

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 اوت 1955- سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Science Biologique

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé :

**Isolement et identification des bactéries lactiques à partir
du miel de différentes Wilayas d'Algérie**

Présenté Par :

BOUMALHA Rahma
BOUZOUALEGH Yasmine

CHAIB Rania
KHENTITE Fella Ines

Membre de Jury:

Dr. Laib Imen (MCA)

Présidente

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Dr. BECHEKER Iméne (MCA)

Promotrice

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Dr. Gueddah Doria (MCB)

Examinatrice

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2023/2024

Remercîment

Avant tout, nous tenons à remercier Dieu tout puissant qui nous a donné la santé, la volonté, et la force pouvoir accomplir ce travail.

Nous tenons en premier lieu, à exprimer notre profonde gratitude à notre Promotrice : **Dr. BECHEKER Imène**, pour la qualité de son encadrement, Nous la remercions du fond du cœur pour sa patience, sa positivité et sa gentillesse à notre égard ont contribué au bon déroulement de ce travail de recherche, ses conseils constructives, ses orientations et ses encouragements durant toute la période de réalisation de ce travail.

Nous tenons également à exprimer nos remerciements aux membres du jury : **Dr. LAIB Imen** et **Dr. GUEDDAH Doria**, qui ont accepté de juger ce travail.

Nous également exprimons nos remerciements à tous les membres du laboratoire de Microbiologie de l'Université 20 Août 1955 Skikda,

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin et qui nous ont soutenus durant notre cursus universitaire et nous ont encouragé afin de persévérer et d'avancer.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à ma mère, dont l'amour inconditionnel et les sacrifices ont été une source constante de motivation et d'inspiration. Ta force et ton dévouement m'ont appris la persévérance et l'importance du travail acharné.

À ma sœur Bouchera, qui a toujours su m'écouter et me conseiller avec bienveillance. Ta présence et ton soutien ont été inestimables.

À mes frères Abed et Salah, pour votre présence et vos encouragements.

À mes amis, pour leur amitié sincère et leur compréhension. Vous avez su me remonter le moral et me donner la force de continuer même dans les moments les plus difficiles.

À mes collègues de travail, Yasmine, Rania, et Ines, pour votre collaboration précieuse, votre esprit d'équipe et votre soutien indéfectible. Travailler à vos côtés a été un véritable plaisir et une expérience enrichissante. Merci pour votre patience, vos conseils et votre amitié.

Ce mémoire est le fruit d'un travail collectif, et il n'aurait pas été possible sans l'amour, l'amitié et le soutien de chacun d'entre vous. Je vous suis infiniment reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Rahma

Dédicace

Avant tous, Mes profonds remerciements s'adressent à ALLAH qui m'a aidé et donné le courage et la patience pour effectuer ce travail.

Je dédie ce modeste travail à : À mes chers parents, C'est grâce à votre soutien inconditionnel et à vos encouragements constants que j'ai pu atteindre ce moment significatif dans ma vie. Ce mémoire est un témoignage humble de ma gratitude éternelle envers vous.

Ma chère sœur Ikram, Tu es bien plus qu'une sœur pour moi ; tu es ma confidente, ma complice. Merci d'avoir été à mes côtés à chaque étape de ce voyage.

À mes frères bien-aimés, À mes amis fidèles, Votre présence a rendu ce parcours non seulement supportable, mais aussi enrichissant et mémorable.

À toute ma famille, Chaque encouragement et chaque sourire ont été des moteurs pour moi tout au long de cette expérience.

À mes chères collègues Rahma, Rania et Ines, Travailler à vos côtés a été un honneur et un plaisir. Vos compétences, votre collaboration et votre amitié ont enrichi mon expérience professionnelle et personnelle d'une manière que je ne saurais exprimer suffisamment en mots. À chacun d'entre vous, je dédie ce mémoire avec toute ma reconnaissance et mon affection sincère. Votre soutien indéfectible a été la force motrice derrière chaque mot écrit et chaque étape franchie. Puisseons-nous continuer à partager de nombreux moments de bonheur et de succès à venir.

Yasmine

Dédicace

Je dédie ce mémoire à toutes les personnes qui m'ont accompagné et soutenu tout au long de ce parcours académique et personnel. Votre présence a été une source d'inspiration et de force inestimable.

À ma mère **ASSIA** et mon père **OMAR**, pour leur amour inconditionnel, leur soutien indéfectible, et leur confiance en moi. Vous avez toujours cru en mes capacités, même lorsque je doutais de moi-même. Votre patience et vos encouragements ont été des piliers dans ma vie, et c'est grâce à vous que j'ai pu surmonter les obstacles et atteindre mes objectifs.

À mes sœurs **HANIA** et **AMINA**, ainsi qu'**ABDERRAHMENE**. Vous êtes non seulement ma famille, mais aussi mes amis et mes confidents. Vos encouragements et votre soutien ont été essentiels pour moi. Vos sourires et votre optimisme ont illuminé les moments les plus sombres et m'ont donné la motivation nécessaire pour persévérer.

À **Mami** et **Papi**, pour votre sagesse, votre amour et vos conseils précieux. Vous avez toujours été là pour moi avec des mots réconfortants et des gestes affectueux. Vos histoires et vos expériences ont enrichi ma vie et m'ont donné des perspectives profondes sur la valeur du travail acharné et de la persévérance.

À **mes oncles** et **mes tantes** et surtout **LEILA** et **MYYA**, pour leur amour et leur soutien inébranlables. Chacun de vous a contribué, par sa présence et ses encouragements, à rendre ce voyage plus joyeux et moins solitaire. Vos mots gentils et vos encouragements constants m'ont donné la force de continuer.

À mes amis **RANIA**, **YAS**, **SARAH**, **RAYENE**, ET **RAHMA** qui ont été là à chaque étape de ce voyage. Votre amitié est un trésor précieux. Vous m'avez offert votre soutien inconditionnel, vos conseils et votre compagnie, transformant les défis en opportunités de croissance. Vous avez été des sources d'inspiration et de motivation, et je suis infiniment reconnaissant pour chaque moment partagé ensemble.

À mes collègues dans ce travail, **Yasmine**, **Rania** et **Rahma**. Travailler avec vous a été une expérience enrichissante et stimulante. Votre professionnalisme, votre dévouement et votre esprit d'équipe ont rendu ce projet non seulement possible, mais également agréable. Vous avez été des partenaires exceptionnelles, et je suis reconnaissant pour votre soutien et votre collaboration.

Merci à vous tous de faire partie de ma vie. Ce mémoire est le fruit de votre amour, de votre soutien et de vos encouragements. C'est grâce à vous que j'ai pu surmonter les défis et réaliser ce projet. De tout cœur, merci.

INES

Dédicace

D'abord, je suis reconnaissante à Allah pour toutes ses bénédictions et sa miséricorde

Dédié avec amour et gratitude profonde à mes chers parents, qui ont été mes piliers inébranlables et mes guides tout au long de ma vie. Leurs sacrifices et leur soutien indéfectible ont tracé le chemin de mes réussites et de mes joies.

À mes sœurs bien-aimées, Roua et Sarah, et à mes frères exceptionnels, Adem et Anes, vous êtes mes compagnons de cœur, mes complices de souvenirs et mes sources infinies de bonheur. Chaque moment partagé avec vous est un trésor précieux que je chéris profondément.

À mes amies fidèles et précieuses, ainsi qu'à mes cousines chéries, mes oncles, ma grand-mère vous avez illuminé mon existence de rires, de soutien inconditionnel et de bonheur. Vous êtes les étoiles qui ont embelli mon ciel nocturne, et je suis reconnaissante de vous avoir à mes côtés.

À Yasmine, Ines et Rahma,

À travers notre parcours ensemble, chaque moment partagé a enrichi notre travail et notre amitié. Votre soutien et votre collaboration ont été essentiels dans la réalisation de ce mémoire. Merci pour votre dévouement, votre persévérance et votre inspiration. Que notre réussite soit le fruit de notre travail commun et de notre solidarité.

Rania

TABLE DES MATIÈRES :

RESUMES

LISTE DES ABREVIATIONS :

LISTE DES FIGURES :

LISTES DES TABLEAUX :

Introduction	1
SYNTHESEBIBLIOGRAPHIQUE.....	3
Chapitre 01 : les bactéries lactiques.....	3
1. Définition des bactéries lactiques.....	3
2. Caractéristiques générales.....	3
3. Les voies des fermentations lactiques.....	4
3.1 La voie homofermentaire.....	4
3.2 La voie hétérofermentaire.....	5
4. Classification des bactéries lactiques.....	5
4.1 Le genre <i>Lactobacillus</i>.....	6
4.2 Le genre <i>Bifidobacterium</i>.....	6
4.3 Le genre <i>Leuconosto</i>.....	6
4.4 Le genre <i>Lactococcus</i>.....	7
4.5 Le genre <i>Enterococcus</i>.....	7
4.6 Le genre <i>Streptococcus</i>.....	7
Chapitre 02 : le miel.....	9
1. Histoire sur le miel.....	9
2. Définition du miel	9
3. Origine botanique.....	11
3.1 Miel de Nectar.....	11
3.2 Miel de miellat.....	11
4. La composition physico-chimique du miel.....	12
4.1 Composition chimique du miel.....	12
4.2 Les propriétés physiques.....	13
5. La culture du miel en Algérie.....	13

6. Les microorganismes présents dans le miel.....	14
<i>Matériel et méthodes</i>	15
1. Matériel.....	15
1.1 Matériel biologique.....	15
2. Méthodes.....	15
2.1 Préparation de la solution mère et des dilutions décimales.....	15
2.2 Isolement des bactéries lactiques.....	16
2.3 Purification des isolats de bactéries lactiques.....	16
2.4 Conservation des isolats.....	17
2.5 Identification des souches.....	17
2.5.1 Identification phénotypique.....	17
2.5.1.1 Examen macroscopique.....	17
2.5.1.2 Examen microscopique.....	18
2.5.2 Identification physiologique.....	18
2.5.2.1 Croissance à différentes températures.....	18
2.5.2.2 La thermorésistance des bactéries.....	18
2.5.2.3 Croissance à différents pH : 4,4 ; 4,9 ; 9 ; 9,6.....	18
2.5.2.4 Croissance en milieu hyper salé NaCl.....	18
2.5.3 Identification biochimique.....	19
2.5.3.1 Test catalase.....	19
2.5.3.2 Test oxydase.....	19
2.5.3.3 Croissance sur le lait bleu de Sherman.....	20
2.5.3.4 Test Mannitol-Mobilité.....	20
2.5.4 Identification technologique.....	21
2.5.4.1 Pouvoir protéolytique.....	21
2.5.4.2 Pouvoir aromatisant.....	21
2.5.4.3 L'activité antibactérienne.....	22
Résultats et Discussion.....	23
1. Isolement des bactéries lactiques.....	23
2. Purification des isolats de bactéries lactiques.....	23
3. Conservation des isolats.....	23
4. Identification des souches lactiques.....	24
4.1 Identification phénotypique.....	24
4.1.1 Examen macroscopique.....	24

4.1.2	Examen microscopique.....	24
4.2	Identification physiologique.....	25
4.2.1	Croissance à différentes températures.....	25
4.2.2	La thermorésistance des bactéries.....	27
4.2.3	Croissance à différents pH.....	28
4.2.4	Croissance en milieu hyper salé NaCl.....	29
4.3	Identification biochimique.....	30
4.3.1	Test catalase.....	30
4.3.2	Test oxydase.....	31
4.3.3	Croissance sur le lait bleu de Sherman.....	32
4.3.4	Test Mannitol-Mobilité.....	33
4.4	Identification technologique.....	34
4.4.1	Pouvoir protéolytique.....	34
4.4.2	Pouvoir aromatisant.....	35
4.4.3	Résultats de l'activité antibactérienne.....	38
	Conclusion.....	41

Résumé

Le miel constitue une ressource très intéressante pour l'isolement de nouvelles souches de bactéries lactiques possédant un potentiel technologique prometteur. Ces souches sont exploitées dans divers secteurs industriels telle que l'industrie agroalimentaire. L'objectif de ce travail est d'isoler et purifier des bactéries lactiques à partir du miel de différentes wilayas : Skikda, Guelma, Annaba, El Djelfa, Tester l'activité antibactérienne des bactéries lactiques. L'isolement de ces bactéries a été réalisé sur des milieux sélectifs MRS et M17, L'identification basée sur des caractères phénotypiques, physiologiques, biochimiques et technologiques (Température de croissance, coloration de Gram, test catalase, la résistance à différents pH, Mannitol mobilité, pouvoir aromatisant.), et l'activité antibactérienne des souches a été testé par la méthode des spots. Finalement, nous avons pu isoler et identifier 07 souches de bactéries lactiques, à savoir trois genres : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Pediococcus*. Les résultats de l'activité antibactérienne indiquent que certaines souches lactiques isolées (la souche 06 de Skikda) ont un effet antibactérien contre les germes pathogènes testés à savoir *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Mots-clés : Bactéries lactiques, Miel, Activité antibactérienne, Germes pathogènes.

Abstract

Honey is a very interesting resource for isolating new strains of lactic acid bacteria with promising technological potential. These strains are utilized in various industrial sectors such as the food industry. The objective of this work is to isolate and purify lactic acid bacteria from honey sourced from different regions: Skikda, Guelma, Annaba, El Djelfa, and to test the antibacterial activity of these lactic acid bacteria. The isolation of these bacteria was performed on selective media MRS and M17. Identification was based on phenotypic, physiological, biochemical, and technological characteristics (growth temperature, Gram staining, catalase test, resistance to different pH levels, mannitol fermentation, mobility, flavoring capability), and the antibacterial activity of the strains was tested using the spot method. Ultimately, we isolated and identified 7 strains of lactic acid bacteria, encompassing three genera: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, and *Pediococcus*. The results of the antibacterial activity indicate that certain isolated lactic acid strains (strain 06 from Skikda) exhibit antibacterial effects against tested pathogenic strains such as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Keywords : Lactic acid bacteria, Honey, Antibacterial activity, Pathogenic germs.

الملخص

شكل العسل مورداً مثيراً للاهتمام لعزل سلالات جديدة من بكتيريا حمض اللاكتيك ذات إمكانات تكنولوجية واعدة ويتم استغلال هذه السلالات في مختلف القطاعات الصناعية مثل صناعة الأغذية. الهدف من هذا العمل هو عزل وتنقية بكتيريا حمض اللاكتيك من العسل من ولايات مختلفة: سكيكدة، قالمة، عنابة، الجلفة، اختبار النشاط المضاد للبكتيريا لبكتيريا حمض اللاكتيك. تم عزل هذه البكتيريا على أوساط ، وتم تحديدها بناءً على الخصائص المظهرية والفسولوجية والكيميائية الحيوية M17 و MRS انتقائية النمو ، مقاومة الحرارة ، مقاومة الأس الهيدروجيني المختلفة والتكنولوجية (تلطيخ الجرام ، درجة حرارة وتركيزات كلوريد الصوديوم المختلفة ، واختبار الكاتالز وأوكسيديز ، اختبار النمو على حليب شيرمان الأزرق ، اختبار مانيتول-التنقل ، ومحلل البروتين ملكية). تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا للسلالات بطريقة البقعة. وأخيراً تمكنا من عزل وتحديد 07 سلالات من بكتيريا حمض اللاكتيك وهي ثلاثة أجناس تشير نتائج النشاط المضاد Lactobacillus ، Streptococcus ، Entrococcus و Pediococcus. للبكتيريا إلى أن بعض السلالات اللبنية المعزولة (سلالة سكيكدة 06) لها تأثير مضاد للجراثيم ضد الجراثيم المسببة للأمراض التي تم اختبارها، وهي المكورات العنقودية الذهبية، الإشريكية القولونية

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك، العسل، النشاط المضاد للبكتيريا، الجراثيم المسببة للأمراض

LISTE DES ABREVIATIONS :

% :	Pourcentage.
°C :	Degré Celsius.
ADN :	Acide Désoxyribonucléique.
ADP :	Adénosine diphosphate.
ARN :	Acide Ribonucléique.
ATP :	Adénosine triphosphate.
BL :	Bactéries lactiques.
CO ₂ :	Dioxyde de carbone.
g :	gramme.
GRAS :	Generally Recognized As Safe.
h :	Heure.
H ₂ O ₂ :	L'eau oxygénée.
HMF :	Hydroxyméthylfurfural.
j :	Jours.
Kg :	kilogramme.
LAB :	Lactic Acid Bacteria.
Mg :	milligramme.
min :	Minute.
mm :	millimètre.
MRS :	Milieu de Man Rogosa Sharpe.
NaCl :	chlorure de sodium.
NAD :	nicotinamide-adénine-dinucléotide.
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide d'hydrogène.
O ₂ :	Oxygène.

pH :	potentiel Hydrogène
S :	Souche.
ssp/ subsp :	Sous-espèce.
T° :	Température.
UE :	Union Européenne.
VP :	Voges Proskauer.
Zi :	Zone d'inhibition.

LISTE DES FIGURES :

Numéro	Titre	Page
01	Miel des différentes couleurs.	10
02	Une abeille sur une fleur de ronce butine le nectar sécrété.	11
03	Une abeille, sur un épicéa, récolte les gouttes poisseuses excrétées par les insectes piqueurs-suceurs.	12
04	Vue globale du laboratoire de Microbiologie de l'Université 20 Août 1955 – Skikda.	15
05	Préparation de la solution mère et des dilutions décimales.	16
06	Résultat de l'observation macroscopique des bactéries lactiques isolées à partir du miel sur milieu M17.	17
07	La réalisation du test catalase.	19
08	La réalisation du test oxydase.	20
09	Test de Mannitol Mobilité	21
10	Résultats de la purification des isolats sur gélose MRS à partir du miel (Guelma, 10^{-4}).	23
11	Résultats de la conservation des isolats sur milieu MRS incliné.	23
12	Résultat de l'observation macroscopique des bactéries lactiques isolées à partir du miel (A : Milieu M17), (B : Milieu MRS).	24
13	Résultat de l'observation microscopique d'un isolat à partir du miel (Guelma) après coloration de Gram (X100).	25
14	Résultats du test de croissance à différentes températures des bactéries lactiques testées (A à T = 30°C), (B à T = 37°C).	26
15	Résultats du test de thermorésistance des bactéries testées.	27
16	Résultats du test de croissance à différents pH (A=9), (B=9.6).	28
17	Résultats du test de croissance en milieu hyper salé NaCl : (A= 3,5%) (B= 6,5%).	29
18	Résultats du test catalase.	30

19	Résultats du test oxydase.	31
20	Résultats du test de croissance sur le lait bleu de Sherman (A) à 1% de bleu de méthylène (B) à 3%.	32
21	Résultats du test Mannitol-Mobilité.	33
22	Zones claires traduisant l'activité protéolytique des souches testées	34
23	Résultats du test aromatisant après l'addition de Vp1 et Vp2	35
24	Les diamètres des zones d'inhibition des souches lactiques vis-à-vis des souches pathogènes.	38

LISTES DES TABLEAUX :

Numéro	Titre	Page
01	Familles et principaux genres des bactéries lactiques.	05
02	Les informations principales sur la composition chimique du miel.	13
03	Résultat de l'observation macroscopique des bactéries lactiques isolées à partir du miel sur milieu M17.	14
04	Résultats du test de croissance à différentes températures.	26
05	Résultats du test de thermorésistance des bactéries à 60°C pendant 30 min.	27
06	Résultats du test de croissance à différents pH.	28
07	Résultats du test de croissance en milieu hyper salé NaCl.	29
08	Résultats du test catalase.	30
09	Résultats du test oxydase.	31
10	Résultats du test de croissance sur le lait bleu de Sherman.	32
11	Résultats du test Mannitol mobilité.	33
12	Résultats de l'activité protéolytique des souches testées sur milieu M17 et MRS additionné de lait écrémé à 10%.	34
13	Résultats du pouvoir aromatisant.	35
14	Caractérisation des Bactéries lactiques présentes dans le miel.	37

INTRODUCTION

Les bactéries lactiques (BL) désignent des bactéries produisant de l'acide lactique par fermentation des hydrates de carbone, tolérant des pH acides, vivant dans des niches écologiques anaérobies ou anaérobies facultatives, et se montrant catalase négative. Ces bactéries jouent un rôle crucial dans divers écosystèmes en raison de leurs capacités fermentaires et probiotiques. Historiquement, elles ont été largement étudiées dans les produits laitiers fermentés, mais leur présence dans d'autres produits alimentaires comme le miel et d'autres aliments commence à susciter un intérêt croissant (**Marco et al., 2021**).

Le miel, un produit apicole riche en sucres et en composés bioactifs, se distingue par la présence d'une biodiversité microbienne abondante, comprenant une variété de bactéries issues de diverses classifications taxonomiques. Parmi ces organismes, les bactéries lactiques sont notablement présentes. Le miel est l'un des produits alimentaires les plus appréciés par l'homme en raison de ses multiples applications thérapeutiques, énergétiques et nutritionnelles, ainsi que de ses propriétés antibactériennes (**Mandal et Mandal, 2011**).

Le Coran mentionne spécifiquement le miel dans la Sourate An-Nahl (Chapitre 16), Versets 68-69, où il est question des propriétés curatives du miel. Ce chapitre, intitulé "L'Abeille", médite sur les leçons que l'humanité peut tirer de la nature et des créatures créées par Allah. Ces versets soulignent la nature miraculeuse des abeilles, comment elles construisent leurs ruches, récoltent leur nourriture et produisent du miel. La référence aux propriétés curatives du miel met en lumière son importance, non seulement comme aliment nutritif, mais aussi comme remède médicinal, reconnu dans diverses traditions et cultures à travers l'histoire (**Jouve, 1997**).

Des études ont révélé que les BL sont des résidents endémiques du tube digestif des abeilles adultes, indépendamment des variations saisonnières ou des apports nutritionnels (**Cheng et al., 2017**). Leur composition et leur abondance varient cependant en fonction des sources de nectar exploitées et de la présence d'autres genres bactériens dans l'estomac des abeilles (**Anderson et al., 2013**). Les BL jouent un rôle clé dans la transformation du nectar en miel et du pollen en pain d'abeille en raison de leurs propriétés fermentatives (**Brøkke et al., 2011 ; Corby-Statham et al., 2013**). Ces bactéries contribuent à l'acidification du nectar, favorisant l'hydrolyse des sucres et la production d'inhibiteurs microbiens, conférant ainsi au miel ses propriétés antibactériennes caractéristiques (**Ngunjiri et Gichure, 2016**).

De ce fait, une relation mutualiste semble exister entre les abeilles et leurs BL. Les BL préparent l'environnement intestinal en sécrétant des composés actifs qui inhibent la croissance des microorganismes nuisibles, protégeant ainsi le tractus digestif des abeilles. En contrepartie, les abeilles fournissent aux BL un habitat favorable à leur développement, notamment le nectar stocké dans leur estomac à une température optimale de 35°C (**Brøkke et al., 2011**).

Vue l'importance des bactéries lactiques présentes dans le miel, notre présent travail a pour objectifs :

- ❖ Isoler, purifier et identifier les bactéries lactiques à partir de miels récoltés au niveau de différentes Wilayas : Skikda (Collo), Guelma (Hammam N'bail), Annaba (Séraïdi), Djelfa.
- ❖ Etudier les différents caractères phénotypiques, physiologiques, biochimiques et technologiques des souches isolées.
- ❖ Evaluer l'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolées.

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE 01 :
LES BACTÉRIES
LACTIQUES

1. Définition des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques, également connues sous l'acronyme LAB (Lactic Acid Bacteria) ont été décrites pour la première fois par Orla-Jensen en 1919 (**Leonard, 2013**), représentent un groupe de bactéries à Gram positif, caractérisés principalement par leur capacité à produire de l'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (**Luis, 2009**).

Elles englobent 12 genres bactériens, parmi lesquels les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Bifidobacterium*. Les BL sont largement exploitées dans divers processus industriels de fermentation agro-alimentaire. Certaines, telles que les lactobacilles ou les bifidobactéries, sont des résidents commensaux du microbiote intestinal et généralement considérées comme sûres par les autorités sanitaires en tant que microorganismes « Generally Recognized As Safe » (GRAS) (**Trias, 2008**), lorsqu'elles sont ingérées en quantités importantes et sous forme vivante, peuvent survivre dans le tractus digestif de l'hôte. Elles sont susceptibles d'exercer diverses actions bénéfiques, telles que l'amélioration de la digestion des fibres, la stimulation du système immunitaire, ainsi que la prévention ou le traitement des diarrhées, une fois ingérées (**Luis, 2009**).

Néanmoins, certaines espèces de *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes (**Aguirre et Collins, 1993**).

2. Caractéristiques générales :

Les bactéries lactiques (LAB) forment un groupe de microorganismes très hétérogène de Gram-positifs unies par certaines caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques, Ce sont des bacilles ou des coques, généralement immobiles et non sporulés. Elles peuvent être aéro-anaérobies facultatives ou anaérobies strictes et sont caractérisées par leur négativité à la catalase et sont dépourvues de cytochromes (**Sampo Lahtinen et al., 2012**). Bien qu'elles préfèrent des températures modérées (mésophiles), les LAB sont capables de croître dans une plage de températures allant de 5°C à 45°C. Leur pH optimal de croissance varie généralement de 5 à 9 mais elles peuvent tolérer des environnements acides (pH 3,2) et alcalins (pH 9,6) (**Van de Guchte et al., 2002**). Les bactéries lactiques ont des besoins complexes en facteurs de croissance tels que la vitamine B, des acides aminés, des bases azotées et des peptides, ce qui rend difficile la formulation de milieux de culture sélectifs, car ils doivent être suffisamment nutritifs. Habituellement, l'acidification du milieu est utilisée comme moyen de sélection (**Trias, 2008**).

Les LAB sont des micro-organismes ubiquitaires, fréquemment présents dans divers aliments tels que le lait et ses dérivés, la viande, les fruits et les légumes. Elles constituent également une partie de la flore intestinale et génitale humaine et animale (Leroi, 2010).

3. Les voies des fermentations lactiques :

La fermentation lactique est un processus métabolique utilisé par certaines bactéries, notamment celles présentes dans le yaourt, choucroute, cornichons et d'autres produits alimentaires acides, ainsi que par les animaux lorsqu'ils manquent d'oxygène.

L'équation de fermentation de l'acide lactique est généralement décrite comme :



Dans la première étape, le glucose est converti en acides pyruviques par le processus de glycolyse. Dans la glycolyse, 2 ADP et 2 NAD⁺ sont convertis en 2 ATP et 2 NADH.

Dans la deuxième étape, l'acide pyruvique est converti en acide lactique avec la conversion de 2 NADH en 2 NAD⁺. Dans cette étape, le NAD⁺ est régénéré pour continuer le processus glycolytique (Guillaume et al., 2018).

Par conséquent, l'équation complète de la fermentation lactique s'écrit sous la forme suivante :



Puis : $\text{Acide pyruvique} + 2 \text{NADH} \rightarrow \text{Acides lactiques} + 2 \text{NAD}^+$.

3.1. La voie homofermentaire :

La fermentation homolactique constitue une variante spécifique de la fermentation lactique, caractérisée par la conversion intégrale du pyruvate en lactate. Cette forme de fermentation est essentielle dans la production de divers produits alimentaires tels que les yaourts, les laits fermentés, les saucissons, la choucroute, le levain pour le pain, ainsi que certains types de fromages. Elle est qualifiée d'homolactique lorsque, sous l'influence de bactéries homofermentaires, l'acide lactique est produit en grande majorité (Guillaume et al., 2018).

La réaction chimique d'une fermentation homolactique est :



Dans le processus de fermentation homolactique, le produit exclusif est le (S)-lactate, résultant en la transformation d'une molécule de glucose en deux molécules de ce composé.

Parmi les bactéries homofermentaires, on trouve des bactéries des genres *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*.

3.2. La voie hétérofermentaire :

La fermentation hétérolactique représente une modalité particulière au sein de la fermentation lactique, se différenciant de la fermentation homolactique. La réaction chimique caractérisant la fermentation hétérolactique peut être représentée par l'équation suivante :



Cette transformation biochimique implique la décomposition d'une molécule de glucose en acide lactique, dioxyde de carbone et éthanol. Parmi les micro-organismes capables de conduire ce type de fermentation, on trouve des bactéries appartenant aux genres *Leuconostoc* ainsi que certaines espèces de *Lactobacillus* (Guillaume et al., 2018).

4. Classification des bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques, initialement défini par Orla-Jensen en 1919, comprend désormais plusieurs genres suite à diverses révisions taxonomiques. Tous ces genres appartiennent au phylum Firmicutes, à la classe Bacilli et à l'ordre des Lactobacillales. Cependant, ils sont représentés par différentes familles (Brenner et al., 2005) (Tableau 01).

Tableau 01 : Familles et principaux genres des bactéries lactiques (Brenner et al., 2005).

Familles	Principaux genres
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Pediococcus sp.</i>
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc sp.</i> , <i>Oenococcus sp.</i> , <i>Weissella sp.</i>
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus sp.</i> , <i>Lactococcus sp.</i>
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium sp.</i>
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus sp.</i> , <i>Tetragenococcus sp.</i> , <i>Vagococcus sp.</i>

Sur le plan phylogénétique, les bactéries lactiques peuvent être regroupées en utilisant des critères biologiques moléculaires tels que le séquençage de l'ARNr. Les ancêtres des bactéries lactiques semblent avoir été des organismes du sol de type *Bacillus*, qui ont ensuite perdu plusieurs gènes et fonctions physiologiques associées tout en s'adaptant à des niches écologiques riches en nutriments (**Sampo Lahtinen et al., 2012**). Il existe plusieurs genres, là, on va citer quelques-uns, à savoir :

4.1. Le genre *Lactobacillus* :

Les Lactobacilles, des bactéries Gram-positives microaérophiles, sont présents dans une diversité d'environnements, allant des habitats riches en nutriments comme les produits laitiers fermentés aux niches écologiques naturelles telles que les surfaces muqueuses humaines, les plantes et le sol. Le genre *Lactobacillus*, classé dans le phylum Firmicutes, la classe des Bacilles et l'ordre des Lactobacillales, présente une grande diversité phénotypique et phylogénétique, avec plus d'une centaine d'espèces différentes. Certaines de ces espèces, telles que *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* et *L. salivarius*, revêtent une importance biologique, technologique et commerciale significative (**Kleerebezem and Vaughan 2009**).

4.2. Le genre *Bifidobacterium* :

Les Bifidobactéries, qui constituent la grande majorité des bactéries présentes dans les selles des nourrissons (**Orla-Jensen, 1924**), ont été initialement découvertes dans les échantillons de selles de nourrissons allaités en 1899 par Tissier et ont été initialement désignées sous diverses appellations telles que *Bacillus bifidus* et *Lactobacillus bifidus*. À partir de 1973, elles ont été classées comme un genre distinct, *Bifidobacterium* comprenant initialement 11 espèces (**Poupard et al., 1973**). Par la suite, le nombre d'espèces de bifidobactéries a été mis à jour à 24 par Scardovi, puis à 33 taxons, avec la description de nouvelles espèces telles que *Bifidobacterium bombi* et *Bifidobacterium crudilactis* (**Delcenserie et al. 2007**).

4.3. Le genre *Leuconostoc* :

Les *Leuconostocs* sont des bactéries à Gram positif, immobiles et non sporulées, dont les cellules ellipsoïdales à sphériques, souvent allongées, surviennent généralement par paires ou en chaînes (**Garvie, 1986**). Les *Leuconostocs* ne peuvent pas hydrolyser l'arginine, ne réduisent pas les nitrates, et ne produisent pas d'indole. Bien qu'elles puissent croître à un pH de 4,5, elles préfèrent un pH initial de 6,5, avec une température optimale de croissance située

entre 20°C et 30°C. Certaines espèces psychrotrophes, telles que *L. carnosum*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum* et *L. inhae*, peuvent même croître à des températures réfrigérées, avec des souches détectées à 1°C (**Johansson et al., 2011**).

4.4. Le genre *Lactococcus* :

Le genre *Lactococcus*, connu pour sa capacité à produire des ménakinones dans certains fromages semi-durs tels que le Vacherin Fribourgeois et la Raclette (**Chollet et al., 2017**). Les Lactocoques sont des bactéries aérobies facultatives gram-positives non pathogènes avec le génome le plus important parmi toutes les bactéries lactiques (**Suba et al., 2022**). Ces cocci mesurent de 0,5 à 1,5 µm et forment des chaînes courtes. Ils sont mésophiles, fermentent les hexoses de manière homofermentaire, produisent de l'acide lactique L(+) et ont des exigences de croissance complexes (**Elliot et al., 1991**).

Le genre *Lactococcus* comprend sept espèces, notamment *Lactococcus lactis* (incluant les sous-espèces *cremoris*, *lactis* et *hordniae*), *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. chungangensis*, et *L. fujiensis*, récemment caractérisée. L'identification des espèces repose sur des critères physiologiques, chimiotaxonomiques et moléculaires (**Cai, 2010**).

4.5. Le genre *Enterococcus* :

Le genre *Enterococcus*, occupe une place importante parmi les bactéries lactiques (LAB). Ces organismes sont associés à divers habitats tels que le sol, les plantes, l'eau, le tractus gastro-intestinal (TGI) des humains et des animaux, le rumen et le fourrage (**Lauková et al., 1993, Strompfová et al., 2003; Simonová et Lauková, 2007**). On les retrouve également dans les aliments, probablement en raison de la contamination à partir de sources végétales ou animales (**Birollo et al., 2001**).

Les entérocoques jouent un rôle significatif dans de nombreux aliments fermentés, leur présence répandue dans la nature étant probablement due à leur capacité à persister et à résister à des conditions défavorables telles que l'acidité, le sel, le séchage, la chaleur et les agents désinfectants chimiques (**Holzappel et al., 2002**).

4.6. Le genre *Streptococcus* :

Les Streptocoques sont des bactéries à Gram positif, catalase négative, et facultativement anaérobies, ayant une forme sphérique ou ovoïde et un diamètre inférieur à 2 µm. Ils ont une faible teneur en G+C, variant de 34 à 46 mol%. Bien qu'ils soient plus communément

considérés comme des membres des bactéries lactiques. Leur croissance le long d'un seul axe favorise la formation de chaînes, notamment dans les cultures liquides, où certaines chaînes peuvent contenir jusqu'à 50 unités cellulaires ou plus (**Ekstedt et Stollerman, 1960**).

CHAPITRE 02 :

LE MIEL

1. Histoire sur le miel :

Depuis les origines de l'humanité, le miel a été utilisé non seulement comme source alimentaire mais également pour ses propriétés médicinales, reconnues depuis plus de 5 000 ans. Les premières traces de l'utilisation thérapeutique du miel remontent à l'ancienne Mésopotamie, aujourd'hui située en Irak, où la plus ancienne prescription médicale connue a été découverte. Cette tablette d'argile, datant de 47 siècles et trouvée à Nippur, énumère douze remèdes faisant régulièrement référence au miel. Par ailleurs, le papyrus d'Ebers, un document égyptien datant d'environ 1600 ans avant notre ère, mentionne fréquemment le miel dans la composition de divers médicaments destinés à traiter plusieurs maladies du corps humain (**Jouve, 1997**).

À l'époque romaine, Jules César suivait les enseignements de Pythagore, qui conseillait une diète incluant le miel. En Inde, un siècle avant notre ère, le miel était valorisé pour ses vertus, intégré dans les préceptes de l'Ayurveda qui recommandait un régime à base de miel et de lait pour prolonger la vie jusqu'à 500 ans. Le miel est également mentionné dans des textes religieux et historiques tels que la Bible, et le Talmud, le Coran. Durant les guerres napoléoniennes, le miel était utilisé pour ses propriétés antiseptiques et cicatrisantes. Aujourd'hui, le miel continue d'être valorisé pour ses vertus thérapeutiques, tant dans des remèdes traditionnels que dans des applications médicales plus modernes, conservant ainsi une place prééminente dans les pratiques de santé actuelles (**Jouve, 1997**).

2. Définition du miel :

Le miel représente une substance sucrée naturelle élaborée par les abeilles de l'espèce *Apis mellifera*. Il est produit soit à partir du nectar de diverses plantes, soit des sécrétions issues de parties vivantes de ces plantes, ou encore des excréments laissées sur elles par des insectes suceurs. Les abeilles récoltent ces substances, les transforment en ajoutant des enzymes spécifiques, les déshydratent, les stockent et permettent leur maturation dans les alvéoles des ruches (**Fanny, 2015**).



Figure 01 : miel des différents couleurs (Web 01).

Le miel est issu soit du nectar floral, soit du miellat produit par les insectes. Il se présente sous différentes formes selon les méthodes de production et de conditionnement employées (**Homrani M. 2020**).

- **Miel en rayon** : conservé par les abeilles dans des alvéoles operculées, celles-ci étant soit nouvellement construites par les abeilles, soit formées à partir de fines feuilles de cire gaufrée en cire d'abeille.
- **Miel égoutté** : extrait par égouttage des rayons préalablement désoperculés.
- **Miel centrifugé** : résultant de la centrifugation des rayons désoperculés, cette opération pouvant se faire avec ou sans application de chaleur.
- **Miel filtré** : obtenu par filtration pour éliminer les impuretés inorganiques ou organiques, processus qui réduit également la présence de pollen.

À l'exception du miel filtré et de celui destiné à l'utilisation industrielle, les appellations commerciales du miel peuvent inclure des précisions supplémentaires (**Homrani M. 2020**):

- Origine florale ou végétale : indiquée lorsque le miel provient principalement ou exclusivement de la source spécifiée, en possédant les caractéristiques organoleptiques, physico-chimiques et microscopiques appropriées.
- Origine régionale, territoriale ou topographique : mentionnée lorsque le produit est entièrement issu de la localisation déclarée.

3. Origine botanique :

Selon leur origine botanique, les miels sont généralement classés en deux catégories distinctes (Oddo et Bogdanov, 2004).

3.1. Miel de Nectar :

Le dictionnaire Larousse définit le nectar comme suit : « C'est un liquide sucré plus ou moins visqueux, riche en glucides, sécrété par les nectaires des plantes ». Le miel de nectar est principalement obtenu à partir des nectars des fleurs (**Figure 02**). Il contient environ 90% de sucre, ainsi que des acides organiques, des protéines, des acides aminés libres, et des composés inorganiques. Les miels de nectar sont classés en miel monofloraux et polyfloraux (Jean-Prost et Le Conte, 2005).



Figure 02 : Une abeille sur une fleur de ronce butine le nectar sécrété (Web 01).

3.2. Miel de miellat :

Ce miel est essentiellement dérivé des excréments laissés par les insectes butineurs, notamment les Hemiptera, sur les parties vivantes des plantes, ou bien il est issu des sécrétions de ces mêmes parties (Codex, 1981) (**Figure 03**). Comparativement au miel de nectar, il se distingue par une viscosité accrue, une couleur plus foncée et un taux d'humidité réduit. Ce type de miel est également enrichi en azote, en acides organiques, en minéraux et en sucres complexes (Jean-Prost et Le Conte, 2005).



Figure 03 : Une abeille, sur un épicéa, récolte les gouttes poisseuses excrétées par les insectes piqueurs-suceurs (**Web 01**).

4. la composition physico-chimique du miel :

4.1. Composition chimique du miel :

La composition du miel dépend de nombreux facteurs : l'espèce végétale butinée, la nature du sol, la race de l'abeille, l'état physiologique de la colonie, la météo etc... Le miel de miellat est souvent très foncé. Il contient moins de glucose et de fructose que les miels de nectar, mais plus des sucres dits supérieurs (par rapport au nombre de carbones contenus dans la chaîne). Les miels de miellats cristallisent généralement moins que les miels de nectar. Dans le miel d'une ruche en bonne santé, on ne trouve pas de substances antifongiques, ni de bactéries à l'état végétatif. On retrouve dans le miel, des grains de pollen entre 100 et 5000 par gramme de miel. On peut utiliser la présence de ce pollen pour définir l'origine de la nature du miel. Cette stratégie d'analyse est utilisée par la répression des fraudes. Le miel de miellat contient plus de pollens anémophiles (signifiant transportés par le vent) et de spores de champignons, ceci étant dû au fait que les pucerons butinent à la surface des plantes. Si les miels contiennent des teneurs élevées en substances minérales sur les pollens, cela peut signifier que le miel extrait a été extrait sous presse et sans précaution. Dans certaines zones du globe, la présence d'une radioactivité indirecte dans le miel, peut être due à des explosions et peuvent aussi avoir été amenée par la pluie

Tableau 02 : Les informations principales sur la composition chimique du miel (Gleiter et al. 2006) :

Propriété	Détails
pH	Entre 3,2 et 5,5, acidité due à la dégradation du glucose en acide gluconique.
Sucres	75-80 % de sucres totaux, principalement glucose et fructose, puis maltose et saccharose.
Eau	Contenu en eau entre 14 et 25 %, idéalement inférieur à 18 %.
Acides	Acides acétique, citrique, lactique, malique, oxalique, butyrique, succinique, etc.
Oligo-éléments	Potassium, calcium, fer, magnésium, phosphore, silicium, sodium... à l'état de traces.
Protéines	Albumines, globulines, acides aminés des pollens, enzymes.
Enzymes	Alpha- et bêta-amylases, gluco-invertase, alpha-glucosidase, gluco-oxydase.
Hydroxyméthylfurfural (HMF)	Indicateur de vieillissement, dégradation des hexoses, principalement fructose, limite UE de 40 mg/kg

4.2. Les propriétés physiques

Les propriétés physiques du miel se résument sur : la densité, la viscosité, L'hygroscopicité, la cristallisation, la conductibilité thermique, la conductibilité électrique, la couleur du miel, Ces caractéristiques des miels varient selon leur composition en protéines, enzymes, acides aminés, acides organiques, polyphénols, et caroténoïdes, lesquelles sont influencées par le type de fleurs butinées. Des recherches effectuées depuis les années 2000 ont mis en lumière les diverses propriétés du miel et leurs bienfaits pour la santé (**Ruegg et Blanc, 1981**)

5. La culture du miel en Algérie:

L'apiculture en Algérie est une pratique ancestrale qui connaît un essor remarquable ces dernières années. L'Algérie présente une grande diversité de climats et de paysages, ce qui se traduit par une flore mellifère riche et variée. On y trouve des maquis, des forêts, des garrigues et des zones steppiques, chacun abritant ses propres espèces mellifères ce qui offre un potentiel immense pour la production de miel de haute qualité avec une variété des saveurs et des propriétés uniques. Pendant la colonisation, l'apiculture traditionnelle était importante,

mais l'apiculture moderne était principalement entre les mains des colons, sans transfert de connaissances aux populations autochtones. La guerre de libération nationale a entraîné la destruction d'une grande partie des ruches traditionnelles par l'armée française, qui craignait qu'elles ne servent de cachettes d'armes. Après l'indépendance, les effectifs de l'apiculture traditionnelle ont été multipliés par huit. Un programme de construction de ruches algériennes a été élaboré, et des abeilles étrangères ont été importées. Depuis 1970, des plans quadriennaux ont été lancés pour promouvoir l'apiculture en Algérie, avec des crédits accordés pour le développement et la création de coopératives apicoles (Web 02).

6. Les microorganismes présents dans le miel :

Le miel est reconnu comme un milieu favorable au développement d'une diversité de micro-organismes, dont certains présentent des propriétés antimicrobiennes remarquables (Pajor et al., 2018). Ces composés naturels, synthétisés par les bactéries présentes dans le miel, pourraient offrir des solutions prometteuses dans divers domaines, notamment la bioconservation des aliments et la lutte contre les infections microbiennes, y compris celles résistantes aux antibiotiques. L'apport des abeilles au cours de la production du miel joue un rôle crucial dans l'enrichissement du produit en micro-organismes d'origine intestinale. Parmi les bactéries les plus fréquemment identifiées dans le miel figurent les genres *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus* et *Clostridium*, ainsi que des bactéries Gram-négatives telles que *Achromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* et *Pseudomonas* (Tableau03). Ces micro-organismes contribuent à la complexité et aux propriétés bénéfiques du miel (Gilliam et al., 1978 ; Ahn et al., 2012).

Tableau 03 : Micro-organismes présents dans le miel (Ahn et al., 2012)

Bactéries	Levures	Champignons
<i>Bacillus</i>	<i>Debaromyces</i>	<i>Asperhillus</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Alihia</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Lipomyces</i>	<i>Bettsiaalvei</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Nematospora</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Pichia</i>	<i>Chaetomium</i>
<i>Neisseria</i>	<i>Saccharomyces Scizosaccharomyces</i>	<i>Coniothecium</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Trichosporium</i>	<i>Hormiscium</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Torula</i>	<i>Peronsporaceae</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Zygasaccharomyces</i>	<i>Peyronelia</i>
<i>Bifidobacterium</i>		<i>Triposporium</i>

**MATÉRIEL
ET MÉTHODES**

Notre travail expérimental a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie de l'Université 20 Août 1955 – Skikda (**Figure 04**), sur une période de deux mois, du 24 Février jusqu'au 02 Mai 2024.



Figure 04 : Vue globale du laboratoire de Microbiologie de l'Université 20 Août 1955 – Skikda (**Prise personnelle**).

1. Matériel :

1.1. Matériel biologique :

Pour la réalisation de la partie expérimentale, les échantillons de miel ont été collectés au niveau de 04 régions différentes : Skikda (Collo), Guelma, Annaba (Seraidi), Djelfa.

La présente recherche s'est concentrée sur l'analyse de quatre échantillons de miel locaux, acquis d'après l'apiculture issue de diverses régions d'Algérie : Skikda (Collo), Guelma, Annaba (Seraidi) et Djelfa. Le choix de ces localités avait pour objectif d'assurer une variété dans l'échantillonnage tant sur le plan géographique que botanique. Les échantillons ont été collectés à la fin de l'année 2023, répondant ainsi aux critères de fraîcheur nécessaire pour garantir la validité des interprétations des résultats obtenus. Ces miels ont été catégorisés en fonction de leur lieu de provenance, ainsi que de leur date de récolte.

2. Méthodes :

2.1. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales :

20 g d'échantillon de miel ont été mélangés à 20 ml d'eau peptonée tamponnée dans un sac de congélation stérile pendant une minute par l'agitation manuelle. Des dilutions décimales jusqu'à 10^{-5} ont été préparées à partir de la solution mère, à l'aide d'une micropipette stérile,

un volume de 1 ml de la solution mère est pris et additionné aseptiquement à 9 ml d'eau peptonée stérile pour l'obtention de la dilution 10^{-1} . Ensuite, 1 ml de cette dernière est repris et additionné à 9 ml d'eau peptonée stérile pour réaliser la dilution 10^{-2} , Et l'opération a été refaite jusqu'à l'obtention de la dernière dilution 10^{-5} (Fessard *et al.*, 2016).



Figure 05 : Préparation de la solution mère et des dilutions décimales (**Prise personnelle**).

2.2. Isolement des bactéries lactiques :

L'isolement a été fait sur les milieux gélosés MRS et M17 coulés et solidifiés dans des boîtes de Petri inoculées à partir des trois dernières dilutions (10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5}) ; en déposant 0,1 ml de ces dilutions à la surface des milieux, suivi d'un étalement, puis l'incubation à 37°C pendant 24 à 48h en anaérobiose (Monnet *et al.*, 2008).

Après incubation, les colonies obtenues ont été sélectionnées par une analyse macroscopique et coloration de Gram. Sauf les colonies qui présentent un aspect typique de bactéries lactiques, et qui sont Gram +, ont été prises en considération.

2.3. Purification des isolats de bactéries lactiques :

La purification est réalisée par des repiquages successifs sur géloses MRS et M17 par la méthode des stries (quatre quadrants) jusqu'à l'obtention de colonies bien distinctes et homogènes (souches pures). La pureté des souches est révélée par la présence de colonies

homogènes ayant le même aspect, la même couleur, la même forme et la même taille (Guiraud, 2004 ; Heleni et *al.*, 2006).

2.4. Conservation des isolats :

Les souches doivent être conservées dans des conditions adéquates pour assurer une très bonne continuité du travail, et cela se fait par une conservation de courte durée ; où les isolats purifiés ont été ensemencé sur les milieux gélosés inclinés MRS et M17, incubés à 30°C pendant 18h et conservés à 4°C, et sur toutes les deux semaines, les cultures sont repiquées (Saidi et *al.*, 2004).

3.5. Identification des souches :

L'identification des souches bactériennes est établie en se basant sur l'étude des caractères phénotypiques, physiologiques, biochimiques et technologiques. Cela se fait par quelques tests.

3.5.1. Identification phénotypique :

3.5.1.1. Examen macroscopique :

Cet examen permet une observation macroscopique, à l'œil nu, des colonies obtenues sur milieux gélosés (MRS et M17) en tenant compte des critères suivants : la taille, la forme, la consistance, le contour, et la couleur des colonies ; aspect, opacité, surface (Guiraud, 2003) et par l'observation des troubles dans le milieu liquide (**Figure 06**).



Figure 06 : Résultat de l'observation macroscopique des bactéries lactiques isolées à partir du miel sur milieu M17 (**Prise personnelle**).

3.5.1.2. Examen microscopique :

Les colonies obtenues sur milieux gélosés MRS et M17 sont soumises à une coloration de Gram, afin de déterminer la morphologie des cellules (coques et bacilles), leur mode de regroupement et leur Gram (+/-) (**Guiraud, 2003**).

3.5.2. Identification physiologique :

3.5.2.1. Croissance à différentes températures :

Ce test permet la mise en évidence de la croissance des isolats à différentes températures (30, 37 et 4°C) dans les bouillons MRS et M17 (pH 6,8) et le développement des souches était apprécié après une semaine d'incubation pour les cultures à 4°C et après 24 à 72 h pour les autres cultures, par comparaison avec un tube de milieu MRS et M17 liquide non ensemencé. L'apparition de trouble indique la croissance des souches (examen de la turbidité) (**Larpent, 1996**).

3.5.2.2. La thermorésistance des bactéries :

Ce test permet de sélectionner les espèces thermorésistantes, il se fait après l'exposition des isolats au bain-marie à 63,5°C pendant 30 min, puis réincubation à 30°C pendant 24h à 48h (**Guiraud., 2003**).

3.5.2.3. Croissance à différents pH : 4,4 ; 4,9 ; 9 ; 9,6 :

Ce test se fait par l'ensemencement des souches dans des tubes qui contiennent les bouillons MRS et M17 à pH ajustés à 4,4 ; 4,9 ; 9 ; 9,6 suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h. La croissance des bactéries est appréciée par l'apparition des troubles. (**Guessas et al., 2006; Rouisset et Bensoltane, 2006**).

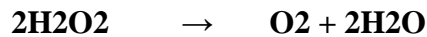
3.5.2.4. Croissance en milieu hyper salé NaCl :

Ce test se fait dans but de connaître la limite de croissance des bactéries lactiques en milieu hypersalé, il se réalise à différentes concentrations de NaCl (3.5%, 6.5%) sur les bouillons MRS et M17, puis une incubation à 37°C pendant 24h. La croissance est révélée par l'apparition de trouble suite à une comparaison avec un tube témoin non inoculé et incubé dans les mêmes conditions (**Carr et al., 2002**).

3.5.3. Identification biochimique :

3.5.3.1. Test catalase:

La catalase est une enzyme qui décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène dégagé, cette enzyme est présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Ce test a pour objectif de différencier les bactéries lactiques (catalase -) des entérobactéries (catalase +). La réaction catalysée est la suivante :



Sur une lame propre on réalise ce test, on dépose une goutte d'eau oxygénée, et on ajoute la colonie bactérienne. Une catalase positive est indiquée par le dégagement de bulles de gaz (Delarras. 2014) (Figure 07).



Figure 07 : La réalisation du test catalase (Prise personnelle).

3.5.3.2. Test oxydase :

L'oxydase est une enzyme capable d'oxyder un réactif appelé le N-diméthyl paraphénylène diamine. Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries lactiques.

En déposant une colonie bactérienne sur un disque oxydase, on ajoute une goutte d'eau physiologique pour étaler soigneusement la préparation bactérienne. Un changement de couleur de disque vers le violet foncé en moins de 30 secondes, indique que le test oxydase est positif. En revanche, si le disque reste incolore ou se colore après 30 secondes, le test est considéré comme négatif. (Marchal et al., 1991) (Figure 08).



Figure 08 : la réalisation du test oxydase (**Prise personnelle**).

3.5.3.3. Croissance sur le lait bleu de Sherman :

Ce test évalue la capacité des bactéries lactiques à se développer en présence de bleu de méthylène, qui devient bleu dans un environnement très oxydant et se décolore en présence de micro-organismes ayant une activité réductrice (**Benreguiég, 2014**).

Ce test est réalisé en deux séries de tubes à essai, contenant chacun 9 ml du lait écrémé stérile, auquel est ajouté 0,1 % de bleu de méthylène pour la première série et 0,3 % pour la deuxième série. Ensuite, les souches bactériennes sont ensemencées et les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures (**Bekhouche, 2006**).

3.5.3.4. Test Mannitol-Mobilité :

Ce test permet de détecter la fermentation du mannitol et de vérifier la mobilité des souches. Il se réalise par l'ensemencement des souches par pique centrale. Le changement de la couleur du milieu du rouge au jaune signifie la fermentation du mannitol, et le déplacement des bactéries de la zone d'ensemencement en créant un voile cela signifie leurs mobilités. Une croissance dans la zone d'ensemencement seulement qui montre que les bactéries sont immobiles (**Gerhardt et al., 1994**) (**Figure 09**).



Figure 09 : Test Mannitol Mobilité (Prise personnelle).

3.5.4. Identification technologique :

3.5.4.1. Pouvoir protéolytique :

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est évaluée sur un milieu MRS/M17 enrichi de lait écrémé à une concentration de 10 % (p/v), en utilisant la méthode des spots. Un volume de 5 μ l d'une culture fraîche du bouillon MRS et M17 est déposé en spot, puis les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures. La protéolyse est caractérisée par l'apparition d'une zone claire autour des spots. Le diamètre est mesuré en mm (**Franciosi et al., 2009**).

3.5.4.2. Pouvoir aromatisant :

La production d'acétoïne est évaluée sur le milieu Clark et Lubs. Les souches bactériennes se cultivent sur ce milieu, après 24 heures d'incubation, on réalise le test de la réaction de Voges-Proskauer, également connu sous le nom de réaction de V.P (Avril et al., 1992). Dans des tubes à hémolyse, 2 ml de culture sont transvaser, auxquels on ajoute 0,5 ml d'une solution de soude (NaOH) à 16 % dans de l'eau distillée (VP1), et 0,5 ml de réactif d'alpha-naphtol à 6 % dans de l'alcool absolu (VP2). Les tubes doivent être soigneusement agités, puis laissés reposer pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. La production d'acétoïne se manifeste par l'apparition d'un anneau ou il y'a une diffusion de la couleur rose à la surface du milieu. Un test VP positif indique que la souche possède une voie métabolique spécifique pour la fermentation des hexoses, la voie butylène glycolique (**Zouarari et al., 1992**).

3.5.4.3. L'activité antibactérienne :

Le pouvoir antibactérien des souches de bactéries lactiques isolées est testé par la méthode de diffusion sur milieu solide Mueller-Hinton vis-à-vis de souches cliniques (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) (Rahal,2005).

Ensemencement par écouvillonnage :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface de haut en bas en stries serrés.
- L'opération se répète deux fois en tournant la boîte de Petri 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Petri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.
- Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h à l'étuve.

L'effet inhibiteur se caractérise par la formation de zones claires autour d'un trouble de croissance des souches cibles. La présence d'une inhibition est confirmée lorsque le diamètre de la zone dépasse 1 mm, selon les critères établis par Schillinger et Lucke en 1989 (Allouche et al., 2010).

**RÉSULTATS
ET DISCUSSION**

1. Isolement des bactéries lactiques :

Lors de cette étude nous avons isolé les souches à partir des miels (Skikda, Annaba, El Djelfa, Guelma). Nous avons procédé à l'étude des caractères phénotypiques, physiologiques, biochimiques et technologiques.

2. Purification des isolats de bactéries lactiques :

Après plusieurs repiquages successifs des isolats sur les milieux MRS et M17, nous avons obtenu des colonies pures (**Figure 10**).

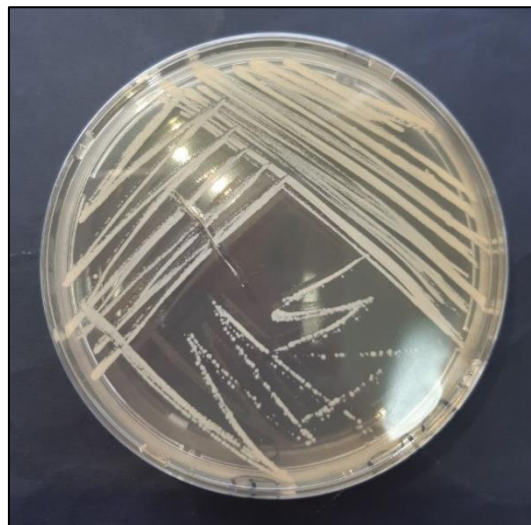


Figure 10 : Résultats de la purification des isolats sur gélose MRS à partir du miel (Guelma, 10^{-4}) (**Prise personnelle**).

3. Conservation des isolats :

Une fois les différentes colonies purifiées, nous les avons conservées sur milieu solide MRS et M17 incliné en attendant leur identification. Après une incubation à 30°C pendant 18 heures, les tubes ont été placés à 4°C pour le stockage ultérieur (**Figure 11**).



Figure 11 : Résultats de la conservation des isolats sur milieu MRS incliné (**Prise personnelle**).

4. Identification des souches lactiques :

Les 13 isolats ont été caractérisés en examinant leurs caractères phénotypiques, physiologiques, biochimiques et technologiques.

4.1. Identification phénotypique :

4.1.1. Examen macroscopique :

Les colonies développées sur le milieu M17 présentent une couleur allant du blanc crème au jaune, avec une forme circulaire ou lenticulaire et des contours réguliers ou irréguliers (**Fig12**).

Quant aux colonies cultivées sur gélose MRS, elles se distinguent par leur couleur blanchâtre, leur forme ronde et leurs contours réguliers (**Figure12**).

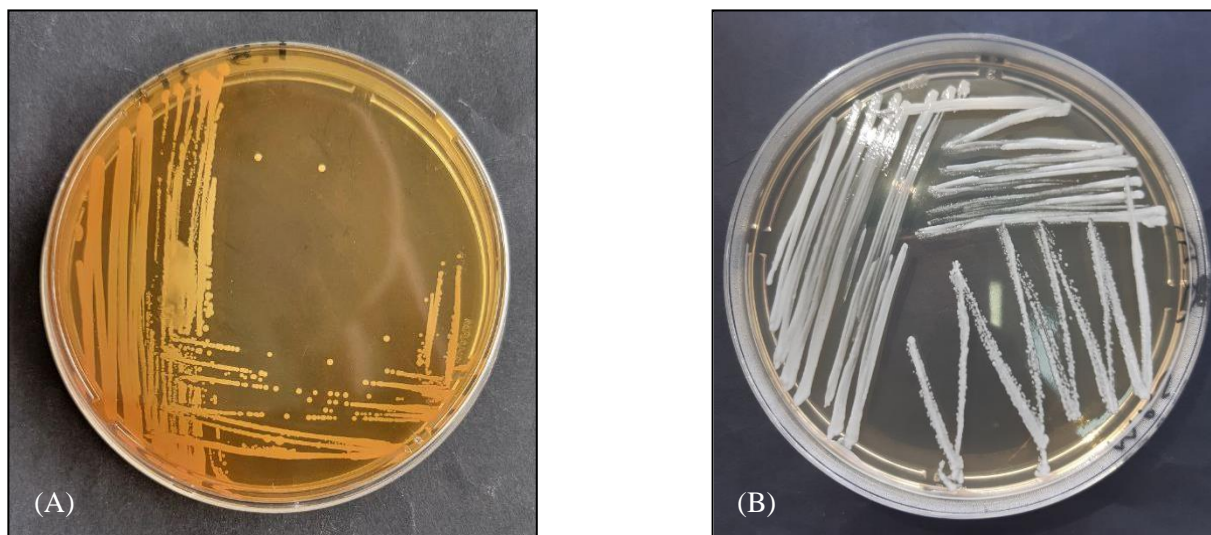


Figure 12 : Résultat de l'observation macroscopique des bactéries lactiques isolées à partir du miel (A : Milieu M17), (B : Milieu MRS) (**Prise personnelle**).

4.1.2. Examen microscopique :

La coloration de Gram révèle la présence de souches bactériennes immobiles à Gram positif et à Gram négatif, coques et bacilles avec différents modes de regroupements (monocoque, diplocoque, en amas ou en chaînette) (**Figure 13**).

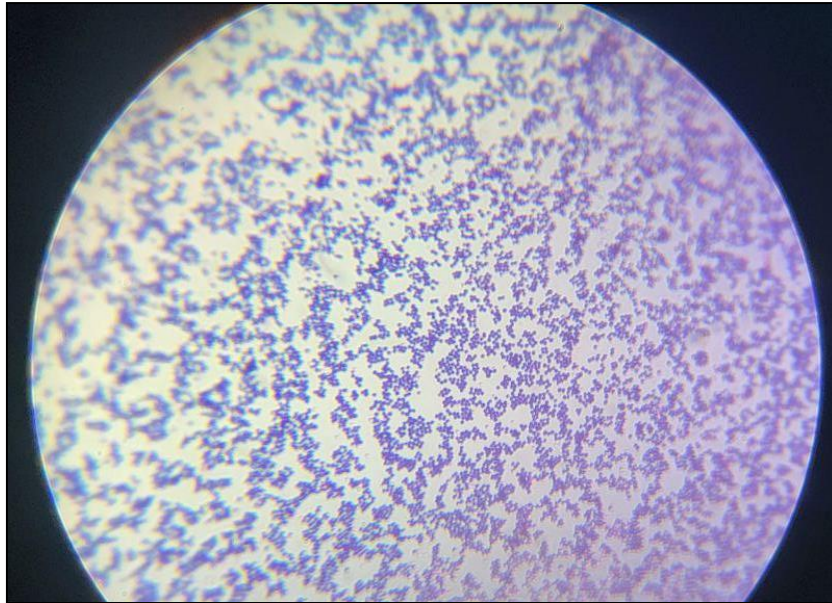


Figure 13 : Résultat de l'observation microscopique d'un isolat à partir du miel (Guelma) après coloration de Gram (X100) (**Prise personnelle**).

4.2. Identification physiologique :

4.2.1. Croissance à différentes températures :

La croissance est détectée par l'apparition de turbidité dans les tubes contenant le bouillon MRS et M17. Les souches testées ont manifesté une croissance à diverses températures : 30°C, 37°C et 4°C. Aucune croissance n'a été observée pour les différentes souches à 4°C (**Tableau 04**) (**Figure 14**).

Tableau 04 : Résultats du test de croissance à différentes températures.

Wilaya	Souches testées	Croissance à différentes températures		
		4°C	30°C	37°C
Skikda	S1	-	+++	+++
	S2	-	+	+
	S3	-	+	+
	S4	-	++	+
	S5	-	+++	+
	S6	-	+	+
El Djelfa	D1	-	+	++
	D2	-	+++	+++
	D3	-	+++	++
Annaba	A1	-	+++	+
	A2	-	+++	++
Guelma	G1	-	-	++
	G2	-	++	++

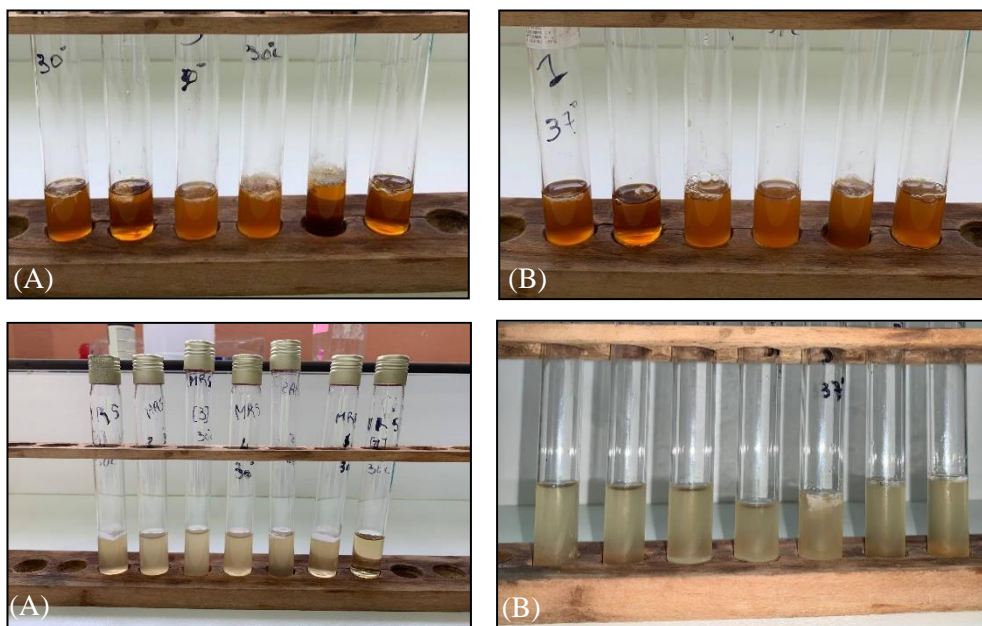


Figure 14 : Résultats du test de croissance à différentes températures des bactéries lactiques testées (A à T = 30°C), (B à T = 37°C) (Prise personnelle).

4.2.2. La thermorésistance des bactéries :

La capacité de résistance à une température de 60°C est confirmée par l'apparition de turbidité dans le milieu liquide MRS et M17. Toutes les souches examinées ont démontré leur résistance à cette température pendant 30 minutes (**Tableau 05**) (**Figure 15**).

Tableau 05 : Résultats du test de thermorésistance des bactéries à 60°C pendant 30 min.

Wilaya	Souches testées	Thermorésistance
Skikda	S1	++
	S2	++
	S3	++
	S4	+
	S5	+
	S6	+
El Djelfa	D1	+
	D2	++
	D3	+
Annaba	A1	+
	A2	++
Guelma	G1	++
	G2	-

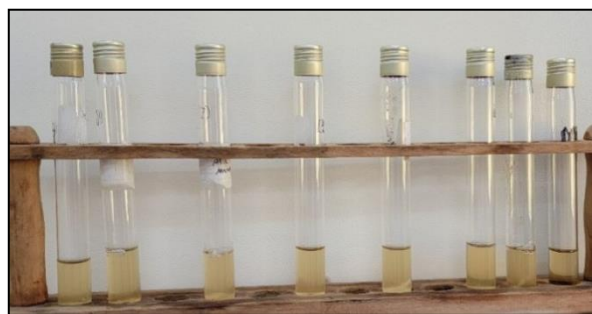


Figure 15 : Résultats du test de Thermorésistance des bactéries testées (**Prise personnelle**).

4.2.3. Croissance à différents pH :

La plupart des souches montrent une croissance optimale à un pH de 9,6, tandis que la croissance est inhibée à un pH de 4,4. Pour les deux autres valeurs de pH testées, soit 4,9 et 9, les résultats varient en fonction des souches bactériennes testées (Tableau 06) (Figure 16).

Tableau 06 : Résultats du test de croissance à différents pH.

Wilaya	Souches testées	Croissance à différents pH			
		4,4	4,9	9	9,6
Skikda	S1	-	++	+	++
	S2	-	-	+	++
	S3	-	-	+	++
	S4	+	++	+	+
	S5	+	+	++	+++
	S6	-	-	++	+++
El Djelfa	D1	-	-	+	+
	D2	+	+	+	+
	D3	-	-	+	+
Annaba	A1	++	+++	++	++
	A2	-	+	++	++
Guelma	G1	-	-	+	++
	G2	-	-	++	++

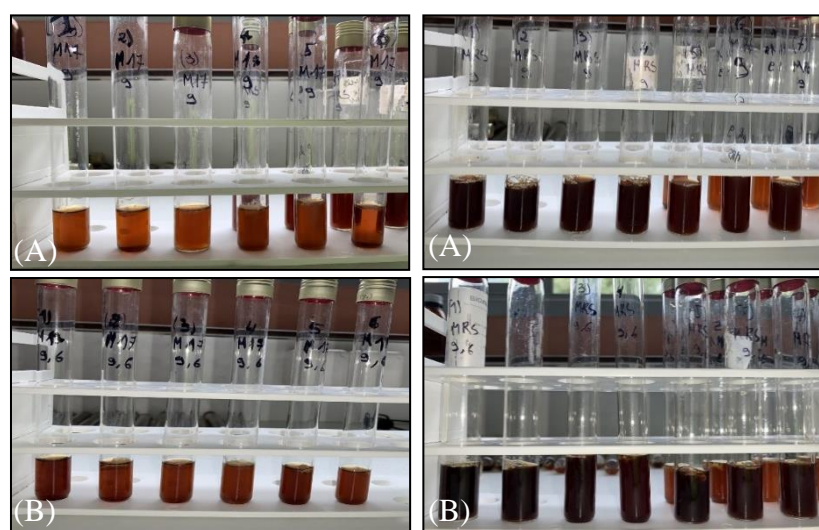


Figure 16 : Résultats du test de croissance à différents pH (A=9), (B=9.6) (Prise personnelle).

4.2.4. Croissance en milieu hyper salé NaCl :

Toutes les souches ont donné un résultat positif lorsqu'elles ont été testées dans des milieux hypersalés contenant respectivement 3,5 % et 6,5 % de NaCl (**Tableau 07**) (**Figure 17**).

Tableau 07 : Résultats du test de croissance en milieu hyper salé NaCl.

Wilaya	Souches testées	Croissance à différentes concentrations d'NaCl	
		3,5%	6,5%
Skikda	S1	-	++
	S2	-	-
	S3	-	-
	S4	+	++
	S5	+	+
	S6	-	-
El Djelfa	D1	-	-
	D2	+	+
	D3	-	-
Annaba	A1	++	+++
	A2	-	+
Guelma	G1	-	-
	G2	-	-

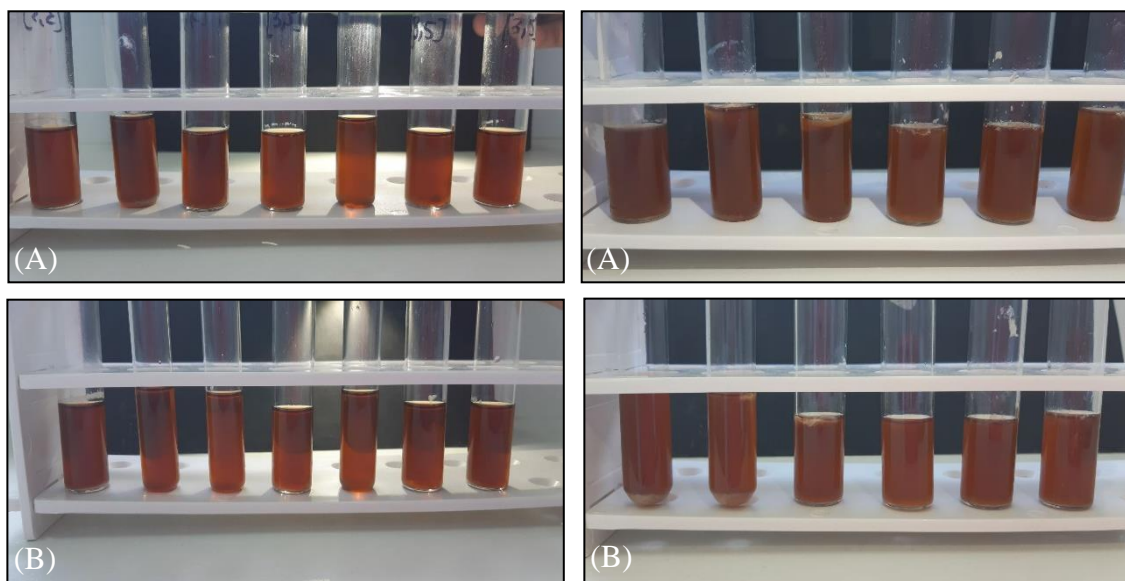


Figure 17 : Résultats du test de croissance en milieu hyper salé NaCl : (A= 3,5%) (B= 6,5%)
(Prise personnelle).

4.4. Identification biochimique :

4.4.1. Test catalase :

Selon ce test, la plupart des souches purifiées montrent une réaction négative à la catalase, car aucun dégagement gazeux n'a été observé après le traitement des colonies avec de l'eau oxygénée (**Tableau 08**) (**Figure 18**).

Tableau 08 : Résultats du test catalase.

Wilaya	Souches testées	Catalase
Skikda	S1	+
	S2	-
	S3	+
	S4	-
	S5	-
	S6	+
El Djelfa	D1	-
	D2	+
	D3	-
Annaba	A1	-
	A2	+
Guelma	G1	+
	G2	+

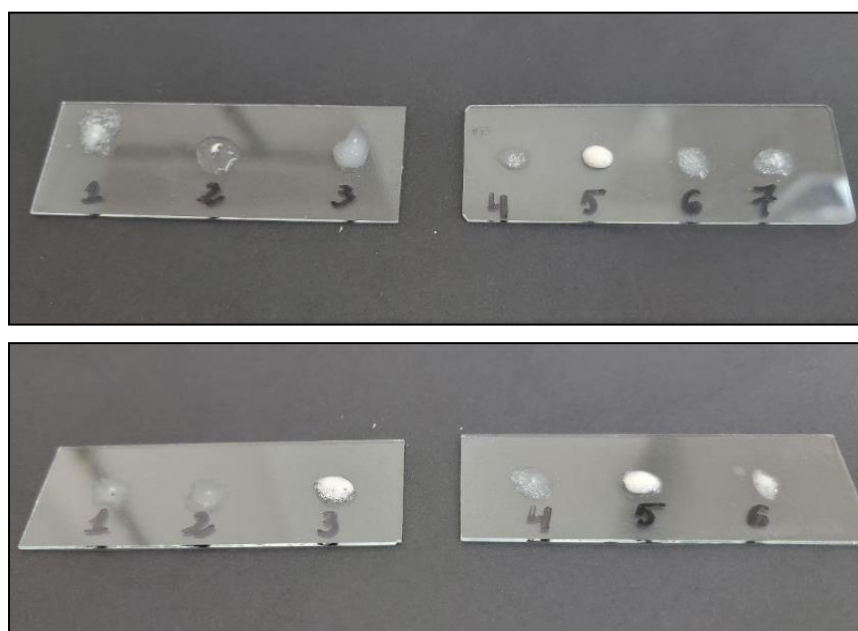


Figure 18 : Résultats du test catalase (Prise personnelle)

4.4.2. Test oxydase :

D'après ce test, toutes les souches purifiées affichent une réaction négative à l'oxydase, car aucun changement de couleur du disque en violet foncé n'a été observé dans les 30 premières secondes (**Tableau 09**) (**Figure 19**).

Tableau 09 : Résultats du test oxydase.

Wilaya	Souches testées	Oxydase
Skikda	S1	+
	S2	-
	S3	-
	S4	+
	S5	+
	S6	-
El Djelfa	D1	-
	D2	+
	D3	-
Annaba	A1	-
	A2	+
Guelma	G1	-
	G2	+

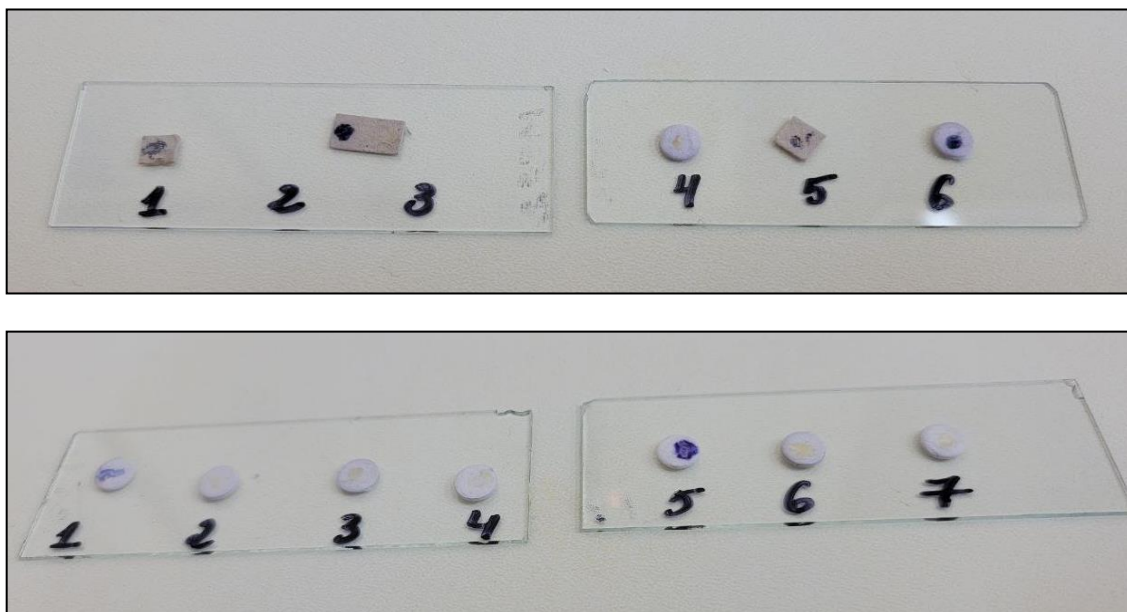


Figure 19 : Résultats du test catalase (Prise personnelle)

4.4.3. Croissance sur le lait bleu de Sherman :

La majorité des souches ont montré une croissance positive sur le lait bleu de Sherman, même aux concentrations de bleu de méthylène de 1 % et 3 %. Ce test a démontré l'aptitude des bactéries à se développer en utilisant l'oxygène du bleu de méthylène, entraînant la décoloration de ce dernier. La formation d'un caillé blanc peut être attribuée à l'augmentation de la charge bactérienne (**Tableau 10**) (**Figures 20**).

Tableau 10 : Résultats du test de croissance sur le lait bleu de Sherman.

Wilaya	Souches testées	Croissance sur le lait bleu de Sherman	
		1%	3%
Skikda	S1	+	+
	S2	+	-
	S3	+	-
	S4	+	+
	S5	+	+
	S6	+	+
El Djelfa	D1	+	+
	D2	+	-
	D3	+	+
Annaba	A1	+	+
	A2	+	+
Guelma	G1	+	+
	G2	+	+

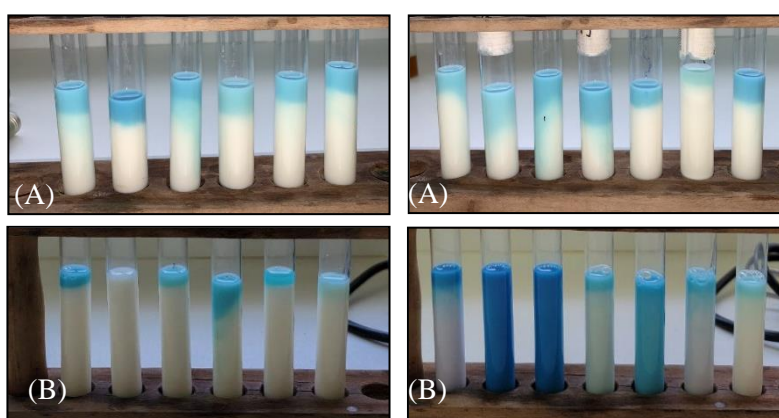


Figure 20 : Résultats du test de croissance sur le lait bleu de Sherman(A) à 1% de bleu de méthylène (B) à 3% (**Prise personnelle**).

4.4.4. Test Mannitol-Mobilité :

Aucune des souches testées n'a révélé de mobilité, tandis que la plupart ont démontré la capacité à fermenter le mannitol (**Tableau 11**) (**Figure 21**).

Tableau 11 : Résultats du test Mannitol mobilité.

Wilaya	Souches testées	Mannitol mobilité	
		Mannitol	Mobilité
Skikda	S1	++	-
	S2	+++	-
	S3	++	-
	S4	+	-
	S5	+++	-
	S6	-	-
El Djelfa	D1	+	-
	D2	+++	-
	D3	+	-
Annaba	A1	+	-
	A2	+	-
Guelma	G1	-	-
	G2	+++	-

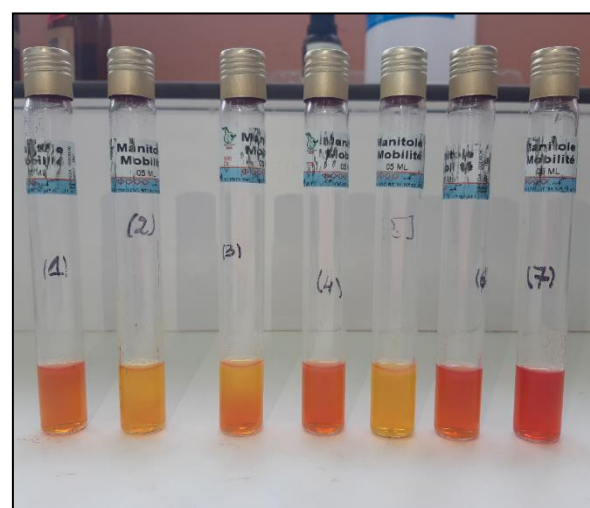


Figure 21 : Résultats du test Mannitol-Mobilité (Prise personnelle).

4.5. Identification technologique :

4.5.1. Pouvoir protéolytique :

Certaines souches testées ont montré une activité protéolytique, se manifestant par la formation d'un halo clair autour des colonies ensemencées, résultant de la dégradation de la caséine. La mesure de diamètre de cette zone claire permet de quantifier l'activité protéolytique de chaque souche (**Tableau 12**) (**Figure 22**).

Tableau 12 : Résultats de l'activité protéolytique des souches testées sur milieu M17 et MRS additionné de lait écrémé à 10%.

Wilaya	Souches	Activité protéolytique	Diamètres en mm
Skikda	S1	-	/
	S2	-	/
	S3	-	/
	S4	++	20
	S5	+	10
	S6	+++	30
El Djelfa	D1	-	/
	D2	-	/
	D3	-	/
Annaba	A1	-	/
	A2	+++	27
Guelma	G1	-	/
	G2	+++	25

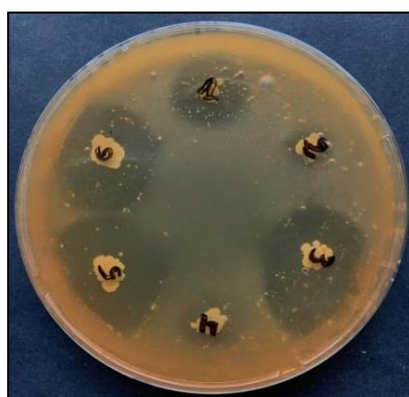


Figure 22 : Zones claires traduisant l'activité protéolytique des souches testées (**Prise personnelle**).

4.5.2. Pouvoir aromatisant :

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 13. D'après les résultats nous remarquons que 06 souches sont capables de produire l'acétoïne ou un anneau rouge clair a apparu dans le milieu Clark et Lubs, Cela indique leurs capacités à produire des substances aromatisantes (l'acétoïne).

Les autres souches sont incapables de produire l'acétoïne ce qui est traduit par l'absence de formation de l'anneau rouge dans le milieu.

Tableau 13 : Résultats du pouvoir aromatisant.

Wilaya	Souches testées	Pouvoir aromatisant	
		Après l'incubation	Après VP1-VP2
Skikda	S1	+++	-
	S2	+	-
	S3	++	+
	S4	+	+
	S5	-	+
	S6	+	-
El Djelfa	D1	+	-
	D2	+++	+
	D3	+	-
Annaba	A1	+	+
	A2	-	+
Guelma	G1	++	-
	G2	++	-

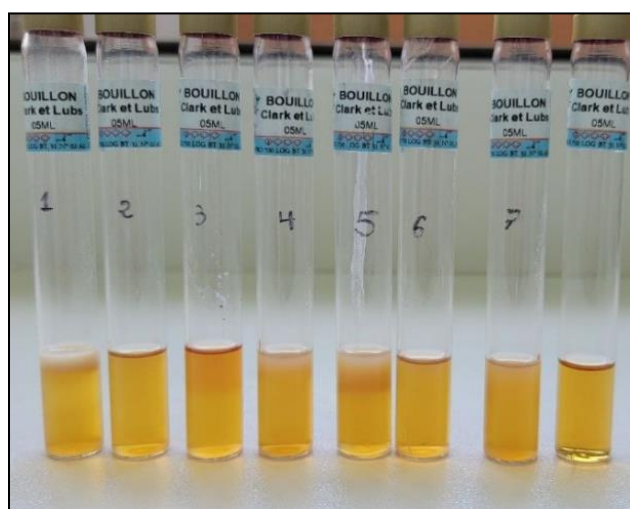


Figure 23 : Résultats du test aromatisant après l'addition de Vp1 et Vp2 (Prise personnelle).

Identification des bactéries isolées :

Le tableau suivant englobe un récapitulatif de tous les tests effectués afin de caractériser l'ensemble des souches isolées dans le but de les identifier.

Tableau 14 : Caractérisation des Bactéries lactiques présentes dans le miel.

Wilaya	Souches testées	Croissance à différentes températures			Thermorésistance	Croissance à différents pH				Croissance à différents NaCl		Test catalase	Test oxydase	Croissance sur lait bleu de sherman		Mannitol mobilité		Pouvoir aromatisant		Pouvoir protéolytique
		4°C	30°C	37°C		4,4	4,9	9	9,6	3,5%	6,5%			0,10%	0,30%	Mannitol	Mobilité	Après l'incubation	Après VP1-VP2	
Skikda	S1	-	+	+	++	-	-	+	++	+	+	-	-	+	-	+++	-	+	-	-
	S2	-	+	+	++	-	-	+	++	+	+	+	-	+	-	++	-	++	+	-
	S3	-	+	+	++	-	-	++	+++	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+++
El Djelfa	D1	-	+	++	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
	D2	-	+++	++	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
Annaba	A1	-	+++	+	+	++	+++	++	++	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
Guelma	G1	-	-	++	++	-	-	+	++	+	+	+	-	+	+	-	-	++	-	-

4.5.3. Résultats de l'activité antibactérienne :

L'évaluation du pouvoir antibactérien des isolats lactiques a été étudié vis-à-vis de deux souches cliniques, à savoir *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. L'inhibition se traduit par la formation de zones claires autour des souches ensemencées par spot. Les diamètres des zones d'inhibitions (Zi) sont représentés dans le tableau 14 et la figure 24.

Tableau 14 : Les diamètres des zones d'inhibition des souches lactiques vis-à-vis des souches pathogènes.

Souches lactiques Souches cibles	Souches cibles						
	S2	S3	D1	S6	D3	A1	G1
<i>E. coli</i>	/	/	/	20mm	/	/	/
<i>S. aureus</i>	/	/	/	20mm	/	/	/

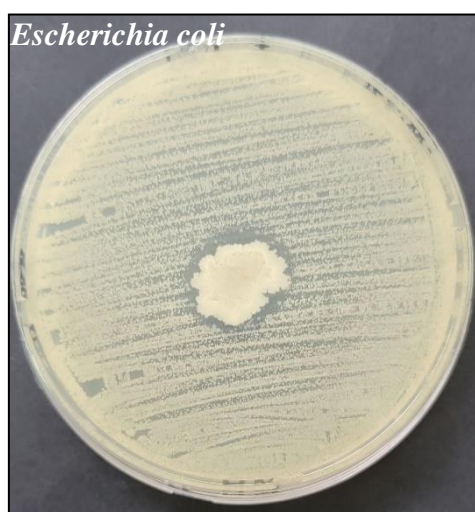


Figure 24 : la zone d'inhibition d'*E.coli* et *S.aureus* par la souche S6 (Prise personnelle).

Le miel est un édulcorant visqueux naturel fabriqué par plusieurs abeilles. Il est produit par l'abeille *Apis mellifera*, la plus étudiée mondialement. Généralement, il contient 80 à 85 % de glucides, 15 à 17 % d'eau, 0,3 % de protéines, 0,2 % de cendres et des quantités mineures d'acides aminés, phénols, pigments et vitamines (Khan et al., 2018).

En raison de sa richesse en nutriments, il comporte également certains micro-organismes, tel que les bactéries lactiques qui consomment une partie du sucre et le transforment en acide lactique par fermentation anaérobie (Souza et al., 2021). Grâce aux composés nutritionnels du miel, la croissance des bactéries est autorisée sans altérer le miel. Ces bactéries modulent les propriétés du miel par fermentation. Ainsi, une interaction entre l'aliment et le micro-organisme vivant est générée (Mărgăoan et al., 2020). Certains micro-organismes contribuent à la conservation du miel et à la digestion des nutriments (Belina-Aldemita et al., 2020 ; Souza et al., 2021).

Dans le cadre de cette étude, nous avons analysé différentes souches de bactéries lactiques isolées à partir du miel de quatre wilayas : Skikda, El Djelfa, Annaba, et Guelma et on a pu isoler 07 souches de bactéries lactiques qui sont S2, S3, S6, D1, D3, A1, G1.

Notre analyse de caractérisation et d'identification phénotypiques, physiologiques, biochimiques et technologiques a été centrée sur les sept souches mentionnées précédemment. Les tests catalase et oxydase sont négatifs pour toutes les souches, confirmant leur identification en tant que des bactéries lactiques. La croissance sur lait bleu de Sherman, ainsi que les tests de Mannitol et Mobilité, montrent une variabilité entre les souches ; La plupart des souches montrent une croissance sur le lait bleu de Sherman et une utilisation du mannitol, mais sont immobiles.

Les résultats de l'identification phénotypique, biochimique et technologique de la souche S6 (bacille) appartenant probablement au genre *Lactobacillus* est similaire à ceux rapportés par (E. Hajj Semaan et al., 2010 ; Guiraud, 2013 ; et par Mechai 2009).

Selon les résultats des caractéristiques obtenus la souche S02, S03, appartenant probablement au genre *Streptococcus*, Nos résultats se rapprochent de ceux cités par plusieurs études menées rapportés par (Badis et al., 2005 ; Bekhouche, 2005).

Les souche D1, D3 et A2 possèdent des caractéristiques correspondent au genre *Enterococcus* Selon des études faites par (**Foulque Moreno et al.,2006**), et la souche G1 est probablement appartenant au genre *Pediococcus* selon des études faites par (**Papagianni, M, 2011**).

Par ailleurs, les résultats fournis par l'étude ont montré que ces souches lactiques ont aussi prouvé une résistance notable face à des environnements hostiles, notamment lors de la culture en milieu hypersalé, ainsi qu'à des niveaux de pH variés.

Les tests d'activité antibactérienne des souches lactiques isolées ont révélé qu'une des souches possèdent un pouvoir inhibiteur significatif contre des pathogènes tels que *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. La souche S6 a démontré une activité antibactérienne vis-à-vis des deux bactéries pathogènes.

Cette activité antibactérienne des souches lactiques est probablement due à la production de plusieurs agents antibactériens. L'acide lactique par son pouvoir acidifiant du milieu inhibe plusieurs types de bactéries. A cela s'ajoute aussi l'effet du diacétyle connu également par son pouvoir inhibiteur. L'H₂O₂ libéré par les souches lactiques inhibe les bactéries qui ne possèdent pas des défenses contre le stress oxydatif. Plusieurs études ont montré l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes suite à la libération de substances de nature protéique, les bactériocines (**Labioui et al., 2005 ; Mami et al., 2010 Tabak et Bensoltane, 2012**).

Il est noté que divers facteurs, tels que les conditions climatiques et la situation géographique, peuvent influencer la composition du miel et la diversité microbienne. L'identification et l'isolement d'espèces probiotiques potentielles dans le miel pourraient considérablement étendre leur utilisation dans les industries alimentaire et pharmaceutique, offrant de nombreux avantages pour la santé et des applications thérapeutiques potentielles.

Les résultats obtenus sont à considérer comme des résultats préliminaires nécessitant validation à travers des analyses biochimiques supplémentaires, notamment la fermentation des sucres, la caractérisation des voies de fermentation, ainsi que l'utilisation de la galerie biochimique API 50.

CONCLUSION

Le miel est l'un des produits naturels les plus appréciés et les plus valorisés par l'humanité depuis l'Antiquité. Le miel est utilisé non seulement comme produit nutritionnel, mais aussi pour la santé. Décrit dans la médecine traditionnelle et largement utilisé comme traitement alternatif pour des conditions cliniques allant de la cicatrisation des plaies au traitement du cancer. Ces propriétés thérapeutiques ont été attribuées à sa composition et surtout sa richesse en bactéries lactiques qui sont des bactéries autochtones du miel.

Cette constatation ouvre des perspectives prometteuses pour l'exploitation de ces ressources naturelles grâce à la recherche visant à découvrir les propriétés biotechnologiques des souches lactiques connues pour avoir plusieurs applications dans différents domaines, et ce, grâce aux composés naturels qu'elles produisent.

Fondée sur ces prémisses, l'objectif principal de cette étude consiste à isoler et identifier les bactéries lactiques présentes dans le miel collecté à partir de quatre wilayas distinctes ainsi qu'à évaluer leur activité antagoniste vis-à-vis de certaines bactéries pathogènes et ces résultats doivent être suivis d'une identification biochimique ou bien moléculaire pour mieux préciser.

L'isolement des souches lactiques a été fait en utilisant les milieux MRS et M17. Ceci nous a permis d'obtenir sept isolats distincts appartenant aux genres *Enterococcus* (D1, D3, A1), *Streptococcus* (S2, S3), *Pediococcus* (G1) et *Lactobacillus* (S6) cette dernière a la capacité d'inhiber la croissance des pathogènes c'est ce qui mène à une activité antibactérienne. Ces souches ont montré des caractéristiques phénotypiques, physiologiques, biochimiques et technologiques variées, reflétant leur adaptation aux conditions spécifiques des différents types de miel.

Le test d'activité antibactérienne des souches lactiques isolées a révélé que certaines souches possèdent un pouvoir inhibiteur significatif contre des pathogènes tels que *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Cette propriété antagoniste est cruciale pour envisager l'utilisation de ces souches comme agents de biocontrôle dans les produits alimentaires, contribuant ainsi à la sécurité et à la prolongation de la durée de conservation des aliments.

Les résultats obtenus ont démontré la diversité microbienne de ce produit naturel dans différentes régions géographiques et contribuent à enrichir nos connaissances sur la microbiologie du miel et ouvrent la voie à de nouvelles recherches visant à mieux comprendre

les interactions entre les bactéries lactiques et leur environnement, ainsi qu'à optimiser leur utilisation dans divers domaines d'application.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

A

Aguirre, M. et Collins, M. D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Microbiology*, 75 : 95–107.)

Ahn, J.H., Hong, I.P., Bok, J.I., Kim, B.Y., Song, J., Weon, H.Y. 2012. Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honeybees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *J. Microbiol.* 50 :735–745)

Allouche F.N., Hellal A., Laraba A., (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie*, (3) :13-20.

Anderson, K. E., Ricigliano, P. J., Mott, T. M., Copeland, H. A., Floyd, L. K., & Maes, B. A. (2013). Distinct phage communities in the honeybee gut microbiota modulate microbiome diversity and function. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(13) : 4005-4016.

B

Badis A ., Laouabdia-Sellami N ., Guetarni D ., Kihal M ., Ouzrout R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabia et kabyle". *Sciences & Technologie C* (23) :30-37.

Belina-Aldemita, M. D., Schreiner, M., and D'Amico, S. (2020). Characterization of phenolic compounds and antioxidative potential of pot-pollen produced by stingless bees (*Tetragonula biroi* Friese) from the Philippines. *J. Food Biochem.* 44

Benreguieg M., (2014). Propriétés antibactériennes et probiotiques de bactéries lactiques isolées à partir de lait de vache, de chèvre et de brebis dans la région de l'ouest algérien. Thèse de doctorat, Université de Mostaganem.

Bekhouche F. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase, Thèse : Génie alimentaire, Institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires, Université Mentouri, Constantine, Algérie, p29, 31.

Bekhouche F., 2006 : Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes (1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturona). Thèse de doctorat. Université de Mentouri Constantine. Pp : 149.

Birollo, G.A., J.A. Reinheimer and C.G. Vinderola. (2001). Enterococci vs. nonlactic acid microflora as hygienic indicators in sweetened yogurt. *Food Microbiol.* 18: 597–604.

Brenner, D. J., Krieg, N. R., Garrity, G. M., et Staley, J. T. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria* Springer.

Brøkke, H., A. Flåøyen, and S.O. Johnsen. (2011). Honeybee lactic acid bacteria as a potential source for natural antimicrobial compounds. *Apidologie*, 42(4) : 442-450.

Bogdanov, S., Ruoff, K., Oddo, L.P. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys, (2004).

C

Chollet. M Dominik. G,(2017), Determination of menaquinone production by *Lactococcus* spp. and propionibacteria in cheese.

Cai, Y., J. Yang, H. Pang and M. Kitahara. (2010). *Lactococcus fujiensis* sp nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable. *IJSEM*. In press.

Cheng, P., Chang, P., and Koppenhöfer, H. (2017). Seasonal variation in the gut microbiota of worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(12):4739-4750.

Chollet. M Dominik. G,(2017), Determination of menaquinone production by *Lactococcus* spp. and propionibacteria in cheese.

Corby-Statham, G., Atrée, A., Ng, A., & Campbell, E. (2013). Key role of the honeybee gut microbiome in sugar metabolism and resistance to pathogens. *PLoS One*, 8(11).

Codex Stan 12-1981 : Honey/THAI AGRICULTURAL STANDARD TAS 8003-2013.

D

Delarras C., (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire recherche de bactéries et de levures-Moisissures. Editions Lavoisier. Pp: 65-66-67-111-113-114.

Delcenserie, V., F. Gavini, H. Beerens, O. Tresse, C. Franssen and G. Daube. (2007). Description of a new species, *Bifidobacterium crudilactis* sp. nov., isolated from raw milk and raw milk cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 381–389.

E

E. Hajj Semaan, H. Dib, R. Abi Ramia et M. Chedid (2010). Caractérisation chimique et qualité bactériologique de produits laitiers caprins traditionnels libanais, *Lebanese science journal*, Libon, Vol.11, No.1.

Ekstedt, R.D. and G.H. Stollerman. (1960). Factors affecting the chain length of group A streptococci. II. Quantitative M-anti-M relationships in the long chain test. *J. Exp. Med.* 112: 687–698.

Elliot, J.A., M.D. Collins, N.E. Pigott and R.R. Facklam. (1991). Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2731–2734.

F

Fanny Balas. Les propriétés thérapeutiques du miel et leurs domaines d'application en médecine générale : revue de la littérature. *Médecine humaine et pathologie.* (2015). dumas-01293955

Fessard A, Bourdon E, Payet B, Remize F. Identification, stress tolerance, and antioxidant activity of lactic acid bacteria isolated from tropically grown fruits and leaves. *Can J Microbiol.* (2016);62(7) : 550-561.

Foulquie Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1173-1181.

Franciosi E., Settanni L., Cavazza A., Poznanski E., (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal.* 19 (1): 3–11.

G

Références Bibliographiques

Garvie, E.I.(1986). Genus *Leuconostoc* van Tieghem 1878, 198AL emended Mut. Char. Hucker and Pederson 1930, 66AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 2, Eds. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, pp. 1071–1075. Williams & Wilkins, Baltimore.

Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R., (1994). Method for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology. Pp: 518.

Gilliam, M., Morton, H.L. (1978). Bacteria belonging to the genus *Bacillus* isolated from honeybees, *Apis mellifera*, fed 2,4-d and antibiotics (1) *Apidologie*. 9 : 213–222.

Gilliland S.E.(1985). Role of starter culture bacteria in food preservation. *Bacteria starter cultures for food*. Gilliland S. E. Boca Raton, USA, CRC Press Inc: 175 185

Gleiter, R.A., Horn, A., & Kühn, W. (2006). Influence du type et de l'état de cristallisation sur l'activité aqueuse du miel. *Food Chemistry*, 96: 441-445.

Guessas B., Hadadji M., Saidi N. and Kihal M., (2006).Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *Dirasat, Agricultural Sci.* 32: (3): 304-312

Guillaume, É., Le Maréchal, P. And Baratti-Elbaz, C. (2018). Fiche 21. Fermentations. Dans : , *Biochimie* (pp. 152-161). Paris: Dunod.

Guiraud JP. (2012). *Microbiologie Alimentaire*, édition DUNOD, Paris, France, p 92-139-140-141.

Guiraud J.P., Rosec J.P., (2004). *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. Afnor. Saint-Denis la plaine, Paris, Pp : 300.

Guiraud J.P., (2003). *Microbiologie alimentaire*. Tec &Doc, Dunod. Paris. Pp : 90-292.

H

Heleni S., Lefki P., Nikolaos T et Evanthia L.T.2006. Population, types and biochemical activities of aerobic bacteria and lactic acid bacteria from the air of cheese factories. *Int.J.Dairy technol.* 59: (3200): 208.

Holzappel, W.H., C. Guigas and C.H.M.A.P. Franz. (2002). General overview of the enterococci. In Programme and Book of Abstracts from Conference Enterococci in Foods, 30–31 May, Berlin, Germany, p. 1.

Homrani M. (2020). Caractérisation physico-chimique, spectre pollinique et propriétés biologiques de miels algériens crus de différentes origines florales. Thèse de doctorat. Univ abdelhamid ben badis Mostaganem. Pp : 253.

J

Jean-Prost P, Medori P, Le Conte Y. Apiculture: connaître l'abeille - conduire le rucher. Paris: Editions Tec & Doc; (2005).

Jouve F., (1997). Le grand livre du miel des abeilles. ED : Solar; Paris. Pp : 87-112

Johansson, P., L. Paulin, E. Vihavainen, N. Salovuori, A. Edward, K. J. Björkroth and P. Auvinen. (2011). Genome sequence of a food spoilage lactic acid bacterium *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811T in association with specific spoilage reactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 4344–4351

K

Khan, S. U., Anjum, S. I., Rahman, K., Ansari, M. J., Khan, W. U., Kamal, S. (2018). Honey: Single food stuff comprises many drugs. *Saudi J. Biol. Sci.* 25, 320.

Kleerebezem, M., J. Boekhorst, R. van Kranenburg, D. Molenaar, O.P. Kuipers, R. Leer, R. Tarchini, S.A. Peters, H.M. Sandbrink, M. Fiers, W. Stiekema, R.M.K. Lankhorst, P.A. Bron, S.M. Hoffer, M.N.N. Groot, R. Kerkhoven, M. de Vries, B. Ursing, W.M. de Vos and R.J. Siezen. (2009). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (4): 1990–1995.

L

Labioui H., Laaroussi E.M., El yachioui M., Ouhsine M. (2005). Sélection de souche des bactéries lactiques antibactérienne, Bull. Soc Pharm, Bordeaux, France. N°144 237-250.

Larpent J-P., (1996). Les bactéries lactiques In Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires. Microbiologie alimentaire: tome 2 -Aliments fermentés et fermentations alimentaires Volume 2 de Microbiologie alimentaire. Pp : 215-301

Lauková, A., M. Mareková and P. Javorský. (1993). Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by Enterococcus faecium CCM 4231. Lett. Appl. Microbiol. 16: 257–260.

Leonard L., (2013). Evaluation du Potentiel Bioprotecteur des Bactéries Lactiques Confinées dans une Matrice Polymérique. Thèse de Doctorat. Discipline : Sciences de l'Alimentation : Université de Bourgogne. 8-18.

Leroi, F. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. Food microbiology, 27, 698–709.

Luis G. Bermúdez-Humarán et Philippe Langella,(2009) Utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs vaccinaux.

M

Mami A., Kihal M., Hamedi A.R., Henni J.E., Kerfouf A. (2010). Antibacterial activity of Lactobacillus plantarum isolated from algerian raw goat's milk against Staphylococcus aureus, les technologies de laboratoire, 2010, volume 5, N° 21.

Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 1(2) : 154-160.

Marchal N., Bourdon [J.L et](#) Richard C.L., (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed., Doin éditeurs, Paris. Pp : 222-293

Mechai A. (2009). Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et biochimiques, Thèse : Faculté des sciences, Université Badji-Mokhtar- Annaba, Algérie, p 05, 12, 13, 92-95.

Monnet C., Latrille E., Béal C., Corrieu G., (2008). Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In Corrieu G. et Luquet F.M. Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Tec & Doc, ED : Lavoisier, Paris. Pp : 511-593.

Mărgăoan, R., Cornea-Cipcigan, M., Topal, E., and Kösoglu, M. (2020). Impact of fermentation processes on the bioactive profile and health-promoting properties of bee bread, mead and honey vinegar. Processes. 8, 9.

N

Ngunjiri, J., & Gichure, J. (2016). Lactic acid bacteria in honey and their effect on honey preservation. "African Journal of Microbiology Research", 10(5) : 151-158.)

O

Orla-Jensen. La classification des bactéries lactiques. Le Lait, (1924), 4 (36), pp.468-474.

P

Pajor, M., Worobo, R.W., Milewski, S., Szweda, P. (2018). The Antimicrobial Potential of Bacteria Isolated from Honey Samples Produced in the Apiaries Located in Pomeranian Voivodeship in Northern Poland. International journal of environmental research and public health.15(9).

Papagianni, M., Papamichael, E.M. (2011). Current Opinion in Biotechnology, 22(2), 174-183.

S

Sampo Lahtinen, Arthur C. Ouwehand, Seppo Salminen, Atte von Wright ,(2012), Lactic Acid Bacteria : microbiological and functional aspects International Standard Book Number-13 978-1-4398-3678-1.

Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E., Salminen S .,Gorbach S ., Lee Y.K ., Benno Y., (2004). Human studies on probiotics: what is scientifically proven today.In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York.Pp : 515-530.

Simonová et Lauková(2007). Bacteriocin activity of enterococci from rabbits. Vet. Res.

Commun. 31: 143–152.

Souza, E. C. A., Menezes, C., and Flach, A. (2021). Stingless bee honey (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a review of quality control, chemical profile, and biological potential.

Apidologie. 52: 113–132.

Suba, S., Vijayakumar, S.V., Vasantharaj, S., Rajeshkumar, M., Munusamy, S., & Solomon, A.A. (2022). Lactococcus spp. mediated MgO nanoparticles: Assessment of antimicrobial and anticancer activities against intestinal disorder.

Strompfová, V., D. Mudroňová and A. Lauková. (2003). Effect of bacteriocin-like substance produced by Enterococcus faecium EF55 on the composition of avian gastrointestinal microflora. Acta Vet. Brno 72: 559–564.

T

Tabak S ., Bensoltane A. (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, Nature & Technologie 6 :71-79. 123.

Trias, R. (2008). Lactic acid bacteria as bioprotective agents against foodborne pathogens and spoilage microorganisms in fresh fruits and vegetables. PhD thesis, University of Girona.

V

Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., et Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 82: 187–216.

W

Web 01: Miel suisse Bettens

Web 02: L'APICULTURE EN ALGERIE - Agronomie