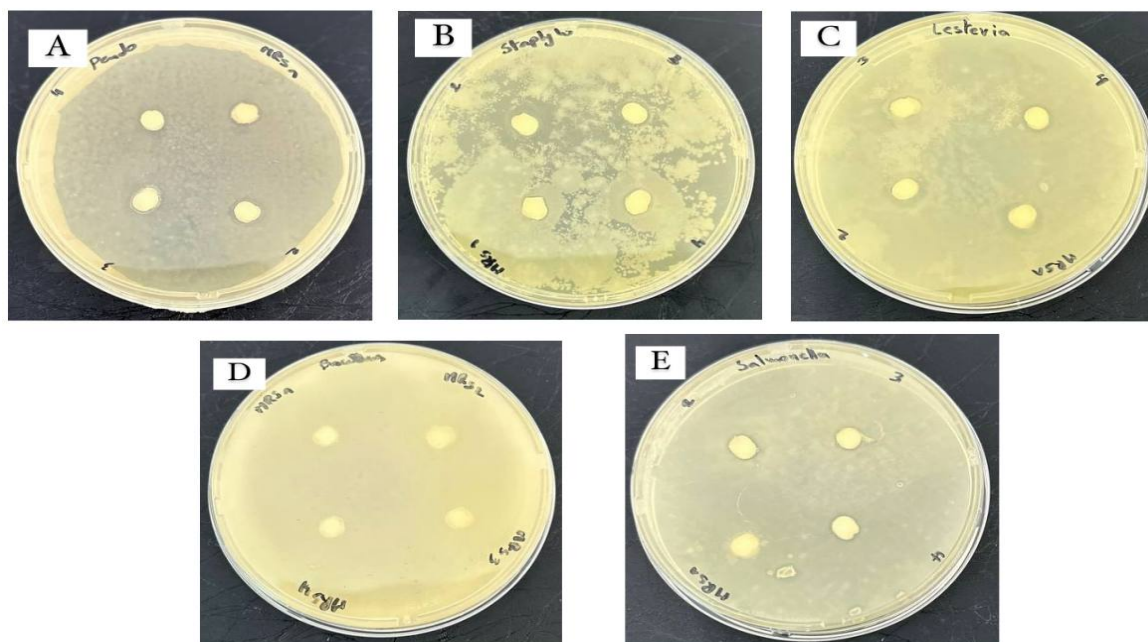


Figure 12 : Résultat Antagonisme des lactobacilles contre des souches indicatrices :
 A) *pseudomonas sp*, B) *staphylococcus sp*, C) *Listeria sp*, D) *Bacillus sp*, D) *salmonella sp*.

Tableau 2 : Antagonismes lactocoques contre souches indicatrices

S.I	Lactocoques					
	Lc1	Lc2	Lc3	Lc4	Lc5	Lc6
Gram⁺						
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria</i>	++	-	++++	-	++	-
<i>Staphylococcus 1</i>	-	-	-	++++	+	-
<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i>	++	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus 2.</i>	-	-	-	-	-	-
Gram⁻						
<i>Enterobacter</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas 1</i>	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	++++	-	-	++++	-	-
<i>Salmonella</i>	-	-	-	++++	-	+
<i>Pseudomonas 2</i>	-	-	-	-	-	-

Zone d'inhibition >16 (++++); entre 10 et 16 mm (+++); diamètre entre 6 et 10 mm (++); diamètre entre 3 et 6 mm (++); diamètre entre 1 et 3 mm (+); pas d'inhibition (-).

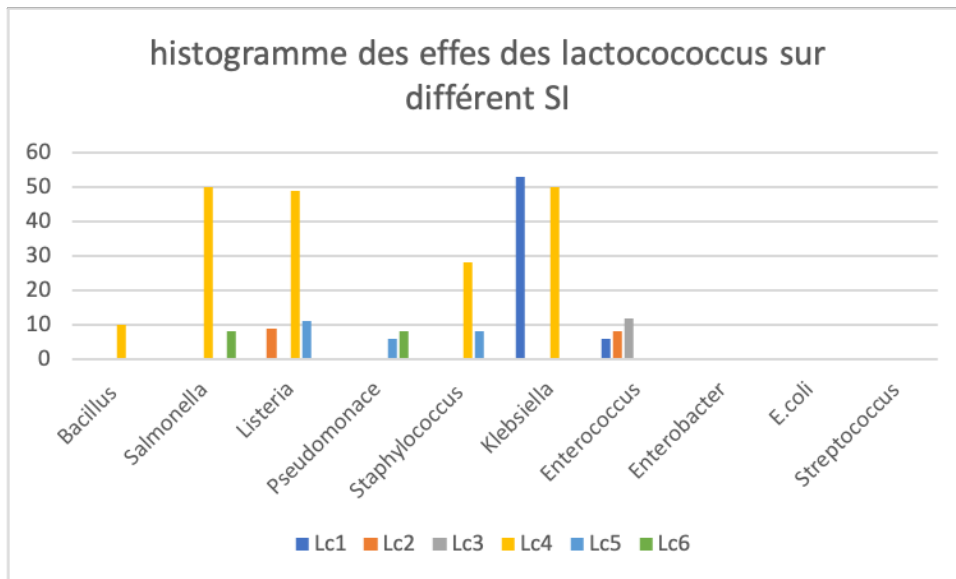


Figure 13 Histogramme des effets des lactocoques sur différentes souches indicatrices

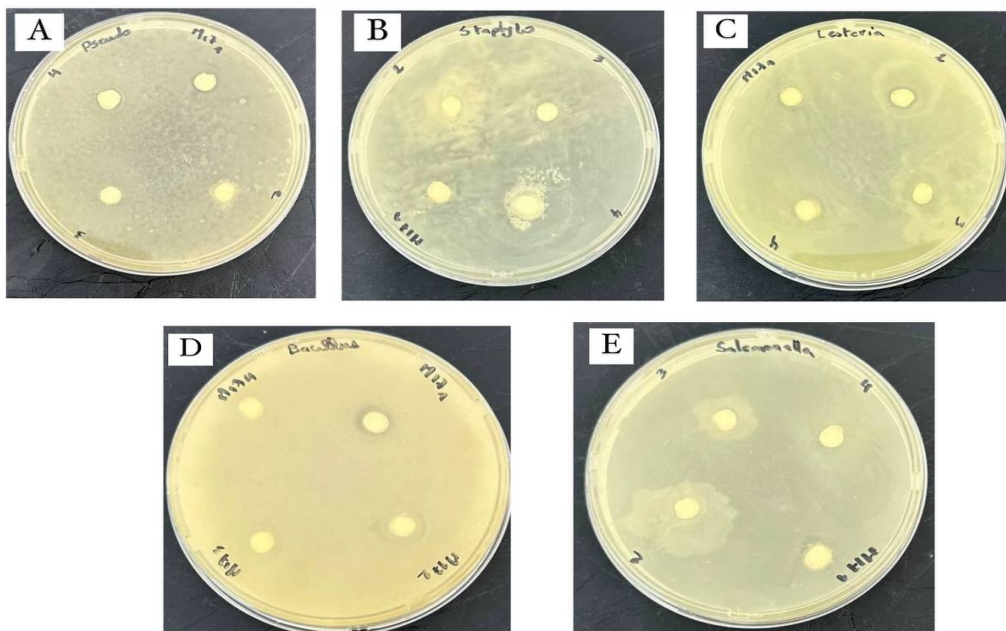


Figure 14 : Résultat Antagonisme des lactocoques contre des Souches indicatrices :
 A) *pseudomonas sp* B) *staphylococcus sp* C) *Listeria sp* D) *Bacillus sp* E) *salmonella sp*.

Par méthode des puits

Tableau 3 : Antagonismes lactobacilles contre certaine Souches indicatrices

SI	Lactobacillus			
	Lb1	Lb2	Lb3	Lb4
Gram⁺				
<i>Staphylococcus 1</i>	-	+++	-	-
<i>Enterococcus</i>	-	+++	-	-
Gram⁻				
<i>Enterobacter</i>	-	-	-	-

<i>Pseudomonas 1</i>	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	-	++++	++++	++++

Zone d'inhibition >16 (++++); entre 10 et 16 mm (+++); diamètre entre 6 et 10 mm (++); diamètre entre 3 et 6 mm (+); diamètre entre 1 et 3 mm (+); pas d'inhibition (-).

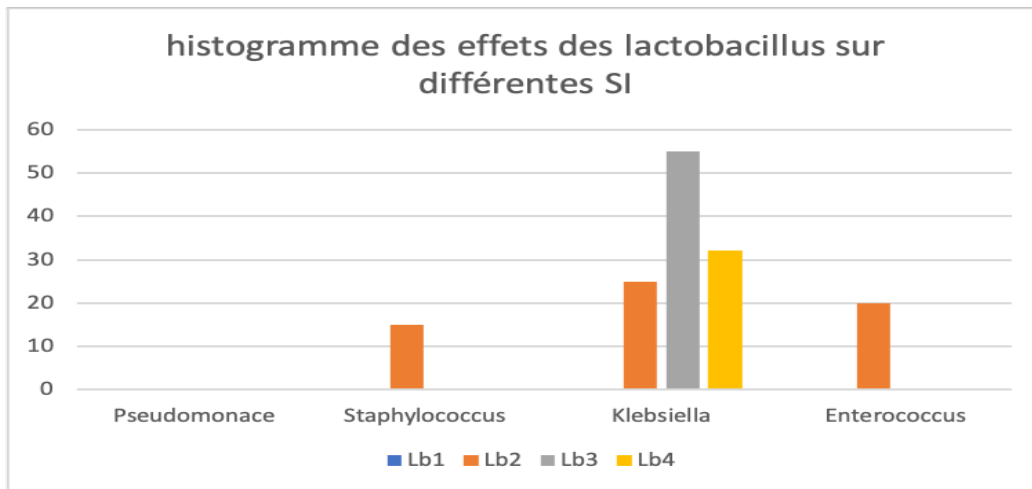


Figure 15 : histogramme des effets des lactobacillus sur différentes souches indicatrices

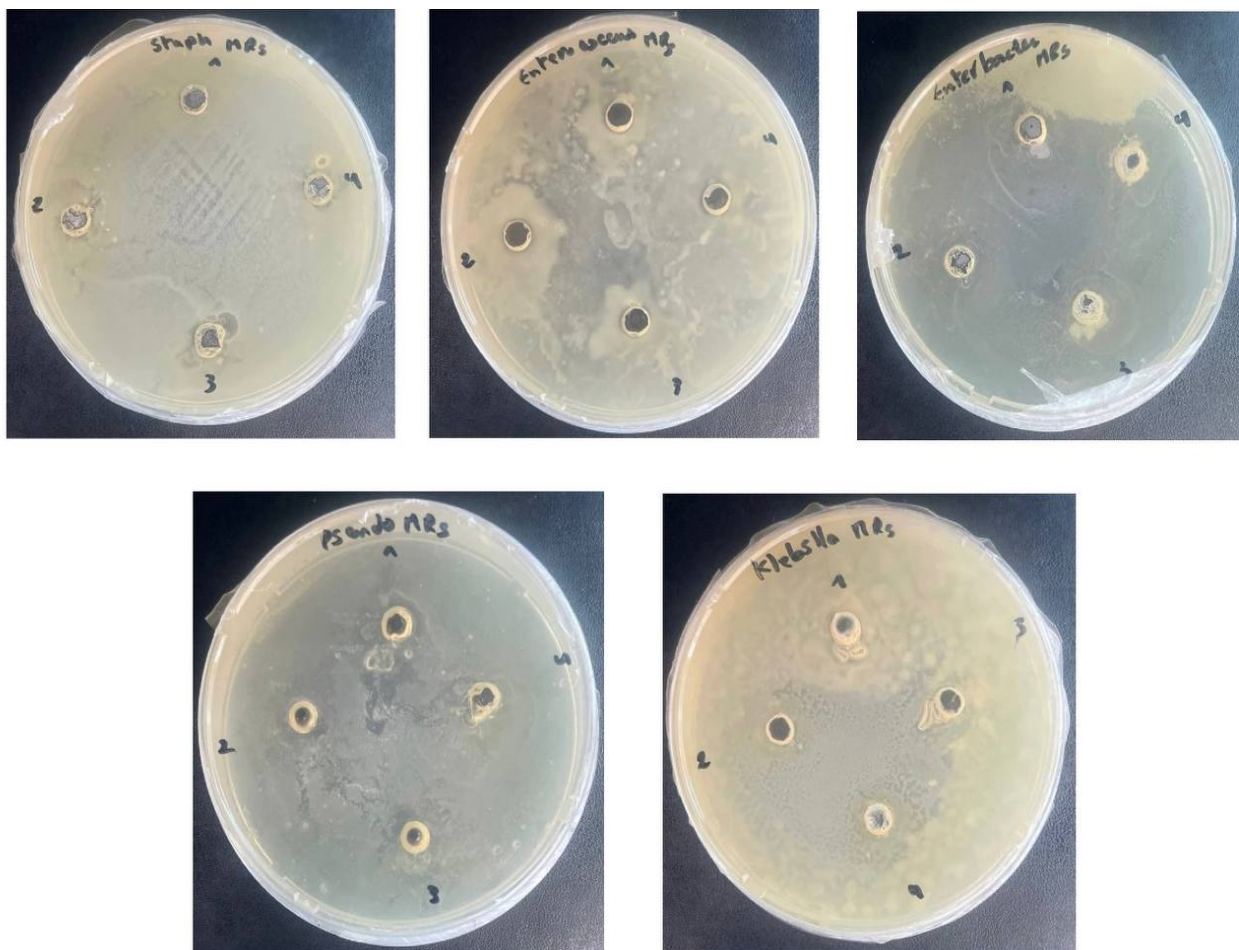


Figure 16 : résultat Antagonisme des lactobacilles contre des Souches indicatrices

Tableau 4 : Antagonismes lactocoques contre certaine SI.

SI	Lactococcus			
	Lc1	Lc2	Lc3	Lc4
Gram⁺				
<i>Staphylococcus 1</i>	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
Gram⁻				
<i>Pseudomonas 1</i>	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	++++	++++	-	-

Zone d'inhibition >16 (++++); entre 10 et 16 mm (+++); diamètre entre 6 et 10 mm (++) ; diamètre entre 3 et 6 mm (++) ; diamètre entre 1 et 3 mm (+); pas d'inhibition (-).

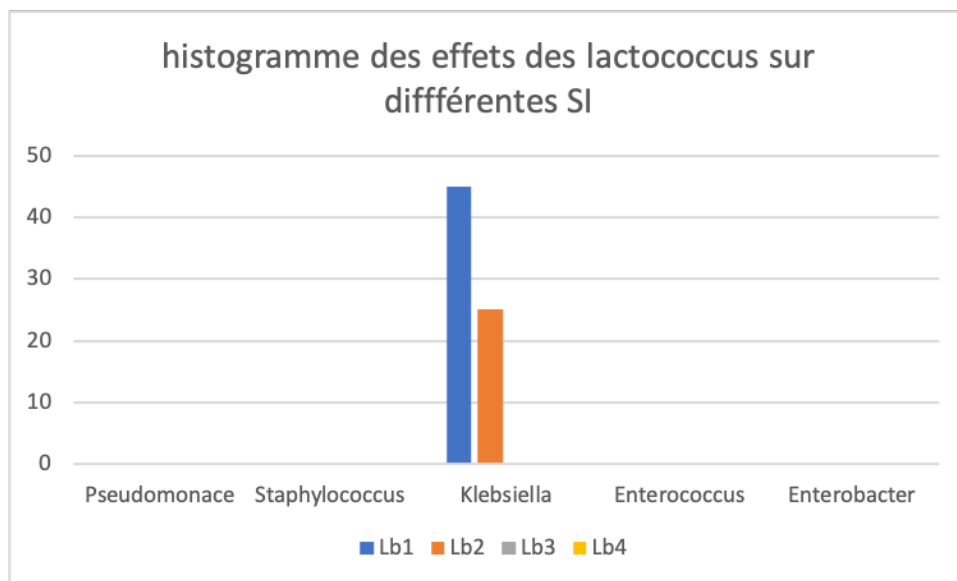


Figure 17 : histogramme des effets des lactocoques sur différents Souches indicatrices

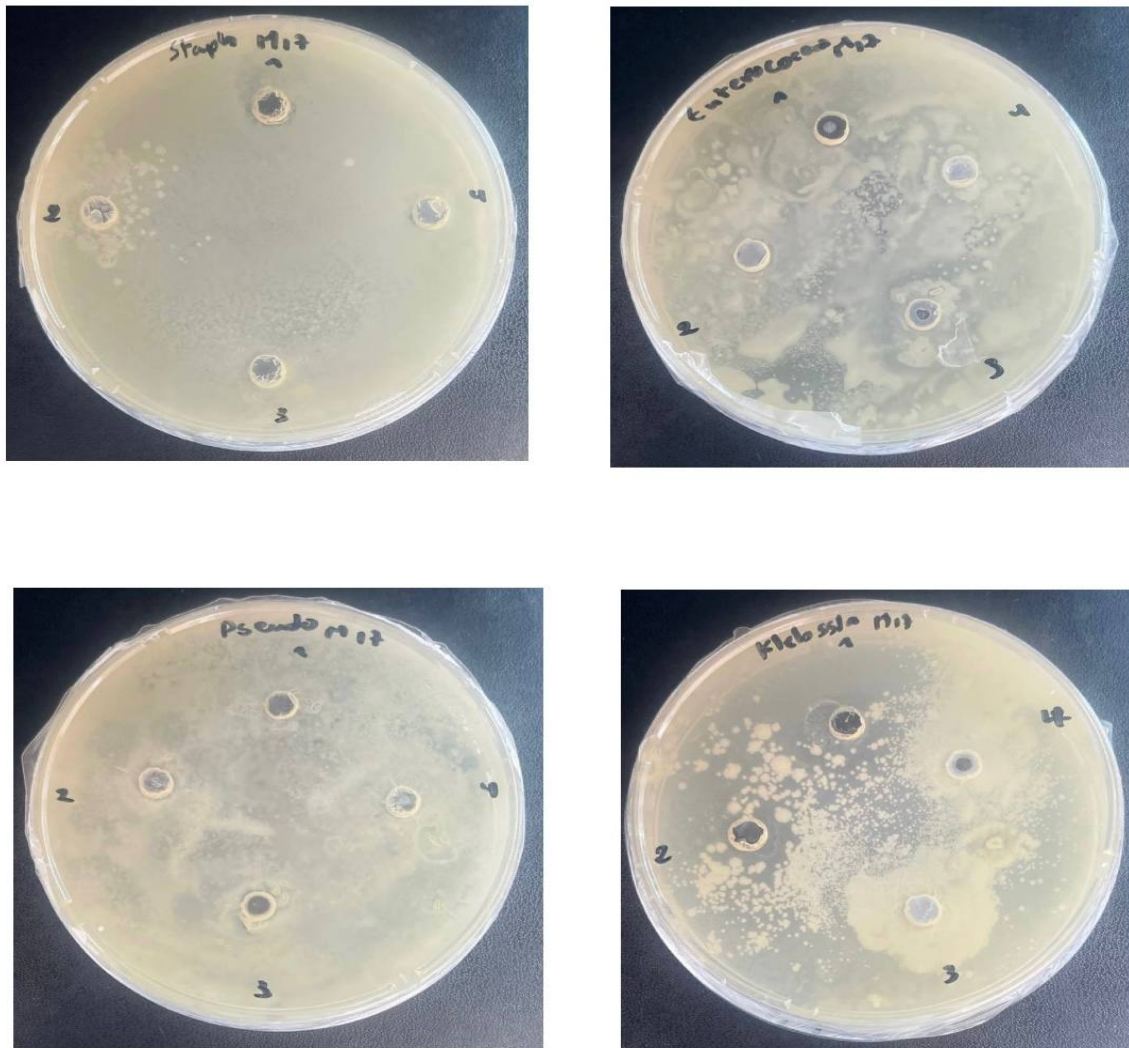


Figure 18 : Résultat Antagonisme des lactocoques contre des Souches indicatrices

3.3. Les Testes

3.3.1. Teste de catalase

Tous nos résultats montrent que les souches sont catalase négatives, ce qui est une caractéristique typique des bactéries lactiques (LAB). Ce résultat est illustré dans la (figure 19).(Annex IV)

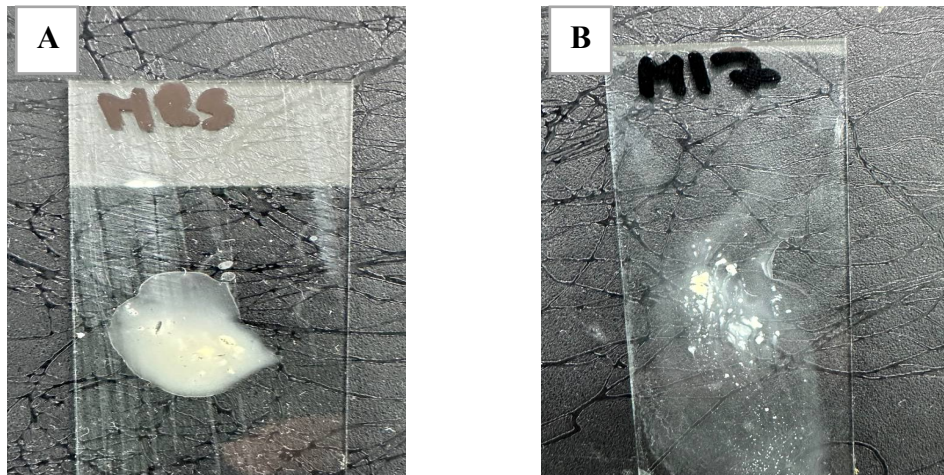


Figure 19 : Résultat de test catalase pour les LAB A) Lactobacille B) Lactococcus

Tableau 5 : les observations microscopiques et les résultats de test catalase effectués sur les souches sélectionnées.

Souches lactiques	Gram	Catalase
Lb1	+	-
Lb2	+	-
Lb4	+	-
Lc1	+	-
Lc2	+	-
Lc3	+	-
Lc4	+	-

3.3.2. Production de CO₂

Tableau 6 : résultat de production CO₂

Souches	Type de fermentation	Produit CO ₂ (bulles dans cloche Durham)	Résultat du test
<i>Lactococcus</i>	Homofermentaire	Non	Négatif
<i>Lactobacille</i>	Homofermentaire	Très faible/ Non	Négatif

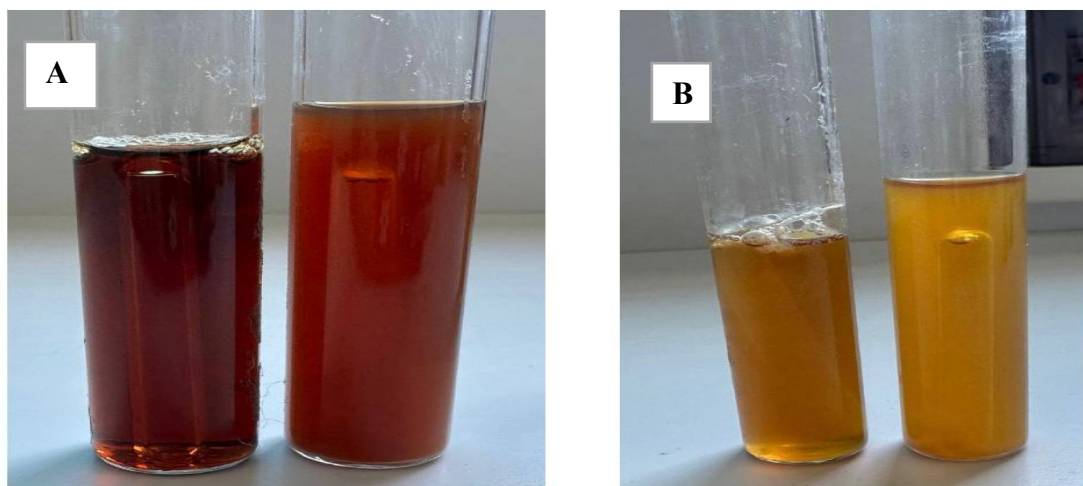


Figure 20 : résultat de test production CO₂ A) Lactobacille B) Lactocoque

3.3.3. La croissance à différent température

Résultats

La croissance des bactéries lactiques a été évaluée à quatre températures : -20°C , 37°C , 4°C et 44°C .

Aucune croissance n'a été observée à -20°C , comme attendu à cette température de congélation. À 4°C , une croissance très lente a été notée, indiquant une faible activité métabolique.

La croissance optimale a été observée à 37°C , ce qui est caractéristique des bactéries mésophiles.

Cependant, une bonne croissance a également été enregistrée à 44°C , notamment chez les souches de *Lactobacillus*, montrant leur capacité à tolérer des températures relativement élevées.

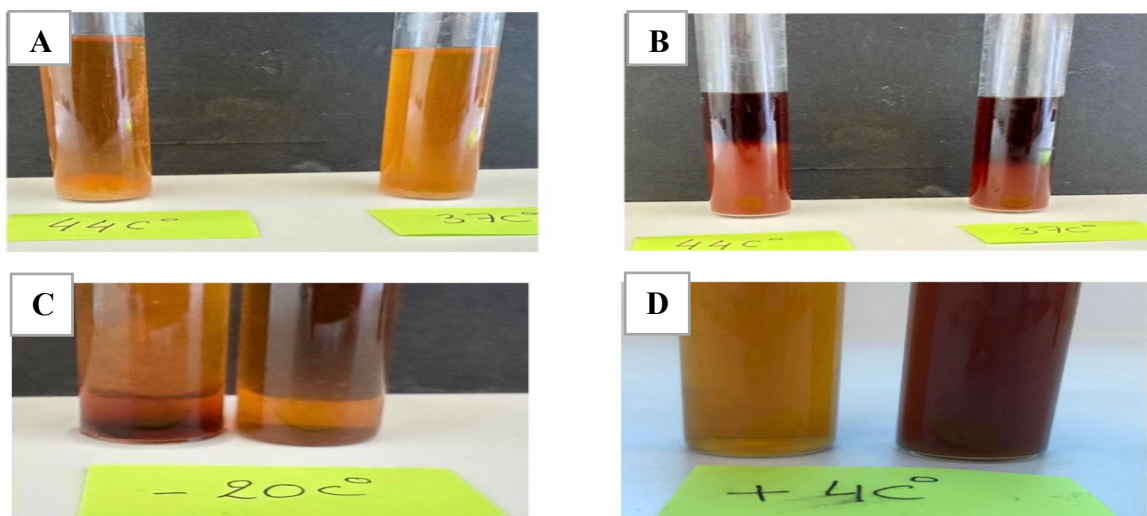


Figure 21 : résultat de croissance à différentes températures de souches lactiques

A) LC (37,44°C) B) LB (37,44°C) C) L

Discussion

Discussion

Choix de sujet

Le choix du présent sujet s'inscrit dans une démarche scientifique moderne visant à valoriser les microorganismes procaryotes, d'origine naturelle et à les intégrer dans des stratégies durables de bioconservation des aliments. L'isolement et l'évaluation de souches lactiques potentiellement bactériocinogènes à partir d'olives de table fermentées représentent une étape essentielle dans le développement d'alternatives naturelles et efficaces aux conservateurs chimiques utilisés en technologie agroalimentaire.

Les olives de table (fruit *olea europea*) constituent un écosystème microbiologique riche, dominé par des bactéries lactiques telles que les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus*, reconnues pour leurs propriétés fonctionnelles et leurs bénéfices sanitaires. Ce type de substrat (végétal) fermentescibles offre une source prometteuse de souches présentant une activité antimicrobienne spécifique, notamment par la production de bactériocines, des composés bioactifs d'un intérêt croissant en matière de sécurité microbiologique des aliments. Ce sujet a permis également d'explorer des approches microbiologiques appliquées aux matrices végétales fermentescibles, ouvrant la voie à des applications concrètes en fermentation contrôlée, en développement de probiotiques, et en conception de bioconservateurs d'origine microbienne. Il contribue par ailleurs à enrichir les connaissances sur la biodiversité microbienne associée aux produits fermentés traditionnels, souvent négligés dans les programmes de recherche en biotechnologie alimentaire. Enfin, ce travail revêt une dimension pédagogique importante en permettant le développement de compétences pratiques en isolement, identification et évaluation fonctionnelle de souches microbiennes, tout en participant activement à un domaine de recherche dynamique à la croisée de la microbiologie alimentaire, de la biopréservation et de l'innovation agroalimentaire durable.

Purification et isolement des souches lactiques et indicatrices

La purification des souches lactiques, cryoconservées, préalablement obtenues à partir d'échantillons d'olives de table constitue une étape fondamentale dans l'approche microbiologique visant à isoler des bactéries à potentiel probiotique. L'utilisation des milieux sélectifs MRS (De Man *et al.*, 1965) (pour les lactobacilles) et M17 (Tarzagli et Sandine, 1975) (pour les lactocoques) a permis une croissance optimale des souches ciblées, tout en inhibant les microflore concurrentes. Ces milieux sont enrichis en nutriments spécifiques (ex. glucose, peptones, sels minéraux) qui favorisent les bactéries lactiques, et leur efficacité est largement documentée dans la littérature (Holzapfel *et al.*, 2001).

Par ailleurs, les souches indicatrices d'altération ont été réactivées sur bouillon nutritif (BN) pour les Gram négatif, le bouillon cœur cerveau pour les Gram positif, permettant l'obtention de cultures pures indispensables pour les tests d'antagonisme. La pureté des cultures est essentielle pour garantir la fiabilité des résultats, notamment lorsqu'il s'agit d'évaluer les interactions inter-microbiennes. Cette méthode de repiquage successif est une pratique classique en microbiologie pour l'isolement de souches bien définies et reproductibles (Pelczar *et al.*, 2006).

Caractères morphologiques et culturels des souches lactiques

Caractères macroscopiques

Sur milieu solide (MRS ou M17), les lactobacilles ont formé des colonies de petite taille (1 à 5 mm), souvent convexes, opaques, lisses et parfois pigmentées en jaune, probablement en raison de la production de pigments caroténoïdes, comme c'est souvent le cas chez *Lactobacillus plantarum* (Breithaupt *et al.*, 2001). Certaines souches ont également montré des colonies rugueuses, ce qui pourrait indiquer une variabilité phénotypique ou une probable production d'exopolysaccharides. En milieu liquide, la croissance des souches s'est manifestée par une turbidité homogène et une sédimentation rapide après incubation. Ce comportement est typique des bactéries lactiques, dont les agrégats cellulaires peuvent résulter de probables d'interactions entre protéines de surface et exopolymères (Schachtsiek *et al.*, 2004).

Observation microscopique

L'observation microscopique à l'état frais et après coloration de Gram a confirmé que les isolats sont des bactéries à Gram positif, soit sous forme de bacilles (lactobacilles), soit sous forme de cocci ou coccobacilles (lactocoques). Cette caractérisation morphologique, associée à la coloration violette, est conforme aux propriétés décrites pour les bactéries lactiques (Joffin & Leryal, 1996).

Activité antagoniste des souches lactiques

Les interactions entre LAB et souches indicatrices prouvent l'existence de plusieurs composés bioactifs à l'exemple des : H₂O₂, acide organique, PH, acidité (°D) (lactate, des arômes... Etc) dans notre cas, et pour des contraintes pratiques uniquement le (SBA) est testé. L'étude de l'antagonisme *in vitro* constitue une étape essentielle pour évaluer le potentiel antimicrobien des souches lactiques. Cette capacité est attribuée à la production de plusieurs composés antimicrobiens tels que les acides organiques (acide lactique, acétique), le peroxyde d'hydrogène, les enzymes (ex. lysozyme), et surtout les bactériocines; peptides antimicrobiens ribosomiaux synthétisés par les bactéries lactiques (Cotter *et al.*, 2005; Ness *et al.*, 2012; Cleveland *et al.*, 2002; Gautam et Sharma, 2009).

Les antagonismes entre LAB (isolées d'olive de table) et les souches indicatrices Gram positif et Gram négatif a été menée *in vitro* sur milieu complexe

Les résultats obtenus montrent une diversité d'activités selon les souches et les cibles microbiennes. Parmi nos souches de *Lactobacillus*, Lb1, Lb2, Lb3, Lb4 a démontré une inhibition marquée (+++++) contre, la souche indicatrice G (-): *Klebsiella sp*, la zone d'inhibition mesurées respectivement (Lb1=40mm, Lb2=58mm, Lb3=36mm, Lb4=38mm), ce qui indique un fort potentiel bactériocinogène.

En outre, la souche: Lb4 ont également montré une activité modérée contre *Listeria sp* (32mm) et *salmonella sp* (29mm), C'est ce qui rend notre résultat conforme à ceux obtenus par Lima et coll (Lima *et al.*, 2006). Et la souche Lb2 montrée une activité inhibitrice contre *staphylococcus sp*(17mm) cela correspond aux résultats du travail élaboré par Bentoura, (Bentoura *et al.*,2017), (tableau 2 figure 11, 12). Ces résultats corroborent les études antérieures, montrant que nos souches, isolées des olives de table : *L. plantarum* et *L. casei* qui sont souvent producteurs de bactériocines actives contre des pathogènes alimentaires majeurs (Messens & De Vuyst, 2002). Du côté de nos souches *Lactococcus*, l'isolat Lc3 avait affiché une activité significative contre *Listeria sp*(49mm) et *Staphylococcus sp*(28mm), bien que de façon plus ciblée. Cela est conforme aux propriétés de certaines souches de *Lactococcus* l'Actis connues pour produire des nisine-like bactériocines (Delves-Broughton *et al.*, 1996).et l'isolat Lc4 affiché une activité contre *klebsielle sp* (50mm) et *Salmonella sp* (50mm), et Lc1# *Klebsiella sp* (53mm), (tableau 4, Figure 13 et 14). Il est également intéressant de constater que l'activité antagoniste varie selon la méthode (diffusion par disques vs. Puits), ce qui peut être lié à la diffusion différentielle des composés antimicrobiens selon la viscosité du milieu ou la concentration locale du produit. Les souches isolées, cryoconservées, réifiées au cours de cette étude, ont révélé un potentiel antimicrobien notable, à l'encontre des souches indicatrices, avec des zones d'inhibition dont les dimensions variaient selon les cas et selon les souches indicatrices. Ce comportement des LAB, a déjà été observé dans des recherches antérieures, qui ont mis en évidence la capacité de certaines bactéries lactiques, issues de milieux très diversifiés, à produire des composés antimicrobiens. Par exemple, des souches LAB ont été isolées à partir de lait cru d'Algérie (Allouche *et al.*, 2010). D'autres travaux ont également montré que ces LAB peuvent être retrouvés dans des denrées alimentaires telles que les produits laitiers fermentés ou les viandes, où elles exercent une activité inhibitrice envers une large gamme de bactéries pathogènes ou responsables de la détérioration des aliments, Nos résultats corroborent partiellement ceux obtenus par (Ge *et al.*, 2007); et ceux élaborés par (Matamoros *et al.*, 2009) ce dernier ayant travaillé sur des LAB psychotopes isolées du produit de mer.

L'efficacité des bactériocines produites par les bactéries lactiques (LAB) varie en fonction du type de paroi cellulaire des micro-organismes cibles. Les bactéries à Gram négatif montrent généralement une plus grande résistance, principalement en raison de la structure complexe de leur enveloppe externe. Celle-ci contient des lipopolysaccharides, des protéines et des phospholipides, formant une barrière qui limite l'entrée de molécules de grande taille. Bien que cette barrière permette le passage de composés de faible masse moléculaire (inférieure à 600 Da), la plupart des bactériocines ont une masse avoisinant les 3 Kda, ce qui en limite l'efficacité (Abeet *et al.*, 1995; Ray *et al.*, 2001). Dans notre étude, lorsque les souches lactiques ont montré une activité réduite contre les bactéries à Gram négatif, cela s'est manifesté par un effet bactéricide moindre. Dans ce contexte, de nombreuses études ont mis en évidence l'existence de substances d'origine protéique, telles que les bactériocines, capables d'inhiber la croissance de divers types de bactéries (Klaenhammer, 1993; Bogovic-Matijasic *et al.*, 1998 ; Cleveland *et al.*, 2002 ; Cotter *et al.*, 2005). Ces peptides antimicrobiens exercent leur action en perturbant l'intégrité de la membrane cellulaire des micro-organismes cibles, en y créant des pores. Cette altération membranaire conduit à une fuite des constituants intracellulaires, provoquant ainsi la lyse et la mort de la cellule (Klaenhammer, 1993). Il convient néanmoins de souligner que l'apparition d'une zone d'inhibition autour d'une souche ne constitue pas une preuve absolue de la production de bactériocines (Klaenhammer, 1993). L'abaissement du pH intracellulaire constitue un mécanisme de défense efficace, perturbant les fonctions enzymatiques essentielles chez les micro-organismes pathogènes sensibles à l'acidité (Deng *et al.*, 1999). Par ailleurs, cette acidification contribue à altérer la perméabilité de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, ce qui favorise l'entrée de composés antimicrobiens tels que les bactériocines, renforçant ainsi leur action inhibitrice (Servin, 2004).

Choix de l'échelon

Pour l'interprétation des résultats on a utilisé l'échelon (Siroli *et al.*, 2017) ce qui a permis de classer les LAB en 5 catégories:

- (-): pas d'inhibition
- (+): diamètre enter 1et 3mm
- (++): diamètre enter 3et 6 mm
- (++): diamètre enter 3et 6 mm
- (+++): diamètre enter 10 et 6 mm
- (++++): zone d'inhibition > 16mm, (Méthode).

Les valeurs des zones d'inhibitions en mm

Nos résultats d'interactions (méthode par les disques) ont montré des LAB ayant large spectre d'action: La souche Lb4 # *Listeria spp* (32mm), la souche Lb2 # *Staphylococcus sp* (17mm), la souche Lb4 # *Salmonella sp* (29mm).

Les LAB étaient actives contre *Klebsiella spp*: Lb1(40mm), Lb2(58mm), Lb3(36mm), Lb4(38mm). (Tableau 2, Figure 11).

Les Lc ont donné les diamètres : la souche Lc3 # *Listeria sp* (49mm), la souche Lc3 # *staphylococcus sp* (28mm), la souche Lc1 # *Klebsiella sp* (53mm), la souche Lc4 # *Klebsiella sp* (50mm), la souche Lc4 # *salmonella sp* (50mm). (Tableau 3, Figure 13). Nos résultats d'interaction (méthode par puits) : la souche Lb2 # *Staphylococcus sp* (15mm), la souche Lb2 # *Enterococcus sp* (20mm), *Klebsiella sp* large spectre d'action contre LAB : Lb2(25mm), Lb3(55mm), Lb4(32mm). (Tableau 4, Figure 15). Et pour les Lc (Lc1 et Lc2) # *Klebsiella sp* (45mm et 25mm). (Tableau 5, Figure 17).

Caractérisation des LAB (Tests biochimiques)

Catalase et production de CO₂

Toutes les souches testées se sont révélées comme; catalase négatives, ce qui est une caractéristique classique des bactéries lactiques. En effet, ces bactéries ne possèdent généralement pas d'enzyme catalase fonctionnelle, car elles vivent dans des environnements peu oxygénés et utilisent des voies fermentaires pour produire de l'énergie (Hammes & Hertel, 2009). De plus, l'absence de production de CO₂ dans les tubes de Durham indique une fermentation type homofermentaire, typique des genres *Lactobacillus* (certaines espèces) et *Lactococcus*. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature concernant le métabolisme fermentaire des bactéries lactiques (Carr *et al.*, 2002).

Effet de la température sur la croissance

L'étude de la croissance des souches LAB à différentes températures révèle une capacité d'adaptation significative. L'absence de croissance à -20°C est attendue, car les cellules entrent en état de dormance à cette température de congélation. La faible croissance à 4°C reflète une activité métabolique minimale, mais démontre une certaine psychrotolérance utile pour la conservation. La croissance optimale à 37°C confirme que ces souches sont mésophiles, ce qui est compatible avec les conditions des niches naturelles (olives fermentées) et avec leur utilisation potentielle dans des produits fermentés. La croissance observée à 44°C, en particulier chez les lactobacilles, indique une tolérance thermique qui pourrait être avantageuse pour les applications industrielles où des élévations modérées de température sont courantes (De Angelis *et al.*, 2003). Ce processus de réactivation cellulaire, impliquant la restauration des membranes,

des enzymes et de l'ADN, peut durer jusqu'à 72 heures avant qu'une croissance soit détectable, en particulier lorsque les conditions de culture sont sous-optimales (ATCC, 2020; Konno *et al.*, 2021).

Contraintes de la cryoconservation

Formation de cristaux de glace intracellulaires, la formation de cristaux de glace à l'intérieur des cellules peut endommager les membranes cellulaires et les organites, compromettant ainsi la viabilité cellulaire après décongélation (Mazur, 1984). Toxicité par des cryoprotecteurs. Les agents cryoprotecteurs tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le glycérol sont essentiels pour prévenir la formation de glace, mais peuvent être toxiques à des fortes concentrations ou provoquer des altérations génétiques, (Fuller, 2004). Altérations génétiques et épigénétiques, la cryoconservation peut induire des modifications chromosomiques ou épigénétiques, affectant la stabilité génétique des cellules procaryotes/ Eucaryotes, notamment des cellules souches mésenchymateuses, (Chen *et al.*, 2023). Risque Lors de la conservation de plusieurs souches bactériennes dans un même environnement, notamment en cas de culture mixte ou d'utilisation de la même cuve de cryoconservation, un risque important de contamination croisée peut survenir. Ce phénomène résulte souvent d'une manipulation inadéquate, d'un mauvais étiquetage, ou d'un manque de séparation physique entre les échantillons. De telles contaminations peuvent compromettre la pureté des souches conservées et entraîner des biais importants dans les résultats expérimentaux (ATCC, 2020). Coût élevé des équipements et de la maintenance, La cryoconservation nécessite des équipements spécialisés tels que des congélateurs ultra-basse température et des cuves d'azote liquide, ainsi qu'un suivi rigoureux des températures afin d'assurer la viabilité des échantillons. Ces équipements représentent un coût élevé non seulement à l'achat, mais aussi en termes de maintenance et de consommation énergétique.

Difficultés liées à la conservation de tissus et d'organes entiers, la cryoconservation de tissus complexes ou d'organes entiers présente des défis supplémentaires, tels que la formation de fractures dues aux contraintes thermiques et la difficulté de préserver l'intégrité fonctionnelle. (Bojic *et al.*, 2021).

Conclusion

Conclusion

Les molécules bioactives des LAB et spécialement bactériocines, ont suscité l'intérêt des chercheurs en science des aliments, en tant que bioconservateurs naturels en raison de leur activité antimicrobienne contre les bactéries responsables de la détérioration des aliments et les bactéries pathogènes, impliquées dans les intoxications alimentaires.

Ce travail s'inscrit dans une démarche de valorisation de micro-organismes d'origine naturelle pour la bioconservation des aliments. Il vise à évaluer l'activité antibactérienne de souches de bactéries lactiques LAB isolées à partir d'olives de table fermentées, ayant été longtemps cryoconservées.

Douze souches lactiques ont été sélectionnées (6 *Lactobacillus* sur MRS et 6 *Lactococcus* sur M17), purifiées, caractérisées morphologiquement, biochimiquement et testées pour leur pouvoir inhibiteur (bactériocinogène) sur plusieurs souches indicatrices d'altération des aliments, de type Gram positif et Gram négatif.

L'identification s'est abolie au rang du genre, l'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par méthode de diffusion sur gélose (méthodes des disques et des puits), en utilisant les Surnageants Bruts Actifs (SBA) des cultures LAB sur MRS et M17 respectivement. Plusieurs souches, telles que Lb4, Lb2, Lc3 et Lc4, ont montré des zones inhibitrices marquées, notamment contre les souches Gram (+) *Listeria* sp. Et Gram (-) *Salmonella* sp. Et *Klebsiella* sp.

Les tests physiologiques ont révélé un métabolisme homofermentaire, une absence de catalase et une croissance mésophile, confirmant les caractéristiques typiques des LAB.

Les souches ont aussi démontré une bonne viabilité après cryoconservation. Ces résultats suggèrent que les souches lactiques issues d'olives fermentées peuvent être exploitées comme agents naturels de bioconservation, en alternative aux conservateurs chimiques, tout en appelant à une vigilance quant à leur profil de résistance aux antibiotiques.

Références

Références

- Abeet A., Knock L. and Hill C. (1995). Bactériocines: modes of action and potential in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. foodmicrobial*, 28: 169-185.
- Allouche, F. N., Hellal, A., & Laraba, A. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature & Technology*, (3), 13.
- Anonyme ATCC. (2020). Bacteriology culture guide (Rev. ed.). American Type Culture Collection.
- Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., & Ouzrout, R. (2005). caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "ARABIA ET KABYLE". *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 30-37.
- Bentoura, A., Amiali, M., Aissiou, M. Y. E. A., & Bitam, A. (2017). Antagonistic effect of lactobacilli isolated from camel (*Camelus dromedarius*) milk on food borne pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 11(17), 673- 680.
- Bogovič-Matijašić, B., Rogelj, I., Nes, I. F., & Holo, H. (1998). Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 606-612.
- Bojic, S., Murray, A., Bentley, B. L., *et al.* (2021). Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biology*, 19.
- Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F., Taibi, H., & Djamel, T. (2014). Valorisation de l'essence aromatique du Thym (*Thymus vulgaris* L.) en aromathérapie anti-infectieuse [Potential *Abdelmalek /Afr.J.Bio.Sc.7(4) (2025)*].
- Bourdichon, F., Arias, E., Babuchowski, A., Bückle, A., Bello, F. D., Dubois, A., ... & Morelli, L. (2021). The forgotten role of food cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 368(14), fnab085.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., ... & Hansen, E. B. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International journal of food microbiology*, 154(3), 87- 97.
- Breithaupt, D. E., & Krause, E. L. (2001). Carotenoids in *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry*, 74(3), 277- 282.
- Breithaupt, D. E., Schwack, W., Wolf, G., & Hammes, W. P. (2001). Characterization of the triterpenoid 4,4'-diaponeurosporene and its isomers in food-associated bacteria. *European Food Research and Technology*, 213(3), 231- 233.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews In Microbiology*, 28(4), 281- 370.
- Carvalho, A. S. *et al.* (2004). *Biotechnology Letters*, 26(12), 1587- 1591.
- Chen, J., Liu, X., Hu, Y., Chen, X., & Tan, S. (2023). Cryopreservation of tissues and organs: present, bottlenecks, and future. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1201794.
- Coelho, M. C., Malcata, F. X., & Silva, C. C. (2022). Lactic acid bacteria in raw-milk cheeses: From starter cultures to probiotic functions. *Foods*, 11(15), 2276.

References

- Cooke, R. D., Twiddy, D. R., & Alan Reilly, P. J. (1987). Lactic-acid fermentation as a low-cost means of food preservation in tropical countries. *FEMS Microbiology Reviews*, 3(3), 369- 379.
- Cotter, P.D., Hill, C., & Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777- 788.
- Dabbou S, Issaoui M, Brahmi F, Nakbi A, Chehab H, Mechri B, & Hammami. M (2012). Changes in volatile compounds during processing of Tunisian-style table olives. *J Am Oil Chem Soc.* (2012) 89: 347- 354.
- Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives.
- Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., ... & Kakanj, M. (2022). Bacteriocins: properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1), e24093.
- De Angelis, M., Siragusa, S., Berloco, M. G., Caputo, L., Settanni, L., Alfonsi, G., Amerio, M., Grandi, A., Ragni, A., & Gobbetti, M. (2003). Selection of potential probiotic Lactobacilli from traditional Italian sourdoughs. *Food Microbiology*, 20(6), 571–581.
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of AppliedBacteriology*, 23, 130- 135.
- Delarras, C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire* (pp. 128, 129, 269, 271). Edition Lavoisier.
- Deng, Y., Ryu, J. H., & Beuchat, L. R. (1999). Tolerance of acid-adapted and non-adapted Escherichia coli O157: H7 cells to reduced pH as affected by type of acidulant. *Journal of Applied Microbiology*, 86(2), 203- 210.
- Duriez J. M., (2004). Code de bonnes pratiques loyales pour les olives de table Fédération des industries condimentaire de France. Association Française Interprofessionnelle de l'olive: 7- 24.
- El-Soda, M., El-Ziney, M., Awad, S., Osman, G., Omran, N., Gamal, G., Ezzat, N., & El-Shafei, H. (2003). A culture collection of lactic acid bacteria isolated from raw milk and traditional Egyptian dairy products. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 31, 23–41.
- Excedr. (2023). How much does a cryogenic freezer cost? Retrieved May 31, 2025,
- Fuller, B. J. (2004). Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*, 25(6), 375- 388.
- Garvie E.I. (1984). Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. *In: Methodes in Microbiology* volume 16. *Academic Press London*: 147- 178.
- Gautam, N., & Sharma, N. (2009). Bacteriocin: Safest approach to preserve food products. *Indian Journal of Microbiology*, 49(2), 204- 211.
- Ge, B., Jiang, P., Han, F., Saleh, N. K., Dhiman, N., Fedorko, D. P., ... & Meng, J. (2007). Identification and antimicrobial susceptibility of Lactic Acid Bacteria from retail fermented foods. *Journal of Food Protection*, 70(11), 2606- 2612.

References

- Guessass B (2007). Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat. Université d'Oran Es Senia. Algérie.
- Guiraud J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Tec &Doc, Dunod. Paris. 90- 292, 140-141.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2006). The genera lactobacillus and carnobacterium. *The prokaryotes*, 4, 320- 403.
- Hassaine, O. (2013). *Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat (Université d'Oran Esenia, Algérie, 2007)).
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 365S–373S.
- Hutkins, R. W. (2019). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Hoboken: Wiley Blackwell.
- Joffin, C., & Leryal, J. (1996). Microbiologie générale et appliquée (2^e éd.). Masson.
- Jose, N. M., Bunt, C. R., & Hussain, M. A. (2015). Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms*, 3, 198–212.
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2018). Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology advances*, 36(8), 2187- 2200.
- Klaenhammer T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMSMicrobioRev*, 12: 39- 86.
- Konno, T., Ichikawa, R., Takeuchi, A., & Shinohara, Y. (2021). Effect of cryopreservation on DNA damage and DNA repair activity in mammalian cells. *Cryobiology*, 98, 132–138.
- Kunji, E. R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., & Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 187- 221.
- Larpent, L., & Verger, C. (1990). The need for using an enzymatic colorimetric assay in creatinine determination of peritoneal dialysis solutions. *Peritoneal Dialysis International*, 10(1), 89-92.
- Le Cureux, J. S., & Dean, G. A. (2018). *Lactobacillus mucosal* vaccine vectors: immune responses against bacterial and viral antigens. *Mosphere*, 3(3), 10- 1128.
- Lima, E. T., Andreatti Filho, R. L., Okamoto, A. S., Noujaim, J. C., Barros, M. R., & Crocci, A. J. (2006). Evaluation *In Vitro* of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. Isolated from chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 71(1), 103- 107.
- Marchal N., Bourdon J. and Richard C. L. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin*. p. 65-149.
- Matamoros, S., Pilet, M. F., Gigout, F., Prévost, H., & Leroi, F. (2009). Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology*, 26(6), 638- 644.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 247(3), C125- C142.

References

- Ness, I. F., Diep, D. B., & Ike, Y. (2014). Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control.
- Ness, I. F., Kjos, M., & Diep, D. B. (2012). Antimicrobial components of lactic acid bacteria. Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A, editors. Lactic acid Bacteria-microbiological and functional aspects: 4th Edition. CRC Press, 2011. Chapter, 15, 286- 322.
- Parente, E. and Hill, C. (1992). A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 290- 298.
- Parente, E., Brienza, C., Moles, M., & Ricciardi, A. (1995). A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *Journal of microbiological methods*, 22(1), 95- 108.
- Parente, E., Ricciardi, A. and Villani, V. (1993) Evaluation of two methods for the measurement of bacteriocin activity. In: Biotechnology and molecular biology of lactic acid bacteria for the improvement of foods and feeds quality (Zamorani, A., Manachini, P.L., Bottazzi, V. and Coppola, S., eds.), pp. 318- 327, Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Rome.
- Parente, E., Ricciardi, A., & Addario, G. (1994). Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 14ONWC during batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(4), 388- 394.
- Rafique, N., Jan, S. Y., Dar, A. H., Dash, K. K., Sarkar, A., Shams, R., ... & Hussain, S. Z. (2023). Promising bioactivities of postbiotics: A comprehensive review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100708.
- Saint-Eve A, Levy C, Le Moigne M, Ducruet V, Souchon I (2008). Quality changes in yogurt during storage in different packaging materials. *Food Chemistry* 110 : 285–293.
- Salminen, S., & Wright, A. (1998). Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects. New York: Marcel Dekker, Inc. a. Sankarankutty, J., & Kaup, S. (2014). Distribution and antibiogram of gram negative isolates from various clinical samples at a Teaching Hospital, Tumkur. *Blood*, 9, 55- 55.
- Schachtsiek, M., Hammes, W. P., & Hertel, C. (2004). Characterization of aggregation in *Lactobacillus curvatus* LTH 1174. *International Journal of Food Microbiology*, 95(1), 1- 10.
- Schillinger, U., & Lucke, F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and environmental microbiology*, 55(8), 1901- 1906.
- Servin A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 28: 405- 440.
- Siedler, S., Balti, R., & Neves, A. R. (2019). Bioprotective mechanisms of Lactic Acid Bacteria against fungal spoilage of food. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 138- 146.
- Silva, C. C., Silva, S. P., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in microbiology*, 9, 594.
- Sindi, A., Badsha, M. B., Nielsen, B., & Ünlü, G. (2020). Antimicrobial activity of six international artisanal kefir against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*,

References

- Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*, and *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*, 8(6), 849.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D. I., Parolin, C., Nahui Palomino, R. A., Vitali, B., & Lanciotti, R. (2017). Determination of antibacterial and technological properties of vaginal lactobacilli for their potential application in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 8, 166.
- Skyttä, E. and Mattila-Sandholm, T. (1991) A quantitative method for assessing bacteriocins and other food antimicrobials by automated turbidometry. *J. Microbiol. Methods* 14, 77- 88.
- Smit, G., Smit, B. A., & Engels, W. J. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS microbiology reviews*, 29(3), 591- 610.
- Szatraj, K., Szczepankowska, A. K., & Chmielewska-Jeznach, M. (2017). Lactic acid bacteria-promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts. *Journal of Applied Microbiology*, 123(2), 325- 339.
- Tagg, J. R., Read, R. S., & Mc Given, A. R. (1973). Bacteriocin of a group A Streptococcus: partial purification and properties. . *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 4(3), 214-221., 4(4(3)), 214- 221.
- Tagg, J., & Mc Given, A. (1971). Assay system for bacteriocins. *Applied microbiology*, 21(5), 943-943.
- Terzaghi, B. E., & Sandine, W. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied microbiology*, 29(6), 807- 813.
- Valero E, Villamiel M, Miralles B, Sanz J, Martinez-Castro I (2001). Changes in flavor and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. *Food Chemistry* 72(1): 51- 58.
- Vieira, C. P., Rosario, A. I. L., Lelis, C. A., Rekowky, B. S. S., Carvalho, A. P. A., Rosário, D. K. A., ... & Conte-Junior, C. A. (2021). Bioactive compounds from kefir and their potential benefits on health: A systematic review and meta-analysis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021(1), 9081738.
- Yang, H., Hao, L., Jin, Y., Huang, J., Zhou, R., & Wu, C. (2024). Functional roles and engineering strategies to improve the industrial functionalities of lactic acid bacteria during food fermentation. *Biotechnology Advances*, 108397.

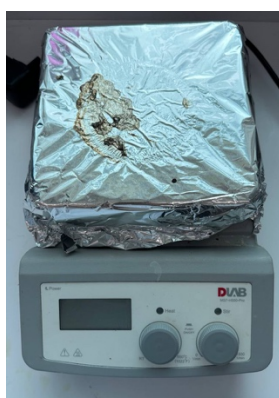
Annexes

Annex I:

1. Matériel

1.1. Matériel et machines

Matériel	Référence
Hotte microbiologique	STERIL-GEMINI (Italy)
Autoclave	SANOCLAV LaM-3-20-ECZ-J- Turkish
Étuves	Memmert (Germany)
Microscope optique	OPTIKA B-350 (Italy)
Compteur de colonies	J.P.SELECTA,s.a (Spain)
Bain marie	Memmen (Germany)
Réfrigérateur / Congélateur	Samsung®, Algérie
Vortex	Fisher Scientific FB 15024
Agitateur magnétique plaque chauffante	AGIMATIC-E
Bec Bunsen électrique	INTEGRA Biosciences®, model FIREBOY bec Bunsens
Autoclave	SANOCLAV LaM-3-20-ECZ-J
Balance de précision	KERN ALS 220-4N (Germany)



1.2. Matériel et milieux de cultures, réactifs et produits chimiques

Accessoires	Verrerie	Solvants	Colorants et réactifs	Sels et tampons
Anses de platine, Barreau magnétique, Boîtes de Pétri, Cuillère, Distributeur, Micropipette, Papier Josef, Papier aluminium, , Ciseau, Pince, Pissette, Poires. Portoir, Rubans de parafilm, Scotch, Spatules.	Béchers, Burette Entonnoirs, Éprouvette graduées, Erlenmeyers, Fioles Jaugé, Flacons, Lames/lamelles, Pipettes graduées, Pipettes Pasteur, Tubes à essai, Mortie	Alcohols (ethanol à 95°), Glycerol, Tween 80	Violet de Gentiane, Lugol,Fushine, Huile à émersion, Phénolphtaléine,	Nacl

Milieux cultures :

Milieu de culture	Composition
Gélose MRS	Polypeptone.....10g Extrait de viande..... 10g Extrait de levure.....05g Glucose.....20g Tween 801,08ml Phosphate bipotassique.....02g Acétate de sodium trihydraté.....05g Citrate d'ammonium.....02g Sulfate de magnésium.....0,05g Agar.....15,00g

Annex I

Gélose M17	Tryptone.....02,5g Peptone pepsique de viande.....02,5 g Peptone papaïnique de soja.....5,0 g Extrait autolytique de levure.....2,5 g Extrait de viande.....5,0g Lactose.....5,0 g
	Glycérophosphate de sodium.....19,0 g Sulfate de magnésium.....0,25 g Acide ascorbique.....0,50g Agar.....15,0
Mueller Hinton (MH)	Hydrolysate acide de caséine.....17,5g Extrait de viande.....03g Amidon.....1.5g Agar16g
Bouillon MRS	Dextrose.....20g Peptone bactériologies.....10g Extrait de bœuf.....8g Acétate de sodium.....5g Extrait de levure.....4g Phosphate di potassique.....2g Citrate d'ammonium.....2g Tween 80.....1ml Sulfate de magnésium.....0.2g Sulfate de manganèse.....0.05g Saccharose.....5g

Annex I

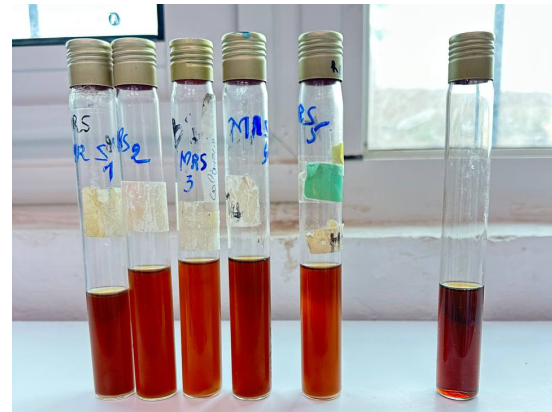
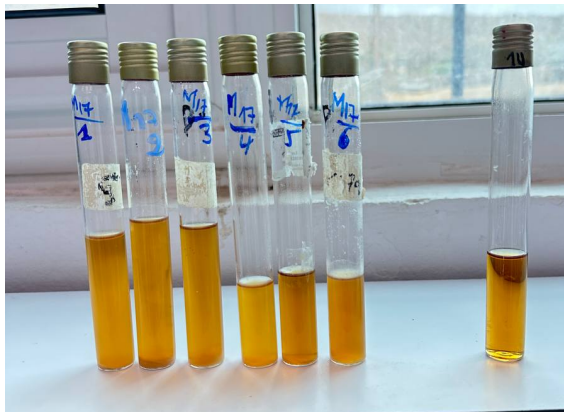
<p>Bouillon M17</p>	<p>Tryptone.....2.5g Peptone pepsique de viande.....2.5g Peptone papainique de soja.....5.0g Extrait de viande.....5.0g Extrait autolytique de levure.....2.5g Acide ascorbique.....0.5g Glycérophosphate de sodium.....19g Sulfate de magnésium.....0.25g</p>
<p>Eau physiologique</p>	<p>Chlorure de sodium.....9g Eau distillée.....1000ml</p>
	<p>Extrait de levure.....2.5g Acide ascorbique.....0.5g Sulfate de magnésium.....0.25g Agar bactériologique.....12.75g</p>
<p>Bouillon nutritif (BN)</p>	<p>Extrait de levure.....04g Tryptone.....05g Glucose.....50.0g Dihydrogénophosphate de potassium.....0.55g Chlorure de potassium.....0.425g Chlorure de calcium.....0.125g Sulfate de magnésium.....0.125g Chlorure ferrique.....0.0025g Sulfate de manganèse.....0.0025g Vert de bromocrésol.....0.022g</p>
<p>Gélose Nutritive (GN).</p>	<p>Peptone5,00g. Extrait de viande de bœuf3,00g. Chlorure de sodium..... 5,00g. Agar..... 15,00g. pH final à 25°C : 7,3 ± 0,2</p>

Annex II :

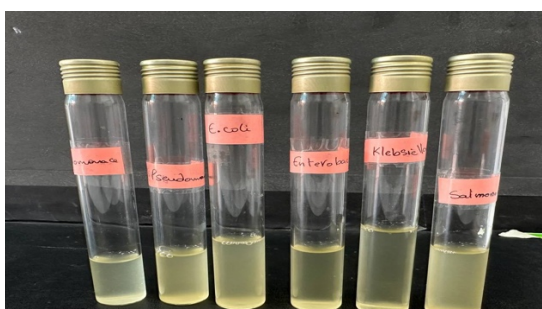
1.3. Matériels biologiques

Les bactéries lactiques

LAB	Origines
Lactobacilles	
<i>Lactobacillus 1</i>	Alimentaire
<i>Lactobacillus 2</i>	Alimentaire
<i>Lactobacillus 3</i>	Alimentaire
<i>Lactobacillus 4</i>	Alimentaire
<i>Lactobacillus 5</i>	Alimentaire
<i>Lactobacillus 6</i>	Alimentaire
Lactocoques	
<i>Lactococcus 1</i>	Alimentaire
<i>Lactococcus 2</i>	Alimentaire
<i>Lactococcus 3</i>	Alimentaire
<i>Lactococcus 4</i>	Alimentaire
<i>Lactococcus 5</i>	Alimentaire
<i>Lactococcus 6</i>	Alimentaire



Les souches Indicatrices



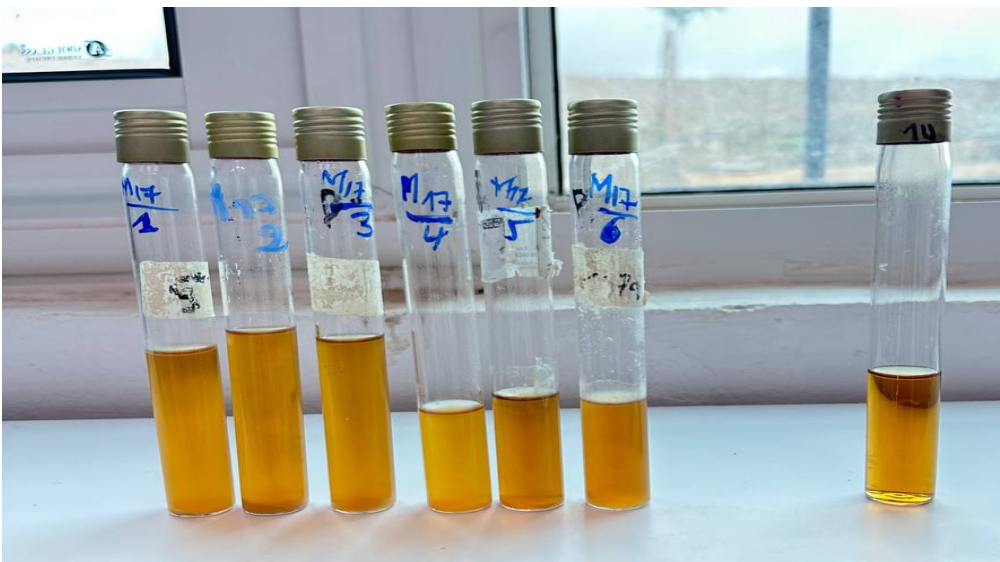
Souches Bactériennes	Caractéristiques (Gram)	Origine
<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella sp</i> <i>Enterobacter sp</i> <i>Salmonella. Sp</i> <i>Pseudomonas sp</i>	G - G - G - G - G-	Liquide d'ascite Urine (ECBU) Urine (ECBU) Eaux potable (Control) Eaux potable (Control)
<i>Staphylococcus sp 1</i> <i>Enterococcus sp</i> <i>Staphylococcus sp. 2</i> <i>Streptococcus sp</i>	G+ G + G + G +	Plaie (infection) Voies urinaires (ECBU) Plaie infectée Liquide d'articulation

Annex III :

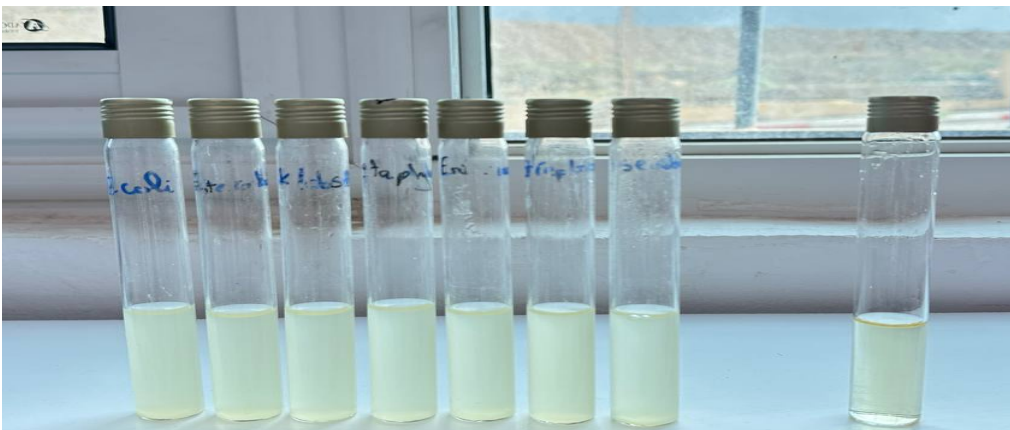
2.1. Réactivation des souches lactobacilles sur MRS



2.2. Réactivation des souches lactocoques sur M17

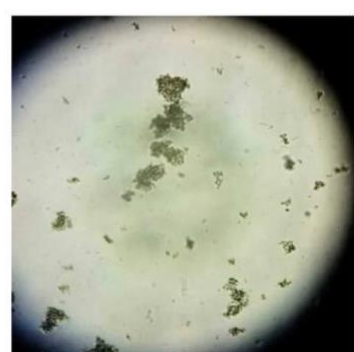
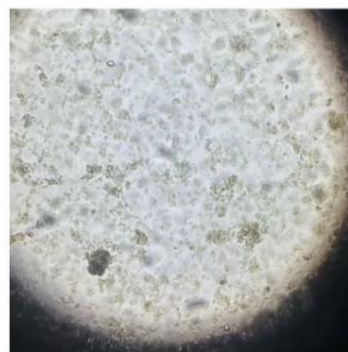


2.3. Réactivation des souches indicatrices sur BN



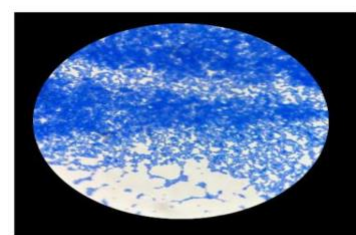
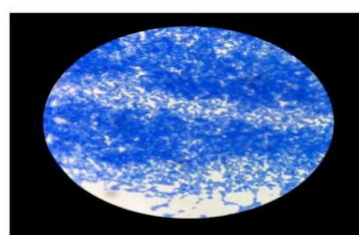
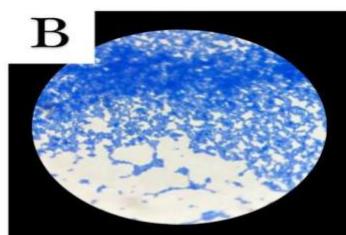
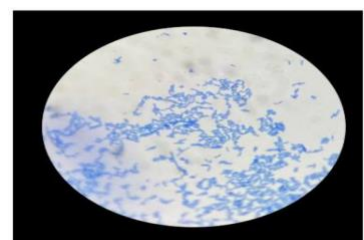
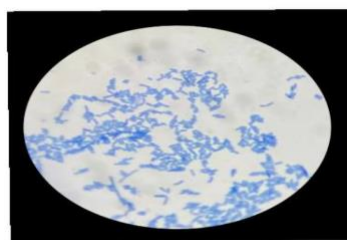
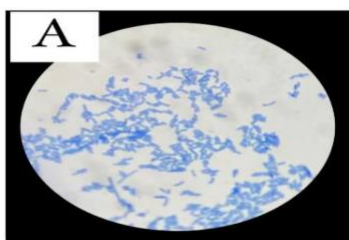
Annex V

1. L'état frais :



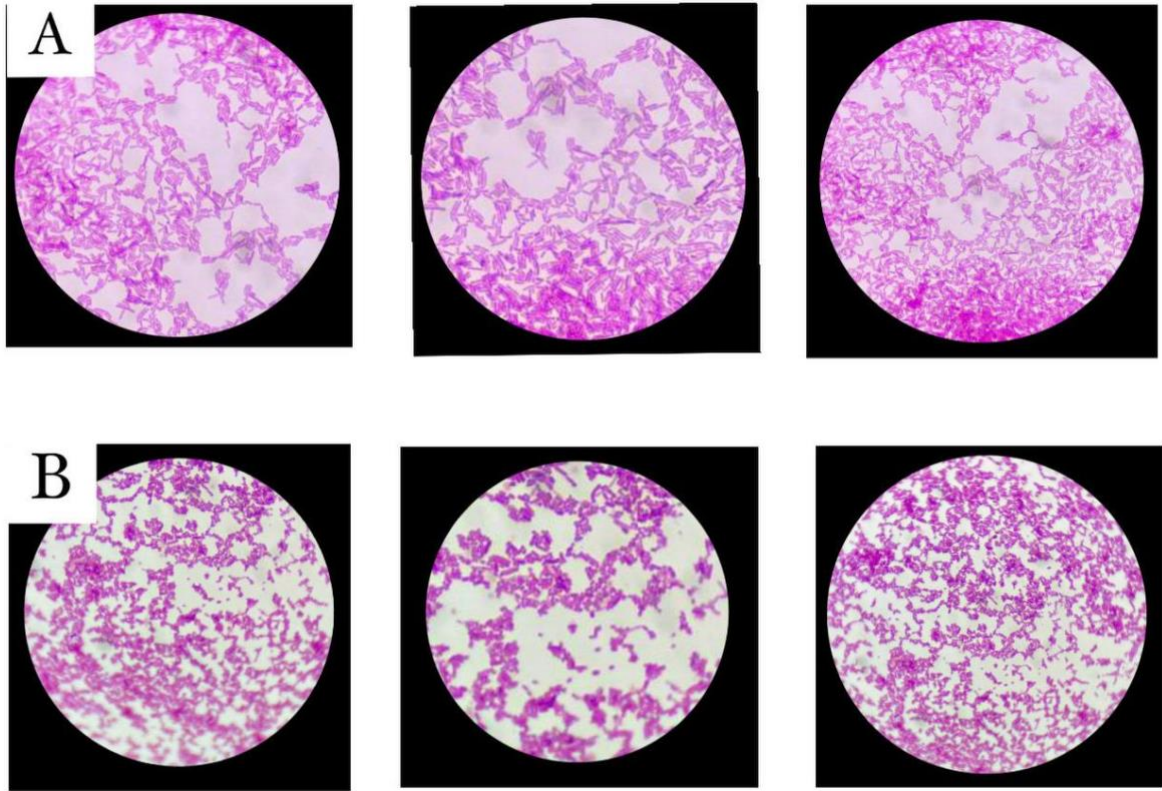
2. Coloration bleu méthylène :

A : lactobacilles, B : lactocoques



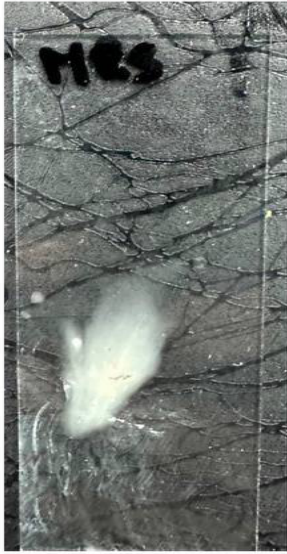
3. Coloration de Gram :

A : lactobacilles, B : lactocoques



Annex IV

1. Test de catalase :



Abstract

The study aimed at the evaluation of bacteriocinogenic effects for 12 lactic strains (LAB), initially isolated from fermented table olives collected in Algeria (6 *Lactococcus* on M17+ and 6 *Lactobacillus* on MRS media). After revivification, purification, and identification, such as lactococci and lactobacilli, strains were partially identified, by conventional bacteriological methods, at the genus level (because of logistics). The antagonism of isolates leads, *in vitro*, on bacteriological Muller Hinton medium, directed against target positive and negative Gram strains. Conducted by two different methods: diffusion on soaked disks and diffusion on agar wells. Results showed that among LAB strains, isolates were bacteriocinogenic, with bactericidal effects directed much more against Gram (+) target strains, with inhibition areas (I.A.). By discs: *Klebsiella sp.*, I.A. measured respectively (Lb1 40 mm, Lb2 58 mm, Lb3 36 mm, Lb4 38 mm). ≠ *Listeria sp.* (32 mm) ≠ *Salmonella sp.* (29 mm). LB4 ≠ *Staphylococcus sp.* (17 mm). LB2 ≠ *Listeria sp.* (49 mm). LB2 ≠ *Staphylococcus sp.* (28 mm). LC3 and *Klebsiella sp.* (50 mm) and LC1 ≠ *Salmonella sp.* (50 mm). By wells, inhibition areas, as follows: LB2 # *Staphylococcus sp.* (15 mm), LB2 # *Enterococcus sp.* (20 mm). Lab: LB2 (25 mm), LB3 (55 mm), LB4 (32 mm). And for LC (LC1 and LC2), # *Klebsiella sp.* (45 mm and 25 mm), respectively. Considered as a strain having inhibited (by bactericidal effect) the growth of the siderophores—indicators with a positive Gram. For both methods, the antagonism results appear to be LAB strain dependent and are not extrapolable/transposable. The best method for exploring antagonism seems to be that of discs.

Résumé

L'objectif de l'étude vise l'évaluation des effets bacteriocinogenes pour 12 souches lactiques (LAB), initialement isolées des olives de table noires d'Algérie (6 Lactocoques sur M17+ 6 Lactobacilles sur MRS), cryoconservées. Après revivification, purification l'identification souches *Lactococcus* et *Lactobacillus* par méthodes bactériologiques classiques s'est abolie au niveau du genre (cause de logistique). L'antagonisme des isolats, conduit *in vitro*, sur milieu gélose Muller-Hinton, dirigé contre souches indicatrices à Gram positif et négatif, par deux méthodes : (celle de diffusion sur disque, diffusion sur puits creusés). Les résultats ont donné des souches LAB, bacteriocinogenes, avec effets bactéricides, dirigées beaucoup plus contre les S.I. à Gram (+), avec zones d'inhibition (Z.I) : Par disques : *Klebsiella sp.*, contre (Lb1=40mm, Lb2=58mm, Lb3=36mm, Lb4=38mm), contre *Listeria sp* (32mm), *Salmonella sp* (29mm). Entre Lb4 et *Staphylococcus sp* (17 mm), entre Lb2 et *Listeria sp* (49 mm) et *Staphylococcus sp* (28 mm). Entre LC3 et *Klebsiella sp* (50 mm) et LC1 contre *Salmonella sp* (50mm). Sur les puits, les résultats des zones d'inhibitions étaient : Lb2 contre *Staphylococcus sp* (15mm), Lb2 contre *Enterococcus sp* (20mm). Large spectre bactéricide. Contre *Klebsiella sp* LAB : Lb2(25mm), Lb3(55mm), Lb4(32mm). Pour les Lc (Lc1 et Lc2) contre *Klebsiella sp* (45mm et 25mm). Pour les deux méthodes, les résultats d'antagonisme semblent souches LAB dépendantes et ne sont pas transposables. La meilleure méthode pour l'exploration d'antagonisme semble être celle des disques.

المخلص

هدف الدراسة هو تقييم التأثيرات الناتجة عن إنتاج المواد المثبطة للبكتيريا (البكتيريوسينات) من قبل 12 سلالة من البكتيريا اللبنية، تم عزلها مبدئياً من الزيتون المصير في الجزائر. تتكون هذه السلالات من ست سلالات من المكورات اللبنية تُميت على وسط تغذية خاص، وست سلالات من العصيات اللبنية تُميت على وسط غذائي مختلف، وقد تم حفظها سابقاً بطريقة الحفظ بالتجميد. بعد الإحياء والتنقية، جرى التعرف على السلالات وتأكيد انتمائها إلى الجنسين المكورات اللبنية والعصيات اللبنية باستخدام طرق بكتريولوجية تقليدية، إلا أن التعرف اقتصر على مستوى الجنس فقط نتيجة لقيود لوجستية. تم اختبار النشاط التثبيطي لهذه السلالات في ظروف مخبرية، باستخدام وسط زراعي مناسب، ضد مجموعة من السلالات المستهدفة موجبة وسالبة لصبغة غرام، وذلك باستعمال طريقتين مختلفتين: طريقة الانتشار بواسطة أقراص ورقية مشبعة، وطريقة الانتشار عبر أبار محفورة في الوسط الصلب. أظهرت النتائج أن جميع السلالات اللبنية (الست من العصيات اللبنية والست من المكورات اللبنية) كانت قادرة على إنتاج مواد مثبطة للبكتيريا، وكان تأثيرها أقوى تجاه السلالات موجبة غرام، وفقاً لما يلي من مناطق تثبيط: ضد بكتيريا كليبسيلا: العصيات اللبنية 1 (40 ملم)، 2 (58 ملم)، 3 (36 ملم)، 4 (38 ملم)، ضد لبيستيريا: 28 ملم (للمكورة 3)، ضد كليسيلا وسالمونيلا: 29 ملم (للعصية 4)، ضد العنقودية: 17 ملم (للعصية 2)، ضد لبيستيريا: 49 ملم، ضد العنقودية: 28 ملم (للمكورة 3)، ضد كليسيلا وسالمونيلا: 50 ملم (للمكورة 1). وباستخدام طريقة الأبار: العصية 2 ضد العنقودية: 15 ملم، العصية 2 ضد المعوية: 20 ملم، بكتيريا كليسيلا كانت حساسة ل: العصية 2 (25 ملم)، العصية 3 (55 ملم)، العصية 4 (32 ملم)، المكورة 1 والمكورة 2 ضد كليسيلا: 45 ملم و 25 ملم على التوالي. تشير هذه النتائج إلى أن السلالات المدروسة تملك قدرة على تثبيط نمو البكتيريا المستهدفة، لا سيما موجبة غرام، من خلال إفرازها لمواد ذات تأثير قاتل للبكتيريا، وقد تبين أن طريقة الانتشار بواسطة الأقراص الورقية المشبعة هي الأكثر فعالية في الكشف عن هذا النشاط التثبيطي.