

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FERHAT Abbas- SETIF  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

## **MEMOIRE**

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

## **MAGISTER**

**Option : Génie microbiologique**

Par

**ABABSA Ahlem**

### *Thème*

***Recherche de bactériocines produites par les bactéries  
lactiques du lait***

Soutenu le : 30 / 06 / 2012

Devant le jury :

Président :	Pr. N. NANCIB	Professeur	U. F. A - Sétif
Rapporteur :	Pr. H. DABA	Professeur	U. F. A - Sétif
Examineurs :	Pr. M. KACEM	Professeur	Université d'Oran
	Dr. S. HABI	M.C.A	U. F. A -Sétif

## REMERCIEMENTS

*Mes profonds remerciements vont à ALLAH qui m'a aidé pour effectuer ce travail.*

*Je remercie en deuxième lieu mon promoteur Monsieur H. DABA pour la proposition de ce thème ainsi que pour sa compréhension et pour l'aide qu'il m'a prodigué et je remercie également les membres du laboratoire de génomique, université Laval, Canada.*

*J'exprime ma profonde gratitude à Messieurs N. Nancib, M. Kacem et S. Habi qui m'on fait l'honneur de juger ce travail.*

*Je tiens également à remercier vivement le professeur A.H. Guechi et monsieur B. Houcher de m'avoir permis d'utiliser leurs laboratoires et leur matériel.*

*Je remercie aussi Mr. M. Zenina et Mr. S. Dyah qui m'ont fournit les échantillons de lait.*

*Mes remerciements s'adressent également à Mr. S. Habi pour ses conseils et son aide précieuse ainsi qu'à Mme S. Mezâache pour sa gentillesse et son aide.*

*Mes remerciements particuliers pour ma très chère amie Asma Bouguerra pour son aide au laboratoire et son soutien moral, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde considération.*

*Mes remerciements s'adressent enfin à Amel et Nadjet et à tous mes collègues du laboratoire de mycologie appliquée et d'études et toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dedicaces*

*Je dédie ce modeste travail à*

*Mes chers adorables parents*

*Mes chers frères chacun par son nom*

*Ma chère Mme. Guembour Hafsa*

*&*

*A ma très chère amie Bouguerra Asma*

## Résumé

L'analyse du lait cru de chamelles provenant de l'Oued et de M'sila et du lait de vache fermenté collecté dans la région de Sétif a permis l'isolement de 76 souches de bactéries lactiques identifiées sur la base de la séquence de leur ADNr 16S comme appartenant aux genres : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Le lait de vache ainsi que celui de chamelle de M'sila ont été dominés par le genre *Lactobacillus* alors que le genre *Enterococcus* est plus fréquent dans le lait de chamelle de l'Oued.

Les essais de l'activité antibactérienne ont mis en évidence 26 souches lactiques actives contre la souche pathogène *Listeria monocytogenes* parmi lesquelles douze, d'origine cameline, se sont distinguées par un meilleur pouvoir inhibiteur. Cependant, la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium et la méthode d'adsorption-désorption appliquées sur les cultures bactériennes de ces dernières n'ont pas mis en évidence une activité bactériocinogène.

En tenant compte de leur activité anti-*Listeria* marquée et de leur large spectre d'activité contre les bactéries indésirables, certaines des souches isolées dans cette étude pourraient être des candidats potentiels utilisables dans la bioconservation des produits alimentaires et dans la transformation biotechnologique du lait.

**Mots clés :** lait, bactéries lactiques, identification moléculaire, bactériocines, activité antibactérienne, bioconservation.

## **Abstract**

The analysis of raw camel milk from l'Oued and M'sila and of fermented cow milk collected from Sétif led to the isolation of 76 strains of lactic acid bacteria identified on the basis of their 16S rDNA sequence as belonging to the following genera: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Leuconostoc*. *Lactobacillus* was the main genus isolated from cow and camel milk collected from M'sila. However, *Enterococcus* was the dominant genus identified in the camel milk of l'Oued.

Antibacterial activity experiments showed 26 strains only exhibiting an anti-*Listeria* potential from which 12, isolated from camel milk, had an important inhibitor activity. However, the two methods used in this study, adsorption-desorption and precipitation with ammonium sulphate, did not show any bacteriocinogenic activity.

The potential high anti-*Listeria* activity of these lactic acid strains and their large spectrum of antibacterial activity, including spoilage bacteria, make them good candidates in industrial food bio preservation and biotechnological transformation of milk.

**Key words:** milk, lactic acid bacteria, molecular identification, bacteriocins, antibacterial activity, bio preservation.

## المخلص

سمح تحليل حليب الناقة الطازج المجلوب من منطقتي الوادي والمسيلة بالإضافة إلى حليب البقر المتخمّر المجلوب من ولاية سطيف بالحصول على 76 عزلة من البكتيريا اللبنية التي تم التعرف عليها بواسطة تتابع نيكلوتيدات ال ADNr 16S الخاص بها و الذي بين انتماءها للأجناس الآتية: *Enterococcus* و *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*. كان الجنس *Lactobacillus* هو السائد بالنسبة لحليب البقر و حليب الناقة المجلوب من منطقة المسيلة, أما حليب الناقة المجلوب من منطقة الوادي فقد تميز بسيادة الجنس *Enterococcus*.

أظهر اختبار النشاطية ضد البكتيرية أن 26 عزلة من مجموع البكتيريا اللبنية المعزولة تميزت بنشاطية مثبتة ضد العزلة الممرضة *Listeria monocytogenes* و أن 12 عزلة من هذه الأخيرة و التي تم عزلها من حليب الناقة أظهرت قدرة تثبيطية عالية. على الرغم من ذلك فإن نتائج البحث عن البكتريوسين باستعمال طريقة الترسيب بواسطة سولفات الأمونيوم وطريقة الإدمصاص و التحرر بينت عدم وجود أي عزلة قادرة على إنتاج البكتريوسين.

نظرا لقدرتها التثبيطية العالية ضد عزلة *Listeria* و طيف تأثيرها الواسع , الذي شمل عزلات ممرضة و مسؤولة عن تحليل الأغذية, فإن البكتيريا اللبنية المعزولة في هذه الدراسة قد يكون لها دور فعال سواء في الحفظ الحيوي للمواد الغذائية أو في التحويل البيوتكنولوجي للحليب.

**الكلمات المفاتيح:** حليب, بكتيريا لبنية, تشخيص جزيئي, بكتريوسين, نشاطية ضد بكتيرية, حفظ حيوي.

## **Abréviations**

AWDA: méthode de puits sur gélose

P/V: poids sur volume

V/V : volume sur volume

ADH: arginine dihydrolase

UFC : unité formant colonie

PEG : polyéthylène glycol

SDS : sodium dodécyl sulfate

GRAS: généralement considérées comme sûres

GAP: glyceraldéhyde phosphate

*Lc* : *Lactococcus*

*Ln* : *Leuconostoc*

*Lb* : *Lactobacillus*

*Ent* : *Enterococcus*

*P* : *Pediococcus*

*E. coli* : *Escherichia coli*

AFLP: amplified fragment length polymorphis

PCR: réaction de polymérisation en chaîne

rep- PCR: polymérase chain reaction utilisant des séquences répétitives

RAPD: Amplification aléatoire de l'AND polymorphique

PFGE: Electrophorèse en champ pulsé

HPLC: Chromatographie liquide à haute performance

*ssp.*: sous-espèce

*sp.* : espèce inconnue

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Dendogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre « <i>Lactobacillales</i> » dans la classe des « <i>Bacilli</i> » .....	6
<b>Figure 2.</b> Voies de dégradation du glucose par les bactéries lactiques .....	8
<b>Figure 3.</b> Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques .....	17
<b>Figure 4.</b> Mécanisme de production et de régulation des lantibiotiques (nisine) .....	20
<b>Figure 5.</b> Mise en évidence de l'activité anti- <i>Listeria</i> par la méthode des spots .....	38
<b>Figure 6.</b> Protocole d'adsorption-désorption .....	39
<b>Figure 7.</b> Protocole de précipitation au sulfate d'ammonium .....	41
<b>Figure 8.</b> Aspect des colonies de bactéries lactiques sur gélose MRS .....	45
<b>Figure 9.</b> Répartition des genres de bactéries lactiques en fonction des laits .....	45
<b>Figure 10.</b> Séquences nucléotidiques des deux souches lactiques sélectionnées .....	49
<b>Figure 11.</b> Mise en évidence de l'activité anti- <i>Listeria</i> des souches LCW.1 à LCW.8 par le test des spots .....	51
<b>Figure 12.</b> Essai par la méthode des puits de l'activité bactériocinogène des extraits des souches LCW.7 et LCW.44 obtenus par la méthode d'adsorption-désorption .....	54
<b>Figure 13.</b> Essai par la méthode des spots de l'activité bactériocinogène des extraits des souches LCW.3, 4, 5, 6 et 8 obtenus par la méthode d'adsorption-désorption .....	54
<b>Figure 14.</b> Effet des souches lactiques sur <i>E. coli</i> et <i>Salmonella typhimurium</i> .....	59
<b>Figure 15.</b> Effet des souches lactiques sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	60
<b>Figure 16.</b> Spectre d'activité des souches LCW.7 et LCW.44 vis-à-vis des souches indésirables .....	61



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Classification des bactériocines des bactéries lactiques .....	<b>15</b>
<b>Tableau 2.</b> Souches cibles utilisées et leur origine .....	<b>34</b>
<b>Tableau 3.</b> Identification génotypique des souches isolées .....	<b>47</b>
<b>Tableau 4.</b> Détection de l'activité anti- <i>Listeria</i> des souches isolées sur gélose BHI .....	<b>52</b>
<b>Tableau 5.</b> Spectre d'action des souches lactiques sélectionnées sur gélose MRS .....	<b>56</b>

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>CHAPITRE I : LES BACTERIES LACTIQUES</b>	2
I-1 Définition et caractéristiques principales	2
I-2 Classification	3
I-3 Voies métaboliques	7
I-4 Identification génotypique des bactéries lactiques	7
I-5 Intérêt des bactéries lactiques	11
- dans l'industrie alimentaire	
- dans le domaine thérapeutique	
<b>CHAPITRE II : LES BACTERIOCINES DES BACTERIES LACTIQUES</b>	12
II-1 Définition et caractéristiques principales	12
II-2 Classification	14
II-3 Mode d'action	14
II-4 Synthèse et régulation	16
II-5 Conditions de production	18
II-6 Facteurs influençant la production des bactériocines	19
II-7 Les applications des bactériocines	22
- dans le secteur alimentaire	
- dans le secteur sanitaire	
<b>CHAPITRE III : MISE EN EVIDENCE ET PURIFICATION DES BACTERIOCINES</b>	24
III-1 Mise en évidence de l'activité bactériocinogénique	24
III-2 Mesure de l'activité des bactériocines	26
III-3 Méthodes de purification des bactériocines	27
<b>DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE</b>	
<b>CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES</b>	33
I-1 Matériel utilisé	33
I-1.1 milieux de culture	33
I-1.2 matériel biologique et produits chimiques	33
I-1.3 appareillage	34
I-1.4 autres	34
I-2 Méthodologie	35
I-2.1 Provenances des laits	35
I-2.2 Isolement et purification des bactéries lactiques	35
I-2.3 Identification génotypique	35
I-2.4 Mise en évidence de l'activité anti-listeria	36
I-2.5 Détection de l'activité bactériocinogène	36
a- Adsorption-désorption	36
b- Précipitation aux sulfates d'ammonium	37
c- Intérêt de la dialyse	37
d- Test de l'activité bactériocinogène	40
I-2.6 Spectre d'activité des souches sélectionnées	42

<b>CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION</b>	43
II-1 Isolement et purification des bactéries lactiques	43
II-2 Identification génotypique des souches isolées	43
II-3 Mise en évidence de l'activité anti- <i>Listeria</i>	46
II-4 Détection de l'activité bactériocinogène	50
II-5 Spectre d'action des souches à activité anti- <i>Listeria</i>	55
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	63
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	64

## INTRODUCTION

Les bactéries pathogènes sont à l'origine de diverses pathologies et intoxication alimentaires, c'est pourquoi les antibiotiques ont été utilisés pour les éliminer. Ceci a conduit à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance menaçant la santé publique. Pour faire face à ce problème les études sont actuellement orientées vers la recherche de substances naturelles entre autres les bactériocines des bactéries lactiques.

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, en tant que starters dans les procédés de fermentations afin de répondre aux exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités et exempts de conservateurs chimiques. Leur apports bénéfiques consistent à l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans altérer le goût ni l'odeur, et en augmentant leur durée de conservation. Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009; Moraes et *al.*, 2010 ).

L'intérêt des bactériocines des bactéries lactiques réside d'une part dans leur effet antimicrobien à spectre large ou étroit et d'autre part dans leur sûreté pour la santé humaine, vue leur sensibilité aux protéases digestives, et leur non toxicité pour les cellules eucaryotes. Ces substances antimicrobiennes ont la capacité de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou altérantes, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables. Ces substances bioactives présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Tous ces critères suggèrent que les bactériocines peuvent être un substituant idéal des conservateurs chimiques (Dortu et Thonart, 2009).

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules de bactériocines produites par les bactéries lactiques essentiellement à partir de biotopes peu explorés comme le lait de chamelle. Des bactéries lactiques ont été isolées des laits crus et fermenté algériens et identifiées par séquençage de l'ADNr 16S. Dans une deuxième étape, l'effet inhibiteur contre *Listeria monocytogenes* et le pouvoir bactériocinogène ont été recherchés au niveau de cette flore lactique.

La dernière étape a consisté à élargir le spectre d'activité des souches antagonistes à effet anti-*listeria* sur une gamme de bactéries pathogènes et/ou responsables de dégradation des produits alimentaires.

## Chapitre I : Les bactéries lactiques

### I-1 Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacilli (Badis et *al.*, 2005). Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont asporulantes, aéro anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4.0 à 4.5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme. Leur division se déroule sur un seul plan à l'exception des genres : *Pediococcus*, *Aerococcus*, et *Tetragenococcus*. (Salminen et *al.*, 2004; König et Fröhlich, 2009 ; Pringsulaka et *al.*, 2011). En général ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (Dellaglio et *al.*, 1994; Salminen et *al.*, 2004).

En plus de l'acide lactique et des autres acides organiques qui empêchent le développement des microorganismes indésirables par diminution du pH du milieu, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutérine, le dioxyde de carbone et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

Les bactéries lactiques colonisent les habitats riches en nutriments, tels les plantes, les fruits, les produits laitiers, les eaux et les eaux usées, les jus, ainsi que les cavités buccales, vaginales et intestinales de l'homme, sans pour autant lui provoquer des maladies, à l'exception de quelques cas causés par les streptococci et certains lactobacilli (König et Fröhlich, 2009).

## I-2 Classification des bactéries lactiques

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (6.5%, 18%), la tolérance aux pH acides, alcalins et à l'éthanol, la configuration de l'acide lactique produit à partir de glucose, l'hydrolyse de l'arginine, la formation d'acétoïne, etc. Les marqueurs chimiotaxonomiques comme la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire peuvent aussi être utiles dans la classification (König et Fröhlich, 2009).

L'identification des espèces de bactéries lactiques peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates à l'aide du système API50CH (Curk et *al.*, 1993).

L'analyse comparative des séquences d'ARN ribosomal 16S a entraîné des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (Salminen et *al.*, 2004).

Selon la dernière édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des *Bacilli* et l'Ordre des *Lactobacillales* renfermant trente cinq genres répartis sur six familles (Fig.1). Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de :

***Aerococcus*** : les cellules de ce genre sont de forme ovoïde (1-2 $\mu$ m de diamètre),  $\alpha$ -hémolytiques, non-gazogènes, arginine(-), pouvant croître à une concentration de 6.5% de NaCl, la division se déroule sur deux plans formant ainsi des tétrades. Cependant, des cellules isolées ou en paires peuvent être observées au milieu de la phase exponentielle.

***Carnobacterium*** : ce genre est constitué de bâtonnets courts parfois incurvés isolés ou en paires, psychrotolérants, pouvant se développer à pH : 9 et incapables de croître à 8% de NaCl ; quelques espèces sont catalase (+) en présence d'hème.

***Enterococcus*** : ce genre comprend des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes, homofermentaires. Quelques espèces sont mobiles par des petits flagelles et d'autres

possèdent une pseudo-catalase. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6.5% de NaCl, au pH : 9.6 et par la croissance à 10°C et 45°C avec une température optimale de croissance de 35°C à 37°C.

***Lactobacillus*** : les cellules de ce genre sont soit des bacilles longs parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes. Elles sont généralement immobiles à l'exception de quelques espèces qui possèdent des flagelles péritriches. Les souches sont acidophiles et peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C à 53°C. Les thermophiles sont incapables de se développer à moins de 15°C.

Le genre *Lactobacillus* peut être divisé en trois groupes : homofermentaires stricts, hétérofermentaires facultatifs et hétérofermentaires stricts.

***Lactococcus*** : les cellules de ce genre sont sphériques ou ovoïdes isolées, en paires, ou en chaînes. De type mésophiles, leur température optimale varie de 10 à 40°C mais sont incapables de se développer à 45°C. Celles-ci se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits.

***Leuconostoc*** : ce genre comprend 10 espèces fastidieuses dans leurs exigences nutritionnelles, les cellules sont ellipsoïdales à sphériques généralement allongées qui s'arrangent en paires ou en chaînes, non acidophiles avec un pH optimum de croissance égal à 6.5. Néanmoins, certains leuconostocs peuvent croître même à un pH de 4,5.

La température optimale est comprise entre 20°C et 30°C mais la croissance peut aussi avoir lieu même à 5°C. Les leuconostocs sont des hétérofermentaires obligatoires. Sur un milieu concentré en saccharose, certaines souches produisent des dextrans extracellulaires.

***Oenococcus*** : les cellules sont immobiles, asporulantes de forme ellipsoïdale à sphérique, avec un arrangement en paires ou en chaînes, non hémolytiques et généralement non protéolytiques. Elles exigent un milieu riche en acides aminés et en facteurs de croissance, leur pH optimum étant de 6 à 6,8 et la température optimale de 20°C à 30°C.

***Pediococcus*** : ce genre est représenté par neuf espèces ayant un métabolisme homofermentaire. Il rassemble des cellules immobiles de forme sphérique parfois ovoïdes, isolées ou en paires qui se divisent dans deux directions perpendiculaires formant ainsi les tétrades mais jamais les chaînes. Certaines espèces produisent une catalase ou une pseudocatalase. Les cellules sont acidophiles mais non halophiles et croissent à pH : 5 mais pas à pH : 9, la température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C.

***Streptococcus*** : les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH: 9.6. Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes.

***Vagococcus*** : les cellules sont ovoïdes isolées, en paires ou en chaînes. La plupart des espèces sont mobiles par des flagelles péritriches. Elles sont capables de croître à 10°C mais non à 45°C sans production de gaz ni d'arginine dihydrolase (ADH).

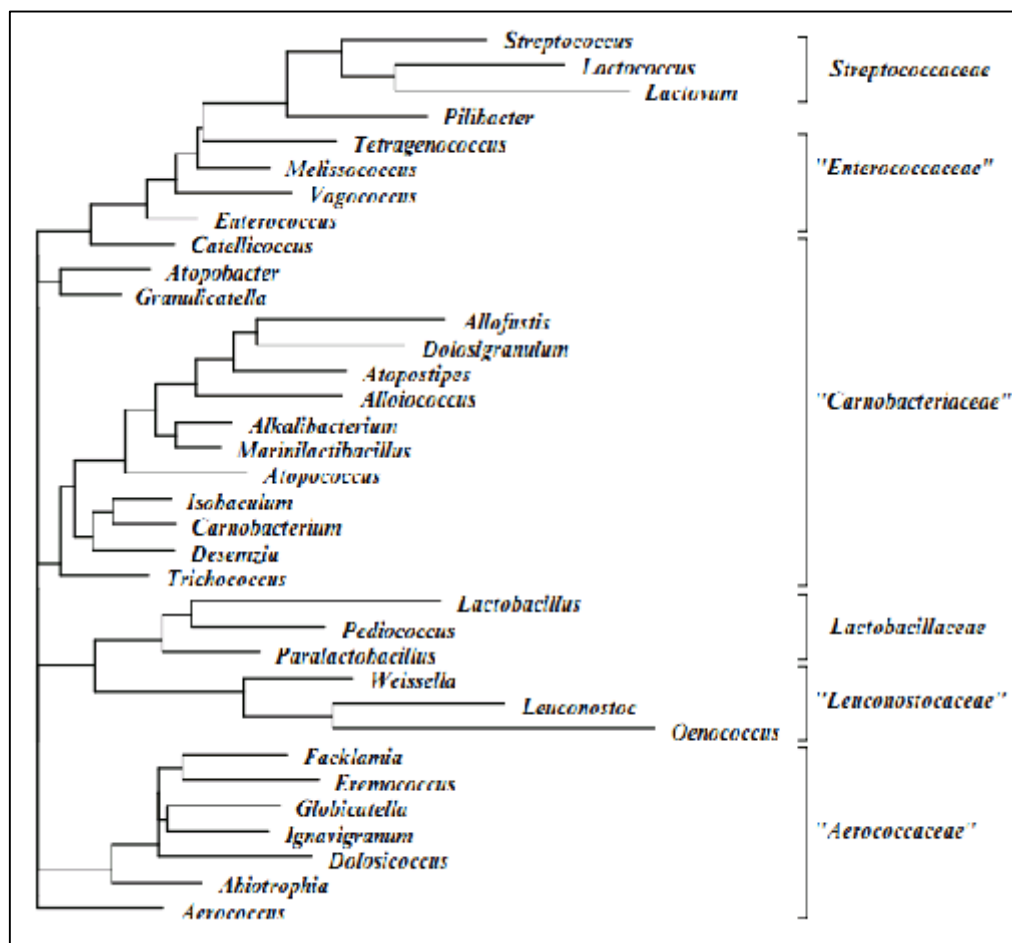
***Tetragenococcus*** : ce genre rassemble des cellules immobiles, sphériques ou ovoïdes avec un diamètre de 0.5-1.0 µm formant des tétrades après leur division dans deux directions perpendiculaires; comme elles peuvent être isolées ou en paires.

Le métabolisme des tétragenococci est homofermentaire. Ils ne produisent pas de CO<sub>2</sub> à partir de glucose comme ils sont incapables de réduire les nitrates ni d'hydrolyser l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 35°C et ne peuvent pas croître à 10°C et à 45°C.

***Weissella*** : les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont immobiles et hétérofermentaires. La température optimale de croissance est de 15°C, mais quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 45°C.



Parmi tous ces genres cités, seulement cinq (*Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*) répondent aux caractéristiques générales d'une bactérie lactique typique (Salminen et al. 2004).



**Fig.1.** Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre « *Lactobacillales* » dans la classe des « *bacilli* » (De Vos et al., 2009).

### I-3 Voies métaboliques

En se basant sur la voie empruntée et le produit final de la fermentation, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes (fig.2):

- **Homofermentaires** : toutes les bactéries lactiques (à l'exception des genres : *Leuconstoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et certains membres du genre *Lactobacillus*) entravent la voie de la glycolyse pour dégrader les hexoses (ex : glucose). Après son transfert vers la cellule, le glucose subit une phosphorylation pour se transformer en fructose qui est à son tour phosphorylé en fructose 1-6 di-phosphate puis clivé en dihydroxyacétone phosphate et glycéraldéhyde phosphate (GAP), ces deux derniers sont convertis en pyruvate.

Le pyruvate est dans une dernière étape réduit en acide lactique qui est le produit unique: c'est la fermentation homolactique. Dans les conditions défavorables telles la limitation du glucose, ces bactéries produisent également l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol et/ou le CO<sub>2</sub> par la voie de fermentation des acides mixtes (Mozzi et al., 2010)

- **Hétérofermentaires** : ce groupe de bactéries lactiques utilise la voie des pentoses phosphate (ou 6-phosphogluconate) qui consiste à une déshydrogénation du glucose, après sa phosphorylation, pour donner le 6-phosphogluconate qui subira une décarboxylation. Le pentose résultant est clivé en glycéraldéhyde phosphate (GAP) qui suit la voie de la glycolyse donnant l'acide lactique et l'acétyle phosphate qui sera réduit en éthanol. En raison de la production de CO<sub>2</sub>, d'éthanol ou de l'acétate en plus de l'acide lactique, cette fermentation est appelée hétérolactique (Salminen et al., 2004).

### I- 4 Identification génotypique des bactéries lactiques

Les méthodes phénotypiques classiques d'identification des bactéries lactiques semblent moins fiables et nécessitent une méthode plus précise et sophistiquée (Salminen et al., 2004), ce qui a fait appel aux méthodes d'identification génotypique telles que le séquençage de l'ADNr, le ribotypage, le profil plasmidique, les méthodes des empreintes digitales (fingerprinting) telles : le RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), rep-PCR

fingerprinting, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), et l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) de l'ensemble de l'ADN chromosomique digéré.

Le génome des bactéries lactiques est de taille variable, *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus plantarum* ont un génome de 3.4Mb. Actuellement le séquençage du génome total de vingt bactéries lactiques est disponible parmi lesquelles : *Oenococcus oeni*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *P. pentosaceus* et *Ln. mesenteroides*. Les bactéries lactiques possèdent à la fois des plasmides circulaires et linéaires qui codent pour différentes fonctions : fermentation des sucres, activité protéolytique, production de bactériocines, résistance aux antibiotiques et aux phages (König et Fröhlich, 2009).

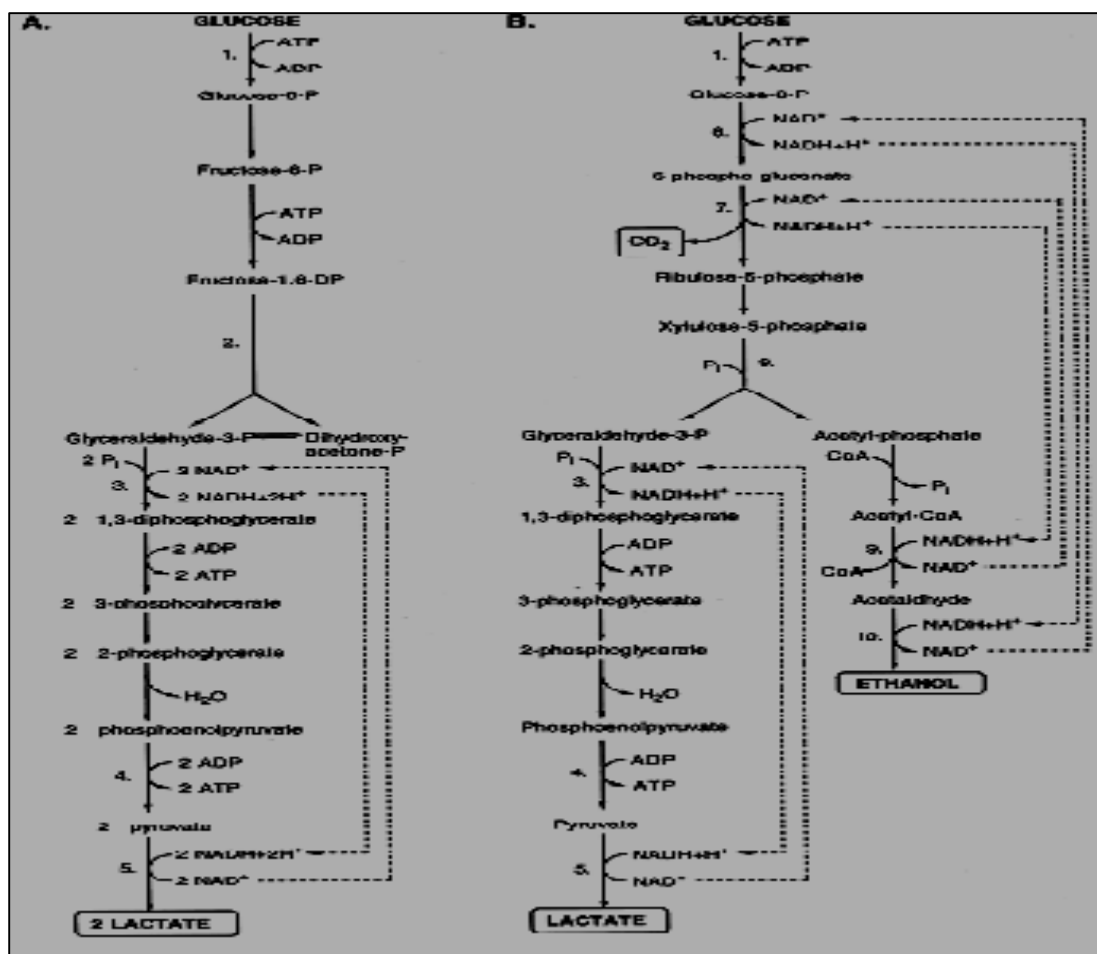


Fig.2. Voies de dégradation du glucose par les bactéries lactiques (Salminen et al., 2004).

A : Homofémentation, B : Hétérofémentation

#### I- 4.1 Séquençage de l'ADN ribosomal 16S

Le gène ADNr 16S codant pour l'ARNr 16S (ARN ribosomal 16S) est l'un des gènes les mieux conservés parmi les organismes procaryotes (Eubactéries et Archéobactéries). Aussi, cet élément est reconnu par la communauté scientifique pour être une base de comparaison efficace et fiable pour pouvoir à la fois comparer et différencier les bactéries entre elles (Zakhia et de Lajudie, 2006).

En effet, l'ADNr 16S :

- comporte des séquences internes très conservées qui permettent de sélectionner des amorces universelles pour l'amplification de l'ADNr 16S de la majorité des bactéries existantes.
- comportent des séquences internes variables qui permettent de distinguer les espèces de bactéries entre-elles.

L'autre atout est que la taille de l'ADNr 16S est suffisamment courte (partielle :  $\approx 500$  nucléotides ou complète :  $\approx 1500$  nucléotides) pour être analysée rapidement.

Certaines bactéries peuvent présenter sur le même génome plus d'une copie d'ADNr 16S qui peuvent être légèrement différentes. Dans ce cas, une ambiguïté apparaîtra pour un nombre restreint de nucléotides mais qui ne perturbera en aucune manière le résultat final d'identification. Bien que le séquençage direct de l'ARNr 16S soit fiable et permet l'identification d'une souche inconnue en une seule étape, son utilisation est limitée du fait que certaines espèces qui diffèrent entre elles peuvent partager la même séquence d'ADNr 16S (Fox et *al.*, 1992; Ouadghiri, 2009). Cette approche moléculaire d'identification des microorganismes par l'ADNr 16S qui sert habituellement de référence sera retenue dans l'étude expérimentale.

#### **I- 4.2 Ribotypage**

Cette méthode, qui permet de différencier entre les différentes espèces, consiste à coupler l'analyse de l'ADN chromosomique par des enzymes de restriction avec l'utilisation de sondes d'ADN recombiné. Celle-ci est employée pour révéler les hétérogénéités entre des souches à faible homologie, sa fiabilité étant fonction du nombre et du type de sondes et d'enzymes de restriction utilisées (Roussel et *al.*, 1993 ; Lyhs et *al.*, 1999 ; Ouadghiri, 2009).

### **I- 4. 3 Profil plasmidique**

Du fait que la plupart des souches de bactéries lactiques peuvent héberger plusieurs plasmides, la variation du nombre et de taille de ces derniers peut être un outil de typage pour elles. Ce typage n'est cependant pas fiable vu l'habilité de ces souches à acquérir ou à perdre des plasmides (Dykes et Von Holy, 1994 ; Holzapfel et *al.*, 2001, Ouadghiri, 2009).

### **I- 4. 4 Les méthodes utilisant les empreintes digitales**

#### **a- Polymorphisme d'amplification aléatoire de l'ADN (RAPD)**

Etant rapide, sensible, et peu coûteuse, cette méthode a servi avec succès à différencier les souches de bactéries lactiques au niveau intra-spécifique, inter-spécifique (comme chez les entérococci, les lactobacilli et les pédiococci) et inter-genre, ceci par l'utilisation d'amorces ayant une capacité discriminatoire (Johansson et *al.*, 1995; BenAmor et *al.*, 2007). Jusqu'à présent on n'a pas décrit des amorces de grande capacité discriminatoire et d'une large applicabilité dans un grand groupe de bactéries lactiques ce qui rend cette méthode moins fiable, en plus celle-ci n'est pas adéquate pour la construction d'une base de données d'identification (Ouadghiri, 2009).

#### **b- Réaction de polymérisation en chaîne utilisant des éléments répétés (rep-PCR)**

Cette méthode met en jeu les séquences répétitives, existant en multiples copies chez la plupart des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, qui se localisent en orientation inverse dans le chromosome bactérien et qui sont hautement conservées chez les souches apparentées et très variables entre les différentes espèces ou genres bactériens (Versalovic et *al.*, 1991; Lupski et Weinstock, 1992). Cette technique consiste à amplifier de façon sélective les régions situées entre ces séquences conservées, les amplicons de taille différente ainsi générés sont soumis à une séparation par électrophorèse sur gel d'agarose puis comparés aux profils des souches de référence. Chez les bactéries lactiques, l'amorce (GTG)<sub>5</sub> est utilisée dans le typage et l'identification des genres *Lactobacillus* et *Enterococcus* (Gevers et *al.*, 2001 ; Svec et *al.*, 2005, Ouadghiri, 2009).

#### **c- Polymorphisme de taille des fragments de restriction (AFLP)**

C'est une technique fiable et largement utilisée pour la discrimination des souches que se soit au niveau de l'espèce ou intra-spécifique, son usage étant en augmentation (Gancheva et al., 1999 ; Torriani et al. , 2001, Ouadghiri, 2009).

#### **d- Electrophorèse en champ pulsé de l'ADN chromosomique digéré (PFGE)**

Par son pouvoir discriminatoire puissant et sa grande reproductibilité, cette technique est considérée comme la meilleure mais relativement laborieuse parmi les autres méthodes du typage moléculaire des bactéries. D'ailleurs, elle a été la première méthode utilisée pour calculer la taille du génome et la variabilité intra-spécifique (Tenover et al., 1995; Salminen et al., 2004). Toutefois, cela nécessite des enzymes de restriction et des conditions d'électrophorèse spécifiques pour chaque espèce ce qui a limité son utilisation à l'étude de la diversité intra-spécifique et à la vérification de l'origine des souches (McCartney, 2002 ; Ouadghiri, 2009).

### **I-5 Intérêt des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique.

- **Dans l'industrie alimentaire** : les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem et al., 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis et al., 2005). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu et Thonart, 2009). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth et Steele, 2001).

- **Dans le domaine thérapeutique** : étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem et *al.*, 2008). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (Mkrtychyan et *al.*, 2010). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish et *al.*, 2011). Uehara et *al.*, (2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

## CHAPITRE II : Les bactériocines des bactéries lactiques

### II-1 Définition et caractéristiques principales

La définition qui était la plus acceptée donnée aux bactériocines est celle de Klaenhammer qui les définit en tant que protéines ou complexes de protéines ayant une activité bactéricide contre les espèces étroitement liées à la souche productrice (Dortu et Thonart, 2009 ; Xie et *al.*, 2011). Cependant, des études récentes ont démontré qu'il existe certaines qui sont actives également contre des bactéries à Gram négatif (Mami et *al.*, 2008 ; Gong et *al.*, 2010 ; Naghmouchi et *al.*, 2010). Ces substances protéiques biologiquement actives sont synthétisées au niveau du ribosome et codées par des gènes, leur sécrétion dans le milieu extracellulaire étant conférée par un système de transfert (Gálvez et *al.*, 2007; Riley et Chavan, 2007; Khalil et *al.*, 2009 ; Tabasco et *al.*, 2009 ).

Les bactériocines se différencient par leur poids moléculaire, leurs propriétés biochimiques, leur origine génétique, ainsi que par leur spectre et mode d'action (BenOmar et *al.*, 2006 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Ruiz-Barba et *al.*, 2010).

**Nomenclature** : La nomination des bactériocines est attachée soit au genre ou à l'espèce de la première souche productrice en ajoutant le suffixe ''cine'' pour indiquer le pouvoir létal ; par exemple: la plantaricine est la bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* (Karthikeyan et Santhosh, 2009).

Chez les bactéries à Gram positif, une souche peut produire plusieurs bactériocines. En effet les bactériocines qui présentent une légère modification dans les séquences d'acides aminés

conservées par rapport à leur prépeptide n'affectant pas leur structure secondaire ni leur spectre d'action ni l'immunité de la souche productrice sont considérées comme étant des variantes naturelles. A titre d'exemple, les nisines Z, Q et U sont des variantes naturelles de la nisine A découverte en premier lieu (Riley et Chavan, 2007).

**Nature :** les bactériocines des bactéries lactiques sont des protéines ou des complexes de protéines constituées généralement de 30 à 60 acides aminés. Ces substances peuvent être des protéines simples comme elles peuvent être associées à une partie lipidique ou glucidique. Certaines d'entre elles renferment des acides aminés inhabituels tels la lanthionine et la  $\beta$ -méthylelanthionine (Kotelnikova et Gelfand, 2002 ; Ammor et *al.*, 2006).

**Caractéristiques :** les bactériocines des bactéries lactiques ressemblent à certains peptides antimicrobiens des eucaryotes (Riley, 2009). Celles-ci sont généralement petites, cationiques (excès en résidus lysyl et arginyl), amphiphiles et thermostables. Leur poids moléculaire est relativement petit (2-6 kDa) ce qui leur permet d'accéder aux cellules cibles et perméabiliser la membrane en se liant à des récepteurs de surface (Moll et *al.*, 1999; Gillor et *al.*, 2008; Anthony et *al.*, 2009; Simova et *al.*, 2009 ; Hartmann et *al.*, 2011 ; Todorov et *al.*, 2011). Ces substances antagonistes, produites par la plupart des bactéries lactiques, se différencient des antibiotiques du fait qu'elles sont synthétisées au niveau du ribosome et leur spectre d'action est relativement étroit, alors que les antibiotiques sont généralement des métabolites secondaires et possèdent un spectre d'action plus large (Ghraiiri et *al.*, 2008).

**Propriétés :** certains critères des bactériocines produites par les bactéries lactiques justifient leur choix comme bioconservateurs (Gálvez et *al.*, 2007 ; Thakur et Roy, 2009) :

- Considérées comme 'GRAS' (Generally Recognized As Safe) ;
- inactives et non toxiques contre les cellules eucaryotes ;
- généralement thermostables et tolérantes aux variations du pH ;
- possèdent un spectre d'activité relativement large ;
- mode d'action généralement bactéricide (membrane cytoplasmique) ;
- déterminants génétiques codés par les plasmides ;
- sensibilité aux protéases et digestibilité dans le tractus intestinal.

## II-2 Classification



La classification récente des bactériocines (citée dans le tableau 1) est celle de Cotter et *al.* (2005) qui est une modification de la classification originale proposée par Klaenhammer (1993). Selon cette classification, les bactériocines des bactéries lactiques sont divisées en deux classes majeures en fonction de la présence ou non d'acides aminés soufrés inhabituels (lanthionine,  $\beta$ -méthyl lanthionine, déhydroalanine et déhydrobutyrine) formés par modifications post-traductionnelles. Les bactériocines qui les renferment appartiennent à la classe des lantibiotiques. Ces derniers sont des peptides thermostables de taille inférieure à 5kDa subdivisés en deux types : ceux à un seul peptide comme la nisine, et ceux qui exigent deux peptides pour avoir une activité comme la lacticine 3147.

La deuxième classe renferme des peptides thermostables de taille inférieure à 10kDa contenant un (pédiocine PA1) ou deux peptides (lactacine F). Certains ont une structure cyclique (entéroïne AS 48), quatre sous-classes sont citées : a, b, c et d (Dortu et Thonart, 2009).

D'après Cotter et *al.* (2005), les bactériolysines ne font pas partie des bactériocines.

### **II-3 Mode d'action**

Bien que toutes les bactériocines partagent le même site d'action qui est la membrane cytoplasmique, leur mode d'action semble être différent (Dortu et Thonart, 2009):

Les lantibiotiques tel que la nisine, portant une structure cationique et amphiphile allongée, interagissent avec la membrane des cellules cibles soit en se liant au lipide II (un précurseur de peptidoglycane) empêchant ainsi la synthèse de la paroi cellulaire conduisant à la mort de la cellule, soit en utilisant ce lipide comme une molécule d'appui pour s'insérer dans la membrane et y former des pores causant la destruction de la cellule suite à la dissipation du potentiel membranaire et l'efflux des petites molécules (ions, ATP, acides aminés, etc). La mersacidine tue la cellule en interférant avec ses réactions enzymatiques comme la synthèse de la paroi (Gillor et al., 2008 ; Dortu et Thonart, 2009).

L'insertion des bactériocines de la classe II dans la membrane est conférée par la structure  $\alpha$ -hélice amphiphile, cette insertion induit la perméabilisation de la membrane et par conséquent la mort cellulaire suite à l'écoulement des molécules à faible poids moléculaire.

**Tableau 1:** Classification des bactériocines des bactéries lactiques (Cotter et *al.*, 2005).

Les bactériolysines par ailleurs ont un mode d'action complètement différent basé sur l'hydrolyse des liaisons peptidiques des peptidoglycanes (Cotter et *al.*, 2005).

Classe	Description et sous-classes	Exemples
I Lantibiotiques	Renferme les lantibiotiques à un et deux peptides  11 sous-classes décrites	- à un seul peptide : Nisine, Lacticine 481, Mersacidine  - à deux peptides: Cytolysine, Lacticine 3147
II Bactériocines non modifiées	Classe hétérogène formée de petits peptides  - sous-classe <b>a</b> : bactériocines semblables à la pédiocine (pediocin-like)  - sous-classe <b>b</b> : bactériocines à deux peptides  - sous-classe <b>c</b> : bactériocines cycliques.  - sous-classe <b>d</b> : bactériocines à un seul peptide linéaire autres que la pédiocine	Pédiocine PA1, Leucocine A  Lactacine F  Enterocine AS48, Reutéline 6  Lactococcine A, Divergicine A
Bactériolysines Protéines lytiques non considérées comme bactériocines	Grosses protéines thermolabiles généralement des hydrolases de muréine.	Lysostaphine, Enterolysine A

La figure 3 illustre le mode d'action de chaque classe.

## II-4 Synthèse et régulation

Différentes protéines sont impliquées dans le mécanisme de production de la bactériocine et de sa régulation. La production est régulée par un système de *Quorum Sensing* (expression de certains gènes en fonction de la densité de la population bactérienne).

#### II-4.1 Synthèse des bactériocines

Chez les deux classes, la bactériocine est produite sous forme d'un prépeptide non-biologiquement actif qui subira des modifications post-traductionnelles pour donner le peptide actif (Dortu et Thonart, 2009).

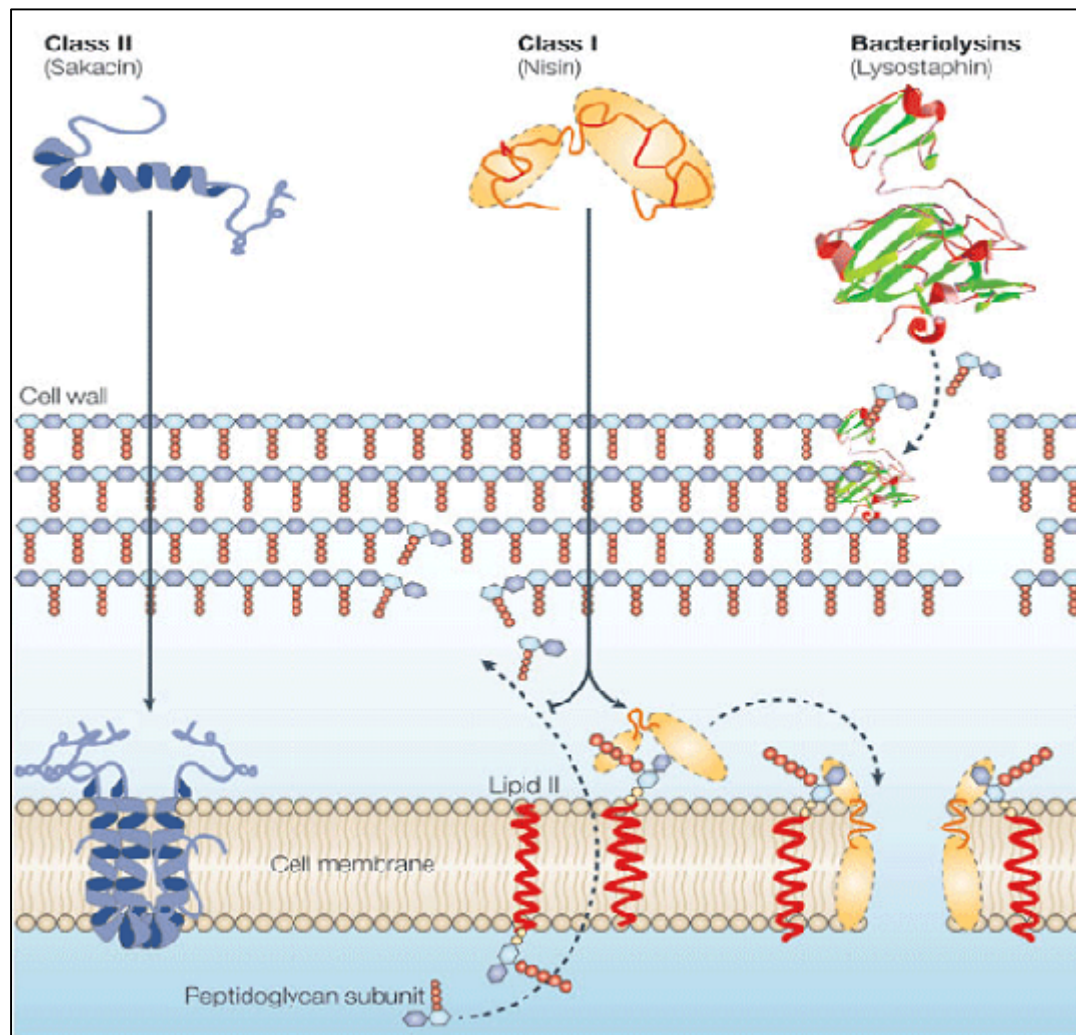
##### a- Les lantibiotiques

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des lantibiotiques (ex : la nisine) sont :

- **Gène de structure (LanA)** : ce gène code pour le prépeptide contenant la séquence N-terminale de 23 à 30 acides aminés qui sera clivée lors du transport à l'extérieur de la cellule.
- **Gènes (LanB et LanC ou LanM)** : ces gènes codent pour les enzymes déshydratase (impliquée dans la déshydratation de la sérine et la thréonine pour donner le déhydroalanine et le déhydrobutyrine) et cyclase (responsable de la structure cyclique par formation de liens thioéthers entre ces résidus et les cystéines environnantes).
- **Gènes codant le transporteur ABC**: il s'agit du gène LanP codant pour le domaine protéasique du transporteur ABC et du gène LanT qui sert à cliver le prépeptide lors de son excrétion à l'extérieur de la cellule sous sa forme active.
- **Gènes d'immunité** : il s'agit des gènes LanI, LanE, LanF et LanG codant les protéines responsables de l'immunité de la souche vis-à-vis de la bactériocine qu'elle produit.

##### b- Les bactériocines de la classe II

Mis-à-part les gènes de modification post-traductionnelle absents chez cette classe, les gènes de synthèse sont identiques à ceux des lantibiotiques. Cependant, certaines bactéries de cette classe utilisent un autre système de sécrétion qui est le "*sec-dependent pathways*" basé sur la translocation du peptide par un pore aqueux formé par plusieurs protéines.



**Fig. 3.** Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques (Cotter et al., 2005).

## II-4.2 Gènes et mécanisme de régulation

### a- Les lantibiotiques

Le mécanisme de régulation est un système d'autorégulation basé sur le *Quorum Sensing* à deux composantes : un gène codant l'histidine kinase (LanK), ce gène codant pour une histidine kinase qui réagit avec un stimulus extérieur (la bactériocine elle-même) et un gène codant le régulateur de réponse (LanR).

Quand la bactériocine s'accumule dans le milieu et atteint un certain seuil, la molécule interagit avec l'histidine kinase. Cette réaction induit la phosphorylation du régulateur de réponse qui permet l'activation du système de transcription des gènes de structure et d'immunité.

La figure 4 explique le mécanisme de production et de régulation de la nisine.

### b- Les bactériocines de la classe II

Pour cette classe, la régulation est assurée par un système de *Quorum Sensing* à trois composantes : un gène codant le peptide d'induction, un gène codant l'histidine kinase et un gène codant le régulateur de réponse. Le mécanisme de régulation pour cette classe est similaire à celui des lantibiotiques à l'exception du stimulus extérieur qui est dans ce cas un prépeptide autre que la bactériocine (Dortu et Thonart, 2009).

## II-5. Conditions de production

Dans leur lutte pour survivre et se nourrir, les bactéries lactiques produisent de nombreuses substances antimicrobiennes entre-autres les bactériocines, qui servent d'armes permettant aux bactéries lactiques de dominer les microorganismes compétitifs. Ces bactériocines peuvent être dégradées sous l'action des protéases de la souche productrice ou être adsorbées à sa surface (Moll et *al.*, 1999 ; Dortu et Thonart, 2009).

Les conditions optimales pour la croissance peuvent l'être également pour la production des bactériocines. Yang et Ray (1994) et Castro et *al.* (2011) ont démontré que les conditions conduisant à une forte densité cellulaire favorisent la production de bactériocine par *Lactobacillus sakei*. Cependant, il a été noté par Verluyten et *al.* (2004) que des conditions défavorables à la croissance permettent de stimuler la production des bactériocines par *Lactobacillus curvatus*.

La présence des microorganismes compétitifs dans le milieu stimule la production des bactériocines. Tabasco et *al.* (2009) ont démontré que *Lactobacillus acidophilus* La-5 augmente la production de lactacine B quand cette souche sent la présence de cellules cibles vivantes ; l'utilisation de ces mêmes cellules cibles après chauffage n'avait aucun impact sur cette production. De même une co-culture de *Lactobacillus plantarum* NC8 avec *Enterococcus faecium* a augmenté sa production de bactériocine (Ruiz-Barba et *al.*, 2010).

## II-6 Facteurs influençant la production des bactériocines

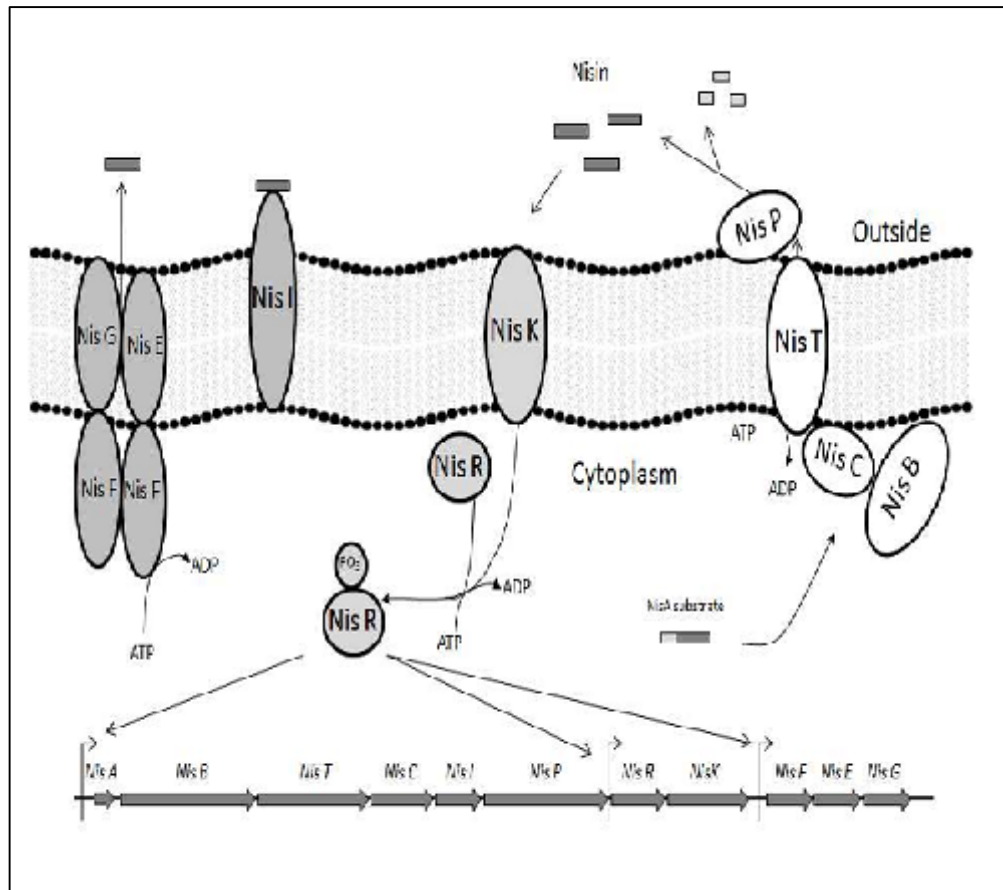
L'utilisation des bactériocines à l'échelle industrielle en nécessite de grandes quantités. Ceci ne peut être atteint qu'en connaissant et optimisant les facteurs influençant leur production tels que : la température, le pH, le milieu utilisé, etc. Ces conditions de culture affectent fortement la production de bactériocines.

### 1- Température et pH

La température et le pH sont des facteurs importants qu'on doit prendre en considération quand à la production de bactériocines. Celle-ci est généralement optimale à des températures et des pH inférieurs à ceux optimaux pour la croissance (Héquet et *al.*, 2007 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Sharma et *al.*, 2010).

L'effet de ces deux facteurs a fait l'objet de plusieurs études. Ainsi, la production de bactériocine par *Leuconostoc lactis* était optimale à 30°C et à pH variant de 6.5 – 7 ; néanmoins, elle est diminuée d'une façon remarquable à 37°C et à pH 5.5 et 8.0 (Dhakur et Roy, 2009). La production de pédiocine LB-B1 par *Lactobacillus plantarum* LB-B1 était optimale à 37°C et à pH : 6 (Xie et *al.* 2011).

*Enterococcus faecium* PC4.1 atteint son maximum de production à 30°C et à pH : 6 (Hadji-Sfahi et *al.* 2011). La production de l'acidocine 8912 par *Lactobacillus acidophilus* était maximisée à 30°C (Ahmed et *al.* 2010).



**Fig.4.** Mécanisme de production et de régulation des lantibiotiques (la nisine)  
(Dortu et Thonart, 2009).

Nis : nisine

## 2-Composition du milieu de culture

La composition du milieu de culture en particulier la source et la teneur de carbone et d'azote influence considérablement la production de bactériocines. Vu leurs exigences nutritionnelles, les bactéries lactiques requièrent plusieurs composants tels que : les facteurs de croissance, les peptones, l'extrait de levure, les hydrolysats de protéines et l'extrait de viande. Ces composants ont un impact positif sur le rendement en bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

De nombreux milieux de culture complexes ont été utilisés pour l'isolement des bactéries lactiques bactériocinogènes tels le MRS (Elmoualdi et *al.*, 2008 ; Khalil et *al.*, 2009 ; Moraes et *al.*, 2010 ; Xie et *al.*, 2011; Abrams et *al.*, 2011 et Castro et *al.*, 2011), le BHI (Ammor et *al.*, 2006 ; Ghrairi et *al.*, 2008), et le M17 (Hadji-Sfaxi et *al.*, 2011). Toutefois, l'Elliker constitue le milieu le plus approprié pour améliorer le rendement des bactériocines (Thakur et *al.*, 2009).

Il a été signalé que la production des bactériocines peut être maximisée en fortifiant le milieu de culture par l'ajout d'extrait de levure (Benkerroum et *al.*, 2000 ; Labioui et *al.*, 2005 ; Elmoualdi et *al.*, 2008 ; Sarika et *al.*, 2010).

Todorov et Dicks (2005) ont démontré que le taux de bactériocines ST461BZ et ST462BZ produites par *Lactobacillus rhamnosus* a significativement augmenté en ajoutant au milieu le  $K_2HPO_4$  et le  $KH_2PO_4$  respectivement.

## 3- Temps d'incubation

La synthèse des bactériocines prend lieu au cours de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Au delà de cette période une diminution du taux de bactériocines a été observée suite à la digestion de ces dernières par les enzymes protéolytiques libérées par la cellule productrice. De ce fait, plusieurs études ont été réalisées pour optimiser la période d'incubation; Gong et *al.* (2010) ont démontré que la production de la plantaricine MG par *Lactobacillus plantarum* atteint sa valeur maximale après 28H d'incubation. La production maximale de bacALP7 par *P. pentosaceus* est observée après 16H d'incubation et diminue de près de la moitié après 21H (Pinto et *al.*, 2009).



## II-7 Les applications des bactériocines

Considérées en tant que « GRAS » (Generally Recognized As Safe) et vu leur abondance et leur pouvoir antimicrobien généralement bactéricide, les bactériocines des bactéries lactiques trouvent leur utilisation dans différents domaines où elles empêchent le développement de bactéries pathogènes et nuisibles (Albano et *al.*, 2007).

### - Dans le secteur alimentaire

L'utilisation des bactériocines dans les produits alimentaires a connu une forte progression. Du fait que ces substances sont naturelles, sûres (non toxiques pour les cellules eucaryotes et facilement digestibles dans le tractus intestinal), tolérantes aux traitements thermiques et aux variations du pH et agissant à des faibles concentrations, leur application conduit à une prolongation de la durée de conservation des produits alimentaires (Gautam et Sharma, 2009).

Ces molécules bioactives sont incorporées dans les aliments soit directement sous forme purifiée ou semi-purifiée (nisine) ou sous forme de concentré (pédiocine) soit indirectement en appliquant la souche productrice dans le produit alimentaire (production *in situ*), comme elles peuvent être immobilisées par encapsulation ou adsorption. A l'heure actuelle, seule la nisine est acceptée comme additif (Ghalfi et *al.*, 2006 ; Dortu et Thonart, 2009).

Benkerroum et *al.* (2000) ont démontré la capacité des bactériocines produites par *Lactococcus lactis* de diminuer le nombre de *Listeria monocytogenes* ajoutée expérimentalement au Jben Marocain. Après contamination du Jben avec  $10^7$  et  $10^4$  UFC.ml<sup>-1</sup>, il a été constaté que la bactériocine entraîne une réduction du nombre de contaminants de 2.7 log après 30H dans le premier cas et l'a complètement éliminé après 24H dans le deuxième.

La nisine produite par *Lactococcus lactis* est utilisée dans la production des fromages pour prévenir la fermentation de l'acide lactique en acide butyrique par le genre *Clostridium*, ce qui affecte la saveur et la texture des produits. La nisine est aussi capable d'inhiber les genres : *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria* et *Clostridium* en particulier *Clostridium tyrobutyricum* responsable de la production de gaz dans les fromages semi solides (Walstra et

*al.*, 2006). Cette bactériocine est utilisée également dans la fabrication des : fromages pasteurisés, produits liquides à base d'œuf, sauces, laits frais, bières et conserves (Glazer et Nikaido, 2007).

Etant un milieu riche, la viande est sujette à des contaminations par les microorganismes pathogènes et altérants tels que *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta* et *Clostridium estertheticum* (Jones et *al.*, 2008). Héquet et *al.* (2007) ont démontré que la sakacine G produite par *Lactobacillus sakei* a diminué le nombre de *Listeria innocua* de 3 log à moins de 1 log dans les jambons cuits conservés à 4°C. Ben Hammou et *al.* (2010) ont réussi à appliquer la nisine en combinaison avec le NaCl pour contrôler le développement de *Listeria monocytogenes* dans les saucisses du mouton.

Albano et *al.* (2009) ont utilisé *Pediococcus acidilactici* productrice de la bactériocine PA-1 pour inhiber un cocktail de souches de *Listeria innocua* dans les saucisses à base de viande fermentée, ceci ayant permis une réduction remarquable de ces souches.

Pinto et *al.* (2009) ont mis en évidence la capacité des bactériocines bacALP7 et bacALP57 produites par *Enterococcus faecium* et *Pediococcus pentosaceus* de réduire le taux de *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* dans les fruits de mer.

#### - Dans le secteur sanitaire

L'usage des bactériocines n'est pas restreint au domaine alimentaire. Celles-ci servent aussi comme agents de thérapie naturelle alternatifs aux antibiotiques (Smaoui, 2010). Suite à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance manifesté par plusieurs bactéries pathogènes (parmi lesquelles certaines sont résistantes à plusieurs antibiotiques à la fois) qui menace la santé publique, les études sont actuellement orientées vers la recherche de nouvelles substances antibiotiques naturelles pouvant résoudre ce problème (Mkrtchyan et *al.*, 2010).

Les bactériocines de la classe IIa présentent un groupe important de peptides antimicrobiens qui peuvent être utilisés en médecine avec les antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses ou comme des agents antiviraux. Ces molécules ont une activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif nuisibles et pathogènes comme *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (Drider et *al.*, 2006).

Xie et *al.* (2011) ont rapporté que le Koumiss (produit chinois à base de lait fermenté) est efficace dans le traitement de la tuberculose et des maladies cardiovasculaires et contribue à l'amélioration de l'immunité, et que ces propriétés sont attribuées aux bactériocines produites par les bactéries lactiques indigènes. Dembélé et *al.* (1998) ont démontré que les bactériocines produites par le genre *Lactobacillus* contribuent à la protection du vagin contre différentes bactéries pathogènes telles : *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*.

Tong et *al.* (2010) ont démontré que la nisine participe dans la prévention et le traitement des caries dentaires en inhibant les microorganismes en cause. La nisine est aussi utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vu sa stabilité aux pH acides et son activité contre *Helicobacter pylori*. Les bactériocines LA-1, YIT9029 et DCE471 produites par *Lb. johnsonii*, *Lb. casei* et *Lb. amylovorus* respectivement manifestent également une activité inhibitrice contre *Helicobacter pylori* (Smaoui, 2010). Des études récentes ont découvert le rôle des bactériocines produites par *Lactobacillus salivarius* dans la réduction de colonisation du caecal des volailles par *Campylobacter* (Nazef et *al.*, 2008).

## **CHAPITRE III : Mise en évidence et purification des bactériocines**

### **III-1. Mise en évidence de l'activité bactériocinogène**

Les méthodes de détection des souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur la diffusion de ces substances protéiques dans un milieu de culture solide ou semi-solide préalablement inoculé par une souche indicatrice (Elmoualdi et *al.*, 2008). Certaines bactériocines, comme la streptocine STH<sub>1</sub>, sont produites uniquement en milieu liquide (Riley et Chavan, 2007).

#### **a- Test des spots (spot on the lawn)**

C'est une méthode permettant la recherche d'antagonisme de plusieurs souches à la fois, cet antagonisme peut être soit direct (simultané) ou indirect (différé).

- Antagonisme direct : il consiste à réaliser sur une gélose un tapis de la souche indicatrice, une culture fraîche de la souche test est ensuite ensemencée sur ce tapis sous forme de spots.

Après incubation, les boîtes sont examinées pour les zones d'inhibition. La densité du tapis cellulaire est un facteur déterminant dans cette méthode (Tagg et *al.*, 1976 ; Riley et Chavan, 2007).

- Antagonisme différé : dans cette méthode, une préculture de la souche test est ensemencée sur gélose sous forme de spots, une incubation est alors réalisée permettant le développement des colonies. Une gélose molle (0.75% d'agar) inoculée par un certain volume de la souche indicatrice est ensuite versée au dessus. L'inhibition se traduit par l'apparition des halos d'inhibition ( $\geq 2\text{mm}$ ) autour des souches productrices (Mami et *al.*, 2008).

La bactérie test peut être tuée par chauffage ou par chloroforme avant de verser la gélose molle. Cependant, le chloroforme peut inactiver les substances inhibitrices. Pour éviter ce problème, une modification de cette méthode consiste à ensemencer la souche indicatrice sur la face opposée par rapport à la souche test et présente également l'avantage d'exclure l'effet des bactériophages (Tagg et *al.*, 1976).

#### **b- Méthode des puits**

Cette méthode proposée par Barefoot et Klaenhammer (1983) consiste à inoculer la gélose fondue et refroidie à 45°C avec une préculture de la souche indicatrice. Après solidification, des puits sont creusés à l'aide d'un emporte pièce ou un embout, puis remplis avec le surnageant préalablement stérilisé par filtration sur membrane de la culture à tester. Une pré-diffusion à 4°C durant 4H est réalisée suivie d'une incubation de 24H à 48H avant examen des zones d'inhibition. Une modification de cette méthode consiste à remplir les puits par une gélose contenant la souche à tester (Berecka et *al.*, 2009).

#### **c- Méthode des disques**

Dans cette méthode, un tapis de la souche indicatrice est réalisé sur la surface d'un milieu solide, ensuite des disques stériles de papier Whatman imbibés de surnageant de la culture à tester sont déposés sur ce tapis. Après incubation, les boîtes sont examinées pour la présence des zones d'inhibition (Berecka et *al.*, 2009).

#### **d- Méthode de plaques de gélose**

Dans cette méthode la gélose est inoculée par 1ml de la souche à tester et incubée pendant 24H. Des plaques sont découpées de cette gélose puis placées sur une autre gélose

inoculée de 0.5ml de la souche indicatrice. Après incubation, les boîtes sont examinées pour visualiser les zones d'inhibition (Berecka et *al.*, 2009).

#### **e- Méthode des microplaques**

Cette méthode consiste à placer 25µl du surnageant de la souche à tester dans les cupules d'une microplaque, ensuite chaque cupule reçoit un volume de 175µl de bouillon approprié inoculé par 1% (v/v) d'une préculture de la souche indicatrice. Après incubation à la température optimale de cette dernière durant 20H, la croissance est examinée en mesurant la densité optique à 650nm (Simova et *al.*, 2009).

### **III-2. Mesure de l'activité des bactériocines**

L'activité des bactériocines est soit bactéricide ou bactériostatique, le titrage de la bactériocine dans une préparation est généralement basé sur l'inverse de la plus forte dilution exerçant une inhibition vis-à-vis d'une souche indicatrice (Tagg et *al.*, 1976).

#### **a- Méthode des dilutions critiques**

Cette méthode est réalisée sur une plaque gélosée soit en y ensemençant les dilutions sous forme de spots ou en les plaçant dans des puits y creusés.

- Méthode par spots : après réalisation des dilutions à partir du surnageant neutralisé et filtré de la souche à tester ; des spots de chaque dilution sont déposés à la surface d'une gélose préalablement inoculée par une préculture de la souche indicatrice. Après incubation, les zones d'inhibition sont visualisées et l'activité est définie comme l'inverse de la plus forte dilution induisant une zone claire d'inhibition qui est calculée selon l'équation suivante :  $\text{activité} = (1000/d)/D$

où d : volume de spot ; D : dilution maximale induisant une inhibition (Karthikeyan et Santhosh, 2009 ; Mkrtchyan et *al.*, 2010).

- Méthode des puits (AWDA) : dans cette méthode des dilutions du surnageant de la souche test préparé comme précédemment sont réalisées. Des quantités égales de ces dilutions sont placées dans les puits creusés dans une gélose préalablement inoculée par une préculture de la souche indicatrice. Après incubation et apparition des zones d'inhibition autour des puits, l'activité est déterminée comme étant l'inverse de la plus forte dilution présentant une zone d'inhibition de la souche indicatrice. Cette activité est exprimée en unité arbitraire par millilitre et calculée

comme suit:  $UA = (1000/v)/D$  où  $v$  : volume inoculé dans les puits ;  $D$  : la plus forte dilution donnant une zone d'inhibition (Simova et *al.*, 2009 ; Castro et *al.*, 2011).

#### **b- Microméthode**

Elle consiste à réaliser une série de dilutions à partir du surnageant de la souche à tester (neutralisé et filtré) qui seront réparties (à volume égal) dans les cupules d'une microplaque. Chaque cupule reçoit par la suite le même volume d'une préculture de la souche indicatrice. Après incubation, l'activité des bactériocines est déterminée en mesurant la turbidité, elle est définie comme la plus forte dilution empêchant le trouble dans les cupules et calculée comme mentionnée précédemment dans la méthode des puits (Daba et *al.*, 1991 ; Saint-Hubert et *al.*, 2009).

### **III-3 Méthodes de purification des bactériocines**

Vu le rendement relativement faible de bactériocines dans les cultures de bactéries lactiques, il est recommandé d'utiliser de grands volumes de milieu de culture quand à leur purification. L'extrait de bactériocines obtenu doit être d'abord concentré. De plus, la production de certaines bactériocines ne peut être détectée qu'en milieu solide, leur récupération se fait alors par élution à partir de l'agar (Tagg et *al.*, 1976).

Etant des protéines, les méthodes de purification des bactériocines sont donc les mêmes que pour les protéines. Beaucoup de protocoles de purification consistent en un enchaînement de chromatographies à différents principes en se basant sur les différentes propriétés des protéines (charge, hydrophobie, taille, etc.) mais le problème posé est la perte de l'activité au fur et à mesure des étapes de purification. Ceci nécessite un contrôle de l'activité de la solution des bactériocines après chaque étape et un changement de méthodes (si c'est possible) influençant l'activité antimicrobienne (Tagg et *al.*, 1976 ; Hainque et *al.*, 2008).

#### **1- Précipitation au sulfate d'ammonium**

C'est une méthode de purification et de concentration des bactériocines basée sur leur précipitation par les sels minéraux, les acides, l'éthanol ou les différents solvants.

Les sels sont les fréquemment utilisés grâce à leur haute solubilité dans l'eau à basse température et leurs ions sont inoffensifs pour les protéines. Le sel le plus utilisé est le sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Le principe de cette méthode est de précipiter la bactériocine à partir d'une solution par addition de différentes concentrations de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  avec agitation. La bactériocine possède une surface hydrophobe, celle-ci dans une solution se trouve entourée de molécules d'eau. Une fois le sel ajouté, l'eau est impliquée dans sa dissolution entraînant une agrégation des molécules de bactériocines suivie de leur précipitation. Le culot est récupéré par centrifugation puis dissout dans le minimum de volume d'eau distillée ou de tampon et enfin le sel est éliminé par dialyse (Culter, 2004).

Plusieurs études ont utilisé la méthode de précipitation; Hata et *al.* (2010) ont purifié la plantaricine ASM1 en saturant la solution à 40% par le sulfate d'ammonium. Il en est de même pour Albano et *al.* (2007) et Mkrtychyan et *al.* (2010) dans la purification de l'acidocine LCHV alors que la précipitation de la plantaricine MG a nécessité une saturation par le sel à 70% (Gong et *al.*, 2010). L'inconvénient de cette méthode est qu'elle permet la précipitation de toutes les protéines existant dans la solution et son rendement est relativement faible (Yang et *al.*, 1992).

## 2- Adsorption-désorption

Cette méthode de purification proposée par Yang et *al.* (1992) est basée sur la propriété d'adsorption des bactériocines à la paroi des cellules productrices et des autres bactéries à Gram positif. Le degré de cette adsorption est en fonction du pH. Ainsi, près de 93 à 100% des bactériocines sont adsorbées à des pH voisins de 6.0 et peu d'entre elles ( $\leq 5\%$ ) sont adsorbées à pH de 1.5-2.0. La démarche consiste à chauffer la culture bactérienne afin de tuer les bactéries et désactiver les enzymes protéolytiques. Le pH est ensuite ajusté à 6.5 permettant l'adsorption des bactériocines à la surface des cellules mortes puis ces dernières sont récupérées par désorption dans le NaCl à pH 2 et centrifugation. Le rendement de cette méthode est plus élevé que celui de la précipitation (Yang et *al.*, 1992). Plusieurs travaux (Tagg et *al.*, 1976 ; Pinto et *al.*, 2009 ; Pringsulaka et *al.*, 2011 ; Xie et *al.*, 2011) ont utilisé cette méthode pour la purification des bactériocines.

### 3- Dialyse

La dialyse sert à éliminer les composés de petite taille (acides organiques, sels, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de la solution de bactériocines en la plaçant dans un sac ou boudin de dialyse. Ce dernier est fermé des deux cotés et trempé dans un liquide dit de contre dialyse (eau distillée ou tampon). Les pores de ce boudin laissent passer les substances de faible poids moléculaire tandis que les bactériocines seront retenues. Il est nécessaire de fréquemment changer le liquide de contre dialyse pour s'assurer de l'élimination complète des petites substances. La dialyse sert aussi à concentrer la solution de bactériocines en remplaçant le liquide de contre dialyse par une solution concentrée de polyéthylène glycol (PEG). Dans ce cas l'eau va quitter le boudin pour diluer cette solution de PEG entraînant la concentration des bactériocines (Kamoun et *al.*, 2003).

### 4- Ultrafiltration

Cette méthode est généralement utilisée en dernier lieu après les chromatographies sur colonnes. L'ultrafiltration permet la concentration sélective des protéines en utilisant des membranes semi-perméables assurant le passage de l'eau et des petites molécules. L'air comprimé exerce une pression sur le liquide à ultrafiltrer et seules les molécules de faible poids moléculaire pouvant traverser la membrane, la bactériocine étant relativement grosse sera donc retenue par cette membrane (Kamoun et *al.*, 2003; Cutler, 2004 ).

### 5- Lyophilisation

Elle consiste à concentrer la solution protéique par élimination de l'eau en la faisant passer directement de l'état solide à l'état gazeux. La solution à concentrer est portée très brutalement à -70°C puis placée dans une enceinte étanche à vide très poussé ce qui permet de retirer l'eau sans altération des structures protéiques (Kamoun et *al.*, 2003). Cette méthode a été utilisée par Ghrairi et *al.* (2008) dans la purification de l'entérocoque A et B et par Millette et *al.* (2008) pour la purification de la pédiocine.

### 6- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Cette technique sert à déterminer le poids moléculaire de la bactériocine. Elle est basée sur la séparation des protéines selon leur poids moléculaire sur gel de polyacrylamide réticulé. Ce gel constitue un filet à mailles plus ou moins fines permettant aux petites molécules de migrer plus loin. La solution tampon contenant le SDS (sodium dodécyl sulfate)



sert à dissocier les sous-unités des protéines, les chaînes polypeptidiques fixent une quantité constante de SDS par gramme (1.4g SDS/g de protéine) et prennent la forme de bâtonnets dont la longueur est proportionnelle au nombre d'acides aminés donc au poids moléculaire, les petites chaînes migrant le plus loin. Leur révélation se fait par coloration. En faisant migrer un mélange de chaînes polypeptidiques de poids moléculaire connu, il est possible de déterminer le poids moléculaire des chaînes séparées (Kamoun et *al.*, 2003). Cette méthode a permis de déterminer le poids moléculaire de la pédiocine LB-B1 produite par *Lactobacillus plantarum* (Xie et *al.*, 2011) et de plusieurs autres bactériocines (Albano et *al.*, 2007 ; Pinto et *al.*, 2009 ; Khalil et *al.*, 2009).

### **7- Chromatographie d'exclusion stérique (gel-filtration)**

Cette méthode permet de séparer les molécules en fonction de leur taille. Les molécules trop volumineuses ne peuvent pas entrer dans les pores du gel, celles-ci sont donc exclues et sortent les premières de la colonne, tandis que les très petites molécules vont diffuser librement à l'intérieur du gel et seront par conséquent retardées et sortent les dernières. Les gels utilisés sont les gels de cellulose, d'agarose, d'agarose-acrylamide, de silice et de polyvinyle qui sont hydrophiles et stérilisables à l'autoclave (Hainque et *al.*, 2008). Gong et *al.* (2010) ont utilisé cette chromatographie pour purifier la plantaricine MG.

### **8- Chromatographie d'échange d'ions**

Cette méthode est fondée sur la séparation des molécules selon leur charge électrique à un pH donné. Les protéines ont des propriétés amphotères leur permettant de s'échanger sur les deux types de résine échangeuse d'ions (échangeuse de cations et échangeuse d'anions). A un pH supérieur au point isoélectrique (PI) de la protéine, cette dernière sera ionisée négativement et se fixe sur la résine échangeuse d'anions par attraction électrostatique, tandis qu'à un pH inférieur à son PI, la protéine prend la charge positive et se fixe sur l'échangeur de cations. Les deux principaux échangeurs d'ions utilisés sont le carboxyméthylcellulose comme échangeur de cations et le diéthylaminoéthylcellulose comme échangeur d'anions (Hainque et *al.*, 2008), cette technique étant utilisée dans de nombreux travaux (Ghrairi et *al.*, 2008 ; Millette et *al.*, 2008 ; Hata et *al.*, 2010 ; Karthikeyan et Santhosh, 2009 ; Simova et *al.*, 2009 ; Doumandji et *al.*, 2010).

### **9- Chromatographie d'interactions hydrophobes**

C'est une méthode de séparation et de purification de protéines qui exploite la possibilité d'interactions entre les groupements hydrophobes exposés à l'extérieur des protéines et des groupements hydrophobes fixés sur une matrice (un gel hydrophile réticulé greffé de groupements de butyle, n-octyle ou phényle), elle se déroule en deux étapes :

1- adsorption des protéines à une molarité élevée en sels neutres (souvent le  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) qui augmentent les forces d'interactions hydrophobes.

2- élution des protéines fixées par diminution de la molarité du sel en utilisant des sels qui diminuent les interactions hydrophobes tel le  $\text{CaCl}_2$  (Hainque et *al.*, 2008). Simova et *al.* (2009) ont utilisé ce procédé pour purifier la bulgaricine BB18 et l'entéroicine NH3.

### **10- Chromatographie en phase inversée (ou reverse)**

C'est une chromatographie de partage basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire hydrophobe et une phase mobile hydrophile constituée d'un mélange d'eau et d'acides organiques miscibles dont le pH est fixé de telle sorte que les protéines à séparer soient ionisées. On utilise des silices greffées de chaînes aliphatiques carbonées plus ou moins longues. L'application de cette méthode est plus analytique que préparative (Hainque et *al.*, 2008). Elle a été appliquée par Ghrairi et *al.* (2008) pour purifier l'entéroicine et par Doumandji et *al.* (2010) dans la purification d'une bactériocine de *Bifidobacterium infantis*.

### **11- Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

Cette technique a considérablement augmenté l'efficacité des processus chromatographiques (Hennen, 2006). Celle-ci consiste à faire passer la solution à analyser à travers une colonne renfermant la phase stationnaire très empaquetée minimisant les espaces libres portant des chaînes non polaires. Une phase mobile de nature polaire est alors appliquée sous pression élevée permettant l'élution des protéines (Hennen, 2006). Ce type de chromatographie a été utilisé dans plusieurs travaux (Ghrairi et *al.*, 2008; Millette et *al.*, 2008 ; Simova et *al.*, 2009 ; Mkrtchyan et *al.*, 2010).

### **12- Composition en acides aminés et détermination de la séquence N-terminale**

La méthode la plus fiable du point de vue quantitatif est l'hydrolyse acide avec  $\text{HCl}$  6 N sous vide à  $110^\circ\text{C}$  pendant 10 à 100 H ce qui permet l'hydrolyse complète des acides aminés aliphatiques comme la valine, la leucine et l'isoleucine. Cependant, cette hydrolyse peut transformer quelques acides aminés (la glutamine en glutamate et l'asparagine en

aspartate) et dénaturer d'autres comme le tryptophane. La détermination du contenu en ce dernier est réalisée par l'hydrolyse alcaline avec NaOH 2 à 4N à 100°C pendant 4 à 8H. Les acides aminés libres des hydrolysats sont séparés et traités par les chromatographies quantitatives (Hennen, 2006).

La détermination de la séquence N-terminale se fait souvent par la réaction d'Edman qui consiste à faire interagir le peptide avec le phénylthiocyanate (PITC) dans un milieu basique, les composés phénylthiocarbamyles résultant de cette réaction sont traités par l'acide trifluoroacétique qui libère le résidu N-terminal en laissant intact le reste de la séquence. La dégradation répétée successivement permet d'établir la séquence N-terminale (Hennen, 2006). Cette méthode a permis la détermination de séquences en acides aminés de nombreuses bactériocines telles la bulgaricine BB18 et l'entéroïcine NH3 (Simova et *al.*, 2009).

## Chapitre I : Matériel et méthodes

### I-1 Matériel utilisé

#### I- 1-1 Milieux de culture

- MRS (De Man, Rogosa et Sharpe) bouillon et gélose (Fluka)
- M17 (Terzaghi et Sandine) bouillon et gélose (Fluka)
- TSY (trypticase soja) bouillon et gélose (Fluka)
- BHI bouillon (brain heart infusion) (Fluka)
- Bouillon nutritif (Sigma)
- 

#### I-1-2 Matériel biologique et produits chimiques

- Nisine N5764 (Sigma)
- Pronase E (Fluka)
- Ethanol 96% (Sigma-Aldrich)
- Eau oxygénée (10v)
- Kit coloration Gram (Sigma)
- HCL 0.02M
- Tampon phosphate de sodium 0.1M
- NaOH 4M
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- NaCl
- Extrait de levure (Fluka)
- Agar-agar (Fluka)
  
- Les souches pathogènes utilisées dans la détection de l'activité antibactérienne sont montrées dans le tableau (2)

#### I-1-3 Appareillage

- Autoclave (Webeco)
- Etuve bactériologique (Memmert)
- Vortex (Heidolph)
- Balance de précision (Sartorius)
- Bain marie (Memmert)

- Microscope optique (Carl Zeiss)
- Loupe binoculaire (Carl Zeiss)
- Plaque chauffante agitante (Fisher)
- Micropipette 100µl (Capp)
- Micropipette 0.5 à 10µl (Isolab)
- Four Pasteur 2712 (Kottermann)
- Centrifugeuse réfrigérée (Sigma 3 K 30 C)

#### I-1-4 Autres

- Filtres Millex-GS-Millipore (0.22µm)
- Papier parafilm WI 54952 (Menasha)
- Membranes à dialyse Cellu Sep T1 (3.5 Kda).

**Tableau 2.** Souches cibles utilisées et leur origine.

Souche	Référence	Origine
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	
<i>Escherichia coli</i>	E12	
<i>Salmonella typhimurium</i>	S8	Laboratoire de microbiologie
<i>Proteus sp.</i>	P2	C.H.U de Sétif
<i>Bacillus subtilis</i>	B10	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	K36	
<i>Staphylococcus aureus</i>	S12	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P58	
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	Laboratoire de microbiologie
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 49452	Université de Tlemcen
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	
<i>Listeria monocytogenes</i>	CLIP 74910	
<i>Listeria monocytogenes</i>	CLIP 74904	Institut Pasteur
<i>Listeria monocytogenes</i>	CLIP 74903	de Paris
<i>Listeria monocytogenes</i>	CLIP 74902	
<i>Listeria ivanovii</i>	CLIP 12229	

ATCC: American type culture collection

CLIP: collection Listeria institute Pasteur

## I-2 Méthodologie

La sélection des souches de bactéries lactiques ayant une activité anti-*Listeria* à partir des laits testés a été réalisée par le procédé d'antagonisme différé en utilisant la méthode des spots dite sur tapis cellulaire.

### I- 2.1 Provenance des laits

Les laits testés dans cette étude provenaient de trois différentes régions en mois de mars, il s'agit du lait de chamelle cru provenant de M'sila et l'Oued et du lait de vache cru et fermenté (lben) provenant de Sétif (Ain-Arnat). Après collecte des échantillons, les flacons de lait ont été conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

### I-2.2 Isolement et purification des bactéries lactiques

Les échantillons de lait dilué ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) dans l'eau physiologique (9‰ NaCl) ont étéensemencés par étalement sur gélose MRS (lactobacilles) et M17 (lactocoques) et ensuite incubés à 32°C pendant 24H à 48H. Des colonies de couleur blanchâtre ou laiteuse ont été récupérées au hasard sur lesquelles ont été appliqués un test préliminaire comprenant la coloration de Gram et le test de catalase. Seules les souches à Gram positif et catalase négative ont été prises en considération puis purifiées par ensemencements successifs en stries avant d'être conservées au glycérol (20 %) dans des microtubes à -15°C. Les isolats ont été codifiés comme suit: LCW (lait de chamelle de l'Oued), LC (lait de chamelle de M'sila), LV (lait de vache cru de Sétif) et Lbn (lait fermenté de vache « lben » de Sétif).

### I-2.3 Identification génotypique des souches isolées

L'identification des souches lactiques a été réalisée au niveau du laboratoire de génomique (Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels, Université Laval, Québec, Canada). L'ADN a été extrait des cultures bactériennes selon la méthode de Vincent et *al.* (1998).

Le protocole se base sur la lyse cellulaire par action de la mutanolysine, du lysozyme, de la protéinase K et de l'ARNase suivie par une purification de l'ADN sur microcolonne. Le gène de l'ADNr 16S est ensuite amplifié par PCR avec des amorces correspondant à des régions conservées (consensus) en 5' et en 3' du gène. La PCR a été programmée sur 33 cycles

alternant : dénaturation, hybridation et élongation. L'amplification génique a été contrôlée par électrophorèse du produit d'amplification dans un gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium.

La séquence des amplicons (taille d'environ 600 nucléotides) a été analysée grâce à un séquenceur automatique d'ADN puis a été comparée avec les séquences d'ADNr 16S répertoriées sur banques de données informatiques (GenBank). L'alignement de la séquence d'ADNr 16S de la souche analysée avec celles des séquences les plus apparentées a permis d'établir le pourcentage d'homologie.

#### **I-2.4 Mise en évidence de l'activité anti-*Listeria***

L'activité anti-*Listeria* a été mise en évidence par la méthode d'antagonisme différé dite «spot on the lawn » (fig. 5). Des précultures de souches lactiques sélectionnées obtenues après 24 à 48H d'incubation à 32°C ont été ensemencées sous forme de spots (2 µl) sur gélose BHI puis incubées dans des jarres d'anaérobiose (pour minimiser l'effet de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 32°C durant 24H pour permettre leur développement. Les boîtes ont été ensuite recouvertes par une gélose BHI molle (0.75% d'agar) inoculée par 1% d'une préculture de 24H de *Listeria ivanovii*. Après 24H d'incubation à 37°C, les boîtes ont été examinées en vue de détecter les zones d'inhibition autour des spots.

#### **I-2.5 Détection de l'activité bactériocinogène**

Afin de concentrer les bactériocines éventuellement produites par les souches lactiques, deux méthodes ont été choisies : la méthode d'adsorption-désorption et la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium. Le bouillon MRS a été supplémenté par 2.5% d'extrait de levure dans le but de maximiser le rendement en bactériocines (Benkerroum et *al.*, 2000).

##### **a - Adsorption-désorption**

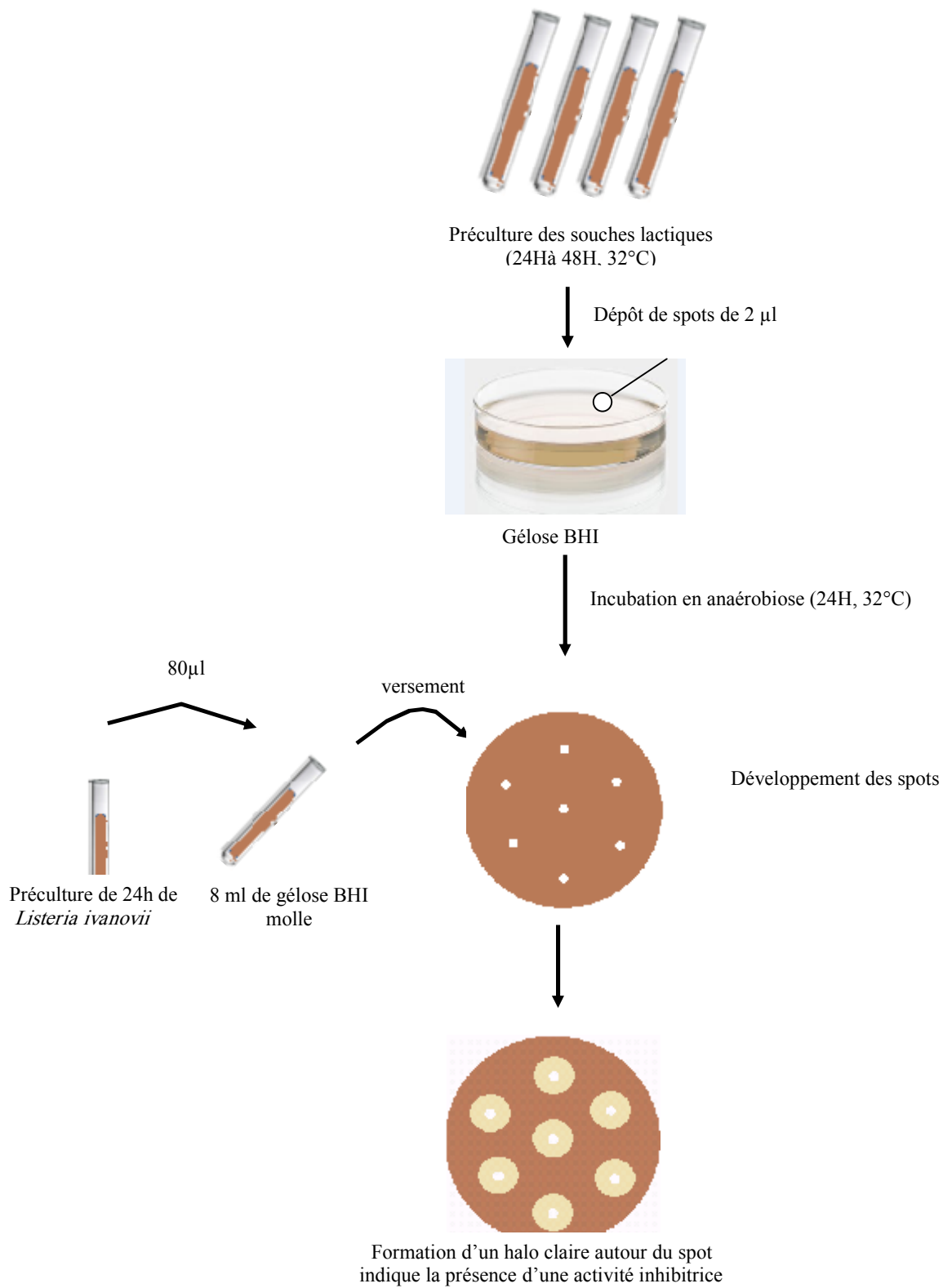
C'est une méthode de concentration des bactériocines selon le protocole de Yang et *al.* (1992). Un volume de 200 ml de bouillon MRS supplémenté d'extrait de levure a été ensemencé par 1% d'une préculture à 32°C de la souche lactique présumée bactériocinogène. Après 24h d'incubation à 32°C, un chauffage à 70°C durant 25 min au bain-marie a été effectué pour détruire les cellules et désactiver les enzymes protéolytiques puis le pH a été ajusté à 6.5 par NaOH 4N pour permettre l'adsorption des bactériocines à la surface des

cellules. Les cultures ont été par la suite soumises à une centrifugation (12 000g, 15 min, 4°C) et le culot récupéré a été lavé deux fois avec le tampon phosphate sodium 5 mM (pH 6.5) puis dissout dans 4 ml de NaCl (100 mM) ajusté à pH 2 avec agitation modérée à 4°C pendant deux heures, ceci pour permettre la désorption des bactériocines. Une dernière centrifugation (19 000g, 50 min, 4°C) a été réalisée et le surnageant contenant les bactériocines a été récupéré, dialysé contre de l'eau distillée (24H, 4°C), stérilisé par filtration sur membrane (0.22 µm) et maintenu au congélateur jusqu'à son utilisation. Les étapes de ce procédé sont montrées dans la figure 6.

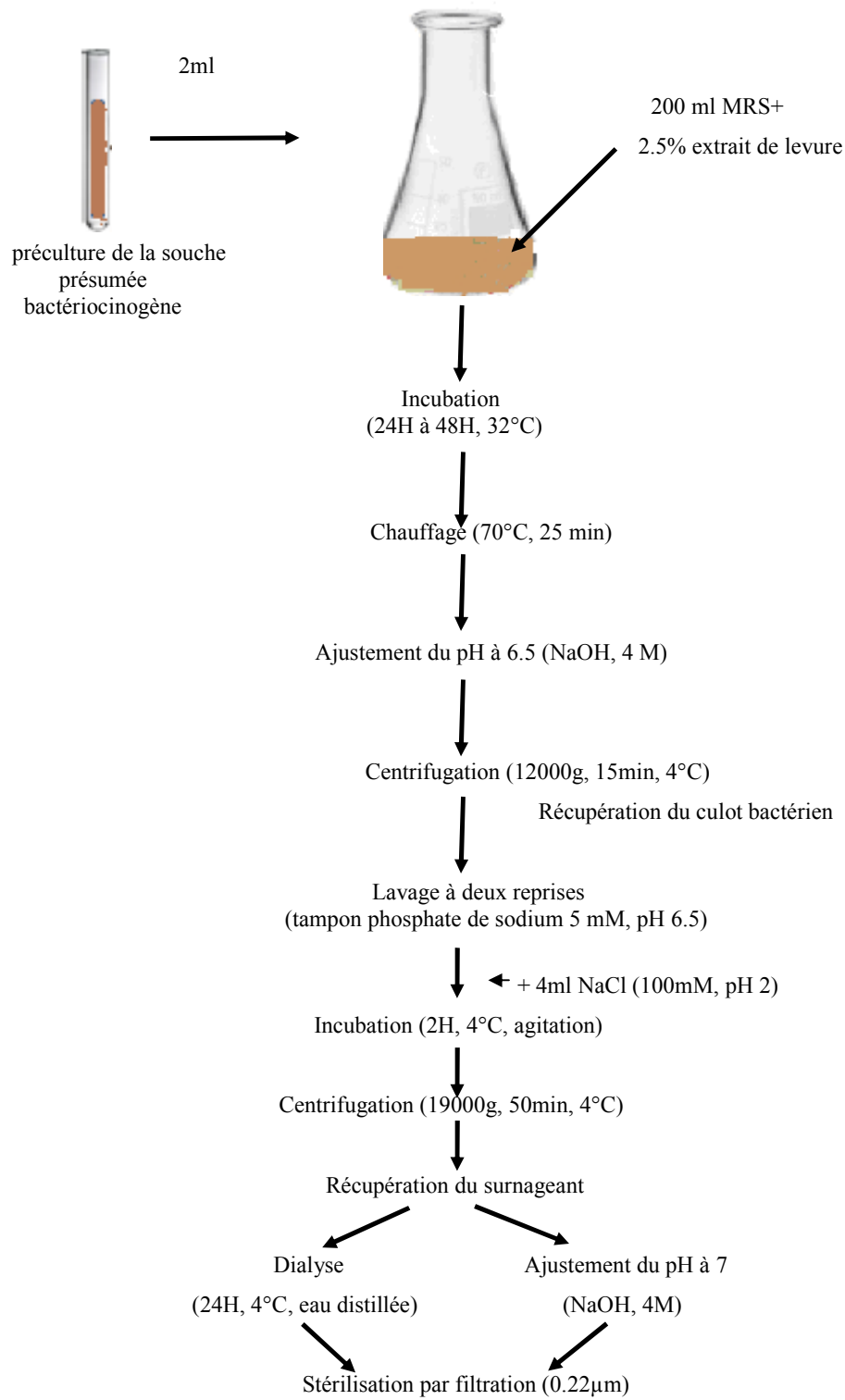
#### **b - Précipitation au sulfate d'ammonium**

Dans cette méthode, une quantité de 200 ml de bouillon MRS fortifié par de l'extrait de levure comme précédemment a été inoculée par 1% d'une préculture de la souche test. Après incubation à 32°C pendant 24H, une centrifugation (12000 g, 15 min, 4°C) a été réalisée et le surnageant obtenu est saturé à 60% par ajout progressif de 36.1% (P/V) de sulfate d'ammonium en poudre avec agitation modérée à 4°C pendant 2H. Après une deuxième centrifugation, le culot résultant est dissout dans 4 ml du tampon phosphate de sodium (0.1M, pH : 6). La solution ainsi obtenue est soumise à une dialyse à 4°C contre de l'eau distillée pendant une nuit avec agitation pour éliminer le sel, stérilisée par filtration sur membrane (0.22 µm) puis conservée au congélateur jusqu'à son utilisation. La figure (7) illustre les étapes de ce protocole.





**Fig. 5.** Mise en évidence de l'activité anti-*Listeria* par la méthode des spots.



**Fig. 6.** Protocole d'adsorption-désorption (Yang et *al.*, 1992).

Après récupération des solutions dialysées, celles-ci ont été stérilisées par filtration sur membrane puis conservées au congélateur jusqu'à leur utilisation. Pour pallier au manque de membranes à dialyse, l'effet des acides organiques a été éliminé par ajustement du pH des solutions à 7.

#### **d - Test de l'activité bactériocinogène**

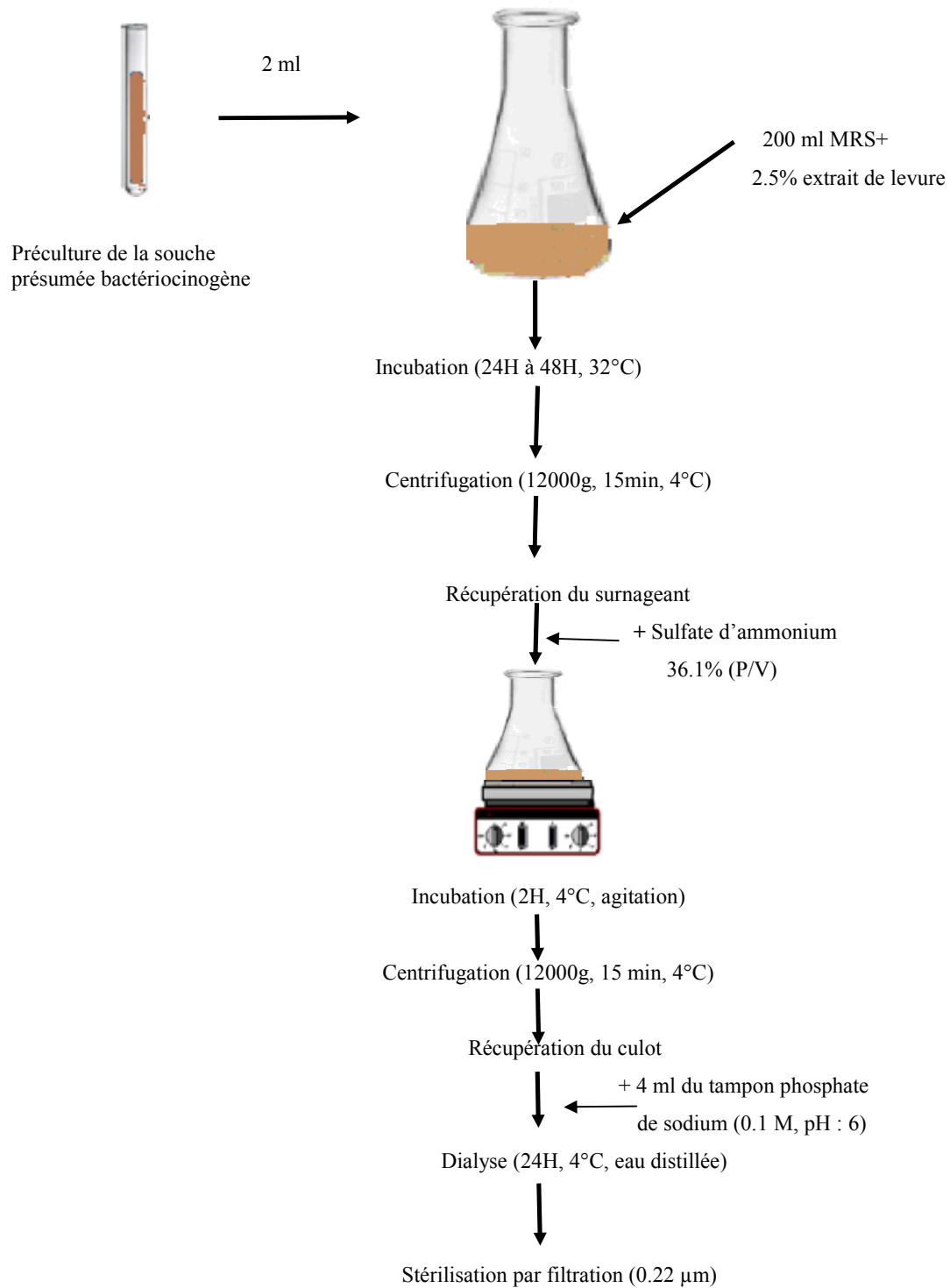
Les extraits obtenus par les deux procédés ont été testés pour leur activité anti-*Listeria* par deux méthodes : la méthode des spots « the spot on the lawn » et la méthode des puits «AWDA». De plus, pour confirmer la nature protéique de ces substances, ces dernières ont été incubées à 37°C durant 2H en présence de pronase E.

##### **\* Méthode des spots**

Cette méthode consiste à réaliser un tapis, par étalement de 0.1 ml d'une préculture de *Listeria* sur gélose TSY, sur lequel des aliquotes de 2 µl d'extraits dialysés avec et sans pronase E ont été déposées sous forme de spots. Un spot de bouillon MRS stérile sert comme un témoin négatif, et un autre de solution de nisine (2mg/ml) sert comme un témoin positif. Après incubation à 37°C pendant 24H, les boîtes ont été examinées pour la présence éventuelle de zones d'inhibition.

##### **\* Méthode des puits**

Pour effectuer ce procédé, des puits de 6 mm de diamètre ont été réalisés en plaçant les bouts des embouts de 1ml stériles sur des boîtes préalablement coulées par une gélose TSY. Une gélose TSY molle inoculée par 1% d'une préculture de *Listeria* est alors coulée sur le dessus. Après solidification, les embouts sont enlevés laissant ainsi des puits qui seront ensuite remplis par 100 µl d'extraits à tester sans et avec pronase E, en laissant un puit pour le témoin négatif (bouillon MRS stérile) et un autre pour le témoin positif (solution de nisine). Après une pré-diffusion d'une à deux heures au réfrigérateur, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24H avant de vérifier la présence d'éventuelles zones d'inhibition autour des puits.



**Fig. 7.** Protocole de précipitation au sulfate d'ammonium.

### **I-2.6 Spectre d'activité des souches lactiques sélectionnées**

Le spectre d'action des souches qui ont exercé une activité anti-*Listeria* plus ou moins marquée a été élargi par antagonisme différé sur d'autres espèces incluant des pathogènes. Le protocole a été établi comme suit : les précultures des souches antagonistes ont été ensemencées sous forme de spots sur gélose MRS et incubées à 32°C pendant 24H.

Un volume de 8 ml de gélose TSY molle (pour les souches de *Listeria*) et de gélose nutritive molle (pour le reste des souches) a été inoculé par 1% d'une préculture de chaque souche indicatrice puis versée au dessus. Les boîtes ont été ensuite incubées à 37°C (température favorable pour le développement des souches pathogènes) pendant 24H, puis examinées pour visualiser d'éventuelles zones d'inhibition.

Les bactéries lactiques testées ont été cultivées deux fois dans le bouillon MRS à 32°C avant leur utilisation. Les souches de *Listeria* ont été revivifiées dans le bouillon TSY (supplémenté de 0.6% d'extrait de levure) à 37°C alors que les autres souches cibles dans le bouillon nutritif avec la même température d'incubation.

### **I-3 Analyse statistique**

Les essais obtenus pour le mode d'action ont été reproduits en duplicata. L'analyse statistique des données (analyse de la variance  $p=0.05\%$  et test de Student Newman et Keuls) a été réalisée par le logiciel du système de l'analyse statistique (SAS, Institut NC, USA).

## Chapitre II : Résultats et discussion

### II-1 Isolement et purification des bactéries lactiques

L'analyse des laits testés a permis l'isolement de 76 souches dont environ 73% ont été isolées à partir du milieu M17 et 27% à partir du milieu MRS, ces deux milieux étant particulièrement recommandés pour la culture des bactéries lactiques. Les colonies isolées et purifiées sont apparues de taille variable avec une couleur blanchâtre ou laiteuse (fig. 8). Les tests préliminaires ont démontré que ces souches sont des cocci ou des bacilli à Gram positif et catalase négative, ces critères étant caractéristiques des bactéries lactiques.

### II-2 Identification génotypique des souches isolées

Les résultats de l'identification génotypique (Tableau 3 et figure 10) ont démontré l'appartenance des souches isolées à divers genres : 13 souches de *Lactococcus* représentées par l'espèce *Lc. lactis*, 13 souches de *Leuconostoc* représentées par l'espèce *Leuconostoc mesenteroides*, 26 souches d'*Enterococcus* représentées par quatre espèces : *Enterococcus faecium*, *Ent. faecalis*, *Ent. durans* et *Ent. italicus*, 22 souches de *Lactobacillus* représentées par trois espèces : *Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. brevis* et une seule souche de *Brevibacterium lutescens*.

La distribution de ces genres dans les trois échantillons de lait testés est répertoriée au niveau de la figure 9. Toutes les souches isolées du lait fermenté (Lben) de Sétif appartiennent au genre *Lactobacillus* avec comme espèces *Lb. casei* et *Lb. brevis*. Cette dominance étant due au fait que ce genre manifeste une grande tolérance à l'acidité du lait fermenté. Ce genre acidophile est très répandu dans les produits fermentescibles où il contribue à la saveur par la production de diacétyl et de H<sub>2</sub>S et sa croissance étant favorable à pH faible (DeVos et al., 2009 ; König et Fröhlich, 2009).

Utilisé dans la fabrication du yaourt et différents produits fermentés à base de lait, certains membres de ce genre ont été même utilisés dans le traitement des infections du vagin (Uehara et al., 2006). Le genre *Lactobacillus* a été signalé comme le genre majoritaire de la flore

lactique des laits de vache, de brebis et de chèvre d'Algérie (Badis et *al.*, 2005 ; Zadi-Karam et Karam, 2006).

Le genre *Enterococcus* s'est révélé comme le genre prédominant dans le lait de chamelle collecté à partir de l'Oued avec un pourcentage de près de 54% suivi des genres *Leuconostoc* 24% et *Lactococcus* 17%.

Le lait de chamelle se caractérise par une teneur élevée en sels, ce qui défavorise la croissance de plusieurs genres lactiques. Cependant, le genre *Enterococcus* peut y s'adapter et dominer les autres genres grâce à sa tolérance à la salinité jusqu'à une teneur de 6.5% (DeVos et *al.*, 2009). Dans une étude similaire, Zadi-Karam et Karam (2006) ont démontré la dominance du lait de chamelle par le genre *Enterococcus* suivi des genres *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Leuconostoc*. Généralement la présence des entérococci dans les produits alimentaires est considérée comme un signe de contamination fécale. Cependant, récemment ces souches ont été acceptées en tant que partie de la flore normale et ont été communément utilisées comme probiotiques (Hadji-Sfaxi et *al.*, 2011).

Le lait de chamelle de M'sila est dominé par le genre *Lactobacillus* avec un pourcentage de près de 44% suivi des genres *Lactococcus* avec 33%, *Leuconostoc* avec environ 17% et *Enterococcus* de l'ordre de 6%. Des résultats similaires concernant la dominance du genre *Lactobacillus* dans le lait camelin ont été obtenus par Ashmaig et *al.* (2009) et Khedid et *al.* (2009).

La présence de divers genres de bactéries lactiques dans le lait de chamelle était prévisible du fait que ces bactéries ont été trouvées dans la microflore de tous les laits étudiés peu importe leur origine (vache, brebis, chèvre). La différence réside dans les genres rencontrés et leur répartition. Celle-ci pourrait dépendre de la source du lait, de la localisation géographique, du type de fourrage ingéré par l'animal, de l'état sanitaire de l'animal, de la saison, des conditions de traite, de la durée de conservation...etc. (Zadi-Karam et Karam, 2006).

Le lait de chamelle se singularise par une salinité relativement élevée par rapport aux autres laits ce qui le rend un milieu plus ou moins spécial, cette salinité étant probablement une adaptation physiologique de l'animal au milieu désertique. Les bactéries qui croissent dans le lait camelin sont adaptées à sa salinité et peuvent par conséquent être exploitées dans sa transformation technologique et dans la fermentation des produits salés tels les fromages salés, les olives et les concombres (Zadi-Karam et Karam, 2006).

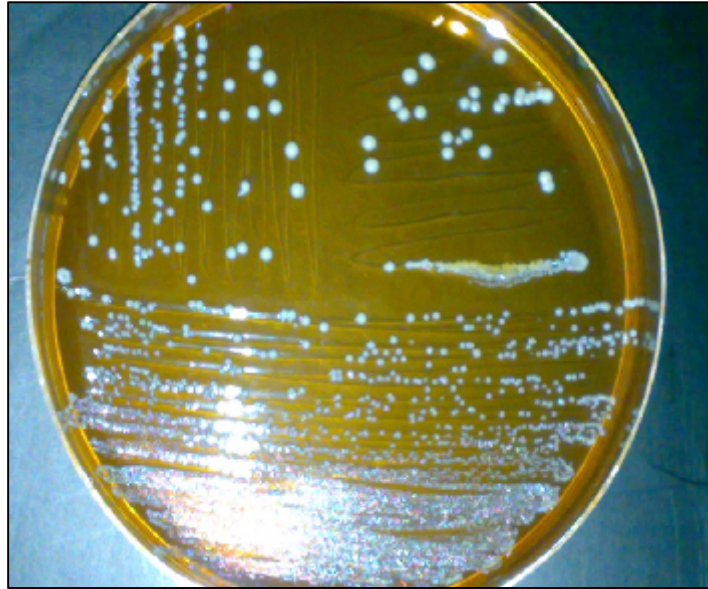


Fig. 8. Aspect des colonies de bactéries lactiques sur gélose MRS.

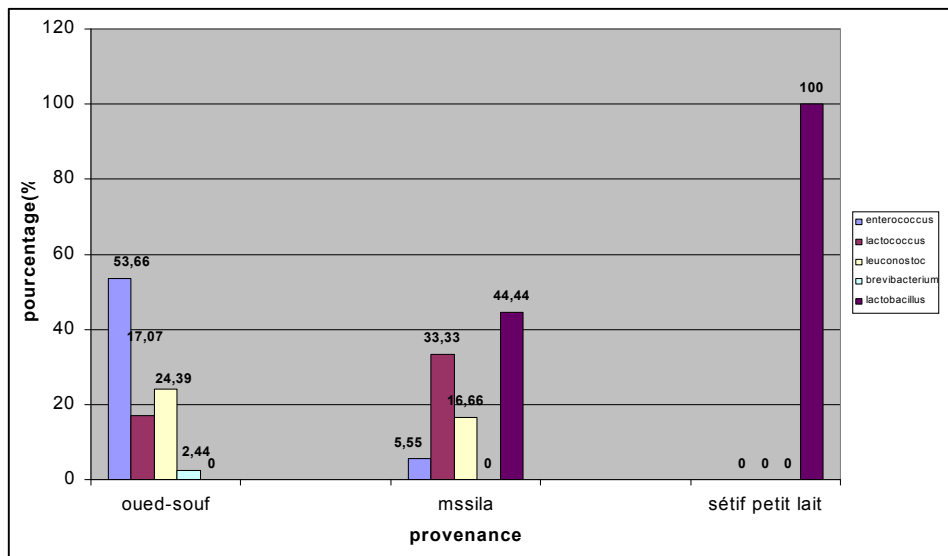


Fig.9. Répartition des genres de bactéries lactiques en fonction des laits.



### II-3 Mise en évidence de l'activité anti-*Listeria*

Les 76 souches isolées à partir des différents laits ont été testées pour leur activité anti-*Listeria* par la méthode des spots (fig. 11) sur gélose BHI. Les résultats rapportés dans le tableau (4) ont démontré que près de 26 souches ont exercé une activité anti-*Listeria* et que parmi ces dernières, seules douze avaient une activité marquée. Plusieurs travaux ont démontré la capacité des bactéries lactiques à inhiber des souches de *Listeria monocytogenes* (Benkerroum et al., 2000 ; Pinto et al., 2009 ; Hartmann et al., 2011 ; Xie et al., 2011) et de *Listeria innocua* (Simova et al., 2009 ; Pringsulaka et al., 2011).

Souche ubiquitaire à Gram positif retrouvée dans le sol, l'eau, les végétaux et le tractus intestinal de l'homme et des animaux, *Listeria* contamine de manière inévitable les aliments crus. Ce pathogène opportuniste est recherché dans le cadre des analyses obligatoires du fait de son implication dans les intoxications alimentaires graves avec un taux de mortalité de 30% parmi les sujets infectés (Héquet et al., 2007 ; Doumandji et al., 2010).

L'activité inhibitrice des bactéries lactiques peut être attribuée à plusieurs substances telles les acides organiques (l'acide lactique, acétique,...etc.), le CO<sub>2</sub>, la reutéline, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009). Le milieu BHI a été employé dans ce travail expérimental car il est caractérisé par sa teneur faible en glucose (0.2%). Ce milieu est préconisé pour minimiser l'effet inhibiteur dû à la production d'acides organiques (Ammor et al. 2006), L'inhibition due au peroxyde d'hydrogène est également minimisée par l'incubation des boîtes de Pétri dans les jarres d'anaérobiose (Yateem et al., 2008).

**Tableau 3.** Identification génotypique des souches isolées.

Code de la souche	Zone	Milieu de culture	Identification
LC1	M'sila	Elliker	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
LC2	M'sila	Elliker	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
LC3	M'sila	Elliker	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
LC4	M'sila	Elliker	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
LC13	M'sila	Elliker	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
LC11	M'sila	Elliker	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
LCW6	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus durans</i>
LCW7	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus durans</i>
LCW8	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus durans</i>
LCW9	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus durans</i>
LCW10	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus durans</i>
LCW11	l'Oued	Elliker	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
LCW12	l'Oued	Elliker	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
LCW13	l'Oued	Elliker	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
LCW14	l'Oued	Elliker	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
LCW15	l'Oued	Elliker	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
LCW17	l'Oued	Elliker	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
LCW18	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus italicus</i>
LCW19	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus italicus</i>
LCW21	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus italicus</i>
LCW22	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus faecium</i>
LCW23	l'Oued	Elliker	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
LCW24	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus italicus</i>
LCW25	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus durans</i>
LCW26	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus italicus</i>
LCW28	l'Oued	Elliker	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
LCW30	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus durans</i>
LCW31	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus durans</i>
LCW32	l'Oued	Elliker	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
LCW33	l'Oued	Elliker	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>

LC : lait de chamelle de M'sila ; LCW : lait de chamelle de l'Oued ; LBN : lait fermenté de vache ; LV : lait de vache ; pourcentage d'homologie 99.99%.

**Tableau3. (Suite)**

LCW35	l'Oued	Elliker	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
LCW36	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus italicus</i>
LCW37	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus italicus</i>
LCW38	l'Oued	Elliker	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
LCW39	l'Oued	Elliker	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
LCW41	l'Oued	Elliker	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
LCW42	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus italicus</i>
LCW44	l'Oued	Elliker	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
LBN1	Sétif	Elliker	<i>Lactobacillus casei</i>
LBN2	Sétif	Elliker	<i>Lactobacillus casei</i>
LBN3	Sétif	Elliker	<i>Lactobacillus casei</i>
LBN5	Sétif	Elliker	<i>Lactobacillus casei</i>
LBN7	Sétif	Elliker	<i>Lactobacillus casei</i>
LBN8	Sétif	Elliker	<i>Lactobacillus brevis</i>
LBN9	Sétif	Elliker	<i>Lactobacillus casei</i>
LBN10	Sétif	Elliker	<i>Lactobacillus brevis</i>
LBN11	Sétif	Elliker	<i>Lactobacillus brevis</i>
LBN13	Sétif	Elliker	<i>Lactobacillus casei</i>
LBN14	Sétif	Elliker	<i>Lactobacillus casei</i>
LBN15	Sétif	Elliker	<i>Lactobacillus casei</i>
LBN18	Sétif	Elliker	<i>Lactobacillus casei</i>
LBN19	Sétif	Elliker	<i>Lactobacillus brevis</i>
LC5	M'sila	Elliker	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LC6	M'sila	Elliker	<i>Lactobacillus brevis</i>
LC7	M'sila	Elliker	<i>Lactobacillus casei</i>
LC8	M'sila	Elliker	<i>Lactobacillus brevis</i>
LC9	M'sila	Elliker	<i>Lactobacillus brevis</i>
LC10	M'sila	Elliker	<i>Lactobacillus brevis</i>
LC16	M'sila	Elliker	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
LC20	M'sila	Elliker	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
LC21	M'sila	Elliker	<i>Enterococcus faecium</i>
LC22	M'sila	Elliker	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>

LC : lait de chamelle de M'sila ; LCW : lait de chamelle de l'Oued ; LBN : lait fermenté de vache ; LV : lait de vache ; pourcentage d'homologie 99.99%.

**Tableau 3. (suite).**

LC24	M'sila	Elliker	<i>Lactobacillus brevis</i>
LC27	M'sila	Elliker	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LCW1	l'Oued	Elliker	à déterminer
LCW2	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus durans</i>
LCW3	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus faecalis</i>
LCW4	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus durans</i>
LCW5	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus durans</i>
LCW29	l'Oued	Elliker	<i>Brevibacterium lutescens</i>
LCW34	l'Oued	Elliker	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
LV1	Sétif	Elliker	<i>Enterococcus faecalis</i>
LV2	Sétif	Elliker	<i>Enterococcus faecalis</i>
LV3	Sétif	Elliker	<i>Enterococcus faecalis</i>
LCW43	l'Oued	Elliker	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
LCW20	l'Oued	Elliker	<i>Enterococcus italicus</i>

LC : lait de chamelle de M'sila ; LCW : lait de chamelle de l'Oued ; LBN : lait fermenté de vache ; LV : lait de vache ; pourcentage d'homologie 99.99%.

LCW7 : *Enterococcus durans* :

AAGTCGTACGCTTCTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTA  
ACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACAACCTGGAAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATC  
GAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAG  
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCYACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACA  
TTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAA  
GTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAA  
CAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG  
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGT  
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTG  
CAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGC  
GAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTC.

LCW44 : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* :

ATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAAGGTGCTTGCACTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAC  
GTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGAAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTG  
TCGCATGACACAAAGTTAAAAGGCGCTTTCGGCGTCACTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTT  
GGTGGGGTAAAGGCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGA  
CTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGAT  
GGAGCAACGCCGCTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTA  
GAATAGGAAATGATTTTAGTTGACGGTACCATAACCAGAAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCG  
CGGTAATACGTATGTCCCAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAA  
GTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATGGAAAACCTGGTAACTTGAGTGCAGTAGA  
GGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCG  
GCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTC.

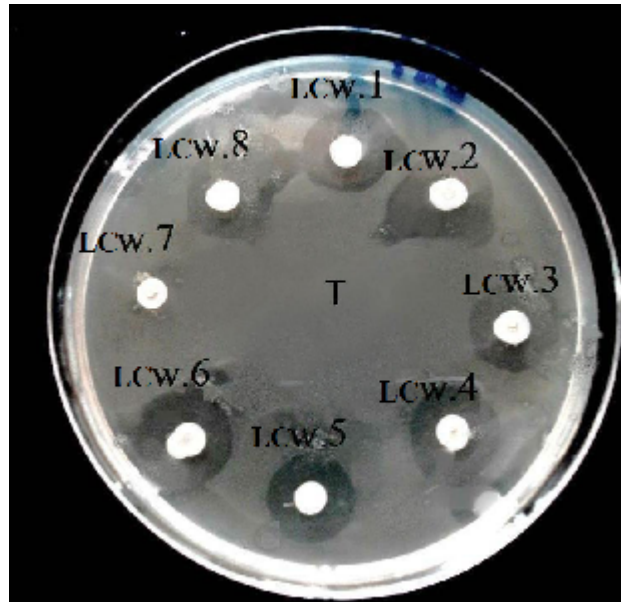
**Fig. 10.** Séquences nucléotidiques des deux souches lactiques sélectionnées.

## II-4 Détection de l'activité bactériocinogène

Les essais de l'activité bactériocinogène des extraits dialysés obtenus par le protocole de précipitation au sulfate d'ammonium et celui d'adsorption-désorption ont été réalisés par la méthode des puits et la méthode des spots sur tapis de *Listeria*. Les résultats n'ont démontré aucune zone d'inhibition autour des puits (fig.12) et des spots (fig.13) traduisant ainsi l'absence d'activité bactériocinogène dans ces extraits. Des mêmes analogues ont été signalés par Ammor et *al.* (2006) où l'activité a été détectée seulement sur milieu BHI solide, tandis que la recherche de celle-ci dans le surnageant sous les conditions qui éliminent l'effet des acides organiques et de peroxyde d'hydrogène étant sans succès. Ceci a été expliqué par l'attachement des bactériocines à la paroi de la cellule productrice, l'inhibition n'aura donc lieu que lorsque cette dernière soit en contact avec la souche indicatrice.

Une autre hypothèse suggère qu'il se peut que les bactériocines soient adsorbées à la membrane filtrante lors du processus de la filtration ou ont pu traverser les pores de la membrane à dialyse grâce à leur petite taille. De même, Yateem et *al.* (2008) ont démontré que les bactéries lactiques isolées du lait de chamelle ont contrôlé les souches pathogènes par des substances inhibitrices autres que les bactériocines.

L'incapacité des bactéries lactiques de produire les bactériocines dans le milieu de culture liquide a été déjà signalée par Barefoot et Klaenhammer (1983) qui ont suggéré que celle-ci peut être probablement attribuée à l'inactivation des bactériocines par les enzymes protéolytiques sous les conditions de croissance. Les facteurs supplémentaires ajoutés dans le milieu de cultures tel le glucose, le magnésium ainsi que les conditions de culture peuvent également affecter la production des bactériocines. En effet, la production de bactériocines peut être augmentée si la cellule productrice est stressée du point de vue nutritionnel ou écologique (Riley et Chavan, 2007).



**Fig. 11.** Mise en évidence de l'activité anti-*Listeria* des souches LCW.1 à LCW.8 par le test des spots. T : témoin négatif.

La fréquence de la production des bactériocines diffère selon les souches; Luo et *al.* (2011) ont démontré que seulement cinq souches sur un total de 256 souches de bactéries lactiques testées ont produit des bactériocines. De même, Salminen et *al.* (2004) ont signalé que quatre sur cinquante deux souches de bactéries lactiques étaient productrices de bactériocines, et que la majorité des souches de *Pediococcus acidipropionici*, *Pediococcus jensenii*, et *Pediococcus thoenii* ont présenté une activité bactériocinogène, tandis que seulement six sur cinquante deux souches de *Pediococcus freudenreichii* avaient cette activité. Castro et *al.* (2011) n'ont isolé qu'une seule souche bactériocinogène sur un ensemble de 141 souches testées.

D'autre part, il a été suggéré que tous les membres des eubactéries et également des archéobactéries, si fraîchement isolés de leurs écosystèmes naturels, sont équipés de la capacité d'expression des bactériocines. Le fait de ne pas mettre en évidence la production de ces dernières est dû à ce que les chercheurs n'ont pas encore déterminé les conditions appropriées pour l'expression de cette capacité bactériocinogène *in vitro* (Riley et Chavan, 2007 ; Gillor et *al.*, 2008).

**Tableau 4.** Détection de l'activité anti-*Listeria* des souches isolées sur gélose BHI.

Bactérie lactique	Effet anti- <i>Listeria</i>	Bactérie lactique	Effet anti- <i>Listeria</i>
LCW1	+	LCW42	-
LCW2	+	LCW43	-
LCW3	+	LCW44	+
LCW4	+	LC1	+/-
LCW5	+	LC2	-
LCW6	+	LC3	-
LCW7	-	LC4	-
LCW8	+	LC5	-
LCW9	+	LC6	-
LCW10	+	LC7	-
LCW11	-	LC8	-
LCW12	+	LC9	-
LCW13	-	LC10	-
LCW14	-	LC11	-
LCW15	-	LC13	-
LCW17	-	LC16	-
LCW18	-	LC20	-
LCW19	-	LC21	-
LCW20	-	LC22	-
LCW21	-	LC24	-
LCW22	-	LC27	-
LCW23	-	LV1	+/-
LCW24	-	LV2	+/-
LCW25	+	LV3	+/-
LCW26	-	LBN1	+/-
LCW28	-	LBN2	+/-
LCW29	-	LBN3	+/-
LCW30	-	LBN5	+/-
LCW31	-	LBN7	+/-
LCW32	-	LBN8	-
LCW33	+/-	LBN9	+/-
LCW34	-	LBN10	-
LCW35	-	LBN11	-
LCW36	-	LBN13	+/-
LCW37	-	LBN14	+/-
LCW38	-	LBN15	-
LCW39	-	LBN18	+/-
LCW41	-	LBN19	-

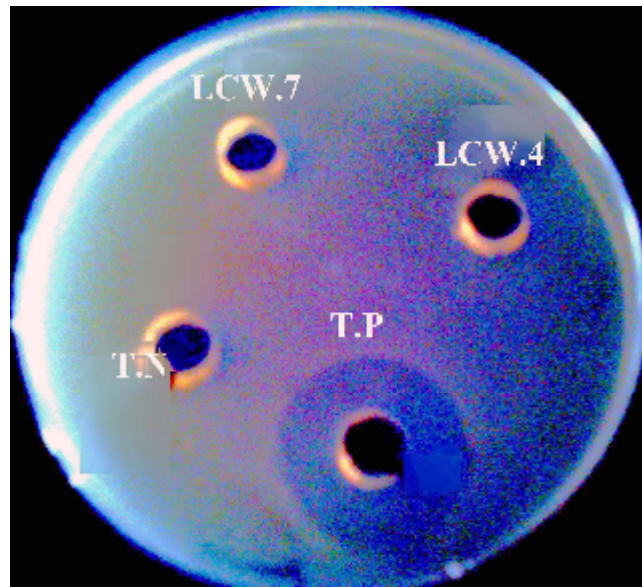
LCW : lait de chamelle de l'Oued, LBN : lait de vache fermenté, LC : lait de chamelle de M'sila,

LV : lait de vache cru

+ : activité importante (>6 mm) ; - : absence d'activité ; +/- : légère activité (<6mm)

Il est à noter que la production de bactériocines, comme tout acte biologique, nécessite une dépense d'énergie pour la cellule productrice, ces bactériocines doivent donc être fonctionnellement indispensables pour l'existence et la survie de ces cellules pour qu'elles les produisent. En effet, la production de bactériocines est un système de défense dont les bactéries lactiques utilisent contre les autres bactéries avec lesquelles elles entrent en compétition pour l'habitat et les nutriments dans la nature. Sous les conditions du laboratoire où la bactérie se trouve en monoculture, en absence de concurrence et en excès de nutriments, la production de bactériocines s'avère alors sans sens et inutile pour la bactérie lactique (Riley et Chavan, 2007). Cette hypothèse pourrait expliquer donc le fait que les souches lactiques isolées dans ce travail ne synthétiseraient pas de bactériocines dans les conditions testées.

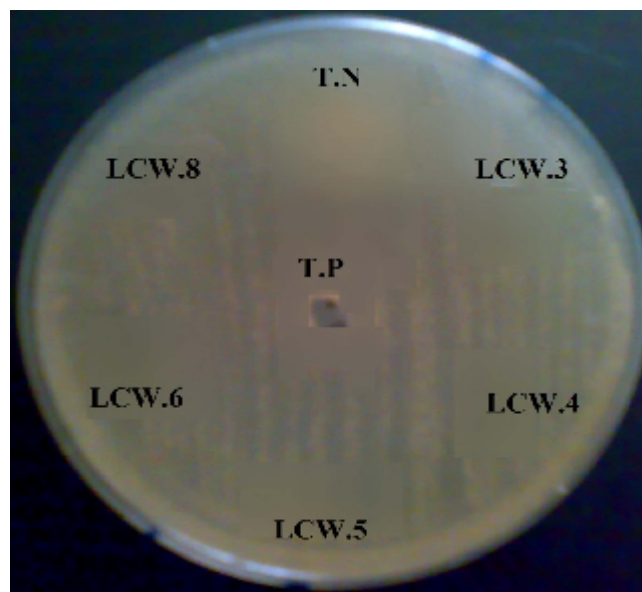




**Fig.12.** Essai par la méthode des puits de l'activité bactériocinogène des extraits des souches LCW.7 et LCW.4 obtenus par la méthode d'adsorption-désorption.

T.P : témoin positif (nisine)

T.N : témoin négatif (bouillon MRS stérile).



**Fig.13.** Essai par la méthode des spots de l'activité bactériocinogène des extraits des souches LCW.3, LCW.4, LCW.5, LCW.6 et LCW.8 obtenus par la méthode d'adsorption- désorption.

T.P : témoin positif (nisine)

T.N : témoin négatif (bouillon MRS stérile).

## II-5 Spectre d'action des souches à activité anti-*Listeria*

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que se soit dans la bioconservation des aliments ou dans la biothérapie grâce à leur pouvoir d'inhiber les bactéries pathogènes et altérantes (Uehara et *al.*, 2006 ; Dortu et Thonart, 2009 ; El-Ghaish et *al.*, 2011). Cette inhibition est conférée soit par la diminution du pH suite à la production d'acides organiques, ou par la production de différents autres métabolites tels le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, le dioxyde de carbone, la reutérine et les bactériocines (Albano et *al.*, 2007 ; Anas et *al.*, 2008).

Les douzes souches appartenant aux genres *Enterococcus* et *Leuconostoc* ont été retenues pour leur activité marquée anti-*Listeria*, il s'agit des souches codées LCW1 à LCW10, LCW25 et LCW44 isolées du lait de chamelle de l'Oued (la souche LCW7 a été retenue pour sa capacité fortement inhibitrice sur milieu MRS). Afin d'évaluer leur potentiel antimicrobien, le spectre d'activité de ces souches a été élargi à une gamme de souches de bactéries pathogènes et/ou altérantes à Gram positif et à Gram négatif. La méthode des spots sur agar a été choisie pour cet objectif car c'est une méthode simple qui permet de tester l'effet de plusieurs bactéries lactiques à la fois vis-à-vis d'une souche indicatrice (Polak-Berecka et *al.*, 2009).

Les résultats obtenus au niveau de la figure (14) ont démontré la présence de zones d'inhibition autour des spots traduisant ainsi une activité inhibitrice des souches lactiques testées contre la totalité des souches cibles utilisées. Le tableau (5) représente les moyennes des diamètres d'inhibition exprimées en millimètres obtenues pour chaque souche. Le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques, d'origine laitière ou autre, contre des bactéries pathogènes et altérantes a été mentionnée par plusieurs auteurs (De Martinis et *al.*, 2001 ; Anas et *al.*, 2008 ; Yateem et *al.*, 2008 ; Moraes et *al.*, 2010 ; Abrams et *al.*, 2011 ; Castro et *al.*, 2011).

Selon l'étude statistique, il s'est avéré que l'effet inhibiteur contre les souches pathogènes diffère très significativement ( $p < 0.0001$ ) d'une souche lactique à l'autre à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui a réagit de la même manière vis-à-vis de toutes les bactéries lactiques testées (figure 15).

**Tableau 5:** Spectre d'action des souches lactiques sélectionnées sur gélose MRS (zones d'inhibition exprimées en mm).

<b>Bactérie lactique</b> <b>Souche cible</b>	<b>LCW1</b>	<b>LCW2</b>	<b>LCW3</b>	<b>LCW4</b>	<b>LCW 5</b>	<b>LCW6</b>
<i>Escherichia coli</i>	10.25±1.84 <sup>b</sup>	8.5±0.41 <sup>b,c</sup>	8 ± 0.00 <sup>b,c</sup>	7.25± 0.20 <sup>c</sup>	8.5± 1.22 <sup>b,c</sup>	8.5±0.41 <sup>b,c</sup>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	17± 1.63 <sup>a</sup>	18.5± 2.04 <sup>a</sup>	14.75±0. <sup>ab</sup>	15.5±0.41 <sup>a,b</sup>	17.5± 2.04 <sup>a</sup>	14.5±1.22 <sup>a,b</sup>
<i>Salmonella typhimurium</i>	11.75±0.20 <sup>e</sup>	14.25±1.0 <sup>cd</sup>	15.5±0.41 <sup>c</sup>	17.5± 0.41 <sup>b</sup>	15.25±0.61 <sup>c</sup>	14±0.00 <sup>c, d,e</sup>
<i>Proteus sp.</i>	21± 0.82 <sup>c</sup>	20.5±0.41 <sup>c,d</sup>	26±0.00 <sup>a</sup>	22 ± 0.00 <sup>b</sup>	26± 0.00 <sup>a</sup>	16± 0.00 <sup>f</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	11± 0.82 <sup>b</sup>	11± 0.82 <sup>b</sup>	9.5±1.22 <sup>bc</sup>	10.5 ±0.41 <sup>b</sup>	11± 0.41 <sup>b</sup>	10.25± 0.61 <sup>b</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16.25±1.43 <sup>b,c</sup>	17.75±1.3 <sup>b,c</sup>	19.5±0.42 <sup>b</sup>	19.75±0.20 <sup>b</sup>	17± 2.45 <sup>b,c</sup>	13.5± 1.63 <sup>c</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.5± 0.41 <sup>d,e</sup>	8± 0.00 <sup>e</sup>	7.5± 0.41 <sup>e</sup>	9± 0.00 <sup>d,e</sup>	7± 0.00 <sup>e</sup>	8± 0.00 <sup>e</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	16± 0.82 <sup>b,c,d</sup>	14± 0.41 <sup>d,e</sup>	12.5±0.82 <sup>e</sup>	15.5±1.22 <sup>c,d</sup>	18.5±1.22 <sup>b,c</sup>	17± 0.41 <sup>b,c,d</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	8.5±0.41 <sup>b,c,d</sup>	7 ± 0.82 <sup>d</sup>	11.5±1.22 <sup>a</sup>	9.25±1.02 <sup>b,c</sup>	7.5± 0.41 <sup>c,d</sup>	7.5± 0.41 <sup>c,d</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	17±0.82 <sup>c,d</sup>	17.25±1.02 <sup>bc,d</sup>	16.75±0.2 <sup>c,d</sup>	14.25±0.61 <sup>e</sup>	18.5±0.41 <sup>b,c</sup>	19± 0.00 <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8.75±0.20 <sup>b,c</sup>	9.75± 0.20 <sup>b</sup>	9.75±0.20 <sup>b</sup>	8.5±0.41 <sup>b,c,d</sup>	9.25±0.61 <sup>b,c</sup>	8± 0.00 <sup>b,c,d</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7± 0.82 <sup>a</sup>	7.5± 1.22 <sup>a</sup>	7.5±1.22 <sup>a</sup>	7± 0.82 <sup>a</sup>	7.5± 1.22 <sup>a</sup>	7± 0.82 <sup>a</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIP74910	10.25±0.20 <sup>a,b,c</sup>	10.75±0.20 <sup>a,b</sup>	10.25±0.20 <sup>a,b,c</sup>	10.5±1.22 <sup>a,b</sup>	9.25±1.43 <sup>b,c,d</sup>	8.25±0.20 <sup>c,d</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIP74904	17± 0.82 <sup>a,b,c</sup>	17± 1.63 <sup>a,b,c</sup>	14.25±0.6 <sup>b,c</sup>	16± 0.82 <sup>a,b,c</sup>	13.25±1.02 <sup>c</sup>	15.5±1.22 <sup>a,b,c</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIP74903	16.25± 1.02 <sup>b</sup>	20± 0.82 <sup>a</sup>	20± 1.63 <sup>a</sup>	16± 1.63 <sup>b</sup>	17.5±1.63 <sup>a,b</sup>	16.5± 1.22 <sup>b</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIP74902	16± 0.41 <sup>c,d</sup>	18.5± 0.00 <sup>b</sup>	17.25±0.6 <sup>b,c</sup>	15.5±0.41 <sup>c,d</sup>	15.5±0.00 <sup>c,d</sup>	16.25 ± 0.61 <sup>c,d</sup>
<i>Listeria ivanovii</i> CLIP12229	10.5± 0.41 <sup>c</sup>	10± 0.82 <sup>c</sup>	12± 0.82 <sup>c</sup>	11± 0.82 <sup>c</sup>	11± 0.00 <sup>c</sup>	12± 0.82 <sup>c</sup>

Tableau 5. (suite)

Bactérie lactique Souche cible	LCW7	LCW 8	LCW9	LCW10	LCW25	LCW44
<i>Escherichia coli</i>	14.75±0.20 <sup>a</sup>	9.5± 0.00 <sup>b,c</sup>	8.5±0.41 <sup>b,c</sup>	8± 0.82 <sup>b,c</sup>	8.5± 0.41 <sup>b,c</sup>	8.5± 0.41 <sup>b,c</sup>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	19.5± 0.41 <sup>a</sup>	17.5± 2.04 <sup>a</sup>	16.75±2.65 <sup>a</sup>	17.5± 2.04 <sup>a</sup>	11.25±0.61 <sup>b</sup>	11.75± 1.02 <sup>b</sup>
<i>Salmonella typhimurium</i>	21.5± 1.22 <sup>a</sup>	12.5± 0.41 <sup>d,e</sup>	12±0.82 <sup>d,e</sup>	12± 0.82 <sup>d,e</sup>	14± 0.82 <sup>c,d,e</sup>	12± 0.82 <sup>d,e</sup>
<i>Proteus sp.</i>	12.5± 0.41 <sup>h</sup>	19± 0.82 <sup>e</sup>	16.25±0.20 <sup>f</sup>	14± 0.00 <sup>g</sup>	15.5± 0.41 <sup>f</sup>	20± 0.00 <sup>d</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	14± 1.63 <sup>a</sup>	9± 0.82 <sup>b,c</sup>	7.5±0.41 <sup>c</sup>	8.5± 0.41 <sup>b,c</sup>	9.75±0.20 <sup>b,c</sup>	9.5± 0.41 <sup>b,c</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24.5± 0.41 <sup>a</sup>	16.5± 0.41 <sup>b,c</sup>	14.75±0.61 <sup>c</sup>	14.5± 2.04 <sup>c</sup>	17± 0.00 <sup>b,c</sup>	17± 0.82 <sup>b,c</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	12± 0.00 <sup>a,b</sup>	7± 0.00 <sup>e</sup>	10±1.63 <sup>c,d</sup>	11± 0.00 <sup>b,c</sup>	12± 0.82 <sup>a,b</sup>	13.5± 1.22 <sup>a</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	19± 0.82 <sup>b</sup>	15.5± 0.00 <sup>d</sup>	16±0.82 <sup>b,c,d</sup>	21.5± 1.22 <sup>a</sup>	17.5±2.04 <sup>b,c</sup>	18± 0.82 <sup>b,c</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	10± 0.00 <sup>b</sup>	7± 0.00 <sup>d</sup>	12± 0.82 <sup>a</sup>	12.25± 1.02 <sup>a</sup>	12.75±0.61 <sup>a</sup>	13.5± 0.41 <sup>a</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	26.5± 1.22 <sup>a</sup>	14.5± 0.41 <sup>e</sup>	15.5±1.2 <sup>d,e</sup>	15.75±0.61 <sup>d,e</sup>	16.75±0.61 <sup>c,d</sup>	16.25±0.20 <sup>d,e</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13.25± 0.61 <sup>a</sup>	9± 0.00 <sup>b,c</sup>	6.5± 0.41 <sup>d</sup>	7.25±0.20 <sup>c,d</sup>	8.75±1.84 <sup>b,c</sup>	7.25±1.02 <sup>c,d</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.5± 0.41 <sup>a</sup>	7± 0.00 <sup>a</sup>	7.5± 0.41 <sup>a</sup>	8± 0.82 <sup>a</sup>	8.5± 0.41 <sup>a</sup>	7.5± 0.41 <sup>a</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIP74910	9.5±0.41 <sup>a,b,c,d</sup>	10.5± 0.41 <sup>a,b</sup>	9±0.00 <sup>b,c,d</sup>	9± 0.00 <sup>b,c,d</sup>	8± 0.82 <sup>d</sup>	11.5± 0.41 <sup>a</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIP74904	19± 0.82 <sup>a</sup>	15.5± 0.41 <sup>a,b,c</sup>	18±0.41 <sup>a,b</sup>	17.5±0.41 <sup>a,b</sup>	15.5±1.22 <sup>a,b,c</sup>	16.5±0.41 <sup>a,b,c</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIP74903	20.25± 1.43 <sup>a</sup>	15.5± 1.22 <sup>b</sup>	16.25±0.20 <sup>b</sup>	14.25±1.02 <sup>b</sup>	15.5± 0.41 <sup>b</sup>	15.5± 1.22 <sup>b</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIP74902	20.5± 0.41 <sup>a</sup>	14.5± 0.41 <sup>d</sup>	16±0.82 <sup>c,d</sup>	15.5±0.41 <sup>c,d</sup>	15± 1.63 <sup>d</sup>	13± 0.00 <sup>e</sup>
<i>Listeria ivanovii</i> CLIP12229	19± 0.00 <sup>a</sup>	16± 0.82 <sup>b</sup>	15± 0.82 <sup>b</sup>	16± 0.82 <sup>b</sup>	18± 0.82 <sup>a</sup>	18± 0.82 <sup>a</sup>

a,b,c,d,e,f,g,h : les moyennes avec des lettres différents sont significativement différentes.

La meilleure zone d'inhibition (26.5 mm de diamètre) a été observée pour la souche LCW7 (*Enterococcus durans*) contre *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (fig.16), tandis que la plus petite avec un diamètre de 6.5 mm étant observée pour la souche LCW 9 (*Enterococcus durans*) contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. De même, l'effet inhibiteur pour chaque bactérie lactique a été significativement différent ( $p < 0.0001$ ) d'une souche cible à l'autre.

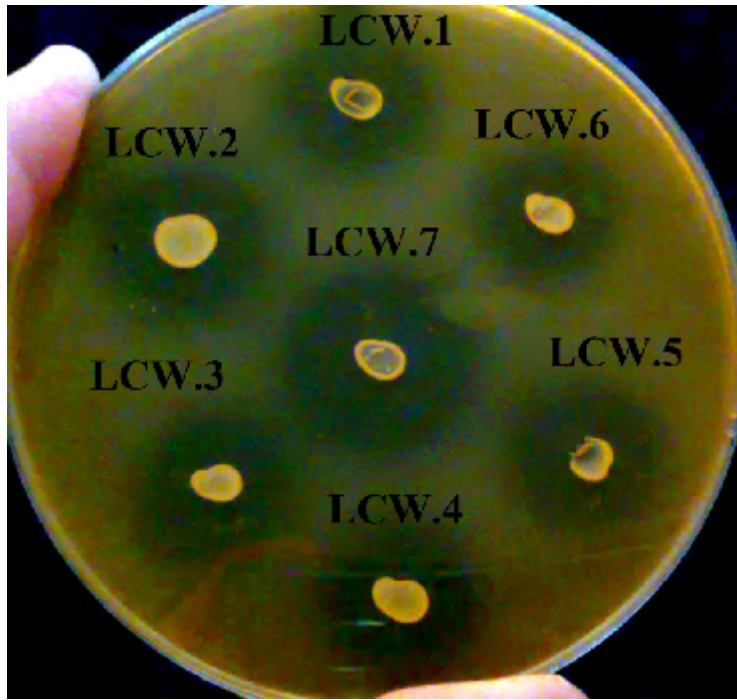
La souche LCW7 identifiée *Enterococcus durans* apparaît la plus performante (fig.16) avec les meilleures zones d'inhibition contre onze des dix sept souches indicatrices utilisées (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Listeria ivanovii* CLIP12229, *Listeria monocytogenes* CLIP74904, *E.coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* CLIP74903, *Listeria monocytogenes* CLIP74902, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603). La souche LCW44 identifiée *Leuconostoc mesenteroides* (fig.16) a été moins performante avec les meilleures zones d'inhibition contre trois souches indicatrices seulement (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* 49452, *Listeria monocytogenes* CLIP 74910).

Concernant les souches indicatrices, *Proteus sp.* s'était révélée la plus sensible avec les plus grandes zones d'inhibition en présence de sept souches de bactéries lactiques sur les douze testées. *Pseudomonas aeruginosa* a été la plus résistante avec un maximum d'inhibition de 8.5 mm obtenu par les souches LCW7 et LCW25 identifiées *Enterococcus durans*. Ammor et al. (2006) ont signalé également la résistance de *Pseudomonas* à toutes les souches lactiques testées.

En comparant entre les souches de *Listeria* utilisées, il apparaît que *Listeria monocytogenes* CLIP74910 était la moins sensible vis-à-vis de toutes les souches lactiques, à l'exception de la souche LCW2, avec un maximum d'inhibition de 11.5 mm obtenu par la souche LCW44.

De plus, il a été observé que l'effet des souches lactiques était significativement différent selon le type de Gram, il est plus important contre les bactéries indicatrices à Gram négatif que contre celles à Gram positif. Ceci laisse suggérer que ces bactéries lactiques ont agit par un mécanisme autre que la production de bactériocines.

A)



B)

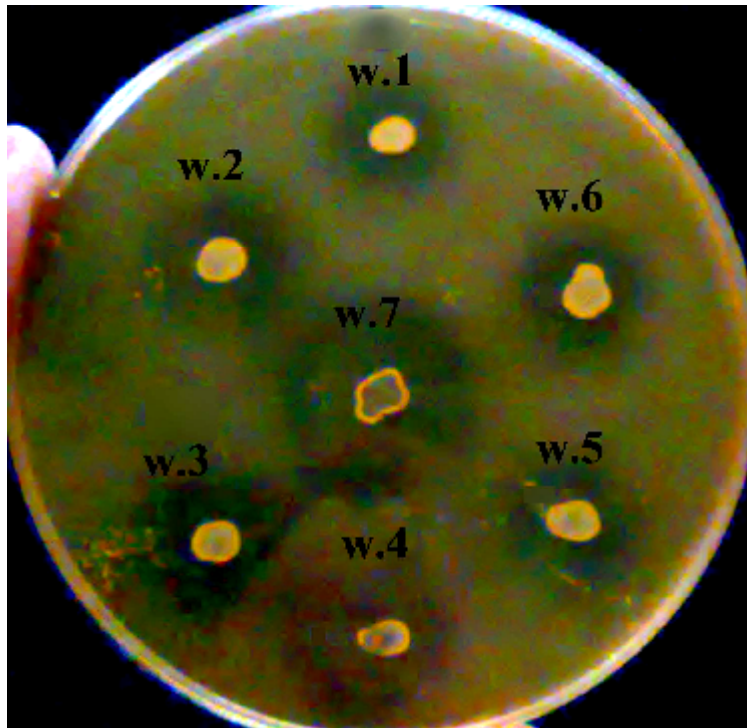
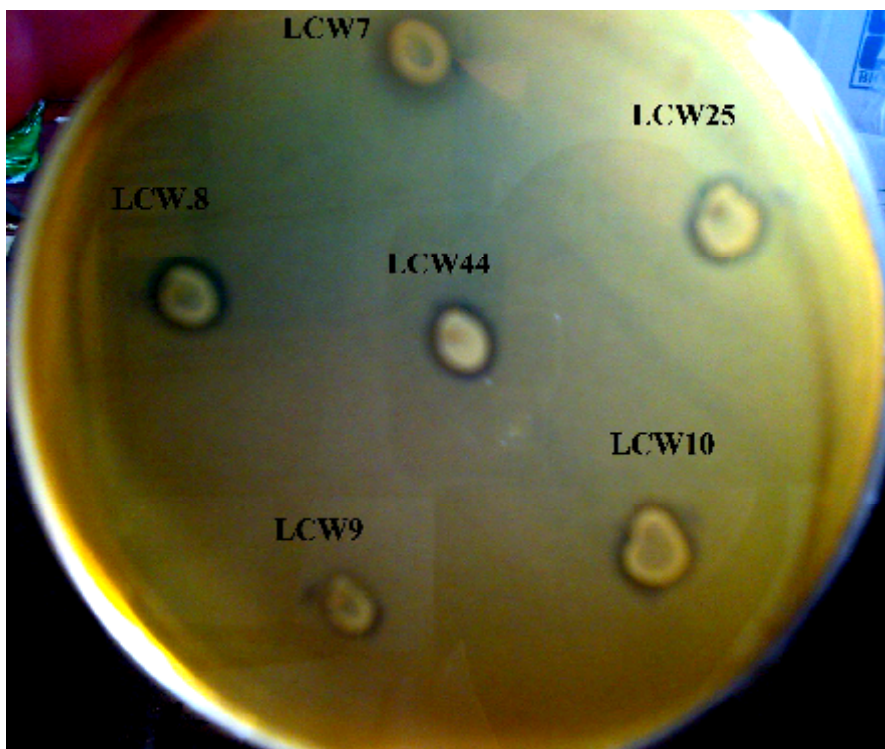
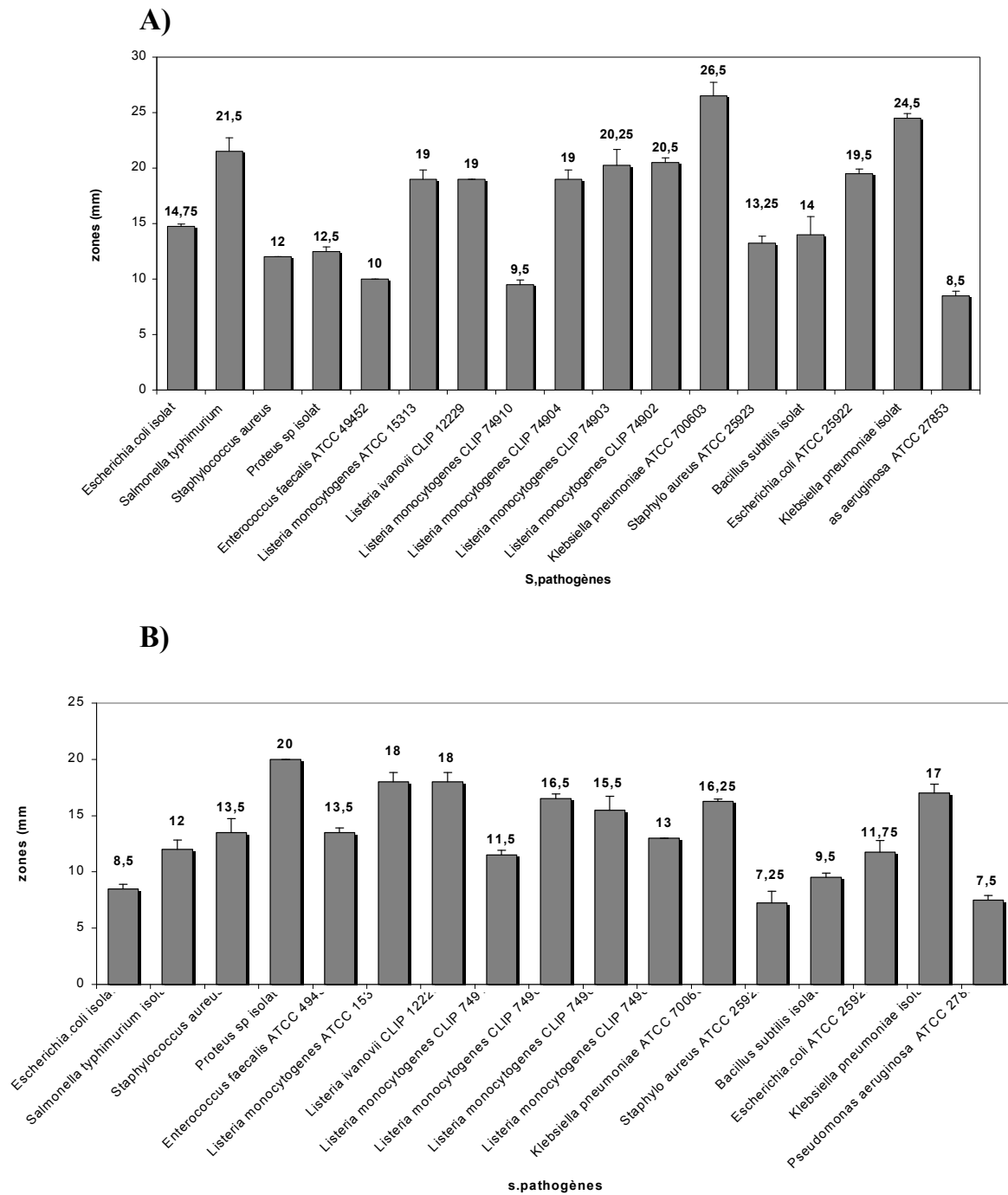


Fig. 14. Effet des souches lactiques sur *E. coli* (A) et *Salmonella typhimurium* (B).



**Fig. 15.** Effet des souches lactiques sur *Pseudomonas aeruginosa*.



**Fig 16.** Spectre d'activité de la souche (A) : LCW7 (*Enterococcus durans*), et (B) : LCW44 (*Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides*) vis-à-vis des souches indésirables.



Yateem et *al.* (2008) ont isolé des souches lactiques à partir du lait de chamelle au Kuwait dont l'effet antagoniste s'était exercé uniquement sur les bactéries à Gram négatif (*Salmonella ssp* et *E. coli*), mais aucun effet n'a été détecté sur *Staphylococcus aureus*. Au contraire, Ammor et *al.* (2006) ont isolé des souches lactiques dont l'effet antagoniste était restreint aux bactéries à Gram positif, celles à Gram négatif étant résistantes.

Il est à noter que parmi les 76 souches lactiques isolées dans cette étude, celles provenant du lait de chamelle étaient plus performantes avec un spectre d'activité large sur les bactéries indésirables testées dans ce travail. Ceci peut expliquer la longue durée de conservation du lait de chamelle et son intérêt thérapeutique (Hassan et *al.*, 2008).

## Conclusion générale

L'outil moléculaire s'est révélé sensible et performant pour identifier les espèces. Ainsi, l'analyse des laits crus et fermenté a permis l'isolement de 76 souches lactiques identifiées par séquençage de leur ADNr 16S. Le genre *Enterococcus* a été dominant pour le lait de chamelle de l'Oued suivi des genres *Leuconostoc* et *Lactococcus*. Le genre *Lactobacillus* s'était montré dominant pour le lait de chamelle de M'sila avec en deuxième position le genre *Lactococcus*. Enfin, il y a eu prédominance du genre *Lactobacillus* en ce qui concerne le lait fermenté de vache provenant de la région de Sétif.

Parmi ces souches lactiques isolées, les tests de l'activité antibactérienne ont fait apparaître 26 souches actives dont douze d'origine cameline ont présenté une activité anti-*Listeria* marquée. Bien que ces isolats ont présenté un spectre d'action étendu sur d'autres bactéries potentiellement pathogènes et/ ou altérantes, les essais n'ont pas mis en évidence une activité bactériocinogène pour les souches sélectionnées dans les conditions de culture testées.

Le pouvoir antibactérien confirmé de certaines souches isolées de lait de chamelle pourrait favoriser leur utilisation en tant que bioconservateurs ou starters dans les produits fermentés après évaluation de leur pouvoir fermentaire ou en tant que probiotiques après la réalisation de plusieurs tests *in vitro* et *in vivo* (tolérance aux conditions hostiles du tube digestif, tolérance aux sels biliaries, adhérence au mucus intestinal, ...etc.). De plus, ces souches étant isolées d'un milieu salé peuvent être exploitées dans la transformation biotechnologique du lait camelin et de différents produits salés (olives, fromages, concombre, ...etc.).

Les outils moléculaires actuellement disponibles constituent également un moyen nouveau pour décrire un écosystème microbien donné ou suivre son évolution dans une matrice alimentaire ou autre. En effet, les approches classiques de caractérisation de ces écosystèmes qui sont basées sur la mise en culture des microorganismes comme préalable à l'identification des espèces ne donnent cependant accès qu'à un aspect limité de la diversité microbienne puisque seule une infime fraction des microorganismes reste viable.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrams, D., Barbosa, J., Albano, H., Silva, J., Gibbs, P. A., Teixeira, P. (2011).** Characterization of bacPPK34 a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* strain K34 isolated from “Alheira”. *Food Control*, **22**: 940-946.
- Ahmed, Z., Wang, Y., Cheng, Q., Imran, M. (2010).** *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: An overview. *Afr. J. Biotechnol.*, **9**: 2843-2850.
- Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silver, J., Carneiro, L., Magalhães, R. (2009).** Evaluation of bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for « Alheira », a fermented meat sausage. *Food Control*, **20**: 764-770.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, 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 the antibacterial compounds. *Food Control*, **17**: 454-461.
- Anthony, T., Rajesh, T., Kayalvizni, N., Gunasekaran, P. (2009).** Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa 9. *Biores. Technol.*, **100**: 872-877.
- Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, **23**: 30-37.
- Barefoot, S. T. et Klaenhammer, T. R. (1983).** Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied Environ. Microbiol.*, **45**: 1808-1815.
- Ben Amor, K., Vaughan, E. E., De Vos, W. M. (2007).** Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *J. Nutr.*, **137**: 741S-747S.
- Ben Hammou, F., Skali, S. N., Idaomar, M., Abrini, J. (2010).** Combination of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage castings at 6°C. *Afr. J. Biotechnol.*, **9**: 1190-1195.

**Benkerroum, N., Oubel, H., Zahar, M., Dlia, S., Maltout, A. F. (2000).** Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis subsp. lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan Jben. *J. Appl. Microbiol.*, **89**: 960-968.

**Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas, R., Martinez-Cañamero, M., Guyot, J. P., Gálvez, A. (2006).** Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saagla, a traditional fermented gruel from Burkina Faso. *Int. J. Food Microbiol.*, **112**: 44-50.

**Berecka, M. P., Wasko, A., Koston, D. (2009).** Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *Annales. Vol. LXIV*1.

**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.

**Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2005).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.*, **3**: 777-788.

**Curk, M.C., Peladan, F., Hubert, J.C. (1993).** Caractérisation biochimique des lactobacilles brassicoles. *Lait*, **73**: 215-231.

**Cutler, P. (2004).** Methods in molecular biology: protein purification protocols. Humana Press Inc., Totawa, NJ.

**Daba, H., Pandian, S., Gosselin, G. E., Simard, R. E., Huang, J., Lacroix, C. (1991).** Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 3450-3455.

**Dellaglio, F., DeRoissart, H., Torriani, S., Curk, M. C., Janssens, D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. DeRoissart, H. et Luquet, F. M., Lorica Uriage, France.

**De Martinis, E. C. P., Públio, M. R. P., Santarosa, P. R., Freitas, F. Z. (2001).** Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged brazilian meat and meat products. *Braz. J. Microbiol.*, **32**: 32-37.

- Dembélé, T., Obdrzalek, V., Votava, M. (1998).** Inhibition of bacterial pathogens by Lactobacilli. *Zent. bl. Bacteriol.*, **288**: 395-401.
- DeVos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H. Whiteman, W. B. (2009).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg London, New York.
- Dortu, C. et Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13**: 143-154.
- Doumandji, A., Bousbia, N., Hellal, A. (2010).** Effet anti-*Listeria* de *Bifidobacterium infantis* isolé à partir de selles de nourrisson allaité au sein. *Sciences et Technologies*, **31** : 14-21.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., Prévost, H. (2006).** The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2**: 564-582.
- Dykes, G. A. et von Holy, A. (1994).** Strain typing in the genus *Lactobacillus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **19**: 63-66.
- El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El-Mecherfi, K.E., Bazukyan, I., Choiset, I., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y. G., Kuliev, A. A., Mozzi, F., Chobert, J. M., Haertlé, T. (2011).** Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Sci. Technol.*, **22**: 509-516.
- Elmoualdi, L., Labioui, H., Boushama, L., Benzakour, A., Ouhssine, M., El Yachioui, M. (2008).** Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis subsp. Cremoris*. *Bull. Soc.Pharm. Bordeaux*, **147** : 7-18.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, Jr. P. (1992).** How close is close: 16rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**: 166-170.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., BenOmar, N. (2007).** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, **120**: 51-70.

**Gancheva, A., Pot, B., Vanhonacker, K., Hoste, B., Kersters, K. (1999).** A polyphasic approach towards the identification of strains belonging to *Lactobacillus acidophilus* and related species. *Syst. Appl. Microbiol.*, **22**: 573-585.

**Gautam, N. et Sharma, N. (2009).** Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian J. Microbiol.*, **49**: 204-211.

**Gevers, D., Huys, G., Swings, J. (2001).** Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, **205**: 31-36.

**Ghali, H., Allaoui, A., Destain, J., Benkerroum, N., Thonart, P. (2006).** Bacteriocins activity by *Lactobacillus curvatus* CWB1-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4°C storage. *J. Food Protection*, **69**: 1066-1071.

**Ghrai, T., Frere, J., Berjeaud, J. M., Manai, M. (2008).** Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Cont.*, **19**: 162-169.

**Gillor, O., Etzion, A., Riley, M. A. (2008).** The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**: 591-606.

**Glazer, A. N. et Nikaido, H. (2007).** Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology. Cambridge University Press, New York.

**Gong, H. S., Meng, X. C., Wang, H. (2010).** Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from "Jiaoke", a traditional fermented cream from China. *Food Cont.*, **21**: 89-96.

**Hadji-Sfaxi, I., El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Batdorj, B., Le Blay- Laliberté, G., Barbier, G., Haertlé, T., Chobert, J. M. (2011).** Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control.*, **22**: 2020-2027.

**Hainque, B., Baudin, B., Lefebvre, P. (2008).** Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

**Hartmann, H. A., Wilke, T., Erdmann, R. (2011).** Efficacy of bacteriocin-containing cell-free supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *Int. J. Food Microbiol.*, **146**: 192-199.

**Hassan, R., El Zubeir, I. E. M., Babiker, S. A. (2008).** Chemical and microbial measurements of fermented camel milk “Gariss” from transhumance and nomadic herds in Sudan. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, **2**: 800-804.

**Hata, T., Tanaka, R., Ohmomo, S. (2010).** Isolation and characterization of plantaricin ASM1: a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A1. *Int. J. Food Microbiol.*, **137**: 94-99.

**Hennen, G. (2006).** Biochimie: approche bioénergétique et médicale. Dunod, Paris.

**Héquet, A., Laffite, V., Simon, L., De Sousa-Caetano, D., Thomas, C., Fermaux, C., Berjeaud, J. M. (2007).** Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to stimulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. *Int. J. Food Microbiol.*, **113**: 67-74.

**Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **73**: 36S-73S.

**Johansson, M. L., Quednau, M., Molin, G., Ahrné, S. (1995).** Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett. Appl. Microbiol.*, **21**: 155-159.

**Jones, R., Hussein, H. M., Zagorec, M., Brightwell, G., Tagg, J. R. (2008).** Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiol.*, **25**: 228-234.

**Kamoun, P., Lavoigne, A., DeVerneuil, H. (2003).** Biochimie et biologie moléculaire. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

**Karthikeyan, V. et Santhosh, S. W. (2009).** Study of bacteriocin as a food preservative and the *L. acidophilus* strain as probiotic. *Pak. J. Nutr.*, **8**: 335-340.

**Khalil, R., Elbahloul, Y., Djadouni, F., Omar, S. (2009).** Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain. *Pak. J. Nutr.*, **8**: 242-250.

**König, H. et Fröhlich, J. (2009).** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

**Kotelnikova, E. A. et Gelfand, M. S. (2002).** Bacteriocin production by Gram-positive bacteria and the mechanisms of transcriptional regulation. *Russian Journal of Genetics*, **38**: 758-772.

**Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachioui, M., Ouhssine, M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc.Pharm. Bordeaux*, **144** : 237-250.

**Luo, F., Feng, S., Sun, Q., Xiang, W., Zhao, J., Zhang, J., Yang, Z. (2011).** Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from kurut, a traditional naturally-fermented yak milk from Qinghai-Tibet plateau. *Food Control*, **22**: 50-53.

**Lupski, J. R. et Weinstock, G. M. (1992).** Short interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.*, **174**: 4525-4529.

**Lyhs, U., Bjorkroth, J., Korkeala, H. (1999).** Characterization of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout using ribotyping. *Int. J. Food Microbiol.*, **52**: 77-84.

**Mami, A., Henni, J. E., Kihal, M. (2008).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy & Sci.*, **3**: 39-49.

**Marth, E. H. et Steele, J. L. (2001).** Applied dairy microbiology. Marcel Dekker, Inc., New York.

**McCartney, A. L. (2002).** Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British J. Nutr.*, **88**: S29-S37.

**Mkrtchyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K. (2010).** Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents.*, **35**: 255-260.

**Moll, G. N., Konings, W. N., Drissen, A. J. M. (1999).** Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**: 185-198.



- Moraes, M. P., Perin, L. M., Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., Nero, L. A. (2010).** Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *Food Sci. Technol.*, **43**: 1320-1324.
- Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M. (2010).** Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Blackwell publishing, Singapore.
- Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Baah, J., Teather, J., Drider, J. (2010).** Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with Polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, **162**: 99-107.
- Nazef, L., Belguesmia, Y., Tani, A., Prévost, H., Drider, D. (2008).** Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence of anti-*Campylobacter* and anti-*Listeria* activities. *Poultry Science*, **87**: 1-6.
- Ouadghiri, M. (2009).** Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « lben » et « jben » d'origine marocaine. Thèse de doctorat. Université Mohammed V- Agdal, Rabat.
- Pinto, A. L., Fernandes, M., Pinto, C., Albano, H., Castilho, F., Teixeira, P., Gibbs, P. A. (2009).** Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *Int. J. Food Microbiol.*, **129**: 50-58.
- Pringsulaka, O., Thongnam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., Rangsiruji, A. (2011).** Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control*, **23**: 547-551.
- Riley, M. A. (2009).** Bacteriocins: Biology, Ecology, and Evolution. Elsevier, Oxford.
- Riley, M. A. et Chavan, M. A. (2007).** Bacteriocins: Ecology and Evolution. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Roussel, Y., Colmin, C., Simonet, J. M., Decaris, B. (1993).** Strain characterization, genome size and plasmide content of *Lactobacillus acidophilus* group (Hansen et Mocollet). *J. Appl. Bacteriol.*, **74**: 549-556.

- Ruiz-Barba, J. L., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragán, A., Jiménez-Díaz, R. (2010).** Coculture with specific bacteria enhances survival of *Lactobacillus plantarum* NC8, an autoinducer-regulated bacteriocin producer, in olive fermentations. *Food Microbiol.*, **27**: 413-417.
- Saint-Hubert, C., Durieux, A., Bodo, E., Simon, J.-P. (2009).** Large scale purification protocols for carnocin KZ213 from *Carnobacterium piscicola*. *Biotechnol. Lett.*, **31**: 519-523.
- Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. (2004).** Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.
- Sarika, A. R., Lipton, A. P., Aishwarya, M. S. (2010).** Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. *Adv. J. Food Sci. Technol.*, **2**: 291-297.
- Sharma, S., Garg, A.P., Singh, G. (2010).** Optimization of fermentation conditions for bacteriocin production *Lactococcus lactis* CCSULAC1 in modified MRS medium. *Int. J. Dairy Sci.*, **5**: 1-9.
- Simova, E. D., Beshkova, D. B., Dimitrov, Zh. P. (2009).** Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. *J. Appl. Microbiol.*, **106**: 692-701.
- Smaoui, S. (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.
- Svec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedlacek, I., Swings, J. (2005).** Evaluation of (GTG)<sub>5</sub>-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol. Lett.*, **247**: 59-63.
- Tabasco, R., García-Cayuela, T., Peláez, C., Requena, T. (2009).** *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, **132**: 109-116.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W. (1976).** Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **40**: 722-756.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., Swaminathan, B. (1995).** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-

field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 2233-2239.

**Thakur, R.L. et Roy, U. (2009).** Antibacterial activity of *Leuconostoc lactis* isolated from raw cattle milk and its preliminary optimization for the bacteriocin production. *Res. J. Microbiol.*, **4**: 122-131.

**Todorov, S. D. et Dicks, L. M. T. (2005).** Growth parameters influencing the production of *Lactobacillus rhamnosus* bacteriocins ST461BZ and ST462BZ. *Ann. Microbiol.*, **55**: 283-289.

**Todorov, S. D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J. G., Franco, B. D. G. M. (2011).** Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) - from isolation to application : characterization of a bacteriocin. *Food Res. Int.*, **44**: 1351-1363.

**Tong, Z., Dong, L., Zhou, L., Tao, R., Ni, L. (2010).** Nisin inhibits dental caries-associated microorganisms in vitro. *Peptides*, **31**: 2003-2008.

**Torriani, S., Clementi, F., Vancanneyt, M., Hoste, B., Dellaglio, F., Kersters, K. (2001).** Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. Pentosus* and *L. Paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP. *Syst. Appl. Microbiol.*, **24**: 554-560.

**Uehara, S., Monden, K., Nomoto, K., Seno, Y., Kariyama, R., Kumon, H. (2006).** A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Int. J. Antimicrobial Agents*, **28**: 30-34.

**Verluyten, J., Leory, F., De Vuyst, L. (2004).** Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 5081-5088.

**Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J. R. (1991).** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, **19**: 6823-6831.

**Vincent, D., Roy, D., Mondou, F., Dery, C. (1998).** Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *Int. J. Food Microbiol.*, **43**: 185-193.

**Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J. (2006).** Dairy science and technology. Taylor & Francis, New York.

**Xie, Y., An, H., Hao, Y., Qin, Q., Huang, Y., Luo, Y., Zhang, L. (2011).** Characterization of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. *Food Control*, **22**: 1027-1031.

**Yang, R., Johnson, M. C., Ray, B. (1992).** Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3355-3359.

**Yang, R. et Ray, B. (1994).** Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* **11**: 281-291.

**Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R. (2008).** Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Sci.*, **3**: 194-199.

**Zadi Karam, H. et Karam, N. H. 2006.** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *TROPICULTURA* **24** : 153-156.

**Zakhia, F. et de Lajudie, P. (2006).** La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques - application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Rev. Microbiol.*, **52**: 169-181.

## Résumé

L'analyse du lait cru de chamelles provenant de l'Oued et de M'sila et du lait de vache fermenté collecté dans la région de Sétif a permis l'isolement de 76 souches de bactéries lactiques identifiées sur la base de la séquence de leur ADNr 16S comme appartenant aux genres : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Le lait de vache ainsi que celui de chamelle de M'sila ont été dominés par le genre *Lactobacillus* alors que le genre *Enterococcus* est plus fréquent dans le lait de chamelle de l'Oued.

Les essais de l'activité antibactérienne ont mis en évidence 26 souches lactiques actives contre la souche pathogène *Listeria monocytogenes* parmi lesquelles douze, d'origine cameline, se sont distinguées par un meilleur pouvoir inhibiteur. Cependant, la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium et la méthode d'adsorption-désorption appliquées sur les cultures bactériennes de ces dernières n'ont pas mis en évidence une activité bactériocinogène.

En tenant compte de leur activité anti-*Listeria* marquée et de leur spectre d'activité contre les bactéries indésirables, certaines des souches isolées dans cette étude pourraient être des candidats potentiels utilisables dans la bioconservation des produits alimentaires et dans la transformation biotechnologique du lait.

**Mots clés :** lait, bactéries lactiques, identification moléculaire, bactériocines, activité antibactérienne, bioconservation.

## الملخص

سمح تحليل حليب الناقة الطازج المجلوب من منطقتي الوادي والمسيلة بالإضافة إلى حليب البقر المتخمر المجلوب من ولاية سطيف بالحصول على 76 عزلة من البكتيريا اللبنية التي تم التعرف عليها بواسطة تتابع نيكليوتيدات الـ 16S ADN الخاص بها و الذي بين انتماءها للأجناس الآتية: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*. كان الجنس *Lactobacillus* هو السائد بالنسبة لحليب البقر و حليب الناقة المجلوب من منطقة المسيلة, أما حليب الناقة المجلوب من منطقة الوادي فقد تميز بسيادة الجنس *Enterococcus*.

أظهر اختبار النشاطية ضد البكتيرية أن 26 عزلة من مجموع البكتيريا اللبنية المعزولة تميزت بنشاطية مثبطة ضد العزلة الممرضة *Listeria monocytogenes* و أن 12 عزلة من هذه الأخيرة و التي تم عزلها من حليب الناقة أظهرت قدرة تثبيطية عالية. على الرغم من ذلك فإن نتائج البحث عن البكتريوسين باستعمال طريقة الترسيب بواسطة سولفات الأمونيوم وطريقة الإدمصاص و التحرر بينت عدم وجود أي عزلة قادرة على إنتاج البكتريوسين.

نظرا لقدرتها التثبيطية العالية ضد عزلة *Listeria* وطيف تأثيرها الواسع , الذي شمل عزلات ممرضة و مسؤولة عن تحليل الأغذية, فإن البكتيريا اللبنية المعزولة في هذه الدراسة قد يكون لها دور فعال سواء في الحفظ الحيوي للمواد الغذائية أو في التحويل البيوتكنولوجي للحليب.

**الكلمات المفاتيح:** حليب, بكتيريا لبنية, تشخيص جزيئي, بكتريوسين, نشاطية ضد بكتيرية, حفظ حيوي.

## *Annexes*

---

**Annexel** : Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques (Salminen et *al.*, 2004).

Caractères	Bâtonnets				Cocci					
	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lactoc. Vagoc.</i>	<i>Leucono. Oenoc.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc.</i>	<i>Weisse.</i> <sup>a</sup>
Formation des tétrades	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO <sub>2</sub> à partir de glucose <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Croissance à 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Croissance à 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Croissance à 6.5% d'NaCl	ND <sup>d</sup>	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Croissance à 18% d'NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Croissance à pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Configuration d'acide lactique <sup>e</sup>	L	D, L, DL <sup>f</sup>	L	L	L	D	L, DL <sup>f</sup>	L	L	D, DL <sup>f</sup>

+ : Positif, - : Négatif, ± : Réponse varie selon les espèces ; ND : Non déterminé ; *Weisse.*<sup>a</sup> : Souches peuvent être bâtonnets. <sup>b</sup> : - : Homofermentaire, + : Hétérofermentaire. <sup>c</sup> : Petite quantité de CO<sub>2</sub> produite qui dépend du milieu.

<sup>d</sup> : Absence de croissance à 8% d'NaCl ; <sup>e</sup> : Configuration de l'acide lactique produit à partir de glucose.

<sup>f</sup> : Production de D-, L- ou DL- acide lactique varie selon les espèces.

**Annexe 2** : Quantités de sulfate d'ammonium solide nécessaire pour les différents degrés de saturation des solutions de protéines (Culter, P., 2004 ).

Initial percentage saturation at 0°C	Target percentage at 0°C <sup>a</sup>																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	481	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	51	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20		27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25			27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30				28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	403	445	488
35					58	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	
40						29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45							20	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50								30	60	92	125	159	191	230	268	308	348
55									30	61	93	127	161	197	235	273	313
60										31	62	95	129	164	201	239	279
65											31	63	97	132	168	205	244
70												32	65	99	134	171	209
75													32	66	101	173	214
80														33	67	103	219
85															34	68	105
90																34	70
95																	35

<sup>a</sup> Grams of solid ammonium sulfate per liter of solution.

**Annexe 3 : Séquences nucléotidiques des souches isolées.**

**LCW10 : *Enterococcus durans***

AAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAC  
GTGGGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGC  
ATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGG  
TAACGGCTCACCAAGGCYACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG  
CCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCG  
TGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCC  
CTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCG  
TTGTCCGGATTTATGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACC  
GGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAA  
TGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG

**LCW25 : *Enterococcus durans***

TCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG  
CCCATCAGAAGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATT  
TGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC  
CAAGGCTACGATGATGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG  
GTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTGACGGTATCT  
AACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGATTTA  
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGAGGGTCAT  
TGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA  
TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG

**LCW30 : *Enterococcus durans***

TAATACATGCAAGTCTGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGG  
TGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAA  
TCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA  
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACT  
GAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGC  
AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACT  
TGTTCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  
TGGCAAGCGTTGTCGGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC  
CGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGT  
AGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGA  
GGCTC

**LCW31 : *Enterococcus durans***

AAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATAAACTTGGAAA  
CAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGG  
ATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCYACGATGCATAGCCGACCTGAGA  
GGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGC  
AATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAG  
AGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC  
CAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTT  
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAG  
AGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT  
CTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGA

**LCW6 : *Enterococcus durans***

TCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG  
GGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATG  
GTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA  
CGGCTCACCAAGGCYACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC  
AAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGA  
GTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCT  
GACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG  
TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGG  
GGAGGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATG  
CGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG



**LCW7 : *Enterococcus durans***

AAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAC  
GTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGAAAAAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGC  
ATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGG  
TAACGGCTCACCAAGGCYACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG  
CCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGG  
TGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCC  
CTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG  
TTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACC  
GGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAA  
TGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTC

**LCW8 : *Enterococcus durans***

ACATGCAAGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAG  
TAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGAAAAAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGA  
AACCAGTGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTG  
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCYACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACATTGGGACTGAG  
ACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAAC  
GCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGT  
TCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG  
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGG  
CTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGC  
GGTGAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC  
TCGA

**LCW9 : *Enterococcus durans***

ATACATGCAAGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTG  
AGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGAAAAAGGTGCTAATACCGTATAACAATC  
GAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGT  
TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCYACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACATTGGGACTG  
AGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCA  
ACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGT  
GTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT  
GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC  
GGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTA  
GCGGTGAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG  
GCTCGAAAGC

**LCW22 : *Enterococcus faecium***

GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCC  
ACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTT  
GGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGC  
TGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGGCMCGATGCATAGCCGAC  
CTGAGAGGGTGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC  
TTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGT  
TGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACT  
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGG  
CGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAACCCCCGGCCCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAGACTTGAGTG  
CAGAAGAGGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG  
GCGGCTCT

**LCW18 : *Enterococcus italicus***

CCTAATACATGCAAGTTGAACGCTTCTTTCTTATCGAACTTCGGTTACCAAGAAAGAAGAGTAGCGAACGGG  
TGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGCGGGGATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGCATAATAC  
TTTTCTCTCATGAGTGAAGTTGAAAGGCGCTTTGCGTCACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGT  
TGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTG  
AGACACGGCCCAAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCA  
ACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAAGAGA  
ATGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTG  
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTG  
AGGCTCGAAAGCG

**LCW19 : *Enterococcus italicus***

CATGCAAGTTGAACGCTTCTTTCTTATCGAACTTCGGTTCACCAAGAAAGAAGAGTAGCGAACGGGTGAGTAA  
CACGTGGGTAACCTGCCCATCAGCGGGGATAAACAACCTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAATACTTTTTCTC  
TCATGAGTGAAGTTGAAAGGCGCTTTTGCCTACTGATGGATGGACCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTAGG  
GTAACGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG  
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCCG  
GTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAAGAGAATGTTTCAT  
CCCTTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG  
CGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGTCAA  
CCGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGGAACCTTGTGTCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGA  
AATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTC

**LCW21 : *Enterococcus italicus***

ACGCTTCTTTCTTATCGAACTTCGGTTCACCAAGAAAGAAGAGTAGCGAACGGGTGAGTAAACAGTGGGTAAC  
CTGCCCATCAGCGGGGATAAACAACCTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAATACTTTTTCTCTCATGAGTGA  
GTTGAAAGGCGCTTTTGCCTACTGATGGATGGACCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTAC  
CAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGAA  
GGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAAGAGAATGTTTCATCCCTTGACGGTA  
TCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT  
TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGTCAACCGGGGAGGGT  
CATTGAAACTGGGGAACCTTGTGTCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT  
ATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAA

**LCW24 : *Enterococcus italicus***

AATACATGCAAGTTGAACGCTTCTTTCTTATCGAACTTCGGTTCACCAAGAAAGAAGAGTAGCGAACGGGTGA  
GTAACAGTGGGTAACCTGCCCATCAGCGGGGATAAACAACCTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAATACTTT  
TTCTCATGAGTGAAGTTGAAAGGCGCTTTTGCCTACTGATGGATGGACCCGCGTGCATTAGCTAGTTGG  
TAGGGTAACGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA  
CACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACG  
CCGCGTGAAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAAGAGAATGT  
TCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG  
CAACGCTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGG  
CTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGGAACCTTGTGTCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGC  
GGTGAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGC  
TCGAA

**LCW26 : *Enterococcus italicus***

AACTTCGGTTCACCAAGAAAGAAGAGTAGCGAACGGGTGAGTAAACAGTGGGTAACCTGCCCATCAGCGGGG  
GATAACAACCTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAATACTTTTTCTCTCATGAGTGAAGTTGAAAGGCGCTTTT  
GCGTACTGATGGATGGACCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCAACGATGCAT  
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  
GGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAA  
ACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAAGAGAATGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCAC  
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCG  
AGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGGAA  
CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAG  
TGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAG

**LCW36 : *Enterococcus italicus***

CCTAATACATGCAAGTTGAACGCTTCTTTCTTATCGAACTTCGGTTCACCAAGAAAGAAGAGTAGCGAACGGG  
TGAGTAAACAGTGGGTAACCTGCCCATCAGCGGGGATAAACAACCTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAATA  
TTTTCTCTCATGAGTGAAGTTGAAAGGCGCTTTTGCCTACTGATGGATGGACCCGCGTGCATTAGCTAGT  
TGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG  
AGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCA  
ACGCCGCGTGAAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAAGAGA  
ATGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
CCGGTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGGAACCTTGTGTCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTG  
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCT

**LCW37 : *Enterococcus italicus***

GTTGAACGCTTCTTTCTTATCGAAGCTTCGGTTCACCAAGAAAGAAGAGTAGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG  
GTAACCTGCCATCAGCGGGGGATAACACTTGGAAAACAGGTGCTAATACCGCATAAATACTTTTTCTCTCATGAG  
TGAAAGTTGAAAGGCGCTTTTTCGCTACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGG  
CCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA  
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTG  
AAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAAGAGAATGTTTCATCCCTTGA  
CGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC  
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGG  
AGGGTCATTGAAAACCTGGGGAAGTCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCC  
TAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC

**LCW42 : *Enterococcus italicus***

GTTGAACGCTTCTTTCTTATCGAAGCTTCGGTTCACCAAGAAAGAAGAGTAGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG  
GTAACCTGCCATCAGCGGGGGATAACACTTGGAAAACAGGTGCTAATACCGCATAAATACTTTTTCTCTCATGAG  
TGAAAGTTGAAAGGCGCTTTTTCGCTACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGG  
CCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA  
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTG  
AAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAAGAGAATGTTTCATCCCTTGA  
CGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC  
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGG  
AGGGTCATTGAAAACCTGGGGAAGTCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCC  
TAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC

**LC1 : *Lactococcus lactis ssp. lactis***

AATACATGCAAGTTGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCAACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCG  
TGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGAAAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTTTAAACACA  
AGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA  
AGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC  
AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGA  
GTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGAAAAGTCTATCAAG  
TGACGGTAACCTCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTT  
GTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCTGGTGTAAGGAGGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGC  
TTGTATGCATTGAAAACCTGGTAGACTTGTAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGC  
GTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACACTGAGGCTCGAAA

**LC4 : *Lactococcus lactis ssp. lactis***

ATACATGCAAGTTGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGT  
GGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGAAAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTTTAAACACAA  
GTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAA  
GGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCA  
AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAG  
TGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGAAAAGTCTATCAAGT  
GACGGTAACCTCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTT  
GTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCTGGTGTAAGGAGGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGC  
TTGTATGCATTGAAAACCTGGTAGACTTGTAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGC  
GTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACACTGAGGCTCGAAA

**LCW11 : *Lactococcus lactis ssp. lactis***

CCTAATACATGCAAGTTGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCAACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAAC  
GCGTGGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGAAAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTTTAAAC  
ACAAGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCTGTATTAGCTAGTTGGTGAGG  
TAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG  
CCAAAACCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGT  
TGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGAAAAGCTC  
AATGACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAG  
CGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCTGGTGTAAGGAGGAGTGGCTCA  
ACCATTGTATGCATTGAAAACCTGGTAGACTTGTAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAA  
ATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACACTGAGGCT

**LCW12 : *Lactococcus lactis ssp. lactis***

ACATGCAAGTTGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGG  
GGAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGAAAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTTTAAACACAAGT  
TTTAAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGG  
CTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAA  
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCCGTGAGTG  
AAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGTGA  
CGGTAACACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTCCTCGAGCGTTGTC  
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCTGGTGAAAAAGCAGTGCTCAACCATTG  
TATGCATTGGAAACTGGTAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA  
GATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCTGTAACCTGACACTGAGGCT

**LCW13 : *Lactococcus lactis ssp. lactis***

ATGCAAGTTGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGG  
AATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGAAAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTTTAAACACAAGTTT  
TAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCT  
CACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAA  
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCCGTGAGTGAA  
GAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGTGACG  
GTAACACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTCCTCGAGCGTTGTCG  
GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCTGGTGAAAAAGCAGTGCTCAACCATTGTA  
TGCATTGGAAACTGGTAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  
TATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCTGTAACCTGACACTGAGGCT

**LCW14 : *Lactococcus lactis ssp. lactis***

ACCGACTGGATGAGCAGCGAACCGGTGAGTAACGCGTGGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGG  
AAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTTTAAACACAAGTTTAAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAA  
AGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGA  
GAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAA  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCG  
GCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGGT  
AGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTAC  
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGTCCCGAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTG  
GTTTATTAAGTCTGGTGAAAAGGCAGTGCTCAACCATTGTATGCATTGGAAACTGGTAGACTTGAGTGCAG  
GAGAGGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCG  
GCTCTCTGGCTGTAACCTGACACTGAGGCT

**LCW15 : *Lactococcus lactis ssp. lactis***

AGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACCGGTGAGTAACGCGTGGGGAATCTGCCTTTGAGCGGG  
GGACAACATTTGAAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTTTAAACACAAGTTTAAAGTTTGAAAGATGCAA  
TTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCGATGATAC  
ATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAA  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTA  
AACTCTGTTGGTAGAGAAGAAGTCTGGTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCCAGAAAGG  
GACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTCCTCGAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAA  
GCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCTGGTGAAAAGGCAGTGCTCAACCATTGTATGCATTGGAAACTGGTA  
GACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACC  
GGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAACCTGACACTGAGGCT

**LCW17 : *Lactococcus lactis ssp. lactis***

GCAAGTTGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCAACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGGA  
ATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGAAAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTTTAAACACAAGTTTT  
AAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCT  
CACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAA  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCCGTGAGTGAA  
GAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGTGACG  
GTAACACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTCCTCGAGCGTTGTCG  
GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCTGGTGAAAAAGCAGTGCTCAACCATTGTA  
TGCATTGGAAACTGGTAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  
TATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCTGTAACCTGACACTGAGGCT

**LCW28 : *Lactococcus lactis* ssp. *lactis***

ATACATGCAAGTTGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCAACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACCGCT  
GGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGACAACATTTGAAAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTTTAAACACAA  
GTTTTAAGTTTGAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCTTGTATTAGCTAGTTGGTGGAGTAAA  
GGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA  
AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCCGCTGAG  
TGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGGAGAGTGAAAGCTCATCAAGT  
GACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTT  
GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCTGGTGTAAAAGGCAGTGGCTCAACCA  
TTGTATGCATTGAAAAGTGGTAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGC  
GTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAACCTGACACTGAGGCTCGAAAAG

**LC2 : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides***

AAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAA  
CCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGAAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTCGCATGACACA  
AAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCT  
ACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAATC  
CTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGCTGTGTGATGA  
AGGCTTTTCGGGTTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAGCAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTGACGGTA  
CCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGAT  
TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGAGCTCAACTCCGGAATGG  
CATTGAAAAGTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATA  
TATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACG

**LC3 : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides***

CGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGA  
GTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGAAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGT  
GTGTCGCATGACACAAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTG  
GTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAG  
ACACGGCCCAAATCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGGAGCAAC  
GCCCGCTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAGCCTAGAAATAGGAAATGA  
TTTTAGTTGACGGTACCATAACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTATGTCC  
CGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAG  
CTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAAAGTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCG  
GTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCT  
CGAAAA

**LC3g : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides***

CTAATACATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC  
ACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGAAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTC  
GCATGACACAAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGG  
GTAAAAGGCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG  
GCCCAAATCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCG  
GTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAGCCTAGAAATAGGAAATGATTTTA  
GTTTGACGGTACCATAACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTATGTCCCGAGC  
GTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAA  
CTCCGGAATGGCATTGAAAAGTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGA  
ATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCT

**LCW23 : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides***

TGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGAC  
AACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGAAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTCGCATGACA  
CAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGC  
CTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAATC  
CTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGCTGTGTGATG  
AAGGCTTTTCGGGTTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAGCAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTGACGGT  
ACCATAACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGA  
TTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATG  
GCATTGAAAAGTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAT  
ATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCT

**LCW32 : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides***

GTCGAACGCACAGCGAAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCT  
GCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTCGATGACACAAAAG  
TAAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACC  
AAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTAC  
GGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGG  
CTTCGGGTTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTAGTTGACGGTACCA  
TACCAGAAAAGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTA  
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCAT  
TGGAAACTGGTTAACTTGAGTGACGTAGAGGTAAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATAT  
GGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGG

**LCW33 : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides***

TCAACGTGAGTTGCAGTCCAGTAAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTA  
CACATGGAGTTCACCTTACTCTACTGCACTCAAGTTAACAGTTTCCAATGCCATTCCGGAGTTGAGCTCCGG  
GCTTTCACATCAGACTTAATAAACCGTCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTCGGGACATA  
CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTATTTAGCCCTCCCTTTCTGGTATGGTACCGTCAAATAAAATCATTTCCT  
ATTCTAGCTGTTCTCCATACAACAGTGCTTTACGACCCGAAAAGCCTTCATCACACACGCGGCGTTGCTCCAT  
CAGGCTTTCGCCCATTTGTGGAAGATTCCCTACTGCAGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAAT  
GTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATTGTCTTGGTAGGCCTTACCCCACTAACTAACTAATGC  
ACCGCGGATCCATCTCTAGGTGACGCCGAAAGCGCCTTTAACTTTGTGTCTGCGACACTAAGTTTTATTCGGT  
ATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCAGCCTTGAGGCAGGTTGTCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTC  
ACTTGAAGGTGCAAGCACCTTTCGCTGTGCGTTCGACTTGATGATTAGGCACGCCCGCAGCGTTTATCCTG  
AG

**LCW35 : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides***

AACGCACAGCGAAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCT  
CAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTCGATGACACAAAAGTTAA  
AAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGA  
CAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGA  
GGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTC  
GGTTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTAGTTGACGGTACCATACCA  
GAAAGGCGCGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCTAATACGTATGTCCCGAGCGTTTCCGGATTTATTGGG  
CGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAA  
ACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAG  
AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGAC

**LCW38 : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides***

ATACATGCAAGTTCGAACGCACAGCGAAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACG  
TGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTCGCA  
TGACACAAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTA  
AAGGCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC  
CAAATCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGT  
GTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTAGTTT  
GACGGTACCATAACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTA  
TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCC  
GGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGC  
GTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGAC

**LCW39 : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides***

ATACATGCAAGTTCGAACGCACAGCGAAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACG  
TGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTCGCA  
TGACACAAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTA  
AAGGCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC  
CAAATCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGT  
GTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTAGTTT  
GACGGTACCATAACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTA  
TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCC  
GGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGC  
GTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAAG

**LCW41 : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides***

GTGCCTAATACATGCAAGTCGAAACGCACAGCGAAAAGGTGCTTGCACCTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAG  
TAAACCGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAG  
TGTCGCATGACACAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGG  
TGGGGTAAAAGGCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA  
CACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGGAGCAACG  
CCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGAT  
TTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGAAAAGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCC  
GAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGC  
TCAACTCCGGAATGGCATTGGAACCTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACCCATGTGTAGCGG  
TGGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCT

**LCW44 : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides***

ATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAAGGTGCTTGCACCTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG  
ACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTGCATGA  
CACAAAAGTTAAAAGGCGCTTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAG  
GCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA  
ACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGGAGCAACGCGCGTGTGTG  
ATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTGAC  
GGTACCATAACCAGAAAAGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCAGCGTTATCC  
GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTTATTAAGTCTGATGTGAAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGA  
ATGGCATTGGAACCTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTA  
GATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTC

**LC11 : *Listeria monocytogenes***

TCTTCCAAAGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGA  
AACCAGGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTA  
CAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTG  
AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC  
CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGT  
TAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACG  
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGG  
TCTTTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCCCGGCTTAAACGGGGAGGGTCATTGGAACCTGGAAGACTGGAGTGCAG  
AAGAGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG  
ACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGA

**Lbn1: *Lactobacillus casei***

CTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCAT  
TTCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCGCTTCTCGGTT  
AAGCCGAGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGC  
TTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTGGATACCGTACGCCGA  
CAACAGTTACTCTGCCGACCATTTCTTCTCCAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCTTCACTCACGCG  
CGTTGCTCCATCAGACTTGGCTCCATTGTGGAAGATCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGCT  
CAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACC  
TAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCAAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCAGCCAAGAACCATGCGGTTCTTG  
GATCTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCACTTAAGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCAC  
CCGTCCGCACTCGTTCCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAGAACTCGTTCGACTTGCATG  
TAT

**Lbn10: *Lactobacillus brevis***

TTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACTAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATT  
CCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTA  
AGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCT  
TGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAAATACCGTCAACCCTTG  
AACAGTTACTCTCAAAGGTGTTCTTTTAAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGC  
ATTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGCTC  
AGTCCCAATGTGGCCGATTACCTCTCAGGTGGCTACGTATCATCGTCTTGGTGGGCTTTACCTCACC  
AACTAATACGCCGCGGGATCATCCAGAAGTGATAGCCGAAGCCACCTTTCAAACAAAATCCATGCGGATTTTG  
TTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCGCTTCTGGGAGATTCCCCACGTGTTACTCACC  
AGTTCGCCACTCGCTTATTGTTGAAATCAGTGCAAGCACGTCATTCAACGGAAGCTCGTTCGACTTGCATGTA  
T

**Lbn11: *Lactobacillus brevis***

TTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACTAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATT  
CCACCCTACACATGGAGTTCCTACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTA  
AGCCGAAGGCTTTACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAAATCCGGACAACGCT  
TGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAACCCTTG  
AACAGTACTCTCAAAGTGTCTTCTTTAAACAACAGAGTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCAGCGGG  
ATTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTGGGCGGTGTCTC  
AGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTGGCTACGTATCATCGTCTTGGTGGGCCCTTACCTACCAACT  
AACTAATACGCCGCGGGATCATCCAGAAGTGATGCCGAAGCCACCTTCAAACAAAATCCATGCGGATTTTG  
TTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCTGCTTCTGGGCAGATTCCCCACGTGTTACTCACC  
AGTTCCGCACTCGCTTCAATTGTTGAAATCAGTGCAAGCACGTCATTCAACGGAAGCTCGTTCCGACT

**Lbn13: *Lactobacillus casei***

CCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTCCACCGC  
TACACATGGAGTTCCTACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCGCTTCCCTCGGTTAAGCCGAG  
GGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAAATCCGGATAACGCTTGCCACCT  
ACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTGGATACCGTACGCGGACAACAGTTA  
CTCTGCCACCATTTCTTCCAACAACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTCTTCACTCAGCGGGCTTGCTCC  
ATCAGACTTGGCTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCA  
ATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAAT  
ACGCCGCGGGTCCATCCAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCAGCCAAGAACCATGCGGTTCTTGGATCTATG  
CGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTATCCCCACTTAAGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGC  
CACTCGTTCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAGAAGCTCGTTCCGACT

**Lbn14: *Lactobacillus casei***

CTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCAT  
TTCACCGCTACACATGGAGTTCCTACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCGCTTCTCCGGTTA  
AAGCCGAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAAATCCGGATAACGC  
TTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTGGATACCGTACGCCGA  
CAACAGTACTCTGCCGACCATTTCTTCCAACAACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTCTTCACTCAGCGGG  
CGTTGCTCCATCAGACTTGGCTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCT  
CAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAAC  
TAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCAGCCAAGAACCATGCGGTTCTTGG  
GATCTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTATCCCCACTTAAGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCAC  
CCGTCCGCACTCGTTCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAGAAGCTCGTTCCGACT

**Lbn15: *Lactobacillus casei***

TCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTCC  
ACCGCTACACATGGAGTTCCTACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCGCTTCTCCGGTTAAG  
CCGAGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAAATCCGGATAACGCTTGC  
CACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTGGATACCGTACGCCGACAAC  
AGTTACTCTGCCGACCATTTCTTCCAACAACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTCTTCACTCAGCGGGCGTT  
GCTCCATCAGACTTGGCTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAG  
TCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAG  
CTAATACGCCGCGGGTCCATCCAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCAGCCAAGAACCATGCGGTTCTTGGAT  
CTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTATCCCCACTTAAGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGT  
CCGCCACTCGTTCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAGAAGCTCGTTCCGACT

**Lbn18: *Lactobacillus casei***

AGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTCCAC  
GCTACACATGGAGTTCCTACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCGCTTCCCTCGGTTAAGCCG  
AGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAAATCCGGATAACGCTTGCCAC  
CTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTGGATACCGTACGCCGACAACAGT  
TACTCTGCCGACCATTTCTTCCAACAACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTCTTCACTCAGCGGGCTTGCT  
CCATCAGACTTGGCTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCC  
CAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTA  
ATACGCCGCGGGTCCATCCAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCAGCCAAGAACCATGCGGTTCTTGGATCTA  
TGCGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTATCCCCACTTAAGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCC  
GCCACTCGTTCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAGAAGCTCGTTCCGACTTGCATGTAT



**Lbn19: *Lactobacillus brevis***

GCCTCAGCGTCAGTTACAGACTAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCG  
CTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTAAGCCGA  
AGGCTTTACATCAGACTTAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACC  
TACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAAATACCGTCAACCCCTTGAACAGTT  
ACTCTCAAAGGTGTTCTTCTTAAACAACAGAGTTTACGAGCCGAAACCCCTTCTCACTCACGGCGCATTGCTC  
CATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCC  
AATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTGCGCTACGTATCATCGTCTTGGTGGGCCTTACCTCACCAACTAACTAA  
TAGCCCGCGGATCATCCAGAAGTGATAGCCGAAGCCACCTTTCAAACAAAATCCATGCGGATTTTGTGTTAT  
ACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCTGCTTCTGGGCAGATTCCCCACGTGTTACTACCAGTTCCG  
CACTCGCTTCATTGTTGAAATCAGTGCAAGCACGTATTCAACGGAAGCTCGTTCCGAC

**Lbn2: *Lactobacillus casei***

CTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCAT  
TTCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCGCTTCTCCGGTT  
AAGCCGAGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGC  
TTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTGGATACCGTCACGCCGA  
CAACAGTTACTCTGCCGACCATTTCTTCCAAACAACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTCTCACTCACGCGG  
CGTTGCTCCATCAGACTTGGCTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCT  
CAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAAC  
TAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCAAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCAGCCAAGAACCATGCGGTTCTTG  
GATCTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCACTTAAGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCAC  
CCGTCCGCCACTCGTTCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAGAAGCTCGTTCGACTTGCATG  
TATTAGGCAC

**Lbn3: *Lactobacillus casei***

AGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTCCAC  
GCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCGCTTCTCCGGTTAAGCCG  
AGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCAC  
CTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTGGATACCGTCACGCCGACAACAGT  
TACTCTGCCGACCATTTCTTCCAAACAACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTCTCACTCACGCGGCGTTGCT  
CCATCAGACTTGGCTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCC  
CAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTGATA  
ATACGCCGCGGGTCCATCCAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCAGCCAAGAACCATGCGGTTCTTGGATCTA  
TGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCACTTAAGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTC  
GCCACTCGTTCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAGAAGCTCGTTCGACTTGCATGTAT

**Lbn5: *Lactobacillus casei***

TCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTCCACCGCTA  
CACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCGCTTCTCCGGTTAAGCCGAGG  
GCTTTCACATCAGACTTAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTA  
CGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTGGATACCGTCACGCCGACAACAGTTAC  
TCTGCCGACCATTTCTTCCAAACAACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTCTCACTCACGCGGCGTTGCTCCA  
TCAGACTTGCCTCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCAA  
TGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATA  
CGCCGCGGGTCCATCCAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCAGCCAAGAACCATGCGGTTCTTGGATCTATGC  
GGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCACTTAAGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCGCC  
ACTCGTTCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAGAAGCTCGTTCGACT

**Lbn7: *Lactobacillus casei***

CTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCAT  
TTCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCGCTTCTCCGGTT  
AAGCCGAGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGC  
TTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTGGATACCGTCACGCCGA  
CAACAGTTACTCTGCCGACCATTTCTTCCAAACAACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTCTCACTCACGCGG  
CGTTGCTCCATCAGACTTGGCTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCT  
CAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAAC  
TAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCAAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCAGCCAAGAACCATGCGGTTCTTG  
GATCTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCACTTAAGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCAC  
CCGTCCGCCACTCGTTCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAGAAGCTCGTTCGACT

**Lbn8: *Lactobacillus brevis***

TTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACTAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCTACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTAA GCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAAATCCGGACAACGCTT GCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAACCCTTGA ACAGTTACTCTCAAAGGTGTCTTCTTTAAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGGCGCA TTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTGGGCCGTGTCTCA GTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTGCGCTACGTATCATCGTCTTGGTGGGCCCTTACCTCACCAACTA ACTAATACGCCGCGGGATCATCCAGAAGTGATAGCCGAAGCCACCTTCAAACAAAATCCATGCGGATTTTGT TGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCTGCTTCTGGGCAGATTCCCCACGTGTACTACCA GTTCCGCACTCGCTTCAATTGTTGAAATCAGTGAAGCACGTCATTCAACGGAAGCTCGTTCGAC

**Lbn9: *Lactobacillus casei***

AGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACC GCTACACATGGAGTTCCTACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCTCAGTTTCCGATGCGCTTCCCTCGTTAAGCCG AGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAAATCCGGATAACGCTTGCCAC CTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTGGATACCGTACGCGGACAACAGT TACTCTGCCGACCATTTCTTCCAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCTTCACTCACGGCGTGTGCT CCATCAGACTTGGCTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCC CAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTA ATACGCCGCGGGTCCATCCAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCAGCCAAGAACCATGCGGTTCTTGGATCTA TGCGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTATCCCCACTTAAAGGGCAGGTTACCCACGTGTACTCACCCGTCC GCCACTCGTTCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAGAAGCTCGTTCGACTTGCAT

**Lc10: *Lactobacillus brevis***

GCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACTAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCA TTCCACCGCTACACATGGAGTTCCTACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGT TAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAAATCCGGACAACG CTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAACCCT TGAACAGTTACTCTCAAAGGTGTCTTCTTTAAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGG GCATTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGT CAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTGCGCTACGTATCATCGTCTTGGTGGGCCCTTACCTCACCAA TAACTAATACGCCGCGGGATCATCCAGAAGTGATAGCCGAAGCCACCTTCAAACAAAATCCATGCGGATTT TGTTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCCTGCTTCTGGGCAGATTYCCCACGTGTACTCA CCAGTTCCGCACTCGCTTCAATTGTTGAAATCAGTGAAGCACGTCATTCAACGGAAGCTCGTTCGACTTGCATG TATAG

**Lc13: *Lactococcus lactis ssp. lactis***

ATACATGCAAGTTGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAAACGCGT GGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGAAAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTTTAAACACAA GTTTTAAAGTTTGAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTTAAA GGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAG TGAAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGAAAGTCAATCAAGT GACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTT GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCTGGTGTAAGGCGAGTGGCTCAACCA TTGTATGCATTGAAAAGTGGTAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACTGACTGAGGCTCGAAA

**Lc16: *Lactococcus lactis ssp. lactis***

CTTTCGAGCCTCAGTGTCAAGTTACAGGCCAGAGAGCCGCTTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCATATATCTACGCAT TTCACCGCTACACATGGAATTCCTACTCTCTCTCTGCACTCAAGTCTACCAGTTTCCAATGCATACAATGGTTG AGCCACTGCCTTTTACACCAGACTTAAATAAACACCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAAATCCGGACAACGCTC GGGACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTCCCTTCTGGGTAGTTACCGTCACTTGATGA GCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTTACCAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGGCGG TTGCTCGGTACAGCTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCA GTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTATGTATCATCGCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTA GCTAATAACAACGCCGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTCAAACCTTAAACCTTGTGTTTAAAGTTTTT ATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAATGTTGTCCTCCGCTCAAAGGCAGATTCCCCACGCTTACTCACCCGTT CGCTGCTCATCCAGTCCGTACAAGTACCAACCTTACGCGCTCAAC

**Lc20: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis***

GCTTTCGAGCCTCAGTGTACAGTTACAGGCCAGAGAGCCGCTTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCATATATCTACGCA  
TTTACCAGCTACACATGGAATTCCACTCTCCTCTCCTGCACTCAAGTCTACCAGTTTCCAATGCATAACAATGGTT  
GAGCCACTGCCTTTTACACCAGACTTAATAAAACCACCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAAATCCGGACAACGCT  
CGGGACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTCCTTTCTGGGTAGTTACCGTCACTTGATG  
AGCTTTCCTACTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGC  
GTTGCTCGGTACAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTC  
AGTCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTACCAACT  
AGCTAATAACAACGCGGGATCATCTTGTAGTGATGCAATTGCATCTTCAAACCTAAAACCTTGTGTTAAAGTTT  
TTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCGCGCTCAAAGGCAGATTCCCCACGCGTTACTCACCCG  
TTCGCTGCTCATCCAGTCGGTACAAGTACCAACCTTCAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGC

**Lc21: *Enterococcus faecium***

GCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCG  
CTACACATGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGG  
GGGCTTTACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAAATCCGGACAACGCTTGCCACC  
TACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGTTAGATACCGTCAAGGGATGAACAGTT  
ACTCTCATCCTTGTCTTCTCTAACAAACAGAGTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCG  
GTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCA  
ATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGGCTATGCATCGTRGCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAAT  
GCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTTCGATTGTTAT  
ACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCTTCTGATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTTCCG  
CACTCTTCTTTTCCGGTGGAGCAAGTCCGGTGGAAAAAGAAGCGTACGACTTGCATGTAT

**Lc22: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis***

GCCTCAGTGTACAGTTACAGGCCAGAGAGCCGCTTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCATATATCTACGCATTTACCG  
CTACACATGGAATTCCACTCTCCTCTCCTGCACTCAAGTCTACCAGTTTCCAATGCATAACAATGGTTGAGCCAC  
TGCTTTTACACCAGACTTAATAAAACCACCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAAATCCGGACAACGCTCAGGACC  
TACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTCCTTTCTGGGTAGTTACCGTCACTTGATGAGCTTCC  
ACTCTACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTC  
GGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCC  
AATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTACCAACTAGCTAA  
TACAACGCGGATCATCTTGTAGTGATGCAATTGCATTTCAAACCTAAAACCTTGTGTTAAAGTTTATGCG  
GTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCGCGCTCAAAGGCAGATTCCCCACGCGTTACTACCCGTTCCGCTG  
CTCATCCAGTCGGTACAAGTACCAACCTTCAGCGCTCAACT

**Lc27: *Lactobacillus plantarum***

AGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCC  
GCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCACCTTCTCGGTTGAGCCG  
AAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAAATCCGGACAACGCTTGCCA  
CCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAG  
TACTCTCAGATATGTTCTTCTTAAACAACAGAGTTTACGAGCCGAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCT  
CCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCC  
CAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTGGCTACGTATCATTTGCCATGGTGAGCCGTTACCCACCATCTAGCTA  
ATACGCCGCGGRRCCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTT  
ATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCGCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCACGTGTTACTACCCAGTTC  
GCCACTCACTCAAATGTAATCATGATGCAAGCACAATCAATACCAGAGTTCGTTTCGACTTGCATGTA

**Lc5: *Lactobacillus plantarum***

AGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCC  
GCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCACCTTCTCGGTTGAGCCG  
AAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAAATCCGGACAACGCTTGCCA  
CCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAG  
TACTCTCAGATATGTTCTTCTTAAACAACAGAGTTTACGAGCCGAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCT  
CCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCC  
CAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTGGCTACGTATCATTTGCCATGGTGAGCCGTTACCCACCATCTAGCTA  
ATACGCCGCGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTT  
ATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCGCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCACGTGTTACTACCCAGTTC  
GCCACTCACTCAAATGTAATCATGATGCAAGCACAATCAATACCAGAGTTCGTTTCGACTTGCATGTA

**Lc6: *Lactobacillus brevis***

TTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACTAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATT  
CCACCGCTACACATGGAGTTCCTACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTA  
AGCCGAAGGCTTTACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCT  
TGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAACCCCTG  
AACAGTTACTCTCAAAGGTGTCTTCTTTAAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCAGCGGG  
ATTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTGGGCCGTGTCTC  
AGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTGGCTACGTATCATCGTCTTGGTGGGCCCTTACCTCACC  
AACTAATACGCCGCGGGATCATCCAGAAGTGATGCCGAAGCCACCTTCAAACAAAATCCATGCGGATTTG  
TTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCTGCTTCTGGGCAGATTYCCCACGTGTACTCACC  
AGTTCCGCACTCGCTTCAATTGTTGAAATCAGTGCAAGCACGTCATTCAACGGAAGCTCGT

**Lc7: *Lactobacillus casei***

GCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCA  
TTTCACCGCTACACATGGAGTTCCTACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCGCTTCTCGGT  
TAAGCCGAGGGCTTTACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACG  
CTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTGGATACCGTACGCGG  
ACAACAGTTACTCTGCGACCAATCTTCTCCAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCCTTCTTCACTCAGCGG  
GCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTGGGCCGTGT  
CTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCCTTGGTGGAGCGGTACCTCACC  
ACTAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCAGCCAAGAACCATGCGGTT  
TTGGATCTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCACTTAAAGGGCAGGTTACCCACGTGTACTC  
ACCCGTCGCGCACTCGTTCATGTTGAAATCTCGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAGAAGCTCGTTCGACTTGCA  
TGAT

**Lc8: *Lactobacillus brevis***

CTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACTAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCAT  
TCCACCGCTACACATGGAGTTCCTACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGT  
AAGCCGAAGGCTTTACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCG  
TTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAACCCCT  
GAACAGTTACTCTCAAAGGTGTCTTCTTTAAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCAGCGG  
CATTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTGGGCCGTGTCT  
CAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCCGCTACGTATCATCGTCTTGGTGGGCCCTTACCTCACC  
TAACTAATACGCCGCGGGATCATCCAGAAGTGATAGCCGAAGCCACCTTCAAACAAAATCCATGCGGATTTT  
GTTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCTGCTTCTGGGCAGATTTCCCACGTGTACTCAC  
CAGTTCGCCACTCGCTTCAATTGTTGAAATCAGTGCAAGCACGTCATTCAACGGAAGCTCGTTCGACTTGCATGT  
ATTAGG

**Lc9: *Lactobacillus brevis***

CTCAGCGTCAGTTACAGACTAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCT  
ACACATGGAGTTCCTACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTAAGCCGA  
GGCTTTACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCACCT  
ACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAACCCCTGAACAGTTA  
CTCTCAAAGGTGTCTTCTTTAAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCAGCGGCAATTGCTCC  
ATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCA  
ATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCCGCTACGTATCATCGTCTTGGTGGGCCCTTACCTCACCACCTAATAAT  
ACGCCGCGGGATCATCCAGAAGTGATAGCCGAAGCCACCTTCAAACAAAATCCATGCGGATTTGTTGTTAT  
ACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCTGCTTCTGGGCAGATTTCCCACGTGTACTCACCAGTTCCG  
CACTCGCTTCAATTGTTGAAATCAGTGCAAGCACGTCATTCAACGGAAGCTCGTTCGACTTGCATGT

**LCW2: *Enterococcus durans***

GCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCG  
CTACACATGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCGGTTGAGCCGG  
GGGCTTTACATCAGACTTAAAGAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCACCT  
TACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAAGGGATGAACAGTT  
ACTCTCATCCTTGTCTTCTTAAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCAGCGGCGTTGCTCG  
GTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCA  
ATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGCTATGCATCGTRGCCTTGGTGGAGCCGTTACCTCACCACCTAGCTAAT  
GCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTCAAATCAAACCATGCGGTTTCGATGTTAT  
ACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCTGCTGATGGGCAGGTTACCCACGTGTACTCACCCTTCGCG  
CACTCTTCTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGGAAAAAGAAGCGTACGACTTGCATGTATTAGG

**LCW20: *Enterococcus italicus***

AGTTGAACGCTTCTTTCTTATCGAACTTCGGTTACCAAGAAAGAAGAGTAGCGAACGGGTGAGTAACACGTG  
GGTAACCTGCCATCAGCGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAATACTTTTTCTCATGA  
GTGAAAGTTGAAAGGCGCTTTTGCCTACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACG  
GCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG  
ACTCTACGGGAGGACAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGT  
GAAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAACCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAAGAGAATGTTTCATCCCTTG  
ACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT  
CCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGG  
GAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGC  
GTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAAC

**LCW29: *brevibacterium lutescens***

CTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGCCCAGAGTCCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCTCTGATATCTGCGCATT  
TCACCGCTACACCAGGAATTCAGACTCCCCTACTGCCTTAGTCAGCCCGTACCCACTGCACGCGCAACGTT  
AAGCGTTGCGTTTTCCACAGCAGACGTGACCAACCACCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATCCGGACAACGC  
TTGTACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGGTACTTCTCTGACGGTACCCTCACTTTCCG  
TTCTTCCCTACTGAAAGCGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCGCACGCGCGTCTGCTGCATCAGGGTTCCC  
CCCATTGTGCAATATTCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTC  
GCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCTGCTGCTTGGTAGGCCACTACCCCAACAAACTGATAGGCCGCGAGT  
CCATCCCAACCAGTAAAACCTTTCCACCACCAGACCATGCGGCCAGTAGTCATATCCGGTATTAGACCCAGT  
TTCCCAGGCTTATCCCGAAGTCAGGGGACAGTTACTACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTCATCCACACCA  
GCAAGCTGGATGCTTCAGCGTTCGACTTGCAAT

**LCW3: *Enterococcus faecalis***

CTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCT  
ACACATGGAATTCCTCTCTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCCTCCCGGTTGAGCCGGG  
GGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAAATCCGGACAACGCTTGCCACCT  
ACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAAGGGATGAACAGTTA  
CTCTCATCTTGTCTTCTCTAACAAACAGAGTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGCGTGTGCTCGG  
TCAGACTTTCGTCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGCTCAGTCCCAA  
TGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTRGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGTAAATG  
CACCCGCGGTCACCTCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTTCGATTGTTATAC  
GGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCTTCTGATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGA  
CTCTTCTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGGAAAAAGAAGCGTACGACTTGCAATGATTAG

**LCW34: *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides***

ATACATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAG  
TGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAACTTAGTGTGCA  
TGACACAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTA  
AAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC  
CAAACCTCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGT  
GTGATGAAGGCTTTCCGGTTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAGCTAGAAATAGGAAATGATTTTAGTTT  
GACGGTACCATAACCAGAAAAGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTA  
TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCC  
GGAATGGCATTGGAACCTGGTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGC  
GTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCCGCTTACTGGACTGCAACTGACG

**LCW4: *Enterococcus durans***

AGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACC  
GCTACACATGGAATTCCTCTCTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCCTCCCGGTTGAGCCG  
GGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAAATCCGGACAACGCTTGCCA  
CCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAAGGGATGAACAG  
TTACTCTCATCTTGTCTTCTTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCTGCT  
CGGTGAGACTTTTCGTCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGCTCAGTCC  
CAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTRGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTA  
ATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTTCGATTGTT  
ATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCTTCTGATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTT  
GCCACTTCTTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGGAAAAAGAAGCGTACGAC

**LCW43: *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides***

AGTCGAACGCACAGCGAAAAGGTGCTTGACCTTTCAAGTGAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAAAC  
CTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTGCGATGACACAA  
AGTAAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCA  
CCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCT  
ACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAA  
GGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTAGTTGACGGTAC  
CATACCAGAAAAGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATT  
TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGAGCTCAACTCCGGAATGGC  
ATTGAAAAGTGGTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATAT  
ATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAG

**LCW5: *Enterococcus durans***

AGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTCCATATATCTACGCATTTACC  
GCTACACATGGAATCCACTCTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCG  
GGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCCAATAAAATCCGGACAACGCTTGCCA  
CCTACGTATTACCGCGCTGCTGGCAGTGTAGTACCCGTGGCTTCTGGTTAGATACCGTCAAGGGATGAACAG  
TTACTCTCATCTTGTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGCGTTGCT  
CGGTCAGACTTTTCGTCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCC  
CAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTRGCTTGGTGGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTA  
ATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTTCGATTGTT  
ATACGGTATTAGCACCTGTTTCAAAGTGTATCCCTTCTGATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTTT  
GCCACTCTTCTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGGAAAAAGAACGCTACGACTTGCATGTATTAG

**Lv1: *Enterococcus faecalis***

GTCGAACGCTTCTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGT  
GGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGAAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCAT  
GGCATAAGAGTGAAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT  
AACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC  
CCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGT  
GAGTGAAGAAGTTTTCCGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCC  
CTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  
TGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAAGCCCCGGCTCAACC  
GGGAGGGTCAATTGAAAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAA  
TGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCT

**Lv2: *Enterococcus faecalis***

GTCGAACGCTTCTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGT  
GGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGAAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCAT  
GGCATAAGAGTGAAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT  
AACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC  
CCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGT  
GAGTGAAGAAGTTTTCCGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCC  
CTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  
TGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAAGCCCCGGCTCAACC  
GGGAGGGTCAATTGAAAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAA  
TGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCT

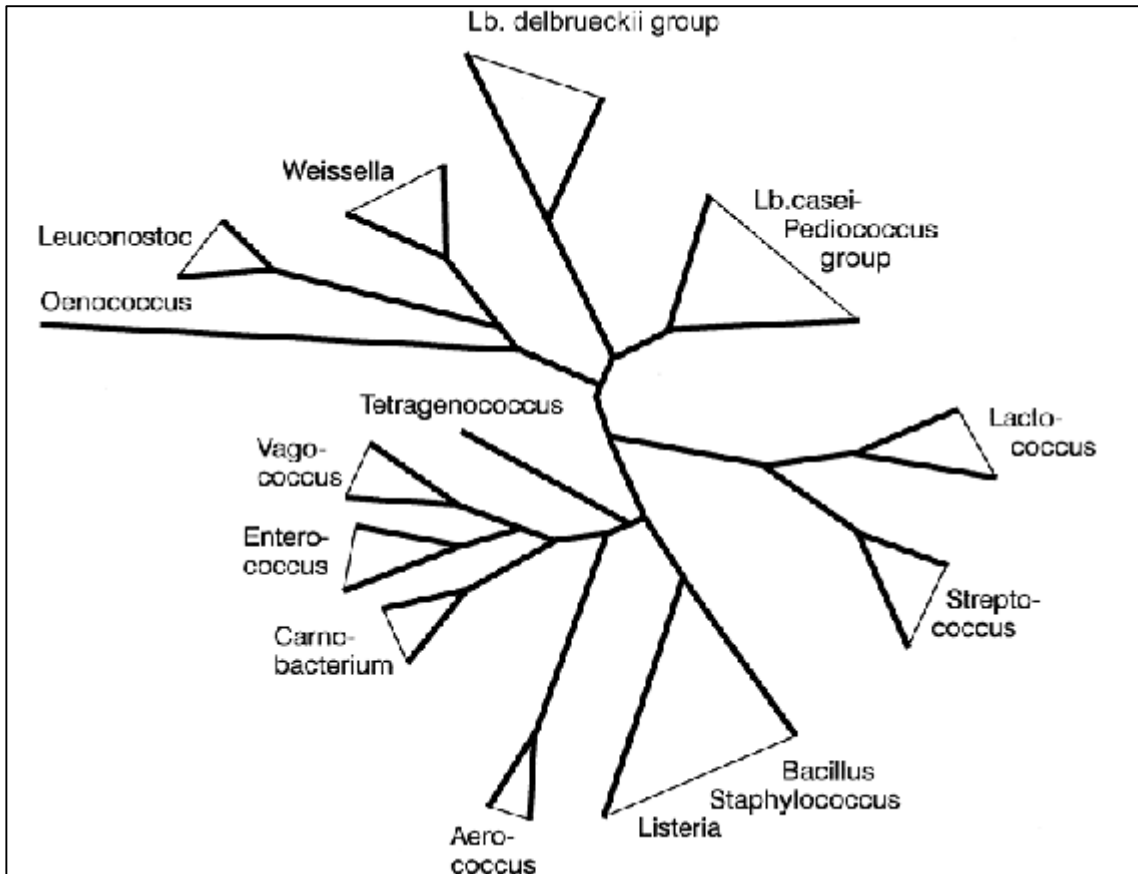
**Lv3: *Enterococcus faecalis***

GGCGTGCCTAATACATGCAAGTGAACGCTTCTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGAGGAGTGGC  
GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGAAAACAGGTGCTAATACCG  
CATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTG  
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCT  
TGACCGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGAC  
GTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTA  
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGT  
GAAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAAT  
TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAC  
TGACGCTGAG

***Lc24: Lactobacillus brevis***

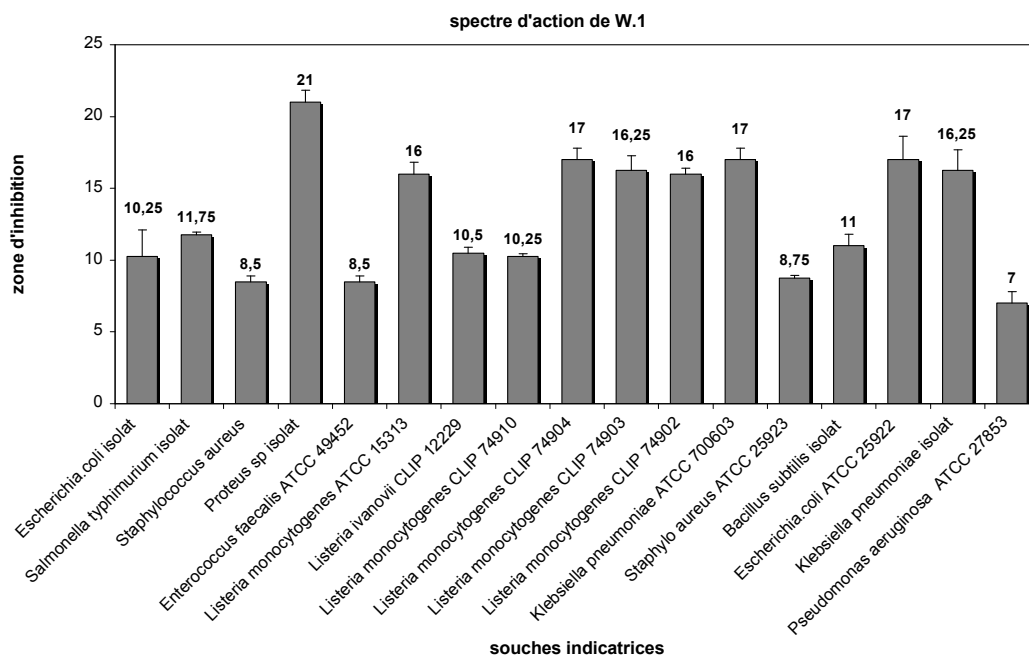
AGCCTCAGCGTCAGTTACAGACTAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCCACC  
GCTACACATGGAGTTCCTACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTAAGCCG  
AAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAAATCCGGACAACGCTTGCCA  
CCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAACCCTTGAACAG  
TTACTCTCAAAGGTGTTCTTCTTAAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCATTGCT  
CCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTGGGCGGTGTCTCAGTCC  
CAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATCGTCTTGGTGGGCCTTACCTCACCAACTAACTA  
ATACGCCGCGGGATCATCCAGAAGTGATAGCCGAAGCCACCTTCAAACAAAATCCATGCGGATTTTGTGTT  
ATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCTGCTTCTGGGCAGATTCCCACGTGTTACTCACCAGTTC  
GCCACTCGCTTCATTGTTGAAATCAGTGCAAGCACGTCATTCAACGGAAGCTCGTTCGACTTGCATGTATTAGG  
CATGCC

**Annexe 4 :** Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Salminen et *al.*, 2004).

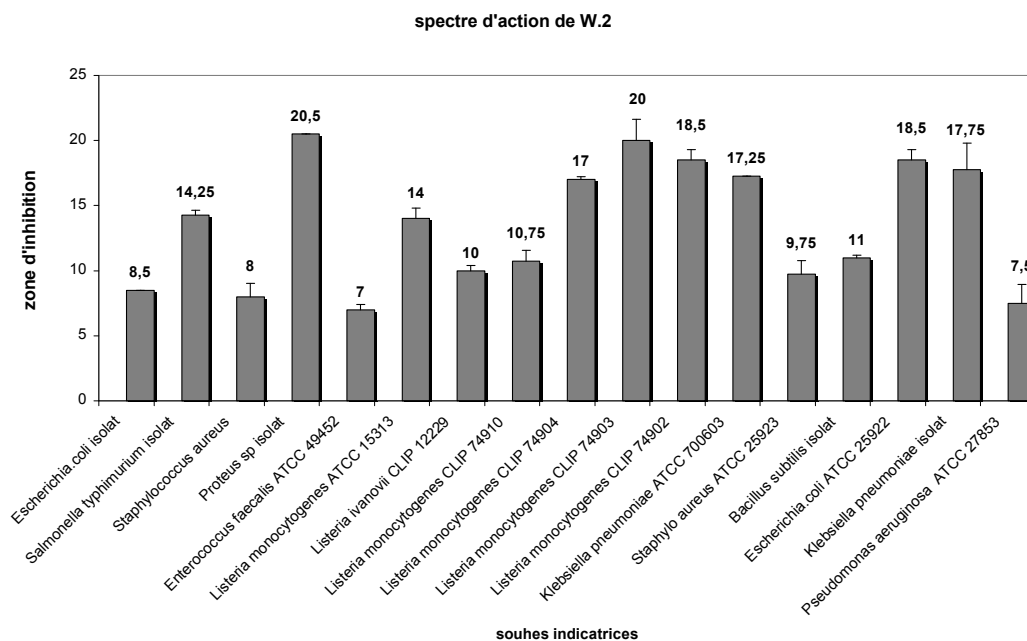




## Annexe 6 : Effet des 12 souches lactiques performantes sur les bactéries indésirables.

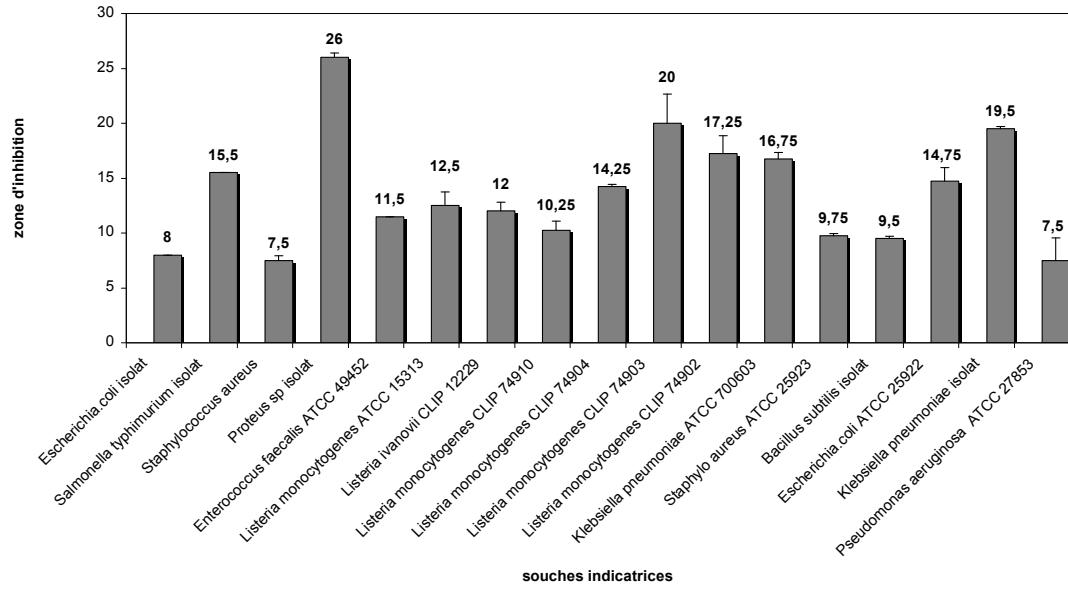


### Spectre d'activité de la souche LCW1



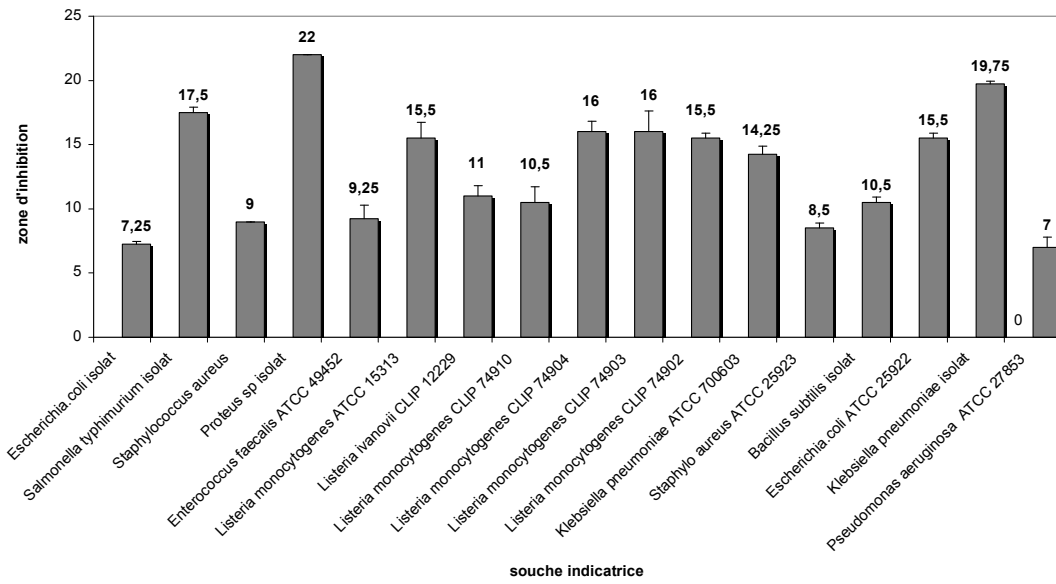
### Spectre d'activité de la souche LCW2

spectre W.3



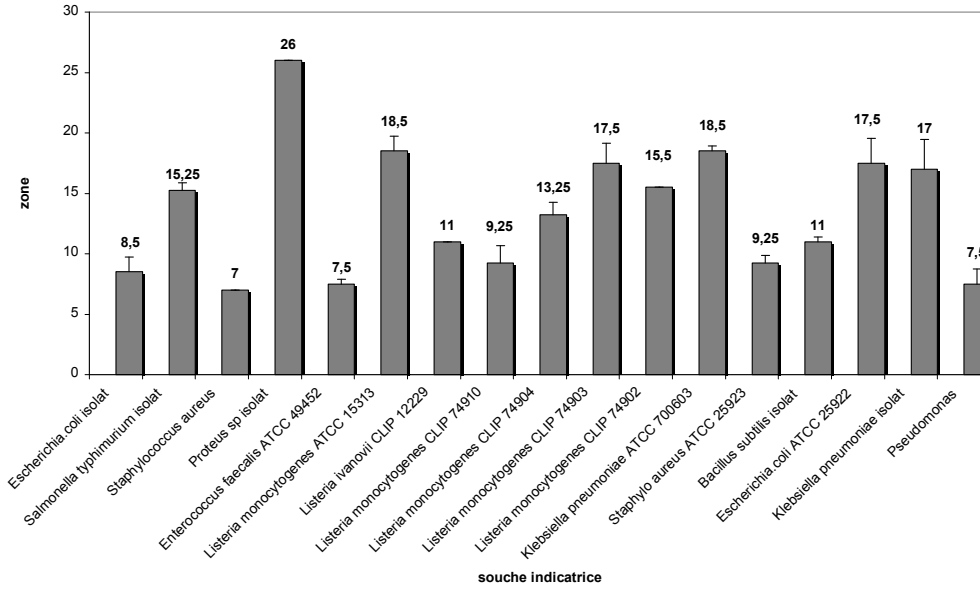
Spectre d'activité de la souche LCW3

spectre w4



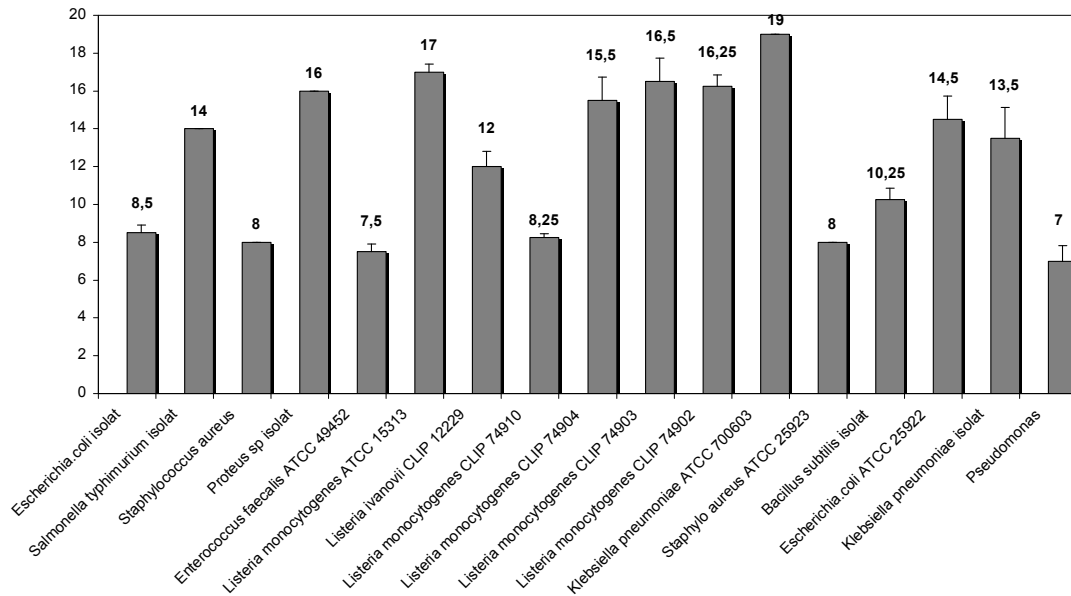
Spectre d'activité de la souche LCW4

spectre d'activité de LCW 5

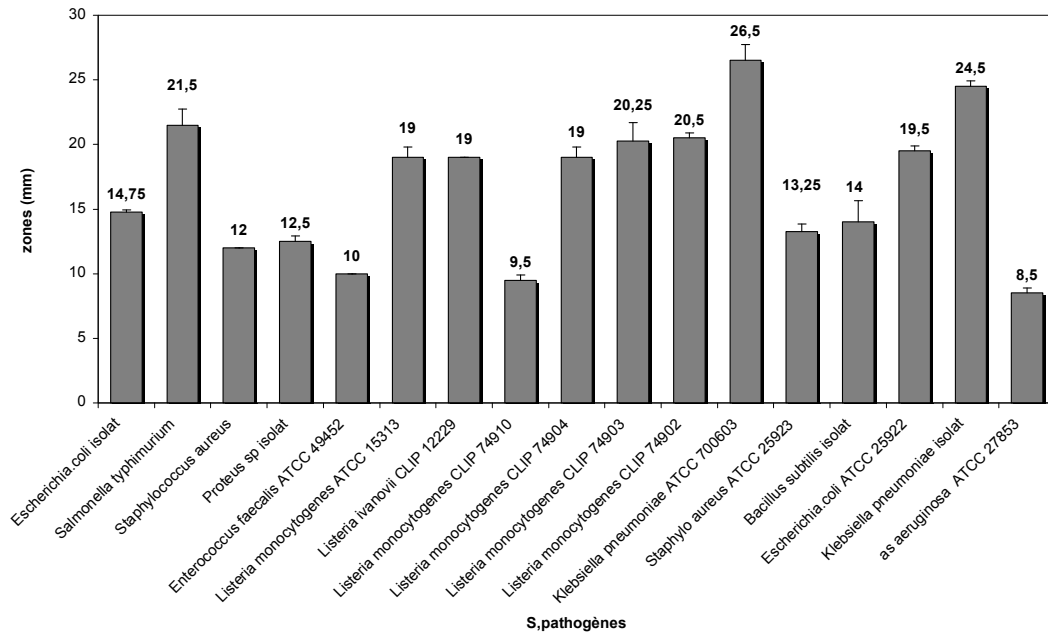


Spectre d'activité de la souche LCW5

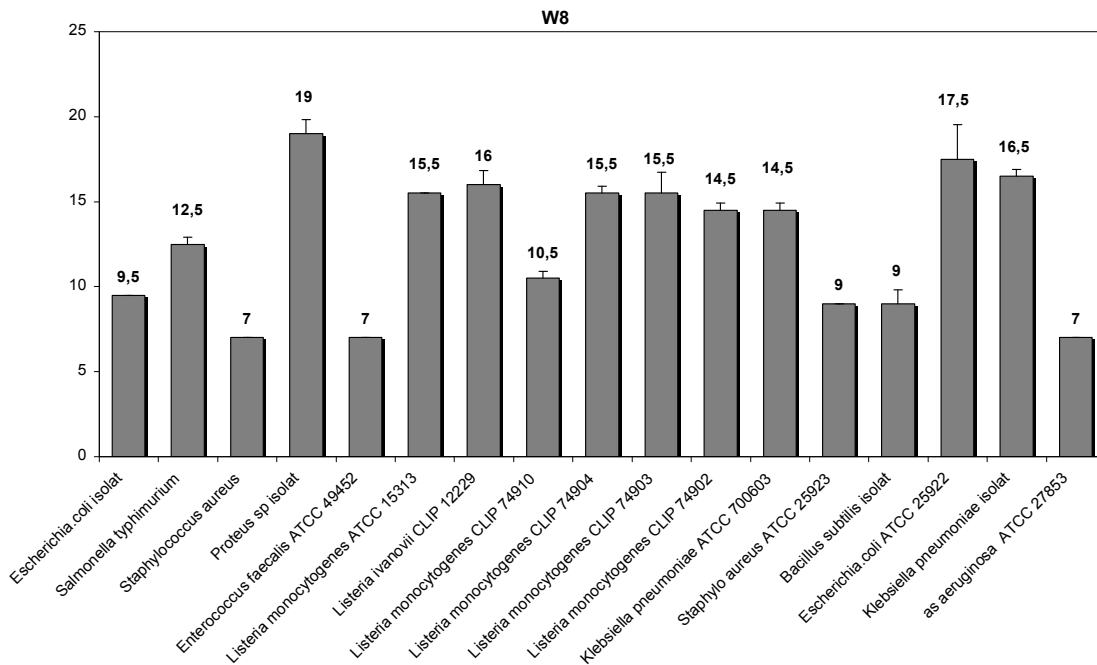
spectre de LCW 6



Spectre d'activité de la souche LCW6

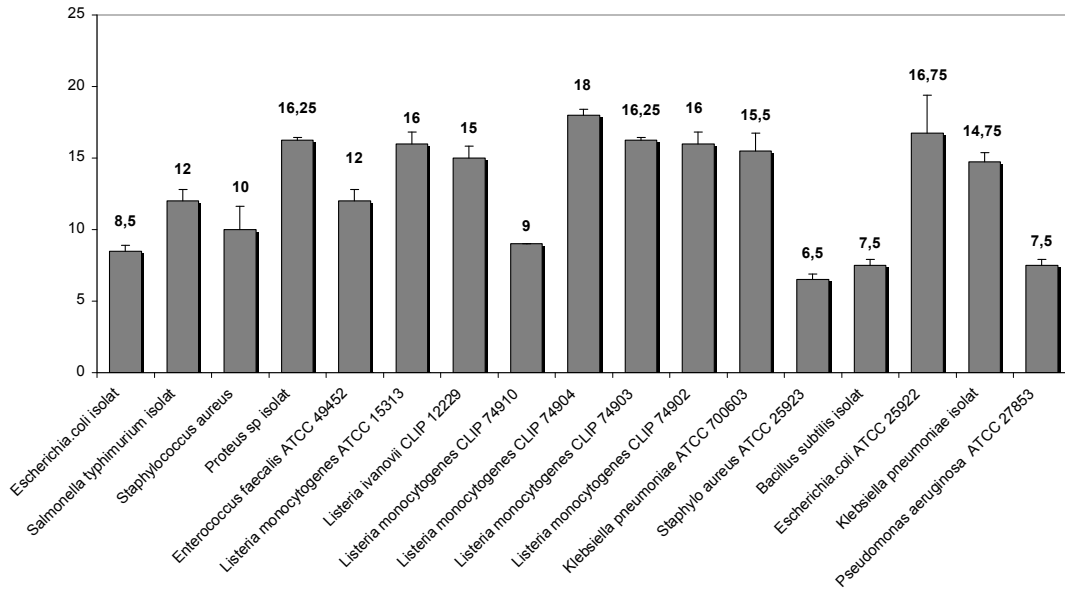


### Spectre d'activité de la souche LCW7



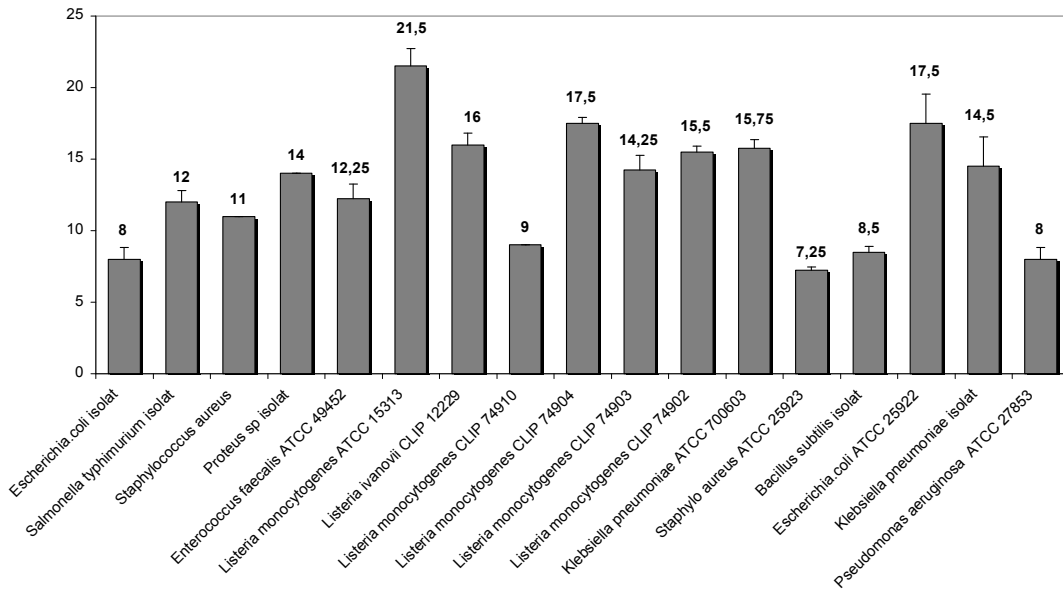
### Spectre d'activité de la souche LCW8

**W9**



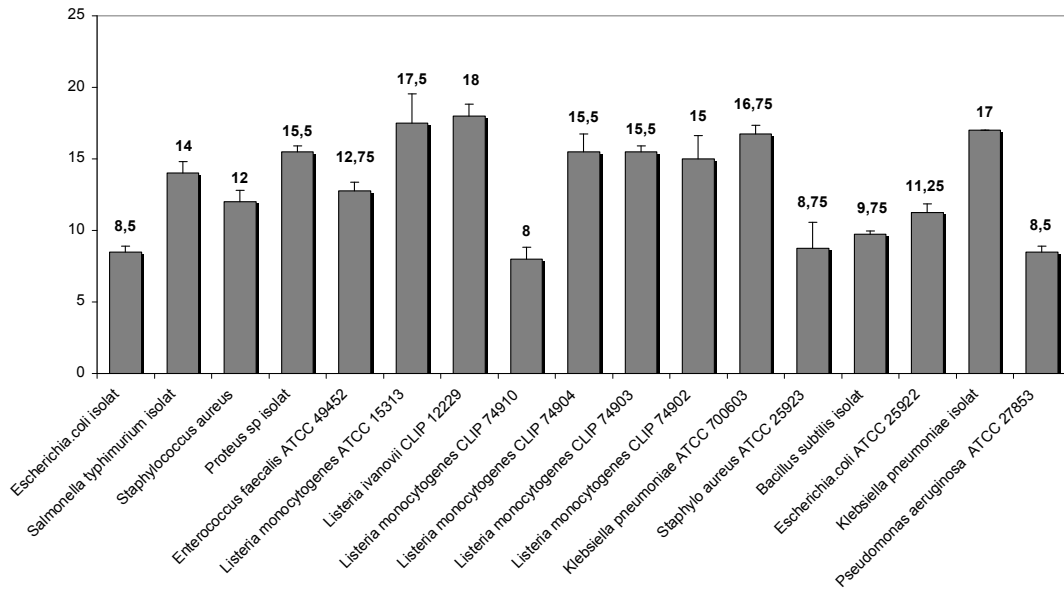
**Spectre d'activité de la souche LCW9**

**W10**

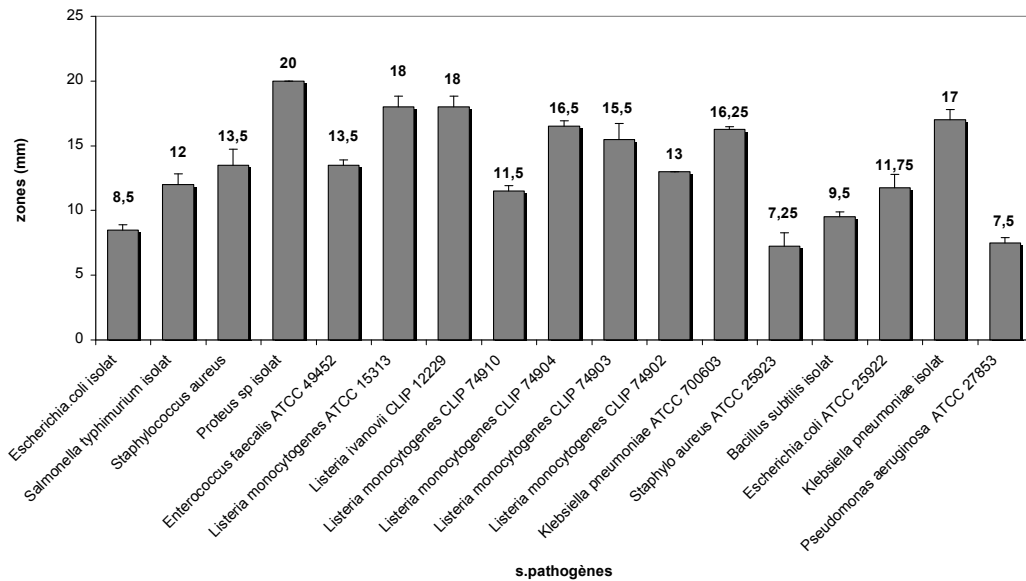


**Spectre d'activité de la souche LCW10**

W25



Spectre d'activité de la souche LCW25



Spectre d'activité de la souche LCW44

