



République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem

جامعة عبد الحميد بن باديس - مستغانم
كلية العلوم الطبيعية

Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

DEPARTEMENT DE Sciences Alimentaires

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

M^{elle} Bencheba Khayra

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRE

Spécialité: Production et transformation laitière

THÈME

***Identification et caractérisation de la flore d'intérêt
technologique des bactéries lactiques du lait de vache***

DEVANT LE JURY

Président	Dr Meghoufel N.L	MAA	U. Mostaganem
Examineur	Dr Dahou A.E.A	MCB	U. Mostaganem
Encadreur	Dr Tahlaïti H	MCA	U. Mostaganem

Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu le Tous Puissant de m'avoir donné la force, le courage, la santé et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

Je tiens à remercier mon père et ma famille pour leur soutien de toutes sortes.

je remercie également tous mes professeurs et mon encadreur.

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont soutenu pour réussir.

Table des matières

Remerciements	
Résumé	
Summary	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction.....	1
CHAPITRE I : Le lait de vache	
Généralités sur le lait	3
1-Définition du lait de vache	4
2- Qualité organoleptique du lait	4
2-1 couleur.....	4
2-2 L'odeur.....	4
2-3La saveur.....	4
3-La composition de lait de vache	6
3-1 Les glucides	7
3-2 Matière minérale	7
3-3 Enzymes	8
3-4 Vitamines	8
3-4-1 Vitamines hydrosolubles.....	8
3-4-2 Vitamines liposolubles.....	8
4- Propriétés physicochimiques du lait.....	9
4-1 Acidité du lait	9
4-2 Densité du lait	9
4-3 Stabilité à la chaleur.....	9
4-3-1 Point d'ébullition.....	9
4-3-2 Point de congélation.....	10
5- Les caractéristiques microbiologiques de lait.....	10
5-1 Flore de contamination.....	10
5-2- Flore originale.....	10

CHAPITRE II : LES BACTERIES LACTIQUES

1-Définition de bactérie lactique.....	10
2-Habitat des bactéries lactiques.....	11
3-Taxonomie des bactéries lactiques.....	12
3-1 : Le genre <i>Lactobacillus</i>	15
3-2 - Le genre <i>Lactococcus</i>	16
3-3 - Le genre <i>Streptococcus</i>	17
3-4- Le genre <i>Leuconostoc</i>	17
3-5- Le genre <i>Bifidobacterium</i>	17
4- Rôle des bactéries lactiques	18
4-1- Fabrications des produits laitiers	18
4- 2- Rôle technologique	19
4-3-Rôle des bactéries lactiques dans la conservation des aliments	19
4-4- Rôle des bactéries lactiques dans l'altération des aliments	20
4-5-Bactéries lactiques et santé humaine	21
5- Caractères technologiques	22
Matériel et méthodes	
1- Lieu et objectif du travail	28
2- Provenance des échantillons.....	29
3. Isolement et culture de la flore lactique.....	29
4. Purification et conservation des isolats	29
Résultats et discussion	42
1- Critères morphologiques	42
2-Critères physiologiques et biochimiques	42
Conclusion	50
Références bibliographiques	
Annexes	

Résumé :

L'isolement des bactéries lactiques à partir de lait cru de vache nous a permis d'obtenir 53 isolats (Gram positif, catalase négatif) qui ont été purifiés et conservés. L'étude des caractéristiques phénotypiques ; biochimiques et physiologiques (type fermentaire, croissance à différents pH, test de croissance à des températures : 15°C, et 45°C, étude de la thermorésistance à 60°C pendant 30 min, test de croissance dans le milieu lait de Sherman, production d'acétoïne production de CO₂ à partir du citrate, production des hydrates de carbone) a permis d'identifier : *Leuconostoc* (28%), *Enterococcus* (11%), *Lactococcus* (45%) et *Lactobacillus* (15%).

Mots-clés : Lait de vache, Bactéries lactiques, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*

Abstract :

The isolation of lactic acid bacteria from raw cow's milk allowed us to obtain 53 strains (Gram positive, catalase negative) were purified and stored.

The study of phenotypic characteristics, biochemical and physiological (fermentation type, growth at different PH , the ability to grow at 15°C and 45°C, survival after heating at 60°C for 30 min, growth test in Sherman milk medium , production of acétoïne, CO₂ production from citrate, production, carbohydrate production) has identified 28% *Leuconostoc* 11% *Enterococcus*, 45% *Lactococcus* and 15% *Lactobacillus*.

Keywords: cow's milk , Lactic acid bacteria; *Leuconostoc* , *Lactococcus* ;*Lactobacillus* ,*Enterococcus* .

المخلص:

من خلال عزل بكتيريا حامض اللاكتيك من حليب البقر الخام قد سمح لنا للحصول على 53 سلالة (موجبة الصبغ لجرام,سالبة الكتلاز) التي تم تنقيتها و تخزينها .

دراسة الخصائص الظاهرية ,البيوكيميائية و الفيزيولوجية (نوع التخمر, النمو في وسط يحتوي على كلوريد الصوديوم ,اختبارات نمو في درجات حرارة مختلفة 15و45 درجة مئوية ,دراسة المقاومة الحرارية 60°C في 30د , اختبار النمو في المتوسط حليب شيرمان. انتاج acétoïne,انتاج CO2من السترات, انتاج الكربوهيدرات) مكننا من تحديد %28 *Leuconostocs* , %45 *Enterococcus* , %15 *Lactococcus* , *Lactobacillus* .

الكلمات المفتاحية: حليب البقرة , بكتيريا حامض اللاكتيك ، *Leuconostoc* , *Lactococcus* ; *Enterococcus*,*Lactobacillus*

Liste des abréviations

ADH : Arginine Dihydrolase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

MRS: Man-Rogosa et Sharp

NaCl : Chlorure de sodium

pH : potentiel Hydrogène

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
Tableau 1	Caractère physique du lait cru	5
Tableau 2	Composition générale du lait de vache	5
Tableau 3	Composition moyenne du lait de vache en gramme /litre	5
Tableau 4	Composition lipidiques du lait	6
Tableau 5	Teneur en vitamines du lait de vache (mg/litre)	7
Tableau 6	Flore indigène du lait cru	9
Tableau 7	Les différents genres des bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques	17
Tableau 8	Températures optimales de croissance des bactéries lactiques	23
Tableau 9	Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques	24

Listes des figures

Figures		Pages
Figure 01	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres Associés, obtenu par analyse des ARNr 16S	14
Figure 2	Représentation schématique des principales voies métaboliques des bactéries lactiques ayant des impacts technologiques	23

Introduction

INTRODUCTION :

Le lait occupe une place stratégique dans l'alimentation quotidienne de l'homme, de par ses composants nobles (protéines, glucides et lipides) et sa richesse en vitamines et en minéraux, notamment en calcium alimentaire. De nos jours, les besoins en lait sont de plus en plus importants vu que ce produit peut être consommé à l'état frais, mais aussi sous forme pasteurisé, stérilisé ou transformé en produits dérivés (Belarbi,2011)

Les bactéries lactiques sont des microorganismes très répandus dans la nature ; on les trouve dans le sol, sur les végétaux, elles jouent un rôle important dans notre santé car elles constituent une fraction majeure de notre flore intestinale et tapissent les muqueuses nasales, buccales et vaginales, les bactéries lactiques sont utilisées depuis des siècles pour fermenter les aliments, elles sont largement présentées un grand intérêt biotechnologique ; considérées comme inoffensives pour l'homme, leur usage est fréquent dans le monde entier pour fabriquer des produits laitiers fermentés (fromage, yaourts...) (Klaenhammer *et al*, 1994 ; Lasagno *et al*, 2002; De Vuyst et Leroy, 2007). La production d'acide lactique est essentielle à la fermentation de ces produits et leur confère une saveur typique, en industrie agro-alimentaire, les bactéries lactiques sont employées pour aider à la fois à la fabrication et à la conservation des produits à partir de certaines matières premières telles que le lait, la viande, le poisson, les végétaux et les céréales, elles sont utilisées en tant que telles (biotechnologies empiriques) ou sous forme de ferment (isolat sélectionnée et purifiée) elles réalisent dans les aliments une acidification, une production d'arômes, une production d'enzymes permettant d'améliorer la digestibilité des aliments, cette dernière activité est due à la production de substances antagonistes tels que les acides organiques (acétique et lactique), le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines (Klaenhammer *et al*, 1994 ; Lasagno *et al*, 2002; De Vuyst et Leroy, 2007).

L'intérêt de ce travail est d'identifier et de caractériser des bactéries lactiques isolées de lait cru de vache provenant de la région de l'Ouest Algérien (Oran).

CHAPITRE I : LE LAIT DE VACHE

Généralités sur le lait :

Le lait était défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante bien nourrie et non surmenée, Le lait doit être colostrum » (Pougheon et Goursaud, 2001).

Le lait doit en contre collecté dans de bonnes conditions hygiéniques et présenter toutes les garanties sanitaires, il peut être commercialisé en l'état mais le plus souvent après avoir subi des traitements de standardisation lipidique et d'épuration microbienne pour limiter les risques hygiéniques et assurer une plus longue conservation. (Jeanet et al 2008).

Le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires des femelles .il s'agit d'un fluide aqueux opaque, blanc, on plus ou moins jaunâtre selon la teneur en β -carotène, de sa matière grasse, d'une saveur douceâtre et d'un pH (6,6 à 6,8) légèrement acide, proche de la neutralité (Alais, 1984).

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1908, lors du premier congrès International pour la répression des fraudes alimentaires, comme « produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli, proprement et ne pas contenir de colostrum (Larpen, 1997.)

Le colostrum est le liquide sécrété par la glande mammaire dans les jours qui suivent la mise bas (Boudier et Luquet, 1981).

Le lait est un substrat riche fournissant à l'homme et aux jeunes animaux naissants , un aliment presque complet , protides ,glucides, lipides, sels minéraux et vitamines sont présents à des concentrations tout à fait satisfaisantes pour la croissance et la multiplication cellulaire (Larpen et al. ,1997)

1- Définition du lait de vache

Le lait de vache est le lait produit par la vache dès la naissance de son veau pour le nourrir. Il est très utilisé en alimentation humaine transformé ou non.

Le lait de vache est un liquide blanc opaque, tendant plus ou moins au jaune selon teneur en matières grasses du bêta-carotène. Sa saveur est douce et son arôme est faible. Il contient un pourcentage élevé d'azote, de calcium et de vitamines fournit un intérêt alimentaire exceptionnel, les proportions des différents composants du lait de vache varient quelque peu selon les espèces de mammifères font partie de ces espèces par race. Un litre de lait cru contient environ 900g d'eau et 132g d'extrait sec, le pourcentage de matières grasses dans le lait de chèvre est presque le même (Belarbi, 2011).

Cependant, le diamètre moyen des globules gras du lait de vache est de $6\mu m$, celui du lait des chèvres mesurent environ $3\mu m$ (Belarbi, 2011).

Les principales protéines sériques sont identiques, à savoir la -lactalbumine et la -lactoglobuline et immunoglobuline. Le lait de vache contient des quantités égales entre Caséine alpha et bêta (Belarbi, 2011)

2- Qualité organoleptique du lait :

2-1 La couleur

Le lait est de couleur blanc mat, qui est due en grande partie à la matière grasse, aux pigments de carotène (la vache transforme le β -carotène en vitamine A qui passe directement dans le lait (Fredot, 2005).

Dans le lait, deux composants, les lipides sous forme de globules de matière grasse et les protéines sous forme de micelles de caséines diffractent la lumière. Ces agrégats dispersent les rayons lumineux sans les absorber et le rayonnement qu'ils renvoient, est identique en composition au rayonnement solaire, à savoir une lumière blanche (Reumont, 2009).

2-2 L'odeur

L'odeur caractéristique du lait provient du fait que la matière grasse qu'il contient fixe des odeurs animales. Elles sont liées à l'ambiance de la traite, à l'alimentation (les fourrages à base d'ensilage favorisent la flore butyrique, le lait prend alors une

forte odeur), à la conservation (l'acidification du lait à l'aide de l'acide lactique lui donne une odeur aigrelette) (Vierling, 2003).

2-3 La saveur :

La saveur du lait normal frais est agréable. Celle du lait acidifié est fraîche et un peu piquante. Les laits chauffés (pasteurisés, bouillis ou stérilisés) ont un goût légèrement différent de celui du lait cru. Les laits de rétention et de mammites ont une saveur salée plus ou moins accentuée. Il en est parfois de même du colostrum. L'alimentation des vaches laitières à l'aide de certaines plantes de fourrages ensilés, etc. Peut transmettre au lait des saveurs anormales en particulier un goût amer. La saveur amère peut aussi apparaître dans le lait par suite de la pullulation de certains germes d'origine extra-mammaire (Larpen et *al*, 1997).

Tableau 1: Caractère physique du lait cru (Larpen et *al*, 1997)

	Caractère normal	Caractère anormal
Couleur	Blanc mat Blanc jaunâtre : Lait riche en crème	Gris jaunâtre : Lait de mammite Bleu, jaune ... Lait coloré par des substances chimiques ou des pigments bactériens
Odeur	Odeur faible	Odeur de putréfaction , de moisi , de rance ...
Saveur	Saveur agréable	Saveur salée : Lait de mammite Gout amer : Lait très pollué par des bactéries

3- La composition de lait de vache

Le lait est une émulsion de matière grasse dans une solution aqueuse comprenant de nombreux éléments dont les uns sont à l'état dissous et les autres sous la forme colloïdale (Vignola *et al*, 2002).

Tableau 2 : Composition générale du lait de vache (Alais, 1975).

Constituants majeurs	Variations limites (%)	Valeur moyenne (%)
Eau	85,5 – 89,5	87,5
Matière grasse	2,4 – 5,5	3,7
Protéines	2,9 – 5,0	3,2
Glucides	3,6– 5,5	4,6
Minéraux	0,7– 0,9	0,8

Tableau 3 : Composition moyenne du lait de vache en gramme /litre (Tormo, 2010)

Eau	Extrait sec	Matière grasse	Matières Azotées			Lactose
			Totales	Caséine	Albumine	
900	130	35--40	30-35	27 –30	3—4	40—50

3-1 L'eau :

L'eau est l'élément quantitativement le plus important : 900 à 910g par litre.

(Mathieu, 1998).

3-2 Matière grasse :

Les matières grasses sont les éléments majeurs du lait (30 à 60 g/l), dont la quantité varie en fonction des conditions d'élevage ; elles se trouvent en émulsion sous forme de globules gras individualisés (0.1 à 20 µ m de dimension) (Vignola, 2002).

Tableau 4 : Composition lipidiques du lait (Grappin et Pochet, 1999).

Constituants	Proportions des lipides du lait
Triglycérides	98
Phospholipides	01
Fraction insaponifiable	01

3-3 Matière azotée

La matière azotée du lait englobe deux groupes, les protéines et les matières non protéiques qui représentent respectivement 95% et 5% de l'azote minéral du lait (Goursaud, 1985).

Une micelle de caséine contient environ 92 à 93% de protéines, les caséines, et 8% de minéraux. La partie minérale de la micelle comporte 90% de phosphate de calcium et 10% d'ions citrate et de magnésium (2,9% de Ca, 0,1% de Mg, 4,3% d'ions phosphate, 0,5% d'ions citrate) (Cayot et Lorient, 1998). La présence de phosphate de calcium lié à la caséine est l'une des forces responsables de la stabilité de la structure des micelles de caséine (Marchin, 2007).

Une propriété importante des micelles est de pouvoir être déstabilisée par voie acide

ou par voie enzymatique et de permettre la coagulation. Elle constitue le fondement de la transformation du lait en fromage et en laits fermentés (Luquet, 1985).

L'autre fraction protéique (environ 17%) du lait est présente dans le lactosérum. Les deux principales protéines sériques sont la bêta-lactoglobuline et l'alpha-lactalbumine (Cayot et Lorient, 1998).

3-4 Les glucides :

Le sucre principal du lait est le lactose ; c'est aussi le composé prépondérant de la matière sèche totale. Sa teneur s'élève en moyenne à 50g par litre. C'est un disaccharide constitué de l' alpha ou bêta glucose uni à du bêta galactose, ce qui est à l'origine de la présence de 2 lactose (Luquet, 1985).

Le lactose est fermentescible par de nombreux micro-organismes et il est à l'origine de plusieurs types de fermentations pouvant intervenir dans la fabrication de produits laitiers (Morrissey, 1995).

A température élevée, le lactose participe avec les protéines à des réactions de brunissement non enzymatique pouvant altérer la couleur des laits stérilisés (Alais, 1975).

3-5 Matière minérale

La matière minérale du lait (7g à 7,5g/l) est fondamentale d'un point de vue nutritionnel et technologique. Il est possible de doser les matières minérales ou cendres du lait par une méthode de calcination à 550°C (Luquet, 1985).

Les minéraux sont présents, soit en solution dans la fraction soluble, soit sous forme liée dans la fraction insoluble (ou colloïdale). Certains minéraux se trouvent exclusivement à l'état dissous sous forme d'ions (sodium, potassium et chlore) et sont existents dans les deux fractions (Mathieu, 1998).

En raison de la présence concomitante de lactose et de phosphopeptides (produits de l'hydrolyse de la caséine), les minéraux sont, de tous les éléments du lait, ceux qui sont les mieux adsorbés et retenus. A cet égard, le rapport calcium/phosphore (Ca/P) du lait de vache (voisin de 1,2), bien qu'inférieur à celui du lait maternel (voisin de 2,2), est de loin supérieur à celui des autres denrées alimentaires, faisant du lait une excellente source de calcium et un bon correctif des rations pauvres en calcium (FAO, 1995).

3-6 Enzymes :

Ces enzymes originaux proviennent du pis de la vache, et les enzymes bactériens d'origine bactérien. Ils existent cependant beaucoup de bactéries qui produisent le même type d'enzymes (Vignola, 2002).

Le lait contient principalement trois types d'enzymes : les hydrolyses, les déshydrolases (ou oxydase) et les oxygénases. (Bahri ,2016)

3-7 Vitamines :

Tableau 5. Teneur en vitamines du lait de vache (mg/litre) (Alais, 1985).

3-7-1 Vitamines hydrosolubles

Vitamine	Moyennes
B1 (thiamine)	042
B2 (riboflavine)	172
B6 (pyridoxine)	048
B12 (cobalamine)	045
Acide ascorbique	092
Acide folique	053
Acide pantothénique	36
Inositol	160
Biotine	036
Choline	170
C (acide ascorbique)	8

3-7-2 Vitamines liposolubles

A	37
Carotène	021
D (cholécalférol)	0008
E (tocophérol)	11

Le lait contient presque toutes les vitamines indispensables à la vie à l'exception de la vitamine C (très petite quantité) (Belarbi, 2011)

4- Propriétés physicochimiques du lait

4-1 - Acidité du lait

Normalement l'acidité du lait est proche de la neutralité (pH=7,0). Il est légèrement acide et son pH varie normalement de 6,6 à 6,8. Cependant, lorsque le lait n'est pas refroidi rapidement à 4°C après la traite, les bactéries lactiques y croissent rapidement. (Bahri , 2016)

Ces bactéries produisent l'acide lactique qui diminue le pH du lait (l'acidité augmente). (Bahri , 2016)

Lorsque l'acidité est suffisamment forte à température ambiante (un pH inférieur à 4,7) la caséine du lait coagule. Si la température est plus élevée, la coagulation de la caséine du lait se produit en présence de moins d'acide (un pH plus élevé). (Mathieu, 1998)

4-2 - Densité du lait :

La densité du lait à 15°C est en moyenne 1.032 (1.028-1.035). Elle est la résultante de la densité de chacun des constituants du lait et il est aussi donné que la matière grasse est le seul constituant qui possède une densité inférieure de 1 (Vignola, 2002).

4-3- Stabilité à la chaleur

Le lait frais peut maintenir sa structure normale lorsqu'il est exposé à de courtes périodes de chaleur intensive. Cependant, l'exposition prolongée à la chaleur dégrade la structure des micelles de caséines et modifie la structure du lactose qui tend à réagir avec les protéines. La stabilité à la chaleur peut donc indiquer la qualité d'un lait. Un lait acide se déstabilise plus rapidement à la chaleur qu'un lait normal (Mathieu, 1998)

4-3-1 Point d'ébullition

On définit le point d'ébullition comme la température atteinte lorsque la pression de la substance ou la solution est égale à la pression appliquée. Le point d'ébullition est légèrement supérieur au point d'ébullition d'eau, soit 100,5°C (Vignola, 2002).

4-2 -2 Point de congélation

Le point de congélation du lait est légèrement inférieur à celui de l'eau puisque la présence de solides solubilisés abaisse le point de congélation. Il peut varier de - 0,530°C à - 0,575°C avec une moyenne à - 0,555°C. Un point de congélation supérieur à - 0,530°C permet de soupçonner une addition d'eau au lait. On vérifie le point de congélation du lait à l'aide d'un cryoscope (Piveteau, 1999).

5 - Les caractéristiques microbiologiques de lait

5-1- Flore de contamination

La flore contaminante est l'ensemble des microorganismes ajoutées au lait de récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels de goût, d'arômes ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène capable de provoquer des malaises chez des personnes (Lamontagne *et al*, 2002).

Le lait au cours de la traite, du transport et du stockage à la ferme ou à l'usine, est contaminé par une grande variété de microorganismes (Larpen, 1997).

-Le lait peut se contaminer par des apports microbiens divers :

- Fèces et téguments de l'animal : Coliformes, *Entérocooccus*, *Clostridium*, *Salmonella*.
- Sol : *Streptomyces*, *Listeria*, bactéries sporulés, spores fongiques.
- - L'air et l'eau : Flores diverses, bactéries sporulées (Guiraud, 2003).

5-2- Flore originale

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions, à partir d'un animal sain (moins de 10³ germes /ml). Il s'agit essentiellement des germes saprophytes de pis et des canaux galactophores : microcoques, streptocoques lactiques, lactobacilles. Des germes pathogènes et dangereux du point de vue sanitaire) peuvent être présents lorsque le lait est issu d'un animal malade (*Streptococcus pyogene*, *Corynebacterium pyogenes*, des *Staphylococcus*) qui sont des agents des mammites et peut exceptionnellement *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus anthracis* et quelques virus (Guiraud, 2003).

La flore microbienne du lait cru participe de façon importante à l'établissement des caractéristiques organoleptiques des fromages et ce, indépendamment de la présence des ferments (Michel *et al*, 2001)

Tableau 6: Flore indigène du lait cru (Lamontagne *et al*, 2002)

Microorganismes	Pourcentage (%)
<i>Micrococcus</i>	30-90
<i>Lactobacillus</i>	10-30
<i>Streptococcus ou Lactococcus</i>	<10
<i>Gram négatif</i>	<10

CHAPITRE II : LES BACTERIES LACTIQUES

1- Définition des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont très anciennes et sont apparues avant les cyanobactéries, il y environ 3 milliards d'années (Taillies, 2001). La première culture pure était des *Bacterium lactis* probablement des *Lactococcus lactis* obtenue par Lister en 1873. Les bactéries lactiques ont été isolées pour la première fois à partir du lait (Metchnikoff, 1908, Sandine *et al*, 1972 et Carr *et al*, 2002).

Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (De Roissart, 1986). Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène (Badis *et al*, 2005). Leur forme peut être coccoïde, coccobacillaire ou bacillaire, elles sont généralement mésophiles avec une température optimum de croissance entre 20°C et 30°C ou thermophiles entre 30°C et 45°. La majorité des souches se développent à pH 4.0-4.5, certaines sont en activité à pH 9.6 et d'autres à pH 3.2 (Jozala *et al*, 2005 Carr *et al* 2002 ; Kotelnikova et Gelfand, 2002).

Elles sont de métabolisme chimio-organotrophe, ce qui signifie qu'elles utilisent comme source énergétique de substances hydrocarbonées telles que les sucres, les alcools et les acides organiques. Elles possèdent souvent des exigences nutritionnelles complexe en termes d'acides aminés, de peptides, de vitamines, de sels, d'acides gras et de sucre (Dellaglio *et al*, 1994).

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).

Elles sont considérées comme non pathogènes et se voient attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe) (Aguirre et Collins 1993). Cependant, quelques membres du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* ainsi que d'autres bactéries lactiques sont considérées comme pathogènes opportunistes (Collins *et al* 1993).

2- Habitat des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées, des produits laitiers, de la viande, des fruits en décomposition, du poisson fermenté, des eaux usées et des cavités (buccale, les organes génitaux, les voies intestinales et respiratoires) des humains et des animaux (König et Fröhlich, 2009).

Grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique, les bactéries lactiques peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique. Dans différents écosystèmes, les bactéries lactiques sont capables d'exercer des effets bénéfiques ou, plus rarement, d'engendrer des altérations biologiques.

La source originale des bactéries lactiques est constituée par les plantes vertes, et suite à des processus d'évolution et d'adaptation, ces bactéries ont colonisé d'autres environnements et se trouvent ainsi dans divers habitats, tant que ceux-ci réunissent les conditions adéquates pour satisfaire leurs besoins nutritifs (Fenton, 1987 ; Kelly *et al.*, 1998 ; Carr *et al.*, 2002). De cette manière, le lait, auquel les bactéries lactiques peuvent accéder à travers le corps de l'animal, les excréments ou les végétaux, est devenu un habitat caractéristique des bactéries lactiques, et ainsi elles se trouvent associées à divers produits laitiers fermentés (Dellaglio *et al.*, 1994). Il faut signaler, en outre, que les bactéries lactiques font partie de la microflore naturelle de la bouche, du tractus intestinal et du vagin de l'espèce humaine et de nombreux animaux homéothermes (Holzapfel *et al.*, 1998 ; Sookkee *et al.*, 2001).

Leurs grandes exigences nutritionnelles les associent à des environnements naturels particulièrement riches en nutriments ; plantes, animaux, produits laitiers et carnés. Grâce à des phénomènes de synergie ou de coopération, différentes espèces de bactéries lactiques sont très souvent associées dans un habitat donné (Marshall, 1987).

3- Taxonomie des bactéries lactiques

La taxonomie des bactéries lactiques repose sur l'identification phénotypique basée sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques. Néanmoins, ces méthodes conventionnelles ont leurs limites, notamment dans le cas de variations du phénotype par la présence ou l'absence d'un plasmide codant pour des fonctions métaboliques. Par conséquent, les méthodes moléculaires s'avèrent indispensables car

elles sont plus fiables pour une classification couvrant des niveaux d'identification allant de la famille à l'espèce. De plus, les informations obtenues avec les méthodes moléculaires sont utiles pour le concept de phylogénie (Pot, 2008).

Depuis la description du *bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot, 2008).

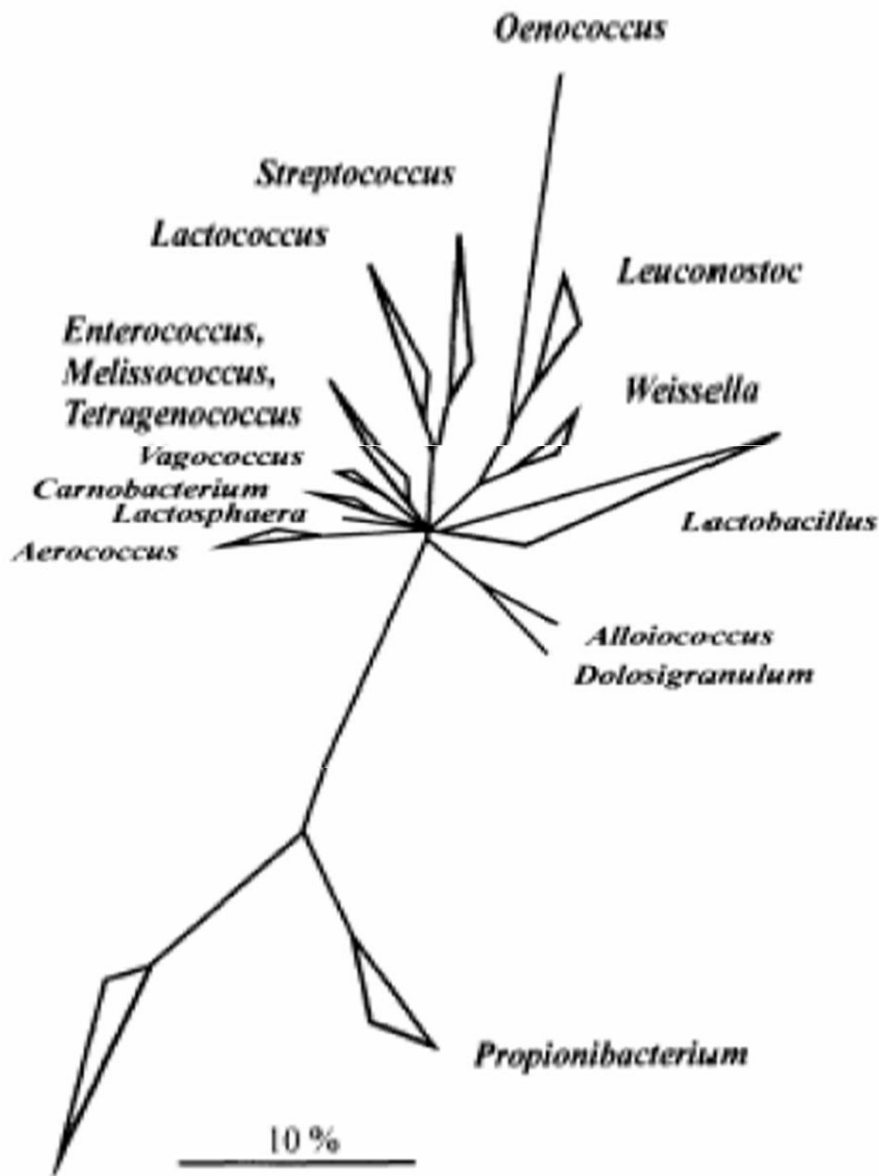
La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique /biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique du lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Vandamme, 1996 ; Stiles et Holzapfel, 1997).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classer les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins *et al*, 1993).

A ce groupe de bactéries lactiques, appartient plusieurs genres comme *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Pot, 2008). Des genres nouveaux, par exemple *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus* ; *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également

été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupes des bactéries lactiques (Broadbent, 2001).

Le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré par plusieurs auteurs comme genre de bactéries lactiques, bien qu'il se distingue par un pourcentage en G+C de 55%, largement supérieur à celui des autres genres et par une voie métabolique de fermentation des sucres particulière. Les études phylogénétiques basées sur l'analyse des séquences des ARN ribosomiques ont confirmé l'appartenance de ces différents genres à un même groupe qui inclut également *Clostridium*, *Bacillus* et *Propionibacterium* (figure 01) (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Pilet *et al.*, 2005).



Bifidobacterium

Figure 01 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres Associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).

Le groupe des bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique a été défini en 1919 par Orla-Jensen. Il a réuni plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (Tredez, 2008).

Les genres les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, et *Pediococcus* (Drouault et Corthier, 2001). Actuellement le groupe des bactéries lactiques associées aux aliments renferme les 12 genres suivantes :

Carnobacterium, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* et *Bifidobacterium*.

3-1 : Le genre *Lactobacillus*

Parmi les genres les plus utilisés en agroalimentaire et la nutrition humaine, selon la collection Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen and Zellkulturen (Kandler et Weiss, 1986). Ce genre renferme 174 espèces (les sous-espèces sont incluses). Il contribue aux saveurs des produits fermentés par la production de diacétyle principalement.

Ces bactéries sont de formes bacillaire ou cocobacillaire et ont tendance à former des chaînettes. Elles sont des acidophiles, leur pH maximum de croissance est de 7,2. Certaines espèces sont mésophiles, mais d'autres sont thermophiles comme l'espèce *Lactobacillus jensenii* (Laurent *et al*, 1998).

Les lactobacilles se répartissent en trois groupes selon leur profil fermentaire, d'après la classification de Kandler et Weiss (1986) (Tormo, 2010).

Groupe I : Ce genre comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (croissance à 45°C) dont *Lb.delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb.helveticus*. La plupart des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers.

Groupe II : Ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration en glucose limitante. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb.plantarum*, majoritairement mésophiles (Laurent *et al*, 1998).

Groupe III : Ce genre est constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires, c'est-à-dire utilisant la voie des pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses.

C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogène, surtout mésophiles, comme *Lb.brevis*, *Lb.kefir* et *Lb. sanfransisco*, Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'homme, et participent à l'équilibre de la flore intestinale (Laurent *et al.*, 1998).

3-2 - Le genre *Lactococcus*

Ce sont des microorganismes mésophiles, à Gram positif, sans activité catalase, non mobiles et se présentant sous forme de coques disposés en paires ou en chaînette. Leur métabolisme est homofermentaire, de l'acide lactique (L+) étant produit par la voie des hexoses (Tormo, 2010). Le genre *Lactococcus* comprend 6 espèces :

L.garviae, *L.piscium*, *L.plantarum*, *L.raffinolactis* et *L.lactis*, *L. chungangens*. Cette dernière espèce est divisée en trois sous espèces : *L.lactis subsp. Lactis*, *L.lactis subsp. Cremoris* et *L.lactis subsp.hordniae* (Bekouche, 2006).

Le genre *Lactococcus* se retrouve fréquemment dans les laits crus à des niveaux pouvant varier de 10 à 10 000 ufc/ml, selon les études et les espèces lactières. Les niveaux sont supérieurs dans les laits de chèvre et de brebis, comparés au lait de vache. Parmi les lactocoques, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus étudiée et la plus fréquemment détectée dans les laits crus (Serna et Rodríguez, 2006).

3-3 - Le genre *Streptococcus*

Les streptocoques sont des coques Gram positif, disposés en paires ou en chaînettes, non sporulés, apparaissant parfois capsulés, immobiles, anaérobies facultatifs, fragiles aux variations de température et de PH. Habituellement sont isolées de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. Leur pouvoir pathogène est très polymorphe selon les espèces (Ctinils, 2010).

Le genre *Streptococcus* contient plus de 40 espèces. Elles se répartissent en six groupes, chaque groupe est caractérisé par distinct potentiel pathogénique et autres propriétés (Kilian, 2002).

_ Le groupe *pyogenic* regroupe la majorité d'espèces qui sont pathogènes de l'homme et les animaux.

_ Le groupe *mitis* regroupe les espèces commensales de cavité buccale et le pharynx de l'homme. Bien que *Streptococcus pneumoniae* est une espèce pathogène très important.

_ Le groupe *bovis* vit au niveau du colon.

_ Le groupe *mutans* colonise exclusivement les dents humaines et certains animaux.

_ Les groupes *anginosus* et *salivarius* parmi la microflore commensale de cavité buccal et du pharynx.

3-4- Le genre *Leuconostoc*

La famille des *Leuconostocaceae*, contient des coques ovoïdes, pouvant être allongés ou elliptiques. Ce sont des cellules sphériques disposent en paire ou en chaîne, elles sont caractérisées par un métabolisme hétérofermentaire en convertissant le glucose en D- lactate et éthanol ou en acide acétique par la voie de transcétolase, elles sont incapables de dégrader l'arginine ce qui leurs distinguent des lactobacilles hétérofermentaires (Gonzalez *et al*, 2007).

On range habituellement les leuconostocs dans les anaérobies facultatifs mais certains les considèrent comme des anaérobies facultatifs, mais certains les considèrent comme des anaérobies aérotolestants. Ils sont exigeants et présentent souvent une auxotrophe pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et glucides (Dellaglio *et al*, 1994).

3-5- Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* a été isolé pour la première fois par Tissier en 1899 (Biavati *et al*, 2000), 32 espèces ont été assignées de ce genre (Dong *et al*, 2000). Ces bactéries sont Gram positive, anaérobie, immobiles, non sporulés et catalase négative (à l'exception de *B.indicum* et *B.asteroides*. Elle a haut pourcentage en G+C (entre 55 et 67%) (Valeria, 2009).

Le tractus intestinal humain et animal est l'habitat naturel de *Bifidobacterium*. Celle-ci prédominant de ce dernier : environ 3% de la microflore fécale chez l'adulte et de 91% chez les nourrissons (Hadadji *et al*, 2005 ; Boclé, 2005).

Tableau 7 : Les différents genres des bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Laurent et al, 1998).

Genre	Morphologie	Fermentation	Température optimale	Nombre d'espèces
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homo ou heterofermentaires	thermophiles ou mésophiles	G1 :23 G2 :16 G3 :22
<i>Lactococcus</i>	Coques	homofermentaires	Mésophiles	5
<i>Streptococcus</i>	Coques	homofermentaires	Mésophiles ou thermophiles	19
<i>Leuconostoc</i>	Coques	heterofermentaires	Mésophiles	11
<i>Bifidobacterium</i>	Forme Irrégulière	Acide acétique et Lactique	Mésophiles	25

4- Rôle des bactéries lactiques :

4-1- Fabrications des produits laitiers

Les bactéries lactiques interviennent essentiellement dans deux étapes de fabrication des fromages :

la coagulation : l'acidification du lait par production des acides lactiques conduit au caillage ;

l'affinage : les molécules produites par les bactéries lactiques lors de l'affinage participent à la flaveur, aux arômes des fromages. Les enzymes bactériennes participent également à la protéolyse qui a lieu pendant l'étape d'affinage de la pâte (Ctinils, 2010).

La fabrication des yaourts utilise quant à elle deux souches bactériennes : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* (Ctinils, 2010).

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique. Elles appartiennent à divers genres comme : *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, et *Carnobacterium*.

Elles interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires : salaison des légumes, boulangerie etc. (Hugenholtz et Kleerebezem, 1999). Les bactéries lactiques contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques (Hugenholtz et Kleerebezem, 1999).

4- 2- Rôle technologique

La fermentation des aliments par les BL est la conversion des hydrates de carbone en acides organiques (acide lactique notamment) et dioxyde de carbone dans des conditions d'anaérobiose en utilisant des intermédiaires organiques comme donneurs d'électrons et accepteurs d'électrons (Von Wright et Axelsson, 2012). Dans la fabrication des aliments, ces bactéries sont utilisées comme agents aromatisants et texturants. Elles produisent plusieurs composants tels que les exopolysaccharides, l'acétate, l'éthanol, le diacétyle et acétaldéhyde qui peuvent améliorer la texture, l'arôme et la saveur des produits alimentaires fermentés (Badel *et al*, 2011). Elles acidifient l'aliment, ce qui entraîne un goût d'acide lactique acidulé, elles exercent souvent des activités protéolytiques et lipolytiques, et produisent des composants aromatiques à partir des acides aminés (Van Kranenburg *et al*, 2002). En outre, les polysaccharides augmentent la viscosité et la fermeté, améliorent la texture et réduisent la sensibilité à la synérèse (Leroy et De Vuyst, 2004).

4-3-Rôle des bactéries lactiques dans la conservation des aliments :

L'homme utilise depuis longtemps, constamment ou non, les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. Ces propriétés se sont avérées être intéressantes pour la conservation des aliments dans lesquels cette flore se développe. Les bactéries lactiques inhibent le développement de certains microorganismes grâce à la synthèse de molécules antimicrobiennes parmi lesquelles se trouvent les acides organiques et les bactériocines (Wilson *et al*, 2005).

L'emploi des bactériocines permettrait d'avoir des produits plus sains et réduirait l'utilisation des agents chimiques de conservation (Harlander, 1993).

4-4- Rôle des bactéries lactiques dans l'altération des aliments

Les bactéries lactiques sont fréquemment associées de manière positive à l'alimentation humaine, à travers la fermentation d'une grande variété de produits (Ross *et al*, 2002). Elles sont présentes en temps que flore technologique dans les produits laitiers (yaourts, fromages), les produits carnés (charcuteries), les produits végétaux (choucroute, pickles, olives fermentées), les levains de panification et les boissons alcoolisées (vins, bières blanches, saké) (Leroy & De Vuyst, 2004). Cependant leur rôle en temps qu'agents altérants est aussi reconnu dans une vaste gamme de produits, sur les produits à base de viande, la croissance des bactéries lactiques entraîne l'apparition d'odeurs et de saveurs aigres ou rances (dus à la présence d'acide lactique ou d'acides gras volatils), de substance visqueuse (due à la production de polysaccharides) et de verdissement (dû à la présence de peroxyde d'hydrogène) (Labadie, 1999 ; Vermeiren *et al.*, 2005).

Des bactéries lactiques des espèces *Cb. divergens* et *Lb. sakei* ont été retrouvées parmi la flore altérante de viande de boeuf réfrigérée , De même il a été montré que *Lc. mesenteroides* pouvait faire partie de la flore d'altération principale de produits de type jambon (Vermeiren *et al*, 2005).

Bien que minoritaires par rapport aux levures, les bactéries lactiques participent à la fabrication de certains types de vins et de bières (lambic, bières blanches, et bières acides de fermentation haute) (Derdelinckx *et al*, 1994) principalement par l'intermédiaire de la fermentation malolactique. Cependant elles peuvent aussi faire partie de la flore d'altération de ces produits. Dans les vins, les phénomènes de "piqûre lactique" (augmentation de l'acidité en fin de fermentation), l'augmentation de la viscosité (due à la production de polysaccharides) et la production de saveurs indésirables ont été reliées à la présence de bactéries des genres *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactobacillus* (Lonvaud-Funel, 1999). Dans la bière, les genres *Lactobacillus* (principalement représenté par les espèces *Lb. brevis* et *Lb. lindneri*) et *Pediococcus* peuvent être à l'origine d'accidents de fermentation (Sakamoto & Konings, 2003).

Certains métabolites peuvent être présents sur des produits altérés sans être pour autant détectables au niveau sensoriel, comme par exemple les amines biogènes. Ce sont des composés azotés, dérivés de la décarboxylation de certains acides aminés.

Lorsqu'elles sont absorbées en trop grandes quantités, elles peuvent être responsables de maux de tête, hypotension, crampes abdominales, diarrhées et vomissements (Silla Santos, 1996). Leur synthèse dans les aliments est principalement due à la présence de microorganismes spécifiques, dont les bactéries lactiques (Brink *et al.*, 1990).

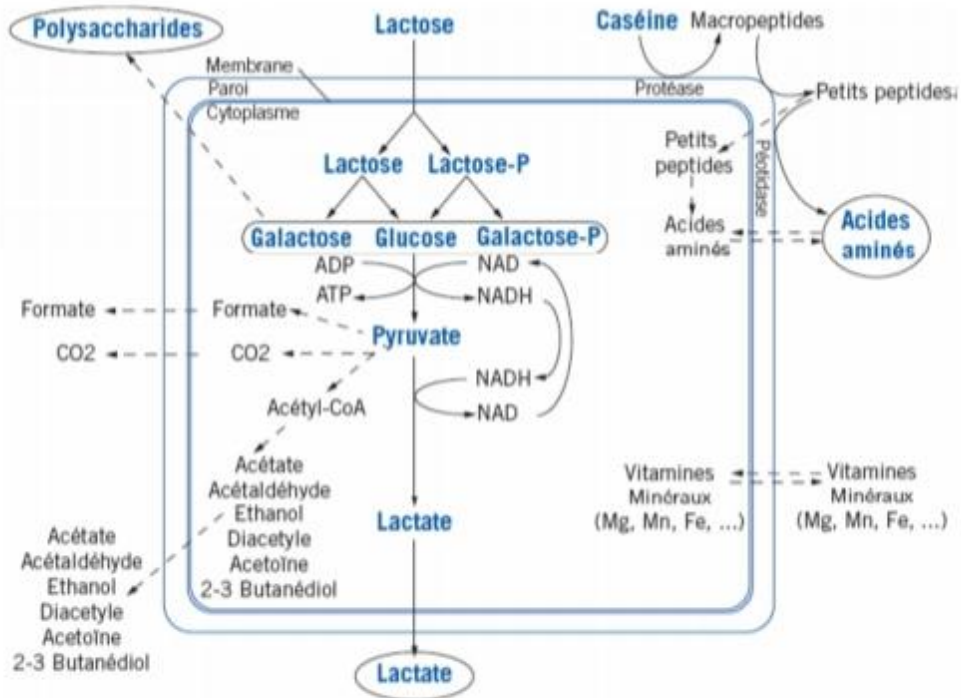
De nombreuses études ont mis en parallèle la présence de bactéries lactiques et la production d'amines biogènes dans les fromages (Joosten & Nunez, 1996), le vin (Lonvaud-Funel, 2001), et les produits à base de viande (Masson *et al.*, 1996 ; Suzzi & Gardini, 2003).

4-5-Bactéries lactiques et santé humaine :

Dans le domaine de la santé, certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire des micro-organismes vivants dont l'application à l'homme ou à l'animal exercent un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinale (Salminen *et al.*, 2004). Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement de certaines affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires , d'autres effets, comme la prévention des gastro-entérites nosocomiales chez le nourrisson, des propriétés anti cancérigènes, anti hyper cholestérolémiques (Salminen *et al.*, 2004).

5-Caractères technologiques :

Dans le processus de transformation du lait en fromage à coagulation lactique ou mixte, la microflore lactique est la première flore à intervenir. Les genres :*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* sont majoritairement retrouvés dans les fromages. La fonction principale de ces bactéries est de dégrader le lactose, sucre majoritairement contenu dans le lait, pour produire de l'acide lactique (fermentation lactique). Du fait de cette propriété, l'utilisation des bactéries lactiques comme levain en fromagerie a été introduite par Weigmann en 1890 (Stiles et Holzapfel, 1997), principalement dans le but d'accomplir l'acidification du lait simultanément à sa coagulation.



D'après Danone – World Newsletter n°5

Figure 2 : Représentation schématique des principales voies métaboliques des bactéries lactiques ayant des impacts technologiques (Dellaglio *et al*, 1994).

Tableau9 : principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (Penaud ,2006)

Genre	Substrat	Exemples de produits
<i>Bifidobacterium</i>	Lait	Laits fermentés
<i>Lactobacillus</i>	Viande Lait Végétaux Céréales	Yaourts, Laits fermentés, Kéfir, Fromages Saucissons secs ,jambons sec Choucroute, olives, Yaourt au lait de soja , pain au levain , bières
<i>Lactococcus</i>	Lait	Fromages, Kéfir
<i>Leuconostoc</i>	Lait Végétaux	Choucroute , olives ,vin Fromages, Kéfir
<i>Pediococcus</i>	Végétaux Viande	Choucroute saucisses Semi – séchées
<i>Oenococcus</i>	Végétaux	Vin
<i>Streptococcus</i>	Lait	Yaourts, Laits fermentés, fromages

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel et méthodes

1- Lieu et objectif du travail :

L'intégralité de ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie de l'université d'Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem

Les échantillons de laits crus de vache proviennent de la région Ouest Algérien(Oran), ils sont prélevés auprès des éleveurs de la ferme située aux amandiers

Les objectifs de cette étude se basent autour des points suivants :

- Isolement des bactéries lactiques à partir de différents échantillons de lait de vache cru de la région Ouest d'Algérie
- L'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats

Matériel et méthodes

2-Provenance des échantillons :

Les mamelles sont lavées avec l'eau savonneuse puis rincées à l'eau javellisée. Les échantillons du lait sont recueillis dans des flacons de 250 ml stériles, après avoir éliminé quelques jets, les échantillons sont conservés dans une glacière et acheminés directement au laboratoire pour analyse.

Les échantillons ont été soigneusement étiquetés (lieu et date de prélèvement....).

3-Isolement et identification des bactéries lactiques

3.1. Isolement et purification

L'isolement des bactéries lactiques a été fait après la réalisation d'une série de dilution décimale par le transfert d'un volume de 1ml du lait à 9ml de solution d'eau physiologique stérile pour l'obtention d'une dilution initiale de 10^{-1} ; elle est utilisée par la suite pour réaliser une série de dilution jusqu'à 10^{-7} (Khedid et *al.*, 2009). Un volume de 100µl de chaque dilution a été étalé sur des boites contenant un milieu MRS solide. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 48 à 72h.

4- Purification des isolats :

Seules les bactéries à Gram positif et catalase négative ont été retenues. Pour chaque échantillon, 5 à 10 colonies sont prélevées sur les milieux MRS et repiquées sur milieu MRS.

La purification des isolats consiste à les ensemercer en stries sur des boites de Pétri coulées avec des milieux MRS (solide). Les boites sont ainsi incubées à 37°C pendant 24 h. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures.

5-Conservation :

Les isolats sont conservés par deux méthodes :

- Conservation de courte durée : les isolats purs étaient ensemençés dans des tubes de gélose inclinée, après l'incubation à 30°C, les tubes sont placés à +4°C et le renouvellement des souches se fait toutes les 4 semaines.
- Conservation de longue durée : les cellules des isolats purifiés sont congelées à -20°C dans un milieu contenant 70% de lait écrémé (enrichi par 0.05 % d'extrait de levure) et 30% de glycérol (Samelis et al, 1994) après la centrifugation à 3000 tr/min pendant 10min. La culture peut être conservée plusieurs mois .

Matériel et méthodes

Identification phénotypique des isolats isolés

Afin d'identifier les bactéries, les méthodes phénotypiques comprenant une observation morphologique, des tests physiologiques et biochimiques ont été réalisés. Tous les tests ont été réalisés sur le milieu de culture ajusté à pH: 6.2, stérilisé et ensemencé par une culture jeune (développée dans le bouillon MRS pendant 16h); ils sont répétés deux fois. Le résultat de chaque test est comparé à un témoin (non inoculé par la bactérie) incubé à la même température.

6.1 Critères morphologiques :

6.1.1 Observation macroscopique :

Afin de déterminer leurs caractères cultureux (taille, forme et couleur), les colonies obtenues sont observées à la loupe binoculaire (Joffin et Leyral, 2006).

L'observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies (couleur, aspect, contour, forme et disposition).

6.1.2 Caractérisation microscopique :

La coloration de Gram a été utilisée pour classer les bactéries selon leur Gram.

6.1.3. Test à la catalase

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'hydrogène.

L'activité catalytique consiste à prélever une colonie sur gélose MRS ou M17 et dissociée dans une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2) à 10 volumes; l'apparition de bulles révélant le dégagement d'oxygène

Les bactéries lactiques sont à Gram positives et catalase ngative.

6.2 Caractérisation physiologiques et biochimiques :

6.2.1 Croissance à différentes températures :

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (Leveau *et al.*, 1991).

L'aptitude à la culture est testée à 15°C, et à 45°C en ensemencant de tube de bouillon MRS.

Les tubes sont examinés au bout d'un délai de 24 heures, la croissance est appréciée par l'apparition de trouble.

6.2.2 Type fermentaire :

Ce test permet de classer les bactéries en hétérofermentaire ou homofermentaire. Il est effectué dans un milieu dépourvu de citrate pour éviter la formation de CO_2 liée à ce

Matériel et méthodes

métabolisme particulier (Dicks et Van Vuren, 1987). On ensemence un tube de 10 ml de bouillon MRS dans le milieu muni d'une cloche de Durham, le CO₂ dégagé par les bactéries hétérofermentaires s'accumule dans la cloche après l'incubation à 30°C pendant 24 à 48 h.

6.2.3 Test de croissance à différents pH

Le bouillon MRS ajusté à des pH différents avec une solution de NaOH stérilisé puis inoculé avec tous les isolats pour les pH: 4.5 et 9.6. Les cocci hétérofermentaires sont cultivés aussi sur pH: 4.8 et les cocci homofermentaires sur pH: 9.2. La croissance des bactéries a été suivie pendant 24 à 48 h à 30°C (Badis et *al.*, 2005).

La croissance se traduit par l'apparition d'un trouble dans le tube

6.2.4 Croissance en présence de NaCl

La tolérance des bactéries au sel a été testée sur bouillon MRS additionné avec 40g/l et 65g/l d'NaCl. Après inoculation et incubation à 30°C pendant 5 jours, le développement des isolats est apprécié par comparaison avec un tube non ensemencé incubé à la même température (Guessas et Kihal, 2004).

6.2.5 Croissance dans le lait bleu de Sherman:

Le développement du test en présence 1% et 3% de bleu de méthylène. Du lait écrémé additionné de 0,1% et/ou 0,3% de bleu de méthylène (1ml de solution à 1% et/ou 3% par tube de 9ml de lait) est ensemencé et incubé durant une période de 24 à 48h à 30°C.

Lactococcus lactis est capable de pousser en présence de 0,3% de bleu de méthylène (Leveau et *al.* 1991).

6.2.6 Test de la thermorésistance :

Des tubes à essai contenant 5 ml de bouillon MRS stérile sont inoculés et placés dans le bain marie à une température de 60°C pendant 30min. L'apparition d'un trouble après une incubation d'une semaine à 30°C détermine la résistance des bactéries (Joffin et Leyral, 2006).

6.2.7 Production d'acétoïne :

La recherche de l'acétoïne est testée par la réaction de Voges Proskauer (VP) (Harrigan et McCance, 1976) ; après une culture de 24h à 30°C sur milieu Clark et Lubs.

Ajouter 5 gouttes du réactif VP1 (solution de soude NaOH à 16% dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VP2 (alpha-naphtol à 6% dans l'alcool à

Matériel et méthodes

95°). Agiter soigneusement les tubes et attendre un temps maximum de 10 min. La présence d'acétoïne se traduit par une coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu.

6.2.8 Fermentation des hydrates de carbones :

Il s'agit d'apprécier l'aptitude des isolats à métaboliser divers substrats carbonés en particulier les sucres. MRS sans extrait de viande et sans citrate (MRSc-ev) selon (Leveau *et al*, 1991) additionné d'un indicateur de pH (pourpre de bromocrésol à 0.05 g/l), le glucose du milieu MRS est remplacé par l'hydrate de carbone à tester, les solutions de sucres (mannitol, dextrine, raffinose, xylose, maltose, galactose, fructose, inositol, rhamnose, glucose, lactose, saccharose, arabinose) sont stérilisées par tyndallisation après ils ont introduit dans le milieu avec une concentration finale de 1%.

Une culture bactérienne de 24h est centrifugée à 3000 tr/min pendant 10min, le culot est rincé 2 fois à l'eau physiologique stérile, une suspension est réalisé avec l'eau physiologique. 0,1 ml de cette suspension estensemencé dans 2ml du MRSc-ev-BCP-sucre recouvrir avec une couche mince d'huile de paraffine (V/V) stérilisé (Samelis *et al*, 1994).

Après incubation pendant 48h à 72h le développement de la culture et le virage au jaune de l'indicateur coloré dû à l'acidification du milieu traduit la fermentation du sucre.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Résultats et Discussion

Lors de cette étude nous avons identifié les bactéries lactiques à partir du lait de vache par des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

L'isolement des bactéries lactiques nous a permis d'obtenir 53 isolats.

1 .Critères morphologiques :

L'examen macroscopique sur milieu solide MRS montre des colonies circulaires, et de couleur blanche, de couleur crème. L'aspect microscopique a révélée deux formes de cellules : Coques et Bâtonnets. Les coques sont disposées en paires (*Diplocoques*) ou en courtes chaînettes tandis que les bâtonnets sont en paires ou en courtes chaînettes.

2. Critères physiologiques et biochimiques :

Le caractère fermentaire a été déterminé sur bouillon MRS sans citrate pour que le CO₂ produit lors de la fermentation de glucose provienne de la voie hétérofermentaire (6-phosphogluconate/phosphocétolase) et non du citrate qui peut être métabolisé par de nombreux genres de bactéries lactiques (Salminen et *al.*, 2004).

Sur la totalité des isolats, vingt-quatre sont réunis par les caractéristiques suivantes: ils sont des cocci ou ovoïdes, arrangés en paires, en courtes ou en longues chaînes, homofermentaires qui ont résisté à une concentration de 4 % de NaCl mais non à 6.5 %. Une croissance a été obtenue à 10 °C, mais non à 45°C. Aucun isolat ne s'est développé au pH4.5 (à l'exception d'un à un pH de 9.6; néanmoins tous les isolats ont crû à pH: 9.2 et en présence d'une concentration de 0.1 % de bleu de méthylène. Aucun isolat n'était thermorésistant.

Le test d'ADH a divisé ces bactéries en deux groupes, quatorze isolats sont ADH + mais les dix restants sont dépourvus de l'arginine dihydrolase.

Le genre *Lactococcus* est différencié des autres cocci homofermentaires par leur croissance à 10°C mais non à 45°C et par leur intolérance à 6.5% d'NaCl et à pH: 9.6 (Salminen et *al.*, 2004).

Les isolats caractérisés ont été rattachés au *Lactococcus* car ce genre est intimement associé au lait et aux produits laitiers et d'après les auteurs: Khedid et *al.* (2009).

Quinze isolats ont représenté les caractéristiques suivantes :

Résultat et *discussion*

Ils sont des cocci, ovoïdes, en paires, en courtes ou en longues chaînes, hétérofermentaires, dépourvus de l'arginine dihydrolase (ADH). Ils ont crû à 4% d'NaCl, certains ont développé même à 6.5%. La plupart ont pu croître à 10°C, mais aucun isolat n'a pas résisté à une température de 45°C.

Tous les isolats ont toléré aux pH acides (4.5 et 4.8), mais non à pH: 9.6 et aucune croissance n'est remarquée après un chauffage à 60°C pendant 30min.

Ces quinze isolats ont été rattachés au genre *Leuconostoc*.

Huit isolats ont été associés au genre *Lactobacillus* genre qui est aisément distingué des autres par sa morphologie caractéristique en bâtonnet. Ils sont longs ou courts, isolés, en paires ou en longues chaînes, homofermentaires, ADH (-), croissent tous à 4% d'NaCl et certains à 6.5%. Toutes les souches peuvent se développer à 10°C, certaines à 45°C. Elles sont toutes des acidophiles (croissance à pH: 4.5) mais ne peuvent pas croître à pH: 9.6. Certains isolats survivent après un chauffage de 60°C pendant 30min.

Six isolats diplocoque et en courtes chaînes, homofermentaire, capable de croître à 4% d'NaCl mais non à 6.5%; thermosensible, ADH+ et résiste à 0.1% de bleu de méthylène. Ils peuvent se développer à 10°C et à 45°C, mais ne tolèrent pas le pH acide (4.5) néanmoins, une légère croissance a été obtenue au pH alcalin (9.6).

Ces isolats ont été rattachés au genre *Enterococcus*.

L'étude biochimique et physiologique a permis d'identifier : *Leuconostoc* (28%), *Lactococcus* (45 %) et *Lactobacillus* (15%) et *Enterococcus* (11%).

Nos résultats montrent que les genres *Leuconostoc*, *Lactococcus* sont les genres dominants les plus fréquemment signalés..

Résultat et *discussion*

CONCLUSION

CONCLUSION

A travers cette étude, nous avons tenté d'apporter une contribution à la caractérisation et l'identification des isolats lactiques a partir de lait de vache provenant région située l'Ouest Algérien (Oran) ferme situé aux amandiers

L'étude par les méthodes d'identification phénotypique fait ressortir que la microflore lactique du lait de de vache est constituée de quatre genres: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Enterococcus*.

A partir de cette étude, on a démontré que le lait cru de vache de la région Ouest d'Algérie (Oran) riche en plusieurs genres des bactéries lactiques comme *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Enterococcus*.

Ces isolats peuvent être exploitées pour la confection d'un starter de culture qu'on utilise dans la fabrication des aliments (le fromage, le yaourt).

Les résultats de caractérisation obtenus a permis d'avoir une idée sur la nature de la flore lactique présente dans le lait de vache.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Alais (1985) : Milk protein : biochemical and biological aspects.

Alais C. (1975). Sciences du lait. Principes des techniques laitières. Edition Sepaic, Paris.

Axelsson L. T. (2004). Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. In Lactic Acid Bacteria-microbiology and functional aspects. Edited by S. Salminen, Av. Wrigh et A Ouwehand MarcelDekker, Inc. 1-66.

Badel, S., Bernardi, T. et Michaud, P. 2011. New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* 29(1): 54-66.

Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et 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 et Technol*.23 :30-37.

Bahri D (2016) : Isolement de la flore lactique à partir d'un lait de vache destiné à la fabrication du camembert : Mémoire de fin d'études en exploitation des écosystèmes microbiens laitiers Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem

Belarbi F (2011), isolment et selection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes : Mémoire de Magistère en microbiologie alimentare et indusutrielle intitulée Université d'Oran Es Senia

Bekhouché F. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes petionolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification Biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme Polygalacturonase. Thèse présentépour obtenir le grade de Docteur en Microbiologie et Enzymologie, Option : Génie alimentaire. Université de Docteur en Microbiologie et Enzymologie, Option : Géniealimentaire. Université de Mentouri Constantine. P21, 24,27.

Références bibliographiques

Biavati B, Vescovo M, Torriani S & Bottazzi V. (2000). *Bifidobacteria* : history, ecology, physiology and application. *Annals of Microbiology*, 50, 117-131.

Boclé J-C Et Thomann C. (2005). Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte. Afssa (agence française de sécurité sanitaire des aliments) Nancy. P 19.

Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. and Huis in 't Veld, J. H. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* 11, 73-84.

Broadbent J.R., 2001. Genetics of Lactic Acid Bacteria. In : Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.). 2 e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 243-300.

Carr F.J., Chill D., Maida N. 2002. The lactic Acid Bacteria : A Literature survey. *Critical Rev. Microbiol.* 28 :281-370.²

Cayot P. et Lorient D. (1998). Structures et Techno fonctions des protéines du lait. Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris.

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

Ctinils. (2010). Conduite à tenir en cas de suspicion d'infection invasive à *Streptococcus pyogenes* (*Streptocoque* beta-hémolytique du groupe A) en service de gynécologie obstétrique et maternité. *Centre de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales Sud-Est. P9.* De contrôle dans les industries agroalimentaires. Vol. 2. Ed. Tech. El Doc. Lavoisier etAPRIA, Paris, 77-115.

Références bibliographiques

Dellaglio F., de Roissard H., Torriani S., Curk M.C., Janssens D., (1994).

Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques. Vol 1. De Roissard H et Luquet FM (ed). Loriga : Uriage.25-116.

Derdelinckx, G., Maudoux, M., Martens, H., Verachert, H. and Dufour, J. P.

(1994). Bières spéciales malts et moûts de type acide. In *Bactéries Lactiques*, pp. 333-340. Edited by H. De Roissart & F. M. Luquet. Paris: Lavoisier.

De Roissart H (1986). Bactéries lactiques In Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de doctorat. Université de Rennes-France.

De Vuyst Luc, Leroy Frédéric, 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J. Mol. Microbiol Biotechnol.*, 13: 194-199

Dicks L.M.T., Van Vuuren H.J.J., 1987. A modification of the hot-tube method for the detection of carbon dioxide produced by heterofermentative *Lactobacillus* strains. *J. Microbiol. Meth.*, 6: 273-275

Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X & Ling D. (2000). *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. *Evolutionary Microbiology* (2000), 50, 119-125.

Drouault, S. et Corthier, G. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés .

FAO. (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO Alimentation et nutrition n°28.

Fonton M.P.1987. An investigation into the Sources of lactic acid bacteria in GRAS silage. *J. Appl. Bacteriol.* 62 :181-188.

Références bibliographiques

Fredot E., (2005). Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier :10-14 (397 pages).

Gonzalez, et al., (2007). In Boudjani, W. (2009). Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages

Goursaud J., (1985). Composition et propriétés physico-chimiques. Dans Laits et produits laitiers vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits de la mamelle à la laitière. Luquet F. M. Edition Tec et Doc Lavoisier, Paris.

Grappin, R, Pochet, S, Le lait, 1999, P 3-22.

Guessas B et Kihal M (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goat's milk .African .Journal of Biotechnology 3(6): 339-342

Guiraud J.P, 2003. Microbiologie Alimentaire. Dunod. Paris. 651p.

Hadadji M, Benama R, Saidi N, Henni D & Kihal M. (2005). Identification of cultivable *Bifidobacterium* species isolated from breast-fed infants feces in West-Algeria. African *Journal of Biotechnology* Vol. 4(5), pp. 422-430, May 2005.

Hammes W.P., Hertel C., 2006. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes.*, 4: 320-403

Harrigan W.F., McCance M.E., 1976. Eds., *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology.* Academic Press, Orlando.

Harlander, S. K (1993) regulatory aspects of bacteriocins use. In: Hoover, D. G. and steenson, I .R, Editors bacteriocins of lactic acid bacteria, academic press, New York. 233- 236.

Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. (2001).

Références bibliographiques

Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr , **73**: 36S-73S Int. J. Food Microbiol. , 132:109-116.

Hughenoltz, J., Kleerebezem, M., Starrenburg, M., Delcour, J., de Vos, W. et Hols, P.(2000). Lactococcus lactis as a cell factory for high-level diacetyl production. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4112-4114.

Idoui, T., Boudjerda, J., Leghouchi, E. ET Karam, N.E., (2009). Lactic acid bacteria from sheep's Dhan'', a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. Gr. Y. Aceites. 60(2): 177-183

Jeantet, R., Croguennec, T., Mahaut, M., Schuck, P., et Brule, G. (2008) : Les produits laitiers, 2ème édition, tec et doc, Lavoisier : 1-3-13-14-17(185 pages).

Joffin, J.N et leyral, G. (2006). Microbiologie technique. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine Bordeaux, France, pp.219-223.

Joosten, H. and Nunez, M. (1996). Prevention of Histamine Formation in Cheese by Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria. Applied and Environmental Microbiology **62**, 1178-1181

Jozala AF, de lencastre Novaes LC,c holewo O, Moras D,et penna TCV.2005,Increase of nisin production by *lactococcus lactis* in different media.Afr J Biotechnol,4:3:262-265.

Kandler, O., Weiss, N., (1986). Genus *Lactobacillus*. In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology., Vol 2. P.H.A, Sneath., N.S, Mair., Sharpe, M.E., Holt, J.G (Ed). Williams and Wilkins, Baltimore, M.D.

Kelly W.J., Davey G.P., Ward L.J.1998. characterization of lactococci isolated from minimally processed fresh and vegetables. *Int. J. Food Microbiol.*45 :85-92.

Khedid K., Faid M., Mokhtari A., Soulaymani A., Zinedine A., 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. Microbiological Research., 164: 81-91

Références bibliographiques

Klaenhammer T.R., Fremaux C., Hechard Y, 1994. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques In Bactéries lactiques. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Lorica. pp: 353-366

Klaenhammer T. R., Barrangou R., Buck B. L., Azcarate-Peril M. A., Altermann E,2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. FEMS Microbiology Reviews., 29: 393-409.

Kilian M. (2002). *Streptococcus* and *Enterococcus*. Bacterial pathogens and associated diseases,N°16.174-188.

König Helmut, Fröhlich Jürgen, 2009. Lactic Acid Bacteria In Biology of Microorganismson Grapes, in Must and in Wine. König H. et al. (eds.). Springer Verlag Berlin, Heidelberg, pp: 3-29 (URL: <http://link.springer.de/link/service/books>)

Kotelnikava EA,et Gelfand MS.2002,Bcateriocin production by Gram positif bacteria and the Mechanisms of Transcriptional Regulation, Russian J,Genetics,38(6):628-641,translated from genetika,38(6):758-772.

Labadie, J. (1999). Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. Meat Science **52**, 299-305.

Lamontagne M., Champagne C.P, Reitz A.J, Moineau S., Gardner N., Lamoureux M.,Jean J., Fliss I., 2002. Microbiologie du lait In Science et technologie du lait : transformation du lait. Vignola C.L. Ecole Polytechnique Montreal, pp: 75-128 (<http://web.google.com/books>)

Larpent J-P., (1997). « Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire. Paris : Technique et documentation », 273 p. (Boudier et Luquet, 1981).

Références bibliographiques

Lasagno M., Beoletto V., Sesma F., Raya R., Font De Valdez G., Eraso A., 2002. Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment. *Microbiologia.*, 25: 37- 44

Laurent, S. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Poly technica Paris. 307 pages. Le codex Alimentarius (CODEX STAN 206-1999).

Leroy F. et De Vuyst L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trek. Food SCI. Technol.* 15 : 67-78.

Leveau J-Y., Bouix Mrielle, De Roissart H., 1991. La flore lactique In Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Bourgeois C.M., Leveau J-Y. Tec & Doc, Lavoisier, pp: 152-186

Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 317-331.

Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **199**, 9-13.

Luquet F. M. (1985). Laites et produits laitiers-Vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits De la mamelle à la laiterie. Tech. & Doc., Coll. STAA, Lavoisier, Paris.

Marchin S. (2007). Dynamique de la micelle de caséines : caractérisation structurale. Thèse INRA/ Agrocampus Rennes.

Marshall, V.M.E., et Law, B.A. (1984). The physiology and growth of dairy lactic-acid bacteria. *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, éd. Elsevier Appl Sci Publish. 1: 67-98.

Masson, F., Talon, R. and Montel, M. C. (1996). Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology* **32**, 199-207.

Mathieu J. (1998). Initiation à la physicochimie du lait. Guides Technologiques des IAA. Edition Lavoisier Tec et Doc, Paris.

Références bibliographiques

Metchnikoff E., 1908. Prolongation of life: Optimistic studies. William Heinemann, London. pp: 161-183

Michel Valérie, Hauwuy Agnès, Chamba J-F, 2001. La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Lait.*, 81: 575-592

Morrissey PA. (1995). Lactose : chemical and physicochemical properties. Dans : *Developments in dairy chemistry 3. (FOX PF).* Elsevier, London.

Penaud, S. (2006). Analyse de la séquence génomique et Etude de l'adaptation à l'acidité de *Lb. Delbrueckii SSP. bulgaricus* ATCC11842. Thèse de Doctorat de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon, France.

Piveteau, P, Le lait N° 97, 1999, P 28-29.

Pot B., 2008. The taxonom of lactic acid bacteria. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.).* Tec & Doc, Lavoisier. Paris.1-106.

Pougheon Sandra, Goursaud Jean, 2001. Le lait: caractéristiques physicochimiques In *Lait, nutrition et santé.* Debry G. Tec & Doc, Lavoisier, pp: 3-42

Reumont P., (2009). Licencié Kinésithérapie, <http://www.medisport.be>

Rosso L., Lobry, J.R., Bajards et Flandrois, J.P. 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth . *Appl Environ Microbiol* 61: 610-6.

Références bibliographiques

Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E, Prevost H. et Kihal M., 2002. Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du Lait Cru de Chèvre des Régions Arides d'Algérie. Journal Algérien des Régions Arides., 01: 01 14

Sakamoto, K. and Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. International Journal of Food Microbiology **89**, 105-124.

Salminen, S., Wright, A., Ouwehand, A. (2004).Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel Dekker.Inc., U.S.A.

Samelis J., Maurogenakis F. et Metaxopoulos J., 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami, Inter. J. Food. Microbiol., 23:179-196

Sandine W.E., Radich P.C., Elliker P.R., 1972. Ecology of the lactic streptococci. A review. J. Milk Food. Techn., 35: 176-185

Serna L & Rodríguez A. (2006). Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *lactis* isolated from sugar cane plants. Electronic Journal of Biotechnology ISSN : 0717- 3458 Vol.9 No.1, 2006 ; 40-45.

Silla Santos, M. H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology **29**, 213-231.

Suzzi, G. and Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. International Journal of Food Microbiology **88**, 41-54.

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

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

Références bibliographiques

Terzaghi, B.E., Sandine, W.E., 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages, Appl. Environ. Microbiol., 29: 807-813

Teuber Michael, Geis Arnold, 2006. The Genus Lactococcus. Prokaryotes 4: 205-228

Tredez M et Louise H.(2008). Méta- analyse des effets protecteurs des probiotiques sur lacancérogénèse colorectale chez les rongeurs. Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire.Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE. P 38-39.

Tormo H. (2010). Diversité des flores microbiennes des laits crus de chèvre et facteurs de variabilité. Thèse pour obtenir grade de Doctorat en Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition. Université de Toulouse. P28, 31-34.

Valeria M Ozzetti. (2009). Novel technological approaches to enhance stress tolerance of *Bifidobacterium longum* NCC2705 cells using continuous cultures. A dissertation submitted for the degree to ETH ZU RICH of Doctor of Sciences. P15-18.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. et Swings J., (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. Microbiol.Rev. 60 : 407.

Vermeiren, L., Devlieghere, F., De Graef, V. and Debevere, J. (2005). In vitro and in situ growth characteristics and behaviour of spoilage organisms associated with anaerobically stored cooked meat products. Journal of Applied Microbiology **98**, 33-42.

Vierling E., (2003). Aliment et boisson-Filière et produit, 2ème édition, doin éditeurs, centre régional de la documentation pédagogique d'Aquitaine : 11(270 pages).

Vignola C. (2002). Science et Technologie du lait Transformation du lait. Edition pressesInternationales Polytechnique, Canada. P.3-75.

Références bibliographiques

Von Wright, A. et Axelsson, L. 2012. Lactic acid bacteria: An introduction. In Lahtinne, S., Salminen, S., Von Wright, A. et Ouwehand, A., Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. *CRC Press*:1-17

Wilson, A. R., Sigeo, D et Epton, H.A. (2005) anti-bacterial activity of lactobacillus plantarum strain SKI against lister monocytogenes is due to lactic acid production. *Journal of applied microbiology* 99. 1516 -1522.

Annexe

Annexe

Milieu MRS

Peptone 10 g

Extrait de viande 8 g

Extrait de levure 5 g

Acétate de sodium 5 g

Phosphate bipotassique 2 g

Citrate d'ammonium 2 g

Sulfate de magnésium 0.1 g

Sulfate de manganèse 0,05g

Glucose 20 g

Tween 80 1ml

Agar 15g

Eau distillée 1000ml