

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DEL'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
20 أوت 1955 - سكيكدة
جامعة 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 biologiques
Option: Microbiologie Appliquée
Intitulé :

Activité antifongique des bactéries lactiques

Présenter par:

Amar Rouana Hind

Amar Rouana Keltoum

Derbikh Rayane

Dib Ouarda

Membre de jury:

Dr. Chekroud.Z

Président

Université 20 Aout 1955 Skikda

Dr. Maachia.L

Directeur de mémoire

Université 20 Aout 1955 Skikda

Dr. Aggoun .A

Examineur

Université 20 Aout 1955 Skikda

Année universitaire 2021/2022

Remerciement

Nous tenons d'abord à remercier ALLAH le tout puissant qui nous a donné la force, le courage et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En second lieu, nos vifs remerciements vont aux membres du jury Dr CHEKROUD Z et AGGOUN A d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous tenons à remercier notre encadreur Dr MAACHIA, pour l'orientation, la confiance, et la patience, son aide et ses conseils ont été précieux durant la période du travail.

Nos sincères remerciements vont également à tous les professeurs qui nous ont enseigné.

Nous ne saurions oublier les ingénieurs de laboratoire 217 de notre département nos sincères remerciements pour leurs encouragements pendant l'élaboration de notre travail.

Dédicace ;

Tout d'abord, je tiens à remercier dieu pour m'avoir guidée pour atteindre ce stade .

J'offre ce travail .

A mes chers parents , ma mère et mon père pour leur patience, leur sacrifices, leur soutiens et leurs encouragements je ne pourrais jamais oublier le don, la tendresse et l'amour dévoué par lesquels ils m'ont toujours entouré depuis mon enfance et la confiance qu'ils m'ont accordé .

A mon soutien morale et source de joie et de bonheur mon frère Abderahman pour l'encouragement et l'aide qu'il m'a toujours accordé que dieu le protège .

A ma chère sœur Yasmine pour l'amour qu'elle me réserve je lui souhaite une vie pleine du bonheur et de succès .

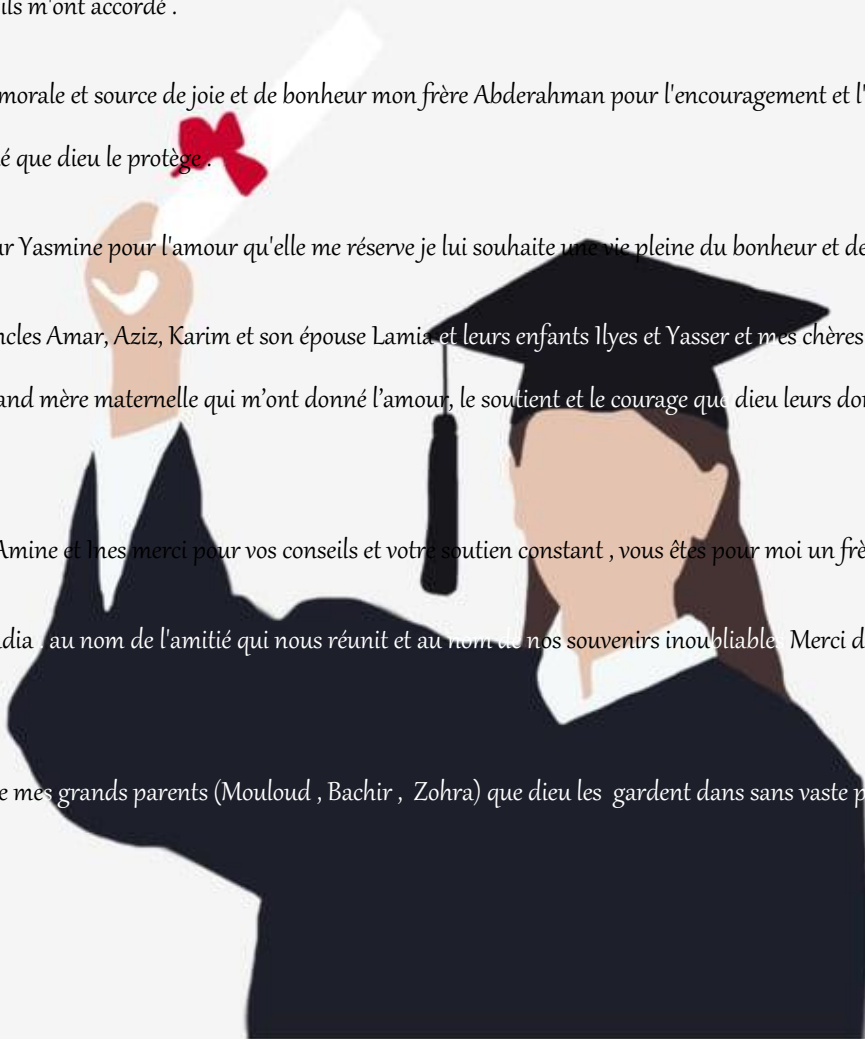
A mes chères oncles Amar, Aziz, Karim et son épouse Lamia et leurs enfants Ilyes et Yasser et mes chères tantes Djamila, Samia et ma grand mère maternelle qui m'ont donné l'amour, le soutien et le courage que dieu leurs donnent une longue et joyeuse vie.

A mes cousins Amine et Ines merci pour vos conseils et votre soutien constant , vous êtes pour moi un frère et une sœur .

A mon amie Hadia au nom de l'amitié qui nous réunit et au nom de nos souvenirs inoubliable . Merci d'être avec moi à tout moment.

A la mémoire de mes grands parents (Mouloud , Bachir , Zohra) que dieu les gardent dans sans vaste paradis .

Hind



Dédicace :

A mon très cher père Amar :

Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es, grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

A ma très chère mère Djamila :

Aucune dédicace très chère maman, ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous, vos sacrifices innombrables et votre dévouement firent pour moi un encouragement. Vous avez guetté mes pas, et m'avez couvé de tendresse, ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Vous m'avez aidé et soutenu pendant de nombreuses années avec à chaque fois une attention renouvelée. Puisse Dieu, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

A mon cher frère Mind : Ces quelques lignes, ne sauraient traduire le profond amour que je te porte. Ta bonté, ton précieux soutien, ton encouragement tout au long de mes années d'étude, ton amour et ton affection, ont été pour moi l'exemple de persévérance. Je trouve en toi le conseil du frère et le soutien de l'ami. Que ce travail soit l'expression de mon estime pour toi et que Dieu te protège, t'accorde santé, succès et plein de bonheur dans ta vie.

A mes chères oncles Ryad, Aziz, Karim et son épouse Lamia et leurs enfants Ilyes et Yasser et mes chères tantes Zina, Samia et ma grand mère maternelle qui m'ont donné l'amour, le soutien et le courage que dieu leurs donnent une longue et joyeuse vie.

A mes chères cousines Hind et Yasmine je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A mon cousin Abderahman je souhaite un avenir radieux plein de réussite.

A la mémoire de mes grands parents (Mouloud , Bachir , Zohra) que dieu les gardent dans sans vaste paradis.

Keltoum



Dédicace

Louange à Dieu, le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force, l'intelligence et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Je dédie ce travail :

A l'âme de mon père qui à toujours été là pour le meilleure et pour le pire. Grace à son encouragement, à son aide et à son amour je suis là .Merci PAPA ta place resteras toujours dans mon cœur.

A ma très chère mère : Tu es le symbole de la bonté par excellence. Que ce travail soit un hommage aux énormes sacrifices que tu t'es imposées afin d'assurer mon bien être, et que Dieu tout puissant, préserve ton sourire et t'assure une bonne santé et une longue vie afin que je puisse te combler à mon amour.

A mes deux bras, très chers frères : Abd Elamed, Abd Elmalek

A mon ange petite sœur : Maria

A mon trésor et mon aide jusqu'au dernier moment, cher mari : Khaled

A toute la famille : Derbikh, Bendjama, Bouleghlem

A mes deux chères amies : Ouarda , Hadjar merci d'être toujours ici pour m'aider à suivre le bon chemin, je n'oublierais jamais vos prières pour moi, et tout l'amour que vous m'as donnée, nos souvenirs en semblent seront gravés à jamais dans ma tête, je te souhaite énormément de réussite.

Merci à tous de m'avoir supporté et soutenu tout au long de ma rédaction de ce projet.

Rayane



DEDICACE

Tout d'abord, louange à « Allah » qui m'a Guidée sur le Droit Chemin tout au long de ma vie et m'a Permis de réaliser ce travail et m'a inspirée les bons pas et les justes reflexes. Sans sa Miséricorde, ce travail n' aura pas abouti

Je dédie le fruit de mes 18 bougies d'études :

A Ceux qui méritent le plus ma reconnaissance, ma gratitude et mon grand amour, ceux qui m'ont apporté toujours soutien et bonheur dans la vie , mon rayon de soleil et ma lune , le secret de ma force et mes indus après dieu :

Ma mère et Mon père

A mes très chères sœurs : Taldja , son mari ilyas et son fils Yazan Ammar, Remaissa , Khaoula et Rihem qui je les aime énormément et que je les souhaite tout le bonheur et pour ses chaleureux encouragements.

A ma très chère amie **Rayane** que nous avons passé des bons moments inoubliables durant les 5 ans de notre étude universitaire.

A ma chère amie , la plus proche **Baraa** pour sa aide ou tout simplement s' amitié.

A mes chères amies et tous qui me sont chers , proches de mon cœur ,tous ceux qui m'aiment et qui aurait voulu partager ma joie.

Ouarda D

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumés	
Introduction	1

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

1. Les bactéries lactiques	2
1.1 Généralités	2
1.2. Classification des bactéries lactiques	2
1.3. La bio préservation_	2
2. Activité antifongique des bactéries lactiques	3
2.1. Les principales bactéries lactiques à caractère antifongique	4
3. Altération fongique	4
3. 1. Altération des produits alimentaires	4
3.2. Genre fongiques incriminés	4
3.2.1. <i>Alternaria</i>	4
3.2.2. <i>Rhizopus stolonifer</i>	4
3.2.3. <i>Aspergillus</i>	5
3.2.4. <i>Penicillium</i>	5

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1. Description de site d'accueil	6
2. Matériel	6
3. Méthodes	12
3.1. Préparation du milieu PDA	12
3.2. Ensemencement des champignons par strie dans le milieu PDA	12
3.3. Incubation	13
3.4. Ensemencement des bactéries lactique	13
3.4.1. Les étapes pour réaliser l'ensemencement en masse	13
3.4.2. Isolement des bactéries lactiques	14
3.4.2.1. Test catalase	14
3.4.2.2. Coloration de Gram	15
3.4.3. Repiquage des boites	15

3.5. Préparation du bouillon nutritif	16
3.5.1. Ensemencement dans un bouillon de culture	16
3.6. Préparation des milieux de fermentation	16
3.7. Identification des champignons	17
3.7.1. Observation macroscopique	17
3.7.2. Etat frais.....	17
3.7.3. Repiquage des champignons	17
3.8. Activité antifongique	18
3.8.1. La confrontation par contacte directe	18
3.8.1.1. La méthode de double couche	18
3.8.1.2. Confrontation par la méthode des disques	18
3.8.1.3. Confrontation par la méthode des puits	19
3.8.2. Confrontation indirecte	19
3.9. Tests de biosurfactant	19
3.9.1. Test d'émulsification (E24)	19
3.9.2. Test de déplacement d'huile	20
3.9.3. Test de parafilm M	20
3.10. Revivification des bactéries lactiques identifiées.....	20

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Résultats	22
1.1. Résultat de l'observation macroscopique et microscopique des bactéries lactiques non identifiées	22
1.2. Résultat des tests catalase et coloration de Gram	29
1.3. Résultat des boîtes repiqués	29
1.4. Résultat des tests catalase et coloration de gram	30
1.5. Résultat des précultures	30
1.6. Résultat de l'observation macroscopique et microscopique des champignons	31
1.7. Résultat de la confrontation	39
1.8. Résultat des tests de biosurfactant	41
1.8.1. Résultat de test E24	42
1.8.2. Test d'effondrement	42
1.8.2.1. MRS L	42
1.8.2.2.1	43

1.8.3. Test de déplacement	43
1.8.3.1. Mrs L	43
1.8.3.2. L	43
1.9. Revivification des bactéries lactiques	44
1.9.1. Observation macroscopique	44
1.9.2. Observation microscopique	44
1.10. Écouvillons	45
1.10.1. Confrontation directe (Bouillon nutritif-champignon)	46
1.10.2. Confrontation directe (surnageant- champignons)	47
1.10.3. Milieu de fermentation	48
1.10.4. Résultats de test E 24 après 10 min	48
1.10.5. Test E 24 après 24h	49
1.10.6. Déplacement et effondrement	49
2.Discussion	51
Conclusion	54
Références bibliographiques	55
Annexes	

Liste des abréviations :

OMS : Organisations mondiale de la santé

BL : Bactérie lactique

DLC : Date limite de consommation

A. *Alternata*: *Alternaria. Alternata*

GRAS: Generally Recognized as Safe

QPS: Qualified Presumption of Safety

R. *Stolinifier*: *Rhizopus. Stolinifier*

PDA: potato dextrose agar

MRS: Man, Rogosa et Sharpe

M17: Gélose M17

DG 18: Dichloran - Glycérol

BCP: Pomme de terre- carotte- bile

E24 : index d'émulsification 24

CF : Crème fraîche

BJ : Beurre jaune

GN : Gélose nutritive

CH 50: Hydrate de carbone 50

L : Lait de vache

I : lait thika

B : Beurre

r : Raib

Y : Yaourt

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Préparation du milieu PDA.	12
2	Boitesensemencées par les champignons d'altération	13
3	Milieux de fermentation pour les bactéries identifier	17
4	Lame préparée par méthode de Roth	17
5	Confrontation par la méthode des disques	18
6	Galeries biochimiques (50 CH).	21
7	Ecouvillon des bactéries lactiques identifier	21
8	Observation macroscopique des bactéries lactiques sélectionnées et repiquées	30
9	Résultats des bactéries lactiques sélectionnées non identifiéesensemencées dans le bouillon nutritif.	31
10	Activité antifongique par confrontation direct.	39
11	Résultat de l'activité antifongique par puits.	40
12	Activité antifongique par confrontation indirecte.	41
13	Milieux de fermentation « MRS L, l » après 3 jours	41
14	Observation de test E24 après 10 min	42
15	Observation de test E24 après 24 h	42
16	Test d'effondrement du MRS L	42
17	Test d'effondrement du l	43
18	Test de déplacement du MRS Lait	43
19	Test déplacement du l	43
20	Observation macroscopique des bactéries lactique après 72 h	44
21	Observation microscopique des bactéries lactiques	44
22	Observation macroscopique des écouvillons des bactéries lactiques identifier .	45
23	Résultats de la confrontation directe par méthodes des disques cylindre des champignons (bouillon nutritif-champignon)	46
24	Résultats de la confrontation directe par méthode des disques (surnageant-champignon)	47
25	Lecture après 72 heures milieux de fermentation	48

26	Résultats de test E24 après 10 min	48
27	Résultats de test E24 après 24 H	49

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Matériel expérimental	6
2	Matériel biologique	10
3	Les conditions d'ensemencements des bactéries lactiques	14
4	Résultat de l'observation macroscopique et microscopique des bactéries isolées	23
5	Résultat de l'observation macroscopique et microscopique des bactéries lactique.	26
6	Résultat des tests catalase et coloration de Gram.	29
7	Résultat de coloration de gram et du test catalase d'une nouvelle série de bactéries lactiques non identifiées.	30
8	Résultat d'observation macroscopiques et microscopique des champignons .	31
9	Identification macroscopique et microscopique des champignons du pain et fraise sur le milieu PDA.	36
10	Identification et observation macroscopique et microscopique des champignons du pain sur le milieu DG 18.	37
11	Identification macroscopique et microscopique des champignons du pain et fraise sur le milieu BCP.	38
12	Résultat de la confrontation directe (milieu d'enrichissement-champignon).	45
13	Résultat de la confrontation directe (surnageant-champignon).	46
14	Indice d'émulsion E24 pour les souches testées après 10 minutes.	47
15	Résultat d'observation microscopique et test catalase.	48
16	Résultat de test E24 après 24 H.	49
17	Résultat des tests de déplacement et d'effondrement.	49

Résumés

Les champignons sont responsables de l'altération des produits alimentaires, ils présentent un véritable danger pour la santé humaine en raison de leur capacité à produire de nombreuses substances toxiques comme les mycotoxines. Pour cela, on a testé l'activité antifongique de quelques bactéries lactiques par plusieurs méthodes de confrontation (par disques réalisées dans les boîtes de pétri contenant les milieux gélosés nutritive extrait de malt, potato dextrose agar). Au total, six bactéries lactiques ont été testé , et les résultats obtenus ont montré que les espèces *Leuconostoc. mes.ssp. Mesenteroides /dextranicum* , *Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus pentosus* et *Lactobacillus salvarius* ainsi que les deux non identifiées sont actives contre la croissance des genres fongiques *Alternaria*, *Aspergillus* et *Rhizopus*. Cette forte inhibition peut être liée à la production de métabolites secondaires comme les biosurfactants mis en évidence.

Mots clés : Activité antifongique, bactéries lactiques, biosurfactants, confrontation.

Abstract:

Fungi are responsible for the spoilage of food products; they present a real danger to human health due to their ability to produce many toxic substances such as mycotoxins. For this, we tested the antifungal activity of some lactic acid bacteria by several confrontation methods (by disks made in petri dishes containing nutrient agar media malt extract, potato dextrose agar). A total of six lactic acid bacteria were tested, and the results obtained showed that *Leuconostoc species. my.ssp. Mesenteroides /dextranicum*, *Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus salvarius* as well as the two unidentified ones are active against the growth of the fungal genera *Alternaria*, *Aspergillus* and *Rhizopus*. This strong inhibition may be linked to the production of secondary metabolites such as the biosurfactants highlighted.

Keywords: Antifungal activity, lactic acid bacteria, biosurfactants, confrontation.

تلخيص

الفطريات هي المسؤولة عن تلف المنتجات الغذائية، فهي تشكل خطراً حقيقياً على صحة الإنسان بسبب قدرتها على إنتاج العديد من المواد السامة مثل السموم الفطرية. لهذا، قمنا باختبار النشاط المضاد للفطريات لبعض بكتيريا حمض اللاكتيك بعدة طرق مواجهة (بواسطة أقراص مصنوعة في أطباق بتري تحتوي على خلاصة الشعير أجار وسط المغذيات، أجار دكستروز البطاطس). تم اختبار ما مجموعه ستة بكتيريا حمض اللاكتيك، وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن نوع *Lactobacillus Lactobacillus plantarum dextranicum / my.ssp. Mesenteroides .Leuconostoc pentosus* و *salvarius Lactobacillus* بالإضافة إلى النوعين المجهولين تنشط ضد نمو الأجناس الفطرية *Alternaria* و *Rhizopus*. قد يكون هذا التنشيط القوي مرتبطاً بإنتاج مستقبلات ثانوية مثل المواد الحيوية الخافضة للتوتر.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للفطريات، بكتيريا حمض اللاكتيك، العوامل الحيوية، المواجهة.

Introduction

Introduction

Les champignons sont responsables de l'altération des produits alimentaires et ils présentent un véritable danger pour la santé humaine en raison de leur capacité à produire de nombreuses substances toxiques le cas des mycotoxines qui ont été reconnues comme l'un des polluants les plus dangereux dans l'alimentation, d'après l'organisation mondiale de la santé ils peuvent avoir des effets nocifs divers pour la santé et représenter une grave menace pour les êtres humains, ils peuvent avoir aussi des effets nocifs immédiats, comme l'intoxication aiguë, ou sur le long terme, comme la déficience immunitaire ou le cancer (**Peraica et al.,1999**).

Un grand nombre de conservateurs chimiques qui ciblent la croissance des champignons dans les aliments ont été approuvés et utilisés depuis de nombreuses années, les consommateurs cherchent et exigent des produits sans conservateurs chimiques et qui maintiennent une bonne durée de vie (**Muhialdin et al., 2011**).

Les conservateurs chimiques peuvent être dangereux pour la santé humaine lorsqu'ils sont consommés à des doses élevées qui peuvent augmenter automatiquement vu leurs présences dans divers aliments à consommation quotidienne.

Actuellement, il existe un intérêt majeur pour l'amélioration de la qualité et de la sécurité alimentaire par des méthodes de préservation et de protection naturelle qui impliquent l'utilisation des microorganismes ; tels que les bactéries lactiques avec des propriétés inhibitrices des champignons.

Des études ont démontré que le lait cru de chamelle, de vache et de chèvre pouvait être de bonnes sources d'isolement des souches de bactéries lactiques qui peuvent être utilisées pour la conservation des aliments, et peuvent également être utilisées comme cultures bio protectrices dans plusieurs types d'aliments ayant la propriété d'inhiber la croissance du champignon phytopathogène et d'altération alimentaire *A. alternata*, qui est connu également pour la production de différentes mycotoxines nocives aux humains et aux animaux (**Zabouri, 2021**).

L'objectif de cette recherche est de tester l'activité antifongique des bactéries lactiques vis-à-vis des moisissures d'altération des fruits et légumes, Dans cette étude, nous avons envisagé l'isolement et l'identification des champignons et des bactéries lactiques aux propriétés antifongiques et la caractérisation des métabolites secondaires.

Chapitre 01 : Synthèse Bibliographique

1. Les bactéries lactiques

1.1 Généralités :

Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles non pathogènes, Gram positif, non-sporulantes et immobiles. Elles ont également un métabolisme aérobic facultatif et ne produisent pas de catalase. Les bactéries lactiques ont la capacité de fermenter les sucres en acide lactique. Elles sont des microorganismes hétérotrophes anaérobies qui tolèrent l'oxygène dans une certaine mesure. Les bactéries lactiques sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte (en symbiose). Elles sont généralement associées à des habitats riches en nutriments comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (**Drouault et Corthier, 2000 ; Badis et al., 2005 ; Yao et al., 2009**).

1.2. Classification des bactéries lactiques :

Leur classification est réalisée en fonction de leur morphologie, de leur type de fermentation et de leur température optimale de croissance selon la classification taxonomique actuelle, ils appartiennent au phylum des *Firmicutes* , classe *Bacilli*, ordre *Lactobacillales* , incluent diverses familles et plusieurs genres *Aerococcus* , *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella* (**Stiles et Holzappel, 1997 ; Khalid, 2011 ; Holzappel et Wood, 2014 ; Quinto et al., 2014 ; Mokoena, 2017**)

1.3. La bio préservation :

La contamination fongique des denrées alimentaires et des aliments pour animaux, en particulier par des champignons mycotoxigènes, n'est pas seulement un problème mondial de qualité alimentaire pour les fabricants de produits alimentaires, cependant, la demande croissante de produits biologiques oblige les fabricants à trouver des alternatives naturelles pour remplacer les ingrédients d'origine chimique afin de garantir ces produits. Les bactéries lactiques (BL), avec le statut généralement reconnu comme sûr (GRAS), sont appréhendées comme un choix approprié pour être utilisées comme conservateurs naturels dans l'alimentation humaine et animale pour contrôler la croissance fongique et la production subséquente de mycotoxines. Les espèces BL produisent un vaste spectre de métabolites antifongiques pour inhiber la croissance fongique; et ont également la capacité d'adsorber, de

dégrader ou de détoxifier les mycotoxines fongiques, notamment les ochratoxines, les aflatoxines et les toxines de *Fusarium*. Le potentiel de nombreuses espèces de BL à contourner la détérioration associée aux champignons a été exploité dans une variété d'aliments pour l'homme et les animaux (**Sediq et al., 2019**)

La biopreservation est une nouvelle approche de conservation basée sur l'utilisation des méthodes impliquant des conservateurs biologiques. Elle utilise des microorganismes antagonistes et leurs métabolites pour prévenir ou tuer les microorganismes nocifs dans les aliments. Il existe différentes voies permettant cette méthode de conservation ; l'utilisation des micro-organismes tels que les bactéries lactiques, des substances issues du métabolisme de microorganismes comme les bactériocines, des huiles essentielles issues de plantes ou bien des systèmes enzymatiques Naturels (**Benharoune et Hassini. 2020**)

Selon **Sharma et al (2014)**, les BL isolés à partir d'échantillons de lait cru prélevés dans des fermes laitières locales ont été criblés pour la production simultanée de biosurfactants et de bactériocines. Le biosurfactant produit s'est avéré être un mélange de lipides et de sucres similaires aux glycolipides et la bactériocine obtenue s'est avérée thermostable ; il semble avoir un énorme potentiel pour l'industrie alimentaire en tant que bio conservateur et/ou ingrédient.

Plusieurs biosurfactants ont montré une action antimicrobienne comme le lipopeptide iturine de *Bacillus subtilis* avec une activité antifongique (**Besson et al, 1976**).

Selon **Kosaric et Velikonja (1993)**, les Rhamnolipides actifs contre *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aureobasidium pullulans* et les phytopathogènes *Botrytis cinerea* et *Rhizoctonia solani*.

2. Activité antifongique des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques isolées à partir de n'importe quelle source sont testées pour leur activité antifongique, leur fermentation et leurs propriétés de conservation après application des méthodes appropriées, à travers la production des composés antimicrobiens. Les composés antifongiques produits par les bactéries lactiques présentent une activité optimale que sous certaines conditions, notamment, leur activité antifongique dépend de la température et du pH (**Rouse et al., 2008**).

2.1. Les principales bactéries lactiques à caractère antifongique :

Le genre *Lactobacillus* est le plus souvent retrouvé parmi les bactéries lactiques, suivi des genre *Lactococcus* et *Leuconostoc*, ainsi que des genres de *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Weissella*, les genres *Streptococcus* et *Carnobacterium* sont les moins retrouvés (Shekh et al., 2009 ; Valerio et al., 2009 ; Ndagano et al., 2011).

3. Altération fongique

3. 1. Altération des produits alimentaires :

Les moisissures sont des champignons microscopiques. Ce sont des organismes pluricellulaires dont l'appareil végétatif, le thalle, est formé de longs filaments ramifiés et souvent cloisonnés que l'on appelle des hyphes. Lorsque la croissance est suffisamment avancée, l'ensemble des hyphes constitue un mycélium visible à l'œil nu qui se présente comme une sorte de feutrage à la surface colonisée (Nicklin et al., 2000). La structure filamenteuse du thalle les rend particulièrement aptes à coloniser des substrats solides. En raison de leurs aptitudes écologiques et physiologiques ; les moisissures sont de loin les microorganismes les plus redoutables pour les grains stockés (Multon, 1982).

Ces organismes hétérotrophes, se développent exclusivement sur des substrats organiques très diversifiés ; produits alimentaires (confitures, fruits, salaisons, grains en silos, produits laitiers...) mais aussi produits manufacturés (bois humide, cuir, papier) .

3.2. Genre fongiques incriminés :

3.2.1. *Alternaria* :

Sont des champignons fréquents dans notre environnement. Ils appartiennent aux moisissures atmosphériques. Ils peuvent être isolés de végétaux très divers. *Alternaria* comprend près de 275 espèces (Simmons, 2007) avec des modes de vie saprophytes et phytopathogènes qui peuvent affecter les cultures sur champ ou les produits végétaux pendant la récolte et post-récolte (Logrieco et al., 2009).

3.2.2. *Rhizopus stolonifer* :

Ce champignon appartient à la subdivision des *Zygomycotina*, classe *Zygomycètes*, ordre *Mucorales*, genre *Rhizopus* et espèce *Rhizopus stolonifer* (*R. stolonifer*) (Agrios, 2001). L'espèce type de *Rhizopus nigricans* est souvent à l'origine d'altérations de fruits, légumes et

céréales les *Rhizopus* se développent aussi sur les bananes en stock et sont fréquents sur le pain (moisissure du pain) (Guy et Vierling, 2007).

De plus, il attaque occasionnellement les plantes en croissance. *R. stolonifer* est un bon colonisateur de débris végétaux, et par conséquent ses spores sont presque omniprésentes et aussi facilement transportées par voie aérienne. En raison de la rapidité avec laquelle il se propage des fruits pourris aux fruits adjacents à la température ambiante. Cet agent pathogène, à croissance très rapide, est l'un des champignons de pourriture post-récolte les plus redoutés. C'est une maladie destructrice rencontrée généralement lors du stockage de la tomate. Il provoque une pourriture molle et aqueuse (Agrios, 2001).

3.2.3. *Aspergillus* :

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux, imparfaits, appartenant à la classe des *Deutéromycètes*. Ils ont un mycélium qui se présente sous forme duveteuse. Le thalle présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores terminés en vésicules qui produisent des conidies en chainettes. Cette structure est dite « tête aspergillaire » et est la caractéristique principale de ce genre (Goswami *et al.*, 2001). Les *Aspergillus* contaminent fréquemment les céréales (blé, riz, Orange, maïs...) et leurs dérivés, mais aussi les stocks de fruits et de légumes (bananes, agrumes, pommes...). Ils sont tous plus ou moins toxiques, la toxine la plus connue étant l'aflatoxine (Guy et Vierling, 2007).

3.2.4. *Penicillium* :

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des *Ascomycètes*. Il comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (Pitt, 1988). Les *Penicillium* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphages pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les céréales (Chermette et Bussieras, 1993).

Chapitre 02 : Matériel et Méthodes





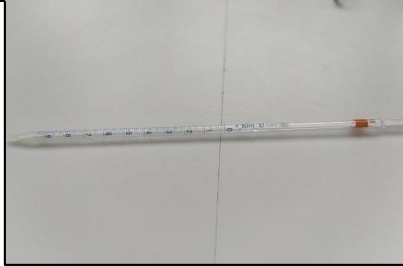

1. Description de site d'accueil



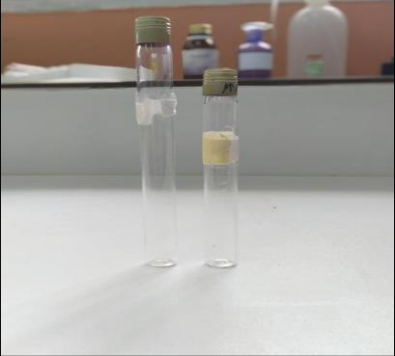







Ce présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie d'université de SKIKDA 20 Aout 1955 sur une période allant du 17 février 2022 jusqu'au 27 avril 2022. Le but de cette étude est la recherche d'activité antifongique des bactéries lactiques vis-à-vis des champignons d'altération.

2. Matériel



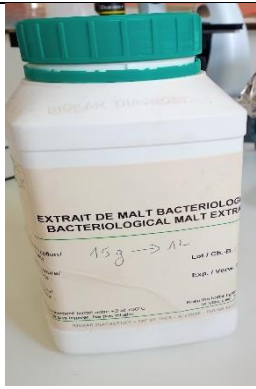
le matériel utilisé dans cette partie pratique est récapitulé dans les tableaux 1 et 2 ci-dessous

Tableau 1: Matériel expérimental.


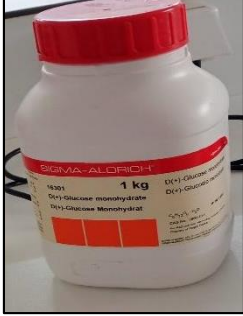







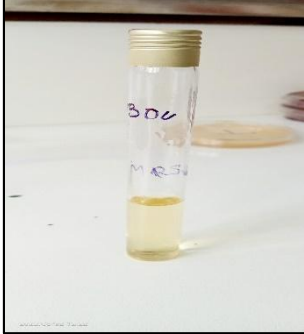
Microscope optique.		Centrifugeuse	
Lames et lamelles		Etuve.	
Pipette graduée		Balance	

<p>Pipette pasteur</p>		<p>Autoclave</p>	
<p>Tube à essai</p>		<p>Portoir.</p>	
<p>Bécher</p>		<p>Bain-marie.</p>	
<p>Erlenmeyer</p>		<p>Plaque chauffante +Agitateur magnétique</p>	
<p>Seringue</p>		<p>Des disques stérile</p>	

Matériel et Méthodes

<p>Spatule</p>		<p>Bec bunsen.</p>	
<p>Anse de platine.</p>		<p>Bleu de méthylène</p>	
<p>Boîtes de pétri.</p>		<p>Gélose PDA</p>	
<p>Extrait de malt</p>		<p>AGAR-AGAR</p>	

Matériel et Méthodes

<p>Huile à immersion.</p>		<p>Glucose</p>	
<p>EAU distillée</p>		<p>Eau physiologique</p>	
<p>Papier filtre</p>		<p>Huile d'olive</p>	
<p>Gélose DG18</p>		<p>Gélose BCP</p>	
<p>Tween 20</p>		<p>Bouillon nutritif</p>	

Matériel et Méthodes


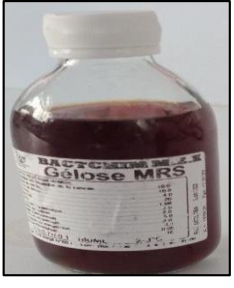




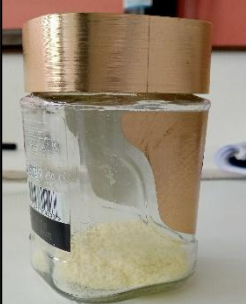



Gélose M17		Gélose MRS	
Fuchsine. Lugol. Alcool. Violet de gentiane		H2O2 V10	

Tableau 2 : Matériel biologique.

Yaourt nature nature SOUMMAM M		Courgette	
Lait en poudre poudre ThiKa		Orange.	
Fromage cheezy.		Carotte.	

<p>Fromage de chèvre.</p>		<p>Fenouil.</p>	
<p>Raib Hodna.</p>		<p>Citron.</p>	
<p>Lait de vache.</p>		<p>Olive.</p>	
<p>Beurre de lait de vache.</p>		<p>Pain moisi.</p>	
<p>Pomme.</p>		<p>Fraise.</p>	
<p>Pomme de terre .</p>		<p>Galeries biochimiques 50 CH (les bactéries lactiques identifier).</p>	

3. Méthodes

3.1. Préparation du milieu PDA :

Le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) est composé de pomme de terre, de glucose, et d'Agar-agar.

Le protocole de préparation du milieu en condition d'asepsie totale est le suivant :

- 200 g de pommes de terre épluchées sont découpés et mis à ébullition dans un récipient contenant 500 ml d'eau distillée pendant 20 min ;
- Les pommes de terre sont retirées et le bouillon est transvasé dans un ballon contenant 20 g de glucose et 20 g d'Agar agar ;
- La solution est complétée à 1L avec de d'eau distillée ;
- Ce milieu est autoclavé à 121 °C pendant 20 min sous une pression d'un bar (**Dedi,2007**).

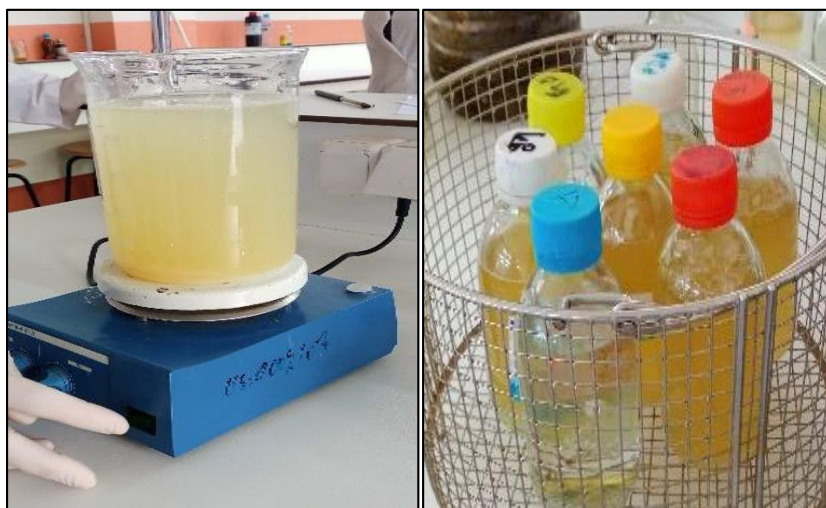


Figure 1 : Préparation du milieu PDA.

3.2. Ensemencement des champignons par strie dans le milieu PDA

Nous allons ensemer 6 boites de gélose PDA à partir des champignons différents (courgette, orange, carotte, fenouil, citron, pomme)

L'ensemencement se fait d'après la méthode d'épuisement par strie.

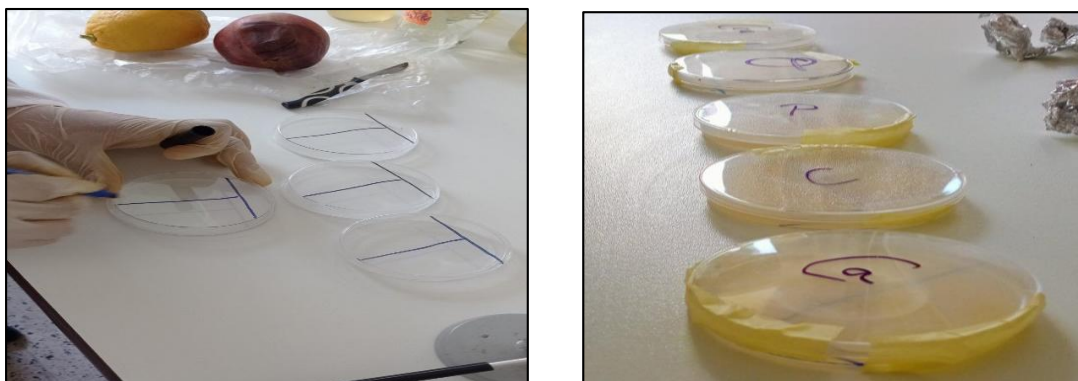


Figure 2 : Boites ensemencées par les champignons d'altération.

3.3.Incubation :

Les boites ensemencées sont incubées à température ambiante et la lecture se fait après 3 à 5 jours.

3.4.Ensemencement des bactéries lactique:

Les milieux utilisés sont **MRS (de Man *et al.*, 1960)** recommandé pour la culture *Lactobacillus* et *Leuconostoc* et **M17 (Terzaghi et Sandine ,1975)** recommandé pour la culture de *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Pediococcus*.

3.4.1. Les étapes pour réaliser l'ensemencement en masse (En profondeur) :

- Déposez 1ml de l'échantillon dans une boîte de Pétri vide (et stérile évidemment) ;
- Ajoutez une première couche de milieu, en général de 10 à 20ml. Attention, la température du milieu doit être maîtrisé. Si celle-ci est trop élevée, vos microorganismes n'y survivront pas !
- Procédez à l'agitation. Elle doit se faire en forme de « 8 » afin de répartir l'échantillon de manière homogène dans le milieu de culture ;
- Ajoutez une deuxième couche de milieu pour s'assurer qu'aucun microorganisme ne se retrouve en surface.

Tableau 3 : Conditions d'ensemencement des bactéries lactiques .

Milieux de culture	MRS	MRS	M17	M17
Température d'incubation	37°C	42°C	37°C	42°C
Echantillons	Yaourt nature SOUMMAM	Yaourt nature SOUMMAM	Yaourt nature SOUMMAM	Yaourt nature SOUMMAM
	Raib Hodna	Raib Hodna	Raib Hodna	Raib Hodna
	Fromage cheezy	Fromage cheezy	Fromage cheezy	Fromage cheezy
	Lait de vache	/	Lait de vache	/
	Beurre de lait de vache	/	Beurre de lait de vache	/

3.4.2. Isolement des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont été isolées des échantillons de Yaourt nature, Raib et fromage, lait de vache et beurre de lait de vache, en utilisant les dilutions décimales dans une solution stérile (eau physiologique), et ensemencés en profondeur dans des boîtes de Pétri (6 boîtes) contenant du milieu MRS et (6 boîtes) contenant du milieu M17. Les cultures ont été incubées à 37°C et 42°C pendant 48 à 72h. Après incubation, puis testés par des tests complémentaires notamment le test de catalase et la coloration de Gram ont été réalisés (**Laref, 2014**).

3.4.2.1. Test catalase

- Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée à l'aide d'une pipette pasteur ;

- Prélever une colonie ;
- Dissocier la colonie dans la goutte ;
- Observation directe de la réaction sur la lame.

3.4.2.2. Coloration de Gram :

- Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane sur le frottis fixé. Laisser agir 1 minute. (Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries) ;
- Jeter l'excès de colorant dans un bécher ;
- Rincer très brièvement en faisant couler de l'H₂O sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis) ;
- Déposer quelques gouttes de Lugol sur le frottis (Le Lugol permet de fixer le violet dans les bactéries) ;
- Laisser agir 1 minute ;
- Jeter la solution de Lugol dans un bécher et rincer brièvement à l'H₂O comme précédemment décrit ;
- Décolorer en faisant couler la solution de décoloration sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10 secondes) (La solution de décoloration contient un mélange d'alcool) ;
- Rincer à l'H₂O ;
- Laisser sécher à l'air ;
- Observer au microscope (objectif x100) (**Delarras,2014**).

3.4.3. Repiquage des boîtes :

Après isolement des colonies d'aspect morphologiques différents (taille, couleur, surface, profondeur...) sont repiquées sur milieu M17, incubées à 37 °C afin d'assurer de la pureté des cultures. La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode par épuisement en strie suivie d'un état frais pour confirmer la pureté des isolats. Des tests complémentaires notamment le test de catalase et la coloration de Gram ont été réalisés pour sélectionner les bactéries lactiques.

Les analyses microbiologiques entamées ont été suivies les protocoles présents dans l'ouvrage (**Delarras,2014**).

3.5. Préparation du bouillon nutritif :

Le bouillon nutritif est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. Il est recommandé dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

La recommandation du fabricant :

- Ajouter 4g de **bouillon nutritif** en poudre dans 500 ml d'eau distillée ;
- Mélanger et dissoudre complètement ;
- Stériliser à l'autoclave à 121 ° C pendant 20 min.

Vu l'indisponibilité des bouillons M17 et MRS, Le bouillon nutritif a été utilisé pour l'ensemencement des bactéries lactiques dans des écouvillons ou des tubes à essai .

3.5.1. Ensemencement dans un bouillon de culture :

À partir des boîtes (MRS lait, MRS beurre, M17 beurre+ Columbia lait) des isolats purs prélevées avec l'anse de platine sont dissociées dans 4 tubes contenant du bouillon nutritif puis incubés à 37°C pendant 24 h (isolats jeunes) . Une centrifugation à 5000 tr /min pendant 5 min a été effectuée pour les bouillon nutritif ensemer afin de récupérer le surnageant acellulaire pour d'autre tests ultérieurs.

3.6. Préparation des milieux de fermentation :

Afin de pouvoir extraire les métabolites d'intérêt (biosurfactant et /ou bactériocine) nous avons préparé des milieux de fermentation (en batch culture discontinue) de la manière suivante :

- Dans chaque erlenmeyer stérile verser 100ml eau minérale ;
- Ajouter 1ml d'inoculum de Bouillon nutritif ensemer par les bactéries lactiques ;
- 1ml d'huile d'olive ;
- Agitation pendant 20 min ;
- Incuber à température ambiante à l'obscurité pendant 3jours.



Figure 3 : Milieux de fermentation pour les bactéries identifier .

3.7. Identification des champignons

3.7.1. Observation macroscopique :

Après incubation des milieux PDA, nous avons fait l'observation macroscopique des boîtes pétri pour enregistrer les caractères de chaque souche fongique ; vitesse de croissance (lente ou rapide), l'aspect des colonies fongiques (plâtreux, poudreux, glabre ...etc.), la couleur des colonies (recto et verso).

3.7.2. Etat frais:

- Réaliser selon la méthode de Roth ;
- A l'aide d'un ruban adhésif (scotch) placer directement sur le champignon présent sur le milieu de culture puis transférée sur une lame propre où une goutte de bleu de méthylène a été déposée , faire l'observation microscopique avec le grossissement (X100, X400) ;
- Noter l'aspect du mycélium , des conidies observés et leur mode de regroupement ;
- Prendre des photographies de chaque aspect microscopique à l'aide d'appareil numérique.

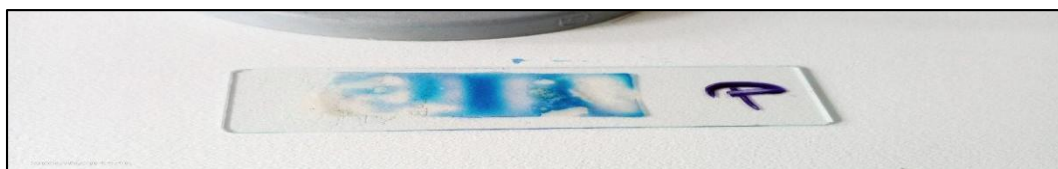


Figure 4 : Lame préparée par la méthode de Roth.

3.7.3. Repiquage des champignons :

On fait le repiquage des champignons d'altération (citron, pain et fraise) à partir des boîtes déjà cultivées sur les milieux PDA, DG18 et BCP par la méthode d'ensemencement en surface par strie .

3.8. Activité antifongique :

La recherche des souches lactiques à caractère antifongique Peut être utilisée selon plusieurs méthode :

3.8.1. La confrontation par contacte directe consiste à déposer une bouture de champignon de diamètre précis, dans la même boîte de Pétriensemencée préalablement par la bactérie et contenant un milieu adéquat pour la croissance bactérienne et fongique. Cette méthode consiste à évaluer la croissance du champignon par mesure de diamètre, après une incubation adéquate permettant la croissance du champignon ciblé , il s'agit d'un test qualitatif (**Gerbardo *et al.*, 2012**).

3.8.1.1. La méthode de double couche consiste à ensemencer deux stries bactériennes d'une culture ou de colonie sur un milieu MRS. Après croissances dans les conditions adéquates à la souche bactérienne, les stries bactériennes sont recouvertes par 10 ml d'une gélose à faible pourcentage d'agar (0.7% à 0.8%) pour faciliter la diffusion, contenant les spores du champignon et adéquate à la croissance. Après une incubation adéquate permettant la croissance du champignon ciblé. Il se produit un halo d'inhibition autour des stries qui permet d'évaluer le pourcentage d'inhibition par rapport à la surface de la boîte de pétri (**Magnusson *et al.*, 2003**).

3.8.1.2. Confrontation par la méthode des disques c'est un test évalué contenant les milieux de cultures , Les isolats fongiques ont été inoculé uniformément à la surface du milieu, des disques de papier stérile imprégner par les surnageants des bactéries lactiques sont déposer sur la gélose ensemencer par le champignon. L'activité antifongique des bactéries lactiques a été évaluée en fonction de la zone d'inhibition autour les disques (**Kumar *et al.*, 2010**).

La même méthode est utilisée on place un cylindre de gélose contenant le champignon ciblé au centre de la boîte et les disques imprégner autour.

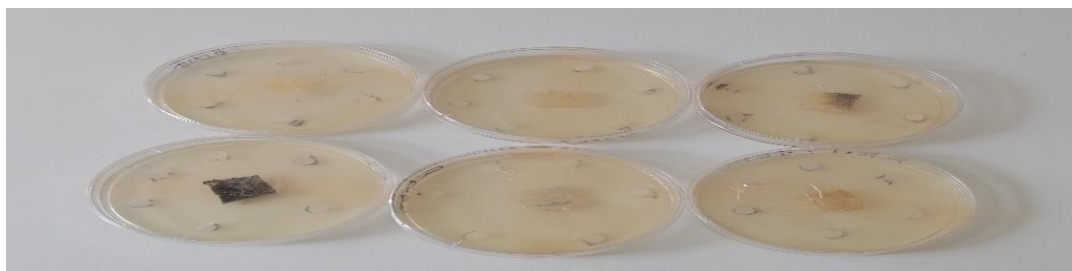


Figure 5: Confrontation par la méthode des disques.

3.8.1.3. Confrontation par la méthode des puits : Cette méthode est réalisée sur les bactéries lactiques inhibitrices possédant les plus grandes zones d'inhibition montrant la présence de substances inhibitrices, ces substances peuvent diffuser dans un milieu de culture solide. Les bactéries lactiques sont repiquées dans un milieu MRS liquide et incubées pendant une période de 18h à 30°C. Après incubation une centrifugation est réalisée à 5000 tr/min pendant 5 min. Des puits de 5 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce sur MRS solide inoculé par la suspension de champignon et seront remplies avec 1, 1/2, 1/4, 1/8 du surnageant. Les boîtes sont incubées à 37°C et la présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 3 jours d'incubation (**Hwanhlem et al., 2011**).

3.8.2. Confrontation indirecte :

Le principe de cette méthode repose sur la technique déjà utilisée par **Camporta (1985)**. Il consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées. Ensuite, un assemblage est réalisé par la superposition de deux boîtes, l'agent antagoniste en bas et l'agent pathogène en haut. La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles. On expose ainsi l'isolat de l'agent antagoniste à l'influence des substances volatiles émises par la souche de l'agent pathogène.

3.9. Tests de biosurfactant :

3.9.1. Test d'émulsification (E24) :

Ce test a été mis au point par (**Francy et al.,1991**) puis modifié par (**Bodour et Maier ,1998**). Ce test permet de vérifier la capacité des souches microbiennes à émulsionner une phase hydrophobe (huile d'olive) dans une phase hydrophile (le milieu de culture).

Le Protocole du test consiste à mélanger 2 ml de milieu de fermentation contenant notre inoculum avec 2 ml d'hydrocarbure (huile d'olive) dans des tubes à essai ,ces derniers sont agités manuellement pendant 2 minutes, la lecture se fait après 10 min et après 24 heures. Nous avons calculé l'index de l'émulsion (E24) selon la formule suivante :

$$E_{24} = \frac{He}{Ht} \times 100$$

E24 : Activité d'émulsification après 24h.

He : Hauteur de l'émulsion formée.

Ht : Hauteur totale du mélange.

3.9.2. Test de déplacement d'huile : Dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre, 20 ml d'eau distillée sont déposés, puis une quantité de 1 ml d'huile d'olive est rajoutée à l'aide d'une micropipette, sur la surface de l'eau, 1 ml de liquide acellulaire (surnageant) et cellulaire (milieu de fermentation) sont déposés au centre délicatement. Le diamètre des zones claires apparaissent dans le cas d'un déplacement positif.

3.9.3. Test de parafilm M : est utilisé comme un essai préliminaire pour la détection de la production des biosurfactants. Nous avons prélevé une goutte de liquide acellulaire (surnageant) et cellulaire (milieu de fermentation) est déposée à l'aide d'une micropipette sur la surface hydrophobe du parafilm. Si les gouttes restent perler le résultat noté comme négatif, et si les gouttes s'effondraient le résultat noté comme positif. Le test est réalisé en présence d'un témoin positif (tween) et négatif (eau distillé).

NB: Les bactéries lactiques identifiées ont été tester par la même manière que les bactéries lactiques non identifiées.

3.10. Revivification des bactéries lactiques identifiées :

Vu l'indisponibilité des galeries biochimiques 50 CH pour identification des bactéries lactiques isolées, nous avons utilisé des bactéries lactiques identifier qui nous ont été fournies aimablement par **Laouamen et al. (2021)** pour tester leur activité antifongique. Dans cette optique nous avons procédé à une revivification des galeries biochimique contenant les bactéries identifiées.



Lactobacillus plantarum 2



leuco. mes.ssp.
Mesenteroides /dext ranicum



Lactobacillus pentosus



Lactobacillus salvarius

Figure 6 : Galeries biochimiques (50CH)(**Laouamen et al.,2021**).

A partir de chaque galerie nous avons prélevé une bactérie lactique identifier puis ensemencer dans un écouvillon contenant du bouillon nutritif (voir 3.5.) .Au totale nous avons ensemencer 4 bactéries lactiques ,puis incubez pendant 24h à 37°C.



Figure 7 : Ecouvillons de bactéries lactiques identifiées.


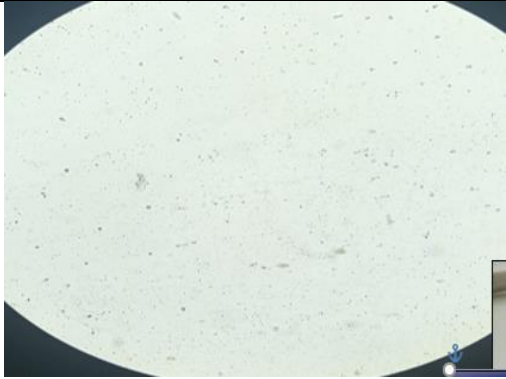

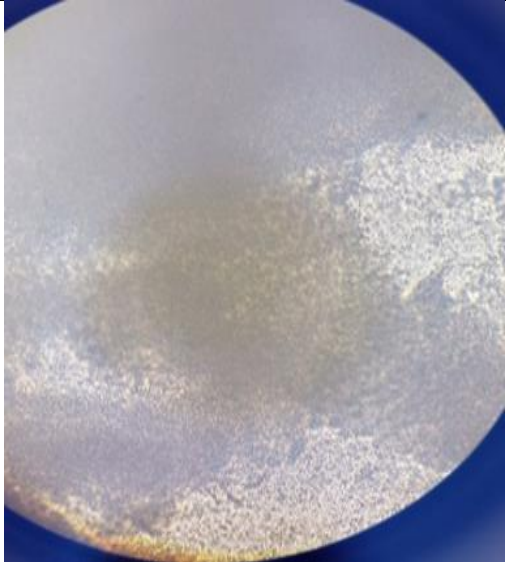
Après l'incubation, les écouvillons ont été utilisé pour un ensemencement en milieu solide GN (*Lactobacillus plantarum* ,*Lactobacillus pentosus* et *Lactobacillus salvarius*) et M17 (*leuco. mes.ssp. Mesenteroides /dext ranicum*) par les méthodes en masse et en stries (voir 3.4.2.) et un ensemencement en milieu liquide comme inoculum dans le milieu de fermentation (voir 3.6.).

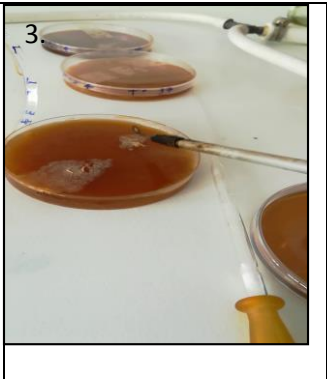
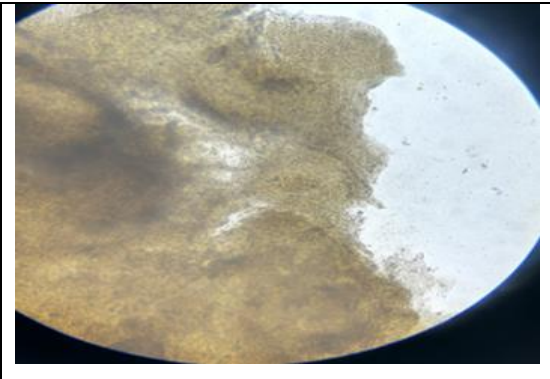
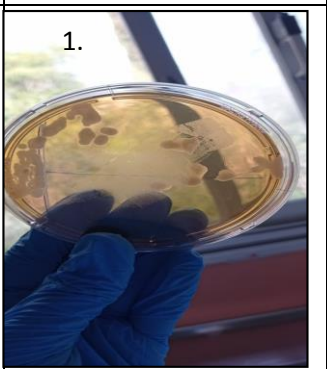
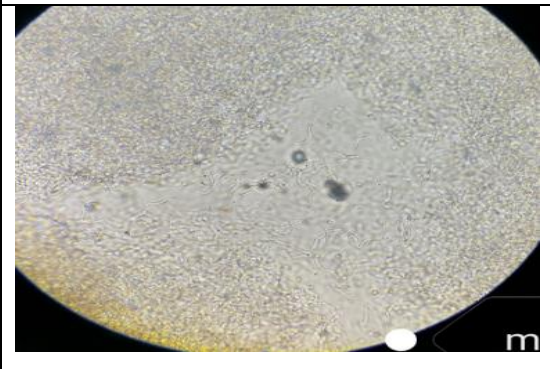


Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Résultat de l'observation macroscopique et microscopique des bactéries lactiques non identifiées .

Tableau 4: Résultat de l'observation macroscopique et microscopique des bactéries isolées .

Bactérie	Observation macroscopique	Observation microscopique	Etat frais
Fromage Dans Milieu M17 à T 37°C.	1. 		Cocci en chaînette. Obj x 10.
Yaourt dans Milieu M17à T 37°C.	2. 		Cocci en chaînette Objx40.

<p>Raib dans Milieu M17 à T 37°C.</p>	<p>3.</p> 		<p>Batônnets. Cocci . Immobiles. Obj x10</p>
<p>Fromage Dans Milieu M17 à T 42°C</p>	<p>1.</p> 		<p>Cocci en chainettes. Objx40</p>
<p>Yaourt dans Milieu M17à T 42°C</p>	<p>2.</p> 		<p>Cocci Isolés immobiles. Objx10</p>

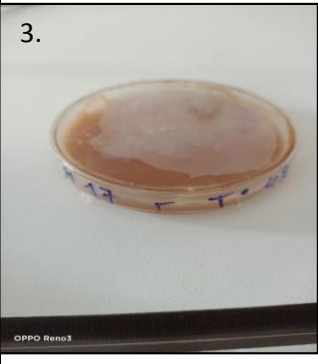
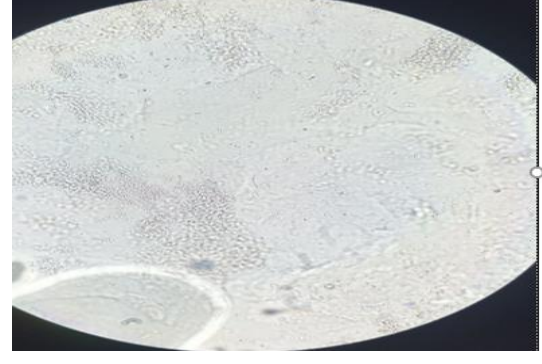

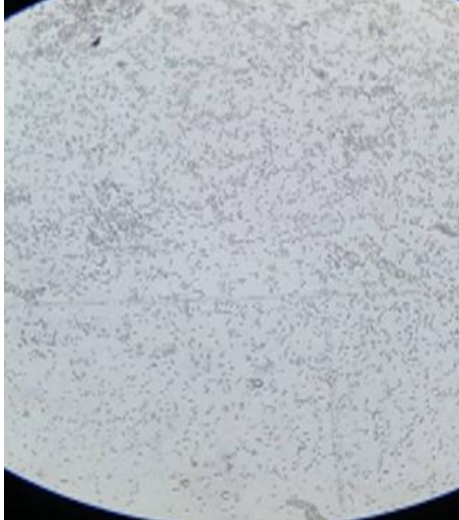
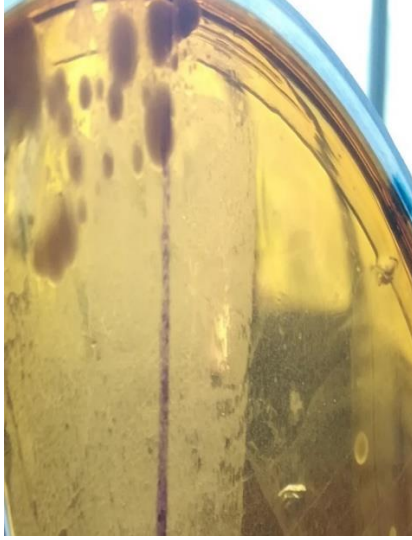
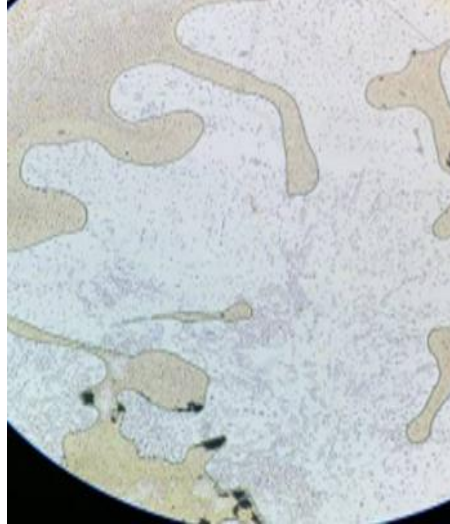
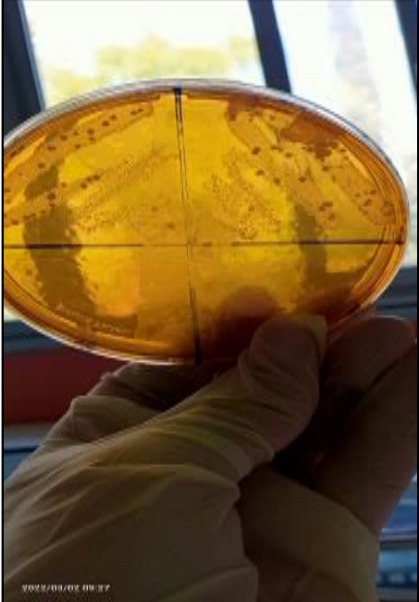
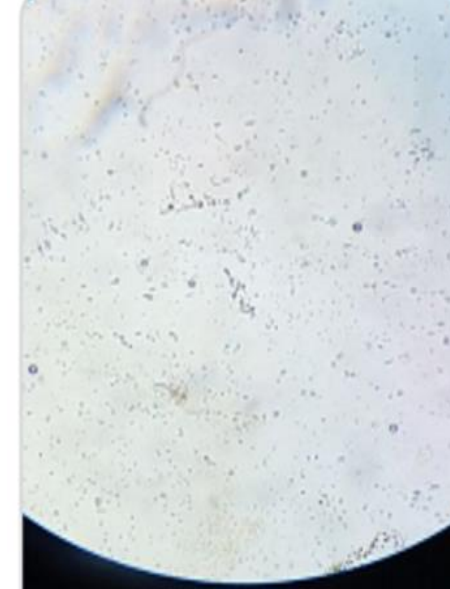
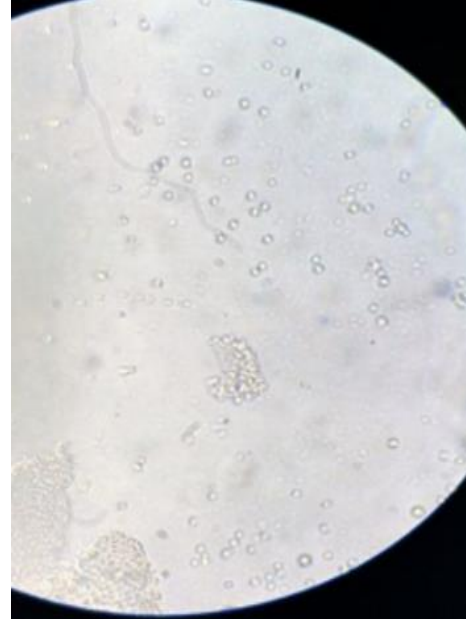
<p>Raib dans Milieu M17 à T 42°C</p>	<p>3.</p>  <p>A photograph of a petri dish containing a bacterial culture. The medium is a light brown color. The petri dish is labeled 'M17 à T' and '42°C'. The image is taken with an Oppo Reno3.</p>	 <p>A micrograph showing a dense population of bacteria. The bacteria are arranged in chains and are mobile. The image is taken with an objective lens of 10x magnification.</p>	<p>Cocci isolés et en chainettes. Mobiles. Batônnetts en chainettes. Objx10</p>
---	---	--	--

Tableau 5: Résultat de l'observation macroscopique et microscopique des bactéries lactique.

Les boites	Observation macroscopique		Observation microscopique	Mode de regroupement et forme
MRS Beurre		<p>Beige. Opaque. Granulés. Petites colonies. Bombés.</p>		<p>En amas. Diplocoques. Obj x 10.</p>

<p>MRS lait de vache</p>		<p>Petites colonies. Bombés. Isolés. Opaques. Granulés. Blanches</p>		<p>Cocci. Obj x 10</p>
<p>M17 Beurre</p>		<p>Petites colonies. Bombés. Blanches. Contour régulier. Opaques.</p>		<p>Cocci en chainettes. Obj x 10</p>

<p>Lait thika</p>	 A photograph of a petri dish held by a gloved hand. The dish contains a bacterial culture on a solid medium, appearing as a uniform, slightly raised, and opaque white layer. A handwritten letter 'L' is visible on the surface of the culture.	<p>Rondes. Bombés. Blanches. Opaques. Pas de granules.</p>	 A circular microscopic field of view showing numerous small, round, white bacterial cells. Some cells are arranged in short chains or pairs, while others are isolated. The background is a light, slightly hazy grey.	<p>Bâtonnets. En palissades. Obj x10</p>
-----------------------	--	---	--	---

1.2. Résultat des tests catalase et coloration de Gram :

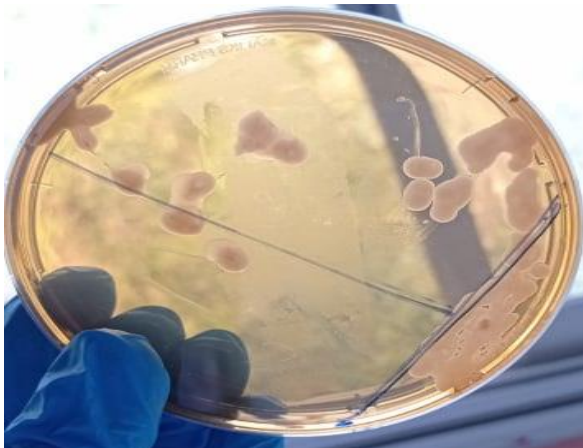
Tableau 6 : Résultat des tests catalase et coloration de Gram.

Boites	MR S y 37°C	M17 y37° C	MR S y 42°C	M17 y42° C	MR S r 37°C	M17 r37° C	MR S r 42°C	M17 r42° C	MR S f 37°C	M17 f37° C	MR S f 42°C	M17 f42° C
Test catalase	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
Coloration de Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

r : raib , y : yaourt , f : fromage cheezy

Les bactéries isolées à partir des produits laitiers seront sélectionnées selon les résultats du tableau 3.

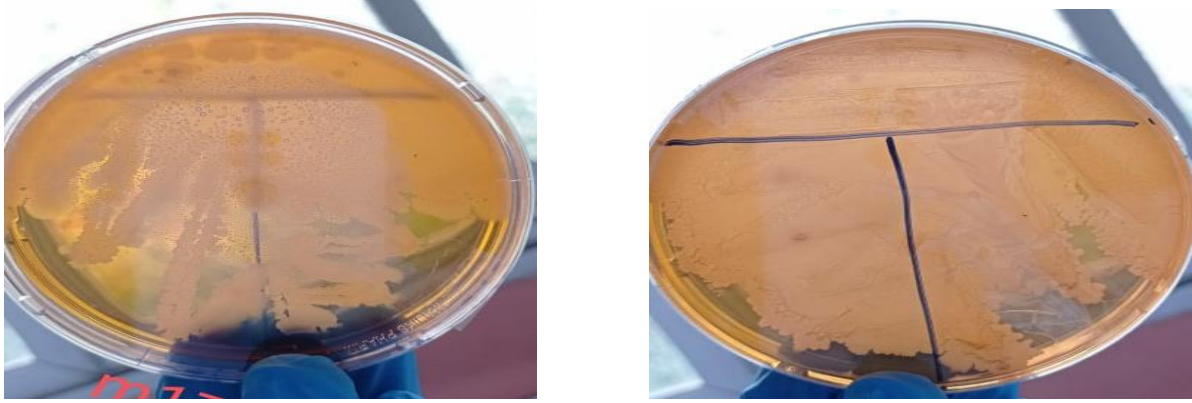
1.3. Résultat des boîtes repiqués :



M17 f 42°C



M17 f 37°C



M 17 Y 37 °C

M 17 Y 42 °C

Figure 8: Observation macroscopique des bactéries lactiques sélectionnées et repiquées .

1.4. Résultat des tests catalase et coloration de gram :

2. **Tableau 7 :** Résultat de coloration de gram et du test catalase d'une nouvelle série de bactéries lactiques non identifiées.

	MRS B 37°C	MRS L 37°C	M17 B 37°C	L 37°C
Coloration de Gram	+	+	+	+
Test catalase	-	-	-	-

B : beurre de vache , **L :** Lait de vache.

Les bactéries lactiques obéissant aux critères de sélections catalase – Gram + immobile asporulée (voir **Annexe B**)

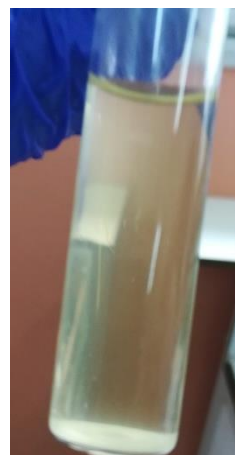
1.5. Résultats des précultures :



MRS lait de vache



bactérie lait Thika



M17 Beurre



MRS Beurre


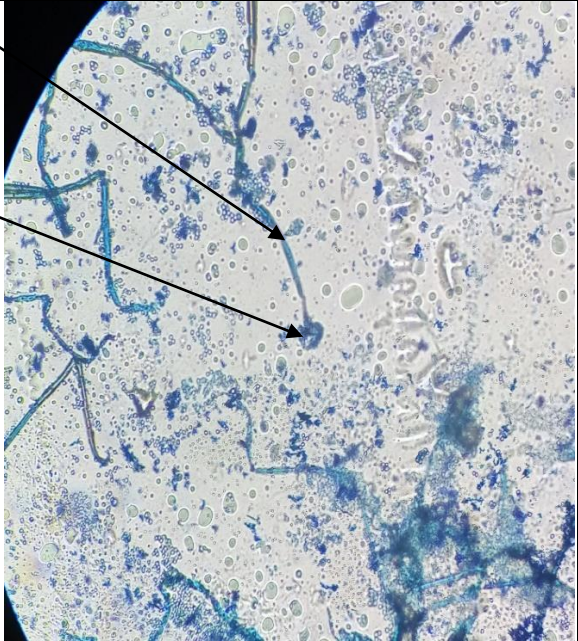
Figure 9: Résultat des bactéries lactiques sélectionnées non identifiées ensemencées dans le bouillon nutritif.

Le dépôt qui apparaît dans les tubes à essai signifie présence de bactéries anaérobies strictes et aéro- anaérobie facultatif.


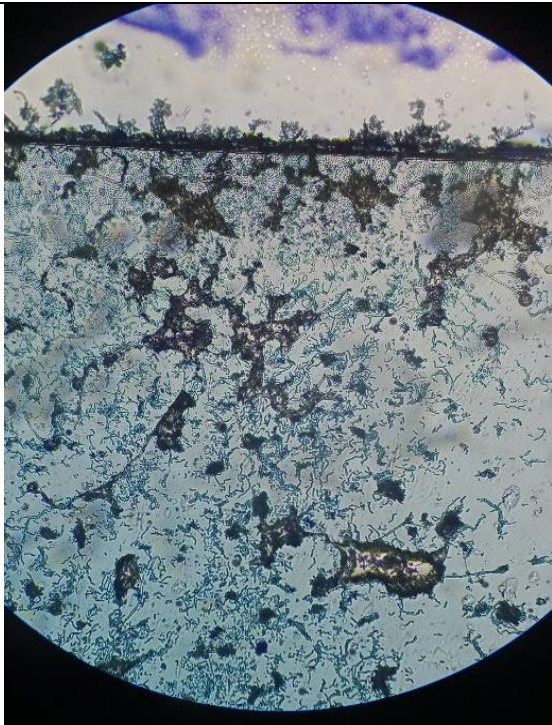
1.6.Résultat de l'observation macroscopique et microscopique des champignons :




Les caractères macroscopiques des champignons ont été observés sur les différents milieux (PDA, DG18, BCP) à l'œil nu et les observations microscopiques ont été faites selon la méthode de Roth .

Tableau 8: Résultat de l'observation macroscopique et microscopique des champignons .

Echantillon	Observation macroscopique Face Revers		Observation microscopique
Courgette	 <p>Couleur de colonie : Blanche et jaune et des colonies noires Revers : Beige Croissance sur PDA :</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Des hyphes siphonné ✓ Tête 	 <p><i>Rhizopus</i> Obj x 10</p>

Résultats et discussion

	lente Aspect : laineuse, poudreuse		
Citron	 <p>Couleur de colonie : Vert et blanche Revers : vert et beige Croissance sur PDA : lente Aspect : poudreuse et granuleuse</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Des hyphes ✓ Des têtes . 	 <p><i>Aspergillus</i> Obj x10</p>

<p>Fenouil</p>	 <p>Couleur de colonie : blanche Revers : beige Croissance sur PDA : lente Aspect : cotonneuse</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Des hyphes siphonné ✓ Tête 	 <p><i>Rhizopus</i> Obj x 10</p>
<p>Pomme</p>		<p>Des conidies allongées en chaînette</p>	


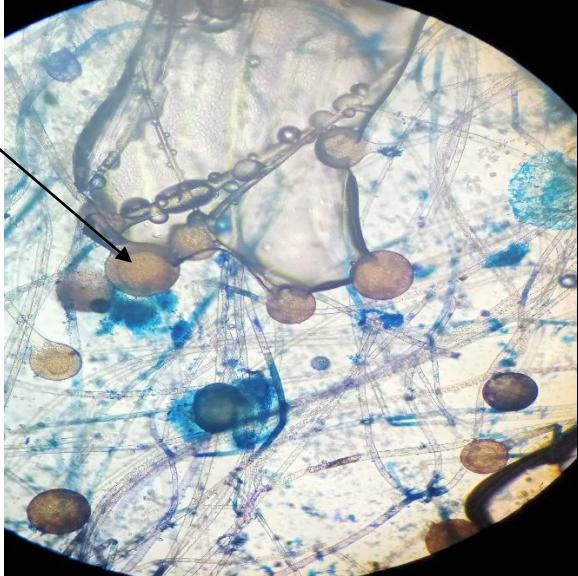

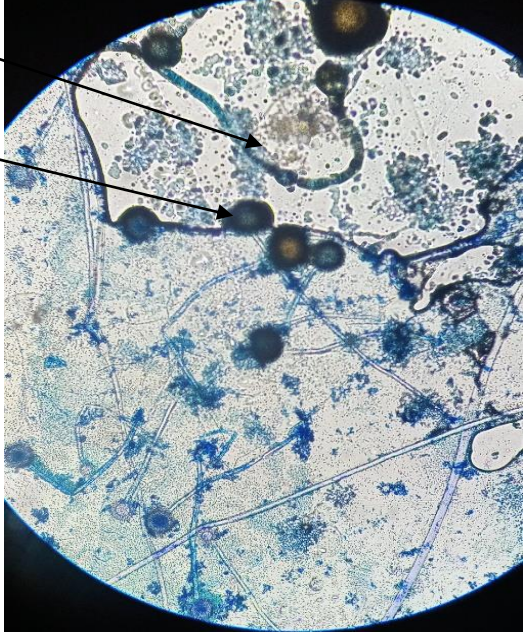


Couleur de colonie :
vert foncé et beige
Revers : verdâtre et
beige
Croissance sur PDA :
rapide
Aspect : Granuleuse



Alternaria


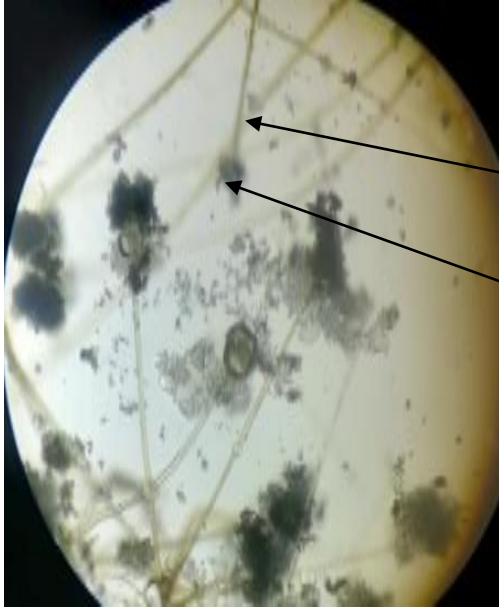
Obj x 10

<p>Orange</p>  <p>Couleur de colonie : Blanche et beige Revers : beige Croissance sur PDA : rapide Aspect : granuleuse</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Une tête ✓ Des ramifications qui donnent des hyphes 	 <p><i>Aspergillus</i> Obj x 10</p>
<p>Carotte</p>  <p>Couleur de colonie :</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hyphe siphonné ✓ Tête aspergillaire ✓ Des spores en germination 	 <p><i>Aspergillus</i> Obj x 10</p>

Résultats et discussion

	Blanc Revers : Beige Croissance sur PDA : Rapide Aspect : granuleuse et laineuse		
--	---	--	--

Tableau 9 : Identification macroscopique et microscopique des champignons du pain et fraise sur le milieu PDA.

Echantillon	Observation macroscopique	Observation microscopique	Genre
Pain	 <p>Couleur : Vert et blanc Aspect : Cotonneuse Revers : pas de pigment</p>		<i>Rhizopus</i> Obj x10 Hyphe siphonné Tête

Résultats et discussion

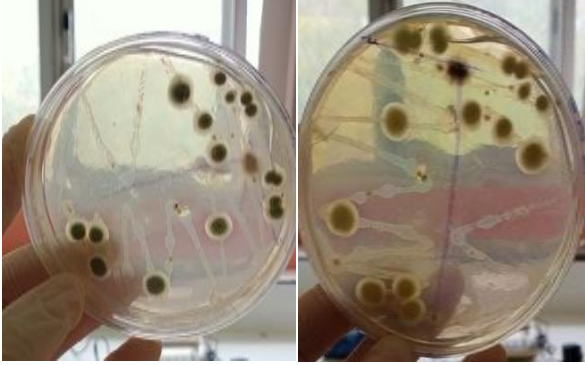

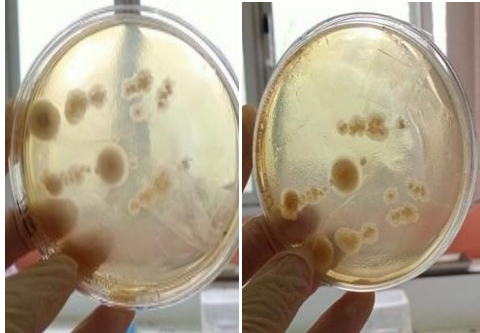
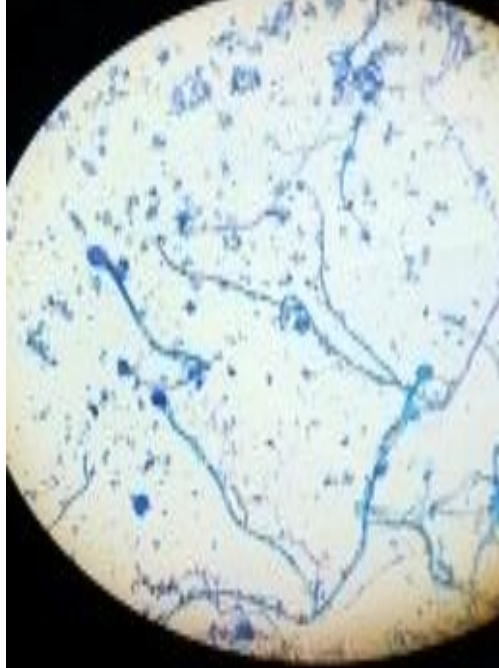
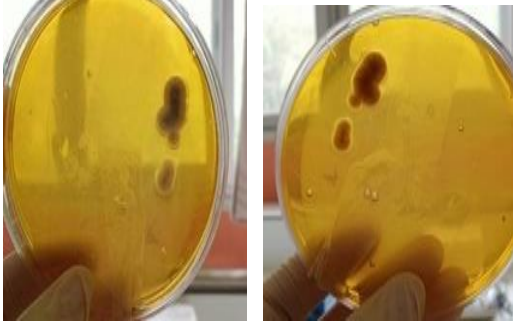

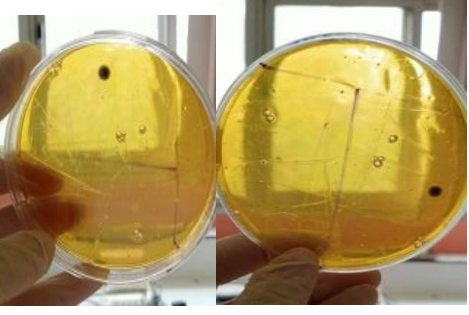

<p>Fraise</p>	 <p>Couleur : verte à noirâtre Aspect : Velouté à poudreuse Colonie : grande Revers : beige à marron</p>		<p><i>Penicillium</i> Obj x 10 Tête en pinceau</p>
----------------------	--	--	--

Tableau 10: Identification et observation macroscopique et microscopique des champignons du pain sur le milieu DG 18.

Echantillon	Observation macroscopique		Observation microscopique	Genre
	Face	Revers		
<p>Pain</p>	 <p>Couleur : blanche Aspect : Cotonneuse Colonie : moyenne/petite Revers : beige</p>			<p><i>Absidia</i> Obj x10</p>

Résultats et discussion

Tableau 11 : Identification macroscopique et microscopique des champignons du pain et fraise sur le milieu BCP.

Echantillon	Observation macroscopique	Observation microscopique	Genre
Pain	 <p data-bbox="327 779 766 929">Couleur : blanc et centre vert clair Aspect : veloutée Revers : beige à marron</p>		<p data-bbox="1268 436 1412 582"><i>Aspergillus niger</i> Obj x 10</p>
Fraise	 <p data-bbox="327 1276 566 1478">Couleur : noir Aspect : Veloutée Colonie : moyenne Revers : jaune</p>		<p data-bbox="1268 952 1412 1097"><i>Aspergillus niger</i> Obj x 10</p>

1.7. Résultat de la confrontation :

Les figures suivantes illustrent les résultats de l'activité antifongique des bactéries lactiques par la méthode de confrontation directe.

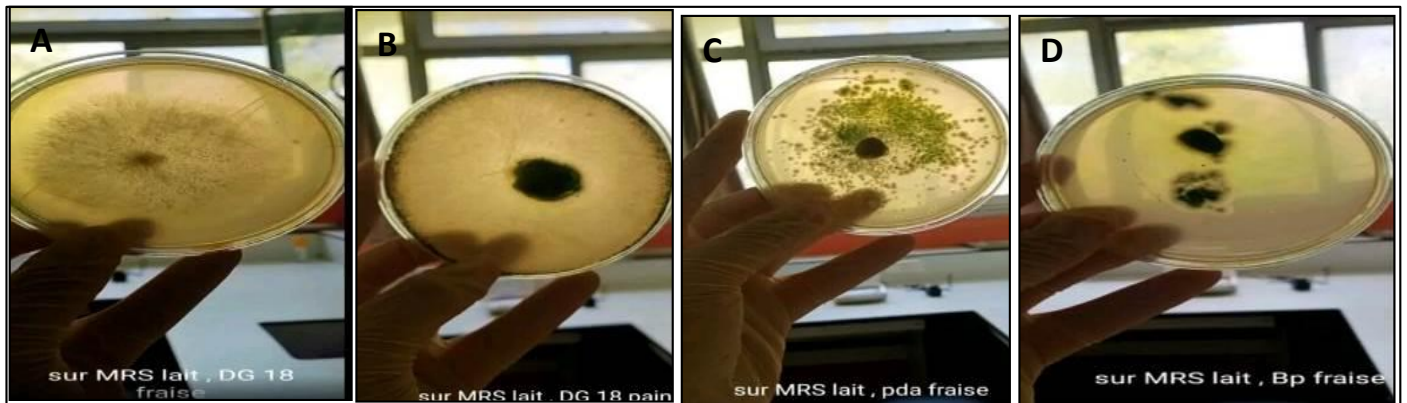


Figure 10: Résultat de l'activité antifongique par confrontation directe.

A : DG 18 fraise +surnagent MRS Lait. B : DG 18 Pain+ surnagent MRS lait. C : PDA + surnagent MRS lait fraise. D : BCP fraise +surnagent MRS lait.



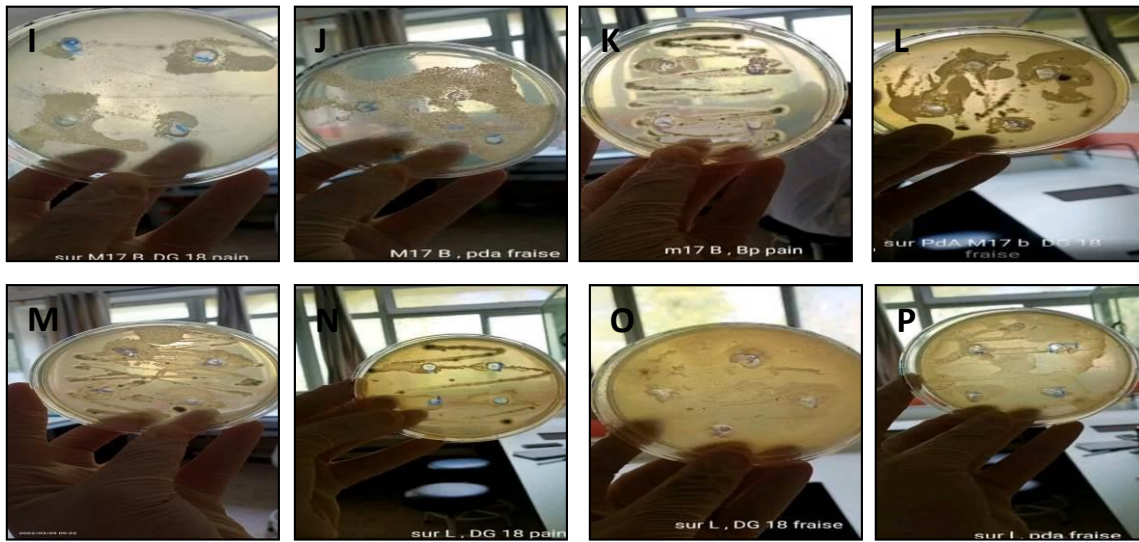
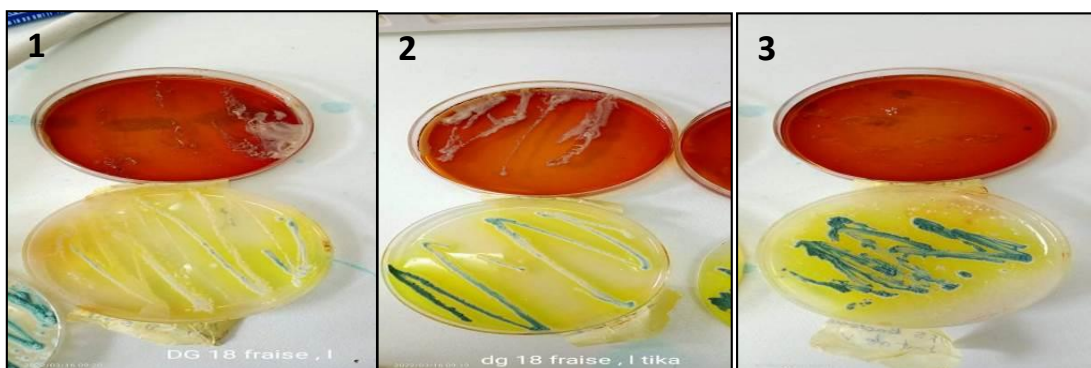


Figure 11: Résultat de l'activité antifongique par puits.

A : DG 18 fraise +surnagent MRS Lait. B : DG 18 Pain+ surnagent MRS lait. C : PDA + surnagent MRS lait fraise. D : BCP fraise + surnagent MRS lait. E : DG 18 fraise + surnageant MRS Beurre. F : BCP Pain + surnageant MRS Beurre. G : DG 18 Pain + surnageant MRS Beurre. H : PDA fraise + surnageant MRS Beurre. I : DG 18 Pain + surnageant M17 Beurre. J : PDA fraise + surnageant M17 Beurre. K : BCP Pain + surnageant M17 Beurre. L : DG 18 fraise + surnagent M17 Beurre. M : BCP pain + surnagent Lait thika. N : DG 18 pain + surnagent Lait thika. O : DG 18 fraise + surnagent lait Thika. P : PDA fraise + surnagent lait Thika.



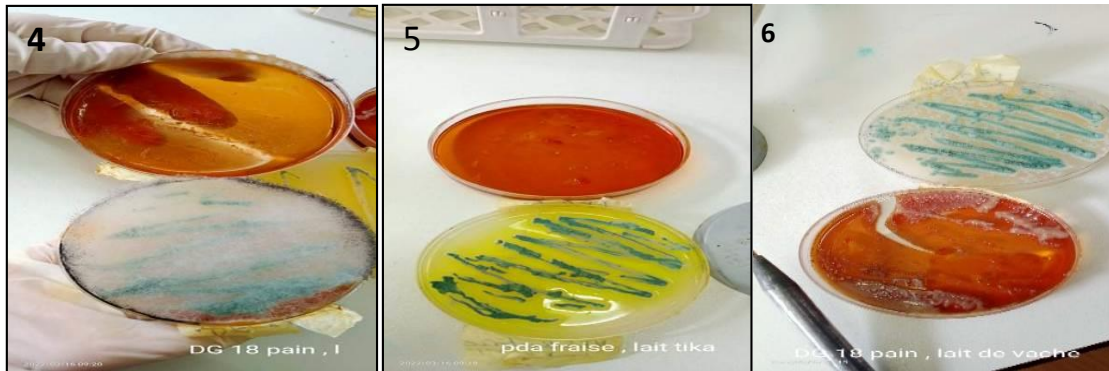


Figure 12 : Activité antifongique par confrontation indirecte.

1 : DG 18 fraise + surnagent lait de vache. 2 : DG 18 Fraise + surnagent lait Thika. 3 : PDA Fraise + surnagent lait de vache .4 : DG 18 Pain + surnagent lait de vache. 5 : PDA fraise + surnagent lait Thika.6 : DG18 pain +lait de vache.

1.8. Résultats des tests de biosurfactant :



Figure 13 : Milieux de fermentation « MRS L, 1 » après 3 jours

1.8.1. Résultat de test E24 :

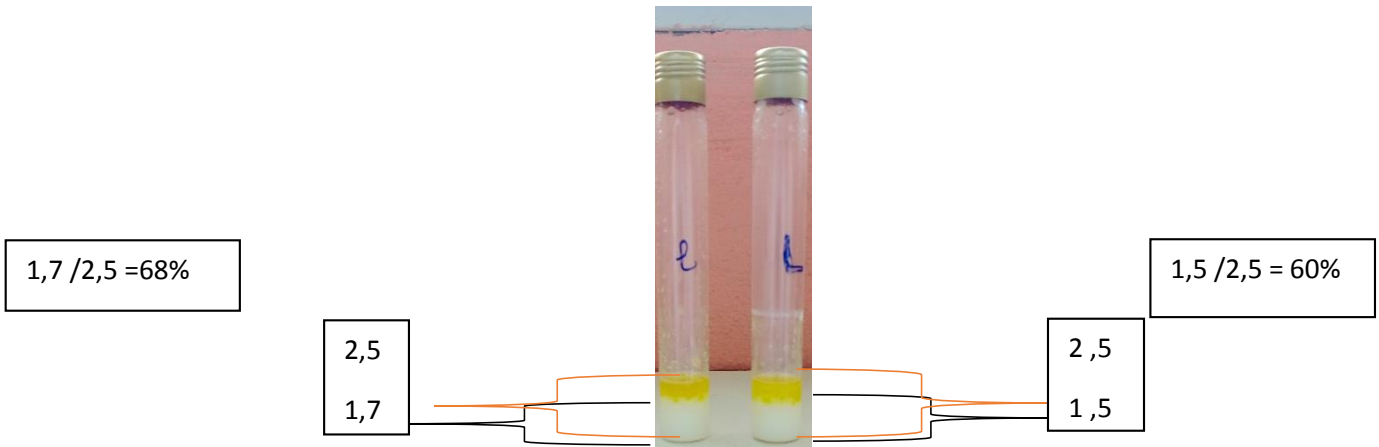


Figure 14 : Observation de test E24 après 10 min.

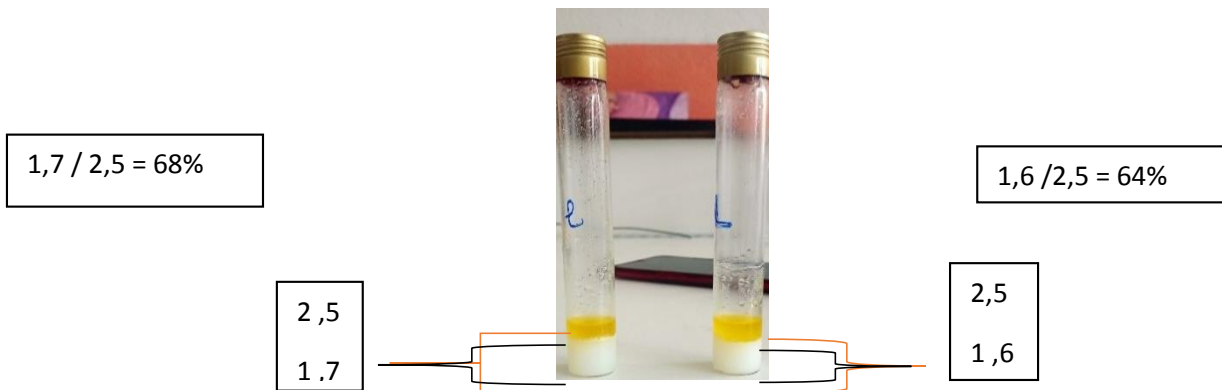


Figure 15 : Observation de test E24 après 24 h.

1.8.2. Test d'effondrement:

1.8.2.1.MRS L :

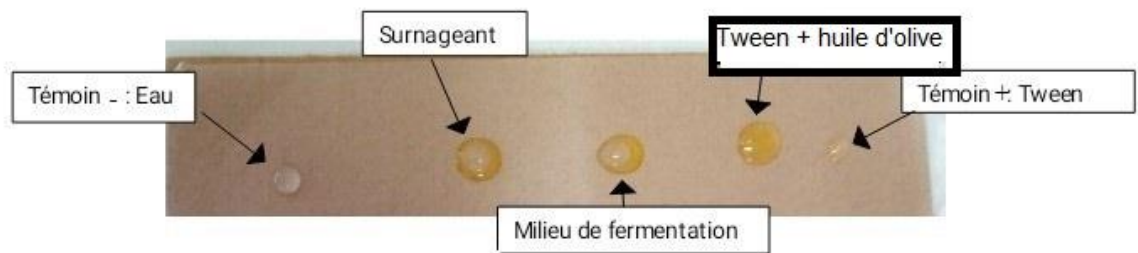


Figure 16: Test d'effondrement du MRS L.

1.8.2.2.1 :

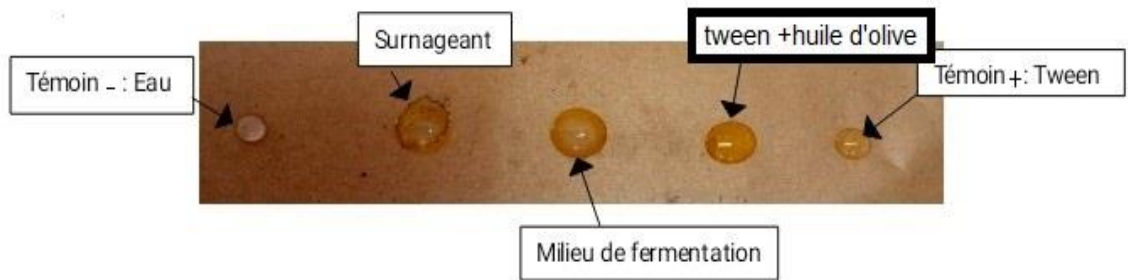


Figure 17: Test d'effondrement du 1.

On a affaîssement des gouttes de les deux souches sélectionnés 1 et MRS L les gouttelettes de surnageant et milieu de fermentation on effondrer par rapport de témoin

1.8.3. Teste de déplacement :

1.8.3.1.Mrs L :

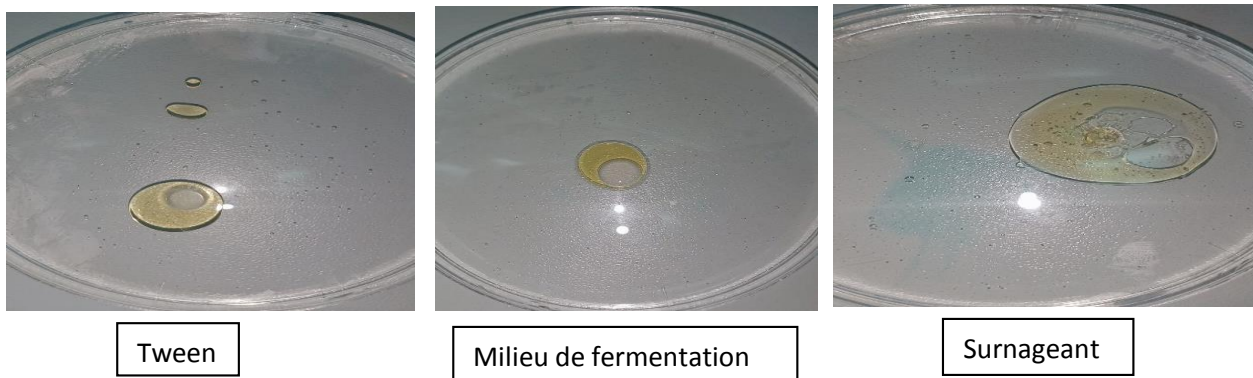


Figure 18: Test de déplacement du MRS Lait.

1.8.3.2.L :



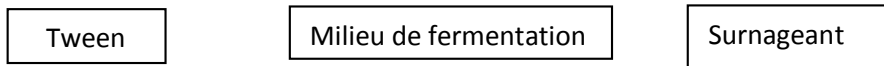


Figure 19 : Test déplacement du l.

1.9.Revivification des bactéries lactiques :

1.9.1 Observation macroscopique :

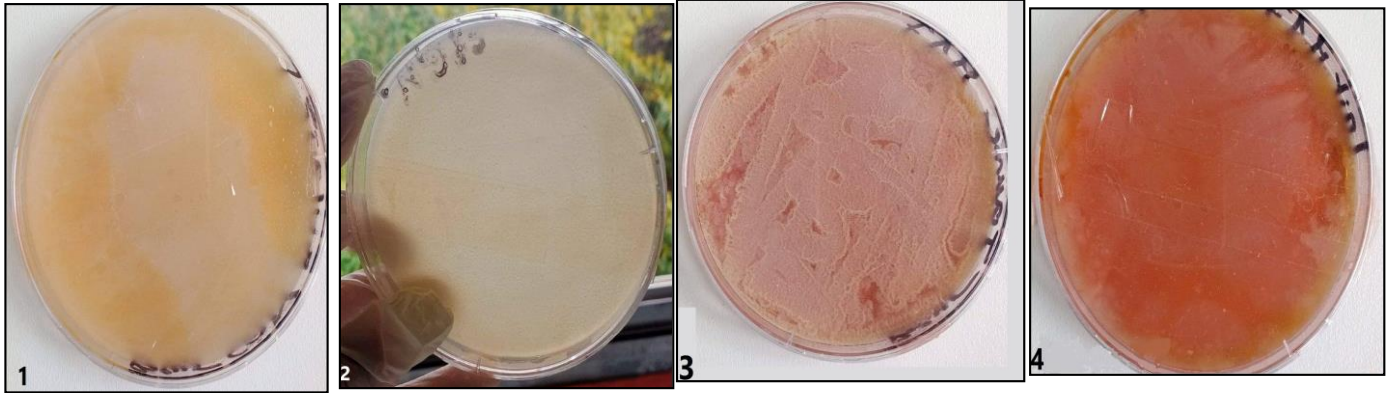


Figure 20 : Observation macroscopique des bactéries lactique après 72h .

1.*Lactobacillus plantarum* , 2.*Lactobacillus salvarius* , 3.*Lactobacillus pentosus* ,
4.*Leuco. mes.ssp. Mesenteroides /dext ranicum* .

1.9.2. Observation microscopique :

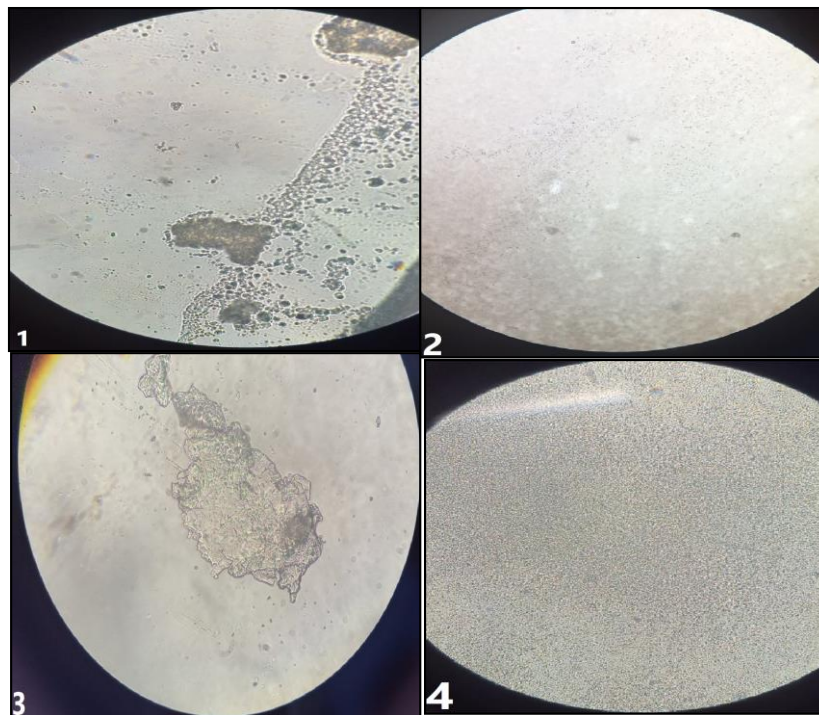


Figure 21: Observation microscopique des bactéries lactiques .

1. *Lactobacillus plantarum* , 2. *Lactobacillus salvarius* , 3. *Lactobacillus pentosus* ,
4. *Leuco. mes.ssp. Mesenteroides /dext ranicum* .

Tableau 12 : Résultat d'observation microscopique et test catalase.

SOUCHES	FORME	Mode de regroupement	Mobilité	CATALASE
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	Coccobacille	isolées	immobiles	-
<i>Lactobacillus salvarius</i>).	Cocci diplocoque	isolées	immobiles	-
<i>leuco. mes.ssp. Mesenteroides /dext ranicum</i> 2,	Cocci en chainette	en chainette	immobiles	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Coccobacilles	isolées	immobiles	-

1.10. Écouvillons :

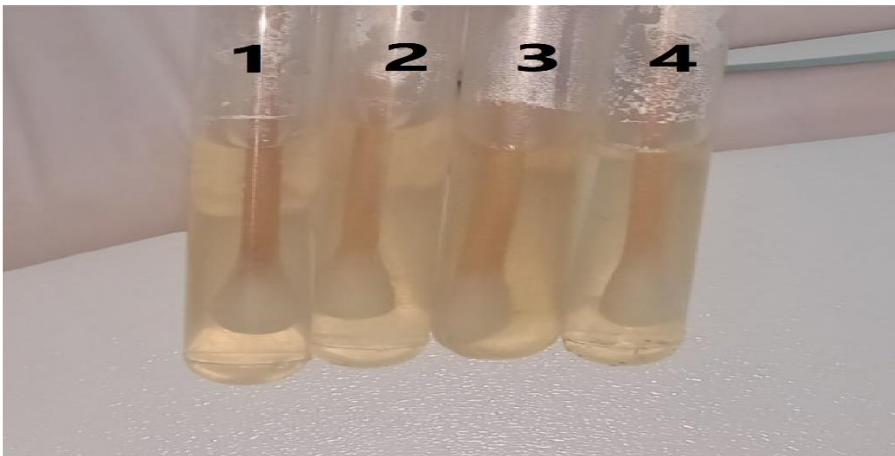


Figure 22: Observation macroscopiques des écouvillons des bactéries lactiques identifiées .

1.10.1. Confrontation directe (Bouillon nutritif-champignon) :

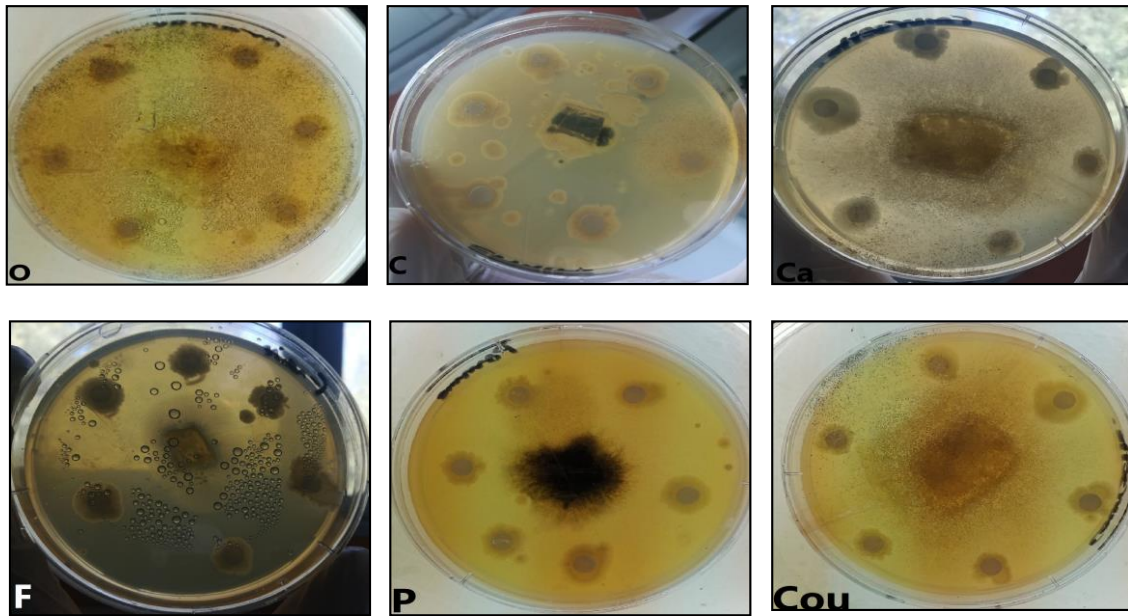


Figure 23: Résultat de la confrontation directe par méthodes des disques cylindre des champignons (bouillon nutritif-champignon)

O : *Aspergillus* / C : *Aspergillus* / Ca : *Aspergillus* / F : *Penicillium* / P : *Alternaria* /
Cou : *Rhizopus*

Tableau 13: Résultats de la confrontation directe (milieu d'enrichissement-champignon).

Champignons \ Surnageant	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Rhizopus</i>
<i>Lactobacillus salvarius</i>	-	+	-	+	+	-
<i>Leuco. mes.ssp. Mesenteroides /dextranicum</i>	-	+	-	+	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	+	+	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	-	+	-	+	+	-

(+) : Présence d'activité antifongique , (-) : Absence d'activité antifongique.

1.10.2. confrontation directe (surnageant- champignons) :

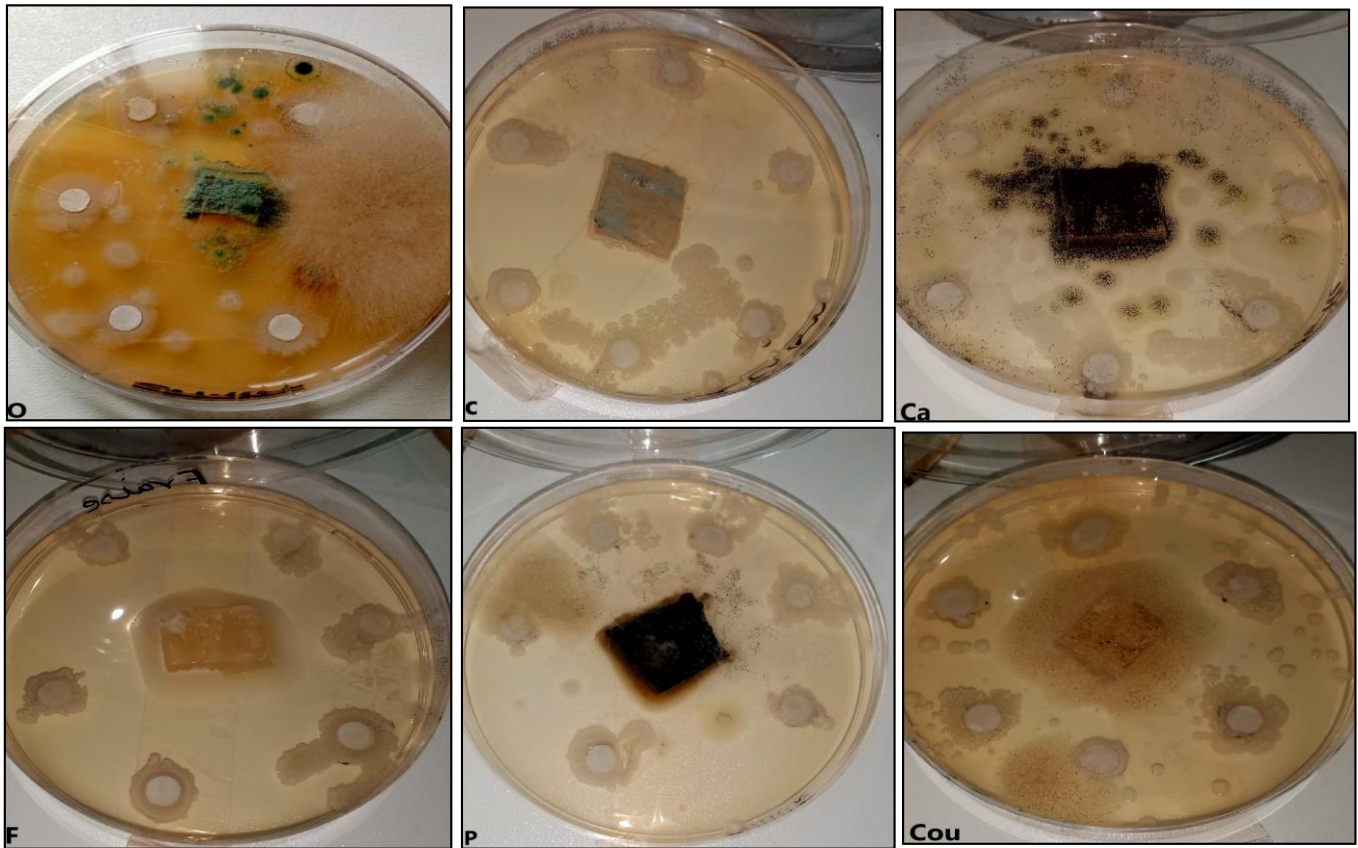


Figure 24 : Résultat de la confrontation directe par méthode des disques (surnageant- champignon)

O : *Aspergillus* / C : *Aspergillus* / Ca : *Aspergillus* / F : *Penicillium* / P : *Alternaria* /

Cou : *Rhizopus*.

Tableau 14 : Résultats de la confrontation directe (surnageant-champignon).

Champignons \ Surnageant	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Rhizopus</i>
<i>Lactobacillus salvarius</i>	+	+	-	+	-	+
<i>Leuco. mes.ssp. Mesenteroides /dextranicum</i>	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	+	-	-

Résultats et discussion

<i>Lactobacillus pentosus</i>	-	+	-	+	-	+
-------------------------------	---	---	---	---	---	---

(+) : Présence d'activité antifongique, (-) : Absence d'activité antifongique.

1.10.3. Milieu de fermentation :

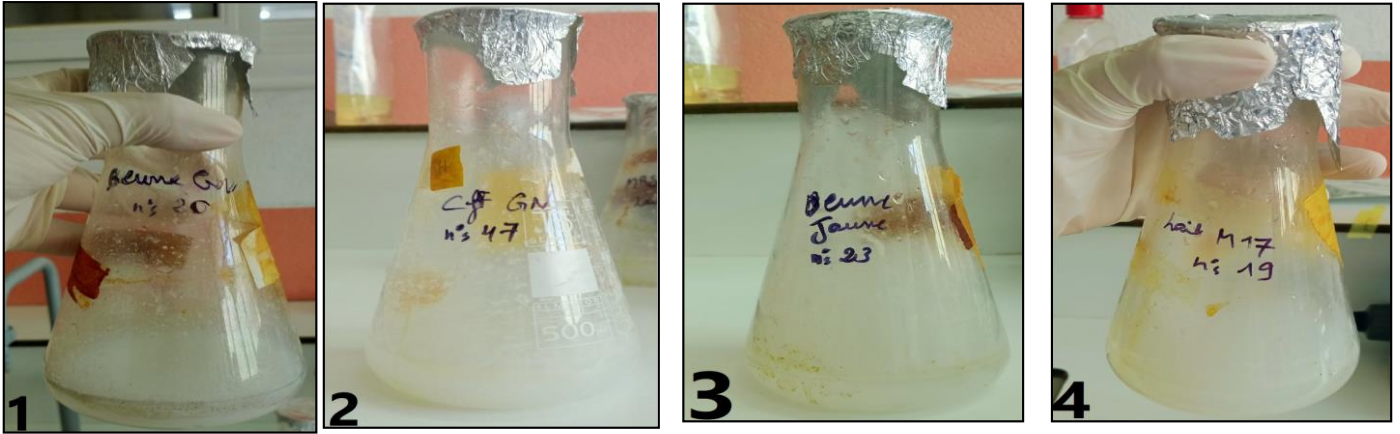


Figure 25 : lecture après 72 heures milieux de fermentation.

1.10.4. Résultats de test E 24 après 10 min :

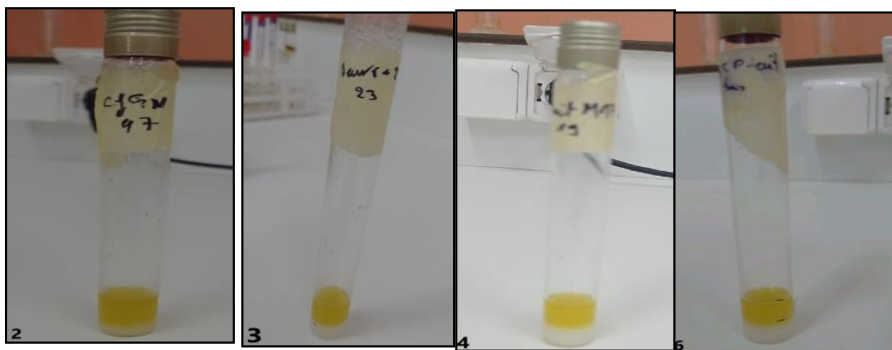


Figure 26: Résultat de test E24 après 10 min.

Tableau 15: Indice d'émulsion E24 pour les souches testées après 10 minutes.

Souche	Equation	Indice E24%
<i>Lactobacillus salvarius</i>	$(0.6/2.5) * 100$	24%
<i>Leuco. mes.ssp.</i> <i>Mesenteroides /dext ranicum</i>	$(0.6/2.1) * 100$	28.57%
<i>Lactobacillus plantarum</i>	$(1/2.5) * 100$	40%
<i>Lactobacillus pentosus</i>	$(1/2.2) * 100$	45.45%

1.10.5. Test E 24 après 24h :

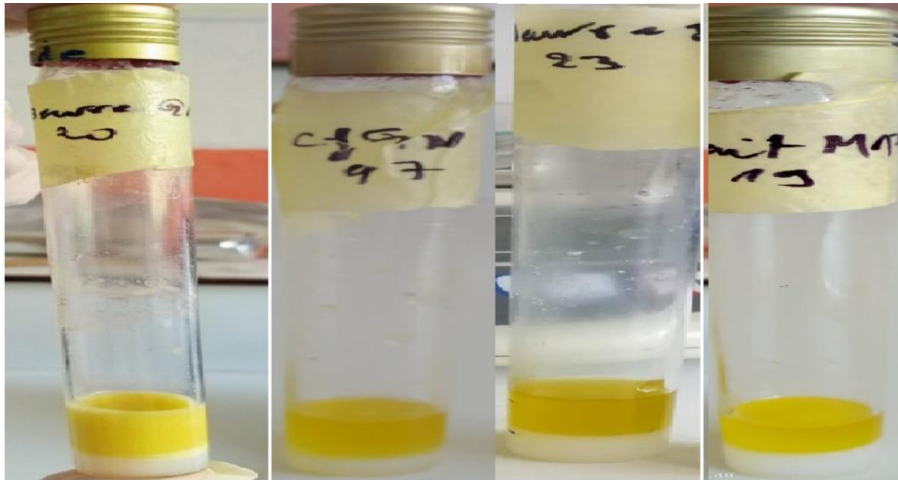


Figure 27 : Résultat de test E24 après 24 H.

Tableau 16 : Résultat de test E24 après 24 H.

Souche	Equation	Indice E24
<i>Lactobacillus salvarius</i>	$(0.7/2.4) * 100$	29.16%
<i>Leuco. mes.ssp.</i> <i>Mesenteroides /dext ranicum</i>	$(0.9/2.1) * 100$	42.85%
<i>Lactobacillus plantarum</i>	$(1.2/2.1) * 100$	57.14%
<i>Lactobacillus pentosus</i>	$(1.1/2.1) * 100$	52.38%

1.10.6. Déplacement et effondrement :

Tableau 17: Résultat des tests de déplacement et d'effondrement.

Tests	Effondrement	Déplacement
Bactéries		
<i>Lactobacillus salvarius</i>		

Résultats et discussion

<p><i>Leuco. mes.ssp.</i> <i>Mesenteroides /dext</i> <i>ranicum</i></p>		
<p><i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i></p>		
<p><i>Lactobacillus</i> <i>pentosus</i></p>		

Selon les résultats mentionnés dans le tableau , les 4 bactéries lactiques identifiées produisent des biosurfactants.

Discussion

Les champignons filamenteux phytopathogènes sont responsables de la détérioration de divers produits alimentaires, tels que les fruits ou les légumes, entraînant des pertes économiques importantes. Ils sont également capables de produire plusieurs mycotoxines dans les légumes et les fruits infectés, ce qui représente un risque sérieux pour la santé humaine et animale. Les bactéries lactiques (BL) sont considérées comme des antagonistes naturels de ces microorganismes dangereux, grâce à la production d'un grand nombre de composés aux propriétés antifongiques. Dans la présente étude, 04 (quatre) souches de BL identifiées *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus salivarius* et *Leuco.mes.ssp. Mesenteroides /dext ranicum* dont les sources sont lait pasteurisé, beurre du lait de vache et crème fraîche, avec 02(deux) souches non identifiées dont les sources sont fromage, lait cru de vache .

Elles ont été testées pour leurs activités antifongiques contre cinq souches du genre *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Absidia*, et *Penicillium* isolées du citron, orange, carotte,courgette, fenouil, pomme,pain et fraise par les méthodes de confrontation directe et indirecte.

Pour la méthode indirecte, aucune bactérie lactique n'est capable de synthétiser des composés organiques volatils, ce résultat concorde avec celui de **Laref (2014)**.

Nous avons pu sélectionner 06(six)souches bactériennes ayant une forte activité antifongique, en utilisant la confrontation directe par la méthode des puits ; les 2 (deux) souches de BL non identifiées (surnagent MRS L et surnagent 1) contre deux souches fongiques d' *Absidia*, *Penicillium* et les 4 (quatre) souches bactériennes (*Leuco.mes.ssp. Mesenteroides /dext ranicum* , *Lactobacillus plantarum* , *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus salivarius*) contre les souches fongiques *Alternaria*, *Aspergillus* et *Rhizopus*.

Les résultats de la confrontation directe par la méthode des puits et des disques montrent que l'inhibition de la croissance fongique observée sur les boîtes de pétri est très importante vu que les liquides cellulaire et acellulaire sont placés en même temps que l'ensemencement des champignons ciblés confirment ceux de **Laref (2014)** ; les souches utilisées dans son étude nécessitent une période d'incubation pour être capable d'inhiber la croissance fongique, il faut les utiliser avant la contamination parce que, une fois que la moisissure est établie, il est difficile de la contrôler, même à l'aide des bactéries lactiques à caractère antifongique.

Selon les résultats de **Sadiq (2019)**, la souche *Lactobacillus plantarum*, l'une des espèces les plus étudiée pour ses propriétés antifongiques, a montré une activité antifongique très faible contre l'espèce *Alternaria alternata*. Des résultats analogues de **Fowoyo (2015)**, ont montré qu'après 24h d'incubation, *Aspergillus niger* et *Rhizopus stolonifer* étaient inhibés par *Lactobacillus plantarum*. Mais cela n'empêche pas de dire que l'activité antifongique présentée par *Lactobacillus plantarum* a montré qu'elle est efficace contre l'élimination des champignons d'altérations.

D'après **Ouidir (2019)**, les criblages préliminaires de l'activité antifongique des 30 souches ont montré que certaines bactéries lactiques avaient un large spectre d'action, comme la souche *Lb. Plantarum* qui était antifongique contre les moisissures *A. tubingensis*, *A. fumigatus*, *T. stollii*, *A. flavus*, *P. formosus*, *F. verticillioides*, *M. racemosus*, *Y. lipolytica*, sur milieu MRS et MRSm.

Les résultats de la confrontation directe par la méthode des puits et des disques contenant les liquides acellulaire (surnageant) et cellulaire (milieu de fermentation)(voir **figures11, 23 et 24**) montrent une activité antifongique remarquable contrairement aux résultats de **Laref (2014)** qui ont montré que l'activité antagoniste de 06(six) souches de *Lactobacille* isolées du lait cru de chamelle, du carotte et de l'ensilage vis-à-vis d'*Aspergillus sp*, par la méthode de double couche et confrontation, présentaient une bonne inhibition fongique par contre aucune inhibition n'a été détectée par le surnageant.

Les résultats de **Tikoudane (2020)** confirment que les bactéries lactiques sont douées d'une activité antifongique contre différents champignons d'altération des denrées alimentaires, ces bio protectrices représentent un intérêt croissant comme alternative aux conservateurs chimiques.

Après l'analyse des travaux, il s'est avéré que les espèces *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici* et *Pediococcus pentosaceus* sont très actif contre *Candida spp.* et que la souche *Lactobacillus rhamnosus* utilisée seule ou en combinaison avec *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* est la meilleure candidate en bio conservation du fromage frais. Il a été démontré également que l'utilisation des bactéries lactique en combinaison ou culture mixte augmente leur activité antifongique le cas des combinaisons de *L. plantarum* avec soit *L. harbinensis* ou *L. rhamnosus* qui ont montré une amélioration importante de leur activité dans les produits laitiers.

Selon les résultats de **Jeong (2005)** , plus de 120 isolats de bactéries lactiques obtenus à partir de Kimchi ont été criblés pour leur activité antifongique contre *Aspergillus fumigatus*.

Environ 10% des isolats ont montré une activité inhibitrice et seulement 4,16 % (cinq) isolats ont montré une forte activité contre le champignon indicateur *A. fumigatus*. Les cinq isolats ont montré une large gamme d'activité antifongique contre *A. flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium commune* et *Rhizopus oryzae*. Ils ont été identifiés par séquençage de l'ADNr 16S comme *Lactobacillus cruvatus*, *L. lactis subsp. lactis*, *L. casei*, *L. pentosus* et *L. sakei*. L'effet de *Lactobacillus* sur la croissance mycélienne et la biomasse fongique ainsi que sa capacité à produire des composés toxiques ont été déterminés. Les résultats indiquent que les trois espèces, *Lactobacillus casei*, *L. lactis subsp. lactis* et *L. pentosus* sont actifs contre *A. fumigatus*.

Conclusion

Conclusion

L'utilisation des bactéries lactiques est largement reconnue comme une source naturelle de conservateurs qui améliorent la qualité sensorielle des aliments transformés et favoriser la santé des consommateurs.

Dans cette étude nous avons démontré que le lait cru de vache, le beurre de lait de vache et le lait en poudre Thi ka, lait pasteurisé, crème fraîche pouvaient être des bonnes sources d'isolement des souches des bactéries lactiques. Ayant la propriété d'inhiber la croissance des champignons phytopathogènes et d'altération alimentaire ils peuvent également être utilisées comme cultures bio protectrices dans plusieurs types d'aliments.

L'objectif est d'utiliser ces microorganismes dans la conservation de certains produits alimentaires périssables telles que les fruits et légumes.

Les résultats obtenus montrent un antagonisme remarquable des quatre bactéries lactiques identifiées *leuco. mes.ssp. Mesenteroides / dextranicum* , *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* , *Lactobacillus salvarius* et deux non identifiés , vis-à-vis des champignons d'altération des genres *Alternaria*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Absidia*, et *Penicillium* connus également pour leurs productions de différentes mycotoxines nocives aux humains et aux animaux.

Cette activité antifongique peut être lié aux métabolites secondaires excrétés par les bactéries lactiques comme les biosurfactants et les bactériocines.

En perspective, ces métabolites doivent être caractérisés par des techniques performantes et explorés pour des applications potentielles dans le domaine agroalimentaire.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Agrios G.N. 2001. Fitopatología. Second Edition. Limusa. Mexico, D.F. 809 p. 4.

Ammor M.S, Belen Florez A, Mayo B. 2007. Antibiotic resistance in nonenterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria, *Food Microbiology*, 24, 559-570.

B

Badis A, Guetarni D, Kihal M et Ouzrout R. 2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle ». *Sciences Technologie*. 23 : 30-37.

Benharoune M . et Hassini Z. 2020, Synthèse bibliographique sur la bio conservation de la viande de dromadaire par une substance antimicrobienne d'origine lactique (type nisine). *Qualité des produits et sécurité alimentaires*. Université Kasdi Merbah, Ouargla.

Besson F., Peypoux G., Michel and. Delcambe L. 1976. Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot.*, 29: 1043-1049.

Bodour A.A et Miller-Maier M.R. 1998. Application of a modified dropcollapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32: 273–280.

C

Chermette R., Bussieras J. 1993. Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.

Camporota P. 1985. Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kühn, *Agronomie*.

D

Delarras C. 2014. Pratique en microbiologie d'élaboration: Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier, Paris. 772P

De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E. 1960. A medium for cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.*, 23, 130–135

Dedi N. K. J. 2007. Inventaire des champignons d'une litière d'élevage et de substrats d'incubation d'oeufs d'*Achatina fulica* Bowdich influence sur le taux d'éclosion et la durée d'incubation. Diplôme d'Etudes Approfondies. Université d'Abobo-Adjamé 48p.

Drouault S. et Corthier G. 2000. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. Institut National de la Recherche Agronomique. 32 :101-117.

F

Fowoyo P.T. and Uzoma E.O. 2015. Studies on the Antifungal Activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* on Spoilage Fungi of Tomato Fruit. *Journal of Microbiology Research*. pp 95-100.

Francy D.S, Thomas J.M., Raymond R. L. and Ward C.H., 1991. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *Journal of Industrial Microbiology*, 8:237-246.

G

Ghasemi A, Marzieh M, Payam S, Gholamreza M and Gholamhossein Y, 2019, Biosurfactant Production by Lactic Acid Bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 Grown on Different Carbon Sources: Strain Screening Followed by Product Characterization, *scientific reports* P 12.

Gakpe E, Pattanathu K. S. M. R. et Hatha M. A.A., 2007 Microbial Biosurfactants Review. *J.Mar. Atmos. Res*, 3(2): 1-17.

Gerbaldo G.A, Barberisa C, Pascuala L, Dalceroa A, Barberisa L., 2012, Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties, *FEMS Microbiology Letter*, 332, 27-33.

Goswami, B. K. and Sharma, S. B. 2001. Application of *Aspergillus terreus* and *Paecilomyces lilacinus* for the management of *Meloidogyne incognita* on tomato. *International Journal of Nematology*, 11 (2), 270-273.

Guy L et Vierling E.2007. Microbiologie et toxicologie des aliments Hygiène et sécurité alimentaires, BIOSCIENCES ET TECHNIQUES collection dirigée par J. Figarella et A. Calas, 4 EDITION, Pays-Bas. 285 P.

H

Holzappel W.H and Wood J.B. (2014). Lactic Acid Bacteria, Biodiversity and Taxonomy. Wiley Blackwell UK. 30-257.

Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S., Tani A. and Maneerat S. 2011. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. Food Control., 22: 401-407.

J

Jeong-Dong Kim . 2005. Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi Against *Aspergillus fumigatus*. Mycobiology, 33(4): 210–214.

K

Khalid K. 2011. An overview of lactic acid bacteria. Int. J. Biosci. 1: 1-13.

Kosaric N and Velikonja, J. 1993. Biosurfactant in food applications. In Biosurfactants - production, properties and applications, ed Kosaric, N. pp. 419-446. New York: Marcel Dekker.

Kumar N, Narayanan R, Kavitha N. and Dhanalakshmi B. 2010, Plasmid profile of lactic acid bacteria with antifungal properties, Asian Journal of Food and Agro-Industry, 3, 229-235.

L

Laouamen Y., Fenchouch A., Boulahla S. et Bouleknafet A. 2021 . Effet antibactérien de quelques bactéries lactiques isolées localement à l'égard des bactéries pathogènes . Mémoire fin d'étude. Microbiologie appliquée. Université de Skikda .

Laref N. 2014. L'étude de l'activité antifongique des lactobacilles et leur effet sur la croissance d'*Aspergillus* sp, contrôle microbiologique et hygiène alimentaire. Th D université d'Oran. 96P

Logrieco A. , Moretti A. and Solfrizzo M. 2009. Alternaria toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. World Mycotoxin Journal. 2 (2): 129- 140.

M

Magnusson J, Ström K, Roos S, Sjogren J. and Schnürer J. 2003, Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 219, 129-135.

Mokoena M.P. 2017. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, 22(8): 1255.

Muhialdin J. 2011. Biopreservation of food by lactic acid bacteria against spoilage fungi, *Annals. Food Science and Technology*, 12.56.

Multon J.L. 1982. Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : Céréales, oléagineux, aliments pour animaux. Lavoisier Technique & Documentation, Paris Apria. Volume 1, 576p.

N

Ndagano D, Lamoureux T, Dortu C, Vandermoten S. and Thonart P. 2011. Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the *Weissella* genus isolated from food, *Journal of Food Science*, 76, 305-311.

Nicklin J, Graeme Cook K., Parget T. et Killington R. 2000. L'essentiel en microbiologie. Ed. Berti.p:211-217.

O

Ouiddir M. 2019. Etude de l'activité antifongique des bactéries lactiques et de la bio préservation des aliments, *Microbiologie appliquée, université Ahmed ben Bella*. 208.

P

Pawlowska A.M, Zannini E, Coffey A. and Arendt E.K. 2012. Green Preservatives, combating fungi in the food and feed industry by applying antifungal Lactic Acid Bacteria, In: Jeyakumar, *advances in food and Nutrition Research*, Elsevier, 244 pp

Peraica M, B. Radic, A. Lucic and M. Pavlovic. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9): p. 754-766.

Pitt J.I. A. 1988. laboratory guide to common *Penicillium* species *Commonw Scientif Ind Research Organisation*, North Ride Australia, 2nd ed 197 p.

Q

Quinto E.J, Jiménez P, Caro I, Tejero J, Mateo J. and Gírbés T. 2014. Probiotic lactic acid bacteria: A review. *Food Nutr. Sci.*, 5:1765–1775.

R

Ross R.P, Morgan S. and Hill C. 2002. Preservation and fermentation: Past, present and future, *international journal of food Microbiology*, 79 ,3-16.

Rouse S, Harnett D, Vaughan A. and Van Sinderen D. 2008. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods, *Journal of Applied Microbiology*, 104, 915-923.

S

Sadiq F.A, Yan B, Tian F, Zhao J, Zhang H, Chen W. 2019. Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, pp. 1403-1436.

Sharma, Deepansh;Singh Saharan and Baljeet. 2014. Simultaneous Production of Biosurfactants and Bacteriocins by Probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. *International Journal of Microbiology*.Vol. 2014, Issue 2014, pp.1-7

Shekh R, Upadhyay K, Singh S.M. and Roy U. 2009. Inhibition of *Candida albicans* and two selected Gram-negative pathogens by *Polar Enterococcus faecalis* and *Carnobacterium* sp., *Research Journal of Microbiology*, 4, 138-142.

Simmons E.G., 2007. *Alternaria. An Identification Manual.*: CBS Biodiversity Series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp.

Stiles M.E. and Holzapfel W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.

Stiles M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 333-345.

Ström K, Schnurer G. and Melin P. 2005. Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, Evaluation of effects on fungal growth and protein expression, *FEMS Microbiology Letters*, 246, 199-124.

T

Tailliez P. 2004. Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine, Antibiotiques, 6, 35-41.

Terzaghi B. and Sandine W. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl Microbiol 29, 807-813.

Tikoudan O. 2020. Activité antifongique des bactéries lactiques, microbiologie appliquée, Mohamed El Bachir El Ibrahimi- BBA.50.

V

Valerio F, Favilla M, De Bellis P, Sisto A, De Candia S. and Lavermicocca P. 2009. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products, Systematic and Applied Microbiology, 32,438-448.

Vandecasteele J. P. 2008. Petroleum microbiology. Editions Technip, France Paris, 816.

Y

Yao A.A., M. Egounlety L.P., Kouam, P. et Thonard P. 2009. Les bactéries lactiques dans les aliments ou les boissons amylacées de l'Afrique de l'Ouest , leur utilisation actuelle. Annales de médecine vétérinaire .153: 54-65.

Z

Zabouri Y .2021. Étude de l'activité antifongique des bactéries lactiques vis-à-vis des champignons phytopathogènes, science biologique, université Abd Alelhamid ibn Badis.157.

Annexe

Annexe A

Les milieux de culture :

➤ **Milieu de culture M17 :**

- Extrait de levure 2.5g
- Extrait de viande 5g
- Tryptone 2.5g
- Peptone papainique de soja 2.5g
- Peptone pepsique de viande 5g
- Peptone de caseine 10g
- Acide ascorbique 0.5
- Lactose 5g
- Glycérophosphate de sodium 19g
- MgSO₄ 0.25g
- Agar-agar 15g
- Eau distillée 1000 ml
- pH 7.1
- Stérilisation à 120 °C pendant 20 min.

➤ **Milieu de culture M.R.S (Man Rogosa et Sharpe) :**

- Extrait de viande 10g
- Extrait de levure 5g
- Acétate de sodium : 5g inhibiteur
- Phosphate dipotassique 2g
- Citrate d'ammonium 2g
- sulfate de magnésium 0.25g
- Sulfate de manganèse 0.05g
- Glucose 20g
- Tween 80 1ml : agent sélectif
- Eau distillée 1000 ml
- pH 5
- Stérilisation à 120 °C pendant 20 min.

➤ **Milieu de culture Gélose nutritive:**

- Extrait de viande 1 g
- Extrait de levure 2g
- Peptone 5g
- Chlorure de Sodium 5g
- Agar15g
- pH=7.4
- Stérilisation à 120 °C pendant 20 min.

➤ **Eau physiologique :**

- Chlorure de sodium 8.5 g
- Peptone 0.5g
- Eau distillée 1000ml
- Stérilisation à 120 °C pendant 20 min.

➤ **Milieu Extrait de malt agar :**

- Extrait de malt 30g
- Agar 15g
- pH=5.5
- Eau distillée 1000ml
- Stérilisation à 120 °C pendant 20 min.

➤ **Milieu de culture Sabouraud:**

- Peptone 10 g
- Glucose 20 g
- Agar-agar 15 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH = 6

➤ **Milieu de culture DG18 (Dichloran – Glycérol) :**

- Tryptone 5g
- Glucose 10g
- sulfate de magnésium 0.5g

-
- Phosphate monopotassique 1g
 - Dichloran(dichloro-2.6-nitro-aniline) 0.002g
 - Chloramphénicol 0.10g
 - Agar 15g
 - pH= 5.6
 - Conservation dans un flacon : 2 – 8 °C à l'obscurité.

➤ **Milieu PCB** (Pomme de terre- carotte- bile)

- Pulpe de pomme de terre 20 g
- Pulpe de carotte 20 g
- Eau distillée 1000 ml
- Macérer une heure, bouillir cinq minutes puis filtrer.
- Ajouter Agar 20 g
- Stériliser vingt minutes à 115°C et refroidir à 45°C.