

## Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière.

Fella Naouel ALLOUCHE<sup>a\*</sup>, Amina HELLAL<sup>b.</sup>, Abdenour LARABA<sup>c.</sup>

<sup>a</sup>Division Bioénergie et Environnement. Centre de Développement des Energies Renouvelables.B.P.62, route de l'observatoire. Bouzareah – Algérie.  
\*Ecole Nationale Supérieure Agronomique. EL Harrach. Algérie

<sup>b</sup>Ecole Nationale Polytechnique El Harrach. Département de Génie de l'Environnement. Algérie  
<sup>c</sup>Hôpital universitaire de Bab el Oued. Service pédiatrie. Algérie

---

### Résumé

Cette étude a été inspirée des problèmes rencontrés dans l'industrie laitière et illustre l'importance antimicrobienne des lactobacilles vis-à-vis des germes d'altération. Dix souches de lactobacilles thermophiles appartenant aux espèces: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*) ont été isolées sur milieu MRS à partir du lait cru et d'un ferment lactique commercial pour l'étude de leur activité antimicrobienne contre des germes Gram positifs et Gram négatifs. Les résultats de l'activité antimicrobienne ont révélé que toutes les souches de *Lactobacillus* isolées produisent et excrètent dans le milieu de culture des substances inhibitrices capables d'inhiber la croissance de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. L'étude des cinétiques de croissance et d'excrétion, nous a permis de choisir une souche de *Lactobacillus acidophilus* comme souche modèle pour la production et la purification de bactériocine. Une caractérisation physico-chimique nous a permis d'observer que la bactériocine présente une faible thermorésistance et un pH optimum de 5. L'activité bactériocinogénique est détruite par 121°C pendant 20 mn. La stabilité de la bactériocine a été détectée à une température de 45° C et à une gamme de pH comprise entre 5 à 6. La bactériocine conserve toute son activité pendant 7 jours à une température à + 4°C et – 20°C. L'activité est entièrement détruite sous l'action des enzymes protéolytiques, ce qui indique que la partie biologiquement active est de nature protéique. Ces propriétés suggèrent que cette substance inhibitrice est considérée comme substance de type « Bactériocine ». L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de l'activité antimicrobienne des lactobacilles dans l'industrie laitière.

*Mots clés* : *Lactobacillus*; Bactériocine; Substances antimicrobiennes; inhibition des germes pathogènes.

### 1. Introduction

Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité à produire lors de leur croissance des composés actifs à savoir les acides organiques qui acidifient le milieu, des dérivés du métabolisme de l'oxygène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et des substances naturelles de nature protéique douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération, leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes [1] [2] [3]. Parmi ces substances synthétisées, des peptides dénommés bactériocines, sont produits puis excrétés à l'extérieur des cellules productrices. Ils présentent une activité bactéricide ou bactériostatique. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelquefois limité aux espèces proches phylogénétiquement des

bactéries productrices [2] [4]. De nombreuses possibilités d'utilisation ont été envisagées, pour répondre aux besoins de l'industrie alimentaire, cosmétique et de la médecine. Ces nouvelles substances naturelles produites par des souches bactériennes universellement reconnues d'usage alimentaire dirigées contre des germes pathogènes pourraient être utilisées comme agent de conservation sous forme d'additif, soit d'inoculum bactérien producteur de bactériocines au cours du processus de fabrication, permettant ainsi de diminuer le nombre d'intoxications alimentaires et d'augmenter la durée de conservation et de commercialisation. Par exemple, la nisine produite par la souche *Lactococcus lactis*, est autorisée et utilisée à cet effet dans certains aliments [5].

L'objectif de notre travail consiste à isoler des souches de lactobacilles thermophiles à partir du lait cru et d'un ferment lactique thermophile commercial; la mise en

évidence de l'activité antimicrobienne des souches *Lactobacillus* sélectionnées; étudier par la suite la cinétique de croissance des souches *Lactobacillus* sélectionnées; extraire et purifier la bactériocine à partir de la souche *Lactobacillus* la plus performante et déterminer les propriétés physico-chimiques de la bactériocine purifiée. Enfin, c'est sur cette base de données, que nous essayerons d'étudier au laboratoire, l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles vis à vis des germes cibles.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Bactéries et conditions de culture

L'isolement des lactobacilles a été effectué à partir du lait cru et lben traditionnel préparé à partir de différents échantillons de lait cru récolté à la ferme expérimentale de l'INA El Harrach et d'un ferment lactique commercial (Danimax-food, ORLAC Birkhadem). L'isolement des lactobacilles a été effectué sur le milieu MRS à pH 6,2, incubé à 42°C pendant 72 heures, en anaérobiose [6]. Les souches ont subi par la suite des tests d'identification spécifiques. Le milieu de production de bactériocine utilisé est le milieu MRS à pH 6,8 préconisé par Barefoot et Klaenhammer; Barefoot et al. [7] [8]. Afin de détecter le spectre d'activité des espèces lactobacilles sélectionnées, nous avons testé les souches contre un certain nombre de germes indésirables. Les souches cibles utilisées pour l'étude de l'activité bactériocinogénique proviennent des collections (ATCC, IPA) fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) (tableau1). Des tests de caractérisation culturels et morphologiques (Gram, catalase et oxydase) sont effectués au préalable. Les résultats des tests de caractérisation ont été comparés avec ceux obtenus par Holt (1994) dans Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology 9 th Edition.

### 2.2. Préparation de l'extrait bactériocinique

Une culture de lactobacilles thermophiles a été effectuée dans le milieu MRS à pH 6,8, incubation à 37°C, dans une jarre d'anaérobiose. Le surnageant contenant l'extrait brut bactériocinique est récupéré par centrifugation est ajusté à pH neutre 6,5 à 7 avec du NaOH 10 M. La neutralisation de l'extrait bactériocinique permet d'éliminer l'effet des acides organiques. L'extrait est ensuite filtré sur filtres Millipore stériles de diamètre 0,22 µm, l'activité antimicrobienne est déterminée pour chaque souche de lactobacille sélectionnée.

### 2.3. Essai de l'activité bactériocinogénique

Afin de minimiser l'influence de l'effet inhibiteur du peroxyde d'hydrogène; les boîtes de Pétri sont ensemencées avec le germe cible en profondeur et en double couche dans la gélose nutritive selon la technique de diffusion des puits préconisée par Tagg et Mc Given [9] puis replit et modifiée par plusieurs auteurs

(Schillinger et Lucke; Ten brink et al.; Jin et al.) [10] [11] [12]. 20 ml de milieu gélosé, sont recouvertes avec 5 ml de milieu semi-solide (0,7 % d'agar) préalablement ensemencé avec 0,05 ml de la suspension de souche cible dilution  $10^{-1}$ . Sur les boîtes de Pétri inoculées par les germes cibles préparées préalablement, on réalise des puits (diamètre de 4,5 mm) qui sont remplis par la suite par 50 µl de l'extrait bactériocinique brut. Les boîtes de Pétri ainsi préparées sont pré-incubées pendant 2 à 4 heures à + 4 °C, afin de permettre la diffusion radiale de l'agent inhibiteur ensuite suivit par une incubation 18 à 24 heures, à 37 °C en anaérobiose, afin d'éviter la présence de l'air nécessaire à la production de peroxyde d'hydrogène [13]. En fin d'incubation, on observe les zones d'inhibition autour des puits, pour les différentes souches sélectionnées vis-à-vis des germes cibles testés. La lecture de l'activité bactériocinogénique se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour du puits, exprimée en mm [14].

### 2.4. Etude de l'évolution de la cinétique de croissance et de production

L'étude de l'évolution de la croissance des lactobacilles thermophiles sélectionnés est effectuée dans le milieu MRS à pH 6,8, incubation à 37 °C, en anaérobiose. Des prélèvements stériles sont effectués périodiquement afin d'évaluer la croissance (DO) à 560 nm, le pH ainsi que la détermination de l'activité bactériocinogénique vis à vis des germes cibles.

### 2.5. Purification de la bactériocine

Afin d'extraire et de purifier la fraction bactériocinique, une méthode d'extraction simple, fondée sur l'emploi de (NaCl) a été développée. La méthode d'extraction acide a pour principe l'adsorption et la désorption des molécules sur les cellules productrices de bactériocines préconisée par Yang et al. [15].

#### 2.5.1. Détermination du pH optimum d'action, de la thermorésistance

Le pH optimum d'action de la bactériocine purifiée est mis en évidence par la variation du pH, l'extrait bactériocinique est ajusté à des valeurs de pH variant de 2 à 10 avec HCl, 1 mole L<sup>-1</sup> ou du NaOH 1 mole L<sup>-1</sup>. Après incubation pendant 1 heure 30 mn à 37 °C, l'activité bactériocinogénique est ensuite testée vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* par la méthode de diffusion des puits [16] [17]. Pour la détermination de la thermorésistance de la bactériocine, différentes fractions d'extraits bactériociniques purifiés sont soumises à un traitement thermique à 40 °C, 45 °C, 50 °C, 60 °C, 80 °C et 100 °C pendant 1 mn et enfin un cycle d'autoclavage à 121 °C pendant 20 minutes à pH optimum (pH 5) [11] [17]. Après refroidissement, l'activité de la bactériocine est vérifiée vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*.

Tableau 1

Référence des souches cibles.

Germes cibles	Milieu d'incubation	Temps d'incubation	Origine
<b>Bactéries Gram positives</b>			
<i>Bacillus subtilis</i>	gélose nutritif (liquide et solide)	30 °C ,18-24 heures	IPA
<i>Bacillus subtilis SL 12</i>			ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>		30 °C ,18-24 heures	IPA
<i>Staphylococcus aureus 209 P</i>			ATCC
Streptocoque D :		37 °C,18-24 heures	IPA
<i>Enterococcus faecalis</i>			
<i>Listeria monocytogenes</i>			ATCC
<b>Bactéries Gram négatives</b>			
<i>Escherichia coli 54127</i>		30 °C ,18-24 heures	ATCC
<i>Escherichia coli 10531</i>		30 °C ,18-24 heures	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa 165</i>		30 °C ,18-24 heures	ATCC
<i>Salmonella seftenberg 67</i>		37 °C, 18-24 heures	IPA

ATCC: American Type Culture Collection;

IPA: Institut Pasteur d'Alger.

### 2.5.2. Détermination de la stabilité thermique de la bactériocine au cours du stockage

Afin d'examiner la stabilité thermique de la bactériocine au cours du stockage, différentes fractions d'extraits bactériociniques purifiées sont conservées à pH optimum à des températures différentes: à 37 °C et à + 4 °C pendant 7 jours et à - 20 °C pendant 7 jours et au moins une année [11] [17]. L'activité de la bactériocine est testée vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*.

### 2.5.3. Effet des enzymes protéolytiques

L'effet des enzymes protéolytiques suivantes: Trypsine (Merck from Bovine pancréas 40 UI/mg),  $\alpha$ -chymotrypsine (Merck 60 UI /mg), Pronase (Merck 4.000.000 UI/g) a été étudié afin de déterminer la nature de la bactériocine.

Tableau 2

Observations culturelles et morphologiques des lactobacilles thermophiles.

Souches	Examen Macroscopique							Croissance sur Milieu MRS Liquide 42°C / 24 H			Examen Microscopique	
	Dimensions	Forme	Couleur	Consistance	Contour	Surface	Mobilité	Trouble	Culot	Forme	Gram	
Lba1, Lba2, Lba3, Lba4, Lba5 Lba6, Lb11, Lbb1,	0,8 < Ø < 1	ronde	Crème (blanc crème)	Pâteuse	Régulier	Lisse	-	+	+	Bâtonnet	+	

Le surnageant doté d'une activité inhibitrice est additionné aux enzymes à une concentration finale de 1mg/ml dans du tampon phosphate de potassium 10 mmole/L ajusté à pH 7,0 avec du HCl ou du NaOH 1 mole L<sup>-1</sup>. Après incubation à 37 °C pendant 1 heure, l'activité résiduelle est déterminée par comparaison avec le témoin [11] [17]. L'activité bactériocinogénique a été testée par la suite en utilisant *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* comme germes cibles.

### 3. Résultats

La détermination des caractères morphologiques et biochimiques des souches isolées nous a permis d'identifier 10 souches, dont quatre espèces appartiennent au genre *Lactobacillus* (tableau 2 et 3).

Tableau 3

Tests d'identification des souches lactobacilles thermophiles.

Caractères Biochimiques	Souches <i>Lactobacillus thermophiles</i>									
	Lba1	Lba2	Lba3	Lba4	Lba5	Lba6	Lbh1	Lbh2	Lbl1	Lbb1
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance sur MRS milieu liquide: 45 ° C 15 ° C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thermoresistance: 60 ° C / 90 mn 65 ° C / 30 mn	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse de l'arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse de l'esculine	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Croissance en présence de NaCl :										
	NaCl à 2 %	+	+	+	+	+	-	-	-	-
NaCl à 4 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
type fermentaire : Homofermentaire	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coagulation du lait écrémé	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentation des sucres :	Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Saccharose	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	Maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Galactose	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	Glucose	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 3.1. Spectre d'activité

Les différentes souches de *Lactobacillus* sélectionnées, présentent un spectre d'activité très proche vis-à-vis des germes cibles testés. Il a été noté que seule la souche (Lba1) est active contre *Escherichia coli*. Les zones d'inhibition sont claires avec des bordures bien distinctes, le diamètre d'inhibition variable entre 12 et 22 mm suivant la souche testée (tableau 4). L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1 mm Schillinger et Lucke, [10].

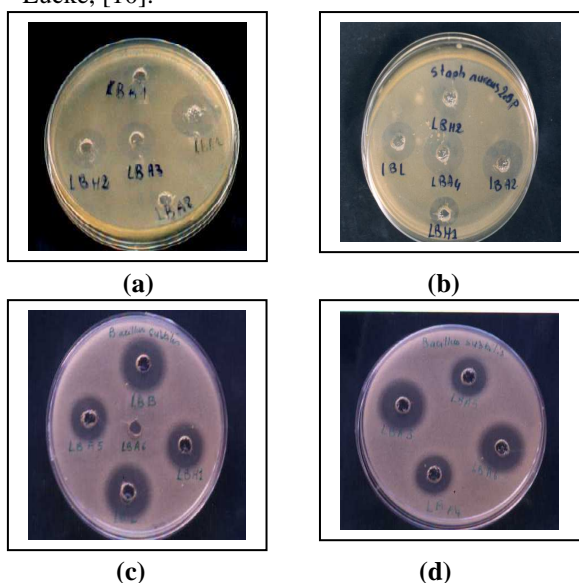


Figure 1. Activité antimicrobienne des souches de *Lactobacillus* thermophiles sélectionnées vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* 209 P (a et b) et *Bacillus subtilis* (c et d) par la méthode de diffusion des puits.

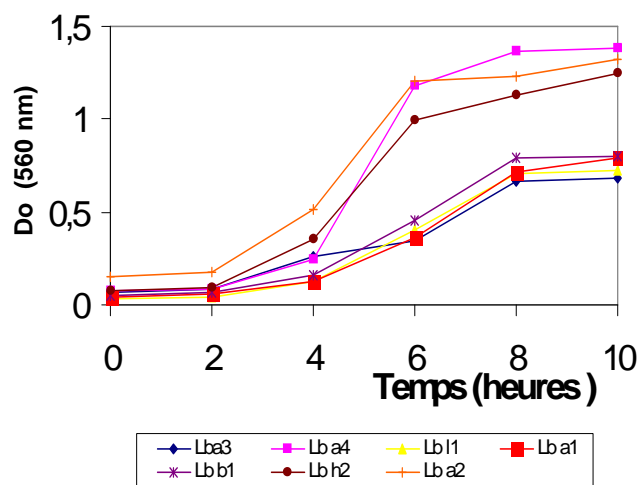


Fig. 2. Cinétique de croissance des souches *Lactobacillus thermophiles*, au cours de la fermentation en bouillon MRS (inoculé à raison de 1%, pH initial 6,8 incubé à 37°C, sans agitation).

### 3.2. Cinétique de production

A partir de l'analyse des cinétiques de croissance, il est intéressant de relever que les sept souches de *Lactobacillus* sélectionnées présentent le même profil cinétique au début de la phase exponentielle, et elles atteignent respectivement leur phase stationnaire au bout de 6-7 heures d'incubation avec des densités optiques variables selon l'espèce (fig.2).

Tableau 4

 Spectre d'activité antimicrobienne des souches de *Lactobacillus* thermophiles par la méthode de diffusion des puits. Zone d'inhibition exprimée en mm.

Souche Tests	Lba1	Lba2	Lba3	Lba4	Lba5	Lba6	Lbh1	Lbh2	Lbl1	Lbb1
<b>Souches cibles</b>										
<b>Bactéries Gram positives</b>	20	20	20	15	18	19	17,5	19	17	22
<i>Bacillus subtilis</i>										
<i>Bacillus subtilis</i> SL12	22,5	19	19	14	17	18	17	18	14,75	14,5
<i>Staphylococcus aureus</i> 209p	14,5	19	19	18	22	21	18	17	17	21
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	0	0	0	21,5	0	18	0	0	16,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Bactéries Gram négatives</b>	19	0	0	0	0	0	0	0	0	18
<i>Escherichia coli</i> 54127										
<i>Escherichia coli</i> 105331	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 165	18	18,5	19	20	22	17	19	0	17	15
<i>Salmonella</i> seftenberg 67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

L'activité inhibitrice atteint son niveau maximal après 6 à 7 heures d'incubation et reste stable jusqu'à la fin de fermentation.

La figure 3, permet d'apprécier la cinétique de croissance de la souche *Lactobacillus acidophilus* (Lba1), l'activité inhibitrice augmente progressivement au début de la phase exponentielle et se stabilise au cours de la phase stationnaire, qui correspond à la phase de synthèse des substances inhibitrices par les cellules productrices dans le milieu extracellulaire. Selon Ten Brink et al. [11] cette stabilité d'activité est attribuée d'une part au fait que la lyse cellulaire est incomplète au début de la fermentation et d'autre part, pour la souche *Lactobacillus acidophilus* M46, la sécrétion de la bactériocine acidocine B a été observée au cours de la croissance pour atteindre le maximum de sécrétion en phase stationnaire. Dans le cas des espèces appartenant au genre *Lactobacillus*, les travaux entrepris par Vaughan et al. [18]; Barefoot et Klaenhammer, [19]; Garriga et al. [20]; Barefoot et al. [8]; Ten Brink et al. [11] et Thompson et al. [21], ont rapporté que la production de bactériocine varie selon l'espèce bactérienne productrice.

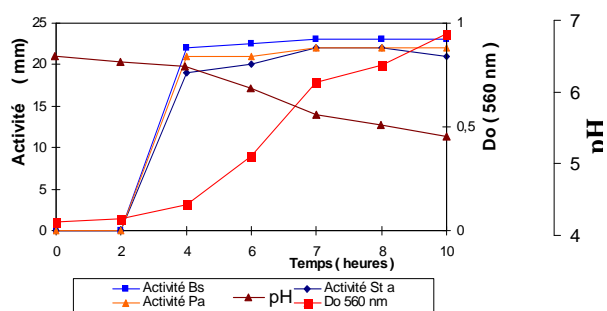


Fig. 3. Cinétique de croissance de *Lactobacillus acidophilus* Lb a 1, activité antibactérienne et évolution du pH au cours de la fermentation en bouillon MRS (inoculé à raison de 1%, pH initial 6,8, incubé à 37°C, sans agitation).

En revanche, on a constaté également que la sécrétion des molécules inhibitrices (bactériocine) augmente au fur et à mesure au cours de la croissance et n'atteint son niveau maximum de production qu'après acidification plus ou moins complète du milieu de culture, vers la fin de la

phase exponentielle et au début de la phase stationnaire (fig.3).

Sur la base des résultats obtenus, il s'avère que le développement des différentes souches *Lactobacillus* étudiées sur le milieu MRS pH initial voisin de la neutralité ne démarre que tardivement et atteint sa densité maximale après 10 heures d'incubation. Il apparaît également que l'acidité développée par les bactéries elles mêmes contribue au ralentissement et à l'arrêt de la croissance (fig.3). A ce titre les travaux de Barefoot et Klaenhammer [7], révèlent que la sécrétion de bactériocines est fortement dépendante du pH initial, du milieu de production; ceci suggère que le pH du milieu facilite à la fois la sécrétion et la solubilité de la bactériocine dans le milieu de production.

#### 4. DISCUSSION

Dans la présente étude, afin de vérifier les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques, nous avons isolé et identifié des souches de lactobacilles thermophiles à partir du lait cru et d'un ferment lactique thermophile. Les résultats d'analyses ont permis d'identifier dix souches de *Lactobacillus* appartenant aux espèces suivantes: *Lactobacillus acidophilus* (Lba1, Lba2, Lba3, Lba4, Lba5, Lba6), *Lactobacillus helveticus* (Lbh1, Lbh2), *Lactobacillus lactis* (Lb11), *Lactobacillus bulgaricus* (Lbb1). De l'ensemble des résultats obtenus, on a constaté que sur le nombre total des espèces *Lactobacillus* thermophiles identifiées, la fréquence de l'espèce *Lactobacillus acidophilus* est la plus dominante.

En travaillant dans des conditions expérimentales éliminant l'influence de l'acide lactique et le peroxyde d'hydrogène, l'activité antimicrobienne due à l'action de la bactériocine pour les différentes souches de *Lactobacillus* thermophiles étudiées a révélé un spectre d'inhibition étroit, dirigé notamment vis-à-vis des germes cibles: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. Il est important de relever que les résultats obtenus dans notre étude sur les souches *Lactobacillus acidophilus* (Lba1, lba2, lba3, lba4, lba5, lba6) testées vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* se rapprochent de ceux cités dans la littérature, [22] [8] [11] [23] [24]. Dans une étude similaire, les travaux de Lin et al. [24] et Karska-Wysocki et al. [26] ont rapportés que les bactériocines produites par *Lactobacillus acidophilus* développent une activité positive vis-à-vis de *Salmonella choleraesuis*, respectivement *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (MRSA). Enfin, Itoh et al [27] Tahara et Kanatani [28] ont montré qu'il est également possible que la souche *Lactobacillus acidophilus* exerce uniquement une activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries taxonomiquement proches de la souche productrice.

L'étude de la cinétique de croissance et d'excrétion des bactériocines a montré que leur sécrétion dans le milieu de culture MRS liquide se fait au fur et à mesure de la croissance de la souche. D'une manière générale, l'activité antimicrobienne des sept souches sélectionnées est détectée au début de la phase exponentielle et n'atteint son niveau maximal de sécrétion qu'après acidification quasiment complète du milieu de culture. En effet, l'étude entreprise par Yang et Ray [15], a montré que la production de bactériocine par les bactéries lactiques est fortement dépendante : des souches, de la composition du milieu de culture, du pH final du milieu, du temps d'incubation, de la température optimale de croissance et surtout elle nécessite l'utilisation des milieux simples et économiques. Sur la base des résultats obtenus sur l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées, la souche *Lactobacillus acidophilus* (Lba1), est considérée comme étant la souche la plus performante pour son activité antagoniste vis-à-vis des souches cibles testées. La souche (Lba1) à été retenue pour sa forte activité comme modèle pour l'isolement et la purification de la bactériocine à partir de l'extrait brut (surnageant de culture). Toutefois, les tests de caractérisation préliminaires révèlent que la bactériocine présente une faible thermorésistance (tableau 5). Son activité est totalement détruite après un cycle d'autoclavage à 120 °C pendant 20 mn. La bactériocine conserve toute son activité pendant 7 jours à une température de + 4 °C et - 20 °C et au moins une année à - 20 °C selon nos conditions expérimentales (tableau 5). Sa stabilité a été détectée à une gamme de pH comprise entre 5 à 6, son pH optimum est estimé à 5.

**Tableau 5**

Détermination de la thermorésistance de la bactériocine issue de la souche *Lactobacillus acidophilus* (Lba1).

Traitement	diamètre d'inhibition (mm)	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 p
Température		
Témoin	23	20
45° C/ 10 mn	22.75	19
50° C/10 mn	15	11
60° C/ 10 mn	0	0
80° C/ 10 mn	0	0
100° C/ 1 mn	10	8.5
121 °C/ 20 mn	0	0

Conditions de réaction: Bactériocine purifiée, tampon phosphate de sodium pH 6.5, incubation à 37 °C pendant 1 heure 30 mn.

L'activité antimicrobienne est entièrement détruite sous l'action des enzymes protéolytiques, ceci suggère que la partie biologiquement active de la bactériocine est de nature protéique (tableau 6). Ces propriétés de la

bactériocine sont très importantes à déterminer, mais il serait intéressant de confirmer ces résultats *in vitro* [29] [30].

Tableau 6

Action des enzymes protéolytiques sur l'activité de la bactériocine issue de la souche *Lactobacillus acidophilus* (Lba1)

Traitement	diamètre d'inhibition (mm)	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 p
Trypsine	-	-
α-Chymotrypsine	-	-
Pronase	-	-

(-) aucune activité n'est notée.

## 5. Conclusion

Les résultats présentés dans cet article permettent à tout le moins de fournir un ordre d'idée plus clair sur le potentiel antimicrobien des souches *Lactobacillus* sélectionnées qui représentent une voie d'avenir pour la production des substances antimicrobiennes utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments. L'analyse des propriétés physico-chimiques de cette substance à activité inhibitrice de type bactériocine est nécessaire et peut servir de base pour orienter les futurs travaux de recherches sur la production de bactériocines à différentes échelles destinées à des applications potentielles dans les produits laitiers, carnés et marins, sous forme d'additif, soit d'inoculum bactérien producteur de bactériocines au cours du processus de fabrication et en tant que conservateur naturel pour inhiber la croissance des microorganismes indésirables dans les aliments. Sur le plan industriel, l'utilisation des bactériocines comme alternative aux additifs chimiques, ne pourra être obtenue que par la sélection judicieuse des souches utilisées pour leur synthèse associée à des procédés technologiques respectant l'environnement.

## Remerciements

Je remercie vivement le Professeur Laraba. A. pour ses encouragements et son aide et le Professeur Mansouri. M. pour avoir accepté de m'accueillir dans le Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP) ainsi que tout le personnel pour m'avoir permis de réaliser mes expériences.

## Références

[1] T.R. KLAENHAMMER, Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70 (1988) 337–349.

[13] E. BELIARD, Sélection des souches de bactéries lactiques inhibitrices de contaminants des viandes et études des mécanismes

[2] R.W. JACK, J.R. TAGG et B. RAY, Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol Rev*, 59 (1995) 171–200.

[3] T. Matilla-Sandholm, J. Mättö, M. Saarela, LAB with health claim-interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy J.* 9 (1999) 25–35.

[4] H. Chen, D.G. Hoover, Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety*, 2 (2003) 82–100.

[5] M. Bakar Diop, R. Dubois-Dauphin, E. Tine, A. Ngom, J. Destain, P. Thonart, Bacteriocin producers from traditional food products. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 11 (2007) 275–281.

[6] J.C. De Man, M. Rogosa, et M.E. Sharpe, A medium for the cultivation of lactobacilli, *Applied Bacteriology*, 23 (1960) 130-135.

[7] S.F. BAREFOOT, T.R. KLAENHAMMER, Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 26 (1984) 328–334.

[8] S.F. BAREFOOT, T.A. CHEN, YING-RU HUGHES, A.B. BODINE, M.Y., SHEARER M.D. HUGHES, Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Appl. Environ Microbiol*, 60 (1994) 3522–3528.

[9] J.R. TAGG, A.R.MC GIVEN, Assay system for bacteriocin. *Appl. Microbiol*, 21 (1971) 943.

[10] U. SCHILLINGER et F.K. LUKE, Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol*, 55 (1989) 1901–1906.

[11] B. TEN BRINK, M. MINEKUS, J.M. B.M. VANDER VOSSEN, R.J. LEER et J.H.J. HUIS IN'T VELD, Antimicrobial activity of *Lactobacilli*: preliminary characterisation and optimisation of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol*, 77 (1994) 140–148.

[12] L.Z. JIN, W. HOY, N. ABDULLAH, M.A ALI et S. JAIALUDIN, Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. *Lett. Appl. Microbiol*, 23 (1996) 67–71.

d'inhibitions. Application à la conservation des produits carnés. Thèse de Doctorat en sciences alimentaires (1990).

- [14] S.R PULSANI, D.R. RAO, G.R. SUNKI, Antimicrobial Activity of lactic cultures: partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Science*, 44 (1979) 575-578.
- [15] R .YANG, M.C. JOHNSON, et B. RAY, Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 3355–3359.
- [16] M.V. GRACIELA, M. N. de KAIRUZ, A. de RUIZ HOLGADO et G. OLIVER, Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *J. Appl. Bacteriol.* 78 (1995) 5-10.
- [17] D. CASLA, T. REQUENA et R . GOMEZ, Antimicrobial activity of lactic bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses : characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL 105. *J. Appl. Bacteriol.* 81 ( 1996) 35–41.
- [18] E.E. VAUGHAN, C. DALY, G.F. FITZGERALD, Identification and characterisation of helveticin V – 1829 a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol.* 73 (1992) 299–308.
- [19] T.R. KLAENHAMMER, Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology. Rev.* 12 (1993) 39-85.
- [20] M. GARRIGA, M. HUGAS, T. AYMERICH et J.M. MONFORT, Bacteriocinogenic activity of *Lactobacilli* from fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 75 (1993) 142-148.
- [21] J.K .THOMPSON, M.A COLLINS. et W.D. MERCER, Characterisation of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ 450. *J. Appl. Bacteriol.* 80 (1996) 338–348.
- [22] P.M. MURIANA., T.R. KLAENHAMMER, Conjugal transfer of plasmid encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 553– 560.
- [23] K. KANATANI ., M. OSHIMURA et K. SANO, Isolation and characterisation of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 ( 1995) 1061–1067.
- [24] M. ZAMFIR, R. CAILEWAERT, P.C CORNEA, L SAVU, L VATAFU. et L. DEVUYST, Purification and characterisation of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *J. Appl. Microbiol.* 87 (1999) 923–931.
- [25] C.K Lin, H.C Tsai, P.P Lin b, H.Y Tsen a, C.C Tsai, *Lactobacillus acidophilus* LAP5 able to inhibit the *Salmonella choleraesuis* invasion to the human Caco-2 epithelial cell. *Anaerobe*, 14 (2008) 251–255.
- [26] B. Karska-Wysockib, M Bazona, W. Smoragiewicz, Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Microbiological Research Available online 29 Januar y* (2010).
- [27] T. ITOH , Y. FUJIMOTO , Y. KAWAI et T. SATTO , Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocin from *Lactobacillus gasseri*. *Lett. Appl. Microbiol.* 12 (1995) 137–141.
- [28] T. TAHARA . et K. KANATANI, Isolation, partial characterisation and mode of action of andocin J 1269, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. *J. Appl. Bacteriol.* 81 (1996) 669–677.
- [29] Q. Shu, HS. Gill, A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* 0157:H7 infection in mice. *Med Microbiol Immunol.* 189 (2001) 147–52.
- [30] C-C. Tsai, P-P Lin, Y-M Hsieh., Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown in vitro. *Anaerobe*, 14 (2008) 61–67.