EFFET INHIBITEUR DES ESPECES DE *Lactobacillus* ISOLEES DU LAIT CRU DE CHEVRE, SUR LA CROISSANCE DE *Staphylococcus aureus*

Anas MAMI *, Bettache GUESSAS*, Jamal Eddine HENNI* et Mabrouk KIHAL*
**Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Departement de Biologie,*
Faculté des Sciences, Université d'Oran, BP 16, Es-senia, 31100, Oran, Algérie.
Corresponding author : Pr Kihal Mebrouk (Kihalm@hotmail.com)

RESUME
La contamination des aliments est un problème majeur pour le consommateur surtout dans la période estivale dans les pays chaud. L'exploitation des interactions bactériennes est un nouveau moyen pour lutter contre ces germes pathogènes. La détection de bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes vis-à-vis des germes indésirables fait l'objet de ce travail. Les méthodes microbiologiques et biochimiques ont été utilisées pour identifier les bactéries présentant une activité antimicrobienne. Neuf isolats de bactéries lactiques ont été identifies à partir du lait cru de chèvre dans les régions ouest d'Algérie. Les espèces dominantes appartenant au genre Lactobacilles sont : *Lb. rhamnosus, Lb. plantarum, Lb. casei, Lb. paracasei subsp. Paracasei, Lb. acidophilus, Lb. delbrueckii subsp lactis, Lb. fermentum, Lactobacillus paraplantarum et Lactobacillus sakei subsp. sake*i. L'étude des interactions a révélé la capacité de trois espèces *Lb. Plantarum* (58), *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (55) et *Lb. rhamnosus* (68) à inhiber *Staphylococcus aureus*. En culture mixte après 24 heures, Lb. plantarum réduit considérablement la croissance de *Staphylococcus aureus* de 1,6 log et devient nulle après 72h. Les différents tests révèlent la nature protéique de cette substance impliquée dans l'inhibition de *Staphylococcus aureus*.

Mots clés : *lait cru de chèvre, bactéries lactiques, interaction, bactériocine, Staphylococcus, culture mixte.*

Inhibition Effect of *Lactobacillus* species isolated from raw goat's milk on the growth *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT
The food contamination is a major problem for the consumer especially during the summer period in the hot countries. The bacterial interactions exploitation is a new strategy to fight against these pathogenic microorganisms. The objectif of this study was to characterize Lactobacillus sp isolated from raw goat's milk which can produce an anti-microbial substance toward the growth of *Staphylococcus aureus*. The microbiological and biochemical methods were used to identify the isolates of lactic acid bacteria which have an antimicrobial activity. 11 isolates of lactic acid bacteria were identified and belonging to Lactobacillus species. The dominant species are: *Lb. rhamnosus, Lb. plantarum, Lb. casei, Lb. paracasei* subsp. *paracasei, Lb. acidophilus, Lb. delbrueckii* subsp. *lactis, Lb. fermentum, Lactobacillus paraplantarum and Lactobacillus sake*i subsp. *sakei*. The study of the interactions revealed the capacity of three strains *Lb. plantarum (58), Lb. paracasei subsp. paracasei (55) and Lb. rhamnosus* (68) which can inhibite *Staphylococcus aureus.* In mixed culture with *Lb.*

plantarum the growth of Staphylococcus aureus was 1.6 log cfu/ml after 12 h and no growth was observed after 72 h of incubation. The chemical characterization of inhibiting substance of Staphylococcus aureus revealed the protein nature.

Key words: *goat's milk, lactic acid bacteria, interaction, bacteriocin, Lactobacillus, Staphylococcus, mixed culture.*

INTRODUCTION :

La pasteurisation la fermentation et la réfrigération ne constituent pas une garantie suffisante pour lutter contre la contamination microbienne. L'emploi excessif ou non contrôlé des additifs chimiques peut engendrer des risques sanitaires pour le consommateur. Actuellement les travaux scientifiques sont axés sur l'exploitation des interactions microbiennes pour réduire d'une façon considérable la présence des microorganismes indésirables. Dans cet ordre d'idée, les bactéries lactiques ont un effet protecteur des aliments dû à la production des composés organiques (Desmazeaud et Cogan, 1996 ; Cocolin *et al.,* 2007). Récemment, la découverte des bactériocines a donné un élan pour le développement des aliments de meilleure qualité sanitaire (Fitzsimmons *et al*., 1999, Badis *et al.,* 2004,). La recherche de nouvelles souches de bactéries lactiques productrices de substances anti-microbiennes est un objectif universel pour la création d'un levain lactique destinée à une meilleure bio-préservation des aliments. L'inhibition des germes pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* par la microflore lactiques a été signalée par Heikkila et Saris (2003). La caractérisation technologique des bactéries lactiques conduit au développement de souches bactériennes bien définies et avec des caractères spécifiques. Ces derniers remplacent progressivement les mélanges non définis traditionnellement employés en industrie laitière (Crow *et al*., 1993). Afin d'éviter l'effet secondaire des conservateurs chimiques, de ces dernières années, l'intérêt de l'utilisation des bactériocines ou des souches de bactéries lactiques productrices pour des applications comme bio-préservatrices a suscité beaucoup de travaux de recherches (Schillinger et Lücke, 1989; Budde *et al*., 2003; Jacobsen *et al*., 2003; Vermeiren *et al*., 2004, Cocolin et al., 2007 ; Alvarez-Martin *et al.,* 2008).

Le but de ces travaux est l'isolement des souches de bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes type bactériocine capables d'inhiber les bactéries impliquées dans les intoxications alimentaires en Algérie, en période des saisons estivales.

MATERIELS ET METHODES :

Provenance des bactéries pathogènes et conditions de croissance:

Les espèces de *Lactobacillus* proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée, département de biologie, faculté des sciences, université d'Oran, Algérie. Les trois bactéries pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923*, Escherichia coli* ATCC 25921 et *Bacillus sp*) proviennent de la collection du laboratoire d'analyse médicale du centre hospitalier universitaire (CHU) d'Oran.

Les espèces de lactobacilles sont ensemencées sur milieu MRS liquide et solide à (pH 5,4) ensuite elles sont incubées à 30°C entre 24 à 72h (De Man *et al.,* 1960). Le dénombrement sélectif de

Staphylococcus aureus est réalisé sur milieu Chapman à 37°C (Kaban et Kaya 2006). Les autres bactéries, *Escherichia coli* et *Bacillus* sp ont été ensemencées sur milieu Muhler et Hinton et incubé à 37°C. Les milieux utilisés au cours de ce travail étaient soit des milieux liquides, soit des milieux solides (1.5% agar p/v) et semi solide (0,7% agar p/v). La stérilisation des milieux est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20min. Le milieu lait écrémé (11% p/v) est stérilisé à 110°C pendant 10 min (Moulay *et al*., 2006). Les isolats retenus sont tous Gram positifs et catalase négatifs. L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une culture dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram. L'identification des espèces de lactobacilles retenues est réalisée par les tests physiologiques biochimiques (Badis *et al.*, 2004; Laouabdia *et al*., 2007).

Mise en évidence des inhibitions inter bactériennes :

La recherche d'éventuelle production de substances inhibitrices par les bactéries isolées est réalisée selon deux méthodes :
La méthode directe de Tagg et McGiven (1971) et Tahara et Kanatani (1996)., qui consiste à cultiver les deux souches dans le même milieu en double couche. Sur du MRS solide tamponné et à partir des cultures jeunes des souches de bactéries lactiques avec le multipoint on ensemence les souches productrices qui sont ensuite incubées à 30°C pendant 24h. Après apparition des colonies une surcouche de culture bactérienne test est versée sur les colonies. La confrontation entre les mêmes espèces permet de détecter la présence de bactériocines. L'activité antimicrobienne vis a à vis des bactéries pathogènes est réalisée en inoculant 0,1ml de cultures jeunes (18 h) de bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus, Bacillus sp. et Escherichia coli)* dans 7,5 ml du milieu semi solide de Muller Hinton (0,7% d'agar). Après solidification du milieu, les boites de Pétri sont incubées à 28°C pendant 48h. La présence d'une zone clair autour des colonies, indiquant l'absence de croissance de la souche test, est mesurée (Tahara et Kanatani, 1996, Kaban et Kaya 2005 et Guessas *et al*., 2006).-
La méthode indirecte de Barefoot *et al*. (1983) et de Shillinger et Lucke (1989), cette méthode permet de mettre en contacte le surnageant de la souche lactique productrice de substances antimicrobiennes avec la souche test. Les souches productrices de substances inhibitrices sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées pendant 18 heures. Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 tr/mn 10 min) et le surnageant est conservé à 4°C. Dans une boite de Pétri contenant du MRS solide et ensemencé par la souche test, des puits sont réalisés avec un emporte pièce. Ces puits recevront 100 µl du surnageant de la souche à testée et les boites sont incubées pendant 24 à 48 heures sont entourés d'une zone claire dans la nappe de culture de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive (Miteva *et al.*, 1998; Guessas, 2007).

Détermination du Spectre d'activité.

La méthode de confrontation directe de Shillinger et Lucke (1989) et de Sookkhee *et al.*, (2001) a été utilisée pour la détermination du spectre d'activité des souches productrices de substances antimicrobiennes. Les espèces productrices retenues appartiennent aux genres *Lactobacillus* (58, 68 et 55) tandis que les espèces tests appartiennent aux bactéries gram négative *Escherichia coli*, et aux bactéries gram positive non sporulé

Staphylococcus aureus et sporulée *Bacillus* sp.

Caractérisation de la nature de l'agent inhibiteur:

Comme les inhibitions peuvent être causées par plusieurs agents tels que l'acidité, le peroxyde d'hydrogène, les phages et les bactériocines. La recherche de la nature de l'agent inhibiteur a été entamée en milieu solide et liquide. Les souches ayant montrées une forte activité inhibitrice on été alors sélectionnées puis testées par la méthode de Tagg et McGiven (1971) en présence d'un milieu tamponné à pH = 7, de la catalase (à raison de 2 mg/ml), d'enzymes protéolytiques (la trypsine et l'α–chymotrypsine). Nous avons utilisés le filtrat concentré 10 fois est traité de la même manière qu'en milieu solide chauffé à 100°C pendant 30 mn.

Cinétique de croissance et d'acidification :

L'évaluation de l'acidité, produite par les souches pures, est réalisée par titrimétrie et par pH -métrie. Chaque souche est ensemencée dans 10 ml de lait écrémé (10% p/v) stérile. Les précultures sont préparées par incubation à 30°C jusqu'à coagulation. 3% de la préculture et transvasées stérilement dans 100 ml de lait écrémé qui est homogénéisée. Le mélange est répartit dans des tubes stériles à raison de 10 ml/tube. Les cinétiques de croissance et d'acidification sont réalisées simultanément aux intervalles en temps réguliers, 0h, 3h, 6h, 9h, 14h, 18h, 20h, 24h, 48h et 72h.

Staphylococcus aureus ATCC.25923 est utilisée comme souche pathogène test qui est inoculée à raison (2 ml dans 100 ml de lait) environ 10^3 ufc/ml**.** Des prélèvements à des temps réguliers suivit de dilution décimale dans l'eau physiologique ont permis de suivre l'évolution de la cinétique de croissance et de production d'acide lactique en milieu lait.

Dosage de l'acidité :

Un prélèvement de 10 ml de la culture est transféré dans une fiole conique de 100 ml et 5 gouttes d'une solution de phénophtaléine (2 mg/ml dans l'éthanol 60°) sont ajoutées. La neutralisation de l'acidité par NaOH 1/9N jusqu'à apparition d'une couleur rose persistante et on note le volume de la solution titrante indiquant ainsi l'acidité produite estimée en degré Dornic (Kihal *et al.,* 1996).

Mesure de la cinétique croissance en culture pure et mixte dans le lait :

Des prélèvements à des temps réguliers subissent des suspensions de dilutions décimales dans l'eau physiologique. 0,1 ml de la dilution convenable sont ensemencées sur milieu MRS acidifié pour le dénombrement des lactobacilles. Le dénombrement de *Staphylococcus aureus* est réalisé sur milieu Chapman. Seulement les boites contenant entre 30 à 300 colonies sont prises en compte (Guessas *et al.*, 2006, Kaban et Kaya 2006; Otero et Macias 2006). Le dénombrement en culture mixte se fait par l'encensement de 0,1 ml de la dilution convenable dans les deux milieux sélectifs MRS acidifié pour

les lactobacilles et Chapman pour *Staphylococcus aureus*.

Effet de l'extrait brut de *Lactobacillus plantarum :*

L'effet de l'extrait brut de *Lactobacillus plantarum* 58 a été testé vis-à-vis de la croissance de *Staphylococcus aureus*. L'extrait brut de cette souche est obtenu par une centrifugation à 8000 tours/min pendant 10 minutes d'une culture de 18h en milieu MRS pH 6,8. Le surnageant est chauffé à 100°C pendant 5 min afin d'éliminer les cellules viables. L'activité résiduelle de l'extrait brute est immédiatement testée après refroidissement et neutralisation du pH par NaOH. Le test consiste à déterminer la concentration minimale inhibitrice de *Staphylococcus aureus*. Après incubation des différentes dilutions, la lecture de la croissance est estimée par la lecture de la densité optique au spectroscope (Le Blay *et al.*, 2007).

RESULTATS ET DISCUSSION :

Le nombre 64 souches de *Lactobacillus* e été isolé. La détection des souches productrices de substances antimicrobiennes est réalisée par confrontation sur milieu solide et 11 souches ont montré une activité inhibitrice. Ces dernières ont été identifiées par les méthodes microbiologique et biochimiques, en appliquant les étapes décrites par Carr *et al.*, (2002).

Caractérisation des isolats

Pour les souches testées des petites colonies d'environ 1mm de diamètre, de forme lenticulaire de couleur blanchâtre ou laiteux, avec une surface lisse et un pourtour circulaire régulier ont été observé sur milieu solide. L'examen microscopique révèle que les souches testées étaient gram positif, sous formes de bâtonnets isolés, en paires ou en chaînes (Tab. 1).

Tableau 1 : Les caractéristiques phénotypiques et le pourcentage de fiabilité des isolats de lactobacilles isolés du lait cru de chèvre.

Code de la souche	Forme cellulaire	Mode d'association	Espèce du genre *Lactobacillus (Lb.)*	Pourcentage de fiabilité
2	Bâtonnet	En chaîne et en diplobacille	*Lb. acidophilus*	90%
7	Bâtonnets courts	En chaîne et en diplobacille	*Lb. fermentum*	75%
13	Bâtonnets fins et longs	En chaîne et en palissade	*Lb. casei*	50%
22	Bâtonnets courts	En chaîne et en diplobacille	*Lb. delbruekii* subsp. lactis	64%
31	Bâtonnet	En chaîne et en diplobacille	*Lb. sakei* subsp *sakei*	90%
52	Bâtonnets courts	En chaîne et en diplobacille	*Lb. rhamnosus*	67%
54	Bâtonnets courts	diplobacilles	*Lb. rhamnosus*	67%
55	Bâtonnet	diplobacilles	*Lb. paracasei* subsp. *paracasei*	64%
55*	Bâtonnet	Isolés et en diplobacille	*Lb. paraplantarum*	82%
58	Bâtonnets courts	En chaîne et en diplobacille	*Lb. plantarum*	55%
68	Bâtonnets courts	En chaîne et en diplobacille	*Lb. rhamnosus*	73%

Tableau 2: Les caractères physiologiques et biochimiques des souches de Lactobacillus ayant une activité antimicrobienne, isolées du lait cru de chèvre.

	Code des souches	Gram	Catalase	Arginine	Croissance 15/45	Production De gaz	Acetoine	Esculine	Galactose	Fructose	Arabinose	Raffinose	Mannose	Mannitol	Maltose	Xylose	Cellobiose	Sucrose	Ribose	Saccharose	Mélibiose	Sorbitol	Glucose	Lactose
Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei	**55**	+	-	-	+/+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Lactobacillus paraplantarum	**55***	+	-	-	-/-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactobacillus acidophilus	**2**	+	-	-	-/+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Lactobacillus delbrukii* subsp *lactis	**22**	+	-	-	-/+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
Lactobacillus sakei* subsp *sakei	**31**	+	-	-	+/-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Lactobacillus rhamnosus	**54**	+	-	-	+/+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Lactobacillus rhamnosus	**52**	+	-	-	+/+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Lactobacillus fermentum	**7**	+	-	+	-/+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Lactobacillus rhamnosus	**68**	+	-	-	+/+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Lactobacillus plantarum	**58**	+	-	+	+/-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactobacillus casei	**13**	+	-	-	+/-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+

Cette observation permet de classer les bactéries selon le gram, leurs morphologies cellulaires et leur mode d'association (Joffin et Leyral, 1996). Sur la base des résultats de l'analyse microbiologique (phénotypique, physiologique et biochimique) (Tab. 2), on a pu établir le pourcentage de fiabilité de chaque souche avec les souches de références puis déterminer la plus proche espèce aux caractères similaires (Stiles *et al.*, 1998, Klein *et al.* 1998 et Carr *et al*,. 2002).

Inhibitions entre les bactéries lactiques

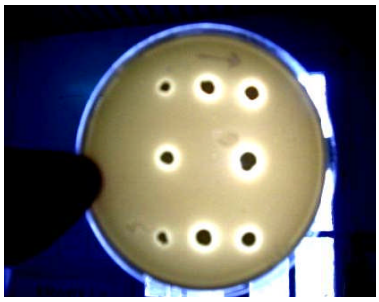
Les 06 espèces retenues et testées pour leur activité antimicrobienne sont: *Lactobacillus plantarum* (01), *Lactobacillus rhamnosus* (03), *Lactobacillus acidophilus* (01), *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* (01), *Lactobacillus casei* (01), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (01).

Le tableau 3, et la figure 1 illustrent l'ensemble des interactions. Nous remarquons que les lactobacilles possèdent un spectre d'activité inhibitrice très varié. Certaines *Lactobacillus* ont inhibé un nombre de souches égale ou inférieure à 3. C'est le cas de *Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus rhamnosus*. Les souches sensibles les plus inhibées appartiennent à *Lactobacillus plantarum* et l'espèce la plus inhibitrice est *Lactobacillus plantarum (58).*

L'activité inhibitrice des lactobacilles peut avoir deux origines; la première est la production d'acide lactique et/ou acétique; en effet, les lactobacilles sont connus pour une grande résistance aux pH acides (jusqu'à un pH voisin de 3.5) contrairement aux autres genres de bactéries lactiques (Wong, et Chen, 1988; Podolak *et al*., 1996; Wilson *et al*., 2005); alors que le deuxième provient de la production de substance organiques et probablement des bactériocines (Larsen *et al*. 1993; Oyetayo *et al*., 2003; Avila *et al*., 2005, Cocolin *et al.,* 2007).

Tableau n°3 : Les interactions entre les différentes souches retenues, les souches ensemencées en touches (spot) sont des bactéries lactiques (en colonnes), les souches test (bactéries lactiques) sont ensemencées en surfaces, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en **mm** dans le milieu de culture tamponné **:**

Code des souches	58	55	68
58	0	7	5
55	8	3	5
68	6	3	4
2	6	4	2
13	3	3	5
52	4	7	2
31	7	4	3
54	5	4	5



13	**68**	**2**
52		**55**
58	**31**	**54**

Figure 3 : Les interactions entre les isolats du genre *Lactobacillus* (Souche **58**) *Lactobacillus plantarum* sur milieu solide tamponné.

Production de peroxyde d'hydrogène :

Le peroxyde d'hydrogène est, depuis longtemps, reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celle des lactobacilles. Les bactéries lactiques sont généralement catalase négative mais certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène lorsqu'elles sont cultivées en aérobiose ou en micro aérobiose (Juillard *et al,* 1987).

Le niveau d'accumulation varie selon la souche bactérienne, il peut être auto-inhibiteur révélant une activité plus intense des réactions génératrices de peroxyde d'hydrogène que des réactions peroxydasique provoquant son élimination (Juillard *et al.*, 1987).

Suite aux résultats de l'inhibition due à la production d'acide et de peroxyde d'hydrogène on constate que certaines inhibitions sont dues à d'autres facteurs:

1. L'inhibition uniquement par l'acidité : aucune souche
2. L'inhibition par le peroxyde d'hydrogène: *Lactobacillus plantarum* (58), *Lactobacillus rhamnosus (*68, 52, 54*), Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei (*55*).*
3. L'inhibition par l'acidité et le peroxyde d'hydrogène : aucune souche
4. L'inhibition due à un autre agent inhibiteur une bactériocine-like: *Lactobacillus plantarum* (58), *Lactobacillus sakei* subsp. *Sakei* (31), *Lactobacillus acidophilus* (2), *Lactobacillus casei* (13).

Les phages peuvent être l'origine des inhibitions dans la croissance bactérienne (McGrath *et al.*, 2002 et Lewis *et al,* 1991). Le test des phages s'est révélé négatif pour l'ensemble des souches, aucune plage de lyse n'est apparue après incubation.

Les substances actives sont donc épuisées au cours de l'action antibactérienne, ce qui n'exclut pas la production d'acides (Deegan *et al*, 2006), de peroxyde d'hydrogène (Piard et Desmazeaud**,** 1991), de diacétyle (Condon, 1987) et ou de substances de type bactériocines (Alexandre *et al*, 2002) par les souches de *Lactobacillus*.

L'effet des enzymes protéolytiques sur la substance inhibitrice :

Comme les bactériocines sont de nature protéique, les réponses obtenues après l'action des enzymes protéolytiques (trypsine et α-chymotrypsine) nous permettra d'identifier les la nature des substances antibactériennes. Si la zone d'inhibition disparaît en présence de l'action d'une enzyme protéolytique, l'agent inhibiteur est de nature protéique (Callewaert et de Vuyst, 2000; Aslim *et al*, 2005). Cependant, s'il persiste après l'action des deux enzymes utilisées, il y a une forte probabilité pour que l'agent ne soit pas de nature protéique. L'effet des diverses enzymes protéolytiques utilisées est montré dans la figure 2 et le tableau 4.

Tableau n°4 : Révèle l'action des enzymes protéolytiques et le traitement thermique sur l'activité antimicrobienne des extraits bruts vis-à-vis de la croissance de S*taphylococcus aureus*.

Souches	α-chymotrypsine	Trypsine	Traitement thermique 100°C
58	-	-	+
68	-	-	-
55	-	-	-
52	-	+	-
54	-	-	-
31	-	+	-
2	-	-	-
13	-	-	-

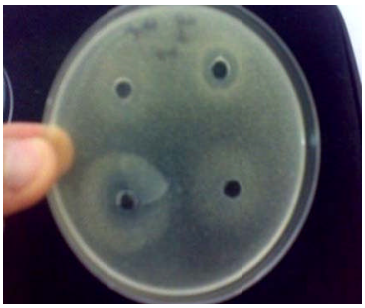


Figure 2 : Révèle l'action des enzymes protéolytiques et le traitement thermique par l'apparition ou l'absence des zones d'inhibition du à l'arrêt de la croissance de S*taphylococcus aureus*.

La perte de l'activité antimicrobienne après traitement avec les enzymes protéolytiques indique la sensibilité des composés actifs secrétés par les souches à l'action des enzymes protéolytiques.

Pour les souches performantes testées pour leur nature d'agent inhibiteur. On a pu remarquer que parmi les huit souches inhibitrices motionnées dans le **tableau 4,** les souches **58, 68, 55, 54, 52** et **13** permettent de suggérer que l'activité antagoniste est due à une substance de nature protéique ou peptidique. Des résultats similaires on été rapportés par Schved *et al*. (1993) au cour de leurs recherches sur la nature des agents inhibiteurs de types bactériocines. En revanche, pour les souches **(52** et **31)** nous avons noté une zone d'inhibition autour de l'enzyme de la trypsine ce qui reflète une sensibilité de cet agent inhibiteur aux enzymes protéolytiques.

Cette sensibilité partielle, déjà observée, peut s'expliquer par soit :

L'agent inhibiteur est protéique et le clivage enzymatique conduit à un fragment qui garde une activité inhibitrice partielle.

L'agent inhibiteur est une protéine conjuguée et l'activité inhibitrice est portée par la partie non protéique : dans ce cas les enzymes effectuent la configuration structurel de la partie protéique ce qui réduit l'activité antagoniste.

1. Peroxyde d'hydrogène et substance protéique cas de la souche **(31)** *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei*.

2. Acidité, peroxyde d'hydrogène et substance protéique pas de cas observée.

3. Substance protéique uniquement cas de la souche **(52** et **31)** *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* respectivement.

L'agent inhibiteur est résistant uniquement à une seule enzyme:

- l'α-chymotrypsine aucune souche
- la trypsine cas de deux souches : **52 et 31**
- l'agent inhibiteur est sensible aux deux enzymes ca s de : **58, 68, 55, 54, 2 et 13.**

La substance protéique produite par **52** et **31** est sensible à l'α-chymotrypsine et mais résistante à la trypsine.

La spécificité de l'action des bactériocines parmi les bactéries à $Gram^+$ est fonction des caractéristiques des souches: composition des protéines et des phospholipides membranaires et de la couche de peptidoglycane. L'incapacité des bactériocines à traverser cette barrière est due à leur poids moléculaire et/ou à leurs propriétés hydrophobes (Schved *et al*., 1994). Dans le cas où la membrane externe est rendue perméable, par un traitement physique (Kalchayanand *et al*., 1992), ou par un traitement chimique (Stevens *et al*., 1991 ; Schved *et al*., 1994), les bactéries Gram négatives deviennent sensibles aux bactériocines.

D'autres bactériocines de lactobacilles possèdent un champ d'activité pouvant regrouper n'importe quel genre de bactérie Gram positive : ce sont par exemple les plantaricines C19, A et B (*Lb. plantarum* C19, C-11 et NCDO1103) (Nettles et Barefoot, 1993).

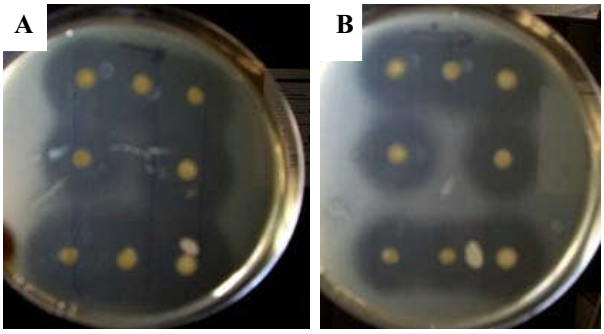
Les substances antimicrobiennes produites par les souches bactériennes isolées du lait cru de chèvre répondent aux critères retenus par Klaenhammer (1988) et peuvent donc être

considérées comme des bactériocines. C'est le cas des substances inhibitrices produites par *Lb*. *plantarum* **(58)**
Lors de la caractérisation des bactériocines, des variations importantes dans les spectres d'activité sont constatées. Il est également noté que la sensibilité d'une souche dépend du genre, de l'espèce et même de la sous-espèce. Ces variations de sensibilité sont dues aux caractéristiques des souches (présence ou absence de sites récepteurs) et donc aux niveaux de lésions occasionnées par le facteur inhibiteur (Kalchayanand *et al.*, 1992).

L'action des lactobacilles sur la croissance de *Staphylococcus aureus* **sur milieu solide :**

Les résultats obtenus dans l'interaction entre les lactobacilles les plus performantes montrent une inhibition de 8 souches (Figure 3). Les souches utilisées dans l'interaction souches test à Gram$^+$ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp*, et à Gram$^-$ *Escherichia. coli* comme pathogène (Tab. 5).

Staphylococcus aureus



13	**68**	**2**
52		**55**
54	**31**	**58**

Figure 3 : Illustre l'activité inhibitrice vis-à-vis de *Staphylococcus aureus p*ar l'apparition des zones claires autour des colonies en milieu non tamponné **A** et en milieu tamponné **B**.

Tableau 5: représente les résultats des interactions par le diamètre de la zone d'inhibition en mm sur milieu non tamponné (MNT) et sur le milieu tamponnée (MT) entre les souches de *Lactobacillus* et les espèces pathogènes.

Souches	***Staphylococcus aureus***			***Bacillus sp***			***Escherichia coli***		
	MNT	**MT**	**%**	**MNT**	**MT**	**%**	**MNT**	**MT**	**%**
58	28	20	**28.5**	26	11	**57.7**	14	10	**28.5**
68	19	14	**26.3**	26	13	**50**	13	10	**23**
55	21	15	**28.5**	25	13	**48**	11	11	**0**
52	15	15	**0**	25	14	**44**	11	6	**36**
54	25	14	**44**	24	10	**58**	16	7	**56**
31	25	12	**52**	26	12	**53.8**	12	7	**41**
2	16	15	**6.25**	25	10	**60**	12	10	**16**
13	26	15	**42.3**	23	7	**70**	11	8	**27**
Somme	175	120	**31,42**	200	90	**55**	100	69	**31**
Moyenne	**21,87 ± 4,85**	**15 ± 2,26**	**31,41**	**25 ± 1,06**	**11,25 ± 2,25**	**55**	**12,5 ± 1,77**	**8,62 ± 1,84**	**31,04**

MNT : milieu non tamponné, MT : milieu tamponné

Lb. plantarum (58) a donné une inhibition considérable vis à vis de *Staphylococcus aureus,* cette inhibition est due à une substance inhibitrice, sachant que L'expérience a été réalisé sur milieu tamponné afin d'écarter l'effet d'acidité du à la production d'acide lactique, les tests supplémentaires à savoir peroxyde, phage et l'effet des enzymes protéolytiques confirme la nature de cette substance, ainsi l'inhibition est due à une bactériocine selon la définition donné par Tagg *et al.,* (1976).

-Les souches **58, 55 et 68** ont exprimé des inhibitions vis à vis *Bacillu*s sp et *E. coli* a différents diamètres et vis à vis du *Staphylococcus aureus* en culture mixte en milieu lait.

-Les souches **52, 54, 31, 2 et 13** ont exprimé des inhibitions vis à vis *Staphylococcus aureus, Bacillu*s *sp.* et *E. coli* a différents diamètres mais inférieure a celles des souches **58, 55, 68.**

Pour cette étude nous avons choisi une souche productrice en se basant sur les résultats statistiques et les résultats observés dans l'étude de l'interaction entre souche inhibitrice et souche test *Sstaphylococcus aureus*, on a remarqué que *Lb. plantarum* (58) a présenté un diamètre de 20 mm avec *Staphylococcus aureus* et 11 mm avec *Bacillu*s *sp.* et 10mm avec *E. coli*.

Lb. paracasei subsp. *paracasei* **(55)** a présenté un diamètre de 15mm avec *Staphylococcus aureus* et 13 mm avec *Bacillu*s sp. et 11mm avec *E. coli* et *Lb. rhamnosus* (68) a présenté un diamètre de 14mm avec *Staphylococcus aureus* et 13mm avec *Bacillu*s sp. et 10 mm avec *E. coli*.

-Pour les souches **52, 54, 31, 2 et 13** ont présenté un diamètre variable entre 12 et 15mm avec *Staphylococcus aureus* et 7 et 14 mm avec *Bacillu*s sp. 6 et 10 mm avec *E. coli*.

Généralement les valeurs moyennes enregistrées en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, montrent que les bactéries à gram positives (*Staphylococcus aureus,* **15 ± 2,26 mm** et *Bacillus* sp. **11,25 ± 2,25 mm)** sont sensibles aux substances inhibitrices produites par les lactobacilles par rapport aux bactéries gram négatives (*E. coli*, **8,62 ± 1,84 mm)**, les bactéries sporulées sont moins sensibles.

Cinétique de croissance et d'évolution du pH en culture mixte de *Lactobacillus* et de *Staphylococcus aureus* en milieu lait.

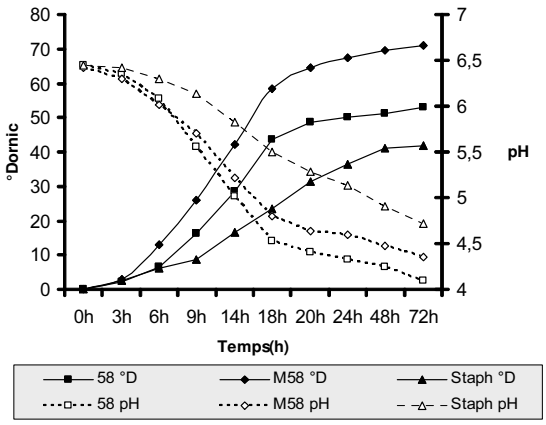


Figure 4 : Evolution de l'acidité dornic (symbole plein) et du pH (symbole vide) en fonction du temps en culture pure et en culture mixte de *Lactobacillus plantarum* **(58)** et de *Staphylococcus aureus.*

L'aptitude technologique des bactéries lactiques est souvent basée sur l'étude du pouvoir acidifiant, toutes les espèces de *Lactobacillus* ont montré une activité acidifiante élevée, qui dépasse celle produite

par la souche de *Staphylococcus aureus* qui est de 36.3°D en 24h (Fig. 4).
Lb. plantarum (58) produit la quantité la plus élevée d'acide lactique 50°D en 24h. Les autres espèces *Lb. rhamnosus* (68) et *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (55) produisent 48°D et 43.5°D respectivement en 24h.
En culture mixte avec *Staphylococcus aureus, Lactobacillus* produise une quantité d'acide lactique supérieure a celle des cultures pures 67.4°D pour *Lb. Plantarum*, 59.4°D *Lb. rhamnosus* et de 47.5 pour *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*. Le suivit de la variation du pH montre que *Lb. plantarum* a diminué le pH jusqu'à 4.32 en 24h alors que le pH de *Lb. rhamnosus* et *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* est de 4.76 et 4.7 respectivement. Le pH est de 5.13 pour la culture de *Staphylococcus aureus*. Alors quant aux cultures mixtes le pH peut atteindre 4.45 pour *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, 4.57 pour *Lb. rhamnosus* et 4.6 pour *Lb. plantarum*.
-*Lb. plantarum* et *Lb. brevis* étudies par Kask *et al., (*1999) et Katina *et al.,* (2002) ont produit une quantité de 40 °D à 50 °D d'acide lactique par litre, ce résultat est proche de nos souches en particulier *Lb. plantarum.* Cette dernière produit une quantité d'acide lactique supérieure à 40°D et peu atteindre une valeur maximale de 100°D.
La plus grand quantité d'acide lactique produite est constaté chez *Lb. plantarum* elle est de 59°D, puits vient la souche *Lb. rhamnosus* et *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* avec 58°D et 48°D respectivement en culture pure après 72h. Alors qu'en culture mixte avec *Staphylococcus aureus* les espèces de *Lactobacillus* produisent une quantité d'acide supérieure, qui est de 71°D pour *Lb. plantarum*, puits vient *Lb. rhamnosus* et *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* avec 64°D et 62°D respectivement en 72h. En milieu synthétique saturé en glucose, Callewaert et de Vuyst (2000) ont remarqué que *Lb. reuteri* produit une acidité de 400°D en 24h.

Dénombrement de *Staphylococcus aureus* en culture pure et mixte :

Le dénombrement au temps 0 h des 3 souches lactiques *Lb.plantarum***,** *Lb. paracasei* subsp. *paracasei***,** *Lb. rhamnosus* qui était de 3.19 log, 3.9 log et 3.55 log respectivement, nous a indiqué le taux d'inoculum initiale. Après 24 h le nombre de bactéries lactiques *Lb. plantarum* était de 8,19 log cfu/ml ; pour *Staphylococcus aureus* le nombre de cellules vivantes exprimées en cfu était de 5,07 log cfu/ml enregistrant ainsi une augmentation de 1,85 log cfu/ml . Par contre, on note une diminution dans le nombre de cellule de l'ordre de 1,6 log cfu/ml en culture mixte après 24h d'incubation. Cette diminution témoigne de l'effet inhibiteur de *Lb. plantarum.*
La densité cellulaire pour *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* était de 8.05 log, pour la souche test *Staphylococcus aureus* le cas était différent. On a remarqué une augmentation du nombre de la souche en culture pure qui était de 5,07 log cfu/ml, en revanche une diminution du nombre 0.8 log cfu/ml est observé en culture mixte après 24h d'incubation (Fig. 5).
Après 72 h d'incubation, le nombre cellules viables de *Lb.plantarum***,** *Lb. rhamnosus* et *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* atteint 8.05 log cfu/ml, 8 log cfu/ml, 8.04 log cfu/ml respectivement. Aucune croissance n'a pu être détectée pour *Staphylococcus aureus* après 72h d'incubation en présence de *Lb. plantarum*. L'activité inhibitrice est légèrement faible chez les deux autres espèces *Lb. rhamnosus* et *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* qui atteint une densité de 1.6 log cfu/ml et 0.6 log cfu/ml respectivement. Cette variation de l'effet inhibiteur des espèces de *Lactobacillus* sur *Staphylococcus aureus* a été remarquée par (Rodriguez *et al., (*2005).
La production de multiples bactériocine par *Lb. plantarum* provoque une inhibition importante de *Staphylococcus aureus* (Hernandez *et al.,* 2005). Les travaux de Arqués *et al.*, (2005) ont montré qu'après 72h d'incubation le nombre de *Staphylococcus aureus* diminue jusqu'à 0,46 log cfu/ml comparé au témoin ou le nombre était de 6.46 log cfu/ml.

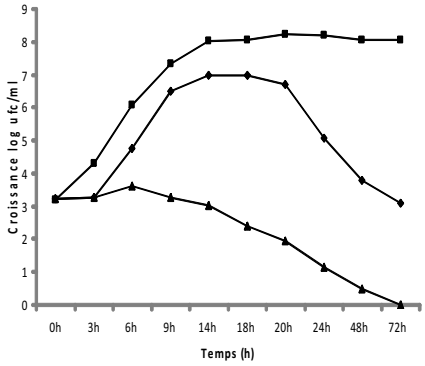


Figure 5 : Cinétique de croissance de *Lb. plantarum* (■) et *Staphylococcus aureus* (♦) en culture pure et *Staphylococcus aureus* (▲) en culture mixte dans le lait.

Effet de l'extrait brut de *Lb. plantarum* sur la croissance de *Staphylococcus aureus :*

Après 6 h d'incubation de l'extrait brute du surnageant de *Lb. plantarum* en remarque l'absence de la croissance de *Staphylococcus aureus* dans les dilutions 1/2 et 1/4 ou le taux de mortalité est supérieur à 90 % (Fig 6). Alors que pour la dilution 1/254 et 1/1016 le taux de mortalité est proche de 50%. Le taux de mortalité après 24h d'incubation dans les trois premières dilutions 1/2, 1/4 et 1/8 est de 93,4, 92,5 et 95,1 respectivement. Ce taux de mortalité est de 10,4% et 4,9% pour les dilutions 1/254 et 1/1016 respectivement.
En peut dire que la dilution 1/2, 1/4 et 1/8 de l'extrait brute de la substance de *Lb. plantarum* a inhibent la croissance de *Staphylococcus aureus.* En revanche, le taux de mortalité observé est inversement proportionnel aux dilutions effectuées. L'inhibition est élevée dans les premières dilutions ou la concentration des protéines est supérieure à 2.5 mg/ml. Les concentrations de protéines de 0,31 mg/ml produit un effet inhibiteur intermédiaire proche de 40% de mortalité. La dernière dilution 1/1016 qui représente une concentration de protéines de 19µg/ml le taux de mortalité enregistré en 24 h est de 4.9%.

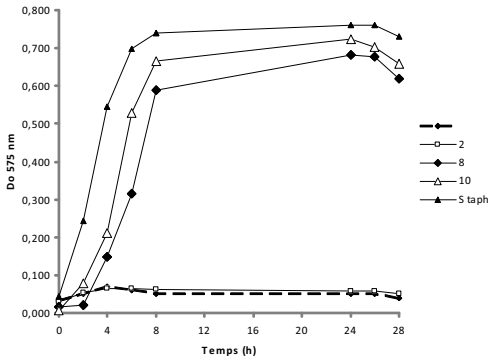


Figure 6: Effet de différentes dilutions de l'extrait brut de *Lactobacillus plantarum* (58) chauffé à 100°C pendant 10 min sur la croissance de *Staphylococcus aureus*.

Cette activité inhibitrice vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* par *Lactobacillus plantarum* 58, observée in vitro nous indique sur la possibilité d'exploiter cette activité pour l'utiliser comme moyen de biopréservation des aliments pour lutter contre les bactéries impliquées dans les intoxications alimentaires observées dans les saisons estivales en Algérie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alexandre, D.P., Silva, M.R., Souza, M.R., et Santos, V.L.M., 2002. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria from artisanal minas cheese against indicator microorganisms. *Arq. Brasil. Med. Vet. Zootec*. 54: 424-428.

Alvarez-Martin, P., Florez, AB., Hernandez-Barranco, et Mayo, B., 2008. Interaction between dairy yeasts and lactic acid Bacteria strains during milk fermentation. Food Control. 19 : 62-70

Arquès, J.L., Rodriguez, E., Gaya, P., Medina, M., Guamis, B., et Nunez M., 2005, Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combination of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. 24:227-38-57.

Aslim, B., Yuksekdag, Z.N., Sarikaya, E., et Beyatli, Y., 2005. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT* 38: 691-694.

Avila, M., Garde, S., Medina, M., et Nunez, M., 2005. Effects of milk innoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture. *J. Food Prot*. 68: 1026-1033.

Badis, A., Guetarni, D., Moussa Boudjema, B., Henni, D.E. et Kihal, M., 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goats milk of four Algerian races. *Food. Microbiol*. 21. 5 : 579-588

Barefoot. S. F et Klaenhammer. T. R., 1983.Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol* ; 45(6), 1808-1815.

Budde, B. B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V. et Koch, A.G., 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *Int. J. Food Microbiol*. 83: 171-184.

Callewaert, R. et de Vuyst, L., 2000. Bacteriocins production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol*. 66: 606-613.

Carr, F.J., Chill, D. et Maida, N; 2002. The lactic acid bacteria: A literature Survey. *Cur. Rev. Microbiol*. 28. 4:281-370

Cocolin, L., Foschino, R., Comi, G., et Fortina, M.G., 2007. Description of the bacteriocins produced by two strains of Enterococcus faecium isolated from Italian goat milk. Food Microbiol. 31:753-758

Condon, S., 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev*., 46: 269-280.

Crow, V.L., Coolbear, T., Holland, R., Pritchard, G.G., et Martley, F.G., 1993. Starters as finishers: starter properties relevant to cheese ripening. *Int. Dairy J*. 3: 423-460.

De Man, J.C., Rogosa, M., et Sharpe, M.E., 1960. Amedium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol*. 23: 130-135.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. et Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J*. 16: 1058-1071.

Desmazeaud, M., et Cogan, T.M., 1996. Role of cultures in cheese ripening. In: Cogan, T.M., Accolas, J.-P. (Eds.), Dairy Starter Cultures. *VCH Publishers, Inc., New York, pp*. 207-231.

Fitzsimmons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S. et Beresford, T., 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol*. 65: 3418-3426.

Fleming, H., P., Erchells, J.L. et Caslilow, R.N., 1975. Microbiol inhibition on isolate *Pediococcus* from cucumber bune. *Appl. Environ. Microbiol*. 30: 1040-1042.

Guessas, B., 2007 : Les particularités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. *Thèse de doctorat. Université d'Oran Es-Senia*. 165p

Guessas, B., Hadadji, M., Saidi, N. et Kihal, M., (2005). Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth in milk by lactic acid bacteria. *Dirassat*, 32. 3 : 53-60

Heikkila, M.P. et Saris, P.E.J., 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the

commensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol*. 95: 471-478

Hernandez, D., Cardell, E., et Zarate, V., 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheeses: Initial characterization of plantaricin TF 711, bacteriocin like substance produced by *Lactobacillus plantarum*. TF 711. J. Appl. Microbial. 99 : 77-84

Jacobsen, T., Budde, B.B. et Koch, A.G., 2003. Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *J. Appl. Microbiol*. 95: 242-249.

Joffin, J.N., et Leyral, G., 1996. Microbiologie technique. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine Bordeaux, France, pp. 219-223.

Juillard, V., Spinnler, M., Desmazeaud, M.J., et Bouquien C.Y., 1987. Phénomène de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Lait.* 67: 149-172.

Kaban, G. et Kaya, M., 2006. Effect of starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* in sucuk. *Food control* 17,797-801.

Kalchayanand, N., Hanilin, M.B., et Ray, B., 1992. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol*. 15: 239-243.

Kask, S., Laht MT., Pall P et Paalme T., 1999. A study on growth characteristics and nutrient consumption of *Lactobacillus plantarum* in A-stat culture. *Antonie van Leeuwenhoek* 75: 309–320.

Katina, K., Sauri. M., Alakomi, H.L. et Mattila-Sandholm, T., 2002. Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 35. 1: 38-45.

Kihal, M., Prevost, H., Lhotte, M.E., Huang, D.Q., et Divies, C., 1996. Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *J. Appl. Microbiol*., 22: 219-223.

Klaenhammer TR., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70:337-49.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. et Reuter G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol*. 41 : 103–125

Laouabdia N.S, Badis A., Guetarni J; Ouzroute R., et Kihal M., 2007. Caractérisation phenotypique of lactic acid bacteria isolated from believed milk of goat of two caprine populations Local Arabia and Kabile. *Journal of Animal and Veterinary Advance*. 6 (12) : 1474-1481

Larsen, A.G., Vogensen, F.K., Josephsen, J., 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *J. Appl. Bacteriol.* 75:113-22.

Le Blay, G., Lacroix, C., Zihler, A. et Fliss, I., 2007. In vitro Inhibition activity of nisin A, nisin Z, pediocin PA-1 and antibiotics common intestinal bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 45 : 252-257.

Lewis, C.B., Kaiser, A., et Montville, T.J., 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol*. 57: 1683-1688.

McGrath, S., van Sinderen D. et Fitzgerald, G.F., 2002. Bacteriophage-derived genetic tools for use in lactic acid bacteria. *Inter. Dairy J*. 12 : 3–15

Miteva,V., Ivanova, I., Budakov, I., Pantev, A., Stefanova, T., Danova, S., Monchev, P., Mitev, V., Dousset, X. et Boyaval, P., 1998. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by a *Lactobacillus delbrueckii* stain 1043. *J. Appl. Microbiol.* 85 : 603-614.

Moulay, M., Aggad H., Benmechernene Z., Guessas B., Henni D.E. et Kihal M. 2006. Proteolytic activity of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk. *World. J. Dairy and Food Sci* 1 (1): 12-18, 2006.

Nettles, C. G., et Barefoot, S. F., 1993. Biochemic and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bactena. *J. Food Prot*. 56: 338-356.

Otero, C. M. et Macias, N. M. E., 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H_2O_2-producing *Lactococcus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal Reprod Sci* 96,35-46.

Oyetayo, V.O., Adetuyi, F.C. et Akinyosoye, F.A., 2003. Safety and

protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent *in-vivo*. *Afr*. *J*. *Biotech*. 2: 448-452.

Piard J. C. et Desmazeaud M., 1991. Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L. oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 71: 525-541.

Podolak, P. K., Zayas, J. F., Kastner, C. L. et Fung, D.Y.C., 1996. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J*. *Food Prot*. 59: 370-373.

Rodriguez E., Calzada J., Arquès JL, Rodrigues JM, Nunez M. et Medina M. 2005. Antimicrobial activity of Pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157 :H7 in cheese. *Inter. Dairy J*. 15: 51

Schillinger. U. et Lücke. K., 1989: Animicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol*, 55 : 1901-1906.

Schved, F., Lalazar, A., Lindner, P. et Juven, B.J., 1994. Interaction of the bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* SJ-1 with the cell envelope of *Lactobacillus* spp. *Lett*. *Appl*. *Microbiol*. 19:281-283.

Schved, F.M., Lalazar, A., Henis, Y. et Juven, B.J., 1993. Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin S J- 1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici. J. Appl. Bacteriol*. 74: 1, 67-77.

Sookkhee, S. Chulasiri, M. et Prachyabrued, W., 2001. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 90 : 172-179.

Stevens, K. A., Sheldon, B.W., Klapes, N. A. et Klaenhammer T. R. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* 57:3612-5.

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

Tagg, J.R. et McGiven, A.R., 1971. Assay system for bacteriocins. *J. Appl. Microbiol*. 21: 943.

Tagg, J.R., Dajani, A.S., et Wannamaker, L.W., 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev*. 40 : 722-756

Tahara T et Kanatani K., 1996. Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J 1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. *J. Appl. Bacteriol*. 81 : 669-677

Vermeiren, L., Devlieghere, F. et Debevere, J., 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int*. *J*. *Food Microbiol*. 96: 149-164.

Wilson, A.R., Sigee, D. et Epton, H.A.S., 2005. Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *J*. *Appl*. *Microbiol*. 99: 1516-1522.

Wong, H.-C., et Chen, Y.-L., 1988. Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Appl*. *Environ*. *Microbiol*. 54: 2179-2184.