

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Centre Universitaire - Salhi Ahmed - Nâama

Institut des Sciences et de Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Laboratoire de recherches

Gestion Durable des Ressources Naturelles dans les Zones Arides et Semi-Aride



MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER Académique

En Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté Par :

Saci Ikram-Saci Nawal

Thème

Bio contrôle des champignons toxigènes par les
bactéries lactique isolées à partir de produit terroir de la
région de Naama

Soutenu le :07/07/2022

Devant le jury :

Président	Seddiki Sidi mohamed Lahbib	Professeur	CU-Naama
Examinatrice	Aissaoui Nadia	MCB	CU-Naama
Encadreur	Amrouche Abdel-ilah	Professeur	CU-Naama
Co encadreur	Khiri Zahia	Doctorante	CU-Naama

Année universitaire 2021-2022

Remerciements

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement du Pr. Amrouche Abdel-ilah, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nos remerciements vont également aux membres de jury qui ont accepté d'évaluer ce travail, au président Pr. Seddiki sidi Mohammed El Habib et à madame l'examinatrice Docteur. Aissaoui Nadia.

On tient également à témoigner nos profondes gratitude à l'ensemble des ingénieurs et techniciens des laboratoires du Centre Universitaire Salhi Ahmed Naâma.

Dédicaces

C'est grâce à Dieu, le tout puissant qui nous a donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail que nous dédions:

A nos parents que nulle dédicace ne puisse exprimer nos sincères sentiments pour leur patience illimitée, leur encouragement continu, leur aide, en témoignage de notre profond amour et respect pour leurs grands sacrifices.

A nos très chères sœurs Hadjer, Dounia, Iness, khaira, et Sara qui nous ont aidé et donné le courage.

Atout la famille Saci et Lairedj

A notre encadreur Pr.Amrouche

A nos très chers amis

IKRAM ET NAWAL

المخلص

نظرا لزيادة الطلب على المنتجات الغذائية "الخالية من المواد الحافظة"، أصبح الحفظ البيولوجي بديل واعد لاستبدال أو تقليل استخدام المواد الحافظة الكيميائية. كان الهدف من هذه الدراسة هو عزل سلالات من بكتيريا حمض اللاكتيك ذات النشاط المضاد للفطريات من أجل تطبيق فعاليتها كمزارع واقية ضد الملوثات الفطرية في المنتجات الغذائية. تم عزل هذه البكتيريا من عينات مختلفة وهي لبن النوق وماء الزيتون وحبوب اللقاح. جعلت اختبارات التعريف المورفولوجية والفيولوجية والكيميائية الحيوية من الممكن تصنيف هذه العزلات إلى 8 أنواع :

Enterococcus fecuim و *Enterococcus avuim* و *Pediococcu sp* و *Lactobacillus sp* و

Leuconostoc sp. و *Lactococcus sp* و *Lactococcus lacis ssp lactis*

في سياق مكافحة البيولوجية القائمة على استخدام بكتيريا حمض اللاكتيك ، قمنا باختبار نشاط هذه العزلات على الفطريات المسببة للسموم من خلال اختبارين: اختبار نوعي يتمثل بطريقة المواجهة المباشرة والاختبار الكمي أظهر حساب معدل تثبيط النمو لهذه الفطريات تأثيراً معنوياً يصل إلى 100٪ ضد *Fusarium oxysporuim* و *Fusaruim graminarum* و *Alternaria linaria* و *Alternaria alternata* و *Aspergillus alliaceus* و *Aspergillus parasitucus* و *Aspergillus niger* و *Aspergillus sp* ونوعين من *Penicillium chrysegenum* ، *Penicillium olsonii* ، بفضل هذه القدرات التكنولوجية ، تستحق بكتيريا حمض اللاكتيك دراسة أكثر تعمقاً من خلال تحديد طبيعة هذه المكونات المثبطة للاستغلال كمواد مساعدة محتملة ومفيدة للصناعات الغذائية الزراعية.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك ، المنتجات المحلية ، الحفظ البيولوجي ، الفطريات السامة

Abstract

With the increasing demand for "preservative-free" food products, bio preservation appears to be a promising alternative to replace or decrease the use of chemical preservatives. The aim of this study was to establish a bank of lactic acid bacteria with antifungal activity in order to apply their efficiency as bioprotective cultures against fungal contaminants in food products. These bacteria were isolated from various samples: camel milk, olive margins and pollen grains. Morphological, physiological and biochemical identification tests allowed identifying 8 species: *Enterococcus fecuim*, *Enterococcus avuim*, *Pediococcus sssp*, *Lactobacillus sp*, *Lactococcus lacis ssp lactis*, *Lactococcus sp* and *Leuconostoc sp*.

In the context of biological control based on the use of lactic acid bacteria, we tested the activity of these isolates on toxigenic fungi by two tests: a qualitative test via the direct confrontation method and a quantitative test via the cou-culture method on solid medium. The calculation of the growth inhibition rate of these fungi showed that a significant effect up to 100% against *Fusarium gramnaruim*, *Fusarium oxysporuim*, *Alternaria linaria*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus parasitucus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp* and two species *Penicillium olsonii*, *Penicillium chrysegenum*. Due to these technological abilities, lactic acid bacteria deserve better management in terms of the exploitation of these microorganisms as potential adjuvants for the food industry.

Key words: Lactic bacteria, soil products, bio preservation, toxigenic fungi.

Résumé

L'augmentation de la demande en produits alimentaires «sans conservateur», la bio-préservation apparaît comme une alternative prometteuse pour remplacer ou diminuer l'utilisation des conservateurs chimiques. Cette étude avait comme but de constituer une banque de bactéries lactiques à activité antifongiques afin d'appliquer leur efficacité en tant que cultures bio protectrices contre les contaminants fongiques des produits alimentaires. Ces bactéries ont été isolées à partir de divers échantillons: lait chamelle, la margines d'olive et les grains de pollen. Les tests d'identification morphologique, physiologiques et biochimiques ont permis d'identifier 8 espèces : *Enterococcus fecuim*, *Enterococcus avuim*, *Pediococcus sp*, *Lactobacillus sp*, *Lactococcus lacis ssp lactis*, *Lactococcus sp* et *Leuconostoc sp*.

Dans le contexte de la lutte biologique fondée sur l'utilisation des bactéries lactiques, nous avons testé l'activité de ces isolats sur des champignons toxigènes par deux tests: un test qualitatif représenté par la méthode de confrontation directe et un test quantitatif par la méthode co-culture sur un milieu solide. Le calcul du taux inhibition de la croissance de ces champignons a montré que un effet significatif pouvant atteindre jusqu'à 100% vis-à-vis de *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria linaria*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp* et deux espèces *Penicillium olsonii*, *Penicillium chrysogenum*. Grâce à ces aptitudes technologiques, ces bactéries lactiques méritent une étude plus approfondie en identifiant la nature de ces composants inhibiteurs pour une exploitation comme adjuvants potentiels et utiles pour les industries agro-alimentaires.

Mots clés : bactéries lactique, produits terroires, biopréservation, champignon toxigène.

Liste des abréviations :

- **LAB** : Bactéries lactiques
- **UFC** : Unité formant colonie
- **MRS** : Gélose de Man Rogosa et Sharpe
- **ISO** : International Standardisation Organisation
- **OTA** : Ochratoxine
- **CATC** : Citrate Aside Tween Carbonate Agar
- **AFB1** : Aflatoxine B1
- **YMA** : Yeast Milk Agar
- **FAO** : Organisation des Nations unies pour l'alimentation L'agriculture
- **DLC** : Date Limite de Consommation
- **mL** : millilitre
- **NaCl** : Chlorure de sodium
- **spp** : plusieurs espèces
- **ADH** : arginine dihydrolase
- **DO** : densité optique
- **GRAS** : Generally Recognizes As Safe

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Habitat des <i>Lactobacillus</i>	11
Tableau 2 : Caractères différentiels des différents genres de bactéries lactiques	15
Tableau 3 : Exemples des <i>Fusarium</i> producteurs de mycotoxines	21
Tableau 4 : Les principales mycotoxines et les limites imposées par les États-Unis et l'Union Européenne aux niveaux des denrées alimentaires et des aliments pour animaux	22
Tableau 5 : résultats des caractères physiologiques et biochimiques des isolats Lactiques	40
Tableau 6 : Résultats de confrontation directe	48

Liste des figures

Figure 1 : Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques...	07
Figure 2 : Schéma montrant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques y compris des différents genres apparentés	09
Figure3 : Aspect microscopique du genre <i>Lactobacillus</i>	10
Figure 4 : <i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i> au microscope électronique	11
Figure 5 : <i>Leuconostoc cremoris</i> au microscope électronique	12
Figure6 : <i>streptococcus thermophilus</i> au microscope électronique	13
Figure 7 : Aspect microscopique de <i>Bifidobacterium</i>	14
Figure 8 : aspect microscopique <i>Enterococcus faecalis</i>	14
Figure 9 : <i>Aspergillus flavus</i>	19
Figure 10 : <i>Penicillium pinophilum</i>	20
Figure11 : <i>Fusarium graminearum</i>	21
Figure 12 : <i>Alternaria infectoria</i>	22
Figure 13 : Photos échantillonnage A : Grain de pollen, B : margine d'olive, C : lait de chamelle	28
Figure14 : Technique de conservation de courte durée des bactéries lactiques	29
Figure15 : A : Schéma démonstratif B : photo de la méthode de confrontation directe	35
Figure 16 : résultats macroscopique des isolats sur différents milieux (A : milieu M17, B : milieu MRS, C : milieu CATC)	37
Figure 17 : Observation microscopique des isolats lactiques Grossissement *100	37
Figure 18 : résultat de différent test physiologique des isolats 1 : test pH, 2 : test température, 3 : test concentration NaCl	38
Figure 19 : Résultats des tests biochimiques A : test fermentation des sucres par isolats, B : Test citrate de Simmons, C: test mobilité, D: test ADH, E: type fermentaire, F:hydrolyse l'esculline	39
Figure 20 : Capacité de production de l'acide lactique dans le laitensemencé par souches isolée	42
Figure 21 : Aspect de coagulation du lait par les souchesensemencées (A : gel ferme, B : témoin)	43
Figure 22 : Confrontation directe par les LAB contre <i>F.graminarum</i> (A) Témoin (B) résultat positif (C) résultat négatif	43

Figure 23 : résultats confrontation directe <i>Aspergillus niger</i>	44
Figure 24 : Confrontation direct contre <i>Aspergillus</i> sp	44
Figure 25 : Confrontations directes par les LAB contre <i>Penicillium</i> (A) Témoin (B) résultat négatif (C) résultat positif	45
Figure 26 : Résultat de test quantitatif des souches fongiques : (A) <i>Alternaria linaria</i> (B)	46
Figure 27 : Résultat de test quantitatif d' <i>Aspergillus niger</i>	47
Figure 28 : Courbe représentatif des taux d'inhibition de la croissance mycélienne par la méthode co-cultures sur un milieu solide entre les souches fongiques et les souches bactériennes.	47

TABLE DES MATIERES

Remerciement	I
Dédicace	II
المخلص	III
Abstract	IV
Résumer	VI
Liste des abréviations	VII
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures	IX
Table de matière	X
Introduction	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I. Synthèse bibliographie	5
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	26
II.1 Première partie : Isolement, Identification et caractérisation des bactéries lactique :	27
II.1.1.Échantillonnage	27
II.1.2. Isolement	28
II.1.2.1.Isolement des bactéries lactiques : (Lait de chamelle)	28
II.1.2.2. Isolement des bactéries lactiques à partir de grain de pollen	28
II.1.2.3. Isolement des bactéries lactiques à partir de margine d'olive	29
II.1.3.Purification	29
II.1.4.conservation à court terme	29
II.1.5. Caractérisation morphologique	29
II.1.5.1.Examen macroscopique	29
II.1.5.2.Observation microscopique	30
II.1.5.2.a. État frais	30
II.1.5.2.b.Coloration de Gram	30
II.1.6.Caractérisation physiologique	30
II.1.6.1.Croissance à différentes températures	30
II.1.6.2. Etude thermo résistance	30
II.1.6.3. Croissance à différent concentration de Na Cl.	30
II.1.6.4.Croissance à différent pH	30
II.1.7.Caractérisation biochimique	31
II.1.7.1. Recherche de la catalase	31
II.1.7.2.Détermination du type fermentaire	31
II.1.7.3. Hydrolyse de l'esculine	31
II.1.7.4.Utilisation de citrate	31
II.1.7.5.Hydrolyse de l'arginine (ADH)	31
II.1.7.6.Test de mobilité (Mannitol)	32
II.1.7.7.TSI (Triple Suger Iron.)	32
II.1.7.8. Inoculation de la galerie API 20Strep	32
II.1.8. Caractérisation technologique et enzymatique	33
II.1.9.1.Pouvoir acidifiant	33
II.1.9.2. Activité amylolytique	33

II.1.9.3.Activité lipolytique	33
II.1.9.4.Activité protéolytique	34
II.1.9.5.Pouvoir coagulant	34
II.2.Deuxième partie : L'activité antifongique	34
II.2.1.Test qualitatif	34
II.2.2.Test quantitatif (Co-culture sur milieu solide)	35

CHAPITRE III : RESULTATS

CHAPITRE III : RESULTATS	36
III.1. Isolement et Identification et caractérisation morphologique des bactéries lactique	37
III.1.1.Isolement et caractérisation morphologique	37
III.1.2. Caractérisation physiologique.	38
III.1.3. Caractérisation biochimique	38
III.1.4. Caractérisation technologique et enzymatique.	41
III.2.Deuxième partie : Résultat l'activité antifongique	44
III.2.1.résultat test qualitatif	46
III.2.2.résultat de test quantitatif	46

CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE

CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE	49
Discussion générale	50
Conclusion et perspectives	56
Référence bibliographique	59
Annexes	

Introduction Générale

Dans un monde en pleine mutation, la sécurité des aliments et la sécurité des approvisionnements vivriers demeurent essentiels dans la plupart des pays. Elles ont fait l'objet d'intenses efforts internationaux et nationaux ces dernières années. Régulièrement placée sous les feux de l'actualité, la sécurité alimentaire est devenue donc la principale préoccupation de l'industrie agroalimentaire et des professions de santé considérant à la fois l'aliment source et vecteur de toxique (**Zineddine, 2004**).

La contamination fongique compte parmi les principales causes de détérioration des denrées alimentaires, surtout après la découverte des mycotoxines produites par ces micro-organismes qui n'a fait qu'accentuer les soucis des agriculteurs, des industriels, des scientifiques et du simple consommateur (**Castagnero et al., 2002**).

Véritables adversaires subtils, les moisissures constituent un inoculum tranquille, invisible, dormant et pourtant susceptible de produire des effets très dommageables, voir catastrophiques lorsque les conditions deviennent favorables. Adversaires encore subtils plus lorsque les dommages visibles aux matières ont été gommés par des procédés de transformation, faisant disparaître les signes perceptibles de l'activité des moisissures sans éliminer pour autant les principes toxiques, souvent très stables, qui ont pu être formés auparavant et empêchant du même coup toute recherche de corrélation entre présence de moisissures et risque mycotoxique (**El khoury, 2007**).

La présence des moisissures dans un produit alimentaire (notamment céréale, le café, les légumes, les fruits lait, viande) peut l'altérer et conduire à l'accumulation des métabolites secondaires toxiques *via* leur prolifération et la production des mycotoxines avant ou après la récolte, pendant le stockage, lors du transport ou bien durant leur transformation (**Laref, 2014**).

La préservation des aliments repose essentiellement sur la prévention et/ou l'inhibition du développement des micro-organismes contaminants. La contamination des denrées alimentaires par des champignons mycotoxigéniques engendre de graves problèmes de santé en raison de la production d'une variété de mycotoxine, dont certains présentent des défis considérables en matière de sécurité alimentaire (**Sadiq et al., 2019**).

Les méthodes de préservation physique et chimique provoquent des altérations de qualité nutritionnelle et organoleptique des aliments. Face à ce problème, la recherche scientifique s'est orientée vers une approche qui est la bio-préservation, c'est-à-dire l'application de micro-organisme et/ou leurs métabolites pour prévenir la détérioration et pour prolonger la durée de conservation des denrées alimentaires (**Gould, 2000 ; Singh, 2018**).

L'utilisation des bactéries lactiques (LAB) pour la conservation est l'une des approches plus anciennes et les mieux caractérisées (**Siedler et al., 2019**), elles jouent un rôle important dans la préparation, la conservation, la transformation de nombreux aliments fermentés ce qui leur confère le statut GRAS*Generally Recognized As Safe*.

De nombreux représentants de ce groupe ont montré une activité antagoniste élevée contre souche pathogène (**Matevosyan et al., 2019**). Ces agents antagonistes sont capables d'assurer la bio-préservation et pourraient permettre la réduction de l'utilisation des produits chimiques dans les aliments.

Devant la problématique grandissante de la contamination fongique, la production des mycotoxines et l'émergence d'un sentiment d'insécurité, l'on assiste de plus en plus à l'installation de nouvelles stratégies préventives visant à limiter la contamination fongique, réduire voire empêcher la production des mycotoxines. Selon (FAO), la contamination par ces moisissures toxigènes limite la durée de conservation et est à l'origine de 5 à 10% des pertes durant la récolte sur le plan mondiale. Elle provoque aussi des modifications physiques et nutritives (**Laref, 2014**).

Dans ce but de lutte contre ces contaminants, de nombreux chercheurs se sont orientés vers des alternatives de réductions ou de lutte contre cette contamination, telle que la lutte naturelle fondée sur l'utilisation des différents métabolites des plantes médicinales et surtout l'utilisation des LAB ou bien leurs métabolites en vue d'une contribution à leur valorisation, en raison de leurs efficacités, et leurs coûts moins élevés par rapport aux autres méthodes de réductions.

En adéquation à ces recherches, nous nous sommes proposés de voir l'efficacité antifongique de certaines souches lactiques isolées de produits terroirs de la région de Naâma en vue d'évaluer leurs efficacités antifongiques, et de ce fait confirmer ou infirmer si ces LAB peuvent être utilisées comme agents de conservation des denrées alimentaires et leur attribuées ainsi le titre d'alternative aux conservateurs chimiques.

Dans ce contexte, le travail que nous proposons est structuré en trois parties : la première partie est consacrée à une synthèse bibliographique décrivant des généralités sur les bactéries lactiques et leur aptitude technologiques et aussi sur les champignons et leur toxine. La seconde partie représente l'étude expérimentale exposant la méthodologie engagée pour mener à bien cette étude. Le principe méthodologique repose sur l'isolement et la caractérisation morphologique, physiologique, biochimique et technologique des bactéries lactiques.

La dernière partie est réservée aux résultats et discussion. Finalement, une conclusion générale permet de récapituler les principaux résultats de ce travail et d'énoncer des perspectives.

Synthèse bibliographique

La contamination des denrées alimentaires par des champignons toxigènes est un problème grave et difficile à gérer car il conduit à d'énormes pertes économiques. Les mycotoxines ont été reconnues comme l'un des polluants les plus dangereux dans l'alimentation. De nombreuses méthodes physiques et chimiques ont été développées dans le but d'inhiber la prolifération fongique dans les aliments et après moult essais il a été conclu que la clé du mystère repose entre les mains c'est la protection naturelle qui impliquent l'utilisation des bactéries lactiques (LAB) qui s'avère être une arme efficace dans la lutte contre la croissance fongique, et qui présente un intérêt majeur pour l'améliorations de la qualité et de la sécurité alimentaires (**Tikoudane & Yahia, 2020**). Les LAB, non seulement connues pour leur innocuité, mais aussi pour leurs activités antimicrobiennes, pourraient permettre la réduction de l'utilisation des produits chimiques dans les aliments (**Djossou et al., 2011**).

Ces bactéries sont un groupe hétérogène de microorganisme produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme (**Dortu & Thonart, 2009**). Leur apports bénéfiques contribuent à l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans altération du goût ni de l'odeur, et en augmentant leur durée de conservation. Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antifongique tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines.

Historiquement, les bactéries lactiques ont été définies comme un groupe des bactéries ubiquitaires et hétérogènes qui peuvent fermenter les sucres en acide lactique principalement. Ce sont des bactéries à Gram-positif, généralement catalase négative, dépourvus de cytochromes-oxydase et de nitrate-réductase, microaérophiles, organotrophes, strictement fermentatives, acido-tolérantes, asporulantes, de forme bacillaire ou coccoïde. Ces bactéries sont caractérisées par leur morphologie, leur physiologie et leur métabolisme, elles peuvent croître à un pH allant jusqu'à 4,5 et à une température comprise entre 10°C et 45°C (**Pringsulaka et al., 2011**). Elles occupent différents habitat, de nombreux milieux naturels, des végétaux (plantes et fruits), des animaux et des humains (cavité vaginale et buccale, viande et le lait). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont pas trouvées ailleurs (**Djermane, 2020**). Généralement, ces LAB sont associées à des habitats riche en nutriment et sont impliquées dans un grand nombre de fermentation spontanée des produits alimentaires. (**Axelson, 2004 ; Dortu et al., 2008**). Pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles).

Les LAB sont capables de dégrader une large gamme d'oses comme le lactose et le galactose pour les produits laitiers, mais aussi le saccharose, le maltose, le glucose, le fructose et des a-galactosides pour les produits d'origine végétale (**Avagodo, 2004**).

La conversion des sucres en acide lactique est une étape principale de la voie métabolique qui fournissant l'énergie aux bactéries lactiques et impliquée dans la production d'une grande quantité de molécules conférant des propriétés organoleptiques particulières aux produits finaux (**Avagodo, 2004**). Ces LAB se divisent en deux groupes différents selon les voies métaboliques empreintes pour fermenter le glucose :

- Homofermentaire : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose
- Hétérofermentaire facultatif : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique, l'acide lactique et l'acide acétique. (**Belarbi, 2011**)

Les bifidobactéries ne produisent ni l'acide butyrique ni l'acide propionique et le CO₂ est synthétisé seulement lors de la dégradation du gluconate (**Scardovi, 1986**). Toutefois, certaines souches de bifidobactéries vont produire plus d'acide acétique et moins d'acide lactique. Le surplus d'acide acétique formé provient d'une autre voie métabolique des bifidobactéries qui convertit le pyruvate en acide formique et en acétate plutôt qu'en acide lactique. Par suite, une partie de l'acide acétique est transformé en éthanol (**De Vries et Stouthamer, 1968 ; Lauer et Kandler, 1976**).

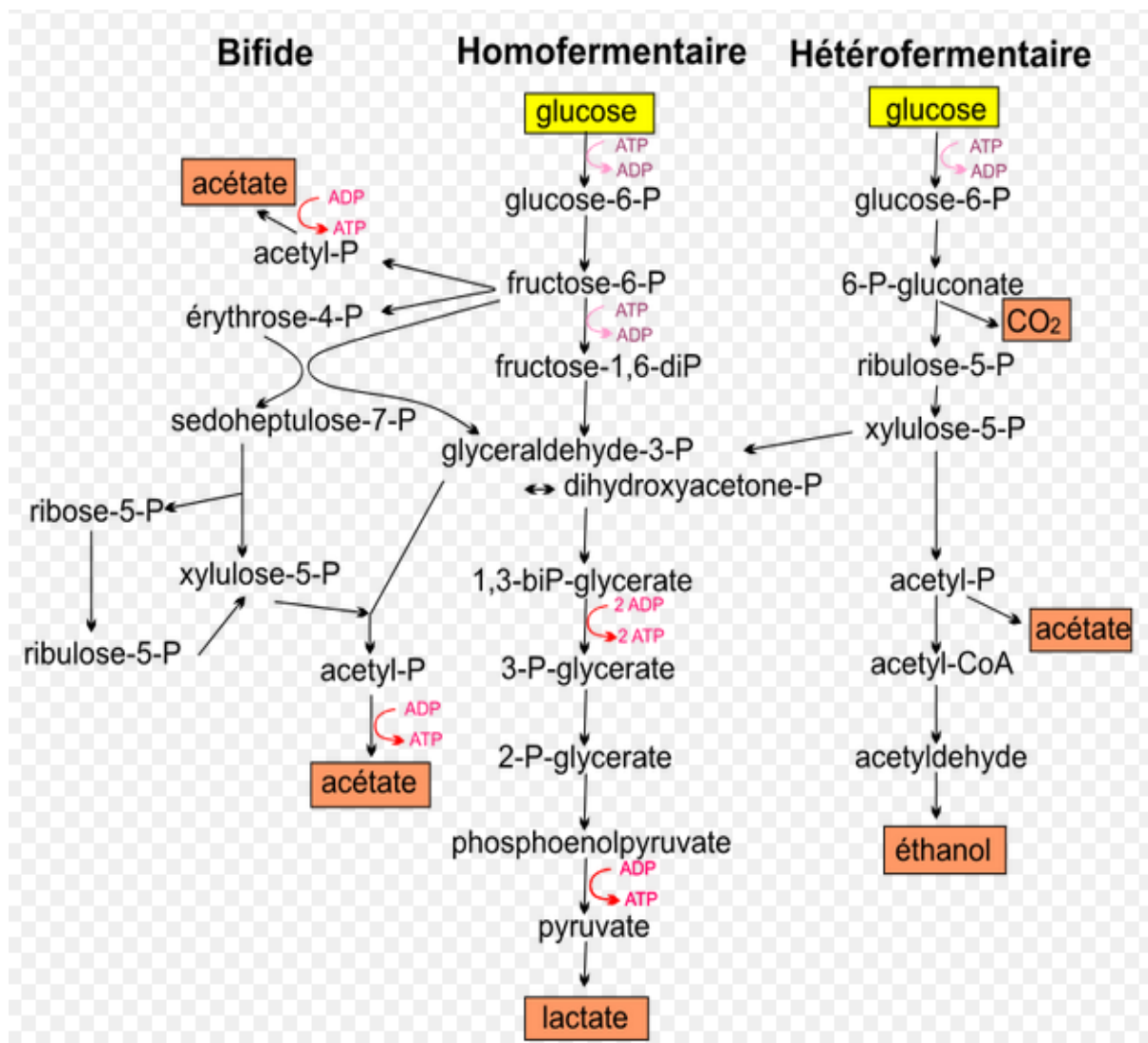


Figure 1. Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques (Drider et pryost,2009)

Vis-à-vis des exigences nutritionnelles, les LAB sont très exigeants et requièrent plusieurs substrats complexes azotés, phosphatés et soufrés mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les cations (Mami, 2013)

1-Exigences en acides aminés : Les LAB sont incapables d'effectuer la synthèse à partir d'une source azotée minérale simple donc elles exigent un apport exogène d'acides aminés pour leur croissance. Ces besoins en acides aminés sont cependant variables d'une souche à une autre. D'une manière générale, il y a des souches moins exigeantes (6 acides aminés au maximum)

alors que d'autres sont auxotrophes et requièrent un très grand nombre d'acides aminés (Kassas, 2017).

2-Exigences en vitamines: les LAB sont incapables de synthétiser certaines vitamines indispensables à leur croissance et qui doivent être fournies par le milieu de culture. Les exigences sont très variables, y compris au sein d'une même espèce. On distingue les vitamines dont le besoins est absolu et stimulent la croissance et celles ayant peu d'effet sur la croissance. Généralement, les exigences des LAB portent souvent sur des vitamines du groupe B tel que la niacine, la riboflavine et l'acide pantothénique (Kassas, 2017).

3-Exigence en bases azotés : les LAB exigent la présence des bases azotées qui peuvent être stimulantes pour leur croissance et sont très variables selon les souches. Ces exigences proviennent de l'absence d'enzymes impliquées dans le métabolisme des pyrimidines et des purines. Les LAB thermophiles présentent une exigence absolue pour: adénine, guanine, uracile et xanthine (Kassas, 2017).

4-Influence des cations : les éléments minéraux jouent un rôle essentiel dans la croissance des LAB et précisément dans les activités enzymatiques bactériennes. Certaines espèces ne peuvent pas croître en absence d'ions minéraux, ce qui indique l'exigence absolue pour ces éléments, à titre d'exemple le magnésium est le principal cation divalent des cellules vivantes et un activateur des différentes réactions métaboliques: division cellulaire, stabilisation des acides nucléiques ou hydrolyse peptidique. Cet ion est indispensable pour la croissance de quelques LAB (Kassas, 2017).

Pour la classification, Orla-Jensen a proposé une classification pour ces bactéries fondée sur les caractères morphologique, biochimique et physiologique (Température de croissance, mode de fermentation du glucose et la forme de l'acide lactique produit), leur classification constitue le centre d'une étude taxonomique intense avec une urgence croissante pour une approche polyphasique, caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries (Orla-Jensen, S. 1919 ;Stiles & Holzapfel, 1997).

La classification phénotypique des bactéries lactiques est basée essentiellement sur la morphologie cellulaire des bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et des coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella* est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques. Cette classification regroupe le type fermentaire, les températures de croissance, l'utilisation des sucres, la tolérance à de hautes concentrations de sel, la capacité de croître dans des pH acide ou alcalin, la nature de l'acide lactique, l'hydrolyse de l'arginine, la formation de l'acétoïne, la production des polysaccharides extracellulaires etc... (Lahtinem et al., 2012).

Par ailleurs, une classification selon la composition de la paroi cellulaire incluant la nature des acides gras qui la composent, a été proposée par König & Fröhlich (2009).

Une autre classification, basée sur la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides, a subdivisé les LAB en trois groupes (McLeod et al., 2008) :

- ❖ **Le groupe I** : renferme majoritairement les homofermentaires.
- ❖ **Le groupe II** : contient les bactéries hétérofermentaires
- ❖ **Le groupe III** : qui occupe une position intermédiaire entre les groupes I et II, renferment ainsi des espèces capables d'être soit homo- ou hétérofermentaires selon les conditions environnementales (McLeod et al., 2008).

En ce qui concerne la classification génotypique, les caractéristiques moléculaires tels que la teneur en GC de l'ADN, les propriétés électrophorétiques des produits génétiques, ADN : études d'hybridation d'ADN et structures et séquence de l'ARN ribosomal (ARNr) sont devenues d'importants outils taxonomiques. Cette classification a révolutionné la taxonomie des bactéries, et la classification des LAB a été profondément modifiée et ce qui a permis une identification pratique plus simple et rapide (Salminen et al., 2004).(figue2)

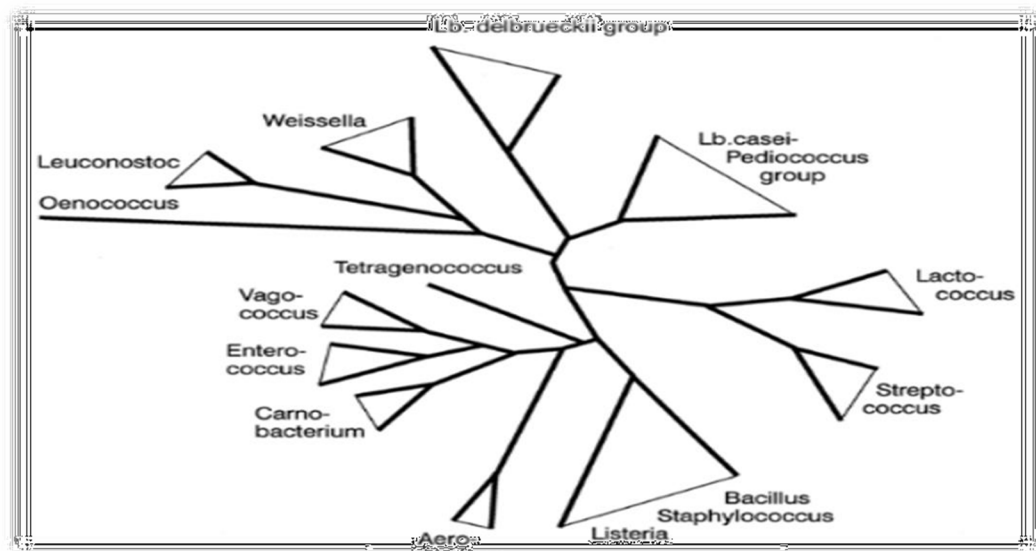


Figure 2. Schéma montrant l'arbre phylogénétique des bactéries lactiques y compris des différents genres apparentés (Axelsson, 2004).

D'après (Ludwig et al., 2008), les LAB sont regroupées dans le phylum *Firmicutes*, classe Bacilli, et sont divisées en 3 familles :

- Famille des *Lactobacillaceae* comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*
 - Famille des *Leuconostocaceae* contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
 - Famille des *Streptococcaceae* comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*
- Aussi le genre *Bifidobacterium* considéré comme faisant partie du groupe des LAB grâce à sa similarité de ses propriétés biochimiques et physiologiques et sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal

□ Lactobacillus :

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont très utiles en microbiologie alimentaire et notamment dans la nutrition humaine en raison de leur contribution à la production des aliments fermentés ainsi que leur utilisation comme probiotiques dans les produits pharmaceutiques (Foschi et al., 2016). Le genre *Lactobacillus* est le principal genre et de loin le plus grand et le plus diversifié de la famille de *Lactobacillaceae* (Figure 3), il comprend 158 espèces, sept de ces espèces sont réparties en 18 sous-espèces, occasionnellement réduisent le nitrate, utilisent le lactose, le glucose et d'autres sucres comme source de carbone, produisent du lactate et peuvent se développer dans des environnements à faible pH et inhibent la croissance d'autres microorganismes (Al kassaa et al., 2014 , Herbel et al., 2013, Arena et al., 2014 ;Raman et al., 2016).

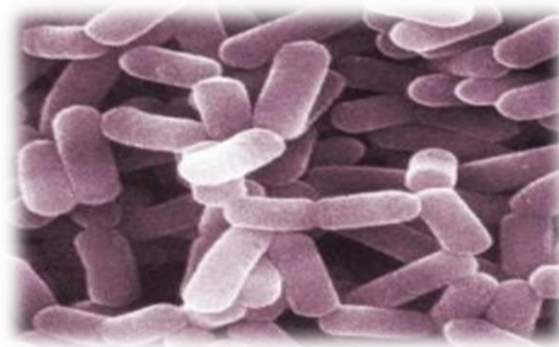


Figure 3. Aspect microscopique électronique du genre *Lactobacillus* (Kechagia et al., 2013).

Orla-Jensen en 1919 a subdivisé le genre de *Lactobacillus* en trois groupes selon la morphologie et la température de croissance en : *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, et *Betabacterium* (Guiraud, 2003) :

Le groupe Thermobacterium : comprend les lactobacilles homofermentaires obligatoires, fermentent le glucose et le gluconate sans production de CO₂. Se développe à 45°C et non à 15°C. Parmi les espèces les plus fréquentes : *Lactobacillus helveticus*, *L.jugurti*, *L.bulgaricus*, *L.lactis*, *L.acidophilus*, *L.leichamni*, *L.delbrueckii*, *L.kifirofaciens*, *L.malir*

Le groupe Betabacterium : comprend les lactobacilles hétérofermentaires stricts qui sont *Lactobacillus fermentum*, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. viridiscens*, *L. kefir*, *L.fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. sanfrancisco*.

Le groupe Streptobacterium : regroupe les lactobacilles homofermentaires mais qui peuvent être hétérofermentaires facultatives en fonction du substrat. Ce sont des mésophiles qui se développent à 15°C, le CO₂ est dégagé lors de la fermentation de gluconate et non produit lors

de la fermentation du glucose. Il comporte les espèces *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. sake*, *L. acetotolerans*, *L. graminis* *L.rhamnosus*...

Les différentes niches écologiques où les lactobacilles ont été isolés sont mentionnées dans le tableau suivant :

Tableau 1. Habitat des *Lactobacillus* (Perry et al., 2004).

Habitat	Espèces rencontrées	Activité ou produit
Matériel végétal en Décomposition	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb.acidophilus</i> ,	Cornichons, ensilage et choucroute
Laiterie	<i>Lb. delbrukii</i> , <i>Lb. lactis</i>	Fromage, yoghourts, etc .
Tractus gastro-intestinal des animaux	<i>Lb. salivarius</i> <i>L. gasseri</i> , <i>L.</i> <i>rhamnosus</i>	
-(Oral)	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb plantarum</i> ,	Formation de Carie
-(Intestinal)	<i>Lb. gasseri</i>	dentaire Flore normale
Vagin des mammifères	<i>Lb. Vaginalis</i> <i>Lactobacillus spp.</i>	Flore normale

□ *Lactococcus* :

Le genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces (**figure4**). L'espèce *Lactococcus lactis subsp. lactis* est isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et est reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé (**Sandine, 1988**). Elles sont généralement micro-aérophiles et se développent à 30°C. Leur fermentation des sucres est homolactique et donne de l'acide lactique comme produit final (**Sun et al., 2014**).

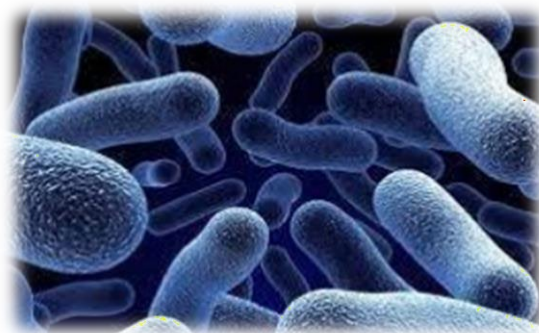


Figure 4. *Lactococcus lactis subsp cremoris* au microscope électronique (Pot, 2008)

□ *Leuconostoc*

En 1878 Van Tieghem fait la première description du genre *Leuconostoc* (Zhang & Cai, 2014). La famille des *Leuconostocaceae*, contient des coques ovoïdes (Figure 5) à Gram positif pouvant être allongés ou elliptiques. Ils se disposent en paire ou en chaîne et sont exigeantes du point de vue nutritionnel. Leur croissance est toujours lente, dont l'optimum est de 20 à 30 °C (Bjorkroth et al., 2006). Elles produisent du diacétyl de l'acétoïne, et du CO₂ à partir du citrate du lait mais plus efficacement chez *Leuconostoc mesenteroides subsp. Cremoris* (Khedid et al., 2006) Ce sont des producteurs d'arôme dans l'industrie laitière, et leur métabolisme gazogène est responsable de la formation des ouvertures (yeux) dans les fromages bleus. Du point de vue physico-chimique, les *Leuconostoc* colonisent des écosystèmes très variés tels que les végétaux (intact ou pourrissant) et les animaux (lait, appareil digestif..).

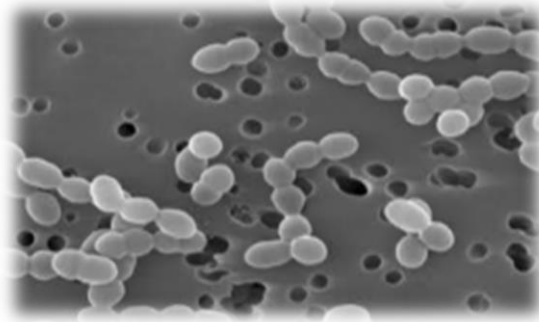


Figure 5. *Leuconostoc cremoris* au microscope électronique (Ogier et al., 2008).

□ *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est vaste et sa classification est en remaniement constant. Généralement, il est divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *S. salivarius*, *S. bovis*) et les autres streptocoques. Ce genre est immobile, sphérique ou ovoïde avec un diamètre inférieur à 2 µm, une disposition en paires ou en chaînes longues (Figure 6) et un contenu en G+C de 35 à 46% (Pilet et al., 2005). La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est de 37 °C (Sun et al., 2014). L'espèce thermophile qui est utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* incluses dans le groupe des « autre streptocoques » par Scheilfer & Kilpper-Bälz (1987). Du fait par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène seul cette espèce est considérée comme appartenant aux bactéries lactiques (Sun et al., 2014).

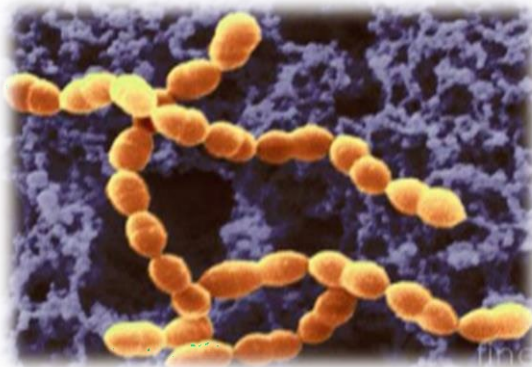


Figure 6 .*Streptococcus thermophilus* au microscope électronique (Furet et al., 2004)

Pediococcus

Le genre *Pediococcus* sont des coques groupées en paires ou en tétrades, mésophiles, homofermentaires, et le plus souvent incapable d'utiliser le lactose. Ils ont été parmi les premières bactéries étudiées par Louis Pasteur en relation avec leur rôle dans la détérioration de la bière. Certaines souches peuvent présenter une activité pseudo-catalase sur des supports à faible teneur en hydrates de carbone (Weiss, 1992). Elles sont immobiles, et ne forment pas de spores ou de capsules. La température de croissance optimale est de 25 à 35 °C, mais dépend de l'espèce. Ces pédiocoques sont capables de croître à pH 5 (Mahamedi, 2015).

Bifidobacterium

Le genre *Bifidobacterium* sont des bacilles à Gram positif, non mobiles, ne produisent pas du gaz et ne forment pas de spores (Figure 7). Elles sont des anaérobies mais quelques espèces tolèrent l'O₂ dans la présence ou non du CO₂. Ces bactéries sont dépourvues de catalase, dégradent le saccharose en produisant de l'acide acétique et l'acide lactique sans production du gaz. Le glucose est dégradé exclusivement et particulièrement par la voie de Fructose-6-phosphoketolase (F6PPK). Le contenu en G+C est de 61% (Mattarelli & Biavati, 2014). Elles sont considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007 ; Sun et al., 2014).



Figure 7. *Bifidobacterium ssp* (Wallace et al., 2003)

- **Entérocoque**

Le genre *entérocoque* a été utilisé la première fois par Thiercelin (1899) pour décrire un diplocoque Gram-positif d'origine intestinale qui se présente sous forme de paires ou en petites chainettes (**Figure 8**) (**Boussouar, 2017**). Les entérocoques sont généralement catalase négative; des chimio-organotrophes avec un métabolisme fermentaire, des homofermentative avec l'acide lactique L(+) qui est le produit final prédominant du métabolisme des glucides. Les milieux de culture complexes sont nécessaires pour leur croissance où la température optimale est de 37 °C, mais de nombreuses espèces peuvent se développer à des températures allant de 10°C à 45°C (**Švec & Franz, 2014**). Ils sont largement répartis entre le tube digestif de l'homme, les autres mammifères, les oiseaux, les reptiles, les insectes, les plantes, le sol et l'eau.



Figure 8. *Enterococcus faecium* au microscope électronique (Wallace et al., 2003).

L'ensemble des caractères phénotypiques différentiels des genres appartenant aux LAB sont regroupées dans le tableau 1.

Tableau 2. Caractères différentiels des différents genres de bactéries lactiques (Axelsson, 2004).

Genre	Caractère									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Carnobacterium</i>	-	-	+	-	ND	-	ND	-	L	9
<i>Lactobacillus.</i>	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	D,L,DL	104
<i>Aerococcus</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	L	6
<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	+	-	+	+	L	33
<i>Lactococcus</i>	-	-	+	-	-	-	+/-	-	L	5
<i>Vagococcus</i>	-	-	+	-	-	-	+/-	-	L	6
<i>Leuconostoc,</i>	-	+	+	-	+/-	-	+/-	-	D	14
<i>Oenococcus</i>	-	+	+	-	+/-	-	+/-	-	D	2
<i>Pediococcus</i>	+	-	+/-	+/-	+/-	-	+	-	L,DL	10
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	+/-	-	-	-	-	L	65
<i>Tetragenococcus</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	L	4
<i>Tetragenococcus</i>	-	+	+	-	+/-	-	+/-	-	D,DL	11

1 : formation de tétrades ; **2** : production de CO₂ ; **3** : croissance à 10°C ; **4** : croissance à 45°C ; **5** : croissance à 6,5% NaCl ; **6** : croissance à 18% NaCl ; **7** : croissance à pH 4,4 ; **8** : croissance à pH 9,6 ; **9** : type d'acide lactique ; **10** : nombre d'espèces identifiées

L'utilisation de ces genres pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques.

- **Activité acidifiante**

Cette activité métabolique est essentielle chez les bactéries lactiques. Elle résulte de la transformation du lactose (ou d'un autre sucre assimilable) en acides organiques, ce qui conduit à l'acidification du produit. Elle conditionne l'aptitude coagulante du lait et assure l'inhibition des microorganismes indésirables (Bougherra, 2012).

Les conséquences d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi:

-accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés ;

- abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires ;
- Limitation des risques de développement des flores pathogène et d'altération dans les produits finaux ;
- déstabilisation des micelles de caséine, coagulation du lait et participation à la synérèse.

Pour un ferment donné, il permet une vitesse d'acidification élevée et/ou atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Le niveau d'acidité dépend des spécifications du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches (**Allaouche & smaoun ,2017**).

- **Activité aromatisante**

Les bactéries lactiques peuvent produire de nombreux composés aromatiques, (tels que : l'acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses (**Benyoucef ,2018**). Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne. (**Allouache & Samouan, 2017**).

- **Propriétés enzymatiques**

Le système protéolytique est considéré comme étant l'événement biochimique le plus important durant la maturation fromagère (**Lane & Fox, 1997**). Les LAB sont incapables de synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique. Pour cela, elles nécessitent un fonctionnement actif de leur système protéolytique dans les environnements où les protéines constituent la principale source d'azote (**Law & Haandrikman, 1997**). Leur systèmes protéolytiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse des protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés (**Kamaly & Marth, 1989**). Ces derniers sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides (**Lane & Fox, 1996, Lynch et al., 1997**). Cette aptitude protéolyse joue un rôle primordial dans l'obtention d'une texture caractéristique et de saveur désirée pour les divers types de fromage.

L'activité lipolytique des LAB présente de plus, un intérêt pour les applications fromagères. Certains micro-organismes, grâce à leurs lipases, peuvent décomposer les matières grasses et les acides gras libres du lait, entraînant l'apparition d'odeurs rances dans le produit laitiers. Les produits laitiers à haute teneur en matières grasses sont plus sensibles à la dégradation par les micro-organismes lipolytiques (**Lamontagne et al., 2002**).

- **Aptitude texturante**

LAB sont capables de produire des exopolysaccharides (EPS) qui joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. Ces composés polymères sont généralement considérés comme des agents épaississants naturels en industrie alimentaire. Les *Lb. delbrueckii ssp.bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés en tant que starters fonctionnels dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis (**Benyoucef, 2018**).

- **Activité antimicrobienne**

Les bactéries lactiques produisent une variété des composés antimicrobiens tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocines, qui sont utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments (**Labioui et al., 2005**). Les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes. Certains LAB produisent des bactériocine à spectre d'action étroit les plus connus : la nisine et la lactostrepcine, la diplosine, la mesentérocin et la leucocine. le dioxyde de carbone un métabolite secondaire synthétiser par LAB hétérofermentaire son accumulation va créer un environnement anaérobie qui s'avère toxique pour certains microorganisme aérobie (**Boullouf, 2019**).

Nos produits de terroir constituent une niche écologique riche pour la sélection de ces LAB ayant des propriétés antagonistes et peuvent être dans la production des cultures starters avec des propriétés nouvelles. Ces produits sont :

- **Lait de chamelle :**

La microflore lactiques du lait de chamelle cru et leurs produits fermentés est constituée d'un mélange de différentes espèces telles que: *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. lactis subsp. lactis*, *Enterococcus faecium* et *Streptococcus thermophilus*. Cette flore lactique spécifique du lait a un impact direct sur le développement de la texture et la saveur du produit laitier final. Cette flore participe aussi aux propriétés antimicrobiennes grâce à la production de plusieurs composés tels que les bactériocines et les acides organiques (**Bougherra, 2021**). Pour les produits végétaux sont aussi présentent une grande diversité de flores lactique qui présente un intérêt essentiel dans la fermentation des végétaux parmi ces végétaux :

- **La margine d'olivier fermenté**

Parmi les genres qui appartient aux ce produit fermenté : *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. curvatus*, *P.acidilactici* et les sous-espèces *Ln. mesenteroides*

sub sp. mesenteroides et *Ln. mesenteroides sub sp. Dextranicum*. D'après l'étude écologique, au fur et à mesure que l'échantillon vieillit, la flore lactique est de plus en plus constituée de coques (*Leuconostoc* et *Pediococcus*), alors que les échantillons récents contiennent principalement des lactobacilles. Les résultats de l'évaluation des aptitudes technologiques indiquent que la plupart de ces genres présentent un bon pouvoir protéolytique, lipolytique, aromatique, texturant et une résistance aux antibiotiques (Brahimi, 2015).

- **Les grains de pollen**

Le grain de pollen est le produit le plus riche en nutriments et en substances actives. Il est très énergétique à cause de sa forte teneur en hydrates de carbone et en protéines. Le pollen contient tous les acides aminés essentiels que l'organisme ne peut pas synthétiser ; il compense, donc, parfaitement les insuffisances imposées par l'alimentation moderne. Il est une excellente source d'antioxydants tels que les polyphénols, flavonoïdes et caroténoïdes. Sa flore lactique est très diversifiée et ont un intérêt alimentaire et thérapeutique (formulation de yaourt diététique à base de pollen) (Jabrani & Oulmene, 2016). Parmi les espèces présentes

dans cette matrice : *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paraplantarum*, *L. farciminis*.

La contamination mycologique des denrées alimentaires peut causer la dévalorisation de la valeur nutritionnelle ainsi que la détérioration de la qualité organoleptique. S'il s'agit de moisissures toxigènes et si les conditions environnantes sont favorables, il peut y avoir également la production et l'accumulation des métabolites toxiques (mycotoxine). (Abdelrhafour, 1994). Ces métabolites secondaires toxiques sont produits par certaines moisissures dans les milieux où elles se développent, principalement dans les matières premières d'origine végétales (céréales, légumes, fruits) (Cristin, 2007). Elles ont un faible poids moléculaire, produites par des champignons filamenteux appartenant au phylum Ascomycota ou par des moisissures. Ces mycotoxines sont actives à de faibles concentrations et ont une grande importance dans la santé des humaines et des animales, étant la cause des maladies aiguës et chroniques (Tola & Kebede, 2016 ; Khaneghah et al., 2019). Les espèces les plus fréquentes retrouvées dans nos alimentations appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, *Alternaria*. Ces moisissures peuvent proliférer et synthétiser des métabolites toxiques avant ou après la récolte, pendant le stockage, le transport, ou la transformation des matières premières et des aliments, sont des genres les plus importants de points de vue économiques et médicaux. (Cristina, 2007). Environ 300 à 400 mycotoxines sont été découvertes jusqu'à présent. En raison de leur haut degré de structure, diversité et pathways biosynthétiques, la classification de ces mycotoxines est plutôt difficile (Pamel et al., 2010 ; Gomez et al., 2020) et la production (les aflatoxines, l'ochratoxine A, les fumonisines, les

trichotécènes, la zéaralénone, lacitrinine et la patuline ..) est couplée à la croissance fongique en relation avec les variations de certains paramètres physique qui sont l'activité en eau (A_w), la température, le pH, la pression d'oxygène et la teneur en eau de l'aliment (Hadeif, 2015).

- **Le genre *Aspergillus***

En 2002 Chabasse et al., ont montré que les *Aspergillus* sont des champignons ubiquistes, cosmopolite appartenant à la classe des ascomycètes, très répandu avec des espèces impliquées dans l'altération des aliments, la production de mycotoxines et les fermentations (Figure 9). Le groupe *A. flavus-oryzae* contient les espèces *A. flavus* et *A. parasiticus*, qui peuvent produire des aflatoxines responsables de pathologies animales et humaines. Ces mycotoxine sont constituées d'un cycle coumarinique et de deux furanes auxquels peuvent être accolés un cycle pentone (Aflatoxines B et M) ou un cycle lactone hexagonal (Aflatoxines G). Les structures diffèrent entre elles par la position de leurs radicaux sur les squelettes de base. (Bouzaout & Adouani, 2020). Parmi la vingtaine d'aflatoxines recensées, quatre seulement se retrouvent dans les aliments (Aflatoxines B1, B2, G1, G2) dont B1 (AFB1) est la mycotoxine la plus étudiée.

Jaquet et al., 1982 détectent les aflatoxines M1 et M2, dérivés respectifs des aflatoxines B1 et B2, et trouvés dans le lait et ses dérivés. Ces toxines ont tenu leur appellation du fait de leurs présences dans le lait « Milk » des vaches laitières nourries par une alimentation contaminée. L'aflatoxine M1 peut altérer le lait maternel humain (El-nezami et al., 1995; Galvano et al., 1996).

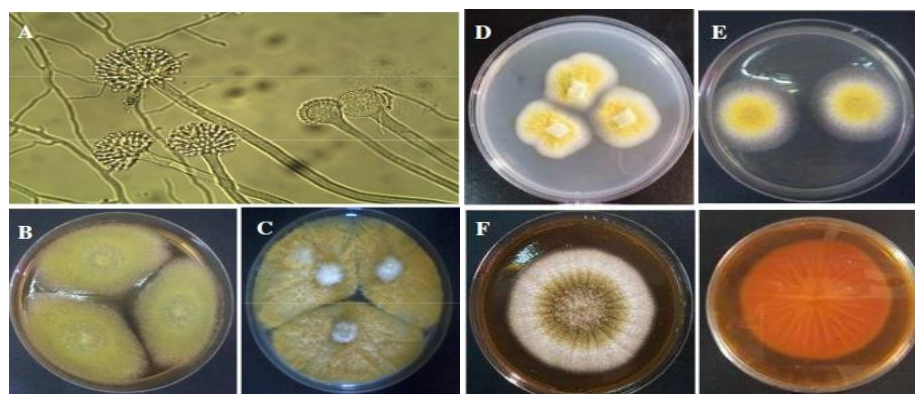


Figure 9. *Aspergillus flavus*. (A) aspect microscopique ($G \times 100$) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA ; (D) culture sur PDA ; (E) culture sur G25N ; (F) culture sur APF (Djaaboub, 2021)

- **Le genre *Penicillium***

C'est le champignon le plus répandus dans le monde entier, et le plus ubiquitaire; présent dans une grande variété d'habitats: du sol à la végétation, en passant par l'air, les environnements intérieurs et divers produits alimentaires (**Figure 10**). D'une part, il joue un rôle très important et varié (la production des fromages, du camembert ou du roquefort, des saucisses fermentées...), et d'autre parts, il est incriminé dans la dégradation des matières organiques, provoquant des pourritures dévastatrices en tant qu'agent pathogène avant et après récolte des cultures agricoles et peut produire diverses mycotoxines (**Moretti, 2017**). Parmi ses toxines, les ochratoxines A (OTA) qui est la plus toxique et la plus fréquents et connus. Cet OTA est un dérivé de phénylalanyl (**Pitt & Hocking, 1997**). Elle possède des propriétés néphrotoxiques, cancérigènes, immunotoxiques, génotoxiques et tératogènes pour toutes les espèces animales testées. L'OTA est sécrétée par des moisissures de genre *Aspergillus* (*A. ochraceus*) ou *Penicillium* (*P. verrucosum*). Le genre *Penicillium* est particulièrement présent dans les régions aux climats tempérés et humides et peut donc infester les cultures céréalières telles que l'orge, le blé, l'avoine, le seigle ect (**Bouzaout & Adouani, 2020**)

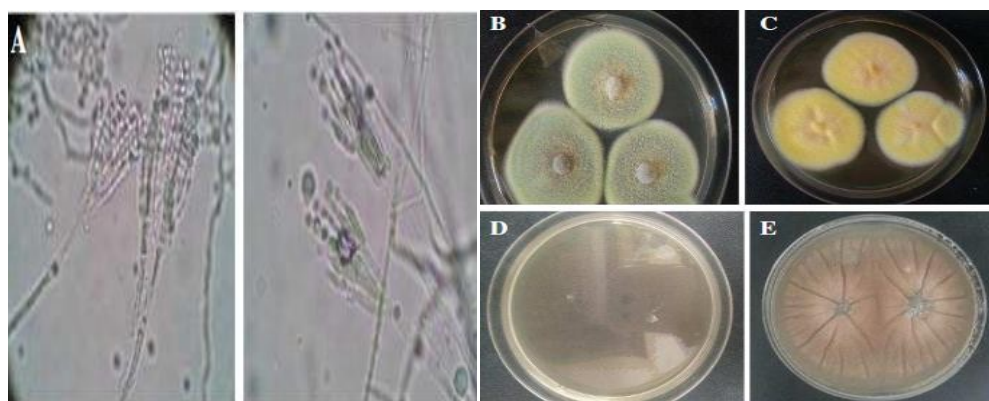


Figure10. *Penicillium pinophilum*. (A) aspect microscopique ($G \times 100$) ; (B) culture sur MEA; (C, D et E) culture sur CYA (**Djaaboub.2021**)

- **Le genre *Fusarium***

En (1809), **Link** a écrit véritablement pour la première fois le genre *Fusarium* (**Djaaboub.2021**). Ce genre inclue des champignons imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes (**Figure 11**). Quelques espèces de *Fusarium* ont des formes imparfaits ou téléomorphe et appartiennent à la classe des Ascomycètes (ordre des *Hyphocreales*, famille des *Nectriaceae*, genres *Gibberella*, *Calonectria* et *Nectria*) (**Munkvold, 2017**). **Imathiu et al en (2014)**, affirmèrent que ces champignons contaminent plusieurs cultures, notamment, les céréales, les arbres fruitiers et les cultures maraîchères en provoquant, ainsi, des maladies

appelées « fusarioses ». Ils causent, généralement, la pourriture des racines, des tiges et des fruits, la dégradation du système vasculaire altèrent la qualité Organoleptique et sanitaire des grains (**Djaaboub, 2021**). Les mycotoxines produites par les différentes espèces du genre *Fusarium* sont mentionnées dans le tableau suivant (**Tableau 3**)

Tableau 3 .Exemples des *Fusarium* producteurs de mycotoxines (**Tabuc, 2007**).

Espèces de <i>Fusarium</i>	Mycotoxines produites
<i>F. acuminatum</i>	Moniliformine, trichothécènes type A
<i>F. graminearum</i>	Trichothécènes type B, zéaralénone
<i>F. solani</i>	Acide fusarique, naftoquinone
<i>F. verticillioides</i> (sin. <i>moniliforme</i>)	Fumonisines, fusarine C, gibberelines, moniliformines, naftoquinone
<i>F. oxysporum</i>	Acide fusarique, moniliformines, oxysporine
<i>F. sporotrichoides</i>	Fusarine C, trichothécènes type A, zéaralénone
<i>F. anthophilum</i>	Moniliformine

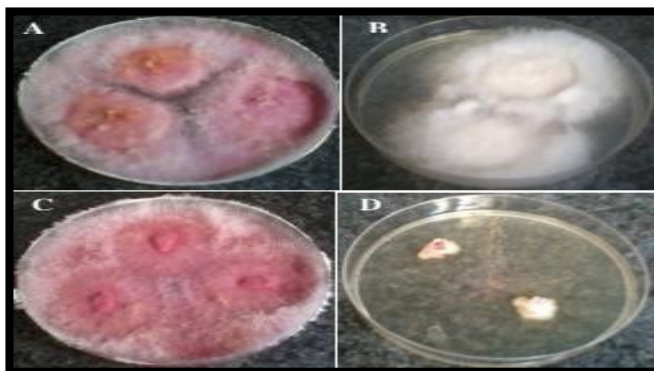


Figure 11. *Fusarium graminearum* (Aspect 3). (A) culture sur MEA ; (B) culture sur CYA ; (C) culture sur PDA ; (D) culture sur G25N (**Djaaboub.2021**)

- **Le genre *Alternaria***

Ce genre est très fréquent dans notre environnement, se sont des champignons mésophiles, appartiennent aux moisissures atmosphériques et peuvent être isolés de divers végétaux (**Figure12**). *Alternaria* comprend près de 275 espèces (**Simmons, 2007**) avec des modes de vie saprophytes et phytopathogènes et peuvent affecter les cultures sur champ ou les produits végétaux pendant la récolte et post-récolte. Les genres pathogènes sont généralement inféodés à une famille ou à une espèce donnée. Les plantes hôtes considérées par les attaques d'*Alternaria* sont très variées, allant des céréales (*A. triticina*) aux cultures maraichères (*A. dauci*, *A. radicina* sur carotte, *A. solani* sur tomate et pomme de terre, *A. porri* sur poireau, *A.*

brassicae et *A. brassicicola* sur radis et chou), aux cultures fruitières (*A. mali* sur pommier, *A. citri* sur citron et orange) (Guillemette, 2003 ; Calmes, 2011).

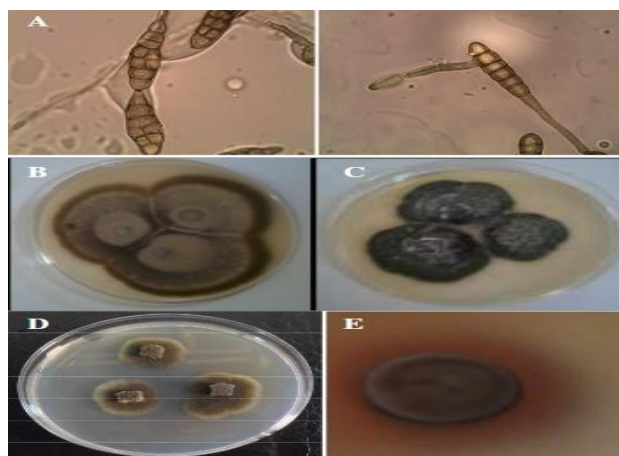


Figure 12. *Alternaria infectoria*. (A) aspect microscopique ($G \times 100$) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA ; (D) culture sur DCMA ; (E) culture sur G25N (Djaaboub, 2021)

Tableau 4. Les principales mycotoxines et les limites imposées par les États-Unis et l'Union Européenne aux niveaux des denrées alimentaires et des aliments pour animaux (Alshannaq & Yu, 2017).

Mycotoxines	Espèces Fongiques	Produits alimentaires
Aflatoxins B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Maïs, blé, riz, arachide, sorgho, pistache, amande, arachides, noix, fig.
Aflatoxine M1	Métabolite de l'aflatoxine B1	Le lait et leurs produits
Ochratoxine A	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Céréales, fruits secs de la vigne, vin, raisins, café, cacao, fromage
Fumonisines B1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Maïs, maïs, produits, sorgho asperges
Zéaralenone	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Céréales, produits céréaliers, maïs, blé, orge
Déoxynivalénol	<i>F.graminearum</i> <i>F.culmorum</i>	Céréales, produits céréaliers
Patuline	<i>Penicillium expansum</i>	Pommes, jus de pomme et concentré

Ces mycotoxines représentent un risque potentiel pour la santé humaine et animal et la contamination des aliments par ces molécules toxiques est devenue une des préoccupations majeures de nos jours surtout que le nombre de ces contaminants est en augmentation sans cesse dans la nature. (Rachelle, 2017). La lutte biologique contre ces mycotoxine vise à contrôler ces molécules toxiques aux moyens d'agents de lutte biologique (Biological contrôle agent: BCA) ainsi que les produits qu'ils en dérivent, mais ; cette lutte a été freinée longuement par la position dominante de la lutte chimique (Messaleti ,2018).

Dans la littérature, les LAB ont été recensées pour leurs propriétés antifongiques (Olga Djossou, 2011) et les recherches sur l'activité antifongique chez ces antagonismes microbiens ont commencé à la fin des années 50 avec Guillo (1958). Il découvrit un produit actif synthétisé par *Lactobacillus acidophilus* ayant un effet inhibiteur contre *Candida albicans*. Wiseman & Marth démontrèrent en (1981) que *Streptococcus lactis* C10 était capable d'inhiber *A. parasiticus* par le biais d'une molécule non connue à cette époque. Plusieurs équipes de recherches ont pu identifier plusieurs substances antifongiques produites par les LAB. Il est rapporté que le genre *Lactobacillus* est le plus pertinent en matière de lutte antifongique et anti-mycotoxicologique (Luchese & Harrigan, 1990), suivi des genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* puis les *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Weissella*. Cependant, les genres *Streptococcus* et *Carnobacterium* sont les moins intéressants. Laref & Guessas, 2013 ont montré une bonne activité d'antagonisme fongique de six souches de *Lactobacillus* isolées du lait de chamelle, de la carotte et d'ensilage vis-à-vis d'*Aspergillus* sp, par la méthode de double couche et de confrontation. Par contre, aucune inhibition n'a été détecté via le surnageant de ces isolats. Guo et al., ont montré en (2012) l'activité antifongique de 220 souches de *Lactobacillus*, isolées à partir de plusieurs échantillons (porcs, nourrissons, souris, vache, fromage et céréales), contre trois champignons dermatophytes : *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* et *Epidermophyton floccosum*. Leur activité a été criblée d'abord contre *A. fumigatus* et *A.niger*. Les résultats obtenus montrent que seulement 8 souches ont une forte activité antifongique : *L. brevis* JJ2P, *L. brevis* L1105, *L. arizonensis* R13, *L. arizonensis* R14, *L. casei* R4, *L. casei* R21, *L. reuteri* ee1p et *L. reuteri* M13.

Les interactions entre les bactéries lactiques et ces métabolites toxiques ont plusieurs origines possibles soit par : stimulation des mycotoxine c'est -à-dire leur production est induite en présence de LAB. Hassan & Bullerman en (2008) ont indiqué une augmentation significative de la production de la FB1 et de DON respectivement chez *Fusarium proliferatum* M 5991 et *F. graminearum* R 4053 lorsqu'ils sont cultivés simultanément en milieu liquide avec *Lb. paracasei* subsp. Tolerans, soit par dégradation des mycotoxine par les bactéries lactiques

à titre d'exemple : Les bactéries mésophiles de Leben marocain (*Lactococcus lactis* en culture pure ou combiné avec *Lactococcus diacetyllactis*) permettent une destruction totale de l'aflatoxine M1, contre une destruction de 58% seulement par *Lactococcus diacetyllactis* (Khaddor et al., 2003) ou par une interaction qui conduit à une inhibition de l'un de ces microorganismes et de ses métabolites toxiques comme l'association de *Streptococcus lactis* avec *Aspergillus flavus* réduit les teneurs en aflatoxines, en parallèle, *l'Aspergillus flavus*, réduit la croissance de *Streptococcus lactis* et affecte la morphologie de la cellule bactérienne (Laref,2014).

Ces molécules antifongiques synthétisées par les bactéries lactiques peuvent être :

- **Les acides organiques**

Sont les principaux composés produits par les LAB au cours de la fermentation. Il existe plusieurs acides comme l'acide lactique qui est produit majoritairement, mais aussi l'acide acétique, qui est produit en fortes concentrations (g/L ou g/Kg) (Stiles, 1996 ; Ross et al., 2002, Leyva Salas et al., 2017). Ces acides organiques faibles sont très impliqués dans l'activité antimicrobienne (Caplice et al., 1999), mais leur introduction va dépendre de la constante de dissociation pKa de ces acides et du pH de l'aliment. Lorsque le pH est inférieur ou égal au pKa, l'acide sera de forme non dissociée, plus hydrophobe, pouvant traverser facilement la membrane plasmique. Une fois à l'intérieur de la cellule, l'acide se dissocie et entraîne une accumulation de proton H⁺ dans le cytoplasme et le pH interne diminue. Ce déséquilibre va inhiber les principaux processus métaboliques (Mollapour & Piper, 2008, Blagojev et al., 2012). De plus, cela poussera la cellule à se rééquilibrer par l'addition d'ions hydrogènes via l'exportation en dehors du compartiment cellulaire, mais au détriment d'une énergie élevée qui est normalement utilisée pour la croissance cellulaire et autres processus métaboliques.

- **Les acides gras**

Ces acides gras sont synthétisés par les LAB à partir d'acides aminés et des lipides présents dans l'aliment. Ils ont un rôle important dans les propriétés organoleptiques, comme l'élaboration des saveurs de certains produits laitiers (Ganesan et al., 2004). Ces acides peuvent aussi induire des effets antifongiques s'ils sont en quantités suffisantes (Bergsson et al., 2001; Sjögren et al., 2003). Ils agissent en s'introduisant dans des membranes fongiques grâce à leur pouvoir lipophile, altérant ainsi leurs fluidités et intégrités (Avi & Bélanger, 2001 ; Ström, 2005). Certains de ces acides gras peuvent aussi interférer dans la germination

des spores (Ström, 2005). A titre d'exemples, les acides 3-(R)-hydroxytétradécanoïque, 3-hydroxy-5-cis-dodécenoïque, 3-(R)-hydroxydodécanoïque et 3-(R)-hydroxydécanoïque sont produits par *Lactobacillus plantarum* MiLAB14 et sont très actifs contre plusieurs moisissures du genre *Penicillium* (*P. roqueforti*, *P. commune*), *Aspergillus* (*A. nidulans*, *A. fumigatus*) et des levures comme *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula mucilaginosa* et *Pichia anomala* (Sjögren et al., 2003).

- . **Les composés peptidiques**

Les LAB ont la capacité de produire plusieurs composés peptidiques antifongiques tels que les bactériocines ou les dipeptides cycliques. Le mode d'action des bactériocines n'est pas encore très bien détaillé, il existe plusieurs études qui ont décelé que ces peptides agissaient essentiellement sur la membrane cytoplasmique en y formant des pores, provoquant ainsi l'endommagement et la perte du matériel intracellulaire (Ross et al., 2002 ; Dortu, 2008 ; Dortu & Thonart, 2009). Ils existent des bactériocines pouvant endommager la paroi et réduire la taille des hyphes des moisissures *A. niger*, *A. oryza*, *A. flavus* et *F. oxysporum*. Ces bactériocines sont produites par *Lb. plantarum* YML007 (Ahmad et al., 2013).

Les LAB produisent aussi les dipeptides cycliques, qui sont des composés intermédiaires pendant la production des peptides non ribosomiques, présentant une activité antifongique contre diverses moisissures (Schwarzer et al., 2003). Parmi ces peptides la cyclo(L-Leu-L-Pro) et cyclo(L-Phe-L-Pro) produits par *Lb. plantarum* FST 1.7 présentaient une forte activité antifongique contre *A. niger*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum* et *P. roqueforti* (Dal Bello et al., 2007).

Matériel et Méthodes

II.1. Première partie : Isolement, identification et caractérisation des bactéries lactique

II.1.1. Echantillonnage : trois types d'échantillons ont été prélevé à partir de la région de Naama : lait de chamelle, le grain de pollen, la margine d'olive.

- **Lait Chamelle**

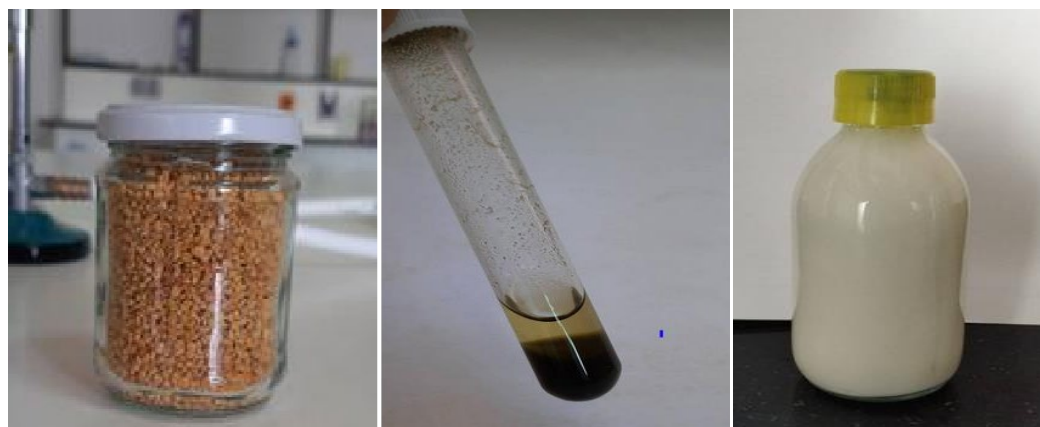
Le lait de chamelle est un liquide blanc opaque, à la traite et lors des transvasements il forme une mousse en raison notamment de la structure et de la composition de sa matière grasse, avec un goût assez doux légèrement âpre, acide, sucré et parfois même salé et un aspect plus visqueux que le lait de vache. C'est un milieu propice pour le développement de plusieurs microorganismes. Ce lait il se caractérise par une composition biochimique et des paramètres physiques qui influent sur les types des microorganismes qui peuvent le peupler par rapport aux autres laits (**Boussouar, 2017**) pour cela nous avons prélevé un échantillon à partir de la région de Naama (khaiter) dans des flacons stérile.

- **Grain du pollen**

Ce grain est une cellule qui un rôle déterminant dans la reproduction sexuée des végétaux. Il s'agit du vecteur de l'élément mâle des plantes à fleurs. Toutefois, ce n'est pas leur seul rôle biologique, d'où leur contenu vivant, a valu à ces particules microscopiques leur intérêt scientifique (thérapeutique et pharmaceutique) nous avons pris cet échantillon chez un épicier.

- **La margine d'olive**

Est un produit fermenté dérivé de l'huile d'olive. Elle représente le résidu d'huile d'olive qui forme un dépôt noir (mélange de pulpe et d'huile d'olives) au fond des barils de conservation. Le prélèvement de cet échantillon a été effectué industriellement.



A

B

C

Figure13. Photos échantillonnage A : Grain de pollen, B : margine d'olive, C : lait de chamelle

II.1.2. Isolement

II.1.2.1. Isolement des bactéries lactiques : (Lait de chamelle)

Dilution : consiste tout d'abord, à préparer la solution mère du lait en mettant 1ml du lait dans 9 ml d'eau physiologique stérile, suivie d'une agitation pendant 3 min en suite, la préparation est laissée se décanter. La solution obtenue a servi à préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 1mL de la solution précédente à 9 ml d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-6} (Jérôme et al., 2004).

Ensemencement : Un volume de 0.1 ml de chacune des dilutions indiquées est déposée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé MRS, puis étalé uniformément avec un étaloir stérile par un mouvement de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose. Enfin, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 heures, durée nécessaire pour l'apparition des colonies de souches bactériennes (Tortora et al., 2003).

II.1.2.2. Isolement des bactéries lactiques à partir de grain de pollen

Deux gramme de chaque échantillon de grain pollen sont ajoutés à 100 ml de bouillon MRS; Après agitation vigoureuse le mélange est mis à incuber pendant 72 heures à 30°C.

Dilution : Une série de dilution décimale est réalisée dans de l'eau physiologique stérile, 100µl de chaque dilution sont étalé sur le milieu MRS agar précédemment stérilisé et coulé dans des boîtes de Pétri. Les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C / 48h dans des conditions d'anaérobiose.

II.1.2.3. Isolement à partir de la marge d'olivier

1ml de l'échantillon a été pipeté aseptiquement dans un 9ml d'eau physiologique et des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à (10^{-6}) . 100 μ l de chaque dilution sont étalés sur le milieu MRS agar précédemment stérilisé et coulé dans des boîtes de Pétri. Les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C / 48h .

II.1.3. Purification des bactéries lactiques

Des colonies de chaque boîte ont été prises, aléatoirement, et repiquées sur MRS bouillon et incubées à 30°C. Après 18h d'incubation, nous avons ensemencé les colonies en surface sur gélose MRS selon la technique des quadrants. (Djaaboub, 2021).

II.1.4. Conservation des isolats lactiques

La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée à tube. Après incubation à 37°C pendant 18h, les tubes sont conservés à +4°C, le renouvellement des cultures se fera toutes les 3 semaines (Saidi et al., 2002).

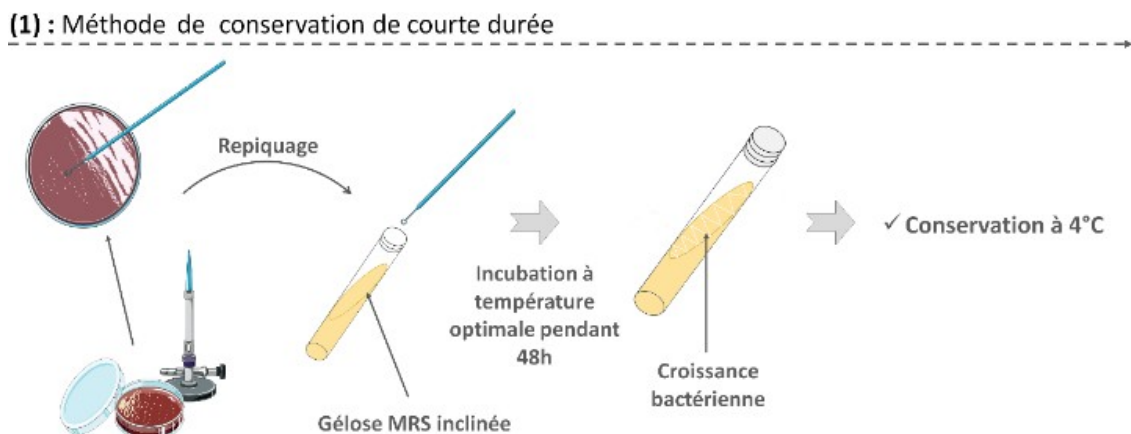


Figure 14. Technique de conservation de courte durée des bactéries lactiques (Ouiddir, M, 2019)

II.1.5. Caractérisation morphologique

II.1.5.1 Examen macroscopique

Il consiste à relever la taille, la forme, le contour et la couleur des colonies des cultures bactériennes. Des ensemencements ont été réalisés sur plusieurs milieux de culture sélectifs notamment MRS, M17, BHI, CATC afin d'identifier le genre des souches lactiques sélectionnées et étudiées. Chaque milieu a été ensemencé par une colonie jeune de bactérie lactique et incubé

pendant 24 heures à 30°C. Au bout de 15h, les colonies de Streptocoques lactose-positives sont déjà visibles sur M17 ; tandis que les entérocoques sont observables sur milieu CATC et BHI.

II.1.5.2 Observation microscopique

II.1.5.2.a. Observation à l'état frais

La technique consiste à déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur la lame en verre propre, puis à l'aide d'une anse de platine stérile, apporter un prélèvement bactérien de la colonie à identifier et la dissocier dans la goutte d'eau physiologique, ensuite recouvrir la lame par une lamelle en évitant la formation de bulles d'air, l'observation est réalisée au microscope optique.

II.1.5.2.b. Coloration de Gram

Après l'examen des colonies à l'œil nu sur différents milieu gélosé, les souches lactiques ont été soumises à la coloration de Gram qui présente un double intérêt : elle permet à la fois d'observer la morphologie bactérienne (forme, taille, mode de regroupement...) et de mettre en évidence les propriétés de la paroi (Gram+ ou Gram-). L'observation microscopique des cellules a été réalisée avec l'objectif à immersion ($\times 100$). **Annexe2**

II.1.6. Caractères physiologique

II.1.6.1 .Croissance à différentes températures

Après inoculation du Bouillon MRS par les cultures jeunes des souches lactiques sélectionnées, les tubes ont été incubés pendant 24h à 48h aux températures 10°C, 37°C, 45°C. la croissance bactérienne est appréciée par examen des milieux. **(Djaaboub, 2021)**

II.1.6.2. Etude thermo résistance

Des cultures jeunes ont étéensemencées dans du tube bouillon MRS et exposés à un chauffage à 63°C pendant 30min puis ont été incubés à 30°C pendant 24h à 48h **(Djaaboub, 2021)**

II.1.6.3. Croissance à différent concentration de NaCl

Les souches lactiques ont étéensemencées sur des bouillons hypersalés à 4.5%, 6.5%, 9% de NaCl et incubés à 37°C pendant 48h. L'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble **(Djaaboub, 2021)**.

II.1.6.4. Croissance à différent pH

Des cultures jeunes ont étéensemencées dans 5ml de bouillon MRS à différents pH 4.4, 6.5, 9.6 les cultures ont été incubés à 30°C pendant 48h. Après incubation, la croissance bactérienne a

été déterminées par l'apparition d'un trouble (**Guirad,1998**).

II.1.7.Caractérisation biochimique

II.1.7.1. Recherche de la catalase

Émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester. Ceci reflète des bactéries à catalase positive (**Adnan & Tan, 2007**).

II.1.7.2. Détermination du type fermentaire

Pour différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires, il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂). Les souches ont été cultivées dans des tubes contenant du bouillon MRS avec une cloche de Durham pour apprécier la production de CO₂. Après incubation à 37°C pendant 48 heures, la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (**Kihal et al., 1996 ; Hariri et al., 2009**).

II.1.7.2.Hydrolyse de l'esculine

L'hydrolyse de cet hétéroside est mise en évidence sur le milieu bouillon à l'esculine. Il a été inoculé par une culture de 24h et incubé à 30°C pendant 24 à 48h. Une réaction positive se traduit par un noircissement du milieu dû aux sels ferriques solubles et l'esculétine. Pour les bactéries négatives, le milieu reste inchangé bien qu'il y a une croissance bactérienne (**Belarbi, 2011**).

II.1.7.3 Utilisation du citrate

L'utilisation du citrate est détectée sur le milieu **Kempler et Mc Kay** après incubation à 30°C pendant 24 à 48h. Les colonies qui fermentent le citrate sont des colonies bleues ou ayant un centre bleu (Citr +). En revanche, les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches (Citr -) (**Belarbi, 2011**). Le milieu Citrate de Simmons coulé en tube incliné a été aussi utilisé pour l'étude de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone par les germes. Il contient un indicateur de pH qui est le bleu de Bromothymol ; ce qui confère au milieu une coloration verte à l'état acide. Les germes qui utilisent le citrate comme seule source de carbone entraînent une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu (**Boussouar, 2016**).

II.1.7.4 Hydrolyse de l'arginine (ADH)

La technique consiste à ensemencer 50µl de solution bactérienne, (de chaque souche lactique), dans un mini puits de microplaque contenant 200µl de bouillon Moëller arginine, (plus un témoin : Moëller sans arginine), ensuite chaque puits doit être recouvert avec 4 à 5mm d'huile de paraffine stérile et incubé pendant 2 à 6jrs à 30°C, la culture dans le puits témoin se manifeste par un virage au jaune dû à l'acidification du milieu, (métabolisme du glucose),

(Larpent-Gourgaud et al., 1997; Carr et al., 2002). La dégradation de l'arginine aboutissant à la formation d'ammoniaque est révélée par une alcalinisation du milieu qui devient violet.

II.1.7.6. Test mobilité mannitol

Ce test permet l'étude de la dégradation du mannitol et la recherche de la mobilité des bactéries. L'ensemencement a été effectué par piqure centrale en utilisant le milieu mannitol mobilité semi-solide. Le tube est ensuite incubé à 37°C pendant 24 à 48h (Boussouar, 2016).

II.1.7.7. TSI (Triple Sugar Iron)

Pour mettre en évidence la fermentation des trois sucres (lactose, glucose et saccharose), nous avons ensemencé le culot par piqure profonde et incubé à 30°C (Tabak & Bensoltane, 2012).

Une coloration jaune du culot montre un glucose positif.

Une coloration jaune de la zone intermédiaire indique un saccharose positif.

Un noircissement de la zone joignant la pente et le culot et de gaz (bulles dans la gélose) pente par une strie médiane indique la production de H₂S

II.1.7.8. Inoculation de la galerie API 20Strep

- **Préparation de la galerie**

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée stérile ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

Sortir la galerie de son emballage individuel puis placer dans la boîte d'incubation

- **Préparation de l'inoculum**

Ouvrir l'ampoule D'Api suspension Médium de 2ml puis à l'aide d'une anse de platine prélever toute la culture préalablement préparée en réalisant une suspension dense : opacité supérieure à 4 Mc Farland.

- **Inoculation de la galerie**

Dans les premiers tests de la plaque (VP à ADH) répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles pour cela, incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pointe de la pipette ou de la psipette sur le côté de la cupule :

Pour les tests VP à LAP : environ 100 µl dans chaque cupule. Pour le test ADH : remplir uniquement le tube.

Dans la deuxième moitié de la galerie (tests RIB à GLYG) :

Ouvrir une ampoule d'API GP Medium et y transférer le reste de la suspension, soit 0,5 ml au minimum. Bien homogénéiser

Répartir cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement. Remplir les cupules des tests soulignés ADH à GLYG avec de l'huile de paraffine en formant un ménisque convexe. Refermer la boîte d'incubation. Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en aérobiose pendant 4H00 - 4H30 pour une première lecture et 24 heures (± 2 heures) si nécessaire pour une deuxième lecture.

- **Lecture de la galerie**

Après 4 heures d'incubation : Ajouter les réactifs :

test VP : 1 goutte de VP 1 et VP 2. Test HIP : 2 gouttes de NIN. Tests PYRA, DGAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP : 1 goutte de ZYM A et ZYM B (*).

II.1.9. Caractérisation technologique et enzymatique

II.1.9.1. Pouvoir acidifiant

La technique basée sur l'ensemencement de 100ml de lait écrémé et reconstitué à 10%, avec 500 μ l d'une culture lactique jeune (DO initiale à 620 = 0,5 Mc Farland de 0.08 à 0.1). Le lait a été, puis en réparti dans des tubes à essais à raison de 10ml/tube et incubé à 37°C à un intervalle de temps de 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 48h. Après chaque durée d'incubation, nous avons mesuré le pH et l'acidité Dornic après avoir titré le lait écrémé par la soude Dornic (N/9) par l'ajout cinq gouttes de phénolphthaléine jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins pendant 10s. L'acidité est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Acidité } (^{\circ}\text{D}) = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

V_{NaOH} : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait. (Djaaboub, 2021)

II.1.9.2. Activité amylolytique

L'activité amylolytique a été effectuée en ensemençant dans un milieu à base d'amidon, on imbibe un coton tige stérile dans une suspension bactérienne, et on ensemece par une seule strie sur la surface du milieu. L'incubation des boites s'effectuera à 37°C pendant 4jour. Lors de la lecture, on ajoute une solution de lugol, l'hydrolyse de l'amidon se traduit par une zone claire autour des stries (Boussouar, 2017).

II.1.9.3. Pouvoir lipolytique

L'activité lipolytique a été réalisée sur gélose MRS additionné du Tween 80 et du Tween 20 à raison de 1ml/100ml (v/v). Nous avons déposé des disques stériles chargés de 10µl d'une culture jeune. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 48 à 72h. Les lipases d'origine microbienne permettent de transformer les triglycérides en glycérides partiels (mono et diglycérides) et en acides gras (Choisy et al., 1984).

II.1.9.3. Pouvoir protéolytique

Le présent test a été effectué sur milieu YMA Ceci afin de mettre en évidence l'hydrolyse de la caséine par le biais des protéases. L'ensemencement de ce milieu est réalisé par la méthode des spots (contact direct). L'incubation aura lieu au bout de 24h à 48h à 37°C, puis on note la présence ou non des zones d'hydrolyse autour des spots (Boussouar, 2017).

II.1.9.4 .Pouvoir coagulant

Nous avons ensemencé des flacons contenant 100ml de lait écrémé stérile reconstitué à 10%, avec 500µl d'une culture jeune de bactérie lactique. Après une incubation à 37°C pendant 24 à 48h, nous avons mesuré le volume de lactosérum exsudé et avons noté l'aspect du coagulum obtenu (Bourgeois & Leveau, 1991).

Partie II : L'activité antifongique

La recherche de l'activité antifongique a été réalisée en premier lieu par un test qualitatif, puis un test quantitatif. Dans cette activité nous avons utilisé des souches fongique suivant : *Fusarium graminearum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus alliaceus*, *Alternaria alternata* *Alternaria linariae*, isolées à partir du tomate et *Fusarium oxysporum*, isolée à partir du palmier dattier et *Penicillium ssp*, *Penicillium ssp*, *Aspergillus ssp* isolées à partir du kadid

II.2.1 .Test qualitatif (Confrontation)

Les isolats ont été d'abord ensemencés en deux stries sur MRS ou bien dans toute la surface de la boîte, puis incubés à 30°C pendant 48h, ensuite une bouture de champignon a été déposée au centre de la boîte et incubée à 30°C pendant trois jours, (Gerbaldo et al., 2012)

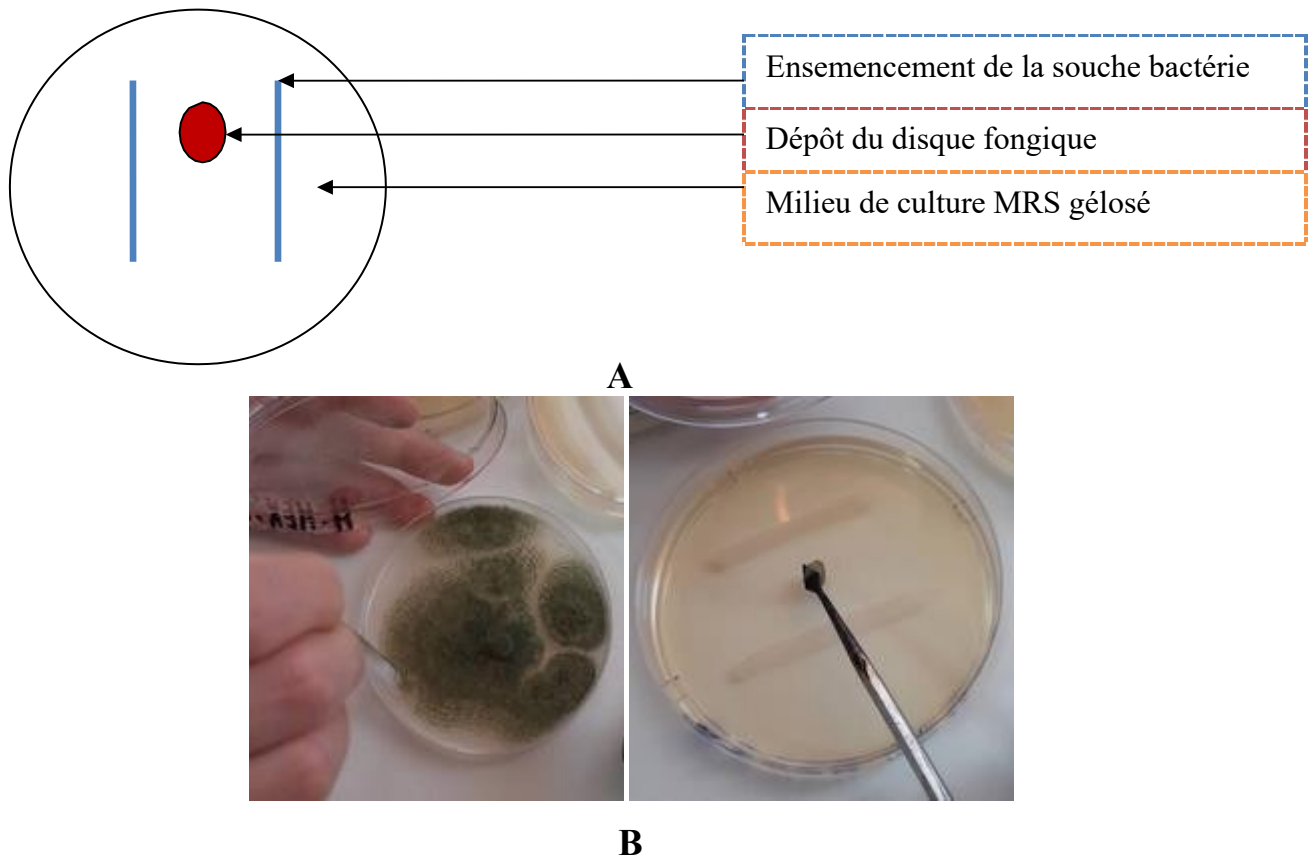


Figure15 : A : Schéma démonstratif B : photo de la méthode de confrontation directe

II.2.2. Test quantitatif (Co-culture sur milieu solide)

Cette méthode est décrite par (Florjanowicz, 2001). 200µl d'une culture jeune ont été ensemencés en profondeur dans 15ml du milieu MRS, puis un disque stérile de 6mm de diamètre a été déposé à la surface au centre, puis a été saturé par 10µl de suspension sporale et incubées à 25°C et le suivi a été réalisé pendant 12 jours. Un témoin a été jugé nécessaire pour chaque souche fongique, il s'agit, en fait, d'ensemencer la moisissure en l'absence de la bactérie lactique. la lecture de l'influence des isolats bactériens déterminée par la croissance radiale des souches fongiques a été mesurée tous les deux jours dans deux directions perpendiculaires. L'activité antifongique est exprimée en termes d'inhibition de la croissance de la colonie fongique comme suit :

$$\text{Inhibition (I) ou activité antifongique (A.A.F)} = 100 \times [1 - (\text{DE} / \text{DT})]$$

DE : diamètre de la colonie dans l'échantillon

DT : diamètre de la colonie dans le témoin

Résultats

Le présent de travail porte sur l'isolement des bactéries lactiques à partir du lait de chamelle, le grain de pollen, la margine d'olives et la mise en évidence de leur activité antifongique.

II.1. Isolement et caractérisation morphologique des bactéries lactiques

L'isolement, la purification et la caractérisation morphologique des bactéries lactiques contenues de chaque échantillons (lait de chamelle, la margine d'olives, grain de pollen) nous a permis de sélectionner 8 isolats bactériens, ceci nous amène à penser qu'il s'agira probablement des bactéries lactiques.

L'observation macroscopique des isolats bactériens sur les milieux MRS agar, M17 et CATC révèle la présence des colonies rondes de taille variable (d'environ 1.5 à 2 mm de diamètre) lisses de couleur blanchâtres crémeuses de forme circulaires avec un contour régulier et convexe comme le montre la figure 16.

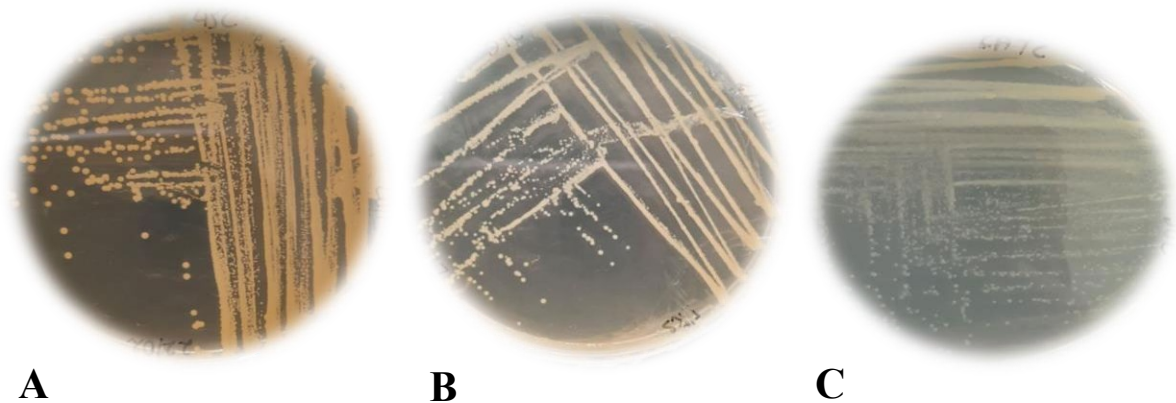


Figure 16. Aspects macroscopique des isolats sur différents milieux (A : milieu M17, B : milieu MRS, C : milieu CATC)

Sur le plan microscopique, l'examen à l'état frais et la coloration de Gram dévoilent que la quasi-totalité des isolats sont des cocci (à l'exception faite de l'isolat LAB08 qui est de forme bacillaire), immobile, à Gram positif, associés en paire, en courte chaînette ou en tétrade. (figure17)

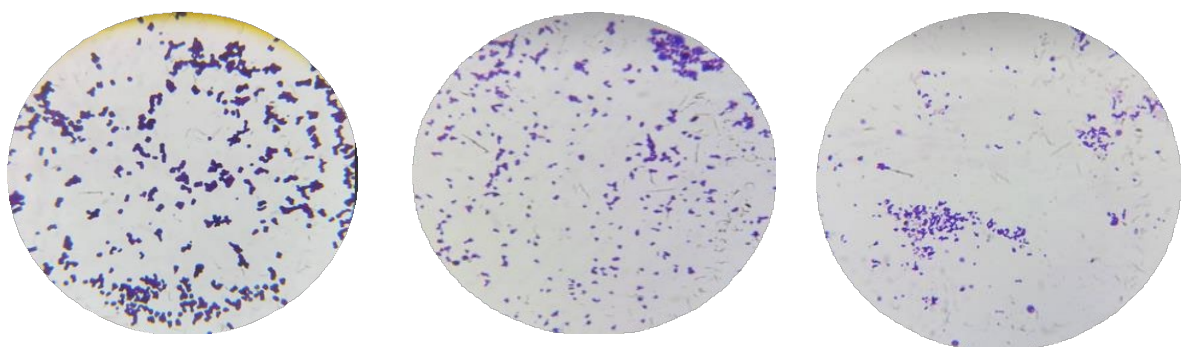


Figure 17. Observation microscopique des isolats lactiques Grossissement *100

III.1 Caractérisation physiologique

La caractérisation physiologique déterminant les intervalles de croissances en fonction de la température montre que l'ensemble des isolats sont capables de pousser dans intervalle de température qui se situe entre 30°C et 37°C avec un maximum de 45°C. Les isolats LAB01 ; LAB02, LAB08 sont incapable de croître à 10°C tandis que les isolats LAB01, LAB02, LAB03 peuvent résister à 60°C durant 30mn. En ce qui concerne le NaCl et pH, tous les isolats ont la capacité de croître à 4,5% voire jusqu'à 6,5% de NaCl, (comme concentration maximale), et dans un pH qui oscille entre 6,5 et 9 (**figure18**).



Figure18. Résultats de différent test physiologique des isolats 1 : test pH, 2 : test température, 3 : test concentration NaCl

III.2 Caractérisation biochimique

Sur le plan biochimique, l'ensemble des isolats sont homo-fermentaire dépourvus de catalase, (à l'exception de LAB04 et LAB08 qui sont hétéro-fermentaire), incapables de dégrader le mannitol sauf pour LAB03 et LAB06. Les résultats du test TSI montrent que les isolats LAB03 et LAB06, LAB07, LAB08 ont la capacité de fermenter les trois sucres, en revanche, les isolats LAB01, LAB02 et LAB04 ne fermentent que le lactose et le saccharose. Pour l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie, tous les isolats sont dépourvus de citrate perméase à l'exception de l'isolat LAB08 ; cet isolat est incapable d'utiliser l'arginine (**figure19**).

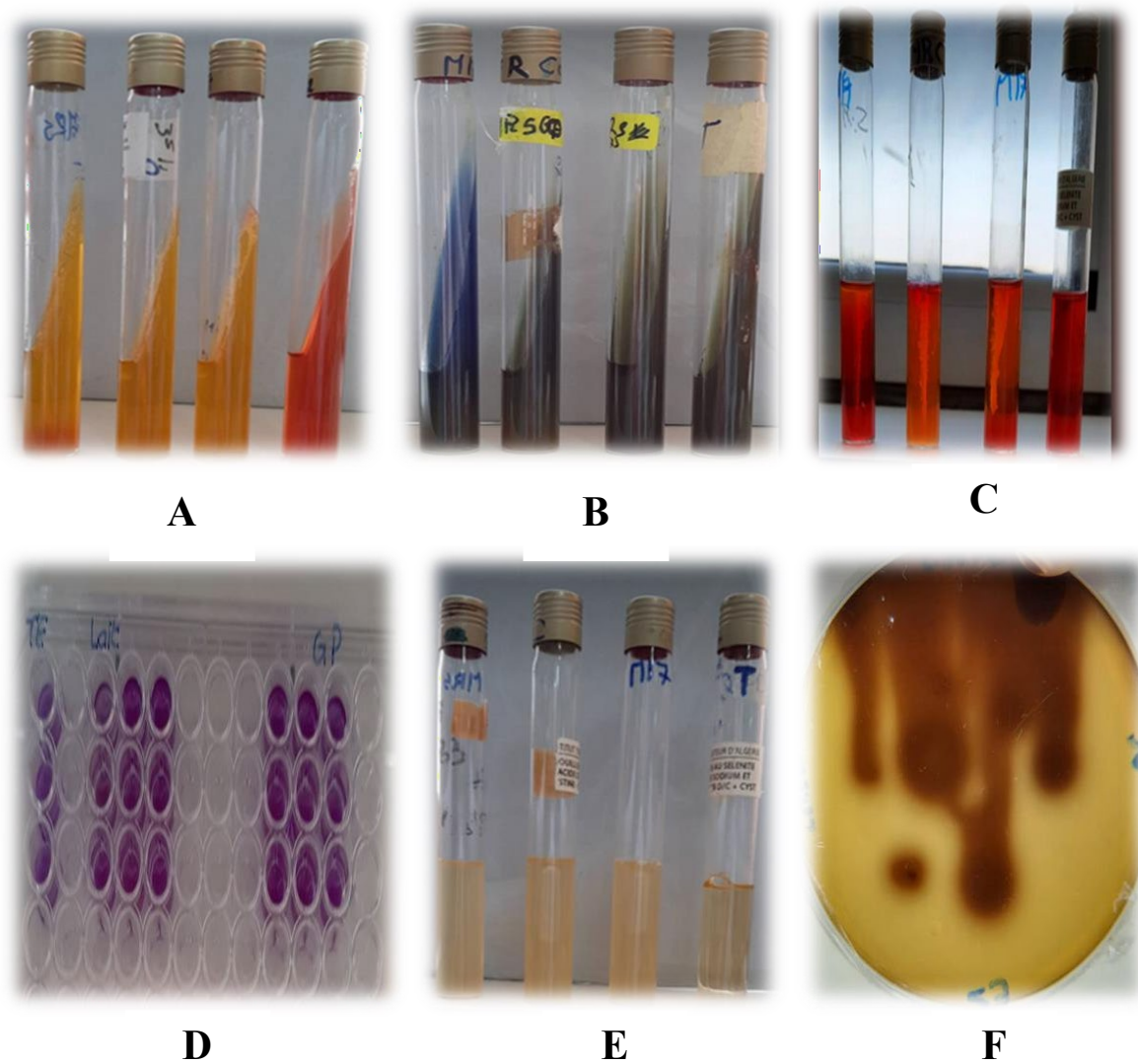


Figure 19. Résultats des tests biochimiques A : test fermentation des sucres, B : Test citrate de Simmons, C: test mobilité, D: test ADH, E: type fermentaire, F:hydrolyse l'esculline

L'ensemble des résultats de l'identification phénotypique sont réunies dans le **Tableau 5**

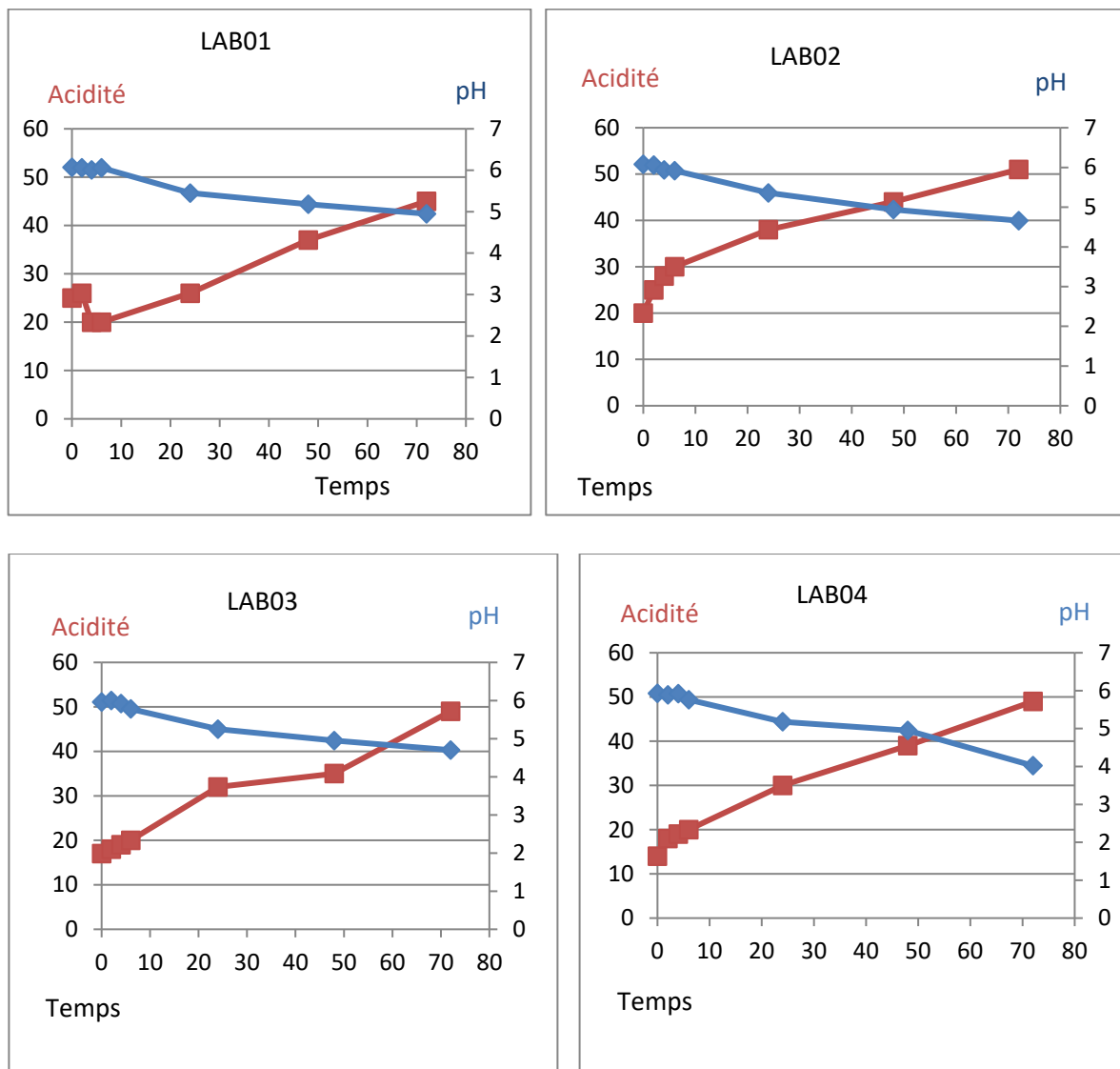
Tableau 5. Résultats de l'identification phénotypique des isolats lactiques

Caractères	Profil des bactéries lactiques							
	Isolats lactique							
Morphologique :	LAB01	LAB02	LAB03	LAB04	LAB05	LAB06	LAB07	LAB08
Forme cellulaire	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Bacille
Association cellulaire	Chainette	tétrade	Chainette	Paire	Paire	Chainette	Paire	
Test physiologique								
10°C	-	-	+	+	+/-	+	+	-
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	-	-	+	+/-	+/-	+/-	-	-
60°C	+	+	+	-	-	-	-	-
4.4 % Nacl	+	+	+	+	+	+	+	-
6.5 % Nacl	+	+/-	+	-	+	+	+	-
9 % Nacl	-	-	+	-	-	-	-	-
pH=4.4	-	-	-	-	+/-	-	-	-
pH=6.5	+	+	+	+	+	+	+	+
pH=9	+	+/-	+	+	+	+	+	+
Test Biochimiques								
Type fermentaire	homo	homo	homo	hétéro	homo	hétéro	homo	Hétéro
Esculine	+	+	+	-	+	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	+
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	-
Mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-

III.4.Caractérisation technologique et enzymatique

III.4.1.Pouvoir acidifiant

L'étude du pouvoir acidifiant consiste à suivre l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et de doser simultanément la production de l'acide lactique présent dans lait écrémé, les résultats sont représentés dans la figure 20.



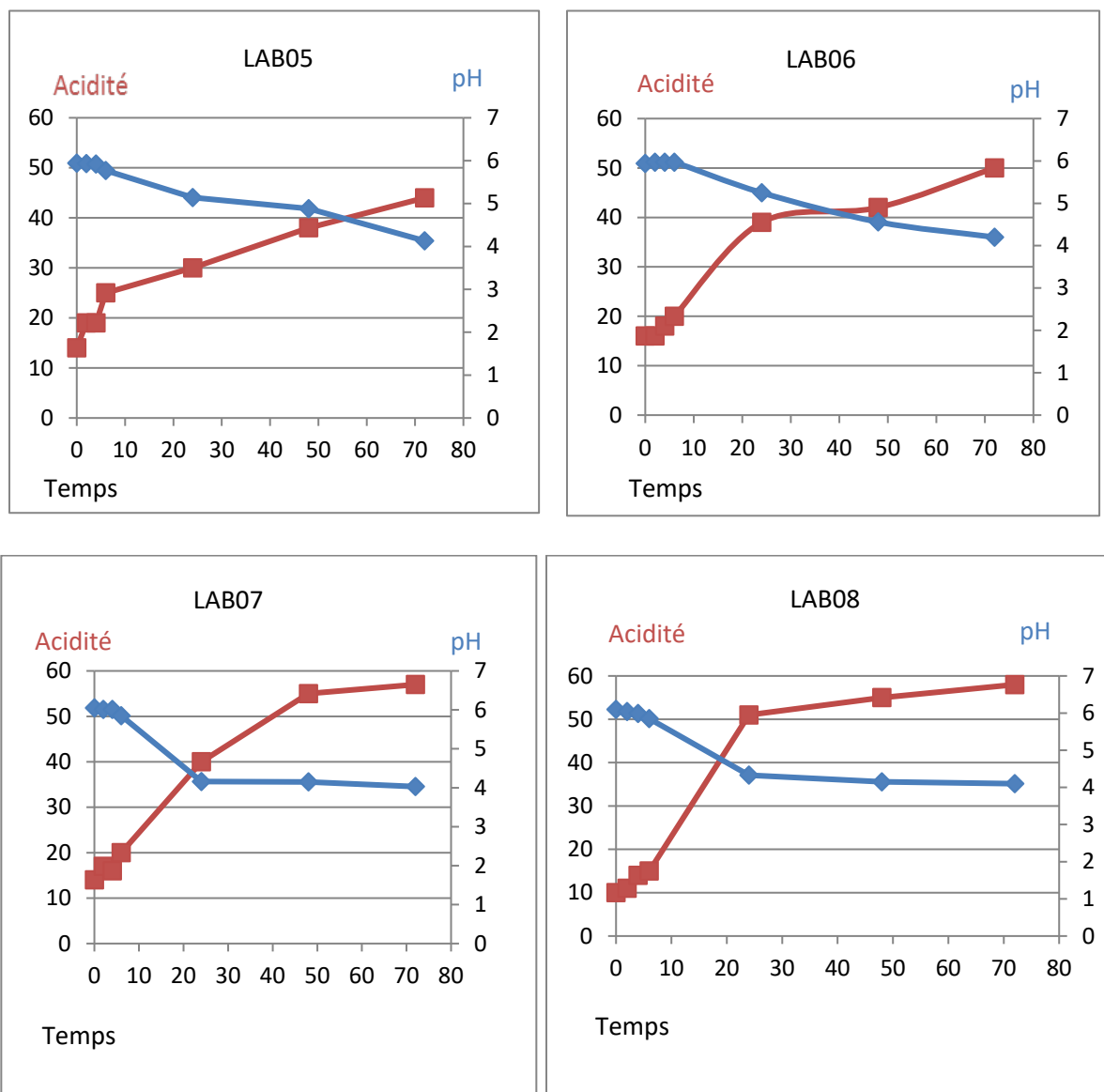
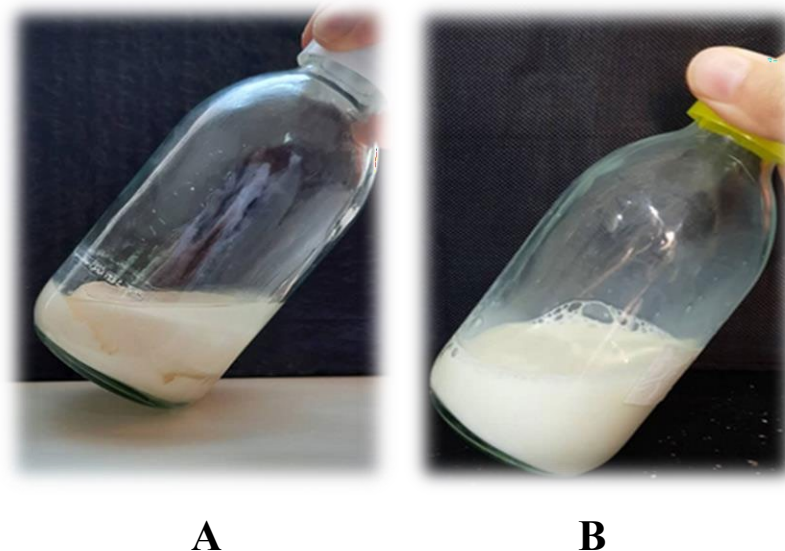


Figure20. Capacité de production de l'acide lactique dans le laitensemencépar les souches isolées.

Le pouvoir acidifiant représente la propriété métabolique la plus recherchée chez les LAB utilisées dans l'industrie agro-alimentaire car c'est un critère primordial dans la sélection des souches à intérêt .les résultats obtenus montrent que la totalité des isolats présentent une production progressive en acide lactique à partir de la fermentation du lactose ; la teneur était de 1.1g/l d'acide lactique à 2.8g/l après 2heures d'incubation et au bout de 48 h et 72h la quantité d'acide était maximale et variait entre 4.9g/là 5.8g/l(degré acidité 49 °D et 58 °D) .Cette production est accompagnée d'un abaissement considérable et progressif du pH du milieu où les valeurs de pH ont diminués de 6.10 à 5.95.

III.4.2. Pouvoir coagulant

Les résultats de la coagulation du lait écrémé montrent que la plupart des isolats sont capables de coaguler le lait après 48h d'incubation à 37°C. Le coagulum formé a une consistance ferme et visqueuse. Le volume du lactosérum mesuré pour ces souches varie entre 20ml et 55ml selon les isolats (**figure21**).

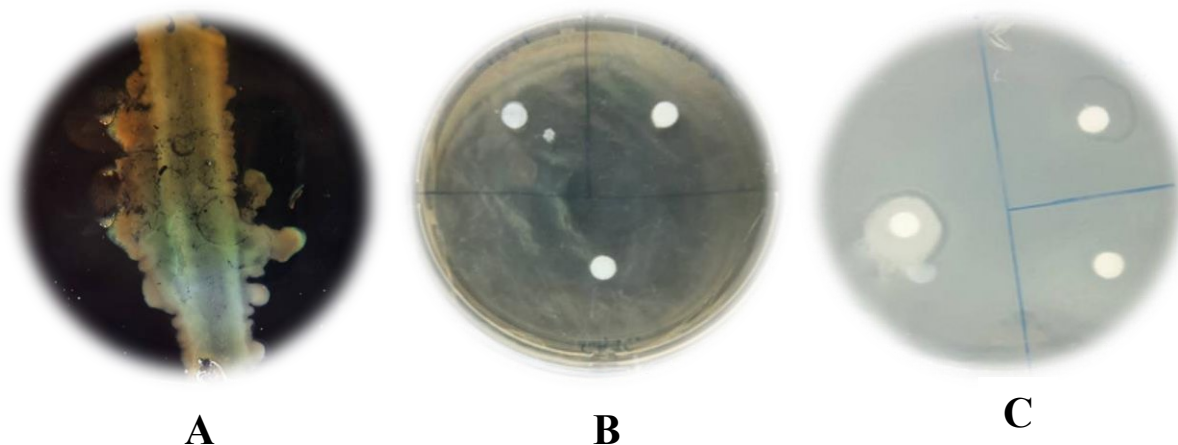


*Figure21. Aspect de coagulation du lait par les souches ensemencées
(A : gel ferme, B : témoin)*

III.4.3 Activité amylolytique, lipolytique et protéolytique

Les résultats du pouvoir amylolytique et lipolytique montrent que tous les isolats sélectionnés sont incapables de dégrader l'amidon et Tween20+80, respectivement.

En ce qui concerne l'activité protéolytique réalisée sur le milieu YMA, les isolats ont pu croître sur le milieu sans un pouvoir protéolytique à l'exception des isolats LAB05 et LAB06 où il y a eu apparition d'un halo clair autour de disque avec un diamètre de lyse estimé à 12 mm comme le montre (**la figure22**).



. *Figure 22: Résultats des aptitudes A : amylolytique, B : lipolytique, C : protéolytique*

III.3 Résultats de l'activité antifongique

III.3.1 Résultats qualitatifs (confrontation directe)

Les résultats de la confrontation directe ont été obtenus après 3 jours d'incubation, Les isolats ont montré une action inhibitrice **totale** contre la souche fongique *Fusarium graminearum* à l'exception de la souche LAB08 où le contaminant fongique s'est développé dans la boîte avec un diamètre de 3mm, ce qui signifie que cet isolat est inactif contre cette moisissure en comparant la croissance radiale avec la boîte témoin (**tableau6**).

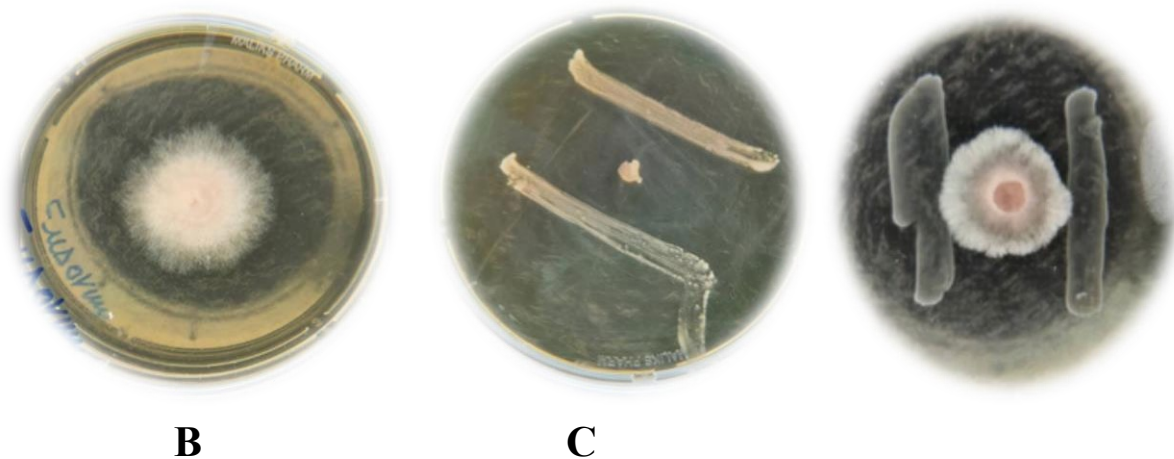


Figure23. Confrontation directe par les LAB contre F.graminearum (A) Témoin (B) résultat positif (C) résultat négatif

Les résultats obtenus contre *Fusarium oxysporum* et *Alternaria alternata* et *Alternaria linaria* ont montré une inhibition totale de la croissance ; ce qui indique le fort pouvoir inhibiteur de ces isolats.

Concernant les résultats des confrontations contre *Aspergillus niger*, les isolats LAB03/LAB04/LAB060/LAB08 ont montré une forte efficacité antagonistes; aucune de croissance de ce contaminant fongique n'a été décelée. Par contre, LAB01, LAB02, LAB05 et LAB07 ont exercé une inhibition moyenne avec un diamètre qui variait entre 0.9 à 3 mm



Figure 24. Résultats confrontation directe *Aspergillus niger*

Un effet inhibiteur totale des isolats vis-à-vis *Aspergillus alliaceus* et *Aspergillus parasiticus* a été enregistré sauf pour LAB03, LAB05 et LAB08 qui ont un pouvoir inhibiteur moindre, car le diamètre d'inhibition variait entre 0.6 à 2.3mm.

Pour le genre *Aspergillus ssp*, seul les isolats LAB06 et LAB04 exerçaient une forte inhibition. En revanche, les autre isolats étaient moins actifs ce qui reflète son résistance; diamètre de croissance est varié entre 1.6 à 2mm comme le montre **la figure 25**.



Figure 25. Confrontation directe contre *Aspergillus sp*

En ce qui concerne le genre *Penicillium olsonii*, les résultats obtenus montrent un fort effet inhibiteur, à l'exception de LAB01 et LAB08 où une croissance radiale de cette moisissure a été observée.

Pour le contaminant *Penicillium chrysegenum*, les résultats de la confrontation de l'ensemble des isolats montrent une inhibition totale de ce contaminant sauf pour LAB03 et LAB08 (**figure 26**).

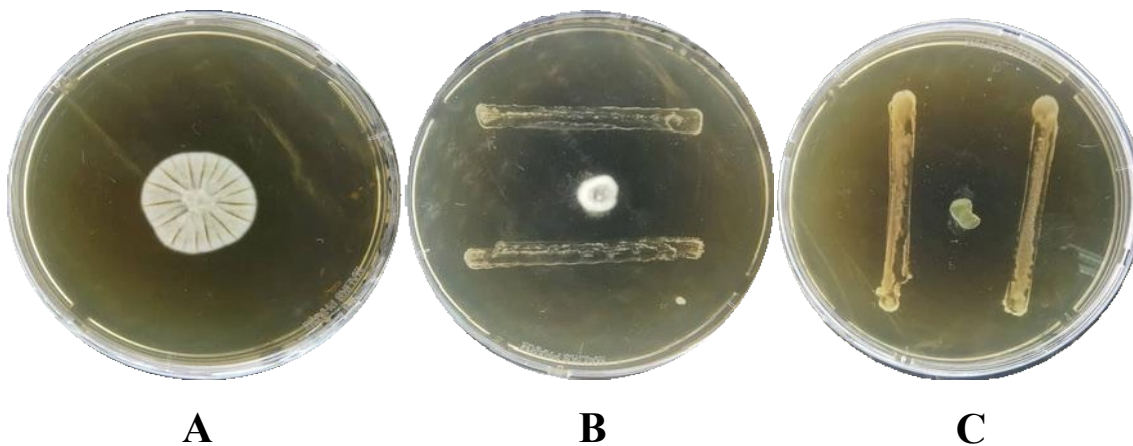


Figure 26. Confrontations directes par les LAB contre *Penicillium chrysegenum* (A) Témoin (B) résultat négatif (C) résultat positif

III.3.2 Résultats Quantitatifs (Co-culture sur milieu solide)

Les résultats de la Co-culture sur milieu solide ont confirmé ceux de la méthode qualitative ; la quasi-totalité de ces isolats ont pu éradiquer la croissance radiale des 4 souches fongiques à savoir : *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *Alternaria linaria* et *Aleternaria aleternata* avec un taux de inhibition de 100% durant 12 jours d'incubation. L'exception est observée pour l'isolat LAB08 où aucune inhibition contre *F. graminearum* n'a été détectée, ce qui indique son faible pouvoir antagoniste (**figure27**).

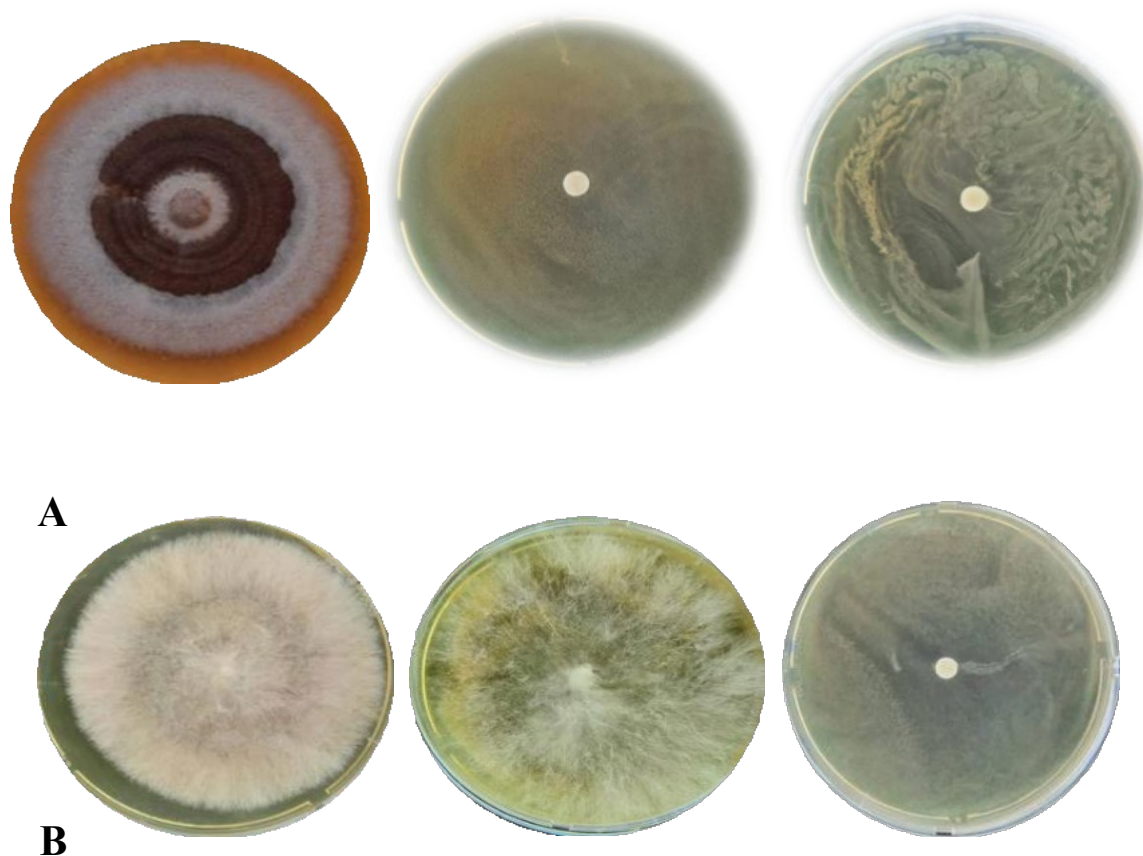


Figure 27. Résultat de test quantitatif des souche fongiques : (A) *Alternaria linaria* (B) *F.graminarum*

Pour *Penecillum chrysegenum*, les isolants ont démontré une inhibition totale à l'exception de LAB03 et LAB08 où les taux d'inhibition étaient de 78% et de 55%, respectivement, après 12 jours incubation.

Concernant *A.niger*, les résultats ont montré sa résistance vis-à-vis de LAB01, LAB02, LAB07 où le taux d'inhibition variait entre 10 % à 18% (figure 28). Les mêmes constatations ont été observées avec le contaminant fongique *A.parasiticus* où le taux d'inhibition était relativement bas (entre 20% et 36%) obtenus avec LAB03, LAB05, LAB07 et LAB08.

Enfin, le contaminant fongique *A. alliaceus* a confirmé le fort pouvoir inhibiteur des isolats, avec un taux d'inhibition de 100%, à l'exception de l'isolat LAB08 où le taux était estimé à 62%.



Figure 28. Résultats du test quantitatif d' *Aspergillus niger*

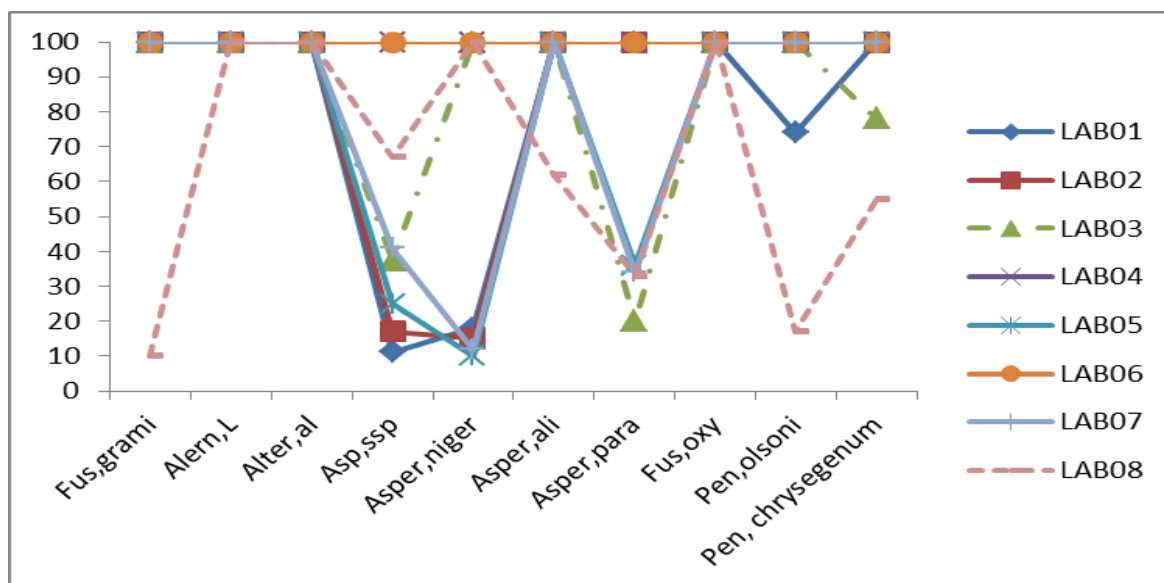


Figure 29. Courbe représentatif des taux d'inhibition de la croissance mycélienne par la méthode co-cultures sur un milieu solide entre les souches fongiques et les souches bactériennes.

Tableau 6. Résultats de la confrontation directe

Souche fongique	<i>Fusarium graminearum</i>								
isolat	LAB01	LAB02	LAB03	LAB04	LAB05	LAB06	LAB07	LAB08	Témoin
Diamètre inhibition	0	0	0	0	0	0	0	3	3.5
S.fongique	<i>Fusarium oxysporum</i>								
isolat	LAB01	LAB02	LAB03	LAB04	LAB05	LAB06	LAB07	LAB08	Témoin
Diamètre inhibition	0	0	0	0	0	0	0	0	3

S.fongique	<i>Alternaria linaria</i>								
isolat	LAB01	LAB02	LAB03	LAB04	LAB05	LAB06	LAB07	LAB08	Témoin
Diametre inhibition	0	0	0	0	0	0	0	0	3
S.fongique	<i>Alternaria alternata</i>								
Isolat	LAB01	LAB02	LAB03	LAB04	LAB05	LAB06	LAB07	LAB08	Témoin
Diametre inhibition	0	0	0	0	0	0	0	0	1.6

S.fongique	<i>Aspergillus niger</i>								
isolat	LAB01	LAB02	LAB03	LAB04	LAB05	LAB06	LAB07	LAB08	Témoin
Diamètre inhibition	1.2	0.9	0	0	3	0	0.7	0	3.3
S.fongique	<i>Aspergillus parasiticus</i>								
Isolat	LAB01	LAB02	LAB03	LAB04	LAB05	LAB06	LAB07	LAB08	Témoin
Diamètre inhibition	0	0	1.7	0	1.6	0	2	2.7	3

S.fongique	<i>Aspergillus ssp</i>								
Isolat	LAB01	LAB02	LAB03	LAB04	LAB05	LAB06	LAB07	LAB08	Témoin
Diamètre inhibition	2.4	1.6	1.3	0	1.9	0	1.7	1.9	2.9

S.fongique	<i>Aspergillus alliaceus</i>								
Isolat	LAB01	LAB02	LAB03	LAB04	LAB05	LAB06	LAB07	LAB08	Témoin
Diamètre inhibition	0	0	0	0	0	0	0	0.8	2

S.fongique	<i>Penicillium olsonii</i>								
Isolat	LAB01	LAB02	LAB03	LAB04	LAB05	LAB06	LAB07	LAB08	Témoin
Diamètre inhibition	0.9	0	0	0	0	0	0	1.1	2
S.fongique	<i>Penicillium chrysegenum</i>								
Isolat	LAB01	LAB02	LAB03	LAB04	LAB05	LAB06	LAB07	LAB08	Témoin
Diamètre inhibition	0	0	0.9	0	0	0	0	1.2	2.8

Discussion Générale

La qualité sanitaire des produits alimentaires peut être menacée par une large gamme de contaminants, incluant les souches fongiques. Cette contamination est à l'origine de la détérioration de la qualité des aliments et cause de graves problèmes sanitaires aux consommateurs due aux différents mycotoxines sécrétées, dont certaines présentent des défis considérables en matière de sécurité alimentaire (**Sadiq et al., 2019**).

Malgré l'avancement technologique dans le domaine de la science et l'utilisation de nombreux processus physiques et chimiques visant l'inhibition de la prolifération fongique, l'être humain est en recherche continue d'un moyen de lutte contre ce fléau persistant et qui demeure un grand défi pour les industries alimentaires (**Oranusi et al., 2013**). Ainsi, de nombreuses études se sont orientées vers des alternatives "Bio" en l'occurrence, l'utilisation des micro-organismes afin de stopper ou éradiquer cette contamination.

Notre étude s'inscrit dans ce contexte de bio contrôle des champignons toxigènes par des bactéries lactiques. L'échantillonnage a été effectué à partir de produits de terroir issus de la région de Naâma en vue de leur évaluation. Ces produits sont : le lait de chamelle, les grains de pollen, la margine d'olive. De ce fait, 8 souches bactériennes ont pu être isolées et ont fait l'objet d'une identification phénotypiques à savoir : caractérisation morphologique, physiologique et biochimique.

L'étude des caractères microscopiques ont montré que les 8 isolats sont des cocci à Gram positif à l'exception de l'isolat LAB08 qui est de forme bacillaire. Les coques sont immobiles, isolées, arrangés en diplocoque ou en courte chainettes. Selon **Joffin & Leyral (1996)**, la classification primaire des isolats peut être réalisée sur la base de la coloration de Gram, la morphologie cellulaire des colonies et leur mode de regroupement. L'identification macroscopique des isolats sur les différents milieux notamment MRS, M17, CATC, montre que les colonies sont rondes de forme régulières et de couleur blanchâtre, ce qui correspond aux traits majeurs des bactéries lactiques (**Franz et al., 1998**). Et catalase négatif la plupart sont homofermentaires, ils ont montré une résistance aux stress rencontrés dans l'environnement ($10^{\circ}\text{C} < T^{\circ} < 45^{\circ}\text{C}$, thermo-résistance à 60°C pendant 30mn, $4,4 < \text{pH} < 6,5$ et $4,4\% < \text{NaCl} < 9\%$), capable de dégrader l'esculine et ADH positif.

A la lumière des caractères macroscopique et biochimique et en se basant sur les caractères physiologiques précisés par le **Bergy's Manuel**, on peut présumer que ces 8 isolats appartiennent aux genres : *Pediococcus* (LAB02), *Lactobacillus* (LAB08), *Enterocoque* (LAB03, LAB06), *Lactocoque* (LAB01, LAB05 et LAB07) et *Leuconostoc* (LAB04).

La dégradation des carbohydrates a été étudiée par la galerie API 20Strep pour les *enterocoque* et *lactocoque*. L'exploitation des résultats de cette galerie nous a permis de classer ces isolats en Genre/Espèce comme telle : *Enterococcus faecium* (LAB03) avec une probabilité de 83%,

Enterococcus avium (LAB06) avec une probabilité de 87%, *Lactococcus ssp lactis* (LAB01) avec une probabilité 62%.

Le second objectif de ce travail est la caractérisation technologique de nos isolats afin de sélectionner les souches à intérêt antifongique.

Lors de cette caractérisation, on s'est intéressé à l'activité acidifiante qui consiste à suivre, d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part, de doser simultanément l'acidité totale par la soude. Il semble que la plupart des isolats identifiées dans cette étude ont une activité acidifiante modérée et sont capables d'abaisser le pH entre 5,18 et 4,15 après 72h d'incubation ces résultats sont similaires avec les travaux de (**Boussouar, 2017**) et (**Djaaboub, 2021**) qu'ils ont trouvé qu'une bonne culture starter productrice d'acide réduira le pH du lait de sa valeur initiale de 6,6 à 5,3 en 6h à 30°C.

La fonction acidité se manifeste par l'hydrolyse de lactose grâce à la bêta-galactosidase pour produire le glucose et le lactose. Ces derniers sera fermenté pour produire des composés acides, du gaz carbonique ou de l'alcool, cette production de composés va entrainer une baisse de pH qui peut induire des odeurs et des goûts particuliers (**Boullouf, 2016**).

Le pouvoir protéolytique des bactéries lactiques peut se manifester soit par une production d'enzymes exo-cellulaires qui accompagne le développement microbien, soit par une libération d'enzymes endo-cellulaires après la lyse des cellules bactériennes (**Djaaboub, 2021**). Leur action protéolytique a un impact significatif sur le développement du goût, arôme et texture (**Ilkay & Zubeyde, 2014**). La majorité de nos isolats présentent une faible activité protéolytique à l'exception au genre *Enterococcus* et *Lactococcus ssp* qui ont montré une activité protéolytique traduite par l'apparition d'un halo clair avec un diamètre de 12 mm. Ces isolats possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en acides aminés. Notons que la souche bactérienne est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse entre 5 et 15mm de diamètre (**Djaaboub, 2021**). De ce fait, selon cette définition, les isolats sont considérées comme protéolytiques.

Nos résultats sont en concordance avec la classification de **Yelnetty et al., (2014)** où ils ont montré que les bactéries qui possède un pouvoir protéolytique de diamètres varie entre 10 à 15 mm sont des souches moyennement protéolytiques.

En ce qui concerne l'activité lipolytiques des bactéries lactiques, la lipolyse est un processus important dans la maturation du fromage en raison de son rôle dans le développement du goût et de la texture du produit final. Ceci est obtenu par hydrolyse enzymatique du triglycérides en acides gras, et qui peut être considéré comme un précurseur d'aromatization tels que les méthylcétones, les alcools secondaires, les esters et les lactones (**Boussouar, 2017**). Nos résultats obtenus dans cette étude ont montrent que les entérocoques sélectionnées n'ont pas

une activité lipolytique, ces résultats corroborent ceux signalés par **Boussouar (2017)**. Pour les d'autre genre, ils se sont avérés lipase négative. Ce résultat peut être relié à la source lipidique utilisé lors du test. En fait, **Rahil (2015)** déclare que l'action lypolytique des *Lactocoque et Enterocoque* est significative en présence de 1% de l'huile d'olive en comparaison avec les substrats lipidiques artificiels.

L'activité amylolytique a été évaluée sur un milieu à base d'amidon; aucune activité n'a été remarquée chez nos isolats sélectionnés. Ces résultats sont similaire avec ceux **Boussouar (2017)** concernant les *Enterococcus* (LAB03et LAB06) et **Belharma (2017)** pour les *Pediococcus*ssp et *Lactobacillus* ssp, car la synthèse de l'amylase est une caractéristique rare pour les bactéries lactiques tel affirmé par (**Girand et al., 1994**).

Un autre pouvoir a été évalué, celui de la coagulation du lait, tous les isolats lactiques ont été capables de coaguler le lait écrémé. Le coagulant formé présent un aspect ferme et visqueux. Cette coagulation peut être provoquée par la transformation progressive du lactose du lait en acide lactique ce qui entrainer l'abaissement du pH et la coagulation du lait.

Depuis des années, plusieurs travaux réalisés ont prouvé que les bactéries lactiques peuvent être une solution intéressante vis-à-vis des contaminations fongiques et de leurs toxines associées (**Saladino et al., 2016 ; Al-Haik et al., 2017 ; Juodeikiene et al., 2018 ; Shehata et al., 2019 ; Martí-Quijal et al.,2020**). Ainsi, la deuxièmes partie de notre travail expérimental est consacré à la recherche et l'évaluation de l'activité antifongiques de ces isolats lactiques sélectionnées vis-à-vis de 10 souches fongiques indicatrices (*Fusarium graminearum* s28, *F. oxysporum*, *Aspergillus niger*, *A. alliaceus*, *A. parasiticus* , *Aspergillus* ssp ,*Alternaria linaria*, *A. alternata* ,*Penicillium .chrysegenum* et *Penicillium* ssp).

Les résultats de l'activité antifongique des 8 isolats lactiques obtenus par la méthode de confrontation, a révélé le fort pouvoir inhibiteur de l'ensemble des bactéries lactiques vis-à-vis de la croissance mycélienne des *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *A. linaria*, *A. alternata* , *A. alliaceus* et *Penicillium chrysegenum*, *Penicillium olsoni*. Par contre, l'effet inhibitoire de *Aspergillus niger*, *A. parasiticus* et *Aspergillus* ssp varie selon les souches lactiques.

L'activité antagoniste de deux souches de LAB (3et 6) identifiées respectivement comme *E. avium* et *E. fecium*, ont montré une très bonne efficacité antagoniste contre la majorité des souches *Penicillium* ssp, *A. alternata* et *A. linaria* et *F.graminearum*, la croissance du mycélium et des conidies a été inhibée par des souches de bactéries lactiques. Ces résultats sont similaires à ceux d'autres études menées par (**Fhoula et al., 2013; Nora, 2014; Braïek et al., 2018**) et (**Zebouri , 2021**). En ce qui concerne le contaminant *A.parasiticus*, les *E. fecuim* n'a présenté aucune inhibition, nos résultats sont en discordance avec les travaux de (**Serra Djaaboub et al., 2018**) où ils ont trouvés que *E.fecuim* présentait une inhibition de la croissance radiale

jusqu'à 73,89%. Cette inhibition peut s'expliquer par le fait que les isolats lactiques peuvent sécréter des acides organiques, des toxines et autres produits antifongiques.

Selon la littérature, *Lactobacillus ssp* (**LAB 05**) est rapportée comme une des espèces les plus étudiées pour ses propriétés antifongiques (**Zbbouri, 2021**). (**Sadiq et al., 2019**), ont montré une très faible activité antifongique de ce genre contre *Alternata*.et *A.alternaria linaria* . Nos résultats ne sont pas similaires avec ses travaux où nos isolats avaient une très bonne efficacité antagoniste contre ces contaminants. Aussi, les résultats de **Fowoyo et al., 2015**, ont montraient que les *Lactobacillus* n'exerçaient pas très bonne inhibitions contre *A.niger*, ce qui n'est pas le cas avec nos *Lactobacillus* , où on a pu montrer qu' après 24h d'incubation, *A. niger* était inhibé de 2mm .

Pour les contaminants fongiques *Penecillum ssp* et *F.oxysporum*, les *lactobacillus* présentent une inhibition totale, ce qui représente une forte activité antagoniste. Nos résultats prouvent les travaux de (**Youcef et al .,2008**) qu'ils ont trouvé une bonne inhibition contre ces contaminants . Cette inhibition peut être provoquée par les dipeptides cycliques produits par *Lactobacillus* capables de retarder la croissance de certaines moisissures.

En 2020 Nebia Zebboudj et ses collaborateurs ont établis une étude pour tester l'activité antifongique des bactéries lactiques appartenant au genre *Leuconostoc ssp*, ils ont prouvé que cette souche peut réduire de manière significative la croissance de diverses espèces de *F. oxysporuim* et *F.graminarum* ; ces travaux sont en accord avec les nôtres .**En 2019 Ouiddir et al** , déclarent que le genre *Lactobacillus ssp* présente une activité antifongiques plus prononcée comparée à celle du *Leuconostoc ssp* contre *Aspergillus*, *Penicillium*. Dans notre étude, les résultats obtenus sont à l'inverse de ceux rapportés par **Ouiddir et al**.

Et ce qui concerne l'espèce *Lactococcus lactis ssp lactis*, une inhibition totale a été observée contre *F.graminrum* avec taux qui pouvait atteindre jusqu'à 100%. Nos résultats sont meilleurs en les comparant avec les travaux de (**Zebboudj et al., 2020**), où la souche *Lactococcus lactis* a inhibé la croissance des *Fusarium* sur MRS avec un taux moyen estimé à 60,5%.et pour le contaminat *Lactococcus ssp* a montré un taux d'inhibition faible contre *Aspergillus ssp A. parasiticus* et *A.niger* ces résultats ne sont pas similaire avec les travaux de (**Zebbouj, 2014**). Le genre *Pediococcus* a exercé un fort antagonisme contre un large panel de souches fongique (*F.graminrum* ,*Aspergillus alliaceus* ...). Ce large spectre est un avantage significatif pour l'utilisation dans la lutte biologique, ce genre est très actif et réduit les populations des contaminants fongiques et la production des toxines (**Ngang et al., 2015**).

Cette inhibition peut être due aux:

- Les acides organiques qui agissent sur la membrane plasmique en neutralisant son potentiel électrochimique et en augmentant sa perméabilité. La forme hydrophobe de

l'acide diffuse sur la membrane cellulaire et se dissocie à l'intérieur de la cellule libérant ainsi des ions qui acidifient le cytoplasme ex: acide acétique est le métabolite antifongique le plus efficace produits par les bactéries lactiques (**Ouidir, 2019**)

- la compétition nutritionnelle entre pathogène /antagoniste pourrait avoir un impact sur l'activité antifongique en limitant les éléments nutritifs essentiel à la croissance des contaminants (**Siedler et al., 2019**) .
- production des peptides antifongiques.
- et enfin la composition du milieu culture MRS qui peut avoir un impact important sur l'expression de l'activité antifongique, car il contient de l'acétate, qui peut augmenter l'activité antifongique des bactéries lactiques.

Conclusion

Au terme de ce travail de fin d'étude, nous rappelons que l'objectif recherché est la réalisation d'une étude visant sur l'identification et la sélection des bactéries lactiques isolées à partir de nos produit de terroir , et de déterminer leur pouvoir antagoniste contre les champignons toxigènes qui pose des problèmes économiques en raison de leur production d'une variété de mycotoxine.

Dans cette étude nous avons ciblé les bactéries lactiques car elles sont parmi les bactéries les plus décrits dans littérature comme agent de préservation par excellence dû à leur caractère GRAS et leurs aptitudes technologiques intéressantes. A l'issue de ce travail, des bactéries lactiques ont été isolées à partir des échantillons de quelques produits de terroir qui sont le lait de la chamelle, les grains de pollen et la margine d'olive sur milieu MRS et purifiées. Les isolats ont subi une série de tests morphologiques et cultureux (étude macroscopique et microscopique) et des caractères biochimiques (recherche de la de catalase, production de gaz) les tests physiologiques (température, pH, salinité..) les résultats obtenus, nous a permis une pré-identification de 8 isolats appartenant aux genres : *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*. Ces genre identifiés ont été retenu par suite pour une évaluation de leur aptitude technologique, ils ont démontré un pouvoir acidifiant modéré couplé à un degré d'acidifiant variant de 49 et 58°D'après 48h d'incubation à 37°C .Concernant l'activité protéolytique, certains isolats possèdent un pouvoir protéolytique moyenne, à l'instar, le pouvoir lypolytique, nos isolats sont lipase négative. En matière d'aptitude antagoniste, nous avons constaté que nos bactéries lactiques présentent une efficacité antifongique allant jusqu'à 100% d'inhibition vis-à-vis les champignons toxigène.

A la lumière de ces résultats obtenus, il apparait que nos produits de terroir renferment une niche écologique importante pour l'isolement des bactéries lactiques avec des applications biotechnologiques potentielles. Ces résultats confirment notre hypothèse de départ : les LAB représentent une voie prometteuse pour la production des substances antifongiques utilisées dans la bio-conservation des aliments, et par leur innocuité, leur aptitudes technologiques et antimicrobiennes, semblent être de bons agents contre les moisissures et leur toxines associées, et apparaissent comme une solution parfaitement envisageable pour augmenter la DLC et remplacer les conservateurs chimiques dans les produits alimentaires.

Les résultats obtenus au cours de ce travail permettent d'envisager plusieurs recommandations et prescriptives :

- Identification moléculaires des souches lactiques isolées.
- Exploitation des performances technologique des bactéries lactiques isolées.

- Optimisation de l'aptitude antagoniste des bactéries lactiques en vue de les utiliser comme des cultures protectrices.
- Tester les cultures antifongiques dans d'autres produits alimentaires.

***Références
bibliographiques***

A

- 1) **Ababsa,Ahlem,2012.** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques. du lait Magister en Génie microbiologique. Université Setif.111
- 2) **Abdelrhafour Tantaoui-elarakp, Lamyae Benabdellah, Mohamed Majdp, Moulay Rachid ElaLaoup & Abdellatif Dahman.1994.** Recherche de mycotoxines dans des denrées alimentaires distribuées au Maroc. Microbiologie Alimentaire et Biotechnologie. Vol. 14 (3): 11 ·16.
- 3) **Adnan A.F.M. & Tan I.K.P,2007.** Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. Bioresource Technology 98:1380-1385.
- 4) **Ahmad-Rather, I., Seo, B.J., Kumar, V.J.R., Choi, U.H., Choi, K.H., Lim, J.H., Park Y.H. 2013.**Isolation and Characterization of a Proteinaceous Antifungal Compound from *Lactobacillus plantarum* YML007 and Its Application as a Food Preservative, Letters in Applied Microbiology, 57, 69-76.
- 5) **Al kassaa I., Hamze M., Hober D., Chihib N. et Drider D. 2014.** Identification of vaginal lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in north Lebanon. Microbiology and Ecology. 67: 722–734
- 6) **Al-Haik W.M., Bawazir A.M.A., Mohammad Aly M., Al-Haddad A.M. and ShantaramM.,2017.** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against toxigenic fungi.Int.J.Curr.Res.Aca.Rev. 5(11): 1-8.
- 7) **Allouche.k,Samoun.O,2017.** Caractérisation de souches locales de bactéries lactiques isolées à partir de quelques produits laitiers artisanaux et mise au point d'un produit type"Raib." master en microbiologie alimentaire et santé, Université A. MIRA – Bejaia,63p.
- 8) **Alshannaq, A. et Yu, J. H.2017.**Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins In Food International journal of environmental research and public health, 14(6), 632
- 9) **Arena M.P., Russo P., Capozzi P., Lopez P., Fiocco D. et Spano G. 2014.** Probiotic abilities of riboflavin-overproducing *Lactobacillus* strains: a novel promising application of probiotics. Applied Microbial Biotechnology. 98:1-14.
- 10) **Avagodo, A. 2004.** Caractérisation biochimique et Moléculaire des bactéries Lactiques productrices d'expolysaccliarides isolées à partir d'échantillons de lait fermenté du Burkina faso. These doctorat. Bienchimie et Biotechnologie. Université Ouagadougou.
- 11) **Avis, T. J., Bélanger, R.R. 2001.** Specificity and Mode of Action of the Antifungal Fatty Acid cis-9-Heptadecenoic Acid Produced by *Pseudozyma flocculosa*. Appl. Environ. Microb. 67(2): 956-960.

- 12) **Axelsson L. 2004.** Classification and physiology. In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A. 3ème Ed: New York, USA. 633: 166.

B

- 13) **Belarbi, Fatima, 2011.** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices de métabolites antibactériennes. Mémoire de magistère. Université d'Oran Es Senia. Algérie. 129p.
- 14) **Belharma, Zineb, 2017.** Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires. Thèse de doctorat en Microbiologie appliquée, Université Sétif, 147p.
- 15) **Benoit, Calmes, 2011.** Réponses adaptatives d'*Alternaria brassicicola* au stress oxydatif lors de l'interaction avec les brassicacées : Rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion Transférases. Thèse de Doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale, Université d'Angers, 202p.
- 16) **Benyoucef, Amel, 2018.** Etude des propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques produisant des substances antibactériennes. Thèse de doctorat en microbiologie appliquée. 181
- 17) **Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Steingrímsson, O., Thormar, H. 2001.** Killing of gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS* 109, 670–678.
- 18) **Björkroth J. et Holzapfel W. 2006.** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *The Prokaryotes*. 4: 267-319
- 19) **Blagojev, N., Škrinjar, M., Veskovia m oračanin, S., Šošo, V. 2012.** Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites, *Romanian Biotechnological Letters*, 17, 7219-7226.
- 20) **Boubakari, Kamel.** Sélection des starters multifonctionnels isolés à partir d'un produit carné artisanal : une étude multivariable de screening. Thèse de doctorat en Microbiologie appliquées et sciences alimentaires
- 21) **Bougerra, Asema, 2021.** Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle. Thèse de doctorat en Microbiologie, université Ferhat Abbas, Setif 1, 141p.
- 22) **Boullouf, Amal, 2016.** Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel « Bouhezza ». Magister en science alimentaires, Université des frères Mentouri Constantine, 135p.
- 23) **Bourgeois C.M, et Larpent J.P., 1996.** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tec & Doc, Lavoisier. 2ème édition. Paris : 523p
- 24) **Bourgeois C.M. & Leveau J.Y., 1991.** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries

- 25) **Boussouar, Naceur, 2016.** Caractérisation technologique et sanitaire des entérocoques isolés à partir de lait de chamelle du sud-ouest algérien. Thèse de doctorat. Université Aboubekr Belkaid. Tlemcen. Algérie. 238p.
- 26) **Bouzaout, L. Adouani, S. 2020.** Production des substances antifongiques par les bactéries lactiques. Master en Microbiologie Appliquée, Université de Jijel, 101p.
- 27) **Brahimi, Samira. 2015,** Isolement et caractérisation biotechnologiques des bactéries lactiques isolées à partir des margines d'olives « AMOREDJ » fermentés. Magister en Biodiversité des micro-organismes, Université de Oran, 203p. industries agro-alimentaires. Vol III : le contrôle microbiologique. Ed. Lavoisier. Paris. 451p.
- 28) **Bartkevicse V., 2018.** Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for Fusarium mycotoxin reduction in malting wheat grains. *LWT - Food Science and Technology* 89: 307-314.

C

- 29) **Calmes B. 2011.** Réponses adaptatives d'*Alternaria brassicicola* au stress oxydatif lors de l'interaction avec les brassicacées : Rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion Transférases. Thèse de doctorat Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale Ecole Doctorale VENAM. p14.
- 30) **Carr F.J., Chill D. and Maida N., 2002** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Rev. Microbiol* 28 (4): 281-3703.
- 31) **Chabasse, D, 2002.** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, pp. 25-27.
- Choisy C., Desmazeaud M., Gripon J.C., Lamberet G., Lenoir J. et Tourneur C., 1984.** Les phénomènes microbiologiques et la biochimie de l'affinage in : Le Fromage. Tech & Doc. Lavoisier. Paris
- 32) **Cristina, 2007.** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de productions des mycotoxines. thèse de Doctorat en Pathologie, Mycologie, Génétique, Université de Bucarest, 190p

D

- 33) **Dal Bello, F., Clarke, C.I., Ryan, L.A.M., Ulmer, H., Schober, T.J., Ström, K., Sjögren, J., vanSinderen, D., Schnürer, J., Arendt, E.K. 2007.** Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *Journal of Cereal Science*, 45, 309–318.
- 34) **De Vries W., Gerbrandy S J. and Stouthamer A H. (1967).** Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 136 :415-425.
- 35) **Djossou O, Perraud-Gaime I, Lakhel Mirleau F, Rodriguez-Serrano G, Karou G, Niamke S, Ouzari I, Boudabous A, Roussos S., 2011,** Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. As potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*, *Anaerobe*, 17, 267-27
- 36) **Dortu C., Huch M., Holzappel W.H., Franz C.M.A.P. et Thonart P. 2008.** Anti-Listerial Activity Of Bacteriocin-Producing *Lactobacillus curvatus* Cwbi-B28 And *Lactobacillus Sakei* Cwbi- B1365 On Raw Beef And Poultry Meat. *Letters In Applied Microbiology*, 47(6): 581– 586.
- 37) **Dortu, C. 2008.** Ph.D Thesis. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique. (Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires).
- 38) **Dortu, C., Thonart, P. 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(1), 143-154.

E

- 39) **El-nezami, HS., Nicoletti, G., Neal, GE., Donohue, DC., Ahokas, J., 1995.** AflatoxinM1 in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food Chem Toxicol*, 33:173-179.

F

- 40) **Fhoula I, Najjari A, Turki Y, Jaballah S, Boudabous A, Ouzari H.2013.** Diversity and Antimicrobial Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Rhizosphere of Olive Trees and Desert Truffles of Tunisia. *BioMed Res Int* 2013; 2013: 405708
- 41) **Florjanowicz, T., 2001.** Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum*. *European Food Research and Technology* 212: 282-286.
- 42) **Fowoyo P.T, Uzoma E.O. 2015.** Studies on the Antifungal Activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* on Spoilage Fungi of Tomato Fruit. *Journal of Microbiology*

- 43) **Franz C.M., Du toit M., Olasupo N.A., Schillinger U. and Holzapfel W.H., 1998.** Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 ready-to-eat salad. *Lett. Appl. Microbiol.* 26(3) : 231-235.
- 44) **Furet J.P., Tailliez P. et Quénée P. 2004.** Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology.* 97 (2):197-207.

G

- 45) **Galvano, F., Galofaro, F., Galvano, G., 1996.** Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products : a worldwide review. *J Food Prot*, 59: 1079- 1090.
- 46) **Ganesan, B., Seefeldt, K., Koka, R. C., Dias, B., Weimer, B. C. 2004.** Monocarboxylic acid production by lactococci and lactobacilli. *Int Dairy J*, 14, 237-246.
- 47) **Giraud E, Champailier A, Rimbault M., 1994.** Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and environmental microbiology.* 60(12): 4319- 4323.
- 48) **Gomez J.V., Tarazona A., Mateo F., Jiménez M., Romera D., et Mateo E.M. 2020.** Study on mycotoxin contamination of maize kernels in Spain. *Food control.* 118
- 49) **Gould G.W, 2000.** Preservation: Past présent and future. *Bertich Médical Bulletin.* 56: 84-96.
- 50) **Guezlane,tebibel Nadjet, Bouras,Noureddine , Ould el hadj Mohamed Didi 2016 .** Les mycotoxines:un danger de sante public .*Algerian journal of arid environment* 35 vol 6 n°1 32-46
- 51) **Guillemette T, 2003.** Contribution à l'étude du déterminisme moléculaire du pouvoir pathogène d'*Alternaria brassicae*, l'agent du black spot des crucifères. Thèse de doctorat.Université d'Angers. 195p.
- 52) **Guillo N., 1958,** Élaboration par *Lactobacillus acidophilus* d'un produit actif contre *Candida albicans*, *Annales de l'institut Pasteur*, 95, 194-207.
- 53) **Guiraud,1998.** *Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agroalimentaire.* Ed. Dunod Paris. France. 652 p.
- 54) **Guo, J., Brid Brosnan, Ambrose Furey, Elke K. Arendt, Pdraigin Murphy et Aidan Coffey.,2012.** Antifungal activity of *Lactobacillus* against *Microsporium canis*, *Microsporu gypseum* and *Epidermophyton floccosum* ,*Bioengineered*,3 :2,104-113.

H

- 56) Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Djilali B., 2009.** Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Congrès international BIOMED 1 Marrakech du 2-5 Novembre : 37-55
- 57) Hassan Y.I. and Bullerman L.B.2008.** Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. International Journal of Food Microbiology 121 (1): 112-115.
- 58) Ho T.N.T., Tuan N., Deschamps A. and Caubet R.. 2007.** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology. 134-142.
- 59) Hocking, A. D. ,2014.** Spoilage Problems: Problems Caused by Fungi. In Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition (Second Edition, Vol. 3).

I

- 60) Ilkay T., Zubeyde O., 2014.** Determination of starter culture properties of lactic bacteria isolated from cheese. GIDA, 39(1):9-15.
- 61) Imathiu S.M., Edwards S.G., Ray R.V. and Back M. 2014.** Artificial inoculum and inoculation techniques commonly used in the investigation of Fusarium Head Blight in cereals. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 49 (2): 129-139. doi: 10.1556/APhyt.49.2014.2.1

J

- 62) Jabrani.R.Oulmene.Y.2016.** Caractérisation de deux types de pollen de trappe« mono et multifloral» de la région de Tizi ouzou et essai de formulation d'un yaourt diététique à base de pollen. Master en qualité et conservation des aliments, Université de Boumerdes, 82p.
- 63) Jagadeesh K.S. 2015.** Lactic acid bacteria as a source of functional ingredients. South Indian Journal of Biological Sciences. 1(2): 70-71.
- 64) Jaquet, J., Lafont, J., Lafont, P., 1982.** Sur la contamination du lait par les aflatoxines. Revue laitière française, 42 : 63-67
- 65) Jerome, J. P., James, T. S., Stephen, L., 2004.** Microbiologie. Ed. Dunod. Paris. P 479

- 66) **Joffin J.N. and Leyral G. ,1996.** Microbiologie technique. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine. Bordeaux. France, pp : 219-223.
- 67) **Juodeikienea G., Bartkieneb E., Cernauskasa D., Cizeikienea D., Zadeikea D.,Leleb V. and Bartkevicsc V.,2018.** Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for Fusarium mycotoxin reduction in malting wheat grains.LWT-Food Science and technology 89:307-314.

K

- 68) **Kamaly K et Marth M.E.H. 1989.** Enzyme Activities of lactic Streptococci and Their Role in Maturation of Cheese: A review. Journal of Dairy Science. 72 : 1945-1966.
- 69) **Kassas, Z, 2017.** Croissance de souches de bactéries lactiques d'intérêts technologiques et/ou probiotiques sur MRS végétal modifié. These de Doctorat en Microbiologie ,Université Badji Mokhtar A
- 70) **Khedid,K., Faid,M., Mokhtari, A., Soulaymani,A et Zinedine, A.,2006.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. Microbiol. Res.10:10-16
- 71) **Kihal M., Prevost H., Lhotte M.E., Huang D.Q. and Divibs C., 1996.** Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. Letters in Applied Microbiology 22 (3): 219-223.
- 72) **König, H., Fröhlich, J.,2009.** Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine.Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

L

- 73) **Labioui H, Elmoualdi L, El Yachioui M, et Ouhssine M. 2005.** Sélection de souches des bactéries lactiques antibactériennes. Bulletin Society Pharmaceutica Bordeaux. 144: 237-250.
- 74) **Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S. and Wright A.V.. 2012.** Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects Fourth edition Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York

- 75) **Lamontagne M, Claude P. C, Joëlle R-A, Sylvain M, Nancy G, Maryse L, Julie J, et Ismaïl F.,2002.** Microbiologie de lait. In Vignola CL. Science et technologie du lait. Tec & Doc. Lavoisier; Montréal, pp. 75-146.
- 76) **Lane C.N et Fox P.F. 1996.** Contribution of starter and Adjunct Lactobacilli to proteolysis in cheddarcheese during ripening. *International Dairy Journal*. 6: 715-728.
- 77) **Lane C.V et Fox P.F., 1997.** Role of Strater enzymes during Ripening of cheddar cheese Made FromPasteurized Milk under controlled Microbiological conditions. *International Dairy journal*. 7: 55-63.
- 78) **Laref N., Guessas B., et Kihal M.2013.** Antifungal compounds production in different temperatures ,PH and on modified MRS Agar by Lactobacillus Strains. *Journal of biological sciences*. 13(2):94-99.
- 79) **Laref, N, 2014.**L'etude de l'activité antifongique des lactobacilles et leur effet sur la croissance d'Aspergillus sp.thèse de doctorat, université Oran,98p
- 80) **LawJ et Handrikman A. 1997.** Review Article: Proteolytic enzymes of lactic Acid Bacteria. *International Dairy journal*. 7: 1-11.
- 81) **Link H.F. (1809).** Observationes in ordines plantarum naturalis, Dissetatio 1. *Mag. Ges. Naturf. Freunde. Berlin* 3: 3-42.
- 82) **Ludwig W., Schleifer K-H., Whitman W.B., 2008.** Bergey's taxonomic outlines – Revised Road Map to the Phylum Firmicutes., vol. 3. Disponible http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_3_Outline. Pdf nnaba,158p.
- 83) **Lynch C.M , Mc Sweeney P.L.H, Cogan T.M et Drinan F.D. 1997.** Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait*. 77: 441-459.

M

- 84) **Mahamedi Alla Eddine,2015.**Etudes des qualité hygynique,phusico-chimique et microbiologiques des ferments st des beurres traditionnel destines à la consommation dans differents region d'Alegeria.Magister en biologie,University Ahemed ben bella Oran,137p.
- 85) **Mami,Anas,2013.**Recherche des bactéries lactique productirice de bactériocine à large sepctred'action vis-à-vis des germes impliquée dans les toxiinfections alimentaire en algérie .Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée, Université Oran,161p.

- 86) Marco M., 2011.** Lactobacillus plantarum in Foods, Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food, Taylor & Francis.
- 87) Martí-Quijal F.J., Princep A., Tornos A., Luz C., Meca G., Tedeschi P., Ruiz M.J., Barba F.J. and Mañes J., 2020.** Isolation, identification and investigation of fermentative bacteria from sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Evaluation of antifungal activity of fermented fish meat and by products broths. *Foods* 9 (5): 576
- 88) Matevosyan L., Bazukyan I. et Trchounian A., 2019.** Antifungal and antibacterial effects of newly created lactic acid bacteria associations depending on cultivation media and duration of cultivation. *BioMed Central Microbiology*. 19: 102. 6-8
- 89) Mattarelli Paola et Biavati Bruno., 2014.** The genera *Bifidobacterium*, *Parascardovia* and *Scardovia*. *Lactic Acid Bacteria, Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley et Sons, Ltd. : P 509-541.
- 90) Mokoena, M. P. 2017.** Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22(8), 1255.
- 91) Mollapour, M., Piper, P. W. 2008.** Weak Organic Acid Resistance of Spoilage Yeasts, In: S.V. Avery, M. Stratford, P. Van West, *British Mycological Society Symposia Series*, Elsevier, 290.
- 92) Moretti, A., 2017.** Mycotoxigenic Fungi. *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, 1542, 58–59.
- 93) Mousavi Khaneghah, A.; Fakhri, Y.; Gahrui, H.H.; Niakousari, M.; Sant'Ana, A.S. (2019).** Mycotoxins in cereal-based products during 24 years (1983–2017): A global systematic review. *Trends Food Sci. Technol.*, 91, 95–105.

N

- 94) Ngang J.J.E., Yadang G., Kamdem S.L.S., Kouebou C.P., Fanche S.A.Y., Kougan D.L.T., Tsoungui A. and Etoa F.X., 2015.** Antifungal properties of selected lactic acid bacteria and application in the biological control of ochratoxin A producing fungi during cocoa fermentation. *Biocontrol Science and Technology* 25 (3): 245-259.

O

- 95) **Orla-Jensen, S. 1919.** The lactic acid bacteria. *Mém. Acad. Roy. Sci. Denmark Sect. Sci*, 5: 181-96.
- 96) **Ogier J.C., Casalta E., Farrokh C. et Saïhi A. 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology*. 126- 286.
- 97) **Ouiddir M., Bettache G., Salas M.L., Pawtowski A., Donot C., Brahimi S., Mabrouk K., Coton E. and Mounier J., 2019.** Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. *Food Microbiology* 82:160-170.

P

- 98) **Pamel E.V., Vlaemyck G., Heyndrickx M., Herman L., Verbeken A. et Daeseleire E., 2010.** Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an UHPLC-MS/MS multi-mycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *Springer*. 1-11
- 99) **Pitt J.I. et Hocking A.D. 1997.** *Fungi and food spoilage*. 2ème Ed. Blackie Academic and Professional, London. p 503.
- 100) **Pot B. 2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments*. Corrieu G. et Luquet F.M. Ed : Lavoisier. Paris 1-106
- 101) **Pringsulaka O., Thongna N., Suwannasai N., Atthakor W., Pothivejkul K. and Rangsiruji A. (2011)** .partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from the fermented meat and fish products. *Food Control*, 23 ;547-551.

R

- 103) **Rahil, F, 2015.** valorisation de lait de chamelle par l'exploitation des potentialités technologiques des bactéries lactiques isolées localement. Thèse de doctorat en contrôle microbiologique et hygiène alimentaire, Université d'Oran, 158p
- 104) **Raman R.P., Dach G., Prasad P.K., Marappan M. et Pradeep M.A., 2016.** Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as a water additive on host associated microflora, growth, feed efficiency and immune response of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture Research*. 47(3): 1-15.

- 105) **Reboux G. 2008.** Micro-organismes environnementaux en milieu agricole. Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU de Besançon. 10-20.
- 106) **Rees T., 1997.** the development of a novel antifungal silage inoculant. Ph.D, Thesis, Cranfield University
- 107) **Ross, R. P., Morgan. S, Hill. C. 2002.** Preservation and fermentation: past, present, and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79:3-16.
- 108) **Ruiz Rodríguez, L. G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M., Mozzi, F. ,2019.** Diversity and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Wild Fruits and Flowers Present in Northern Argentina. *Frontiers in microbiology*, 10, 1091.

S

- 109) **Sadiq F.A., Yan B., Tian F., Zhao Jn., Zhang H. et Chen W. 2019.** Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews.in Food Science and Food Safety.* 18 (5): 1403-1436
- 110) **Saladino F., Luz C., Manyes L., Fernandez-Franzon M. and Meca G., 2016.** In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. *Food Control* 67: 273-277.
- 111) **Salminen S., Gorbach S., Yuan-Kun L. et Benno Y. 2004.** Human studies on probiotics: What is scientifically proven today? In: *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects.* Salimen S., Von Wright A. et Ouwerhand A. Ed: Newyork Dekker M. 515-530.
- 112) **Sandine, W.E,1988.** New nomenclature of the non-rod-shaped lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70,pp: 519-522
- 113) **Scardovi V., (1986).** Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen, 1924, 472. In : *Bergey's Manuel of systematic Bacteriology*, IXs Edition. William and Wilkins. Baltimore.
- 114) **Schleifer K.H. et Kilpper-Bälz R., 1987.** Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.*, 10: 1-19
- 115) **Schwarzer, D., Finking, R., Marahiel, M. A. 2003.** Nonribosomal peptides: from genes
- 116) **Shehata M.G., Badr A.N., El Sohaimy S.A., Asker D. and Awad T.S. ,2019.** Characterization of antifungal metabolites produced by novel lactic acid bacterium and their potential application as food bio-preservatives. *Annals of Agricultural Sciences* 64

(1): 71-78.

- 117) **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.
- 118) **Simmons, EG. 2007.** *Alternaria. An Identification Manual.* : CBS Biodiversity Series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp.
- 119) **Singh V.P. 2018.** Recent approaches in food bio-preservation: a review. *Open Veterinary Journal*. 8(1):104.
- 120) **Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J., Kenne, L. 2003.** Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12),7554-7557.
- 121) **Stiles Michael E., Holzapfel Wilhelm H., 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Inter. J. Food Microbiol*, 36: 1-29
- 122) **Stiles, M. E., Holzapfel W. H. 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1-29.
- 123) **Ström, K. 2005.** Fungal inhibitory lactic acid bacteria, Doctoral Thesis, Swedish University of
- 124) **Sun Zh., Yu J., Dan T., Zhang W. et Zhang H. 2014.** Phylogenesis and evolution of lactic acid bacteria. In: *Lactic acid bacteria: fundamentals and practice*. Ed: Springer. 1-78.
- 125) **Švec P & Franz M.A.P.C., 2014.** The genus *Enterococcus*, In: *Lactic Acid Bacteria, Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley et Sons, Ltd. : PP 175-211. UK.
to products. *Natural Product Reports*, 20, 275-287.

T

- 126) **Tabak.S et Bensoltane.A.2012.** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophiles*, *Bifidobacterium bifidus* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. Laboratoire de microbiologie alimentaire et industrielle, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université d'Oran.9
- 127) **Tabuc C. 2007.** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. INPT. Toulouse. France. 190p.
- 128) **Tikoudane.,O .Yahia.,A.2020.** Activité antifongique des bactéries lactiques. master en microbiologie appliquée. 50p.

- 129) **Tola, M. et Kebede, B. 2016.** Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food Agric.*, 1–12.

W

- 130) **Weiss, N. 1992.** The genera *Pediococcus* and *Aerococcus*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.H. (eds), *The Prokaryotes*, 2nd edn. New York: Springer-Verlag, pp. 1502–7.
- 131) **Wiseman D.W. and Marth E.H. 1981.** Growth and aflatoxin production by *A. Parasiticus* when in the presence of *Streptococcus. lactis*. *Mycopathologia*, 73: 49-56.

Z

- 132) **Zebboudj, N., Wassim Yezli, Nisserine Hamini-Kadar, Mebrouk Kihal .2020.** Antifungal activity of lactic acid bacteria against *Fusarium* species responsible for tomato crown and root rots. *Environmental and Experimental Biology* .18: 7–13.
- 133) **Zhang H. et Cai Y. 2014.** *Lactic acid bacteria fundamentals and practice*. Ed :Springer Dordrecht Heidelberg. New York London. 536p. magister, université mouloud Mammeri de TIZI Ouzo, Alger, 106p.

Annexes

Annexe N°1 : milieu cultures utilisés

Milieux de culture pour 1000ml d'eau distillée

PDA

Pomme de terre (macération 500ml de filtrat)	200g
Sucrose	10g
Agar	15g

MRS

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Sodium acétate	10g
Di-potassium hydrogénophosphate	2g
Polysorbate 80	1g
Ammonium citrate	2g
Magnésiumsulphate	0,10g
Manganèsesulphate	0,05g
Glucose	20g
Tween 80	1 ml
Agar	15g

M17

Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5g
Tryptone	5g
Peptone papainique	2,5g
Peptone pepsique deviande	5g
Acide ascorbique	0,5g
Lactose	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium	0,25g
Agar	15g

Citrate de Simmons

Sulfate de magnésium	0,2 g
Phosphate de mono-ammoniaque	1g
Phosphate bipotassique	1g
Citrate de sodium	2g
Chlorure de sodium	5g

Bleu de bromothymol	0,08g
Agar	15g

Mannitol-mobilité

Peptone	20g
Nitrate de potassium	1g
Mannitol	2g
Rouge de phénol	40g
Agar	4g

CATC

Peptone de caseine	18g
Extrait de levure	5g
Potassium	5g
Citrate de sodium	15g
Tween 80	1ml
Agar	15g

Solutions ajoutée

TTC	0.1g
Carbonate de sodium	2g
Azide de sodium	0.4g

YMA

Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Lait écrémé	1g
Agar	15g

Lait écrémé à 10%

Poudre de lait (0%MG)	100g
-----------------------	------

Stériliser par tyndallisation, 3 répétions à 100°C pendant 30min

Bouillon MRS

Polypeptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait autolytique	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de Sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de manganésium	0.02g
Sulfate de manganèse	0.05g

TSI

Extrait de viande de bœuf	3g
Peptone	20g
Chlorure de Sodium	5g
Citrate ferrique	0.3g
Thiosulfate de Sodium	0.3g
Lactose	10g
Glucose	1g
Saccharose	10g
Agar	12g
Extrait de levure	3g

Esculline

Peptone	10g
Esculline	1g
Citrate de fer ammoniacal	1g
Agar	20g

Gélose à l'amidon

Peptone	5g
Extrait de levure	7g
NaCl	2g
Amidon soluble	20g
Agar	15g

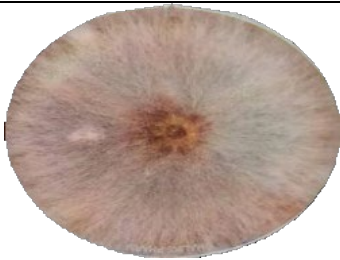









Annexe N° 2 : Coloration de Gram


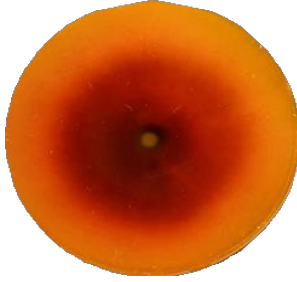

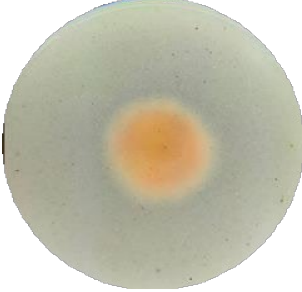
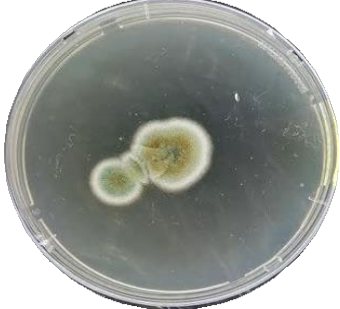
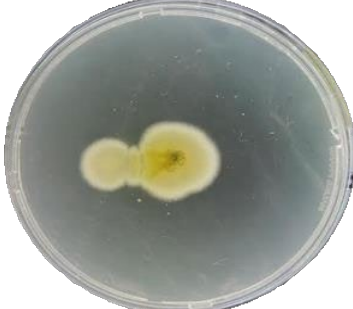

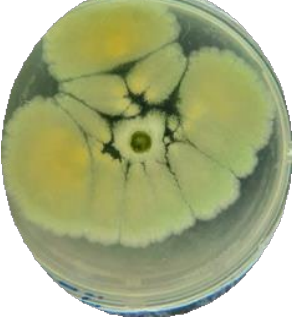
- Déposer une goutte d'eau distillée sur une lame
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec goutte l'eau
- Sécher par un passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- Couvrir le frottis par cristal violet (60s)
- Lavage avec l'eau
- Couvrir de lugol pendant 30s
- Lavage avec l'eau (5s)
- Rincer immédiatement le frottis avec l'alcool
- Laver à l'eau distillée pendant 5 s
- Couvrir avec la fuschine pendant 15s
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur les frottis et observer au microscope à un fort grossissement

Annexes N°3 : Résultat du pouvoir acidifiant

Heure	0h		2h		4h		6h		24h		48h		72h	
	pH	D°	pH	D°	pH	D°	pH	D°	pH	D°	pH	D°	pH	D°
LAB01	6,07	25	6,06	26	6,01	20	6,06	20	5,45	26	5,18	37	4,95	45
LAB02	6,08	20	6,06	25	5,94	28	5,92	30	5,36	38	4,94	44	4,66	51
LAB03	5,96	17	6	18	5,92	19	5,78	20	5,25	32	4,95	35	4,7	49
LAB04	5,93	14	5,89	18	5,92	19	5,76	20	5,18	30	4,95	39	4,02	49
LAB05	5,94	14	5,93	19	5,92	19	5,77	25	5,14	30	4,88	38	4,13	44
LAB06	5,94	16	5,97	16	5,97	18	5,97	20	5,25	39	4,56	42	4,2	50
LAB07	6,05	14	6,01	17	6,01	16	5,85	20	4,16	40	4,15	55	4,03	57
LAB08	6,1	10	6,04	11	5,99	14	5,85	15	4,33	51	4,15	55	4,1	58

Annexes N°4: évaluation macroscopique des champignons







<u>Souche fongique</u>	<u>Vers</u>	<u>Revers</u>	<u>Descriptions</u>
<i>Fusarium graminearum</i>			Aspect <i>F.grami</i> dense et le mycélium est d'une couleur rose à grenat brunâtre. le revers de couleur rubis
<i>Fusarium oxysporum</i>			La colonie présente une couleur rose à blanche et revers une pigmentation rose
<i>Aspergillus niger</i>			L'aspect plat, veloutées, de couleur brun foncé à noir et leur revers est pâle.
<i>Aspergillus parasiticus</i>			Elles sont denses, de couleur vert jaunâtre devenant vert olive foncé avec l'âge. Le revers de couleur pale
<i>Alternaria alternata</i>			Aspect de mycélium est de couleur blanche devenant gris et le revers foncé, grisâtre et un revers marron à noir.



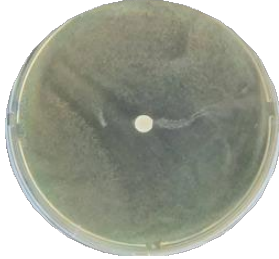

<p><u>Alternaria</u> <u>linariae</u></p>			<p>Aspect couteneux de couleur jaune a blanchâtre et revers de couleur orange foncé</p>
<p><u>Aspergillus</u> <u>alliaceus</u></p>			<p>La colonie présente un aspect couteneux avec un mycélium de couleur rose à blanchâtre après 7 jour il devient mauve et revers couleur rose pale</p>
<p><i>Penicillium chrysegenum</i></p>			<p>La colonie développe moins rapidement de contour irrégulier couleur blanche et revers jaune pale</p>
<p><i>Penicillium olsanii</i></p>			<p>Les colonies de couleur vert, poudreux, revers avec une couleur jaune</p>





Annexes N°5 : Résultat profil des isolats lactiques par les galeries 20strep


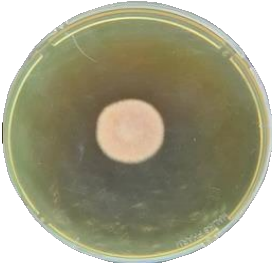


Sucre	LAB01	LAB03	LAB06
VP	+	+	+
HIP	?	?	?
ESC	+	+	+
PYRA	-	-	-
αGAL	-	-	-
βGUR	-	-	-
βGAL	-	-	-
PAL	-	-	-
LAP	-	-	-
ADH	+	+	-
RIB	+	+	-
ARA	+	+	+
MAN	+	+	+
SOR	-	-	-
LAC	+	+	-
TRE	+	+	+
INU	-	-	-
RAF	-	-	+
AMD	-	+	-
GLYG	-	-	-

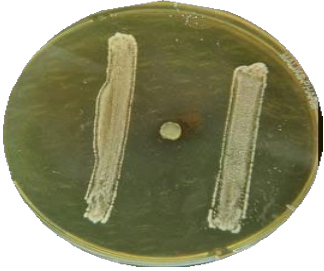


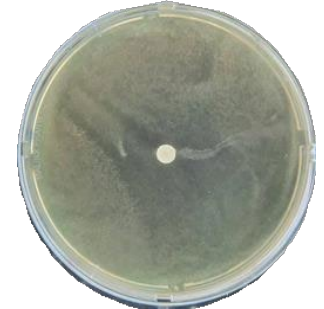


Annexes N°6 : Résultats de l'activité antifongique







souche fongique	<i>Fusarium graminearum</i>		
	Test positif	Test négatif	Témoin
Test qualitatif			
Test quantitatif			

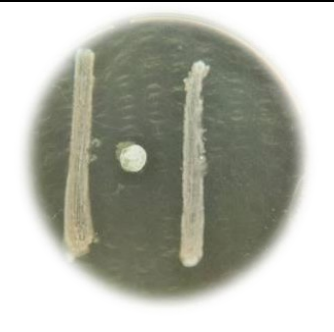





souche fongique	<i>F.oxysporum</i>	
	Test positif	Témoin
Test qualitatif		
Test quantitatif		




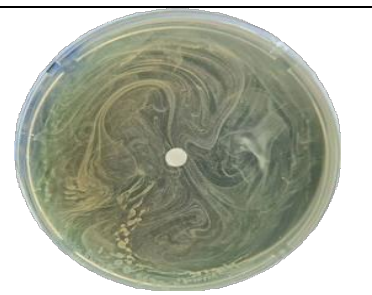
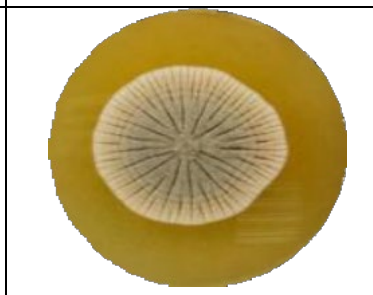

souche fongique	<i>A. alternata</i>	
	Test positif	Témoin
Test qualitatif		
Test quantitatif		







souche fongique	<i>Al, linaria</i>	
	Test positif	Témoin
Test qualitatif		
Test quantitatif		




souche fongique	<i>A,niger</i>		
	Test positif	Test négatif	Témoin
Test qualitatif			
Test quantitatif			

souche fongique	<i>A,alliaceus</i>		
	Test positif	Test négatif	Témoin
Test qualitatif			
Test quantitatif			

souche fongique	<i>Aspergillus, ssp</i>		
	Test positif	Test négatif	Témoin
Test qualitatif			
Test quantitatif			

souche fongique	<i>Pen, chrysegenum</i>		
	Test positif	Test négatif	Témoin
Test qualitatif			
Test quantitatif			

souche fongique	<i>Asper parasiticus</i>		
	Test positif	Test négatif	Témoin
Test qualitatif			
Test quantitatif			

souche fongique	<i>Penicillium olsonii</i>		
	Test positif	Test négatif	Témoin
Test qualitatif			
Test quantitatif	