



UNIVERSITE MUSTAPHA STAMBOULI DE MASCARA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
THESE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT LMD

Option : Qualité des produits et Sécurité Alimentaire
Spécialité : Sciences Alimentaire

**Sélection et caractérisation technologique de
certaines bactéries lactiques isolées à partir des
produits de pêches**

Présenté par
Mme BATOCHE Amel épouse Djelti

Soutenu publiquement le :
Devant le jury :

Présidente
Examinatrice
Examinatrice
Examineur
Directrice de thèse

Pr. CHOUITAH O.
Dr. BENFREHA H.
Dr. SIDE LARBI K.
Dr. BELLIL Y.
Pr. SAHNOUNI F.

Université Mustapha Stambouli. Mascara
Université Mustapha Stambouli. Mascara
Université Mustapha Stambouli. Mascara
Université de Dr Moulay Tahar de Saïda
Université Mustapha Stambouli. Mascara

Remerciements

*Nous tenons tout d'abord à remercier **ALLAH** le tout puissant de nous avoir aidé à réaliser ce modeste travail.*

Je tiens avant tout exprimer mes remerciements les plus chaleureux à ma directrice de thèse, le professeur Fatma SAHNOUNI, pour m'avoir accordé l'honneur de soutenir ce sujet de recherche et pour la confiance qu'elle m'a donné pour mener à bien mon projet. Vos précieux conseils, votre aide abondante, votre esprit critique, ont considérablement contribué à mon progrès. Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance et tout mon respect.

Je remercie vivement, le professeur CHOUITAH O. d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent également aux Dr. BENFREHA H., Dr. SIDE LARBI K., Dr. BELLIL Y. de l'Université de Dr. Moulay Tahar de Saida, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier le professeur BENARBA B., de nous avoir donné une chance pour continuer notre chemin de recherche.

Mes vifs remerciements s'adressent au Dr BENDAHA M., pour ces conseils et son aide précieuse.

Je remercie également Pr HARIRI A., pour sa disponibilité et son aide appréciable.

Mes remerciements s'adressent également aux directeurs, responsables et personnels de laboratoires de recherches et de la pédagogie (S.N.V).

Je tiens à remercier infiniment Melle KADA Zahira, chef service de suivi de formation de la post- graduation, faculté SNV, pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Enfin, je tiens aussi à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ses quelques lignes l'expression de mes sincères remerciements.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mon très cher père, mon modèle, mon espoir. Je tiens à vous remercier énormément de tout mon cœur pour tous vos sacrifices, vos encouragements d'aller plus loin. J'ai l'honneur de vous satisfaire avec ce modeste travail.

A ma mère, ma très chère, que j'ai malheureusement perdu au long de mon parcours académique que je devais poursuivre mon chemin tout en n'étant pas à mes côtés. Merci pour vos conseils précieux, vos encouragements, vos sacrifices, votre amour inestimable, votre tendresse et votre gentillesse. Grace à vous je suis devenue ce que je suis, je sais que vous auriez été fière de moi.

A mon très cher unique frère Mourad, que j'ai malheureusement récemment perdu, pour ton amour, ton soutien moral. Tous les deux, vous avez laissé un vide énorme au sein de la famille.

A mon très cher mari Wahib, qui a été toujours disponible pour moi, qui m'a toujours soutenu et encouragé. Merci pour ta patience, ta compréhension et ton soutien continu, je t'en serais infiniment reconnaissante.

A mes très chers à mon cœur, mes enfants Mohammed Redouane Ellah, Abd El Hak Theb, Issam Djamel Eddine et Abd Erraouf Boualem, que dieu les protège.

A mes très chères sœurs : Ndjet, Fadéla, Hafida, Nawel et Hadjira, pour leur présence, leur amour et leur soutien moral. A toute la famille BATONCHE.

A ma chère belle-mère et à mon beau-père. Merci pour vos encouragements et votre soutien moral.

A mes belles sœurs et beaux-frères, ainsi qu'à toute ma belle-famille.

Table des matières

Table des matières.....	I
Liste des figures.....	VI
Liste des tableaux.....	IX
Liste des abréviations.....	X
Résumé.....	i
Abstract.....	ii
ملخص.....	iii
Introduction générale.....	1
I. Etude bibliographique	
1. La microbiologie du milieu aquatique et du poisson	3
1.1. La microbiologie du milieu aquatique.....	3
1.2. La biologie du poisson.....	4
1.2.1. Généralité.....	4
1.2.2. La morphologie du poisson.....	4
1.2.3. Type de poisson.....	4
1.2.4. Classification des poissons.....	5
-Les poissons osseux.....	5
-Les poissons cartilagineux.....	5
1.2.5. L'appareil digestif de poisson.....	5
1.3. La composition biochimique et valeur nutritionnelle du poisson.....	6
1.4. La microflore du poisson.....	7
1.4.1. La flore microbienne du poisson vivant ou fraîchement capturé.....	8
-La microflore de la peau.....	9
-La microflore des branchies.....	10
-La microflore intestinale.....	11
1.4.2. La microflore du poisson mort.....	13
-Evolution de la microflore et altération bactérienne du poisson mort.....	13
-Changements autolytiques et réactions chimiques.....	14
-Changements bactériologiques.....	14
-Changements organoleptiques et physiques.....	14
1.4.3. La flore spécifique d'altération du poisson (SSO).....	15
1.4.3.1. Bactéries à Gram-négatif.....	16
-Pseudomonas sp.....	16
-Shewanella sp.....	17
-Aeromonas sp.....	19
-Vibrio sp.....	20
-Flavobacterium.....	21
-Photobacterium.....	22
1.4.3.2. Bactéries à Gram-positif.....	23
-Carnobacterium.....	23
-Bronchitrix.....	25
-Enterococcus.....	26
1.4.4. La flore d'altération du poisson légèrement préservé.....	26
1.4.5. Les autres microorganismes.....	27
-Les algues microscopiques.....	27
-Les virus.....	27

-Les parasites.....	28
-Les levures et les moisissures.....	28
2. Les bactéries lactiques	
2.1. Définition.....	30
2.2. Propriétés générales.....	30
2.3. Ecologie et classification.....	31
2.4. Caractérisation des principaux genres de bactéries lactiques.....	34
2.4.1 Enterococcus.....	34
-Les espèces importantes du genre.....	34
- <i>Enterococcus faecalis</i>	34
- <i>Enterococcus faecium</i>	35
- <i>Enterococcus lactis</i>	35
2.4.2 Lactobacillus.....	35
2.4. 3 Carnobacterium.....	36
2.4.4 Weissella.....	38
2.4.5 Leuconostoc.....	38
2.4.6 Pediococcus.....	39
2.5. Rôle des bactéries lactiques.....	39
2.5.1 Propriétés probiotiques.....	40
- Notion de probiotique.....	40
- Définition.....	40
- Rôle d'un probiotique.....	40
2.5. 2 Préservation et innocuité de l'aliment.....	41
2.5. 3 Formation de l'arôme et de la saveur.....	42
2.5.4 Influence sur la valeur nutritionnelle.....	42
2.5.5 Production de vitamines par les bactéries lactiques.....	43
3. Les propriétés technologiques de bactéries lactiques	44
3.1. Activité acidifiante et production d'acide lactique.....	44
3.2. Activité protéolytique.....	45
3.3. Activité lipolytique.....	45
3.4. Activité aromatique.....	46
3.5. Production des exopolysaccharides.....	47
3.6. Activité amylolytique.....	48
3.7. Activité antimicrobienne.....	48
3.7.1. Propriétés inhibitrice des bactéries lactiques.....	48
-La compétition nutritionnelle et pour l'espace.....	48
-La production des métabolites antimicrobiens.....	49
3.7.2. Les substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques .	49
-Les acides organiques.....	50
-Le peroxyde d'hydrogène.....	50
-Le dioxyde de carbone.....	51
-Le diacetyl.....	51
-La reutéline.....	51
-Les peptides antimicrobiens (bactériocines).....	52
A. Les bactériocines de bactéries lactiques.....	52
B. Classification des bactériocines.....	53
C. Biosynthèse des bactériocines.....	54
D. Mode et mécanisme d'action.....	54
E. Les entérocinés.....	57

-Les entérocoques et leur classification.....	57
-Mode d'action des entérocoques.....	58
3.2. Application biotechnologique des bactéries lactiques et de leur bactériocines.....	58
3.2.1. Application des bactériocines de bactéries lactiques.....	60
-Application dans le système alimentaire.....	60
-Application en médecine.....	61
3.2.2. Application des bactéries lactiques.....	61
-Application dans le domaine alimentaire.....	62
II. Matériel et méthodes	
1. Recherche et identification des bactéries lactiques à intérêt technologique.....	65
1.1. Lieu de l'étude.....	65
1.2. Objectif.....	65
1.3. Le matériel biologique.....	65
1.4. Echantillonnage.....	66
1.5. Isolement des bactéries lactiques (BL).....	67
1.5.1. Préparation des dilutions.....	67
1.5.2. Préparation des cultures et purification.....	67
1.6. Conservation des isolats purs.....	67
1.7. Caractérisation des souches lactiques.....	68
1.7.1. Pré-identification des isolats.....	68
-Caractérisation morphologique.....	68
-Test de la catalase.....	69
1.7.2 Criblage sur la base de l'activité antibactérienne.....	69
-Le Test direct.....	69
- Le test indirect.....	69
1.7.3. Caractérisation physiologique et biochimique.....	71
- Recherche de l'arginine di-hydrolase.....	71
-Test de mobilité.....	71
- Taux de croissance à différentes conditions.....	72
a) Croissance à différentes températures et thermorésistance.....	72
b) Croissance à différentes concentrations de sel.....	72
c) Croissance à différents pH.....	72
- Détermination du type fermentaire.....	72
1.7.4 Identification des isolats par Galeries API.....	73
-Lecture et interprétation.....	73
1.7.5. Caractérisation technologique des isolats purs sélectionnés.....	73
- Pouvoir acidifiant des isolats purs.....	73
-Activité protéolytique.....	74
A. Méthode qualitative.....	74
B. Méthode quantitative.....	75
-Activité lipolytique.....	76
A. Mise en évidence de l'activité lipolytique.....	76
B. La recherche de l'activité lipolytique extracellulaire.....	76
C. Détermination de l'activité lipolytique par titrimétrie.....	76
- Pouvoir texturant des isolats.....	77
A. Recherche des Exo-polysaccharides.....	77
B. Quantification des EPS.....	78
-Pouvoir aromatisant.....	79
A. La production d'acétoïne.....	79

B. Recherche de la citratase.....	79
-Activité amylolytique.....	79
1.7.6. Caractérisation de la substance inhibitrice.....	80
A. Détermination de la nature de la substance inhibitrice.....	80
-Inhibition due à la production d'acides organiques.....	80
-Inhibition due à la production de peroxyde d'hydrogène.....	80
-Inhibition due à la production de substance de nature protéique	80
B. Caractérisation physicochimique de Bactériocines Like	80
-Effet des enzymes, du traitement thermique et du pH sur l'acti	80
té des bactériocines	
- Purification partielle de bactériocine-like (BLIS).....	81
-Dosage de Bradford.....	81
-Détermination de la CMI par microdilution en milieu liquide..	83
-Détermination du mode d'action des substances inhibitrice.....	83
1.7.7. Caractérisation des critères de performances.....	84
A. Résistance aux antibiotiques.....	84
B. Activité hémolytique.....	84
C. Production des amines biogènes.....	85
1.7.8. Les facteurs de virulence.....	85
A. L'hydrolyse de la gélatine.....	85
B. Hydrophobicité.....	86
C. Capacité d'auto-agrégation et de co-agrégation.....	86
1.7.9. Identification génotypique des souches pures.....	87
-Extraction de l'ARN génomique et amplification de l'ARN par PCR	87
-Electrophorèse sur gel d'agarose.....	87

III. Résultats et discussion

1. Isolement et caractérisation phénotypique.....	90
1.1. Caractérisation phénotypique.....	90
1.1.1. Critères morphologiques.....	90
A. Aspect macroscopique.....	90
B. Aspect microscopique.....	90
2. Criblage sur la base de l'activité antibactérienne.....	92
2.1. Le Test direct.....	93
2.2. Le test indirect.....	94
3. Identification physiologique et biochimique des isolats sélectionnés.....	95
3.1. Hydrolyse de l'arginine.....	95
3.2. Test de mobilité.....	96
3.3. Taux de croissance à différentes conditions.....	96
3.4. Type fermentaire.....	98
4. Identification des isolats par Galerie API.....	98
5. Caractérisation technologique des isolats purs.....	99
5.1. Cinétique de croissance et d'acidification.....	99
5.2. Activité protéolytique.....	102
5.3. Activité lipolytique.....	105
5.4. Production des EPS.....	106
5.5. Recherche de la citratase.....	107
5.6. La production d'acétoïne.....	109
5.7. Activité amylolytique.....	109

5.8. Caractérisation de la substance inhibitrice.....	110
5.8. 1. Détermination de la nature de la substance inhibitrice.....	110
5.8.2. Caractérisation physicochimique de Bactériocines Like (BLIS).....	111
-La détermination de la concentration de bactériocine like	113
-Détermination de la CMI et CMB par micro- dilution en milieu liquide.	114
-Détermination du mode d'action des substances inhibitrices.....	115
6. Les critères de performance.....	118
6.1. La résistance aux antibiotiques.....	119
6.2. Activité hémolytique.....	121
6.3. Production des amines biogènes.....	121
6.4. Détermination des facteurs de virulences.....	122
6.4.1. L'hydrolyse de la gélatine.....	122
6.4.2. Évaluation de l'hydrophobicité des surfaces cellulaires.....	123
6.4.3. Capacité d'auto-agrégation et de co-agrégation.....	123
7. Identification géotypique des souches pures.....	125
IV. Conclusion.....	131
V. Références bibliographiques.....	134
Annexes	

Liste des figures

Figure 1 : Dissection de l'appareil digestif d'un poisson osseux.....	06
Figure 2 : Dissection légendée d'une sardine femelle (10 cm).....	06
Figure 3 : Types de bactéries d'altération et composés typiques retrouvés lors de l'altération du poisson.....	16
Figure 4 : Photographie au microscope électronique et principales caractéristiques taxonomiques et physiologiques du genre <i>Pseudomonas sp</i>	16
Figure 5 : Photographie au microscope électronique et principales caractéristiques taxonomiques et physiologiques du genre <i>Shewanella sp</i>	17
Figure 6 : Processus enzymatique la conversion du TMAO par les bactéries (SSO) présentes dans la chair.....	19
Figure 7 : Photographie au microscope électronique (barre = 1 µm) et principales caractéristiques taxonomiques et physiologiques du genre <i>Aeromonas</i>	19
Figure 8 : Photographie au microscope électronique et principales caractéristiques taxonomiques et physiologiques du genre <i>Vibrio</i>	20
Figure 9 : Photographie au microscope électronique et principales caractéristiques taxonomiques et physiologiques du genre <i>Flavobacterium</i>	21
Figure 10 : Photographie au microscope électronique et principales caractéristiques taxonomiques et physiologiques du genre <i>Photobacterium</i>	22
Figure 11 : Photographie au microscope électronique des cellules de <i>Carnobacterium</i>	23
Figure 12 : Microscopie à force atomique d'une microcolonie (panneau de gauche) et d'une cellule (panneau de droite) de <i>C. maltaromaticum</i> DSM207302.....	23
Figure 13 : Photographie au microscope électronique du genre <i>Brochothrix</i>	25
Figure 14 : Photographie au microscope électronique et principales caractéristiques taxonomiques et physiologiques du genre <i>Enterococcus</i>	26
Figure 15 : Types fermentaires de bactéries lactiques.....	33
Figure 16 : Modèle générique pour la biosynthèse des hétéropolysaccharides par voie Wzy-dépendante (polymérase)	47
Figure 17 : Mécanisme d'action des bactériocines sur les bactéries à Gram-positif.....	55
Figure 18 : Mécanisme d'action des bactériocines sur les bactéries à Gram-négatif	58
Figure 19 : Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif	58
Figure 20 : Le mécanisme antimicrobien des entérocin	59

Liste des figures

Figure 21 : Vue d'ensemble de la sécurité, des propriétés techno-fonctionnelles et fonctionnelles des probiotiques.....	63
Figure 22. Schéma résumant le protocole de la dissection, l'isolement et la purification.	68
Figure 23 : Schéma résumant le traitement du surnageant d'isolat retenu.....	70
Figure 24 : Courbe étalon de la Glycine pour l'évaluation de l'activité protéolytique.....	76
Figure 25 : Courbe d'étalonnage du glucose pour la quantification des EPS.....	79
Figure 26 : Courbe d'étalonnage SAB.....	90
Figure 27 : Aspect macroscopique des colonies des souches ABBC2 ABBC3 sur milieu MRS	91
Figure 28 : Aspect microscopique des cellules ABBC2 (A) cellules ovoïdes associées en diplocoques et ABBC10 (B) Batonnets regroupés en chainettes courtes)	91
Figure 29 : Spectre d'action de la souche ABBC3 vis-à-vis <i>B.subtilis</i> , <i>S.aureus</i> et <i>B.cere</i> et <i>St.aureus</i>	93
Figure 30 : Interaction bactérienne des isolats, <i>Enterococcus sp.</i> C2, <i>Enterococcus sp.</i> C3, <i>Enterococcus sp.</i> C4, <i>Carnobacterium sp.</i> C10 et <i>Carnobacterium sp.</i> C12 vis-à-vis <i>B.cereus</i>	95
Figure 31 : Les résultats de la production de l'arginine di-hydrolase.....	96
Figure 32 : Effet du pH sur la croissance des différents isolats.....	97
Figure 33 : Effet du NaCl sur la croissance des différents isolats.....	97
Figure 34 : Effet de la température sur la croissance des différents isolats.....	97
Figure 35 : Profil fermentaires des isolats <i>Enterococcus sp.</i> C2, <i>Enterococcus sp.</i> C3 et <i>Enterococcus sp.</i> C4.....	99
Figure 36 : Paramètres cinétiques de la croissance et de l'acidité produite par les souches <i>Enterococcus sp.</i> C2 et <i>Enterococcus sp.</i> C4 au cours de la fermentation discontinue.....	101
Figure 37 : Activité protéolytique des isolats <i>Enterococcus sp.</i> C4, <i>Carnobacterium sp.</i> C10 et <i>Carnobacterium sp.</i> C12.....	102
Figure 38 : Quantification des protéines, des lipides et des EPS pour les souches <i>Enterococcus sp.</i> C2 et <i>Enterococcus sp.</i> C4.....	104
Figure 39 : A) Activité lipolytique des isolats 2%HO) (spots) B) Activité lipolytique des isolats (3%HO) (puits).....	105
Figure 40 : Exemples de production des EPS par les isolats sur milieu MSE.....	107
Figure 41 : Dégradation du citrate par les isolats A) <i>Enterococcus sp.</i> C2 (fissure), B) <i>Carnobacterium sp.</i> C10.....	108
Figure 42 : Production d'acétoïnes par les isolats <i>Enterococcus sp.</i> C2, <i>Enterococcus sp.</i> C3 et <i>Enterococcus sp.</i> C4.....	109

Liste des figures

Figure 43 : Exemples de la dégradation de l'amidon par les isolats A) <i>Enterococcus sp.</i> C3, B) <i>Enterococcus sp.</i> C10 et <i>Carnobacterium sp.</i> C12	110
Figure 44 : CMI à T0.....	114
Figure 45 : CMI à T=24h.....	114
Figure 46 : Effet du surnageant des trois isolats <i>Enterococcus sp.</i> C2, <i>Enterococcus sp.</i> C3 et <i>Enterococcus sp.</i> C4 sur la croissance de <i>B.C</i>	116
Figure 47 : Effet du surnageant des trois isolats <i>Enterococcus sp.</i> C2, <i>Enterococcus sp.</i> C3 et <i>Enterococcus sp.</i> C4 sur la croissance de <i>S. abony</i>	116
Figure 48 : Antibiogramme des bactéries lactiques.....	120
Figure 49 : Adhésion des isolats au xylène.....	123
Figure 50 : Le pourcentage d'auto-agrégation des isolats.....	124
Figure 51 : Le pourcentage de co-agrégation des isolats avec <i>B.C</i>	125
Figure 52 : Le pourcentage de co-agrégation des isolats avec <i>S.A</i>	125
Figure 53 : Analyse de l'arbre phylogénétique par la méthode du maximum de vraisemblance des souches d' <i>Enterococcus sp.</i> C2 et <i>Enterococcus sp.</i> C4.....	128
Figure 54 : Analyse de l'arbre phylogénétique d' <i>Enterococcus sp.</i> C2 et <i>Enterococcus sp.</i> C3 par la méthode du maximum de vraisemblance.....	129

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les constituants principaux du poisson et du muscle de bœuf.....	06
Tableau 2 : Flore bactérienne du poisson capturé dans des eaux propres non polluées....	07
Tableau 3 : La flore bactérienne de la peau du poisson.....	09
Tableau 4 : Les espèces bactériennes isolées du tractus intestinal des espèces de poissons Au stade larvaire et post-larvaire.....	12
Tableau 5 : Classification des grands groupes des bactéries lactiques.....	32
Tableau 6 : Les genres de bactéries lactiques associés aux aliments et leurs caractéristiques physiologiques.....	37
Tableau 7 : Métabolites antimicrobiens de faible masse molaire sécrétés par les bactéries lactiques autres que les bactériocines.....	50
Tableau 8 : Classification de bactériocines.....	56
Tableau 9 : Expression hétérologue des entérocinés dans différents systèmes.....	56
Tableau 10 : Espèces utilisées pour l'établissement de la mise en évidence du spectre d'activité antibactérienne.....	70
Tableau 11 : Préparation de la courbe étalon Glycine.....	75
Tableau 12 : Préparation de la courbe étalon glucose pour le dosage des EPS.....	78
Tableau 13 : Préparation de la courbe étalon : Sérum Albumine Bovine.....	82
Tableau 14 : Liste des antibiotiques testés.....	84
Tableau 15 : Les caractéristiques morphologiques et biochimique des isolats lactiques...	92
Tableau 16 : Effet inhibiteur des isolats lactiques sur des bactéries indicatrices.....	93
Tableau 17 : Caractérisation technologiques des isolats.....	103
Tableau 18 : Influence de la température, pH et Na Cl et les enzymes sur l'activité de bactériocine.....	113
Tableau 19 : Résultats du test de sensibilité aux antibiotiques.....	119

Liste des abréviations

AB : Amines biogènes

HO : Huile d'Olive

AGL : Acides Gras Libres

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-acétate

BSA : Sérum Albumine Bovine

BLIS: Bacteriocin Like Inhibitory Substance

BL : Bactérie lactique

CFS : Cell Free Supernatant

D.O : Densité Optique

TCA : Trichloroacétate

EPS: Exo-Poly-Saccharide

ESM: EPS Selection Medium

MH : Muller Hinton

ATB : Antibiotique

QS : *Quorum Sensing*

PCR : Polymerase chain reaction

UFC : Unité Formant Colonie

pH : Potentiel d'hydrogène

°D : Degrés Dornic

GRAS: Generally Recognized As Safety

ATCC: American Type Collection Culture

ADH : Arginine di- hydrolase

TMAO : Oxyde deTriméthylamine

TMA : Triméthylamine

M : Molaire
m/v : masse sur volume
mL : millilitre
mM : millimolaire
Mn : Minute
MRS : de Man Rogosa et Sharpe
Na cl : Chlorure de sodium
Na OH : Hydroxyde de sodium
NCBI : National Center for Biotechnology Information
µl : Microlitre
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARNr : Acide ribonucléique ribosomique
ATCC : American Type Culture Collection
BLAST : Basic Local Alignment Search
CHU : Centre Universitaire Hospitalier
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institut
trm: tour par minute
rpm: Rotation par minute
FASTA : « Fast-All » ou « Rapide-tout »
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

Résumé

La présente étude s'est focalisée sur la valorisation des sous-produits de la pêche. A travers cette approche, notre travail s'est fondé sur le screening des caractéristiques technologiques des *Enterococcus* isolés du tube digestif de deux poissons marins frais : *Sarda sarda* et *Sardina pilchardus*, le long de la côte algérienne. Les bactéries lactiques *Enterococcus sp.* C2, *Enterococcus sp.* C3 et *Enterococcus sp.* C4, ont été identifiées au niveau de l'espèce conformément au test biochimique API 50 CH et le séquençage du gène ARNr16S. Nous avons examiné les activités technologiques (acidifiante, protéolytique, lipolytique, antibactérienne, aromatique et production d'exopolysaccharides) tout en garantissant la sécurité alimentaire, afin de sélectionner l'isolat lactique le mieux approprié pour renforcer l'activité antibactérienne, les caractéristiques organoleptiques et la qualité nutritionnelle. Ces isolats sélectionnés ont démontré une faible capacité d'acidification, de protéolyse et de lipolyse, tout en produisant de petites quantités d'exo-polysaccharides. Notre étude a également démontré que les trois isolats lactiques exerçaient une action antibactérienne directe contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Salmonella abony*. De plus, leurs surnageants développaient une activité antibactérienne indirecte vis-à-vis *B.cereus*. Les surnageants C2, C3 et C4 sont à la fois sensibles à la protéase et à la température, ce qui confirme la nature protéique des substances inhibitrices. La Bactériocine C2 était thermostable et restait active sur une large plage de pH de 3,5 à 6,5, tandis que la bactériocine C3 restait stables pendant 30 minutes à 60°C et son efficacité était maintenue à 100% à pH 6,5. Il est important de souligner que la résistance aux antibiotiques a été notée chez *Enterococcus sp.* C2 envers les antibiotiques examinés, à l'exception de la spiramycine, tandis que *Enterococcus sp.* C4 et C3 ont uniquement montré une résistance à l'amoxicilline, la tétracycline et la pénicilline. Il convient de noter que le criblage phénotypique pour la production d'hémolysine et d'amines biogènes, a montré que les souches semblaient totalement sûres. Les souches sélectionnées ont révélé une tolérance à la température et à un pH bas. Elles ont également démontré une activité hydrophobe, une auto-agrégation et une co-agrégation. Ces caractéristiques confèrent à ces isolats l'aptitude de coloniser l'intestin. Nos découvertes ont des implications notables pour le secteur alimentaire et cette étude contribuera à l'innovation alimentaire : des saveurs uniques, une élaboration de méthodes de conservation naturelle des aliments plus sûres et plus efficaces et des bienfaits pour la santé.

Mots clés : *Enterococcus sp.*, bactérie lactique, caractérisation technologique, bactériocine-like, activité antibactérienne, sécurité.

Abstract

The present study focused on the valorization of fishery by-products, particularly fish viscera. Through this approach, our work was based on screening the technological characteristics of *Enterococcus* isolated from the gastrointestinal tract of two fresh marine fish: *Sarda sarda* and *Sardina pilchardus*, along the Algerian coast. The lactic bacteria *Enterococcus* sp. C2, *Enterococcus* sp. C3, and *Enterococcus* sp. C4 were identified at the species level according to the API 50 CH biochemical test and 16S rRNA gene sequencing. We examined the technological activities (acidifying, proteolytic, lipolytic, antibacterial, aromatic, and exopolysaccharide production) while ensuring food safety, in order to select the most appropriate lactic isolate to enhance antibacterial activity, organoleptic characteristics, and nutritional quality. These selected isolates demonstrated a low capacity for acidification, proteolysis, and lipolysis, while producing small amounts of exopolysaccharides. Our study also demonstrated that the three lactic isolates exerted a direct antibacterial action against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Salmonella abony*. Moreover, their supernatants exhibited indirect antibacterial activity against *B. cereus*. The supernatants C2, C3, and C4 are both sensitive to protease and temperature, which confirms the protein nature of the inhibitory substances. Bacteriocin C2 was thermally stable and remained active over a wide pH range from 3.5 to 6.5, while bacteriocin C3 remained stable for 30 minutes at 70°C and their efficacy were maintained at 100% at pH 6.5. It is important to note the resistance of *Enterococcus* sp. C2 towards the examined antibiotics, except for spiramycin, while *Enterococcus* sp. C3 and C4 showed resistance only to amoxicillin, tetracycline, and penicillin. It should be mentioned that the phenotypic screening for the production of hemolysin and biogenic amines showed that the strains appeared to be completely safe. The selected strains revealed a tolerance to temperature and low pH. They also demonstrated hydrophobic activity, auto-aggregation, and co-aggregation. These characteristics confer to these isolates the ability to colonize the intestine. Our discoveries have significant implications for the food sector, and this study will contribute to food innovation: unique flavors, the development of safer and more effective natural food preservation methods, and health benefits.

Key words: *Enterococcus* sp., lactic acid bacteria, technological characterization, bacteriocin-like, antibacterial activity, safety

الملخص

ركزت الدراسة الحالية على استغلال المنتجات الثانوية لصيد الأسماك، وخاصة أحشاء الأسماك. من خلال هذا النهج، كان عملنا قائمًا على فحص الخصائص التكنولوجية لبكتيريا *Enterococcus* المعزولة من الجهاز الهضمي لمسكتين بحريتين طازجتين *Sardina pilchardus* و *Sarda sarda*، على طول الساحل الجزائري. تم تحديد البكتيريا اللبنية *Enterococcus sp. C2* و *Enterococcus sp. C4* و *Enterococcus sp. C3* على مستوى النوع وفقًا للاختبار البيو كيميائي API 50 CH التسلسل الجيني ARNr16S. لقد قمنا بفحص الأنشطة التكنولوجية (التخمير، التحلل البروتيني، التحلل الدهني، المضاد للبكتيريا، العطرية وإنتاج البوليسكاريدات الخارجية) مع ضمان سلامة الغذاء، من أجل اختيار العزلة اللبنية الأكثر ملاءمة لتعزيز النشاط المضاد للبكتيريا، والخصائص الحسية والجودة الغذائية. أظهرت هذه العزلات المختارة قدرة منخفضة على التخمض، التحلل البروتيني والتحلل الدهني، بينما أنتجت كميات صغيرة من البوليسكاريدات الخارجية أظهرت دراستنا أيضًا أن العزلات اللبنية الثلاثة كانت تمارس تأثيرًا مضادًا للبكتيريا مباشرةً ضد المكورات العنقودية الذهبية (*S.aureus*)، العصويات (*B.cerus*، *B.subtilis*)، بكتيريا القولون (*E.coli*) سالمونيللا (*S.abony*) علاوة على ذلك، كانت المادة الطافية تطور نشاطًا مضادًا للبكتيريا بشكل غير مباشر تجاه *B.cereus*. السوبرناتانت (*surrogate*) *C2* و *C3* و *C4* حساسة لكل من البروتياز ودرجة الحرارة، مما يؤكد الطبيعة البروتينية للمواد المثبطة. كانت البكتيريوسين *C2* مستقرة حراريًا وظلت نشطة على نطاق واسع من الرقم الهيدروجيني من 3.5 إلى 6.5، بينما ظلت البكتيريوسين *C3* مستقرة لمدة 30 دقيقة عند 70 درجة مئوية وكانت فعاليتها محفوظة بنسبة 100% عند الرقم الهيدروجيني 6.5. من المهم أن نلاحظ أن المقاومة قد لوحظت لدى *Enterococcus sp. C2* تجاه المضادات الحيوية التي تم فحصها، باستثناء السيبرومييسين، بينما أظهرت *Enterococcus sp. C4* و *C3* مقاومة فقط للأموكسيسيلين والنتراسيكلين والبنسلين. من الجدير بالذكر أن الفحص الظاهري لإنتاج الهيموليسين والأمينات البيوجينية أظهر أن السلالات تبدو آمنة تمامًا. السلالات المختارة أظهرت تحملاً لدرجة الحرارة ودرجة حموضة منخفضة. لقد أظهرت أيضًا نشاطًا كارهاً للماء، وتجمعًا ذاتيًا، وتجمعًا مشتركًا. هذه الخصائص تمنح هذه العزلات القدرة على استعمار الأمعاء. اكتشافاتنا لها تداعيات ملحوظة على قطاع الأغذية وستساهم هذه الدراسة في الابتكار الغذائي: نكهات فريدة، وتطوير طرق للحفظ الطبيعي للأغذية تكون أكثر أمانًا وفعالية، وفوائد صحية.

الكلمات المفتاحية: *Enterococcus sp.*، بكتيريا الحليب، توصيف تكنولوجي، شبيهة البكتيريوسين، نشاط مضاد للبكتيريا، الأمان.

Introduction générale

Depuis longtemps, les bactéries lactiques (BL) jouent un rôle essentiel dans l'industrie alimentaire en raison de leur utilisation pour la fermentation et la conservation (Canon et al., 2020 ; Peng et al., 2020). Parmi ces BL c'elles d'origine marine qui sont isolées de différents environnements marins tel que l'eau de mer ou les algues marines ainsi que les produits de la mer surtout du tube digestif des poissons

Ces bactéries marines font preuve d'ingéniosité et d'adaptabilité pour survivre dans des environnements parfois hostiles (la température, la salinité et la disponibilité des nutriments). Pour cela, elles développent des métabolismes originaux sources d'une vaste gamme de biomolécules encore inexploitées et au potentiel d'innovation inestimable. Les substances biochimiques et les enzymes d'origine marine représentent donc un champ immense d'investigation pour de nombreuses applications biotechnologiques, via leur pouvoir acidifiant, protéolytique, lipolytique, aromatisant, amylolytique, l'aptitude antagoniste et la production des exo-polysaccharides (Tollis, 2014).

Le tube digestif des produits de pêche représente donc la source de souches à intérêt technologique, en particulier les souches bioprotectrices marines utilisées comme substituant ou alternatives aux additifs alimentaires tels que les conservateurs chimiques contestés par le consommateur (Passerini et al., 2021).

La course à l'innovation a permis de développer de nouvelles stratégies technologiques, conduisant à l'élaboration de nouveaux produits naturels. Cela est devenue bien plus qu'une tendance, à une époque où l'on prend de plus en plus conscience des problèmes de santé. Plus particulièrement, on recherche les bactéries vivant dans des conditions atypiques, ce qui constitue une base de recherche de molécules à forte activité biologique tels que les bactériocines et les EPS. Ces caractéristiques confèrent aux produits une diversité de valeurs nutritionnelles, une durée de vie prolongée et des propriétés organoleptiques souhaitables (Peng et al., 2020).

Les propriétés antibactériennes des bactériocines contre les agents pathogènes d'origine alimentaire et les bactéries d'altération ont suscité beaucoup d'intérêt en raison de leur utilisation potentielle dans la préservation des aliments (Hanchi et al., 2018).

Récemment, des travaux considérables ont fait l'objet pour introduire des bactériocines et des souches bactériocinogènes dans une variété de produits alimentaires.

En tant qu'additifs alimentaires naturels, les bactériocines produites par les bactéries lactiques, ont pour but d'améliorer la sécurité de nos aliments. La nisine et la pédiocine PA1/AcH ont été les seuls bactériocines approuvées pour une utilisation en tant qu'additifs alimentaires par l'Administration Américaine des Aliments et des Médicaments « FDA » (Martinez et al., 2016 ; Barbosa et al., 2017 ; Hanchi et al., 2018). De nouveaux agents antimicrobiens sont particulièrement nécessaires, ceux qui ciblent les bactéries résistantes aux antibiotiques (Fair and Tor, 2014).

A travers cette approche, le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des sous- produits de la pêche tels que les viscères de poissons, source de bactéries lactiques dotées de propriétés fonctionnelles incluses, le pouvoir inhibiteur. L'objectif de la présente étude se concentre sur :

- L'isolement de bactéries lactiques à partir du tractus gastro-intestinal (TGI) de deux types de poissons, la sardine (*Sardina pilchardus*) et la bonite (*Sarda sarda*).
- Identification biochimique et moléculaire des isolats lactique d'origine marine.
- Evaluation qualitative et quantitative du potentiel technologique des différents isolats.

Dans ce manuscrit triparti de trois chapitres, une étude bibliographique reprend initialement les connaissances apportées par les travaux antérieurs en relation a une description de la microflore du milieu aquatique, du poisson ainsi que sa biologie. En second lieu, l'étude est consacrée aux bactéries lactiques et la caractérisation des principaux genres. En dernier lieu, on présente les propriétés technologiques des bactéries lactiques et leur application industrielle. Une approche expérimentale, comme une deuxième partie, relative aux matériels et méthodes du protocole développé. Enfin, une troisième partie, résultats et discussion qui traite les résultats de la caractérisation qualitative et quantitative des activités métaboliques des entérocoques. Ce manuscrit se termine par une conclusion et perspectives.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

1. Microflore du milieu aquatique et du poisson

1.1. Microbiologie du milieu aquatique

Le milieu aquatique peut être considérablement pollué par les rejets humains et animaux et renfermer donc :

- Des germes pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Clostridium perfringens*, etc.). L'eau de mer contient une flore voisine de celle des eaux douces mais cette flore est adaptée aux conditions de salinité (Bouaziz, 2021).

On peut rencontrer en outre dans l'eau de mer et des océans :

- Des phytoplanctons microscopiques et les bactéries associés créant un réseau alimentaire complexe à différentes profondeurs.

Le phytoplancton est composé de microplancton autotrophe de taille 20-200µm, nanoplancton autotrophe de taille 2-20 µm et picoplancton autotrophe de taille de 0,2–2 µm tel que :

- ✓ Les algues unicellulaires eucaryotes
- ✓ Les bactérioplanctons procaryotes notamment les cyanobactéries. Le bactérioplancton est représenté par des cyanobactéries photosynthétiques de 0,4 à 2 µm. Leur développement excessif représente un risque sanitaire important pour la santé humaine et animale puisque certaines espèces peuvent produire des toxines et donc contaminer les eaux douces ou marines. Les cyanobactéries (ou cyanophytes) sont des microorganismes phytoplanctoniques possédant à la fois des propriétés communes aux algues et aux bactéries. Leur densité peut atteindre 10^6 cell/ml, ce qui fait que ce sont les organismes photosynthétiques les plus abondants de la biosphère. Cent cinquante genres de cyanobactéries peuvent produire des molécules toxiques (endotoxine) pour les mammifères (poissons et hommes) (Boukef-Ben Omrane, 2018).
- Des virus (bactériophages et entérovirus) et des parasites animaux et végétaux.

L'océan contient une abondance et une diversité surprenantes de virus. Leurs charges naturelles dépassent généralement 10^8 à 10^{11} particules virales par litre d'eau de mer, $1,2 \times 10^{30}$ particules virales dans tout l'océan et 10^{28} virus produits chaque jour dans tout l'océan (25 fois plus nombreux que les bactéries), ce qui en fait les entités biologiques les plus nombreuses, dépassant de plusieurs ordres de grandeur l'abondance des formes de vie cellulaire/microbienne telles que les archées, les bactéries et les protistes. Ils sont des parasites obligatoires des cellules vivantes. Sur

un plan fonctionnel, les virus ont été estimés, en milieu marin, la cause de plus de 30 % de la mortalité du bactérioplancton (cyanobactéries) et de près de 10% de la mortalité du phytoplancton (micro-algues) (Bachy et Badoux, 2022 ; Jacquet et al, 2023).

- Les parasites sont représentés par les métazoaires ou protozoaires appartenant à différents groupes notamment les nématodes, les cestodes et les trématodes (Amblard et al., 1998).
- Les levures et les moisissures sont présentes dans le milieu aquatique. Selon Fleet (1992), le nombre de cellules de levure par millilitre varie de 10^2 à 10^3 dans les environnements aquatiques. Les populations et la diversité des espèces microbiennes dépendent de leur situation géographique, des saisons et des niveaux de pollution, qui reflètent ceux des eaux environnantes (Pal et al, 2016 ; Tahiluddin et al., 2022).

1.2. Biologie des poissons

1.2.1. Généralités

Le poisson est un animal à sang froid (exotherme), c'est à dire que son métabolisme dépend de la température de l'eau qui l'entoure.

Un poisson possède des branchies qui absorbent l'eau et filtre l'oxygène nécessaire à son sang. Autrement dit, le poisson respire l'oxygène de l'eau à l'aide de ses deux branchies situées sur sa tête sans cesse en mouvement.

1.2.2. Morphologie des poissons

La forme générale d'un poisson varie selon son habitat, son mode d'alimentation, son mode de vie, son mode de nage, ...

- Les poissons plats vivent généralement sur le fond ;
- Les poissons « fusiformes » vivent dans la colonne d'eau et peuvent nager de longues distances ;
- Les poissons « anguilliformes » vivent généralement dans les interstices des roches ;
- Les poissons ayant de grandes nageoires ou aux formes extravagantes (hippocampe, diodon,...) sont généralement sédentaires, etc...

1.2.3. Types de poissons

La fraction lipidique est souvent le constituant qui subit les plus fortes variations saisonnières, avec généralement un minimum pendant la période de frais.

La teneur en matière grasse affecte fortement les caractéristiques techniques de la chair du poisson. Ainsi, on distingue 3 types de poissons en fonction de leur teneur en matières grasses.

- **Les poissons gras**

Ils ont une teneur en matière grasse supérieure à 8%. C'est le cas par exemple du thon, du maquereau, du saumon, de la sardine, de la bonite, etc... qui stockent particulièrement leurs lipides dans le muscle ;

- **Les poissons maigres**

Ils stockent la majorité de leur lipide dans le foie et qui contiennent moins de 2% de lipide. C'est le cas du cabillaud, du merlu, du carrelet, le tilapia, la perche, etc.,

- **Les poissons semi-gras**

Comme le mullet, le requin, la sole, l'anchois, etc. qui renferment des teneurs modérées en matière grasse, entre 4 et 8%, et généralement emmagasinée dans le foie, le muscle et le tissu adipeux périviscérale ou sous cutané. Comme chez les mammifères, les triglycérides sont, les principales formes de réserves des matières grasses, quel que soit le type de poissons (Médale et al., 2003).

1.2.4. Classification des poissons

- **Les poissons osseux**

Leur classe est la plus importante et la plus diversifiée des poissons. Ils possèdent un squelette constitué d'os et d'arêtes distinctes, notamment la truite, le merlan, la sardine, la bonite, le thon...

- **Les poissons cartilagineux**

Les poissons dits cartilagineux, sont dotés d'un squelette constitué de cartilage, dont les deux représentants sont les requins ou squales et les raies (la raie présente des arêtes soudées entre elles par du cartilage).

1.2.5. L'appareil digestif du poisson

Généralement, chez les poissons, le système digestif est constitué de la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin, le cæcum et l'anus (Fig.1 et Fig.2).

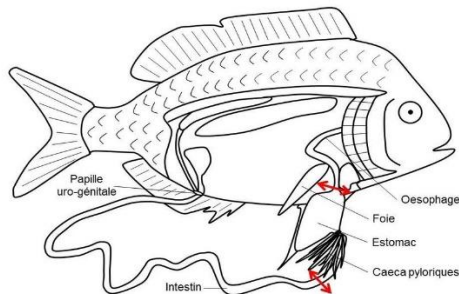


Figure 1. Dissection de l'appareil digestif d'un poisson osseux (Le Luherne et caillot, 2018)

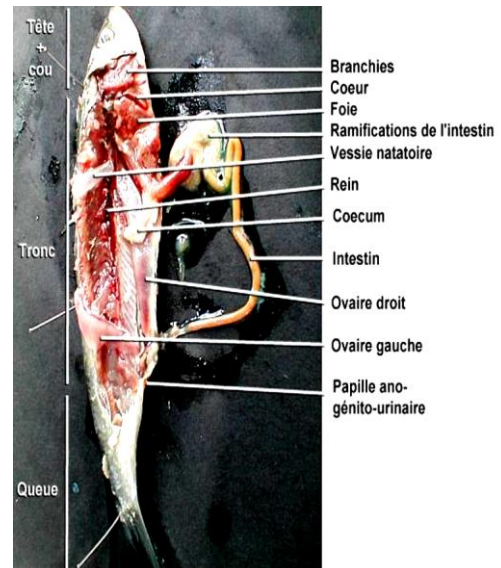


Figure 2. Dissection légendée d'une sardine femelle (10 cm) (Anonyme 1)

1.3. La composition biochimique et valeur nutritionnelle du poisson

Les produits de pêche sont des denrées alimentaires riches en protéines de haute valeur biologique, qui approuvent la comparaison avec les viandes pour plusieurs raisons. C'est un aliment qui fournit tous les constituants nécessaires à une ration équilibrée. La valeur énergétique des poissons maigres est généralement inférieure à celle de la viande de bœuf, par contre la chair des poissons gras présente la même valeur. Avec en plus l'avantage de contenir une plus grande quantité d'iode et de vitamine liposolubles (Dib, 2023).

La viande des poissons est riche en eau, en histidine, en azote non protéique, en phosphore et en oméga3, les poissons gras comme le thon, la sardine, le saumon et l'anchois, sont assez riches en oméga-3. Elle contient peu de glucides. Les principaux éléments chimiques sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1. Les constituants principaux du poisson et du muscle de bœuf (Huss, 1999, Belco Latifou et al., 2019)

Constituants	Filets de poisson (%poids vif) (intervalle normal)	Muscle de bœuf (%poids vif)
Protéines	16 – 21%	20

Lipides	0,2 – 25%	3
Hydrates de carbone	< 0,5%	1
Cendres	1,2 – 1,5%	1
Eau	66 – 81%	75

La flore de ces produits est fortement affectée par celle du milieu aquatique. En effet les poissons renferment une large gamme de taxons bactériens, qui reflètent souvent la composition de la microflore de l'eau environnante. On trouvera en outre une flore propre. Normalement, la chair des poissons est exempte de microorganismes, les régions contaminées sont les branchies, le mucus qui recouvre la peau et le tube digestif (Austin B., 2002).

1.4. La microflore du poisson

Le microbiome des poissons peut être très diversifié et inclure des protistes, des champignons, des levures, des virus et des membres de la famille des bactéries et des archées (Merrifield et Rodiles, 2015)

Des exemples de la flore bactérienne sont mentionnés dans le tableau 2.

Tableau 2. Flore bactérienne du poisson capturé dans des eaux propres non polluées (FAO, 1999).

Gram-négative	Gram-positive	Observation
<i>Pseudomonas</i> , <i>Moraxella</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Shewnella putrefaciens</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Cytophaga</i> <i>Vibrio</i> <i>Photobacterium</i> <i>Aeromonas</i>	<i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i> <i>Micrococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Coryneforms</i>	<i>Vibrio</i> et <i>Photobacterium</i> sont typiquement marins ; <i>Aeromonas</i> est typiquement d'eau douce.

Dans les eaux polluées, on peut trouver des charges élevées d'*Enterobacteriaceae*.

Les microorganismes sont en commun présents sur les surfaces de poissons, comme la peau et les branchies, ainsi que dans le tube digestif et les organes internes

(Sheng et Wang, 2020). La charge microbienne des poissons est généralement de l'ordre de 10^2 à 10^7 germes/cm² de peau et de 10^3 à 10^9 germes/g de branchies ou d'intestins (Kontominas, 2014 ; Belco Latifou, 2019).

La flore de surface des poissons d'eau de mer est constituée par des bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Sarcina*, *Proteus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, etc. La flore est plus ou moins psychrophile selon la température habituelle de l'eau. La flore intestinale est constituée dans tous les cas de bactéries appartenant aux genres *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Vibrio*, etc. Des contaminations ont lieu via l'environnement et des manipulations (Bouaziz, 2021).

1.4.1. La flore microbienne du poisson vivant ou fraîchement capturé

Le poisson frais signifie un poisson conservé vivant jusqu' à sa consommation ou un poisson mort conservé par l'eau froide ou la glace. On peut dire que tout poisson ne présentant pas d'odeur suspecte, dont l'œil est brillant, saillant, la pupille très noire, les branchies fraîches et roses, le corps ferme est considéré un poisson frais (FAO, 1999). Plusieurs travaux menés en Inde (Surendran et al., 1989) ont permis d'isoler une microflore qui comporte les *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* et *Vibrio* à partir de poisson fraîchement pêché. Une autre étude sur la microflore de la sardine pêchée en mer méditerranée (adriatique) et entreposée sous glace, menée par Gennari et al. (1999), a montré que la flore bactérienne de la sardine fraîche était constituée principalement de germes à Gram négatif, non fermentatifs appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Acinetobacter* et *Shewanella* accompagnés d'une faible proportion d'*Enterobacteriaceae* et de bactéries à Gram positif.

De nombreuses flores microbiennes associées aux poissons ont été étudiées pour définir les groupes bactériens normalement associés aux différentes espèces de poissons. Les bactéries isolées à partir de la peau et les branchies peuvent être transitoires plutôt que résidentes à la surface des poissons. *Photobacterium phosphoreum* qui peut être isolé de la surface du poisson, se retrouve également en grand nombre dans l'appareil gastro-intestinal de certaines espèces de poissons (Dalgaard, 1993). La microflore intestinale semble varier en fonction de la complexité du tube digestif du poisson. Les genres présents dans l'intestin semblent généralement

être ceux qui proviennent de l'environnement ou du régime alimentaire et qui peuvent survivre et se multiplier dans le tractus intestinal (Cahill, 1990). Généralement, le poisson est considéré un aliment sain et la chair du poisson sain, vivant ou fraîchement pêché est considérée stérile (Karunasagar, 2015 ; Novoslavskij et al., 2016), car le système immunitaire du poisson empêche la prolifération des bactéries dans sa chair. A la mort du poisson, le système immunitaire s'effondre et les bactéries peuvent se multiplier spontanément.

A la surface de la peau, les bactéries colonisent largement les alvéoles des écailles. Lors du stockage, elles envahissent la chair en se déplaçant entre les fibres musculaires. Murray et Shewan (1979) ont montré que seul un nombre très limité de bactéries envahie la chair pendant la préservation sous glace. Lorsque le nombre de microorganismes à la surface de la peau dépasse 10^6 UFC/cm², des bactéries peuvent être détectées au microscope dans la chair, stockée sous glace ou à température ambiante (Ruskol et Bendsen, 1992).

- **La microflore de la peau**

Des exemples de genres bactériens isolés à partir de la peau de poisson sont donnés dans le tableau 3.

Tableau 3. La flore bactérienne de la peau du poisson (Kahill, 1990)

Espèces de poisson	Location	Les bactéries isolées	Références
Divers	USA	<i>Pseudomona</i> 43.9%, <i>Vibrio</i> 3,4%, <i>Achromobacter</i> 18.1%, <i>Flavobacterium</i> 8.6%, <i>Corynebacterium</i> 7.8%, <i>Micrococcus</i> 6.9%,	Colwell (1962)
Salmon atlantique (<i>Salmo salar</i>)	Ecosse	<i>enterobacterim</i> 5,2%, <i>Bacillus</i> 0,9%, <i>others</i> <i>Moraxella</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium/Cytoph</i> Bay , <i>aga</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>coryne</i> Scotlet <i>forms</i> , <i>Micrococcaceae</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Aeromonas</i>	Horsley (1973)
Rouget de mer (<i>Mugil cephalus</i>)	Australie		

Merlan (<i>Sillago cilliata</i>), Dorade (<i>Mylio australis</i>) et poisson à tête plate (<i>Platycaphalus fuscus</i>)	Ecosse	<i>Micrococcus</i> 49%, <i>Pseudomonas</i> %, <i>coryneforms</i> 12%, <i>Moraxella</i> 8%, <i>Flavobacterium/Cytophaga</i> 8%, plus <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , et <i>Vibrio</i>	Gillespie et Mac Rae (1975)
Plie (<i>Pleuronectes platessa</i> L.)	Angleterre	<i>Pseudomonas</i> Groups I, II, et IV/ <i>Achromobacter</i> / <i>Alcaligenes</i> <i>Agrobacterium</i> , <i>Vibrio/anaerogenic</i> <i>Aeromonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Moraxella</i>	Gilmour et al. (1976)
Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i> L.)		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Alcaligenes spp.</i> , <i>Bacillugs spp.</i> , <i>Caulobacter spp.</i> , <i>coryneforms</i> , <i>Cytophaga-Flavobacterium</i> <i>Flexibacter spp.</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Hyphomicrobium-Hyphomonas spp.</i> , <i>Lucibacterium harveyi</i> , <i>Photobacterium spp.</i> , <i>Prosthecomicrobium spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Vibrio spp.</i>	Austin (1983)

Horsley (1973) a examiné les bactéries de la peau du saumon de l'Atlantique en milieu marin. Il y avait 10^2 à 10^3 bactéries hétérotrophes viables cm^{-2} sur la peau. Environ 25 taxons, ont été isolés de la peau de Turbots sains. *Photobacterium angustum*, *Photobacterium logei*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus firmus* ont été isolés exclusivement de la surface de poissons sains (Austin, 1982, 1983).

- **La microflore des branchies**

Les tissus branchiaux sont colonisés par des populations bactériennes importantes jusqu'à 10^6 bactérie g^{-1} de tissus (Austin, 2002). Les études menées par Shewan (1961) ont enregistré des espèces de *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacter* et *Vibrio* sur les branchies de poissons marins. La présence de carnobactéries (*Carnobacterium piscicola-like*) sur les branchies de l'omble chevalier à des nombres d'environ 3×10^4 UFC/g a été démontrée (Ringo et Holzapfel, 2000).

Moraxella représentait 32 % de la flore des poissons des sites d'échantillonnage marins.

- **La microflore intestinale**

Le tractus intestinal des poissons renferme une communauté complexe de micro-organismes dont les bactéries constituent le microbiote le plus dominant. La colonisation de l'intestin du poisson commence dès le stade larvaire et est continuellement maintenue lorsque le développement larvaire est achevé conduisant à un microbiote intestinal. Environ 10^8 cellules bactériennes, appartenant à plus de 500 espèces différentes, envahissent le tractus gastro-intestinal y compris des germes du groupe Vibrio-Aeromonas apportés par les proies vivantes, pouvant atteindre une grandeur de l'ordre de 10^7 à 10^8 (UFC)/g de larve. Puis cette charge bactérienne décroît lorsque la nourriture des jeunes alevins passe des proies vivantes aux aliments composés. Le même groupe de bactéries reste généralement dominant avant et après ce changement de régime (Gatesoupe et Lésel, 1998; Egerton et al., 2018; Talwar et al., 2018).

Le tube digestif des poissons marins adultes contient des *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et *Vibrio*, y compris *V. iliopiscarius*. Ces micro-organismes comprennent aussi les bactéries lactiques. Ces dernières sont identifiées à plusieurs espèces appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus* et *Weissella*, adaptées pour se développer dans des conditions environnementales très différentes et sont des représentants importants du microbiote intestinal des poissons d'eau douce et d'eau de mer (Gatesoupe et Lésel, 1998 ; Austin, 2002). Récemment, de nombreuses études réalisées notamment celles menées par Iorizzo et al. (2021) permettant de mettre en évidence que dans la communauté des bactéries lactiques du microbiote intestinal de la truite méditerranéenne, il existe une prédominance de *Carnobacterium maltaromaticum* et *Lactobacillus plantarum*. D'autres bactéries lactiques présentes dans la muqueuse épithéliale ont été assimilées à *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Streptococcus spp.* Dans une autre étude, *Lactobacillus*, *Enterococcus durans*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *C. divergens* et *C. piscicola* ont été isolés des poissons d'eau douce, notamment la truite brune (*Salmo trutta*). Une nouvelle espèce, *C. inhibens*, a été retrouvée dans l'intestin du saumon de l'Atlantique

et a démontré une activité antibactérienne contre les pathogènes des poissons, notamment *Aeromonas salmonella* et *Vibrio anguillarum*. D'autres travaux ont décelé que les viscères des poissons de la mer sont dominés par *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Carnobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* et *Vibrio* (Talwar et al., 2018). Des exemples d'espèces bactériennes isolées à partir des intestins sont donnés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Les espèces bactériennes isolées du tractus intestinal des espèces de poissons au stade larvaire et post-larvaire (Egerton et al., 2018)

Espèces de poisson	Genre bactérien	Références
Morue de l'Atlantique, <i>Gadus morhua</i>	<i>Vibrio/Aeromonas</i> <i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Cytophaga/Flexibacter</i> , <i>Lactobacillus</i> ,	Strøm et Olafsen, 1990 Strøm et Ringø, 1993 Bergh et al., 1994 Bergh, 1995
Flétan de l'Atlantique, <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	<i>Cytophaga/Flexibacter/Flavobacterium</i> <i>Vibrio/Aeromonas</i>	Campbell et Buswell, 1983
Sole commune, <i>Solea solea</i>	<i>Pseudomonas/Alcaligenes</i> , <i>Vibrio/anaerogenic Aeromonas</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Flavobacterium/Cytophaga</i> , <i>Moraxella</i> , <i>coryneforms</i>	Nicolas et al., 1989
Turbot, <i>Scophthalmus Maximus</i>	<i>Vibrionaceae</i> <i>Aeromonas caviae</i> , <i>Acinetobacter</i> <i>Pseudomonas/Alcaligenes</i> , <i>Flavobacterium/Cytophaga</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Moraxella</i>	Ringo et al., 1996 Hansen et al., 1992 Tanasomwang et Muroga, 1989
Hareng, <i>Clupea harengus</i> Sébaste coreen (perche noir), <i>Sebastes schlegeli</i>	<i>Aeromonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Cytophaga</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>coryneforms</i> <i>Pseudomonas/Alteromonas</i> , <i>Flavobacterium</i> <i>Vibrio</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	Muroga et al., 1987 Muroga et al., 1987 Fernetez et al., 1996 Gatesoupe et al., 1997
Dorade rouge, Dorade japonaise, Dorade noir, <i>Acanthopagrus schlegeli</i> Poisson-lait, <i>Chanos chanos</i>	<i>Aeromonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Cytophaga</i>	Ringø et Johnsen

Loup de mer (perche de mer), <i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	
Poisson loup, <i>Anarhichas lupus</i>	<i>Vibrio</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Carnobacterium divergens</i>	

14.2. La microflore du poisson mort

- **Evolution de la microflore et altération bactérienne du poisson mort**

Après la capture, des mécanismes d'évolution des produits de la pêche sont déroulés, suivies immédiatement par les altérations.

Dès l'arrêt de la circulation sanguine un milieu favorable à l'anaérobiose est créé. Les mécanismes d'altération des poissons sont très complexes et dus d'une part aux enzymes tissulaires et digestives et à l'oxydation des lipides qui surviennent immédiatement après la mort de l'organisme, et d'autre part à l'hétérogénéité des microflores bactériennes dont la composition est en relation étroite à l'origine des poissons et à leur environnement (Belco Latifou et al., 2019). Du fait de leur composition, les produits de pêche sont de nature instables et donc très périssables de part des caractéristiques de leurs constituants (pH neutre, une activité de l'eau élevée, forte teneur en substances nutritives). La décomposition des produits aquatiques, étape ultime de l'altération, représente un phénomène séquentiel débutant après la mort du poisson (post mortem). Cette dernière est due aux enzymes tissulaires via l'autolyse suivie d'une dégradation bactérienne. A cette étape, le niveau bactérien des poissons tropicaux est semblable à celui observé sur les espèces de poissons des eaux tempérées (Gram, 1990 ; Gram et al., 1996). La dégradation microbienne résulte de la flore de surface et de la flore intestinale, pouvant envahir les tissus après autolyse des viscères d'où l'intérêt d'une éviscération rapide. À basse température, les germes les plus actifs sont les *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alteromonas* et *Flavobacterium* ; à température ordinaire interviennent les *Micrococcus* et *Bacillus*. Dans d'autres cas sont inclus des coliformes, *Proteus*, *Clostridium*, etc. (Belco Latifou, 2019). La vitesse d'altération et la durée de conservation du poisson sont influencées par plusieurs paramètres. En général, on peut dire que les poissons les plus gros se décomposent plus lentement que les plus petits, les poissons plats se gardent mieux que les poissons

ronds et les poissons maigres se conservent plus longtemps que les poissons gras en aérobiose ; de même les poissons osseux restent conformes plus longtemps que les cartilagineux. La peau des poissons pélagiques gras est souvent très mince et ceci peut aboutir à leur altération rapide car les enzymes et les bactéries peuvent y pénétrer plus rapidement. Au contraire, la peau épaisse des poissons plats et les composés antibactériens trouvés dans leur mucus peuvent contribuer à leur bonne conservation. En effet, le mucus du poisson plat contient des enzymes bactériolytiques, des anticorps et différentes autres substances antibactériennes (Huss, 1999).

L'altération Post Mortem du poisson met en jeu des processus chimiques, physiques et microbiologiques et des modifications observées le long de l'évolution du poisson sont d'ordre physique, chimique, biologique et sensoriel.

- **Changements autolytiques et réactions chimiques**

Les activités enzymatiques telles que les substances chimiques naturellement présentes dans le poisson, utiles pour la digestion et l'activité musculaire, à la mort du poisson, responsables de l'autolyse ainsi que l'oxydation. Sans protection le poisson se déshydrate.

- **Changements bactériologiques**

Principalement présentes en surface sur la peau, les branchies et les intestins, les bactéries constituent un facteur déterminant de la dégradation de la qualité des produits de la pêche. Effet souvent rapide, fréquent, mais souvent peu grave (virus, bactérie, parasite). En général la chair de poisson est stérile, les microorganismes y apparaissent et prolifèrent à la suite de lésions ou de conditions de détérioration.

- **Changements organoleptiques et physiques**

Les changements organoleptiques initiales qui se manifestent après la mort du poisson sont principalement utilisés par les consommateurs pour évaluer l'état de fraîcheur des poissons (Cheng et al., 2014 ; Belco Latifou et al., 2019).

Les germes d'altération provoquent de mauvais goût, de mauvaises odeurs, de rancissement, de colorations ou de décolorations, de dégradations et surtout de putréfactions des protéines et graisses. L'altération aboutit le plus souvent à la production d'ammoniac et d'amines. Des amines biogènes toxiques (histamine) peuvent être formées à partir d'acides aminés par décarboxylation ceci est fréquent chez certaines familles de poissons (Belco-Latifou, 2019 ; Bou-Aziz, 2022).

Suivant les espèces bactériennes dominantes, il existe des différences dans le profil d'altération. L'altération par *Shewanella* se caractérise par l'accumulation de la triméthylamine (TMA) et les sulfures (H_2S) tel que l'altération par *Pseudomonas* qui se traduit par la production d'odeurs douces et sulfhydriques de pourri (FAO, 1999).

Les changements physiques sont dues au pH et au potentiel Redox (Eh) du poisson qui sont des indicateurs du degré de fraîcheur et de détérioration des poissons (Makawa et al. 2014 ; Akter et al., 2014). Le pH du poisson vivant ou frais est proche de la neutralité (environ 7) et diminue normalement les premières heures qui suivent la mort suite à la formation d'acide lactique en anaérobiose dans la chair du poisson. Après quelque jours, le pH se stabilise puis augmente à cause de l'accumulation des dégradations des composés azotés et une accumulation des peptides et des amines, résultant d'une activité microbienne et aux réactions autolytiques des enzymes bactériennes (Ozyurt et al., 2009 ; Liu et al., 2010 ; Farid et al., 2014 ; Makawa et al. 2014).

Un pH bas favorise la déperdition de l'eau et la chair devient sèche alors qu'un pH élevé permet une bonne rétention d'eau et présente une meilleure jutosité (Erkan et al., 2011).

1.4.3. La flore spécifique d'altération du poisson (SSO)

L'altération sensorielle apparaît bien après que la flore totale ait atteint son maximum de croissance, que ce soit dans les poissons frais conservés à l'air ou dans les poissons transformés et/ou emballés. Seules certaines espèces du microbiote sont à l'origine de la dégradation organoleptique des produits via la synthèse de métabolites altérants (Fig. 3). Il s'agit de « bactéries spécifiques d'altération », ce qui est l'équivalent du concept anglophone « SSO » (Specific Spoilage Organism) (Gram et Huss, 1996; Gram et Dalgaard, 2002). L'altération sensorielle n'est perceptible que lorsque les SSO atteignent un niveau suffisant (souvent entre 10^6 et 10^9 UFC g^{-1}) (Gram et Dalgaard, 2002).

Dans le poisson conservé sous glace, ce sont les bactéries psychrotrophes appartenant au genre *Pseudomonas* et à l'espèce *Shewanella putrefaciens* qui prédominent.

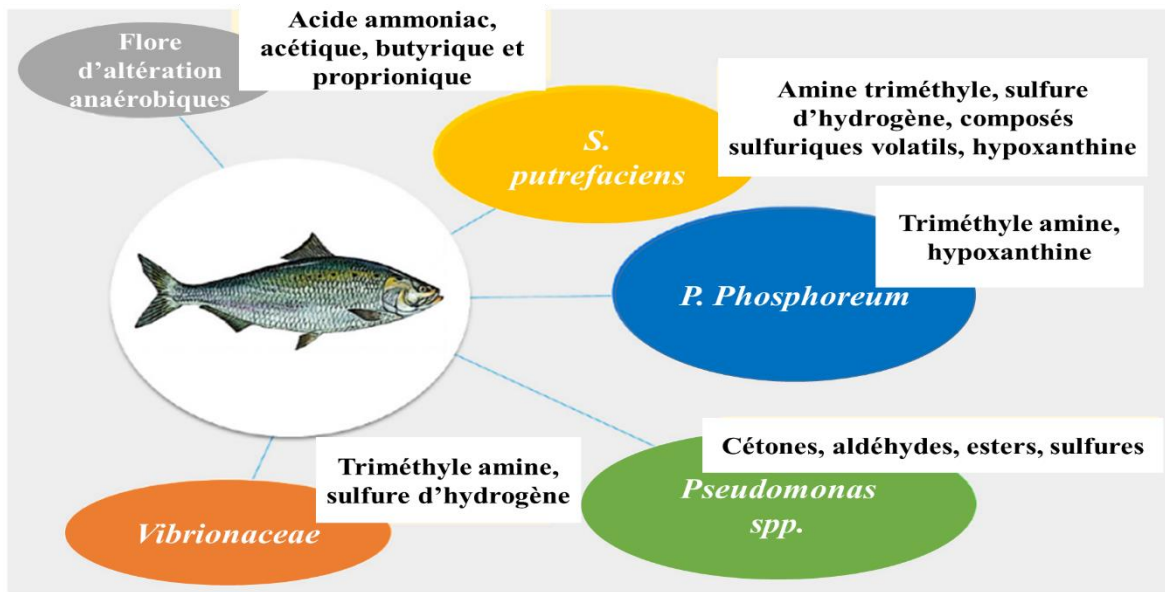
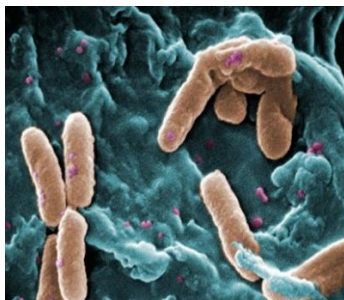


Figure 3. Types de bactéries d'altération et composés typiques retrouvés lors de l'altération du poisson (Rathod et al., 2022).

- **Bactéries à Gram-négatif**

A. Genre *Pseudomonas*



Bactérie>Prokaryota>Proteobacteria>
Pseudomonadales>Pseudomonaceae>Pseudomonas
Espèce type : *P.aeruginosa*
G+C : 58 à 70%
Bacille, 1 à 5 µm×0,5 µm
Gram-, catalase+, oxydase+
Aérobie strict, non fermentaire
Mésophile (4-45°C) optimum : 30 à 37°C)
Ubiquitaire (sol, milieu aquatique)

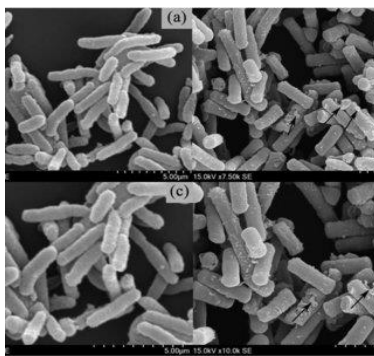
Figure 4. Photographie au microscope électronique (barre = 2 µm) et principales caractéristiques taxonomiques et physiologiques du genre *Pseudomonas* sp. (Carr, 2008).

Le genre *Pseudomonas* a été créé en 1894 par Migula. Ce genre constitue l'un des plus complexes parmi ceux des bactéries à Gram négatif. Les espèces classifiées sont principalement des microorganismes saprophytes d'origine essentiellement telluriques et aquatiques. Certaines espèces de *Pseudomonas* sont impliquées dans les altérations des denrées alimentaires réfrigérées, en produisant des enzymes (protéases et lipases) qui sont à l'origine du dégagement des odeurs indésirables (Alquati et al., 2002).

Dans le thon conditionné sous atmosphère modifiée, ces bactéries sont très sensibles à la présence de CO₂ (Emborg et al., 2005) . Ainsi, elles ont des difficultés à se

développer lorsque la teneur en eau du produit est trop faible ($a_w < 0,97$). Le salage, le séchage et le fumage et/ou le conditionnement sous-vide et sous atmosphère CO_2/N_2 sont donc des méthodes efficaces pour lutter contre cette flore. L'action des bactéries de ce genre dépend des espèces et de l'hôte. Certaines espèces sont pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes alors que d'autres sont en revanche utiles (décontamination des sols et de bio-dépollution des milieux aquatiques, fertilisation des sols puisqu'elles décomposent la matière organique) (Meghdas et al., 2004).

B. *Shewanella* sp.



Bacteria>Prokaryota>γ- Prteobacteria>Alteromonadales>
Shewanellaceae>
Shewanella
Espèce type : *S. putrefaciens*
G+C : 44 à 47%
Bacille, 2 à 3 $\mu m \times 0,4$ à 0,7 μm
Gram-, catalase+, oxydase+
Anaérobie facultative, non fermentaire
Psychrotrophe (4 à 40°C, optimum 25 à 35°C)
Ubiquitaire (sol, milieu aquatique)

Figure 5. Photographie au microscope électronique (barre = 2 μm) et principales caractéristiques taxonomiques et physiologiques du genre *Shewanella* sp. (Dennis Kunkel, 2004)

Le genre *Shewanella* a été nommé d'après James Shewan (1960). La première espèce a été identifiée comme *Achromobacter putrefaciens* isolée du beurre rance par Derby et Hammer en 1931, qui a ensuite été renommée *Pseudomonas putrefaciens* en 1941 puis *Alteromonas putrefaciens* en 1977 (Hammer et al., 1941 ; Lee et al., 1977). En 1985, Mac Donell et Colwell l'ont finalement reclassée en *Shewanella*.

L'espèce type *Shewanella putrefaciens* est décrite pour la première fois comme une espèce caractérisée par son exigence en sodium. Elle fait partie de la microflore marine, en constituant un important agent de détérioration des aliments réfrigérés riches en protéines (Müller et al., 2023). Le genre comprend plus de 50 espèces qui présentent diverses activités uniques, telles que la réduction des métaux et la production de triméthylamine. Certaines espèces se développent à une température ($T \leq 4$)°C et produisent une variété de sulfures volatils, y compris le H_2S . Chez les poissons de mer, elles réduisent l'oxyde de triméthylamine (TMAO) en triméthylamine

(TMA), qui a une odeur de poisson. Les *Shewanella spp.* impliquées dans l'altération des aliments sont illustrées par *S. putrefaciens*. Cette espèce joue un rôle important dans l'altération des poissons de mer conservés dans la glace, dont l'altération implique également *Photobacterium spp.*, *Pseudomonas spp.* et des bactéries lactiques (Satomi et al., 2007, 2014).

Le poisson et les produits de la pêche sont, en général, d'excellents substrats pour la croissance microbienne. Comme d'autres matières premières alimentaires, le poisson non transformé contient de grandes quantités d'eau et est riche en azote non protéique (NPN), comme les acides aminés libres. À partir de ces substrats, plusieurs facteurs, tel que le pH du muscle de poisson qui est rarement inférieur à 6,0, favorisent, la production d'une série de composés volatils importants pour la détérioration, par *S. putrefaciens*, notamment la TMA, les sulfures, l'ammoniac, les cétones et les aldéhydes. Le **TMAO** fait partie de la fraction d'azote non protéique, après accumulation, il est métabolisé par des enzymes bactériennes spécifiques, la TMAO oxydoréductase et la TMAO-déméthylase, produisant de la de la triméthylamine (**TMA**), un composé connu pour son odeur caractéristique de poisson, et de la diméthylamine (**DMA**). Ces deux composés contribuent collectivement à l'azote basique volatil total (TVB-N) avec des limites supérieures suggérées de 30-45 mg/100 g pour les produits de la mer (Leisner et Gram, 2014 ; Muzaddadi et al., 2016).

Des odeurs putrides très désagréables sont provoquées par la production d'H₂S à partir de l'acide aminé soufré l-cystéine et par la production de méthylmercaptan (CH₃SH) et de sulfure de diméthyle ((CH₃)₂S) à partir de la méthionine par *Shewanella putrefaciens* (Satomi et al., 2007 ; Leisner et Gram, 1999 ; 2014).

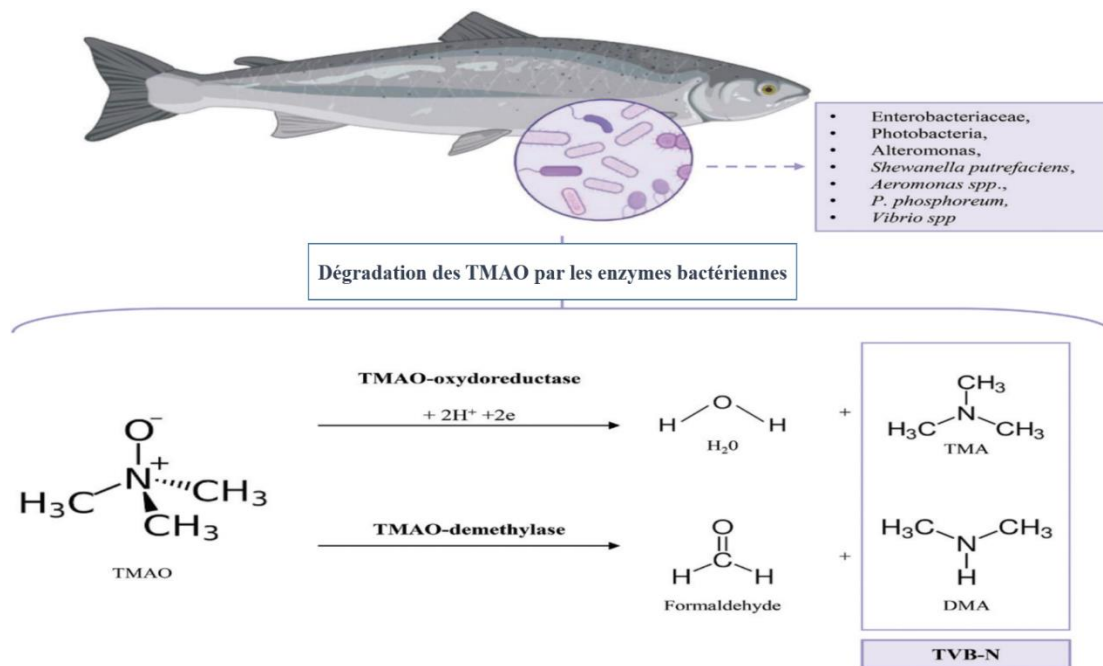


Figure 6. Processus enzymatique la conversion du TMAO par les bactéries (SSO) présentes dans la chair (Conz et al., 2024).

C. *Aeromonas* sp.



Bacteria>Proteobacteria>Gammaproteobacteria>Aeromonadales>
 Aeromonadaceae>Aeromonas
 Espèce type : Aeromonas
 G+C
 Bacilles Gram négatif, en courtes chainettes
 Gram négatifs ou capsulés
 Asporulés
 Mobile (ciliature monotriche) ou immobile
 Environnement : sol, eaux +++, denrées alimentaires (viandes, poissons, crustacées)

Figure 7. Photographie au microscope électronique (barre = 1 µm) et principales caractéristiques taxonomiques et physiologiques du genre *Aeromonas* (Anonyme3).

Le genre *Aeromonas* a été décrit en 1943 par Stanier, celui-ci a été divisé en deux groupes dans le milieu des années 1970. Le premier renferme les espèces mésophiles (représentant : *A. hydrophila*) et le second les espèces psychrophiles (représentant : *A. salmonicida*) (Jeta et Abbott, 2010). Ces bactéries sont des pathogènes opportunistes présents dans diverses niches écologiques (eaux, poissons, aliments, etc...). Les *Aeromonas* sont typiques des poissons d'eaux douces mais peuvent être isolées des eaux marines (Dauchy Silbete, 2016).

Ils sont présents dans la flore initiale du thon jaune où il représentent entre 12 et 23% des isolats de la peau, des branchies, des intestins et de la chair (Emborg et al., 2005).

D. *Vibrio*



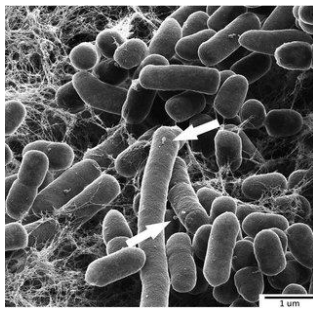
Bacteria>Pseudomonadota>Gammaprotéobactéria>
Vibrionale>Vibrionaceae> *Vibrio*
Espèce type : *Vibrio*
Bacille Gram- de forme incurvé
Mobilité : ciliature polaire
Environnement : Eau, habitats aquatiques salés (eau de mer, intestins des animaux marins)
Caractère halophile

Figure 8. Photographie au microscope électronique (barre = 2 μ m) et principales caractéristiques taxonomiques et physiologiques du genre *Vibrio*. Image copyright (Fortuna, 2024)

Certaines espèces sont pathogènes pour l'homme (*Vibrio Cholerae*) engendrant le choléra alors que d'autres le sont pour les animaux aquatiques : *Vibrio* cholériques des eaux douces et marines et sont halotolérants (jusqu'à 3% de) NaCl. *Vibrio* halophiles isolés dans les eaux côtières saumâtres et dans les espèces aquatiques (coquillages, crustacés et poissons) tolèrent jusqu'à 6 à 8% de NaCl.

- *Vibrio parahaemolyticus* : une espèce isolée en mer Méditerranée, tolérant de 8 à 10% NaCl. Cette espèce est à l'origine de toxi-infection sévère chez l'homme après consommations des poissons contaminés crus ou peu cuits.
- *Vibrio alginolyticus* : c'est l'espèce la plus dominante dans l'environnement marin
- *Vibrio anguillarum* : Espèces pathogènes pour les poissons (Boukef-Ben Omrane, 2018).

E. *Flavobacterium*



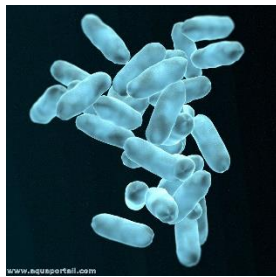
Bacteria>Bacteroidota>Flavobacteriia>Flavobacteriales>
 Flavobacteriaceae>Flavobacterium
 Espèce : *Flavobacterium*
 G+C : 30 à 41%
 Bacilles
 Gram-, catalase+, oxydase+
 Aérobie obligatoire
 Mobiles par glissement
 Ubiquitaire : sol, eau douce, eau marine, poisson

Figure 9. Photographie au microscope électronique (barre = 1μm) et principales caractéristiques taxonomiques et physiologiques du genre *Flavobacterium* (Leppänen et al., 2017)

Le genre *Flavobacterium* a été établi par Franklet en 1889 et, depuis lors, de nombreuses modifications ont été apportées à sa description. Ces bactéries peuvent jouer un rôle spécialisé dans l'absorption, la dégradation et la décomposition de la matière organique dans les environnements aquatiques froids et dans la biomasse du bactérioplancton. En effet, de nombreuses espèces du genre *Flavobacterium* sont capables d'hydrolyser des polymères organiques, tels que des polysaccharides complexes (Bernardet et al., 1996 ; Qu et al., 2008).

Les membres du genre *Flavobacterium* sont largement répandus dans la nature et ont été isolés dans divers habitats, tels que des poissons malades, des sédiments d'eau douce et de rivière, de l'eau de mer et des sédiments marins, des sols et des glaciers (Bernardet et al., 1996 ; Zhu et al., 2003). Parmi les nouvelles espèces de *Flavobacterium*, trois ont été isolées à partir de poissons : *Flavobacterium oncorhynchi* provenant du foie et des branchies de truite arc en ciel (Zamora et al., 2012), *Flavobacterium chilense* de lésions externes de truites arc-en-ciel malades, et *Flavobacterium araucanum* de reins et de lésions externes de deux espèces différentes de saumon de l'Atlantique (Waskiewicz et Irzykowska, 2014).

F. *Photobacterium*



Bacteria>Pseudomonadota>Gammaproteobacteria>Vibrionales>Vibrionaceae>

Photobacterium

Espèce type : *Photobacterium*

G+C

Bacille fluorescente, Gram-, catalase+, oxydase+

Mobile, libre ou découvert en colonies associées à certaines espèces de poissons.

Figure 10. Photographie au microscope électronique (barre = 1 μ m) et principales caractéristiques taxonomiques et physiologiques du genre *Photobacterium* (Anonyme 2).

Photobacterium phosphoreum est un organisme commensal bien connu de plusieurs espèces de poissons, mais l'habitat le plus commun de ce dernier est l'intestin des poissons marins. La présence et la croissance de *Photobacterium phosphoreum* ont été étudiées dans 20 expériences avec des poissons frais provenant du Danemark, d'Islande et de Grèce. L'organisme a été détecté dans toutes les espèces marines, mais pas dans les poissons d'eau douce. De nombreux poissons sont contaminés par *P. phosphoreum* car l'organisme est largement répandus dans l'environnement marin (Dalgaard et al., 1997). Dans les produits de la pêche, *P. phosphoreum* produisait de la triméthylamine (TMA) à partir de l'oxyde de triméthylamine (TMAO), dans les poissons conservés en aérobiose, et qu'il jouait un rôle important dans la production d'histamine. *P. phosphoreum* a été identifié comme l'organisme de détérioration spécifique (SSO) responsable de la production de TMA car il présentait une forte résistance à la concentration de CO₂. Ce qui explique la durée de vie limitée des poissons conditionnés sous atmosphère modifiée (MAP) (Dalgaard et al., 1993,1997 ; Dalgaard, 1995a,b).

- Bactéries à Gram-positif

A. *Carnobacterium*



Bacteria>Firmicutes>Bacille>Lactobacillales>Carnobacteriaceae>Carnobacterium
 Espèce type : *Carnobacterium divergens*
 G+C : 33 à 44%
 Bacille mince
 Gram+, catalase-, oxydase-
 Anaérobie-aéro-tolérante, Fermentaire
 Psychrotrophe (0 à 45°C, optimum 23 à 30°C)
 Ubiquitaire : aliment (viande, lait, poisson)

Figure 11. Photographie au microscope électronique des cellules *Carnobacterium* (bar = 5 µm). Source: Wiley & Sons (2015) image copyright (Collins et al., 1987)

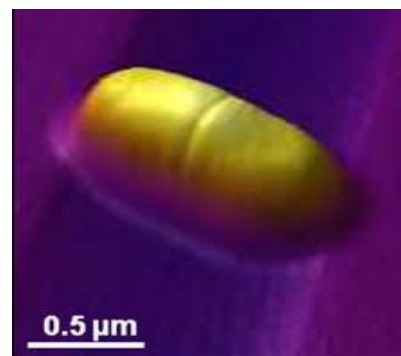
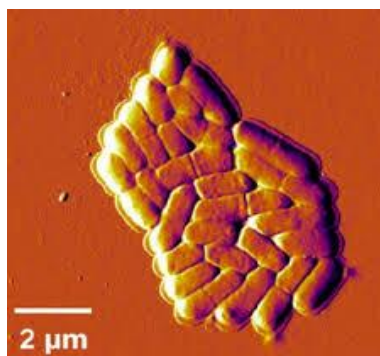


Fig. 12. Microscopie à force atomique d'une microcolonie (panneau de gauche) et d'une cellule unique (panneau de droite) de *C. maltaromaticum* DSM207302 (Cailliez-Grimal 2014)

Carnobacterium a été proposé par Collins en 1987. Les représentants du genre sont ubiquitaires et ont été isolés dans des environnements froids et tempérés. Ils sont fréquents chez les poissons, en particulier dans le tube digestif (Ringø et al. 2001 ; Austin, 2002). Une série d'espèces de *Carnobacterium* ont été identifiées comme constituant du microbiote intestinal des salmonidés. La première étude visant à isoler des carnobactéries à partir de poissons a été menée par Strøm (1988) qui a isolé une souche (Lab01) du tractus gastro-intestinal du saumon sauvage de l'Atlantique, initialement identifiée comme *Lactobacillus plantarum*, puis reclassée comme *Carnobacterium divergens* (Ringø et al. 2001).

Carnobacterium maltaromaticum a été isolé pour la première fois chez des malades de la truite arc-en-ciel et du saumon, et il a été donc décrit comme agent pathogène du

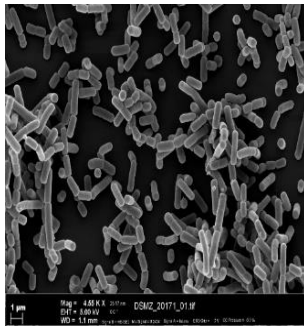
poisson. Par la suite, d'autres carnobactéries sont identifiées comme des composants de la flore gastro-intestinale normale de poissons sains (*C. divergens* et *Carnobacterium inhibens*). Parmi les 10 espèces du genre *Carnobacterium*, *C. divergens* et *C. maltaromaticum* (anciennement *C. piscicola*) sont plus fréquemment isolées des produits alimentaires (Cailliez-Grimal et al., 2014). Les représentants du genre *Carnobacterium* ont des habitats divers ; ils ont été isolé de viande rouge, de volaille et de produits de pêches (*C. inhibens*) (Hiu et al., 1984 ; Leroi et al., 1998) et *C. maltaromaticum* (Edima, 2007).

Plusieurs bactéries d'intérêt du genre *Carnobacterium* ont été isolées du saumon fumé. Elles produisent des bactériocines (petits peptides) à forte activité anti-*Listeria*. Parmi lesquelles on peut citer, *Carnobacterium divergens* V41, qui a été testée avec succès contre une soixantaine de souches de *L. monocytogenes* représentatives des souches de saurisserie française. Inoculée dans le saumon fumé à raison de (10^{4-5} UFC/g), elle permet de maintenir le nombre de *L. monocytogenes* (taux initial 20 UFC/g) à un seuil inférieur à 50 UFC/g pendant toute la durée de stockage à 4 et 8°C, sans altérer les qualités physico-chimiques (amines biogène, pH) ni organoleptiques. De même des espèces *C. maltaromaticum* (*C. piscicola*) majoritairement productrices de bactériocines, ont été étudiées pour limiter le développement de *L. monocytogenes* responsable de la détérioration des produits de la pêche tels que le saumon fumé à froid (Nilsson et al, 2004 ; Brillet et al, 2005 ; Yamazaki et al, 2003).

De nombreux travaux portent sur l'application de ces souches dans la biopréservation grâce à leurs aptitudes à synthétiser des biomolécules actives (bactériocines) à pouvoir antimicrobien (Edima, 2007 ; Afzal, 2012).

Ces bactéries sont connues pour leur résistance à la congélation et aux hautes pressions (Leisner et al., 2007). Parmi les métabolites associés à *Carnobacterium* : 3-méthyl butanal produit par la souche *C. maltaromaticum* (LMA28), associé à la production de saveurs maltées dans les fromages à pâte molle. En revanche, les principaux métabolites responsables des altérations correspondent à des amines biogènes notamment la tyramine et l'histamine, des alcools et des aldéhydes,... (Afzal et al., 2010 ; Cailliez-Grimal et al., 2014).

B. *Brochothrix* sp.



Bacteria>Bcillota>Bacilli> Caryophanales >Listeriaceae>Bronchotrix
 Espèce type : *B. thermosphacta*
 G+C : 36 à 37%
 Bacille, 1 à 2 μm×0,6 à 0,8 μm, immobile
 Gram+, catalase-, oxydase-
 Aerobie, Fermentaire
 Psychrotrophe (0 à 30°C, optimum 20 à 25°C)
 Ubiquitaire : Sol, associé aux animaux et aliments (+++ vietes)

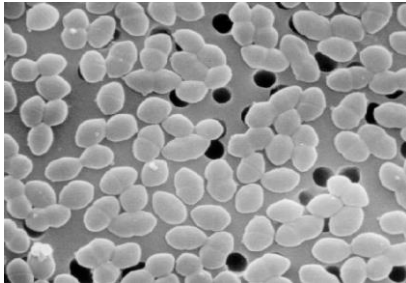
Figure 13. Photographie au microscope électronique du genre *Brochothrix* (bar = 1 μm).

Le genre a été proposé par Sneath et Jones (1976) pour certains organismes de viande, précédemment désignés par *Microbacterium thermosphactum* (McLean et Sulzbacher, 1953). Le genre *Brochothrix* contient l'espèce type *B. thermosphacta* (Sneath et Jones, 1986) et *B. campestris* (Talon et al. 1988), décrites pour des isolats de sol et d'herbe. Bien que ces deux espèces ne soient pas pathogènes, *B. thermosphacta* a suscité un intérêt scientifique en raison de son implication dans la détérioration de la viande et des produits de la mer (Illikoud, Jaffrès et Zagorec, 2018). En effet, *B. thermosphacta* est une bactérie psychrotrophe et ubiquitaire dont la présence a été signalée dans divers produits de viande et de fruits de mer stockés à froids, et est à l'origine de la production d'odeurs indésirables telles que les odeurs de fromage et de beurre. Des études ont montré que *B. thermosphacta* apporte de la détérioration en produisant divers composés volatils indésirables comprenant des aldéhydes, des cétones, des esters, des alcools et de petites quantités d'acides gras à chaîne courte, tout en dégageant des odeurs et des saveurs (Casaburi et al., 2014, 2015).

Cette espèce produit également des acides organiques (acides lactique et acétique) et de l'éthanol. Certaines des molécules responsables de la détérioration, produites par *B. thermosphacta* peuvent avoir une odeur ou une saveur intense, et donc affecter la qualité sensorielle du produit même à des niveaux faibles. Par exemple, l'acide acétique a une odeur piquante, acide et de vinaigre indésirable même à faible concentration (Illikoud, Jaffrès, Zagorec, 2018). *B. thermosphacta* a également été associée à la production d'amines biogènes (BA) dans certaines études (Casaburi et al., 2014). Les études sur l'emballage sous atmosphère modifiée (MAP) ont démontré la

sensibilité de cet organisme à l'oxygène et ont montré qu'ils sont également inhibés par un taux élevé de CO₂.

B. *Enterococcus* sp.



Bacteria>Bacillota>Bacilli>Lactobacillales>Enterococcaceae>
 Enterococcus
 Espèce type : *Enterococcus faecium*
 G+C :
 Cocci ovoïde
 Gram+, ctalase-, oxydase-
 Ubiquitaire [aliments (viandes, lait, poisson)]

Figure 14. Photographie au microscope électronique (barre = 2 µm) et principales caractéristiques taxonomiques et physiologiques du genre *Enterococcus*. Image copyright (Carr, 2006).

Le genre *Enterococcus* appartient aux bactéries lactiques (LAB), représentant ainsi le troisième large genre de BL après *Lactobacillus* et *Streptococcus*, avec 37 espèces classées sur la base d'une évaluation phylogénétique utilisant le séquençage de l'ARNr 16S et l'hybridation ADN-ADN. *E. faecium* et *E. faecalis* restent les espèces d'entérocoques les plus importantes malgré les nouvelles espèces qui ont été récemment découvertes, comme *E. thailandicus*, *E. ureasiticus*, *E. pallens*, *E. caccae*, *E. cammelliae*, *E. lactis*. D'un point de vue taxonomique, après avoir été décrits comme des streptocoques, les entérocoques ont été classés séparément en 1984. Plusieurs espèces d'entérocoques ont été isolées chez les poissons (viscères et peau) : *E. mundtii*, *E. faecium*, et *E. durans* (Ben Braiek et Smaoui, 2019).

1.4.4. La flore d'altération du poisson légèrement préservé

Les produits de la mer semi-préservés comportent les produits légèrement salés, séchés, fumés ou marinés, présentant un pH final supérieur à 5, et un taux de sel inférieur à 6% en phase aqueuse (saumon fumé, filet d'anchois marinés, produits cuits et conservés en saumure ou emballés sous atmosphère protectrice, comme les crevettes décortiquées, etc.). La flore initiale de ces produits est souvent dominée par des bactéries à Gram négatif typiques de la flore du poisson frais, comme *Shewanella* spp., *Photobacterium* spp., *Serratia* spp., *Yersinia* spp. et *Vibrio* spp. (Leroi, 2009).

Durant la conservation sous vide ou sous atmosphère protectrice, les bactéries à Gram positif deviennent régnantes, avec une prédominance notoire des bactéries lactiques, dont le niveau peut atteindre sans craindre 10^7 à 10^8 UFC/g en quelques semaines de conservation, et particulièrement de *C. maltaromaticum* et *Lactobacillus curvatus* ou *Lactobacillus sakei*. Le taux d'entérobactéries (*Serratia liquefaciens*, *H. alvei*), de *P. phosphoreum* et de *B. thermosphacta*, est également plus élevé. Parmi toutes ces espèces, certaines bactéries lactiques, notamment *C. maltaromaticum*, *L. sakei* et *L. farciminis*, ainsi que *B. thermosphacta* et *S. liquefaciens*, sont les principales bactéries altérantes, avec des odeurs fromage/aigre, d' H_2S , de beurre ou de chou/amine, respectivement. Les composés volatils les plus souvent rencontrés sont le 2,3-pentanedione, le 2,3-butanedione, le 2-heptanone, le 2,3-heptanedione, l'hexanone, le diméthyl disulfure, le TMA, le 2-pentanol, le 2-méthyl-1-butanol et le 3-méthyl-1-butanol (Le Fur, Leroi et al., 2013).

1.4.5. Les autres micro-organismes

- **Les algues microscopiques**

Les micro-algues marines ou plancton secrètent des biotoxines ou phycotoxines. L'homme peut être fréquemment intoxiqué en consommant des coquillages qui ont séjourné dans des eaux où se sont multipliées ces algues toxiques. Les risques majeurs sont liés à l'intoxication diarrhéique par les fruits de mer : acide okadaïque élaboré par différentes espèces de dinophysis, par l'intoxication paralytique par les fruits de mer : saxitoxine produite par *Gonyaulax*, *Prorocentrum* *Alexetrium* et par l'intoxication amnésiante par *Pseudo nitzschia*.

- **Les virus**

La source de contamination de l'homme par le milieu hydrique est représentée par les coquillages. Les mollusques aquatiques ont un mode d'alimentation fondé sur la filtration de volumes importants d'eau. Les virus les plus souvent mis en cause sont : Norovirus, Virus de l'hépatite A, rotavirus. Ce sont surtout les huîtres, coques, clams qui sont à l'origine des intoxications. De nombreux virus associés à des vertébrés marins ont été identifiés récemment. Ils appartiennent à des groupes variés (par exemple *Arenaviridae*, *Astroviridae*, *Filoviridae*, *Flaviviridae*, *Hepadnaviridae*, *Matonaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*). On a révélé que de nombreux virus à ARN sont associés aux invertébrés (plusieurs centaines) (Jacquet et al., 2023).

- **Les parasites**

Les produits de la pêche peuvent être envahis par des parasites notamment les métazoaires ou protozoaires surtout lorsqu'ils sont consommés crus (Sushi), comme dans certains pays d'Asie de l'Est. Ces parasites appartiennent à différents groupes, tels que les nématodes, les cestodes et les trématodes dont les larves sont révélées chez de nombreuses espèces de poissons.

Les deux parasites ayant le plus d'incidence sur les produits marins sont des nématodes, responsables de l'Anisakiase : *Anisakis simplex* et *Pseudoterranova decipiens*.

Pseudoterranova decipiens (ou *Phocanema decipiens*), appelé souvent "ver de la morue". Il s'agit d'un ver rond (nématode) typique des eaux froides et tempérées de l'Atlantique dont les larves infectent les muscles de la morue. Ces larves sont de couleur beige à brune et mesurent de 25 à 50 mm de long.

Anisakis simplex, nématode, se rencontre occasionnellement chez la morue mais plus souvent chez le hareng. Les larves, de couleur blanche, d'environ 30 mm de long, ont une affinité pour les intestins et le foie des poissons, mais peuvent migrer par centaines dans les muscles. ***Anisakis simplex*** peut apporter de sérieux problèmes de santé au consommateur (violentes douleurs abdominales pour les formes classiques, perforation digestive et péritonite pour les formes graves).

Diphyllobothrium latum, cestode, dont la larve est parfois présente dans les viscères et dans les muscles des poissons d'eau douce (brochet, perche, truite, saumon). L'ingestion de poisson cru, de poisson fumé à froid ou mal cuit peut mener à une parasitose dégénérant en anémie et en avitaminose. Comme pour les autres parasites, la congélation et le traitement par la chaleur peuvent éliminer ce cestode (Cappelier, 2008).

- **Les levures et les moisissures**

Une gamme variée de moisissures est capable de produire des métabolites toxiques, trois genres qui sont particulièrement importants dans les aliments : *Aspergillus*, *Penicillium*, et *Fusarium*. Cependant, la toxicité chronique à long terme est particulièrement préoccupante, car plusieurs métabolites de ces moisissures sont cancérigènes, ou peuvent avoir d'autres effets toxiques. De nombreux aliments sont sensibles à la prolifération des moisissures lorsqu'ils sont conservés dans des conditions inappropriées au sein desquels les mycotoxines peuvent se former. La

plupart des moisissures peuvent se développer à des a_w inférieurs à 0,8, ce qui indique qu'elles sont capables de se développer à des concentrations élevées de sel ou dans des produits secs. Les poissons fumés traditionnels, comme le saumon et le maquereau, peuvent être vulnérables au développement de moisissures s'ils sont stockés dans des conditions sous-optimales au cours du temps. Les levures sont des champignons de forme ronde ou cylindrique, beaucoup plus petits que les moisissures, avec une taille de 3 à 5 microns, qui colonisent les aliments à faible activité hydrique, à faible pH ou à forte teneur en sel, où la plupart des bactéries ne survivent pas (Sahu et Bala, 2017 ; Ianieva et Ogirchuk, 2018), et peuvent également entraîner une détérioration alimentaire (Lianou et al., 2016). La plupart des altérations alimentaires sont causées par des espèces de levures telles que *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces spp.* *Cetida spp.* (Rawat, 2015).

Les poissons, les mollusques et les crustacés fraîchement pêchés sont susceptibles d'héberger des levures à leur surface et à l'intérieur de leur corps. Les fruits de mer sont des produits extrêmement périssables en raison de leurs caractéristiques physicochimiques, puisqu'ils constituent des nutriments de base pour l'activité microbienne entraînant une détérioration de la qualité, limitant leur durée de conservation (Adebayo-Tayo et al., 2012 ; Comi, 2017). La durée de conservation des aliments glacés et réfrigérés est limitée par l'espèce, la transformation et la manipulation de l'aliment, bien que la réfrigération joue un rôle important dans le maintien des propriétés nutritionnelles et sensorielles (Pal et al., 2016 ; Comi, 2017). En général, il est peu probable que les levures se développent et altèrent les fruits de mer lorsqu'ils sont conservés au réfrigérateur, mais il peut y avoir des exceptions. Les levures jouent un rôle plus important dans l'altération de la chair de poisson, en particulier lorsque certaines espèces de levures, telles que *Cetida lipolytica*, produisent des bases azotées volatiles, et dans les viandes d'huîtres congelées ou réfrigérées, il a été démontré que les levures pigmentées se développent, entraînant des viandes roses ou rouges (Amlani et Sarri, 2022).

2. Les bactéries lactiques

2.1. Définition

Le concept de bactéries lactiques (BL) en tant que groupe d'organismes s'est développé au début des années 1900. La première culture pure (*Bacterium lactis*, aujourd'hui connu sous le nom de *Lactococcus lactis*) a été isolée en 1873 par Lister. Les bactéries lactiques sont connues comme les bactéries les plus importantes pour la fermentation des aliments et les applications pharmaceutiques et diététiques spéciales. Récemment, avec l'excellent rôle des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire et les fonctions probiotiques, leurs caractéristiques métaboliques microbiennes ont également attiré plus d'attention ainsi que d'autres métabolites importants pour des applications avancées en bio-ingénierie et biotechnologie (Fennema et al., 2004 ; Liu et al., 2014 ; Wang et al., 2021).

2.2. Propriétés générales

Les bactéries lactique (BL) regroupent un genre de bactéries gram-positives qui utilisent les hydrocarbures comme principale source de carbone (George et al., 2018). Historiquement, les bactéries lactiques sont définies comme une famille ubiquitaire et hétérogène de microbes qui peuvent fermenter divers nutriments, principalement en acide lactique, comme produit final du métabolisme (Klaenhammer et al., 2005; Sun et al., 2014). Généralement les bactéries lactiques sont caractérisées par leur gram-positif, catalase négative, certaines espèces produisent une catalase qui semble positive avec une légère effervescence (pseudo-catalase) (Lebreton, 2014), elles sont anaérobies ou microaérophiles, tolérantes à l'acide et non sporulantes (Giraffa, 2014 ; Zhang et Cai, 2014). Elles sont généralement mésophiles (température de croissance optimale à 35°C), mais certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes (allant de 10 à 45°C) (Lebreton, 2014). Elles se développent principalement à des pH de 4,0 à 9,5 et certaines sont encore actives à des pH extrêmes tels que 9,6 ou 3,2. Elles ont une tolérance très variable au NaCl (Carr et al., 2002 ; Abiola et al., 2022).

L'hétérogénéité de ce groupe bactérien se reflète bien dans la large gamme de morphologies cellulaires, puisqu'elles peuvent se présenter sous forme de cellules uniques ou diploïdes, de tétrades et de chaînes courtes à longues. Les bactéries lactiques sont les groupes bactériens les plus importants impliqués dans les processus

de fermentations pour transformer une variété de produits laitiers, de viandes, de légumes et de céréales, aboutissant à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (Klaenhammer et al., 2005 ; Barzegar et al., 2021). Ces bactéries peuvent métaboliser les constituants de la matrice alimentaire et produire des composés tels que des peptides, des acides aminés, des aldéhydes, des alcools, des acides organiques, des esters et des acides gras.

Sur la base de la dissimilation du glucose, les BL sont subdivisés en deux groupes fermentaires, homolactiques et hétérolactiques qui, en utilisant les glucides, elles peuvent produire soit de l'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes), soit de l'acide lactique et l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives), soit de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂ (bactéries hétérolactiques strictes) (Szutowska, J., 2020) (Figure 15).

2.3. Ecologie et classification

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes ubiquitaires qui résident dans une grande diversité d'habitats. Ceux-ci comprennent les cavités humaines telles que le tractus gastro-intestinal, la cavité buccale, les voies respiratoires et la cavité vaginale, ainsi qu'un certain nombre de niches écologiques telles que les plantes et les produits transformés à base de lait, de viande, de poisson et de légumes (Sun et al., 2014 ; Herten et al., 2014 ; Szutowska, 2020).

La systématique est en évolution permanente. C'est en 1919 qu'Orla- Jensen a établi la première classification des bactéries lactiques, sur la base des propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. La composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également mis en jeu pour la classification. Surtout, sur la base de la fermentation, que la taxonomie du genre était créée pour distinguer trois sous-genres : "*Thermobacterium*" et "*Streptobacterium*" pour les bactéries obligatoirement homofermentaires et les bactéries facultativement hétérofermentaires respectivement, et "*Betabacterium*" pour les bactéries obligatoirement hétérofermentaires (Tableau 5). Les bactéries lactiques font partie de la lignée des firmicutes, de la classe des bacilli, et de l'ordre des lactobacilles (Szutowska, 2020).

Selon Ludwig et al. (2008), elles sont réparties en trois familles :

- ✓ Famille des *Lactobacillaceae* contenant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.
- ✓ Famille des *Leuconostocaceae* comportant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- ✓ Famille des *Streptococcaceae* comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

Tableau 5 : Classification des grands groupes des bactéries lactiques (Holzapfel et al., 2001 ; Carr et al., 2002).

Genre	Forme	Catalase	Réduction nitrate	Fermentation	Genre types
Betabacterium	bacille	-	-	Hétérofermentaire	<i>Lactobacillus</i>
Thermobacterium	bacille	-	-	Homofermentaire	<i>Lactobacillus</i>
Streptobacterium	bacille	-	-	Homo et Hétérofermentaire	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i> <i>Streptococcus</i>
<i>Streptococcus</i>	coque	-	-	Homofermentaire	<i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>
Betacoccus	coque	-	-	Hétérofermentaire	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
Micobacterium	bacille	+	+	Homofermentaire	<i>Brochothrix</i>
Tetracoccus	coque	+	+	Homofermentaire	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>
Bifidobacteria	polymorphe	-	-	Homofermentaire	<i>Bifidobacterium</i>

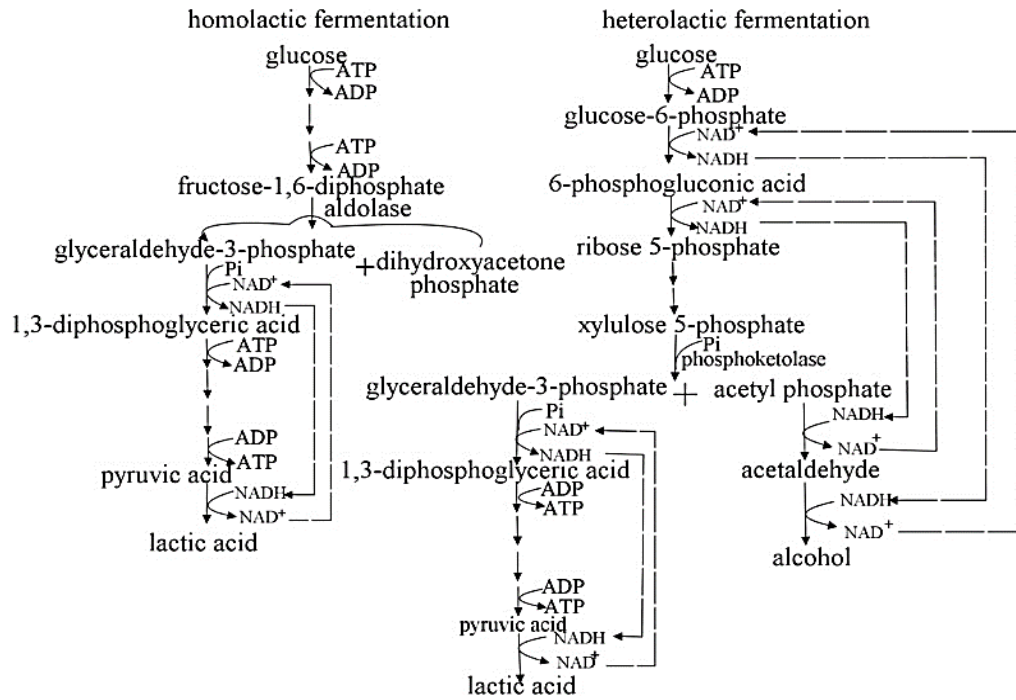


Figure 15 : Types fermentaires de bactéries lactiques (Eiteman et Ramalingam, 2015; Stincone et al., 2015).

Selon la classification taxonomique actuelle, et en se basant sur des données de séquençage de 16S et 23S de l'ADNr, les bactéries lactiques forment deux embranchements distincts, à savoir les *Firmicutes* et les *Actinobacteria*. Au sein des *Firmicutes*, se trouvent des bactéries à Gram positif avec un pourcentage G + C inférieur à 50%, appartenant à l'ordre des *Lactobacillales* et comprennent les genres suivants : *Aerococcus*, *Alloiooccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Symbiobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*, qui sont tous des organismes à faible teneur en guanine-cytosine (31-49 %). Les bactéries lactiques dans les *Actinobactéries*, ayant une teneur en G + C supérieure à 50%. Cet embranchement ne comprend que les espèces du genre *Bifidobacterium* (Quinto et al., 2014 ; Liu et al., 2014 ; Szutowaska, 2020). Les différentes familles et les différents genres peuvent être recherchés dans l'explorateur de taxonomie NCBI (Schoch CL et al., 2020) ou dans le navigateur Taxonomie UniProt (Anonyme 4).

Les genres de bactéries lactiques en relation avec les aliments sont les suivants *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* et *Streptococcus* (Axelsson, 2004).

2.4. Caractérisation des principaux genres de bactéries lactiques

La classification actuelle de bactéries lactiques concerne les principaux genres : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Bifidobacterium* (Liu et al., 2014 ; Zheng et al., 2020 ; Tang et al., 2023).

2.4.1. *Enterococcus*

Les entérocoques sont des bactéries lactiques exploitées depuis longtemps dans la transformation des aliments. Ces microorganismes jouent un rôle essentiel dans la conservation (prolongation de la durée de l'entreposage) et dans la qualité bactériologique des denrées alimentaires, tout en maintenant leurs propriétés nutritionnelles et organoleptiques (Aguilar-Galvez et al., 2012). Le terme "entérocoque" a été établi pour la première fois par Thiercelin (1899) pour désigner un groupe de diplocoques intestinaux à Gram positif. Les entérocoques sont des cocci ovoïdes à Gram positif qui se présentent seuls, par paires, en courtes chaînes ou qui peuvent être disposés en amas. Les cellules sont souvent allongées dans le sens des chaînes. Elles sont généralement négatives pour la catalase ; cependant, certaines souches peuvent révéler une catalase positive (pseudo-catalase). Elles sont homofermentaires, l'acide L (+)-lactique étant le produit final prédominant du métabolisme des hydrates de carbone. Le genre *Enterococcus* se différencie des autres cocci Gram positif, catalase négative par des caractéristiques typiques, y compris la capacité à tolérer une large gamme de températures (10°C à 45°C, à survivre à la dessiccation) et de pH, et à se développer en présence de 6,5 % de NaCl et de 40 % de sels biliaires ainsi que la production d'acétoïne (test de Voges-Proskauer), la production d'acide à partir de ribose et la possession de l'antigène du groupe D (Švec et Devriese, 2015 ; Wu et al., 2022 ; Auger et Cattoir, 2023).

Dans d'autres cas, il est nécessaire de confirmer l'identification du genre via des méthodes moléculaires (Passerini et al., 2021).

➤ Les espèces importantes du genre

-*Enterococcus faecalis*

Les traits supplémentaires sont les suivants : Les espèces sont généralement non hémolytiques et résistent à un chauffage de 60°C pendant 30 minutes. Une pseudo

catalase peut être produite lorsqu'elle est cultivée sur un milieu gélosé contenant du sang (Frankenberg et al., 2002). Le malate, la sérine, le citrate, le gluconate et l'arginine sont utilisés comme sources d'énergie. La tyrosine est décarboxylée en tyramine. *Enterococcus faecalis* habituellement présente dans les aliments (produits laitiers, viande et produits carnés fermentés, produits frais) et dans l'environnement (plantes, compost et eaux marines, saumâtres et douces).

-*Enterococcus faecium*

Les traits supplémentaires sont les suivants : L'espèce peut être α -hémolytique, se développe à un pH de 9,6 et supporte un chauffage de 60°C pendant 30 minutes. Les tests d'utilisation du malate et de la sérine et d'hydrolyse de la gélatine sont négatifs.

Enterococcus faecium a été décrit comme négatif pour l'acidification du D-xylose, mais la plupart des souches canines et bovines sont positives. Elle a été décrite comme négatif pour l'acidification du raffinose et du sorbitol (Devriese et al., 1992 ; Devriese et Pot, 1995).

Cette espèce est naturellement résistante aux bêtalactames et aux amygdalines que l'*Enterococcus faecalis* (Stucki, Nendas, Harbarth, 2014).

Cependant, aucune caractéristique phénotypique n'a été trouvée pour distinguer ces groupes, et des expériences d'hybridation ADN-ADN ont confirmé que les représentants de ces groupes appartiennent à une seule espèce (Vancanneyt et al., 2002). Elle est isolée des aliments (produits laitiers, lait de chamelle fermenté, viande, crevettes pourries).

-*Enterococcus lactis*

Les traits supplémentaires sont les suivants : L'espèce est α -hémolytique sur milieu gélosé au sang de mouton et se développe à un pH de 9,6. Elle est négative pour l'hydrolyse de la gélatine et de la tributyrine et ne produit pas de gaz à partir du glucose. Elle est également positive pour la salicine et négative pour l'acidification du méthyl- β -xyloside. Les principaux acides gras sont C16 :0 (30,0 %), C19 :0 cyclo9c (20,3 %), C18 :1 (17,5 %), C16 :1 (15,4 %) et C14 :0 (10,4 %) (Moreti et al., 2012). Concernant les habitats des représentants de ce genre, *E. faecium* et *E. faecalis* sont les espèces prédominantes dans les produits carnés,

tandis que *E. hirae* et *E. durans* s'y retrouvent en moindre pourcentage. *Enterococcus lactis* prédomine les produits laitiers (Auger et Cattoir, 2023).

2.4.2. *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Il comprend plusieurs espèces intervenant via la fermentation lactique, dans de nombreuses industries (Guiraud, 2003).

Les représentants du genre *Lactobacillus* sont asporulés, non mobiles et ont généralement la forme de bâtonnets, bien que l'on puisse observer des coccobacilles ; les cellules sont souvent organisées en chaînes. La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 40°C, bien que la température totale de croissance puisse varier de 2 à 53°C ; la plage de pH puisse aller de 3 à 8. Les lactobacilles sont fermentaires et tolèrent généralement l'oxygène, mais se développent bien dans des conditions anaérobies. Elles sont caractérisées par leur hétérogénéité : le pourcentage G-C varie de 32 à 53%. Elles sont présentes dans des milieux très différents laits fermentés tel que le kéfir, les viandes fraîches ou fermentées, le tube digestif de l'homme et des animaux. Plusieurs études ont révélé la présence d'espèces de *Lactobacillus* dans le tractus gastro-intestinal de plusieurs espèces de poissons (Lauzon et Ringo, 2011 ; Merrifield et al., 2014).

2.4. 3. *Carnobacterium*

Le genre *Carnobacterium* a été proposé par Collins en 1987. C'est le genre type de la famille *Carnobacteriaceae* récemment créée (Ludwig et al., 2009), qui a été validée par la suite (Ludwig et al., 2010). Le genre comprend actuellement 11 espèces présentant une variété de caractéristiques physiologiques distinctes, *C.gallinarum*, *C.viridans*, *C.funditum*, *C. iners*, *C. jeotgali* dont *C.piscicola* (*maltaromaticum*), *C.divergens*, *C.mobile*, *C.alterfunditum* et *C.inhibens* sont isolées des intestins de poissons. Récemment, *C. gilichinskyi* a été décrite comme *C. inhibens subsp gilichinskyi* et la sous espèce *C.inhibens* a été conçue pour *C.inhibens* (Nicholson et al., 2016; Ringo et al., 2018).

Le genre *Carnobacterium* comprend des bactéries lactiques hétérofermentaires, anaérobies facultatives, psychrotolérantes, mobiles ou non, Gram positif, en forme de

bâtonnets. Elles produisent principalement de l'acide L-lactique par fermentation du glucose.

Les représentants du genre *Carnobacterium* ont des habitats divers. Ils ont été isolés de viande (bœuf, mouton) réfrigérée et/ou emballée sous vide (*C. divergens*, *C. maltaromaticum*, *C. viridans*) (Montel et al., 1991; Stoffels et al., 1992), de viandes de volaille (*C. divergens*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. maltaromaticum*), de fromages affinés (*C. divergens* et *C. piscicola*) (Edima, 2007 ; Caillez-Grimal et al., 2014), d'eau douce de lacs de l'Antarctique (*C. alterfunditum* et *C. funditum*) (Franzmann et al., 1991) et de poissons (*C. inhibens* et *C. maltaromaticum*) (Anne-Brillez, 2004).

Carnobacterium maltaromaticum, *Carnobacterium divergens* et *Carnobacterium mobile* sont également associés aux fruits de mer, par exemple les crevettes, les poissons gravides, le saumon fumé à froid, etc... (Leroi et al., 2014).

Tableau 6. Les genres de bactéries lactiques associés aux aliments et leurs caractéristiques physiologiques (Lahtinen et al., 2011; Fennema et al., 2004)

Famille	Genre	caractéristiques							
		forme	CO ₂ à partir du glucose	Croissanc e à 10°C	Croissance à 45°C	Croissance à 6,5% NaCl	Croissance à 18% NaCl	Croissance à pH 4,4	Croissance à pH 9,6
Aerococcaceae	Aerococcus	Cocci (tétrade)	-	+	-	+	-	-	+
Carnobacteriaceae	Carnobacterium	Bacille	-	+	-	ND	-	ND	-
Enterococcaceae	Enterococcus	Cocci	-	+	+	+	-	+	-
	Pediococcus	Cocci (tétrade)	-	Variable	Variable	D	-	D	L
Lactobacillaceae	Lactobacillus	Bacille	Variable	+	Variable	variable	-	ND	L
Leuconostocaceae	Leuconostoc	Cocci	+	+	-	variable	Variable	variable	-
Streptococcaceae	Lactococcus	Cocci	-	+	-	-	-	Variable	-
	Streptococcus		-	-	- variable	-	-	-	-

Note ND Non déterminé

- a. Certaines souches de *Weissella* ont une forme de bâtonnet.
- b. Dans la littérature ancienne, les espèces de *Lactococcus* sont désignées comme des streptocoques du groupe N.

2.4.4. *Weissella*

Le genre *Weissella* comprend des bactéries à Gram positif, catalase négative, non sporulées, coccoïdes ou en forme de courts bacilles, se trouvent de manière isolée ou groupées par deux ou en courtes chaînes, immobiles, oxydase négative (Björkroth et al., 2014). Vingt espèces validées de *Weissella* sont connues à ce jour (Fusco et al., 2015 ; Lee et al., 2015a, b) se cultivent à 15°C, certaines espèces se développent à 42-45°C.

Les espèces de *Weissella* sont connues pour leur production des exopolysaccharides (EPS) in vivo et in vitro. La production de dextrane, les EPS les plus connues produite par les bactéries lactiques hétérofermentaires, ont été rapportés pour *W. beninensis*, *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. fabaria*, *W. ghanensis*, *W. ketleri* et *W. koreensis* (De Bruyne et al. 2010; Padonou et al., 2010).

2.4.5. *Leuconostoc*

Ce sont des coques à GRAM (+) groupées en paires ou en chaînes, catalase (-). Les *Leuconostoc* sont hétérofermentaires, ils produisent de l'acide lactique, du CO₂ et de l'éthanol (Nieminen et al., 2014 ; Bello et al., 2022). Leur température optimale de croissance se situe entre 25 et 30°C. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à survivre à des températures négatives et à prospérer à 10 °C, à tolérer 50 g/L de sel et à se développer à des pH supérieurs à 4,5 (Raimondi et al., 2021 ; Ceteliere et al., 2024). Lors de la fermentation de divers hydrates de carbone et substrats, elles produisent du CO₂, des composés aromatiques et des exopolysaccharides (Samet-Bali et al., 2024 ; Tsitko et al., 2018). La plupart des représentants du genre *Leuconostoc* ont été classés « généralement reconnus comme sécuritaire », appartenant au Statut GRAS.

Les *Leuconostocs* sont associées à de nombreux habitats et sont donc présents dans les aliments d'origine animale, y compris le lait cru et les produits laitiers, la viète, la volaille et le poisson (Björkroth et Holzapfel, 2006). Ils ont également été

retrouvés dans les intestins de l'omble chevalier (Ringø et al., 1998) et d'autres salmonidés (Balcázar et al., 2007).

2.4.6. *Pediococcus*

Les pédiocoques sont des bactéries à Gram positif, catalase négative et oxydase négative, qui se développent dans des conditions aérobies facultatives à microaérophiles. Elles sont aérobies facultatives et produisent de l'acide lactique comme principal produit final de la fermentation du glucose. Elles sont homofermentaires et ne produisent donc pas de CO₂ à partir du glucose et sont incapables de réduire les nitrates. Les cellules sont uniformément sphériques et jamais ovoïdes ou allongées. Les représentants du genre *Pediococcus* partagent un certain nombre de caractéristiques physiologiques avec les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Weissella*, ainsi que le même habitat et des exigences de croissance relativement similaires (Holzapfel, 1992).

La structure phylogénétique du genre *Pediococcus* a été décrite par Collins (1991). La teneur en % molaire G+C de l'ADN des espèces de *Pediococcus* varie de 38 à 42 %.

2.5. Rôle des bactéries lactiques

La colonisation des bactéries lactiques est importante pour le développement et la physiologie de l'hôte. Dans l'intestin, elles contribuent à l'absorption des nutriments, à la réponse immunitaire, à la tolérance des muqueuses et au développement épithélial. Une population équilibrée de bactéries intestinales est essentielle au maintien de la santé de l'hôte (Rungrassamee et al., 2014, Russo et al., 2015). Le tractus intestinal est considéré comme une bonne source pour l'isolement des BL (Moosavi-Nasab et al., 2014).

Les bactéries lactiques sont des agents actifs importants dans l'industrie alimentaire et sont surtout connues pour leur rôle dans le processus de fermentation de l'acide lactique.

Les bactéries lactiques jouent un rôle important dans de nombreux processus de fermentation industrielle et dans l'alimentation humaine. Du fait de leur présence dans le tractus gastro-intestinal, certains membres ont été désignés comme

probiotiques, puis qu'ils sont d'origine humaine et apportent des avantages pour la santé humaine (Klaenhammer et al. 2008 ; Makarova et al. 2006).

2.5.1. Propriétés probiotiques

- **Notion de probiotique**

Les bactéries lactiques constituent des starters de fermentation et sont couramment présents dans les aliments. Elles sont donc de bonnes candidates pour une intégration dans les processus industriels et sont souvent commercialisées pour la prévention et le traitement des maladies. La majorité des souches probiotiques actuellement disponibles et utilisées dans les aliments et les suppléments à base de probiotiques sont des bactéries lactiques, en particulier les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Foligné et al. 2013).

- **Définition**

Les bactéries lactiques sont utilisées autant que probiotiques définis comme des préparations de micro-organismes viables en quantités suffisantes pouvant moduler la flore de l'organisme hôte, ainsi des effets bénéfiques pour la santé (FAO/ WHO, 2006).

- **Rôle d'un probiotique**

La majorité des probiotiques jouent un rôle principalement dans la prévention des troubles gastro-intestinaux, l'amélioration de la digestion et de l'absorption, et la stimulation du système immunitaire (Galdeano, 2019). Les bactéries lactiques protègent également les souris contre *Sa. Typhimurium* via la stimulation de la production d'immunoglobulines IgA. Le lait fermenté contenant de bactéries lactiques peut être utilisé comme adjuvant dans les vaccinations contre *V. cholerae*. Les réponses immunitaires sériques et intestinales contre le rotavirus sont fortifiées chez les enfants nourris avec *L. casei*. Des effets anticarcinogènes ont également été prouvés (Bermúdez-Humarán et Langella, 2009). Ces aspects nécessitent une plus grande attention chez les poissons, notamment pour le développement de vaccins contre les bactéries et les virus ou pour limiter les effets des composés toxiques cancérogènes (Comité mixte d'experts FAO/OMS 2002).

Dans l'industrie alimentaire, la dégradation des protéines par les bactéries lactiques peut supprimer les allergènes protéiques dans les aliments. En particulier, dans le processus de fermentation des produits laitiers, les bactéries lactiques peuvent dégrader la caséine, réduisant ainsi l'allergénicité des produits laitiers (Iwamoto et al., 2019). Par exemple, certaines souches d'*Enterococcus faecium* isolées du lait fermenté et du fromage peuvent exprimer des métalloprotéases ou une protéinase de l'enveloppe cellulaire, etc. Entre autre, pouvant efficacement hydrolyser la caséine dans le lait (Biscola et al., 2018 ; Kordesedehi et al., 2018 ; Worsztynowicz et al., 2019).

2.5. 2 Préservation et innocuité de l'aliment

Actuellement, les BL jouent un rôle important dans l'industrie en raison de leurs métabolites. Ceux-ci comprennent leurs activités inhibitrices notamment la production de composés antimicrobiens, à savoir : des acides organiques (lactique, acétique et formique), le dioxyde de carbone, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, l'éthanol et les bactériocines. La production d'acides organiques au cours de la fermentation résultant du métabolisme des sucres, entraîne une réduction importante du pH, qui associée à la formation de composés antimicrobiens détermine la stabilité microbienne des produits (prévenir ou inhiber la croissance des agents pathogènes présents dans les aliments) (YAO., 2009).

Plusieurs travaux ont été mis en œuvre pour préserver les produits de pêches. Effectivement, l'efficacité des BL a été d'avantage étudiée par Gómez-Sala et al. (2016), qui ont utilisé des souches de bactériocine de bactérie lactique à Gram-positif, d'origine marine dans leur méthode innovante de biopréservation pour le poisson frais. En raison de leurs capacités inhibitrices ou bactéricides vis-à-vis les bactéries pathogènes et d'altération, *Lactobacillus curvatus* BCS35 et *Enterococcus faecium* BNM58, isolées de poissons et de produits de la mer, ont été sélectionnées. Aymerich et al. (2019) ont testé l'effet de trois souches de BL pour contrôler la croissance de *Listeria monocytogenes* dans divers types de saumon fumé. Tous les produits à base de saumon ont montré de forts effets inhibiteurs de *Lactobacillus sakei* CTC494, suggérant un potentiel bioprotecteur prometteur. Wiernasz et al. (2020) ont examiné l'activité biopréservatrice de six souches de BL sur des tranches de saumon, démontrant une dominance antibactérienne contre *L. monocytogenes* et

les micro-organismes d'altération. Une souche notable de *Carnobacterium maltaromaticum* SF1944 a effectivement inhibé la croissance de *L. monocytogenes*.

Plusieurs souches de bactéries lactiques produisent des bactériocines à spectres d'activités plus ou moins large comme la lactococcine A, la lactococcine B et la lactococcine M produites par *Lactococcus lactis subsp cremoris* 9B4, la diplosine par *Lc. cremoris*, la plantaricine par *Lb. plantarum*, la mésentéroïne Y105 produite par *Leuconostoc mesenteroides*, l'entéroïne L50 produite par *Enterococcus faecium* L50, la carnobactériocine A et la piscicoline 61 synthétisées respectivement par, *Carnobacterium piscicola* LV17A et *Carnobacterium piscicola* (Makhloufi, 2012). La production de ces peptides bioactifs peut présenter un intérêt dans la lutte contre des bactéries à Gram positif d'altération ou pathogènes.

2.5. 3. Formation de l'arôme et de la saveur

Les bactéries lactiques contribuent ainsi à la formation des arômes via la production des composés volatils tels que l'acétoïne et ses dérivés ainsi que certains composés aromatiques (1-propanol, acétate d'éthyle, 3-méthyl-1-butanol, acétoïne). La conversion des sources de carbone en composés d'arôme tels que des esters et des composés carbonylés, est une caractéristique de la saveur des aliments (Taban et al., 2014).

2.5.4. Influence sur la valeur nutritionnelle

L'action des bactéries lactiques au cours de la fermentation a aussi un impact sur la valeur nutritionnelle des produits fermentés. En effet, les acides organiques notamment l'acide lactique et l'acide acétique, produits lors de la fermentation entraînent une acidification de la matrice. Ce processus non seulement acidifie le produit, mais augmente également la biodisponibilité des nutriments essentiels, tels que les vitamines, les minéraux et les molécules antioxydantes, de mieux absorber les nutriments et les composés bioactifs (Abdul Hakim et al., 2023). La valeur nutritionnelle et la digestibilité des protéines alimentaires peuvent toutes deux être augmentées par les bactéries lactiques. Les protéines alimentaires peuvent être décomposées par les bactéries lactiques pour produire une gamme d'acides aminés libres ou de petits peptides. Par exemple, le principal groupe de lactobacilles dans la culture de kéfir décompose considérablement la protéine du lait (Dallas et al., 2016).

2.5.5. Production de vitamines par les bactéries lactiques

Les BL peuvent servir de source de vitamines, en utilisant certaines souches sélectionnées lors de la fermentation du lait. La Vitamine B12 ou cobalamine, vitamine K2, riboflavine et thiamine (vitamine B1) sont aussi produits par les Lactobacilles (Massa, 2014). Les espèces lactiques de *Streptococcus*, d'*Enterococcus* et de *Lactobacillus* (*Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus bulgaricus*) capables de produire le folate (vitamine B9) (Masuda et al., 2014). L'industrie alimentaire se concentre sur la stratégie de sélectionner et utiliser les espèces probiotiques productrices de folate, pour accomplir les produits alimentaires par des quantités élevées de folate naturel, en augmentant les avantages pour la santé tout en maintenant les coûts de production bas (Florou-Paneri et al., 2013). Les espèces du microbiote gastro-intestinal et celles des aliments fermentés doivent être utilisé comme bactérie starter pour la fortification des aliments en folate (De Crécy-Lagard, 2007).

3. Propriétés technologiques des bactéries lactiques

Le métabolisme des bactéries lactiques (BL) a été de plus en plus étudié ces dernières années (George et al., 2018). L'association d'une variété de caractéristiques métaboliques intéressantes, a aboutie à une multitude d'applications potentielles dans le secteur de la biotechnologie alimentaire et de la santé humaine. Une capacité métabolique diversifiée y compris l'activité acidifiante, l'activité protéolytique, l'amélioration de la saveur, le pouvoir texturant, la production des EPS, la production de substances antimicrobiennes, est attribuée à sept genres clés de BL : *Lactobacillus* (lait, viande, légumes, céréales), *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus* (matière végétale, lait, viande ou poisson), *Leuconostoc* (lait, légumes), *Pediococcus* (légumes, viande), *Oenococcus* (matières végétales et aliments fermentés à base de produits laitiers, de viande et de céréales) (Singh, 2018). Cependant, certains scientifiques considèrent le genre *Bifidobacterium* comme appartenant aux bactéries lactiques en raison de leurs caractéristiques physiologiques et biochimiques analogues et parce qu'ils partagent des niches écologiques communes, tels que le tractus gastro-intestinal (Liu, 2014). Les principaux produits lors de la fermentation sont les acides organiques ainsi que le dioxyde de carbone et l'alcool. De plus, d'autres métabolites sont élaborés tels que des vitamines, des peptides bioactifs et des composés aromatiques (O'Bryan et al., 2015). Par ailleurs, du fait de leurs bienfaits pour la santé, les caractéristiques de certaines espèces de BL sont actuellement adoptées en tant que probiotiques.

3.1. Activité acidifiante et production d'acide lactique

La capacité d'acidification des bactéries lactiques se traduit par la production d'acide lactique à partir des hydrates de carbone grâce à la fermentation au cours du développement bactérien. L'activité métabolique des glucides peut se dérouler de manière homofermentaire ou hétérofermentaire, ce qui entraîne une diminution du pH par la suite de la production d'acides organiques. Les bactéries homofermentaires convertissent le glucose en excès comme source de carbone à travers le métabolisme du pyruvate uniquement en acide lactique à plus de 90%, sous l'action du lactate déshydrogénase, tandis que les bactéries lactiques hétérofermentaires peuvent produire des quantités considérables d'acides organiques (notamment l'acide acétique) autre que l'acide lactique. Le lactate et l'acétate sont les principaux composés produits lors de la fermentation des glucides (Moosavi-Nasab et al., 2014).

La cinétique et l'intensité de l'action acidifiante varie d'une souche à l'autre, en fonction des conditions de milieu : nature et dose des sucres apportés, température d'incubation et l'activité de l'eau (a_w) initiale (Liu, 2003 ; Eiteman et Ramalingam, 2015).

3.2. Activité protéolytique

Comme les acides aminés libres sont rares dans les aliments (le lait), certaines bactéries lactiques ont des activités protéolytiques pour produire une gamme d'acides aminés libres ou de petits peptides en décomposant les protéines alimentaires (Dallas et al., 2016). En général, l'exploitation de la caséine par les BL est initiée par une protéinase de l'enveloppe cellulaire qui dégrade la protéine en oligopeptides, qui sont par la suite absorbés par les cellules via des systèmes de transport de peptides spécifiques pour une dégradation supplémentaire en peptides plus courts et en acides aminés par une action combinée de diverses peptidases intracellulaires. Par exemple, la protéine du lait est fortement décomposée par le groupe principal de lactobacilles dans la culture de kéfir (Savijoki et al., 2006 ; Dallas et al., 2016). Les acides aminés peuvent être transaminés ou décarboxylés par les bactéries lactiques pour produire des amines et des α -cétoacides, qui sont des éléments constitutifs d'une variété de produits chimiques aromatiques. Ces α -cétoacides peuvent être encore réduits pour produire des alcools et des aldéhydes, ce qui renforce considérablement la saveur des aliments fermentés. Les alcools dérivés des acides aminés peuvent également réagir avec les acides gras libres pour former des esters, qui sont connus pour leurs agréables arômes fruités. En raison de son rôle dans le développement de propriétés organoleptiques particulières, la protéolyse couvre une importance industrielle (Hayek, et Ibrahim, 2013 ; Azam et al., 2017).

3.3. Activité lipolytique

La lipolyse est importante dans le développement de la saveur des produits laitiers, en particulier dans la maturation des fromages. Plusieurs bactéries lactiques, y compris *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum* et *Lb. rhamnosus*, ont été signalées comme ayant une activité lipolytique (Di Cagno et al., 2006 ; Abeijón et al., 2009). Les représentants du genre *Enterococcus* exercent des activités lipolytiques et estérolytiques attribuées à des lipases et estérases, impliquées dans l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres, glycérol, mono et

diglycérides (Garcia Cano et al., 2018 ; Esteban-Torres et al., 2014). Cette unique propriété des lipases les rendent des enzymes très importantes de signification industrielle, en particulier les systèmes lipolytiques et esterolytiques des enterococci sont très utile dans la fermentation des aliments, essentiellement dans le cas des produits laitiers et de la viande nécessitant une maturation (Cˆolo et al., 2015). Généralement, Les bactéries lactiques sont considérées comme faiblement lipolytiques, par comparaison avec d'autres groupes de microorganismes. Des données concernant les activités lipolytiques des entérocoques ont été rapportées à ce jour, les résultats obtenus allant d'une activité lipolytique prononcée à une activité lipolytique relativement élevée, à faible activité lipolytique ou son absence (Ribeiro et al, 2014 ; Jaouani et al., 2015).

3.4. Activité aromatique

De nombreuses bactéries lactiques présentent des caractéristiques phénotypiques significatives liées aux métabolismes du citrate et du pyruvate. Plusieurs espèces de BL transforment le citrate en composés aromatiques importants, tels que l'acétate, l'acétaldéhyde et le diacétyl (Giraffa, 2003). Dans le cas des bactéries lactiques, une citrate perméase assure le passage du citrate par la membrane cellulaire. Une fois dans la cellule, le citrate est converti en acétate et oxaloacétate par une citrate lyase. L'oxaloacétate est décarboxylé en pyruvate, clivé en diacétyle grâce à une suite de réactions intermédiaires (Bourel et al., 2001). Concernant les entérocoques, leurs capacités de métaboliser le pyruvate ont été extensivement étudiées mais peu est connu sur leurs capacités de métaboliser le citrate, dans lesquelles le pyruvate est un intermédiaire. *Enterococcus* produit de quantités significatives d'acétate, formate et alcool dépendant des conditions de croissance. Le pyruvate est le précurseur immédiat de ces produits. En outre, la décomposition du lactose et du citrate au cours de la maturation des aliments produit un certain nombre de composés volatils, tels que l'acétaldéhyde, le diacétyle, l'acétone et l'acétoïne, qui peuvent également contribuer à l'arôme (Giraffa, 2014). Le diacétyle est l'un des principaux composés aromatiques importants (goût de beurre) dans les produits laitiers, mais l'acétoïne ne contribue pas à l'arôme, bien que l'acétoïne soit produite à des niveaux plus élevés que le diacétyle (Ray et Daeschel, 1992). Certaines BL ont la capacité de métaboliser le citrate, ce qui implique le transport du citrate et sa conversion en oxaloacétate et en pyruvate. Le métabolisme du citrate par les BL

entraîne la formation de composés à 4 carbones, le diacétyle, l'acétoïne et le 2,3-butanediol, qui ont des qualités aromatiques et donnent à certains produits fermentés une odeur particulière (Lambuk et al. 2022)

3.5. Production des exopolysaccharides

Les bactéries lactiques sont capables de produire des polysaccharides classés selon leur position dans la cellule. Ceux qui sont excrétés hors la paroi cellulaire sont appelés polysaccharides exocellulaires ou EPS. Ils peuvent former une couche cohésive (Ruas-Madiedo, 2002). Leur biosynthèse dans les BL se fait par la voie extracellulaire (Schmid et al., 2015 ; Zhou et al., 2019) en utilisant des glycosyl-transférases extracellulaires et des fruc-tosyl-transférases (Angelin et Kavitha, 2020). Cette voie se déroule en cinq phases, commençant à l'intérieur de la cellule et se terminant à l'extérieur (Fig.16).

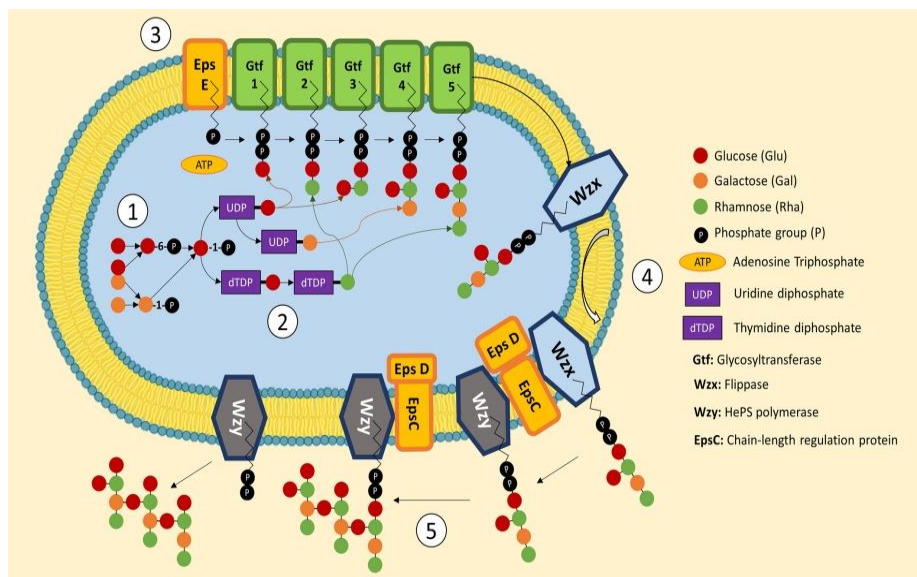


Figure 16 : Modèle générique pour la biosynthèse des hétéropolysaccharides par la voie Wzy-dépendante (polymérase).

Les principales phases sont représentées dans la figure 16 :

(1) Le transport du sucre dans le cytoplasme, (2) La synthèse des nucléotides du sucre, (3) La formation d'unités répétitives et leur attachement au lipide porteur de glycosyl, (4) La translocation des unités répétitives vers la surface extracellulaire et (5) La polymérisation des hétéropolysaccharides extracellulaires, la rupture de la liaison des hétéropolysaccharides du lipide porteur et leur libération dans le milieu (Abarquero et al., 2022).

On reconnaît généralement les EPS pour leur influence sur les caractéristiques rhéologiques (texture et viscosité) et sensorielles des produits laitiers fermentés. Plusieurs cultures utilisées en tant que ferments ou additifs dans ces produits secrètent des EPS susceptibles d'avoir un impact favorable sur les caractéristiques du produit, comme sa texture et ses caractéristiques sensorielles (Mende et al., 2016).

Globalement, ces bio-polymères ne sont pas exploités comme source d'énergie par le micro-organisme producteur, mais ils garantissent une protection efficace de l'intégrité des cellules microbiennes dans un écosystème aux conditions environnementales difficiles. Dans ce sens, la capacité d'un micro-organisme à produire de l'EPS lui confère des caractéristiques particulières comme sa résistance aux hautes pressions, son dessèchement, sa reconnaissance par d'autres micro-organismes, sa protection contre les agressions d'autres micro-organismes et les antibiotiques ou les toxines. Dans le domaine de la technologie alimentaire, ils ont la capacité d'améliorer diverses caractéristiques des aliments, comme par exemple la gélification, l'épaississement, l'émulsification et la liaison de l'eau (Akgul, 2023).

3.6. Activité amylolytique

L'activité amylolytique ou amylolyse est la conversion de l'amidon en sucre par l'action d'enzyme telle que l'amylase. La dégradation de l'amidon est essentiellement assurée par quatre groupes : les endo- et exo-amylases, qui agissent principalement sur la liaison α -1,4 ; les enzymes de débranchement, qui s'attaquent surtout à la liaison α -1,6 ; et les cyclodextrines glycosyltransférases, qui dégradent l'amidon en catalysant principalement des réactions de cyclisation et de disproportionnement. Les enzymes amylolytiques les plus connues sont l' α -amylase, la β -amylase et la glucoamylase. Ces trois amylases sont très différentes tant sur le plan fonctionnel que structurel (Horváthová, 2000).

3.7. Activité antimicrobienne

3.7.1. Propriétés inhibitrice des bactéries lactiques

- **La compétition nutritionnelle et pour l'espace**

Les bactéries lactiques, peuvent produire de nombreux métabolites comme l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide formique, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2),

le dioxyde de carbone (CO₂), la reutéline, le diacétyl et les bactériocines. Ces métabolites sont impliqués dans la compétitivité des bactéries lactiques, en perturbant ou en inhibant la croissance des autres microorganismes vivant dans les mêmes écosystèmes (Leroi, 2014 ; Al kassaa et al., 2016). Au sein des communautés bactériennes, une compétition pour certains nutriments est évoquée pour expliquer l'effet protecteur, si elles exploitent les mêmes ressources (le même substrat). Certains nutriments, présents dans un aliment en faibles quantités et indispensables à la croissance bactérienne, peuvent être utilisés plus efficacement par un groupe microbien au dépend d'un autre, alors qu'un organisme peut exclure l'autre. C'est ce qui se passe évidemment avec les bactéries lactiques utilisant le lactose (Desmazeaud, 1996 ; Leoi, 2014). Des bactériocines produites par des souches bactériennes ont l'avantage défensif d'inhiber de manière compétitive des bactéries d'autres groupes pour la nutrition, il s'agit d'un effet compétitif pour l'accès aux nutriments dans les écosystèmes regroupant une diversité de microorganismes (Al kassaa et al., 2016 ; Vaishali et al., 2019).

En raison de leurs exigences nutritionnelles importantes, les bactéries lactiques envahissent complètement le milieu. Donc elles limitent la prolifération des autres colonisateurs, il s'agit de la compétition pour l'espace (Johansen et Jespersen, 2017). En outre, un mécanisme de communication nommé *Quorum Sensing* (QS) est adopté par les cellules d'une même espèce bactérienne. Des signaux sont envoyés (le système QS) d'une cellule à une autre, lorsqu'une certaine densité cellulaire de la molécule régulatrice nommée auto-inducteur (AI) qui s'accumule dans le milieu, est abordée. Donc, l'expression de certains gènes est régulée et le métabolisme est orienté (Dong et Zhang, 2005).

3.7.2. Les substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques

De nombreux métabolites antimicrobiens sont élaborés par les bactéries lactiques, comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines.

Tableau 7 : Métabolites antimicrobiens de faible masse molaire sécrétés par les bactéries lactiques autres que les bactériocines (Suskovic et al., 2010).

Composés antimicrobiens	Souches productrices	Spectre antimicrobien
Acide lactique	Toutes les bactéries lactiques	Levures Bactéries à Gram +/-
Acide acétique	Bactéries lactiques hétérofermentaires	Levures Bactéries à Gram +/-
Diacétyl	<i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>	Levures Bactéries à Gram +/-
Peroxyde d'hydrogène	Toutes les bactéries lactiques	Levures Bactéries à Gram +/-
Dioxyde de carbone	Bactéries lactiques hétérofermentaires	La plupart des groupes taxonomiques de MO
Reutéline Protozoaires	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Champignons, Bactéries à Gram +/-

- **Les acides organiques**

La production des acides organiques par les bactéries lactiques est la principale propriété pour la conservation des aliments. L'acide lactique et l'acide acétique produits par les bactéries lactiques sont les agents antimicrobiens les plus importants et les mieux caractérisés. Ces deux acides organiques sont bioactifs dans leur état dissocié à faible pH (Arena et al., 2016). Durant la prolifération des BL, les hydrocarbures sont essentiellement transformés en acide lactique ($\text{CH}_3\text{--CH(OH)--COOH}$) conduisant à la réduction du pH (Singh, 2018).

La principale caractéristique antimicrobienne des bactéries lactiques réside dans les formes dissociées de lactate. Ces dernières agissent sur la membrane cytoplasmique en perturbant le maintien du potentiel membranaire et en entravant les systèmes membranaires du transport actif. Par conséquent, la croissance est inhibée et les microorganismes finissent par décroître (déstabilisation des cellules) (Zhitnitsky et al., 2017 ; Singh, 2018).

- **Le peroxyde d'hydrogène**

L'effet antimicrobien du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut être traduit par son rôle autant que précurseur pour la production de radicaux libres tels que le groupement superoxyde ($\text{O}_2^\bullet$) et le groupement hydroxyle ($\text{OH}^\bullet$) aptes

d'endommager l'ADN bactérien causant ainsi la destruction des pathogènes notamment *Listeria monocytogenes*. En présence d'oxygène et en l'absence de catalase, le peroxyde d'hydrogène s'accumule créant ainsi un environnement toxique pour les cellules dépourvues de système de protection capable de dégrader ce composé. Son pouvoir oxydatif engendre l'oxydation des lipides et la destruction des structures moléculaires de base des protéines cellulaires tout en augmentant la perméabilité de la membrane du microorganisme cible (Suskovic et al., 2010 ; Singh, 2018)

- **Le dioxyde de carbone**

Au cours de la fermentation hétérolactique, par accumulation dans le milieu extérieur, le dioxyde de carbone (CO₂) élaboré exerce une activité antimicrobienne. Cela s'exprime par la création d'une anaérobiose, inhibant la décarboxylation enzymatique et perturbant les membranes cellulaires, figurant toxique pour certains micro-organismes aérobies présents dans l'aliment.

- **Le diacetyl**

Le diacetyl (C₄H₆O₂) est produit lors du métabolisme du citrate. Dans le métabolisme du citrate, le citrate pénètre dans les cellules via la citrate perméase et est fragmenté par une citrate-lyase pour générer de l'oxaloacétate et de l'acétate. La décarboxylation de l'oxaloacétate produit du pyruvate, qui est transformé par l' α -acétolactate synthétase en acétaldéhyde-thiamine pyrophosphate et en α -acétolactate. Ce dernier est instable, se décarboxylant spontanément dans des conditions oxydantes pour former du diacétyle. En fait, l'acétoïne est produite par les entérocoques en tant que principal composé volatil avec l'éthanol, l'acétaldéhyde et le diacétyle, en fonction de la souche. L'acétoïne est produite par l' α -acétolactate décarboxylase ou par la réduction du diacétyle par la diacétyle réductase. La production de diacétyle a un effet distinct sur la qualité des produits laitiers (Taban et al., 2014). Le diacétyle a une activité antimicrobienne envers certaines bactéries à Gram-négatif (Canon et al., 2020). Il empêche la prolifération des bactéries en perturbant les processus comme l'usage de l'arginine (Ammor et al., 2006).

- **La reutéline**

Certaines des propriétés probiotiques de *Lactobacillus reuteri* ont été attribuées à sa capacité à produire un composé antimicrobien, la reutéline lors de la bioconversion anaérobie du glycérol. C'est un aldéhyde (β hydroxypropionaldéhyde ; β -HPA) avec un potentiel élevé en tant que conservateur

alimentaire : elle est soluble dans l'eau, active dans une large gamme de pH et résistante aux enzymes protéolytiques et lipolytiques (Langa et al., 2018). L'activité antimicrobienne de la reutéline a été largement prouvée contre *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.* et *Staphylococcus aureus* (Langa, et al., 2014; Montel, et al., 2014). Une souche *L. reuteri* INIA P572, sélectionnée pour ses niveaux élevés de production de reutéline, a été signalée comme produisant de la reutéline dans les produits laitiers en présence de glycérol (Langa, et al, 2013 ; Martín-Cabrejas, et al., 2017).

- **Les peptides antimicrobiens (les bactériocines)**

Par définition, les bactériocines sont des métabolites primaires de peptides ou des protéines bactériennes synthétisées par le ribosome et dotées d'une activité antimicrobienne (García-Bayona et al., 2017). Depuis toujours, elles sont reconnues autant que petits peptides cationiques thermostable. Leur spectre d'activité, leur mode d'action et leur poids moléculaire les différencient (Mokoena, 2017). Par conséquent, elles jouent un rôle défensif en inhibant l'invasion d'autres souches ou en limitant la croissance des cellules environnantes (Sharma et al., 2021).

A. Les bactériocines de bactéries lactiques

Les bactériocines produites par les BL sont des molécules cationiques thermostables contenant d'environ 30 à 60 acides aminés, biologiquement actives, formant des hélices amphiphiles à effet bactéricide ou bactériostatique.

Contrairement à d'autres antibiotiques thérapeutiques, les bactériocines sont des agents protéiques rapidement dégradables par les protéases du tractus gastro-intestinal. En raison de leur non-toxicité, de leur non-immunogénicité, de leur thermorésistance, et de leur large spectre d'activité antibactérienne, les bactériocines de BL sont perçues comme des bio-préservateurs efficaces contre les bactéries à Gram-positif et quelques bactéries à Gram-négatif, y compris divers agents pathogènes tels que *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, etc... (Singh, 2018 ; Razouqui, 2022). Les genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Streptococcus* sont des bactéries lactiques bactériocinogènes.

B. Classification des bactériocines

La classification de bactériocines a fait l'objet de plusieurs modifications, en raison de l'abondance des résultats scientifiques. On classe les bactériocines selon leur structure primaire, leur poids moléculaire, leurs transformations post-traductionnelles, leurs caractéristiques génétiques, leur propriétés physiques, leur structures chimiques et leur modes d'action, etc...(Sahoo et al., 2014 ; Al Kassa et al., 2016 ; Taale et al., 2016 ; Mokoena, 2017 ; Yi et al., 2022). Toutefois, il n'y a pas de modèle de classification universellement adopté pour les BL. Initialement reconnues comme quatre catégories (Klaenhammer, 1993 ; Heng et Tagg, 2006), des auteurs ont récemment réduit ces dernières à trois (Liu et al., 2014). Cependant, la description des sous-classes varie légèrement entre les différents auteurs.

-La classe I : Les bactériocines nommées lantibiotics considérées comme petits peptides (<5 kDa), notamment la nisine et la lactocine. Elles subissent extensivement des modifications post-traductionnelles, ce qui conduit à la formation des acides aminés inhabituels tels que lanthionine et methyllanthionine (Parada et al., 2007, Wang et al, 2024). La nisine, bactériocine de classe I est affectée par le pH.

-La classe II : Les bactériocines qui se caractérisent par leur poids réduit (<10 kDa) sont de courts peptides cationiques, non modifiés, thermostables et hydrophobes. On les subdivise en classe IIa (Pediocine-like) et classe IIb qui sont connues par deux peptides rendus actifs par action cordonnée (Taban, 2014).

Les peptides actifs de la classe IIa attirent une attention particulière dans la préservation des aliments notamment la pediocine PA1 et la leucocine A, utilisées industriellement comme ferment pour réduire *Listeria monocytogenes* en biotechnologie alimentaires (Perez et al., 2014 ; Fernandes et al., 2024). En raison de leurs abondance considérables et grâce à leurs hautes capacités biologiques, leurs excellentes stabilités à la température et au pH, les bactériocines de classe IIa sont considérées comme les candidates les plus potentielles dans l'exploration de nouveaux agents bioprotecteurs (Wang et al., 2024). Environ de 30 à 50 différents types de bactériocines de classe IIa ont été identifiées à partir de diverses BL (Mokoena, 2017 ; Yi et al., 2022). A ce jour, les bactériocines de cette sous classe ont éprouvé des effets préservatifs dans une large gamme d'aliments, y compris les produits laitiers, la viande, fruits et légumes (Cui et al., 2021). Les bactériocines de

Classe IIc représentent tous les peptides nonantibiotique dérivés d'une variété de BL (Taban, 2014).

La classe III : Les bactériocines de cette classe sont de grandes protéines antibactériennes (supérieures à 10 kDa) et thermolabiles, ayant des activités enzymatiques qui décomposent les parois cellulaires. Elles comprennent des bactériolysines, ainsi que des tailocines bactériennes à Gram-positif récemment découvertes (Garvey et Rowan, 2019, sharma et al., 2023). La colicine, produite par *Escherichia coli*, est la plus répandue des bactériocines de classe III. De plus, cette classe comprend l'helveticine J produite par *Lactobacillus helveticus* et l'entérolysine A produite par *E. faecalis* et l'helveticine M récemment identifiée, produite par *Lactobacillus crispatus* (Sun et al., 2018).

C. Biosynthèse des bactériocines

Les bactériocines sont des composés peptidiques produits naturellement par diverses souches bactériennes et possèdent une activité antimicrobienne qui cible des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice (Dortu et Thonart, 2009). Les bactériocines sont des peptides modifiés post-traductionnellement et synthétisés par le ribosome qui sont initialement produits sous forme de prépeptides inactifs qui subissent des modifications post-traductionnelles aboutissant à une forme mature (active). En fonction du type de bactériocine, les gènes régulateurs du transport et la modification des prépeptides sont situés à proximité du gène de biosynthèse des bactériocines et des gènes responsables de l'immunité et des bactériocines actives. La majorité de ces gènes se trouvent dans des groupes d'opérons, et ils peuvent être portés par des plasmides, des génomes ou d'autres facteurs génétiques mobiles. La production de bactériocines s'effectue au cours de la phase exponentielle de croissance et elle est souvent régulée par un système de *Quorum Sensing*, un mécanisme permettant à certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité bactérienne (biomasse) (Darbeti et al., 2022).

D. Mode et mécanisme d'action

Les bactériocines peuvent avoir différents modes d'action, notamment l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire, l'inhibition des activités ADNase et ARNase et, plus communément, la formation de pores dans la membrane cellulaire cible (da Silva et al., 2014 ; Sharma et al., 2021). La majorité des travaux indiquent

que le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, où leur action s'exprime par la formation de pores et par un déséquilibre de la perméabilité membranaire, d'où la chute de la Force Proton Motrice. Or, cette dernière joue un rôle primordial dans la synthèse de l'ATP, le transport actif et la mobilité bactérienne. En consécutif, l'activité cellulaire est entravée et donc la cellule cible est détruite. Le mode d'action des bactériocines de BL a fait l'objet de nombreuses recherches, bien qu'une partie considérable de travaux ait été effectué avec la nisine, la première bactériocine de bactérie à Gram-positif. En raison de leurs propriétés cationiques et hydrophobes, la grande majorité de ces peptides est capable d'agir comme des perméabilisateurs de membranes. La formation de pores entraîne la perte totale ou partielle de la force motrice des protons, ce qui induit finalement la mort de la cellule (Razouqui Hussein, 2022). La plupart des bactériocines de BL, en particulier celles qui inhibent les bactéries à Gram-positif, exercent leurs propriétés antimicrobiennes en ciblant l'enveloppe cellulaire bactérienne notamment la nisine, produite par *L. lactis* sub sp., qui inhibe les spores de *Clostridium* et de *Bacillus* (Darbeti et al., 2022).

L'efficacité de la bactériocine des BL est principalement due à des interactions électrostatiques avec des groupes phosphates chargés négativement sur les membranes des cellules cibles via la liaison initiale par la formation de pores et la destruction des cellules conduisant à des dommages létaux . Alors, l'autolysine est activée pour digérer la paroi cellulaire (Langa et al., 2018).

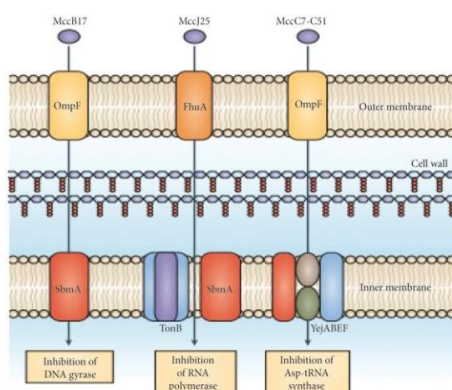


Figure 17 : Mécanisme d'action des bactériocines sur les bactéries Gram+ Gram- (da Costa, 2019).

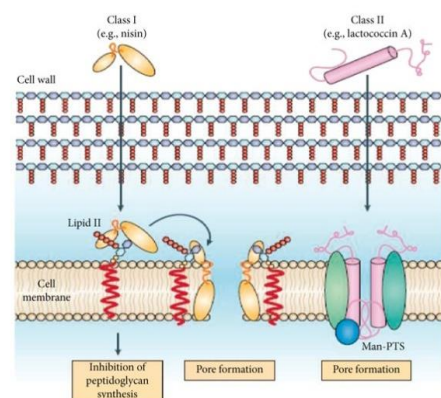


Figure 18 : Mécanisme d'action des bactériocines sur les bactéries Gram- (Negash, 2020)

Le mécanisme d'action des bactériocines se résume en trois étapes : l'adsorption ou fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible ; l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique avec implication de plusieurs peptides antibactériens pour former un pore et enfin, la formation de pores aboutissant aux fuites de composés intracellulaires vitaux (Figure 13 et 14). Cette perte provoque des effets néfastes pour la cellule cible, procédant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne aboutissant à la mort cellulaire (Taale et al., 2016).

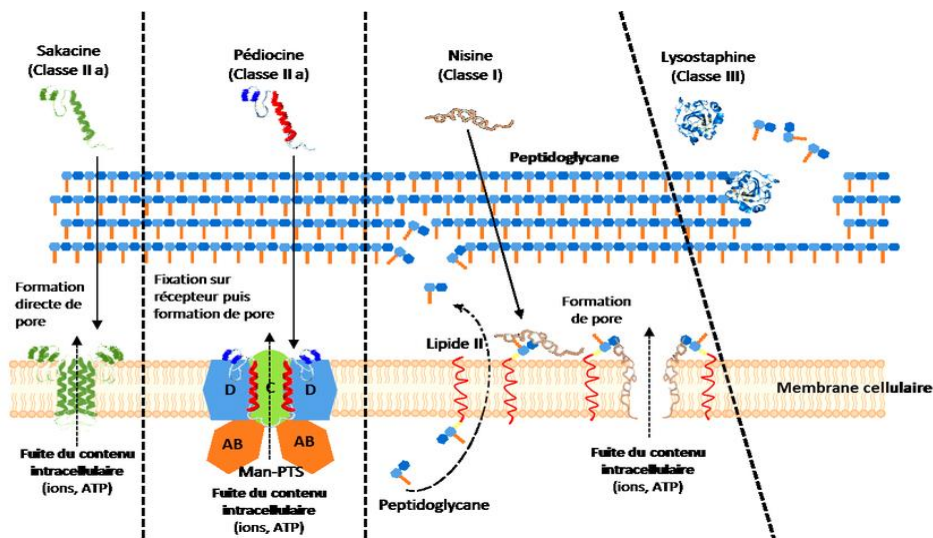


Figure 19 : Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries Gram positif (Fernandez, 2014).

La sakacine, une bactériocine de classe IIa, agit directement au niveau de la membrane interne en formant un pore conduisant à la mort de la bactérie cible.

La pédiocine PA-1, appartenant aussi à la classe IIa, se fixe sur l'unité D du mannose phosphotransférase (enzyme transmembranaire multimérique). Elle s'internalise et force le canal à rester ouvert, conduisant à la fuite du contenu intracellulaire et à la mort de la bactérie cible. La nisine, une bactériocine de classe I, se fixe sur le lipide II transmembranaire impliqué dans la synthèse du peptidoglycane. Elle s'internalise et forme des pores tout en bloquant la fonction du lipide II. Enfin, la lysostaphine, une bactériocine de classe III agit directement au niveau du peptidoglycane.

E. Les entérocinés

• Les entérocinés et leur classification

Bien que la position taxonomique du genre *Enterococcus* n'ait été déterminée qu'en 1982, la majorité des entérocinés qui ont été isolés et purifiés ces dernières années provenaient d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*. Les principales catégories et caractéristiques des entérocinés sont répertoriées dans le tableau (8) basé sur la classification standard la plus récente pour les bactériocines (Wu et al., 2022).

- **Les entérocinés de classe I**, renvoyées à de petites molécules thermostables (<10 kDa). Les enterocines courantes de classe I incluent la cytolysine et l'entérociné AS-48 (Cruz et al., 2013). La cytolysine appartient à la classe Ia (lanthipeptides), est codée pour des facteurs de virulence hémolytiques, ce qui signifie qu'elle n'a aucun potentiel d'application dans le domaine alimentaire et médicale. Le premier entérociné circulaire décrit et classé dans la classe Ib était l'entérociné AS-48. Elle a été largement impliquée dans les systèmes alimentaires en raison de sa stabilité. Maky et al. (2015) ont récemment décrit l'entérociné F4-9, un bactériocine glycosylée dérivée d' *E. faecium* faisant partie de Glycocine classe Ie.

- **Les entérocinés de classe II**, renferment de petites molécules non modifiées (<10 kDa) thermostable après transcription. La majorité des entérocinés sont des bactériocines de classe II parmi lesquelles, le premier entérociné typique représentatif de la classe IIa, dont le gène *ent A* a été trouvé dans la première souche d'*E. faecium* DO en éprouvant un séquençage du génome entier. L'entérociné X est un bactériocine de classe IIb élaboré par *E. faecium* KU-B5 (Wu et al., 2022). Peptides sans leader N-terminal, ou entérocinés de classe IIc, comprenant l'entérociné L50A et l'entérociné L50B, l'entérociné L50 est un bactériocine à large spectre codé par un plasmide. Les deux entérocinés ont également montré des résultats notables à effets synergiques significatifs ont été observés lorsque les deux entérocinés étaient utilisés en combinaison, en particulier avec des souches indicatrices spécifiques. *E. faecium* L50, le producteur d'entérociné L50A et L50B, est capable de produire deux autres bactériocines (entérociné P et entérociné Q) (Hanchi et al., 2018). L'entérociné B appartenant à la classe IId montre une forte homologie avec la carnobactériocine A.

- **Les entérocinés de Classe III.** Ce sont des macromolécules non modifiées et thermosensibles avec poids moléculaires supérieurs à 10 kDa. Cette classe inclue l'enterolysine A qui exerce un mode d'action bactéricide (Wu et al., 2022).

Tableau 8 : Classification des bactériocines (Wu et al., 2022)

Classification	Caractères	Exemples
Class I	Ia modification post-traductionnelle ; lanthipeptides	Cytolysine (Booth et al., 1996)
	Ib modification posttraductionnelle;peptide cyclique;	Entérociné AS-48 (José et al., 2014)
	Ic modification posttraductionnelle; sactibiotics	
	Id modification posttraductionnelle; linéaire peptides (azoline)	
	Ie modification posttraductionnelle; Entérociné glycocines	F4-9 (Maky et al., 2015)
	If modification posttraductionnelle ; peptides lasso	
Class II	II a bactériocins non modifiées ; pediocine-like	Enterocine A (Eijsink et al., 1998)
		Enterocine P (Cintas et al., 1977)
	II b bactériocins non modifiées ; deux-peptides de bacteriocine	Enterocine X (Hu et al., 2010)
		Enterocine L50 Cintas et al ; 1998)
	II c bactériocines non modifiées ; bacteriocines leader	Enterocine Q (Criado et al., 2006)
Class III		Enterocine EJ97 (Garciaetal.,2004)
		Enterocine RJ-11 ari et (Tiwari et Srivastava, 2003)
	II d bactéricines non modifiées ; non-pediocine-like	Enterocine B (Casaus et al., 1997)
	poids moléculaire > 10 ; thermolabile	Enterolysine A (Khan et al., 2013)

• Mode d'action des entérocinés

Tableau 9 : Expression hétérologue des entérocinés dans différents systèmes

Systèmes d'expression	Entérocinés	Souche productrice	Hôte d'expression	Plasmide	Références
<i>E. coli</i>	Enterocine P	<i>E. faecium</i> P13	<i>E. coli</i> ER2566	pTWIN1	Le et al., (2014)
	Entérolysine A	<i>E. faecalis</i> II/1	<i>E. coli</i> SG13009	pQE-30 UA	Nigutová et al. (2008)
	Entérociné CRL 35	<i>E. mundtii</i> CRL35	BL21 (DE3)	pACYCDuet-1	Daniela et al. (2017)
Levures	Entérociné A et B	<i>E. faecium</i> ATB197	BL21 (DE3)	pET37b(+)	Klocke et al. (2005)
	Entérociné HF et entérociné CRL 35	<i>E. faecium</i>	<i>p.pastoris</i> X-33	pPICZaA ;	Arbulu et al. (2019)
		<i>E. faecium</i> CTC492	<i>p.pastoris</i> X-33 ;	pPICZaA ;	Hu et al. (2014) ;
	Entérociné A	<i>E. faecium</i> T136	<i>K.Lactis</i> GG799EA	pKLAC2	Jiménez al. (2014)

	L50A et L50B	<i>E. faecium</i> L50	<i>p.pastoris</i> X-33	pPICZαA	Basanta et al. (2010)
	Entérocin P	<i>E. faecium</i> P13	<i>p.pastoris</i> X-33	pPICZαA	Gutierrez et al. (2005)
Lactobacillus	Enterocin A	<i>E. faecium</i> T136; <i>E. faecium</i> PLBC21	<i>L.casei</i> CECT475; <i>L.casei</i> IL1403; <i>L. casei</i> NZ9000	pSIP411UAI; pMG36c	Jiménez et al. (2015) ; Martin et al ;(2007)
	Ent5 3B 5-3	<i>E. faecium</i> NKR-5-3	<i>L. casei</i> NZ9000	pNK-B	Perez et al. (2016)

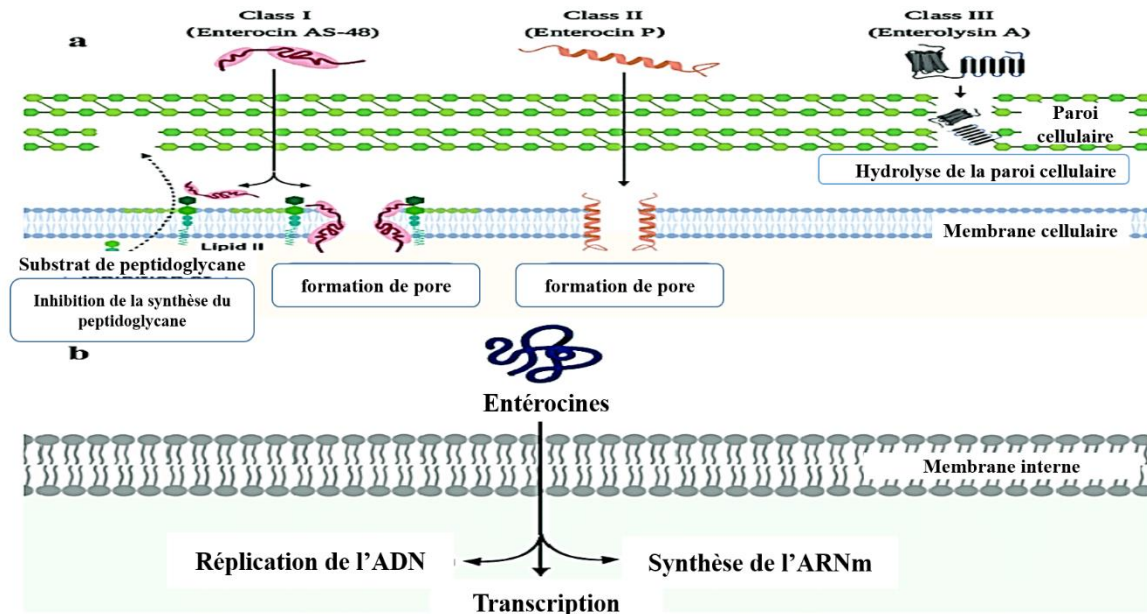


Figure 20 : Le mécanisme antimicrobien des entérocin (Cotter et al., 2005).

3.2. Application biotechnologique des bactéries lactiques et de leur bactériocines

Les avantages des BL reposent sur leurs caractéristiques de développement rapide et leurs activités métaboliques. Ces processus métaboliques indispensables pour leur prolifération et leur survie, jouent également un rôle crucial dans toute application, telles que les probiotiques, le secteur agricole et la biotechnologie alimentaire (Hayek et Ibrahim, 2013 ; Abiola et al., 2022).

Les BL ainsi que leurs bactériocines ont reçu plus d'attention tant dans l'industrie que dans la recherche en raison de leurs applications accrue, en particulier dans le domaine des probiotiques et la biopéservation.

3.2.1. Application des bactériocines

Les bactériocines ont un potentiel énorme en tant que biopréservateurs et thérapeutiques (Kumari et al., 2018 ; Kumariya et al., 2019; Mittal et al., 2020, Sharma et al., 2016).

- **Application dans le système alimentaire**

Compte tenu de leur sécurité pour la santé humaine, certaines bactériocines ont été utilisées dans le secteur alimentaire comme bactériostatiques et bactéricides (Cotter et al., 2005 ; Alvarez-Sieiro et al., 2016). Les approches les plus courantes de l'utilisation des bactériocines pour des aliments consistent en une inoculation des aliments par des souches productrices de bactériocines. L'ajout de bactériocines purifiées ou semi-purifiées, qui exercent soit un effet bactéricide avec/sans lyse cellulaire, ou un effet bactériostatique qui inhibe la croissance cellulaire, contribue à la biopréservation en vue d'augmenter la durée de vie et d'améliorer la sécurité sanitaire des produits alimentaires (Taale et al., 2016 ; Darbeti et al., 2022). Parmi les bactériocines, qui méritent une attention particulière, la nisine produite naturellement par *Lactococcus lactis*. Elle a été commercialisée dès 1953 en tant qu'agent antimicrobien et, depuis 1969, elle est perçue comme un ingrédient alimentaire sécurisé qui assure la protection des aliments contre les bactéries pathogènes telles que *Listeria*.

En outre, l'efficacité de l'utilisation combinée de différentes bactériocines, y compris des bactériocines de sous-classe II, de *L. fermentum* ACA-DC179 et de cultures bioprotectrices d'*E. faecium* PCD71, dans l'inhibition de *L. monocytogenes* dans divers produits à base de viande a été documentée. De plus, les entérocoques ont été reconnues en tant que bactériocines antimicrobiennes à large spectre contre les agents pathogènes d'origine alimentaire (*Clostridium spp.* et *Listeria spp.*) (Silva et al., 2018). Il a été également prouvé que la bifidocine A purifiée possède un large spectre d'action antimicrobienne vis-à-vis les bactéries de détérioration et les bactéries pathogènes d'origine alimentaire telles que *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* et certaines levures (Liu et al., 2015). Une autre application des bactériocines est l'emballage bioactif. Ces matériaux biofonctionnels sont prometteurs (biopréservation et biodégradation). Il s'agit d'un processus qui peut protéger les aliments de la contamination externe, améliorant ainsi la sécurité alimentaire et la durée de conservation. Les exemples commerciaux sont peu nombreux, ce qui peut

être attribué à ce stade aux méthodes d'immobilisation nécessitant une recherche intensive pour être incorporable industriellement.

- **Application en médecine**

En thérapie, elles peuvent donc avoir une application également intéressante pour le domaine médical pour prévenir ou soigner les infections, en alternative aux traitements antibiotiques. Il s'agit donc du candidat idéal et prometteur pour une future utilisation en tant que médicaments et répondre donc à la problématique de multi-résistance... Les bactériocines représentent une solution innovante pour réduire le développement de la résistance (Bonhi et Imran, 2019). Contrairement aux applications alimentaires des bactériocines, aucune d'entre elle n'est à ce jour commercialisée comme médicament. Cependant, quelques-unes sont en cours d'essais cliniques pour le traitement d'infections cutanées, respiratoires, systémiques et/ ou urogénitales parmi elles la rBPI21 en phase clinique III pour le traitement de la méningite (Hancock, 2000). Ainsi qu'on utilise souvent la mersacidine, la lacticine 3147, l'épidermine et la gallidermine, pour le traitement d'infections cutanées (Sass et al., 2008; Sutyak et al., 2008). De plus, les bactériocines recommandées pour le traitement d'infections systémiques sont la piscicoline 126, l'abp-118, la divercine V41 et la nisine (Dicks et al., 2011). Les entérocoques « AS-48 », « E50-52 » et « E-760 » sont actives contre *Salmonella* sp., *Escherichia coli* et *Clostridium* sp., responsables également d'infections systémiques (Alquassa et al., 2015).

Les bactériocines présentent également des activités anti-virales. Wachsman et al. (2003), ont montré qu'à $100\mu\text{g.ml}^{-1}$, l'entérocoque CRL35 avait une activité in-vitro contre l'herpès virus (type 1 et 2). Cette bactériocine de classe IIa produite par *E.faecium* CRL35, agirait en inhibant la synthèse de protéines virales impliquées dans la réplication

3.2.2. Application des bactéries lactiques

Si l'utilisation des bactériocines en industrie alimentaire s'avère complexe, l'utilisation directe des bactéries lactiques bactériocinogènes peut présenter plusieurs avantages. Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans plusieurs applications industrielles, allant des ferments dans l'industrie laitière aux probiotiques dans les compléments alimentaires et aux agents de bioconservation (Sun et al, 2014).

- **Application dans le domaine alimentaire**

Les exo-polysaccharides de BL ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de leur potentiel d'application industrielle, en particulier ceux formés in situ. Ils peuvent être utilisés pour remplacer ou réduire l'utilisation d'hydrocolloïdes externes parce qu'ils lient l'eau et retiennent l'humidité dans le produit (Lynch et al., 2018). La production des EPS par les bactéries lactiques formées in situ, à des concentrations bien définies, peut trouver une application pour améliorer la texture des produits carnés, en particulier ceux à faible teneur en matières grasses, tout en garantissant leur qualité (Loeffler et al., 2020 ; Korcz et Varga 2021). Les applications industrielles de la biopréservation dans les aliments, et en particulier dans les produits de la mer, sont encore assez peu nombreuses mais suscitent de plus en plus l'intérêt des industriels. Citons la société nantaise « Biocéane » qui commercialise le ferment LLO (*Lactococcus Lactis* LLO) sous forme lyophilisée ou en suspension pour conserver les crevettes, le saumon et le merlan, et le producteur de ferment « Sacco » qui a récemment développé le ferment « Lyoflora » à base de *Carnobacterium* pour des applications anti-listeria par injection, immersion ou nébulisation en spray sur le produit (le saumon et d'autres produits de la mer), après le salage à sec ou lors du tranchage (Leroi, 2014). Dans le cas du saumon fumé, plusieurs bactéries lactiques intéressantes du genre *Carnobacterium* ont été isolées de ce produit. Elles produisent des bactériocines (petits peptides) à forte activité anti-*Listeria* et ne sont pas connues comme présentant un fort potentiel d'altération du saumon fumé. L'une de ces bactéries, *Carnobacterium divergens* V41, inoculée dans le saumon fumé (10^{4-5} ufc/g), elle permet de maintenir le nombre de *L. monocytogenes* (taux initial 20 UFC/g) à un seuil inférieur à 50 UFC/g pendant toute la durée de stockage à 4 et 8°C, sans pour autant modifier les qualités physico-chimiques (amines biogène, pH) ni organoleptiques du produit (Richard, Leroi, Brillet et al., 2003).

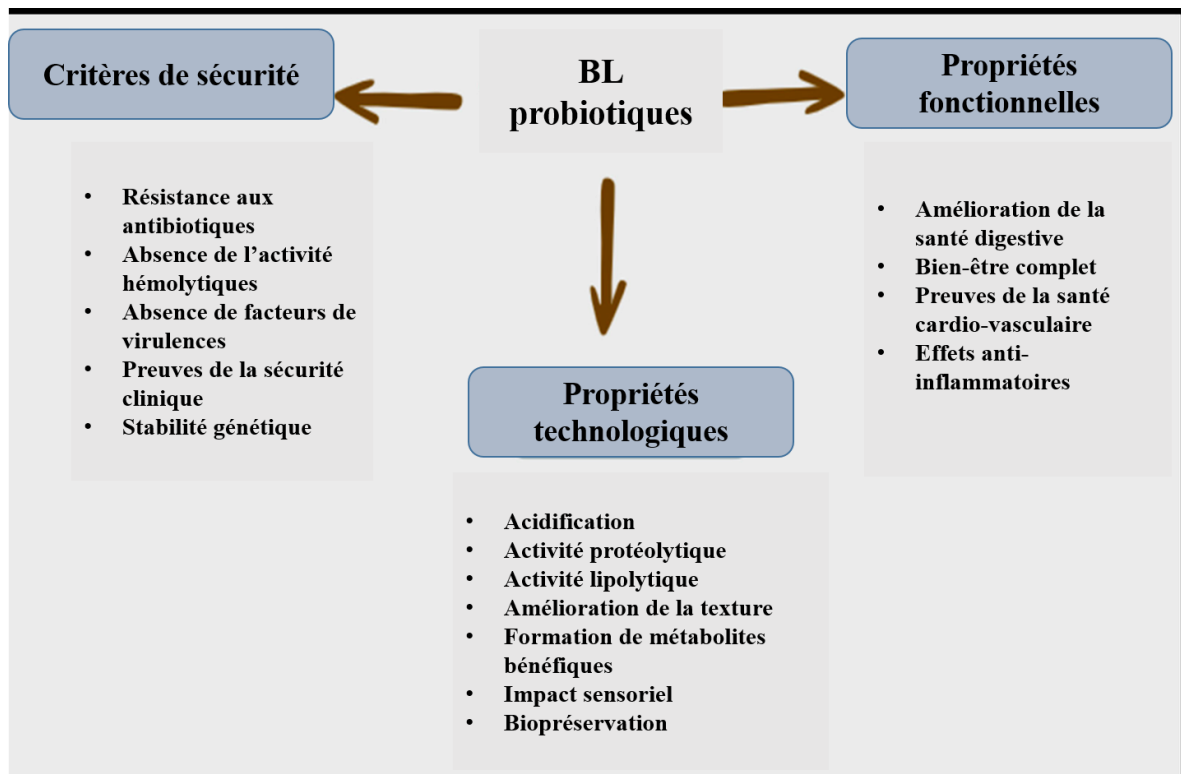


Figure 21 : Vue d'ensemble de la sécurité, des propriétés techno-fonctionnelles et fonctionnelles des probiotiques (Ayed et al., 2024)

• Application dans le domaine médicale

Les bactéries lactiques provenant du tractus gastro-intestinal humain sont les plus utilisées comme probiotiques. Fréquemment, on rencontre les lactobacilles (*Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* et *Lb. reuteri*) et les bifidobactéries (*B. lactis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis* et *B. animalis*) ainsi que des souches appartenant aux genres *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* et *Streptococcus*. L'utilisation des entérocoques comme probiotiques est potentiellement possible puisqu'ils appartiennent aux bactéries lactiques et font partie intégrante de la flore commensale de l'homme et des animaux. L'efficacité clinique d'*E. faecium* SF68 a été démontrée dans la prévention de diarrhées associées aux antibiotiques chez l'adulte et dans le traitement de diarrhées chez l'enfant. D'autre part, une préparation probiotique, appelée Causido, composée d'un mélange de *S. thermophilus* et d'*E. faecium*, montre un effet hypocholestérolémiant à court terme. Parmi les souches qui ont été proposées comme probiotiques se trouvent également *E. faecium* EF9296 possédant une activité antimicrobienne contre *Listeria* spp. et *E. mundtii* ST4V (Aguilar-Galvez et al., 2012). Des recherches et des progrès sont accentués sur l'utilisation des BL commensales

comme vecteurs de délivrance de protéines d'intérêt médical pour développer de nouveaux vaccins. A l'heure actuelle, nous disposons de données suffisantes qui renforcent l'intérêt d'utiliser des bactéries lactiques (BL), notamment des souches des lactocoques et lactobacilles, pour le développement de nouvelles stratégies de vaccination mucoale (Bermúdez-Humarán et Langella, 2009). Ces bactéries présentent en outre l'avantage d'être facilement administrables par voie orale ou locale, en plus de leur statut GRAS pour la consommation humaine (Kaushik et Arora, 2017 ; Sing, 2021 ; Sharma et al., 2021). Récemment, dans leur étude, Hyewon et al. (2022) ont démontré que L15EPS (EPS d'*E. faecium* L15 EPS) peut avoir une valeur thérapeutique dans la régénération osseuse en tant que postbiotiques potentiels. L'intérêt pour l'utilisation des espèces de *Pediococcus* comme probiotiques en aquaculture a augmenté ces dernières années, la majorité des recherches se concentrant sur *P. acidilactici*, le produit commercial connu sous le nom de Bactocell. Par exemple, les effets potentiels possibles du *P. acidilactici* alimentaire (10^6 UFC/g) ont été évalués sur la qualité du sperme chez le poisson-zèbre (Valcarce et al., 2015). De plus, les probiotiques ont été couramment utilisés en aquaculture en raison de leurs nombreux avantages, qui incluent des bénéfices environnementaux, nutritionnels et immunologiques (Sha et al., 2016). Le dextrane sulfate est employé comme anti-coagulant et anti-inflammatoire. Les EPS ont été classés parmi les fibres alimentaires parce qu'ils peuvent favoriser la croissance des bactéries probiotiques dans le tractus gastro-intestinal.

Chapitre II

Matériel et méthodes

1. Recherche et identification des bactéries lactiques à intérêt technologiques

1.1. Lieu de l'étude :

L'étude a été réalisée au sein du Laboratoire de Recherche sur les Systèmes Biologiques et Géomatique (LRSBG), le Laboratoire de recherche Géo-Environnement et Développement des Espaces (LGEDE) et de la pédagogie (S.N.V).

1.2. Objectif

L'objectif principal de cette étude est de valoriser les sous-produits de pêche. En isolant et caractérisant de nouvelles souches de bactéries lactiques productrices de bactériocine, à partir du tractus gastro-intestinal du poisson. Les explorer en étudiant leurs aptitudes technologiques.

Notre travail repose sur les objectifs suivant :

- ✓ L'isolement de bactéries lactiques à intérêt technologique, à partir du TGI de deux types de poissons frais, la sardine (*Sardina pilchardus*) et la bonite (*Sarda sarda*).
- ✓ L'identification biochimique et moléculaire des isolats lactique d'origine marine.
- ✓ Le screening des propriétés technologiques (fonctionnelles).
- ✓ Evaluation qualitative et quantitative du potentiel technologique des isolats purs

Le protocole expérimental développé a été fondé sur un criblage primaire des isolats lactiques d'origine marine en les sélectionnant sur la base de leurs activités inhibitrices. Dans un second criblage les isolats présélectionnés avec diverses activités métaboliques ont fait l'objet d'un screening de leurs propriétés technologiques.

1.3. Le matériel biologique

Il s'agit d'espèces de poisson les plus pêchées dans le bassin de la mer méditerranée, la sardine (*Sardina pilchardus*) et la bonite (*Sarda sarda*).

- La sardine : C'est une espèce de poisson qui vit dans la mer Méditerranée et l'océan Atlantique, appartenant à la famille des Clupeidae. Il s'agit de l'unique espèce du genre *Sardina*. Elle est pêchée toute l'année, cependant près de 90 % des captures sont effectuées entre mai et septembre car c'est à cette période qu'elle est la plus grasse (et la plus appréciée) (Gomez et Magnus, 2024).

Nom scientifique : *Sardina pilchardus*

Famille : Clupeidae

Embranchement : Chordata

Classe : Actinopterygii

Sous-classe : Néoptérygii

Ordre : Clupeiformes

Genre : *Sardina*

Espèce : *pilchardus*



- La bonite : C'est un poisson marin de la mer Méditerranée et de l'océan Atlantique tropical, de la famille des Scombridés, dont le genre principal est *Sarda*. Il s'agit d'une espèce de poisson qui se nourrit de petits poissons, en particulier l'anchois et la sardine (Compos et al., 2006). Elle est pêchée de septembre à mars. Sa chair est très savoureuse, ce qui lui confère un grand intérêt commercial ainsi qu'elle a une valeur nutritionnelle élevée comme le poisson sardine.

Nom scientifique : *Sarda sarda*

Famille : Scombridae

Embranchement : chordata

Classe : Actinopterygii

Sous-classe : Néoptérygii

Ordre : Perciformes

Genre : *Sarda*

Espèce : *sarda*



1.4. Echantillonnage

Les poissons de sardine et de bonite ont été capturés le long de la côte méditerranéenne. Les échantillons de poissons ont été achetés de la poissonnerie transportés dans une glacière. Pour chaque opération d'échantillonnage biologique,

dès l'arrivée au laboratoire, cinq poissons (sardine ou bonite) ont été prélevées au hasard pour la dissection du tube digestif.

1.5. Isolement des bactéries lactiques (BL)

1.5.1. Préparation des dilutions

Des souches lactiques (LAB) ont été isolées du tractus gastro-intestinal de deux espèces de poissons (*Sarda sarda* et *Sardina pilchardus*). Après dissection aseptique, des échantillons de TGI (1g) ont été homogénéisés dans une solution saline contenant 0,9 % de NaCl. Une série de dilutions décimales a été réalisée (jusqu'à 10^{-5}).

1.5.2. Préparation des cultures et purification

Cent microlitres de chaque dilution ont étéensemencées en surface sur différents milieux gélosés MRS, DMRS (MRS dépourvu d'acétate de sodium, ajusté à pH 8,5), APT et TSA. Après incubation à 30 °C pendant 24 à 48 h, les colonies ont subi le test direct et indirect pour l'étude de leurs activités antibactériennes. Les souches indicatrices incluent ont été répertoriées dans le tableau (10). Toutes les souches ont été cultivées dans le bouillon nutritif (BN) ou dans la gélose DE Man Rogosa et Sharpe (MRS) pendant 18h à température optimale (30 ou 37°C). Les isolats ont été purifiés par ensemencement en strie. Des repiquages successifs ont étaient effectués à partir de 8 colonies distinctes bien isolées choisies au hasard. Seulement les souches présentant un gram positif et une catalase négative sont retenues, après étude de l'aspect microscopique.

1.6. Conservation des isolats purs

La conservation à court terme a été effectuée sur milieu solide incliné à 4 °C et les cultures purifiées sont repiquées une fois toutes les quatre semaines. La conservation à long terme consiste à les maintenir dans un mélange MRS / glycérol à 20% (v/v) dans des microtubes eppendorfs à (-20) °C.

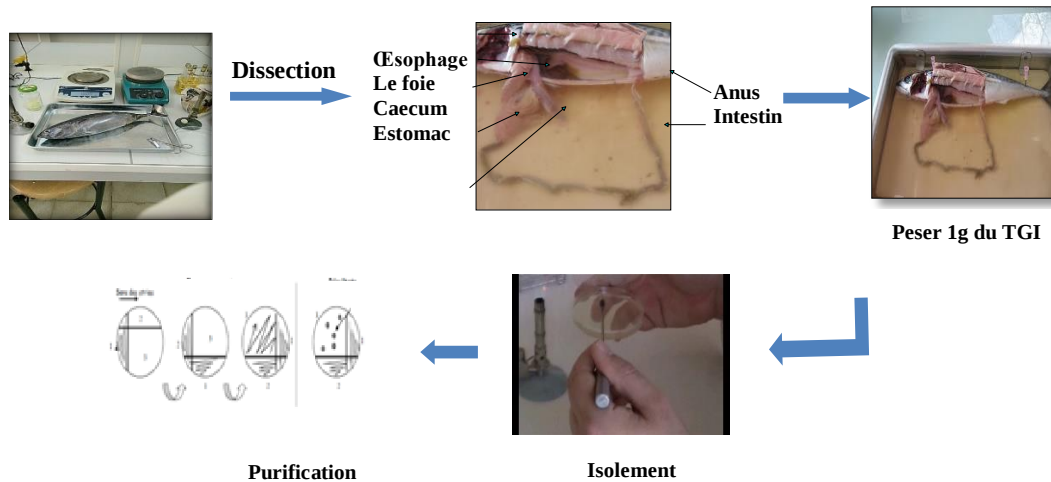


Figure 22. Schéma résumant le protocole de la dissection, l'isolement et la purification.

1.7. Caractérisation des souches lactiques

Après purification, une pré-identification des isolats, basée sur une caractérisation morphologique et la recherche de la catalase a été réalisée. Ils seront identifiés par la suite, au niveau de l'espèce, en se basant sur des critères d'identification classique et confirmés par des tests moléculaires.

1.7.1. Pré-identification des isolats

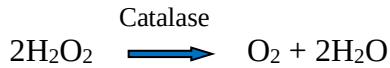
L'identification phénotypique du genre des isolats de BL a été effectuée en deux étapes. La première consistait à tester tous les isolats par la coloration de Gram et la production de catalase. Quant à la deuxième, elle s'est concentrée sur l'étude morphologique (macroscopique et microscopique).

- **Caractérisation morphologique**

L'étude morphologique est fondée sur l'observation macroscopique et microscopique : l'étude macroscopique permet de décrire les colonies (la forme, la couleur, la taille, l'aspect et contour) tandis que l'étude microscopique consiste à observer au microscope un frotti bactérien après coloration de Gram. Celle-ci permet de définir le type de Gram, la forme cellulaire ainsi que le mode d'association.

- **Test de la catalase**

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage. La réaction catalysée est la suivante :



Cette enzyme est mise en évidence par l'émulsification de la suspension bactérienne dans une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame. La présence de la catalase est indiquée par un dégagement de bulles de gaz (Delarras, 2007).

1.7.2. Criblage sur la base de l'activité antibactérienne

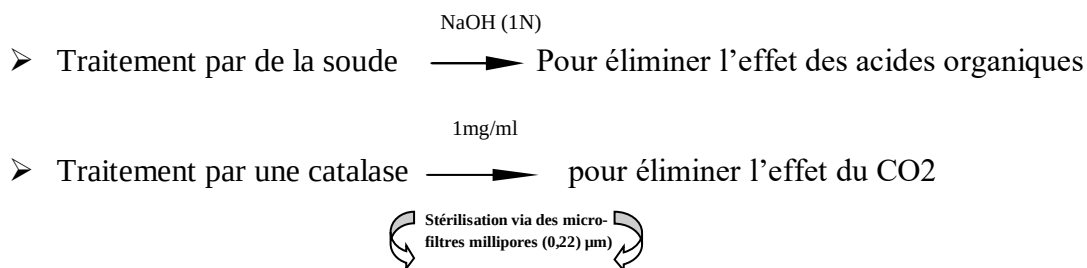
- **Le Test direct**

Le Spot On Agar Test (SOAT) adapté par Fleming et al. (1975) consistait à ensemencer en spot des boîtes de Pétri contenant de la gélose MRS, avec des cultures jeunes d'isolats lactiques. Après 24 h d'incubation, cette couche a été recouverte d'une seconde couche de 7 ml de gélose Mueller Hinton (MH) inoculée à 0,1 % avec une culture de l'un des huit souches indicatrices (Tableau 10) en fin de phase exponentielles (environ 18h d'incubation). Les boîtes de Pétri ont été examinées pour détecter les zones claires après une seconde incubation de 24 h.

- **Le test indirect "Agar well-Diffusion Test" (ADT)**

Les isolats lactiques présentant une activité antimicrobienne directe ont été sélectionnés, sur la base de leur spectre d'activité antimicrobienne et ont été testés pour la présence d'une activité bactériocinogène dans leurs surnageants de culture, par un test de diffusion sur gélose (ADT) tel que décrit par Schillinger et Luke (1989). Pour évaluer leur niveau d'inhibition, des boîtes de Pétri contenant 20 ml de la gélose MH, préalablement recouverte de la culture de la bactérie indicatrice (*Bacillus cereus*), dans laquelle des puits ont été creusés et remplis avec 50-100 µl de surnageant préalablement traité (figure22). Après 24 h d'incubation, les boîtes de Pétri ont été examinées pour la présence de zones claires. L'activité antimicrobienne a été déterminée en mesurant le diamètre du halo d'inhibition de la croissance des indicateurs

Traitement du surnageant d'isolats retenus (CFS)



Le surnageant (CFS) est prêt pour le test de l'activité antibactérienne

Figure 23. Schéma résumant le traitement du surnageant d'isolat retenu
(Ocaña et Nader-Macías, 2004)

Tableau 10 : Espèces utilisées pour l'établissement de la mise en évidence du spectre de l'activité antibactérienne

Code	Espèce	Référence	Source
KB6	<i>L. plantarum</i>	JCM 1149	Lait de Brebie
KV4	<i>L. pseudomesenteroides</i>	NRIC 1777	Lait de vache
KC5	<i>P. pentosaceus</i>	ATCC25745	Lait de caperin
E	<i>E. coli</i>	ATCC 25922	LCEPH de Rouïba. Alger
S1	<i>S. aureus</i>	ATCC 43300	LCEPH de Rouïba. Alger
S2	<i>S. abony</i>	ATCC 6017	CIP (Souche lyophilisée d'origine Américaine)
B1	<i>B. cereus</i>	ATCC 14579	LUBEM Université de Bretagne Occidentale. France.
B2	<i>B. subtilis</i>	ATCC 168	LUBEM Université de Bretagne Occidentale. France.

ATCC: American type collection culture

LCEPH : Laboratoire Centrale de l'Etablissement Public Hospitalier

CIP : Collection Institut Pasteur

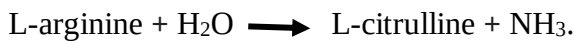
LUBEM : Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne.

1.7.3. Caractérisation physiologique et biochimique

De nombreux caractères biochimiques ont permis l'établissement de cette étude. Chaque essai a été réalisé en trois exemplaires.

- **Recherche de l'arginine dihydrolase**

La recherche de l'ADH est importante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Cette enzyme libère l'ammoniac (NH₃) et la citrulline à partir de l'arginine en catalysant la réaction suivante :



Pour effectuer ce test, le bouillon Moeller à arginine (présenté en Annexe 1) a étéensemencé par les cultures à tester. Les conditions d'anaérobiose ont été assurées par l'ajout d'une couche de vaseline à la surface du milieu. Après une incubation à 30°C pendant 24 h, la croissance des BL dans le milieu de base se manifeste par le virage du milieu au jaune dû au métabolisme du glucose conduisant à une acidification du milieu. Les BL possédant une ADH dégradent l'arginine entraînant la libération de l'amine (NH₄) qui va neutraliser les acides produits lors de la première étape, provoquant ainsi une augmentation du pH accompagné d'un changement de la couleur du milieu du jaune au violet (Moeller, 1955).

- **Test de mobilité**

L'attaque du mannitol est mise en évidence par un changement de couleur du milieu Mannitol mobilité ainsi que la mobilité de la souche à étudier. L'ensemencement a été effectué par pique centrale avec un fil de platine. Après incubation à 30°C pendant 48h, la mobilité de la souche s'est traduite par l'envahissement plus ou moins grand de la totalité du milieu à partir de la pique de l'inoculation (Guiraud, 2003).

- **Taux de croissance à différentes conditions**

a) Croissance à différentes températures et thermorésistance

La croissance à différentes températures (4- 15- 37 et 45°C) a été déterminée, comme décrit par Schillinger et Lucke (1987). Un millilitre (ml) d'une culture de 18h de chaque souche (à 600 nm, D.O= 0.1) a été inoculé dans 10 ml de MRS et la croissance a été évaluée par la différence entre la D.O à T₀ et après 24 h d'incubation à 30°C (Boulares et al, 2012).

La thermorésistance des souches est mise en évidence en ensemençant les bouillons appropriés par 100 µl de la culture bactérienne à tester et chauffage au bain marie à 60°C pendant 30 minutes. Après traitement thermique, 100µl de chaque culture a été inoculée dans un tube à essai contenant le même milieu et porté à incubation à 30°C pendant 24 - 48 h. Seules les souches thermorésistantes révèlent un trouble (Badis et al., 2004).

b) Croissance à différentes concentrations de sel

La capacité à croître à différentes concentrations de NaCl (0.5- 6.5- 10 et 18% m/v) dans le bouillon MRS a été déterminée (Dykes et al., 1994).

c) Croissance a différents pH

La croissance à différents pH (3.9- 4.6- 6.5 et 9.6) a été déterminée, selon Thapa et al. (2006).

- **Détermination du type fermentaire**

Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Les souches ont été inoculées dans du bouillon MRS, contenant une cloche de Durham. Après incubation à 30 °C pendant 24 jusqu'à 48 h, la croissance a été évaluée par l'apparition d'un trouble et la présence de gaz (CO₂) dans la cloche désignant le métabolisme hétérofermentaire de la souche.

1.7.4 Identification des isolats par Galeries API

Les isolats sélectionnés à Gram positif, catalase négatif ont fait l'objet d'une identification biochimique par le système standardisé API bioMérieux en utilisant la galerie API 50 (bioMérieux, France), renfermant 49 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Cette galerie est composée de microtubes contenant des substrats déshydratés permettant l'étude de la fermentation de 49 sucres. Les galeries ont été ensemencées selon les instructions du fabricant, les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension bactérienne dense, effectuée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux et les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (renfermant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. Après incubation à 30°C pendant 48h, le catabolisme des glucides conduit à des acides organiques qui provoquent une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré.

- **Lecture et interprétation**

Lecture de la galerie (voir notice API 50 CH), après 48 h d'incubation, on recherche dans chaque tube l'acidification produite qui se traduit par le virage au jaune du bromocrésol pourpre contenu dans le milieu. Pour le test esculine (tube n° 25), on observe un virage du pourpre au noir. Noter les résultats sur la fiche de résultats. Le profil biochimique ainsi obtenu peut être identifié à partir de la base de données, à l'aide du logiciel d'identification API Web, comme il peut également être utilisé avec d'autres résultats pour une étude taxonomique (<http://www.biomerieux.com>).

1.7.5. Caractérisation technologique des isolats purs sélectionnés

Cette étude consiste à caractériser les souches isolées de point de vue des principales propriétés technologiques recherchées en industrie.

- **Pouvoir acidifiant des isolats purs**

Les deux procédés les plus fréquents pour l'évaluation du pouvoir acidifiant sont les mesures du pH et de l'acidité titrable (AT) selon (Moulay et al., 2006). Le pH exprime la concentration des ions d'hydrogènes dissociés alors que l'AT peut exprimer aussi bien les ions d'hydrogène dissociés et non dissociés.

Chaque souche est ensemencée dans 10 ml de lait écrémé (10% p/v) stérile. Les

pré-cultures ont été préparées par incubation à 30°C et la coagulation du lait a été évaluée visuellement au cours de la fermentation. 3% (v/v) de la pré-culture est transvasée stérilement dans 100 ml de lait écrémé homogénéisée. Le mélange est réparti dans des tubes stériles à raison de 10 ml/tube.

La cinétique d'acidification consiste à suivre l'évolution du pH et l'AT en fonction du temps alors que la cinétique de croissance repose sur le suivi de la D.O au spectrophotomètre après clarification du milieu lait avec de l'EDTA (à 1 %) (Monnet, 2004). Les cinétiques de croissance et d'acidification sont réalisées simultanément aux intervalles en temps réguliers, 0h, 4h, 6h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 48h, 72h. *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 est utilisée comme test. La mesure a été répétée trois fois.

L'acidité Dornic (1°D = 0,1 g d'acide lactique/ litre) a été évaluée par titrage de 10ml de lait prélevé, par une solution de soude en présence de 5 gouttes de phénolphtaléine, jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant.

L'acidité est déterminée selon la formule :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

Les paramètres cinétiques de croissance ($\mu \text{ inh}^{-1}$, QAc en g/g.h, productivité en g/L.h) sont respectivement, le taux spécifique de croissance, le taux spécifique de l'acidité produite, la productivité d'acidité obtenus à partir de la courbe de croissance de chaque souche à l'aide du logiciel spécialisé KaleidaGraph.

- **Activité protéolytique**

A) Méthode qualitative

L'activité protéolytique est mise en évidence sur une gélose blanche à raison de 10% de lait écrémé stérile UHT. Une culture jeune de 18h, à tester, a été ensemencée à la surface du milieu de culture en spot et portée à incubation à 30°C pendant 48h. Le pouvoir protéolytique se traduit par l'apparition d'un halo clair autour de chaque touche (Thapa et al., 2006).

B) Méthode quantitative

L'activité protéolytique a été évaluée par le dosage des groupements NH_2 -libres des protéines du lait après 72h d'incubation. Le lait écrémé stérile a été inoculé par une préculture de 24h à raison de 1%. A la fin de l'incubation, une solution de TCA a été rajoutée à un volume du lait à doser, de façon à avoir une concentration finale de 6%. Après 20 minutes de repos à température ambiante, les surnageants issus de la centrifugation à (12000 rpm, 15mn) ont subi un dosage des groupements NH_2 -libres, à une longueur d'onde de 507nm, après être réagis avec de la cd-ninhydrine, selon la technique décrite par Folkertsma et Fox(1992). Les résultats obtenus étaient exprimés en milli mole d'équivalent Glycine par litre de lait (meq Gly/l).

C) Préparation de la courbe étalon Glycine

Une courbe étalon a été tracée à partir d'une solution mère glycine à 0,5mM/l en effectuant une gamme étalon (0,01- 0,5mM/l), d'après la méthode adaptée de Bouton et al. (1993).

Tableau 11 : Préparation de la courbe étalon Glycine

[gly]mM/l	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
V(SM) ml	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
V(ED) ml	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0

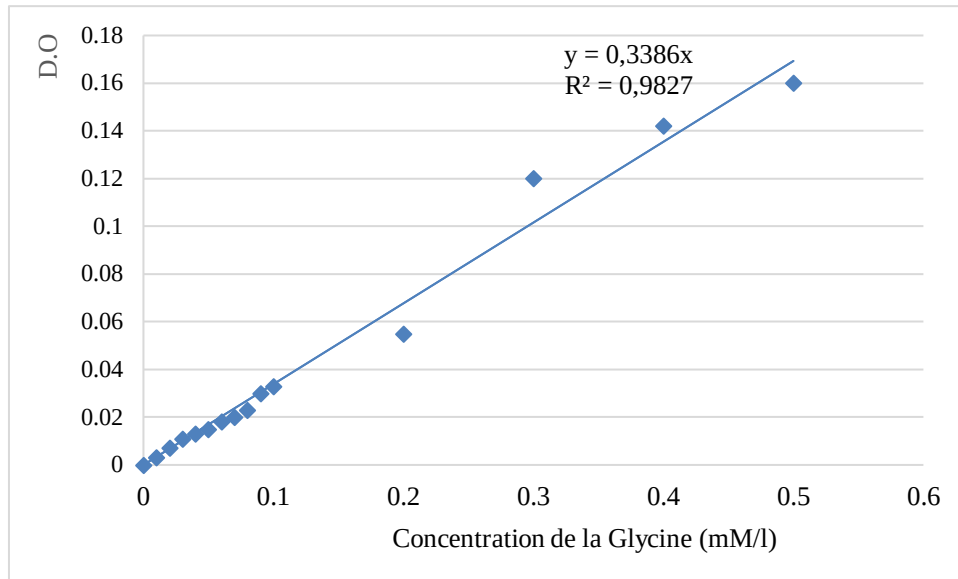


Figure 24 : Courbe étalon de la Glycine pour l'évaluation de l'activité protéolytique (Méthode spectrophotométrique à la ninhydrine)

- **Activité lipolytique**

A) Mise en évidence de l'activité lipolytique

Le pouvoir lipolytique est vérifié sur gélose supplémentée de 1%, 3%, 5%, tween 20, tween 80 ou l'huile d'olive selon Zadi Karam (2012) comme unique source lipidique. Les souches lactiques sont ensemencées en spots à partir des cultures jeunes de 18h.

B) La recherche de l'activité lipolytique extracellulaire

Le bouillon MRS est additionné de 0,01% CaCl_2 , 0,5% Na Cl et 3% tween 80 et ensemencé à 1% de culture de 18h. Après 7 à 10 jours d'incubation, le milieu est centrifugé à 12000trs/mn pendant 30mn. 50 μl de surnageant récupéré sont déposés dans des puits creusés dans une gélose MRS supplémentée de 3% tween 80, de 0,01% CaCl_2 et 0,5% Na Cl. La présence de lipase dans le surnageant est révélée sous forme d'un halo autour du puits.

C) Détermination de l'activité lipolytique par titrimétrie

L'activité lipolytique est déterminée par le dosage des acides gras libres dans le surnageant de cultures jeunes d'isolats lactiques issus d'une centrifugation à 12000trs

pendant 30mn. La méthode est décrite par (Soares et al., M.D.K.G., 2015) : 1ml d'un tampon phosphate à pH 7 (Na₂HPO₄ / KH₂PO₄) à 0,05M et 1,5ml d'huile d'olive sont ajoutés à 0,5ml de surnageant de cultures. Après 60mn d'incubation à 37°C, on y ajoute 1ml d'acétone et 1ml d'éthanol à 95% afin d'extraire les acides gras libres. La concentration des acides gras libres est évaluée par titrage avec une solution de KOH à 0,05M et à l'aide de 2 à 3 gouttes de phénolphthaléine (solution préparée à 0,1% dans l'éthanol). Le dosage est réalisé sous agitation mécanique jusqu'au virage de la couleur au rose pâle correspondant à un pH allant de 9.16 à 9.25 et on note le volume de KOH titré. Les résultats sont exprimés en µmol d'AGL/ml selon l'équation ci-dessous :

$$\mu\text{mol d'AGL/ml} = [V_{\text{KOH}} (\text{E}) - V_{\text{KOH}} (\text{B}) \times N \times 1000] / 60$$

Où N : est la normalité de la solution titrante de V_{KOH} (pour notre cas N=0,05)

E : échantillon et B : le blanc

Le blanc :

Bouillon MRS à 1% d'HO- cellules → Surnageant $\xrightarrow[12000\text{trs}/20\text{m}]{\text{Centrifugation}}$ incubation à 37°C/48h

Surnageant+1,5ml d'HO $\xrightarrow[37^\circ\text{C}/30\text{mn}]{\text{Incubation}}$ dosage

L'échantillon :

Bouillon MRS à 1% d'HO+cellules → Surnageant $\xrightarrow[12000\text{trs}/20\text{mn}]{\text{Centrifugation}}$ incubation 37°C/48h

Surnageant+1,5ml d'HO +1ml solution tampon $\xrightarrow[37^\circ\text{C}/60\text{mn}]{\text{Incubation}}$ (1ml)acétone+(1ml)éthanol → dosage

• Pouvoir texturant des isolats

A) Recherche des Exo-Poly-Saccharides

La production des EPS a été mise en évidence sur une gélose hypersaccharosée de Mayeux selon (Nieto-Arribas, 2010)

Après ensemencement des cultures jeunes de 20h, en spot, les boîtes étaient incubées à 30°C pendant 24-48h.

B) Quantification des EPS

Elle a été réalisée dans le milieu ESM (EPS Selection Medium) selon Bachtarzi et al. (2019), contenant : 90g/l de lait écrémé, 3,5g/l d'extrait de levure, 3,5g/l de peptone, 10 g/l de glucose, autoclavé à 105°C pendant 15mn, puis ensemencé à 2%. Après 48h d'incubation à 30°C, les cultures étaient additionnées d'un volume de 2(v/v) d'une solution de TCA (à 12%) (w/v), afin de précipiter les protéines. Après centrifugation (5000 t/mn à 4°C pendant 20mn, les surnageants étaient filtrés et dosés par une méthode phénol-acide sulfurique utilisant le glucose comme standard (Dubois et al., 1956). Un volume de 2ml est additionné à 1ml de phénol à 5% et 5ml d'acide sulfurique pur (95-98%). Le mélange était agité et les tubes étaient incubés au bain-marie (25-26°C) pendant 20-30 mn. La lecture était effectuée par spectrophotométrie à 490 nm contre un blanc (milieu non inoculé préparé et incubé dans les mêmes conditions que les échantillons). La concentration des sucres était exprimée en g/l à l'aide d'une courbe d'étalonnage utilisant le glucose comme standard.

✓ Préparation de la courbe étalon glucose

Une courbe étalon a été tracée à partir d'une solution mère de glucose à 0,1g/l en réalisant une gamme de dilutions de 0,01 à 0,1g/l.

Tableau 12 : Préparation de la courbe étalon glucose pour le dosage des EPS

Solution de glucose 0,1 g/l	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Eau distillée (ml)	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
[glucose] g/l	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1

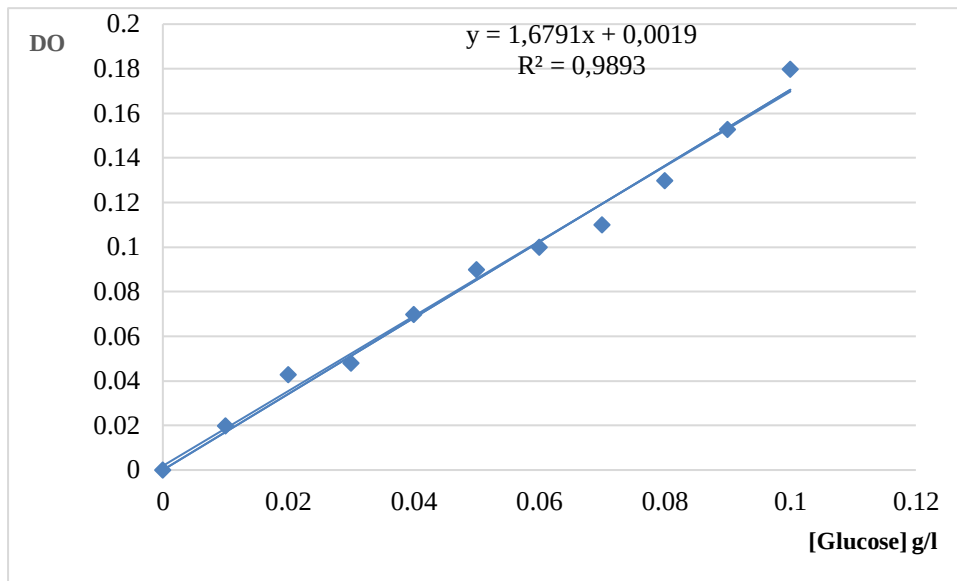


Figure 25 : Courbe d'étalonnage du glucose pour la quantification des EPS (phénol-acide sulfurique)

- **Pouvoir aromatisant**

A) La production d'acétone

Elle est décelée sur milieu lait par une méthode colorimétrique basée sur la réaction de Voges Proskauer. Les tubes contenant du lait écrémé stérile ont été ensemencés par l'un des souches à tester et incubés à 30°C pendant 24 à 48 h. Cinq gouttes des deux réactifs VPI et VPII ont été ajoutées et laissées reposer. La présence d'arôme est marquée par l'apparition d'un anneau rouge (Delarras, 2007).

B) Recherche de la citratase

La mise en évidence de la citratase est réalisée dans une gélose renfermant comme seule source de carbone le citrate. Seulement les souches qui sont équipées d'une citratase perméase peuvent se développer après incubation à 30°C pendant 24h. La présence de la citratase se traduit par la production de gaz dans la gélose ensemencée en masse, ce qui provoque des fissures au niveau de celle-ci (Leveau et al., 1991).

- **Activité amylolytique**

L'activité amylolytique était détectée sur gélose à l'amidon à raison de 0,3% selon Thapa et al. (2004). Après incubation d'une culture de 24h à 30°C pendant 4 jours, les boîtes étaient recouvertes par une solution d'iode pendant 15 à 30 mn

pour examiner les zones claires. L'hydrolyse de l'amidon était mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour des colonies, par contre un résultat négatif se traduit par une couleur brune violacée autour de la culture.

1.7.6. Caractérisation de la substance inhibitrice

Les bactéries lactiques peuvent inhiber d'autres bactéries par l'élaboration de multiples agents inhibiteurs tels que les acides organiques, les peroxydes d'hydrogène ou les bactériocines (Aguilar-Galvez et al., 2012).

A) Détermination de la nature de la substance inhibitrice

- **Inhibition due à la production d'acides organiques**

L'acide lactique est un agent principal dans les inhibitions bactériennes. La raison pour laquelle les surnageants de souches lactiques sont ajustés à pH 7 pour bloquer son effet.

- **Inhibition due à la production de peroxyde d'hydrogène**

L'action du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut être supprimée par une catalase.

- **Inhibition due à la production de substance de nature protéique**

Pour confirmer la nature de la substance inhibitrice, le surnageant de souche a été traité par des enzymes protéolytiques ou lipolytiques.

B) Caractérisation physicochimique de Bactériocines Like (BLIS)

- **Effet des enzymes, du traitement thermique et du pH sur l'activité des bactériocines**

La sensibilité aux enzymes protéolytiques et lipolytiques est vérifiée selon (Ocaña et Nader-Macías, 2004 ; Castro et al., 2011). Des échantillons (surnageant traité par de la soude et de la catalase) de 90 µl ont été incubés avec 10 µl d'enzyme à une concentration finale de 1 mg/ml dans le tampon approprié à 37°C pendant 2 h avec la protéinase K ou la lipase. L'échantillon non traité a été utilisé comme contrôle. L'activité antibactérienne de toutes les réactions a été déterminée par l'essai de diffusion en puits contre *Bacillus cereus* comme indicatrice. La stabilité

thermique du surnageant (CFS) contenant la bactériocine a été testée à 70 pendant 30 min et à 100°C pendant 30 min, 10 min et la résistance à la température par autoclavage à 121 pendant 20 min selon Khouiti et Simon (1997). L'échantillon non traité a été utilisé comme contrôle.

Pour vérifier l'effet du pH, 1 ml de CFS de la souche sélectionnée est ajusté à des valeurs de pH de 3,5- 4,5- 5,5 et 6,5 en ajoutant les volumes appropriés de HCl 4 N ou de NaOH 4 N. Les valeurs de pH sont mesurées à l'aide d'un pH-mètre comme démontré par Castro et al. (2011).

- **Purification partielle de bactériocine-like (BLIS)**

La méthode de Yang et al. (1992) a été suivie pour obtenir une bactériocine partiellement purifiée. Les cellules provenant d'une culture de nuit (14-18h) ont été chauffées à 70°C pendant 30 minutes pour tuer les cellules et inactiver les protéases. La culture a été ajustée à un pH de 7 avec du Na OH 4 M. Après 30 minutes d'agitation douce à température ambiante, les cellules ont été récupérées par centrifugation (9000 × g pendant 25 minutes). Un échantillon du liquide surnageant a été prélevé pour estimer la quantité de bactériocine non adsorbée sur les cellules.

- **La détermination de la concentration de bactériocine like dans le CFS**

- Dosage de Bradford**

La quantité de bactériocine-like (BLIS) partiellement purifié, dans les CFS a été déterminée par le dosage colorimétrique de Bradford (1976).

C'est une méthode basée sur la formation d'un complexe entre les protéines ou peptides et un colorant : le bleu de Coomassie G-250 ou réactif de Bradford. En milieu acide, ce réactif, rouge/brun à l'état libre, prend une couleur bleue lorsqu'il est lié aux protéines/ peptides et plus particulièrement aux acides aminés basiques (principalement l'arginine) et montre par conséquent un coefficient d'extinction molaire élevé à 595 nm. Le dosage de Bradford a été réalisé en suivant les instructions du kit « Coomassie Protein Assay Kit » (Pierce). Afin de réaliser une gamme étalon à partir d'une solution mère de Sérum albumine bovine (1mg /ml), le réactif de Bradford a été rajouté à une gamme de dilution de SAB (0,5- 2,5 µg/ml). A 595nm la D.O de chaque échantillon a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'échantillon d'intérêt a subi le même traitement que la SAB et sa concentration a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage.

-Préparation de la courbe étalon

Une courbe étalon était préparée en utilisant une solution mère à 1mg/ml de sérum albumine bovine (BSA) et le réactif de Bradford.

Tableau 13 : Préparation de la courbe étalon : Serum Albumin Bovine

Tube	1	2	3	4	5	6
Solution BSA (1mg /ml) (µl)	0	10	20	30	40	50
Quantité de protéine BSA (µg)	0	10	20	30	40	50
Eau distillée (µl)	50	40	30	20	10	0
Réactif de Bradford (µl)	2	2	2	2	2	2
[SAB] (µg/ µl)	0	0,005	0,01	0,015	0,02	0,025

-Coloration

Un volume de 2ml de réactif de Bradford a été ajouté dans chaque tube contenant 50 µl de BSA ou d'échantillon prélevé de surnageant. Après un repos de 20 mn à l'obscurité sous agitation, la quantité de BSA ou de bactériocine (BLIS) a été estimée en déterminant leur D.O, à l'aide d'un spectrophotomètre à $\lambda = 595$ nm. La courbe d'étalonnage $D.O = f([SAB])$ a été tracée.

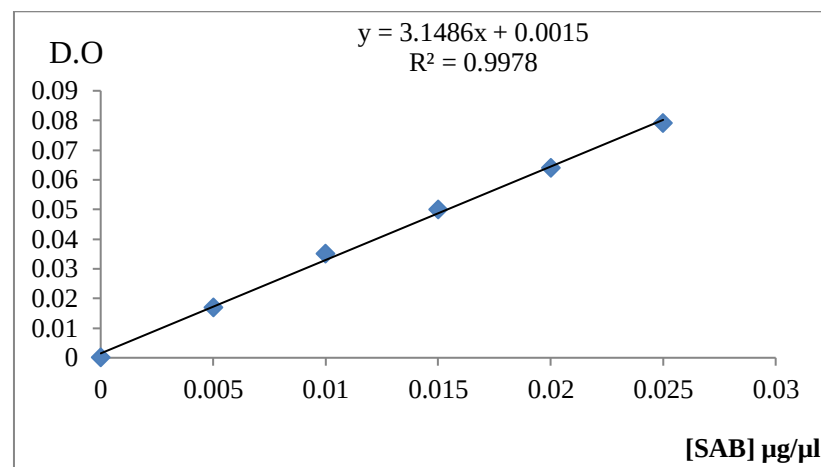


Figure 26 : Courbe d'étalonnage SAB.

- **Détermination de la CMI par microdilution en milieu liquide**

La méthode de dilution en milieu liquide permet de déterminer les paramètres d'inhibition (CMI) de la croissance bactérienne par les substances bioactives. Selon Wade et al. (2001) et Radojevic et al. (2012), les valeurs de la CMI ont été déterminées en utilisant la méthode de dilution sur microplaque pour tous les isolats. Les cupules de la microplaque ont été remplies par 50 µl de bouillon de Mueller-Hinton. Un volume de 50µl de surnageants de cultures d'isolats lactiques a été additionné aux cupules de la 3^{ème} colonne. Des dilutions binaires ont été ensuite réalisées. Des volumes de 50 µl de suspension bactérienne de *Bacillus cereus* ou *Salmonella abony* standardisée à 10⁸ UFC/ml et 10 µl de la résazurine ont été ajoutés.

On laisse deux rangées verticales représentant les témoins : Les puits de la première rangée remplis par 50µl de bouillon MH, 50 µl de surnageant et 10 µl de la résazurine représente le témoin négatif et les puits de la deuxième rangée remplis par 50µl de MH, 50µl de la suspension bactérienne et 10 µl de la résazurine représentent le témoin positif.

La microplaque a été ainsi incubée à 37 ° C pendant 24 heures. Au cours de l'incubation, les densités optiques ont été mesurées à l'aide d'un lecteur de microplaque ELISA (ELx 808).

- **Détermination du mode d'action des substances inhibitrices**

Le mode d'action bactériostatique des entérocinés produites par les isolats lactiques a été déterminé selon la méthode adaptée de Ben Kerroum et al. (1993) avec quelques modifications.

Un volume de 20ml de surnageant de cultures de chaque souche bactériocinogène a été préparé. Des volumes de 180 ml du milieu MRS ont étéensemencés à 1% par une souche indicatrice (D.O= 0,1 à 600nm) et incubés à 37°C. Après 4h d'incubation, les surnageants sont ajoutés à la culture sur milieu MRS. La densité optique à 600 nm de chaque milieu a été mesurée toutes les heures jusqu'à 24h. La croissance de *Bacillus cereus* ATCC 14579 ou de *Salmonella abony* ATCC 6017 a été utilisée pour le contrôle.

1.7.7. Caractérisation des critères de performances

A) La résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques a été testée selon la méthode publiée par le comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CASFM).

Les souches ont été cultivées dans le bouillon MRS à 30°C pendant 18h ensuite ont été standardisées à une charge de 0,5 Mc Ferland puis étalées sur une gélose Mueller Hinton. Des disques d'antibiotiques ont été déposés sur gélose et incubés à 30°C pendant 24 h. Les ATB mis en jeu sont démontrés au Tableau (14).

Le diamètre de la zone de diffusion du disque a été interprété sur la base des tableaux de l'Institut des normes cliniques et de laboratoire (CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institut) (Weinstein *et al.*, 2020), les isolats ont été classés en trois catégories : résistants (R), intermédiaires (I) et sensibles (S).

Tableau 14 : Liste des antibiotiques testés

Antibiotique	Charge de disque µg	Symbole
Tétracycline	30	TE
Pénicilline G	10	P
Acide nalidixique	30	NA
Vancomycine	30	VA
Gentamycine	10	GN
Amoxicilline	30	AM
Erythromycine	15	E
Spyramycine	10	SP

B) Activité hémolytique

L'activité hémolytique a été réalisée comme décrit par Giraffa *et al.* (1995). Les cultures bactériennes ont été inoculées sur de la gélose Columbia additionnée de 5 % de sang de cheval et incubées à 30 °C pendant 24 h. Tout changement sur les plaques a été signalé : la γ -hémolyse (pas de zone) ou l' α -hémolyse (zone verte) autour des

colonies a été considérée comme non hémolytique ; tandis que la β -hémolyse (zone claire) a été considérée comme hémolytique (Casarotti et al., 2017).

C) Production des amines biogènes

Le test de décarboxylase pour la production d'amines biogènes a été effectué selon Maijala (1993), avec l'ajout des acides aminés suivants comme précurseurs : lysine, ornithine, adénine et tyrosine. Des précultures d'isolats de souches lactiques ont été déposées sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose décarboxylante additionnée à 0,25 % de chacun des précurseurs précédents. Après incubation, la production d'amines biogènes devait être détectable par la présence d'un halo violet entourant les spots.

1.7.8 Les facteurs de virulence

En plus d'identifier l'activité antibactérienne, la capacité de produire les EPS, la résistance aux antibiotiques, il s'avère nécessaire d'examiner les caractéristiques pratiques, y compris les déterminants de virulence tels que, la recherche de la gélatinase, l'hydrophobicité, la capacité d'auto-agrégation et de co-agrégation et la capacité d'adhésion des souches aux cellules intestinales humaines (Krawczyk et al., 2021).

A. L'hydrolyse de la gélatine

- **Test de gélatinase**

La gélatinase dégrade la gélatine ajoutée à une suspension bactérienne.

- **Principe**

La gélatinase ou collagénase est une protéase qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides. La gélatinase est une enzyme mise en évidence sur gélose à la gélatine (gélose nutritive additionnée de 5% de gélatine utilisée comme substrat).

- **Test**

Un inoculum de bactéries testées âgées de 18 à 24 heures est inoculé par piqûre (spot) sur des boîtes de Pétri remplies préalablement de gélose à la gélatine. Une fois inoculées, elles sont incubées à 37 °C pendant 24 heures. L'hydrolyse de la gélatine est indiquée par des zones claires autour des colonies positives à la gélatinase. Les boîtes sont inondées avec du sulfate d'ammonium saturé à 50% pour précipiter la gélatine non hydrolysée, rendant ainsi les zones claires plus faciles à voir. Les résultats sont souvent observés dans les 5 à 10 minutes suivant l'inondation (de la Cruz & Torres, 2012).

B. Hydrophobicité

Le protocole de Guan et Liu (2020) avec de légères modifications a été utilisé pour déterminer le degré d'hydrophobicité de la surface cellulaire des isolats avec le solvant polaire xylène, qui détermine indirectement la capacité de l'isolat à adhérer aux cellules intestinales. Ces méthodes étaient basées sur l'adhésion des cellules aux gouttelettes du xylène.

Les culots ont été récupérés après la centrifugation (8000 trs, 10 min) des cultures jeunes (18h) d'isolats, lavés deux fois avec une solution saline tamponnée au phosphate stérile (pH 7,2) et remis en suspension dans le même tampon à 10^8 CFU/mL. L'absorbance de la suspension cellulaire a été mesurée à 600 nm (A_0). Un millilitre de xylène a été ajouté à 3 ml de suspension cellulaire et mélangé au vortex pendant 2 minutes. La suspension a été incubée à température ambiante pour permettre la séparation des phases. La phase aqueuse a été prélevée et son absorbance à 600nm (A_1) a été lue. Le pourcentage d'adhésion des bactéries au solvant a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Hydrophobicité (\%)} = [1 - (A_1/A_0)] \times 100$$

Où

A_1 : l'absorbance de la phase aqueuse après séparation du système biphasique.

A_0 : l'absorbance de la suspension bactérienne initiale.

C. Capacité d'auto-agrégation et de co-agrégation

- L'essai d'auto-agrégation et de co-agrégation a été effectué comme décrit précédemment par Li et al. (2020) avec des modifications mineures.

En bref, pour l'auto-agrégation, les cultures de 18h, en milieu MRS à 37°C, ont été récoltées par centrifugation à 5000 trs pendant 10 minutes. Les culots obtenus ont été lavés trois fois avec une solution saline tamponnée au phosphate stérile (pH 7,2) et remis en suspension dans 4mL du tampon phosphate pour obtenir un nombre de cellules de 10^8 UFC/ml (A0). La suspension a été incubée à 37°C et l'absorbance (At) a été mesurée à 600 nm, à chaque point dans le temps (0, 2, 4, 6, 10 et 24 heures).

Une mesure de 100 µL de la couche supérieure de la suspension a été transférée dans une micro-cuve et l'absorbance a été lue à 600 nm.

Le **taux d'auto-agrégation** a été déterminé par l'équation ci-dessous :

$$\text{Auto-agrégation (\%)} = [1 - (A_t / A_0)] \times 100$$

A0 : absorbance au temps zéro.

At : absorbance au temps (2, 4, 6, 10 et 24 h).

- **Les propriétés de co-agrégation** ont été réalisées en utilisant des culots de cultures d'isolats remis en suspension dans 4 mL d'une solution saline tamponnée au phosphate (pH 7,2), comme mentionné dans la procédure d'auto-agrégation et mélangés avec 1ml de différentes suspensions bactériennes ensuite vortexés (*Bacillus cereus* ATCC 14579, *Salmonella abony* ATCC 6017) et incubés à différents intervalles de temps (2, 4, 6, 10 et 24 h).

Après incubation, l'absorbance de toutes les suspensions a été lue à 600 nm.

L'équation suivante a été utilisée pour calculer le pourcentage de co-agrégation :

$$\text{Co-agrégation \%} = 1 - [A_{\text{mélange}} / (A_{\text{BL}} + A_{\text{pathogène}})] \times 100$$

A (BL) + A (pathogène) = absorbance du mélange de suspensions de BL et d'agents pathogènes à T0 (0 h).

A (mélange) = absorbance du mélange de suspensions de BL et de pathogènes aux temps (2, 4, 6, 10 et 24 h).

1.7.9. Identification génotypique

- **Extraction de l'ADN génomique et amplification de l'ADN par PCR**

L'ADN bactérien a été extrait à l'aide du kit Macherey-Nagel Nucleospin en suivant la procédure d'extraction du fournisseur du kit (Macherey-Nagel Allemagne).

Les ADN extraits ont été analysés avec le nano drop 2000 pour la détermination de leurs quantités et qualités en regardant le rapport des longueurs d'onde 260/280 et 260/230. L'amplification a été réalisée à l'aide du thermocycleur Biorad P100 (Biorad, USA). Les amorces universelles 16S sont :

27f (forward) : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ;

1492R (Reverse) : 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'

Mélange PCR

Réactifs	Concentrations Initiales	Concentrations Finales	Volume à prélever (µl)
Eau ultra pure			14,1
Tampon de TaqPromega	5X	1X	5
MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,5
DNTP	25mM	0,2mM	0,2
Amorce 27F	10µM	0,4	1
Amorce 1492R	10µM	0,4	1
Taq polymérase Promega	5U	1U	0,2
ADN génomique			2
Volume final :			25

Conditions de Température d'amplification PCR

Dénaturation initiale	95°C pendant 5min
35 cycles	
Dénaturation	95°C pendant 30s
Hybridation	55°C pendant 30s
Élongation	72°C pendant 45s
Elongation finale	72°C pendant 7min
Stockage avant révélation	10°C jusqu'à utilisation

• **Electrophorèse sur gel d'agarose**

Les produits d'amplification ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% par dépôt de 10µl de produit PCR suivi d'une coloration dans un bain de bromure d'éthidium (0,5µg/ml). Après migration, l'ARN est visualisé et photographié sous lumière UV. Les produits PCR ont été purifiés par le kit Clean up de Macherey-

Nagel (Macherey-Nagel Allemagne) en suivant le protocole décrit par le fournisseur. L'identification des isolats sélectionnés a été confirmée par le séquençage des gènes de l'ARNr 16S après l'amplification par PCR. Les produits PCR isolés et purifiés ont été séquencés par la technique Sanger (Sanger et al., 1977) à l'aide du kit big Dye v3.1 d'Applied Biosystems et des amorces utilisées pour l'amplification PCR. Les séquences obtenues ont été analysées et nettoyées à l'aide de CHROMAS PRO. L'alignement des séquences a été effectué à l'aide de MUSCLE (Edgar, 2004). L'historique de l'évolution a été déduit en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance basée sur le modèle à 2 paramètres de Kimura (1980). L'arbre est dessiné à l'échelle, avec la longueur des branches étant mesurée en nombre de substitutions par site. L'algorithme Neighbor-joining a été utilisé pour obtenir l'arbre initial (Saitou et Nei, 1987). L'analyse a porté sur 20 séquences de nucléotides. Les analyses évolutives ont été réalisées avec MEGA7 (Kumar, 2016). L'arbre a été visualisé avec iTOL (Letunic et Bork, 2019).

Chapitre III

Résultats et discussions

1. Isolement et caractérisation phénotypique

L'isolement des bactéries lactiques sur différents milieux de cultures MRS, DMRS (MRS dépourvu d'acétate de sodium), DMRS+0,4% MnSO₄, APT et TSA à partir d'échantillons de TGI de deux espèces de poissons (*Sardina pilchardus*, *Sarda sarda*), a permis l'obtention d'un soucier de 40 isolats Gram-positif et catalase- négative, présumés appartenant aux bactéries lactiques.

La purification nous a permis d'avoir 20 souches pures, de lesquelles on a pu sélectionner 5 souches productrices de substances antibactériennes pour faire l'objet du screening technologique.

1.1. Caractérisation phénotypique

Les 20 isolats lactiques obtenus ont été identifiés selon des critères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

1.1.1. Critères morphologiques

A. Aspect macroscopique

Les isolats sont présentés sous petites tailles, forme circulaire, blanchâtre à translucide avec un bord régulier (figure 27). Cet examen nous a permis de retenir cinq isolats.

B. Aspect microscopique

Après coloration de Gram, l'examen microscopique a montré que les isolats présentent un Gram-positif et forment deux groupes distincts, l'un de forme ovoïde et l'autre de forme bâtonnet organisés en paire ou en chaîne courte (figure 28). Cet examen nous a conduit à retenir cinq isolats lactiques, parmi lesquels trois sont de forme coque (ovoïde) (ABBC2, ABBC3 et ABBC4) et les deux autres de forme bâtonnet (ABBC10 et ABBC12).

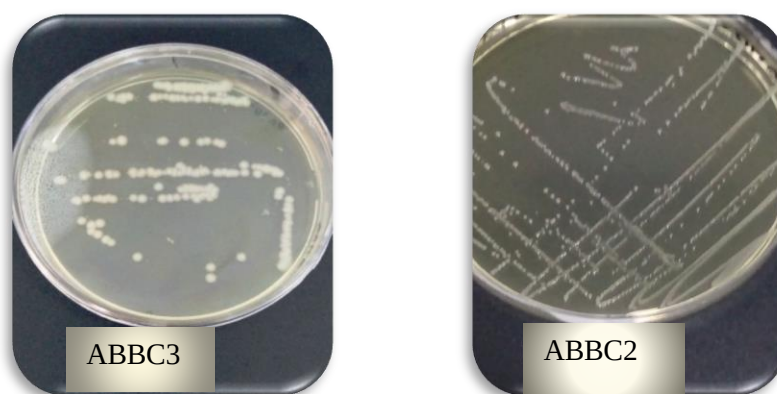


Figure 27 : Aspect macroscopique des colonies des souches ABBC2 ABBC3 sur milieu MRS.

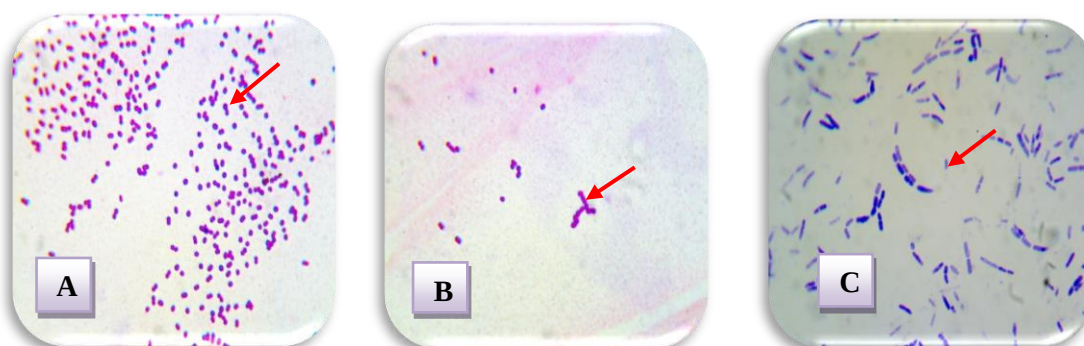


Figure 28 : Aspect microscopique des cellules (A) Cellules ovoïdes ABBC2 associées en diplocoques, (B) Cellules ABBC3 regroupées en chainettes courtes et (C) Bâtonnets ABBC10 regroupés en chainettes courtes) (G×100)

D'après les caractéristiques morphologiques et biochimiques des isolats lactiques (Tableau 15), on a pu identifier phénotypiquement, trois souches appartenant au groupe des entérocoques nommées *Enterococcus sp. C2*, *Enterococcus sp. C3* et *Enterococcus sp. C4*. Le genre *Enterococcus* comprend un groupe ubiquitaire de bactéries à Gram-positif, de forme ovoïde hydrolysant l'arginine (Schleifer et al., 1995).

Leur croissance est entre 10 °C et 45 °C, avec une croissance optimale entre 35 et 37°C (Švec et Devriese, 2015) et peuvent survivre sous un chauffage de 60°C pendant 30mn, une caractéristique attribuée aux entérocoques. Comme on a pu classer

deux souches présumées appartenant au groupe des Carnobactéries nommées *Carnobacterium sp. C10* et *Carnobacterium sp. C12*. Le genre *Carnobacterium* renferme un groupe ubiquitaire de bactéries à Gram-positif, de forme bâtonnet, hétéro-fermentaires, hydrolysent l'arginine, capables de croître à 4°C et 10°C et non pas à 45°C et incapable de se développer sur gélose à l'acétate (Tableau 15).

Tableau 15 : Les caractéristiques morphologiques et biochimiques des isolats lactiques

Souche	cata-lase	Gram	ADH	Croissance sur gélose à l'acétate	Croissance à T (°C)				Mobilité	Aspect des colonies	Forme des cellules et mode d'association
					4	30	45	60			
<i>Enterococcus sp. C2</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	Sur DMRS : Colonies blanches pointes	Coque (ovoïde) diplocoque et en courte chaînette
<i>Enterococcus sp. C3</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	Sur DMRS : Colonies blanches pointes	Coque (ovoïde) diplocoque
<i>Enterococcus sp. C4</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	Sur DMRS : Colonies blanches pointes	Coque (ovoïde)
<i>Carnobacterium sp. C10</i>	pseudo	+	+	-	+	+	-	-	+	Sur DMRS+0,4%MNSO ₄ colonies semi translucides (B)	Bacille court
<i>Carnobacterium sp. C12</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	+	Sur APT colonies à contour régulier blanchâtre (s)	Bacille court fin

2. Criblage sur la base de l'activité antibactérienne

Afin d'étudier le spectre d'activité antibactérienne des isolats lactiques et de leurs surnageants vis-à-vis des bactéries indicatrices, on a utilisé deux méthodes. Une méthode directe permettant de mettre en évidence une interaction antagoniste entre les bactéries lactiques et les souches test et une méthode indirecte qui favorise la détection de substances inhibitrices diffusibles contenues dans les surnageants des cultures d'isolats lactiques.

2.1. Le Test direct

On a étudié l'antagonisme des isolats lactiques contre huit espèces bactériennes, cinq pathogènes et/ou d'altération, trois Gram-positif sporulées ou non, deux Gram-négatif et trois autres lactiques. Un exemple de résultat est révélé dans la figure et l'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le tableau 16.

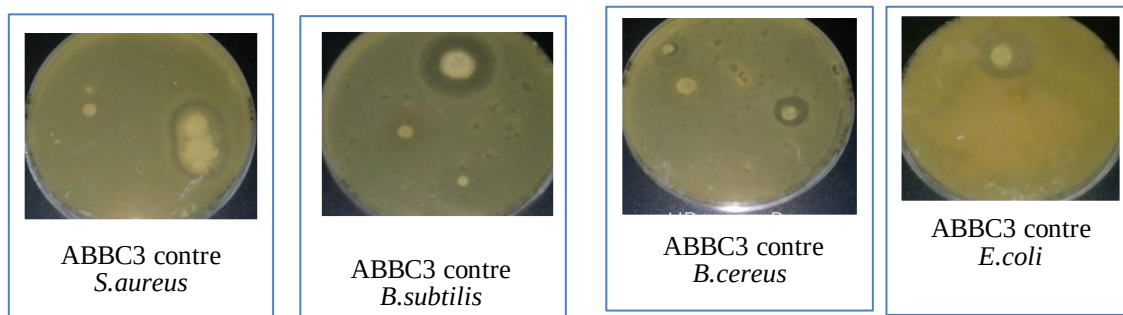


Figure 29 : Spectre d'action de la souche ABBC3 vis-à-vis *B.subtilis*, *S.aureus*, *B.cereus* et *E.coli*

Tableau 16 : Effet inhibiteur des isolats lactiques sur des bactéries indicatrices

Isolats lactiques / Bactéries indicatrices	ABBC2	ABBC3	ABBC4	ABBC10	ABBC12
<i>L. plantarum</i> JCM 1149	10	12	15	-	-
<i>L. pseudomesenteroides</i> NRIC 1777	11	14	18	-	-
<i>P. pentosaceus</i> ATCC25745	12	12	16	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	20	22	20	16	17
<i>B.cereus</i> ATCC 14579	25	25	25	-	12
<i>B. subtilis</i> ATCC 168	18	22	23	-	13
<i>E. coli</i> ATCC 25922	20	18	19	17	Nt
<i>S. abony</i> ATCC 6017	11	20	24	18	-

Les diamètres des halos d'inhibitions sont exprimés en mm. Nt : non testé

D'après les résultats obtenus, on peut tirer les remarques suivantes :

Généralement, les isolats ABBC2, ABBC3 et ABBC4 ont des effets inhibiteurs sur toutes les souches indicatrices testées. Les diamètres des zones d'inhibitions sont notablement analogues à l'exception des souches KB6, KV4 et *S. abony* dont les diamètres des halos d'inhibitions sont 10, 11, 11 mm, respectivement. Alors qu'on constate des actions inhibitrices des isolats ABBC10 et ABBC12 envers quelques souches indicatrices, prenant le cas de l'absence de zone d'inhibition pour la souche ABBC10 contre *B.cereus* et *B.subtilis* ainsi que la souche ABBC12 contre *S.abony*.

Les souches *Enterococcus sp. C2*, *Enterococcus sp. C3* et *Enterococcus sp. C4* ont été actifs contre des micro-organismes pathogènes tels que : *Escherichia coli*, *Salmonella abony*, *Staphylococcus* *Bacillus aureus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*. D'après les résultats obtenus, ces trois isolats ont les activités antibactériennes les plus importantes, produisant des halos d'inhibition bien définis avec un large spectre (halo d'inhibition >12mm) contre toutes les souches indicatrices testées (Gram-positif et Gram-négatif). Le spectre d'inhibition des *Enterococcus* a été largement étudié et caractérisé, en particulier en ce qui concerne *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus sp.* et *Clostridium sp.* mais aussi contre les bactéries à Gram négatif, les champignons et les levures (Aguilar-Galvez et al., 2012).

L'activité antimicrobienne d'*Enterococcus sp.* isolée à partir de viscères de poisson a été rapportée. Migaw et al (2013) ont décrit l'activité antimicrobienne de souches d'*E. durans*, qui ont été isolées à partir de viscères de poisson et ont inhibé la croissance de *Listeria monocytogenes* et d'autres bactéries à Gram positif. La charge microbienne des produits de pêche a montré que les cocci lactiques sont les BL prédominantes (Gomez-Sala et al., 2015), qui peut être attribuée à la forte concentration de sels dans la mer (Thapa et al., 2006), plusieurs espèces d'entérocoques ont été isolées à partir de poissons, comme *E. faecium* (Thapa et al., 2006 ; Gomez-Sala et al., 2015) et *E. durans* (Migaw et al., 2014).

2.2. Le test indirect

L'aptitude inhibitrice des isolats lactiques vis-à-vis *Bacillus cereus* a été démontré dans (Figure 30). Les résultats illustrent que nos souches sont capables d'inhiber

une bactérie sporulée à Gram-positif « *Bacillus cereus* » en traçant des halos d'inhibition les plus élevées et qui sont sensiblement semblables. Les isolats testés ont révélé un large spectre antibactérien, capable d'être actif contre les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. Nos résultats sont pertinents et montrent que ces souches pourraient être utilisées dans le contrôle des pathogènes alimentaires, bien que les BL pourraient produire des métabolites qui ont une activité lytique importante, comme les bactériocines. Si elles sont utilisées comme cultures starter, il y aurait un effet supplémentaire de production d'acide lactique et de compétence pour les substrats avec d'autres microorganismes (García-Cano et al., 2014).



Figure 30 : Interaction bactérienne des isolats, *Enterococcus* sp. C2, *Enterococcus* sp. C3, *Enterococcus* sp. C4, *Carnobacterium* sp. C10 et *Carnobacterium* sp. C12 vis-à-vis *B.cereus*

3. Identification physiologique et biochimique des isolats sélectionnés

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques sont représentées dans le Tableau (15). Les résultats sont comparés à ceux indiqués par Axelsson (2004), (voir Annexe 2).

3.1. Hydrolyse de l'arginine

Initialement, une acidification du milieu est provoquée lors de la fermentation lactique aboutissant à une coloration jaune. En présence d'acides aminés (arginine), cette acidification favorise l'action de l'ADH qui entraîne la formation des substances alcalines et par conséquent le virage au violet dû à l'alcalinisation du milieu (pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH).

Les bactéries dépourvues de l'arginine dihydrolase (ADH-) acidifient le milieu Moëller par la fermentation du lactose d'où une couleur jaunâtre tandis que les bactéries capable d'hydrolyser l'arginine alcalinisent le milieu. Donc sur milieu Moëller, tous les isolats hydrolysent l'arginine (ADH+) et ré-alcalinisent le milieu (Figure 31).

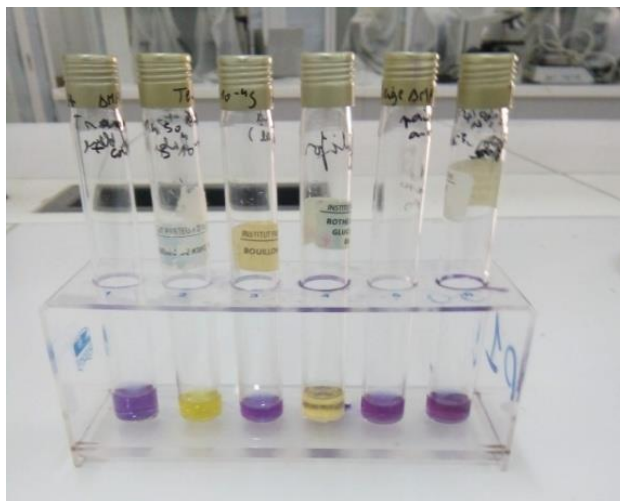


Figure 31 : Les résultats de la production de l'arginine di-hydrolase.

3.2. Test de mobilité

Sur milieu Mannitol mobilité (MM), les quatre isolats, *Enterococcus* sp. C3, *Enterococcus* sp. C4, *Carnobacterium* sp. C10 et *Carnobacterium* sp. C12, ont été montrés mobiles. Ils ont attaqués le mannitol car la couleur du milieu a changé (virage de la couleur du rouge au jaune orangé) comme ils ont envahis le milieu à partir de la pique de l'inoculation. A l'exception de l'isolat *Enterococcus* sp. C2 qui n'a pas utilisé le mannitol car la couleur du MM n'a pas changé de plus, il n'a pas envahis le milieu.

3.3. Taux de croissance à différentes conditions

Le taux de croissance à différentes températures, le pH et la tolérance au sel sont des facteurs limitant qui affectent la persistance et la compétitivité des cultures starter. Selon les résultats obtenus, la meilleure croissance des trois souches a été obtenue à 45°C en 0,5% NaCl, à un pH adéquat de 6.5 pour *Enterococcus* sp. C2 et de 9.6 pour les deux autres isolats *Enterococcus* sp. C3 et *Enterococcus* sp. C4. *Enterococcus* sp. C2 et *Enterococcus* sp. C3 peuvent croître à un taux de NaCl de 6,5% tandis que l'isolat *Enterococcus* sp. C4 peut croître jusqu' à 18%. Le taux de croissance aux autres paramètres étant plus faible, les résultats sont présentés dans

les (Figures 32, 33, 34). Donc on peut affirmer que les isolats d'origine marine peuvent résister aux traitements technologiques.

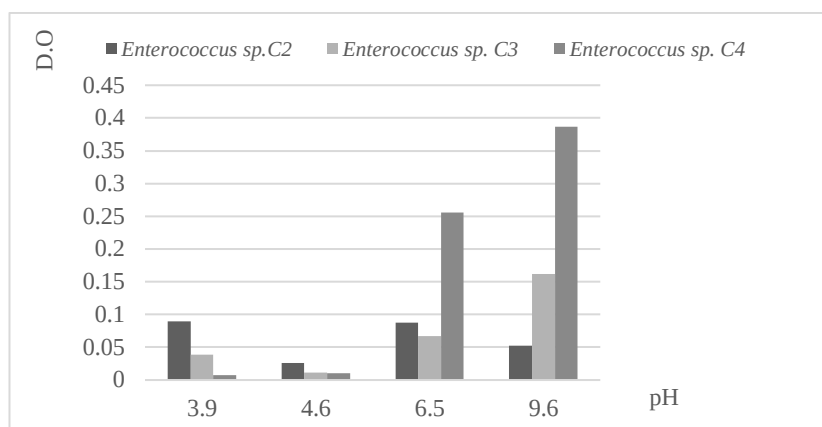


Figure 32 : Effet du pH sur la croissance des différents isolats.

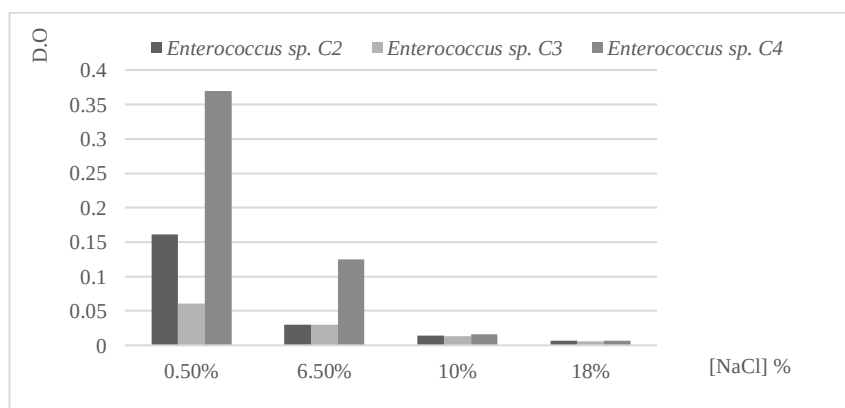


Figure 33 : Effet du NaCl sur la croissance des différents isolats.

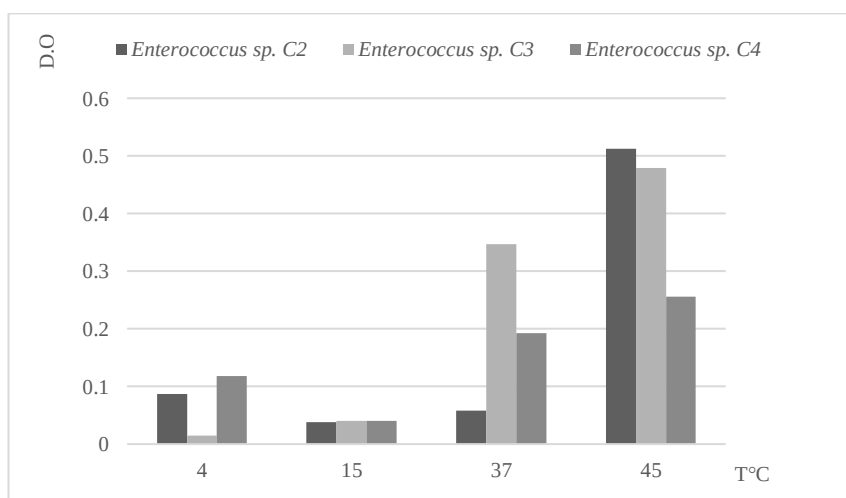


Figure 34 : Effet de la température sur la croissance des différents isolats.

Les *Entérocooccus* sont connus comme micro-organismes mésophiles qui se développent dans une gamme de températures allant de 10 à 45 °C, avec une température optimale de 35 °C. Certaines espèces peuvent survivre à 60 °C pendant 30 mn. Ils se prolifèrent dans des conditions hostiles de 6,5 % de NaCl et dans une gamme de pH comprise entre 4,4 et 9,6 (Le Blanc, 2006 ; Aguilar- Galvez, 2012 ; Giraffa, 2014 ; Calatrava, 2022).

3.4. Type fermentaire

Ce test consiste à mettre en évidence la production de CO₂. Tous les isolats sont homofermentaires puisqu'ils n'ont pas produit de CO₂. Les *Enterococcus* produisent essentiellement de l'acide lactique et en quantité moindre, de l'acétate, du formiate et de l'éthanol (Giraffa, 2003, 2014). Le genre *Carnobacterium* appartient aux BL à Gram-positif, catalase-négatives qui produisent de l'acide lactique comme principal produit final de la fermentation des hydrates de carbone (caillez-Grimal et al., 2014).

4. Identification des isolats par Galerie API

Pour compléter l'identification des espèces *Enterococcus sp.* C2, *Enterococcus sp.* C3 et *Enterococcus sp.* C4, on a étudié le profil fermentaire des sucres en utilisant la Galerie API 50 CHL, qui permet de tester leur aptitude à fermenter 49 sucres différents, ce qui permet l'identification de l'espèce. Pour la lecture des résultats, on a comparé le profile fermentaire de nos isolats lactiques avec les résultats du Tableau de Švec et Franz (2014).

La figure (35) présente le profil fermentaire des sucres des trois isolats. Le tableau (voir Annexe 3) englobe les résultats obtenus.

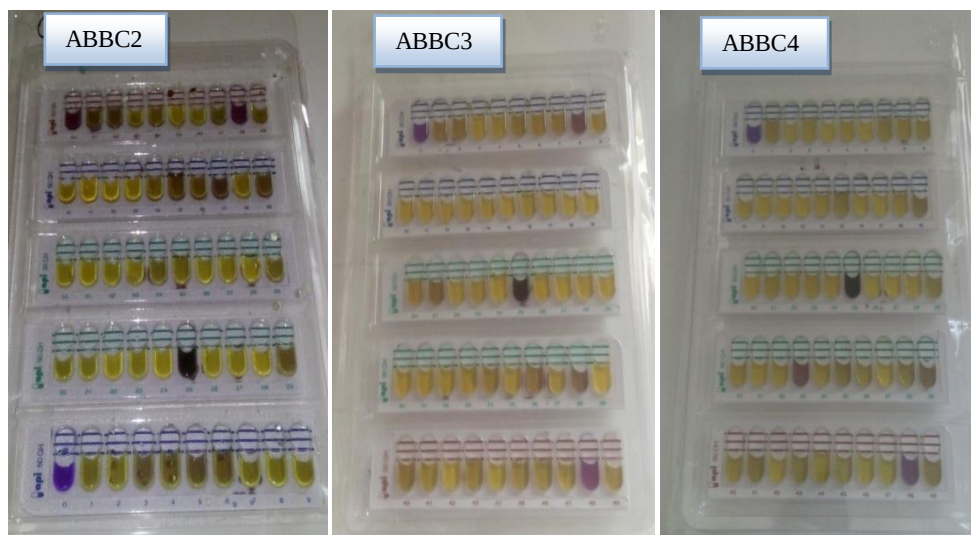


Figure 35 : Profil fermentaires des isolats *Enterococcus sp. C2*, *Enterococcus sp. C3* et *Enterococcus sp. C4*

Le profil fermentaire des sucres par les isolats lactiques a montré une plus forte correspondance des isolats ABBC2 et ABBC3 à l'espèce *Enterococcus faecium* avec une différence dans deux sucres, le turanose et l'adonitol, alors que l'isolat ABBC4 correspond fortement à l'espèce *Enterococcus durans* avec une différence dans l'inuline (Švec et Franz, 2014).

5. Caractérisation technologique des isolats purs

5.1. Cinétique de croissance et d'acidification

L'aptitude d'acidification des isolats à produire de l'acide lactique dans le lait écrémé a été testée en mesurant la diminution du pH durant 72h. La cinétique d'acidification a révélé deux schémas d'acidification : les acidifiants moyens et les acidifiants lents. Les isolats *Enterococcus sp. C2* et *Enterococcus sp. C4* se sont développés dans le lait et ont été capables de changer le pH du lait après 12, 20, 24, 48 et 72 heures d'incubation. L'isolat testé *Enterococcus sp. C4* a acidifié rapidement le lait à la fin des 12 heures d'incubation. Par contre, la souche *Enterococcus sp. C2* a pris 20 h. Après 72 h, le pH des souches lactiques diminue à des valeurs inférieures à 5 (4.05) pour *Enterococcus sp. C4*. Ces souches sont divisées en isolats faiblement (*Enterococcus sp. C2* ; AT= 55 °D, *Enterococcus sp. C3* ; AT=50 et *Enterococcus sp. C12* ; AT=40°D) à modérément acidifiants (*Enterococcus sp. C10* ; AT=66 °D et *Enterococcus sp. C4* ; AT=70 °D). En accord avec Mrkonjić Fuka et al. (2017) qui ont trouvé que *Enterococcus durans* (ED0207)

d'origine laitière présentait une acidification moyenne et Schirru et al. (2012) qui ont rapporté que l'activité acidifiante d'*E. faecium* isolé du lait de chèvre était généralement faible. Les paramètres cinétiques de croissance évalués sont : $\mu_{\max}$ [vitesse spécifique de croissance ($\mu \text{ inh}^{-1}$)], vitesse spécifique de production d'acidités (QAc en g/g.h) et productivité d'acidité en g/L.h. Les valeurs de ces paramètres obtenus diffèrent entre les souches (voir Figure 36). Cela dépend de leur capacité à croître dans le lait. Les cinq souches *Enterococcus sp.* C10, *Enterococcus sp.* C2, *Enterococcus sp.* C3, *Enterococcus sp.* C4 et *Carnobacterium sp.* C12 démarrent avec une D.O initiale de 0.05, 0.02, 0.03, 0.06 et 0.05 respectivement et atteignent les valeurs maximales de 0.23, 0.19, 0.17, 0.25 et 0.16 après 72 h de culture. Pendant cette période de croissance, ils produisent des quantités d'acidité de 37, 31, 27, 40 et 18 respectivement (voir Tableau 2 en Annexe 2).

L'étude des paramètres cinétiques indique que les quatre souches ont des vitesses spécifiques maximales de croissance faibles ($\mu_{\max}$ de 0.108 h^{-1} pour *Enterococcus sp.* C2 et *Carnobacterium sp.* C10, 0.111 h^{-1} pour *Enterococcus sp.* C3 et 0.103 h^{-1} pour *Enterococcus sp.* C4) tandis que *Carnobacterium sp.* C12 étant la plus faible avec $0,056 \text{ h}^{-1}$. Le taux spécifique maximal de production d'acidité (QAc max) est très élevé pour la souche *Enterococcus sp.* C4 (20.36 g/g.h) par rapport aux autres souches *Carnobacterium sp.* C10 (18,93 g/g.h), *Enterococcus sp.* C2 (13.39g/g.h), *Enterococcus sp.* C3 (13.45 g/g.h) et *Carnobacterium sp.* C12 (8,98 g/g.h). Les valeurs de la productivité des cinq isolats *Carnobacterium sp.* C10, *Enterococcus sp.* C2, *Enterococcus sp.* C3, *Enterococcus sp.* C4 et *Carnobacterium sp.* C12 sont 14.81, 12.16, 11.60, 16.36 et 11.36 g/L.h respectivement (Voir figure 36).

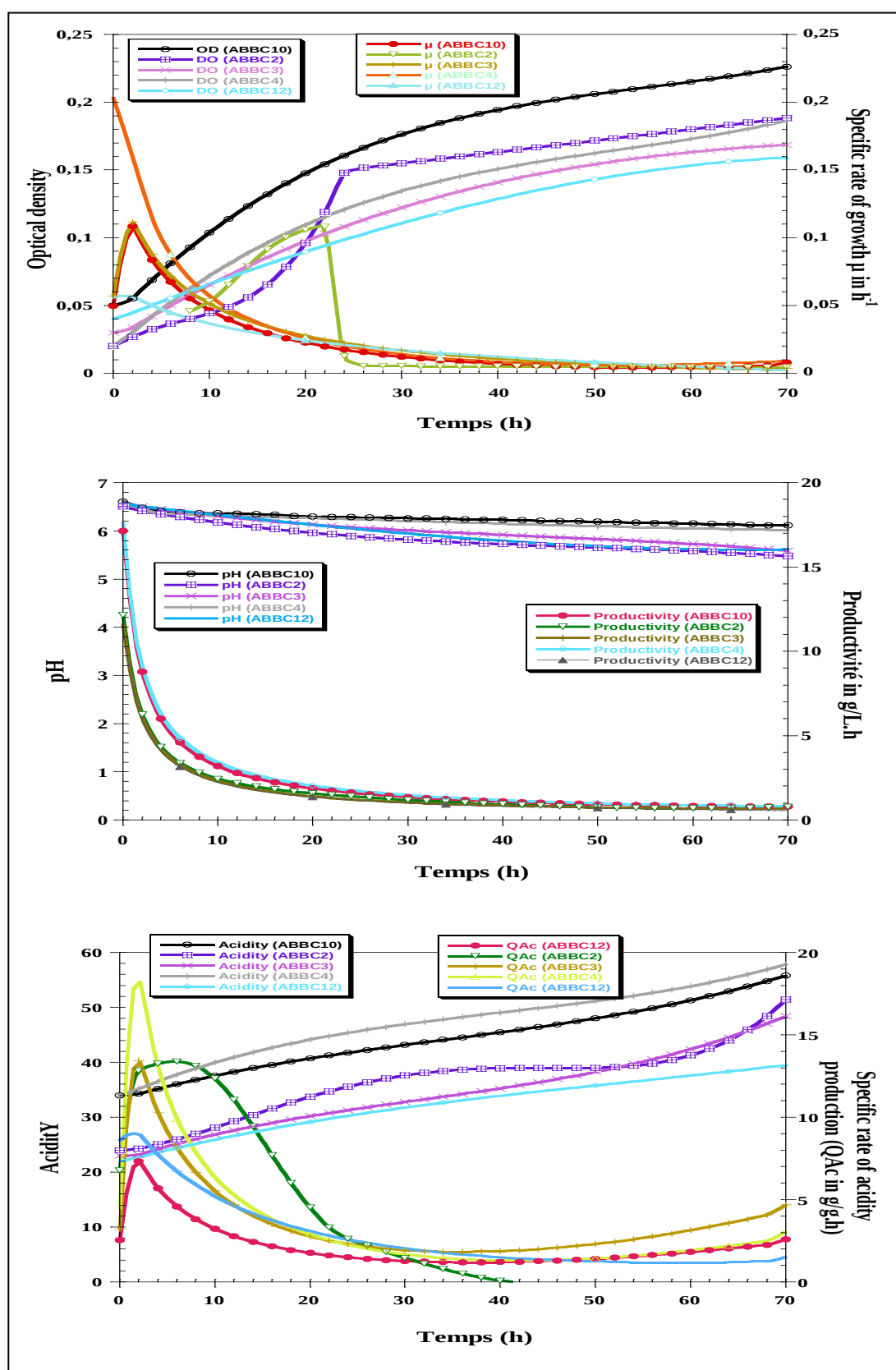


Figure 36 : Paramètres cinétiques de la croissance et de l'acidité produite par les souches *Carnobacterium* sp. C10, *Enterococcus* sp. C2, *Enterococcus* sp. C3, *Enterococcus* sp. C4 et *Carnobacterium* sp. C12 au cours de la fermentation discontinue.

Pendant l'acidification, la diminution du pH résulte de la production d'acide lactique par les BL comme forme finale de la fermentation du lactose. En outre, elles peuvent aussi fermenter des monosaccharides (ribose, xylose, galactose), des hexitols ou des pentitols (mannitol, xylitol, sorbitol) et des disaccharides (saccharose, maltose, tréhalose) (Belkheir, 2017). De plus, une bonne culture de départ produisant de l'acide peut réduire le pH du lait de sa valeur normale de 6,6 à $5 \pm 0,3$ en 6h, et en général, les entérocoques présentent une faible capacité d'acidification du lait (Schirru et al., 2012 ; Huggins et Sandine., 1984). La capacité d'acidification à 30°C se révèle généralement faible car les isolats lactiques testés n'ont pas pu réduire le pH au-delà de 5 après 24 h d'incubation. *Enterococcus* sp. C2 est un acidifiant lent alors que *Enterococcus* sp. C4 s'est montré moyennement acidifiant après 72 h, avec un taux de croissance élevé (20,361 g/g.h).

5.2. Activité protéolytique

Les résultats concernant l'activité protéolytique ont montré que les trois isolats testés C4, C10 et C12 étaient capables d'hydrolyser les caséines. *Enterococcus* sp. C2 et *Enterococcus* sp. C3 n'ont montré aucune activité détectable pour la protéolyse sur la gélose au lait, ce qui peut être considéré comme une caractéristique de sécurité selon Ahmadova et al. (2012) (Figure 37).

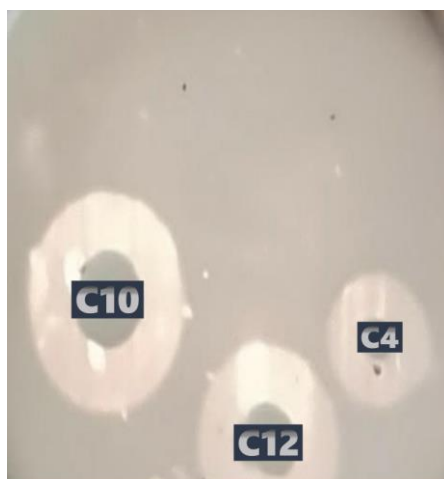


Figure 37 : Activité protéolytique des isolats *Enterococcus* sp. C4, *Carnbacterium* sp.C10 et *Carnbacterium* sp.C12

Tableau 17 : Caractérisation technologique des isolats

Souches	Activité protéolytique	Activité lipolytique	Production des EPS	Activité amylolytique	Production d'acétoïne	Dégrada- tion du citrate
C2	-	++	+	+	+++	+
C3	-	++	+	++	+++	+
C4	++	+	+	+++	+	-
C10	+++	+	-	+	-	+
C12	++	+	-	+	-	-

La souche *Enterococcus sp.* C4 a montré le plus grand diamètre de dégradation (Figure 37), bien que l'activité protéolytique estimée que celui-ci qui a le plus d'activité protéolytique avec la valeur la plus élevée (3,185 mM eq gly/l de lait) par rapport à l'isolat *Enterococcus sp.* C2 (1,809 mM eqgly/l) et *Enterococcus sp.* C3 (1,785 mM eq gly/l) (voir figure 38). Schirru et al. (2012) ont rapporté dans leur étude une faible activité protéolytique pour 2 parmi 4 souches d'*E. faecium* testées, isolées du lait de chèvre (de Sardaigne, Italie). En se basant sur les résultats de Hassain (2007) qui a trouvé que la valeur protéique du surnageant des BL isolées de trois races de lait cru de dromadaire dans le sud de l'Algérie, est évaluée en 72 h à un niveau compris entre 1,85 (*E. faecium* DN5) et 5,95 mM eqgly/l (*E. faecium* DT2), nos résultats se situent dans cet intervalle (Figure 38).

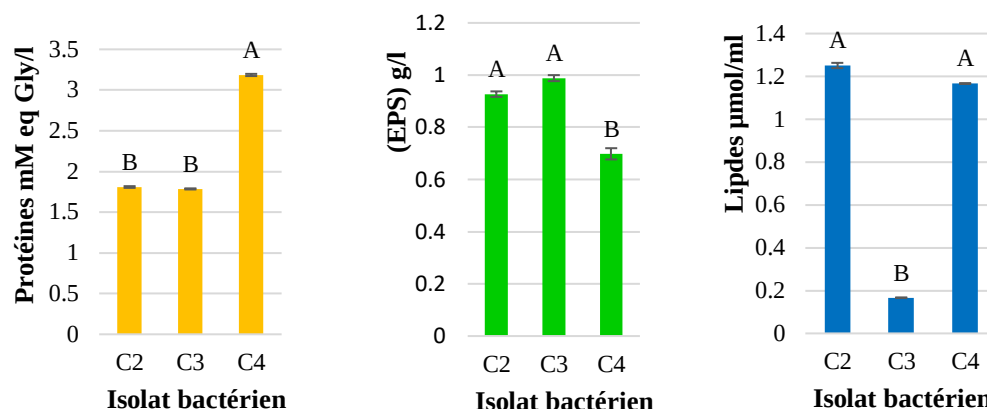


Figure 38 : Quantification des protéines, des lipides et des EPS pour les souches *Enterococcus sp.* C2, *Enterococcus sp.* C3 et *Enterococcus sp.* C4

Les résultats concernant la protéolyse traduisent l'exploitation de la caséine par les BL, qui commence par la dégradation des protéines en oligopeptides, puis en peptides plus courts et en acides aminés par l'intermédiaire d'une protéinase de l'enveloppe cellulaire après une action combinée de diverses peptidases intracellulaires (Savijoki et al., 2006). La protéolyse a également une importance industrielle en raison de sa contribution aux caractéristiques organoleptiques des produits laitiers fermentés (Sridhar et al., 2005). À l'exception des souches d'*E. faecalis*, ces activités sont généralement faibles pour les souches d'*Enterococcus* (Suzzi et al., 2000 ; Andrighetto et al., 2001). Des études considérables sur les activités protéinases et comparativement moins d'études sur les activités peptidases chez *Enterococcus sp.* recommandent que les activités protéolytiques soient généralement faibles. Ces informations concordent avec nos résultats concernant les activités protéolytiques des isolats lactiques, qui ont montré de faibles activités protéasiques en produisant de petites quantités de protéines. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec ceux obtenus par Thapa et al. (2006). L'activité protéolytique et la production d'acide des entérocoques pendant leur croissance dans le lait sont parfois comparées à celles de *Streptococcus thermophilus* (Gatti et al., 1995). En raison de leur faible capacité d'acidification et de leurs propriétés protéolytiques limitées, les entérocoques ne sont plus considérés comme des composants importants des cultures de départ primaires pour les produits laitiers. Ces propriétés technologiques peuvent être exploitées dans le cas de produits de pêche non fermentés, contenant une faible concentration d'hydrates de carbone, ce qui ne permet pas de diminuer l'acidification des aliments (Leroi, 2014).

Enterococcus sp. C4 a constitué l'isolat modérément acidifiant après 72h tout en exprimant une protéolyse modérée. Au terme de ces résultats, il apparaît que pour cette souche, il existe une relation entre les deux activités.

5.3. Activité lipolytique

Les trois souches lactiques ont montré des activités lipolytiques révélées sur gélose avec de l'huile d'olive, Tween 20 ou du Tween 80. L'apparition de la plus grande zone claire de dégradation est obtenue par la souche *Enterococcus sp.* C2, évaluée par les quantités d'acide gras libre (AGL) et la valeur modérée produite est mesurée par la concentration de -NH₂ libre du surnageant de l'isolat (1,25 µmol/ml) contre 1,166 µmol/ml pour *Enterococcus sp.* C4 (Figure 39). L'isolat *Enterococcus sp.* C3 étant marqué la concentration la plus faible estimée à 0,166 µmol/ml.

Les résultats concernant la mise en évidence de l'activité lipolytique sur un milieu agar supplémenté avec différentes sources de matières grasses ont montré que les isolats pouvaient hydrolyser le substrat de matière grasse naturelle (huile d'olive) par rapport au substrat artificiel (Tween 80) (voir figure 39). Alors qu'ils sont incapables d'hydrolyser le Tween 20 (absence de zone claire). Ces résultats concordent avec les travaux réalisés par Karam et al. (2012). Plusieurs facteurs, tels que l'origine des espèces, peuvent influencer l'activité lipolytique des entérocoques (Taban, 2014). Plusieurs BL, y compris *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, et *E. durans* ont été rapportées comme présentant une activité lipolytique (Di Cagno et al., 2006 ; Abeijón et al., 2009).

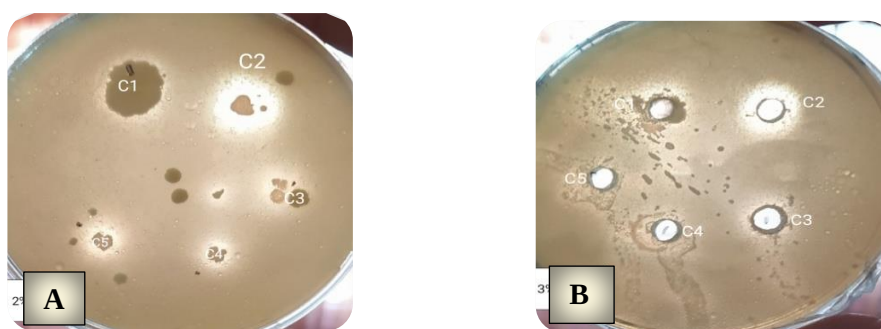


Figure 39 : A) Activité lipolytique des isolats 2%HO) (spots)
B) Activité lipolytique des isolats (3%HO) (puits)

Les quantités enregistrées d'AGL ont été confirmées par les résultats obtenus par Carrasco de Mendoza (1992) concernant les souches d'entérocoques examinées qui

présentaient une faible activité lipolytique et par la littérature qui considérait les souches lactiques comme peu ou pas lipolytiques par rapport à d'autres groupes de micro-organismes (Perez-Guerra et al., 2003 ; Collins et al., 2003). Il peut être intéressant d'obtenir des caractéristiques souhaitables sans développer les défauts créés dans le cas d'aliments à maturation prolongée. La lipolyse est importante dans le développement de la saveur des produits laitiers, en particulier dans la maturation du fromage. La lipolyse dans le fromage intervient généralement par l'intermédiaire des systèmes estérase/lipase des bactéries lactiques. Les entérocoques interviennent dans la saveur et l'arôme ordinaires des fromages par protéolyse et lipolyse (Taban et al., 2014).

La faible activité protéolytique et lipolytique des entérocoques peut être un avantage, puisqu'une légère lipolyse ou protéolyse d'un aliment est suffisante pour induire la production d'arômes désirables (Collins et al., 2003). Nos résultats concernant la protéolyse et la lipolyse sont des caractéristiques possibles d'une saveur favorable dans les produits (Thapa et al, 2004). Cependant, les lipases sont particulièrement intéressantes pour l'isolation de l'huile et des graisses des sous-produits de la mer, ainsi que pour la préparation d'acides gras ω -3-poly-insaturés (ω -PUFA) et d'huiles marines enrichies, étant donné la qualité nutritionnelle de ces constituants (Fernandes, 2016).

5.4. Production des EPS

La production d'exo-polysaccharides est apparue sur gélose hyper-saccharosée MSE (Tableau 17) pour les trois souches testées estimée par de petites quantités (*Enterococcus* sp. C2 ; 0,93 g/l, *Enterococcus* sp. C3 ; 0,98 g/l et *Enterococcus* sp. C4 ; 0,7 g/l) sur milieu ESM (EPS selection medium) après 48h (Figure 38).

Selon Zarour (2018) dans son étude de la production des EPS par les souches de *Leuconostoc.mesenteroides* isolées du lait cru de dromadaire et qui a observé des niveaux de production variables avec des formes différentes sur MRS-Saccharose, on a pu classer nos isolats lactiques comme moyennement à faiblement productrices d'EPS. Puisqu'ils présentaient des colonies gluantes de forme moyenne et d'aspect rigide (voir figure 40) avec des niveaux de production entre 0,5 et 2 g/L. En outre, les BL productrices d'EPS sont des micro-organismes industriellement importants pour le développement de produits alimentaires fonctionnels et sont utilisées comme cultures de dé-

part ou auxiliaires pour développer des aliments fermentés tels que le yaourt, le fromage et les produits à base de céréales (Ruas-Madiedo et al., 2002 ; Zannini et al., 2016) en raison de leur viscosité.

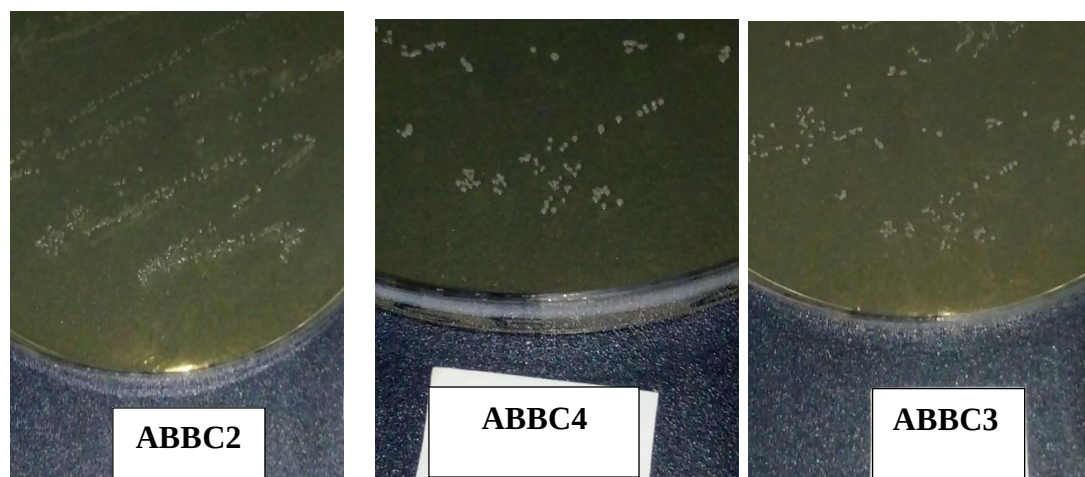


Figure 40 : Exemples de production des EPS par les isolats sur milieu MSE

Les EPS peuvent servir de texturants et de stabilisateurs pour éviter l'utilisation d'additifs alimentaires grâce à leur capacités à retenir l'eau, à interagir avec les protéines et à augmenter la viscosité du sérum du lait. L'objectif est d'obtenir un aspect visuel désirable du produit, d'empêcher l'interaction et d'avoir une texture crémeuse (Duboc et Mollet, 2001).

Plusieurs genres d'*Enterococcus* ont été étudiés pour la production d'EPS. Les potentiels bioactifs des EPS d'*Enterococcus* comprennent des potentiels antibactériens, anticancéreux, anti-biofilm, immunologiques, antioxydants, prébiotiques et antidiabétiques (Kavitake et al., 2023).

5.5. Pouvoir aromatisant

5.5.1. Recherche de la citratase

Une autre activité des entérocoques ayant un impact sur la saveur des aliments, est leur métabolisme du citrate, qui libère plusieurs composés volatils. L'aptitude à utiliser le citrate par les BL est une caractéristique technologique recherchée. Son métabolisme est dû à un excès de pyruvate dans la cellule et peut être converti *via* l' α -

acétolactate en diacétyl, acétoïne ou 2-3 butanediol, qui sont des composés aromatiques d'importance dans certains produits alimentaires (Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Dapkevicius et al., 2021).

Selon les résultats obtenus, les isolats *Enterococcus* sp. C2, *Enterococcus* sp. C3 et l'isolat de *Carnobacterium* C10 présentent un profil positif pour l'utilisation du citrate (Figure 41). Ce n'est pas le cas pour *Enterococcus* sp. C4 et *Carnobacterium* C12, qui présentent un profil négatif.

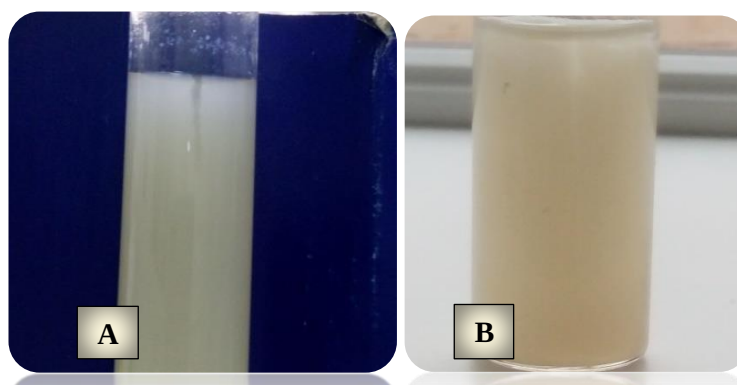


Figure 41 : Dégradation du citrate par les isolats **A)** *Enterococcus* sp. C2 (fissure), **B)** *Carnobacterium* sp. C10

Nos résultats concordent avec les données de Zarour (2018), sauf pour *Enterococcus* sp. C4 qui est citrate (-). Cela peut être expliqué par l'absence de gènes qui codent pour des enzymes impliquées dans le métabolisme ou la perte du plasmide contenant le gène codant pour la citrate perméase P. Cette dernière est incluse dans le transport du citrate vers le cytoplasme, permettant ainsi aux bactéries de le métaboliser (Kempner et McKay, 1980).

Le citrate est généralement utilisé comme accepteur d'électrons au cours du co-métabolisme avec d'autres sucres. Cependant, le citrate n'est pas utilisé directement comme accepteur d'électrons et il sert de précurseur à un accepteur d'électrons. L'oxaloacétate, le produit de clivage du citrate, est décarboxylé en pyruvate, et le pyruvate est utilisé comme accepteur d'électrons. Cette voie permet la formation de composés aromatiques tels que le diacétyl, l'acétoïne et l'acide acétique. Seulement quelques BL sont capables de se développer sur la gélose au citrate comme seul substrat (Endo et Dicks, 2014).

La production de diacétyl et, dans une moindre mesure, d'acétoïne a été décrite dans des entérocoques provenant de fromages. En outre, l'annotation des génomes d'entérocoques a révélé des gènes qui codent pour des enzymes impliquées dans la production d'acétaldéhyde, de diacétyl et d'acétoïne (Dapkevicius et al., 2021).

5.6. La production d'acétoïne

La production d'acétoïne, révélée par la présence d'un anneau rouge dans le milieu lait, a donné un résultat positif pour les trois isolats d'Enterocoques (*Enterococcus* sp.C2, *Enterococcus* sp. C3 et *Enterococcus* sp.C4) (voir figure 40). Ce n'est pas le cas pour le genre *Carnobacterium* (C10 et C12) qui sont acétoïne (–) (figure 42).

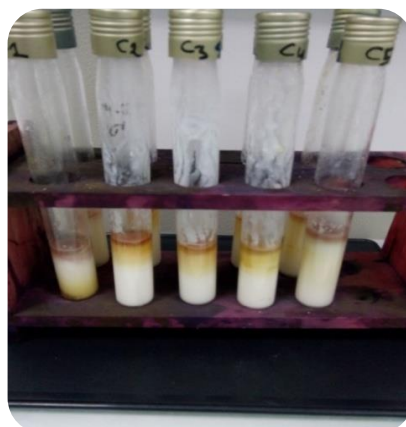


Figure 42 : Production d'acétoïne par les isolats *Enterococcus* sp.C2, *Enterococcus* sp.C3 et *Enterococcus* sp.C4

L'acétoïne, provenant du catabolisme du pyruvate est responsable du développement des saveurs donc, il contribue dans l'arôme. Bien que les l'isolat *Enterococcus* sp. C4 était capables de produire de l'acétoïne, il était inapte de métaboliser le citrate (Tableau 17). Du fait qu'il a catabolisé une partie du pyruvate produit à partir d'autres sources de sucre existant dans le milieu de culture en acétoïne. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux précédemment rapportés, puisque tous les isolats d'entérocoques ont produit de l'acétoïne dans leur milieu de culture. Cette substance peut contribuer au développement des diverses propriétés organoleptiques des produits laitiers fermentés.

5. 7. Activité amylytique

Tous les isolats testés ont montré un profil positif pour l'aptitude amylytique sur la gélose à l'amidon. Les cinq isolats étaient tous capables de dégrader l'amidon.

(Tableau 17). Les activités amylolytiques les plus élevées ont été trouvées chez *Enterococcus sp.* C4 (absence de coloration violette après l'inondation de la boîte par Lugol), suivit par *Enterococcus sp.* C3 (le plus grand diamètre de la zone de dégradation de l'amidon). Les isolats *Carnobacterium sp.* C10, *Carnobacterium sp.* C12 sont proche (les diamètres des zones de dégradation sont analogues) et *Enterococcus sp.* C2 avec le plus petit diamètre (voir Figure 43).

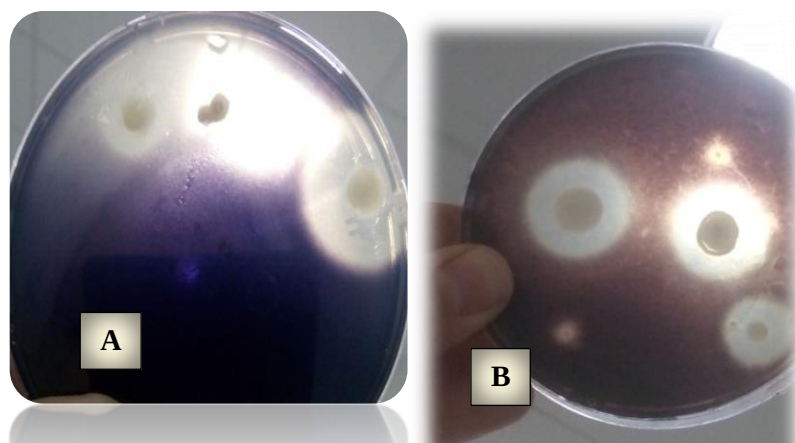


Figure 43 : Exemples de la dégradation de l'amidon par les isolats **A)** *Enterococcus sp.* C3, **B)** *Enterococcus sp.* C10 et *Carnobacterium sp.* C12

5.8. Caractérisation de la substance inhibitrice

5.8.1. Détermination de la nature de la substance inhibitrice

Parmi les substances antibactériennes produites par les souches lactiques isolées dans cette étude, des substances de nature protéique. Après avoir été traités avec la protéinase K l'activité des agents inhibiteurs des souches *Enterococcus sp.* C2, *Enterococcus sp.* C3 et *Enterococcus sp.* C4 a été totalement désactivée (Tableau 18). L'inactivation de l'agent inhibiteur par les enzymes protéolytiques a été démontrée par plusieurs chercheurs qui ont suggéré qu'il s'agit de bactériocines qui ont été dégradées par ces enzymes. Des résultats similaires ont été observés par certains auteurs, en effet l'activité de la bactériocine CAMT6 produite par *Enterococcus durans* YQ6 est affectée par les traitements à la protéinase K (Li et al., 2023). Nos résultats indiquent que la substance inhibitrice produite par les souches *Enterococcus sp.* C2, *Enterococcus sp.* C3 et *Enterococcus sp.* C4 est bien de nature protéique, il s'agit donc de bactério-

cine. Etant donné que les bactériocines produites par le genre *Enterococcus* sont nommées des entérocinés, c'est pour ça nous les avons nommés Entérocin C2, entérocin C3 et entérocin C4.

5.8.2. Caractérisation physicochimique de Bactériocines Like (BLIS)

Ces bactériocines sont bien thermostable, gardant leur effet sur une large gamme de température. Nos résultats sont pertinents et montrent que ces souches pourraient être utilisées dans le contrôle des pathogènes alimentaires, bien que les BL pourraient produire des métabolites qui ont une activité lytique importante, tel que les bactériocines. Comme elles sont stables à des pH et températures choisies sur la base de leurs niveaux habituels dans les aliments et les opérations de traitement.

Le traitement avec la catalase et les enzymes lipolytiques n'a aucun effet sur l'activité antibactérienne (Tableau 18), suggérant que l'inhibition n'était pas attribuée au peroxyde d'hydrogène et que les bactériocines n'étaient ni lipolytiques ni lipoprotéiques (surnageant neutralisé à pH 6,5).

La stabilité des bactériocines à la chaleur a été vérifiée et notre étude a révélé qu'à des températures d'autoclavage de 121°C pendant 20 minutes, la bactériocine C2 est restée stable à la chaleur, tandis que la bactériocine C3 était stable jusqu'à 100°C pendant 10 minutes et elle perd son activité à 100°C pendant 30mn et à 120°C (Tableau 18). Contrairement à la bactériocine C4 qui a montré une sensibilité dans toute la plage de la température. Cela indiquait qu'une protéine de faible poids moléculaire était responsable de l'inhibition observée (Syukur, Fachrial et Jamsari, 2014 ; Gomez, 2015).

L'activité des bactériocines dépend au pH et son influence a montré une activité stable à 100 % qui a été atteinte dans la plage de 3,5 à 6,5 pour C2 contre une activité stable à 100 % maintenue pour C3 à pH 6,5 (Tableau 18). Par conséquent, l'activité des composés antibactériens élaborés par *Enterococcus sp.* C2 était stable dans une large gamme de pH conformément à Migaw et al. (2013). Alors que celle d'*Enterococcus sp.* C3 était stable uniquement à pH 6.5, en dehors de cette valeur, l'activité

antagoniste était inactivée. En fait, plusieurs auteurs ont rapporté des résultats similaires pour d'autres souches bactériocinogènes (Rivas et al., 2012, Migaw et al., 2013) Elayaraja et al., 2014, Ghomrassi et al., 2016; Khalkhali & Mojgani, 2017).

La plage de 70°C à 80°C est la température la plus souvent utilisée pour la stérilisation des aliments. Par conséquent, de nombreux produits alimentaires soumis à un traitement thermique, y compris la pasteurisation, le chauffage et la stérilisation, peuvent contenir ces entérocoque bactériocinogéniques comme biopréservatives (Campos et al., 2006; Du et al., 2022).

Ces résultats sont compatibles avec ceux de Ghomrassi et al. (2016), qui ont annoncé que l'élaboration de l'entérocoque A par *E. faecium* HTE5 n'était pas influencée par un chauffage à 100°C pendant 10 et 30 minutes, mais diminuait après une exposition à 121°C pendant 20 minutes. Ghrairi et al. (2008) ont constaté qu'après 15 minutes de chauffage à 100 °C, l'entérocoque MMT21 ne montrait aucune activité inhibitrice contre *L. monocytogenes*. La thermostabilité des entérocoques est en accord avec les résultats de plusieurs souches bactériocinogènes d'*E. faecium* (Compos et al., 2006 ; Ben Belkacem et al., 2008 ; Goh et Philip, 2015; Unal Turhan et al., 2018).

Ainsi, il a été constaté que les souches productrices de bactériocines avaient une large plage de pH d'activité contre *Bacillus cereus*. L'entérocoque C2 a montré une forte résistance face aux changements de pH. Comme l'ont rapporté Ennnahar et al. (1998), Compos et al. (2006), et Rivas et al. (2012), les entérocoques ont généralement conservé leur activité dans une plage de valeurs de pH comprise entre 4 et 8. De plus, Goh et Philip (2015) ont annoncé que l'entérocoque Bac C1 générée par *Enterococcus faecium* C1 a résisté et maintenu sa stabilité à des valeurs de pH faibles allant de 2 à 6. De même, dans notre étude, l'entérocoque C2 a continué son activité à un pH situé entre 3,5 et 6,5.

La température et le pH affectent l'activité antibactérienne des entérocoques (Moreno et al., 2003; Unal Turhan et al., 2018). Cela concorde avec le résultat de l'entérocoque C4 qui a perdu son activité dans toute la plage de la température et du pH (Tableau 18).

En fait, l'activité antibactérienne reste stable pour les autres isolats, sur une large plage de pH et de température, probablement en raison des acides aminés uniques que

contiennent les bactériocines, qui soutiennent la capacité à permettre des mutations (Sharma et al., 2018; Du et al., 2022).

Tableau 18 : Influence de la température, pH et Na Cl et les enzymes sur l'activité de bactériocine

Traitement	C2	C3	C4
Enzymes			-
Control+	+	+	-
Control-	-	+	+
Protéinase K	-	-	+
Lipase	+	-	+
Catalase	+	+	+
Température			
70°C/30mn	+	+	-
100°C/10mn	+	+	-
100°C/30mn	+	-	-
121°C/20mn	+		-
pH			
3,5	+	-	-
4,5	+	-	-
5,5	-	-	-
6,5	+	+	-
Na Cl			
3%	-	-	-
6%	-	-	-

- **La détermination de la concentration de bactériocine like dans le CFS**

- L'estimation de la concentration des protéines par la Méthode de Bradford

En utilisant la méthode de Bradford, les concentrations de protéines extracellulaires des entérocin C2, C3 et C4 ont été évaluées. La courbe standard de concentration en protéines de SAB est illustrée dans la Figure 25, et l'équation de régression linéaire était $y = 3,1486x + 0,0015$, $R^2 = 0,9978$, où x est la teneur en protéines de la bactériocine et y est la valeur d'absorbance brute de la bactériocine avec $\lambda = 595$ nm. La teneur en protéines des entérocin suivantes, C2 C3 et C4, telle que déterminée par cette courbe standard, était respectivement 34. 93, 58.75 et 30.17µg/ml. La courbe présente une forte relation linéaire.

De nombreuses études ont rapporté la capacité d'*E. faecium* à élaborer di verses bactériocines tels que l'entérocin SH01 (Kim, 2015), l'entérocin A et B (Aspri, 2017) et l'entérocin P (Bayoub, 2011).

- **Détermination de la CMI par microdilution en milieu liquide**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie par la plus faible concentration à laquelle aucune croissance de la souche testée n'est visible sur milieu liquide, après 24h d'incubation. Le test à la résazurine ou (test Alamar Blue) offre une mesure simple, rapide et sensible de la viabilité des cellules bactériennes. Un changement de couleur du bleu au rose indique une réduction de la résazurine et donc de la croissance bactérienne. La CMI a été définie comme la concentration la plus faible empêchant ce changement de couleur.

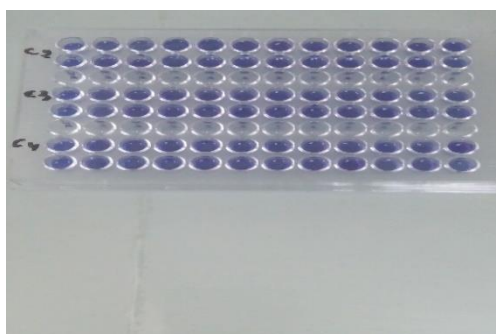


Figure 44 : CMI à T0

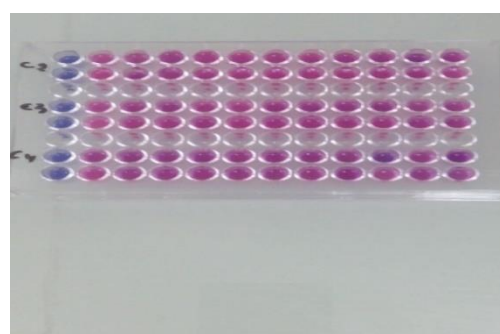


Figure 45 : CMI à T=24h

Deux bactéries indicatrices (50 μ L) à une concentration de 10^5 UFC/mL ont été ajoutées aux puits de la microplaquette. Différentes quantités de surnageants C2, C3 et C4 contenant les bactériocines partiellement purifiées (34.93, 58.75 μ g/ml et 30.17 respectivement) ont été ajoutées à 50 μ L de bouillon de Muller-Hinton utilisés pour créer les différentes dilutions. Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Après 0 heure, 2 heures et 24 heures, trois mesures de CMI ont été obtenues (l'absorbance A à $\gamma=620$ nm).

Enterococcus produit des bactériocines lors du métabolisme, qui sont des métabolites primaires de polypeptides ou de polypeptides précurseurs ayant une action bactériostatique et élaborés par les bactéries à l'aide de ribosomes (Kumariya et al., 2019; Wu et al., 2022).

Selon des recherches antérieures, les entérocoques ont une forte activité antibactérienne contre des agents pathogènes d'origine alimentaire significatifs, qu'ils soient à Gram-positif ou à Gram-négatif, tels que *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (Wu et al., 2022).

Les entérocinés C2, C3 et C4 avaient des CMI de 4.36- 9.18 et 18.85 µg/ml contre *Bacillus cereus* et de 1.91- 4.59 et 4.92 µg/ml contre *Salmonella abony*, respectivement. Les valeurs précédentes sont inférieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI) de plusieurs bactériocines qui ont été rapportées comme étant générées par les BL (Galvez et al., 1998; Liu et al., 2017; Zhang et al., 2020). La CMI varie en fonction des souches cibles et des bactériocines, comme l'ont noté Ennahar et al. (2000).

La croissance de 24 espèces de bactéries à Gram-négatif et de 3 espèces de bactéries à Gram-positif est inhibée par l'enterocine E-760, selon les recherches de Line et ses collaborateurs (2008). La CMI pour ces bactéries indicatrices varie de 0,1 µg/mL à 3,2 µg/mL. La CMI de l'entérociné HDX-2 contre *L. monocytogenes* CMCC 1959 était de $5,07 \pm 0,14$ µg/mL dans une étude similaire (Du et al., 2022). De plus, selon Mu et al. (2024), la concentration minimale inhibitrice (CMI) des bactériocines C2-1 contre *L. monocytogenes* CICC 21633 était de 13,98 µg/mL.

Comparés à d'autres bactériocines de classe IIa, les résultats montrent que les entérocinés C2 et C3 présentent un pouvoir bactériostatique avec de faibles valeurs de CMI contre *Salmonella abony* et *Bacillus cereus*, suggérant que C2 et C3 pourraient être des bactériocines utiles.

- **Détermination du mode d'action des substances inhibitrices**

Généralement les entérocinés de classe II exercent un mode d'action bactériostatique

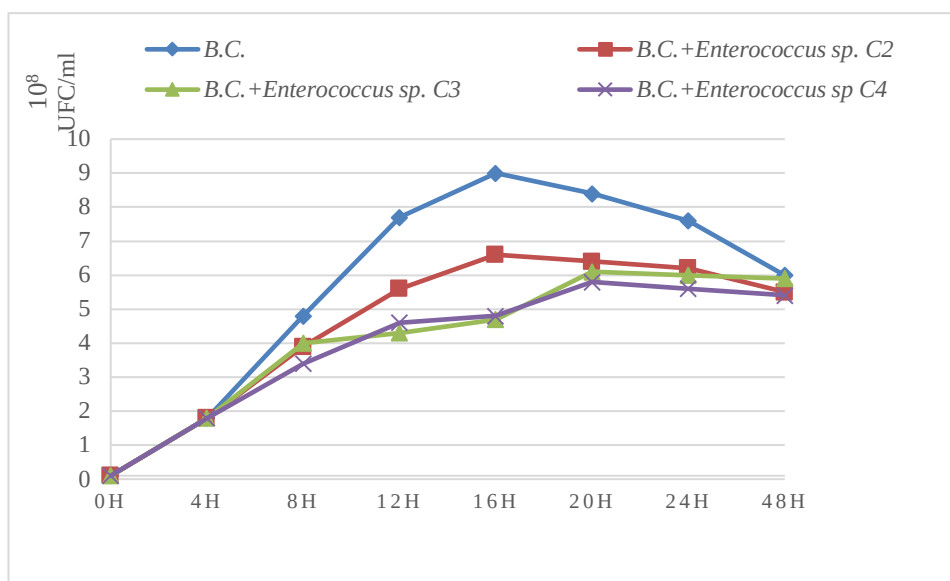


Figure 46 : Effet du surnageant des trois isolats *Enterococcus sp.* C2, *Enterococcus sp.* C3 et *Enterococcus sp.* C4 sur la croissance de *B. cereus*

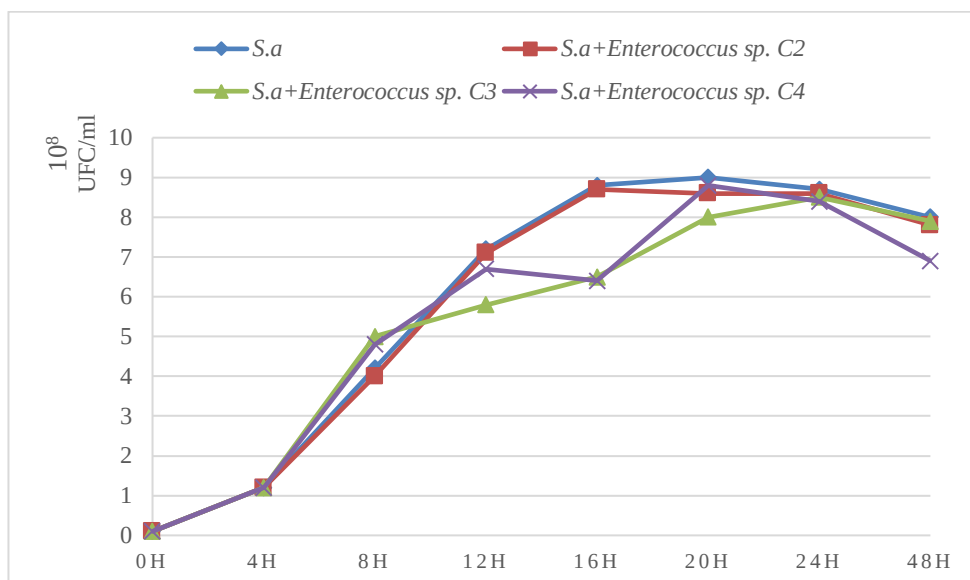


Figure 47 : Effet du surnageant des trois isolats *Enterococcus sp.* C2, *Enterococcus sp.* C3 et *Enterococcus sp.* C4 sur la croissance de *S. abony*

Les souches indicatrices (*B.cereus* ou *S.abony*) ont étéensemencées dans des milieux de culture MRS, après quatre heures d'incubation, on y a additionné les surnageants de chaque isolat lactique *Enterococcus sp.* C2, *Enterococcus sp.* C3 et *Enterococcus sp.* C4. La D.O de chaque culture est mesurée à 600nm chaque heure.

D'après les résultats obtenus on a pu faire les remarques suivantes :

❖ Pour la souche indicatrice *B. cereus* :

-Pendant le premier temps d'incubation (0h-8h), l'entéroccine contenant dans le surnageant C3 a maintenu la croissance de la souche indicatrice stable.

-Après 8h d'incubation jusqu'à 16h, la D.O a diminuée ensuite maintenue stable, la charge bactérienne reste environ 4×10^8 UFC/ml. Au-delà de 16h la charge a évoluée jusqu'à 24h. Après 24h à 48h, une diminution légère de la croissance.

On peut conclure que l'entéroccine C3 exerce un mode d'action bactériostatique qui n'a duré que 8h (8h-16h) et la charge est maintenue stable environ 4×10^8 UFC/ml (voir figure 46).

- L'entéroccine C2 exerce un mode d'action bactériostatique qui n'a duré que 8h (16h-24h) et la charge ($6,6 - 6,8 \times 10^8$ UFC/ml) (voir Figure 46).

- L'entéroccine C4 exerce un mode d'action bactériostatique qui n'a duré que 12h (12-24h) avec une stabilité de la charge ($4 - 5 \times 10^8$ UFC/ml) (voir Figure 46).

❖ Pour la souche indicatrice *S. abony*

-Pendant le premier temps d'incubation (0h-8h), l'entéroccine C3 a maintenu la croissance de la souche indicatrice stable.

De 8h-16h, la charge est maintenue stable ($5 - 6 \times 10^8$ UFC/ml). Ensuite la D.O a augmenté (16h-24h). Au-delà de 24h, la charge a légèrement diminuée. On peut conclure que l'entéroccine C3 exerce un mode d'action bactériostatique qui n'a duré que 8h (8h-16h) et la charge est maintenue stable ($5 - 6 \times 10^8$ UFC/ml) (Voir figure 47).

- Pendant le premier temps d'incubation (0h-12h) la croissance est maintenue stable. Dès 12h l'entéroccine C2 exerce un mode d'action bactériostatique qui a duré 24h (12h-48h) avec le maintien de la charge ($7 - 8 \times 10^8$ UFC/ml) (Figure 47).

-L'entéroccine C4 exerce un mode d'action instable (la charge augmente puis diminue puis augmente et enfin diminue après 16h pour atteindre $6,9 \times 10^8$ UFC/ml (Figure 47).

Donc on peut retenir que l'entéroccine C3 exerçait un mode d'action bactériostatique qui ne durait que 8 heures (8h-16h), que ce soit contre *Bacillus cereus* (Gram-positif) ou *Salmonella abony* (Gram-négatif). La différence résidait dans la charge, qui était maintenue à $4 - (5 - 6 \times 10^8)$ UFC/ml respectivement. Alors que l'entéroccine C2 montrait un mode d'action bactériostatique, maintenant la charge ($6 - 5 \times 10^8$ UFC/ml) envers *B.cereus* (voir figures 45) durant 8 heures et de 8×10^8 UFC/ml durant 36 heures contre *S. abony* (figure 46 et 47).

Les bactériocines sont des métabolites primaires de polypeptides, de protéines ou de complexes protéiques synthétisés par les bactéries à l'aide de ribosomes et dotés

d'une activité antibactérienne. Les bactériocines peuvent inhiber la croissance et la reproduction d'une variété de bactéries.

La bactériocine interagit avec la surface cellulaire pour augmenter la perméabilité de la cellule ; elle inhibe la production de la paroi cellulaire ; elle inhibe la synthèse de l'acide nucléique ; elle inhibe la synthèse des protéines ; elle inhibe la croissance des bactéries (Kumariya et al., 2019).

Le mode d'action des bactériocines de classe IIa a été clairement démontré dans le cas des entérocinés (Javed et al., 2011 ; Goh et Philip, 2015; Wu et al., 2022).

Les études de Losteinkit et al. (2001) et Ennahar et al. (1998), qui concordent avec nos résultats, démontrent que l'ajout de surnageant de BL provoque une augmentation de la densité optique suivie d'une diminution. De même, Losteinkit et al. (2001) ont constaté que la densité optique de la culture indicatrice cessait d'augmenter après 5 heures d'incubation et restait stable après l'ajout d'entérociné N15, qui montrait une activité contre la croissance de *Lb. sakei* JCM1157. Moreno et al. (2002) ont rapporté que l'entérociné B1 et l'entérociné B2 ont montré un mode d'action bactériostatique contre *L. innocua* LMG 13568, de même les entérocinés C2 et C3 ont démontré un mode d'action bactériostatique contre *Bacillus cereus* et *Salmonella abony*, dans l'étude en question.

Les données suggèrent qu'un mode d'action du bactériocine proposé pourrait impliquer la dépolarisation de la membrane. Ces résultats ont prouvé le rôle des bactériocines C2 et C3 dans la dissipation du potentiel électrique transmembranaire et la dépolarisation de la membrane. Probablement, C2 et C3 pourraient induire la perméabilisation des cellules de la membrane cible, en formant des pores iono-sélectifs, ce qui entraîne la disparition de la force protonique et la réduction de l'ATP intracellulaire. A cet égard, de nombreuses études ont rapporté que la plupart des bactériocines de classe II pouvaient induire la perméabilisation des cellules cibles en formant des pores iono-sélectifs (Akbar et al., 2016 ; Chakchouk-Mtibaa et al., 2018; Wu et al., 2022).

6. Les critères de performance

Les critères de performance sont parmi les outils essentiels pour la sélection de souche d'intérêt technologique.

6.1. La résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un critère important dans la caractérisation de la sécurité d'*Enterococcus sp.* en vue d'une intégration dans l'industrie alimentaire. La résistance aux antibiotiques des deux souches testées a été réalisée contre huit antibiotiques (ATB) en utilisant la méthode des disques par diffusion. Les isolats lactiques *Enterococcus sp.* C2 a montré une résistance à tous les ATB, y compris la vancomycine, l'acide nalidixique et la gentamicine, à l'exception de la spiramycine tandis que *Enterococcus sp.* C3 a présenté une résistance à cinq ATB, la gentamicine, l'amoxicilline, la tétracycline la pénicilline et l'acide nalidixique. Elle est intermédiaire pour la vancomycine. *Enterococcus sp.* C4 a montré une résistance seulement à l'amoxicilline, à la tétracycline et à la pénicilline. Les trois souches testées étaient contradictoires, *Enterococcus sp.* C4 étant sensible à la gentamycine, à la vancomycine, à l'acide nalidixique et à la Spiramycine (Tableau 19, figure 47)

Tableau 19 : Résultats du test de sensibilité aux antibiotiques

ATB	<i>Enterococcus sp.</i> C2	<i>Enterococcus sp.</i> C3	<i>Enterococcus sp.</i> C4
Gentamicine	R	S	S
Amoxicilline	R	R	R
Tetracycline	R	R	R
Erythromycine	R	R	I
Vancomycine	R	I	S
Penicilline	R	R	R
Spiramycine	S	S	S
Acide Nalidixique	R	R	S

R résistante, S sensitive, I intermédiaire

La résistance aux antibiotiques est un point important dans la caractérisation de la sécurité des entérocoques en vue de leur utilisation dans l'industrie alimentaire. Elle comprend la résistance naturelle (intrinsèque) et acquise (transférable). Les entérocoques sont naturellement résistants à de nombreuses b-lactamines et aminoglycosides. La résistance acquise aux antibiotiques, favorisée par des plasmides, comprend des résistance au chloramphénicol, aux tétracyclines, aux macrolides, aux quinolones et aux aminoglycosides, ce qui constitue un problème grave (Franz et al., 2003 ; Giraffa, 2022). L'isolat testé *Enterococcus sp.* C2 a révélé une résistance à tous les antibiotiques testés (ATB), à l'exception de la spiramycine (figure 48).

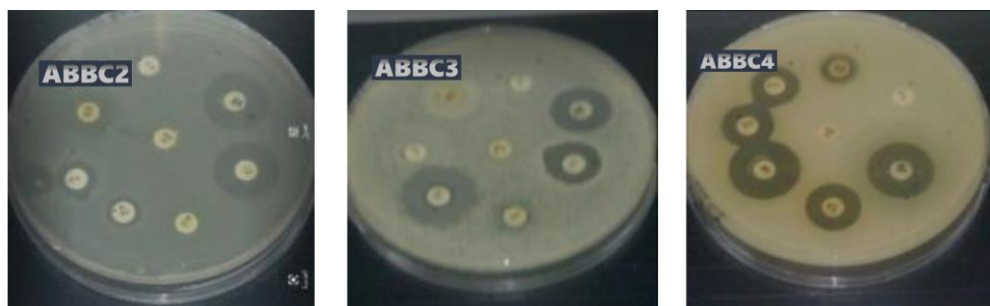


Figure 48 : Antibiogramme des bactéries lactiques

Notre étude est en accord avec les résultats trouvés par Elmoslih (2017) qui a étudié des souches d'*E. faecium* isolées à partir des produits laitiers du Maroc et Gomez-Sala (2015) sur des souches d'Enterococci isolées de poissons, de fruits de mer et de produits de la mer. La résistance aux antibiotiques dans le genre *Enterococcus* est controversée. *Enterococcus sp.* C4 a montré une résistance seulement à trois ATB (amoxicilline, tétracycline et gentamycine), contrairement aux études de Migaw et al. (2014) qui ont démontré une résistance à plusieurs antibiotiques pour les souches d'*E. faecium* GM12, y compris les bêta-lactamines, amino-glycosides et (vancomycine). La résistance à la vancomycine pose des problèmes inquiétants aux cliniciens. Tandis que *Enterococcus sp.* C3 a montré une résistance envers cinq ATB et comme elle est intermédiaire pour la vancomycine, elle ne pose pas de graves problèmes.

Le principal mécanisme de résistance aux glycopeptides (vancomycine) chez les entérocoques implique l'altération de la voie de synthèse du peptidoglycane, plus précisément le remplacement de D-Alanine-D-Alanine (D-Ala-D-Ala), en D-Alanine-D-Lactate (D-Ala-D-Lac) ou en D-Alanine-D-Sérine (D-Ala-D-Sér).

Jusqu'à présent, les opérons liés à la résistance à la vancomycine pour les entérocoques sont définis comme -A, -B, -C, -D, -E, -G, -L, -M et -N (Arthur et Quintiliani, 2001 ; Courvalin, 2006). Cependant, les isolats du TGI de poissons ont montré plus de multi-résistance que les isolats d'origine alimentaire (Belicova et al., 2007). Peu sont résistants aux antibiotiques, cliniquement importants tels que l'ampicilline, pénicilline, gentamycine et vancomycine (Franz et al., 2003). Ces caractéristiques présentent un intérêt particulier, notamment pour la thérapie clinique.

6.2. Activité hémolytique

L'hémolysine est une toxine capable de provoquer une hémolyse, codée dans un plasmide ou dans l'ADN chromosomique et constitue un facteur de virulence important qui affecte l'intensité de la maladie (Perez-Pulido, 2006). Le faible pourcentage de souches d'*E. faecium* qui produisent une β -hémolyse a été mentionné par Giraffa et al. (1995). De même, Eaton et Gasson (2001), Trivedi et al. (2011) ont décrit des isolats d'*Enterococcus* β -hémolytique provenant de denrées alimentaires et rappelé que l'activité β -hémolytique était plus élevée chez *E. faecalis* par rapport à *E. faecium*. L'activité hémolytique a été détectée chez *E. mundtii* et *E. durans* d'origine laitière et deux souches d'*E. casseliflavus* d'origine laitière et carnée. Contrairement à notre étude qui rapporte que tous les isolats d'Entérocoques (*Enterococcus* sp. C2, *Enterococcus* sp. C3 et *Enterococcus* sp. C4) présentaient un profil négatif à l'hémolysine, cela est en accord avec les résultats trouvés par Gomez-Sala (2015). Aucun des isolats testés n'a produit d'hémolysine, de sorte que l'absence d'activité hémolytique indique que ces souches ne sont pas virulentes et devrait être un critère de sélection pour leur utilisation comme cultures starter.

6.3. Production des amines biogènes

L'activité décarboxylase des bactéries lactiques devraient être le principal inducteur de la production d'amines biogènes dans les aliments. La production d'AB par les entérocoques est favorisée lors de la fermentation, en raison de l'acidification et de la protéolyse.

Les entérocoques peuvent provoquer une intoxication alimentaire par la production d'amines biogènes. Les niveaux de tyramine supérieurs à 100 et 500 mg/kg, sont considérés comme potentiellement dangereux pour l'homme. De nombreux facteurs environnementaux tels que le pH, température et la concentration en sel peuvent affecter la formation d'amines par les entérocoques (Taban et al., 2014).

Les résultats sont similaires à ceux obtenus par Martin-Platero (2009). Les trois isolats de BL ont été incapables de produire des amines biogènes à partir de l'ornithine et de la lysine, ce qui est un bon critère pour l'industrie technologique, mais la production de tyramine présente un risque et pose un problème. L'application des entéro-

coques comme cultures de départ ou comme adjuvants dans la transformation de certains produits laitiers et carnés est toujours contestée par le consommateur en raison de la formation d'amines biogènes par la décarboxylation microbienne des acides aminés libres (Taban et al., 2014).

6.4. Détermination des facteurs de virulence

En plus d'identifier l'activité antibactérienne, la capacité de produire les EPS, la résistance aux antibiotiques, il s'avère nécessaire d'examiner les caractéristiques pratiques, y compris les déterminants de virulence tels que, l'hydrophobicité, la capacité d'auto-agrégation et de co-agrégation et la capacité d'adhésion des souches aux cellules intestinales humaines (Krawczyk et al., 2021).

6. 4.1. L'hydrolyse de la gélatine

La gélatinase est une enzyme, spécifiquement une Zn-métalloprotéase (EC 3.4.24.4), ayant la capacité d'hydrolyser des substrats tels que la β -insuline, la gélatine, le collagène, la caséine, l'hémoglobine et divers autres peptides biologiquement actifs. La gélatinase produite par un micro-organisme joue un rôle important dans sa survie et sa capacité à provoquer des maladies, agissant comme un facteur de virulence. La gélatinase est l'un des facteurs de virulence largement étudié chez *E. faecalis*. En outre, la gélatinase contribue au processus de formation de biofilm, ce qui peut augmenter la capacité des entérocoques à coloniser les tissus et à persister dans les sites d'infection (Aguilar-Galvez et al., 2012).

L'absence de zone claire autour des colonies traduit les colonies négatives à la gélatinase pour les trois isolats testés. Dans une étude similaire, aucune activité de gélatinase n'a été observée chez *E. faecium* FL31. On a également rapporté le même résultat pour *E. faecium* Y31 (Liu, Zhang, Shi et al., 2015).

Enterococcus faecalis est responsable de 80 à 90 % des infections à base d'*Enterococcus*, *E. faecium* n'est associé qu'à 5 à 10 % des infections *E. durans* est identifiée occasionnellement comme organisme responsable d'infections chez l'homme

6.4.2. Évaluation de l'hydrophobicité des surfaces cellulaires

Un solvant non polaire, à savoir le xylène, a été utilisé pour évaluer l'hydrophobicité des surfaces cellulaires des isolats. La capacité des trois isolats sélectionnés à adhérer au xylène est démontrée dans la figure (49). Les pourcentages d'adhésion variaient en fonction des souches isolées, allant de 57,9 % à 73 %. Le taux d'adhésion d'*Enterococcus sp.* C4 était comparativement plus faible que ceux d'*Enterococcus sp.* C2 et C3. Les résultats ont montré que les isolats C2, C3 et C4 étaient significativement hydrophobes en raison de la présence de composants hydrophobes dans la couche externe de leurs parois cellulaires.

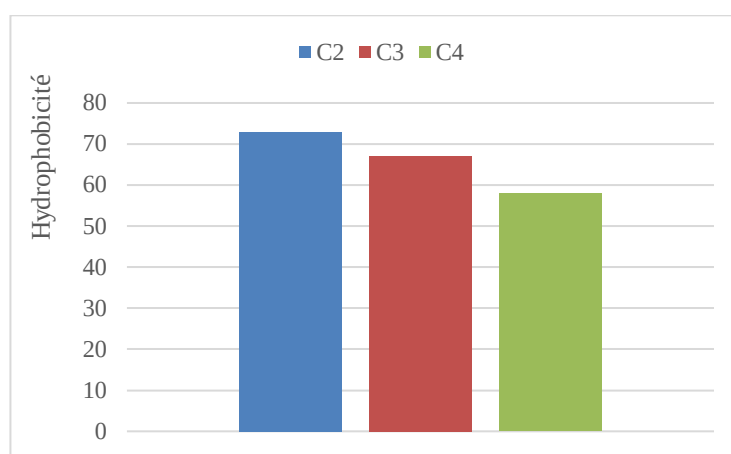


Figure 49 : Adhésion des isolats d'*Enterococcus sp.* C2, C3 et C4 au xylène

Les avantages des probiotiques pour la santé, sont basées sur leur capacité à rester viables et à adhérer à l'intestin de l'hôte. Les capacités adhésives des isolats diffèrent les unes des autres du fait que chaque souche de notre étude possède des substances chimiques distinctes à la surface cellulaire qui contribuent à sa capacité d'adhésion.

6.4.3. Capacité d'auto-agrégation et de co-agrégation

Les résultats d'auto-agrégation et co-agrégation des trois isolats sont illustrés dans les figures (50) et (51, 52) respectivement.

Selon des recherches antérieures, l'auto-agrégation peut être considérée comme dépendante de chaque souche (Huligere et al., 2024, Patil, Shirahatti et Ramu, 2022).

Selon des résultats similaires à la présente étude, Hulgere et al. (2024) ont trouvé que le niveau plus élevé d'hydrophobicité de surface cellulaire est exercé par les isolats RAMULAB48 (80.42 ± 2.41) et RAMULAB44 (76.48 ± 0.90), indiquant de fortes propriétés hydrophobes. Dans une autre étude, *L. mucosae* M6-29 et *L. salivarius* M2-71 ont une plus grande capacité à adhérer aux cellules que les autres isolats en raison de leur capacité d'agrégation significative. Les diverses agrégation qui favorisent les liaisons hydrogène entre et parmi les surfaces cellulaires sont associées à une capacité d'adhésion plus élevée (Li et al., 2020).

Les résultats d'hydrophobicité et d'auto-agrégation concordent avec ceux de Martiz et al. (2023) et Li et al. (2020).

Une forte adhésion est associée à une grande capacité d'auto-agrégation, selon une étude antérieure d'Al Seraih et al. (2018).

Les résultats obtenus sont consistants avec la théorie selon laquelle il existait une relation étroite entre l'adhésion et l'agrégation (Dowdell et al., 2019).

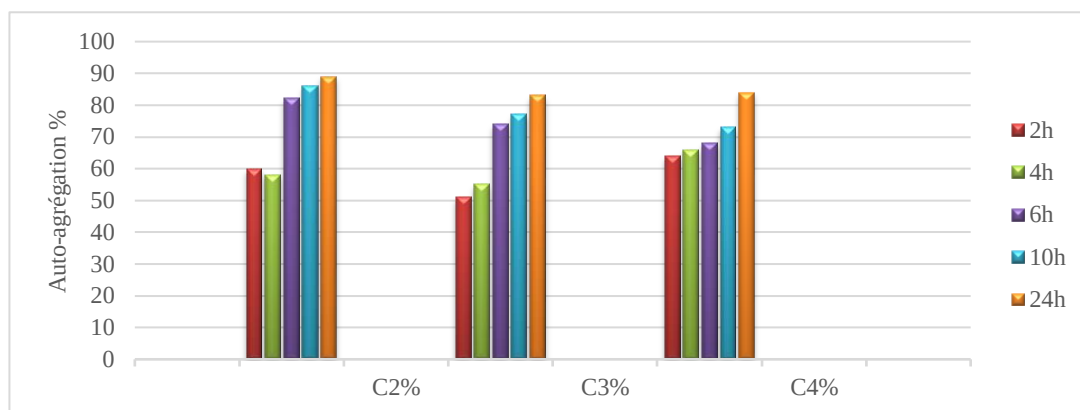


Figure 50 : Le pourcentage d'auto-agrégation des isolats d'*Enterococcus* sp. C2, C3 et C4

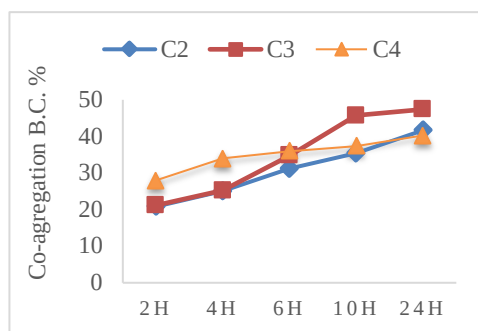


Figure 51 : Le pourcentage de co-agrégation des isolats avec B.C.

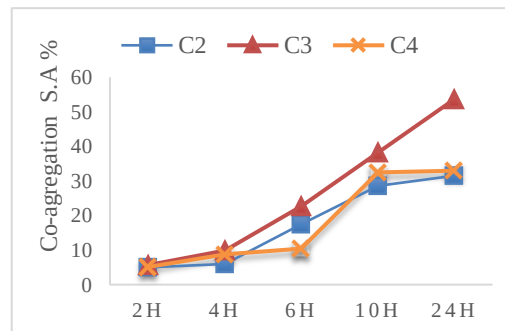


Figure 52 : Le pourcentage de co-agrégation des isolats avec S.A.

Toutes les souches sélectionnées d'*Enterococcus* sp. C2, C3 et C4 ont démontré la capacité de co-agrégation avec les deux bactéries pathogènes testées (Figure 47, 48). Mais, il fallait souligner que les taux de co-agrégation étaient dépendants du temps et spécifiques aux souches.

Par rapport aux autres isolats, *Enterococcus* sp. C3 a montré les pourcentages de co-agrégation les plus élevés avec les deux souches indicatrices, *Bacillus cereus* (47,65%) et *Salmonella abony* (53,6) après 24h. Cependant, *Enterococcus* sp. C2 et *Enterococcus* sp. C4 présentaient des taux plus proches, dans le temps (41,66%, 40,26%) avec B.C. et (31,5%, 32,95%) avec S.A. après 24h, respectivement

L'auto-agrégation et la co-agrégation des probiotiques sont importantes pour empêcher la colonisation des surfaces par les pathogènes (Li et al., 2020).

7. Identification génotypique des souches pures

Sur la base du séquençage de l'ARNr 16S, les isolats *Enterococcus* sp. C2, *Enterococcus* sp. C3 et *Enterococcus* sp. C4 du TGI ont été taxonomiquement identifiées comme des espèces d'*Enterococcus*.

Le séquençage comprend les séquences en FASTA et les chromatogrammes qui sont mentionnés ci-dessous.

Gène d'ARN ribosomique 16S de la souche CAU8374 d'*Enterococcus faecium* à 99 %, séquence partielle

ID de séquence : [MF424710.1](#)

>C2.6S_27f

TATCTGTAACGGAGCTTGCTCCACCGGTAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAG-

TAACACGTGGGTAACTGCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAA

ACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGG-
TGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA
CATTGGGACTGAGA-
CACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCC
GCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAGAGAAGAACAAGGAT-
GAGAGTAAGTGTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG-
TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGA
AGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACAC-
CAGTGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCTTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGG-
TTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG-
TTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTT
TCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTGA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTC-
TAGCAAGACTGCCGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAATCATCATGCCCTTATGACTGGGGCTA
CCACGTGCTACATGGGAAGTCA

Gène d'ARN ribosomique 16S de la souche BPB31 d'*Enterococcus faecium* à 99%,
séquence partielle

ID de séquence : [MK748264.1](#) L

>C3.16S_27f

TATTAAGAGGAGTGCCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCA-
GAAGGGGATAAACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGC
GCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGG-
TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACA
CGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCT-
GACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAGAGAAGAACAAGGATGA
GAGTAAGTGTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCA-
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC
GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT-
GAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACAC-
CAGTGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCTTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGG-
TTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG-
TTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTT
TCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGG-
TTAAGTCCCGCACGAGCGCACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACCACCTGCT

Gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche B_8LAB d'*Enterococcus durans*, à
99% du séquence partielle

ID de séquence : [MF405179.1](#)

>C4.16S_27f

AATAAGAAGAGTGCCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCA-
GAAGGGGATAAACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGC
GCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGG-
TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACA

GGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCT-
 GACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGA
 GAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCA-
 GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGGC
 GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT-
 GAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATT
 CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACAC-
 CAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGG-
 TTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA
 AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG-
 TTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCT
 TCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCACCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGG-
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGACTCTAGCAGACTGCCGGTGA
 CAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAATCATCATGCCCTTAGGACTGGGCTAC-
 CACGTGCTACATGGGAAGTCAACG

Les liens entre les souches et leurs séquences comparables correspondantes provenant d'autres bactéries étroitement apparentées sont montrés par l'arbre phylogénétique illustré dans la Figure (53). Les deux souches d'*Enterococcus sp.* C2 et C4 ont vu leurs séquences partielles du gène ARNr 16S ajoutées à la base de données GenBank ; leurs numéros d'accès sont respectivement ON377335 et ON383936. L'analyse de la séquence de l'ARNr 16S a révélé que les souches étaient très similaires aux espèces d'Entérocoques. On peut observer sur l'arbre phylogénétique que *Enterococcus sp.* C4 et C2 sont regroupés dans le clade II avec *Enterococcus lactis* BT159 et *Enterococcus faecium* DSM 20477. *Enterococcus durans* 100479 et *Enterococcus thailandicus* NBRC 101867 sont membres du premier clade (Figure 53).

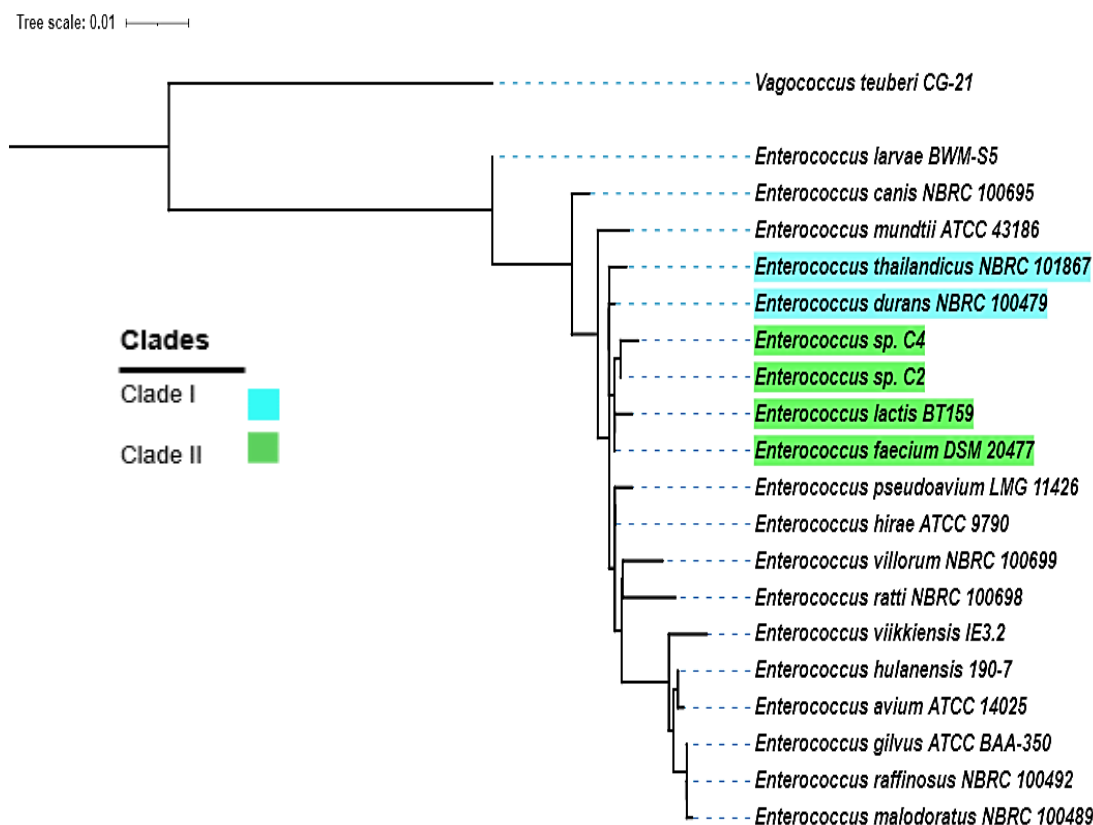


Figure 53 : Analyse de l'arbre phylogénétique par la méthode du maximum de vraisemblance des souches *Enterococcus* C2 et C4.

Au cours de l'analyse de la phylogénie moléculaire par la méthode du maximum de vraisemblance, les valeurs de bootstrap sont représentées par des cercles sur les branches et les longueurs des branches sont exprimées en termes de nombre de substitutions par site, et l'arbre est représenté à l'échelle.

L'arbre phylogénétique présenté dans la figure (54) est construit en utilisant les séquences ARNr 16S des souches sélectionnées et leurs souches types les plus proches, l'analyse de la séquence ARNr 16S partage une identité avec ses voisins les plus proches. Les séquences de gènes ARNr 16S partiels de la souche *Enterococcus sp. C3* ont été ajoutées à la base de données GenBank ; son numéro d'accès est : ON383934. Les études de séquençage de l'ARNr 16S indiquent une grande similarité entre les souches et les espèces d'*Enterococcus*. D'après l'arbre phylogénétique (Fig. 54), on remarque que *Enterococcus faecium* C3 et *Enterococcus faecium* NBRC 100486 sont regroupés ensemble dans le clade II. *Enterococcus durans* C2, qui est plus étroitement lié à *Enterococcus durans* JCM 8725, est membre du premier clade.

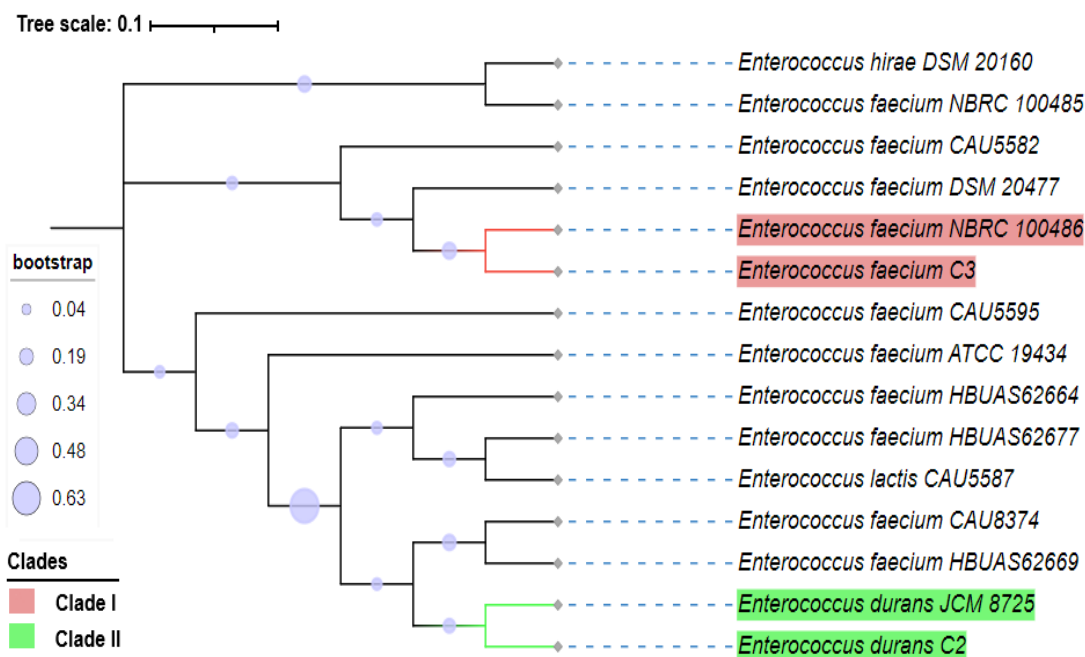


Figure 54 : Analyse de l'arbre phylogénétique d'*Enterococcus* sp. C2 et *Enterococcus* sp. C3 par la méthode du maximum de vraisemblance.

Toutefois, l'attribution définitive de ces isolats au genre *Enterococcus* serait discutable car il s'agit d'un genre connu pour couvrir des espèces qui ne peuvent pas être classées dans le genre *Enterococcus* délimitées uniquement sur la base de leur gène ARNr 16S. Une identification fiable serait possible si elle était basée sur l'analyse de génomes complets.

Plusieurs espèces d'entérocoques ont été isolées à partir de poissons, tel que *E. faecium* (Thapa, 2006 ; Gomez-Sala, 2015) et *E. durans* (Migaw et al. 2014). Selon Franz et al. (2004) et Giraffa (2022), les souches bactériennes prédominantes du genre *Enterococcus* ont été isolées à partir de fruits de mer non cuits (mollusques, poissons et filets de poisson) *E. faecium* et *E. faecalis*, tandis que *E. hirae* et *E. durans* ont été trouvés en plus faible proportion.

L'exploration du génome à la recherche de composés antimicrobiens dans les entérocoques associés aux espèces marines sauvages a été décrite par Prichula et al. (2021), les bactéries des environnements marins sont particulièrement prometteuses. 73 composés antimicrobiens putatifs ont été identifiés, dont 61 bactériocines (83,56

%), 10 terpènes (13,70 %) et (13,70 %) et 2 (2,74 %) liés à des peptides non ribosomiques putatifs

Conclusion et perspectives

Conclusion

L'environnement aquatique est très complexe, présentant une grande diversité biologique. À cet effet, diverses souches lactiques ont été identifiées et analysées à partir de divers produits de pêches. Ces types de souches lactiques marines offrent certains attributs technologiques par rapport aux autres bactéries lactiques. A travers cette approche, de nombreuses recherches ont été menées dans le contexte d'étudier les caractéristiques technologiques, génétiques ou organoleptiques de nouvelles souches "sauvages" isolées de niches écologiques non laitières. Bien qu'elles soient recherchées pour leur potentiel technologique, leurs bactériocines sont impliquées dans la biopréservation des aliments. Le microbiote des produits de la mer constitue une source de souches bioprotectrices, pouvant être exploité pour répondre aux besoins des consommateurs qui tendent vers les aliments naturels, sains et fonctionnels.

A l'issue de cette étude, Vingt isolats lactiques ont été isolés du tube digestif de poisson marin. Après une pré-identification phénotypique des isolats lactiques, un premier screening a été réalisé en fonction de l'activité antibactérienne. 05 isolats ont été sélectionnés parmi les 20 isolats pour la suite de cette étude. La caractérisation phénotypique (morphologique, physiologique et biochimique) a permis d'identifier 3 souches de forme coque (ovoïde) appartenant au groupe des entérocoques nommées *Enterococcus sp. C2*, *Enterococcus sp. C3* et *Enterococcus sp.C4*. Ainsi que deux souches de forme bâtonnet (bacille) présumées appartenant au groupe des Carnobactéries nommées *Carnobacterium sp. C10* et *Carnobacterium sp.C12*. Un second screening, sur la base de la caractérisation technologique des isolas sélectionnés, a été effectué en terme de la production de bactériocine, l'activité acidifiante, protéolytique lipolytique et amylolytique, la production des EPS et d'acétoïne ainsi que la recherche de la citratase. Ce qui a conduit à retenir les trois isolats *Entreococcus sp. C2*, *Entreococcus sp.C3* et *Entreococcus sp.C4*. Des critères de performance portant sur la résistance aux antibiotiques, la production des amines biogènes et l'activité hémolytique, ont été aussi examinés. Les facteurs de virulences (la recherche de la gélatinase, l'activité hydrophobe, l'auto-agrégation et la co-aggrégation) ont été ainsi déterminés. Les Galeries API 50 CHL ont été utilisées pour compléter l'identification de ces 03 isolats. L'identification initiée, a été confirmé via le séquençage des gènes de l'ARNr 16S après l'amplification par

PCR (identification génotypique). A la lumière, de cette identification moléculaire, il découle que les isolats appartiennent au genre *Enterococcus sp.* On a pu identifier *Enterococcus faecium*, *Enterococcus lactis* que *durans* et *Enterococcus sp.*

Les trois souches d'*Enterococcus* exercent des effets inhibiteurs vis-à-vis au moins deux bactéries pathogènes utilisées dans ce travail (*B.cereus*, *B.subtilis*, *S.abony*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*,...). Les souches lactiques isolées dans cette étude ont développé des substances antibactériennes thermostables de nature protéique, maintenant leur effet bactériostatique sur une large gamme de pH. Il est possible d'utiliser ces molécules bioactives dans les aliments, car ils sont stables à des pH et des températures spécifiques en fonction de leurs niveaux habituels dans les aliments et des opérations de traitement. Elles ont également démontré une activité hydrophobe, une auto-agrégation et une co-agrégation. Ces caractéristiques confèrent à ces isolats le pouvoir de coloniser l'intestin. On peut conclure que ces souches provenant de produit de pêches présentaient des caractéristiques technologiques importantes faisant d'elles d'intéressantes candidates pour une éventuelle intégration en industrie alimentaire. La souche lactique C3 semble la plus pertinente sur le plan technologique présentant des aptitudes technologiques prometteuses (peu acidifiante avec un effet inhibiteur significatif, faible activité protéolytique et lipolytique, dégradation de l'amidon et du citrate). De plus, la caractérisation de la sécurité a confirmé que la souche ne présente aucun facteur de virulence notable, ni résistance à la vancomycine (intermédiaire).

Nos découvertes auront d'importantes répercussions pour le secteur alimentaire et cette étude contribuera à l'innovation alimentaire en offrant des saveurs spécifiques, une élaboration de méthodes de conservation naturelle des aliments plus sécurisés et plus efficaces tout en apportant des bienfaits pour la santé.

En perspective, des études approfondies doivent compléter ce travail tels que :

- Purification et identification des bactériocines par des méthodes chromatographiques (HPLC... etc).
- Caractérisation des gènes impliqués dans la production de ces substances active.
- Dosage d'amine biogène par HPLC pour estimer leur concentration (déterminer la dose sans effet néfaste).

- Approfondir les mécanismes d'action utilisés par les bactéries pour l'activité inhibitrice de bactériocine.

Dans le prolongement des travaux initiés dans cette thèse, il serait pertinent de continuer à décoder les voies impliquées dans le mode d'action. Toutefois, la capacité des bactéries lactiques à produire des bactériocines à une dose contrôlée et leur à jouer de manière efficace et stable sur les fonctions antibactériennes et de conservation des aliments, représentent la future orientation pour le développement de la synthèse des bactériocines dans l'industrie alimentaire.

Les chercheurs du monde entier sont à la recherche d'alternatives possibles pour s'attaquer au problème de l'antibiorésistance. La forte activité spécifique de certaines bactériocines contre les pathogènes cliniques, même contre les souches multi résistantes, offre une solution possible à ce problème croissant.

De par la production restreinte de ses bactériocines, bien que certaines d'entre elles soient précieuses, certaines bactéries lactiques ne sont pas suffisamment performantes pour servir de bactéries industrielles. Ainsi, l'emploi de la biotechnologie synthétique pour procéder à une transformation spécifique des souches peut contribuer à la production de certains produits à haut rendement.

Notre prochaine recherche se concentrera sur l'extraction d'enzymes impliquées dans le métabolisme, notamment des protéases et des lipases. L'évolution de la technologie enzymatique et la compréhension accrue de l'action des enzymes d'origine marine offrent d'importantes opportunités pour la production économique d'enzymes pertinentes destinées à la commercialisation grâce à la technologie de l'ARN recombinant. En outre, nos recherches mettent l'accent sur les utilisations médicales possibles des isolats résistants à de nombreux antibiotiques, et nous envisageons d'approfondir leur utilisation dans la thérapie clinique.

En exploitant les capacités de ces isolats pour produire des starters bactériens, on pourrait considérablement augmenter la qualité et la sécurité des produits alimentaires.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

Abarquero, Renes, E., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2022). Study of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and their industrial applications: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 57, 16–2. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15227>

Abdul Hakim, B.N., Xuan, N.J., Oslan, S.N.H. (2023). A Comprehensive Review of Bioactive Compounds from Lactic Acid Bacteria: Potential Functions as Functional Food in Dietetics and the Food Industry. *Foods*, 12, 2850.

Abeijón Mukdsi, M.C., Medina, R.B., Katz, M.B., Pivotto, R., Gatti, P. & González, S.N. (2009). Contribution of lactic acid bacteria esterases to the release of fatty acids in miniature ewe's milk cheese models. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1036–44.

Abiola, R., Okoro, E.K., Oludayo, okunbi, O. (2022). Lactic Acid Bacteria and the Food Industry - A Comprehensive Review. *International Journal of Health Sciences and Research* 12 (5), 128–142. <https://doi.org/10.52403/ijhsr.20220516>

Adebayo-Tayo, A. C., Odu, N. N., Michael, M. U., & Okonko, I. O. (2012a). Multi-drug resistant (MDR) organisms isolated from seafoods in Uyo, South-Southern Nigeria. *Nature and Science*, 10(3), 61-70.

Afzal, M., Thibaut, J., Delaunay S., Borges F., Millière J.-B., Revol-Junelles A.-M., Cailliez-

Grimal, C. (2010). *Carnobacterium maltaromaticum*: Identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products. *Food Microbiol.* 27, 573–579.

Afzal, M.I. (2012). Physiologie et aspects technologiques de *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 en biopréservation alimentaire. Thèse de doctorat. Université de Lorraine, France.

Aguilar-Galvez, A., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., Campos, D., Thonart, P. (2012). Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16(1), 67–76. <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=8423>.

Akgul, H.I., (2023). Exopolysaccharides : Définition, Caractéristiques et Bienfaits

Akbar, A., Ali, I., Anal, A.K. (2016). Industrial perspectives of lactic acid bacteria for biopreservation and food safety. *The Journal of Animal & Plant Sciences*. 26(4), 938–948.

Akter, M., Islam, M. J., Mian, S., Shikha, F.H., Rahman, M.H., Kamal, MD. (2014). Changes in fillet quality of pangas catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) during frozen storage. *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 6(2): p. 146–155.

Al kassaa, I., Belguesmia, Y., Chihib, N.E., Bendalif, H., Naghmouchi, K., Fliss, I.,

- Dridr, D. (2016).** Chapitre 10. Applications des bactériocines et bactéries lactiques dans le contrôle des pathogènes alimentaires. Economica.
<https://www.researchgate.net/publication/334081297>
- Al Seraih A, Belguesmia Y, Cudennec B, Baah J, Dridr D. (2018).** In silico and experimental data claiming safety aspects and beneficial attributes of the bacteriocinogenic strain *Enterococcus faecalis* B3A-B3B. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 10, 456–65. Doi: 10.1007/s12602-017-9357-8
- Allende, A., Jacxsens, L., Devlieghere, F., Debevere, J., Artés, F. (2002).** Effect of superatmospheric oxygen packaging on sensorial quality, spoilage, and *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas caviae* growth in fresh processed mixed salads. *Journal of Food Protection®* 65, 1565–1573.
- Alquati, C., De Gioia, L., Santarossa, G., Alberghina, L., Fantucci, P., Lotti, M. (2002).** The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*. Heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling. *Eur. J. Biochem*. 269, 33213–3328.
- Alvarez-Sieiro, P., Redruello, B., Ladero, V., Martín, M. C., Fernández, M., and Alvarez, M. A. (2016b).** Screening sourdough samples for gliadin-degrading activity revealed *Lactobacillus casei* strains able to individually metabolize the coeliac-disease-related 33-mer peptide. *Can. J. Microbiol.* 62 , 422–430. Doi: 10.1139/cjm-2015-0796
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., Kuipers, O.P. (2016).** Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100(7), 2939–51.
- Amblard, C., Boisson, J. C., Bourdier, G., Fontvieille, D., Gayte, X. & Sime-Ngando, T. (1998).** Écologie microbienne en milieu aquatique : des virus aux protozoaires. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 11, 145–162.
<https://doi.org/10.7202/705336ar>
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufor, E. & Chevalier, I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1- Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control*. 17, 454–461.
- Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F. (2001)** Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research*. 68(2), 303–16.
- Anonyme1.** <http://espace-svt.ac-rennes.fr/aplic/dissect/poisson/pois.htm>
- Anonyme 2 (2023).**
www.fmstudies.org

Anonyme 3 (2024).
w.w.w.aquaportail.com

Anonyme 4 (2014).

UniProt Taxonomy browser.
<http://www.uniprot.org/taxonomy/186826>

Arthur, M.R., Quintiliani, J.R. (2001). Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45, 375–381.

Aspri, M., O'Connor, P.M., Field, D., Cotter, P.D, Ross, P., Hill, C. (2017). Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *Int Dairy J*. 73, 1–9.

[10.1016/j.idairyj.2017.04.008](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.04.008)

Auger, G., Cattoir, V. (2023). *Biologie médicale*. Doi: 10.1016/S2211-9698(23)80252-

Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects*. New York: Marcel Dekker, Inc., p.1–66

Austin, B. (1983). Bacterial microflora associated with a coastal, marine fish-rearing unit. *J Mar Biol Ass UK* 63:585-592

Austin, B. (2002). The Bacterial Microflora of Fish. Mini-Review *TheScientificWorldJOURNAL* 2, 558–572 ISSN 1537-744X; DOI 10.1100/tsw.137

Austin, B. (1982). Taxonomy of bacteria isolated from a

coastal, marine fish-rearing unit. *J.Appl. Bacteriol*. 53, 253–268

Ayed, L., M'hir, S., Nuzzolese, D., Di Cagno, R., Filannino, P. (2024). Harnessing the Health and Techno-Functional Potential of Lactic Acid Bacteria: A Comprehensive Review. *Foods*,

Aymerich, T., Rodríguez, M., Garriga, M., et al. (2019). Assessment of the bioprotective potential of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 8 °C. *Food Microbiology*, 83, 64–70.

Azam, M., Mohsin, M., Ijaz, H., Tulain, U. R., Ashraf, M. A., Fayyaz, A., et al. (2017). Review-Lactic acid bacteria in traditional fermented Asian foods. *Pak. J. Pharm. Sci.* 30(5), 1803–814.

Bachtarzi, N., Kharroub, K., Ruas-Madiedo, P. (2019). Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian dairy products and their application for skim-milk fermentations. *Elsevier Science*. 107, 117–124.

Bachy, C. & Baudoux, A.-C. (2022). Diversity and ecological importance of viruses in the marine environment. *Med Sci (Paris)*. 38, 1008–1015. <https://doi.org/10.1051/medsci/2022165>

Badis, A., Guetarni, D., Moussa Boudjema, B., Henni D.E, Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races.

Food Microbiology. 21(5), 579-588.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.11.006>

Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Gironés, O. & Muzquiz, J.L. (2007). Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 111–18

Barzegar, H., Behbahani, B.A., Falah, F. (2021). Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of *Lactobacillus* strains isolated from Iranian raw milk cheeses. *Food Sci. Nutr.* 9, 4094–4107. DOI: [10.1002/fsn3.2365](https://doi.org/10.1002/fsn3.2365)

Bayoub, K., Mardad, I., Ammar, E., Serrano, A., Soukri, A. (2011). Isolation and purification of two bacteriocins 3D produced by *Enterococcus faecium* with inhibitory activity against *Listeria monocytogenes*. *Curr Microbiol.* 62(2), 479–85.

[10.1007/s00284-010-9732-0](https://doi.org/10.1007/s00284-010-9732-0)

Belco Latifou, A., Imorou Toko, I., Boni, A.R., Gandaho, D.M.F., Djibril, L., Tougan P.U., Ahyi, V. (2019). Changements Post Mortem et Evaluation de la Qualité du Poisson Destiné à la Consommation Humaine : Revue de la Littérature. *International Journal of Progressive Sciences and Technologies (IJPSAT)*.

17(1), pp. 111–141. <http://ijpsat.ijsh-journals.org/>

Belkheir, K. 2017. Caractérisation technologique de nouvelles souches de bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle d'Algérie. Réalisation de ferments actiques. Thèse de doctorat, Université d'Oran 1.

Bello, S., Rudra, B., Gupta, R.S. (2022). Phylogenomic and comparative genomic analyses of *Leuconostocaceae* species: Identification of molecular signatures specific for the genera *Leuconostoc*, *Fructobacillus* and *Oenococcus* and proposal for a novel genus *Periweissella* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 72, 005284.

Ben Belgacem, Z., Ferchichi, V., Prévost, H., Dousset, X., & Manai, V. (2008). Screening for anti-listerial bacteriocin-producing lactic acid bacteria from "Gueddid," a traditionally Tunisian fermented meat. *Meat Science*, 78, 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.021>

Ben Braiek, O., Smaoui, S. (2019). Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *Bio.Med.Research Int.* P.13. <https://doi.org/10.1155/2019/5938210>

Ben Mouna, Z. (2018). Etude de bactériocines de bactéries lactiques et leurs effets sur les bactéries pathogènes et/ou d'altération. Thèse de Doctorat. Université Oran 1 Ahmed Ben Bella

Benkerroum N., Y. Ghouati, W.E. Sandine & Tantaoui-Elaraki, A. (1993). Methods to demonstrate the bactericidal activity of

bacteriocins. Letters in Appl. Microbiol. 17, 8-78-81.

Bermúdez-Humarán, L. G., Langella, P. (2009). Utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs vaccinaux. Rev. Francoph. Lab. 417, 79–89. DOI : 10.1016/S1773-035X(09)70312-0

Bernardet, J.F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., Vandamme, P. (1996). Cutting a gordian knot: Emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom nov. International Journal of Systematic Bacteriology.

Biscola, V., Choiset, Y., Rabesona, H., Chobert, J.-M., Haertlé, T., Franco, B.D.G.M. Björkroth, J., & Holzapfel, W. H. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), The Prokaryotes (3 ed., Vol. 4, pp. 267-319). Springer. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_9

Biscola, V., Choiset, Y., Rabesona, H., Chobert, J.-M., Haertlé, T., Franco, B.D.G.M. (2018). Brazilian artisanal ripened cheeses as sources of proteolytic lactic acid bacteria capable of reducing cow milk allergy. *J. Appl. Microbiol.* 125(2), 564–574. Doi : 10.1111/jam.13779. Epub 2018 May 4

Björkroth, J.A., Dicks, L.M.T.D., Endo, A. (2014). The

genus *Weissella*. In: Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B. (Eds.), Lactic Acid Bacteria, Biodiversity and Taxonomy. Wiley Blackwell, Chichester, pp. 418–428.

Booth, M.C., Bogie, C.P., Sahl, H.G., Siezen, R.J., Hatter, K.L., Gilmore, M.S. (1996). Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. Mol. Microbiol. 21, 1175–1184.

Bouaziz, A. (2021). Microbiologie des principaux produits alimentaires. Microbiologie des poissons et des produits aquatiques. . <http://staff.univ-batna2.dz/bouaziz-amira>.

Boukef-Ben Omrane, I. (2019). ECUE : Microbiologie aquatique (fondamental). Institution de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur Agricoles. Université de Carthage.

Boulares, M., Aouadhi, C., Mankai, M., Ben moussa, O., Essid, I. and Mnasser, H. (2012). Characterization, Identification and technological properties of psychotrophic lactic acid bacteria originating from Tunisian fresh fish. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2012.00385.x>.

Bourel, G., Henini, S., Krantar, K., Oraby, M., Diviès, C., Garmyn, D. (2001). Physiologie, métabolisme : Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. Lait 81, 75–82 © INRA, EDP Sciences.

Bouton, Y., Guyot, P., Dasen, A., Grappin, R. (1993). Proteolytic activity of thermophilic lactobacillus strains isolated from sourdoughs and Comté. 1. Validation of laboratory techniques on mini cheeses.

Dairy Science and Technology. 73(3), 265–279.

Breukink, E., Wiedemann, I., Van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Sahl, H.G. and De Kruijff, B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Sci.* 286, 2361–2364.

Brillet A., Pilet M-F., Prevost H., Bouttefroy A., Leroi, F. (2004). Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *J. of App. Microbiol.* 97, 1029–1037.

Brillet, A., Pilet, M.F., Prévost, H., Cardinal, M., Leroi, F. (2005). Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 309–324.

Brillez, A. (2005). Sélection et caractérisation de souches de *Carnobacterium* pour la biopréservation du saumon fumé. Thèse de Doctorat. École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique. <https://www.researchgate.net/publication/29491585>

Bruno M., Montville T. (1993). Common mechanistic action of bacteriocins from lactic

acid bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 59, 3003–3010

<https://doi.org/10.1111/jam.13779>

Cahill, M.M. (1990). Bacterial Flora of Fishes: A Review. Source: *Microbial Ecology*, 19 (1), p 21-41. <http://www.jstor.org/stable/4251098>.

Caillez-Grimal, C., Afzal, M.I. and Revol-Junelles, A.-M. (2014). *Carnobacterium*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 1, 379–383. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00381-5>

Cailliez-Grimal, C., Chaillou, S., Anba-Mondoloni, D., Iou, V., Afzal, M.I., Gilles Kergourlay, A., Champomier-Vergès, M.C., Zagorec, M., Dalgaard, P., Leisner, J.J., Prévost, H., Revoil-Junelles, A.M., Borges, F. (2013). Complete Chromosome Sequence of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28. *J. ASMorg.* 1(1). 1 DOI:10.1128/genomeA.00115-12

Calatrava, E. (2022). Other *Streptococcus* Species and *Enterococcus*. *Encyclopedia of Infection and Immunity*. 1, 529-541.

Candelieri, F., Sola, L., Busi, E., Rossi, M., Amaretti, A., Raimondi, S. (2024). The Metabolism of *Leuconostoc* Genus Decoded by Comparative Genomics. *Microorganisms*. 12, 1487. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071487>.

Caplice, E. & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50, 131-149.

Cappelier, J.M. (2008). La filière pêche et produits de la pêche. Polycopié

Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. Critical Reviews in Microbiol. 28(4), 281–370.

Doi : 10.1080/1040-840291046759.

Carr, J.H. (2006). Centers for Disease Control and Prevention, part of the United States Department of Health and Human Services.

Carr, J.H. (2008). Scanning Electron micrograph of *Pseudomonas aeruginosa*, Photograph, Available online: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudomonas_aeruginosa_SEM.jpg,

Carrasco de Mendoza, M.S., Scarinci, M.S., Huerto-Garat, H.E., Simonetta, A.C. (1992) Technological properties of enterococci in lactic starters: acidifying and lipolytic activities. Microbiologie, Aliments, Nutrition. 10(3), 289–293.

Casaburi, A., DeFilippis, F., Villani, F., Ercolini, D. (2014). Activities of strains of *Brochothrix thermosphacta* in vitro and in meat. Food Research International. 62,366–374.

Casaburi, A., DiMartino, V., Ercolini, D., Parente, E., Villani, F. (2015). Antimicrobial activity of *Myrtus communis* L. water-ethanol extract against meat spoilage strains of *Brochothrix thermosphacta* and *Pseudomonas fragi* in vitro and

in meat. Annals of Microbiology. 65,841–850.

Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G.-J., Villani, F., Ercolini, D. (2015). Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. Food Microbiology. 45, 83–102.

Casarotti, S.N., Carneiro, B.M., Todorov, S.D., Nero, L.A., Rahal, P., Penna, A.L.B.B. (2017). In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. Annals of Microbiology. 67(4), 289–301.

Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E., Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from enterococcus faecium T136 wich can act synergistically with enterocin A. Microbiology.143, 2287–2294.

Castro, M.P., Palavecino, N.Z., Herman, C., Garro, O.A., Campos, C.A. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. Meat Science 87 321–329. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.11.006>

Chakchouk-Mtibaa, A., Sellem, I., Kamoun, Y., Smaoui, S., Karray-Rebai, I., and Melloul, L. (2018). Safety Aspect of Enterococcus faecium FL31 Strain and Antibacterial Mechanism of Its Hydroxylated Bacteriocin BacFL31 against *Listeria monocytogenes*. Bio.Med. Research International. 10. <https://doi.org/10.1155/2018/5308464>

Champagne, C.P., Roy, D., Gardner, N. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit Rev Food Sci. Nutr.* 45, 61–84.

Cheng, J., Gao, J., Zhang, J., Yuan, W. (2021). Optimization of Hexavalent Chromium Biosorption by *Shewanella putrefaciens* using the Box-Behnken Design. *Water Air and Soil Pollution.* 232 (3). DOI: [10.1007/s11270-020-04947-7](https://doi.org/10.1007/s11270-020-04947-7)

Cheng, J.H., Sun, D.W., Han, Z., Zeng, X.A. (2014). Texture and Structure Measurements and Analyses for Evaluation of Fish and Fillet Freshness Quality Comprehensive. *Reviews in Food Science and Food Safety.* 13.

Cintas, L.M., Casaus, P., Havarstein, L.S., Hernández, P.E., Nes, I.F. (1977). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec- dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4321–4330.

Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P.E., Nes, I.F., Havarstein, L.S. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180, 1988–1994.

Clements, K. D., Pasch, I. B., Moran, D., and Turner, S. J. (2007). Clostridia dominate 16S rRNA gene libraries prepared from the hindgut of temperate marine herbivorous fishes. *Mar. Biol.*

150, 1431–1440. doi: 10.1007/s00227-006- 0443-9.

Collins, M.D., Rodrigues, U., Ash, C. et al. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77, 5–12.

Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. & Wallbanks, S. (1993). Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 595–603

Collins, Y.F., Mc Sweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal.* 13, 841–866.

Čolo, J., Mihajlović, S., Tolinački, M., Popović, D., Kojić, M., Terzić-Vidojević, A. (2015). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bosnian artisanal dry fermented sausage (Sudžuk) during fermentation. *Genetika.* 47, 819–832

Colwell RR (1962). The bacterial flora of Puget Sound fish. *J. Appl. Bacteriol.* 25, 147–158

Comi, G. (2017). Spoilage of meat and fish. In A. Bevilacqua, M. R. Corbo & M. Sinigaglia (Eds.). *The microbiological quality of food* (pp. 179–210). Wood head Publishing.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00011-X>

Campos, C. A., Rodriguez, O., Calo-Mata, P., Prado, M. & Barros-Velazquez, J. (2006). Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (Psetta maxima). *Food Research International*. 39, 356–364

Conz, A., Davoli, E., Franchi, C., and Diomede, L. (2024). Review: Seafood loss prevention and waste reduction. *Food Quality and Safety*. 8, fyae017. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyae017>

Cotter, P., Hill, C., and Ross, R. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 777–788. Doi: 10.1038/nrmicro1273

Courvalin, P. (2006) Vancomycin resistance in gram positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*. 42(1), 25-34.

Criado, R., Gutiérrez, J., Martín, M., Herranz, C., Hernández, P.E., Cintas, L.M. (2006). Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7634–7643.

Cui, Y.; Luo, L.; Wang, X.; Lu, Y.; Yi, Y.; Shan, Y.; Liu, B.; Zhou, Y.; Lu, X. (2021). Mining, heterologous expression, purification,

antibactericidal mechanism, and application of bacteriocins: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20, 863–899.

da Costa, R.J., Voloski, F. L. S., Mondadori, R., Fiorentini, A.M. (2019). Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *Journal of Food Quality*. 1, 1–12. DOI: 10.1155/2019/4726510

<https://doi.org/10.1155/2019/4726510>
. Figure mode of action of bacteriocin Gram+

da Silva SS, Vitolo M, González JMD, de Souza Oliveira RP (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res Int.* 64,527–536.

Dalgaard, P, Mejlholm, T.J., Christiansen and Huss, H.H. (1997). Importance of photobacterium phosphoreum in relation to spoilage of modified atmosphere packed fish products. *Letters in applied Microbiology*. 24, 373–378

Dalgaard, P. (1995a). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International journal of food microbiology*. 26, 319–333

Dalgaard, P. (1995b). Modelling of microbial activity prediction of shelf life for packed fish. *International journal of food microbiology*. 26, 305–317

Dalgaard, P., Gram, L., Huss, H.H. (1993). Spoilage and shelf life

of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.* 19(4), 283–294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90020-H](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90020-H).

Dallas, D., Citerne, F., Tian, T., Silva, V., Kalanetra, K., Frese, S., et al. (2016). Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. *Food Chem.* 197 273–284.
10.1016/j.foodchem.2015.10.116

Dapkevicius M.E., Bruna Sgardioli, Câmara S. P. A., Poeta P. and Malcata X.F. (2021). Current Trends of Enterococci in Dairy Products: A Comprehensive Review of Their Multiple Roles. *Foods.* doi.org/10.3390/foods10040821

Darbandi, A., Asadi, A., Ari, M.M., Ohadi, E., Talebi, M., Zadeh, M.H.,

Daskalov, H. (2006). The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control* 17, 474-483.

Dauchy Silbande, A. (2016). Ecosystèmes microbiens des poissons tropicaux, *Thunnus albacares* et *Sciaenops ocellatus*, après abattage et incidence sur la qualité des produits. Thèse de doctorat. Université Des Antilles, Martinique, France d'enseignement ENVN, UV82, 6, 43p.

De Bruyne, K., Camu, N., De Vuyst, L. & Vandamme, P. (2010). *Weissella fabaria* sp. nov. from Ghanaian cocoa fermentation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1999–2005.

De Crécy-Lagard, V., El Yacoubi, B., de la Garza, R. D., Noiriel, A., & Hanson, A. D. (2007). Comparative genomics of bacterial and plant folate synthesis and salvage: predictions and validations. *BMC Genomics*, 8(Figure 2), 245. Doi: 10.1186/1471-2164-8-245. DOI : 10.1007/978-94-017-8841-0_1

Delarras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.

Desmazeaud, M. (1996). Quelques problèmes posés par le réensemencement des bactéries lactiques dans le lait industriel. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie.* 11, 106–112

Di Cagno, R., Quinto, M., Corsetti, A., Minervini F. & Gobbetti, M. (2006). Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *Int. Dairy J.* 16, 119–30.

Dib, A. L. H. (2023). Les Produits De La Pêche. « A5 » Institut des Sciences Vétérinaires Université Frères Mentouri, Constantine 1. https://fac.umc.edu.dz/vet/Cours_Ligne/cours_22_23/HIDAOA_A5/Les_produits_de_la_pe%CC%82che.pdf. DOI : 10.1002/adbi.201770059

Dicks, L.M.T., Heunis, T.D.J., van, Staden, D.A., Brand, A., Noll, K.S., Chikindas, M.L. (2011). Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*, Drider D, Rebuffat S (eds). Springer: New York; 391–421

- Dinçer, E.; Kıvanç, M. (2018).** Lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Turkish pastırma. *Anadolu Univ. J. Sci. Technol. C-Life Sci. Biotechnol.* DOI: 10.18036/aubtdc.306292
- Domínguez, L., Moore, E.R.B., Vela, A.I. (2012).** *Flavobacterium oncorhynchi* sp.
- Dong, Y.H., Zhang, L.H. (2005).** Quorum Sensing and Quorum-Quenching Enzymes. *The Journal of Microbiology.* 43,101–109.
- Dortu, C. et Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires
- Dowdell P, Chankhamhaengdech S, Panbangred W, Janvilisri T, Aroonnu A. (2019).** Probiotic activity of *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* isolated from Thai fermented sausages and their protective effect against *Clostridium difficile*. *Probiotics Antimicrob Proteins.* doi: 10.1007/s12602-019-09536-7
- Du, R., Ping, W., Ge, J. (2022).** Purification, characterization and mechanism of action of enterocin HDX-2, a novel class IIa bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* HDX-2. *LWT. Food Sci. And Technol.* 153, 112451. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112451>
- Duboc, P., Mollet, B. (2001).** Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal.* 11(9), 759–768.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robert, P.A. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry.* 28, 350–356.
- Dykes, G.A., Britz, T.J. and Von Holy, A. (1994).** Numerical taxonomy and identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged Vienna sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 246–252.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J. (2001)** Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology.* 67, 1628–1635.
- Edgar, R.C. (2004).** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research.* 32(5), 1792–1797.
- Edima, H. C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A.-M., Tonti, L., Linder, M., Millière, J.-B. (2007).** “A selective enumeration medium for *Carnobacterium maltaromaticum*”. *J. of Microbiol. Methods.* 68, 516–521.
- Edima, H.C. (2007).** *Carnobacterium maltaromaticum* : caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère.
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, S., Stanton, C., Ross, R.P. (2018).** The Gut Microbiota of Marine Fish. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00873.
- Eijssink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H.; Brurberg, M.B., Nes, I.F. (1998).** Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3275–3281.

Eiteman, M., and Ramalingam, S. (2015). Microbial production of lactic acid. *Biotechnol. Lett.* 37, 955–972. Doi: 10.1007/s10529-015-1769-5

Elayaraja, S., Annamalai, N., Mayavu, P., Balasubramanian, T. (2014). Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pac. J Trop. Biomed.* 4, S305-S311. doi:10.12980/APJTB.4.2014C537.

Emamie, A., D., Ghanavati, R., Kakanj, M. (2022).

Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 36 (e24093), 1–40. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>

Emborg, J., Laursen, B.G., Dalgaard, P. (2005). Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2° C—effect of vacuum-and modified atmospherepackaging on psychrotolerant bacteria. *International journal of food microbiology* 101, 263–279.

Endo, A. and Dicks, L.M.T. (2014). Physiology of the LAB. In *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy*. Eds Holzapfel, H.W.H. and. Wood, B.J.B.

Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Assobhei, O., Hasselmann, C. (1998). Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE

81 isolated from cheese. *J. Appl. Microbiol.* 85, 521–526

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* 24 (2000) 85–106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00534.x>

Erkan, N.T., Ulusoy, S.Y., Uretener, S. G. (2011). The use of thyme and laurel essential oil treatments to extend the shelf life of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) during storage in Ice. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.* 6(1), p. 39–48.

Erten, H., Aǧirman, B., Gunduz, C.P.B., Car, sanba, E., Sert, S., Bircan, S.,

Esteban-Torres, M., Mancheño, J.M., de Las Rivas, B., Muñoz, R. (2014). Production and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* suitable for cheese lipolysis. *J. Dairy Sci.* 97, 6737–6744.

Fanny, G., Catherine, C., _Muriel, T., Guilbaud, S., Tessier,A., Revol-Junelles, A.M., Borges, F., Benoît, F. (2018). Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological **Front Microbiol.** 9 (2899), 13, 1538. <https://doi.org/10.3390/foods13101538>

FAO/WHO (2002). Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1

- FAO/WHO (2006).** Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food
- FAO/WHO, 2006.** Les probiotiques dans l'alimentation. Propriétés sanitaires et nutritionnelles et lignes directrices pour l'évaluation. Rome: FAO Food and Nutrition. Paper 85.
- Farid, F.B., Latifa, G.A., Nahid, M.N., Begum, M. (2014).** Effect of sun drying on proximate composition and pH of shoal fish (*C. striatus*; Bloch, 1801) treated with salt and salt-turmeric storage at room temperature (27 C-30 C). *J. Agricul. Veter. Sci.* 7(9): p. 01–08
- Fennema, O.F., Hui, Y.H., Karel, M., Walstra, P., Whitaker, J.R. (2004).** Lactic acid bacteria (Microbiological and Functional Aspects) In: Salminen S, von Wright A, editors. Food science and technology a series of monographs, textbooks, and reference books. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. P. 19–30.
- Fernández-Garayzábal, J.F., Svensson-Stadler, L.A., Palacios, M.A., Zhu, F., Wang, S., Zhou, P.J. (2003).** *Flavobacterium xinjiangense* sp. nov. and *Flavobacterium omnivorum* sp. nov., novel psychrophiles from the China No. 1 glacier
- Fernandes, P. (2016).** Enzymes in Fish and Seafood Processing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 4(59), 1–14.
- Fernandes, S., Gomes, I.B., Simoes, M., Simoes, L.C. (2024).** Novel chemical-based approaches for biofilm cleaning and disinfection. *Curr. Opin. Food Sci.* 55, 101124.
- Fiore, E, Van, Tyne, D, Gilmore, M.S. (2018).** Pathogenicity of Enterococci. *Microbiol. Spectrum.* 7(4), GPP3–0053. Doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018.
- Fleet, G. (1992).** Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology,* 12(1-2), 1-44. <https://doi.org/10.3109/07388559209069186>
- Fleming, H.R., Etchell, G.L., Costilow, R.N. (1975).** Microbial inhibition by isolate of *pediococcus* from cucumber brine. *Applied Microbiology.* 30,104-1042.
- Florou-Paneri, P., Christaki, E., & Bonos, E. (2013).** Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. *Lactic Acid Bacteria-R&D for Food, Health and Livestock Purposes,* 589–614.
- Foligné B, Daniel C, Pot B. (2013).** Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Curr; Opin; Microbiol.*16, 284–292.
- Folkertsma, B., Fox, P.F. (1991).** Use of the Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese

- during ripening. *Journal of Dairy Research*. 59, 217–224.
- Fortuna, S.D. (2024).** Get to Know Vibrio Bacteria in Vaname Shrimp As the Cause of Various Diseases.
<https://delosaqua.com/vibrio-bacteria-in-vaname->
- Frankenberg, L., Brugna, M. & Hederstedt, L. (2002).** *Enterococcus faecalis* heme-dependent catalase. *J. Bacteriol.* 184, 6351–6356
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. (2004).** The genus *Enterococcus*: biotechnological and safety issues. In: Salminen, A., von Wright, A., Ouwehand, A. (eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Food Science and Technology. New York. 139, 199–248.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H. (2003).** Enterococci in foods- a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 105–122.
- Fusco, V., Quero, G.M., Cho, G.S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W., Franz, C.M. (2015).** The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Front. Microbiol.* 6, 155.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00155>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- Galdeano, C. M., Cazorla, S. I., Dumit, J. M. L., Vélez, E., &Perdigón, G. (2019).** Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. *Ann Nutr Metab*, 74(2), 115-124. DOI: 10.1159/000496426
- García, M.T., Cañamero, M.M., Lucas, R., Omar, N.B., Pulido, R.P., Gálvez, A. (2004).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 161–170.
- García-Bayona, L., Guo, S.M. and Laub, T.M. (2017).** Contact-dependent killing by *Caulobacter crescentus* via cell surface-associated, glycine zipper proteins. *eLife*. 6, e24869. Doi: 10.7554/eLife.24869.
- García-Cano, I., Rocha-Mendoza, D., Ortega-Anaya, J., Wang, K., Kosmerl, E., Jiménez-Flores, R. (2019).** Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 5243–5257.
- Garvey, M., Rowan, N.J. (2019).** Pulsed UV as a potential surface sanitizer in food production processes to ensure consumer safety. *Curr. Opin. Food Sci.* 26, 65–70.
- Gatesoupe, F.J., Lésel, R. (1998).** Dossier : Flore bactérienne « Flore digestive des poissons : approche environnementale ». *Cahiers Agricultures*. 7, 29–35
- Gatti, M., Fournasari, E., Garni, D., Giraffa, G., Neviani, E. (1994).** Enterococci present in Italian cheeses activate biochemical technological significance. *Industria del Latte*. 30, 11–27.

- Gennari, M., Tormaselli, S., Cotrona, V. (1999).** La microflore de sardines (*Sardina pilchardus*) fraîches et altérées pêchées dans la mer Adriatique (Méditerranée) et stockées dans la glace. *Food Microbiol.* 16(1), 15–28. DOI
- George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F. et al. (2018).** Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in DJunelles, A.-M., istinc Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Front. Microbiol.* 9:2899.
- Ghomrassi, H., ben Braiek, O., Choiset, Y., Haertlé, T., Hani, K., Chobert, J.M., Ghrairi, T. (2016).** Evaluation of marine bacteriocinogenic enterococci strains with inhibitory activity against fish-pathogenic Gram-negative bacteria. *Dis. Aquat. Org.* 118, 31–43.
doi: 10.3354/dao02953
- Ghrairi, T., Frere, J., Berjaud, J.M., Manai, M. (2008).** Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Contr.* 19, 162–169.
- Gill, C. O. (1976).** Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* 41, 401–410.
- Gillespie, N.C., MacRae, I.C. (1975).** The bacterial flora of some Queensland fish and its ability to cause spoilage. *J. Appl. Bacteriol.* 39 (91)-100 16.
- Gilmour, A.M.c, Callum, M.F., Allan, M.C. (1976).** A study of the bacterial types occurring on the skin and in the intestines of farmed plaice, *Pleuronectes platessa*. *Aquaculture.* 7,161–172.
- Giraffa G. (2014).** Enterococcus. *Encyclopedia of Food Microbiology.* Volume 1.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00098-7>
- Giraffa, G. (2003).** Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol* 88:215-222. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00183-1)
- Giraffa, G. (2003).** Review Functionality of enterococci in dairy products. *International J. of Food Microbiol.* 88, 215 – 222.
Doi:10.1016/S0168-1605(03)00183-1
- Giraffa, G. (2022)** Microorganisms with food applications as probiotics. In: *Probiotics.* Academic Press. 39-53.
- Giraffa, G., Pepe, G., Locci, F., Neviani, E., Carminati, D. (1995).** Haemolytic activity production of thermonuclease and biogenic amins by dairy enterococci. *Italian Journal of Food Sciences.* 7, 341–349.
- Goh, H.F. and Philip, K. (2015).** Isolation and mode of action of bacteriocin BacC1 produced by nonpathogenic *Enterococcus faecium* C1. *J. Dairy Sci.* 98, 5080–5090
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-9240>.
- Gomez, S., Magnus, J. (2024).** La sardine commune.
fishipedia.fr/poisson/sardina-pilchardus

- Gomez, G.D., Balcazar, J.L. (2008).** A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52,145–154. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x>.
- Gomez-Sala, B., Muñoz-Atienza, E., Sánchez, J., Basanta, A., Herranz, C., Hernández, P.E., Cintas, L.M. (2015)** Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. *European Food Research and Technology.* 241, 341–356
- Gram, L., Dalgaard, P. (2002).** Fish spoilage bacteria—problems and solutions. *Current opinion in biotechnology* 13, 262–266.
- Gram, L., Huss, H.H. (1996).** Microbiological spoilage of fish and fish products. *International journal of food microbiology* 33, 121–137.
- Gram, L., Trolle, G. & Huss, H. H. (1987).** Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 4, 65–72.
- Grande Burgos, M., Pulido, R., Del Carmen López Aguayo, M., Gálvez, A., Lucas, R. (2014).** The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, № 12, p. 22706-22727. <https://doi.org/10.3390/ijms151222706>
- Guiraud, J.P. (2002).** Microbiologie alimentaire. Dunod éditeur. Paris. 651
- Günther, H.L. & White, H.R. (1961).** The cultural and physiological characters of the pediococci. *J. Gen. Microbiol.* 26, 185–197.
- Ghomrassi, H., ben Braiek, O., Choiset, Y., Haertlé, T., Hani, K., Chobert, J.M., Ghrairi, T. (2016).** Evaluation of marine bacteriocinogenic enterococci strains with inhibitory activity against fish-pathogenic Gram-negative bacteria. *Dis. Aquat. Org.* 118, 31–43.
doi: 10.3354/dao02953
- Ghrairi, T., Frere, J., Berjaud, J.M., Manai, M. (2008).** Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Contr.* 19, 162–169
- Hammer, B., Long, H. (1941).** Factors influencing bacterial growth in butter. *Bacteriol. Rev.* 5, 337–374.
- Hanchi H, Mottawea W, Sebei K and Hammami R (2018).** The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. *Front. Microbiol.* 9:1791.
- Hancock, R. E. (2000).** Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs.* 9: 1723–1729.
- Hayek, S.A., Ibrahim, S.A. (2013).** Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutr. Sci.* 4, 73–87. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2013.411A010>.
- Herrero, M., Mayo, B., Gonzalez, B. & Suarez (1996).** Evaluation of

technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. Journal of Applied Bacteriology, 81, 565-570.

https:

//doi.org/10.1128/aem.55.8.1901-1906.1989

Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. The American journal of clinical nutrition, 73, 365s-373s

Holzappel, W.H. (1992). Culture media for non-sporulating Gram-positive food spoilage bacteria. Int. J. Food Microbiol. 17, 113–133.

Holzappel, W.H., Wood B.J.B. (2014). Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy

Horsley, R.W. (1973). The bacterial flora of the Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) in relation to its environment. J. Appl. Bacteriol. 36, 377–386.

Horváthová, V., Janeček, S. & Šturdík, E. (2000). Amylolytic enzymes: their specificities, origins and properties. Biologia, Bratislava, 55(6) 605–615.

Hu, C.B., Malaphan, W., Zendo, T., Nakayama, J., Sonomoto, K. (2010). Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. Appl. Environ. Microbiol.

Huggins, A.M., Sandine, W.E. (1984). Differentiation of Fast

and Slow Milk Coagulating Isolates in Strains of Streptococci. Journal of Dairy Science. 67 (8), 1674–1679

Huligere, S.S., Kumari C.V. B., Patil, S.M., Jayanthi M.K., Wong, L.S., Kijssomporn, J., Al-Tamimi, J.H., Ramu, R. (2024). Sauerkraut-derived LAB strains as potential probiotic candidates for modulating carbohydrate digestion attributing bacterial organic acid profiling to antidiabetic activity

Huss, H.H (1999). La qualité et son évolution dans le poisson frais In FAO. Document technique sur les pêches. N°348. Rome, pp. 1–98. Laboratoire de technologie Ministères de l'agriculture et des pêches Danemark. Organisation Des Nations Unies Pour l'Alimentation et l'Agriculture. M-47 ISBN 92-5-203507-9.

Hyewon, K., Naeun, O., Kwon, O.H., Seockmo, K., Jeongmin, S., Sangho, R. (2022). Exopolysaccharide of *Enterococcus faecium* L15 promotes the osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via p38 MAPK pathway. Stem Cell Res. Ther. 13(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/s13287-022-03151-0

Ianieva, O. D., & Ogirchuk, K. S. (2018). Yeasts associated with salted herring and brine,

Ukraine. Microbiology journal. 80(2), 80–91. https://doi.org/10.15407/microbiol_j80.02.080

Illikoud, N., Jaffrès, E., Zagorec, M. (2018). *Brochothrix thermosphacta*. 1-17

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53, 853–857.

Indumathi, K. P., Kaushik, R., Arora, S., & Wadhwa, B. K. (2015). Evaluation of iron fortified Gouda cheese for sensory and physicochemical attributes. *Journal of Food*

Iorizzo, M., Albanese, G., Testa, B., Ianiro, M., Letizia, F., Succi, M., Tremonte, P., D'Andrea, M., Iaffaldano, N., Coppola, R. (2021). Presence of Lactic Acid Bacteria in the Intestinal Tract of the Mediterranean Trout (*Salmo macrostigma*) in Its Natural Environment. *Life*. 11, 667. <https://doi.org/10.3390/life11070667>.

Iwamoto, H., Matsubara, T., Okamoto, T., Matsumoto, T., Yoshikawa, M., and Takeda, Y. (2019). Ingestion of casein hydrolysate induces oral tolerance and suppresses subsequent epicutaneous sensitization and development of anaphylaxis reaction to casein in mice. *Int. Arch. Allergy Imm.* 179, 221–230. Doi: 10.1159/000497410

Jacquet, S., Baudoux, A.-C., Desdevises, Y., Le Guyader, S. (2023). LES VIRUS MARINS. Quae. Quae, Enjeux science, ISBN : 978-2-7592-3526-1. fflal-04017648

Janda, J.M., Abbott, S.L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical microbiology reviews*. 23, 35–73.

Jaouani, I.; Abbassi, M.S.; Ribeiro, S.C.; Khemiri, M.; Mansouri, R.; Messadi, L.; Silva, C.C.G. (2015). Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia. *J. Appl. Microbiol.* 119, 1089–1100.

Javed, A., Masud, T., Imran, M., Maqsood, S. (2011). Enterocins of *Enterococcus faecium*, emerging natural food preservatives. *Ann. Microbiol.* 61, 699–708. DOI 10.1007/s13213-011-0223-8

Johansen, P., and Jespersen, L. (2017). Impact of quorum sensing on the quality of fermented foods. *Curr. Opin. Food Sci.* 13, 16–25. Doi: 10.1016/j.cofs.2017. 01.001

José, M., Burgos, G., Pulido, R.P., Aguayo, M.d.L., Gálvez, A., Lucas, R. (2014). The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 22706–22727.

Kalam, A. (2019). Thermal stability and pH tolerance of antimicrobial producing bacteria isolated from spoiled food. *Life science Informatics Publications*, 5(2), 711-719. DOI: 10.26479/2019.0502.52

Karam, N.E., Dellali, A., Zadi-Karam, H. (2012). Lipolytic Activity from Lactic Bacteria. *Recent Research in Ruminants*. 19,1.

Karunasagar, I. (2015). Bacterial pathogens associated with aquaculture products. In A. Sing (Ed.), *Zoonoses-infections affecting humans and animals* (pp. 125–158). Berlin, Germany: Springer.

- Kaushik, R., & Arora, S. (2017).** Effect of calcium and vitamin D 2 fortification on physical, microbial, rheological and sensory characteristics of yoghurt. *International Food Research Journal*, 24(4)
- Kavitake, D., Bruntha, P., Devi, C., Delattre, G.B., Reddy, P.H., Shetty, P.H. (2023)** Exopolysaccharides produced by *Enterococcus* genus. An overview. *International Journal of Biological Macromolecules*. 226, 111–120.
- Kempler, G. & Mckay, L. 1980.** Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Applied Environment Microbiology*, 39, 926-927.
- Khalkhali, S., Mojjani, N. (2017).** Bacteriocinogenic potential and virulence traits of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* isolated from human milk. *I. J. M.* 9 (4), 224–233.
- Khan, H., Flint, S., Yu, P., Yu, C.P.-L., Group, B. (2013).** Determination of the mode of action of enterolysin A, produced by *Enterococcus faecalis* B9510. *J. Appl. Microbiol.* 115, 484–494.
- Khouiti, Z., and Simon, J.P. (1997).** Detection and partial characterization of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* 213. *J. of Industr. Microbiol. & Biotechnol.* 19, 28–33
- Kilpper-Bälz, R., Fischer, G. & Schleifer, K.H. (1982).** Nucleic acid hybridization of group N and group D streptococci. *Curr. Microbiol.* 7: 245–50.
- Kim, M.J., Jung, M. and Kim, W.J. (2015).** Antilisterial Effect of Bacteriocin SH01, Obtained from *Enterococcus faecium* SH01, in Ground Beef. *Food Sci. of Animal Resources.* 35(2), 211–215. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.2.211>
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution.* 16, 111–120.
- Klaenhammer TR, Barrangou R, Buck BL, Azcarate-Peril MA, Altermann E. (2005).** Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev.* 29 (3), 393–409. DOI:10.1016/j.femsre.2005.04.007.
- Klaenhammer, T. R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 12(1-3), 39-85.
- Klaenhammer, T.R., Altermann, E., Pfeiler, E., Buck, B.L., Goh, Y.J., O’Flaherty, S. (2008).** Functional genomics of probiotic *Lactobacilli*. *J Clin Gastroenterol.* 42 S160–162. doi:10.1097/MCG.0b013e31817da140.
- Kontominas, M.G. (2014).** Seafood: In *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition). <https://w.w.w.sciencedirect.com/referencework/9780123847331/encyclopedia-of-food-microbiology>

- Korcz, E. & Varga, L. (2021).** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 375–384.
- Kordesedehi, R., Taheri-Kafrani, A., Rabbani-Khorasgani, M., Kazemi, R., Mutangadura, D., and Haertle, T. (2018).** Modification of IgE binding to α S1- casein by proteolytic activity of *Enterococcus faecium* isolated from Iranian camel milk samples. *J. Biotechnol.* 27, 10–14.
- Krawczyk, B., Wityk, P., Gałęcka, M., Michalik, M. (2021).** The Many Faces of *Enterococcus* spp.—Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. *Microorganisms*. 9, 1900.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016).** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33, 1870–1874.
- Kumari S, Sharma S, Kaundal K. (2018).** Production, purification and efficacy of bacteriocin isolated from natural lactic acid fermentation of wild Himalayan fig fruit. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 12(2): 879–885.
- Kumariya, R., Garsa, A., Rajput, Y., Sood, S., Akhtar, N., and Patel, S. (2019).** Bacteriocins: classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis* 128, 171–177.
- Kumariya, R., Garsa, K.A., Y.S. Sood, R.S.K., Akhtar, N., Patel, S. (2019).** *Microbial Pathogenesis*. 1–33.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>
- Laemmli, U. K. (1970).** "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4". *Nature*. 227 (5259), 680–685.
doi : 10.1038/227680a0
- Lahtinen, S., Salminen, S., Ouwehand, A., Wright, A.V. (2011).** Lactic acid bacteria, Microbiological and functional aspects. 4th ed. Boca Raton: CRC Press.
- Lambuk, F., Mazlan, N., Thung, T.Y., New, C.Y., Rinai, K.R. and Son, R. (2022).** A review of lactic acid bacteria isolated from marine animals: their species, isolation site and applications. *Food Research* 6 (1), 311 – 323.
<https://www.myfoodresearch.com/>
- Langa, S. Martin-Cabrejas, I., Montiel, R., Peiroten, A., Arques, J.L., Medina, M. (2018).** Protective effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in semi-hard cheese. *Journal of food control*. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.08.004.
- Langa, S., Landete, J. M., Martín-Cabrejas, I., Rodríguez, E., Arqués, J. L., & Medina, 391 M. (2013).** In situ reuterin production

by *Lactobacillus reuteri* in dairy products. *Food Control*, 33, 200–206.

Langa, S., Martín-Cabrejas, I., Montiel, R., Landete, J. M., Medina, M., & Arqués, J. L. (2014). Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens. *Journal of Dairy Science*, 97, 61166–121.

Larpent, J.P. (1997). Microbiologie des viandes. In : Larpent (eds). *Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire*. Lavoisier. Paris. 860–870

Lauzon, H. L., Ringø, E. (2011). “Prevalence and application of lactic acid bacteria in aquatic environments,” in *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 4th Edn, eds S. Lahtinen, A. Ouwehand, S. Salminen, and A.

Le Blanc D., 2006. *Enterococcus*. *Prokaryotes*, 4, 175-204.

Le Fur, B., Wacogne, D., Lorre, S., Pilet, M.F., Leroi, F. (2013). Applications de la biopréservation via des cultures microbiennes dans la filière des produits de la mer. In : *Flores protectrices pour la conservation des aliments*. Zagorec, Christeians. Editions Quae

Le Luherne, E. & caillot, E. (2018). Définition d'un protocole national de surveillance scientifique des "Fonctions écologiques des prés salés (ouverts à la mer) pour l'ichtyofaune" et sa mise en place sur le Bassin Seine-Normandie en 2017.

Observatoire du Patrimoine Naturel Littoral (RNF-AFB) Rapport final – convention de partenariat AAMP/16/047.

<https://www.researchgate.net/publication/352992820>

Lebreton, F., Willems, R.J.L. and Gilmore, M.S. (2014). *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In Gilmore M.S., Clewell D.B., Ike Y., et al. (eds). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. pp. 1– 45. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Leclerc, H., Gaillard, F.L. et Simonet, M. (1994). Les grands groupes de bacteries. In : *Microbiologie générale : La bactérie et le monde microbien*. DOIN. Paris. 445

Lee, J., Gibson, D., Shewan, J.M. (1977). A numerical taxonomic study of some *Pseudomonas*-like marine bacteria. *Microbiology*. 98, 439–451.

Lee, M.R., Tsai, C.J., Teng, S.H., Hsueh, P.R. (2015a). Identification of *Weissella* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Front. Microbiol.* 6, 1246.

Lee, S.H., Jung, J.Y. Lee, S.H. & Jeon, C.O. (2011). Complete genome sequence of *Leuconostoc kimchii* strain C2, isolated from kimchi. *J. Bacteriol.* 193, 5548.

Lee, S.H., Ku, H.J., Ahn, M.J., Hong, J.S., Lee, S.H., Shin, H., Lee, K.C., Lee, J.S., Ryu, S., Jeon, C.O., Lee, J.H. (2015b).

Weissella jogaejeotgali sp. nov., isolated from jogae jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4674–4681.

Leisner, J.J., Laursen, B.G., Prévost, H., Drider, D., Dalgaard, P. (2007). Carnobacterium: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiology Reviews.* 31, 592–613.

Leisner, J. J., Gram, L. (2014). FISH | Spoilage of Fish: In *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition). <https://w.w.w.sciencedirect.com/referencework/9780123847331/encyclopedia-of-food-microbiology>

Leisner, J.J., Gram, L. (1999). FISH | Spoilage of Fish : In *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition). <https://w.w.w.sciencedirect.com/referencework/9780123847331/encyclopedia-of-food-microbiology>

Leppänen, M., Sundberg, L.R., Laanto, E., de Freitas Almedia, G.M., Papponen, P., Maasilta, I.J. (2017). Bioimaging: Imaging Bacterial Colonies and Phage-Bacterium Interaction at Sub-Nanometer Resolution Using Helium-Ion Microscopy (*Adv. Biosys.* 8/2017).

Leroi, F. (2009). Bactéries lactiques et applications alimentaires : Partie 2 : les produits de la mer In :

"Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications Industrielles des bactéries lactiques" Drider et Prévost coordonnateurs, Préface Dr. Gruss, A., Chapter V, Pages 459-47

Leroi, F. (2014). Des bactéries marines pour la conservation des aliments. *Biofutur.* (360), 33–35. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00241/35192/>

Leroi, F., Joffraud, J., Chevalier, F., Cardinal, M. (1998). Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *International journal of food microbiology* 39, 111–121.

Letunic, I., Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic acids research.* 47 (1), 256–259.

Leveau, J.V., Bouix, M. et Deroissat, H. (1991). Techniques d'analyses et de contrôles dans les industries agro-alimentaires : le contrôle microbiologiques, 2^{ème} édition, Techniques & Documentation. Lavoisier, Paris, pp ; 125–183.

Lianou, A., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. (2016). Microbiological spoilage of foods and beverages. In P. Subramaniam (Ed.). *The stability and shelf life of food* (pp. 3-42). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100435-7.00001-0>

Liu, G., Ren, L., Song, Z., Wang, C., Sun, B. (2015). Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium animalis* BB04

from centenarians' intestine. *Food Control*. 50, 889–895.

Liu, S, Fan, W., Zhong, S., Ma, C., Li, P., Zhou, K., Peng, Z., Zhu, M. (2010). Quality evaluation of tray-packed tilapia fillets stored at 0°C based on sensory, microbiological, biochemical and physical attributes. *African Journal of Biotechnology*. 9(5): p. 692–701.

Liu, S.Q. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International journal of food microbiology*, 83, 115–131.

Liu, W. Pang, H. Zhang, H., Cai, Y. (2014). Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. In: H. Zhang and Y. Cai (eds.), *Lactic Acid Bacteria*.

Liu, W., Zhang, L., Shi, J. et al. (2015). “Assessment of the safety and applications of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* Y31 as an adjunct culture in North-eastern Chinese traditional fermentation paocai,” *Food Control*, vol. 50, pp. 637–644, 2015.

Loeffler, M., Hilbig, J., Velasco, L. & Weiss, J. (2020). Usage of in situ exopolysaccharide-forming lactic acid bacteria in food production: meat products—a new field of application? *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19, 2932–2954.

Losteinkit, C., Uchiyama, K., Ochi, S., Takaoka, T., Nagahisa, K., Shioya, S. (2001). Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 390–395

Ludwig D.S., Kabat Zinn, J. (2008). Mindfulness in medicine. *Jama*. 300, 11–1350.

Ludwig W, Seewaldt E, Kilpper-Ba" LZR, Heinz K, Magrum L, Woese C.R. (1985). The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Gen. Microbial.* 131(3), 543–551.

Ludwig W, Weizenegger M, Kilpper-Ba"lz R, Schleifer K. (1988). Phylogenetic relationships of anaerobic streptococci. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38(1), 15–18

Lynch, K.M., Coffey, A. & Arendt, E.K. (2018). Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products. *Food Research International*, 110, 52–61.

Mac Donell, M., Colwell, R. (1985). Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst. Appl. Microbiol.* 6, 171–182.

Maicas, S., Ferrer, S., Pardo, I. (2002). NAD (P) H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. *Microbiol.* 148, 325–332

Maijala, R.L. (1993). Formation of histamine and tyramine by some by some lactic acid bacteria in

- MRS broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology*. 17, 40–43.
- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E. (2006).** Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103(42),15611–6. Doi: 10.1073/pnas.0607117103.
- Makawa, Z., Kapute, F., Valeta, J. (2014).** Effect of delayed processing on nutrient composition, pH and organoleptic quality of pond-raised tilapia (*Oreochromis shiranus*) stored at ambient temperature. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 14(3).
- Makhloufi, K. M. (2012).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- Maky, M. A., Ishibashi, N., Zendo, T., Perez, R. H., Doud, J. R., Karmi, M., et al. (2015).** Enterocin F4-9, a novel O-linked glycosylated bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 4819–4826. Doi: 10.1128/AEM.00940-15
- Marian M. Cahill (1990).** Bacterial Flora of Fishes: A Review. Microbial Ecology Springer-Verlag New York Inc.
- Martín-Cabrejas, I., Langa, S., Gaya, P., Rodríguez, E., Landete, J. M., Medina, M., & 407 Arqués, J. L. (2017).** Optimization of reuterin production in cheese by *Lactobacillus 408 reuteri*. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1346–1349
- Martínez, B., Böttiger, T., Schneider, T., Rodríguez, A., Sahl, H.G. and Wiedemann, I. (2008).** Specific interaction of the unmodified bacteriocin Lactococcin 972 with the 562 cell wall precursor lipid II. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4666–4670.
- Martin-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M. (2009).** Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 132, 24–32.
- Massa, S. (2014).** *Lactobacillus plantarum* as a Strategy for an In situ Production of Vitamin B2. *Journal of Food & Nutritional Disorders*, s1 (01), 1–5. doi:10.4172/2324-9323.S1-004
- Masuda, M., Ide, M., Utsumi, H., Niiro, T., Shimamura, Y. and Murata, M. (2014).** Production Potency of Folate, Vitamin B12, and Thiamine by Lactic Acid Bacteria Isolated from Japanese Pickles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(11), 2061–2067. <https://doi.org/10.1271/bbb.120414>
- McLean, R.A., Sulzbacher, W.L. (1953).** Microbacterium thermosphactum, specnov; a non heat resistant bacterium from fresh pork sausage. *Journal of Bacteriology*. 65, 428–433.
- Médale, F., Lefevre, F., & Corraze, G. (2003).** Qualité nutritionnelle

et diététique des poissons : Constituants de la chair et facteurs de variations : Poissons. Cahiers de Nutrition et de Diététique. 38(1), 3744.

Meghdas, I., Hamze, M., Dabboussi, F., Baida, N., Izard, D. (2004). Taxonomie du genre pseudomonas : rétrospective et actualité. Leban. Sci. J. 5(1).

Merrifield D. L., Balcázar J. L., Daniels C., Zhou Z., Carnevali O., Sun Y.-Z., et al. (2014). "Indigenous lactic acid bacteria in fish and crustaceans," in Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics, (eds) Merrifield D. L., Ringo E. (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons), 128–168. 10.1002/9781118897263.

Merrifield, D. L., and Rodiles, A. (2015). "The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues," in Mucosal Health in Aquaculture, ed. E. Peatman (San Diego, CA: Academic Press), 273–295.

Migaw, S., Ghairi, T., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Berjeaud, J.M., Chobert, J.M., Hani, K., Haertle, T. (2014). Diversity of bacteriocino-genic lactic acid bacteria isolated from Mediter-ranean fish viscera. World Journal of Microbi-ology and Biotechnology. 30, 1207–1217.

Migula, W. (1894). On a new system of bacteria. Arb Bacteriol Inst Karlsruhe. 1, 235–328.

Mion, S., Rémy, B., Plener, L., Chabrière, E., Daudé, D. (2019). Quorum sensing et quorum quenching Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence ? médecine/sciences. 35(1), 31–8.

<https://doi.org/10.1051/medsci/2018310>

Mishra C., Lambert J. Production of anti-microbial substances by probiotics. Asia Pacific J.Clin.Nutrition (1996), .5, 20–24

Mittal, M., Thakur, A., Kaushik, R., & Chawla, P. (2020). Physicochemical properties of Ocimum sanctum enriched herbal fruit yoghurt. Journal of Food Processing and Preservation, e14976. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14976>.

Moeller, V. (1955). Simplified tests of some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. 36, 158-172.

Mokoena, M.P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their

Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A MiniReview. Molecules 22, 1255. Doi: 10.3390/molecules22081255.

<http://www.mdpi.com/journal/molecules>

Monnet, C., Pernoud, S., Sepulchre, A., Fremaux, C., Corrieu, G. (2004). Selection and Properties of *Streptococcus thermophilus* Mutants Deficient in Urease. Journal of Dairy Science. 87, 1634–1640.

- Montel, M.C., Talon, R., Fournaud, J., Champomier, M.C. (1991).** Lactobacillus and Carnobacterium spp. from meat. J. of App. Bacteriol. 70, 469–472
- Montiel, R., Martín-Cabrejas, I., Langa, S., El Aouad, N., Arqués, J. L., Reyes, F., & Medina, M. (2014).** Antimicrobial activity of reuterin produced by Lactobacillus 415 reuteri on Listeria monocytogenes in cold-smoked salmon. Food Microbiology, 44, 416 1–5.
- Moosavi-Nasab, M., Abedi, E., Moosavi-Nasab, S. and Eskandari, M.H. (2014).** Inhibitory Effect of Isolated Lactic Acid Bacteria from *Scomberomorus commerson* Intestines and Their Bacteriocin on *Listeria innocua*, Iran Agriculture Research, 33(1), 43–52. <https://doi.org/10.22099/IAR.2014.2380>
- Morandi, S., Cremonesi, P., Povo, M., Brasca, M. (2012).** Enterococcus lactis sp. nov., from Italian raw milk cheeses. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62, 1992–6.
- Moreno, M. R. F., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J. & De Vuyst, L. (2003).** Isolation and biochemical characterization of enterococci produced by enterococci from different sources. J. of Appl. Microbiol. 94, 214–229
- Moulay, M., Aggad, H., Benmechrenene, Z., Guessas, B., Henni, D. & Kihal, M. (2006).** Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and their proteolytic activity.
- World Journal of Dairy Food and Sciences, 1, 12–18.
- Mrkonjic Fuka, M.; Zgomba Maksimovic, A.; Tanuwidjaja, I.; Hulak, N.; Schlöter, M. (2017).** Characterization of enterococcal community isolated from an artisan Istrian raw milk cheese: Biotechnological and safety aspects. Food Technol. Biotechnol. 55, 368–380
- Müller, S., von Bonin, S., Schneider, R., Krüger, M., Quick, S. and Schröttner, P. (2023).** Shewanella putrefaciens, a rare human pathogen: A review from a clinical perspective Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 10.3389/fcimb.2022.1033639
- Muzaddadi, A.U., Devatkal, S., Oberoi, H.S. (2016).** Chapter– 9 Seafood enzymes and their application in food processing. In: Dhillon, G.S., Kaur, S. (Eds.). Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 201–232.
- Negash, A.W., Tsehai, B.A. (2020).** Current Applications of Bacteriocin. International Journal of Microbiology. 1–7 <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J.M., Palop, L., Cabezas, L. (2010).** Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego

cheese manufacture. Food Microbiology. 27(1), 85–93.

Nilsson I., NG Y.Y., Christiansen J.N., Jorgensen B.L., grotinum d., GRAM, L. (2004). The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. Journal of Applied Microbiology. 96, 133– 143.

Novoslavskij, A., Terentjeva, M., Eizenberga, I., Valcin, a, O., Bartkevičs, V., Berzin, S, A. (2016). Major Foodborne pathogens in fish and fish products: A review.

Annals of Microbiology, 66(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1102-5>

Nicholson, W.L., Davis, C.L., Shapiro, N., Huntemann, M., Clum, A., Reddy T. B. K., Manoj Pillay, M., Markowitz, V., Varghese, N., Pati, A., Ivanova, N., Kyrpides, N., Woyke, T. (2016). An improved high-quality draft genome sequence of *Carnobacterium inhibens* subsp. *inhibens* strain K1T. Standards in Gen. Sci. 11, 65. DOI 10.1186/s40793-016-0193-3

Nieminen, T.T., Säde, E., Endo, A., Johansson, P., Björkroth, J. (2014). The Family Leuconostocaceae. In The Prokaryotes, 4 th ed., Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 215–240.

O'Bryan, C.A., Crandall, P.G., Ricke, S.C. and Ndahetuye, J.B. (2015). Lactic Acid Bacteria (LAB) as Antimicrobials in Food Products: Types and Mechanisms of Action. In Taylor, T.M. (Ed.) Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality, p. 117–136. USA: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-1-78242-034-7.00006-2>

Ocaña, V.S. et Nader-Macías, M.E. (2004). Production of Antimicrobial Substances by Lactic Acid Bacteria II. Screening Bacteriocin-Producing Strains With Probiotic Purposes and Characterization of a *Lactobacillus* bacteriocin

Orla-Jensen S. (1919). The lactic acid bacteria Fred Host and Son. Copenhagen. 21–7.

Ozyurt, G., Kuley E, Ozkutuk, S., Ozogul, F. (2009). Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. Food chemistry. 114(2), p. 505–510.

Padonou, W.S., Schillinger, U., Nielsen, D.S. et al. (2010). *Weissella beninensis* sp.

nov., a novel motile lactic acid bacterium species isolated from submerged cassava fermentations in Benin. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 2193–8.

Pal, M., Ketema, A., Manyazewal Anberber, M., Mulu, S., & Yashodhara Dutta, Y. (2016). Microbial quality of fish and

fish products. *Beverage & Food World*, 43(2), 46-49.

Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50, 521–542.

Passerini, D., Kolypczuk, L., Macé, S., Pilet, M.F., Leroi, F. (2021). Biopréservation des produits de la mer avec des bactéries marines. DOI: 10.51257/a-v1-bio9240

Patil, S. M., Shirahatti, P. S., & Ramu, R. (2022). *Azadirachta indica* A.Juss (neem) against diabetes mellitus: A critical review on its phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 74, 681–710. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgab098>

Perez, R.H., Zendo, T., Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microb. Cell Fact.* 13, S3.

Qu, J.-H., Li, H.-F., Yang, J.-S., Yuan, H.-L. (2008). *Flavobacterium cheniae* sp. nov. A new species isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Quinto, E.J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J. and Gírbés, T. (2014). Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*,

5, 1765-1775. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2014.518190>

Radojevic, I.D., Stankovic, M.S., Stefanovic, O.D., Topuzovic, M.D., Comic, L.R., Ostojic, A.M. (2012). Great horsetail (*Equisetum telmateia* Ehrh.): active substances content and biological effects. *Excli J.* 11:59–67

Raimondi, S., Spampinato, G., Candeliere, F., Amaretti, A., Brun, P., Castagliuolo, I., Rossi, M. (2021). Phenotypic Traits and Immunomodulatory Properties of *Leuconostoc carnosum* Isolated From Meat Products. *Front. Microbiol.* 12, 730827.

Rathod, N.B., Nirmal, N.P., Pagarkar, A., Özogul, F. and Rocha, J.M. (2022). Review Antimicrobial Impacts of Microbial Metabolites on the Preservation of Fish and Fishery Products. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040773>

Rawat, S. (2015). Food spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(4), 47-56.

Ray, B. & Daeschel, M. (1992). *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Razooqi Hussein, A. (2022). Foods Bio-preservation: A Review. *International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 9(3), 212–217. <http://www.ijrasb.com/>

Ribeiro, S.C.; Coelho, M.C.; Todorov, S.D.; Franco, B.D.G.M.; Dapkevicius, M.L.E.; Silva, C.C.G. (2014). Technological properties of bacteriocin-producing lactic

acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. *J. Appl. Microbiol.* 116, 573–585

Richard, C., Leroi, F., Brillet, A., Rachman, C., Connil, N., Drider, J., Pilet, M.F., Onno, B., Dousset, X., Prevost, H. (2004). Maîtrise du développement de *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé : intérêt de la biopréservation par des bactéries lactiques. *Bibliomer. Lait.* 83 (28). 1–10

Ringø, E., Wesmajervi, M. S., Bendiksen, H. R., Berg, A., Olsen, R. E., Johnsen, T., et al. (2001). Identification and characterization of carnobacteria isolated from fish intestine. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 183–191. doi: 10.1078/0723-2020-00020.

Ringø, E., and Birkbeck, T. H. (1999). Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquac. Res.* 30, 73–93. doi: 10.1046/j.1365-2109.1999.00302.x

Ringo, E., Holzapfel, W. (2000). Identification and characterization of carnobacteria associated with the gills of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Syst. Appl. Microbiol.*

Ringo, E., Hosseinifar, S.H., Ghosh, K., Doan, V.H., Beck, B.R., Song, S.K. (2018). Lactic Acid Bacteria- An Update. *Front. Microbiol.* 9, 1818. Doi: 10.3389/fmicb.2018.01

Rivas, F.P., Castro, M.P., Vallejo, M., Marguet, E., & Campos, C.A. (2012). Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from ewes' milk and cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 428–436. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.005>

Rohde, M. (2024). Electron microscope image. <https://doi.org/10.13145/bacdiv6867.20240510.9>

Rombout, J. H., Abelli, L., Picchiatti, S., Scapigliati, G., Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 616–626. doi: 10.1016/j.fsi.2010.09.001

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal.* 12, 163–171

Rungrasamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Chaiyapechara, S., Jiravanichpaisal, P., Karoonuthaisiri, N. (2014).

PLOS. One. 9(3), e91853
Doi: 10.1371/journal.pone.0091853

Ruskol, D. and P. Bendsen (1992). Invasion of *S. putrefaciens* during spoilage of fish. *Technological Laboratory and the Technical University. Denmark.*

Russo, P., Iturria, I., Mohedano, M. L., Caggianiello, G., Rainieri, S., Fiocco, D., Angel Pardo, M.,

- Lopez, P. & Spano, G. (2015).** Zebrafish gut colonization by mCherry-labelled lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 3479–3490.
- Sahoo, T.K., Jena, P.K., Patel, A.K. & Seshadri, S. (2014).** Bacteriocins and their applications for the treatment of bacterial diseases in aquaculture: a review. *Aquaculture Research*, 2014, 1–15 doi:10.1111/are.12556
- Sahu, M., & Bala, S. (2017).** Food processing, food spoilage and their prevention: An overview. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 3(1), 753–759. <https://doi.org/10.21276/ijlssr.2017.3.1.1>
- Saitou, N., Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4), 406–425.
- Samet-Bali, O., Bellila, A., Ayadi, M.-A., Marzouk, B., Attia, H. A (2020).** Comparison of the physicochemical, microbiological and aromatic composition of Traditional and Industrial Leben in Tunisia. *Int. J. Dairy Technol.* 63, 98–104.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 74(12), 5463–5467.
- Sass, P, Jansen A, Szekat, C, Sass, V, Sahl, HG, Bierbaum, G. (2008).** The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*, 8(1), 186. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-8-186>
- Satomi, M., Vogel, B.F., Gram, L., Venkateswaran, K. (2006).** *Shewanella hafniensis* sp. nov. and *Shewanella morhuae* sp. nov., isolated from marine 295 fish of the Baltic Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 243–249.
- Satomi, M., Vogel, B.F., Venkateswaran, K., Gram, L. (2007).** Description of *Shewanella glacialis* sp. nov. and *Shewanella algidipiscicola* sp. nov., isolated from marine fish of the Danish Baltic Sea, and proposal that *Shewanella affinis* is a later heterotypic synonym of *Shewanella colwelliana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 347–352. DOI: 10.1099/ijs.0.64708-0
- Satomi, M. (2014).** *Shewanella*: In *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition).
- Savijoki, K., Ingmer, H. & Varmanen, P. (2006).** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 394–406.
- Schillinger, U., Lucke, F.K. (1987).** Identification of lactobacilli from

- meat and meat products. Food Microbiol. 4, 199–208.
- Schillinger, U. & Lücke, K. (1989).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55, 1901-1906.
- Schirru, S., Todorov, S. D., Favaroc, L., Pasqualina Mangia, N., Basaglia, M., Casella, S., Comunian, R., Gombossy de MeloFranco, B.D., Deiana, P. (2012).** Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. Food Control. 25(1), 309–320.
- Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W., Amann, R. (1995).** Application of molecular method for the classification and identification of lactic acid bacteria. International Journal of Dairy Science. 5(8), 1081–1094.
- Schmid, J., Sieber, V. & Rehm, B. (2015).** Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. Frontiers in Microbiology. 6, 496
- Schoch, C.L., et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford) (2020).** NCBI Taxonomy Browser.
- Sha, Y., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Sun, G. and Wang, L. (2016).** Gut Bacterial Diversity of Farmed Sea Cucumbers *Apostichopus japonicus* with Different Growth Rates. *Microbiology*, 85(1), 109–115. <https://doi.org/10.1134/S0026261716010112>
- Shah, D., Varahan, S. (2024).** *Enterococcus faecalis*: Trends in Microbiology. 32(9), 925-926. <https://www.cell.com>
- Sharma, K., Kaur, S., Singh, R., Kumar, N. (2021).** Classification and mechanism of bacteriocin induced cell death: a review. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 11 (3), e3733, 1–10 <https://doi.org/10.15414/jmbfs.3733>
- Sharma, G., Dang, S., Gupta, S., Gabrani, R. (2018).** Antibacterial Activity, Cytotoxicity, and the Mechanism of Action of Bacteriocin from *Bacillus subtilis* GAS101. *Med Princ Pract.* 27(2), 186–192. <https://doi.org/10.1159/000487306>
- Sharma, S., Kaushik, R., Sharma, S., Chuhan, P., & Kumar, N. (2016).** Effect of herb extracts on growth of probiotic cultures. Indian Journal of Dairy Science, 69(3).
- Sheng, L. et Wang, L. (2020).** The microbial safety of fish and fish products: Recent advances in understanding its significance, contamination sources, and control strategies. DOI: 10.1111/1541-4337.12671 Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety.
- Shewan J.M. (1961).** The microbiology of seawater fish. In: Borgstrom G (ed) Fish as food, vol I. Academic Press, London, pp 487-560
- Shewan, J.M. (1962).** The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. In Recent advances in food science, vol. 1: 167–193, Ed J. Hawthorn and J. Muil Leitch. Londres, Butterworths

- Shewan, J.M., Hobbs, G., Hodgkiss, W. (1960).** The Pseudomonas and Achromobacter groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 463-468.
- Shewan, J.M., Murray, C.K. (1979).** The microbial spoilage of fish with special reference to the role of psychrophiles. In *Cold Tolerant Microbes in Spoilage and the Environment* eds Russell, A.O. & Fuller, R., pp, 117-136, Society of Applied Bacteriology, Technical Series, No. 13. New York & London: Academic Press
- Silva, CC, Silva, SP, Ribeiro, SC. (2018).** Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Front Microbiol.* 9 (594).
- Silva, L., Netto, J., and Cardarelli, H. (2019).** Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*: technological and potential application in the food industry. *Annals of Microbiology*, 69(4), 321-328.
<https://doi.org/10.1007/s13213-019-01456-9>
- Singh, R., Walia, A., Mehra, R., Kumar, H. (2020).** Sensory and nutritional qualities of multi-grain cookies supplemented with different Level of Rice Bran.
- Singh, V.P. (2018).** Recent approaches in food bio-preservation - a review. *Open Veterinary Journal*, 8(1), 104-111.
<http://dx.doi.org/10.4314/ovj.v8i1.16>
- Soares, M.D.K.G., Facundes, B.C., Júnior, A.F.C. and da Silva, E.M. (2015).** Assessment of lipolytic activity of isolated microorganisms from the savannah of the Tocantins. *ActaScientiarum Biological Sciences.* 37(4), 471–475.
- Sneath, P.H.A., Jones, D. (1976).** *Brochothrix*, a new genus tentatively placed in the family Lactobacillaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 26, 102–104.
- Sneath, P.H.A., Jones, D. (1986).** Genus *Brochothrix*. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., vol. 2. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., pp. 1249–1253.
- Sridhar, V.R., Hughes, J.E., Welker, D.L., Broadbent, J.R., Steele, J.L. (2005).** Identification of Endopeptidase Genes from the Genomic Sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the Role of These Genes in Hydrolysis of Model Bitter Peptides. *Applied and Environmental Microbiology.* 71(6), 3025–3032.
- Steinkraus, K.H. (1997).** Classification of fermented food, worldwide review of household fermentation technique. *Food Cont.* 8, 311-317.
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, Wamelink, M.M.C. et al. (2015).** The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Bioll. Rev. Camb. Philos Soc.* 90, 927–963. DOI: 10.1111/brv.12140

- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M., Campbell, K., Cheung, E., Stucki, K., Nendas, M., Harbarth, S. (2014).** Infections à entérocoques : du plus simple au plus complexe... In : *Revue médicale suisse*. 10 (446), 1920–1923.
<http://www.revmed.ch/rms/2014/RMS-N-446/Infections-a-enterocoques-du-plus-simple-au-plus-complexe>
- Stoffels G., Nissen-Meyer, J., Gudmundsdottir, A., Sletten, K., Holo, H., Nes, I.F. (1992)** Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *App. and Environ. Microbiol.* 58, 5, 1417–1422
- Sun, Z., Yu, J., Dan, T., Zhang, W., Zhang, H. (2014).** Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria. In:
Zhang, H., Cai, Y. (eds.), *Lactic Acid Bacteria: Fundamental and Practice*. pp. 1–80.
DOI 10.1007/978-94-017-8841-0.
- Sun, Z., Wang, X., Zhang, X., Wu, H., Zou, Y., Li, P. et al. (2018).** Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane. *J India Microbiol Biotechnol.* 45, 213–27
- Suskovic, J., Kos, B., Beganovic, J., Labos, A., Pavunc, A.L., Habjanic, K. and Matosic, S. (2010).** Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* 48 (3), 296–307
- Sutyak, KE, Wirawan, RE, Aroutcheva, AA, Chikindas, ML. (2008).** Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology.* 104(4), 1067–1074. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03626.x>
- Syukur, S., Fachrial, E. and Jamsari (2014).** Isolation, Antimicrobial Activity and Protein Bacteriocin Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dadih in Solok, West Sumatera, Indonesia. *RJPBCS*, 5(6), 1096.
- Szutowska, J. (2020).** Functional Properties of Lactic Acid Bacteria in Fermented Fruit and Vegetable Juices: A Systematic Literature Review. *Eur. Food Res. Technol.* 246, 357–372.
- Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C., Lanorte, M.T. (2000).** A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese. *Journal of Applied Microbiology.* 89, 267–274.
- Švec, P. and Franz, C.M.A.P., 2014.** Genus *Enterococcus*: Chapter 15. In: Holzapfel, W.H. and Wood, B.J.B. (eds.) *Lactic acid bacteria – biodiversity and taxonomy*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK, pp. 175–211
- Švec, P., Devriese, L.A. (2015).** *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. Enterococcus*. In: Whitman, W.B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., Dedysh, S. (eds.), Wiley, J.,

- Sons, Ltd, Chichester, England.1–25.
- Taale, E., Savadogo, A., Zongo, C., Tapsoba, F., Karou, S.D., Traore, A.S. (2016).** Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne : cas des bactériocines. International Journal of Biological and chemical Sciences. 10(1), 384-399.
<http://ajol.info/index.php/ijbcs>
- Taban, B.M., Dogan, H.B., Halkman, A.K. (2014).** Biology of the *Enterococcus spp.* In: Encyclopedia of Food Microbiology (2 nd Ed). 652–657.
- Tahiluddin, A.B., Maribao, I.P., Amlani, M.Q., Sarri, J.H. (2022).** A Review on Spoilage Microorganisms in Fresh and Processed Aquatic Food Products. Food Bulletin, 1(1), 21-36.
<https://doi.org/10.29329/foodb.2022.495.05>
- Takeuchi, M., Fujiwara-Nagata E., Katayama T. & Suetake H. (2021).** Skin bacteria of rainbow trout antagonistic to the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. 11 (7518).
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-87167-1>.
- Talon, R., Grimont, P.A.D., Grimont, F., Gasser, F., Boeufgras, J.M. (1988).** *Brochothrix campestris* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 38, 99–102.
- Talwar, C., Nagar S., Lal R., Negi R.K. (2018).** Fish Gut Microbiome: Current Approaches and Future Perspectives. Indian J. Microbiol. doi.org/10.1007/s12088-018-0760-y.
- Tang, H., Huang, W., Yao, Y.-F. (2023).** The Metabolites of Lactic Acid Bacteria : Classification, Biosynthesis and Modulation of Gut Microbiota. Microb. Cell. 10, 49–62.
- Tanguler, H. (2014).** Importance of Yeasts and Lactic Acid Bacteria in Food Processing. In Food Processing: Strategies for Quality Assessment; Malik, A., Erginkaya, Z., Ahmad, S., Erten, H., Eds.; Food Engineering Series; Springer: New York, NY, USA. pp. 351–378. ISBN 978-1-4939-1378-7.
- Terzić-Vidojević, A., Veljović, K., Popović, N., Tolinački, M., Golić, N. (2021).** Enterococci from Raw-Milk Cheeses: Current Knowledge on Safety, Technological, and Probiotic Concerns. Foods. 10, 2753.
<https://doi.org/10.3390/foods10112753>
- Thapa, N., PAL, J. and Tamang, J.P. (2004).** Microbial diversity in ngari, hentak and tungtap, fermented fish products of North-East India. World J. Microbiol. Biotechnol. 6, 599–607.
<https://doi.org/10.1023/B:WIBI.000043171.91027.7e>
- Thapa, N., Pal, J. & Tamang, J.P. (2006).** Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish product of the Eastern Himalaya. Int. food Microbiol. 107, 33-38.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmic.2005.08.009>.

Thiercelin, M.E. (1899). Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. C. R. Séances Soc. Biol. 50, 269–271.

Tiwari, S.K., Srivastava, S. (2003). Purification and characterization of plantaricin LR14: A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 79, 759–767.

Tollis, S. (2014). La merveilleuse ingéniosité des bactéries. Tell me your science popularization blog, <https://tellyourscience.org/2014/03/03/la-merveilleuse-ingeniosite-des-bacteries/>

Trivedi, K., Cupakova, S., Karpiskova, R. (2011). Virulence factors and antibiotic re-sistance in enterococci isolated from foodstuffs. *Journal of Veterinary Medicine.* 56(7), 352–357.

Tsitko, I., Manninen, J., Smart, K., James, S., Laitila, A. (2018). Management of barley-associated bacterial biofilms: A key to improving wort separation. *J. Inst. Brew.* 124, 325–335. doi:10.1111/brv.12140

Unal Turhan, E., Erginkaya, Z., Bayram Turemis, A., Terkuran, M. (2018). Antibacterial Effect of Bacteriocinogenic Enterococci from Different Sources on *Listeria monocytogenes*. *J. of Agricult.*

DOI: 10.15832/ankutbd.448475

Üretimi, D. (2005). Production of dextran by newly isolated strains of *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-4 and PCSIR-9. *Türk Biyokimya Dergisi* [Turkish Journal of Biochemistry-Turk J Biochem], 31(1), 21-26.

Vaishali, Jhandai, P., Jadhav, V.J., Gupta, R. (2019). Bio-preservation of Foods: A Review. *European Journal of Nutrition & Food Safety*, 11(4), 164–174,

EJNFS.2019.023.

<http://www.sdiarticle4.com/review-history/53215>

Valcarce, D.G., Pardo, M.Á., Riesco, M.F., Cruz, Z., Robles, V. (2015). Effect of diet supplementation with a commercial probiotic containing

Pediococcus acidilactici (Lindner, 1887) on the expression of five quality markers in zebrafish (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)) testis. *J. Appl. Ichthyol.* 31, 18–21. <http://doi.org/10.1111/jai.12731>

Vogel, B. F., Venkateswaran, K., Satomi, M., Gram, L. (2005). Identification of *Shewanella baltica* as the most important H₂S producing species during iced storage of Danish marine fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6689–6697.

Wachsman, M.B et al. (2003). *Antiviral Research.* 58, 17-24

- Wade, C., Shea, K.A., Jensen, R.V., Mc Alear, M.A. (2001).** EBP2 is a member of the yeast RRB regulon, a transcriptionally coregulated set of genes that are required for ribosome and rRNA biosynthesis. *Mol. Cell. Biol.* 21(24): 8638-50.
- Wang, W., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., Geng, W. (2021).** Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9 (612285), 1–19. Doi: 10.3389/fbioe.2021.612285
- Wang, Y., Shang, N., Huang, Y., Gao, B., Li, P. (2024).** The Progress of the Biotechnological Production of Class Iia Bacteriocins in Various Cell Factories and Its Future Challenges.
- Waskiewicz, A. and Irzykowska, L. (2014).** *Flavobacterium* spp. Characteristics, Occurrence, and Toxicity. *Encyclopedia of Food Microbiology.* 1, 938–942. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00126-9>
- Weinstein, M.P., Lewis, J.S. (2020).** The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: background, organization, functions, and processes. *Journal of Clinical Microbiology.* 58(3), 10-1128.
- Wiedemann, I., Breukink, E., Van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., De Kruijff, B. and Sahl, H.G. (2001).** Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor 616 lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent 617 antibiotic activity. *J. Bio. Chem.* 276, 1772–1779.
- Wiernasz, N., Leroi, F., Chevalier, F., et al. (2020).** Salmon gravlax biopreservation with lactic acid bacteria: a polyphasic approach to assessing the impact on organoleptic properties, microbial ecosystem and volatilome composition. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3103.
- Wiley, J., Sons (2015).** *Carnobacterium*. This article is © 2009 Bergey's Manual Trust. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm00593.
- Worsztynowicz, P., Schmidt, A., Białas, W., and Grajek, W. (2019).** Identification and partial characterization of proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* relevant to their application in dairy industry. *Acta. Biochim. Pol.* 66, 61–69. Doi: 10.18388/abp.2018_2714
- Wu, Y., Pang, X., Liu, X., Zhang, X. (2022).** Enterocins: Classification, Synthesis, Antibacterial Mechanisms and Food Applications. *Molecules*, 27, 2258. <https://doi.org/10.3390/molecules27072258>
- Xie, L. and van der Donk, W.A. 2004.** Posttranslational

modifications during lantibiotic biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8(5), 498–507.

Yang, R., Johnson, M.C. and Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 58, 3355–3359

Yang, J.B. (1999). The application of lactic acid bacteria in medicine. In: Yang JB, Fu XL, eds. *Lactic acid bacteria: biological basis and application*. Beijing: China Light Industry Press; 1999. p. 178–182.

Yang, S.-C., Lin, C.-H., Sung, C.T. and Fang, J.-Y. (2014). Antibacterial Activities of Bacteriocins: Application in Foods and Pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-10. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00241>

Yamazaki K., Suzuki M., Kawai Y., Inoue N., Montville T.J. (2003). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *Journal of Food Protection*, 66, 1420–1425.

Yao, A.A., Egounlety, M., Kouame, L.P., Thonart, P. (2009). Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l’Afrique de l’Ouest : leur utilisation actuelle. *Ann. Méd. Vét.* 153, 54-65.

Yi, Y., Li, P., Zhao, F., Zhang, T., Shan, Y., Wang, X., Liu, B., Chen, Y., Zhao, X., Lu, X. (2022). Current Status and potentiality of class II bacteriocins from lactic acid bacteria: Structure, mode of action and applications in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.*

Zamora, L., Fernández-Garayzábal, J.F., Svensson-Stadler, L.A., Palacios, M.A., Zhu, F., Wang, S., Zhou, P.J. (2003). *Flavobacterium xinjiangense* sp. nov. and *Flavobacterium omnivorum* sp. nov., novel psychrophiles from the China No. 1 glacier.

Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., Arendt, E.K. (2016) Production, properties and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(3), 1121–1135.

Zarour, K., Prieto, A., Pérez-Ramos, A., Kihal, M. & López, P. (2018). Analysis of technological and probiotic properties of Algerian *L. mesenteroides* strains isolated from dairy and non-dairy products. *Journal of functional foods*, 49, 351-361.

Zhang, Y., Yang, J., Liu, Y., Wu, Y., Fang, Z., Wang, Y., Sun, L., Deng, Q., Gooneratne, R., & Xiao, L. (2020). A novel bacteriocin PE-ZYB1 produced by *Pediococcus pentosaceus* zy-B isolated from intestine of *Mimachlamys nobilis*: Purification, identification and its anti-listerial action. *LWT* –

Food Science and Technology,
118. [https://doi.org/
10.1016/j.lwt.2019.108760](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108760),
108760-108760.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J. et al. (2020). A Taxonomic Note on the Genus *Lactobacillus*: Description of 23 Novel Genera, Emended Description of the Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and Union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 2782–2858.

Zhitnitsky D., Rose J. et Lewinson, O. (2017). The highly synergistic, broad spectrum, antibacterial activity of organic acids and transition metals. *Scientific reports*, 15(7), 44554.

Doi : 10.1038/srep44554.

Zhou, Y., Cui, Y. & Qu, X. (2019). Exopolysaccharides of lactic acidbacteria: structure, bioactivity and associations: a review. *Carbohydrate Polymers*. 207, 317–332

Annexes

Annexe 1 : Milieux de culture

- **Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Peptone.....	10 g
Citrate de sodium	2 g
Acétate de sodium.....	5 g
Glucose.....	20 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,25 g
Tween 80.....	1 mL
MnSO ₄	0,05 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée	qsp..... 1000 mL
pH 6,5	
Autoclavage 120 °C pendant 20 min	

- **Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elikier, 1962)**

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Saccharose.....	100 g
Citrate de sodium.....	1 g
Glucose.....	5 g
Gélatine.....	2,5 g
Sodium azide	0,075 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée	qsp..... 1000 mL
pH 6,5	
Autoclavage 120 °C pendant 20 min	

- **Milieu ESM (EPS Selection Medium) selon Bachtarzi et al. (2019)**

Lait écrémé	90g/l
Extrait de levure.....	3,5g/l
Peptone	3,5g/l
Glucose.....	10 g/l
Autoclavage 105°C pendant 15mn	

- **Eau physiologique**

Chlorure de sodium	8,5 g
Peptone.....	0,5 g
Eau distillée	qsp..... 1000 mL
pH 7,0	
Autoclavage 120°C pendant 20 minutes	

• **Mueller Hinton (Mueller et Hinton, 1941) Gélose molle**

Infusion de viande.....	300cm ³
Peptone de caséine.....	17,5g
Amidon de maïs.....	1,5g
Agar-Agar.....	8,5g
Eau distillée.....	1000mL
Autoclavage 120°C pendant 20mn	

• **Gélose nutritif (GN)**

Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure.....	2g
Peptone.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar-Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

• **Gélose au citrate de sodium**

Lait écrémé stérile.....	5ml
Citrate de sodium.....	0,25g
Gélose blanche.....	3ml
Eau distillée.....	1000 ml

• **Gélose blanche**

Agar-Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000 ml

• **Gélose nutritive (pH 7,4)**

Chlorure de sodium	5 g
Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Gélose	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

• **Milieu APT**

Tryptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
K ₂ HPO ₄	5g

Citrate de sodium.....	5g
NaCl.....	5g
Saccharose.....	10g
Tween 80.....	1ml
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,8g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,14g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,04g
Agar-Agar.....	15g
Eau distillée.....	10 ml
Autoclavage 120°C pendant 20 mn.	

• Milieu de Moëller à l'arginine

Peptone	5g
Extrait de viande.....	5 g
Glucose	0.5 g
Pyridoxal	5 mg
Pourpre de bromocresol	0.1 g
Rouge de crésol	5 mg
Arginine	10 g
Eau distillée	1000 ml
pH 6.8	
Autoclavage à 120°C pendant 15 à 20 mn	

Tableau 1 : Caractéristiques des bactéries lactiques (Axelsson, 2004)

	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Aggitorum</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Dentococcus</i>	<i>Reuterella</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenes</i>	<i>Weissella</i>
Morphologie	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C
Tétrades	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Croissance à 10°C	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-	+
Croissance à 45°C	-	+/-	-	+	-	-	+/-	+/-	-	-
Croissance à pH 4,4	nd	+/-	-	+	+/-	+/-	+	-	-	+/-
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Croissance à 6,5% NaCl	nd	+/-	+	+	-	+/-	+	-	+	+/-
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Production de CO ₂	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	+
Production d'acide lactique	l.	l., d.	l.	l.	l.	d.	l., d.	l.	l.	+/-

B : bacilles ; C : cocci ; nd : non déterminé ; +/- : variables selon les espèces

Tableau 2 : Les paramètres de l'acidification en fermentation discontinue

Attributs	ABBC10	ABBC2	ABBC3	ABBC4	ABBC12
D.O <i>initiale</i>	0.05	0.02	0.03	0.06	0.04
D.O <i>finale</i>	0.23	0.19	0.17	0.25	0.16
Acidité <i>initiale</i>	29	24	23	30	22
Acidité <i>finale</i>	66	55	50	70	40
Acidité formée	37	31	27	40	18
$\mu_{\max}$ in h ⁻¹	0.108	0.108	0.111	0.103	0.056
QAc max in g/g.h	18.933	13.390	13.450	20.361	8.988
Productivité max in g/L.h	14.814	12.158	11.602	16.363	11.365

Annexe 3

Tableau : Profil fermentaire des bactéries lactiques

	C2	C3	C4
Glycérol	+/-	+/-	+/-
Erythritol	+/-	+/-	+/-
D-Arabinose	+/-	+	+/-
L-Arabinose	+/-	+	+
Ribose	+/-	+/-	+/-
D-Xylose	+/-	+/-	+
L-Xylose	+	+/-	+/-
Adonitol	+	-	+/-
Méthyl-Xyloside	+	+/-	+/-
Galactose	+	+	+/-
Glucose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Sorbose	+/-	+	+/-
Rhamnose	+/-	+	+/-
Dulcitol	+/-	+	+
Inositol	+/-	+	+
Mannitol	+	+	+/-
Sorbitol	+/-	+	+/-
Méthyl-D-Mannoside	+	+/-	+
Méthyl-D-Glucoside	+	+/-	+/-
N-Acétyl-Glucosamine	+	+	+
Amygdaline	+	+/-	+/-
Arbutine	+	+	+
Esculine	+	+	+
Salicine	+	+	+
Cellobiose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Lactose	+/-	+	+/-
Mélibiose	+	+	+/-
Saccharose	+	+	+
Tréhalose	+	+	+/-
Inuline	+	+	-
Mélézitose	+/-	+/-	+/-
D-Raffinose	+/-	+	+/-
Amidon	+	+/-	+/-
Glycogène	+	+	+
Xylitol	+	-	+/-
Gentiobiose	+	+	+/-
Turanose	-	+/-	+/-
Lyxose	+/-	+/-	+/-
Tagatose	+/-	+	+
D-Fucose	+/-	+/-	+/-
L-Fucose	+/-	+	+/-

Annexe 3

D-Arabitol	+	+	+/-
L-Arabitol	+	+	+
Gluconate	+	+/-	+/-
2-cétogluconate	-	-	-
5- cétogluconate	+/-	+/-	+/-

Tampons, solutions et réactifs

1) Tampon phosphate 0,1M à pH7

-Solution A : 0,1 M potassium di-hydrogenophosphate

Dissoudre 13,61g de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml eau distillée

-Solution B : 0,1M di-sodium hydrogenophosphate

Dissoudre 17,8g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml eau distillée

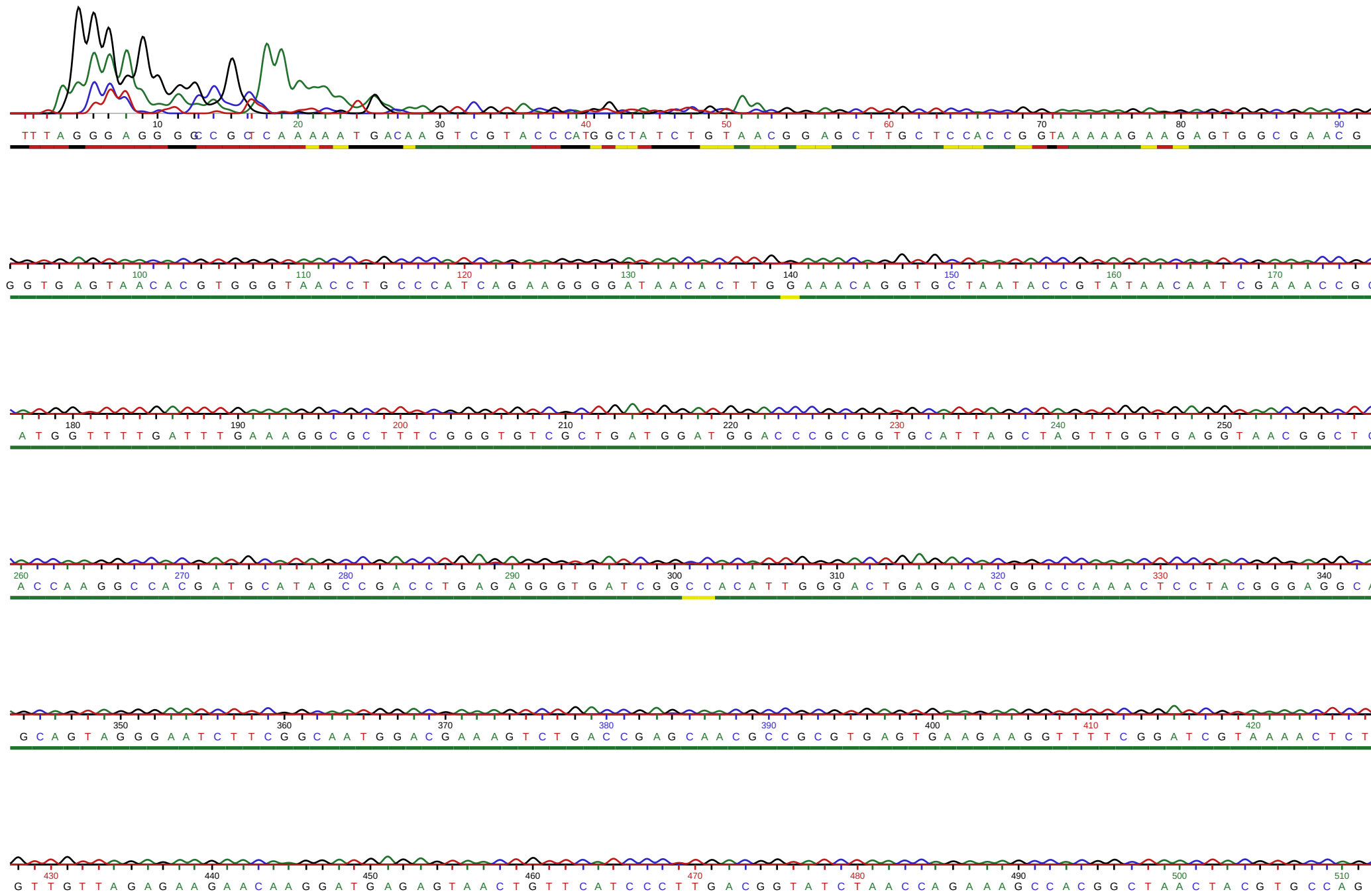
Pour obtenir un tampon phosphate 0,1M à pH 7 : il faut mélanger 40 ml A et 60 ml B.

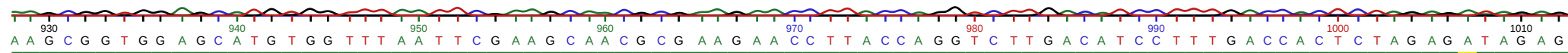
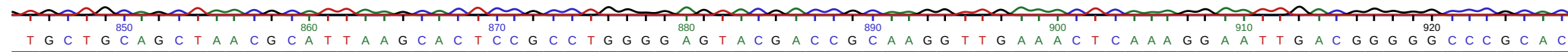
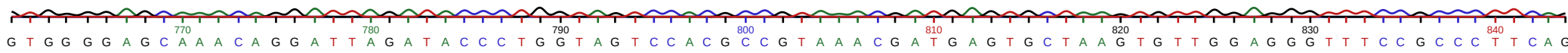
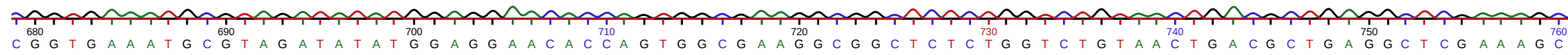
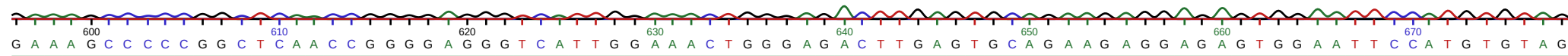
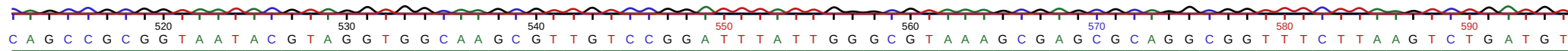
2) Réactif de bleu de Comassie G-250

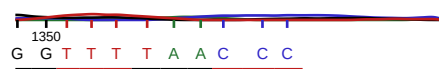
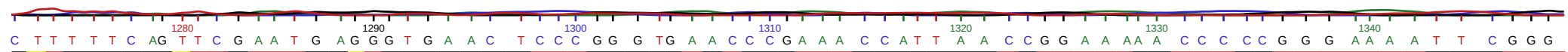
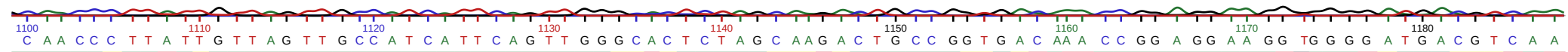
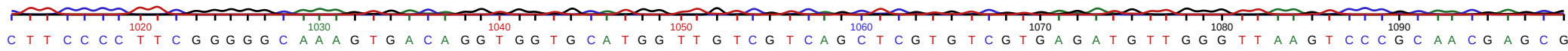
Dissoudre 100 mg de bleu de Comassie G-250 dans 50 ml d'éthanol à 95°. On ajoute pour cette solution H_2SO_4 à 85%. Diluer la solution résultante pour un volume final de 1000 ml.

3) Ninhydrine

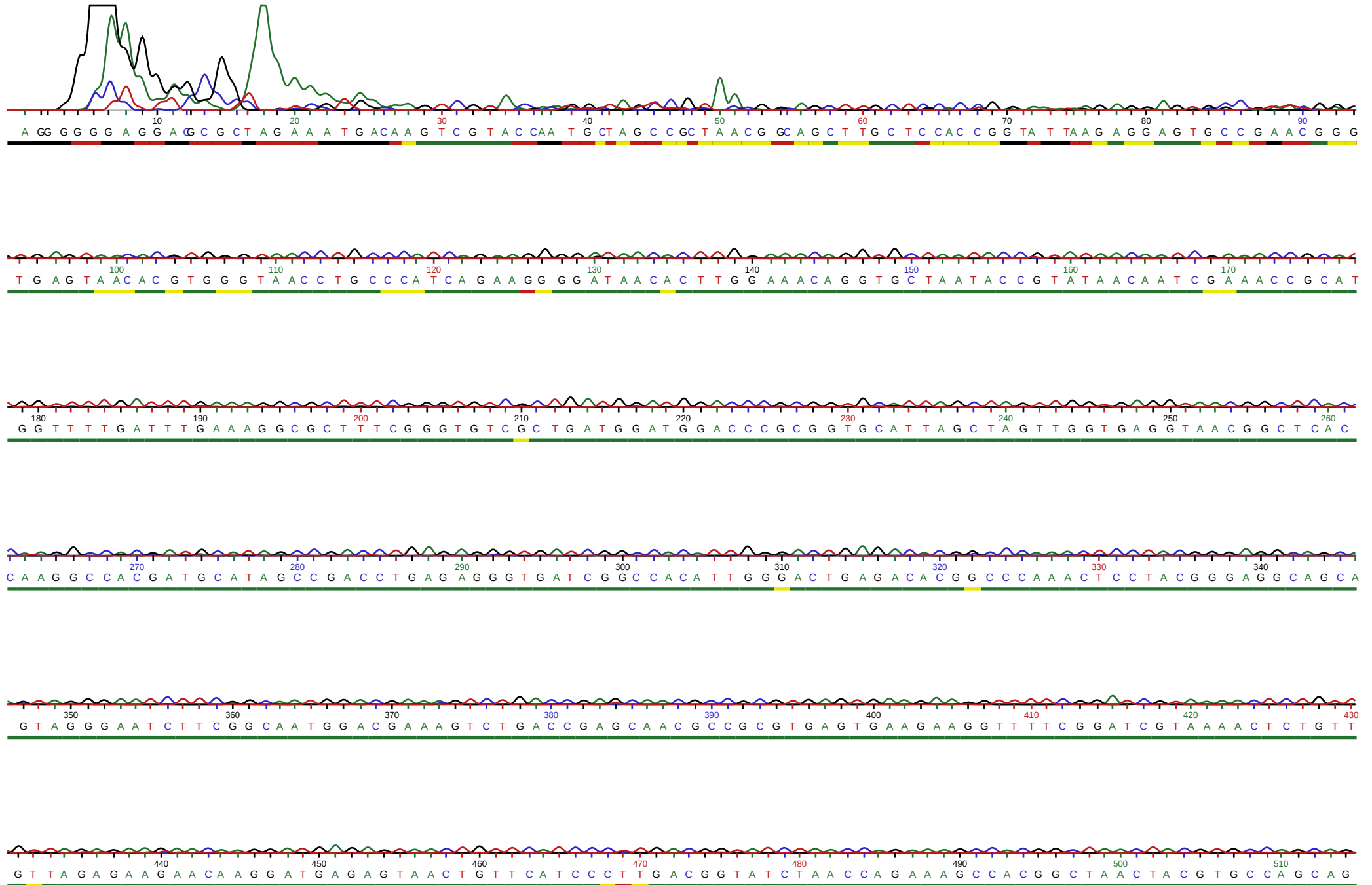
Dissoudre 0,8 g de la ninhydrine dans 80 ml d'éthanol à 99,5% et 10 ml d'acide acétique, suivi d'une addition de CaCl_2 dissout dans 1 ml d'eau distillée.







Page: 1 / 3
16.12.2021





C C G C G G T A A T A C G T A G G T G G C A A G C G T T G T C C G G A T T T A T T G G G C G T A A A G C G A G C G C A G G C G G T T T C T T A A G T C T G A T G T G A A

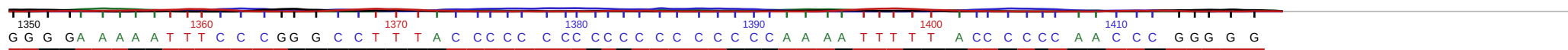
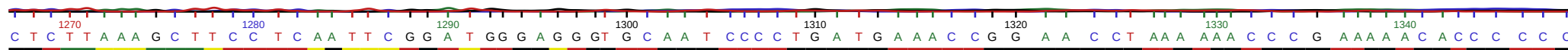
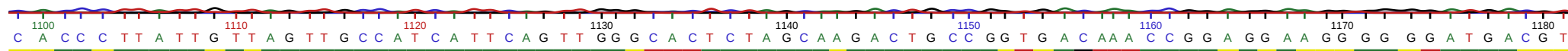
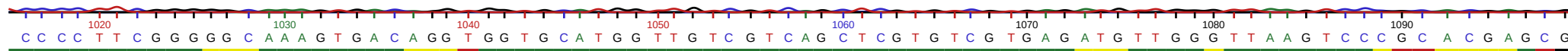
A G C C C C G G C T C A A C C G G G G A G G G T C A T T G G A A A C T G G G A G A C T T G A G T G C A G A A G A G G A G A G T G G A A T T C C A T G T G T A G C G G

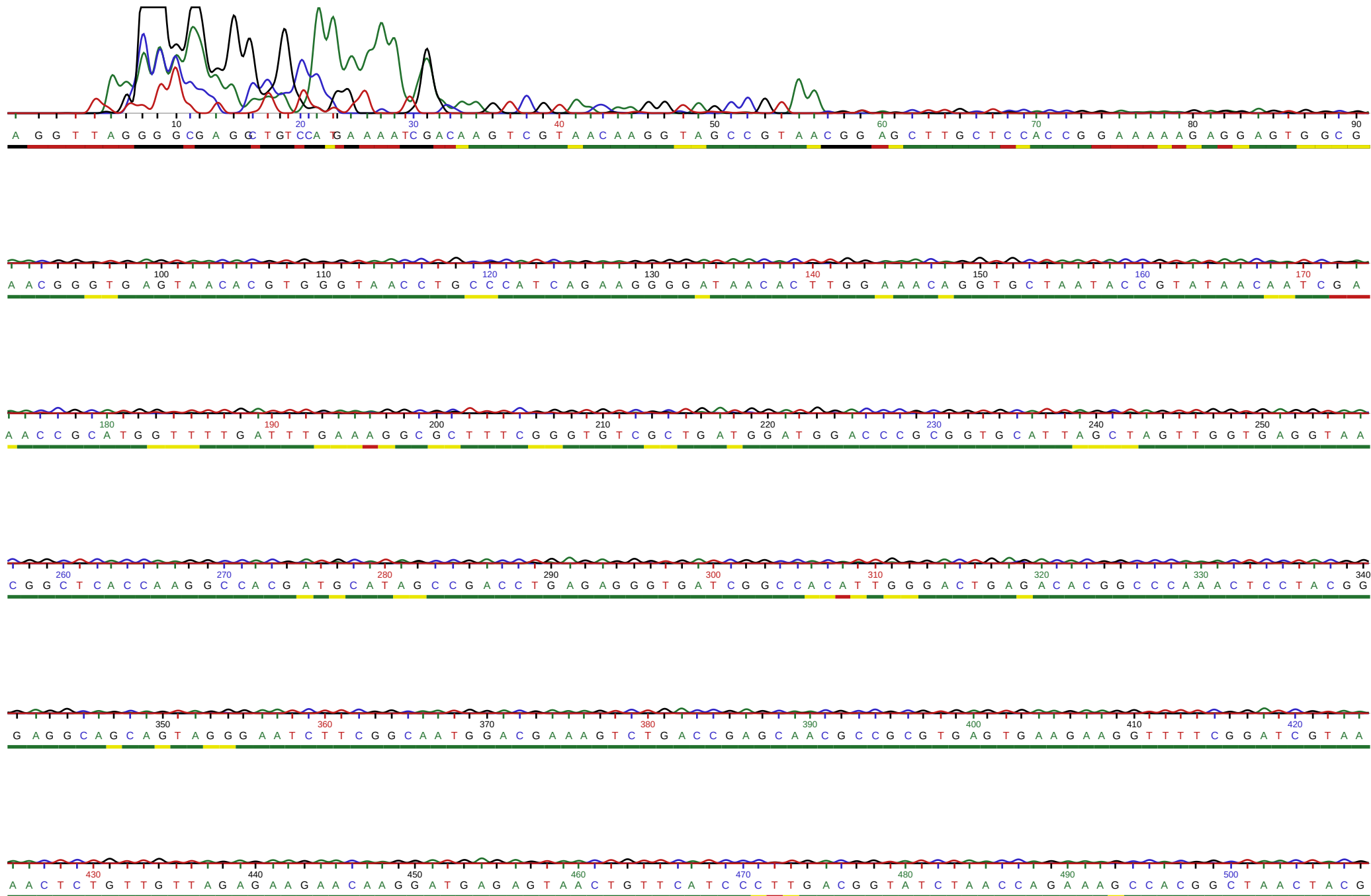
T G A A A T G C G T A G A T A T T G G A G G A A C A C C A G T G G C G A A G G C G G C T C T C T G G T C T G T A A C T G A C G C T G A G G C T C G A A A G C G T G

G G G A G C A A A C A G G A T T A G A T A C C C T G T A G T C C A C G C C G T A A A C G A T G A G T G C T A A G T G T T T G G A G G G T T T C C G C C C T T C A G T G C

T G C A G C T A A C G C A T T A A G C A C T C C G C C T G G G G A G T A C G A C C G C A A G G T T G A A A C T C A A A G G A A T T G A C G G G C C C G C A C A A G

C G G T G G A G C A T G T G G T T T A A T T C G A A G C A A C C G C G A A G A A C C T T A C C A G G T C T T G A C A T C C T T T G A C C A C T C T A G A G A T A G A G C T T





510 520 530 540 550 560 570 580 590
T G C C A G C A G C C G C G G T A A T A C G T A G G T G G C A A G C G T T G T C C G G A T T T A T T G G G C G T A A A G C G A G C G C A G G C G G T T T C T T A A G T

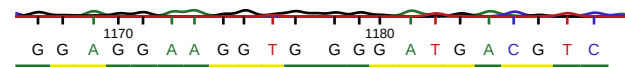
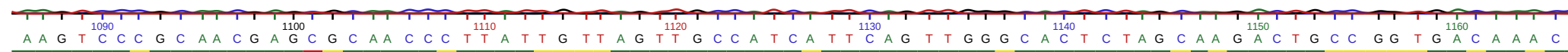
600 610 620 630 640 650 660 670
C T G A T G T G A A A G C C C C C G G C T C A A C C G G G G A G G G T C A T T G G A A A C T G G G A G A C T T G A G T G C A G A A G A G G A G A G T G G A A T T C C A

680 690 700 710 720 730 740 750
T G T G T A G C G G T G A A A T G C G T A G A T A T A T G G A G G A A C A C C A G T G G C G A A G G C G G C T C T C T G G T C T G T A A C T G A C G C T G A G G C

760 770 780 790 800 810 820 830
T C G A A A G C G T G A G G A G C A A A C A G G A T T A G A T A C C C T G G T A G T C C A C G C G T A A A C G A T G A G T G C T A A G T G T T G G A G G G T T T C C

840 850 860 870 880 890 900 910 920
G C C C T T C A G T G C T G C A G C T A A C G C A T T T A A G C A C T C C G C C T G G G A G T A C G A C C G C A A G G T T G A G A C T C A A A G G A A T T G A C G G G

930 940 950 960 970 980 990 1000
G G C C C G C A C A A G C G G T G G A G C A T G T G G T T T A A T T C G A A G C A A C G C G A A G A A C C T T A C C A G G T C T T G A C A T C C T T T G A C C A C T



Production scientifique

Publication

1. Amel BATOUCHE, Mohammed EL Amine BENDAHA, Ahmed HARIRI, Fatima SAHNOUNI (2024). Molecular identification and technological properties of *enterococcus* sp. isolated from Algerian fresh fish. Fresenius Environmental Bulletin. 33 (01), 9-21

2. Publication du résumé de la participation de la SAN

BATOUCHE A., SAHNOUNI F., BOULENOUAR A. (2021). P121 : **Mise En Evidence De L'Effet Inhibiteur Et La Cinétique D'Acidification De Souches De *Carnobacterium* sp. Isolées De Certains Produits De La Pêche.** 4^{ème} Congrès International de la SAN « CI-SAN 2021 Oran, 16-17 Octobre 2021 ». Nutr. Santé, 2021, Vol. 10. (01), S1-S133

Communication

1. BATOUCHE Amel, SAHNOUNI Fatima. Mise en évidence de l'effet inhibiteur de la cinétique d'acidification de souches de *Carnobacterium* sp. Isolées de certains produits de la pêche. 4^{ème} Congrès International de la SAN. 16 et 17 octobre 2021. Oran, Algérie.

2. BATOUCHE Amel, SAHNOUNI Fatima. Caractérisation de certaines souches d'*Enterococcus* dans les produits de pêche. First National Symposium on Agro-ecology, Biodiversity and Climate Change held. 03 et 04 Juin 2023. Mascara, Algérie.

3. BATOUCHE Amel, SAHNOUNI Fatima. Activité antibactérienne et antibiorésistance de bactéries lactiques isolées à partir de produits de pêches. Second National Webinar on Biodiversity, Biochemistry & Environmental Microbiology held . 03 et 04 Janvier 2021. Laghouat, Algérie.

4. BATOUCHE Amel, SAHNOUNI Fatima. Caractérisation technologique de coques lactiques isolées à partir de produits de pêches. The First International Days of Natural and Life Sciences. 01 et 02 Mars 2022. Ouarguella, Algérie.

MOLECULAR IDENTIFICATION AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF *Enterococcus* sp. ISOLATED FROM ALGERIAN FRESH FISH

Amel Batouche^{1,5}, Mohammed El Amine Bendaha^{2,3,*}, Ahmed Hariri⁴, Fatima Sahnouni¹

¹Research Laboratory on Biological Systems and Geomatics (LRSBG), University Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria

²Laboratory of Molecular Biology, Genomics and Bioinformatics, University Hassiba Ben Bouali, Chlef, Algeria

³University Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria

⁴Laboratory of Bioconversion, Microbiology Engineering, and Health Safety, University Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria

⁵Laboratory of Geo-Environment and Space Development (GEDE), University Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria

ABSTRACT

The present study focused on the screening of the technological properties of *Enterococcus* isolated from the Gastro-Intestinal Tract of fresh fish of the Algerian coast. The technological characterization (antibacterial activities, acidifying ability, proteolytic and lipolytic activities, and production of exo-polysaccharides) and the safety one were studied to select the most appropriate LAB isolate to be used for the reinforcement of the antibacterial activity and the organoleptic properties in the food industry. These isolates showed low acidifying, proteolytic, and lipolytic activity and produced small amounts of exo-polysaccharides. Our research also showed that both *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4 isolates displayed direct antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella abony* and toward *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Pediococcus pentosaceus*. Furthermore, we investigated indirect antibacterial activity through LAB isolates supernatant. It is worth noting that antibiotic resistance was observed in *Enterococcus* sp. C2 against all the antibiotics tested except spiramycin, while *Enterococcus* sp. C4 showed resistance only to amoxicillin, tetracycline, and penicillin. Notably, both isolates were unable to produce biogenic amine from ornithine and lysine. Overall, our findings have significant implications for the food industry, and this research will contribute to the development of safer and more effective food preservation methods.

KEYWORDS:

Enterococcus sp., lactic acid bacteria, technological characterization, antibacterial activity

INTRODUCTION

Due to the large unexplored biodiversity, marine environments and bacteria are especially promising [1]. Biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin was applied by Gomez-Sala et al. [2]. Lactic Acid Bacteria (LAB) are a genetically diverse group of bacteria, encompassing rod-shaped bacteria such as *Enterococci*, *Pediococci*, or *Leuconostoc* [3], they have been used for a long time in food processing and preservation (alternative to chemical products). Due to their proteolytic activity, lipolytic activity, and diacetyl production [4], *Enterococcus* sp. have played a major role in the preparation of various fermented kinds of milk and meat products for generations, and they are mainly used for the refining of cheese products and the development of their aroma [5, 6]. However, the production of biogenic amines can be a negative factor associated with the use of lactic acid bacteria [7].

Enterococci are part of the commensal flora of the gastrointestinal tract of humans and animals which constitutes their predominant habitat even though they represent only a small proportion of the intestinal consortium, generally comprising less than 1% of the adult microflora [8, 9].

During the last decennium, various investigations on the isolations of LAB in fin fish have been accomplished. According to Merrifield et al. [10] members belonging to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, and *Weissella* genera are indigenous species in finfish.

E. faecium was founded by Sánchez et al. [11] in fish and seafood. *E. faecium* NKR-5-3 was isolated from fermented fish [12]. Several studies in the last decade have revealed the useful application of enterococci in foods [6, 13]. These microorganisms play an interesting role in the preservation (extension of shelf life) and the bacteriological quality of food while keeping their nutritional and organoleptic characteristics. However, enterococci also contributed to the fermentation of different foods (milk, vegetables, meats, or fish) and can produce diverse

antimicrobial substances (lactic acid, bacteriocins, or hydrogen peroxide) that make them important in the industry [14]. Bacteriocins can also find applications in the medical sector [15] where they can be exploited as antimicrobial agents in the pharmaceutical industry [16]. *Enterococcus* genera are useful in the treatment of diarrheal diseases caused by food-related pathogens and are also used as probiotics [17]. In their study, Hyewon et al. [18] demonstrated that L15EPS (EPS from LAB *E. faecium* L15 EPS) may have therapeutic value in bone regeneration as potential postbiotics.

Technological characterization of *Enterococcus* from fish has been reported. Thapa [19] described the technological properties of *Enterococcus* isolated from traditional process fish products and Migaw [20, 21] characterized *Enterococci* bacteriocinogenic strains from fish viscera. Extensive studies interested in dairy products, little works focused on the technological characterization of *Enterococcus* from fish.

Accordingly, this paper describes the isolation, antimicrobial spectrum, molecular, technological and safety characterization of *Enterococcus* strains originating from gastrointestinal tract (GIT) of fresh fish.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of lactic acid bacteria (LAB). Lactic acid bacteria (LAB) were isolated from the gastrointestinal tract (GIT) of two fish species (*Sardina sarda* and *Sarda pilchardus*). The GIT samples were homogenized in a saline solution containing 0.9 % of NaCl. A series of decimal dilutions is performed (up to 10^{-5}). 100 µl of each solution were spread on MRS agar as demonstrated by Mokrani et al. [22]. The Petri dishes were then incubated at 30 °C for 24 to 48 h. The isolates were purified by successive sub-culturing until pure colonies are obtained and stored in 20 % glycerol broth at -20 °C.

Antibacterial activity. The Spot On Agar Test (SOAT) adapted by Fleming et al. [23] using eight indicator strains was used for the screening of the antibacterial activity. Petri dishes containing MRS agar were spotted with 18 h cultures of lactic isolates. This later was covered after 24 h of incubation with a second layer of 7 µl of Muller Hinton agar (MH) containing each indicator strain. Petri dishes were examined for clear zones after a second incubation of 24 h.

The LAB isolates showing direct antimicrobial activity were selected based on their antimicrobial activity spectrum and assayed for the presence of bacteriocin activity in their cell-free culture supernatants by an agar well-diffusion test (ADT) as described by Schillinger and Luke [24]. To evaluate their inhibition amount, Petri dishes are cast by MH

agar of about 20 µl in which wells are dug and are subsequently filled with 50-100 µl of LAB isolate supernatants. Petri dishes were examined for clear zones after 24 h of incubation.

Phenotypic and genotypic identification. Isolated strains were examined for Gram stain, catalase, oxidase, ADH, and typical fermentation according to Bergy's Manual. Biochemical analysis was applied for the selected strains using the API 50CH system (BioMerieux, France), and the results were interpreted using the APIWEB program. Bacterial RNA was extracted using the Macherey-Nagel Nucleospin Kit following the extraction procedure of the kit supplier (Macherey-Nagel Germany). The extracted RNAs were assayed with the nano drop 2000 for the determination of their quantities and qualities by looking at the ratio of the wavelength ratio 260/280 and 260/230. Amplification was performed using the Biorad P100 thermal cycler (Biorad, USA). The universal 16S primers: 27f (forward) 5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3' and 1492R (Reverse) 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', the amplification products were revealed by 1% agarose gel electrophoresis by deposition of 10µl of PCR product followed by staining in an ethidium bromide bath (0.5µg/ml). After migration, the RNA is visualized and photographed under UV light. PCR products were purified by the Clean up kit from Macherey-Nagel (Macherey-Nagel Germany) following the protocol described by the supplier.

The identification of selected isolates was confirmed by sequencing 16S rRNA genes after PCR amplification. Isolated and purified PCR products were sequenced by the Sanger technique [25] using the big Dye v3.1 kit from Applied Biosystems and by using the primers that were used for PCR amplification. The sequences obtained were analyzed and cleaned up using the CHROMAS PRO. Sequence alignment was done using MUSCLE [26]. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model [27]. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The Neighbor-joining algorithm was used to obtain the initial tree [28]. The analysis involved 20 nucleotide sequences. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [29]. The tree was visualized with iTOL [30].

Technological characterization of the selected LAB isolates.

Acidification activity and kinetic of growth. The acidifying activity was performed according to Kihal and Prevost [31]. Kinetics of growth and acidification were determined in sterile skim milk. Tubes containing 10 mL of sterile skimmed milk were inoculated with 2 % of 18h fresh cultures. After 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h, 48 h, and 72 h of incubation at 30 °C, the acidification is studied using a pH meter

and the Kinetic growth was determined by spectrophotometer after clarifying milk medium with EDTA (at 1 %) [32]. The kinetic growth parameters ($\mu_{\max}$ in h^{-1} , QAc max in g/g.h , productivity max in g/L.h) are respectively, specific rate of growth, specific rate of acidities production, the productivity of acidities obtained from each strain growth curve using specialized software KaleidaGraph.

Proteolytic activity. Proteolytic activity was evaluated on milk agar (at 10 % sterile skim milk). Surface-dried plates of this agar were spotted with 24 h old cultures, incubated at 30 °C for 48 h, and examined for any clearing of casein around and underneath the growth [19]. It was determined by measurement of the diameter of the clear zone surrounding the inoculated spots (mm). After 72 h of incubation of sterile skim milk previously inoculated at 1 % with 24 h old culture, quantification of proteins (evaluated as free amino acid in medium) was performed as described by Folkertsma and Fox [33] using Cd-ninhydrin reagent. It is a determination of freeamino-acid- NH_2 groups in the culture supernatants at a wavelength of 507 nm. The results obtained were expressed in millimoles of glycine equivalent per liter of milk using a standard range made with a glycine stock solution according to the method adapted from Bouton et al. [34].

Lipolytic activity. Determination of lipolytic activity was assessed using the agar plate assay on MRS medium supplemented with 2 %, 3 %, and 5 % of Tween 80, Tween 20, or olive oil as described by Karam [35]. The LAB isolates were inoculated in spots from young precultures of 18 h. When a clear zone was formed around the colonies, the results were considered positive. Lipolytic activity was evaluated by the determination of free fatty acids in the supernatant of young cultures of lactic isolates after centrifugation at 12000 rpm for 30 mn [36]. The titration was performed with KOH solution and phenolphthalein under mechanical agitation until the color turned to pale pink. The volume of KOH was noted.

Exopolysaccharide production (EPS). Production of exo-polysaccharides was performed on Mayeux hyper sucrose agar according to Nieto-Arribas [37]. After incubation for 24-48 h at 30 °C, the EPS-producing colonies appear large and slithery. EPS quantification was performed in ESM (EPS Selection Medium) broth according to Bachtarzi [38]. The medium containing 90 g/l skim milk, 3.5 g/l yeast extract, 3.5 g/l peptone, and 10 g/l glucose was inoculated at 2 % of LAB isolate preculture to be incubated at 30 °C. The determination of EPS was performed by the phenol-sulfuric acid method using glucose as standard [39].

Safety characterization.

Antibiotic resistance. The resistance to antibiotics was tested according to the method published by the antibiogram committee of the French Society of Microbiology (CASFM). The isolates were screened for their resistance to amoxicillin (10 μg), erythromycin (15 μg), gentamicin (10 μg), penicillin G (10 μg), spyramycine (10 μg), tetracycline (30 μg), vancomycin and nalidixic acid (30 μg). The diameter of the disc diffusion zone was interpreted based on the tables of the Clinical and Laboratory Standards Institute [40], the isolates were classified into three categories: resistant (R), intermediate (I) and susceptible (S).

Hemolytic activity. Hemolytic activity was performed as described by Giraffa et al. [41]. Bacterial cultures were inoculated on Columbia agar supplemented with 5 % of horse blood and incubated at 37 °C for 24 h. Any changes on the plates were reported γ -hemolysis (no zone) or α -hemolysis (green zone) around colonies was considered non hemolytic; while β -hemolysis (clear zone) was considered as hemolytic [42].

Biogenic amine production. The decarboxylase test for the production of biogenic amines was performed according to Maijala and Eerola [43] with the addition of the following amino acids as precursors: lysine, ornithine, adenine and tyrosine. Precultures of LAB strain isolates were spotted on Petri dishes containing decarboxylating agar supplemented at 0.25 % with each of the previous precursors. After incubation, biogenic amine production should have been detectable by the presence of a purple halo surrounding the spots.

Statistical analysis. Statistical analysis were performed using SPSS (Ver. 20). Numerical data corresponding to technological characteristics were subjected to analysis of variance (ANOVA) at a significance level of $P < 0.05$. Statistical differences between the means of the properties were noted and all analyses were made in triplicate.

RESULTS

Antibacterial activity. 20 bacterial strains Gram-positive, catalase negative, and oxidase negative were screened for their antibacterial activity against eight indicators strains, three of them are lactic acid bacteria LAB (*Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Pediococcus pentosaceus*), the remaining five are : *Escherichia coli*, *Salmonella abony*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*, assayed by Spot On Agar Test (SOAT) and well diffusion Agar Test (WDAT). Two LAB isolates were selected for further technological properties. Inhibitory spectra of

these isolates against three LAB strains, Gram-negative (*E. coli* and *S. abony*) and Gram-positive pathogenic bacteria non-sporulated (*S. aureus*) and sporulated (*B. cereus* and *B. subtilis*) is presented in Table 1.

Bacterial strains identification and phylogenetic analysis. The isolated strains ABBC2 and ABBC4 were identified phenotypically based on their morphological and biochemical characteristics and by API 50CH gallery. The genus *Enterococcus* comprises a ubiquitous group of non-spore-forming, ovoid, Gram-positive bacteria [44]. They are chemo-organotrophic facultative anaerobes with homofermentative metabolism [17]. Their growth is between 10 °C and 45 °C, with an optimum growth between 35 °C and 37 °C [45], they can use mannitol and arabinose but do not ferment inulin and can survive under 60 °C/30 min. The results showed that *Enterococcus* dominated the other genera in fresh fish. The two retained isolates ABBC2 and ABBC4 were

phenotypically classified as *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4 respectively.

The phylogenetic tree demonstrating the relationships between the strains with their corresponding similar sequences from other closely related bacteria are shown in Figure 1. The partial 16S rRNA gene sequences of the two strains *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4 have been deposited in the GenBank database, accession numbers are respectively: ON377335 and ON383936. 16S rRNA sequence analysis showed high strain similarity to *Enterococcus* species. From the phylogenetic tree, we can see that *Enterococcus* sp. C4 and *Enterococcus* sp. C2 are clustered together with *Enterococcus lactis* BT159 and *Enterococcus faecium* DSM 20477 in clade II. The first clade includes *Enterococcus thailandicus* NBRC 101867 and *Enterococcus durans* 100479.

TABLE 1
Antibacterial activity of the strains ABBC2 and ABBC4

	ABBC2	ABBC4
<i>L. plantarum</i> JCM 1149	-	+++
<i>L. pseudomesenteroides</i> NRIC 1777	++	+++
<i>P. pentosaceus</i> ATCC25745	++	+++
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+++	+++
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	+++	+++
<i>S. abony</i> ATCC 6017	++	+++
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	+++	+++
<i>B. subtilis</i> ATCC 168	+++	+++

- No activity, + radius of inhibition zone (<6 mm), ++ radius of inhibition zone (6–12 mm), +++ radius of inhibition zone (>12 mm).

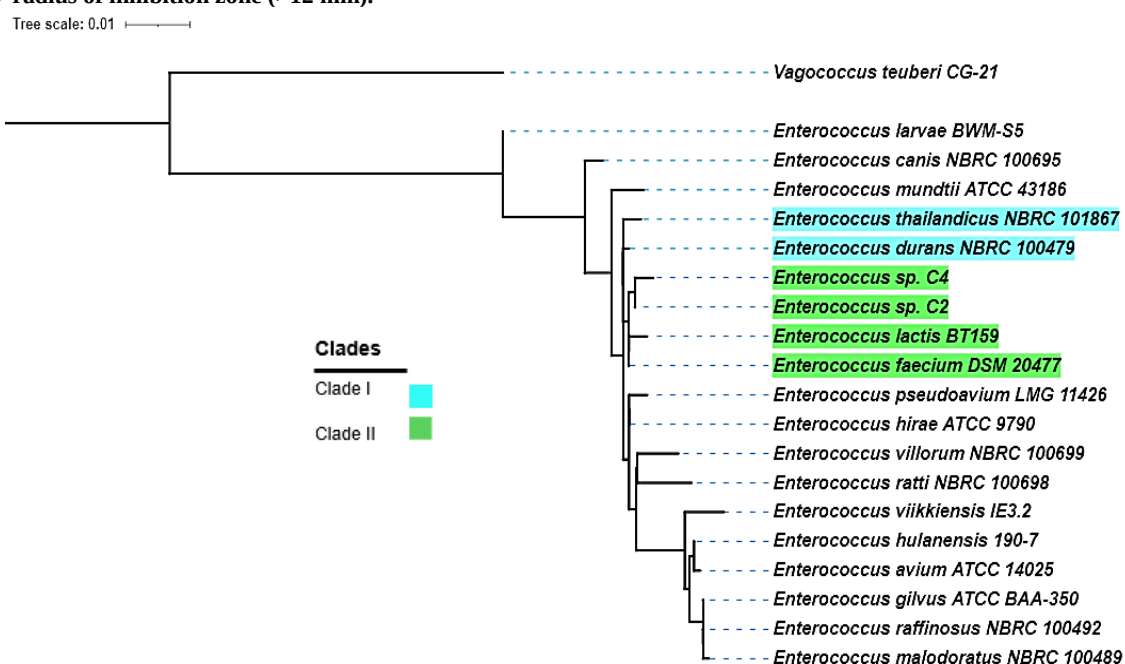


FIGURE 1
Phylogenetic tree analysis by Maximum Likelihood method.

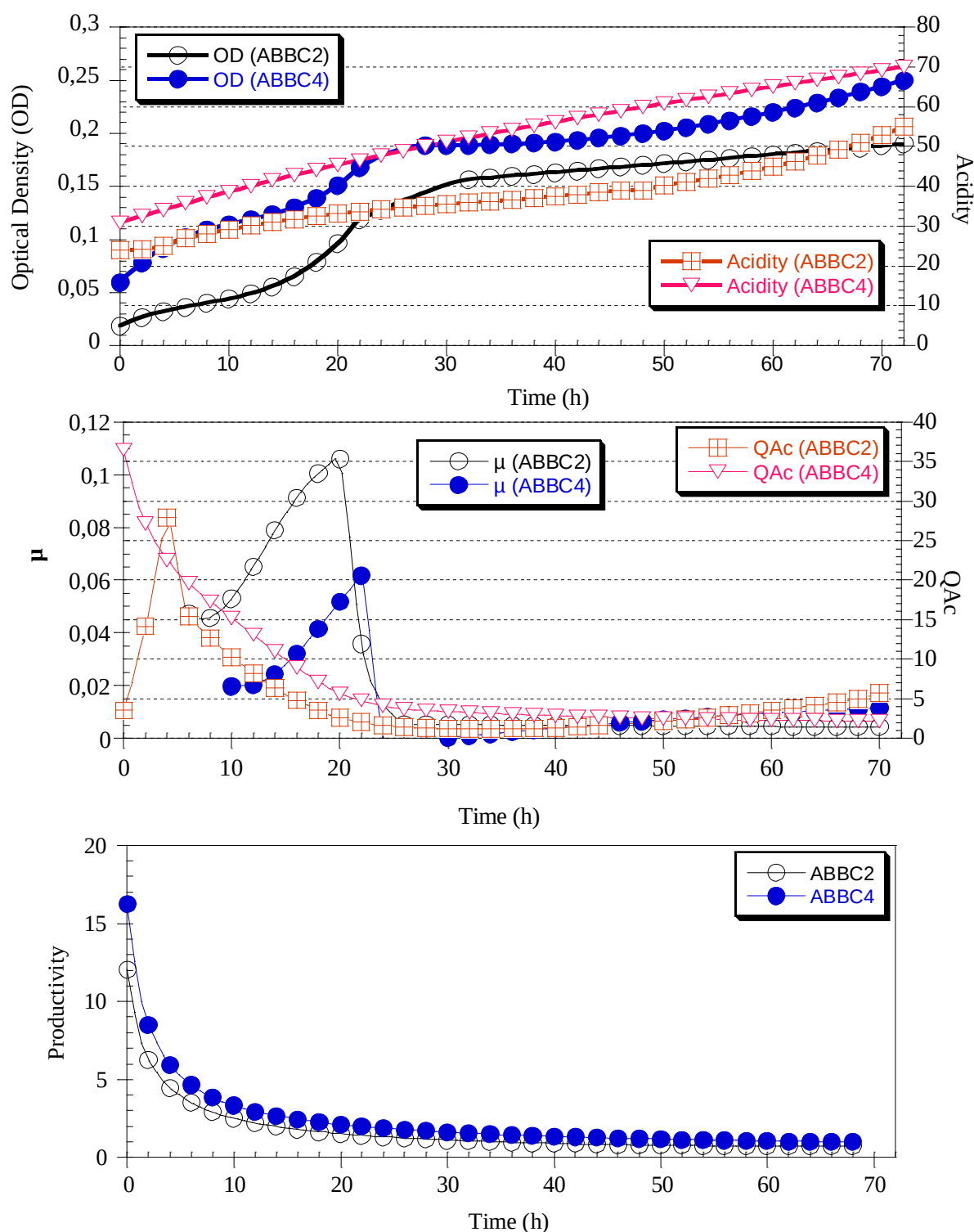


FIGURE 2

Kinetic parameters of growth and acidity production by *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4 strains during batch fermentations.

Technological properties.

Acidifying activity. *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4 isolates grew in milk and were able to change milk's pH after 12, 20, 24, 48, and 72 h of incubation. The tested LAB isolate *Enterococcus* sp. C4 acidifies rapidly milk at the end of 12 h of

incubation. However, the strain *Enterococcus* sp. C2 takes 20 h. After 72 h, the pH of LAB strains decreased to values lower than 5 (4.05) for *Enterococcus* sp. C4. These strains are divided into low (*Enterococcus* sp. C2; AT= 55 °D) to moderate acidifying isolate (*Enterococcus* sp. C4; AT=70 °D). In

agreement with Mrkonjić Fuka et al. [46] who found that *Enterococcus durans* (ED0207) of dairy origin exhibited medium acidification and Schirru et al. [47] who reported that acidifying activity of *E. faecium* isolated from goat's milk was generally low (Figure 2). Kinetic growth parameters evaluated are: $\mu_{\max}$ [specific rate of growth ($\mu \text{ inh}^{-1}$)], specific rate of acidities production (QAc in g/g.h) and productivity of acidities in g/L.h. Values of the growth parameters obtained differed between strains. It depends on their capacity to grow in milk. The two strains *Enterococcus sp.* C2 and *Enterococcus sp.* C4 starts with an initial OD of 0.02 and 0.06 respectively and reaches the maximum values of 0.19 and 0.25 after 72 h of culture. During this period of growth, they produce an amount of acidity of 31 and 40 respectively.

The study of the kinetic parameters indicates that the two strains have low maximal specific rates of growth ($\mu_{\max}$ of 0.036 h^{-1} for *Enterococcus sp.* C2 and 0.062 h^{-1} for *Enterococcus sp.* C4). The maximal specific rate of acidity production (QAc max) is very high for the *Enterococcus sp.* C4 strain (36.43 g/g.h) compared to the *Enterococcus sp.* C2 strain (27.93 g/g.h). Productivity is 12 g/L.h for *Enterococcus sp.* C2 and 16 g/L.h for *Enterococcus sp.* C4.

Proteolytic activity. Results regarding proteolytic activity demonstrated that the two tested isolates were able to hydrolyze caseins. *Enterococcus sp.* C2 showed no detectable activity for proteolysis on milk agar plates, which can be considered as a safety character according to Ahmadova et al. [48]. Whereas the strain *Enterococcus sp.* C4 showed the highest diameter halo of degradation, though the estimated proteolytic activity of these strains revealed that the LAB isolate *Enterococcus sp.* C4 is the one with the highest value (3.185 mmol eq gly/l of milk) compared with the isolate *Enterococcus sp.* C2 (1,809 mmol eq gly/l). Schirru et al. [47] in their study reported low proteolytic activity in 2 among 4 tested *E. faecium* strains isolated from goat's milk (from Sardinia, Italy). Based on the results of Has-sain [49] who found that the supernatant protein

value of LAB isolated from three breeds of dromedary raw milk in south Algeria, is evaluated in 72 h at a level between 1.85 (*E. faecium* DN5) and 5.95 mmol eq gly/l (*E. faecium* DT2), our results are comprised in this interval (Figure 3).

Lipolytic activity. The two LAB strains showed lipolytic activities revealed on agar with olive oil or Tween 80 (Table 2). The appearance of the biggest clear zone of degradation is obtained by the strain *Enterococcus sp.* C2 is evaluated by the quantities of free fatty acid (FFA) and the moderate value produced is measured as the concentration of NH_2 released from isolate supernatant (1.25 $\mu\text{mol/ml}$) against 1.166 $\mu\text{mol/ml}$ for *Enterococcus sp.* C4 (Figure 3).

EPS production. The production of exopolysaccharids appeared on hyper sucrose agar (Table 2) for the two tested LAB strains estimated by small quantities (*Enterococcus sp.* C2; 0,93 g/l and *Enterococcus sp.* C4; 0,7 g/l) in ESM (EPS Selection Medium) after 48h (Figure 3).

Safety characterization.

Antibiotic resistance. Antibiotic resistance of the two tested strains was performed against eight antibiotics (ATB) using the disk diffusion method. The LAB isolates *Enterococcus sp.* C2 showed resistance to all the ATBs including Vancomycin, Nalidixic acid, and Gentamicin except Spiramycin whereas *Enterococcus sp.* C4 showed resistance only to Amoxicillin, Tetracycline, and Penicillin. The two tested strains were contradictory whose *Enterococcus sp.* C4 was susceptible to Gentamycin, Vancomycin, nalidixic acid and Spiramycin (Table 2).

Biogenic amines production. LAB isolates were screened for their abilities to produce biogenic amines. None of the two strains *Enterococcus sp.* C2 and *Enterococcus sp.* C4 produced biogenic amine from ornithine and lysine but they showed this ability from tyrosine and adenine. In particular, in the presence of a pool of free amino acids as precursors, *E. faecalis*, *E. faecium*, and *E. durans* strains are regarded to be strong tyramine producers [50].

TABLE 2
Antibiotic resistance of *Enterococcus sp.* C2 and *Enterococcus sp.* C4

	<i>Enterococcus sp.</i> C2	<i>Enterococcus sp.</i> C4
Gentamicin	R	S
Amoxicillin	R	R
Tetracycline	R	R
Erythromycin	R	I
Vancomycin	R	S
Penicillin	R	R
Spiramycin	S	S
Nalidixic acid	R	S

R resistant, S sensitive, I intermediate

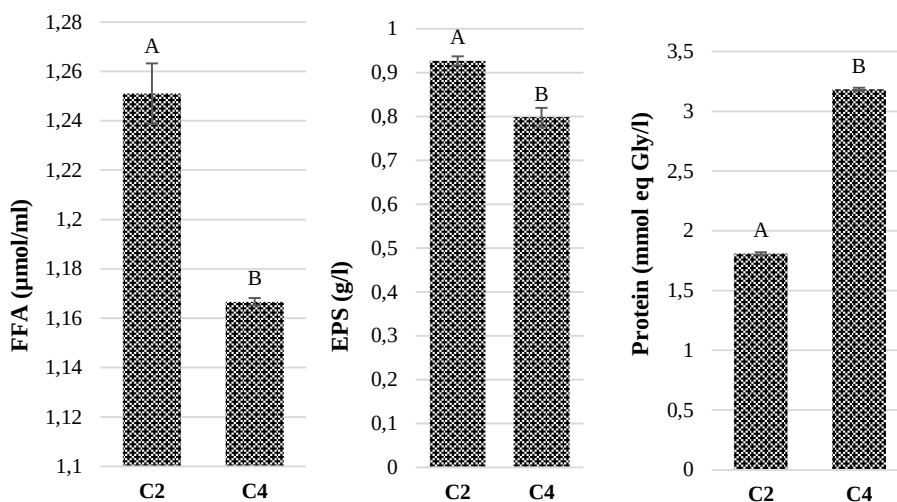


FIGURE 3

Protein, lipid, and EPS quantification for the strains *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4

Hemolytic activity. Hemolysin is a toxin capable of causing hemolysis, encoded in either plasmid or the chromosomal DNA, and it constitutes a significant virulence factor that affects the intensity of the disease [51]. The hemolytic activity was detected in *E. mundtii* and *E. durans* of dairy origin and two *E. casseliflavus* strains of dairy and meat origin. Contrary to the current study which recalled that *Enterococcus* isolate *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4 are interestingly hemolysin negative, accordingly to results found by Gomez-Sala [52].

DISCUSSION

The present study aimed at the exploration of the LAB of fresh Algerian fish and the investigation of their metabolic activities (acidifying, proteolytic, lipolytic, antibacterial activities and EPS production) with a view to their potential application in food industry or medical field. 20 strains were selected from two fish species captured along the Algerian coastline. Of these, two isolates were selected for their high antagonist properties against several LAB and food borne pathogens. The microbial load of peach products showed that lactic cocci are the predominant LAB [53], which may be attributed to the high concentration of salts in the sea [19]. Both ABBC2 and ABBC4 were active against pathogen microorganisms such as *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Escherichia coli*, *Salmonella abony*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. Based on the obtained results, this two isolates have the most important antibacterial activity produced well-defined inhibition halos with a large spectrum (inhibition halo >12mm) against all indicator strains tested (Gram-positive and Gram-negative). Our results are relevant and showed that these strains could be used in the

control of food-borne pathogens, LAB could produce metabolites which have an important lytic activity, such as bacteriocins, and if they are to be used as starter cultures, then there would be an additional effect of lactic acid production and competence for substrates with other microorganisms [54]. The inhibition spectrum of *Enterococcus* has been extensively studied and characterized, particularly with regard to *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* sp. and *Clostridium* sp., but also against Gram-negative bacteria, fungi and yeasts [14]. Antimicrobial activity of *Enterococcus* spp. isolated from fish viscera has been reported. Migaw et al. [20] described the antimicrobial activity of *E. durans* strains, which were isolated from fish viscera and inhibited the growth of *Listeria monocytogenes* and other Gram-positive bacteria, several species of enterococci have been isolated from fish, such as *E. faecium* [19, 52] and *E. durans* [21]. According to Franz et al. [8] and Giraffa [50], the predominant bacterial strains of the genus *Enterococcus* that have been isolated from uncooked seafood (mollusks, fish, and fish fillets) were *E. faecium* and *E. faecalis*, while *E. hirae* and *E. durans* were found in lower proportion.

Based on 16S rRNA sequencing, the LAB GIT isolate strains ABBC2 and ABBC4 were taxonomically identified as *Enterococcus* species. They are classified in clade II, together with *Enterococcus faecium* DSM 20477 and *Enterococcus Lactis* BT159 respectively. Several species of enterococci have been isolated from fish, such as *E. faecium* [19, 52] and *E. durans* [21]. According to Franz et al. [8] and Giraffa [50], the predominant bacterial strains of the genus *Enterococcus* that have been isolated from uncooked seafood (mollusks, fish, and fish fillets) were *E. faecium* and *E. faecalis*, while *E. hirae* and *E. durans*, they were found in lower proportion. However, the definitive assignment of these isolates to the genus *Enterococcus* would be questionable as it is a genus known to cover species that can not be

delineated solely based on their 16S rRNA gene. Reliable identification would be possible if based on the analysis of complete genomes.

Genome mining for antimicrobial compounds in enterococci associated with wild marine animals has been described by Prichula et al. [1], bacteria from marine environments are especially promising, 73 putative antimicrobial compounds were identified, including 61 bacteriocins (83.56 %), 10 terpenes (13.70 %), and 2 (2.74 %) related to putative nonribosomal peptides (NRPs).

This research demonstrated that pH decrease of milk results from the production of lactic acid as the final form of lactose fermentation. A good acid-producing starter culture can reduce the pH of milk from its normal value of 6.6 ± 0.3 in 6h, and in general, enterococci exhibit low milk acidifying ability [55, 47]. The acidifying capacity at 30°C is revealed generally weakly because the tested LAB isolates were unable to reduce the pH beyond 5 after 24 h of incubation. *Enterococcus* sp. C2 is low acidifying whereas C4 showed a moderate acidity value after 72 h with a high growth rate (20,361 g/g.h). Results concerning proteolysis traduced the exploitation of casein by LAB, which started by the degradation of protein into oligopeptides, then to shorter peptides and amino acids via a cell-envelope proteinase after a combined action of various intracellular peptidases [56]. Proteolysis is also of industrial significance due to its contribution to the organoleptic characteristics of fermented milk products [57]. Except for *E. faecalis* strains, such activities are generally low for *Enterococcus* strains [58, 59]. Considerable studies on proteinase and comparatively fewer studies on peptidase activities in *Enterococcus* sp. recommend that proteolytic activities are generally low. This information agrees with our results about the proteolytic activities of LAB isolates, which showed low protease activity by producing small amounts of protein. Moreover, these results were in agreement with those obtained by Thapa et al. [19]. The proteolytic activity and acid production of enterococci during growth in milk is sometimes compared to those of *Streptococcus thermophilus* [60]. Due to their low acidifying capacity and limited proteolytic properties, enterococci are no longer considered as important components of primary starter cultures for dairy products. The results above demonstrate that LAB exercise low proteolytic and acidifying activity in fish products [19]. These technological properties can be exploited in the case of non-fermented peach products, containing a low concentration of carbohydrate content, which does not let decrease the acidification of food [61].

Enterococcus sp. C4 constituted the moderately acidifying isolate after 72h while expressing moderate proteolysis. At the end of these results, it appears that for this strain, there is a relationship between the two activities. The quantities recorded of FFA was

asserted by results concluded by Carrasco de Mendoza [62] concerning the examined enterococci strains exhibiting low lipolytic activity and literature which considered LAB strains as low or no lipolytic compared with other groups of microorganisms [63, 64]. It can be an interesting trait to obtain desirable characteristics without the development of defaults created in the case of extended maturation foods. Lipolysis is important in the development of flavor in dairy products, especially in cheese ripening. Results concerning highlighting lipolytic activity on agar medium supplemented with various fat sources showed that LAB isolates could hydrolyze natural fat substrate (olive oil) compared with artificial substrates (Tween 80). Whereas they are unable to hydrolyze Tween 20 (absence of clear zone). These results concord with works realized by Karam et al. [35]. Several factors, such as the origin of species, can influence enterococcal lipolytic activity [65]. Several dairy LAB, including *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, and *E. durans* have been reported to display lipolytic activity [66, 67]. Lipolysis in cheese usually intervenes via the esterase/lipase systems of LAB. Enterococci intervene in the ordinary savor and flavor of cheeses through proteolysis and lipolysis [65]. The low proteolytic, lipolytic activity of enterococci can be an advantage, since a slight lipolysis or proteolysis of a food is sufficient to induce the production of desirable flavors [64]. Our results regarding moderate proteolysis and lipolysis are possible traits of favorable flavor in the products [68]. However, lipases are of particular interest for the isolation of oil and fats from seafood byproducts as well as in the preparation of ω -3-poly-unsaturated fatty acids (ω -PUFAs) and enriched marine oils, given the nutritional quality of these constituents [69]. Moreover EPS producing LAB is industrially important microorganisms in the development of functional food products and used as starter cultures or coadjutants to develop fermented foods such as yogurt, cheese, and cereal-based products [70, 71] because of their viscosity. EPS may act as texturizers and stabilizers to avoid the use of food additives by its ability to retain water, interact with proteins, and increase the viscosity of the milk serum phase. The purpose is to obtain a desirable visual appearance of a product, to prevent interaction, and to have a creamy texture [72]. Several genera of *Enterococcus* have been studied for the production of EPS. The bioactive potentials of *Enterococcus* EPS include antibacterial, anticancer, anti-biofilm, immunological, antioxidant, prebiotic, and anti-diabetic potentials [73].

Antibiotic resistance susceptibility is an important point in the safety characterization of *Enterococcus* sp. for use in the food industry. It comprises both natural (intrinsic) and acquired (transferable) resistance. Enterococci are intrinsically resistant to many β -lactams and aminoglycosides. Acquired antibiotic resistance mediated by plasmids includes re-

sistance to chloramphenicol, tetracyclines, macrolides, quinolones, and aminoglycosides, which is a serious problem [74, 50]. The tested isolate *Enterococcus* sp. C2 revealed resistance towards all tested antibiotics (ATB) except Spiramycine. Our study agrees with results founded by Elmoslih [75] who studied strains of *E. faecium* isolated from Morocco dairy products and Gomez-Sala [52] on Enterococci strains isolated from fish, seafood, and fish products. Antibiotic resistance in the genus *Enterococcus* is controversial. *Enterococcus* sp. C4 showed resistance only to three ATBs (Amoxicillin, Tetracyclin, and Gentamycin) contrary to studies of Migaw [21] who demonstrated resistance to multiple antibiotics for *E. faecium* GM12 strains including beta-lactams, amino-glycosides and (vancomycin). Vancomycin resistance causes worrying problems for clinicians. The principal mechanism of glycopeptide resistance (vancomycin) in enterococci implicates the alteration of the peptidoglycan synthesis pathway, specifically the replacement of D-Alanine-D-Alanine (D-Ala-D-Ala), to either D-Alanine D-Lactate (D-Ala-D-Lac) or D-Alanine-D-Serine (D-Ala-D-Ser). To date, operons related to vancomycin resistance for enterococci are defined as A, -B, -C, -D, -E, -G, -L, -M, and N [76, 77]. However, isolates from fish GIT showed more multi-drug resistance than isolates from food origin [78] only a few are resistant to the clinically important antibiotics ampicillin, penicillin, gentamycin, and vancomycin [74]. These features are of special interest, particularly for clinical therapy. The decarboxylase activity of the Lactic acid bacteria should be the most inductor for production of biogenic amines in food. Enterococci can cause food intoxication through the production of biogenic amines. Tyramine level above 100 and 500 mg/kg, is considered potentially harmful for human health. Many environmental factors such as pH, temperature, and salt concentration can affect the amine formation by enterococci [65].

The results above are similar to those found by Martin-Platero [13]. The two tested LAB isolates were unable to produce biogenic amine from ornithine and lysine which is a good criterion for technological industry but production of tyramine presents a risk and poses a problem. The application of enterococci as, starter cultures, or adjuncts in the processing of some dairy and meat products is still a disputed issue due to formation of biogenic amines through microbial decarboxylation of free amino acids [65]. The low percentage of *E. faecium* strains which produced β -hemolysis was mentioned previously by Giraffa et al. [41]. Correspondingly, Eaton and Gasson [79], Trivedi et al. [80] described β -hemolytic *Enterococcus* isolates from food stuffs and recalled that β -haemolytic activity was higher in *E. faecalis* compared to *E. faecium*. None of the tested isolates produced hemolysin, so the absence of hemolytic activity indicates that these strains are not

virulent and should be a criterion for their selection to be used as starter cultures.

CONCLUSION

This study highlighted that *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4 is naturally occurring in the fish GIT microbiota, creating a favorable environment for the isolation of LAB, particularly Enterococci, that exhibit various functional properties such as acidifying, proteolysis, lipolysis, antibacterial activities, and EPS production. Considering these properties, along with safety evaluation tests, can facilitate selecting marine bacteria as starters or adjuncts in the food industry, to improve flavor, texture, safety, and quality of food.

Delving deeper, our future work will explore the extraction of enzymes involved in metabolisms, including proteases and lipases. Advances in enzyme technology and the growing understanding of enzyme action and marine sources of enzymes present significant opportunities for the economical generation of valuable enzymes for commercialization through recombinant RNA technology. Furthermore, our study highlights the potential medical applications of multi-drug resistant isolates, and we plan to delve deeper into their clinical therapy applications. By utilizing the abilities of these isolates to develop bacterial starters, it may be possible to enhance the quality and safety of seafood products significantly.

In summary, our endeavor has opened up new avenues for exploration and presents exciting opportunities to promote scientific advancements, improve the food industry, and enhance health and well-being.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was realized in the Research Laboratory on Biological Systems and Geomatics (LRSBG) and Laboratory of Geo-Environment and Space Development (GEDE) of University Mustapha Stambouli of Mascara, Algeria. Therefore, our sincere thanks go to the staffs of these two units.

REFERENCES

- [1] Prichula, J., Primon-Barros, M., Luz, R.C.Z., Castro, Í.M.S., Paim, T.G.S., Tavares, M., Ligabue Braun, R., d'Azevedo, P.A., Frazzon, J., Frazzon, A.P.G., Seixas, A., Gilmore, M.S. (2021) Genome Mining for Antimicrobial Compounds in Wild Marine Animals-Associated Enterococci. *Marine Drugs*. 19(6), 328.

- [2] Gomez-Sala, B., Muñoz-Atienza, E., Sánchez, J., Basanta, A., Herranz, C., Hernández, P.E., Cintas, L.M. (2015) Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. *European Food Research and Technology*. 241, 341–356.
- [3] Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier, F. (2014) Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*. 177, 136–154.
- [4] Giraffa, G. (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 215–222.
- [5] Foulquié-Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst L. (2006) The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106, 1–24.
- [6] Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings J., Holzapfel, W.H. (2011) Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 67, 4385–4389.
- [7] Cerning, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 7(1-2), 113–130.
- [8] Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. (2004) The genus *Enterococcus*: biotechnological and safety issues. In: Salminen, A., von Wright, A., Ouwehand, A. (eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Food Science and Technology. New York. 139, 199–248.
- [9] Lebreton, F., Willems, R.J.L., Gilmore, M.S. (2014) *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston*. 92–252.
- [10] Merrifield, D.L., Balcázar, J.L., Daniels, C., Zhou, Z., Carnevali, O., Sun, Y.Z. (2014) Indigenous lactic acid bacteria in fish and crustaceans. In: Merrifield D., Ringo E. (eds.), *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, UK. 128–168.
- [11] Sánchez, A., Benomar, N., Abriouel, H., Martínez Cañamero, M., Gálvez, A. (2010) Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiology*. 27, 955–961.
- [12] Wilaipun, P., Takeshi, Z., Sangjindavong, M., Nitisinprasert, S., Leelawatcharamas, V., Jiro, N., Kenji, S. (2002) Influence of physical factors and various complex media on growth and bacteriocin production of two-synergistic peptides with heat stable bacteriocin producer, *Enterococcus faecium* NKR-5-3 isolated from fermented fish. *Kasetsart Journal - Natural Science*. 36(3), 268–277.
- [13] Martin-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M. (2009) Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 132, 24–32.
- [14] Aguilar-Galvez, A., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., Campos, D., Thonart, P. (2012) Enterococci: advantages and disadvantages in biotechnology. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 16(1), 67–76.
- [15] Turcotte, C., Lacroix, C., Kheadr, E., Grignon, L., Fliss, I. (2004) A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*. 90, 283–293.
- [16] Folli, C., Ramazzina, I., Arcidiaco, P., Stoppini, M., Berni, R. (2003) Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. *FEMS Microbiology Letters*. 221, 143–149.
- [17] Švec, P., Franz, C.M.A.P. (2014) The genus *Enterococcus*. In: Holzapfel, W.H., Wood B.J.B. (eds.), *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. Wiley J., Sons, Ltd, Chichester, England. 175–211.
- [18] Hyewon, K., Naeun, O., Kwon, O.H., Seockmo, K., Jeongmin, S., Sangho, R. (2022) Exopolysaccharide of *Enterococcus faecium* L15 promotes the osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via p38 MAPK pathway. *Stem Cell Research and Therapy*. 13(446), 1–13.
- [19] Thapa, N., Pal, J., Tamang, J.P. (2006) Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish product of the Eastern Himalaya. *International Journal of Food Microbiology*. 107, 33–38.
- [20] Migaw, S., Ghrairi, T., Le Chevalier, P., Brillet, B., Fleury, Y., Hani, K. (2013) Isolation and Characterization of Enterococci Bacteriocin Strains from Tunisian Fish Viscera. *Food Science and Nutrition*. 4, 701–708.
- [21] Migaw, S., Ghrairi, T., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Berjeaud, J.M., Chobert, J.M., Hani, K., Haertle, T. (2014) Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Mediterranean fish viscera. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30, 1207–1217.

- [22] Mokrani, T., Essid, I., Hassouna, M., Lachheb, J., Ghram, A., Jouin, A. (2018) Phenotypic and Genotypic Characterization of *Carnobacterium divergens* Isolated from Refrigerated Tunisian Minced Raw Beef Meat. *Gene Technology*. 7(144), 2.
- [23] Fleming, H.R., Etchell, G.L., Costilow, R.N. (1975) Microbial inhibition by isolate of pediococcus from cucumber brine. *Applied Microbiology*. 30,104-1042.
- [24] Schillinger, U., Lücke, K. (1989) Antimicrobial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 55, 1901–1906.
- [25] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 74(12), 5463–5467.
- [26] Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5), 1792–1797.
- [27] Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16, 111–120.
- [28] Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4), 406–425.
- [29] Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33, 1870–1874.
- [30] Letunic, I., Bork, P. (2019) Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic acids research*. 47(1), 256–259.
- [31] Kihal, M., Prévost, H., Lhotte, M.E., Huang, D.Q., Diviès, C. (1996) Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *Microbiology*. 22, 219–223.
- [32] Monnet, C., Pernoud, S., Sepulchre, A., Fremaux, C., Corrieu, G. (2004) Selection and Properties of *Streptococcus thermophilus* Mutants Deficient in Urease. *Journal of Dairy Science*. 87, 1634–1640.
- [33] Folkertsma, B., Fox, P.F. (1991) Use of the Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*. 59, 217–224.
- [34] Bouton, Y., Guyot, P., Dasen, A., Grappin, R. (1993) Proteolytic activity of thermophilic lactobacillus strains isolated from sourdoughs and Comté. 1. Validation of laboratory techniques on mini cheeses. *Dairy Science and Technology*. 73(3), 265–279.
- [35] Karam, N.E., Dellali, A., Zadi-Karam, H. (2012) Lipolytic Activity from Lactic Bacteria. *Recent Research in Ruminants*. 19, 1.
- [36] Soares, M.D.K.G., Facundes, B.C., Júnior, A.F.C. and da Silva, E.M. (2015) Assessment of lipolytic activity of isolated microorganisms from the savannah of the Tocantins. *Acta Scientiarum Biological Sciences*. 37(4), 471–475.
- [37] Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J.M., Palop, L., Cabezas, L. (2010) Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. *Food Microbiology*. 27(1), 85–93.
- [38] Bachtarzi, N., Kharroub, K., Ruas-Madiedo, P. (2019) Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian dairy products and their application for skim-milk fermentations. *Elsevier Science*. 107, 117–124.
- [39] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robert, P.A. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28, 350–356.
- [40] Weinstein, M.P., Lewis, J.S. (2020) The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: background, organization, functions, and processes. *Journal of Clinical Microbiology*. 58(3), 10–1128.
- [41] Giraffa, G., Pepe, G., Locci, F., Neviani, E., Carminati, D. (1995) Haemolytic activity production of thermonuclease and biogenic amines by dairy enterococci. *Italian Journal of Food Sciences*. 7, 341–349.
- [42] Casarotti, S.N., Carneiro, B.M., Todorov, S.D., Nero, L.A., Rahal, P., Penna, A.L.B.B. (2017) In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. *Annals of Microbiology*. 67(4), 289–301.
- [43] Maijala, R.L. (1993) Formation of histamine and tyramine by some by some lactic acid bacteria in MRS broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology*. 17, 40–43.
- [44] Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W., Amann, R. (1995) Application of molecular method for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Journal of Dairy Science*. 5(8), 1081–1094.
- [45] Švec, P., Devriese, L.A. (2015) Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. Enterococcus. In: Whitman, W.B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., Dedysh, S. (eds.), Wiley, J., Sons, Ltd, Chichester, England. 1–25.

- [46] Mrkonjic Fuka, M., Kos, I., Maksimovic, A.Z., Bacic, M., Tanuwidjaja, I. (2021) Proteolytic *Lactococcus lactis* and Lipolytic *Enterococcus durans* of Dairy Origin as Meat Functional Starter Cultures. *Food Technology and Biotechnology*. 59(1), 63-73.
- [47] Schirru, S., Todorov, S.D., Favaroc, L., Pasqualina Mangia, N., Basaglia, M., Casella, S., Comunian, R., Gombossy de Melo Franco, B.D., Deiana, P. (2012) Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. *Food Control*. 25(1), 309–320.
- [48] Ahmadova, A., Dimov, S., Ivanova, I., Choiset, Y., Chobert, J.M., Kuliev, A., Haertlé, T. (2011) Proteolytic activities and safety of use of Enterococci strains isolated from traditional Azerbaijani dairy products. *European Food Research and Technology*. 233, 131–140.
- [49] Hassain, O., Zadi-Karam, H., Karam, N. (2007) Technological important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). *African Journal of Biotechnology*. 6(14), 1720–1727.
- [50] Giraffa, G. (2022) Microorganisms with food applications as probiotics. In : *Probiotics*. Academic Press. 39-53.
- [51] Perez-Pulido, R., Abriouel, H., Omar, N.B., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Galvez, A. (2006) Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food and Chemical Toxicology*. 44(12), 2070–2077.
- [52] Gomez-Sala, B., Muñoz-Atienza, E., Sánchez, J., Basanta, A., Herranz, C., Hernández, P.E., Cintas, L.M. (2015) Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. *European Food Research and Technology*. 241, 341–356.
- [53] Leroi, F. (2010) Occurrence and role of lactic acid bacteria in food products. *Food Microbiology*. 27, 698–709.
- [54] García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C.E., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, M.E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., Quirasco, M. (2014) Antibacterial activity produced by *Enterococcus spp.* isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LWT- Food Science and Technology*. 59(01), 26–34.
- [55] Huggins, A.M., Sandine, W.E. (1984) Differentiation of Fast and Slow Milk Coagulating Isolates in Strains of Streptococci. *Journal of Dairy Science*. 67(8), 1674–1679.
- [56] Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71, 394–406.
- [57] Sridhar, V.R., Hughes, J.E., Welker, D.L., Broadbent, J.R., Steele, J.L. (2005) Identification of Endopeptidase Genes from the Genomic Sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the Role of These Genes in Hydrolysis of Model Bitter Peptides. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(6), 3025–3032.
- [58] Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C., Lanorte, M.T. (2000) A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese. *Journal of Applied Microbiology*. 89, 267–274.
- [59] Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F. (2001) Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research*. 68(2), 303–16.
- [60] Gatti, M., Fournasari, E., Garni, D., Giraffa, G., Neviani, E. (1994) Enterococci present in Italian cheeses activate biochemical technological significance. *Industria del Latte*. 30, 11–27.
- [61] Leroi, F. (2014) Marine bacteria for food preservation. *Biofutur*. 360, 33–5.
- [62] Carrasco de Mendoza, M.S., Scarinci, M.S., Huerto-Garat, H.E., Simonetta, A.C. (1992) Technological properties of enterococci in lactic starters: acidifying and lipolytic activities. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*. 10(3), 289–293.
- [63] Perez-Guerra, N., Torrado-Agrasar, A., López-Macias, C., Pastrana, L. (2003) Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 2(3), 1–85.
- [64] Collins, Y.F., Mc Sweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G. (2003) Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*. 13, 841–866.
- [65] Taban, B.M., Dogan, H.B., Halkman, A.K. (2014) Biology of the *Enterococcus spp.* In: *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd Ed). 652–657.
- [66] Di Cagno, R., Quinto, M., Corsetti, A., Minervini, F., Gobbetti, M. (2006) Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *International Dairy Journal*. 16(2), 119–130.
- [67] Abeijón, M.C.M., Roxana, M., Medina, B., Alvarez, M. de F., González, S.N. (2009) Ester synthesis by lactic acid bacteria isolated from goats and ewe's milk and cheeses. *Food Chemistry*. 117(2), 241–247.
- [68] Thapa, N., Pal, J., Tamang, J.P. (2004) Microbial diversity in ngari, hentak and tungtap, fermented fish products of North-East India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 6, 599–607.

- [69] Fernandes, P. (2016) Enzymes in Fish and Seafood Processing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 4(59), 1–14.
- [70] Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P. (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 12, 163–171.
- [71] Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., Arendt, E.K. (2016) Production, properties and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(3), 1121–1135.
- [72] Duboc, P., Mollet, B. (2001) Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*. 11(9), 759–768.
- [73] Kavitha, D., Bruntha, P., Devi, C., Delattre, G.B., Reddy, P.H., Shetty, P.H. (2023) Exopolysaccharides produced by *Enterococcus* genus. An overview. *International Journal of Biological Macromolecules*. 226, 111–120.
- [74] Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzappel, W.H. (2003) Enterococci in foods- a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 105–122.
- [75] Elmoslih, A., Zanzan, M., Aissa, R., Hamadi, F., Ait Baddi, G., Ait Ben Aoumar, A., Achemchem, F. (2017) Isolation and Characterization of Bacteriocinogenic Enterococcal and Lactococcal Strains from South of Morocco Dairy Product. *Biotechnology Journal International*. 18(4), 1–16.
- [76] Arthur, M.R., Quintiliani, J.R. (2001) Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45, 375–381.
- [77] Courvalin, P. (2006) Vancomycin resistance in gram positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*. 42(1), 25–34.
- [78] Belicova, A., Krzkova, L., Krajcovic, J., Jurkovic, D., Sojka, M., Ebringer, L., Duinsky, R. (2007) Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* species isolated from Slovak Bryndza cheese. *Folia Microbiologica*. 52, 115–119.
- [79] Eaton, T.J., Gasson, M.J. (2001) Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 1628–1635.
- [80] Trivedi, K., Cupakova, S., Karpiskova, R. (2011) Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Journal of Veterinary Medicine*. 56(7), 352–357.

Received: 21.11.2023

Accepted: 06.01.2024

CORRESPONDING AUTHOR

Mohammed El Amine Bendaha

Laboratory of Molecular Biology, Genomics and Bioinformatics.

University Hassiba Ben Bouali
Chlef – Algeria

e-mail: m.a.bendaha@gmail.com

Annexes

Annexe 1 : Milieux de culture

- **Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Peptone.....	10 g
Citrate de sodium	2 g
Acétate de sodium.....	5 g
Glucose.....	20 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,25 g
Tween 80.....	1 mL
MnSO ₄	0,05 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée	qsp..... 1000 mL
pH 6,5	
Autoclavage 120 °C pendant 20 min	

- **Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elikier, 1962)**

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Saccharose.....	100 g
Citrate de sodium.....	1 g
Glucose.....	5 g
Gélatine.....	2,5 g
Sodium azide	0,075 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée	qsp..... 1000 mL
pH 6,5	
Autoclavage 120 °C pendant 20 min	

- **Milieu ESM (EPS Selection Medium) selon Bachtarzi et al. (2019)**

Lait écrémé	90g/l
Extrait de levure.....	3,5g/l
Peptone	3,5g/l
Glucose.....	10 g/l
Autoclavage 105°C pendant 15mn	

- **Eau physiologique**

Chlorure de sodium	8,5 g
Peptone.....	0,5 g
Eau distillée	qsp..... 1000 mL
pH 7,0	
Autoclavage 120°C pendant 20 minutes	

• **Mueller Hinton (Mueller et Hinton, 1941) Gélose molle**

Infusion de viande.....	300cm ³
Peptone de caséine.....	17,5g
Amidon de maïs.....	1,5g
Agar-Agar.....	8,5g
Eau distillée.....	1000mL
Autoclavage 120°C pendant 20mn	

• **Gélose nutritif (GN)**

Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure.....	2g
Peptone.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar-Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

• **Gélose au citrate de sodium**

Lait écrémé stérile.....	5ml
Citrate de sodium.....	0,25g
Gélose blanche.....	3ml
Eau distillée.....	1000 ml

• **Gélose blanche**

Agar-Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000 ml

• **Gélose nutritive (pH 7,4)**

Chlorure de sodium	5 g
Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Gélose	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

• **Milieu APT**

Tryptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
K ₂ HPO ₄	5g

Citrate de sodium.....	5g
NaCl.....	5g
Saccharose.....	10g
Tween 80.....	1ml
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,8g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,14g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,04g
Agar-Agar.....	15g
Eau distillée.....	10 ml
Autoclavage 120°C pendant 20 mn.	

• Milieu de Moëller à l'arginine

Peptone	5g
Extrait de viande.....	5 g
Glucose	0.5 g
Pyridoxal	5 mg
Pourpre de bromocresol	0.1 g
Rouge de crésol	5 mg
Arginine	10 g
Eau distillée	1000 ml
pH 6.8	
Autoclavage à 120°C pendant 15 à 20 mn	

Tableau 1 : Caractéristiques des bactéries lactiques (Axelsson, 2004)

	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Aggitorum</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Delbrueckii</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenes</i>	<i>Weissella</i>
Morphologie	B	B	C	C	C	C	C	C	C
Tétrades	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Croissance à 10°C	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+	+
Croissance à 45°C	-	+/-	-	+	-	-	+/-	+/-	-
Croissance à pH 4,4	nd	+/-	-	+	+/-	+/-	+	-	+/-
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	+	-
Croissance à 6,5% NaCl	nd	+/-	+	+	-	+/-	+	+	+/-
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Production de CO ₂	-	+/-	-	-	-	+	-	-	+
Production d'acide lactique	l.	l., d.	l.	l.	l.	d.	l., d.	l.	+/-

B : bacilles ; C : cocci ; nd : non déterminé ; +/- : variables selon les espèces

Tableau 2 : Les paramètres de l'acidification en fermentation discontinue

Attributs	ABBC10	ABBC2	ABBC3	ABBC4	ABBC12
D.O <i>initiale</i>	0.05	0.02	0.03	0.06	0.04
D.O <i>finale</i>	0.23	0.19	0.17	0.25	0.16
Acidité <i>initiale</i>	29	24	23	30	22
Acidité <i>finale</i>	66	55	50	70	40
Acidité formée	37	31	27	40	18
$\mu_{\max}$ in h ⁻¹	0.108	0.108	0.111	0.103	0.056
QAc max in g/g.h	18.933	13.390	13.450	20.361	8.988
Productivité max in g/L.h	14.814	12.158	11.602	16.363	11.365

Annexe 3

Tableau : Profil fermentaire des bactéries lactiques

	C2	C3	C4
Glycérol	+/-	+/-	+/-
Erythritol	+/-	+/-	+/-
D-Arabinose	+/-	+	+/-
L-Arabinose	+/-	+	+
Ribose	+/-	+/-	+/-
D-Xylose	+/-	+/-	+
L-Xylose	+	+/-	+/-
Adonitol	+	-	+/-
Méthyl-Xyloside	+	+/-	+/-
Galactose	+	+	+/-
Glucose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Sorbose	+/-	+	+/-
Rhamnose	+/-	+	+/-
Dulcitol	+/-	+	+
Inositol	+/-	+	+
Mannitol	+	+	+/-
Sorbitol	+/-	+	+/-
Méthyl-D-Mannoside	+	+/-	+
Méthyl-D-Glucoside	+	+/-	+/-
N-Acétyl-Glucosamine	+	+	+
Amygdaline	+	+/-	+/-
Arbutine	+	+	+
Esculine	+	+	+
Salicine	+	+	+
Cellobiose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Lactose	+/-	+	+/-
Mélibiose	+	+	+/-
Saccharose	+	+	+
Tréhalose	+	+	+/-
Inuline	+	+	-
Mélézitose	+/-	+/-	+/-
D-Raffinose	+/-	+	+/-
Amidon	+	+/-	+/-
Glycogène	+	+	+
Xylitol	+	-	+/-
Gentiobiose	+	+	+/-
Turanose	-	+/-	+/-
Lyxose	+/-	+/-	+/-
Tagatose	+/-	+	+
D-Fucose	+/-	+/-	+/-
L-Fucose	+/-	+	+/-

Annexe 3

D-Arabitol	+	+	+/-
L-Arabitol	+	+	+
Gluconate	+	+/-	+/-
2-cétogluconate	-	-	-
5- céto gluconate	+/-	+/-	+/-

Tampons, solutions et réactifs

1) Tampon phosphate 0,1M à pH7

-Solution A : 0,1 M potassium di-hydrogenophosphate

Dissoudre 13,61g de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml eau distillée

-Solution B : 0,1M di-sodium hydrogenophosphate

Dissoudre 17,8g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml eau distillée

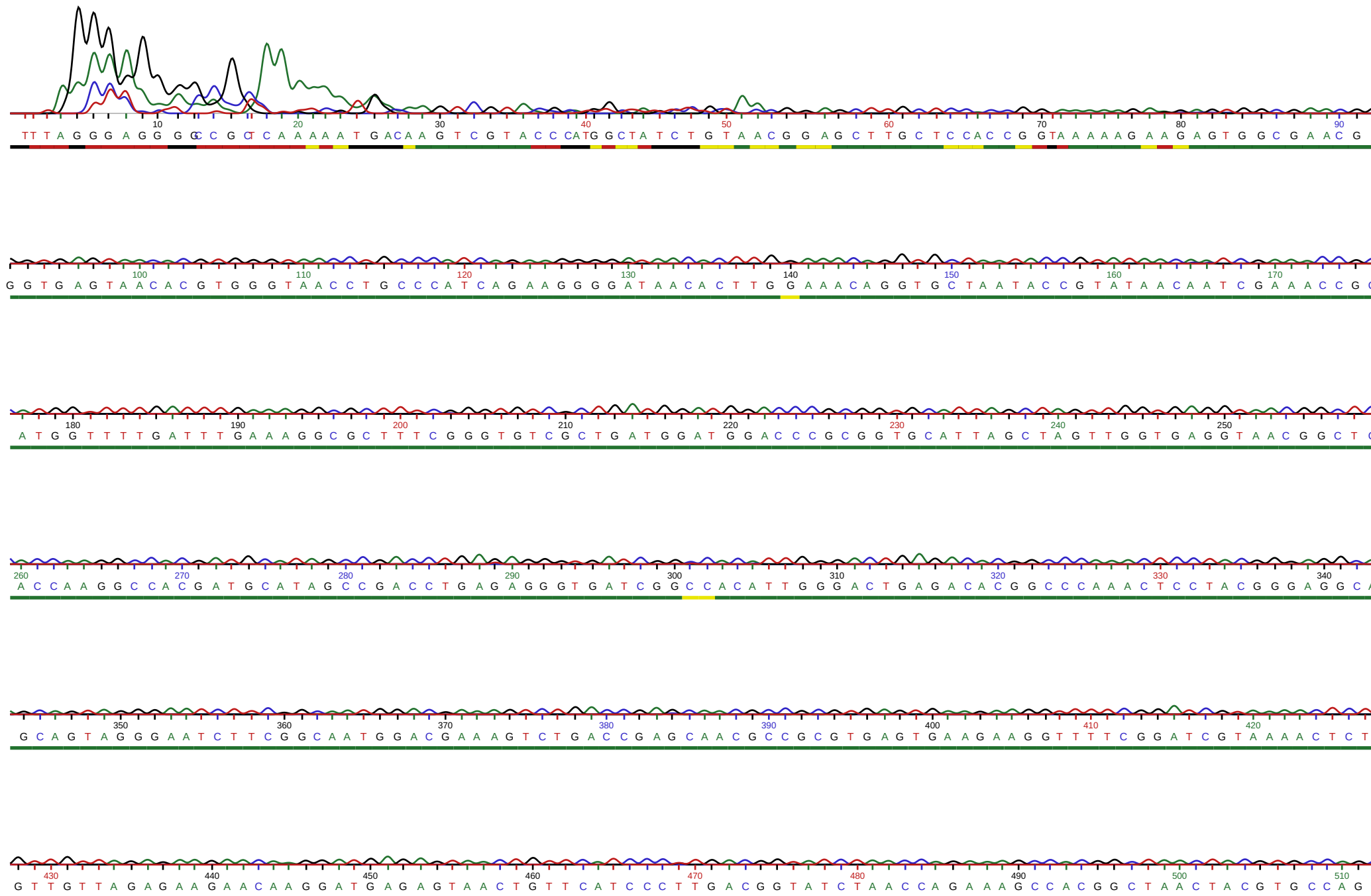
Pour obtenir un tampon phosphate 0,1M à pH 7 : il faut mélanger 40 ml A et 60 ml B.

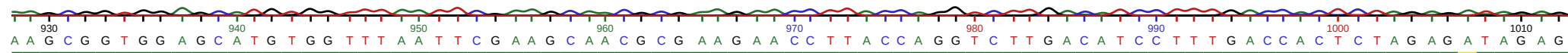
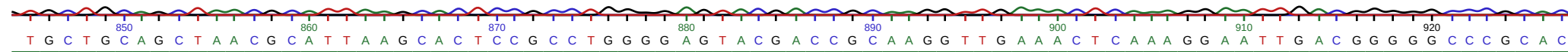
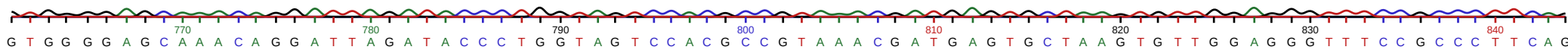
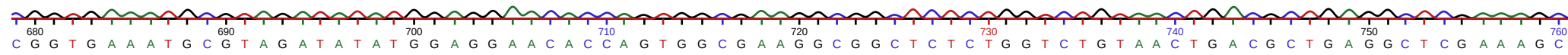
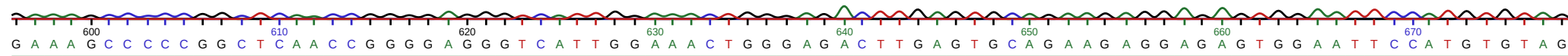
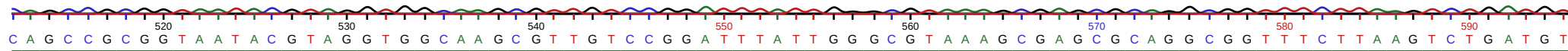
2) Réactif de bleu de Comassie G-250

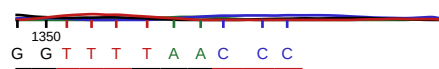
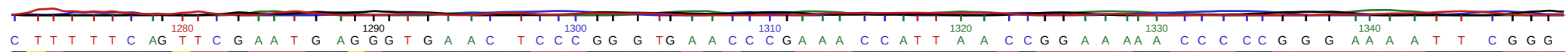
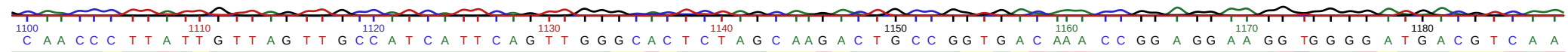
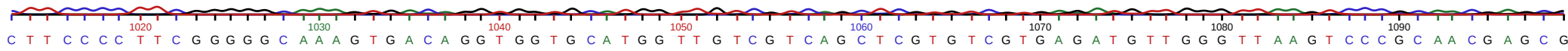
Dissoudre 100 mg de bleu de Comassie G-250 dans 50 ml d'éthanol à 95°. On ajoute pour cette solution H_2SO_4 à 85%. Diluer la solution résultante pour un volume final de 1000 ml.

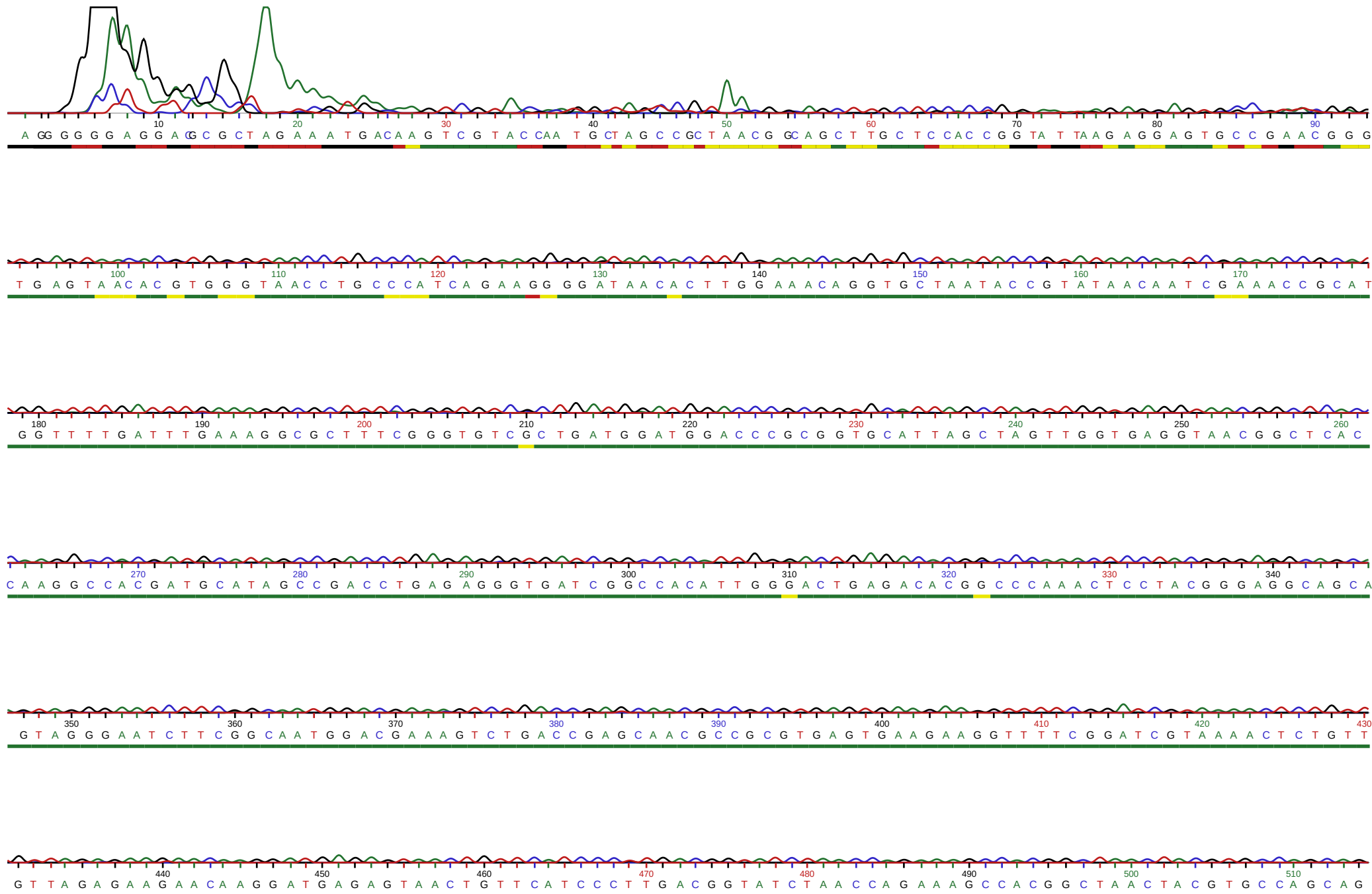
3) Ninhydrine

Dissoudre 0,8 g de la ninhydrine dans 80 ml d'éthanol à 99,5% et 10 ml d'acide acétique, suivi d'une addition de CaCl_2 dissout dans 1 ml d'eau distillée.











C C G C G G T A A T A C G T A G G T G G C A A G C G T T G T C C G G A T T T A T T G G G C G T A A A G C G A G C G C A G G C G G T T T C T T A A G T C T G A T G T G A A

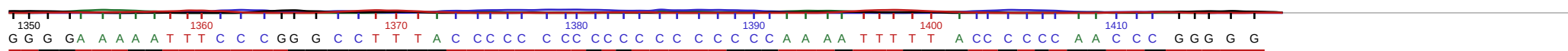
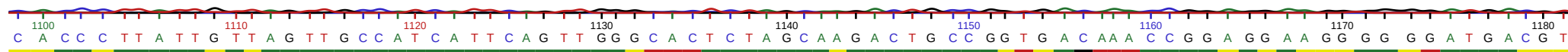
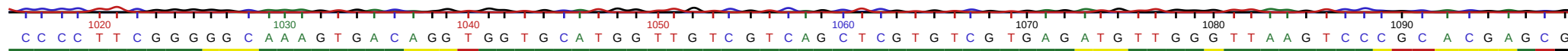
A G C C C C G G C T C A A C C G G G G A G G G T C A T T G G A A A C T G G G A G A C T T G A G T G C A G A A G A G G A G A G T G G A A T T C C A T G T G T A G C G G

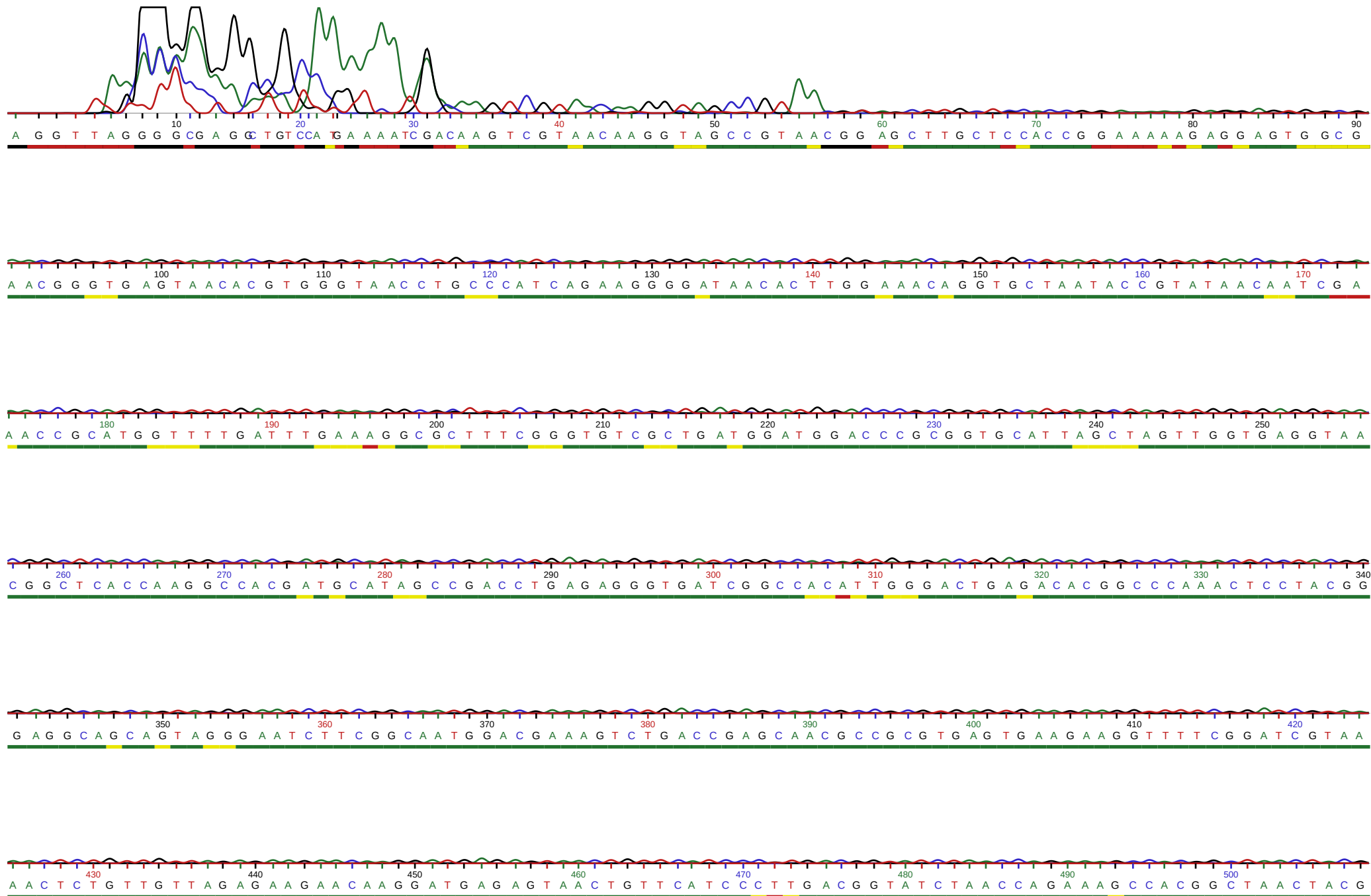
T G A A A T G C G T A G A T A T A T G G A G G A A C A C C A G T G G C G A A G G C G G C T C T C T G G T C T G T A A C T G A C G C T G A G G C T C G A A A G C G T G

G G G A G C A A A C A G G A T T A G A T A C C C T G T A G T C C A C G C C G T A A A C G A T G A G T G C T A A G T G T T T G G A G G G T T T C C G C C C T T C A G T G C

T G C A G C T A A C G C A T T A A G C A C T C C G C C T G G G G A G T A C G A C C G C A A G G T T G A A A C T C A A A G G A A T T G A C G G G G C C C G C A C A A G

C G G T G G A G C A T G T G G T T T A A T T C G A A G C A A C C G C G A A G A A C C T T A C C A G G T C T T G A C A T C C T T T G A C C A C T C T A G A G A T A G A G C T T







510 520 530 540 550 560 570 580 590
T G C C A G C A G C C G C G G T A A T A C G T A G G T G G C A A G C G T T G T C C G G A T T T A T T G G G C G T A A A G C G A G C G C A G G C G G T T T C T T A A G T

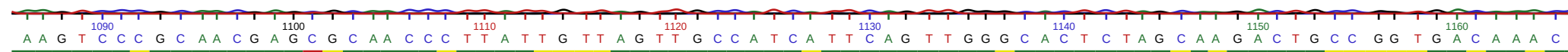
600 610 620 630 640 650 660 670
C T G A T G T G A A A G C C C C C G G C T C A A C C G G G G A G G G T C A T T G G A A A C T G G G A G A C T T G A G T G C A G A A G A G G A G A G T G G A A T T C C A

680 690 700 710 720 730 740 750
T G T G T A G C G G T G A A A T G C G T A G A T A T A T G G A G G A A C A C C A G T G G C G A A G G C G G C T C T C T G G T C T G T A A C T G A C G C T G A G G C

760 770 780 790 800 810 820 830
T C G A A A G C G T G A G G C A A A C A G G A T T A G A T A C C C T G G T A G T C C A C G C G T A A A C G A T G A G T G C T A A G T G T T G G A G G G T T T C C

840 850 860 870 880 890 900 910 920
G C C C T T C A G T G C T G C A G C T A A C G C A T T A A G C A C T C C G C C T G G G A G T A C G A C C G C A A G G T T G A G A C T C A A A G G A A T T G A C G G G

930 940 950 960 970 980 990 1000
G G C C C G C A C A A G C G G T G G A G C A T G T G G T T T A A T T C G A A G C A A C G C G A A G A A C C T T A C C A G G T C T T G A C A T C C T T T G A C C A C T



Production scientifique

Publication

1. Amel BATOUCHE, Mohammed EL Amine BENDAHA, Ahmed HARIRI, Fatima SAHNOUNI (2024). Molecular identification and technological properties of *enterococcus* sp. isolated from Algerian fresh fish. Fresenius Environmental Bulletin. 33 (01), 9-21

2. Publication du résumé de la participation de la SAN

BATOUCHE A., SAHNOUNI F., BOULENOUAR A. (2021). P121 : **Mise En Evidence De L'Effet Inhibiteur Et La Cinétique D'Acidification De Souches De *Carnobacterium* sp. Isolées De Certains Produits De La Pêche.** 4^{ème} Congrès International de la SAN « CI-SAN 2021 Oran, 16-17 Octobre 2021 ». Nutr. Santé, 2021, Vol. 10. (01), S1-S133

Communication

1. BATOUCHE Amel, SAHNOUNI Fatima. Mise en évidence de l'effet inhibiteur de la cinétique d'acidification de souches de *Carnobacterium* sp. Isolées de certains produits de la pêche. 4^{ème} Congrès International de la SAN. 16 et 17 octobre 2021. Oran, Algérie.

2. BATOUCHE Amel, SAHNOUNI Fatima. Caractérisation de certaines souches d'*Enterococcus* dans les produits de pêche. First National Symposium on Agro-ecology, Biodiversity and Climate Change held. 03 et 04 Juin 2023. Mascara, Algérie.

3. BATOUCHE Amel, SAHNOUNI Fatima. Activité antibactérienne et antibiorésistance de bactéries lactiques isolées à partir de produits de pêches. Second National Webinar on Biodiversity, Biochemistry & Environmental Microbiology held . 03 et 04 Janvier 2021. Laghouat, Algérie.

4. BATOUCHE Amel, SAHNOUNI Fatima. Caractérisation technologique de coques lactiques isolées à partir de produits de pêches. The First International Days of Natural and Life Sciences. 01 et 02 Mars 2022. Ouarguella, Algérie.

MOLECULAR IDENTIFICATION AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF *Enterococcus* sp. ISOLATED FROM ALGERIAN FRESH FISH

Amel Batouche^{1,5}, Mohammed El Amine Bendaha^{2,3,*}, Ahmed Hariri⁴, Fatima Sahnouni¹

¹Research Laboratory on Biological Systems and Geomatics (LRSBG), University Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria

²Laboratory of Molecular Biology, Genomics and Bioinformatics, University Hassiba Ben Bouali, Chlef, Algeria

³University Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria

⁴Laboratory of Bioconversion, Microbiology Engineering, and Health Safety, University Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria

⁵Laboratory of Geo-Environment and Space Development (GEDE), University Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria

ABSTRACT

The present study focused on the screening of the technological properties of *Enterococcus* isolated from the Gastro-Intestinal Tract of fresh fish of the Algerian coast. The technological characterization (antibacterial activities, acidifying ability, proteolytic and lipolytic activities, and production of exo-polysaccharides) and the safety one were studied to select the most appropriate LAB isolate to be used for the reinforcement of the antibacterial activity and the organoleptic properties in the food industry. These isolates showed low acidifying, proteolytic, and lipolytic activity and produced small amounts of exo-polysaccharides. Our research also showed that both *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4 isolates displayed direct antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella abony* and toward *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Pediococcus pentosaceus*. Furthermore, we investigated indirect antibacterial activity through LAB isolates supernatant. It is worth noting that antibiotic resistance was observed in *Enterococcus* sp. C2 against all the antibiotics tested except spiramycin, while *Enterococcus* sp. C4 showed resistance only to amoxicillin, tetracycline, and penicillin. Notably, both isolates were unable to produce biogenic amine from ornithine and lysine. Overall, our findings have significant implications for the food industry, and this research will contribute to the development of safer and more effective food preservation methods.

KEYWORDS:

Enterococcus sp., lactic acid bacteria, technological characterization, antibacterial activity

INTRODUCTION

Due to the large unexplored biodiversity, marine environments and bacteria are especially promising [1]. Biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin was applied by Gomez-Sala et al. [2]. Lactic Acid Bacteria (LAB) are a genetically diverse group of bacteria, encompassing rod-shaped bacteria such as *Enterococci*, *Pediococci*, or *Leuconostoc* [3], they have been used for a long time in food processing and preservation (alternative to chemical products). Due to their proteolytic activity, lipolytic activity, and diacetyl production [4], *Enterococcus* sp. have played a major role in the preparation of various fermented kinds of milk and meat products for generations, and they are mainly used for the refining of cheese products and the development of their aroma [5, 6]. However, the production of biogenic amines can be a negative factor associated with the use of lactic acid bacteria [7].

Enterococci are part of the commensal flora of the gastrointestinal tract of humans and animals which constitutes their predominant habitat even though they represent only a small proportion of the intestinal consortium, generally comprising less than 1% of the adult microflora [8, 9].

During the last decennium, various investigations on the isolations of LAB in fin fish have been accomplished. According to Merrifield et al. [10] members belonging to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, and *Weissella* genera are indigenous species in finfish.

E. faecium was founded by Sánchez et al. [11] in fish and seafood. *E. faecium* NKR-5-3 was isolated from fermented fish [12]. Several studies in the last decade have revealed the useful application of enterococci in foods [6, 13]. These microorganisms play an interesting role in the preservation (extension of shelf life) and the bacteriological quality of food while keeping their nutritional and organoleptic characteristics. However, enterococci also contributed to the fermentation of different foods (milk, vegetables, meats, or fish) and can produce diverse

antimicrobial substances (lactic acid, bacteriocins, or hydrogen peroxide) that make them important in the industry [14]. Bacteriocins can also find applications in the medical sector [15] where they can be exploited as antimicrobial agents in the pharmaceutical industry [16]. *Enterococcus* genera are useful in the treatment of diarrheal diseases caused by food-related pathogens and are also used as probiotics [17]. In their study, Hyewon et al. [18] demonstrated that L15EPS (EPS from LAB *E. faecium* L15 EPS) may have therapeutic value in bone regeneration as potential postbiotics.

Technological characterization of *Enterococcus* from fish has been reported. Thapa [19] described the technological properties of *Enterococcus* isolated from traditional process fish products and Migaw [20, 21] characterized *Enterococci* bacteriocinogenic strains from fish viscera. Extensive studies interested in dairy products, little works focused on the technological characterization of *Enterococcus* from fish.

Accordingly, this paper describes the isolation, antimicrobial spectrum, molecular, technological and safety characterization of *Enterococcus* strains originating from gastrointestinal tract (GIT) of fresh fish.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of lactic acid bacteria (LAB). Lactic acid bacteria (LAB) were isolated from the gastrointestinal tract (GIT) of two fish species (*Sardina sarda* and *Sarda pilchardus*). The GIT samples were homogenized in a saline solution containing 0.9 % of NaCl. A series of decimal dilutions is performed (up to 10^{-5}). 100 μ l of each solution were spread on MRS agar as demonstrated by Mokrani et al. [22]. The Petri dishes were then incubated at 30 °C for 24 to 48 h. The isolates were purified by successive sub-culturing until pure colonies are obtained and stored in 20 % glycerol broth at -20 °C.

Antibacterial activity. The Spot On Agar Test (SOAT) adapted by Fleming et al. [23] using eight indicator strains was used for the screening of the antibacterial activity. Petri dishes containing MRS agar were spotted with 18 h cultures of lactic isolates. This later was covered after 24 h of incubation with a second layer of 7 μ l of Muller Hinton agar (MH) containing each indicator strain. Petri dishes were examined for clear zones after a second incubation of 24 h.

The LAB isolates showing direct antimicrobial activity were selected based on their antimicrobial activity spectrum and assayed for the presence of bacteriocin activity in their cell-free culture supernatants by an agar well-diffusion test (ADT) as described by Schillinger and Luke [24]. To evaluate their inhibition amount, Petri dishes are cast by MH

agar of about 20 μ l in which wells are dug and are subsequently filled with 50-100 μ l of LAB isolate supernatants. Petri dishes were examined for clear zones after 24 h of incubation.

Phenotypic and genotypic identification. Isolated strains were examined for Gram stain, catalase, oxidase, ADH, and typical fermentation according to Bergy's Manual. Biochemical analysis was applied for the selected strains using the API 50CH system (BioMerieux, France), and the results were interpreted using the APIWEB program. Bacterial RNA was extracted using the Macherey-Nagel Nucleospin Kit following the extraction procedure of the kit supplier (Macherey-Nagel Germany). The extracted RNAs were assayed with the nano drop 2000 for the determination of their quantities and qualities by looking at the ratio of the wavelength ratio 260/280 and 260/230. Amplification was performed using the Biorad P100 thermal cycler (Biorad, USA). The universal 16S primers: 27f (forward) 5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3' and 1492R (Reverse) 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', the amplification products were revealed by 1% agarose gel electrophoresis by deposition of 10 μ l of PCR product followed by staining in an ethidium bromide bath (0.5 μ g/ml). After migration, the RNA is visualized and photographed under UV light. PCR products were purified by the Clean up kit from Macherey-Nagel (Macherey-Nagel Germany) following the protocol described by the supplier.

The identification of selected isolates was confirmed by sequencing 16S rRNA genes after PCR amplification. Isolated and purified PCR products were sequenced by the Sanger technique [25] using the big Dye v3.1 kit from Applied Biosystems and by using the primers that were used for PCR amplification. The sequences obtained were analyzed and cleaned up using the CHROMAS PRO. Sequence alignment was done using MUSCLE [26]. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model [27]. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The Neighbor-joining algorithm was used to obtain the initial tree [28]. The analysis involved 20 nucleotide sequences. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [29]. The tree was visualized with iTOL [30].

Technological characterization of the selected LAB isolates.

Acidification activity and kinetic of growth. The acidifying activity was performed according to Kihal and Prevost [31]. Kinetics of growth and acidification were determined in sterile skim milk. Tubes containing 10 mL of sterile skimmed milk were inoculated with 2 % of 18h fresh cultures. After 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h, 48 h, and 72 h of incubation at 30 °C, the acidification is studied using a pH meter

and the Kinetic growth was determined by spectrophotometer after clarifying milk medium with EDTA (at 1 %) [32]. The kinetic growth parameters ($\mu_{\max}$ in h^{-1} , QAc max in g/g.h , productivity max in g/L.h) are respectively, specific rate of growth, specific rate of acidities production, the productivity of acidities obtained from each strain growth curve using specialized software KaleidaGraph.

Proteolytic activity. Proteolytic activity was evaluated on milk agar (at 10 % sterile skim milk). Surface-dried plates of this agar were spotted with 24 h old cultures, incubated at 30 °C for 48 h, and examined for any clearing of casein around and underneath the growth [19]. It was determined by measurement of the diameter of the clear zone surrounding the inoculated spots (mm). After 72 h of incubation of sterile skim milk previously inoculated at 1 % with 24 h old culture, quantification of proteins (evaluated as free amino acid in medium) was performed as described by Folkertsma and Fox [33] using Cd-ninhydrin reagent. It is a determination of freeamino-acid-NH₂ groups in the culture supernatants at a wavelength of 507 nm. The results obtained were expressed in millimoles of glycine equivalent per liter of milk using a standard range made with a glycine stock solution according to the method adapted from Bouton et al. [34].

Lipolytic activity. Determination of lipolytic activity was assessed using the agar plate assay on MRS medium supplemented with 2 %, 3 %, and 5 % of Tween 80, Tween 20, or olive oil as described by Karam [35]. The LAB isolates were inoculated in spots from young precultures of 18 h. When a clear zone was formed around the colonies, the results were considered positive. Lipolytic activity was evaluated by the determination of free fatty acids in the supernatant of young cultures of lactic isolates after centrifugation at 12000 rpm for 30 mn [36]. The titration was performed with KOH solution and phenolphthalein under mechanical agitation until the color turned to pale pink. The volume of KOH was noted.

Exopolysaccharide production (EPS). Production of exo-polysaccharides was performed on Mayeux hyper sucrose agar according to Nieto-Arribas [37]. After incubation for 24-48 h at 30 °C, the EPS-producing colonies appear large and slithery. EPS quantification was performed in ESM (EPS Selection Medium) broth according to Bachtarzi [38]. The medium containing 90 g/l skim milk, 3.5 g/l yeast extract, 3.5 g/l peptone, and 10 g/l glucose was inoculated at 2 % of LAB isolate preculture to be incubated at 30 °C. The determination of EPS was performed by the phenol-sulfuric acid method using glucose as standard [39].

Safety characterization.

Antibiotic resistance. The resistance to antibiotics was tested according to the method published by the antibiogram committee of the French Society of Microbiology (CASFM). The isolates were screened for their resistance to amoxicillin (10 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), penicillin G (10 µg), spyramycine (10 µg), tetracycline (30 µg), vancomycin and nalidixic acid (30 µg). The diameter of the disc diffusion zone was interpreted based on the tables of the Clinical and Laboratory Standards Institute [40], the isolates were classified into three categories: resistant (R), intermediate (I) and susceptible (S).

Hemolytic activity. Hemolytic activity was performed as described by Giraffa et al. [41]. Bacterial cultures were inoculated on Columbia agar supplemented with 5 % of horse blood and incubated at 37 °C for 24 h. Any changes on the plates were reported γ -hemolysis (no zone) or α -hemolysis (green zone) around colonies was considered non hemolytic; while β -hemolysis (clear zone) was considered as hemolytic [42].

Biogenic amine production. The decarboxylase test for the production of biogenic amines was performed according to Maijala and Eerola [43] with the addition of the following amino acids as precursors: lysine, ornithine, adenine and tyrosine. Precultures of LAB strain isolates were spotted on Petri dishes containing decarboxylating agar supplemented at 0.25 % with each of the previous precursors. After incubation, biogenic amine production should have been detectable by the presence of a purple halo surrounding the spots.

Statistical analysis. Statistical analysis were performed using SPSS (Ver. 20). Numerical data corresponding to technological characteristics were subjected to analysis of variance (ANOVA) at a significance level of $P < 0.05$. Statistical differences between the means of the properties were noted and all analyses were made in triplicate.

RESULTS

Antibacterial activity. 20 bacterial strains Gram-positive, catalase negative, and oxidase negative were screened for their antibacterial activity against eight indicators strains, three of them are lactic acid bacteria LAB (*Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Pediococcus pentosaceus*), the remaining five are : *Escherichia coli*, *Salmonella abony*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*, assayed by Spot On Agar Test (SOAT) and well diffusion Agar Test (WDAT). Two LAB isolates were selected for further technological properties. Inhibitory spectra of

these isolates against three LAB strains, Gram-negative (*E. coli* and *S. abony*) and Gram-positive pathogenic bacteria non-sporulated (*S. aureus*) and sporulated (*B. cereus* and *B. subtilis*) is presented in Table 1.

Bacterial strains identification and phylogenetic analysis. The isolated strains ABBC2 and ABBC4 were identified phenotypically based on their morphological and biochemical characteristics and by API 50CH gallery. The genus *Enterococcus* comprises a ubiquitous group of non-spore-forming, ovoid, Gram-positive bacteria [44]. They are chemo-organotrophic facultative anaerobes with homofermentative metabolism [17]. Their growth is between 10 °C and 45 °C, with an optimum growth between 35 °C and 37 °C [45], they can use mannitol and arabinose but do not ferment inulin and can survive under 60 °C/30 min. The results showed that *Enterococcus* dominated the other genera in fresh fish. The two retained isolates ABBC2 and ABBC4 were

phenotypically classified as *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4 respectively.

The phylogenetic tree demonstrating the relationships between the strains with their corresponding similar sequences from other closely related bacteria are shown in Figure 1. The partial 16S rRNA gene sequences of the two strains *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4 have been deposited in the GenBank database, accession numbers are respectively: ON377335 and ON383936. 16S rRNA sequence analysis showed high strain similarity to *Enterococcus* species. From the phylogenetic tree, we can see that *Enterococcus* sp. C4 and *Enterococcus* sp. C2 are clustered together with *Enterococcus lactis* BT159 and *Enterococcus faecium* DSM 20477 in clade II. The first clade includes *Enterococcus thailandicus* NBRC 101867 and *Enterococcus durans* 100479.

TABLE 1
Antibacterial activity of the strains ABBC2 and ABBC4

	ABBC2	ABBC4
<i>L. plantarum</i> JCM 1149	-	+++
<i>L. pseudomesenteroides</i> NRIC 1777	++	+++
<i>P. pentosaceus</i> ATCC25745	++	+++
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+++	+++
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	+++	+++
<i>S. abony</i> ATCC 6017	++	+++
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	+++	+++
<i>B. subtilis</i> ATCC 168	+++	+++

- No activity, + radius of inhibition zone (<6 mm), ++ radius of inhibition zone (6–12 mm), +++ radius of inhibition zone (>12 mm).

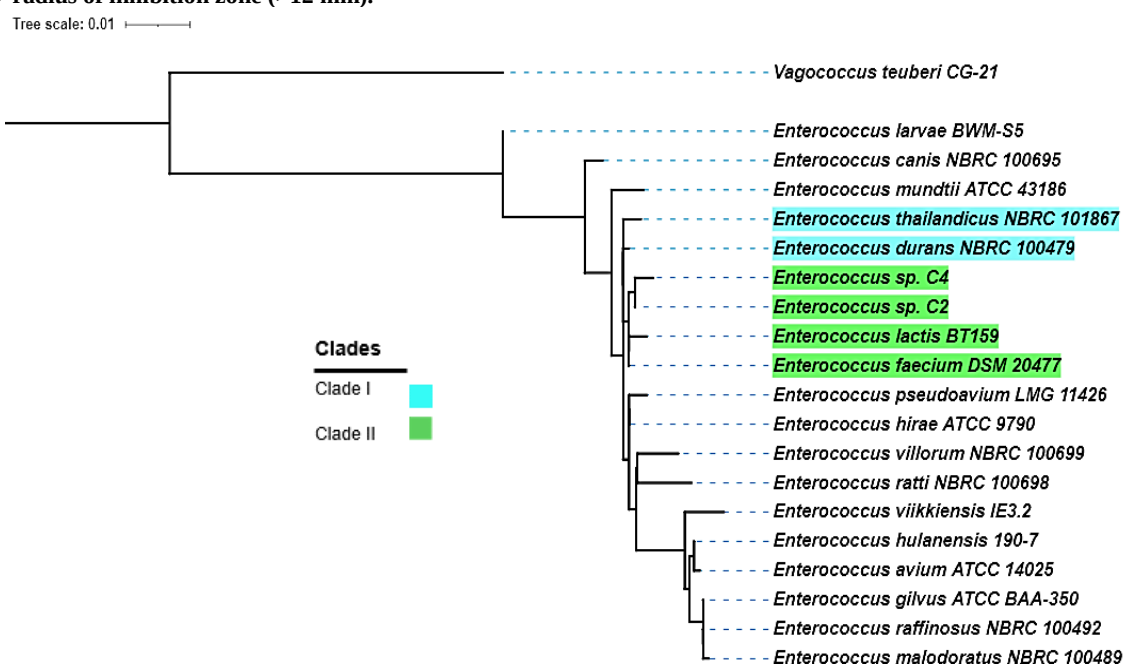


FIGURE 1
Phylogenetic tree analysis by Maximum Likelihood method.

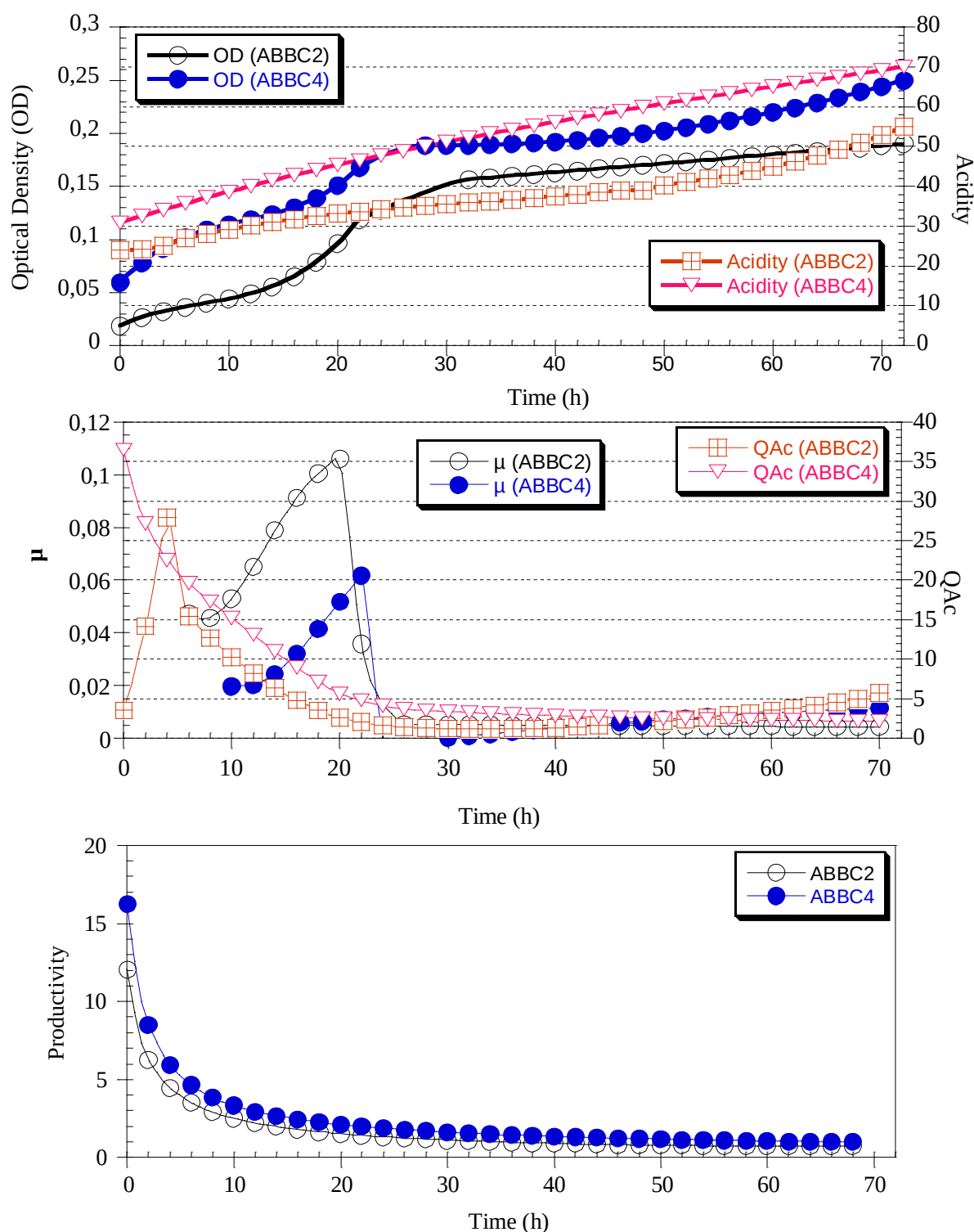


FIGURE 2

Kinetic parameters of growth and acidity production by *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4 strains during batch fermentations.

Technological properties.

Acidifying activity. *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4 isolates grew in milk and were able to change milk's pH after 12, 20, 24, 48, and 72 h of incubation. The tested LAB isolate *Enterococcus* sp. C4 acidifies rapidly milk at the end of 12 h of

incubation. However, the strain *Enterococcus* sp. C2 takes 20 h. After 72 h, the pH of LAB strains decreased to values lower than 5 (4.05) for *Enterococcus* sp. C4. These strains are divided into low (*Enterococcus* sp. C2; AT= 55 °D) to moderate acidifying isolate (*Enterococcus* sp. C4; AT=70 °D). In

agreement with Mrkonjić Fuka et al. [46] who found that *Enterococcus durans* (ED0207) of dairy origin exhibited medium acidification and Schirru et al. [47] who reported that acidifying activity of *E. faecium* isolated from goat's milk was generally low (Figure 2). Kinetic growth parameters evaluated are: $\mu_{\max}$ [specific rate of growth ($\mu \text{ inh}^{-1}$)], specific rate of acidities production (QAc in g/g.h) and productivity of acidities in g/L.h. Values of the growth parameters obtained differed between strains. It depends on their capacity to grow in milk. The two strains *Enterococcus sp.* C2 and *Enterococcus sp.* C4 starts with an initial OD of 0.02 and 0.06 respectively and reaches the maximum values of 0.19 and 0.25 after 72 h of culture. During this period of growth, they produce an amount of acidity of 31 and 40 respectively.

The study of the kinetic parameters indicates that the two strains have low maximal specific rates of growth ($\mu_{\max}$ of 0.036 h^{-1} for *Enterococcus sp.* C2 and 0.062 h^{-1} for *Enterococcus sp.* C4). The maximal specific rate of acidity production (QAc max) is very high for the *Enterococcus sp.* C4 strain (36.43 g/g.h) compared to the *Enterococcus sp.* C2 strain (27.93 g/g.h). Productivity is 12 g/L.h for *Enterococcus sp.* C2 and 16 g/L.h for *Enterococcus sp.* C4.

Proteolytic activity. Results regarding proteolytic activity demonstrated that the two tested isolates were able to hydrolyze caseins. *Enterococcus sp.* C2 showed no detectable activity for proteolysis on milk agar plates, which can be considered as a safety character according to Ahmadova et al. [48]. Whereas the strain *Enterococcus sp.* C4 showed the highest diameter halo of degradation, though the estimated proteolytic activity of these strains revealed that the LAB isolate *Enterococcus sp.* C4 is the one with the highest value (3.185 mmol eq gly/l of milk) compared with the isolate *Enterococcus sp.* C2 (1,809 mmol eq gly/l). Schirru et al. [47] in their study reported low proteolytic activity in 2 among 4 tested *E. faecium* strains isolated from goat's milk (from Sardinia, Italy). Based on the results of Has-sain [49] who found that the supernatant protein

value of LAB isolated from three breeds of dromedary raw milk in south Algeria, is evaluated in 72 h at a level between 1.85 (*E. faecium* DN5) and 5.95 mmol eq gly/l (*E. faecium* DT2), our results are comprised in this interval (Figure 3).

Lipolytic activity. The two LAB strains showed lipolytic activities revealed on agar with olive oil or Tween 80 (Table 2). The appearance of the biggest clear zone of degradation is obtained by the strain *Enterococcus sp.* C2 is evaluated by the quantities of free fatty acid (FFA) and the moderate value produced is measured as the concentration of NH_2 released from isolate supernatant (1.25 $\mu\text{mol/ml}$) against 1.166 $\mu\text{mol/ml}$ for *Enterococcus sp.* C4 (Figure 3).

EPS production. The production of exopolysaccharids appeared on hyper sucrose agar (Table 2) for the two tested LAB strains estimated by small quantities (*Enterococcus sp.* C2; 0,93 g/l and *Enterococcus sp.* C4; 0,7 g/l) in ESM (EPS Selection Medium) after 48h (Figure 3).

Safety characterization.

Antibiotic resistance. Antibiotic resistance of the two tested strains was performed against eight antibiotics (ATB) using the disk diffusion method. The LAB isolates *Enterococcus sp.* C2 showed resistance to all the ATBs including Vancomycin, Nalidixic acid, and Gentamicin except Spiramycin whereas *Enterococcus sp.* C4 showed resistance only to Amoxicillin, Tetracycline, and Penicillin. The two tested strains were contradictory whose *Enterococcus sp.* C4 was susceptible to Gentamycin, Vancomycin, nalidixic acid and Spiramycin (Table 2).

Biogenic amines production. LAB isolates were screened for their abilities to produce biogenic amines. None of the two strains *Enterococcus sp.* C2 and *Enterococcus sp.* C4 produced biogenic amine from ornithine and lysine but they showed this ability from tyrosine and adenine. In particular, in the presence of a pool of free amino acids as precursors, *E. faecalis*, *E. faecium*, and *E. durans* strains are regarded to be strong tyramine producers [50].

TABLE 2
Antibiotic resistance of *Enterococcus sp.* C2 and *Enterococcus sp.* C4

	<i>Enterococcus sp.</i> C2	<i>Enterococcus sp.</i> C4
Gentamicin	R	S
Amoxicillin	R	R
Tetracycline	R	R
Erythromycin	R	I
Vancomycin	R	S
Penicillin	R	R
Spiramycin	S	S
Nalidixic acid	R	S

R resistant, S sensitive, I intermediate

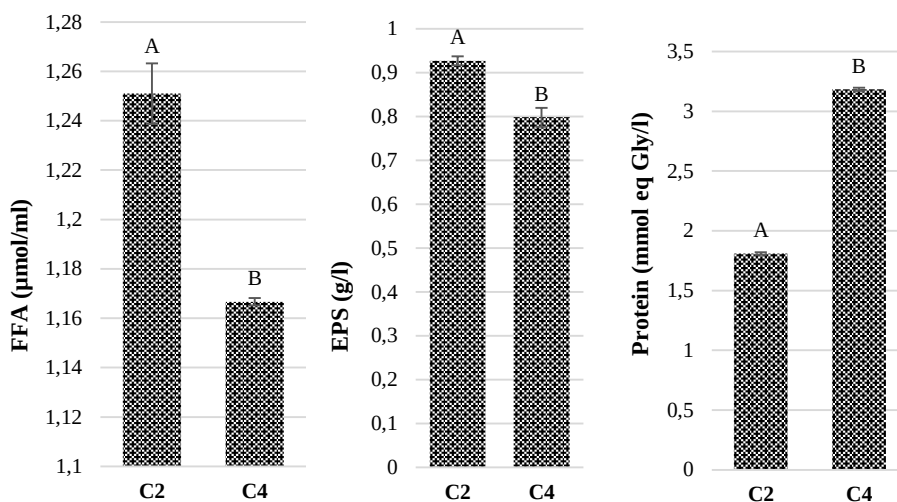


FIGURE 3

Protein, lipid, and EPS quantification for the strains *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4

Hemolytic activity. Hemolysin is a toxin capable of causing hemolysis, encoded in either plasmid or the chromosomal DNA, and it constitutes a significant virulence factor that affects the intensity of the disease [51]. The hemolytic activity was detected in *E. mundtii* and *E. durans* of dairy origin and two *E. casseliflavus* strains of dairy and meat origin. Contrary to the current study which recalled that *Enterococcus* isolate *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4 are interestingly hemolysin negative, accordingly to results found by Gomez-Sala [52].

DISCUSSION

The present study aimed at the exploration of the LAB of fresh Algerian fish and the investigation of their metabolic activities (acidifying, proteolytic, lipolytic, antibacterial activities and EPS production) with a view to their potential application in food industry or medical field. 20 strains were selected from two fish species captured along the Algerian coastline. Of these, two isolates were selected for their high antagonist properties against several LAB and food borne pathogens. The microbial load of peach products showed that lactic cocci are the predominant LAB [53], which may be attributed to the high concentration of salts in the sea [19]. Both ABBC2 and ABBC4 were active against pathogen microorganisms such as *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Escherichia coli*, *Salmonella abony*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. Based on the obtained results, this two isolates have the most important antibacterial activity produced well-defined inhibition halos with a large spectrum (inhibition halo >12mm) against all indicator strains tested (Gram-positive and Gram-negative). Our results are relevant and showed that these strains could be used in the

control of food-borne pathogens, LAB could produce metabolites which have an important lytic activity, such as bacteriocins, and if they are to be used as starter cultures, then there would be an additional effect of lactic acid production and competence for substrates with other microorganisms [54]. The inhibition spectrum of *Enterococcus* has been extensively studied and characterized, particularly with regard to *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* sp. and *Clostridium* sp., but also against Gram-negative bacteria, fungi and yeasts [14]. Antimicrobial activity of *Enterococcus* spp. isolated from fish viscera has been reported. Migaw et al. [20] described the antimicrobial activity of *E. durans* strains, which were isolated from fish viscera and inhibited the growth of *Listeria monocytogenes* and other Gram-positive bacteria, several species of enterococci have been isolated from fish, such as *E. faecium* [19, 52] and *E. durans* [21]. According to Franz et al. [8] and Giraffa [50], the predominant bacterial strains of the genus *Enterococcus* that have been isolated from uncooked seafood (mollusks, fish, and fish fillets) were *E. faecium* and *E. faecalis*, while *E. hirae* and *E. durans* were found in lower proportion.

Based on 16S rRNA sequencing, the LAB GIT isolate strains ABBC2 and ABBC4 were taxonomically identified as *Enterococcus* species. They are classified in clade II, together with *Enterococcus faecium* DSM 20477 and *Enterococcus Lactis* BT159 respectively. Several species of enterococci have been isolated from fish, such as *E. faecium* [19, 52] and *E. durans* [21]. According to Franz et al. [8] and Giraffa [50], the predominant bacterial strains of the genus *Enterococcus* that have been isolated from uncooked seafood (mollusks, fish, and fish fillets) were *E. faecium* and *E. faecalis*, while *E. hirae* and *E. durans*, they were found in lower proportion. However, the definitive assignment of these isolates to the genus *Enterococcus* would be questionable as it is a genus known to cover species that can not be

delineated solely based on their 16S rRNA gene. Reliable identification would be possible if based on the analysis of complete genomes.

Genome mining for antimicrobial compounds in enterococci associated with wild marine animals has been described by Prichula et al. [1], bacteria from marine environments are especially promising, 73 putative antimicrobial compounds were identified, including 61 bacteriocins (83.56 %), 10 terpenes (13.70 %), and 2 (2.74 %) related to putative nonribosomal peptides (NRPs).

This research demonstrated that pH decrease of milk results from the production of lactic acid as the final form of lactose fermentation. A good acid-producing starter culture can reduce the pH of milk from its normal value of 6.6 ± 0.3 in 6h, and in general, enterococci exhibit low milk acidifying ability [55, 47]. The acidifying capacity at 30°C is revealed generally weakly because the tested LAB isolates were unable to reduce the pH beyond 5 after 24 h of incubation. *Enterococcus* sp. C2 is low acidifying whereas C4 showed a moderate acidity value after 72 h with a high growth rate (20,361 g/g.h). Results concerning proteolysis traduced the exploitation of casein by LAB, which started by the degradation of protein into oligopeptides, then to shorter peptides and amino acids via a cell-envelope proteinase after a combined action of various intracellular peptidases [56]. Proteolysis is also of industrial significance due to its contribution to the organoleptic characteristics of fermented milk products [57]. Except for *E. faecalis* strains, such activities are generally low for *Enterococcus* strains [58, 59]. Considerable studies on proteinase and comparatively fewer studies on peptidase activities in *Enterococcus* sp. recommend that proteolytic activities are generally low. This information agrees with our results about the proteolytic activities of LAB isolates, which showed low protease activity by producing small amounts of protein. Moreover, these results were in agreement with those obtained by Thapa et al. [19]. The proteolytic activity and acid production of enterococci during growth in milk is sometimes compared to those of *Streptococcus thermophilus* [60]. Due to their low acidifying capacity and limited proteolytic properties, enterococci are no longer considered as important components of primary starter cultures for dairy products. The results above demonstrate that LAB exercise low proteolytic and acidifying activity in fish products [19]. These technological properties can be exploited in the case of non-fermented peach products, containing a low concentration of carbohydrate content, which does not let decrease the acidification of food [61].

Enterococcus sp. C4 constituted the moderately acidifying isolate after 72h while expressing moderate proteolysis. At the end of these results, it appears that for this strain, there is a relationship between the two activities. The quantities recorded of FFA was

asserted by results concluded by Carrasco de Mendoza [62] concerning the examined enterococci strains exhibiting low lipolytic activity and literature which considered LAB strains as low or no lipolytic compared with other groups of microorganisms [63, 64]. It can be an interesting trait to obtain desirable characteristics without the development of defaults created in the case of extended maturation foods. Lipolysis is important in the development of flavor in dairy products, especially in cheese ripening. Results concerning highlighting lipolytic activity on agar medium supplemented with various fat sources showed that LAB isolates could hydrolyze natural fat substrate (olive oil) compared with artificial substrates (Tween 80). Whereas they are unable to hydrolyze Tween 20 (absence of clear zone). These results concord with works realized by Karam et al. [35]. Several factors, such as the origin of species, can influence enterococcal lipolytic activity [65]. Several dairy LAB, including *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, and *E. durans* have been reported to display lipolytic activity [66, 67]. Lipolysis in cheese usually intervenes via the esterase/lipase systems of LAB. Enterococci intervene in the ordinary savor and flavor of cheeses through proteolysis and lipolysis [65]. The low proteolytic, lipolytic activity of enterococci can be an advantage, since a slight lipolysis or proteolysis of a food is sufficient to induce the production of desirable flavors [64]. Our results regarding moderate proteolysis and lipolysis are possible traits of favorable flavor in the products [68]. However, lipases are of particular interest for the isolation of oil and fats from seafood byproducts as well as in the preparation of ω -3-poly-unsaturated fatty acids (ω -PUFAs) and enriched marine oils, given the nutritional quality of these constituents [69]. Moreover EPS producing LAB is industrially important microorganisms in the development of functional food products and used as starter cultures or coadjutants to develop fermented foods such as yogurt, cheese, and cereal-based products [70, 71] because of their viscosity. EPS may act as texturizers and stabilizers to avoid the use of food additives by its ability to retain water, interact with proteins, and increase the viscosity of the milk serum phase. The purpose is to obtain a desirable visual appearance of a product, to prevent interaction, and to have a creamy texture [72]. Several genera of *Enterococcus* have been studied for the production of EPS. The bioactive potentials of *Enterococcus* EPS include antibacterial, anticancer, anti-biofilm, immunological, antioxidant, prebiotic, and anti-diabetic potentials [73].

Antibiotic resistance susceptibility is an important point in the safety characterization of *Enterococcus* sp. for use in the food industry. It comprises both natural (intrinsic) and acquired (transferable) resistance. Enterococci are intrinsically resistant to many β -lactams and aminoglycosides. Acquired antibiotic resistance mediated by plasmids includes re-

sistance to chloramphenicol, tetracyclines, macrolides, quinolones, and aminoglycosides, which is a serious problem [74, 50]. The tested isolate *Enterococcus* sp. C2 revealed resistance towards all tested antibiotics (ATB) except Spiramycine. Our study agrees with results founded by Elmoslih [75] who studied strains of *E. faecium* isolated from Morocco dairy products and Gomez-Sala [52] on Enterococci strains isolated from fish, seafood, and fish products. Antibiotic resistance in the genus *Enterococcus* is controversial. *Enterococcus* sp. C4 showed resistance only to three ATBs (Amoxicillin, Tetracyclin, and Gentamycin) contrary to studies of Migaw [21] who demonstrated resistance to multiple antibiotics for *E. faecium* GM12 strains including beta-lactams, amino-glycosides and (vancomycin). Vancomycin resistance causes worrying problems for clinicians. The principal mechanism of glycopeptide resistance (vancomycin) in enterococci implicates the alteration of the peptidoglycan synthesis pathway, specifically the replacement of D-Alanine-D-Alanine (D-Ala-D-Ala), to either D-Alanine D-Lactate (D-Ala-D-Lac) or D-Alanine-D-Serine (D-Ala-D-Ser). To date, operons related to vancomycin resistance for enterococci are defined as A, -B, -C, -D, -E, -G, -L, -M, and N [76, 77]. However, isolates from fish GIT showed more multi-drug resistance than isolates from food origin [78] only a few are resistant to the clinically important antibiotics ampicillin, penicillin, gentamycin, and vancomycin [74]. These features are of special interest, particularly for clinical therapy. The decarboxylase activity of the Lactic acid bacteria should be the most inductor for production of biogenic amines in food. Enterococci can cause food intoxication through the production of biogenic amines. Tyramine level above 100 and 500 mg/kg, is considered potentially harmful for human health. Many environmental factors such as pH, temperature, and salt concentration can affect the amine formation by enterococci [65].

The results above are similar to those found by Martin-Platero [13]. The two tested LAB isolates were unable to produce biogenic amine from ornithine and lysine which is a good criterion for technological industry but production of tyramine presents a risk and poses a problem. The application of enterococci as, starter cultures, or adjuncts in the processing of some dairy and meat products is still a disputed issue due to formation of biogenic amines through microbial decarboxylation of free amino acids [65]. The low percentage of *E. faecium* strains which produced β -hemolysis was mentioned previously by Giraffa et al. [41]. Correspondingly, Eaton and Gasson [79], Trivedi et al. [80] described β -hemolytic *Enterococcus* isolates from food stuffs and recalled that β -haemolytic activity was higher in *E. faecalis* compared to *E. faecium*. None of the tested isolates produced hemolysin, so the absence of hemolytic activity indicates that these strains are not

virulent and should be a criterion for their selection to be used as starter cultures.

CONCLUSION

This study highlighted that *Enterococcus* sp. C2 and *Enterococcus* sp. C4 is naturally occurring in the fish GIT microbiota, creating a favorable environment for the isolation of LAB, particularly Enterococci, that exhibit various functional properties such as acidifying, proteolysis, lipolysis, antibacterial activities, and EPS production. Considering these properties, along with safety evaluation tests, can facilitate selecting marine bacteria as starters or adjuncts in the food industry, to improve flavor, texture, safety, and quality of food.

Delving deeper, our future work will explore the extraction of enzymes involved in metabolisms, including proteases and lipases. Advances in enzyme technology and the growing understanding of enzyme action and marine sources of enzymes present significant opportunities for the economical generation of valuable enzymes for commercialization through recombinant RNA technology. Furthermore, our study highlights the potential medical applications of multi-drug resistant isolates, and we plan to delve deeper into their clinical therapy applications. By utilizing the abilities of these isolates to develop bacterial starters, it may be possible to enhance the quality and safety of seafood products significantly.

In summary, our endeavor has opened up new avenues for exploration and presents exciting opportunities to promote scientific advancements, improve the food industry, and enhance health and well-being.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was realized in the Research Laboratory on Biological Systems and Geomatics (LRSBG) and Laboratory of Geo-Environment and Space Development (GEDE) of University Mustapha Stambouli of Mascara, Algeria. Therefore, our sincere thanks go to the staffs of these two units.

REFERENCES

- [1] Prichula, J., Primon-Barros, M., Luz, R.C.Z., Castro, Í.M.S., Paim, T.G.S., Tavares, M., Ligabue Braun, R., d'Azevedo, P.A., Frazzon, J., Frazzon, A.P.G., Seixas, A., Gilmore, M.S. (2021) Genome Mining for Antimicrobial Compounds in Wild Marine Animals-Associated Enterococci. *Marine Drugs*. 19(6), 328.

- [2] Gomez-Sala, B., Muñoz-Atienza, E., Sánchez, J., Basanta, A., Herranz, C., Hernández, P.E., Cintas, L.M. (2015) Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. *European Food Research and Technology*. 241, 341–356.
- [3] Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier, F. (2014) Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*. 177, 136–154.
- [4] Giraffa, G. (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 215–222.
- [5] Foulquié-Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst L. (2006) The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106, 1–24.
- [6] Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings J., Holzapfel, W.H. (2011) Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 67, 4385–4389.
- [7] Cerning, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 7(1-2), 113–130.
- [8] Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. (2004) The genus *Enterococcus*: biotechnological and safety issues. In: Salminen, A., von Wright, A., Ouwehand, A. (eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Food Science and Technology. New York. 139, 199–248.
- [9] Lebreton, F., Willems, R.J.L., Gilmore, M.S. (2014) *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston*. 92–252.
- [10] Merrifield, D.L., Balcázar, J.L., Daniels, C., Zhou, Z., Carnevali, O., Sun, Y.Z. (2014) Indigenous lactic acid bacteria in fish and crustaceans. In: Merrifield D., Ringo E. (eds.), *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, UK. 128–168.
- [11] Sánchez, A., Benomar, N., Abriouel, H., Martínez Cañamero, M., Gálvez, A. (2010) Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiology*. 27, 955–961.
- [12] Wilaipun, P., Takeshi, Z., Sangjindavong, M., Nitisinprasert, S., Leelawatcharamas, V., Jiro, N., Kenji, S. (2002) Influence of physical factors and various complex media on growth and bacteriocin production of two-synergistic peptides with heat stable bacteriocin producer, *Enterococcus faecium* NKR-5-3 isolated from fermented fish. *Kasetsart Journal - Natural Science*. 36(3), 268–277.
- [13] Martin-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M. (2009) Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 132, 24–32.
- [14] Aguilar-Galvez, A., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., Campos, D., Thonart, P. (2012) Enterococci: advantages and disadvantages in biotechnology. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 16(1), 67–76.
- [15] Turcotte, C., Lacroix, C., Kheadr, E., Grignon, L., Fliss, I. (2004) A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*. 90, 283–293.
- [16] Folli, C., Ramazzina, I., Arcidiaco, P., Stoppini, M., Berni, R. (2003) Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. *FEMS Microbiology Letters*. 221, 143–149.
- [17] Švec, P., Franz, C.M.A.P. (2014) The genus *Enterococcus*. In: Holzapfel, W.H., Wood B.J.B. (eds.), *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. Wiley J., Sons, Ltd, Chichester, England. 175–211.
- [18] Hyewon, K., Naeun, O., Kwon, O.H., Seockmo, K., Jeongmin, S., Sangho, R. (2022) Exopolysaccharide of *Enterococcus faecium* L15 promotes the osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via p38 MAPK pathway. *Stem Cell Research and Therapy*. 13(446), 1–13.
- [19] Thapa, N., Pal, J., Tamang, J.P. (2006) Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish product of the Eastern Himalaya. *International Journal of Food Microbiology*. 107, 33–38.
- [20] Migaw, S., Ghrairi, T., Le Chevalier, P., Brillet, B., Fleury, Y., Hani, K. (2013) Isolation and Characterization of Enterococci Bacteriocin Strains from Tunisian Fish Viscera. *Food Science and Nutrition*. 4, 701–708.
- [21] Migaw, S., Ghrairi, T., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Berjeaud, J.M., Chobert, J.M., Hani, K., Haertle, T. (2014) Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Mediterranean fish viscera. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30, 1207–1217.

- [22] Mokrani, T., Essid, I., Hassouna, M., Lachheb, J., Ghram, A., Jouin, A. (2018) Phenotypic and Genotypic Characterization of *Carnobacterium divergens* Isolated from Refrigerated Tunisian Minced Raw Beef Meat. *Gene Technology*. 7(144), 2.
- [23] Fleming, H.R., Etchell, G.L., Costilow, R.N. (1975) Microbial inhibition by isolate of pediococcus from cucumber brine. *Applied Microbiology*. 30,104-1042.
- [24] Schillinger, U., Lücke, K. (1989) Antimicrobial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 55, 1901–1906.
- [25] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 74(12), 5463–5467.
- [26] Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5), 1792–1797.
- [27] Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16, 111–120.
- [28] Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4), 406–425.
- [29] Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33, 1870–1874.
- [30] Letunic, I., Bork, P. (2019) Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic acids research*. 47(1), 256–259.
- [31] Kihal, M., Prévost, H., Lhotte, M.E., Huang, D.Q., Diviès, C. (1996) Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *Microbiology*. 22, 219–223.
- [32] Monnet, C., Pernoud, S., Sepulchre, A., Fremaux, C., Corrieu, G. (2004) Selection and Properties of *Streptococcus thermophilus* Mutants Deficient in Urease. *Journal of Dairy Science*. 87, 1634–1640.
- [33] Folkertsma, B., Fox, P.F. (1991) Use of the Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*. 59, 217–224.
- [34] Bouton, Y., Guyot, P., Dasen, A., Grappin, R. (1993) Proteolytic activity of thermophilic lactobacillus strains isolated from sourdoughs and Comté. 1. Validation of laboratory techniques on mini cheeses. *Dairy Science and Technology*. 73(3), 265–279.
- [35] Karam, N.E., Dellali, A., Zadi-Karam, H. (2012) Lipolytic Activity from Lactic Bacteria. *Recent Research in Ruminants*. 19, 1.
- [36] Soares, M.D.K.G., Facundes, B.C., Júnior, A.F.C. and da Silva, E.M. (2015) Assessment of lipolytic activity of isolated microorganisms from the savannah of the Tocantins. *Acta Scientiarum Biological Sciences*. 37(4), 471–475.
- [37] Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J.M., Palop, L., Cabezas, L. (2010) Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. *Food Microbiology*. 27(1), 85–93.
- [38] Bachtarzi, N., Kharroub, K., Ruas-Madiedo, P. (2019) Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian dairy products and their application for skim-milk fermentations. *Elsevier Science*. 107, 117–124.
- [39] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robert, P.A. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28, 350–356.
- [40] Weinstein, M.P., Lewis, J.S. (2020) The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: background, organization, functions, and processes. *Journal of Clinical Microbiology*. 58(3), 10–1128.
- [41] Giraffa, G., Pepe, G., Locci, F., Neviani, E., Carminati, D. (1995) Haemolytic activity production of thermonuclease and biogenic amines by dairy enterococci. *Italian Journal of Food Sciences*. 7, 341–349.
- [42] Casarotti, S.N., Carneiro, B.M., Todorov, S.D., Nero, L.A., Rahal, P., Penna, A.L.B.B. (2017) In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. *Annals of Microbiology*. 67(4), 289–301.
- [43] Maijala, R.L. (1993) Formation of histamine and tyramine by some by some lactic acid bacteria in MRS broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology*. 17, 40–43.
- [44] Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W., Amann, R. (1995) Application of molecular method for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Journal of Dairy Science*. 5(8), 1081–1094.
- [45] Švec, P., Devriese, L.A. (2015) Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. Enterococcus. In: Whitman, W.B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., Dedysh, S. (eds.), Wiley, J., Sons, Ltd, Chichester, England. 1–25.

- [46] Mrkonjic Fuka, M., Kos, I., Maksimovic, A.Z., Bacic, M., Tanuwidjaja, I. (2021) Proteolytic *Lactococcus lactis* and Lipolytic *Enterococcus durans* of Dairy Origin as Meat Functional Starter Cultures. *Food Technology and Biotechnology*. 59(1), 63-73.
- [47] Schirru, S., Todorov, S.D., Favaroc, L., Pasqualina Mangia, N., Basaglia, M., Casella, S., Comunian, R., Gombossy de Melo Franco, B.D., Deiana, P. (2012) Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. *Food Control*. 25(1), 309–320.
- [48] Ahmadova, A., Dimov, S., Ivanova, I., Choiset, Y., Chobert, J.M., Kuliev, A., Haertlé, T. (2011) Proteolytic activities and safety of use of Enterococci strains isolated from traditional Azerbaijani dairy products. *European Food Research and Technology*. 233, 131–140.
- [49] Hassain, O., Zadi-Karam, H., Karam, N. (2007) Technological important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*camelusdromedarian*). *African Journal of Biotechnology*. 6(14), 1720–1727.
- [50] Giraffa, G. (2022) Microorganisms with food applications as probiotics. In : *Probiotics*. Academic Press. 39-53.
- [51] Perez-Pulido, R., Abriouel, H., Omar, N.B., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Galvez, A. (2006) Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food and Chemical Toxicology*. 44(12), 2070–2077.
- [52] Gomez-Sala, B., Muñoz-Atienza, E., Sánchez, J., Basanta, A., Herranz, C., Hernández, P.E., Cintas, L.M. (2015) Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. *European Food Research and Technology*. 241, 341–356.
- [53] Leroi, F. (2010) Occurrence and role of lactic acid bacteria in food products. *Food Microbiology*. 27, 698–709.
- [54] García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C.E., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, M.E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., Quirasco, M. (2014) Antibacterial activity produced by *Enterococcus spp.* isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LWT- Food Science and Technology*. 59(01), 26–34.
- [55] Huggins, A.M., Sandine, W.E. (1984) Differentiation of Fast and Slow Milk Coagulating Isolates in Strains of Streptococci. *Journal of Dairy Science*. 67(8), 1674–1679.
- [56] Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71, 394–406.
- [57] Sridhar, V.R., Hughes, J.E., Welker, D.L., Broadbent, J.R., Steele, J.L. (2005) Identification of Endopeptidase Genes from the Genomic Sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the Role of These Genes in Hydrolysis of Model Bitter Peptides. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(6), 3025–3032.
- [58] Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C., Lanorte, M.T. (2000) A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese. *Journal of Applied Microbiology*. 89, 267–274.
- [59] Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F. (2001) Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research*. 68(2), 303–16.
- [60] Gatti, M., Fournasari, E., Garni, D., Giraffa, G., Neviani, E. (1994) Enterococci present in Italian cheeses activate biochemical technological significance. *Industria del Latte*. 30, 11–27.
- [61] Leroi, F. (2014) Marine bacteria for food preservation. *Biofutur*. 360, 33–5.
- [62] Carrasco de Mendoza, M.S., Scarinci, M.S., Huerto-Garat, H.E., Simonetta, A.C. (1992) Technological properties of enterococci in lactic starters: acidifying and lipolytic activities. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*. 10(3), 289–293.
- [63] Perez-Guerra, N., Torrado-Agrasar, A., López-Macias, C., Pastrana, L. (2003) Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 2(3), 1–85.
- [64] Collins, Y.F., Mc Sweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G. (2003) Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*. 13, 841–866.
- [65] Taban, B.M., Dogan, H.B., Halkman, A.K. (2014) Biology of the *Enterococcus spp.* In: *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd Ed). 652–657.
- [66] Di Cagno, R., Quinto, M., Corsetti, A., Minervini, F., Gobbetti, M. (2006) Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *International Dairy Journal*. 16(2), 119–130.
- [67] Abeijón, M.C.M., Roxana, M., Medina, B., Alvarez, M. de F., González, S.N. (2009) Ester synthesis by lactic acid bacteria isolated from goats and ewe's milk and cheeses. *Food Chemistry*. 117(2), 241–247.
- [68] Thapa, N., Pal, J., Tamang, J.P. (2004) Microbial diversity in ngari, hentak and tungtap, fermented fish products of North-East India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 6, 599–607.

- [69] Fernandes, P. (2016) Enzymes in Fish and Seafood Processing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 4(59), 1–14.
- [70] Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P. (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 12, 163–171.
- [71] Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., Arendt, E.K. (2016) Production, properties and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(3), 1121–1135.
- [72] Duboc, P., Mollet, B. (2001) Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*. 11(9), 759–768.
- [73] Kavitha, D., Bruntha, P., Devi, C., Delattre, G.B., Reddy, P.H., Shetty, P.H. (2023) Exopolysaccharides produced by *Enterococcus* genus. An overview. *International Journal of Biological Macromolecules*. 226, 111–120.
- [74] Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzappel, W.H. (2003) Enterococci in foods- a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 105–122.
- [75] Elmoslih, A., Zanzan, M., Aissa, R., Hamadi, F., Ait Baddi, G., Ait Ben Aoumar, A., Achemchem, F. (2017) Isolation and Characterization of Bacteriocinogenic Enterococcal and Lactococcal Strains from South of Morocco Dairy Product. *Biotechnology Journal International*. 18(4), 1–16.
- [76] Arthur, M.R., Quintiliani, J.R. (2001) Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45, 375–381.
- [77] Courvalin, P. (2006) Vancomycin resistance in gram positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*. 42(1), 25–34.
- [78] Belicova, A., Krzkova, L., Krajcovic, J., Jurkovic, D., Sojka, M., Ebringer, L., Duinsky, R. (2007) Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* species isolated from Slovak Bryndza cheese. *Folia Microbiologica*. 52, 115–119.
- [79] Eaton, T.J., Gasson, M.J. (2001) Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 1628–1635.
- [80] Trivedi, K., Cupakova, S., Karpiskova, R. (2011) Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Journal of Veterinary Medicine*. 56(7), 352–357.

Received: 21.11.2023

Accepted: 06.01.2024

CORRESPONDING AUTHOR

Mohammed El Amine Bendaha

Laboratory of Molecular Biology, Genomics and Bioinformatics.

University Hassiba Ben Bouali

Chlef – Algeria

e-mail: m.a.bendaha@gmail.com