



Isolement et caractérisation des bactéries lactiques



Encadrante : Mme Isabelle Perraud Gaime

ETUDIANTES :

AZARNIA AMEL

BAHLOUL YASMINA

ANNEE SCOLAIRE : 2006/2007

Master 1 BioEco, Université Paul Cézanne, Aix-Marseille III

SOMMAIRE

Résumé

1) Introduction

- 1.1) Généralités
- 1.2) Les bactéries lactiques
- 1.3) Les résidus agricoles
 - 1.3.1) Les grignons d'olives
 - 1.3.2) La pulpe de café

2) Matériel et méthodes

- 2.1) Les substrats
- 2.2) L'estimation de la microflore
 - 2.2.1) La préparation des milieux
 - 2.2.2) La mesure du taux d'humidité
 - 2.2.3) L'inoculation
- 2.3) L'isolement des colonies
- 2.4) La caractérisation des souches

3) Résultats

- 3.1) Le poids sec
- 3.2) La microflore totale
- 3.3) L'isolement des colonies
- 3.4) La caractérisation des souches

4) Discussion

5) Conclusion

6) Références Bibliographiques

Remerciements

Annexes

Résumé

Les productions agricoles engendrent un grand nombre de sous produits considérés à ce jour comme des déchets (olives, café...). Le rôle des microorganismes dans les cycles biogéochimiques est considérable. Leur capacité à dégrader et/ou transformer différents éléments récalcitrants offre de nombreuses perspectives dans le domaine des biotechnologies.

Des études ont montré la capacité des bactéries lactiques à hydrolyser et dégrader les composés phénoliques simples et d'autres molécules plus complexes comme l'oleuropéine. Une étude préliminaire consistant à isoler, purifier et caractériser des bactéries lactiques a donc été réalisée à partir de deux substrats : des grignons d'olive lyophilisés et de la pulpe de café séchée au soleil.

1) Introduction

1-1 Généralités

Des études menées ont montré l'existence de bactéries lactiques endogènes dans la pulpe de café (Perraud-Gaime, 1995) et dans des olives de table (Ben Othman *et al.*, 2006). D'autre part, certaines bactéries lactiques sont capables de dégrader l'oleuropéine, composé récalcitrant de l'olive et responsable de l'amérisation du fruit (Servili *et al.*, 2006).

Le but de notre étude est de rechercher à partir de deux substrats différents : grignons d'olive et pulpe de café, des bactéries lactiques, de les isoler et de les caractériser.

La méthodologie portera sur les techniques de détermination de la microflore endogène des deux substrats (bactéries, levures, champignons, aérobie et anaérobie), d'isolement de microorganismes et de caractérisation par observation macroscopique et microscopique, par la détermination du Gram, par le test de la Catalase, et l'identification par des Galeries Api CH50.

1-2 Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un vaste ensemble de microorganismes procaryotes qui se rattachent à deux filiations généalogiques, ou phylum :

- Le phylum des *Clostridium*, dont l'ADN chromosomique contient un pourcentage de guanine + cytosine inférieur à 50%
- Le phylum des *Actinomycètes*, dont l'ADN chromosomique contient un pourcentage de guanine + cytosine supérieur à 50%

Le phylum des *Clostridium* comprend le groupe des bactéries lactiques au sens strict, présentes sous deux formes : coque ou bâtonnet (bacille). Les bactéries lactiques au sens strict sont Gram positives, catalase négatives, aéro-anaérobies facultatives et ne sporulent pas. Certaines sont capables de réduire les nitrates en nitrites quand le pH n'est pas trop acide. Elles métabolisent les saccharides par deux mécanismes :

- Le processus homofermentaire (voie d'Embden-Meyerhof), qui est la fermentation des hexoses et du lactose aboutissant en anaérobiose à la production presque exclusive d'acide lactique (90% au moins), avec comme étape intermédiaire de l'acide pyruvique. C'est la voie suivie par la plupart d'entre elles dont les *Lactobacillus* du groupe I.
- Le processus hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphates), fermentation des hexoses et du lactose aboutissant à la production d'acide lactique, environ 50% et de substances diverses telles que le gaz carbonique, environ 25%, l'éthanol, le glycérol et des acides (en particulier l'acide acétique). Cette voie est suivie facultativement par les *Lactobacillus* de groupe II et strictement par les *Lactobacillus* de groupe III (Dacosta, 2000).

1-3 Les résidus agricoles

L'objectif de l'Unité de Recherche Biotrans est d'étudier la capacité des microorganismes à transformer les composés récalcitrants de sous produits agro-industriels, l'intérêt étant une valorisation de ces résidus qui pourraient être utilisés pour l'alimentation du bétail (ou humaine). L'Institut de Recherche pour le Développement a mené de nombreuses recherches dans ce sens, notamment pour la pulpe de café, les résidus d'ananas, et la canne à sucre. Notre analyse portera sur deux substrats : la pulpe de café et les grignons d'olives.

1-3-1 Les grignons d'olive

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile, laisse deux résidus, l'un liquide, les margines, et l'autre solide, les grignons.

La composition chimique des grignons d'olive varie selon le stade de maturité du fruit et le procédé d'extraction de l'huile. Les teneurs en matières grasses et en cellulose brute présentent les variations les plus importantes (Nefzaoui, 1991). Ces variations se répercutent directement sur la valeur nutritive du produit. Les teneurs en matières azotées sont en moyenne de l'ordre de 10%. L'olive contient des quantités élevées de phénols (0,3 à 5% de la matière sèche). Ce sont surtout des orthophénols. L'oleuropéine, glucoside amer, est le composé phénolique le plus abondant et le plus caractéristique des oléagineux (Vasquez-Roncero *et al.*, 1970). La concentration de l'oleuropéine varie selon le type d'olive et diminue avec la maturation du fruit (Bouaziz *et al.*, 2006).

Les polyphénols sont utiles dans le fruit pour protéger l'huile mais deviennent polluants lorsqu'ils sont rejetés dans l'environnement à cause de leur caractère récalcitrant et antibactérien (Hamdi, 1992).

Les bactéries lactiques sont capables d'hydrolyser et de dégrader les composés phénoliques simples (Cavin *et al.*, 1997) et d'autres molécules plus complexes comme les tanins pouvant exister dans les olives et les produits de transformation (Ayed & Hamdi, 2002).

1-3-2 La pulpe de café

Au cours des dernières années plusieurs études ont été menées avec pour objectif la diminution, voire l'élimination, des composés toxiques de la pulpe de café, principal résidu de l'agro-industrie du café. En effet la limitation principale à l'utilisation de la pulpe de café comme substrat pour l'alimentation animale réside dans la présence de composés toxiques tels que la caféine, les phénols libres (l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide tannique), les phénols polymériques (les tanins hydrolysables et les tanins condensés) et la forte concentration de potassium.

Des études quantitatives ont été accomplies pour déterminer les principaux groupes de microorganismes naturellement présents dans ce substrat. Il a été montré que la pulpe de café est un substrat très chargé en microorganisme (bactéries, levures et champignons) (Gaime-Perraud *et al.*, 1993). La microflore lactique endogène de la pulpe de café comptée à partir de pulpe ensilée est constituée essentiellement de *Lactobacillus* (Perraud-Gaime, 1995).

L'utilisation de ce substrat dans notre étude a pour but d'isoler et caractériser des bactéries lactiques pour finalement mesurer leur capacité à dégrader l'oleuropéine.

En effet, des travaux ont montré une importante hydrolyse de l'oleuropéine par des souches de *Lactobacillus* après fermentation d'olives de tables (Servili *et al.*, 2006).

2) Matériel et méthodes :

2-1) Les substrats :

-Les grignons d'olive utilisés sont originaires du Maroc et ont été lyophilisés (2prélèvements G2 et G2').

-La pulpe de café est originaire de Cuba, elle a été séchée au soleil (2prélèvements CA et CA').

2-2) Estimation de la microflore :

2-2-1) Préparation des milieux

Pour le comptage de la microflore totale aérobie, on prépare un milieu PCA (Plate Count Agar). Dans un flacon de 600 ml, on met 200 ml d'eau distillée, on rajoute 7g de milieu PCA (Fluka), on complète à 400 ml avec de l'eau distillée. On introduit un barreau aimanté et on place le flacon sur un agitateur.

Pour la détermination des champignons et des levures on utilise le milieu PDA (Plate Dextrose Agar) +antibiotique (Chloramphénicol). Le protocole est identique au précédent. On pèse 15,6 g de PDA (SIGMA) et 0,1 g de Chloramphénicol que l'on incorpore dans chaque flacon de 400 ml.

Pour la détermination de la microflore anaérobie, on prépare un milieu MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) ; milieu qui nous servira à isoler des bactéries lactiques s'il y en a (De Man *et al.*, 1960).

Même protocole, en pesant 24,4 g de MRS (SIGMA) et 0,4 g de Tween80 (SIGMA) pour 400 ml d'eau distillée. Le Tween est un tensioactif qui nous permet d'avoir une bonne dispersion des microorganismes dans le milieu.

Placer les flacons contenant les milieux à l'autoclave pour la stérilisation (15 mn à 121°C). Déposer au préalable sur chaque flacon un Scotch à autoclave pour s'assurer que la stérilisation a bien eu lieu.

Placer les flacons sous la hotte et les laisser refroidir avant de les couler dans des boîtes de Pétri. A raison de 20 ml de milieu par boîte, un flacon permet de remplir environ 20 boîtes. Couler les boîtes sous la hotte près du Bec Bunsen pour rester dans des conditions stériles. Une fois toutes les boîtes sèches, les retourner et les placer à l'étuve à 28°C pendant 48H pour vérifier qu'il n'y a pas eu de contamination.

La composition des milieux est donnée en Annexe I.

2-2-2) mesure du taux d'humidité:

On détermine le poids sec des substrats grâce à une balance spécifique Sartorius MA 45. Placer une coupelle dans le réceptacle et faire la tare ; Déposer environ 10 grammes de substrat ; Au bout de quelques minutes, le pourcentage d'humidité du produit s'affiche sur l'écran de l'appareil.

2-2-3) Inoculation :

- Préparation des différentes dilutions :

Dans un flacon de 250 ml, introduire 90 ml d'eau distillée stérile+Tween (1ml de Tween pour 1 litre d'eau distillée), et 10 g de substrat (grignons d'olive ou pulpe de café). La solution obtenue est homogénéisée sur un agitateur pendant 60 minutes pour la pulpe de café et 30 minutes pour les grignons d'olive. Des dilutions successives sont réalisées à partir de la solution mère obtenue. La gamme de dilution s'étend de 10^{-1} à 10^{-6} .

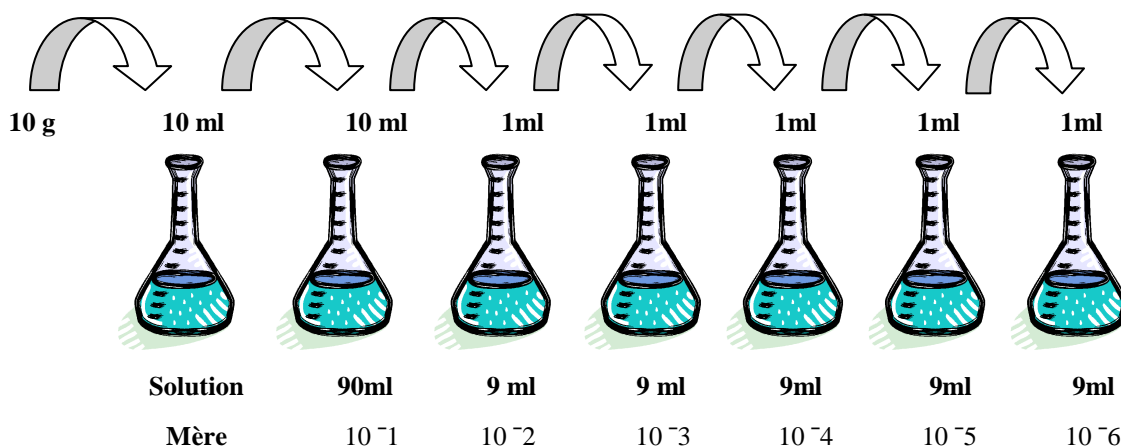


Fig.1. Schéma des dilutions

- Inoculation des boîtes :

Chaque boîte est notée selon le modèle présenté ci-dessous :



Fig.2.Methode d'inoculation par point de 20µl de chaque dilution

Prélever à l'aide de pipetman (20 à 200 µl) et de pointes stériles, 20 µl de chaque dilution en commençant par la plus faible et inoculer les boîtes de Pétri, sous la hotte, près du Bec Bunsen. Trois réplicats par boîte sont réalisés. Laisser les boîtes sécher pour que les gouttes s'imprègnent bien sur le milieu, avant de les retourner. Placer les boîtes contenant les milieux PDA+Antibiotique et PCA à l'étuve à 28°C pendant 48 heures.

Placer les boîtes contenant le milieu MRS dans une jarre anaérobie (on place jusqu'à 15 boîtes de Pétri par jarre) contenant un capteur d'oxygène (sachet Genbox, Biomérieux) et un indicateur d'anaérobiose (bandelette, Biomérieux) dont la couleur bleue en présence d'oxygène, devient blanche en absence d'oxygène. Placer la jarre à l'étuve pendant 48 heures.

-Observation, comptage et identification :

Une fois le délai d'incubation respecté, on procède à l'observation, d'abord macroscopique, puis microscopique des microorganismes qui se sont développés sur les boîtes.

L'observation macroscopique nous permet de faire un comptage direct du nombre de colonies et de champignons observés. L'observation microscopique nous permet de distinguer les bactéries des levures. Quand il s'agit de bactéries le microscope nous permet de différencier les bacilles et les coques, caractéristique indispensable à l'identification.

-Evaluation de la microflore :

Les résultats obtenus sont la moyenne des triplicats. Pour ramener le nombre de colonies au gramme de substrat sec, on utilise la formule suivante :

Nombre de colonies

D x P x % MS

Où :

D est le facteur de dilution ; **P** est la quantité d'échantillon prélevée en gramme ; **% MS** est la teneur en matière sèche de l'échantillon ;

2-3) Isolement des colonies :

-Préparation des tubes de MRS liquide et repiquage:

La préparation du milieu MRS liquide (SIGMA) suit le même protocole que celle pour le milieu solide (préparation et incubation). On prépare 400 ml de milieu répartis dans 40 tubes en utilisant une dispensette (9 ml/tube). Après observation des boîtes de MRS solide et identification des souches de bactéries, on prélève des colonies différentes que l'on introduit dans des tubes de 2 ml d'eau distillée stérile. On prélève ensuite 1 ml de ces tubes que l'on introduit dans un tube de MRS liquide (opération que l'on réalise pour toutes les colonies). On place les tubes à l'étuve pendant 48h. On procède à des observations régulières pour s'assurer de la bonne croissance des bactéries.

-Technique d'étalement sur gélose

La technique que l'on utilise consiste à étaler une colonie à la surface du milieu MRS solide coulé en boîte de Pétri. On sépare la boîte en 3 secteurs, on prélève une goutte d'inoculum à l'aide d'une oëse que l'on a préalablement flambé, on étale l'inoculum en une zone périphérique sur une surface d'1 cm². On flambe de nouveau l'instrument, on le laisse refroidir, on dissémine l'inoculum précédemment déposé en étalant en stries très serrées sur une moitié de la boîte, on fait pivoter la boîte d'un quart de tour on flambe de nouveau l'instrument et on laisse refroidir. On trace à nouveau des stries dans la moitié de la boîte. On répète l'opération pour disséminer l'inoculum sur le troisième secteur de la boîte.



Fig.3-Résultat d'un étalement sur gélose

2-4) Caractérisation des souches :

-Test de GRAM

Réalisation d'un frottis :

Déposer sur une lame propre une goutte d'eau distillée puis prélever à l'aide d'une oëse stérile une colonie de la culture. Incorporer progressivement de façon à obtenir une suspension homogène. Réaliser le frottis en partant du centre de la lame, en décrivant un mouvement circulaire de façon à obtenir un étalement mince et homogène. Sécher et fixer le frottis au dessus de la flamme du bec bunsen sans trop le chauffer.

Technique :

- recouvrir la lame de violet de gentiane phéniqué durant une minute.
- laver à l'eau distillée (non obligatoire).
- recouvrir la lame d'une solution de Lugol durant 30 secondes.
- laver à l'eau distillée.
- recouvrir la lame d'éthanol à 0,95 durant 10 secondes.
- laver rapidement et recouvrir la lame de fuchsine phéniquée, pendant 1 minute.
- laver à l'eau distillée.
- observer après séchage à l'immersion (objectif x100).

Résultat :

Les bactéries à Gram positif apparaissent violettes. Les bactéries à Gram négatif sont roses. Ce sont des différence de nature de la paroi qui sont la cause de cette différence de coloration ; les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus fine que celle à Gram positif, et, de plus, elles sont riches en lipides (membrane externe de la paroi) dans lesquels l'éthanol est fortement soluble.

-Test de la catalase

Principe :

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire (AS et AAF) qui peuvent détruire les peroxydes. La catalase est une enzyme qui catalyse :



La plupart des microorganismes aérobies possèdent une catalase, en particulier les bacilles Gram négatifs aérobies. Son absence est donc un critère d'identification intéressant. Par exemple, parmi les coques Gram + aérobies, seuls les *Streptococcaceae* sont catalase négative. *Lactobacillus* et *Erysipelothrix* sont les seuls groupes de bacilles Gram + aérobies non sporulés dépourvus de catalase.

Technique :

Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes, à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien. Observer immédiatement.

Lecture

<ul style="list-style-type: none">- apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : catalase +- pas de bulles : catalase –	
--	--

-Galerie API 50CH

Le principe d'identification de la galerie API est le même que celui enzyme/substrat. Chaque cupule contient un substrat différent sur lequel le micro organisme va réagir. Chaque bactérie ayant des affinités avec un ou plusieurs substrats. Prélever une colonie et l'introduire dans un flacon de Mc Farland (Biomérieux) contenant 2ml d'eau distillée, une turbidité moyenne indique que la concentration en bactéries est suffisante. Introduire le contenu du flacon dans une suspension médium (api 50CHL médium, Biomérieux). Remplir chaque puit avec la suspension bactérienne obtenue et déposer dans chaque cupule une goutte d'huile de paraffine pour créer l'anaérobiose. Les creux du support de la galerie doivent être remplis d'eau distillée (pour créer une atmosphère humide), puis la galerie posée dans le support et le couvercle posé par-dessus. On fera attention à ne prélever qu'une seule colonie par identification pour ne pas que celle-ci soit faussée. On note la date, l'heure et la souche prélever avant de passer la galerie à l'étuve.

Lecture :

Un tableau est fourni avec les galeries. Au bout de 48h d'incubation, pour chaque puit, on note « + » si la réaction d'acidification a eut lieu (coloration jaune) et « - » dans le cas contraire (coloration violette). Le tableau ainsi rempli est envoyé au laboratoire qui se charge du traitement des résultats.

3) Résultats :

3-1) Poids sec :

Grignon d'olives : 4,38% d'humidité

Pulpe de café : 10,32% d'humidité

3-2) Microflore totale :

Tableau I : Recapitulatif de la microflore des grignons d'olives

Grignons	Champignons	Bactéries	Levures	Bactéries anaérobies	Levures anaérobies	Microflore Totale
G2 PCA 10-1		0,00E+00	0,00E+00			
G2 PCA 10-2	2,79E+05	0,00E+00	0,00E+00			
G2 PCA 10-3	8,72E+05	0,00E+00	0,00E+00			
G2' PCA 10-1		3,49E+03				
G2' PCA 10-2	3,84E+05	0,00E+00	3,49E+04			
G2' PCA 10-3	8,72E+05	0,00E+00	0,00E+00			
G2 PDA 10-1			0,00E+00			
G2 PDA 10-2	1,05E+05		0,00E+00			
G2 PDA 10-3	1,74E+05		0,00E+00			
G2' PDA 10-1			0,00E+00			
G2' PDA 10-2	8,72E+04		0,00E+00			
G2' PDA 10-3	6,98E+05		0,00E+00			
G2 MRS 10-1				0,00E+00	0,00E+00	
G2 MRS 10-2				0,00E+00	0,00E+00	
G2 MRS 10-3				0,00E+00	0,00E+00	
G2' MRS 10-1				0,00E+00	0,00E+00	
G2' MRS 10-2				0,00E+00	0,00E+00	
G2' MRS 10-3				0,00E+00	0,00E+00	
ufc/gpulpeMS	4,34E+05	3,49E+03	3,49E+04	0,00E+00	0,00E+00	4,72E+05

Tableau II :Recapitulatif de la microflore de la pulpe de café

Pulpe de café	Champignons	Bactéries	Levures	Bactéries anaérobies	Levures anaérobies	
CA PDA 10-1	2,23E+04		0,00E+00			
CA PDA 10-2	7,43E+04		0,00E+00			
CA PDA 10-3	0,00E+00		0,00E+00			
CA' PDA 10-1	4,27E+04		0,00E+00			
CA' PDA 10-2	5,57E+04		0,00E+00			
CA' PDA 10-3	0,00E+00		0,00E+00			
CA MRS 10-1				1,12E+04	1,30E+04	
CA MRS 10-2				0,00E+00	1,86E+04	
CA MRS 10-3				0,00E+00	0,00E+00	
CA' MRS 10-1				2,04E+04	4,83E+04	
CA' MRS 10-2				3,71E+04	1,86E+04	
CA' MRS 10-3				0,00E+00	0,00E+00	

ufc/gpulpeMS	4,88E+04		0,00E+00	2,29E+04	2,46E+04	9,63E+04
--------------	----------	--	----------	----------	----------	----------

Les tables de calcul permettant d'obtenir ces résultats sont données dans les annexes II et III

3-3) Isolement :

Tableau III : Résumé de la procédure d'isolement des bactéries anaérobies

Grignon	Pas de bactéries	Pas d'isolement			
Café	AY 1	Repicage	Repicage	Repicage	AY1 pure
	AY 2	sur	sur	sur	AY21 pure
		Tube	Tube	Boite	AY 22 pure
	AY 3	MRS	MRS	MRS	AY 3 pure

3-4) Caractérisation :

Tableau IV : Description macroscopique des souches

	Taille (mm de diamètre)	Forme	Elévation	Bordure	Couleur	Surface	densité
AY1	2	Circulaire	Légèrement bombée	Lisse	Crème	Lisse brillante	Opaque
AY 21	2	Circulaire	Légèrement bombée	Lisse	Crème	Lisse brillante	Opaque
AY 22	0,1	Circulaire	Légèrement bombée	Lisse	Crème	Lisse brillante	Opaque
AY 3	1,5	Circulaire	Légèrement bombée	Lisse	Crème	Lisse brillante	Opaque

Tableau V : Description microscopique des souches

Souches bactériennes	GRAM +/-	Bacilles ou coques	Individus en chaîne	Long /trapus	Catalase
AY1	+	Bacilles	En chaîne	Longs	-
AY 21	+	Bacilles	En amas/chaîne	Longs	-
AY 22	+	coques	En chaîne	trapus	-
AY 3	+	Bacilles	En amas /chaîne	Courts	-

Galeries API

Les résultats des Galeries Api sont en cours de traitement chez Biomérieux.

4) Discussion

La microflore totale des grignons d'olive est peu importante par rapport aux études réalisées à partir de pulpe de café (Gaime-Perraud et al., 1993), de bagasse de canne à sucre (Roussos, 1985) et de farine de manioc (Raimbault, 1980). Cependant, les résultats obtenus en terme de champignons et de levures restent dans le même ordre de grandeur. (Tableau VI)

Le nombre total de bactéries est moins important. On peut supposer donc que la conservation puis la lyophilisation du substrat ait influencé de manière importante le développement des microorganismes endogènes.

La microflore bactérienne, moins résistante que les champignons, qui sporulent quand les conditions sont difficiles, a été considérablement affectée.

Tableau VI : Recapitulatif de la microflore de différents produits agro-industriels

substrat	Echantillon (pays)	Microorganismes (ufc par gramme de poids sec du substrat)			
		champignons	Levures	Bactéries	Microflore totale
Pulpe de café séchée au soleil	A (Mexico)	1,24 x 10 ⁶	1,07 x 10 ⁵	1,11 x 10 ⁸	1,12 x 10 ⁸
Pulpe de café séchée au soleil	B (Colombie)	2,58 x 10 ⁴	8,52 x 10 ³	6,64 x 10 ⁵	7,01 x 10 ⁵
Pulpe de café lyophilisée	C (Colombie)	8,56 x 10 ⁴	2,18 x 10 ⁶	1,33 x 10 ⁶	3,60 x 10 ⁶
Bagasse de canne à sucre (Roussos, 1985)		1,08 x 10 ⁴		2,63 x 10 ⁶	2,64 x 10 ⁶
Farine de manioc (Raimbault, 1980)					2,50 x 10 ⁸

Aucune bactérie anaérobie n'a pu être isolée à partir des ensemencements par les grignons d'olives. Par contre à partir de la pulpe de café on a pu isoler 4 souches anaérobies.

Les colonies bactériennes isolées lors de cette étude sont toutes Gram positive et Catalase négative. Elles se sont développées sur MRS, en anaérobiose, on peut donc supposer qu'il peut s'agir de bactéries lactiques. Il y a trois bacilles et un coques. Les résultats de la Galerie Api 50 CH, nous permettrons de terminer notre caractérisation.

5) Conclusion

Aucune souche de bactéries lactiques n'a été isolée à partir de grignons d'olives. On peut suggérer que l'utilisation d'un substrat frais, en période de production donnerait des résultats plus concluants. Les souches isolées à partir de la pulpe de café pourront être utilisées par le laboratoire pour inoculer des tubes de MRS liquide contenant 1% d'oleuropéine.

Des mesures successives de la concentration en phénols du surnageant indiqueront s'il y a ou non dégradation de l'oleuropéine par ces souches.

Remerciements

Nous tenons à remercier Madame Isabelle Perraud Gaime de nous avoir permis de faire ce stage au sein de l'Institut de Recherche pour le Développement implanté dans l'université St Jérôme, Marseille.

Un grand merci aussi à Julien Agusti pour son aide et sa disponibilité.

Nous remercions également l'ensemble des membres de l'IRD présents durant ce stage.

Références bibliographiques

Ayed, L. & Hamdi, M. (2002) Culture conditions of tannase production by *Lactobacillus plantarum*. *Biotechnology Letters*, **24**, 1762-1765.

Ben Othman, N., Chammem, N., Kachouri, F., Ayed, L., & Hamdi, M. (2006). Production des bactéries lactiques et leurs potentialités d'applications aux produits de l'olivier. In *Biotechnology and Quality of Olive tree products around the Mediterranean basin* (eds M. Ismaili-Alaoui, S. Roussos & I. Perraud-Gaime), pp. 317-327. Edited Actes, Rabat.

Bouaziz, M., Jemai, H., & Sayadi, S. (2006). Changes in phenolic content and antioxidant activity of Chemlali olive fruits during maturation. In *Biotechnology and Quality of Olive tree products around the Mediterranean basin* (eds M. Ismaili-Alaoui, S. Roussos & I. Perraud-Gaime), pp. 193-198. Edited Actes, Rabat.

Cavin, J.F., Barthelmebs, L., & Divies, C. (1997) Molecular characterization of an inducible p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: Gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 1939-1944.

- Dacosta, Y. (2000) *La bioprotection des aliments*, Dacosta, Yves edn.
- De Man, J.C., Rogosa, M., & Sharpe, M.E. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, **23**, 130-135.
- Gaime-Perraud, I., Roussos, S., & Martinez-Carrera, D. (1993) Natural microorganisms of the fresh coffee pulp. *Micologia Neotropical Aplicada*, **6**, 95-103.
- Hamdi, M. (1992) Toxicity and biodegradability of olive wastewater in bacterial anaerobic digestion. *Applied and Environmental Microbiology*, **37**, 155-163.
- Nefzaoui, A. (1991) Valorisation des sous-produits de l'olivier. *Options Mediterraneennes - serie Seminaires*, **16**, 101-108.
- Perraud-Gaime, I. (1995) Mixed cultures of lactic bacteria and filamentous fungi for conservation and decaffeination of coffee pulp in solid state fermentation. Doctorate, Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- Rimbault, M. (1980) Fermentation en milieu solide - Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. Doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse.
- Roussos, S. (1985) Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de cellulases. Doctorat, Université de Provence, Marseille.
- Servili, M., Minnocci, A., Veneziani, G., Taticchi, A., Urbani, S., Esposito, S., Sebastiani, L., & Montedoro, G.F. (2006) Compositional and structural modifications in table olives induced by natural debittering process. In *Olivebioteq 2006. Second International Seminar of Biotechnology and Quality of olive tree products around the Mediterranean basin*, Vol. II, pp. 575-578.
- Vasquez-Roncero, A., Graciani-Constante, E., & Maestro-Duran, R. (1970) Componentes fenolicos de la aceituna. I. Polifenoles de la pulpa. *Grasas y Aceites*, **25**, 269.

ANNEXE I

MILIEU MRS liquide

Composition du milieu

Peptone de viande	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Acétate de sodium	5
Phosphate bi potassique	2
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	0,1
Sulfate de manganèse	0,05
Glucose	20
Tween 80 (ou teepol)	1 ml

Porter le mélange à ébullition pendant 1 minute.

62.5g pour préparer 1litre.

PLATE COUNT AGAR PCA

La gélose glucosée à l'extrait de levure appelée par les Anglo-Saxons "Plate Count Agar" est utilisée en bactériologie alimentaire pour le dénombrement des bactéries aérobies dans le lait, les viandes, les produits à base de viande, les autres produits alimentaires, ainsi que pour l'analyse des produits pharmaceutiques, des produits cosmétiques et de leurs matières premières.

COMPOSITION (grammes/litre)

Tryptone	5
Extrait auto lytique de levure	2,5
Glucose	1
Agar	15

17,5g pour préparer 1litre de milieu

POTATOES DEXTROSE AGAR (PDA)

COMPOSITION (grammes/litre)

Infusion	4.0 (infusion de 200 pommes de terre par g)
Glucose	20.0 de D (+)
Agar-Agar	15.0
pH :	5.6 ± 0.2

39g permettent de préparer 1litre de milieu

MRS (GELOSE) (De Man, Rogosa, Sharpe)

Version solide du bouillon MRS pour la culture des bactéries lactiques.

COMPOSITION (grammes/litre)

Peptone	10,0
Extrait de viande de bœuf	8,0
Extrait de levure	4,0
Glucose	20,0
Tween 80	1,0 ml
Hydrogénophosphate de potassium	2,0
Acétate de sodium 3 H ₂ O	5,0
Citrate d'ammonium	2,0
Sulfate de magnésium 7 H ₂ O	0,2
Sulfate de manganèse 4 H ₂ O	0,05
Agar	10,0
PH	6,2 ± 0,2

62.5g permettent de préparer 1litre de milieu.

ANNEXE II résultats du dénombrement pour l'échantillon CA' de la pulpe de café.

Pulpe café CA'	Champignons						Levures		
	PDA						PDA		
Dilutions	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03				1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03
1	7	1	0				0	0	0
2	8	1	0				0	0	0
3	8	1	0				0	0	0
Moy (20µl)	7,67	1,00	0,00				0,00	0,00	0,00
ufc/ml D	3,83E+02	5,00E+01	0,00E+00				0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
ufc/ml SM	3,83E+03	5,00E+03	0,00E+00				0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
quantité g	10,01	10,01	10,01				10,01	10,01	10,01
ufc/g humide	3,83E+04	5,00E+04	0,00E+00				0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
humidité	10,32	10,32	10,32				10,32	10,32	10,32
ufc/g sec	4,27E+04	5,57E+04	0,00E+00				0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Pulpe café CA'				Bacteries anaerobies			Levures anaerobies		
				MRS			MRS		
Dilutions				1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03
1				2	0	0	8	1	0
2				4	1	0	6	0	0
3				5	1	0	12	0	0
Moy (20µl)				3,67	0,67	0,00	8,67	0,33	0,00
ufc/ml D				1,83E+02	3,33E+01	0,00E+00	4,33E+02	1,67E+01	0,00E+00
ufc/ml SM				1,83E+03	3,33E+03	0,00E+00	4,33E+03	1,67E+03	0,00E+00
quantité g				10,01	10,01	10,01	10,01	10,01	10,01
ufc/g humide				1,83E+04	3,33E+04	0,00E+00	4,33E+04	1,67E+04	0,00E+00
humidité				10,32	10,32	10,32	10,32	10,32	10,32
ufc/g sec				2,04E+04	3,71E+04	0,00E+00	4,83E+04	1,86E+04	0,00E+00

ANNEXE III : résultats du dénombrement pour l'échantillon G2 de grignon d'olives

Grignon G2	Champignons				Bacteries			Levures		
	PCA				PCA			PCA		
Dilutions	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03		1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03
1		9	3		0	0	0	0	0	0
2		4	1		0	0	0	0	0	0
3		3	1		0	0	0	0	0	0
Moy (20µl)	0,00	5,33	1,67		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ufc/ml D	0,00E+00	2,67E+02	8,33E+01		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
ufc/ml SM	0,00E+00	2,67E+04	8,33E+04		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
quantité g	9,99	9,99	9,99		9,99	9,99	9,99	9,99	9,99	9,99
ufc/g humide	0,00E+00	2,67E+05	8,34E+05		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Humidité	4,38	4,38	4,38		4,38	4,38	4,38	4,38	4,38	4,38
ufc/g sec	0,00E+00	2,79E+05	8,72E+05		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Grignon G2	Champignons				Levures		
	PDA				PDA		
Dilutions	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03		1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03
1		3	1		0	0	0
2		2	0		0	0	0
3		1	0		0	0	0
Moy (20µl)	0,00	2,00	0,33		0,00	0,00	0,00
ufc/ml D	0,00E+00	1,00E+02	1,67E+01		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
ufc/ml SM	0,00E+00	1,00E+04	1,67E+04		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
quantité g	9,99	9,99	9,99		9,99	9,99	9,99
ufc/g humide	0,00E+00	1,00E+05	1,67E+05		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Humidité	4,38	4,38	4,38		4,38	4,38	4,38
ufc/g sec	0,00E+00	1,05E+05	1,74E+05		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Grignon G2					Bactéries anaérobies			Levures anaérobies		
					MRS			MRS		
Dilutions					1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03
1					0	0	0	0	0	0
2					0	0	0	0	0	0
3					0	0	0	0	0	0
Moy (20µl)					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ufc/ml D					0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
ufc/ml SM					0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
quantité g					9,99	9,99	9,99	9,99	9,99	9,99
ufc/g humide					0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Humidité					4,38	4,38	4,38	4,38	4,38	4,38
ufc/g sec					0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00