

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Abou Bekr Belkaid  
Tlemcen Algérie



جامعة أبي بكر بلقايد

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de  
l'Univers  
Département d'Agronomie  
Mémoire

Pour l'Obtention du Diplôme Master en Agronomie  
Option : Technologie des Industrie Agro-Alimentaire

## Thème

*Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques isolées du  
lait de chamelle*

Présenté par :

Mme : MEHIDI Né BENGUELLA NASSIMA

Devant le jury:

Mr BENAMMAR CH.,	M.C.A	Président
Mr BENYOUB N.,	M.A.A	Examineur
Mme BARKA S.,	M.C.A	Promoteur

Année universitaire : 2014-2015

## **REMERCIEMENTS**

*Mes profonds remerciements vont à ALLAH qui m'a aidé pour effectuer ce travail.*

*Je remercie en deuxième lieu mon promoteur Monsieur S. BARKA pour la proposition de ce thème ainsi que pour sa compréhension et pour l'aide qu'il m'a prodigué*

*Je tiens également à remercier vivement les responsables de laboratoire sciences agronomique université de tlemcen de m'avoir permis d'utiliser le laboratoires et le matériel.*

*Mes remerciements s'adressent également à MrRACHID. laborantin, pour son aide précieuse ainsi qu'à Mlle. Atika pour sa gentillesse et son aide.*

*Mes remerciements s'adressent enfin à mes chers adorables parents, à mon mari, mes frères et toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## ***Résumé***

L'objectif de ce travail est d'isolé et d'identifié des souches lactiques mésophiles ou Thermophiles a partir du lait de chamelle, qui sont capable d'inhibé la prolifération de bactérie pathogène *Staphylococcus aureus* STA-49444 et *Escherichia coli* ATCC 25922 qui cause l'altération des aliments. A partir de 10 souches initialement isolées et caractérisées 5 avaient un résultat positif. Nous avons aussi testé le pouvoir bactériocinogènes des souches isolé du lait de chamelle par la méthode des spots.

Les 5 souches ont donné des zones d'inhibition à l'égard de la souche cible *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres de 10mm, 10mm, 12mm, 11mm, et 10mm, pour les souches Lc1, Lc2, Lc3, Lc4, et Lb5 respectivement. et des diamètres de 8mm, 6mm, 11mm, 13mm, et 9mm pour les même souches lactiques.

En tenant compte de leur activité anti-bactérienne marquée et leur large spectre d'activité contre les bactéries indésirables, certaines des souches isolées dans cette étude pourraient être des candidats potentiels utilisables dans la bioconservation des produits alimentaires et dans la transformation biotechnologique de lait.

**Mots clés : lait de chamelle, Bactéries lactiques ;bactériocine ; pathogène.**

## ملخص

الهدف من هذا البحث هو القيام بعزل وتشخيص 5 سلالات من نوع بكتيريا الحليب من حليب الناقة لقدرتها على تثبيط نمو البكتيريا الضارة المتسببة في إتلاف المواد الغذائية بعد القيام بعزل 10 سلالات، 5 منها ذات نتيجة إيجابية قمنا بتجربة القرعة على تثبيط نمو البكتيريا الضارة بطريقة SPOTS، الخمس سلالات لها القدرة على تثبيط نمو البكتيريا الضارة Staphylococcus بقطر 10 مم، 10 مم، 12 مم، 11 مم، 10 مم، 10 مم، 13 مم، 11 مم، 6 مم، 8 مم، بالنسبة ل Escherichia coli بالترتيب و

لقيمته التثبيطية ضد البكتيريا الضارة يمكن إستخدام هذه البكتيريا لحفض المواد الغذائية و تحويل المواد اللبنية .

كلمات المفتاح؛

بكتيريا، Staphylococcus، Escherichia coli، حليب الناقة،

## **Abstract ;**

The main of this work is to isolate and identify strains of lactic mesophilic or Thermophiles from camel milk, which are able to inhibit the proliferation of pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* STA-49444 and *Escherichia coli* ATCC 25922 with spoil aliments .From 10 strains isolated and characterized initially 5 had a positive result. We also tested their antibacterial effects of isolated strains of camel milk by spotlights method.

The 5 strains gave zones of inhibition with respect towards strain *Staphylococcus aureus*, with diameters of 10mm, 10mm, 12mm, 11mm, and 10mm, for strains Lc1, Lc2, Lc3, LC4 and LB5 respectively .and 8mm diameter, 6mm, 11mm, 13mm and 9mm for the same lactic strains.

Taking account of their anti-bacterial effect and their broad spectrum acts against undesirable bacteria, some strains isolated in this study could be potential candidates for use in the food and bioconservation in biotechnology milk processing.

## Liste des tableaux

**Tableau 1:** Classification des bactériocines des bactéries lactiques (Cotter et *al.*,2005).

**Tableau 02:** Origine des différentes souches étudiées.

**Tableau 03:** Observations culturelles et morphologiques des bactéries lactiques,

**Tableau 04 :** Les observations microscopiques et biochimiques préliminaires des souches isolées

## Liste des figures

**Figure 01 :**Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques del'ordre « *Lactobacillales*» dans la classe des « *bacilli*» (De Vos et al., 2009).

**Figure 02 :** Aspect macroscopique des colonies de Bactérie lactique sur milieu MRS,

**Figure 03 :** Aspect macroscopique des colonies de Bactérie lactique sur milieu MRSliquide,

**Figure 04 :** Test à la catalase,

**Figure 05 :** Diamètre d'inhibition en mm des souches lactique en présence d'*Escherichiacoli*

**Figure 06 :** Activité antibactérienne des différents souches lactiques (Souche expérimentale)

**Figure 07 :** Diamètre d'inhibition en mm des souches lactique en présence de

*Staphylococcus aureus* STA 49444

**Figure 08 :** Activité antibactérienne des différents souches lactiques (Souche expérimentale)

## Liste des abréviations

% : pourcentage

°C : Degré Celsius

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide Ribonucléique

BHIB: bouillon cœur cervelle

cm : centimètre

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone

DLC : Date limite de consommation

EFFCA : European Food and Feed Culture Association

FAO : Food and Agriculture Organisation (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)

g : gramme

GRAS : Generally recognised as safe (généralement reconnu sans risques)

h: heure

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : l'eau oxygénée

H<sub>2</sub>S : Sulfure d'hydrogène

LAB :Lactic acid bacteria

min: minute

ml: millilitre

mm: millimètre

MRS : de Man Rogosa Sharpe

N : normalité

NaCl: chlorure de sodium

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide d'hydrogène

NaOH: Hydroxyde de sodium (soude)

OMS : organisation mondiale de la santé

pH: potentiel d'hydrogène

QPS:QualifiedPresumption of Safety

spp. : species

T° : température

t: tonne

UFC : unité formant colonie

UV : ultra-violet

# Table des matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	10
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>Chapitre 1 : Généralité sur le lait de chamelle et les bactéries lactiques :</b>	
1-1 Définition du lait de chamelle .....	13
1-2 Caractéristiques du lait de chamelle.....	13
1-2-1 Caractères physiques et organoleptiques.....	13
1-2-1-1 Composition chimique.....	13
1-2-1-2 La matière grasse.....	14
<b>Chapitre 2 : Les bactéries lactiques.....</b>	<b>16</b>
2-1 Définition et caractéristiques.....	16
2-2 Classification des bactéries lactiques.....	16
2-3 Voies métaboliques.....	21
2-4 Intérêt des bactéries lactiques.....	21
2-4 Dans l'industrie alimentaire.....	21
2-5 Dans le domaine thérapeutique.....	22
<b>CHAPITRE 3 : Les bactériocines des bactéries lactiques</b>	
3-1 Définition et caractéristiques principales.....	24
3-2 Nomenclature.....	24
3-3 Nature.....	24
3-4 Caractéristiques.....	25
3-5 Propriétés.....	25
3-6 Classification.....	25
3-7 Mode d'action.....	26
3-8 Conditions de production.....	27
3-9 Facteurs influençant la production des bactériocines.....	28
3-9-1 Température et pH.....	28
3-9-2 Composition du milieu de culture.....	28
3-9-3 Temps d'incubation.....	29
3-10 Les applications des bactériocines.....	29
3-10-1 Dans le secteur alimentaire.....	29
3-10-2 Dans le secteur sanitaire.....	31
<b>CHAPITRE 4 : Mise en évidence et purification des bactériocines</b>	



4-1. Mise en évidence de l'activité bactériocinogène.....	33
---	----

## **ETUDE EXPERIMENTALE**

### **Matériel et méthodes**

1 Matériel utilisé.....	36
1-1 Milieux de culture.....	36
1-2 Produits chimiques.....	36
2 Les souches pathogènes.....	36
3 Méthodologie.....	37
4 Prélèvement et collection des échantillons .....	37
5 Isolement et purification des bactéries lactiques.....	37
5-1 Isolement et identification des souches lactiques mésophiles.....	37
6 .Caractères biochimiques et physiologiques.....	37
7 Pouvoir antibactérien des souches.....	38
8 technique utilisée.....	38

### **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

1. Caractéristiques des isolats .....	41
2 Caractère microscopique .....	42
3 Spectre d'activité.....	42
3.1 Activité antagoniste de souches vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i> .....	42
3.2. Activité antagoniste de souches vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ..	44

### **CONCLUSION**

## INTRODUCTION

Les bactéries pathogènes sont à l'origine de diverses pathologies et intoxication alimentaires, c'est pourquoi les antibiotiques ont été utilisés pour les éliminer. Ceci a conduit à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance menaçant la santé publique. Pour faire face à ce problème les études sont actuellement orientées vers la recherche de substances naturelles entre autres les bactériocines des bactéries lactiques.

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, en tant que starters dans les procédés de fermentations afin de répondre aux exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités et exempts de conservateurs chimiques. Leur apports bénéfiques consistent à l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans altérer le goût ni l'odeur, et en augmentant leur durée de conservation. Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009; Moraes et *al.*, 2010 ).

L'intérêt des bactériocines des bactéries lactiques réside d'une part dans leur effet antimicrobien à spectre large ou étroit et d'autre part dans leur sûreté pour la santé humaine, vue leur sensibilité aux protéases digestives, et leur non toxicité pour les cellules eucaryotes. Ces substances antimicrobiennes ont la capacité de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou altérantes, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables. Ces substances bioactives présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Tous ces critères suggèrent que les bactériocines peuvent être un substituant idéal des conservateurs chimiques (Dortu et Thonart, 2009).

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques essentiellement à partir de biotopes peu explorés comme le lait de chamelle. Des bactéries lactiques ont été isolées de laitde chamelle crus algériens et mises en interaction avec des bactéries pathogènes ; pour observer la production de bactériocines.

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Chapitre 1 :**

# **Généralité sur le lait de chamelle et les bactéries lactiques**

**Chapitre 1 : Généralité sur le lait de chamelle et les bactéries lactiques :**

**1-1 Définition du lait de chamelle :**

Le lait de chamelle constitue depuis des temps trèslointains , la principale ressource alimentaire pour les peuplades nomade qui le consomment habituellement a l'état cru ou fermenté . il est considéré comme l'aliment de base pour une période annuelle prolongée ,dans la plupart de ces zone pastorales sahariennes physico-chimique relativement similaire a celle du lait bovin , se lait se singularise néanmoins par une teneur élevée en vitamine C et en niacine et par la présence d'un puissant système protecteur, lié à des taux relativement élevés en Lysozyme, en Lactopéroxydase (système LP/ SCN/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en Lactoferrine et en Bactériocines produites par des bactéries lactiques .se si prolonge naturellement sa conservation de quelques jours sous des température relativement élevées. (Sbouï ,2009)

## **1-2 Caractéristiques du lait de chamelle**

### **1-2-1 Caractères physiques et organoleptiques**

Le lait de chamelle est de couleur blanche, en raison notamment de la structure et de la composition de sa matière grasse, relativement pauvre en  $\beta$ -carotène (Sawaya et al, 1984). Il est légèrement sucré, avec un goût acide, parfois même salé (Abdel-Rahime, 1987) et / ou amère (Ramet, 2003). Cette variabilité dans le goût est lié au type de fourrage ingéré ainsi qu'à la disponibilité en eau (Yagile et Etzion, 1980 ; Wangoh et al, 1998 ) le pH du lait camelin se situe au tour de 6,6 et l'acidité est de l'ordre de 15° Dornic. Sa densité oscille entre 0,99 et 1,034 avec une viscosité moyenne de 2,2 centipoise (Hassane et al, 1987) et un point de congélation variant de -0,53 à -0,61°C.

#### **1-2-1-1 Composition chimique**

La composition chimique globale du lait de chamelle, même si elle fluctue selon les auteurs (donc selon les animaux et l'environnement considéré), montre néanmoins des teneurs importante et équilibré en nutriments de base (protéines, matière grasses et lactose) avec des proportions similaires à celles présentes dans le lait de vache. Les teneurs en protéines et en matière grasse carient respectivement de 2,5 à 4% et de 1,1 à 4,6% (avec une fréquence de élevée à des taux supérieurs à 3%), alors que la teneur en lactose fluctue 2,5 et 5,6% .(Siboukeur ,2009).

La concentrations élevées observées pour se dernier nutriment expliqueraient la saveur parfois sucrée du lait de chamelle rapportée par plusieurs auteurs (Gnan et Shereha, 1986 ; Bayoumi, 1990) .

La teneur en eau du lait camelin, qui varie selon son apport dans l'alimentation, atteint son maximum pendant la période de sécheresse. En effet il a été montré que la restriction en eau alimentaire des chameles se traduit par une dilution du lait: un régime riche en eau donne un lait ayant un taux de 86% alors que dans un régime déficient, celui-ci s'élève à 91% (Yagil et Etzion, 1980 ; Faye et Mulato, 1991). Cette dilution pourrait être l'effet d'un mécanisme d'adaptation naturelle pourvoyant en eau les chameles durant la période de sèche.

Les sels minéraux présents dans le lait de chamelle sont aussi diversifiés que se rencontrés dans le lait de vache. On y dénombre en effet des macro et des oligo-éléments qui se trouvent sous forme de sels (phosphates, chlorures et citrates) ou de métaux divers (sodium, potassium, fer, cuivre, zinc...etc.).

Le lait de chamelle se singularise par sa richesse relative en vitamine B3 (niacine) et en vitamine C. même si des variations importantes de 25 à 60 mg/l) de la teneur de cette dernière dans le lait camelin sont rapportés (Farah, 1993), il n'en demeure pas moins que les teneurs signalées (autour de 36 mg/l selon Farah et al, 1992) sont en moyenne 3 fois plus élevées que celles présentes dans le lait bovin, qui ne dépassent pas 22 mg/l selon Mathieu (1998). Cette caractéristique est particulièrement intéressante, car elle permet au lait de cette espèce, par son apport important en cette vitamine, de répondre aux besoins nutritionnels, aussi bien du jeune chamelon que des populations locales, qui vivent dans un environnement où l'apport en ce type de vitamine est particulièrement limité.

Farah (1993) signale que le lait camelin contient des teneurs plus faibles en vitamines A et E et en certaines vitamines du groupe B (vitamine B2, B5 et B9).

### **1-2-1-2 La matière grasse**

La matière grasse laitière qui représente une source importante d'énergie, est constituée essentiellement de lipides et de substances lipoidiques. Néanmoins des composés protéiques sont présents dans la membrane du globule gras. Elle constitue également, un apport important en acides gras essentiels et en vitamines liposolubles.

Les quelques études consacrées à cette matière ont mis en évidence son apport quantitatif et qualitatif (Glass et al, 1967 ; Hagrass et al, 1987) .

Néanmoins, pour ce dernier volet, la composition et les propriétés physicochimiques et structurales de cette matière lipidique n'ont fait l'objet que de quelques investigations limitées

# **Chapitre 2 :**

## **Les bactéries lactiques**

### **Chapitre 2 : Les bactéries lactiques**

#### **2-1 Définition et caractéristiques**

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacilli (Badis *et al.*, 2005). Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont asporulantes, aéro anaérobies facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4.0 à 4.5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme. Leur division se

déroule sur un seul plan à l'exception des genres : *Pediococcus*, *Aerococcus*, et *Tetragenococcus*. (Salminen et al., 2004; König et Fröhlich, 2009 ; Pringsulaka et al., 2011).

En général ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (Dellaglio et al., 1994; Salminen et al., 2004).

En plus de l'acide lactique et des autres acides organiques qui empêchent le développement des microorganismes indésirables par diminution du pH du milieu, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutéline, le dioxyde de carbone et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

Les bactéries lactiques colonisent les habitats riches en nutriments, tels les plantes, les fruits, les produits laitiers, les eaux et les eaux usées, les jus, ainsi que les cavités buccales, vaginales et intestinales de l'homme, sans pour autant lui provoquer des maladies, à l'exception de quelques cas causés par les streptococci et certains lactobacilli (König et Fröhlich, 2009).

## 2-2 Classification des bactéries lactiques

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (6.5%, 18%), la tolérance aux pH acides, alcalins et à l'éthanol, la configuration de l'acide lactique produit à partir de glucose, l'hydrolyse de l'arginine, la formation d'acétoïne, etc. Les marqueurs chimiotaxonomiques comme la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire peuvent aussi être utiles dans la classification (König et Fröhlich, 2009). L'identification des espèces de bactéries lactiques peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates à l'aide du système API50CH (Curk et al., 1993).

L'analyse comparative des séquences d'ARN ribosomal 16S a entraîné des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (Salminen et al., 2004). Selon la dernière édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des *Bacilli* et l'Ordre des *Lactobacillales* renfermant trente cinq genres répartis sur six familles (Fig.1). Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de :

***Aerococcus*** : les cellules de ce genre sont de forme ovoïde (1-2µm de diamètre), α-



hémolytiques, non-gazogènes, arginine(-), pouvant croître à une concentration de 6.5% de NaCl, la division se déroule sur deux plans formant ainsi des tétrades. Cependant, des cellules isolées ou en paires peuvent être observées au milieu de la phase exponentielle.

***Carnobacterium*** : ce genre est constitué de bâtonnets courts parfois incurvés isolés ou en paires, psychrotolérants, pouvant se développer à pH : 9 et incapables de croître à 8% de NaCl ; quelques espèces sont catalase (+) en présence d'hème.

***Enterococcus*** : ce genre comprend des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes, homofermentaires. Quelques espèces sont mobiles par des petits flagelles et d'autres possèdent une pseudo-catalase. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6.5% de NaCl, au pH : 9.6 et par la croissance à 10°C et 45°C avec une température optimale de croissance de 35°C à 37°C.

***Lactobacillus*** : les cellules de ce genre sont soit des bacilles longs parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes. Elles sont généralement immobiles à l'exception de quelques espèces qui possèdent des flagelles péritriches. Les souches sont acidophiles et peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C à 53°C. Les thermophiles sont incapables de se développer à moins de 15°C.

Le genre *Lactobacillus* peut être divisé en trois groupes : homofermentaires stricts, hétérofermentaires facultatifs et hétérofermentaires stricts.

***Lactococcus*** : les cellules de ce genre sont sphériques ou ovoïdes isolées, en paires, ou en chaînes. De type mésophiles, leur température optimale varie de 10 à 40°C mais sont incapables de se développer à 45°C. Celles-ci se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits.

***Leuconostoc*** : ce genre comprend 10 espèces fastidieuses dans leurs exigences nutritionnelles, les cellules sont ellipsoïdales à sphériques généralement allongées qui s'arrangent en paires ou en chaînes, non acidophiles avec un pH optimum de croissance égal à 6.5. Néanmoins, certains leuconostocs peuvent croître même à un pH de 4,5. La température optimale est comprise entre 20°C et 30°C mais la croissance peut aussi avoir lieu même à 5°C. Les leuconostocs sont des hétérofermentaires obligatoires. Sur un milieu concentré en saccharose, certaines souches produisent des dextrans extracellulaires.

***Oenococcus*** : les cellules sont immobiles, asporulantes de forme ellipsoïdale à sphérique, avec un arrangement en paires ou en chaînes, non hémolytiques et généralement non protéolytiques. Elles exigent un milieu riche en acides aminés et en facteurs de croissance, leur pH optimum étant de 6 à 6,8 et la température optimale de 20°C à 30°C.

***Pediococcus*** : ce genre est représenté par neuf espèces ayant un métabolisme homofermentaire. Il rassemble des cellules immobiles de forme sphérique parfois ovoïdes, isolées ou en paires qui se divisent dans deux directions perpendiculaires formant ainsi les tétrades mais jamais les chaînes. Certaines espèces produisent une catalase ou une pseudocatalase. Les cellules sont acidophiles mais non halophiles et croissent à pH : 5 mais pas à pH : 9, la température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C.

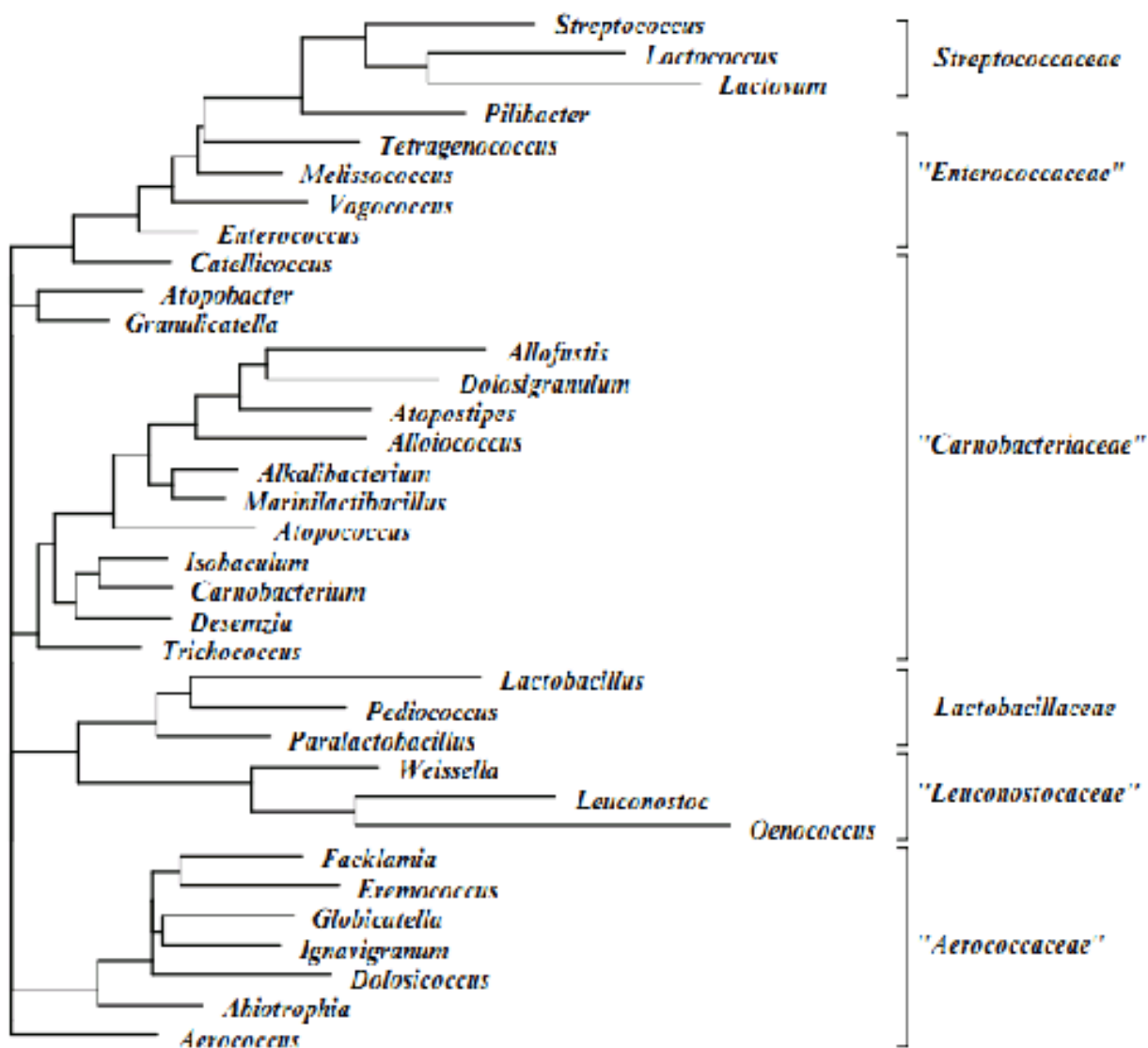
***Streptococcus*** : les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH: 9.6. Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes.

***Vagococcus*** : les cellules sont ovoïdes isolées, en paires ou en chaînes. La plupart des espèces sont mobiles par des flagelles péritriches. Elles sont capables de croître à 10°C mais non à 45°C sans production de gaz ni d'arginine dihydrolase (ADH).

***Tetragenococcus*** : ce genre rassemble des cellules immobiles, sphériques ou ovoïdes avec un diamètre de 0.5-1.0 µm formant des tétrades après leur division dans deux directions perpendiculaires; comme elles peuvent être isolées ou en paires. Le métabolisme des tétragenococci est homofermentaire. Ils ne produisent pas de CO<sub>2</sub> à partir de glucose comme ils sont incapables de réduire les nitrates ni d'hydrolyser l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 35°C et ne peuvent pas croître à 10°C et à 45°C.

***Weissella*** : les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont immobiles et hétérofermentaires. La température optimale de croissance est de 15°C, mais quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 45°C.

Parmi tous ces genres cités, seulement cinq (*Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostocet* *Pediococcus*) répondent aux caractéristiques générales d'une bactérie lactique typique (Salminen et al. 2004).



**Fig.1.** Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre « *Lactobacillales* » dans la classe des « *bacilli* » (De Vos et al., 2009).

### 2-3 Voies métaboliques

En se basant sur la voie empruntée et le produit final de la fermentation, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes (fig.2):

- **Homofermentaires** : toutes les bactéries lactiques (à l'exception des genres : *Leuconstoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et certains membres du genre *Lactobacillus* ) empruntent la voie de la glycolyse pour dégrader les hexoses (ex : glucose). Après son transfert vers la cellule, le glucose subit une phosphorylation pour se transformer en fructose qui est à son tour phosphorylé en fructose 1-6 di-phosphate puis clivé en dihydroxyacétone phosphate et glycéraldéhyde phosphate (GAP), ces deux derniers sont convertis en pyruvate.

Le pyruvate est dans une dernière étape réduit en acide lactique qui est le produit unique: c'est la fermentation homolactique. Dans les conditions défavorables telles la limitation du glucose, ces bactéries produisent également l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol et/ou le CO<sub>2</sub> par la voie de fermentation des acides mixtes (Mozzi et *al.*, 2010)

- **Hétérofermentaires** : ce groupe de bactéries lactiques utilise la voie des pentoses phosphate (ou 6-phosphogluconate) qui consiste à une déshydrogénation du glucose, après sa phosphorylation, pour donner le 6-phosphogluconate qui subira une décarboxylation. Le pentose résultant est clivé en glycéraldéhyde phosphate (GAP) qui suit la voie de la glycolyse donnant l'acide lactique et l'acétyl phosphate qui sera réduit en éthanol. En raison de la production de CO<sub>2</sub>, d'éthanol ou de l'acétate en plus de l'acide lactique, cette fermentation est appelée hétérolactique (Salminen et *al.*, 2004).

### 2-4 Intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique.

#### **2-4 Dans l'industrie alimentaire :**

les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem et al., 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis et al., 2005). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu et Thonart, 2009). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth et Steele, 2001).

#### **2-5 Dans le domaine thérapeutique :**

étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem et al., 2008). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (Mkrtchyan et al., 2010). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish et al., 2011). Uehara et al., (2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

**CHAPITRE 3 :**  
**Les bactériocines des bactéries lactiques**

## **CHAPITRE 3 : Les bactériocines des bactéries lactiques**

### **3-1 Définition et caractéristiques principales**

La définition qui était la plus acceptée donnée aux bactériocines est celle de Klaenhammer qui les définit en tant que protéines ou complexes de protéines ayant une activité bactéricide contre les espèces étroitement liées à la souche productrice (Dortu et Thonart, 2009 ; Xie et *al.*, 2011). Cependant, des études récentes ont démontré qu'il existe certaines qui sont actives également contre des bactéries à Gram négatif (Mami et *al.*, 2008 ; Gong et *al.*, 2010 ; Naghmouchi et *al.*, 2010). Ces substances protéiques biologiquement actives sont synthétisées au niveau du ribosome et codées par des gènes, leur sécrétion dans le milieu extracellulaire étant conférée par un système de transfert (Gálvez et *al.*, 2007; Riley et Chavan, 2007; Khalil et *al.*, 2009 ; Tabasco et *al.*, 2009 ).

Les bactériocines se différencient par leur poids moléculaire, leurs propriétés biochimiques, leur origine génétique, ainsi que par leur spectre et mode d'action (BenOmar et *al.*, 2006 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Ruiz-Barba et *al.*, 2010).

### **3-2 Nomenclature :**

La nomination des bactériocines est attachée soit au genre ou à l'espèce de la première souche productrice en ajoutant le suffixe "cine" pour indiquer le pouvoir létal ; par exemple: la plantaricine est la bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* (Karthikeyan et Santhosh, 2009).

Chez les bactéries à Gram positif, une souche peut produire plusieurs bactériocines. En effet les bactériocines qui présentent une légère modification dans les séquences d'acides aminés conservées par rapport à leur prépeptide n'affectant pas leur structure secondaire ni leur spectre d'action ni l'immunité de la souche productrice sont considérées comme étant des variantes naturelles. A titre d'exemple, les nisines Z, Q et U sont des variantes naturelles de la nisine A découverte en premier lieu (Riley et Chavan, 2007).

### **3-3 Nature :**

les bactériocines des bactéries lactiques sont des protéines ou des complexes de protéines constituées généralement de 30 à 60 acides aminés. Ces substances peuvent être des protéines simples comme elles

peuvent être associées à une partie lipidique ou glucidique. Certaines d'entre elles renferment des acides aminés inhabituels tels la lanthionine et la  $\beta$ - méthylelanthionine (Kotelnikova et Gelfand, 2002 ; Ammor et *al.*, 2006).

### **3-4 Caractéristiques :**

les bactériocines des bactéries lactiques ressemblent à certains peptides antimicrobiens des eucaryotes (Riley, 2009). Celles-ci sont généralement petites, cationiques (excès en résidus lysyl et arginyl), amphiphiles et thermostables. Leur poids moléculaire est relativement petit (2-6 kDa) ce qui leur permet d'accéder aux cellules cibles et perméabiliser la membrane en se liant à des récepteurs de surface (Moll et *al.*, 1999; Gillor et *al.* , 2008; Anthony et *al.* , 2009; Simova et *al.* , 2009 ; Hartmann et *al.*, 2011 ; Todorov et *al.* , 2011). Cessubstances antagonistes, produites par la plupart des bactéries lactiques, se différencient des antibiotiques du fait qu'elles sont synthétisées au niveau du ribosome et leur spectre d'action est relativement étroit, alors que les antibiotiques sont généralement des métabolites secondaires et possèdent un spectre d'action plus large (Ghraiiri et *al.*, 2008).

### **3-5 Propriétés :**

certaines critères des bactériocines produites par les bactéries lactiques justifient leur choix comme bioconservateurs (Gálvez et *al.*, 2007 ; Thakur et Roy, 2009) :

- Considérées comme 'GRAS' (Generally Recognized As Safe) ;
- inactives et non toxiques contre les cellules eucaryotes ;
- généralement thermostables et tolérantes aux variations du pH ;
- possèdent un spectre d'activité relativement large ;
- mode d'action généralement bactéricide (membrane cytoplasmique) ;
- déterminants génétiques codés par les plasmides ;
- sensibilité aux protéases et digestibilité dans le tractus intestinal.

### **3-6 Classification**

La classification récente des bactériocines (citée dans le tableau 1) est celle de Cotter et *al.* (2005) qui est une modification de la classification originale proposée par Klaenhammer(1993). Selon cette classification, les bactériocines des bactéries lactiques sont divisées en deux classes majeures en fonction de la présence ou non d'acides aminés soufrés inhabituels (lanthionine,  $\beta$ -méthyl lanthionine, déhydroalanine et déhydrobutyrine) formés par modifications post-traductionnelles. Les bactériocines qui les renferment appartiennent à la classe des lantibiotiques. Ces derniers sont des peptides thermostables de taille inférieure à 5kDa subdivisés en deux types : ceux à un seul peptide comme la nisine, et ceux qui exigent deux peptides pour avoir une activité comme la lacticine 3147.



La deuxième classe renferme des peptides thermostables de taille inférieure à 10kDa contenant un (pédiocine PA1) ou deux peptides (lactacine F). Certains ont une structure cyclique (entéroisine AS 48), quatre sous-classes sont citées : a, b, c et d (Dortu et Thonart, 2009).

D'après Cotter et *al.* (2005), les bactériolysines ne font pas partie des bactériocines.

### **3-7 Mode d'action**

Bien que toutes les bactériocines partagent le même site d'action qui est la membrane cytoplasmique, leur mode d'action semble être différent (Dortu et Thonart, 2009):

Les lantibiotiques tel que la nisine, portant une structure cationique et amphiphile allongée, interagissent avec la membrane des cellules cibles soit en se liant au lipide II (un précurseur de peptidoglycanes) empêchant ainsi la synthèse de la paroi cellulaire conduisant à la mort de la cellule, soit en utilisant ce lipide comme une molécule d'appui pour s'insérer dans la membrane et y former des pores causant la destruction de la cellule suite à la dissipation du potentiel membranaire et l'efflux des petites molécules (ions, ATP, acides aminés, etc). La mersacidine tue la cellule en interférant avec ses réactions enzymatiques comme la synthèse de la paroi (Gillor et al., 2008 ; Dortu et Thonart, 2009).

L'insertion des bactériocines de la classe II dans la membrane est conférée par la structure  $\alpha$ -hélice amphiphile, cette insertion induit la perméabilisation de la membrane et par conséquent la mort cellulaire suite à l'écoulement des molécules à faible poids moléculaire.

Les bactériolysines par ailleurs ont un mode d'action complètement différent basé sur l'hydrolyse des liaisons peptidiques des peptidoglycanes (Cotter et *al.*, 2005).

Classe	Description et sous-classes	Exemples
I Lantibiotiques	Renferme les lantibiotiques à un et deux peptides  11 sous-classes décrites	- à un seul peptide : Nisine, Lacticine 481, Mersacidine  - à deux peptides: Cytolysine, Lacticine 3147
Classe hétérogène formée de petits peptides		
II Bactériocines non modifiées	- sous-classe <b>a</b> : bactériocines semblables à la pédiocine (pediocin-like)  - sous-classe <b>b</b> : bactériocines à deux peptides  - sous-classe <b>c</b> : bactériocines cycliques.  - sous-classe <b>d</b> : bactériocines à un seul peptide linéaire autres que la pédiocine	Pédiocine PA1, Leucocine A  Lactacine F  Enterocine AS48, Reutéline 6  Lactococcine A, Divergicine A
Bactériolysines Protéines lytiques non considérées comme bactériocines	Grosses protéines thermolabiles généralement des hydrolases de muréine.	Lysostaphine, Enterolysine A

**Tableau 1:** Classification des bactériocines des bactéries lactiques (Cotter et *al.*,2005).

### 3-8 Conditions de production

Dans leur lutte pour survivre et se nourrir, les bactéries lactiques produisent de nombreuses substances antimicrobiennes entre-autres les bactériocines, qui servent d'armes permettant aux bactéries lactiques de dominer les microorganismes compétitifs. Ces bactériocines peuvent être dégradées sous l'action des protéases de la souche productrice ou être adsorbées à sa surface (Moll et *al.*, 1999 ; Dortu et Thonart, 2009).

Les conditions optimales pour la croissance peuvent l'être également pour la production des bactériocines. Yang et Ray (1994) et Castro et *al.* (2011) ont démontré que les conditions conduisant à une forte densité cellulaire favorisent la production de bactériocine par *Lactobacillus sakei*. Cependant, il a été noté par Verluyten et *al.* (2004) que des conditions défavorables à la croissance permettent de stimuler la production des bactériocines par *Lactobacillus curvatus*.

La présence des microorganismes compétitifs dans le milieu stimule la production des bactériocines. Tabasco et *al.* (2009) ont démontré que *Lactobacillus acidophilus* La-5 augmente la production de lactacine B quand cette souche sent la présence de cellules cibles vivantes ; l'utilisation de ces mêmes cellules cibles après chauffage n'avait aucun impact sur cette production. De même une co-culture de *Lactobacillus*

*plantarum*NC8 avec *Enterococcusfaecium* augmenté sa production de bactériocine (Ruiz-Barba et *al.*, 2010).

### **3-9 Facteurs influençant la production des bactériocines**

L'utilisation des bactériocines à l'échelle industrielle en nécessite de grandes quantités. Ceci ne peut être atteint qu'en connaissant et optimisant les facteurs influençant leur production tels que : la température, le pH, le milieu utilisé, etc. Ces conditions de culture affectent fortement la production de bactériocines.

#### **3-9-1 Température et pH**

La température et le pH sont des facteurs importants qu'on doit prendre en considération quand à la production de bactériocines. Celle-ci est généralement optimale à des températures et des pH inférieurs à ceux optimaux pour la croissance (Héquet et *al.*, 2007 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Sharma et *al.*, 2010).

L'effet de ces deux facteurs a fait l'objet de plusieurs études. Ainsi, la production de bactériocine par *Leuconostoc lactis* était optimale à 30°C et à pH variant de 6.5 – 7 ; néanmoins, elle est diminuée d'une façon remarquable à 37°C et à pH 5.5 et 8.0 (Dhakur et Roy, 2009). La production de pédiocine LB-B1 par *Lactobacillus plantarum*LB-B1 était optimale à 37°C et à pH : 6 (Xie et *al.* 2011).

*Enterococcusfaecium*PC4.1 atteint son maximum de production à 30°C et à pH : 6 (Hadji- Sfaxi et *al.* 2011). La production de l'acidocine 8912 par *Lactobacillus acidophilus* était maximisée à 30°C (Ahmed et *al.* 2010).

#### **3-9-2 Composition du milieu de culture**

La composition du milieu de culture en particulier la source et la teneur de carbone et d'azote influence considérablement la production de bactériocines. Vu leurs exigences nutritionnelles, les bactéries lactiques requièrent plusieurs composants tels que : les facteurs de croissance, les peptones, l'extrait de levure, les hydrolysats de protéines et l'extrait de viande. Ces composants ont un impact positif sur le rendement en bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

De nombreux milieux de culture complexes ont été utilisés pour l'isolement des bactéries lactiques bactériocinogènes tels le MRS (Elmoualdi et *al.*, 2008 ; Khalil et *al.*, 2009 ; Moraes et *al.*, 2010 ; Xie et *al.*, 2011; Abrams et *al.*, 2011 et Castro et *al.*, 2011), le BHI (Ammor et *al.*, 2006 ; Ghrairi et *al.*, 2008), et le M17 (Hadji-Sfaxi et *al.*, 2011). Toutefois, l'Elliker constitue le milieu le plus approprié pour améliorer le rendement des bactériocines (Thakur et *al.* , 2009).

Il a été signalé que la production des bactériocines peut être maximisée en fortifiant le milieu de culture par l'ajout d'extrait de levure (Benkerroum et *al.*, 2000 ; Labioui et *al.*, 2005 ; Elmoualdi et *al.*, 2008 ; Sarika et *al.*, 2010).

Todorv et Dicks (2005) ont démontré que le taux de bactériocines ST461BZ et ST462BZ produites par *Lactobacillus rhamnosus* significativement augmenté en ajoutant au milieu le K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et le KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> respectivement.

### **3-9-3 Temps d'incubation**

La synthèse des bactériocines prend lieu au cours de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Au delà de cette période une diminution du taux de bactériocines a été observée suite à la digestion de ces dernières par les enzymes protéolytiques libérées par la cellule productrice. De ce fait, plusieurs études ont été réalisées pour optimiser la période d'incubation; Gong et al. (2010) ont démontré que la production de la plantaricine MG par *Lactobacillus plantarum* atteint sa valeur maximale après 28H d'incubation. La production maximale de bacALP7 par *P. pentosaceus* est observée après 16H d'incubation et diminue de près de la moitié après 21H (Pinto et al., 2009).

### **3-10 Les applications des bactériocines**

Considérées en tant que « GRAS » (Generally Recognized As Safe) et vu leur abondance et leur pouvoir antimicrobien généralement bactéricide, les bactériocines des bactéries lactiques trouvent leur utilisation dans différents domaines où elles empêchent le développement de bactéries pathogènes et nuisibles (Albano et al., 2007)

#### **3-10-1 Dans le secteur alimentaire**

L'utilisation des bactériocines dans les produits alimentaires a connu une forte progression. Du fait que ces substances sont naturelles, sûres (non toxiques pour les cellules eucaryotes et facilement digestibles dans le tractus intestinal), tolérantes aux traitements thermiques et aux variations du pH et agissant à des faibles concentrations, leur application conduit à une prolongation de la durée de conservation des produits alimentaires (Gautam et Sharma, 2009).

Ces molécules bioactives sont incorporées dans les aliments soit directement sous forme purifiée ou semi-purifiée (nisine) ou sous forme de concentré (pédiocine) soit indirectement en appliquant la souche productrice dans le produit alimentaire (production *in situ*), comme elles peuvent être immobilisées par encapsulation ou adsorption. A l'heure actuelle, seule la nisine est acceptée comme additif (Ghalfi et al., 2006 ; Dortu et Thonart, 2009).

Benkerroum et al. (2000) ont démontré la capacité des bactériocines produites par *Lactococcus lactis* de diminuer le nombre de *Listeria monocytogenes* ajoutée expérimentalement au Jben Marocain. Après contamination du Jben avec 107 et 104 UFC.ml<sup>-1</sup>, il a été constaté que la bactériocine entraîne une réduction

du nombre de contaminants de 2.7 log après 30H dans le premier cas et l'a complètement éliminé après 24H dans le deuxième.

La nisine produite par *Lactococcus lactis* est utilisée dans la production des fromages pour prévenir la fermentation de l'acide lactique en acide butyrique par le genre *Clostridium*, ce qui affecte la saveur et la texture des produits. La nisine est aussi capable d'inhiber les genres : *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria* et *Clostridium* en particulier *Clostridium tyrobutyricum* responsable de la production de gaz dans les fromages semi solides (Walstra et al., 2006). Cette bactériocine est utilisée également dans la fabrication des : fromages pasteurisés, produits liquides à base d'oeuf, sauces, laits frais, bières et conserves (Glazer et Nikaido, 2007).

Etant un milieu riche, la viande est sujette à des contaminations par les microorganismes pathogènes et altérants tels que *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta* et *Clostridium estertheticum* (Jones et al., 2008). Héquet et al. (2007) ont démontré que la sakacine G produite par *Lactobacillus sakei* a diminué le nombre de *Listeria innocua* de 3 log à moins de 1 log dans les jambons cuits conservés à 4°C. Ben Hammou et al. (2010) ont réussi à appliquer la nisine en combinaison avec le NaCl pour contrôler le développement de *Listeria monocytogenes* dans les saucisses du mouton.

Albano et al. (2009) ont utilisé *Pediococcus acidilactici* productrice de la bactériocine PA-1 pour inhiber un cocktail de souches de *Listeria innocua* dans les saucisses à base de viande fermentée, ceci ayant permis une réduction remarquable de ces souches.

Pinto et al. (2009) ont mis en évidence la capacité des bactériocines bacALP7 et bacALP57 produites par *Enterococcus faecium* et *Pediococcus pentosaceus* de réduire le taux de *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* dans les fruits de mer.

### **3-10-2 Dans le secteur sanitaire**

L'usage des bactériocines n'est pas restreint au domaine alimentaire. Celles-ci servent aussi comme agents de thérapie naturelle alternatifs aux antibiotiques (Smaoui, 2010). Suite à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance manifesté par plusieurs bactéries pathogènes (parmi lesquelles certaines sont résistantes à plusieurs antibiotiques à la fois) qui menace la santé publique, les études sont actuellement orientées vers la recherche de nouvelles substances antibiotiques naturelles pouvant résoudre ce problème (Mkrtchyan et al., 2010).

Les bactériocines de la classe IIa présentent un groupe important de peptides antimicrobiens qui peuvent être utilisés en médecine avec les antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses ou comme des agents antiviraux. Ces molécules ont une activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif nuisibles et pathogènes comme *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (Drider et al., 2006).

Xie et al. (2011) ont rapporté que le Koumiss (produit chinois à base de lait fermenté) est efficace dans le traitement de la tuberculose et des maladies cardiovasculaires et contribue à l'amélioration de l'immunité, et que ces propriétés sont attribuées aux bactériocines produites par les bactéries lactiques indigènes. Dembélé et al. (1998) ont démontré que les bactériocines produites par le genre *Lactobacillus* contribuent à la protection du vagin contre différentes bactéries pathogènes telles : *Escherichia coli*, *Serratiamarcescens*, *Shigella boydii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*.

Tong et al. (2010) ont démontré que la nisine participe dans la prévention et le traitement des caries dentaires en inhibant les microorganismes en cause. La nisine est aussi utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vu sa stabilité aux pH acides et son activité contre *Helicobacter pylori*. Les bactériocines LA-1, YIT9029 et DCE471 produites par *Lb. johnsonii*, *Lb. casei* et *Lb. amylovorus* respectivement manifestent également une activité inhibitrice contre *Helicobacter pylori* (Smaoui, 2010). Des études récentes ont découvert le rôle des bactériocines produites par *Lactobacillus salivarius* dans la réduction de colonisation du caecal des volailles par *Campylobacter* (Nazef et al., 2008).

# **CHAPITRE 4:**

## **Mise en évidence et purification des bactériocines**

### **CHAPITRE 4 : Mise en évidence et purification des bactériocines**

#### **4-1. Mise en évidence de l'activité bactériocinogène**

Les méthodes de détection des souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur la diffusion de ces substances protéiques dans un milieu de culture solide ou semisolide préalablement inoculé par une souche indicatrice (Elmoualdi et *al.*, 2008). Certaines bactériocines, comme la streptocine STH1, sont produites uniquement en milieu liquide (Riley et Chavan, 2007).

### **a- Test des spots (spot on the lawn)**

C'est une méthode permettant la recherche d'antagonisme de plusieurs souches à la fois, cet antagonisme peut être soit direct (simultané) ou indirect (différé).

- Antagonisme direct : il consiste à réaliser sur une gélose un tapis de la souche indicatrice, une culture fraîche de la souche test est ensuiteensemencée sur ce tapis sous forme de spots. Après incubation, les boîtes sont examinées pour les zones d'inhibition. La densité du tapis cellulaire est un facteur déterminant dans cette méthode (Tagg et *al.*, 1976 ; Riley et Chavan, 2007).

- Antagonisme différé : dans cette méthode, une préculture de la souche test estensemencéesur gélose sous forme de spots, une incubation est alors réalisée permettant le développement des colonies. Une gélose molle (0.75% d'agar) inoculée par un certain volume de la souche indicatrice est ensuite versée au dessus. L'inhibition se traduit par l'apparition des halos d'inhibition ( $\geq 2$ mm) autour des souches productrices (Mami et *al.*, 2008).

La bactérie test peut être tuée par chauffage ou par chloroforme avant de verser la gélose molle. Cependant, le chloroforme peut inactiver les substances inhibitrices. Pour éviter ce problème, une modification de cette méthode consiste à ensemencer la souche indicatrice sur la face opposée par rapport à la souche test et présente également l'avantage d'exclure l'effet des bactériophages (Tagg et *al.*, 1976).

b- Méthode des puits (Berecka et *al.*, 2009).

c- Méthode des disques (Berecka et *al.*, 2009).

d- Méthode de plaques de gélose (Berecka et *al.*, 2009).

e- Méthode des microplaques (Simova et *al.*, 2009).



# **ETUDE EXPERIMENTALE**

# **Matériel et méthodes**

## **Matériel et méthodes**

### **1 Matériel utilisé**

### 1-1 Milieux de culture

- MRS ; (De Man, Rogosa et Sharpe) bouillon et gélose (Fluka)
- BHIB: bouillon cœur cervelle
- chapman

### 1-2 Produits chimiques

- Ethanol 96% (Sigma-Aldrich)
- Eau oxygénée (10v)
- Kit coloration Gram (Sigma)
- HCL 0.02M
- NaOH 4M
- Agar-agar (Fluka)

## 2 Les souches pathogènes

Il s'agit de *Staphylococcus aureus* STA 49444, *Escherichia coli* ATCC 25922, provenant du laboratoire espagnol Laboratoire de Sécurité Alimentaire par les Bactéries Lactiques et les Probiotiques (SEGABALP), Université de Madrid, Espagne.

**Tableau 02:** Origine des différentes souches étudiées.

Souches	Origine
<i>E.coli</i> ATCC 25922	Laboratoire de Sécurité Alimentaire par les Bactéries Lactiques et les Probiotiques (SEGABALP), Université de Madrid, Espagne
<i>Staphylococcus aureus</i> Sta-49444	Laboratoire de Sécurité Alimentaire par les Bactéries Lactiques et les Probiotiques (SEGABALP), Université de Madrid, Espagne

## 3 Méthodologie

La sélection des souches de bactéries lactiques ayant une activité anti-*bacterienne* à partir des laits testés a été réalisée par le procédé d'antagonisme différé en utilisant la méthode des spots dite sur tapis cellulaire.

#### **4 Prélèvement et collection des échantillons :**

Les souches lactiques utilisées dans notre travail ont été isolées à partir d'un échantillon de lait de chamelle provenant de la région de Tindouf (espèce : *Camelus dromedarius* ; âge 6 ans de couleur marron).

Le prélèvement s'effectue en soutirant une quantité suffisante du liquide dans un flacon stérile. Il faut nettoyer la source de prise (le prélèvement a été fait aseptiquement après que les mamelles ont été désinfectées par l'eau tiède contenant de l'eau de javel 2%), en suite l'échantillon est mis dans un flacon stérile et conservé à 4°C jusqu'à son utilisation.

#### **5 Isolement et purification des bactéries lactiques**

##### **5-1 Isolement et identification des souches lactiques mésophiles**

L'isolement est réalisé sur milieu MRS solide, milieu adapté à la recherche spécifique des souches lactiques. Les cultures sont incubées 24 à 72 heures à 30°C dans des boîtes de Pétri à l'obscurité. La purification est effectuée par quatre repiquages successifs d'étalement en milieu MRS solide. La conservation se fait sur milieu MRS incliné à +4°C en tubes à essais à l'obscurité. L'identification est établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : catalase, température de croissance et production de gaz carbonique.

#### **6 .Caractères biochimiques et physiologiques**

##### **● L'activité catalytique**

permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et eau. Elle est mise en évidence en 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.

#### **7 Pouvoir antibactérien des souches**

Les nombreuses méthodes décrites pour la détection de souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible (les souches cibles utilisées dans notre protocole expérimentale sont *Staphylococcus aureus*, *E.coli*).

La production de substances actives est détectée par le pouvoir inhibiteur du micro-organisme testé sur la croissance du germe cible. Les souches de bactéries lactiques après culture sur milieu MRS à 30°C sont testées pour leur pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion en milieu gélosé (Tagget Mac Given, 1971).

## 8 technique utilisée

La recherche de l'effet des bactériocines produites par les bactéries lactiques est réalisée par la méthode de la double couche.

Les souches *Staphylococcus* et *E.coli* sont ensemencées sur milieu CHAPMAN et BHIB liquide est incubées 18 heures à 37°C, tandis que les bactéries lactiques sont ensemencées en spot sur MRS solide tamponné. L'effet des acides organiques, notamment des acides lactique et acétique est éliminé, en neutralisant le surnageant par une solution de NaOH 0,1N à pH 6,5., elles sont incubées à 30°C entre 24 h et 72 h.

Après incubation les *E.coli* et *Staphylococcus* sont inoculées dans du BHIB et CHAPMAN semi solide et les boîtes de MRS sont inondées par les souches à étudier et laisser incubées 24 h à 37°C, on note l'apparition d'un halo autour des Puits, le pouvoir antagoniste est exprimé par la moyenne de deux diamètres perpendiculaires.

# CHAPITRE 6

## RESULTATS ET DISCUSSION

### RESULTATS ET DISCUSSIONS

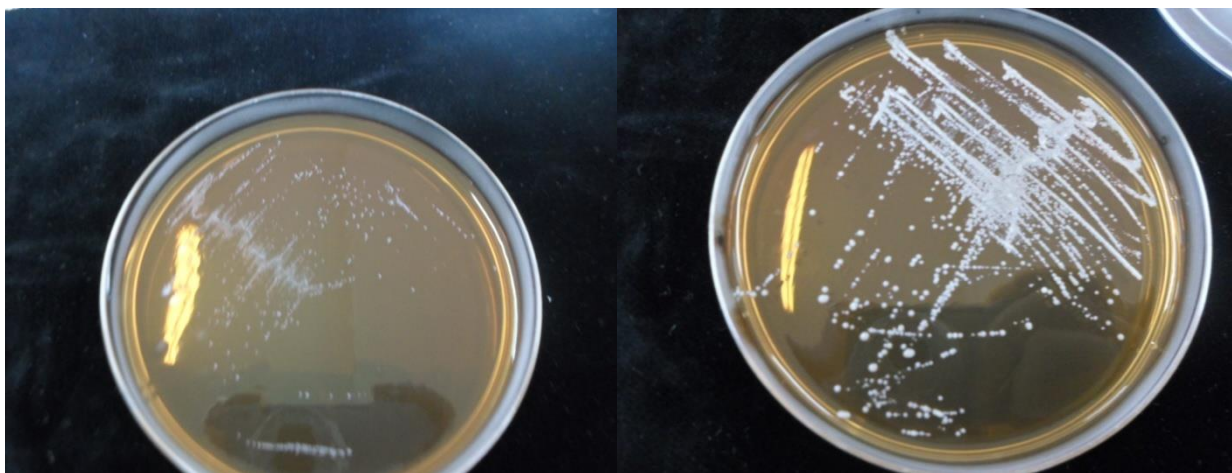
#### 1. Caractéristiques des isolats :

- **Sur milieu solide :**

Des étalements sur boîtes de Pétri du milieu MRS solide dans des conditions de culture en anaérobiose et à l'obscurité ont été choisis de manière à sélectionner les bactéries lactiques. La

température d'incubation utilisée est de 30°C afin de favoriser la sélection de bactéries mésophiles 45° a fin de favorise la sélection des bactéries thermophiles. Les colonies apparaissent après 72h de culture à 30°C sur MRS solide et aucun prolifération à 45°. Ce sont des bactéries mésophiles, des colonies de petite taille environ 0,1 à 1 mm de diamètre, blanches, lisses, rondes et bombées.(kihal, 1996 ; carr et al, 2002) (figure 4).

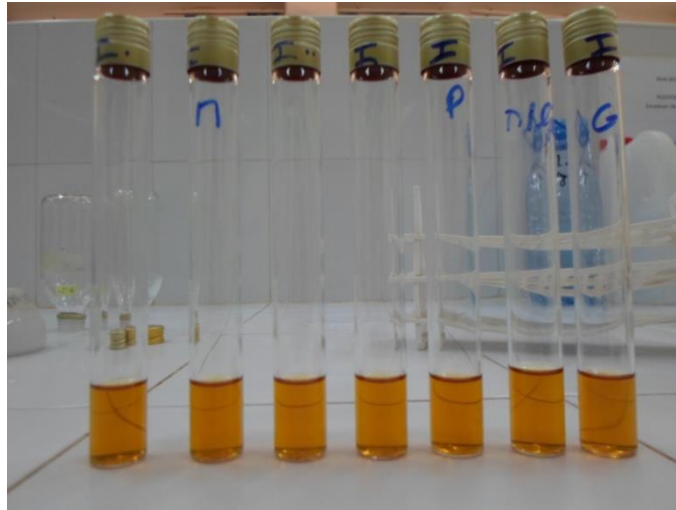
La détermination des caractères morphologiques et biochimiques des souches isolées nous a permis d'identifier 5 souches. Les souches isolées nommées Lc1, Lc2, Lc3, Lc4 et Lb5 montrent à l'examen microscopique qu'elles sont gram positif, catalase négative et ne produisent pas de gaz en milieu MRS liquide munie de cloche de durham.



**Figure 02:** Aspect macroscopique des colonies de Bactérie lactique sur milieu MRS

- **Sur milieu liquide :**

Lacroissance des bactéries apparait sous forme de trouble dans le milieu MRS liquide, cette trouble est concentré au fon à la recherche des conditions anaérobiques de ces bactéries. (kihal, 1996 ; carr et al, 2002) (figure 4).



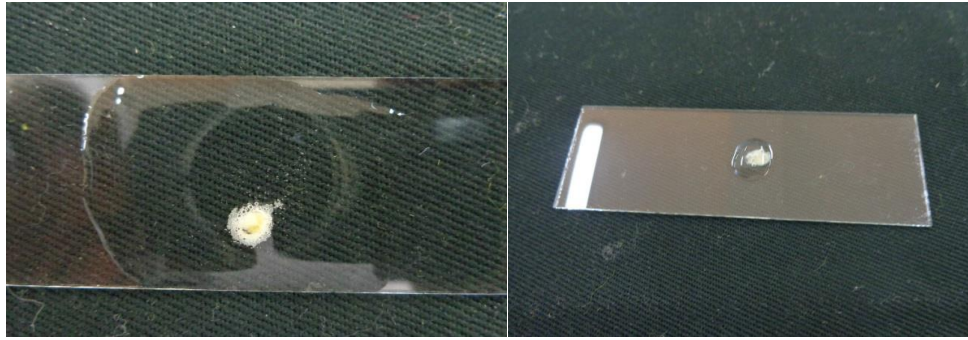
**Figure 03:** Aspect macroscopique des colonies de Bactérie lactique sur milieu MRSliquide

## 2 Caractère microscopique :

Après effectuer l'examen de la recherche de la catalase et la coloration de gram, toute les bactéries gram positif et catalase négatif sont présumées comme bactéries lactique.

L'observation microscopique nous a permis de voir des cellulesovoïde ou coccobacille ; dont le mode d'association est toujours en chaines incurvées de nombre paires.(kihal, 1996 ; carr et al, 2002)





**Figure 04:** Test à la catalase

Souches	Examen Macroscopique		Examen Microscopique			
	Dimensions	Forme	Couleur	Consistance	Gram	Forme
Lc1, Lc2, Lc3, Lc4	1,1 <math>\text{Ø}</math> <math>< 1</math>	sphère	blanchâtre	normale	+	Coque
Lb5	0,8 <math>< \text{Ø}</math> <math>< 1</math>	ronde	Crème	Pâteuse	+	bâtonnet

**Tableau 03:** Observations culturelles et morphologiques des bactéries lactiques

Caractéristiques des souches	Cocci	Lactobacille
	Lc	Lb
Gram	+	+
Catalase	-	-
Dégagement de Gaz	-	-

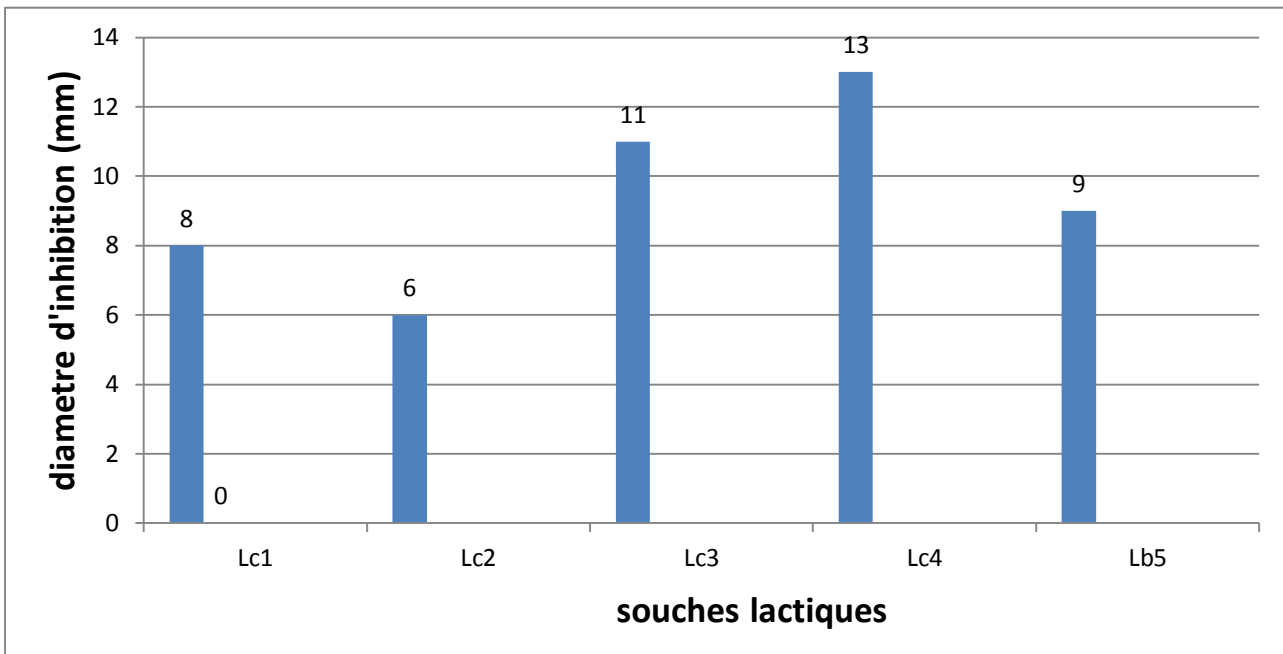
**Tableau 04:** Les observations microscopiques et biochimiques préliminaires des souches isolées

### 3 Spectre d'activité

#### 3.1 Activité antagoniste de souches vis-à-vis d'*Escherichia coli* ATCC 25922 :

Les différentes souches sélectionnées Lc1, Lc2, Lc3, Lc4 et Lb5 isolées à 30 ° C présentent un spectre d'activité très proche vis-à-vis du germe cible testé *Escherichia coli* ATCC 25922. Les zones d'inhibition sont claires avec des bordures bien distinctes, le diamètre d'inhibition est

variable et varie de 6 mm à 13 mm (Figure 05). L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 8 mm (**Schillinger et Lucke, 2001**),



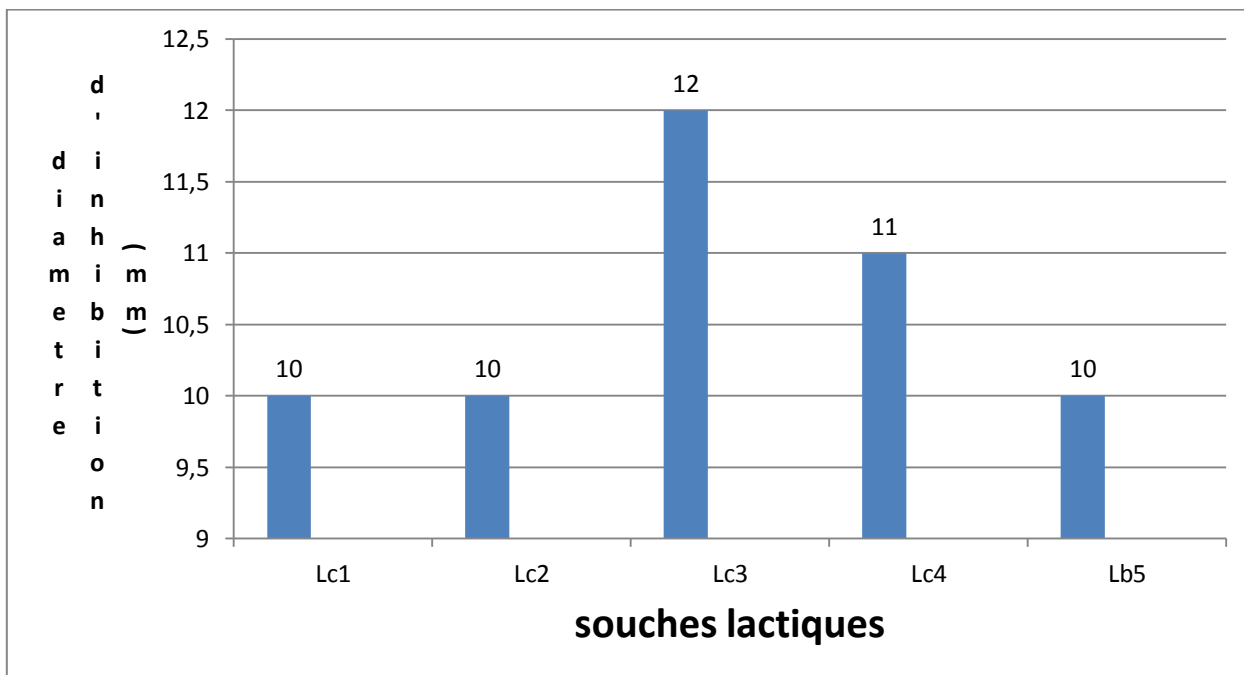
**Figure 5:** Diamètre d'inhibition en mm des souches lactique en présence d'*Escherichiacoli*



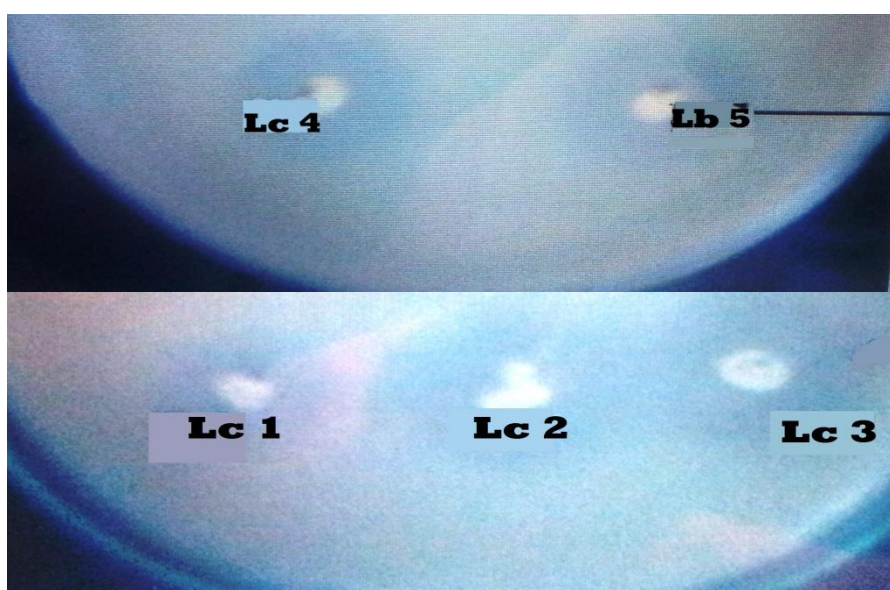
**Figure 6 :** Activité antibactérienne des différents souches lactiques (Souche expérimentale)

### 3.2. Activité antagoniste de souches vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* STA 49444:

Les différentes souches sélectionnées Lc1, Lc2, Lc3, Lc4 et Lb5 isolées à 30 ° C présentent un spectre d'activité très proche vis-à-vis du germe cible testé *Staphylococcus aureus* STA 49444. Les zones d'inhibition sont claires avec des bordures bien distinctes, le diamètre d'inhibition est variable et varie de 10 mm à 12 mm (Figure 04). L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 8 mm (*Schillinger et Lucke, 2001*),



**Figure 7:** Diamètre d'inhibition en mm des souches lactique en présence de *Staphylococcus aureus* STA 49444



**Figure 8:** Activité antibactérienne des différents souches lactiques (Souche expérimentale)

# CONCLUSION

## CONCLUSION

La biopréservation consiste à inoculer un produit par des bactéries sélectionnées pour leur aptitude à inhiber le développement de germes indésirables, sans modifier les qualités organoleptiques et sanitaires de ce produit. Les bactéries lactiques sont de bons candidats pour cette technologie car elles produisent souvent une large gamme de composés inhibiteurs (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl, bactériocines, reutéline). Avec la méthode de (Tagg et al., 1976); appliqué dans ce travail, nous avons sélectionné des souches de bactéries lactiques à partir du lait de chamelle, en utilisant le milieu MRS.

Après effectuer les tests physiologiques et biochimiques nous avons pu isolé 5 souches mésophiles (Lc1, Lc2, Lc3, Lc4, et Lb5) .les souches sont catalase négatif et gram positif.

On a observé les zones d'inhibition formées par nos souches à l'égard des bactéries pathogènes. Contre *Staphylococcus aureus* STA 49444, les souches (Lc1, Lc2, Lc3, Lc4 et Lb5) montrent un diamètre d'inhibition variant de 10 et 12 mm.

Les mêmes souches lactiques isolées présentent aussi une activité bactéricide contre *Escherichia coli* ATCC 25922 avec une zone d'inhibition variant de 6 et 13 mm .

Les résultats présentés dans ce mémoire permettent au moins de fournir un ordre d'idée plus clair sur le potentiel antimicrobien des souches sélectionnées qui représentent une voie d'avenir pour la production des substances antimicrobiennes utilisées dans la bioconservation des aliments et la fermentation.

L'analyse des propriétés biochimiques et physiologiques de cette substance à activité inhibitrice 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 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.

# **REFERENCE BIBLIOGRAPHIE**

- Abdalla, O.M., Davidson, P.M., Christen, G.L.**( 1993) - Survival of selected pathogenic bacteria in white pickled cheese made with lactic acid bacteria or antimicrobials. *Journal of Food Protection* 56, 972-976.
- Arous, S., Dalet, K., Héchard, Y.** (2004) - Involvement of the mpo operon in resistance to classIIa bacteriocins in *L. monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 37-41.
- Altieri, C., Speranza, B., Del Nobile, M.A., and Sinigaglia, M.,**( 2005) - Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1294-1302.
- AFSSA.,** (2002) - Recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des micro-organismes utilisés dans le secteur agroalimentaire – souches nouvelles ou modifiées - applications différentes de souches déjà utilisées.
- Alvarez –Olmos M.I. and Oberhelman R.A.,** (2001) - Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious diseases.*32, (11):1567-1576.
- A.Meyer, J. Deiana, A. Bernard** (2004) - Cours de microbiologie générale 2ème Edition, 176 -179.
- Arous S., Dalet K and Héchard Y.,** (2004) - Involvement of the mpo operon in resistance to class IIa bacteriocins in *L. monocytogenes*. *FEMS Microbiology*, 99, 1294 – 1302.
- Asa Ljungh and Torkel Wadström** (2010) - Lactic Acid Bacteria as Probiotics, 73 - 75.
- Baya, A.M., Toranzo, A.E., Lupiani, B., Li, T., Roberson, B.S., and Hetrick, F.M.,**(1991) - Biochemical and serological characterization of *Carnobacterium* spp. Isolated from farmed and natural populations of striped bass and catfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3114-3120.
- Bauer, R., Dicks, L.** (2005) - Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 201-216.
- Bibek Ray,** (2005) - Fundamental Food Microbiology 3rd Edition, 131-132.
- Beldsoe, G.E., Flick, G.J., Gram, L., Herman, D., Fahncke, M.L., and Ward, D.R.,** (2001) - Processing parameters needed to control pathogen in cold-smoked fish. *J. Food Sci.* 66, 1058-1133.
- Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Bouttefroy, A. and Leroi, F.** (2004) - Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1029-1037.
- Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Cardinal, M. and Leroi, F.** (2005) - Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a bio-preservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 104, 309-324.
- Castellano, P. and Vignolo, G.** (2006) - Inhibition of *L. innocua* and *Brochothrixthermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lb. curvatus* CRL705 and its bacteriocins. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 194-199.
- Castellano, P., Vignolo, G., Farias, R.N., Arrondo, J.L., Chelin R.** (2007) - Molecular view by fourier transform infrared spectroscopy of the relationship between lactocin 705 and membranes : speculations on antimicrobial mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(2), 415-420.
- Calder P.C and Kew S. Monville T.J.,**(1993) - The immune system target for functional foods ?*British Journal of Nutrition* 88:S165-S176.



- Carine Dortu, Philippe Thonart** (2009) - Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires, *13*, 143-154.
- C. Patterson, PhD, PAg The pathfinder Research & Management Ltd** (2008) - Probiotiques : Bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base, 1-4.
- Cornu, M., Beaufort, A., Rudelle, S., Laloux, L., Bergis, H., Miconnet, N., Sérot, T., and Delignette-Muller, M.L.**, (2006) - Effect of temperature, water-phase salt and phenolic contents on *Listeria monocytogenes* growth rates on cold-smoked salmon and evaluation of secondary models. *Int. J. Food Microbiol.* *106*, 159-168.
- Cardinal, M., Berdague, J.-L., Diné, V., Knockaert, C. and Vallet, J.-L.** (1997) - Effet de différentes techniques de fumage sur la nature des composés volatils et les caractéristiques sensorielles de la chair de saumon. *Sciences des aliments* *17*, 679-696.
- Cardinal, M., Gunnlaugsdottir, H., Bjoernevik, M., Ouisse, A., Vallet, J.-L. and Leroi, F.** (2004) - Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. *Food Research International* *37*, 181-193.
- Cotter P.D & Hill C.**, (2003) - Surviving the acid test: responses of Gram+ bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *67*, 429-453.
- Cocconier, M. H., M. F. Bernet, J. R. Neeser and A. L. Servin** (1993) - Inhibition of adhesion on enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion *FEMS Microbiol Lett.* *110*: 299-306.
- Cocconier, M. H., V. Lievin, M. F. Bernet-Camard, S. Hudault and A. L. Servin** (1997) - Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB *Antimicrob Agents Chemother.* *41*: 1046-1052.
- Cocconier, M. H., V. Lievin, E. Hemery and A. L. Servin** (1998) - Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactococcus acidophilus* strain LB *Appl Environ Microbiol.* *64*: 4573-4580.
- Champagne, C.P., Roy, D., Gardner, N.**, (2005) - Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* *45* (1), 61-84.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P.** (2006) - Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* *16*: 1058-1071.
- Debevere, J. and Boskou, G.**, (1996) - Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA-producing microflora of cod fillets. *Int. J. Food Microbiol.* *31*, 221-229.
- Desmazeaud M.J** (1998) - Bactéries lactiques et qualité des fromages. Qualité sanitaire des produits alimentaires. Laboratoire de recherches laitières. INRA Paris.
- Diep, D.B. and Nés, I.F.** (2002) - Ribosomally synthesized antibacterial peptides in gram-positive bacteria. *Curr. Drug Targets.* *3*: 107-122.
- Diep, D.B., Axelsson, L., Grefslí, C. and Nés, I.** (2000) - The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiol.* *146*: 2155-2160.
- De Man, J.C., Rogosa, M. Sharpe, M.T.** (1960) - A medium for cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, *23*, 130-135.
- Dora Beshkova, Dora Beshkova** (2012) - *Eng. Life Sc* Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry N° 4, 419-432.
- Dunne C.L., O'Mahony et al.**, (2001) - In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin : correlation with in vivo findings. *American Journal of clinical Nutrition* *73*(2):386s-392s.



**Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X. and Boyaval, P.** (1999a) - Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *in situ* produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. On Vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection* 62, 1394-1403.

**Duffes, F., Leroi, F., Boyaval, P. and Dousset, X.** (1999b) - Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 47, 33-42.

**Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M., and Prevost, H.** (2006) - The continuing story of class IIa bacteriocins *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 564 – 582.

**Dr Jean Marc ROBIN, Armelle ROUCHY** (2001) - Nutri-thérapie info: Les Probiotiques, 1-2.

**Dalet, K., Briand, C., Cenatiempo, Y., Héchard, Y.** (2000) - The *rpoN* gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.* 41(6), 441-443.

**Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P. and Héchard, Y.** (2001) - A  $\beta$ 54-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *L. monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology* 147, 3263-3269.

**Dalgaard, P., Gram, L. and Huss, H. H.** (1993) - Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 19, 283-294.

**Dalgaard, P.** (1995) - Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology* 26, 319-333.

**Dalgaard, P. and Jorgensen, L. V.** (2000) - Cooked and brined shrimps packed in a modified atmosphere have a shelf-life of > 7 months at 0°C, but spoil in 4-6 days at 25°C. *International Journal of Food Science and Technology* 35, 431-442.

**Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Euras Vilalta, N., Swings, J., Fruekilde, P. and Leisner, J. J.** (2003) - Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0 degrees C and 25 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* 94, 80-89.

**Dalgaard, P., Madsen, H. L., Samieian, N. and Emborg, J.** (2006) - Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*)-- effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *Journal of Applied Microbiology* 101, 80-95.

## E

**Earnshaw R.G., (1992)** - The antimicrobial action of lactic acid bacteria: Natural food preservation systems. In the lactic acid bacteria in health and disease .Edited by B.I.B,Wood ,Elsibier science publishers .London and New york 1,211-232.

**Eijsink VGH, Brurberg MB, Middelhoven PJ & Nes IF** (1996) - Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sakei* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.* 178: 2232–2237.

**Eijsink VGH, Skeie M, Middelhoven PH, Brurberg MB & Nes IF** (1998) - Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3275–3281.

**Eduardo Marcos Balciunas a, Fabio Andres Castillo Martinez a, Svetoslav Dimitrov Todorov b, Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco b, Attilio Converti c, Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira a,** (2013) - Food Control 32 Novel biotechnological applications of Bacteriocins, 134-142.

**Emborg, J., Laursen, B. G., Rathjen, T. and Dalgaard, P.** (2002) - Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere packed salmon (*Salmo salar*) at 2 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* 92, 790-799.

**Eldar, A., Gorla, M., Ghittino, C., Zlotkin, A. and Bercovier, H.** (1999) - Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1005-1008.

## **F**

**Fimland, G., Axelsson, L., Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G., Nissen-Meyer, J.** (2000) - A C-Terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J.bacterial.* 182, 2643-2648.

**Fimland, G., Eijsink, V.G., Nissen-Meyer, J.** (2002) - Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology*, 148, 3661-3670.

**Fimland G, Jack R, Jung G, Nes IF & Nissen-Meyer J** (1998) - The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center towards the C-terminus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 5057–5060.

**Fuller R.** (1989) - Probiotics in man and animals. *J.Appl.Bacteriol.*66:365-378.

**FAO/WHO.**, (2002) - Joint working group report on guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada.

**Feldhusen, F.**(2000)-The rôle of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes Infect.* 2: 1651-1660.

**Fella Naouel ALLOUCHEa\*, Amina HELLALb., Abdenour LARABAc.** (2010) - Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Revue « Nature et Technologie ».* n° 03/Juin 2010.

**Fletcher, G.C., Summers, G., Corrigan, V.K., Johanson, M.R., and Hedderley, D.,** (2004) - Optimizing gas mixtures for modified atmosphere packaging of fresh king salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 13, 5-28.

## **G**

**Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Oma, N.** (2007) - Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120(1-2), 51-70.

**Gagnon M.,**(2007) - Rôle des probiotiques lors d'infection entériques d'origine bactérienne et virale :analyse in vitro et études in vivo chez des modèles murins. Département des sciences des aliments et de nutrition Québec. Université Laval Ph.D 155.

**Ghalfi, H., Allaoui, A., Destain, J., Benkerroum, N., Thonart, P.** (2006a) - Bacteriocin activity by *Lb. curvatus* CWBI-B28 to inactivate *L. monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4 degrees C storage. *J. Food Prot.* 69, 1066-1071.

**Ghalfi, H.** (2006b) - Sélection et utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocines anti-listeria comme bio-conservateur et caractérisation de trois bactériocines produites par *Lb. curvatus* CWBI-B28. Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique, FUSAGx.

**Ghalfi, H., Benkerroum, N., Doguiet, D.D., Delvigne, F., Thonart, P.** (2007a) - Comparison of the performances of different fermentation strategies on cell growth and bacteriocin production by *Lb. curvatus* CWBI-B28. *J. Sci. Food Agr.* 87:541-549.

**Ghalfi, H., Benkerroum, N., Doguiet, D.D.K., Bensaid, M., Thonart, P.** (2007b) - Effectiveness of cell-adsorbed bacteriocin produced by *Lb. curvatus* CWBI-B28 and selected essential oils to control *L. monocytogenes* in pork meat during cold storage. *Lett. Appl. Microbiol.*44, 268-273.

**Gancel, F., Dzierszynski, F., and Tailliez, R.,** (1997) - Identification and characterization of *Lactobacillus* species isolated from fillets of vacuum-packed smoked and salted herring (*Clupea harengus*). *J. Appl. Microbiol.* 82, 722-728.

**Gram, L. and Huss, H. H.**(1996) - Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121-137.

**Gravesen A., Ramnath M., Rechinger K.B., Andersen N., Jänsch L., Héchard Y.,**

**Hasting J.W and Knochel S.**, (2002) – High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *L. monocytogenes*. *Microbiology*, 148: 2361 – 2369.

**Gravesen, A., Ramnath, M., Rechinger, K.B., Andersen, N., Jänsch, L., Héchard, Y., Hastings, J.W., Knochel, S.** (2002a) - High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *L. monocytogenes*. *Microbiology* 148, 2361-2369.

**Gravesen, A., Jydegaard, A., Mendes da Silva, J., Hansen, T.B., Knochel, S.** (2002b) - Frequency of Bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *L. monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2), 756-764.

**Gravesen, A., Diao, Z., Voss, J., Budde, B., Knochel, S.** (2004) - Differential inactivation of *L. monocytogenes* by D- and L-lactic acid. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 528-532.

**Guarner, F., Schaafsma, G.J.** (1998) - Probiotics. *Int. J. Food. Microbiol.*, 39, 237–238.

**Guarner, F., Perdigón, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., Morelli, L.** (2005) - Should yoghurt cultures be considered probiotic? *Brit. J. Nutr.*, 93, 783–786.

**Guinane, C.M., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P.** (2005) - A review - Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota of food. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1316-1325.

**Guinane, C.M., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P.** (2006) - Spontaneous resistance in *Lc. lactis* L1403 to the lantibiotic lacticin 3147. *FEMS Microbiol. Lett.* 260(1), 77-83.

**Guinane, C.M., Cotter, P.D., Lawton, E.M., Hill, C., Ross, P.** (2007) - Insertional mutagenesis to generate lantibiotic resistance in *Lc. lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(14), 4677-4680.

**Gonzalez-Rodriguez, M. N., Sanz, J. J., Santos, J. A., Otero, A. and Garcia-Lopez, M. L.** (2002) - Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *International Journal of Food Microbiology* 77, 161-168.

## H

**Hildebrandt, G. and Erol, I.**, (1988) - Sensorische und mikrobiologische Untersuchung an vakuumverpackten Räucherlachs in Scheiben (Sensory and microbiological analysis of vacuum packed sliced smoked salmon). *Arch. Lebensmittelhyg.* 39, 120- 123.

**Jorgensen, L. V. and Huss, H. H.** (1998) - Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *International Journal of Food Microbiology* 42, 127-131.

**Jorgensen, L. V., Dalgaard, P. and Huss, H. H.** (2000a) - Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2448-2453.

**Jorgensen, L. V., Huss, H. H. and Dalgaard, P.** (2000b) - The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* 89, 920-934.

**Joanne M. Willey, Linda M. Sherwood, Christopher J. Woolverton** (2008) - Prescott, Harley and Klein's *Microbiology* 7<sup>th</sup> Edition, 25-28.

**Joborn, A., Dorsch, M., Olsson, J. C., Westerdahl, A. and Kjelleberg, S.** (1999) - *Carnobacterium inhibens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 1891-1898.

**Joffraud, J. J., Leroi, F., Roy, C. and Berdague, J. L.** (2001) - Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 66, 175-184.

- Joffraud, J. J., Cardinal, M., Cornet, J., Chasles, J. S., Léon, S., Gigout, F. and Leroi, F.** (2006) - Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 112, 51-61.
- Johnsen, L., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J.** (2004) - Structurefunction analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*70(5), 2647-2652.
- Johnsen, L., Fimland, G., Nissen-Meyer, J.** (2005) - The C-terminal domain of Pediocin-like antimicrobial peptides (Class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.* 280, 9243-9250.
- K**
- Klaenhammer T.R.** (1988) - Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337-347.
- Klaenhammer T.R.** (1993) - Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12(1-3), 39-85.
- Klaenhammer T.R. and Kullen M.J.,** (1999) - Selection and design of probiotics. *International Journal of Food.*50 (1-2):45-47.
- Kauri I.P.,Kuhad A,et al.,** (2009) - Probiotics :Delineation of prophylactic and Therapeutic Benefits .*Journal of medical Food* 12(2):45-47.
- Katla T.,Moretro T.,Aasen I.M.,Holck A.,Axelsson L and Naterstad K.** (2001) - Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacinP and/or live *Lactobacillus sakei* cultures .*Food Microbiology*, 18,431-439.
- L**
- Lalitha, K. V., Sonaji, E. R., Manju, S., Jose, L., Gopal, T. K. and Ravisankar, C. N.** (2005) - Microbiological and biochemical changes in pearl spot (*Etroplus suratensis*Bloch) stored under modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1222-1228.
- Laursen, B. G., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P. and Leisner, J. J.** (2005) - *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum*as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 151-164.
- Laursen, B. G., Leisner, J. J. and Dalgaard, P.** (2006) - *Carnobacterium* species: effect of metabolic activity and interaction with *Brochotrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3604-3611.
- Leistner, L.** (2000) - Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55, 181-186.
- Leroi, F., Arbey, N., Joffraud, J. J. and Chevalier, F.** (1996) - Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf-life of vacuum-packed cold smoked salmon.*International Journal of Food Science and Technology* 31, 497-504.
- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F. and Cardinal, M.** (1998) - Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 39, 111-121.
- Leroi, F., Joffraud, J. J. and Chevalier, F.** (2000)- Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold-smoked salmon during storage at 5 degrees C as estimated by the factorial design method. *Journal of Food Protection* 63, 502-508.349.
- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F. and Cardinal, M.** (2001) - Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *Journal of Applied Microbiology* 90, 578-587.
- Leisner, J. J.** (2005) - *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum*as spoilers or protective cultures in meat and seafood:Phenotypic

- and genotypic characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 151-164.
- Lilly D.M., Stillwell R.H.,** (1995) - Probiotics :Growth promoting factors produced by microorganisms .*Science*, 147,747-748.
- Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J.,** (1990) - Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations .*Ferms .Microbiol.Rev.* 87,149-163.
- Liston J.** (1980) - Microbiology in fishery science. In: Connell JJ, editor. *Advances in Fish Science and Technology*. Farnham, Surrey, U.K.: Fishing News Books, 138-157.
- Lyhs, U., Björkroth, J., Hyytiä, E., and Korkeala, H.,**(1998) - The spoilage flora of vacuum-packaged, sodium nitrite or potassium nitrate treated, cold smoked rainbow trout stored at 4°C ou 8°C. *Int. J. Food Microbiol.* 45, 135-142.
- Lyhs, U., Björkroth, J., and Korkeala, H.,** (1999) - Characterisation of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged, cold smoked rainbow trout using ribotyping. *Int. J. Food Microbiol.* 52, 77-84.
- Lyhs, U. and Bjorkroth, J.K.,** (2008) - *Lactobacillus sakei/curvatus* is the prevailing lactic acid bacterium group in spoiled maatjes herring. *Food Microbiol.* 25, 529-533.
- Lyhs, U., Korkeala, H., and Björkroth, J.,** ( 2002) - Identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged gravad rainbow trout using ribotyping. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 147-153.
- Lyhs, U., Korkeala, H., Vandamme, P., and Björkroth, J.,** ( 2001a) - *Lactobacillus alimentarius*: a specific spoilage organism in marinated herring. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 355-360.
- Lyhs, U., Lahtinen, J., Fredriksson Ahomaa, M., Hyytiä-Trees, E., Elfing, K., and Korkeala, H.,** (2001b) - Microbiological quality and shelf life of vacuum packaged gravad rainbow trout stored at 3 and 8°C. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 221-228.
- Lyhs, U., Lahtinen, J., and Schelvis-Smit, R.,** ( 2007) - Microbiological quality of maatjes herring stored in air and under modified atmosphere at 4 and 1degrees C. *Food Microbiol.* 24, 508-516.
- Luchansky, J.B., Call, J.E.** (2004) - Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *L. monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. *J.Food Protec.* 67, 1017-1021.
- M**
- Marry Ellen Sanders** (1999) - Scientific State Summary Probiotics, 53, N° 11, 67-77.
- M. P. Zacharof <sup>a</sup>and R. W. Lovitt<sup>b</sup> .,** (2012) - Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria, 2, 82-100.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C.,** (2001) - Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 285–308.
- McAuliffe, O., Hill, C. and Ross, R. P.** (1999) - Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lacticin 3147-producing starter culture. *Journal of Applied Microbiology* 86, 251-256.
- Mejlholm, O., Boknaes, N., and Dalgaard, P.,** (2005) - Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (*Pandalus borealis*) in modified atmosphere packaging. *J. Appl. Microbiol.* 99, 66-76.
- Mejlholm, O. and Dalgaard, P.,** (2007) - Modeling and predicting the growth of lactic acid bacteria in lightly preserved seafood and their inhibiting effect on *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 70, 2485-2497.
- Molin, G., Stenström, I.M., and Ternstrom, A.,**( 1983) - The microbial flora of herring fillets after storage in carbon dioxide, nitrogen or air at 2°C. *J. Appl. Bacteriol.* 55, 49-56.
- Montel, M.C., Talon, R., Fournaud, J., and Champomier, M.C.,** ( 1991) - A simplified key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat.*J. Appl. Bacteriol.* 70, 469-472.

## N

**Nakamura, H., Hatanaka, M., Ochi, K., Nagao, M., Ogasawara, J., Hase, A., Kitase, T., Haruki, K., and Nishikawa, Y., ( 2004) - *Listeria monocytogenes*30.**

isolated from cold smoked fish products in Osaka city, Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 323-328.

**Nilsson L., Gram L., Huss H.H., (1999) - Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *Journal of food protection*, 62, 33—342.**

**Nilsson, L., Hansen, T. B., Garrido, P., Buchrieser, C., Glaser, P., Knochel, S., Gram, L. and Gravesen, A., (2005) - Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a non bacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Applied Microbiology* 98, 172-183.**

**Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H., (2003) - Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2975–2984.**

**Nigutova, K., Morovsky, M., Pristas, P., Teather, R.M., Holo, H., Javorsky, P. (2007) - Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram-positive cocci. *J. Appl. Microbiol.* 102(2), 563-569.**

## O

**Olivia McAulije a; b;1, R. Paul Ross c, Colin Hill a;b.,(2001) - FEMS Microbiology Reviews: Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action 28 , 285-308.**

**Ouattara B., Simard R.E., Holley R.A., Piette G., Begin A., (1997) - Inhibitory effect of organic acids upon meat spoilage bacteria .*Journal of Food protection* ,60,246-253.**

**Oppegard, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P.E., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. (2007) - The two-peptide class II bacteriocins: structure, production and mode of action. *J.Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13(4), 210-219.**

**Ordonez, J. A., Lopez-Galvez, D. E., Fernandez, M., Hierro, E. and de la Hoz, L. (2000) - Microbial and physicochemical modifications of hake (*Merluccius merluccius*) steaks stored under carbon dioxide enriched atmospheres. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1831-1840.**

**Papagianni, M., (2003) - Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Adv.* 21, 465–499.**

**Paludan-Muller, C., Dalgaard, P., Huss, H. H. and Gram, L. (1998) - Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified atmosphere-packed cold smoked salmon stored at 5 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 39, 155-166.**

## R

**Richard, C., Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H. and Drider, D., (2003) - Evidence on Inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Letters in Applied Microbiology* 36, 288-292.**

**Ross R.P, Morgan S and Hill C., (2002) - Preservation and fermentation: Past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3-16.**

**Rodgers, S. (2001) - Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures – a review. *Trends in Food Science & Technology* 12, 276-284.**

**Rodgers, S., Peiris, P. and Casadei, G. (2003) - Inhibition of nonproteolytic *Clostridium botulinum* with lactic acid bacteria and their bacteriocins at refrigeration temperatures. *Journal of Food Protection* 66, 674-678.**

**Rudi, K., Maugesten, T., Hannevik, S. E. and Nissen, H. (2004) - Explorative multivariate analyses of 16S rRNA gene data from microbial communities in**

modified-atmosphere-packed salmon and coalfish. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5010-5018.

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

**R. YANG, M.C. JOHNSON, et B. RAY.**, (1992) - Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3355–3359.

**Ringo, E., Olsen, R. E., Overli, O. and Lovik, F.** (1997) - Effect of dominance hierarchy formation on aerobic microbiota associated with epithelial mucosa of subordinate and dominant individuals of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture Research* 28, 901-904.

**Ringo, E., Wesmajervi, M. S., Bendiksen, H. R., Berg, A., Olsen, R. E., Johnsen, T., Mikkelsen, H., Seppola, M., Strom, E. and Holzappel, W.** (2001) – Identification

and characterization of Carnobacteria isolated from fish intestine. *Systematic and Applied Microbiology* 24, 183-191.

**Ringø, E. and Gatesoupe, F.-J.** (1998) - Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160, 177-203.

**Ringø, E., Bendiksen, H. R., Wesmajervi, M. S., Olsen, R. E., Jansen, P. A. and Mikkelsen, H.** (2000) - Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Applied Microbiology* 89, 317-322.

**Ribeiro Neunlist, M., Ralazamahaleo, M., Capellier, J.M., Besnard, V., Federighi, M., and Leroi, F.,**(2005) - Effect of salting and cold-smoking process on the culturability, viability, and virulence of *Listeria monocytogenes* strain Scott A. *J. Food Prot.* 68, 85-91.

**Richard, C., Brillet, A., Pilet, M.F., Prévost, H., and Drider, D.,** (2003) - Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 288-292.

## **S**

**Salminen S., Ouwehand A.C., Benno Y., and Lee Y.K.,**(1999) - Probiotics: How should they be defined ? *Trends Food Sci. Technol.* 10:107-110.

**Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Nielsen, T., Appel, K.F., and Gram, L.,** (2000) - The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture* 182, 1-15.

**Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Sick, E.B., Pipper, C.B., Martinussen, T., Slierendrecht, W.J., and Gram, L.,**(2001) - The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environ. Microbiol.* 3, 755-765.

**Sumner, J. and Ross, T.** (2002) - A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 77, 55-59.

**Stiles M.E. & Holzappel W.,**(1997) - Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36(1), 1-29.

**Seppola, M., Olsen, R.E., Sandaker, E., Kanapathippillai, P., Holzappel, W.H., and Ringo, E.,** (2006) - Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing of *Carnobacteria* isolated from hindgut chamber and large intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 131-137.

**Stohr, V., Joffraud, J. J., Cardinal, M. and Leroi, F.** (2001) - Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International* 34, 797-806.

**Stiles, M.E.** (1996) - Biopreservation by lactic acid bacteria. *Ant. van Leeuw* JO: 331-345.

**S.F. BAREFOOT, T.R. KLAENHAMMER.,** (1984) - Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob*

Agents Chemother, 26, 328–334.

**Said Ennahar, Toshihiro Sashihara, Kenji Sonomoto, Ayaaki Ishizaki.,** (2000) - FEMS Microbiology Reviews 24 Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity, 85-106.

**Shewan, J.M.,** (1977) - The bacteriology of fresh fish and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action, p. 51-66, Proceedings of the Conference on "Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish".

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

**S. Parvez<sup>1\*</sup>, K.A. Malik<sup>2</sup>, S. Ah Kang<sup>3</sup> and H.-Y. Kim<sup>1</sup>.** (2006) - Journal of Applied Microbiology Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, 100, 1171-1185.

**S. Matamoros a,b, M.F. Pilet a, F. Gigout b, H. Pre´ vost a, F. Leroi b.,** (2009) - Food Microbiology Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria , 26 (6) ,638-644.

**Schillinger, U., Becker, B., Vignolo, G., Holzapfel, W.H.,** (2001) - Efficacy of nisin in combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu. *Int. J. Food Microbiol.* 71,159–168.

**Strom, E. and Olafsen, J.A.,** (1990) - The indigenous microflora of wild-captured juvenile cod in net-pen rearing. In: Lèsel, R. (Ed.), *Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier, Amsterdam. pp. 181-185.

**Schroder,J., Schroder,G., Huisman,H., Schilperoort,R.A., and Schell,J.**(1981a) - *FEBS Lett.*, 129, 166-168.

**Schroder,J., Hillebrandt,A., Klipp,W., and Pulhler,A.**(1981b) - *Nudeic Acids Res.*, 9, 5187-5202.

**Stohr, V., Joffraud, J.J., Cardinal, M., and Leroi, F.,** (2001) - Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *FoodnRes. Int.* 34, 797-806.

## T

**T.R. KLAENHAMMER.,** (1993) - Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology.Rev* 12, 39-85.

**T.R. KLAENHAMMER.,**(1988) - Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70,337 –349.

**T.R. KLAENHAMMER.,** (1993) - Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology.Rev*, 12, 39-85.

**Truelstrup-Hansen, J., Gill, T. and Huss, H. H.** (1995) - Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. *Food Research International* ,28, 123-130.

**Truelstrup-Hansen, L. and Huss, H. H.** (1998) - Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses. *Food Research International* 31, 703-711.

**Truelstrup-Hansen, L., Rontved, S. D. and Huss, H. H.**(1998) - Microbiological quality and shelf life of cold-smoked salmon from three different processing plants. *Food Microbiology* 15, 137-150.

**TABAK Souhila, BENSOLTANE Ahmed** (2012) - L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales *Rev*, 6 ,71-79.

**Tamura,H.,Kitta,K.,Shibamoto,T.,**(1991) - Formation of reactive aldehydes from fatty acids in a Fe<sup>2+</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation system. *J.Agr.Food Cheille* ,39,439-442.

**ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. and Huis in 't Veld, J. H.** (1990).-



Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* 11, 73-84.

**Taufik Ghrairi, Nawel Chaftar and Khaled Hani** Bacteriocins: Recent Advances and Opportunities.

**Tomé, E., Teixeira, P. and Gibbs, P. A.** (2006) - Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria Isolated from commercial cold smoked salmon. *Food Microbiology* 23, 399-405.

**Toranzo, A.E., Novoa, B., Baya, A.M., Hetrick, F.M., Barja, J.L., and Figueras, A.** (1993) - Histopathology of rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum), and striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum) experimentally infected with *Carnobacterium piscicola*. *J. Fish Dis.* 16, 261-267.

**Twomey D., Ryan M., Meaney B. and Hill C.**, (2002) - Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and application. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 165-185.

**Y**

**Yamazaki K., Suzuki M., Kawai Y., Inoue N. and Montville T.J.**, (2003) - Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *Journal of Food Protection* , 65, 1420-1425.

**Y. H. Hui, Lis bet h Meunier- Goddi k, Ase Solvejg Hansen, Jytte Josephsen, Wai- Kit Nip, Peggy S. Stanfield, Fidel Toldra.**, (2004) - Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology , 32-33.

**V**

**Vadyvaloo, V., Hastings, J.W., van der Merwe, M.J., Rautenbach, M.** (2002) - Membranes of class IIa Bacteriocin-resistant *L. monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(11), 5223-5230.

**Vadyvaloo, V., Arous, S., Gravesen, A., Héchard, Y., Chauhan-Haubrock, R., Hastings, J.W., Rautenbach, M.** (2004a) - Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *L. monocytogenes* strains. *Microbiology* 150, 3025-3033.

**Vadyvaloo, V., Snoep, J.L., Hasting, J.W., Rautenbach, M.** (2004b) - Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *L. monocytogenes* strains. *Microbiology* 150, 335-340.

**Vermeiren, L., Devlieghere, F. and Debevere, J** (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology* 96, 149-164.

**Vermeiren, L., Devlieghere, F., De Graef, V. and Debevere, J.** (2005) - In vitro and in situ growth characteristics and behaviour of spoilage organisms associated with anaerobically stored cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology* 98, 33-42.

**Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J.** (2006a) - Co-culture experiments demonstrate the usefulness of *Lb. sakei* 10A to prolong the shelf-life of a model cooked ham. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 68-77.

**Vermeiren, L., Devlieghere, F., Vandekinderen, I. Debevere, J.** (2006b) - The interaction of the non-bacteriocinogenic *Lb. sakei* 10A and lactocin S producing *Lb. sakei* 148 towards *L. monocytogenes* on a model cooked ham. *Food Microbiol.* 23, 511-518.

**Vescovo, M., Gianluigi, S. and Zacconi, C.**, (2006) - Inhibition of *Listeria innocua* growth by Antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed coldsmoked salmon. *Food Microbiology* 23, 689-693.

**Vescovo, M., Scolari, G., Orsi, C., Sinigaglia, M. and Torriani, S.** (1997) - Combined effect of *Lactobacillus casei* inoculum, modified atmosphere packaging and storage temperature in Controlling *Aeromonas hydrophilia* in ready-to-use

vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* 32, 411-419.

**Veciana-Nogues, M. T., A. Marine-Font and M. C. Vidal-Carou. (1997)** - Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *J. Agric. FoodChem.* 45:2036-2041.

## **W**

**Wang, C.Y., Lin, P.R., Ng, C.C., Shyu, Y.T. (2010)** - Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, 166, 578-585.

**Wallbanks, S., Martinez.Murcia, A.J., Fryer, J.L., Phillips, B.A., and Collins, M.D., (1990)** - 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 224-230.

**Wessels S and Huss H.H., (1996)** - Suitability of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ATCC 11454 as a proteprotective culture for lightly preserved fish products. *Food Microbiology*, 13,323-332.

**Weiss, A. and Hammes, W. P. (2006)** - Lactic acid bacteria as protective cultures against *Listeria* spp. on cold smoked salmon. *European Food Research and Technology* 222, 343-346.

**Williams, A. M., Fryer, J. L. and Collins, M. D. (1990)** - *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiology Letters* 56, 109-113.

**Wiedemann, I., Böttiger, T., Bonelli, R.R., Wiese, A., Hagge, S.O., Gutschmann, T., Seydel, U., Deegan, L., Hill, C., Ross, P., Sahl, H.G. (2006)** - The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147 - a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Mol. Microbiol.* 61(2), 285-296.

**Wijaya, A., Neudeker, C., Holzappel, W., Franz, C.M.A.P. (2006)** - Influence of bacteriocinproducing *Enterococcus faecalis* BFE 1071 on *Lactobacillus* spp. in the rat gastrointestinal tract. *Proceedings of Food Micro*, Bologna, August 2007, p. 124.

**Willey, J.M., van der Donk, W.A. (2007)** - Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 477-501.