

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية والشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Ibn Khaldoun –Tiaret–

Faculté Sciences de la Nature et de la Vie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : "Biotechnologie "

Spécialité: "Biotechnologie microbienne"

Présenté par :

BOUGUEFAH ASMAA

DJELAILI FATIHA

THEME

**Activité antimicrobienne d'un emballage
Actif à base de PHBV((polyhydroxybutyrate - co-
hydroxyvalerate), incorporé de l'huile essentielle de
thym .**

Soutenu publiquement le 21/06/2023

Jury:

Grade

Président: Mr. YEZLI. W

MCA .Université de Tiaret

Examinatrice: Mme. BOUBAKEUR. B

MCA Université de Tiaret

Encadrant : Mme. MEDJEBER.N

MCB Université de Tiaret

Année universitaire 2022-2023

Remerciements

Nous remercions Allah le tout puissant, qu'il nous guide sur la bonne voie

Ainsi nous remercions notre encadrant Mme .MEDJEBER. N pour tous ses conseils et ses orientations pour la réalisation de ce travail.

Aux membres du jury qui ont bien voulu lire et évaluer le présent Mémoire

Dr «YEZLI. W »pour accepter de présider ce jury.

Mme «BOUBKEUR. B »d'avoir accepté d'être l'examinatrice de notre travail.

Nos vifs remerciements aux responsables du département d'écologie et Environnement et biotechnologie pour leurs aides et orientations durant notre formation.

. Nos remerciements à madame Leila pour sa gentillesse et pour sa sympathie

Et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace



Je dédie ce travail, Mes chers parents, pour leurs dévouements, leurs amours, leur compréhension, leurs sacrifices, leur tendresse, leurs prières et leur patience à mon égard.

Mes chers frères FETHI ET YACINE et sœurs ZAHIRA ET KARIMA : Pour leur soutien durant toute la période de nos études.

Mes amis : Djelaili Fatiha et Abderrahim Karima pour leur compagnie et les bons moments passés ensemble.

Mes camarades de classe (promotion 2022-2023).

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Asmaa

Dédicace



*À mes chers parents, pour leur dévouement, leurs amours, leur compréhension,
leurs sacrifices, leur tendresse, leurs prières et leur patience à mon égard.*

À ma très chère sœur Zahia et son mari Ameer

À toute la famille Djelaili et mon fiancé Mohamed et la famille Abzouzi

Et à tous mes proches sans exception, Asma, Narimen, Manel, Rania

Ikram, Asma et Amina

*Toute la promotion de Biotechnologie microbienne (2022-2023).
Tous ceux qui ont contribué à m'aider à la réalisation de ce mémoire*

Fatima

Résumé

L'emballage alimentaire mérite aujourd'hui une mobilisation importante pour faire évoluer les matériaux et les technologies vers des solutions plus respectueuses à la fois de l'environnement et du consommateur. Les emballages actifs et biodégradables est une solution très prometteuse.

Notre étude vise à déterminer l'activité antimicrobienne d'un mélange actif d'huile essentielle de thym incorporé dans le PHBV (Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate)), en utilisant la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

Ce mélange actif a montré son efficacité contre de nombreux types de micro-organismes, y compris les bactéries et les champignons.

Nos résultats ont dévoilé que l'activité antimicrobienne dépend surtout de la concentration d'huile essentielle dans le polymère et la souche testée. Ainsi, les films contenant 20% de HET ont donné une activité inhibitrice plus élevée que celles avec 10% et 5%.

L'évaluation d'activité antifongique de ces films a donné des inhibitions plus importantes que celles obtenues avec les bactéries. Une zone d'inhibition maximale de 77 mm a été obtenue avec la souche *F.oxysporum* (MG973096), tandis qu'une zone d'inhibition de 60 mm a été détectée avec *Aspergillus flavus*.

Pour les souches bactériennes, *S. aureus* ATCC43300 et *B.cereus* ATCC14579 se sont révélées les plus sensibles, avec un diamètre d'inhibition maximal de (38 mm) tandis que la souche *P.aeruginosa* ATCC9027 a montré une inhibition de (32,5 mm) et *E. coli* ATCC25922 (25 mm).

Mots-clés : Emballage actif, activité antimicrobiennes, PHBV (polyhydroxybutyrate - CO-hydroxyvalérate), huile essentielle de thym.

Abstract

Food packaging deserves significant mobilization today to develop materials and technologies towards solutions that are more respectful of both the environment and the consumer. Active and biodegradable packaging is a very promising solution.

Our study aims to determine the antimicrobial activity of an active blend of thyme essential oil incorporated into PHBV (Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)) using the agar diffusion method.

This active blend has demonstrated its effectiveness against various types of microorganisms, including bacteria and fungi.

Our results revealed that the antimicrobial activity mainly depends on the concentration of essential oil in the polymer and the tested strain. Thus, films containing 20% of HET exhibited higher inhibitory activity than those with 10% and 5%.

The evaluation of antifungal activity of these films yielded greater inhibitions compared to those obtained with bacteria. A maximum inhibition zone of 77 mm was obtained with the *F.oxysporum* strain (MG973096), while an inhibition zone of 60 mm was detected with *Aspergillusflavus*.

For bacterial strains, *S. aureus* ATCC43300 and *B. cereus* ATCC14579 were found to be the most sensitive, with a maximum inhibition diameter of 38 mm, while the *P.aeruginosa* ATCC9027 strain showed an inhibition of 32.5 mm, and *E. coli* ATCC25922 showed an inhibition of 25 mm.

Key words: Active packaging, antimicrobial activity, PHBV (polyhydroxybutyrate - CO-hydroxyvalerate), thyme essential oil.

ملخص

يستحق التغليف الغذائي حاليًا تعبئة كبيرة لتطوير المواد والتقنيات نحو حلول أكثر احترامًا للبيئة و المستهلك. تعتبر التغليفات النشطة والقابلة للتحلل حلاً واعدًا جدًا.

تهدف دراستنا إلى تحديد النشاط المضاد للميكروبات لمزيج نشط من زيت الزعتر المضاف إلى PHBV بولي هيدروكسي بيوتيرات - كو-هيدروكسي فاليرات)، باستخدام طريقة الانتشار على وسط جيلي.

أظهر هذا المزيج النشاط فعاليته ضد العديد من أنواع الميكروبات، بما في ذلك البكتيريا والفطريات .

كشفت نتائجنا أن النشاط المضاد للميكروبات يعتمد بشكل أساسي على تركيز زيت الزعتر في البوليمر والسلالة المختبرة. بالتالي، أظهرت الأفلام التي تحتوي على 20٪ HET نشاطًا مثبتًا أعلى من تلك التي تحتوي على 10٪ و 5٪ .

تقييم نشاط هذه الأفلام المضادة للفطريات أظهر تثبيطًا أكبر من تلك المحصلة مع البكتيريا. تم الحصول على منطقة تثبيط قصوى بقطر 77 ملم مع سلالة (*F. Oxysporum*(MG973096) ، بينما تم اكتشاف منطقة تثبيط بقطر 60 ملم مع *Aspergillus flavus*.

بالنسبة للسلاطات البكتيرية، تبين أن سلالات *S. aureus* ATCC43300 و *B. cereus* ATCC14579 هما الأكثر حساسية، حيث بلغ قطر التثبيط الأقصى (38 ملم)، في حين أظهرت سلالة *P. aeruginosa* ATCC9027 تثبيطًا (32.5 ملم) وسلالة *E. Coli* ATCC25922 (25 ملم).

الكلمات المفتاحية: التغليف النشط، لنشاط المضاد للميكروبات، بولي هيدروكسي بيوتيرات - كو-هيدروكسي فاليرات ، زيت الزعتر الأساسي .

Liste d'abréviations

PHA :	Poly (hydroxyalcanoates)
PHBV:	Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate)
HET :	Huile essentielle de thym
GN :	Gélose nutritif
H₂O₂ :	Peroxyde d'Hydrogène
PDA :	Potato Dextrose Agar
ONPG :	Orthonitrophényl-B-D-galactopyranoside

Liste des tableaux

Tableau n°01: Matériel, milieux de culture et produits chimiques.....	03
Tableau n°02 : Codes des souches microbiennes	05
Tableau n°03 : Résultats d'identification des souches bactériennes.....	17
Tableau n°04 : Diamètres des zones d'inhibition des 04 souches étudiées	21
Tableau n°05 : Diamètre des zones d'inhibition en mm des deux souches fongiques....	24

Liste des figures

Figure n°01 : Huile essentielle de thym (HET) « PURE NAISSANCE Algérie ».....	04
Figure n°02 : Structure chimique du PHBV.....	04
Figure n°03 : Organigramme récapitulatif du protocole expérimental.....	07
Figure n°04 : Etapes de préparation des films de PHBV.....	08
Figure n°05 : Aspect macroscopique d' <i>A. flavus</i> sur milieu PDA.....	13
Figure n°06 : Aspect macroscopique de <i>F. oxysporum</i> sur milieu Sabouraud.....	13
Figure n°07 : Aspect microscopique d' <i>E. Coli</i> (× 100)	14
Figure n°08 : Aspect microscopique de <i>S. aureus</i> (×100)	14
Figure n°09 : Aspect microscopique de <i>P. aeruginosa</i> (×100)	15
Figure n°10 : Aspect microscopique de <i>B. cereus</i> (×100)	15
Figure n°11 : Aspect microscopique d' <i>A. flavus</i> (×40)	16
Figure n°12 : Aspect microscopique de <i>F. oxysporum</i> (×40)	16
Figure n°13 : Résultat du test catalase.....	17
Figure n°14 : Résultat de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HET sur <i>S.aureus</i> . (E1, E2)	18
Figure n°15 : Résulta de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HET sur <i>E.coli</i> (E1, E2)	19
Figure n°16 : Résulta de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HET sur <i>P.aeruginosa</i> (E1, E2)	19
Figure n° 17 : Résulta de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HET sur <i>B .cereus</i> (E1, E2)	19
Figure n° 18 : Résultats des diamètres d'inhibition des films de PHBV incorporés d'HET vis-à-vis les quatre souches étudiées.....	21
Figure n°19 : Résultats de l'activité antifongique des films de PHBV incorporés d'HET sur <i>Fusariumoxysporum</i>	23
Figure n°20 : Résultats de l'activité antifongique des films de PHBV incorporés d'HET sur <i>Aspergillus Flavus</i>	23
Figure n°21 : Résultats des zones d'inhibition des films de PHBV additionnés d'HET vis-à-vis les deux souches fongiques étudiées.....	25

Table de matières

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Liste des figures

Introduction

Chapitre 1:

Matériel et méthodes

I.1. Objectif du travail	3
I.2. Durée et lieu de travail	3
I.3. Matériel et produits	3
I.3.1. Huile essentielle de thym.....	4
I.3.2. Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) PHBV	4
I.3.3. Micro-organismes	5
I.3.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	5
I.3.3.2. <i>Pseudomonasaeruginosa</i>	5
I.3.3.3. <i>Bacillus cereus</i>	5
I.3.3.4. <i>Escherichia coli</i>	6
I.3.3.5. <i>Aspergillus flavus</i>	6
I.3.3.6. <i>Fusarium oxysporum</i>	6
I.4. Protocole expérimentale	7
I.5. Méthodes.....	8
I.5.1. Préparation des films de PHBV.....	8
I.5.2. Identification des micro-organismes	9
I.5.2.1. Examen macroscopique	9
I.5.2.2. Examen microscopique	9
I.5.2.3. Identification biochimique.....	9
I.5.2.3.1. Test d'oxydase.....	9
I.5.2.3.2. Test catalase	10
I.5.2.3.3. Test ONPG	10

I.5.3. Préparation des suspensions microbiennes.....	11
I.5.3.1. Préparation des suspensions bactériennes	11
I.5.3.2. Préparation des suspensions fongiques	11
I.5.4. Activité antimicrobienne	11

Chapitre 2

Résultats et discussion

II.1. Identification des souches microbiennes.....	13
II.1.1. Observation macroscopique des champignons.....	13
II.1.2. Identification microscopique	14
II.1.3. Résultats des tests biochimiques	17
II.1.3.1. Test d'oxydase	17
II.1.3.2. Test catalase	17
II.1.3.3. Test d'ONPG	17
II.2. Activité antibactérienne de PHBV incorporé d'HET.....	18
II.3. Activité antifongique des films de PHBV incorporés de l'HET	22

Conclusion

Référence bibliographique

Annexe



Introduction

Introduction

La pollution plastique est une menace directe pour notre monde aujourd'hui, en raison des graves effets sur la biodiversité, car les matières plastiques entrent dans les emballages et emballages alimentaires, qui sont des sources non renouvelables et non biodégradables qu'au fil des ans, et donc une alternative respectueuse de l'environnement doit être trouvée.

Ces dernières années, les polymères biodégradables obtenus à partir de ressources renouvelables ont attiré beaucoup d'attention, résultant de la prise de conscience mondiale du respect de l'environnement et du problème de l'épuisement des ressources fossiles. La recherche, le développement et la production de biopolymères sont les plus rapides depuis plusieurs années (**VromanetTighzert, 2009**)

Les polymères sont des matériaux constitués de très longues chaînes (macromolécules). Elle-même formée de molécules élémentaires (monomères) assemblées entre elles. Ces chaînes sont constituées principalement d'atomes de carbone attachés à des éléments tels que l'hydrogène ou l'oxygène (**Yahaoui, 2020**). La biodégradabilité d'un matériau est définie comme la capacité inhérente à être dégradé par l'attaque des micro-organismes, en simplifiant progressivement sa structure et en la convertissant éventuellement en CO₂, H₂O et/ou CH₄ et une nouvelle biomasse. (**Chikh, 2018**)

Le PHA (polyhydroxyalcanoate) est une famille de bio polymère intracellulaire synthétisé par de nombreuses bactéries comme source de stockage d'énergie et de carbone. Ils sont principalement produits à partir de ressource renouvelables par fermentation. Leurs propriétés sont proches de celles des plastiques conventionnels à base de pétrole. Le poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) ou PHBV est un biopolymère appartenant cette famille.

Ils sont considérés comme des biomatériaux biodégradables et biocompatibles au contact des tissus vivants. Ils peuvent être utilisés dans divers domaines ; applications biomédicales, agriculture, automobile, pharmaceutique, emballage alimentaire (**Avérous, 2013**).

Dans notre vie quotidienne, le plastique est principalement utilisé dans les emballages alimentaires, ils sont essentiels et omniprésents car presque tous les aliments sont emballés d'une manière ou d'une autre. Sans emballage, la sécurité et la qualité des aliments seraient compromises.

Les Emballage passifs ont pour fonctions ; la sécurité des aliments, la protection, la praticité et la communication tandis que les emballages actifs offrent une protection active libérant en permanence des composés actifs tels que des antioxydants, des agents antimicrobiens, des enzymes, des arômes et des produits nutraceutiques(**Yahyaoui, 2020**).

Introduction

Les emballages actifs et les emballages bioactifs, impliquent une interaction intentionnelle avec l'aliment ou son environnement, l'avancement de nouvelles technologies d'emballage alimentaire implique le retardement de l'oxydation, prolonge la durée de conservation des aliments, préserve la saveur et réduit les niveaux d'additifs et de conservateurs, tout en maintenant la qualité du produit (**Majid et al., 2016**). Donc l'emballage actif est l'un des concepts innovants qui ont été introduits en réponse aux changements continus du monde actuelle des consommateurs et des tendances du marché (**Quintivalle, 2002**).

L'emballage antimicrobien est une forme d'emballage actif. Il interagit avec le produit pour réduire inhiber ou retarder la croissance des micro-organismes qui peuvent être présents dans l'aliment emballé ou le matériau de l'emballage lui-même (**Appendini et Hotchkiss, 2002**). Parmi les substances actives ajoutées dans les emballages, les huiles essentielles, telles que ; l'huile essentielle de clou de girofle, thym, citrus, Romarin

Les huiles essentielles sont des produits issus de plantes aromatiques avec une composition complexe. Notamment l'huile essentielle de thym, qui possède de nombreuses propriétés, surtout des propriétés antibactériennes, antifongiques et antiparasitaires. Les substances antimicrobiennes présentes dans cette huiles vont agir sur différentes cibles, ils sont capables d'inhiber la reproduction des microorganismes ou de les détruire (**Martins, 2020**).

Les aliments sont plus susceptibles d'être contaminés par des bactéries et des champignons, qui se multiplient rapidement dans les aliments et qui les rendent inutilisables. Parmi ces espèces ; (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus flavus*, *Fusariumoxysporum*,).

Le but de notre étude est d'évaluer l'intérêt de fusion entre le PHBV (*Le poly(3-hydroxybutyrate- Co -3-hydroxyvalérate)*) et l'huile essentielle de thym et de déterminer la capacité de protéger l'aliment contre certains microorganismes.



Chapitre I:

Matériels et méthodes

I.1. Objectif du travail

Cette présente étude s'intéresse à évaluer l'effet antimicrobien d'un emballage actif à base de PHBV incorporé d'huile essentielle de thym, dans le but d'augmenter la durée de conservation des aliments.

I.2. Durée et lieu de travail

La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie « Université IBN-KHALDOUN Tiaret », pour une durée allant du 05-02-2023 au 10-03-2023.

I.3. Matériel et produits

Les appareils, produits chimiques, milieux de culture et réactifs nécessaires à la réalisation de la partie expérimentale sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau n°01 : Matériel, milieux de culture et produits chimiques utilisés

Milieux de culture	<ul style="list-style-type: none"> - Gélose nutritive - Sabouraud - PDA - Bouillon nutritif 	<ul style="list-style-type: none"> - King A - Mueller Hinton - Chapman
Appareillage	<ul style="list-style-type: none"> - Bec bunsen - Agitateur magnétique - Vortex - Spectrophotomètre - Microscope - Autoclave - Four Pasteur 	
Matériel	<ul style="list-style-type: none"> - Pincés - Flacon - Pipette graduée - Tube à essais - Seringues stériles - Ecouvillons 	<ul style="list-style-type: none"> - Bêchers - Pipette Pasteurs - Boites de Pétri - Anse de platine
Produits	<ul style="list-style-type: none"> - Eau distillée - Disque ONPG - Lugol - Gentamicine - Eau physiologique - Huile essentiels de Thym 	<ul style="list-style-type: none"> - Métronidazole - Disque Oxydase - PHBV - Fucshine - Chloroforme - Violet de Gentiane

I.3.1. Huile essentielle de thym

L'huile essentielle utilisée dans cette étude, est une huile commerciale pur, « Huile essentielle de thym PURENAISSANCE Algérie ».



Figure n°01 : Huile essentielle de thym (HET)
« PURE NAISSANCE Algérie ».

I.3.2. Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalérate) PHBV

Le poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate), PHBV, est un biopolymère doté d'excellentes propriétés, biocompatibilité et biodégradabilité, c'est l'un des candidats potentiels pour remplacer les polymères dérivés du pétrole (Ariagna et al., 2018).

Le PHBV utilisé dans cette étude se présente sous forme de granules de couleur beige, contenant 8 mol % de l'hydroxyvalérate (HV), commercialisé par Aldrich (Germany).

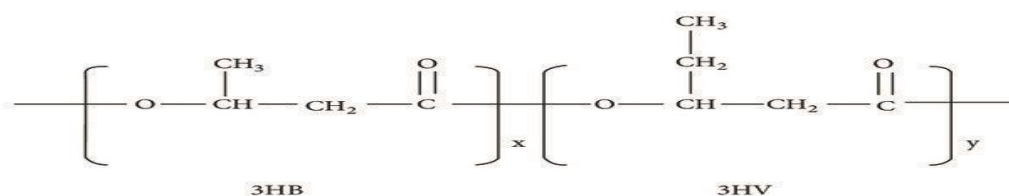


Figure n°02 : Structure chimique du PHBV (Vigneswari et al. 2019)

I.3.3. Micro-organismes

Dans ce présent travail, deux souches fongiques et quatre souches bactériennes ont été utilisées (Tableau 02).

Tableau n°02 : Codes des souches microbiennes

Souches Microbiennes	Code des souches Microbiennes
<i>Echerichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATTCC9027
<i>Fusarium oxysporum</i>	MG973096

I.3.3.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie de la famille des *Micrococcaceae* de forme sphérique (cocci) de 0,5 µm à 1,5 µm de diamètre, à Gram positif se présentent généralement en grappes, par paires ou en cellules individuelles compte tenu de l'âge de la culture. C'est une bactérie non mobile, a sporulée et aérobie facultatif.

I.3.3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* appartient au genre *Pseudomonas*, famille des *Pseudomonadaceae*. C'est une bactérie de forme bacillaire à Gram négatif, aérobie strictes, généralement mobiles grâce à des flagelles polaires, très résistante aux antibiotiques (Veron, 1983).

I.3.3.3. *Bacillus cereus*

Cette bactérie forme des bacilles de grande taille à Gram positif, aérobie facultatif, sporulant, largement distribué dans l'environnement (Edward, 2010).

I.3.3.4. *Escherichia coli*

E. coli est une bactérie polyvalente à Gram négatif, asporulée, forme généralement des petits bacilles fin et allongé à extrémité arrondie, mobile grâce à une ciliature péritriche (**Braz et al., 2020**).

I.3.3.5. *Aspergillus flavus*

Les espèces d'*Aspergillus* sont des mycètes filamenteux imparfaits ubiquitaires ; l'*Aspergillus flavus*, passe la majeure partie de sa vie comme saprophyte dans sol. Il est aussi un microbe pathogène opportuniste. Il contamine également les récoltes et produit des toxines, telles que les aflatoxines (**Halewyn, 2019**).

I.3.3.6. *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum est un champignon d'origine tellurique très ubiquiste, avec une très grande diversité génétique et écologique et qui infecte différents hôtes, provoquant des pertes économiques importantes chez de nombreuses plantes cultivées comme le cotonnier, le melon, la tomate...etc. (**Srinivas et al., 2019**).

I.4. Protocole expérimentale

La démarche expérimentale relative à cette étude est illustrée par l'organigramme suivant :

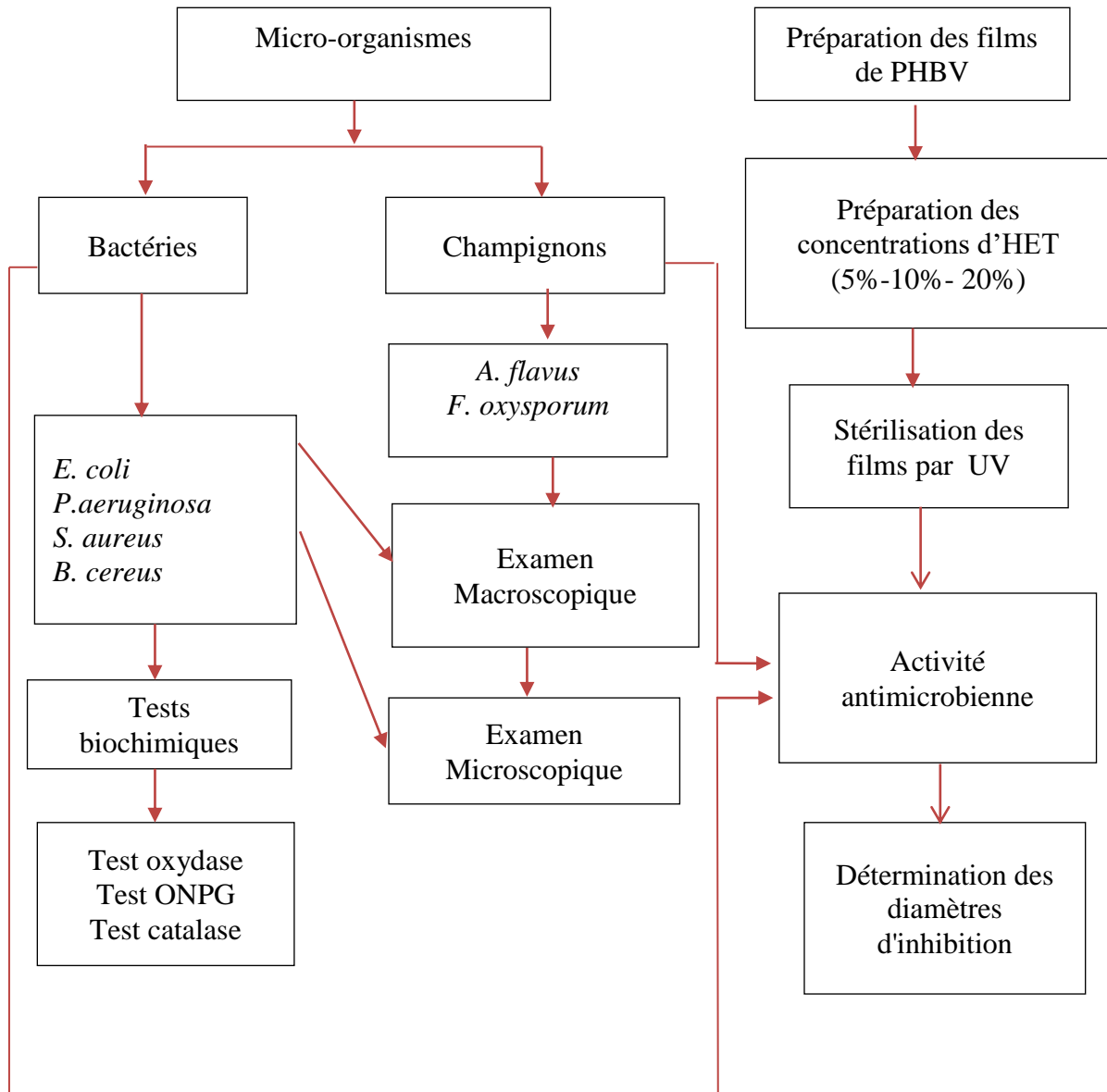


Figure n°03 : Organigramme récapitulatif du protocole expérimental

I.5. Méthodes

I.5.1. Préparation des films de PHBV

Les films de PHBV ont été préparés par la méthode de dissolution dans un solvant. Une solution de 5% a été préparée. Pour cela 5g de PHBV est dilué dans 100 ml de chloroforme, le mélange a été fermé par du papier aluminium pour minimiser l'évaporation du solvant, après homogénéiser sous agitation magnétique à une température de 60°, cette solution a été filtrée, partagée dans des béchers, puis différentes concentrations (5%,10%,20%) d'huile essentielle de thym ont été ajoutées et homogénéisées afin d'étudier l'activité antimicrobienne. Les solutions obtenues ont été versées dans des boîtes de Pétri en verres et recouvertes de papier aluminium perforé et laissées pendant 72h (le temps nécessaires à la formation d'un film mince et sec)

Les films de PHBV incorporé de l'huile essentielle de thym obtenus sont conservés au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation.

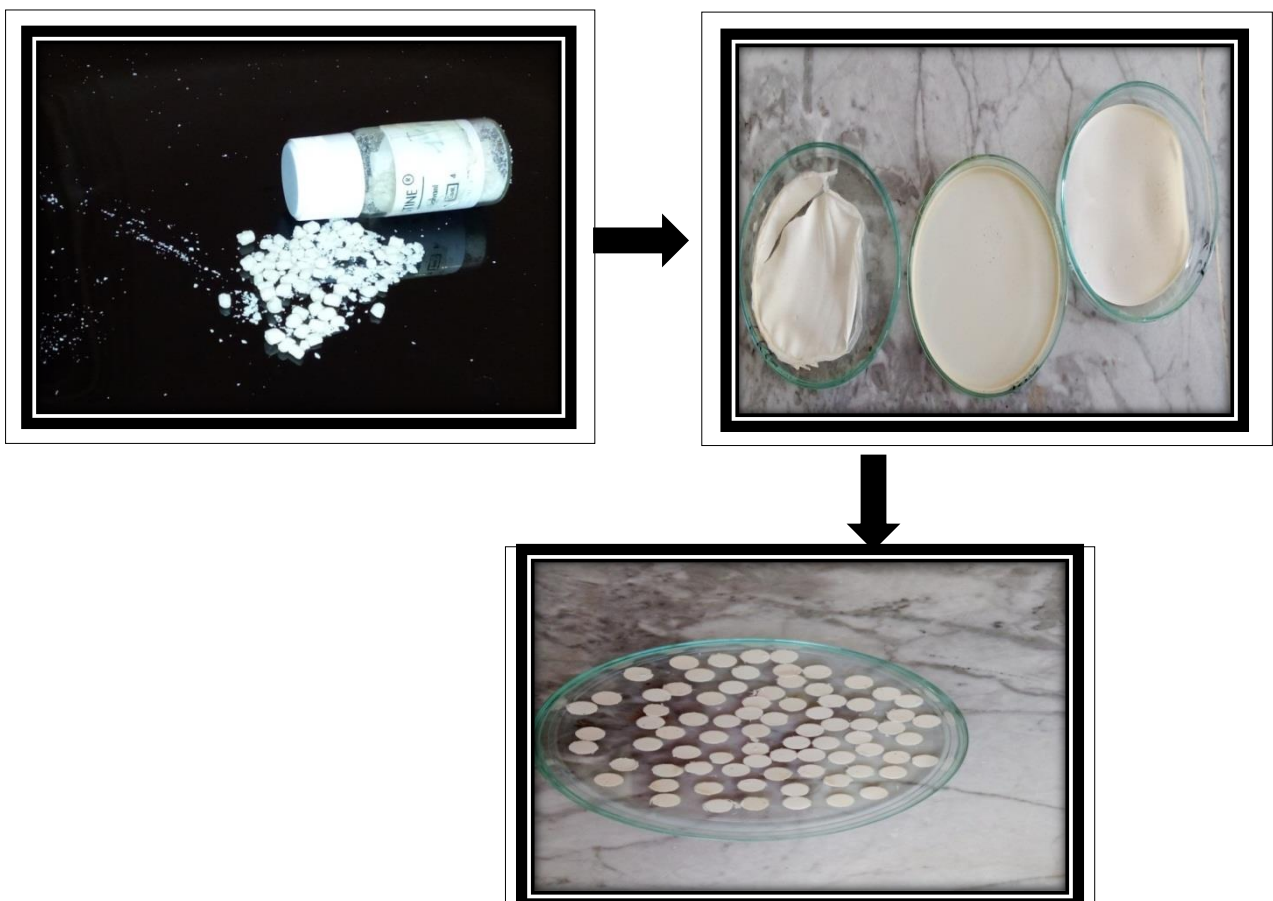


Figure n°04 : Etapes de préparation des films de PHBV

I.5.2. Identification des micro-organismes

I.5.2.1. Examen macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies dépend du milieu de culture, de la durée et la température d'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir des colonies bien isolées. La description des colonies doit mentionner plusieurs éléments : La taille, La forme, l'aspect de la surface, la consistance et la pigmentation.

I.5.2.2. Examen microscopique

Afin de s'assurer de la pureté des bactéries on a eu recours à la coloration de Gram, qui permet de classer les bactéries en Gram-positives qui apparaissent colorées en violet et Gram-négatives qui sont de couleur rose en fonction de la structure chimique de la paroi,

On peut aussi voir la morphologie des bactéries (bacille, cocci, spirale, ovale...), leurs modes d'association (individuelle ou regroupées sous différente forme) et ainsi présence des spores intracellulaires si il s'agit de bactéries sporulantes (**Clair, 2007**).

Pour confirmer l'aspect microscopique des champignons, la technique du drapeau a été adoptée. Pour cela, il faut placer un morceau de scotch sur la culture du champignon à identifier, le fixer sur une lame et l'observer directement avec un microscope optique, on peut voir la structure du mycélium et la morphologie des spores.

I.5.2.3. Identification biochimique

I.5.2.3.1. Test d'oxydase

Principe

Ce test permet de mettre en évidence : **la phénylène diamine oxydase**. Une enzyme capable d'oxyder un réactif (le N- diméthyle paraphénylène diamine).

Les organismes contenant du cytochrome produisent cette enzyme intracellulaire, rendent le réactif bleu/violet. Les organismes dépourvus de cytochrome c dans leur chaîne respiratoire n'oxydent pas le réactif, le laissant incolore, sont oxydase-négatifs (**Aryal, 2022**).

Technique

- A l'aide d'une pince stérile placer un disque d'oxydase sur une lame porte objet.
- Choisir une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche à tester.
- Prélever la colonie choisie avec l'anse de platine.
- Frotter doucement la colonie sur le disque et observer l'apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes (**Jurtshuk et Mcquitty, 1976**).

I.5.2.3.2. Test catalase

Principe

Les métabolites des micro-organismes aérobies et anaérobies facultatifs donnent naissance à des sous-produits toxiques comme le peroxyde d'hydrogène et le radical du peroxyde (O₂). La catalase hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène gazeux, ce qui peut être confirmé par la production de bulles de gaz (**Khatoon et al, 2022**).

Le mécanisme est



Technique

- Placer une goutte d'H₂O₂ dans une lame en verre.
- Transférer une petite quantité de culture bactérienne à la surface de la lame et homogénéiser avec l'eau oxygénée.
- Observer l'apparition des bulles d'oxygène(**Khatoon et al, 2022**).

I.5.2.3.3. Test ONPG

Principe

L'o-nitrophényl-bêta-D-galactopyranoside(ONPG) est un substrat artificiel structurellement similaire au lactose à l'exception que le glucose est remplacé par un groupe o - nitrophényl. Contrairement au lactose ; le substrat (ONPG) est capable de pénétrer dans la cellule bactérienne sans la présence de perméase (**Tille et Forbes,2014**).

Technique

- Placer un disque d'ONPG dans un tube stérile et ajouter 0.2ml de solution saline (eau physiologique stérile).
- Ensemencer abondamment le tube avec l'isolat a testé.
- Incuber à 37°C pendant 24 à48h maximum.
- Examinez le changement decouleur(La coloration jaune indique l'hydrolyse d'ONPG) (**Aryal, 2022**).

I.5.3. Préparation des suspensions microbiennes

I.5.3.1. Préparation des suspensions bactériennes

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne, des suspensions bactériennes ont été préparées. Les souches étudiées ont été ensemencées sur gélose nutritif et incubées à 37 °C pendant 24h. Prélever quelques colonies à l'aide d'une anse de platine puis transférer dans l'eau physiologique. Les suspensions ont été standardisées à 0,5 McFarland, qui correspond à une concentration de 10^6 à 10^8 germe/ml et une densité optique entre (0,08 – 0,13) à 630 nm mesurer à l'aide de spectrophotomètre (kouame, 2011).

I.5.3.2. Préparation des suspensions fongiques

Des cultures de champignons de 72h ont été utilisées pour préparer les suspensions fongiques. Ces cultures ont été immergées par l'eau physiologique stérile, par la suite les mycéliums sont raclées de la surface du milieu de culture, le tout est mis dans un bécher stérile, homogénéiser, puis centrifuger, le surnageant a été récupéré. Les suspensions dilutions de spores sont préparées à partir de cette solution. Les suspensions fongiques choisit, doivent être d'une concentration de 10^6 spores/ml qui correspond à une densité optique de 0,06 à 0,13 a une longueur d'ordre de 630nm (saadi, 2008).

I.5.4. Activité antimicrobienne

La détermination du pouvoir antimicrobien fait appel à plusieurs techniques. Dans cette étude l'activité antimicrobienne des films incorporés d'HET se fait par la méthode de diffusion par disque en milieu solide, ensemencé avec les suspensions microbiennes standardisées à 0,5Mc Farland pour les bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*) sur milieu Muller-Hinton et 10^6 spore/ml pour les champignons (*Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*) sur milieu PDA.

Les films de PHBV incorporés de l'huile essentielle de thym à différent concentration (5%, 10%, 20%) ont été découpés en disques d'environ 6mm de diamètre, Des disques de PHBV sans l'HET (témoin négatif) ont été aussi préparés.

Concernant, le témoin positif, des disques de gentamicine (Antibiotique) et des disques de Métronidazole (Antifongique) sont utilisées.

Les disques sont stérilisés par l'UV puis déposer aseptiquement sur la surface de la gélose Muller Hinton ensemencé déjà par les suspensions bactériennes et incubées à 37°C

pendent 24h et sur milieu PDAensemencé par les suspensions de spores fongiques (champignons) et incubés à 30°C pendant 3jours à 7jours.

La lecture des résultats a été faite par mesure des diamètres de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

- $\emptyset = 0$: Pas d'activité antibactérienne.
- $\emptyset \leq 10\text{mm}$ Activité réduite.
- $10 < \emptyset \leq 12\text{mm}$: Activité significative.
- $12 < \emptyset \leq 15\text{mm}$: Activité modérément significative.
- $15 < \emptyset \leq 20\text{mm}$: Activité très significative.
- $20\text{mm} < \emptyset$: Activité fortement significative (**Rsaissi et al., 2013**)



Chapitre II:

Résultats et discussion

II.1. Identification des souches microbiennes

II.1.1. Observation macroscopique des champignons

–*Aspergillus flavus*

Les colonies d'*Aspergillus flavus* sont duveteuses ou poudreuses, de couleur blanche ensuite jaunes puis vert-jaune.



Figure n°05 : Aspect macroscopique d'*A. flavus* sur milieu PDA

–*Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum présente souvent des colonies de couleur blanches avec un aspect duveteux à floconneux



Figure n°06 : Aspect macroscopique de *F.oxysporum* sur milieu Sabouraud

II.1.2. Identification microscopique

- *Escherichia coli*

L'observation microscopique après coloration de Gram montre que la bactérie *E. coli* est de type Gram négatif sous forme bâtonnet avec des cellules isolées les unes des autres.

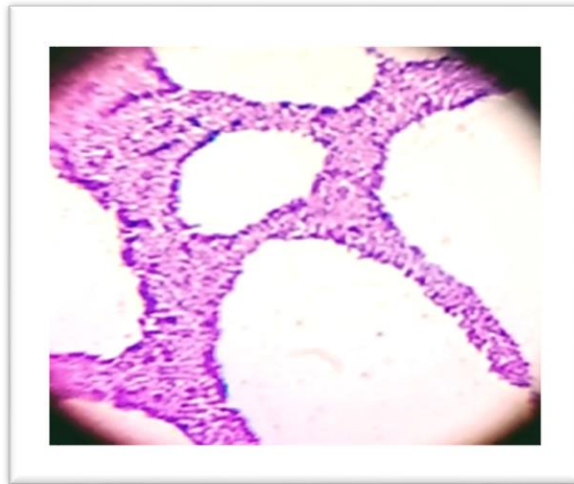


Figure n°07 : Aspect microscopique d'*E. Coli* ($\times 100$)

- *Staphylococcus aureus*

S.aureus est une bactérie Gram positif de forme cocci regroupé en amas.

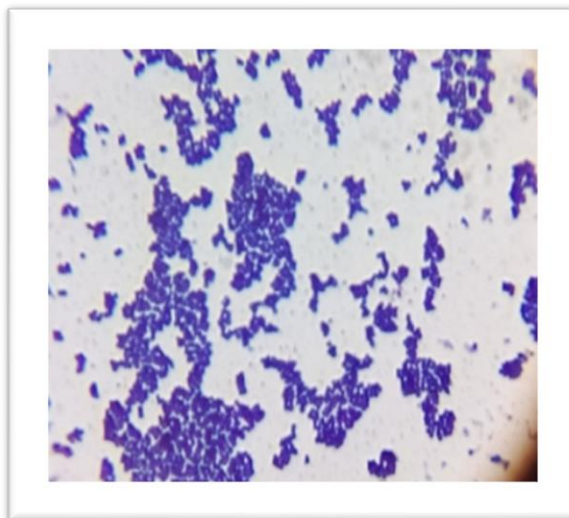


Figure n°08 : Aspect microscopique de *S. aureus* ($\times 100$)

-Pseudomonas aeruginosa

La bactérie *P.aeruginosa* est une bactérie Gram positif de forme bacillaire non sporulés.

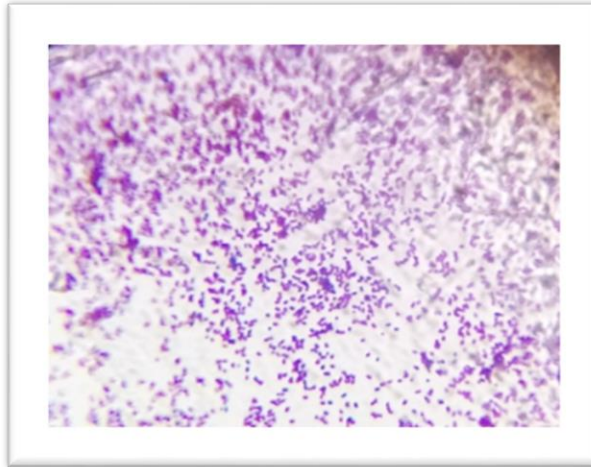


Figure n°09 : Aspect microscopique de *P. aeruginosa* (×100)

-Bacillus cereus

Bacillus cereus est une bactérie Gram positif de forme bacillaire sporulé regroupé en chainettes.

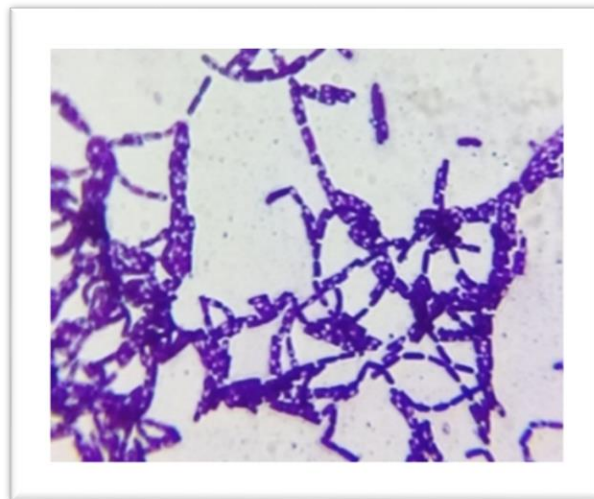


Figure n°10 : Aspect microscopique de *B. cereus* (×100)

-Aspergillus flavus

L'examen microscopique d'*A. Flavus* est reconnaissable par ses têtes aspergillaires unisériées, en colonne compacte. La vésicule hémisphérique, située à l'extrémité d'un conidiospore court, lisse et hyalin, et sévissant progressivement à son sommet, porte une rangée unique de phialides, qui produisent par bourgeonnement à leur sommet toute une série de conidies rondes, lisses et de petite taille (2-3 μm), disposées en chaînes.

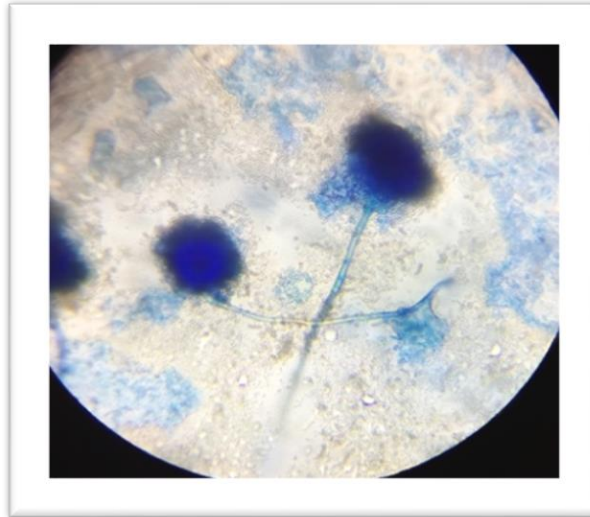


Figure n°11 : Aspect microscopique d'*A. flavus* ($\times 40$)

-Fusarium oxysporum

L'examen microscopique direct a révélé des mycéliums septés régulier, souvent associés à des chlamydospores. On peut observer avec des phialides, des macro conidies, des micro conidies arquées multicellulaires, unicellulaires ou bicellulaires sont le plus souvent arrangées en bouquet.



Figure n°12 : Aspect microscopique de *F. oxysporum* ($\times 40$)

II.1.3. Résultats des tests biochimiques

II.1.3.1. Test d'oxydase

Le test d'oxydase a montré que toutes les souches bactériennes étudiées dans ce présent travail, sont Oxydase négatives, pas de changement de couleur.

II.1.3.2. Test catalase

Toutes les souches testées (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*) sont catalases positives (dégagement de gaz (O₂)).

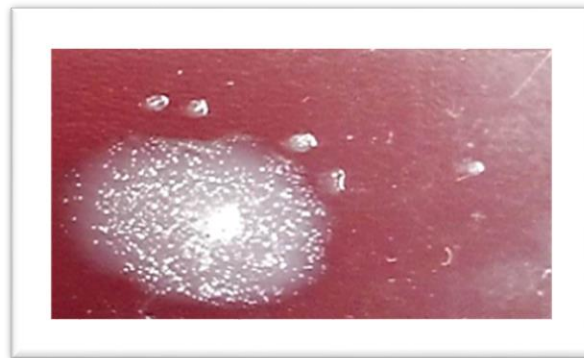


Figure n°13 :Résultat du test catalase

II.1.3.3. Test d'ONPG

Pour le test ONPG il a été remarqué un changement de la couleur du milieu vers le jaune pour les souches (*Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus*) ce qui indique un test positif.

Par contre pour (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) la couleur ne change pas donc le test est négatif.

Tableau N°3: Résultats d'identification des souches bactérienne (les tests biochimique)

Les souches	Les tests		
	Test oxydase	Test catalase	Test ONPG
<i>S. aureus</i>	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	+
<i>B. cereus</i>	-	+	+
<i>E. coli</i>	-	+	-

II.2. Activité antibactérienne de PHBV incorporé d'HET

L'évaluation de l'effet antibactérien des films de PHBV incorporés d'huile essentielle de thym a été étudiée sur quatre souches bactériennes utilisant la méthode de diffusion sur disque sur milieu Muller-Hinton. Les résultats montrent que ces films incorporés de cette huile essentielle exercent une forte activité sur les bactéries à Gram positif.

Les films contenant 20% d'HET présentaient une activité antimicrobienne plus importante par rapport aux autres films (5%, 10%).

Les souches *S. aureus* ATCC43300 et *B.cereus* ATCC14579 sont les plus sensibles.

Le diamètre de la zone d'inhibition maximal est observé avec *S. aureus* ATCC43300 (38 mm) et *B.cereus* ATCC14579 (38mm) suivi de *P.aeruginosa* ATCC9027 (32,5 mm) enfin *E.coli* ATCC25922 (25mm) en présence des films contenant 20% d'HET.

L'utilisation des disques de gentamicine dans cette étude comme témoin positif a révélé des zones d'inhibitions moins importantes que celles obtenues avec les films de PHBV 20% HET, un diamètre d'inhibition de (33mm) a été observé avec la souche *S. aureus* ATCC43300 suivi de *B.cereus* ATCC14579 (25,5 mm) puis (20,5mm) avec la souche *P. aeruginosa* ATCC9027 et un très faible diamètre d'inhibition a été remarqué pour la souche *E. coli* ATCC25922 (11,5 mm).

Les films de PHBV sans l'HET ont été utilisés comme témoin négatif, aucune zone d'inhibition n'a été observée.

Le PHBV est considéré comme un biopolymère naturellement synthétisé ainsi dégradé par les bactéries, il n'exerce aucune toxicité contre les microorganismes.

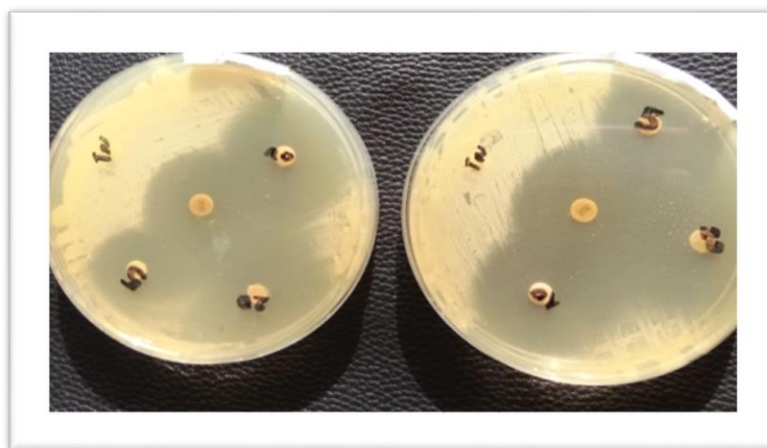


Figure n°14 : Résultats de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HET sur *S.aureus* (E1, E2).

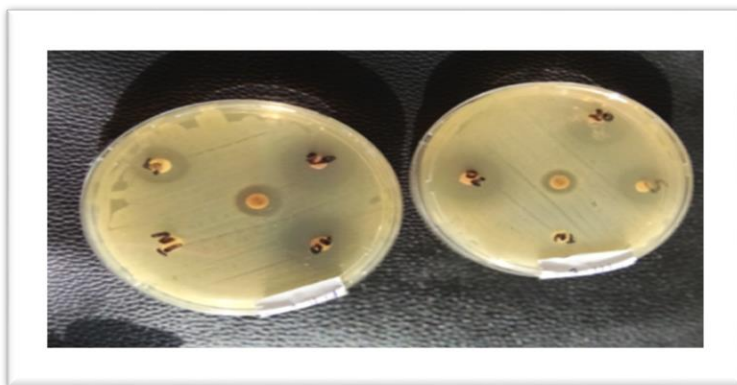


Figure n°15 : Résultats de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HET sur *E.coli* (E1, E2)

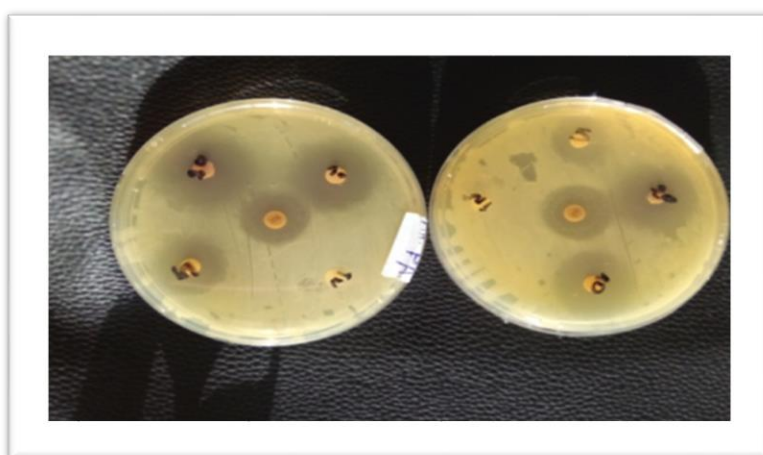


Figure n°16 : Résultats de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HET sur *P.aeruginosa* (E1, E2)

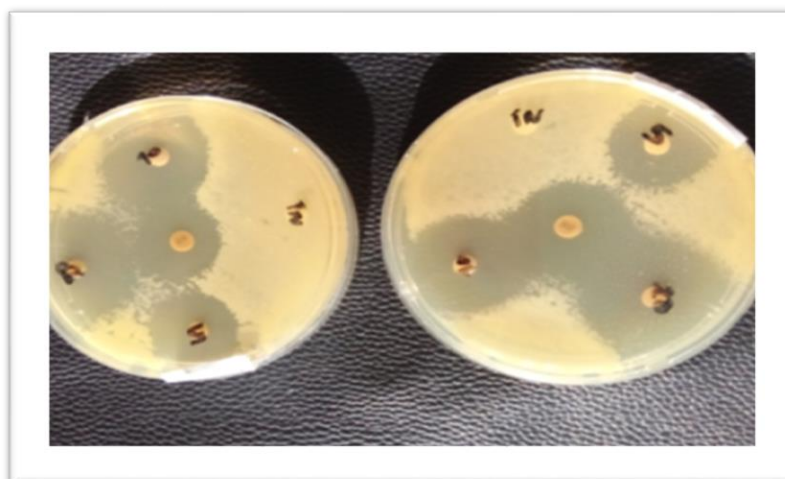


Figure n° 17 : Résultats de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HET sur *B .cereus* (E1, E2).

D'après plusieurs recherches, La sensibilité d'un microorganisme aux huiles essentielles dépend des propriétés de l'huile essentielle et du microorganisme lui-même. Il est bien connu que les bactéries à Gram+ sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries à Gram- ; cette activité inhibitrice existe grâce à la différence structurale de la paroi. Les bactéries Gram négatif ont une paroi en multicouche liée à une membrane cellulaire externe qui comporte des lipopolysaccharidiques considérée comme une barrière aux composés hydrophobes, alors que la paroi cellulaire des bactéries Gram positif est constituée par une seule couche (Kalembe and Kunicka, (2003) ; Bouguerra et al., (2014) Himed et al., (2016)) .

Selon une étude réalisée par Chaiane et al., (2020) l'activité antimicrobienne des films de PHB incorporés de 20% de l'eugénol a montré une activité antimicrobienne uniquement contre *Salmonella sp.* Cependant les films de PHB avec 40% de l'eugénol sont actifs contre *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* .

Il a été remarqué dans ce présent travail, que les concentrations d'HE testées dans les films de PHBV (5%, 10%, 20%) donnent une activité antibactérienne contre toutes les souches étudiées, mais l'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration d'HE dans le film.

Les résultats de l'activité antibactérienne des films actifs élaborés sont liés au profil chimique des composés bioactifs contenus dans l'HE qui ont été libérés des films dans l'espace fermé de la boîte de Pétri pendant la période d'incubation.

Nos résultats montrent l'efficacité de l'huile essentielle de thym contre les bactéries testées, ainsi l'intérêt prometteur de cette huile comme substance active dans les emballages alimentaires.

En effet, l'emballage actif antimicrobien permet au produit alimentaire d'interagir avec l'environnement de l'emballage, ce qui se traduit par un moyen dynamique de conserver la nourriture. Les changements physico-chimiques et microbiologiques sont des facteurs importants pour augmenter la détérioration des aliments donc un emballage adéquat réduira les pertes des produits alimentaires. Des agents antimicrobiens naturels, comme les huiles essentielles de thym, de clous de girofle, d'origan, Romarin.....etc. Peuvent être incorporés dans le polymère.

L'agent antimicrobien d'une manière générale incorporé dans le matériau de l'emballage se répandra jusqu'à ce qu'il soit résorbé de la surface du matériau, puis solubilisé sur la surface de l'aliment finalement diffusé dans l'aliment (Dabaghi, 2018).

De ce fait, la technologie moderne des emballages actifs améliore l'hygiène des aliments, augmente la durée de conservation et ainsi ouvre des options pour les consommateurs.

Tableau n°04 : Diamètres des zones d'inhibition en mm pour les quatre souches étudiées.

Bactéries	Concentration d'huile essentielle de Thym dans les films de PHBV				
	5%	10%	20%	TN	T.P.G
	Diamètres des zones d'inhibition en mm				
<i>S. aureus</i>	24	35	38	/	33
<i>P.aeruginosa</i>	20	25	32,5	/	20,5
<i>B.cereus</i>	24,5	30,5	38	/	25,5
<i>E. coli</i>	15,5	21,5	25	/	11,5

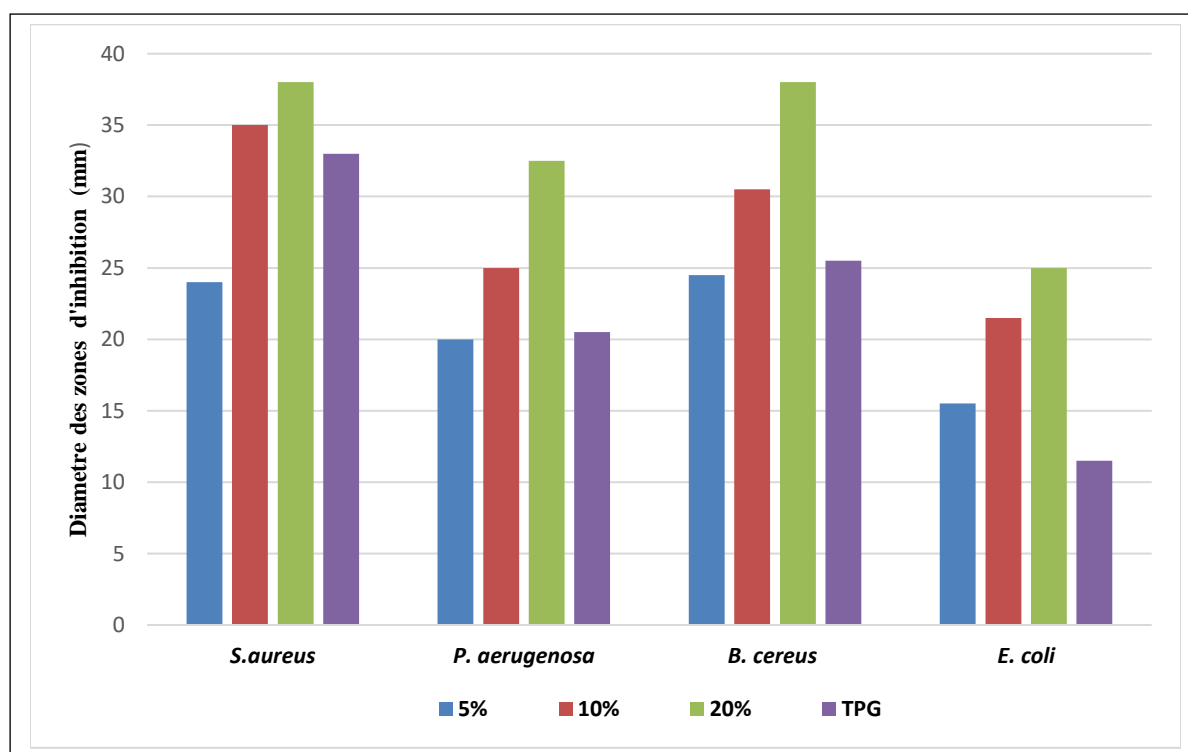


Figure n° 18 : Résultats des diamètres d'inhibition des films de PHBV incorporés d'HET vis-à-vis les quatre souches étudiées

II.3. Activité antifongique des films de PHBV incorporés de l'HET

Le but principal des tests antimicrobiens dans ce présent travail était d'évaluer l'utilisation potentielle des huiles essentielles dans les films de PHBV comme inhibiteurs de microorganismes pour l'utilisation dans les emballages alimentaires.

L'activité antifongique des films de PHBV incorporés de l'HET à raison de (5%, 10%, 20%) a été étudiée contre deux souches fongiques par la méthode de diffusion des disques sur milieu (PDA).

Les résultats ont montré que l'incorporation de l'huile essentielle de thym dans le PHBV donne une forte activité inhibitrice sur les champignons par rapport aux bactéries

Les zones d'inhibition ont augmenté avec l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle dans les films. L'activité antifongique contre la souche *F.oxysporum* (MG973096) est plus élevée que celle exercée sur *Aspergillus flavus*.

Le PHBV incorporé de 20% d'EHT inhibe d'une façon spectaculaire la souche *F.oxysporum* (MG973096) avec une zone d'inhibition (77mm) contre une zone d'inhibition de 60mm détectée avec *Aspergillus flavus*.

Les films supplémentés de 5% et 10% d'HET ont donné des zones d'inhibition respectivement de(54mm - 69mm) avec *F.oxysporum* suivi d'*A. flavus* (34 - 51,5 mm), (figure 19, 20 et tableau n°05).

Aucune d'inhibition n'a été observée avec le témoin négatif (films de PHBV sans l'HET) et le témoin positif métronidazole sur les deux souches testées.

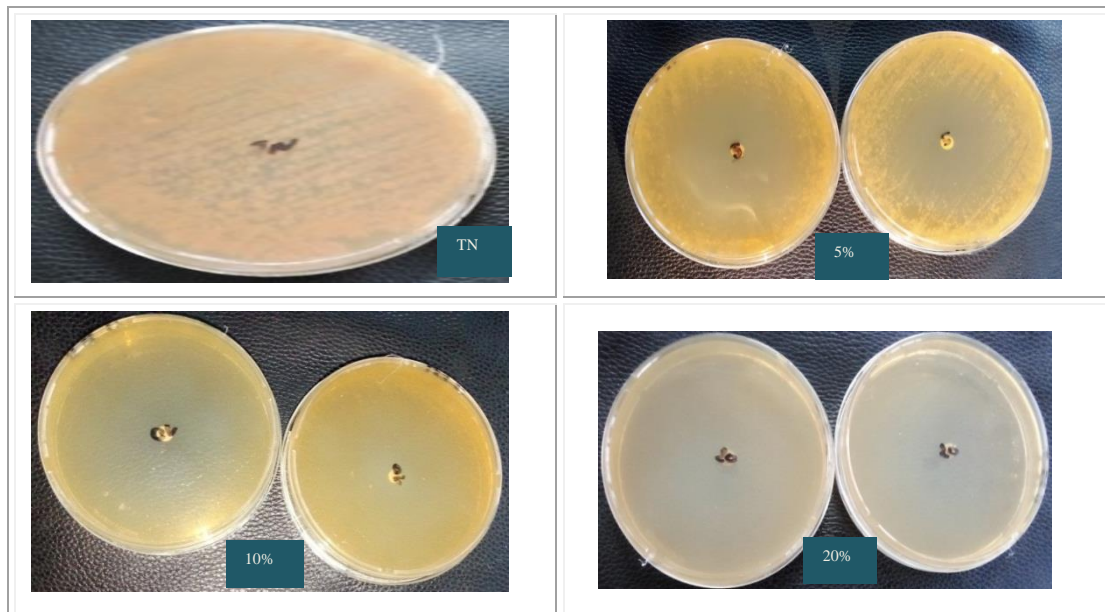


Figure n°19 : Résultats de l'activité antifongique des films de PHBV incorporés d'HET sur *Fusarium oxysporum*.

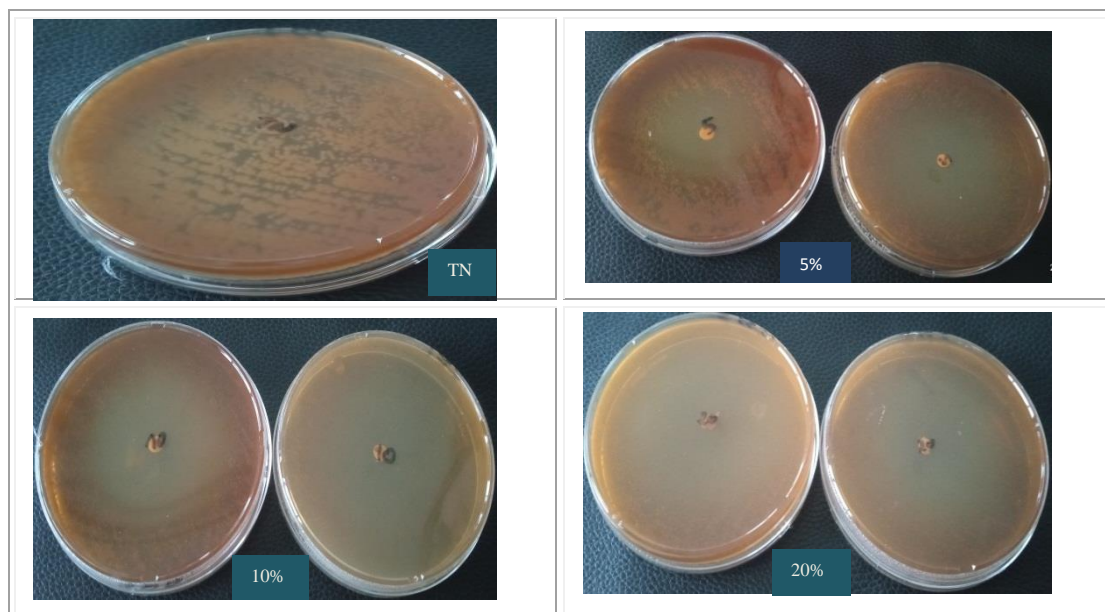


Figure n°20 : Résultats de l'activité antifongique des films de PHBV incorporés d'HET sur *Aspergillus Flavus*.

En comparant les différents résultats obtenus de l'activité antifongique des films de PHBV additionnés de l'HET sur les deux souches, on peut dire que les zones d'inhibition obtenue contre *A. flavus* sont inférieure par rapport à *F. oxysporum*, un diamètre d'inhibition minimal de 34mm a été observé contre *A. flavus* avec PHBV5 (5%) et un diamètre d'inhibition maximal de 77mm contre *F. oxysporum* pour les films de PHBV20 (20%).

Les résultats de **Shabnam et al., (2013)** qui ont utilisé la méthode de diffusion sur disques pour la détermination de l'activité antifongique de l'huile essentielle de zestes de *C. limetta*, montrent une zone d'inhibition minimale contre *Fusarium oxysporum*(11 mm) après 48 h d'incubation et (22 mm) contre *Aspergillus niger*.

Nos résultats sont cohérents avec une étude réalisée par **Belarbietal., (2022)**, sur l'activité antifongique des films de PHBV incorporés d'huile essentielle de clou de girofle à raison de 20% qui a montré que *F. oxysporum* est plus sensible par rapport *A. niger* avec des zones d'inhibition de 42mm et 36mm respectivement.

L'activité antifongique des films de PLA additionnés d'huile essentielle de thym commercial à raison de 2 et 5% a été étudiée par **Yahyaoui, (2020)**, les résultats ont montré une activité plus au moins significative contre l'espèce *A. niger*.

Des expériences antérieures réalisées avec les huiles essentielles de romarin et de thym ont montré que ces huiles ont une activité antifongique en retardant la croissance du mycélium. Ainsi, les chercheurs ont suggéré que l'activité antimicrobienne est due à la diminution du cytoplasme dans les hyphes causant des dégâts dans la paroi cellulaire du champignon et, finalement, l'affaiblissement du mycélium. **Yahyaoui, (2020)**.

Plusieurs études confirment que l'activité antifongique augmente avec l'augmentation de la concentration des huiles essentielles. Ces huiles peuvent être utilisées comme des agents antifongiques potentiels contre les champignons contaminants les aliments (**Hamdani et al., 2021**).

Tableaux n°05: Diamètre des zones d'inhibition en (mm) des deux souches fongiques étudiées.

Champignons	Concentration d'huile essentielle de Thym dans les films de PHBV				
	5%	10%	20%	TN	AF
	Diamètres des zones d'inhibition en mm				
<i>F. oxysporum</i>	54	69	77	/	/
<i>A. flavus</i>	34	51,5	60	/	/

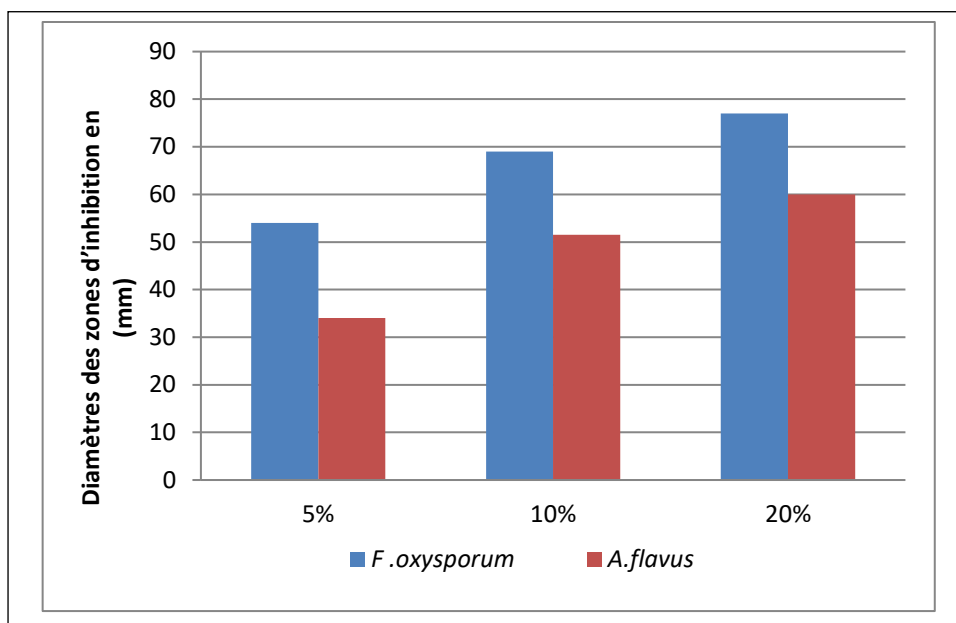


Figure n°21: Résultats des zones d'inhibition des films de PHBV additionnés d'HET vis-à-vis les deux souches fongiques étudiées



Conclusion

Conclusion


Les microorganismes sont les principaux responsables d'altération des aliments. Un emballage actif et biodégradable offre une solution intéressante dans plusieurs domaines.

Dans ce présent travail, le PHBV en tant que polymère biodégradable et l'agent bioactif naturel « l'huiles essentielles de thym » ont été choisis comme un modèle d'emballage actif.

Il est important d'évaluer l'efficacité et la sécurité de l'emballage actif dans des applications spécifiques. Plusieurs études ont montré que l'huile essentielle de thym possède des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes (contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives) ainsi que des propriétés antifongiques.

Par conséquent, nous avons réalisé cette étude pour évaluer l'activité antimicrobienne d'huile essentielle de thym associée au PHBV et confirmer son efficacité contre les microorganismes. Les résultats de l'activité antifongique des films de PHBV en présence de l'agent antimicrobien, ont montré un effet antifongique puissant (contre *Aspergillus flavus* et *Fusarium oxysporum*), ainsi une grande sensibilité des quatre souches bactériennes testées (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Bacillus cereus*).

Il est intéressant de poursuivre ce travail à travers des études complémentaires afin de confirmer les propriétés biologiques de cette huile essentielle en tant qu'agent puissant et protecteur, doté de propriétés antimicrobiennes, pour des applications industrielles et agricoles.



Références bibliographiques

A

Appendini, P. Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 113-126.

Ariagna, L. Briso, R. and Serrano-Aroca, A. (2018). Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) . Enhancement Strategies for Advanced Applications. 10(7): 732.

Aryal, S. (2022). Oxidase Test-Principle, Uses, Procedure, Types, Result Interpretation, Examples and Limitations. *Microbiology Info.com*

Aryal, S. (2022). ONPG Teste – principle, uses, precautions, result interpretation with precautions. Last updated: *Microbiology Info.com*

Avérous, L. (2013). Les polymères biodégradables et biosourcés. *L'actualité chimique*, (375-376).

B

Belarbi, H. Akkoussa, L, & Barkat, N. F. (2022). Activité antimicrobienne du Poly (3-hydroxybutyrate-co-3 hydroxyvalérate) (PHBV) incorporé de l'huile essentielle de clou de girofle (Mémoire de master, Université Ibn Khaldoun-Tiaret-).

Bougurra, A. Himed, L. Barkat, M. (2014). Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des écorces de citrus réticulât. *Société Algérienne de nutrition*, Vol.03 N°01 ,32-39.

Braz, VS. Melchior, K. Moreira, CG. (2020). *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. *Front Cell Infect Microbiol.* 21; 10:548492.

C

Chaiane, R.R. Da Silva, K.C. Bagnara, B.E, Bittencourt, P.R, Koschevic, M.T, Tayla da Serantoni, T.F, Marco Antonio UtreraMartines M.A, Caon T, Martelli, S.M .(2020). Biodegradation of Polyhydroxybutyrate films incorporated with eugenol in different soil types. Chemical and Environmental engineering. Doi. CSCEE100014.

Chikh, A. (2018). Étude des mélanges PHBV/PBS et des mélanges hybrides PHBV/PBS/sépiolite: préparation, caractérisation physico-mécanique et durabilité (Thèse doctorat Université de béjaia (ALGERIE)).

Claire, k. (2007). Les différentes bactéries, Gram et sa coloration.

D

Dabaghi, E. Z. (2018).Développement et caractérisation de films biodégradables à base d'acide polylactique et de chitosane. Thèse doctorat Université Laval. Québec. Canada.

E

Edward, J. (2010).*Bacillus cereus*, a Volatile HumanPathogen. Clinicalmicrobiologyreviews23 (2) : 382-398.

H

Halewyn, M. A. (2019).Microbiologie-immunologie. Pierre Chevalier, Ph. D. microbiologie

Hamdani, F.Z, Ziri, S. Benallou, A. Djani, H. Belkacem, A. (2021).Fort potentiel antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et *Tetraclinisarticulata*, (2021) 19: 190–194.

Himed, L. Merniz, S. Barkat, M. (2016).Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de Citrus limon (variété Lisbon) extraite par hydrodistillation. Algerian Journal of Natural Products4:1 (2016) 252-260.

J

Jurtshuk Jr, P. E. T. E. R., & McQUITTY, D. N. (1976). Use of a quantitative oxidase test for characterizing oxidative metabolism in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(5), 668-679.

K

Kalemba, D. Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry* 10:813-29.

Khatoon, H. Anokhe, A. Kalia, V. (2022). Catalase teste: A Biochemical for bacterial identification. *AgriCos e-News letter*, ISSN : 2582-7049.

Kouame, D. (2011). *Biotechnologie alimentaire : travaux pratiques.*

M

Majid, I. Nayik, G. A. Dar, S.M. & Nanda, V. (2016). Novel food packaging technologies: innovations and future prospective. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.

Martins, A. (2020). *Les huiles essentielles antibactériennes: exemple du thym (thymus),* Thèse de doctorat université de Picardie Jules Verne UFR de Pharmacie.

Q

Quintivalle, S. Vicini, I. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* 62 (3) .373-380.

R

Rsaissi, N. Bouchache, M. (2013). *La lutte chimique contre le jujubier.* Programme National de transfert de Technologie en Agriculture (PNTTA), DERD (Ed) Rabat.

S

Saadi, Z. (2008). Etude de la dégradation fongique des polymères : cinétique de dégradation des polymères et caractérisation des sous –produit de dégradation –Etude de l’écotoxicité de ces polymères. Thèse Doctorat en chimie université de Maine.

Shabnam, J. Rauf, A. Khurram, S. Shaista, N. Salman, S. Yasar, S. (2013). Chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of *Citrus limetta* var. *Mitha*(sweet lime) peel in Pakistan.African journal of microbiology research.

Srinivas, C. Devi, N. K. Murthy, N. Lakshmeesha, T.R. Singh B. (2019).*Fusariumoxysporum*f. sp. Lycopersici causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity-A review. Saudi Journal of Biological Sciences ; 26(7): 1315–1324.

T

Tille, P.M. et Forbes, B.A. (2014). Microbiologie diagnostique (3ème édition.) saint- louis, Missouri : Elsevier.2014.

V

VERON, M. (1983). Biologie de *Pseudomonas aeruginosa*, médecine et maladies .13N°6 bis. 352 à 356

Vigneswari, S . J.M. Chai . Shantini , K . A.A Amirul .Bhubalan,K .(2019). Designing Novel Interfaces via surface Functionalization of Short-chain-length Polyalkantes

Vroman, I. Tighzert, L. Vroman, I. &Tighzert, L. (2009).Biodegradable polymers. Materials (basel) 2: 307–344.

Y

Yahyaoui, M. (2020). Application des huiles essentielles dans le domaine des emballages alimentaires. Thèse Doctorat université Tunis.



Annexes

ANNEXE N° 01

■ Composition des milieux de cultures

1. Gélose de Chapman

Peptones	11 g/l
Extrait de viande	1 g/l
Chlorure de sodium	75 g/l
Mannitol	10 g/l
Rouge de phénol	0,025 g/l
Agar	15 g/l
pH = 7,4	

Gélose de Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf	300 g/l
Peptone de caséine	17,5 g/l
Amidon de maïs	1,5 g/l
Agar	17 g/l
pH = 7,4	

Gélose nutritive

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
pH = 7	

Bouillon nutritif

Peptone	10 g/l
Extrait de viande	4 g/l
Chlorure de sodium	5 g/l
pH = 7,2	

Annexes

Milieu King A

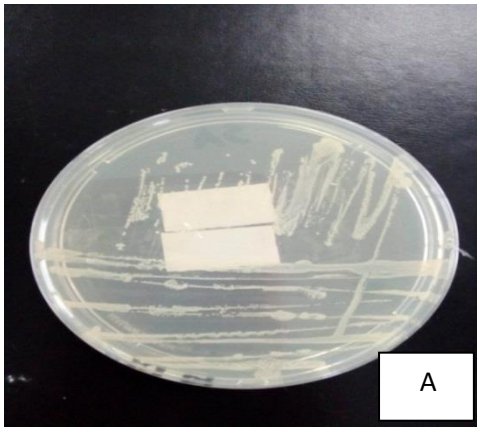
Peptone	20g
Glycérol	10g
Sulfate de potassium	10g
Chlorure de magnésium	1,4g
Agar purifié	12g
pH=7,2 .autoclave 15 minutes à 120C°	15 g/l

Milieu Sabouraud

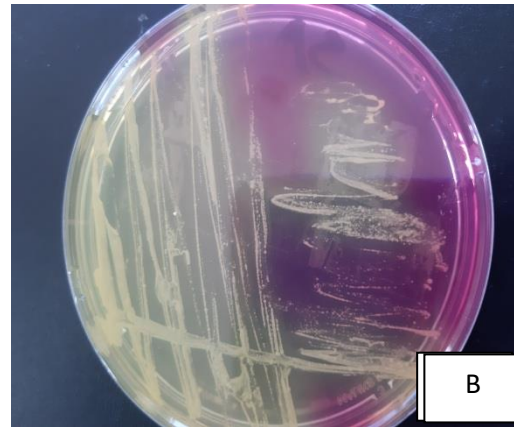
Peptones	20g
Glucose (ou dextrose)	10g
Agar agar	10g
PH 5,6 Autoclave 15mn à 120C°	1,4g

ANNEXE N°02

■ Cultures bactériennes

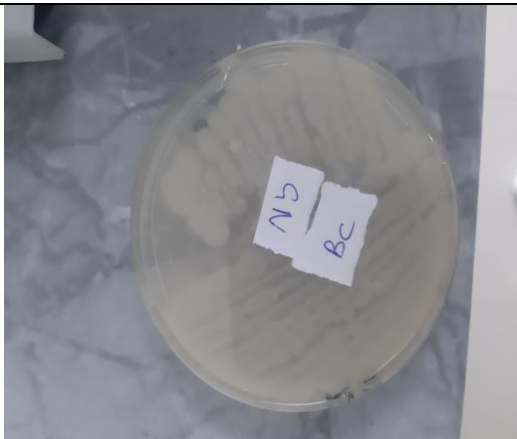


A



B

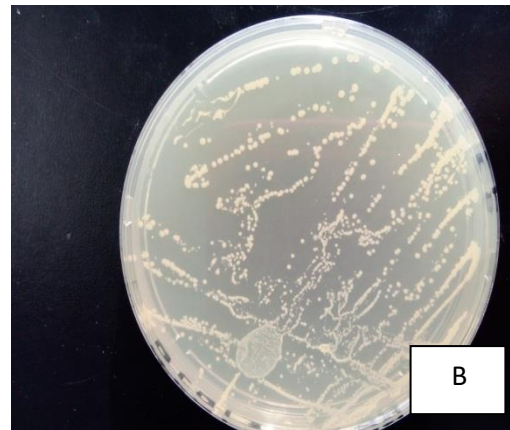
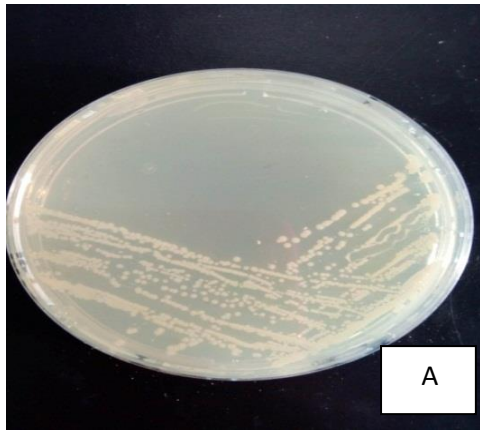
Aspect des colonies de *Staphylococcus aureus* sur milieu (A : GN / B : Chapman).



Aspect des colonies de *Bacillus cereus* sur milieu GN



Aspect des colonies d'*E. coli* sur milieu Hektoen



Aspect des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu (A : GN/ B : King A).

ANNEXE N°03

■ Coloration de Gram

Principe et technique

La coloration de Gram est la coloration de base en bactériologie. C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries non seulement d'après leur forme et leur disposition, mais surtout d'après leur affinité pour les colorants liée à la structure de la paroi. La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes qui consistent à :

Faire un frottis et coloration :

- Fixer le frottis a la flamme d'un bec bunsen
- Recouvrir le frottis d'une solution de violet de gentiane on laisse agir une minute
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau
- Recouvrir la préparation de lugol, laisser agir 30 secondes
- Rejeter le lugol puis laver à l'eau
- Décolorer à l'alcool on le laissant agir pendant 30 secondes
- Rincer a l'eau courante et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir 30 secondes
- Rejeter la fuchsine, laver abondamment, égoutter, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres

Lecture :

La lecture se fait au grossissement x 100 avec une goutte d'huile à immersion. Les bactéries à Gram positif apparaissent colorées en violet, alors que les bactéries à Gram négatif sont roses.

ANNEXE N°04

- Antibiotique Gentamicine commercial.



- Antifongique Métronidazole commercial



- Pied à coulisse



ANNEXE N°05

Tableaux n°01 : Diamètres des zones d'inhibitions des souches bactériennes étudiées (mm).

Bactéries	Les essais	Concentration d'huile essentielle de Thym dans les films de PHBV				
		5%	10%	20%	TN	T.P.G
		Diamètres des zones d'inhibition en mm				
<i>S. aureus</i>	E1	20	36	40	/	32
	E2	28	34	36	/	34
<i>P.aeruginosa</i>	E1	19	28	34	/	21
	E2	21	22	31	/	20
<i>B.cereus</i>	E1	25	31	40	/	26
	E2	24	30	36	/	25
<i>E. Coli</i>	E1	15	21	25	/	12
	E2	16	22	25	/	11

Tableaux n°02 : Diamètres des zones d'inhibitions des souches fongiques étudiées (mm).

Les Champignons	Les essais	Concentration d'huile essentielle de Thym dans les films de PHBV				
		5%	10%	20%	TN	AF.
		Diamètres des zones d'inhibition en mm				
<i>F.oxysporum</i>	E1	53	68	76	/	/
	E2	55	70	78	/	/
<i>A.flavus</i>	E1	34	48	60	/	/
	E2	34	55	60	/	/