



Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de biologie

**Mémoire de fin d'études**

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

**Option : Microbiologie Fondamentale**

**Présenté par :**

M<sup>elle</sup> Bencharef nouria samira

M<sup>elle</sup> Mehal farah

Soutenues publiquement le : 04/07/2018

**Thème :**

*Etude de quelques propriétés technologique des  
bactéries Lactiques isolées à partir d'un lait cru*

**Soutenues devant le jury :**

<b>Président : Mme Choghrani.F</b>	<b>Pr.</b>	<b>Université de Mostaganem</b>
<b>Examineur: M. Ben bouziane.A</b>	<b>MCB</b>	<b>Université de Mostaganem</b>
<b>Encadreur : Mme Henni Nassiba</b>	<b>MAA</b>	<b>Université de Mostaganem</b>

**Année universitaire : 2017/2018**

# **REMERCIEMENTS**

*J'adresse en premier lieu ma reconnaissance à notre DIEU tout puissant, de m'avoir permis d'en arriver là, car sans lui rien n'est possible.*

*Au terme de ce travail, il est agréable de présenter mes remerciements les plus sincères à Mme Henni N., pour m'avoir proposé ce sujet si intéressant et m'avoir accepté d'encadrer et d'orienter tout au long de mon travail avec leur judicieux conseils et sa constante disponibilité, c'est grâce à sa compétence et indulgence que ce travail a pu être réalisé*

*Je tiens à remercier les membres du jury : Mr Benbouzianne .A et Mme Chograni.F*

*Je remercie aussi l'ensemble du personnel travaillant au laboratoire du LSTPA.*

*Mes remerciements vont également à mes enseignants qui m'ont accompagné pendant mon cursus universitaire.*

*Je tiens à remercier tous le personnel de m'avoir aidé à réaliser ce projet. Merci infiniment pour les efforts fournis.*

*Mes plus vifs remerciements à mes parents, ma famille, et mes amies.*

# *Dédicace*

*Je m'incline devant Dieu Tout - Puissant qui m'a ouvert la porte du savoir et*

*M'a aidé à la franchir.*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A ma mère (Mama Aïcha), source d'affection de courage et d'inspiration qui a autant*

*Sacrifié pour me voir atteindre ce jour.*

*A mon père (Papa Harrag), source de respect, en*

*Témoignage de ma profonde reconnaissance pour tout l'effort et le soutien*

*Incessant qui m'a toujours apporté*

*A mes frères Asri et Mohamed*

*A ma belle soeurs Hamida*

*A toute la famille de mon père Bencharef et ma mère Benalioua*

*Une spéciale dédicace à mes collègues : Amina, Farah, Aïcha, Abir, Soumia*

*A ma grand-mère qu'Allah les préserveh; Ama fatiha*

*A tous ceux que je porte dans mon coeur.*

*Nouria*

# *Dédicace*

*Je m'incline devant Dieu Tout - Puissant qui m'a ouvert la porte du savoir et*

*M'a aidé à la franchir.*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A ma mère (Mama Hayet ), source d'affection de courage et d'inspiration qui a autant*

*Sacrifié pour me voir atteindre ce jour.*

*A mon père (Papa Norine), source de respect, en*

*Témoignage de ma profonde reconnaissance pour tout l'effort et le soutien*

*Incessant qui m'a toujours apporté*

*A mes frères Mohamed houcie et Mohamed islam*

*A toute la famille de mon père Mehal et Bouazza et ma mère Yahiaoui*

*Une spéciale dédicace à mes amis :Amina ,nouria ,Aicha,Abir,Soumia*

*A grand-père qu' Allah les préservé; Lahcen azedine*

*A tous ceux que je porte dans mon coeur.*

*Farah*

## Sommaire :

Introduction.....1

Partie bibliographique :

Chapitre I : lait.

1. Définition du lait.....	3
1.1 Présentation générale.....	3
1.2 Définition du lait de vache.....	4
2. Microflore du lait.....	4
2.1 Flore contaminant.....	5
2.2 Flore indigène ou originelle.....	6
3. Voies métaboliques .....	6
3.1 Voie homo fermentaire ou EMP.....	7
3.2 Voie hétéro fermentaire ou voie de pentose phosphate.....	7

Chapitre II : les bactéries lactiques.

1. Historique.....	8
2. Définition des bactéries lactiques.....	8
3. Habitat.....	8
4. Caractéristiques générale.....	9
5. Classification.....	9
5.1 enterococcus.....	9
5.2 lactobacillus.....	10
5.3 Lactococcus.....	10
5.4 Leuconostoc.....	10
5.5 Pediococcus.....	10
5.6 Streptococcus.....	11
6. Propriétés technologiques.....	11
6.2.Activité protéolytiques.....	13
6.3Formation des exo polysaccharides.....	13
6.1 production des substances inhibitrices.....	14

Partie expérimentale :

Matériels et méthodes :

Objectif du travail .....	15
Lieu de travail.....	15
1 Matériels.....	15
1.1 Milieux de culture .....	15
II. Méthodes .....	16
II.1 Analyse physico-chimique.....	16
II.1.1 Mesure du Ph .....	16
II.1.2 Détermination de l'acidité titrable.....	16
II.2 Provenance des échantillons.....	17
II.3 Isolement et culture de la flore lactique.....	17
II.4 Purification et conservation des souches .....	19
II.5- pré- Identification des isolats .....	20
II. 5-1 Critères morphologiques.....	20
II. 5.1.1 Caractérisation macroscopique.....	20
II.5.1.2 Caractérisation microscopique .....	20
II.5.1.3 Test de la catalase .....	21
II.6 Tests physiologiques .....	21
II.6.1 Croissance à différentes températures .....	21
II.6.2 La thermo résistance .....	21
II.6.3 La culture sur milieu hyper salé (Na CL) .....	21
II.6.4 les tests de différent ph .....	22
II.7 Tests biochimiques .....	22

II.7.1 Type fermentaire .....	22
II.7.2 production d'acétoine .....	22
II.7.3 Croissance dans des conditions hostiles .....	23
II.7.3.1 Croissance sur le lait bleu de Sherman (1937) .....	23
II.7.4 Fermentation des hydrates de carbones .....	23
II.8 Etude de quelques caractéristiques biotechnologiques des isolats .....	23
II.8.1 Recherche de l'arginine di hydrolase (ADH) .....	23
II.8.2 Détection des colonies larges et gluantes sur gélose hyper saccharose .....	24
II.8.3 La recherche d'esculine .....	24
II.8.4 Pouvoir protéolytique .....	24
II.8.5 pouvoir lipolytique.....	25
II.8.6 L'antibiogramme .....	25

### Chapitre III

#### Résultats et discussions :

#### Résultats :

I-Résultats des analyses physico-chimiques d'échantillon de lait de vache cru.....	28
I.1. Résultat de Mesure du pH.....	28
I-2Résultat d'Acidité titrable .....	28
II-pré-Identification des isolats .....	29
II-Critères morphologiques .....	29
II-1 Caractérisation macroscopique .....	29
II--2 Caractérisation microscopique .....	29
II-1-3 test catalase.....	30
III- résultats de l'étude pré-identification .....	32

III-1 Tests physiologiques .....	32
III-1-1 Type fermentaire .....	32
III-1-2 Croissance à 30°C et 42°C et la thermo résistance .....	32
III-2 Tests biochimiques .....	34
III-2-1-résultats des tests en milieux hostiles.....	34
III-2-1-2 croissance en milieu hypersalée.....	34
III-2-1-3 croissance à ph 4,6 et 9,6 .....	34
III-2-1-4 croissance à Lait de Sherman .....	35
III-2-2 Résultats test de l'arginine déshydrogénase l'ADH .....	36
III-2-3 Résultats d'Esculine .....	37
III-2-4 La production d'acétoine .....	38
III-2-5 Résultats du test des profils fermentaires .....	40
III-3- les tests technologiques .....	42
III-3-1- Résultats de production de dextrane .....	42
III-3-2 Résultats d'activité protéolytique .....	43
III-3-3- Les résultats de test de résistances aux antibiotiques .....	45
Discussion.....	47
Conclusion.....	50



❖ *Liste d'abréviations :*

ADH	Arginine Dihydrolase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNr 16S	Sous-unité 16S de l'acide ribonucléique ribosomique
ATP	Adénosine triphosphate.
BCP	Pourpre de bromocrésol
BL	Bactérie lactique
°C	Degré Celsius.
Ca	calcium
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
D°	Degré Dornic
EMP	Embdn-Meyerhof-Parnas
EN	Enterococcus
EPS	Exopolysaccharides
FAO	Food and Agriculture Organization
h	Heure
L	Litre
<i>Lb</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Ln</i>	<i>Leuconostoc</i>
ML	millilitre
Mm	millimètre
Min	minute
MG	magnésium
Mg	milligramme.
MRS	Man Rogosa et Sharpe
NaCl	Chloride de Sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
PTS	Phosphotransférase système
UFC	Unité formant colonie
T°	Température
T	Temoin
Sp	espèce
<i>ST</i>	<i>Streptococcus</i>
Subsp	sous espèce
VP	Voges-Proskauer

## Liste des figures :

Figure01 : Arbre phylogénétique de l'ordre de Lactobacillales.....	11
Figure02 : Protocole d'isolement des souches lactiques.....	18
Figure 03 : Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées .....	19
Figure04 : aspect macroscopique d'une bactérie lactique sur milieu MRS isolé à partir d'un lait de vache.....	28
Figure05 : Observation microscopique des souches Entérocooccus (A), Lactobacillus(B), Leuconostoc (C) après coloration de Gram(Gx100).....	29
Figure06 : Résultats de test de catalase.....	29
Figure07 : Résultats de type fermentaires.....	31
Figure08: Résultat de la thermorésistance des quelques souches lactiques à 63°C. T :témoins,(+) :positifs ,(-) :négatifs .	32
Figure 09 : Résultats de la croissance en milieu hypersalée à 4% et 6,5% .....	33
Figure10 : Résultats de la croissance à Ph 4,6 et 9,6 après incubation de 24h.....	34
Figure11 : Témoin de lait de sherman 1%.....	34
Figure 12 : Résultat de lait de Sherman 1%.....	34
Figure 13 : résultat de lait de sherman 3%.....	35
Figure14 :test de l'arginine déshydrogénase ADH (T : témoin+1colonie) la couleur Jaune (-) violet (+).....	35
Figure15 : Résultats de quelque souche sur milieu Esculine.....	36
Figure16 : Résultat de la production d'acétoïne .....	37
Figure 17: résultats de profil fermentaire.....	39
Figure 18 :répartition des espèces de collection lactiques(%).....	41
Figure19 : Résultats des EPS sur milieux hypersaccharosée MSE .....	42
Figure20 :Aspect des colonies protéolytique Sur milieu PCA au lait écrémé à 1% .....	44.

Figure 21:Aspect des colonies protéolytique sur milieu PCA au lait écrémé à 2%.....	44
Figure22 :Résultats du test d'antibiogramme d'une souches lactique LB2.....	45

## Liste des tableaux :

Tableau01 : Flore indigène du lait cru.....	06
Tableau02 : Milieux l'isolement des bactéries lactiques.....	17
Tableau03 : Résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur 1 échantillons de lait analysé. ....	27
Tableau04 : Critères morphologiques test de la catalase des 25 isolats .....	30
Tableau05 : Résultats de test de l'arginine déshydrogénase (ADH) des isolats retenus.....	36
Tableau06 : Résultats de test d'esculine .....	37
Tableau07: Répartition des résultats pré-identification des souches isolées.....	38
Tableau08 : Résultat de profil fermentaire des souches isolées.....	39
Tableau09 :les résultats de l'identification des souches lactiques isolées de lait de vache.....	40
Tableau10 : Résultats du pouvoir texturant des souches lactiques.....	42
Tableau11 : Résultats de l'activité protéolytique des souches de bactéries lactiques isolées à partir de lait de vache.....	43
Tableau 12: Résultats de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques.....	45

## **Résumé :**

Au cours de notre travail, nous avons procédé à l'isolement, la purification, la caractérisation et l'identification des isolats lactiques du lait de vache de l'ouest algérien : Hassi mamach de willaya Mostaganem. Après nous avons étudié quelques aptitudes technologiques de ces souches lactiques.

L'étude de 25 souches de bactéries lactiques a révélé une dominance du genre *Enterococcus* dans ce type de lait d'environ 44% suivi en deuxième ordre de la souche *Lactobacillus* avec un pourcentage 24%. Et le troisième ordre le genre *Streptococcus* à un pourcentage de 16% et les derniers genres avec faible pourcentage les *Lactococcus* de 12% et *Leuconostoc* de 4%.

D'après les résultats de l'étude des aptitudes technologiques, nous avons pu déduire que, même au sein d'une même espèce, il existe des variations entre les souches autant au niveau d'aromatique que l'activité protéolytique et texturante. Cependant, les souches avaient de bonnes fonctionnalités technologiques.

**Mots clés :** isolats, souches lactique, lait de vache, identification, aptitudes technologiques.

## **Abstract :**

During our work, we isolated, purified, characterized and identified lactic isolates of cow milk from western Algeria: Hassi mamach of Willaya Mostaganem. After that, we studied some technological skills of these lactic acid strains.

The study of 25 strains of lactic acid bacteria revealed a dominance of the *Enterococcus* gait in this type of milk of approximately 44%, followed in second order by the *Lactobacillus* strain with a percentage of 24%. And the third order the genus *Streptococcus* at a percentage of 16% and the last genera with low percentage *Lactococcus* of 12% and *Leuconostoc* of 4%.

According to the results of the study of technological abilities, we have been able to deduce that, even within the same species, there are variations between the strains as much at the aromatic level as the proteolytic and texturing activity. However, the strains had good technological features.

**Key words:** isolates, lactic acid strains, cow's milk, identification, technological abilities.

# Introduction

## INTRODUCTION

Le lait occupe une place stratégique dans l'alimentation quotidienne de l'homme 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.

Plusieurs produits laitiers sont obtenus par fermentation et cela par ensemencement du lait cru ou stérilisé par des bactéries lactique qui sont capables de bio- convertir ses différents éléments en nouvelles molécules dotant le lait de nouvelles propriétés organoleptiques, hygiéniques et même sanitaire.

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, contribuant ainsi à nous protéger contre l'invasion des germes pathogènes.

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...).La production d'acide lactique est essentielle à la fermentation de ces produits et leur confère une saveur typique.

Les bactéries lactiques colonisent naturellement plusieurs matrices alimentaires Elles sont depuis des siècles associées à l'alimentation humaine et animale. Ces micro-organisme sont tolérés par l'homme et les animaux, ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (Klaenhammer et al.,2005).

Certaines souches de bactéries lactiques s'avèrent bénéfiques pour la santé humaine et sont appelées probiotiques. Ils sont capables de survivre dans le système digestif humain, voire de le coloniser et sont utilisées pour le traitement des diarrhées et autres troubles digestifs. Des études récentes mettent en évidence des propriétés de stimulation de la réponse immunitaire

spécifique et certaines souches auraient la capacité de réduire les réactions d'allergie alimentaire, en particulier aux protéines du lait (Salminen et *al.*, 1996).

L'utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs vivants en vue d'une vaccination par voie orale est aujourd'hui un axe de recherche très privilégié.

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 empirique) ou sous forme de ferment (souche sélectionné et purifiée).

Elles réalisent dans les aliments une acidification, une production d'aromes, une production d'enzymes permettant d'améliorer la digestibilité des aliments et une inhibition des microorganismes qu'elle soit pathogène ou d'altération. Cette dernière activité est due à la production des substances antagonistes tels que les acides organique (acétique et lactique), le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines (Klaehammer et *al.*, 1994 ; Lasagno et *al.*, 2002 ; De Vuyst et Leroy, 2007)



# **Partie bibliographique**

# **Chapitre I :**

## **Le lait**

# Chapitre I Le lait

---

## I- Lait

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1909 par le congrès international de la répression des fraudes : (le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie. (Larpen, 1996b).

### I-1- Présentation générale

Le lait est produit par les ruminants qui transforment les protéines végétales en protéines animales. Le lait est sécrété par les glandes mammaires des femelles de plus de quelques 4000 espèces de mammifères. Sa composition varie légèrement d'une espèce de mammifère à l'autre. Le lait est un fluide aqueux opaque, blanc mat, légèrement bleuté, d'une saveur douceâtre et d'un pH(6,6 à 6,8) légèrement acide, proche de la neutralité (Pougheon et Goursaud, 2001).

Le lait est un substrat très 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).

Les principaux constituants du lait sont donc par ordre décroissant :

- De l'eau, très majoritaire ;
- Des glucides, principalement représentés par le lactose ;
- Des lipides, essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras ;
- Des protéines : caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles ;
- Des sels et minéraux à l'état ionique et moléculaire ;
- Des éléments à l'état de traces mais au rôle biologique important : enzymes, vitamines, oligoéléments.

# Chapitre I Le lait

---

## 1-2 Lait de vache

Le lait de vache est un liquide opaque de couleur, plus au moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en beta carotène. Sa saveur est douce et son odeur faible. Le lait de vache de par sa richesse en matière azotée, en calcium et en vitamines offre un intérêt alimentaire exceptionnel.

Les proportions des différents composants du lait vache varient quelque peu selon les espèces de mammifères et parmi ces espèces selon leur race. Un litre de lait contient près de 900 g d'eau et 132 g d'extrait sec.

Le pourcentage de matière grasse est sensiblement le même que dans le lait de chèvre. Cependant, le diamètre moyen des globules gras dans le lait de vache est de 6 $\mu$ m, le lait de chèvre est d'environ 3 $\mu$ m

Les principales protéines du sérum sont identiques, soit l' $\alpha$ -lactalbumine, la  $\beta$ -lactoglobuline et les immunoglobulines. Le lait de vache contient des quantités équivalentes entre les caséines alpha et béta.

Le lait contient presque toutes les vitamines indispensables à la vie à l'exception de la vitamine C (très petite quantité). (IDF, 1990).

## II-Microflore du lait

La microflore du lait fait partie de sa flore et se caractérise par son aptitude à fermenter le lactose avec production d'acide lactique et donc abaissement du pH. Les ferments lactiques laitiers constituent un groupe diversifié de bactéries qui ont néanmoins un certain nombre de caractéristiques communes : elles sont à Gram positif, catalase négative, anaérobies facultatifs ou micro-aérophiles et hétérotrophes (Alais, 1984 ; Claude et Champagne, 1998).

L'ensemble de ces caractères précieux permet aux bactéries lactiques un développement plus rapide que les espèces considérées comme étant nuisibles (Kouda et Boudabous, 1994).

# Chapitre I Le lait

---

## II-1-Flore contaminante

La flore contaminante est l'ensemble des microorganismes ajoutés 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 maladies chez les personnes (**Lamontagne et al., 2002**).

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

Les principales sources de contamination sont les suivantes ;

- Fèces et téguments de l'animal : *Coliformes, Bacillus, Clostridium, Salmonella*.
- Sol : *Streptomyces* , bactéries sporulées ,spores de champignons.
- Litières et aliments : flore banale, *lactobacilles, Clostridia butyrique* (ensilage).
- L'air et l'eau : flores diverse.
- L'équipement de traite et de stockage du lait : flore lactique microcoques, lactobacilles, *chromobacterium, Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, levures*.
- Manipulateurs : *Staphylocoques* des mains germes d'expectoration et de contamination fécale.
- Vecteurs divers : insectes en particulier (**Larpent J-P., 1997**).

Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont : *Pseudomonas, Proteus*, les coliformes, soit principalement les genres *Escherichia* et *Enterobacter*, les sporulées telles que *Bacillus, Clostridium* et certaines levures et moisissures.

D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade : ils sont généralement pathogènes et dangereux. Il peut s'agir par exemple d'agents de mammites.

## Chapitre I Le lait

---

Les mammites sont dues à des infections par *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactine*, *Escherichiacoli*, *Corynebacteriumbovisou* *Corynebacteriumpyogenes*, *Mycoplasma* , *Nocardiaasteroides*.

### II-2 Flore indigène ou originelle

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans des conditions aseptiques, à partir d'un animal sain, il devrait contenir moins de 5000 germes/ml et de moins de 1 coliforme /ml

La flore indigène du lait se définit comme l'ensemble de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores.

**Tableau 01** : 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
Gram négatif	<10

La flore microbienne du lait cru participe de façon importante à l'établissement des caractéristiques organoleptique des fromages et ce, indépendamment de la présence des ferments (Michel et *al.*, 2001). Les fabrications de produits laitiers utilisent beaucoup de microorganismes et, en particulier, des bactéries lactiques

### III- Voies métaboliques

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

# Chapitre I Le lait

---

## III-1 Voie homofermentaire ou EMP

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de *lactocoques*, *pediocoques*, ainsi que certains *lactobacilles*. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. La fructose-1,6-bisphosphate aldolase est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

## III-2 Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate :

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> sont dites hétérofermentaires.

Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc* et certains *Lactobacilles*. Ces microorganismes sont dépourvus le système de transport PTS (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

# **CHAPITRE II :**

## **Bactéries lactiques**



### II- Les bactéries lactiques

#### II.1. Historique

Les bactéries sont de très anciens micro-organismes dont les ancêtres (Drideret, 2009). Ils ont été utilisés pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans, sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité (Sallofe, 1994).

Ce n'est qu'à la fin du 19ème siècle, époque des grandes découvertes de la microbiologie, que certaines chercheurs ont isolé un *Streptocoque* (Poulain, 1994), comme VonFreudeinreichen 1897. La production des cultures de bactéries et l'emploi de ferment se développent au début du 20ème siècle (Drideret, 2009).

#### II.2. Définition

Les bactéries lactiques constituent l'un des groupes incontournables de la microbiologie alimentaire (Drideret et Prevost, 2009). Défini pour la 1ère fois par Orla-Jensen (1919), il réunit plusieurs genres caractérisés par leurs capacités à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (Novel, 1993).

Micro-organismes ubiquitaires, les bactéries lactiques se trouvent dans différents environnements (Dellaglio et *al.*, 1994 ; Matamoros, 2008), ce sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (De Roissart, 1986). Elles jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers produisant de l'acide lactique comme produit principal et vaginale (humain ou animale). (Raynaud, 2006).

#### II.3. Habitat

Les bactéries lactiques sont très abondantes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, de végétaux ou des aliments ensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Leveu et Bouix, 1993; Hassan et Frank, 2001; Hadeif, 2012). Ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe).

### II.4. Caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries possédant une réponse positive à la coloration de Gram, immobiles, non sporulées, au point de vue enzymatique catalase, oxydase et nitrate réductase négative, anaérobies ou aéro-tolérantes (Laurent et *al.*, 1998), se présentant sous formes différentes, Cocci ou bâtonnets (Bourgeois et Larpent, 1996).

Elles ont des besoins complexes en facteur de croissance : vitamine B, acide aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques. Elles se caractérisent par un métabolisme exclusivement fermentaire les conduisant à produire à partir du glucose des quantités importantes d'acide lactique, accompagné dans certains cas d'autres métabolites (éthanol, CO<sub>2</sub>, autres acides organiques). Elles ont une faible capacité de biosynthèse (Luquet, 1986).

### II.5. Classification

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

L'identification des espèces de bactéries lactiques peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates à l'aide du système API 50CH (Curk et *al.*, 1993).

L'analyse comparative des séquences d'ARN ribosomal 16S a entraîné des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (Salminen et *al.*, 2004). Selon la dernière édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilliet l'ordre des *Lactobacillales* renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles (Figure 1).

Parmi ces genres :

#### II.5.1. *Enterococcus*

Ce genre comprend des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes, homofermentaires. Quelques espèces sont mobiles par des petits flagelles et d'autres possèdent une pseudo-catalase. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6.5% de NaCl, à un pH 9.6 et un intervalle de température compris entre 10°C et 45°C avec une optimale de croissance de 35°C à 37°C.

### II.5.2. *Lactobacillus*

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

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

### II.5.3. *Lactococcus*

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

### II.5.4. *Leuconostoc*

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

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

### II.5.5. *Pediococcus*

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

II.5.6. *Streptococcus*

Les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues.

La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à un pH 9.6. Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes.

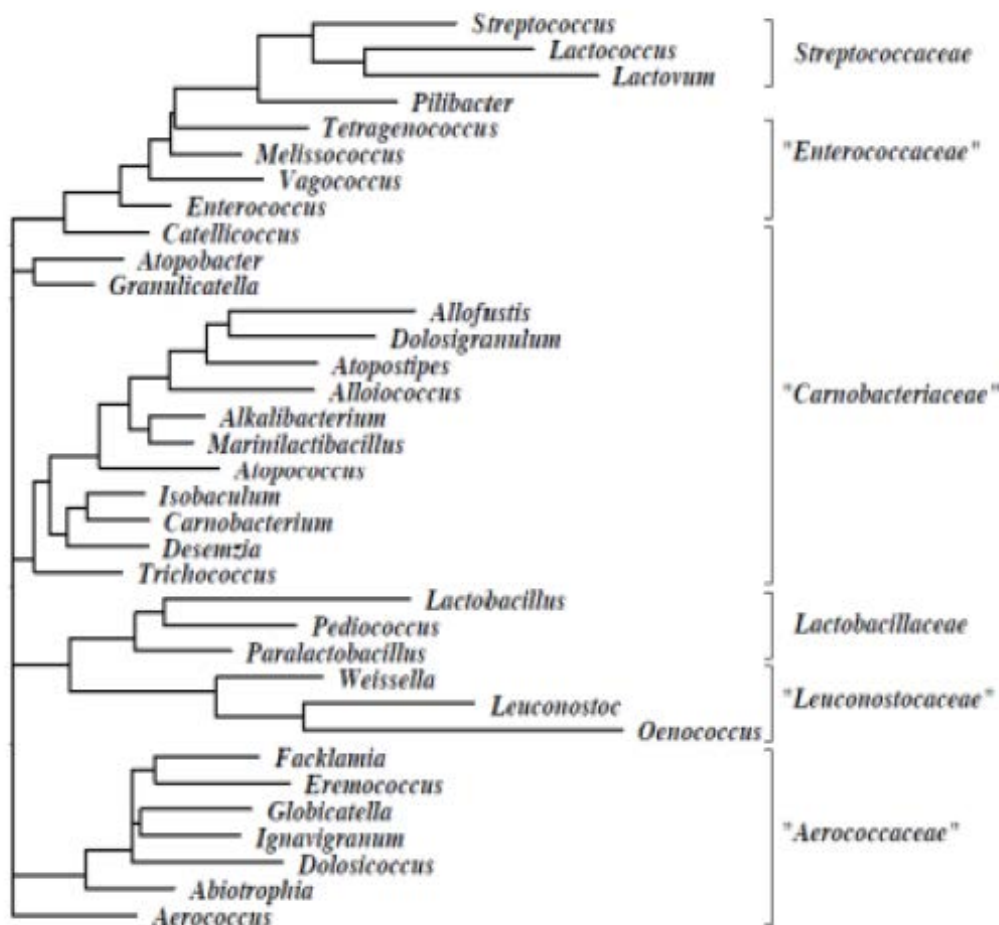


Figure 01 : Arbre phylogénétique de l'ordre de Lactobacillales (Ludwig et al., 2008)

II.6. Propriétés technologiques des bactéries lactiques :

Les progrès effectués dans la connaissance des bactéries lactiques ont mis en évidence une formidable diversité d'espèces et de souches, ainsi qu'un très large éventail de propriétés, allant bien au-delà du potentiel acidifiant. Ainsi, deux souches d'une même espèce peuvent

manifester des propriétés extrêmement différentes, ce qui confère à tous les comportements physiologiques observés un caractère « souche dépendant » très marqué. A cela s'ajoutent d'autres facteurs plus spécifiques du contexte industriel.

C'est le cas des associations de plusieurs souches, réalisées afin de constituer des ferments susceptibles de générer l'ensemble des propriétés requises pour l'élaboration d'un produit, ou des interactions de ces souches avec différents matrices alimentaires qui correspondent à autant de milieux de culture particuliers. Tout ceci complique fortement la mise en œuvre et la maîtrise des bactéries lactiques dans les aliments (Corrieu et Luquet, 2008).

Outre l'innocuité, de nombreux autres critères interviennent dans le choix des bactéries lactiques qui sont appelées à jouer un rôle technologique dans la fabrication des aliments (Dacosta, 2000).

Il paraît, au travers des publications scientifiques, que les connaissances sur les activités estérasiques et lipolytiques des bactéries lactiques soient encore fragmentaires, pourtant, il semblerait qu'elles participent à l'élaboration de la flaveur de nombreuses denrées alimentaires, bien que parfois elles soient à l'origine d'altérations, les bactéries lactiques possèdent des enzymes lipolytiques, capables d'hydrolyser une multitude d'esters d'acide gras, des substrats de tri-, di- et mono acylglycérols. (Liu et *al.*, 2001).

Les espèces appartenant aux genres *Lactococcus* et *Lactobacillus* sont généralement considérées comme ayant une activité lipolytique faible, en comparaison avec d'autres espèces de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium* (Chich et *al.*, 1997). Les lactocoques auraient une activité estérasique plus importante que les lactobacilles. Parmi les souches de lactobacilles thermophiles, les activités lipolytiques de *Lb.delbrueckii*ssp. *Lactis* et *Lb.acidophilus* sont supérieures à celles de *Lb.delbrueckii*ssp. *Bulgaricus* et *Lb.haveticus*. Les souches de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs : *Lb.casei* et *Lb.plantarum*, possèdent un système estérasique plus actif que les hétérofermentaires strictes : *Lb.brevis* et *Lb.fermentum* (Talon et *al.*, 2000). Les activités lipasiques sont maximales pendant la phase exponentielle de croissance, et sont dépendantes des milieux de cultures (Umemoto et sato, 1975 ; El Soda et *al.*, 1986 ; Piatkiewicz, 1987 ; Kamaly et *al.*, 1988 ; Papon et talon, 1988).

### II-6-2- Activité protéolytique

La protéolyse joue un rôle clé dans plusieurs processus biologiques chez les bactéries lactiques : nutrition azotée, activation des protéines et dégradation des protéines.

La machinerie protéolytique des bactéries lactiques est constituée d'un ensemble d'enzymes qui diffèrent par leur mécanisme catalytique, leur spécificité d'hydrolyse, leur localisation cellulaire et leur rôle. Les bactéries lactiques possèdent un système protéolytique complexe qui assure leur croissance dans des milieux à faibles concentrations en acides aminés libres et oligopeptides comme le lait (Kawai *et al.*, 1999 ; Vasiljevic *et al.*, 2005).

Ce système comprend des protéases situées à la surface cellulaire pour briser la caséine en oligopeptides ; des protéinases intracellulaires et des peptidases qui hydrolysent des oligopeptides et de ce fait, produisent les substances responsables de la flaveur et de la texture des produits fermentés (Hughes *et al.*, 2002 ; Papamanoli *et al.*, 2003 ; Ammor *et al.*, 2005).

### II-6-3- Formation des exo polysaccharides (EPS)

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés (Ruas-madiedo *et al.*, 2002 ; Welman *et al.*, 2003). Ces composés polymères sont généralement utilisés comme additif alimentaire dans plusieurs produits destinés à la consommation. Ils peuvent alors servir d'émulsifiants ou d'agents gélifiants et contribuent ainsi à la viscosité du produit, à sa texture et à sa stabilité. Leur utilisation en alimentation offre donc une alternative intéressante à l'emploi de polysaccharides produits par des organismes moins sécuritaires, car les EPS de LAB peuvent être utilisés directement dans le produit alimentaire, sans purification préalable, et peuvent même être produits *in situ*.

Outre leurs propriétés texturantes et stabilisatrices, les EPS des LAB sont connus pour leurs caractéristiques considérées utiles à la santé humaine comme prébiotiques ou grâce à leur propriétés anti-tumorales, antivirales, anti-cancérogènes et immuno-modulatrices (De Vuyst L et Degeest 1999b). De plus, une diminution du taux de cholestérol chez des rats ayant consommé du lait fermenté par la souche *L.lactis*spp. *cremoris* SBT 0495 a été observée et attribuée à l'EPS produit par cette souche (Nakajima *et al.*, 1992).

La production d'EPS dépend de la souche bactérienne (Ricciardi et Clementi, 2000), de la croissance (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilan, 2005), de la température d'incubation (Looijesteijn et *al.*, 2001), du milieu de culture (Behare et *al.*, 2009), de la vitesse d'acidification (Looijesteijn et *al.*, 2000), du pH (Vaningelgem et *al.*, 2004) et de la quantité d'oxygène requis dans le milieu de culture (Cerning et *al.*, 1990).

### II-6-4- Production des substances inhibitrices

La propriété des bactéries lactiques à produire des composés antagonistes est reconnue depuis très longtemps. Par cette capacité, l'utilisation des bactéries lactiques permet de satisfaire les besoins au point de vue sanitaire en industrie alimentaire.

Outre la compétition nutritionnelle, les bactéries lactiques synthétisent certains métabolites à effet antimicrobien tels que l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle (Atrih et Foster, 2001), les composés antifongiques (Corsetti et *al.*, 1998), les acides phényllactiques (Lavermicocca et *al.*, 2000), les antibiotiques comme la reutéricucline (Holtzel et *al.*, 2000) et les bactériocines. Grâce à ces propriétés que les bactéries lactiques sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires (Abee et *al.*, 1995) ; Rodgers, 2001).

# **Matériels et méthode**



# Matériel et Méthodes

---

## Matériel et Méthodes :

### Objectifs du travail

Notre étude répond à certains objectifs suivants :

- Isolement de souches lactique à partir de lait cru de vache collecté dans la région de Hassi Mameche wilaya de Mostaganem.
- Identification des souches lactiques par des tests phénotypiques et biochimiques.
- Etude de quelques propriétés technologiques des bactéries lactiques isolées à partir d'un lait cru de vache.
  - Dans l'étude des aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées, les pouvoirs technologiques recherchés sont :
    - \* Le pouvoir protéolytique
    - \* Le pouvoir aromatisant
    - \* Le pouvoir lipolytique
    - \* Le pouvoir antimicrobien

### Lieu de travail

Laboratoire des sciences et techniques de production animal Mostaganem et au laboratoire pédagogique de microbiologie, de l'université Abed El Hamid Ibn Badais Mostaganem. A partir du mois de février jusqu'au mois de juin.

## I - Matériel

### I.1. Milieux de culture : (Voir annexes pour la composition).

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants :

**Les géloses :** MRS (DeMan-Rogosa et Sharp,1960) , M17 (Terzaghi et Sandine,1975),Agar ,MSE (Mayeux, Sandine et Elliker,1962)

**Les bouillons :** bouillon M17 et MRS ,bouillon hyper salé à 6.5% de NaCl, ADH, lait de Sherman, Clark et Lubs (Institut Pasteur ,2003)

**Les réactifs :** réactifs de Vogues Proskauer (VPI et VPII). Ethanol, lugol, eau oxygénée, sucres (Glucose, xylose, Mannose, Saccharose, Maltose ,Adonitol , Tréhalose , Cellobiose, Lactose, Galactose)

## Matériel et Méthodes

---

Les colorants : Violet de Gentiane, Fuschine, cristal violet, bleu de méthylène, phénolphtaléine à 1%.

**Les acides et bases** : la soude N/9, l'acide lactique.

### **-Disques d'antibiotiques**

Pour étudier le comportement des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques, sept disques ont été utilisés pour réaliser un antibiogramme sur milieu solide, il s'agit de Erythromycine, Cefalexin, Ciprofloxacine, Triméthoprim, Ofloxacine, Fosfomycine, Amoxicilline.

## **II. Méthodes**

### **II.1 Analyse physico-chimique**

L'analyse des échantillons ont été réalisée par l'appareil de Lactostar (Gerber, 2008) (laboratoire des sciences et techniques de production animale Mostaganem). Cet appareil permet d'analyser avec précision les paramètres suivants :

La matière grasse, protéine, lactose, extrait sec total, extrait sec dégréssion.

Les résultats sont enregistrés et affichés en pourcentage sur l'écran.

#### **II.1.2. Mesure du pH**

Les mesures de pH effectuées sur l'échantillon, la valeur de pH caractérisant l'échantillon analysé, est lue directement sur l'appareil (pH mètre) après immersion de son électrode dans le lait. Cette opération comme pour toutes les autres mesures physico-chimiques, avec rinçage l'électrode de l'appareil entre chaque mesure.

#### **II.1.3 Détermination de l'acidité titrable :**

Comme décrit par (Tantaoui-Elaraki et al., 1983), l'acidité titrable est déterminée avec une solution de NaOH à 0.111 mol/l en présence de phénolphtaléine.

L'acidité titrable exprimée en degré Dornic (°D), et calculée proportionnellement au volume de NaOH utilisé jusqu'au virage au rose pâle du milieu.

## Matériel et Méthodes

---

### II.2 Provenance des échantillons :

Les échantillons de laits crus de vache proviennent de la région de Hassi Mameche willaya de Mostaganem.

Les mamelles sont lavées avec l'eau savonneuse puis rincer avec de l'eau javellisée. Les échantillons du lait sont recueillis dans des flacons stériles de 250 ml. Les échantillons de lait sont conservés à 4°C et transportés au laboratoire pour leurs analyses.

### II.3 Isolement de la flore lactique :

Après coagulation de lait, l'échantillon est réparti en deux tubes, le premier tube est incubé à 30°C et le deuxième à 42°C, Des dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) de la suspension mère sont réalisées à l'aide de milieu de dilution (peptone-sel) (voir annexe).

L'isolement a été réalisé sur gélose M17 préalablement coulée et solidifiée dans des boîtes de pétri, en portant 0,1ml respectivement des dilutions  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  à la surface du milieu suivi d'un étalement. L'incubation est faite à 30 °C et 42°C pendant 24h à 48 h en conditions d'aérobies.

L'isolement a été réalisé sur gélose MRS par ensemencement en masse à partir des dilutions.  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  Les cultures sont incubées pendant 24h à 48 h à 30 °C et 42°C dans des boîtes de Pétri en conditions d'anaérobies.

**Tableau 02** : Milieux l'isolement des bactéries lactiques (Badis et *al*, 2004)

Milieux d'isolement	Bactéries	T°C/durée	Incubation
MRS (Man et <i>al.</i> ,1960)	Lactobacilles	37/24h-72h	Anaérobiose
M17(Terzaghi et sandine,1975)	Streptocoques Lactiques	45/24h-72h	Aérobiose
Elliker(Elliker,1956)	Lactocoques	30/48h-72h	Aérobiose
MSE (Mayeux et <i>al.</i> ,1962)	Leuconostocs	30/48h-72h	Aérobiose
M17(Terzaghi et sandine,1975)	Pediocoques	30/48h-72h	Aérobiose

T°C : température optimale de croissance

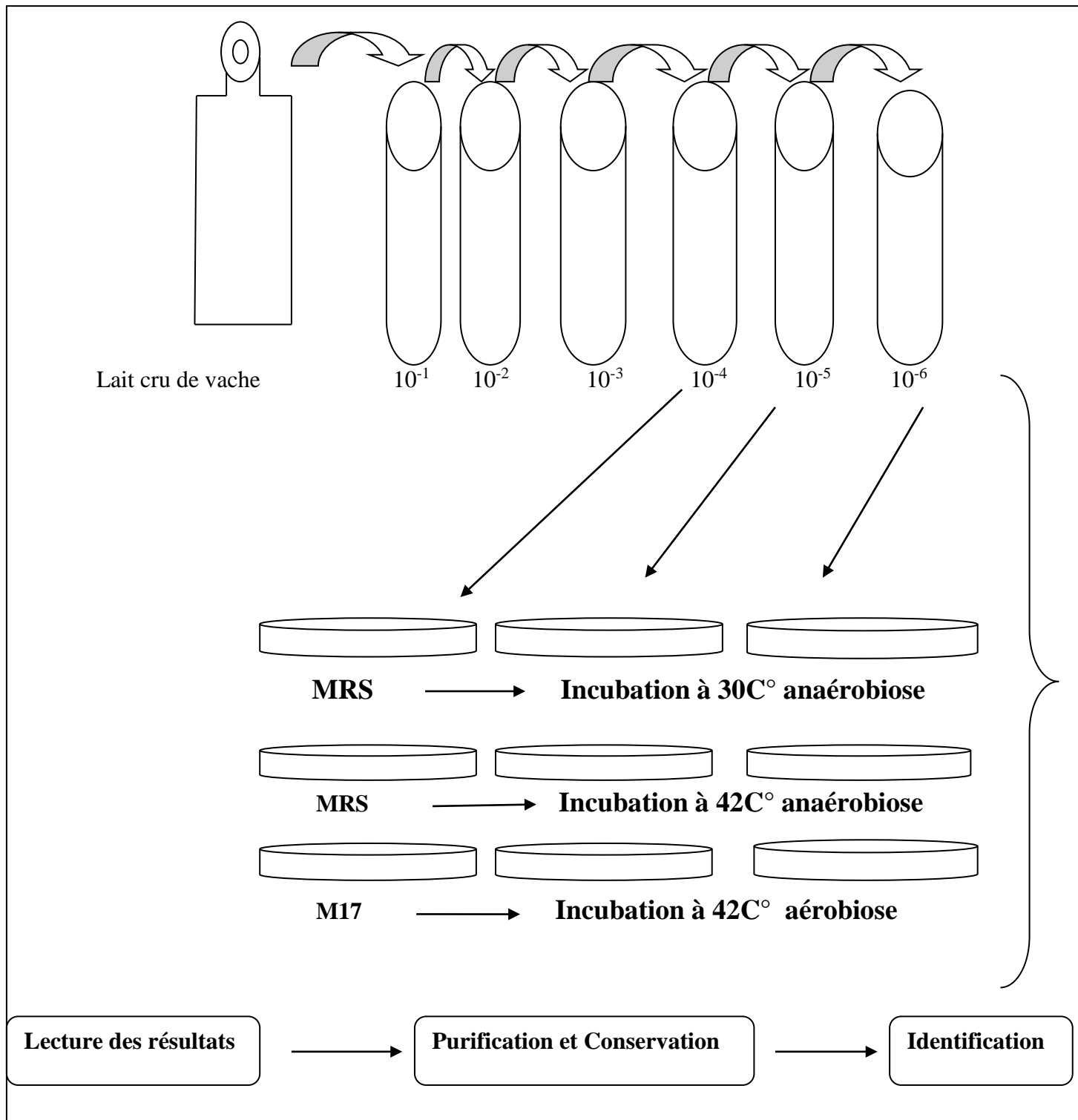


Figure 2 : Protocole d'isolement des souches lactiques.

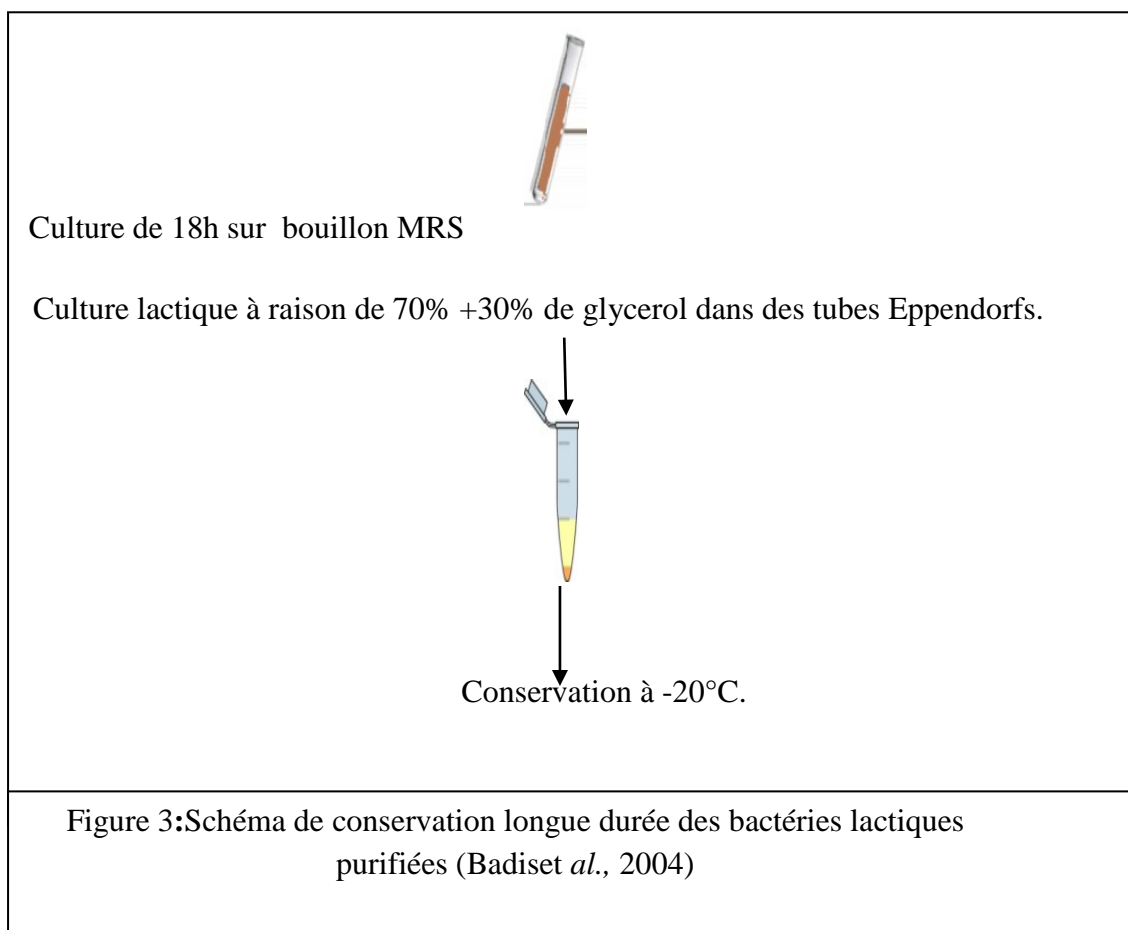
## Matériel et Méthodes

### II.4 Purification et conservation des souches :

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 ou M17 et repiquées sur milieu MRS ou M17. Après purification, les souches sont conservées par deux méthodes :

**Conservation de courte durée :** les souches pures étaient ensemencées 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 3000tr/min pendant 10 min. la culture peut être conservée plusieurs mois.



# Matériel et Méthodes

---

## II.5. Pré-Identification des isolats

### II. 5-1 Critères morphologiques

#### II. 5.1.1 Caractérisation macroscopique

L'examen macroscopique est porté sur l'observation macroscopique qui permet de décrire

L'aspect des colonies (la forme, taille, pigmentation contour, viscosité ...)

#### II.5.1.2 Caractérisation microscopique

##### **Coloration de Gram**

Une colonie a été prélevée à partir d'une culture sur boîte et étalée sur une lame de verre. La lame a ensuite été séchée à l'air libre, passée à la flamme afin de fixer l'échantillon. Après fixation, la lame a été posée sur un porte-objet et colorée avec le violet cristallisé pendant 1 min avant d'être rincée rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de Lugol, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors la lame colorée à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 2 à 3 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. A ce stade les cellules Gram- seront incolores, les cellules Gram+ seront violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la Fushine pour colorer les cellules Gram- présentes. Après un bref rinçage, le frottis est séché et examiné à l'objectif à immersion (grossissement X 1000) (Singleton, 1999). Avec cette coloration double, les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge (Delarras, 2007).

La coloration de Gram a été utilisée pour classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie et leur mode d'association.

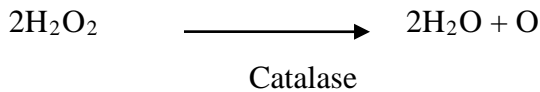
Les bactéries Gram positives et catalase négatives sont présumées des bactéries lactiques

## Matériel et Méthodes

---

### II.5.1.3 Test de la catalase :

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



L'activité catalytique consiste à prélever une colonie sur gélose MRS ou M17 et dissociée dans une goutte d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à 10 volumes ; l'apparition de bulles révélant le dégagement d'oxygène (Ahmed et Irene, 2007).

### II.6 Tests physiologiques :

#### II.6.1 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 :

- 30°C et 42°(Lactobacilles) sur milieu MRS (De Man et *al.*,1960).
- 30°C(Leuconostocs) sur milieu MRS.
- 42°C (Sreptocoques, Lactocoques et Enterocoques) sur milieuM17 (Terzaghi et Sandine ,1975).

#### II.6.2 La Thermorésistance

La thermorésistance est réaliser pour les Cocci, un chauffage du milieu à une température de 60°C pendant 30 min (stiles et Holzapfel ,1997 ; Teuber et Geis,2006) est testé en utilisant le milieu M17 liquide et mettre à l'étuve 24h à30°C. Le chauffage est réalisé dans un bain-marie à 60C° pendant 30 min.

#### II.6.3 La culture sur milieu hyper salé (NaCl)

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification.Les cultures à tester ont étéensemencées sur des bouillons hyper salés à 4% et 6.5% de NaCl. Après une incubation à 37°C pendant 24h, l'aptitude à croitre sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble. (Rouissatetal.,2006).

## Matériel et Méthodes

---

### II.6.4 les tests de différent pH :

Deux milieu de MRS liquide ont été utilisés contenant différentes concentrations de pH 4,6 et 9,6 après stérilisation des milieux et refroidissement, ensementer et incuber à 30°C et 42°C. (Rouissatet et *al.*,2006).

### II.7 Tests biochimiques

#### II.7.1 Type fermentaire

Ce test permet de définir le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé : il consiste à mettre en évidence la formation de gaz (CO<sub>2</sub>).

On enseme les souches dans des tubes à essais contenant un milieu M17 et des cloches de durham pour mettre en évidence la production du gaz.

Après 24h à 48h d'incubation à 30C° et 42C°, le développement d'une souche homofementaire ne conduit pas a un dégagement de gaz, par contre dans le cas d'un métabolisme hétérofermentaire le gaz produit est collecté dans la cloche qui est ainsi poussée vers le haut du tube. (Harrigan et Mc cance,1976) et (Axelsson,2004).

#### II.7.2 Production d'Acétoïne :

La recherche de l'acétoïne est testée par la réaction de VogesProskauer (VP) (Harrigan et McCance,1976 ;Zourari et *al.*,1991 ;Facklam et Elliot,1995) après une culture de 24h à 30°C et 42C°sur milieu Clark et Lubs (annexe).

Ajouter 5 gouttes du réactif VP1 (solution de soude NaOH à16% dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VP2 (alpha-naphtol à 6%dans l'alcool à 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.



## Matériel et Méthodes

---

### II.7.3. Croissance dans des conditions hostiles

#### Croissance sur le lait bleu de Sherman

Ce test est réalisé pour la caractérisation des lactocoques des entérocoques et les streptocoques. (Schleifer et *al.*, 1995 ; Hardie et Whiley, 1995 ; Stiles et Holzapfel, 1997) Nous avons ensemencé les isolats une forme en cocci et en bacilles dans deux séries de tubes contenant 10 ml de lait écrémé additionné à 1ml de bleu de méthylène (1%) pour première série, et à 1ml de bleu de méthylène (3%) pour la deuxième. Le bleu de méthylène tire sa couleur grâce à l'oxygène, ce test porte toujours sur le système respiratoire de *lactocoques*, car vu que ce sont des micro aérophiles, ils ne vont utiliser qu'une faible partie de l'oxygène présent dans le bleu de méthylène (3%) et de ce fait la couleur de lait (bleue) ne virera que légèrement vers le blanc et contrairement aux entérocoques (aérobies) qui utilisent tout l'oxygène de bleu de méthylène (Larpen et *al.*, 1990) .

### II.7.4 Fermentation des hydrates de carbonés :

Ils s'agissent d'apprécier l'aptitude des souches à métaboliser divers substrats carbonés en particulier les sucres. Ce test est réalisé en galeries classiques de tubes sur bouillon MRS sans extrait de viande et sans glucose selon (Leveau et *al.*, 1991) additionné d'un indicateur de pH (pourpre de bromocrésol à 0,05g/l), le glucose du milieu MRS est remplacé par l'hydrate de carbone à tester ,les solutions de sucre (mannitol,xylose,maltose,galactose,fructose,glucose,lactose,saccharose,arabinose et raffinose) sont stérilisées après ils ont introduit dans le milieu .on a ensemencé dans 2ml du MRS-BCPsucre recouvrir avec une couche mince d'huile de paraffine stériliser (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.

## II.8 Etude de quelques caractéristiques biotechnologiques des isolats

### II.8.1 Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

Déterminer si la bactérie possède ou pas l'enzyme arginine di hydrolase capable d'attaquer l'acide aminé L-Arginine.

## Matériel et Méthodes

---

Le milieu contenant de l'arginine, après avoir été ensemencé par la souche change de couleur dans un premier temps (après 10h) du violet vers le jaune, cela est due à l'acidification du milieu provoqué par l'utilisation du glucose comme source de carbone par la souche.

Puis dans un deuxième temps si la bactérie possède l'enzyme en question, on observe un retour vers le violet (après 24h) due à la ré-alcalinisation du milieu (formation d'ammoniaque résultante de la dihydrolase de l'arginine) si non le milieu garde sa couleur jaune.

La condition d'anaérobiose est essentielle à ce test, afin d'empêcher l'ammoniaque de se dissiper dans l'air, sans quoi les résultats sont faussés. (Samelis et al., 1994)

### **II.8.2 Détection des colonies larges et gluantes sur gélose hypersaccharosée :**

Appliqué pour les isolats de *Leuconostoc* (Carr et al., 2002., König et Frohlich, 2009).

La production du dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu solide, les souches à tester ont été ensemencées en stries sur gélose hypersaccharosée déjà coulée et solidifiée. Après incubation à 37°C et 45°C pendant 24h, la production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies larges et gluantes (Leveau et al., 1991). Pour un pouvoir texturant.

### **II.8.3 La recherche d'esculine :**

L'hydrolyse de l'esculine qui rompt la liaison glucosidique et libère et l'esculine donne une coloration noire en présence de citrate de fer ammoniacal. Après préparation le milieu BEA (bile esculine azide), stériliser et coulée dans des boîtes et solidifier après ensemencement incubé à 30°C et 42°C pendant 48h à 72h. Le résultat positif se traduit par un noircissement du milieu (Marshall et al., 2001)

### **II.8.4 Pouvoir protéolytique :**

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est recherchée en milieu MRS gélosé additionné de lait écrémé à 1% et 2% selon la méthode de (Van den Berg et al., 1993) les souches bactériennes à tester sont ensemencées simultanément en touches à la surface du milieu. Après une incubation à 30°C pendant 24h, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des touches.

## Matériel et Méthodes

---

### **II.8.5 activité lipolytique :**

L'activité lipolytique des souches est mise en évidence en milieu MRS supplémenté de différents substrats lipidiques (naturels et artificiels) à différentes concentrations.

#### **II.8.5.1 recherche de l'activité lipolytique sur milieu MRS additionné de substrats lipidiques naturels**

L'activité lipolytique est détectée sur milieu MRS solide tamponné à pH 7. Le milieu est privé de Tween 80 et supplémenté en huile d'olive comme unique source lipidique. L'ajout de substrats lipidiques est réalisé à différentes concentrations (1%,3%).

Des précultures de 24h des souches bactériennes à tester sontensemencées à l'aide d'un inoculateur multipoints en touches à la surface de milieu de culture .Après incubation à 30C° pendant 48h ,l'activité lipolytique est détectée par l'apparition d'une clarification autour des touches.(Dellali A,2012).

#### **II.8.5.2 recherche de l'activité lipolytique sur milieu MRS additionné de substrats lipidiques artificiels :**

L'activité est recherchée sur milieu MRS solide tamponné à pH7 contenant des concentrations de 1% et 3% de Tween 80 comme unique source lipidique. Le milieu est additionné de 0.01% de chlorure de calcium(CaCL<sub>2</sub>)et .05% de chlorure de sodium (NaCL).les souches lactiques sontensemencées par touches à partir de cultures de 18h.Après incubation à 37C° pendant 7à 10 jours l'activité lipolytique se traduit par l'apparition d'un halo opaque autour de la colonie (Guiraud et Galzy,1980) .

### **II.8.6L'antibiogramme :**

Pour chaque souche testée, une colonie en morphologie typique a été sélectionnée et repiquée sur milieu MRS liquide et incubé pendant 24h. Les souches sont étalées sur milieu MRS à l'aide d'écouvillon, et poser sept antibiotique testés sur gélose avec disques d'antibiotique ont été mesurés à l'aide d'une règle. Les résultats ont été exprimés comme sensibles et résistantes selon les normes recommandées (Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie,2007).

Chaque antibiotique diffuse a la surface de la gélose après 18h d'incubation, des zones d'inhibition de croissance, de tailles variables sont observées autour des disques, la

## Matériel et Méthodes

---

sensibilité aux divers antibiotiques testés est exprimée par la mesure de ses zones, cette technique nous permet d'avoir un choix large et modulables des antibiotiques à tester, et une visualisation directe de l'effet antimicrobien.

L'interprétation des résultats de l'antibiogrammes après comparaison avec les normes, nous renseigne avec précision sur la réaction de la bactérie face à l'antibiotique sensibilité / résistance.

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

### I-Résultats des analyses physico-chimiques d'échantillon de lait de vache cru

Les résultats d'analyses physicochimiques sont mesurés dans le tableau 03.

#### I.1. Mesure du pH

La valeur recueillie lors de cette mesure donne une moyenne de pH pour l'échantillon de lait de vache de 6,92.

Les pH du lait à la traite peuvent résulter de l'infection de la mamelle de l'animal (Morgan, 1999), aussi à une grande influence sur les variations pH du lait (Remeuf et *al.*, 2001).

#### I-2. L'Acidité titrable

L'échantillon de lait analysé dans cette étude, avec l'acidité titrable 20°D. L'augmentation de l'acidité est un indicateur de la qualité de conservation du lait (Cassinello et Pereira, 2001).

**Tableau 3** : Résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur 1 échantillons de lait analysé.

TAUX	Pourcentage
Matière grasse	3,96%
Matière sèche non grasse	9,38%
Protéine	3,19%
Lactose	4,74%
Densité	1,0224%
Point de congélation	-0,558°C
pH	6,92
Acidité Dornic	20,7°D

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

### II-Pré-Identification des isolats

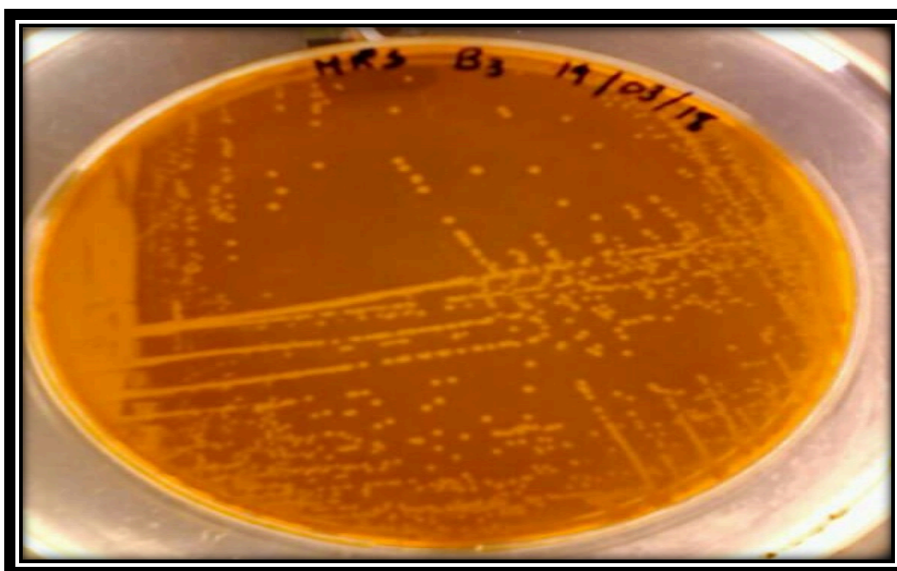
Lors de cette étude nous avons identifié les souches isolées à partir de lait de vache par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Les isolats sont de Gram positif et catalase négative.

### II-1 Critères morphologiques

#### II-1-1 Caractérisation macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS et M17 solide et liquide ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies sur milieu solide et le trouble dans le milieu liquide (Badis et *al.*,2005).



**Figure 4** : aspect macroscopique d'une bactérie lactique sur milieu MRS isolé à partir d'un lait de vache.

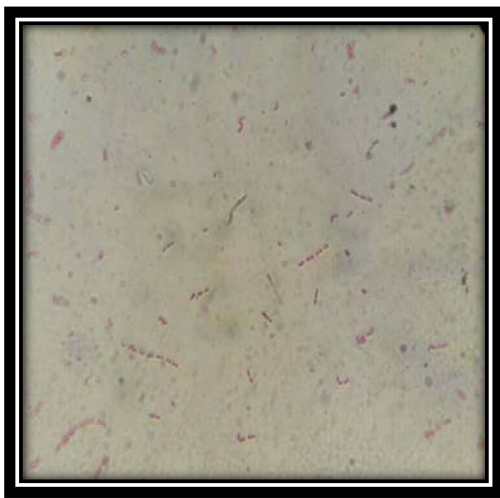
#### II-1-2 Caractérisation microscopique :

Les souches LB2, LB3, LB6, LB9, LB10, LB22, LB27, LB28, LB32, LB0, LB1, LB4 sont des cocci et les souches LB23, LB14, LB19, LB26, LB21, LB36, LB37, LB38, LB39, LB40 sont des bâtonnets Gram positif et catalase négative, le mode d'association varie d'une souche à l'autre il est expliqué dans le Tableau 4, ces observations permettent de classer

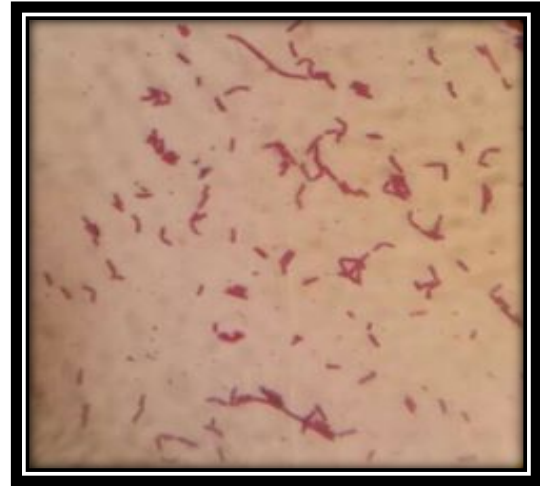
## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

initialement les isolats selon le Gram , leurs morphologies cellulaires et leur mode d'association (Joffin et Leyral,1996)



(A)



(B)



(C)

**Figure 5:** Observation microscopique des souches *Enterococcus* (A), *Lactobacillus* (B), *Leuconostoc* (C) après coloration de Gram (Gx100).

### II-1-3. Test catalase

Les bactéries lactiques ne possèdent pas l'activité catalasique (absence de dégagement gazeux (O<sub>2</sub>)) elles sont dites catalase négatives. Toutes les bactéries répondent bien aux caractéristiques des bactéries lactiques comme le montre (figure 06.)



## Chapitre III : Résultats et Discussion



**Figure06** : Résultats de test de la catalase.

**Tableau 04** : Critères morphologiques test de la catalase des 24 isolats .

Souches	Gram	Catalase	Forme	Mode d'association
LB2	+	-	Cocci	En chaine
LB3	+	-	Cocci	En chaine
LB6	+	-	Cocci	Isolées
LB9	+	-	Cocci	En chaine
LB10	+	-	Cocci	En chaine
LB21	+	-	Ovoïde	Isolées
LB22	+	-	Cocci	Diploïdes
LB23	+	-	Bacille	En chaine
LB24	+	-	Ovoïde	Isolées
LB26	+	-	Ovoïde	En chaine ,diploïde
LB27	+	-	Cocci	En chaine
LB28	+	-	Cocci	Isolées
LB 15	+	-	Cocci	En chaine
LB14	+	-	Bacille	En chaine
LB19	+	-	Bacille	En chaine
LB36	+	-	Cocci	Diploïdes
LB37	+	-	Cocci	Diploïdes
LB38	+	-	Bacille	Diploïdes
LB39	+	-	Bacille	Diploïdes
LB40	+	-	Cocci	Diploïdes
LB0	+	-	Cocci	En chaine
LB1	+	-	Cocci	En chaine
LB4	+	-	Cocci	En chaine
LB35	+	-	Cocci	En chaine

## Chapitre III : Résultats et Discussion

### II-Résultats de l'étude pré-identification

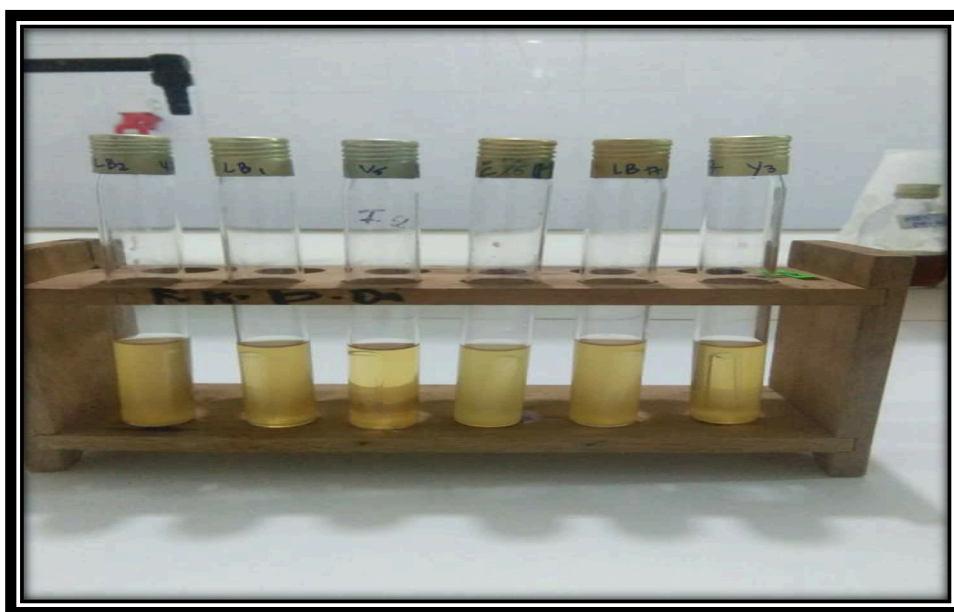
Un total de 24 isolats lactiques a été regroupé en 5 groupes bactériens. Ces isolats sont identifiés au stade du Genre en se basant sur leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques.

#### III-1 Tests physiologiques

##### III-1-1 Type fermentaire

Ce test pour différencier entre les souches homofermentaires et hétérofermentaires utilise bouillon MRS ou M17 stérile qui contient une cloche de DUHRAM.

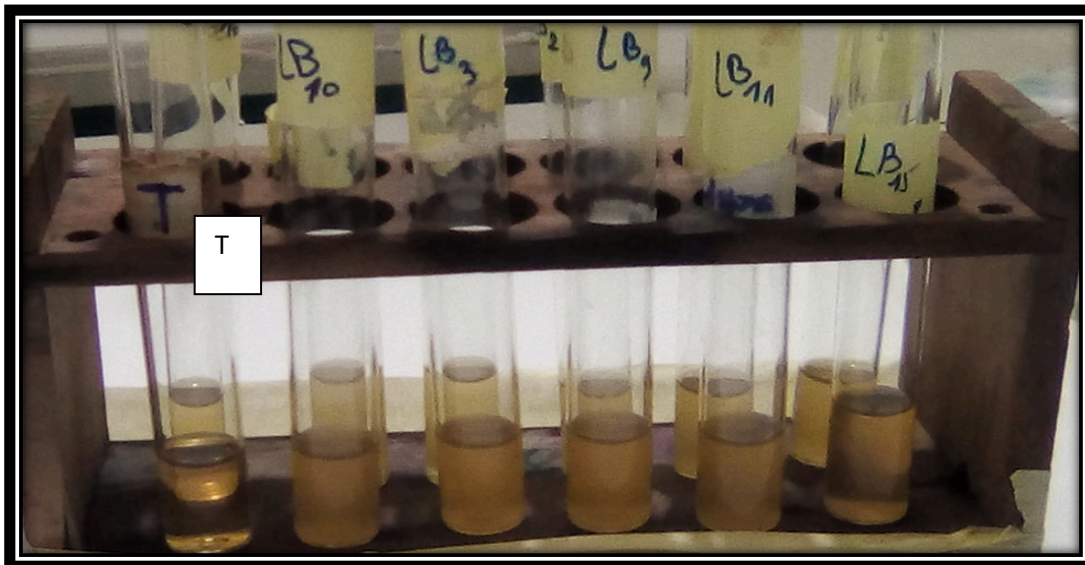
Tous les souches aucune production de gaz ( $\text{CO}_2$ ) n'a été observé, ainsi considérées comme homofermentaires. À l'exception d'une seule souche LB40 à manifesté un métabolisme hétérofermentaire.



**Figure 7:** Résultats de type fermentaires.

##### III-1-2 Croissance à 30°C et 42°C et la thermorésistance

Cette étude de la croissance à 4°C, 30°C, 42°C et la thermorésistance à 63°C pendant 30 minutes permet de faire la différence entre la flore thermophile et la flore mésophile. D'après les résultats obtenus, il a été constaté la présence de 13 souches mésophiles et 11 souches thermophiles. Le test de la thermorésistance à 63°C est représenté dans le (Tableau 08).



**Figure 8** : Résultat de la thermorésistance des quelques souches lactiques à 63°C. T :témoins,(+) :positifs ,(-) :négatifs

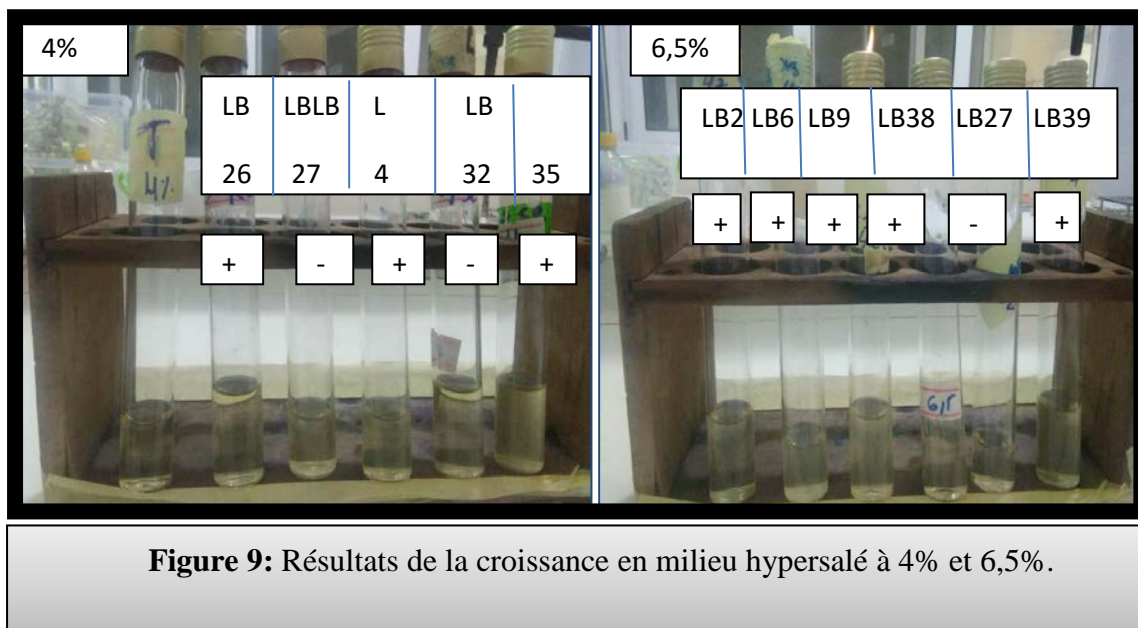
## Chapitre III : Résultats et Discussion

### III-2-Résultats des tests biochimiques

#### III-2-1-Résultats des tests en milieux hostiles

##### III-2-1-2 Croissance en milieu hypersalé

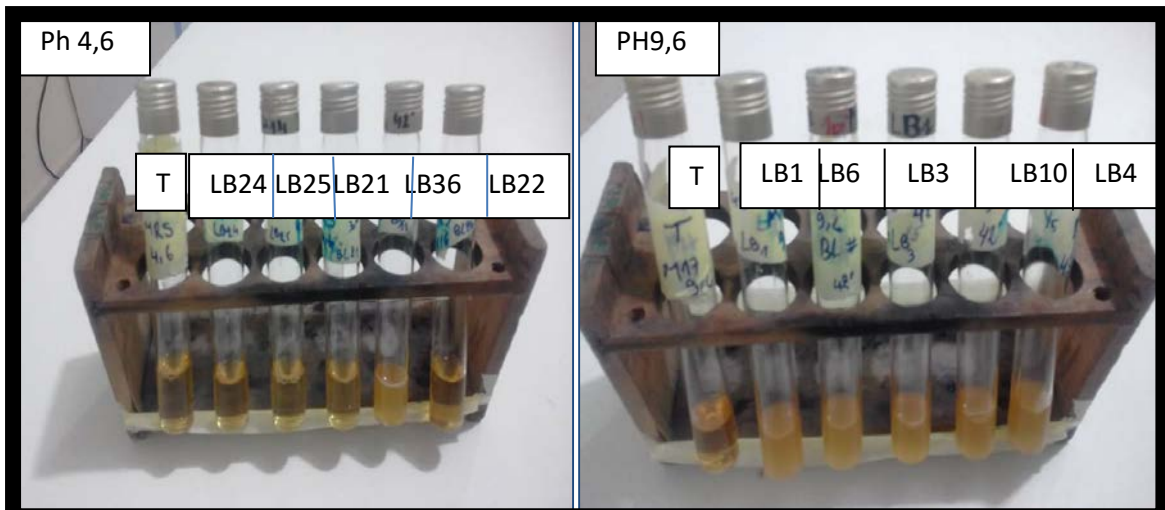
Ce test est réalisé dans le but de différencier entre les *Lactocoques* et les entérocoques. Après culture on a remarqué que les souches ont pu croître en présence de 4% et 6.5% de NaCl en les considère comme des *Enterocoques*.



##### III-2-1-1- Croissance à pH 4,6 et 9,6 :

La croissance des souches à pH 4,6 a été marquée positive pour les souches :LB2, LB3, LB6, LB9, LB10, LB23, LB26, LB14, LB19, LB36, LB37, LB38, LB39, LB40, LB0, LB4 et la croissance à pH 9,6 les isolats qui notée positif sont : LB2, LB3, LB6, LB9, LB10, LB21, LB22, LB23, LB24, LB27, LB28, LB32, LB35, LB19, LB36, LB37, LB38, LB39 et LB40.

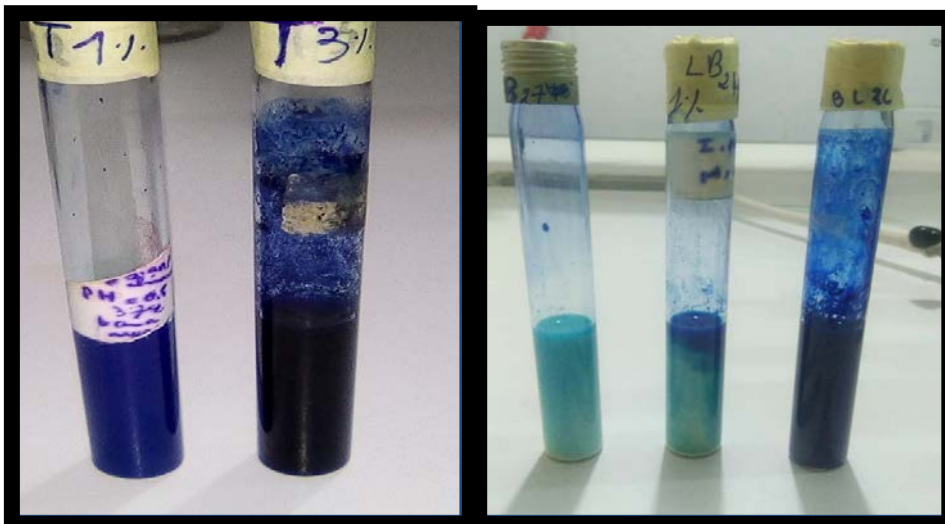
Les souches LB2, LB3, LB6, LB9, LB10, LB23, LB19, LB36, LB37, LB38, LB39, LB40 qui sont capables de poussée dans les deux ph 4,6 et 9,6.



**Figure 10:** Résultats de la croissance à PH 4,6 et 9,6 après incubation de 24h.

### III-2-1-3-Croissance à Lait de Sherman :

Les résultats obtenus dans un lait écrémé stérilisé contenant le bleu de méthylène, ont montré que les souches LB2, LB6, LB9, LB10, LB15, LB36, LB37, LB24 et LB27 sont capables de croître à la présence du bleu de méthylène 1% à l'exception de LB21, LB22, LB23, LB28, LB14 et LB19.



**Figure 11 :** Témoin lait de Sherman 1% et 3%.

**Figure 12 :** Résultat de lait de sherman 1%



**Figure 13:** Résultat de lait de Sherman 3%.

### III-2-2-Résultats test de l'arginine déshydrogénase l'ADH :

La production de l'acide lactique acidifie le milieu de culture qui contient un indicateur de pH et la couleur de ce dernier va virer vers le jaune. Les souches possédant l'arginine déshydrogénase (ADH) réalkalinisé le milieu et sa couleur redeviendra mauve. Ceux qui ne possèdent pas l'ADH, leur milieu reste jaune (figure 14)

Que les souches LB1 ,LB3, LB35 ,LB28 ,LB32, LB15 ,LB24, LB26 ,LB37 possède l'arginine déshydrogénase.



**Figure 14:** Test de l'arginine déshydrogénase ADH (T : témoin+1 colonie)

La couleur Jaune(-), violet(+).



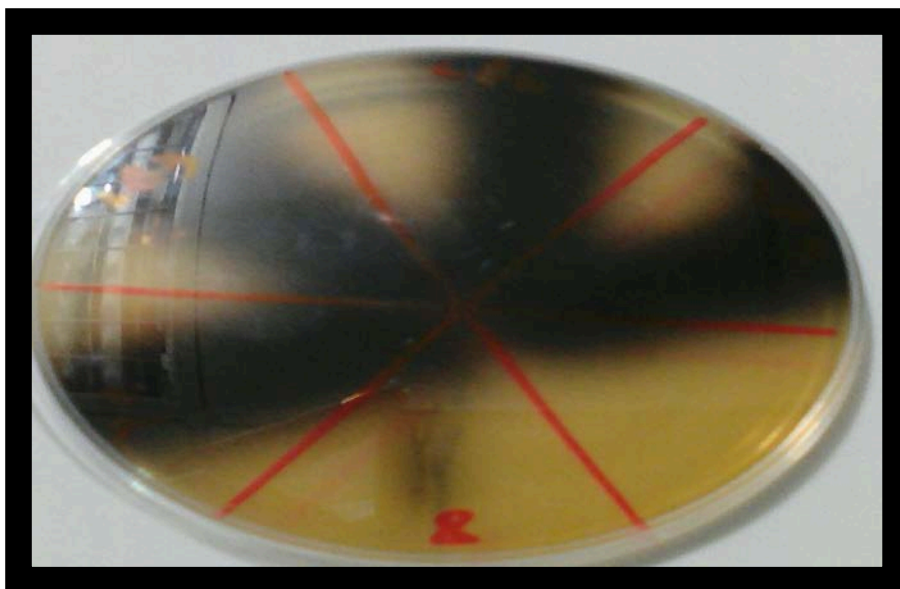
## Chapitre III : Résultats et Discussion

**Tableau 5:** Résultats de test de l'arginine déshydrogénase (ADH) des isolats retenus

Souche	ADH	Souche	ADH
LB 10	+	LB4	-
LB0	-	LB35	+
LB1	+	LB28	+
LB39	-	LB15	+
LB21	+	LB22	+
LB19	-	LB24	+
LB14	-	LB26	-
LB27	+	LB27	+
LB40	-	LB36	+
LB9	+	LB37	+
LB2	+		
LB23	-		

### II-2-3 Résultats de l'esculine :

Ce test a pour objectif de déceler si la souche possède l'esculinase responsable de la dégradation de l'esculine en l'esculétine. D'après les résultats obtenus on à remarquer que les souches :LB1, LB3, LB6 ,LB9,LB37,LB23,LB10 ,LB0 ,LB2,LB15 possèdent cette enzyme. (Tableau 06).



**Figure 15 :** Résultats de quelques souches sur milieu Esculine.

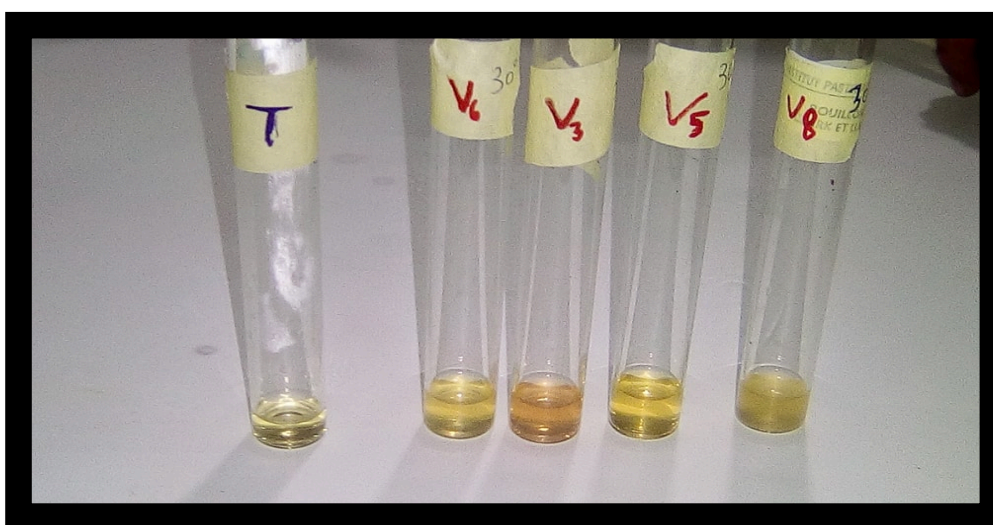
## Chapitre III : Résultats et Discussion

**Tableau 06 :** Résultats de test d'esculine

Souche	Esculine	Souche	Esculine
LB1	+	LB0	+
LB3	+	LB39	-
LB6	+	LB2	+
LB9	+	LB14	-
LB37	+	LB15	+
LB40	-	LB4	-
LB27	+	LB22	-
LB19	-	LB24	-
LB23	+	LB21	-
LB10	+		

### III-2-4-La production d'acétoïne

Ce test est réalisé afin de différencier les souches qui ont la capacité de produire les composés aromatiques (acétoïne) (figure16 ) par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu, D'après les résultats enregistrés, on a constaté que tous les souches ont cette capacité de produire les composés aromatiques. (Tableau07)



**Figure 16:** Résultat de la production d'acétoïne



## Chapitre III : Résultats et Discussion

**Tableau7** : Répartition des résultats pré-identification des souches isolées.

Tests physiologiques		Tests biochimiques											Genre		
souche	Type Fermentaire	Croissance à T°				pH		Na cl		Lait de Sherman		ADH		acétoïne	esculine
		30C	4C°	42C°	63C°	4.6	9.6	4%	6,5%	1%	3%				
<b>LB0</b>	homo	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Streptococcus</i>
<b>LB1</b>	homo	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Streptococcus</i>
<b>LB2</b>	homo	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Enterococcus</i>
<b>LB3</b>	homo	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
<b>LB4</b>	homo	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Streptococcus</i>
<b>LB6</b>	homo	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Enterococcus</i>
<b>LB9</b>	homo	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
<b>LB10</b>	homo	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
<b>LB14</b>	homo	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Lactobacillus</i>
<b>LB15</b>	homo	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
<b>LB19</b>	homo	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Lactobacillus</i>
<b>LB21</b>	homo	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	<i>Lactococcus</i>
<b>LB22</b>	homo	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	<i>Lactococcus</i>
<b>LB 23</b>	homo	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Lactobacillus</i>
<b>LB24</b>	homo	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	<i>Lactococcus</i>
<b>LB26</b>	homo	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Enterococcus</i>
<b>LB27</b>	homo	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	<i>Enterococcus</i>
<b>LB28</b>	homo	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	<i>Enterococcus</i>
<b>LB32</b>	homo	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
<b>LB35</b>	homo	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
<b>LB36</b>	homo	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
<b>LB37</b>	homo	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
<b>LB38</b>	homo	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>Lactobacillus</i>
<b>LB39</b>	homo	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>Lactobacillus</i>
<b>LB40</b>	Hétéro	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>Leuconostoc</i>

## Chapitre III : Résultats et Discussion

### III-2-5 Résultats du test des profils fermentaires

La détermination des espèces bactérienne, réside essentiellement dans leur capacité à fermenter les sucres en acide organiques. L'analyse des profils fermentaires révèle une grande diversité métabolique chez les isolats.



**Figure 17:** Résultats de profil fermentaire

**Tableau 08:** Résultat de profil fermentaire des souches isolées.

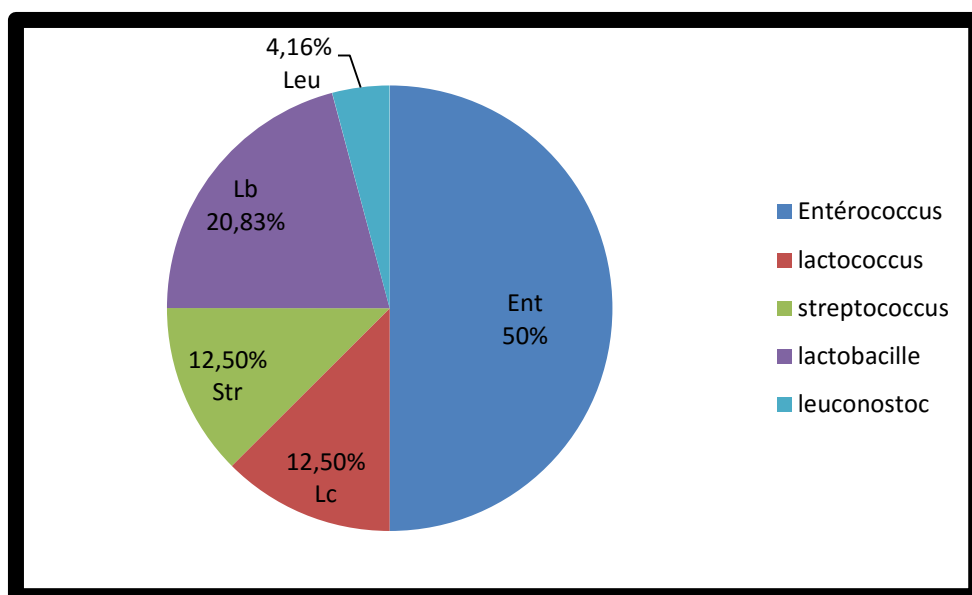
Souches	GLU	XYL	MAN	SACCH	MAL	ADDI	TRE	Cello	LAC	GAL
LB21	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
LB22	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
LB23	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
LB24	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
LB26	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+
LB27	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
LB28	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LB32	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
LB35	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
LB14	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
LB19	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
LB1	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
LB0	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

**Tableau09** : les résultats de l'identification des souches lactiques isolées de lait de vache

Code des souches	Genre et espèce
LB2	<i>Entérocooccusfaecium</i>
LB3	
LB15	
LB26	
LB6	
LB9	
LB10	
LB27	
LB28	
LB35	
LB36	
LB37	<i>Entérocooccus faecalis</i>
LB21	<i>Lactococcus lactis</i>
LB22	
LB24	
L14	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LB23	
LB38	
LB19	<i>Lactobacillus cassein</i>
LB39	<i>Lactobacillus pentosus</i>
LB0	<i>Streptococcus thermophilus</i>
LB1	
LB3	
LB40	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>



**Figure18:** Répartition des espèces de collection lactiques(%)

A partir de cette figure, nous pouvons noter que les *Enterococcus* le genre plus dominant des souches isolées avec un pourcentage de 50% ,suivi en deuxième ordre de la souche *Lactobacilles* avec un pourcentage 20,83% .Et le troisième ordre le genre *Streptocoques* à un pourcentage de 12,5% et les derniers genres avec faible pourcentage les *Lactococcus* de 12,5% et *Leuconostoc* de 4,16%.

### III-3- Les tests technologiques :

#### III-3-1- Résultats de production de dextrane :

Le milieu hyper-saccharose est utilisé pour détecter la production des exo polysaccharides (la formation de colonies gluantes).

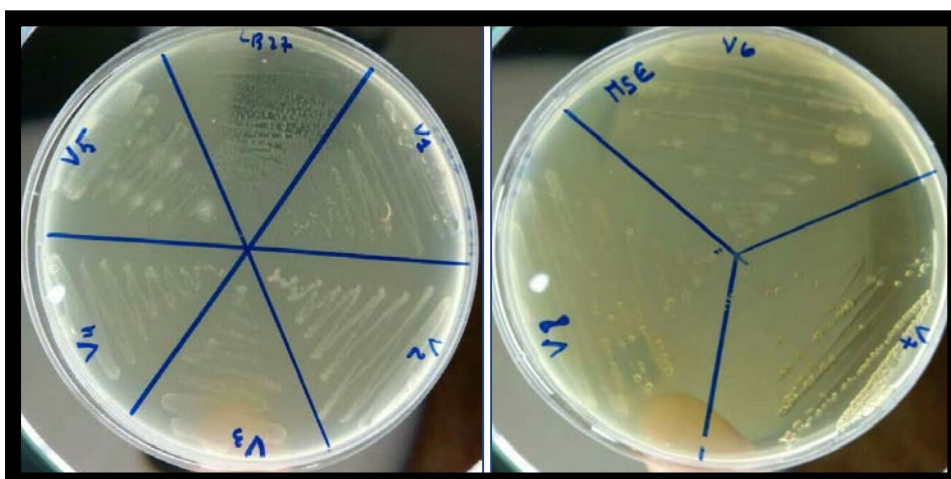
La production d'exo polysaccharides sur ce milieu est un critère important pour différencier entre les espèces de bactéries lactiques (Kheddid et al,2006).

Cela à été observé chez la majorités des souches qui ont la capacité de produire du dextrane (Tableau 10, figure19).

## Chapitre III : Résultats et Discussion

**Tableau10** : Résultats du pouvoir texturant des souches lactiques

Souche	Dextrane	Souche	Dextrane
LB2	-	LB32	+
LB3	-	LB35	-
LB6	-	LB14	-
LB9	-	LB19	-
LB10	-	LB36	+
LB15	-	LB37	+
LB21	+	LB38	+
LB22	+	LB39	+
LB23	+	LB40	+
LB24	+	LB0	+
LB26	-	LB1	+
LB27	-	LB4	+
LB28	+		



**Figure 19** : Résultats des EPS sur milieux hypersaccharosée MSE.

### III-3-2 Résultats d'activité protéolytique

Les résultats d'hydrolyse des protéines par les souches lactiques isolée et cultivées sur milieu PCA à 1% et 2% de lait écrémé sont représentés dans le (tableau11 ) la lecture des résultats consiste à mesurer les diamètres des halos clairs autour des colonies bactériennes. Après 48h d'incubation, les souches lactiques montrent deux types de croissance avec protéolyse due à l'apparition d'un halo clair autour des colonies bactériennes et une croissance sans protéolyse.

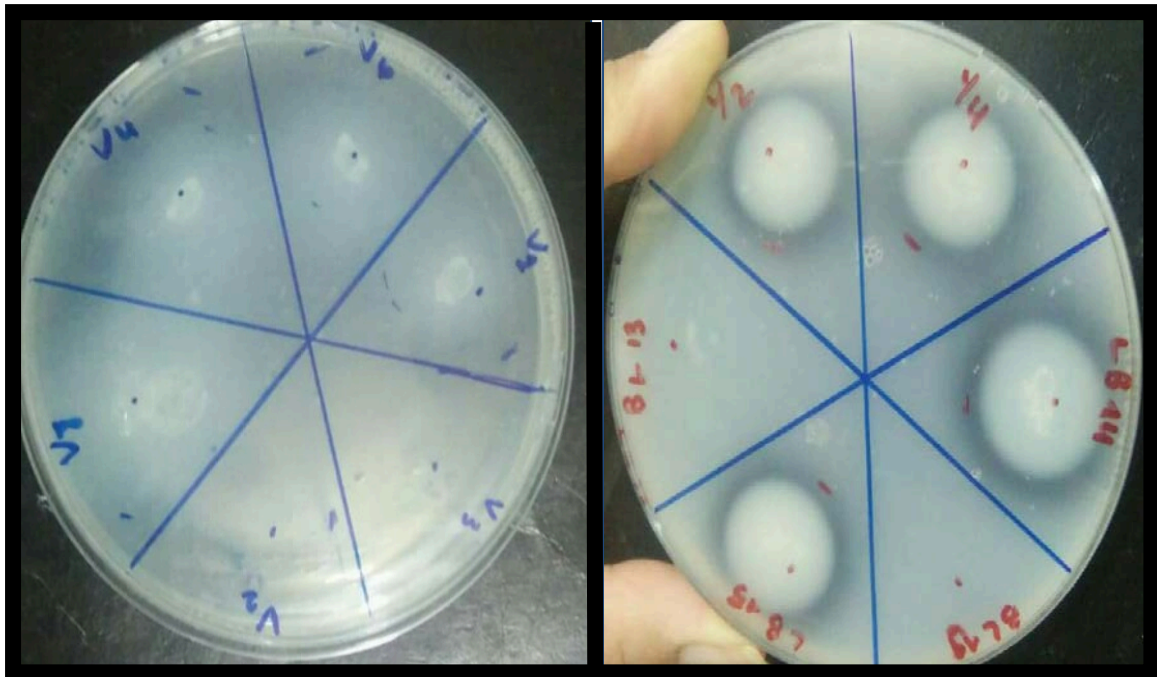
D'après les résultats obtenus, on remarque que les souches appartenant aux espèces :

## Chapitre III : Résultats et Discussion

*Entérocooccus faecium* , *Lactobacillus pentosus* ,*Leuconostoc mesenteroides* ,*Sterptococcus thermophilus* ,,*Lactococcuslactis* possèdent une activité protéolytique importante.(figure 20,21).

**Tableau 11** : Résultats de l'activité protéolytique des souches de bactéries lactiques isolées à partir de lait de vache.

Genre et espèce	Code des souches	Diamètre		Evaluation de protéolyse
		PCA1%(cm)	PCA2%(cm)	
<i>Entérocooccusfaecium</i>	LB2	1,6	2	++
<i>Entérocooccusfaecium</i>	LB3	2	2	++
<i>Entérocooccusfaecium</i>	LB6	1,6	2	++
<i>Entérocooccusfaecium</i>	LB9	2	2,2	++
<i>Entérocooccusfaecium</i>	LB10	3	2	+++
<i>Entérocooccusfaecium</i>	LB27	-	2,4	+
<i>Entérocooccusfaecium</i>	LB28	-	-	-
<i>Entérocooccusfaecium</i>	LB35	1,6	2,2	++
<i>Entérocooccusfaecium</i>	LB36	2,6	2,6	++
<i>Entérocooccusfaecium</i>	LB26	1,2	-	+
<i>Entérocooccusfaecalis</i>	LB37	2	2 ;2	++
<i>Lactococcuslactis</i>	LB21	-	2,8	+
<i>Lactococcuslactis</i>	LB22	1,6	-	+
<i>Lactococcuslactis</i>	LB24	2,6	2,6	++
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LB14	1,4	0,4	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LB23	-	2,2	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LB38	-	1	+
<i>Lactobacillus cassein</i>	LB19	-	-	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	LB39	2,8	2,6	++
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LB0	2,2	2,2	++
<i>Streptococcusthermophilus</i>	LB1	2,6	2	++
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LB4	3	2,4	+++
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LB32	2	2,4	++
<i>Leuconostocmesenteroides</i>	LB40	3,2	2,4	+++



**Figure 20:** Aspect des colonies protéolytique Sur milieu PCA au lait écrémé à 1%.

**Figure21 :** Aspect des colonies protéolytique sur milieu PCA au lait écrémé à 2%.

### III-3-4- Les résultats de test de résistances aux antibiotiques :

La souche **LB24** résistances a tous les antibiotiques testés, et les souches **LB37**, **LB38**, **LB39** et **LB40** résistances a Gentamicin, Trimethoprim et Fosfomycin; et sensible à Ciprofloxacin, Ofloxacin, Amoxycilin et Erythromycine. Enfin la souche **LB2** sensible à tous les antibiotiques testés sauf que Gentamicin.

**CN:** Gentamicin; **CIP:** Ciprofloxacin; **Tri:** Trimethoprim; **Of:** Ofloxacin; **Fos:** Fosfomycin

**Amo:** Amoxycilin; **Ery:** Erythromycine. Sensible (**S**) /Résistant(**R**)

## Chapitre III : Résultats et Discussion

**Tableau 12:** Résultats de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques.

Souches	CN		CIP		TRI		OFL		Fos		Amo		Ery	
	R	0cm	S	1,2cm	R	0cm	S	1,4cm	R	0cm	S	2cm	S	0,6cm
LB37	R	0cm	S	1,2cm	R	0cm	S	1,4cm	R	0cm	S	2cm	S	0,6cm
LB40	R	0cm	S	1,5cm	R	0cm	S	1cm	R	0cm	S	2,3cm	S	3cm
LB39	R	0cm	S	1cm	R	0cm	S	1cm	R	0cm	S	2,1cm	S	3cm
LB2	R	0cm	S	3cm	S	3,5cm	S	2,5cm	S	2cm	S	3,5cm	S	2cm
LB24	R	0cm	R	0cm	R	0cm	R	0cm	R	0cm	R	0cm	R	0cm
LB38	R	0cm	S	1,2cm	R	0cm	S	1cm	R	0cm	S	2,8cm	S	3cm



**Figure 22 :** Résultats du test d'antibiogramme d'une souche lactique LB2



## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

### Discussion générale

L'identification selon les critères morphologiques, physiologiques et biochimiques nous a permis de mettre en place une collection représentée par cinq genres de bactéries lactiques dont leurs distributions selon le pourcentage d'apparition est illustrée par (**la figure16**)

Les analyses morphologiques, physiologiques et biochimiques ont mis en évidence toute la diversité de la flore lactique en genres et en espèces isolés à partir du lait de vache. Cette composition de bactéries lactiques est relative et dépend des différents critères utilisés dans chaque étude (Bissonnette et *al.*,2000).

Parmi les bactéries lactiques isolées vingt-quatre (24) ont été purifiées et identifiées. Le test catalase et la coloration de gram a montré que les souches sont des coques et bacilles à Gram positif .la majorité des souches isolées sont homofermentaires à l'exception de la souche LB 40 est hétérofermentaires .

Parmi les souches sélectionnées pour les tests d'identification ,12 appartiennent au groupe *Entérocooccus*et présentent un développement positif à 30C° et 42C°, à pH 9,6, en présence de 6,5% de NaCl et une thermorésistante à 63C°.

La protéolyse catalysée par les enzymes bactériennes est un des événements biochimiques essentiels de la maturation du fromage (Muyncka et al.,2004).

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est essentielle pour leur croissance dans le lait ainsi que pour le développement des propriétés organoleptiques des différents produits laitiers (Savoyet,2001 ; Hassaine et al.,2007)

Il apparait à travers des publications scientifiques que les connaissances sur l'activité lipolytique des bactéries lactiques soient encore fragmentaire (Lui et al.,2001). Les résultats montrent que l'activité lipasique est généralement faible chez les bactéries lactiques testées sur gélose aux triglycérides, il est bien clair qu'il ni y a aucune activité lipolytique.

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques à partir de différents substrats qui participent aux qualités organoleptiques des produits fermentés (Cholet, 2006). Toutes les souches ont eu la capacité de produire des composés aromatisants min en évidence sur le lait écrémé.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

Le milieu hyper-saccharosé est utilisé pour détecter la production des exopolysaccharides (la formation de colonies gluantes), la production d'exopolysaccharides sur ce milieu est un critère important pour différencier entre les espèces de bactéries lactiques (Kheddid et al., 2006).

Le genre *Lactococcus*, 03 souches ont été déterminées. Ces dernières ne se développent pas à 6,5% NaCl. Elles produisent de l'acétoïne, Elles ne présentent pas de résistance à 63°C, ni de croissance à pH 9,6 capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine.

Le genre *Lactobacillus*, 05 souches se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C on a trouvé que sont homofermentaire, ADH négatif et esculine positif.

Le genre *Streptococcus*, de 03 souches sont toutes thermorésistances positives avec une croissance positive à 42°C et un test de lait de Sherman négatif.

Le genre *Leuconostoc* qui est présenté par une seule souche LB40 qui se développe à 30°C et non pas à 42°C, ne possèdent pas d'arginine déshydrogénase (ADH) et elle est hétérofermentaire.

Les souches qui produisent l'acétoïne sont dites aromatiques puisqu'elles sont capables, à partir du pyruvate, de synthétiser divers composés responsables des arômes des produits laitiers : diacétyl, acétoïne, 2,3-butanediol et  $\alpha$ -acétolactate (Raynaud et al., 2003 ; Leroy et De Vuyst, 2004).

La production des EPS par les bactéries lactiques est un phénomène favorable à de nombreux processus industriels alimentaires (Walling et al., 2001). Le principal intérêt de l'utilisation de bactéries lactiques productrices d'EPS dans les ferments lactiques lors de la production de laits fermentés est l'amélioration de la texture et la diminution de la synérèse. Il a été montré que les EPS produits par *Streptococcus* sont impliqués dans la colonisation bactérienne et la formation de plaque dentaire (Cerning, 1990).

Les tests d'identification biochimique et physiologique montrent que les échantillons de lait de vache prélevés sont constitués par les espèces de *Entérocooccus faecium*, *Entérocooccus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus pentosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

Cette diversité en relation avec la composition du lait de vache, peut-être dû à l'environnement où vivent ces animaux (Jennens, 1980 ; Remeuf et al., 1991 ; Picque et al., 1992 et Gomes 1998).

Plusieurs études ont montré la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques (Botes et al., 2008).

### **Perspective :**

Les résultats obtenus ont montré que nos souches ont des caractéristiques technologiques importantes et pour un bon développement d'applications technologiques :

- Tel que l'étude de pouvoir acidifiant des souches.
- De faire une étude d'antagonisme entre les souches afin d'obtenir des ferments lactiques pour réaliser différents produits laitiers.

# **CONCLUSION**

## Conclusion

A travers cette étude, nous avons tenté d'apporter une contribution à la caractérisation et l'identification des souches lactiques à partir de lait de vache.

A l'issue de ce qui a été réalisé, vingt-cinq (25) souches ont été isolées, purifiées et identifiées. L'identification des isolats a été réalisée par la détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques. La majorité des souches isolées étaient des bâtonnets et des coques appartenant aux cinq genres *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostocs*.

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

D'après les résultats de l'étude des aptitudes technologiques, nous avons pu déduire que, même au sein d'une même espèce, il existe des variations entre les souches autant au niveau d'aromatique que l'activité protéolytique et texturante. D'où les bonnes fonctionnalités technologiques des souches étudiées.

L'activité protéolytique des ferments constitués est d'un intérêt capital pour l'industrie fromagère, de ce fait, une étude de cette dernière a été réalisée afin de caractériser les enzymes protéolytiques impliquées. Les résultats obtenus ont révélé une activité protéasique considérable.

## Références bibliographiques :

- **Ahmed Frais Mohd Adnan. Irebe K.P. Tan,2007.** Isolation of lactuca cid bacteria from malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. Bioresource technology., 98 :1380-1385.
- **Alais C.,1984.** Science du lait, principales des techniques laitieres.
- **Amouzou K S., Prevost H., Divies G.R., 1985** –Effect of magnesium supplementation of milk on lactic fermentation by streptococcus lactic and streptococcus thermophilus. Lait :65 : pp21-34.
- **Axelsson Lars,2004.** Lactic acid bacteria : classification and physiology In lactic acid bacteria microbioloical and functional aspects. Salminen S., Wright A.V., Ouwehand A. 3<sup>E</sup> Ed., Marcel Dekker,pp :1-66.
- **Badis A., Guetarni D., Moussa Boudjema B., Henni D.E., Kihal M.,2004.** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. Food Microbiology,21 :579-588.
- **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 « Arabie et kabyle ». Science et Technologie C : 23 : pp 30-37.
- **Ben-Yahia L., 2012** – Etude du dialogue hote / bactéries lactiques du yaourt chez drats gnotobioltiques. Thèse pour obtenir le grade de docteur délivré. L’institut des Sciences et Industries du vivant et de l’environnement : 21p.
- **Bourgeois C M et Larpen J P., 1996** – Microbiologie alimentaire T2 ; aliments fermentes et fermentations alimentaire. Ed. Technique et documentation :523p.
- **Boyaval P., Terré S et Corre C., 1988** –production l’acide lactique à partir de permeat de lactosérum par fermentation continu en réaction à membrane lait :1 : pp65-84.
- **Carr Frank J., Chill Don, and Maida Nino, 2002.** The Lactic Acid Bacteria : A Literatue Survey. Critical Reviews in Microbiology,28(4) :281-370.
- **Comité de l’antibiogramme de la société française de microbiologie, 2007.**
- **Corrieu G., Luquet F M., 2008** – bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Ed. Lavoisier. Paris. France : pp472-676.
- **De Man,J. Rogosa, M. et Sharpe, M.E.,1960.** A medium for the cultivation of lactobacilli, j. appl. Bacteriol., 23 :130-135.
- **De Roissart., 1986** – bactéries lactiques dans le lait et produits laitieres. Ed. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris :445p.

- **De Vuyst Luc, Leroy Frédéric, 2007.** Bactériocins from Lactic Acid Bacteria : Production, Purification, and Food application. *J. MOL. Microbiol Biotechnol.*, 13 : 194-199.
- **Dellaglio F., Roissart H., Torriani S., Curk M C. and Janssen D., 1994** – caractéristiques générales des bactéries lactiques. In *bactéries lactiques*. Ed. H Roissart et F M. Luquet. Paris : Lavoisier : pp25-116.
- **Desmazeaud M., 1983** – comment les bactéries lactiques se comportent elles dans le lait. *Technique laitière* : 976 : pp11-14.
- Dicks L.M.Y., 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.
- **Dortu C. et Thonart P., 2009** – les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bio conservation des produits alimentaire. *Biotechnol. Agron . Soc. Environ* : 13 : pp 143-154.
- **Dridrer D., Prevost H., 2009** – bactéries lactiques physiologie, Métabolisme, Génomique et application industrielle. Ed, Economisa 49 rue Harica 75015 Paris : pp381-427.
- **Facklam R., Elliot J.A., 1995.** Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Négative, Gram-Positive cocci, Excluding the streptococci and Enterococci. *Clinical Microbiol. Reviews.*, 8 : 479-495.
- **Hadef S., 2012** – Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des lactiques locales. *Mémoire de magister* : pp7-8.
- **Hardi J.M., Whiley R.A., 1995.** The genus streptococcus in the genera of lactic acid bacteria. B.J.B. Wood, and W.H. Holzappel Eds., Vol2., aspen publishers, gaithersburg, MD.
- **Harrigan W.F., McCance M.E., 1976.** Eds., laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press, orlando.
- **Hassan A.N. et Frank J.F., 2002.** Starter cultures and their use. *In : Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L) 2<sup>e</sup> Ed., Marcel dekker, inc. New york. 151-205.
- **IDF : International Dairy Federation, 1990.** The composition of ewe's goat's milk *Ed.doc*, pp220.
- **Imbert M., Bondeau R., 1998** – on the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Curr. Microbiol.* 37 : pp64-66.
- **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.
- **Klaenhammer T.R., Fremaux C., Hechard Y., 1994.** Activité antimicrobienne des bactéries lactiques in *bactéries lactiques*. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Loriga. pp : 353-366.

- **Konig H. et Frohlich J., 2009** –biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer- Verlag. Berlin. Heidelberg : pp 18-20.
- **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 de lait : transformation du lait. Vignola C.L. Ecole Polytechnique Montreal,pp : 75-128 (<http://web.google.com/books>).
- **Larpent J-P., 1996b.** laits et produits laitiers non fermentés In Microbiologie alimentaire : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Bourgeois C.M., Mesclé J.F., Zucca J. Tome I , Tec & Doc, Lavoisier, pp :272-294.
- **Larpent J-P., Copin M-P., Germonville A., Jaquet M., Thétas J-L., 1997.**Microbiologie du lait et des produits laitiers In microbiologie alimentaire techniques de laboratoire. Larpent J-P. Tec & Doc, Lavoisier, pp : 704-805.
- **Larpent-Gourgaut Monique, Michaux odile, Lrpent J.P, Desmasures Nathalie Desmazeaud Mechel, Mangin Irène, Masson Florence, Montel M.C. et Tailliez Patrick, 1997.** Les ferments lactiques et bactéries apparentées In Microbiologie alimentaire techniques de laboratoire. Larpent J-P. Tec & Doc, Lavoisier, pp : 199-255.
- **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.
- **Ledesma O V., De Ruiz Hogado A P., Olivier G., De Giori G S., Raibaud P., Galpin J V., 1997** - A synthetic medium for comparative nutritional studies of Lactobacilli. J. Appl. Bcteriol. Vol 42 : pp123-133.
- **Lenoir J., Hermier J., Weber F., 1992** –les groupes microbiens d’intérêt, Ed Cidil : pp 30-50.
- **Letrot C., Juillard V., 2001** – Developement of a minimal chemically. Defined medium for the exponential growth of streptococcus thermophilus.J. APPL. Microbiol :91 : pp 1023-1029.
- **Leveau J Y. et bouix M., 1993** – Microbiologie industrielle : les micro-organismes d’intérêt industriel. Tec and Doc. Lavoisier. Paris : pp85-87. Hassan AN. Et Frank J F.,2001 – star cultures and their use. In : Applied. Dairy. Microbiology (Marth E H. et Steele J L).2Ed. Marcel. Dekker.Inc. New York : pp 151-205.
- **Leveau J-Y., Bouix Mrielle, De Roissart H., 1991.** La flore lactique In technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Bourgeois C.M., Leveau J-Y. Tec & Doc, Lavoisier, pp : 152-186.
- **Luquet F M., 1986** – lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre, T3., qualité, énergie et tables décomposition ). Ed. Technique et documentation. Paris : pp 343-442.



- **Matamoros S., 2008** – caractérisation de bactéries lactiques psychrotropes en vue de leur utilisation dans la bio préservation des aliments. Etude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au thèse de doctorat. Université de Nantes : 17P.
- **Mazali J., 1992** – bioconversion de permeat de lactosérum par de cellules lactobacilles in mobilisées sur un support solide. Mémoire. Université du Québec. INRS-EA : pp5-7.
- **Michel Valérie, Hauwuy Agnés, Chamba J-F,2001.** La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. Lait.,81 :575-592.  
Microbiol., 6 :183-195.
- **Novel G., 1993** – les bactéries lactiques in : Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. Technique et Documentation Lavoisier : 614p.
- **Pandey A., Bringel F., Meyer J M., 1994** – Iron requirement and 5 earch for side rophoresincactic acid bacteria. Apple. Microbiol. Biotechnol :40 : pp735-739.
- **Pougheon Sandra, Goursaud Jean,2001.** Le lait : caractéristiques physicochimiques In lait, nutrition et santé. Debry G.Tec & Doc, lavoisier, pp :3-42.
- **Poulin., 1994** – Evaluation de la préparation commerciale des ferments lactiques inles bactéries lactiques T1. Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Lorica. Lavoisier :604p.
- **Raynaud S., 2006** – Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'auto acidification chez lactococcus lactis. Thèse de doctorat. L'institut national des sciences appliquées de Toulouse :21p.
- **Ruissat,L., Reyes-Gavilan C.G., Suarez A., Fernandez-Garcia M., Margolles M. and bensoltan,A.2006.** physico-chemical, microbiological studies of lactic acid bactéria isolated from ewe's milk of algerian tow breeds ( ouled Djillali ans hamra). Egypt.J. app. Sci.21 : (2b),567-582.
- **Sallofe Coste., 1994** – Lactis acid bacteries. Dannone News latter n°5 July.
- **Salminen S., Isolauri E. Salminen E., 1996.** Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier : succesful strains and future challanges. Anatomie Leeuwenhoek., 70 :347-358.
- **Salminen S., Wright A V., Ouwehand A., 2004** – Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel. Dekker.Ins., 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.
- **Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Balz R., Collins M.D., Fischer W., 1995.** Transfer of streptococcus lactis and related streptococci to the genus lactococcus gen. Nov.syst. appl.

- **Stiles M.E et Holzapfel W.H. 1997.** Review article lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *int.J. food microbiol.* 36 :1-26.
- **Tarzaghi, B.E., et Sandine.W E., 1975.** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Journal of applied Microbiology* 29 :807-813.
- **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.
- **Thompson J., Gentry-Weeks C R., 1994 –** Métabolisme de sucres par les bactéries lactiques. In : bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F M). *Lorica. Uriage* : 1 : pp 239-290.
- **Vaillancourt K., Moineau S., Frenette M., Lessard C. and Vadeboncoeur C., 2002-** Galactose and Lactose Genes from Galactose-positive bacterium *streptococcus salivarius* and the Phylogenetically Related Galactose-Negative Bacterium *streptococcus thermophilus* : Organization. Sequence. Transcription. And Activity of the gal Gene Products. *Journal of Bacteriology* : 184 : pp 785-793.
- **Van den Bogaard P T C., Hols P., Kleerebezem M., Kuipers O P. and de Vos W M., 2004 –** Sugar utilisation and conservation of the gal-lac gene cluster in *streptococcus thermophilus*. *Syst. Appl. Microbiol* :27 : pp 10-17.
- **Wood B J B .et Holzapfel W H (éditeur), 1995 –** The lactic acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria 2 Ed, Blackie Academic and Professional London :2 : pp40-90.
- **Yateem A., Balba M T., AL-Surrayai T., AL-Mutairi B. and AL-Daher R., 2008 –** isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *International. Journal of Dairy. Science* : 3(4) : pp 194-199.
- **Zourari A., Roger S., Chabanet C., Desmazeaud M., 1991.** Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. Souches de *streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*. *Lait.*, 71 :445-461.
- **Zourari A., Roger S., Chabanet C., Desmazeaud M., 1991.** Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. Souches de *streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*. *Lait.*, 71 :445-461.
- **Institut pasteur d'Algérie. 2003.** Catalogue milieux de culture réactifs de laboratoire. Edition IPA.
- **Lourent Federighi M., Jouve J L., 1998 –** Manuel de bactériologies alimentaire, polytechnica. Paris : 308p.

- **Curk M.C., Boeufgras J.M., Decaris B., Gavini F., Kersters K., Larpent J.P., Le Bourgeois P., Renault p., De Roissart H., Rouvier C., 1994.** Méthodes d'identification des bactéries lactiques in bactéries lactiques. De roissart h., luquet f.m. tome 1. Lorica.pp : 141-160.
- **Ludwig W., Schleifer k-h., whitman w.b., 2008.** Bergey's taxonomic outlines – revised road map to the phylum firmicutes., vol.3.
- **Vasiljevic T., Shah N.P. et Jelen p.2005 :** growth characteristics of lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus ATCC. 11842 as affected by different neutralizers. Aust J Dairy technol,60 :3-9.
- **Vaningelgem F., Zamfir M., Adriany T. et De Vuyst L.2004 :** fermentation conditons affecting the bacterial growth and exopolysaccharides production by streptococcus thermophilus ST 111 in milk-based medium.J.Appl. Microbiol.97 :1257-1273.
- **Talon G., Walter D., Montel M.C. 2000.** Growth and effect of staphylococci and lactic acid bacteria on unsaturated free fatty acids. Meat science.54 :41-47.
- **Ruas-Madiedo P., Husenholtz J., Zoon P.2002.**an overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Int. Dairy J.12 :163-171.
- **Ruas-madiedo P., De los reyes-gavilan C.G.2005.** METHODS FOR THE SCREENING ? ISolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria.J Dairy Sci. 88 :843-856.
- **Rodgers S.2001 :** preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures : a review. Tends Food Sci. Technol.12 :276-284.
- **Ricciardi A., Clementi F.2000.** exopolysaccharides from lactic acid bacteria : structure, production and technological aplication.Ital food Sci.12 :22-45.
- **Piatkiewicz A.1987.** lipase and esterase formation by mutants of lactic acid streptococci and lactobacilli. Milchwissenschaft.42 :561-564.
- **Papamanoli E.,N. Tzantakis E.litopoulou-Tzantaki and P. Kotzekidou 2003 :** characterisation of lactic acid bacteria isolated from a greek dry- fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat Sci.65 :859-867.
- **Papon M., Talon R.1988 :** Factors affectino growth and lipase production by meat lactobacilli strains and brochothrix thermosphacta. Journal of applied bacteriology.64 :107-115.
- **Nakajima H, suzaki Y., Kaizu H., Hivota T.1992 :** cholesterol lowering activity of ropy fermented milk.j food sci.57 :1327-1329.
- **Lin, S-Q., Holland, R., & Crow, V.L.2001.** Purification and properties of intracellular esterases from streptococcus thermophilus . International Dairy Journal. 11 :27-35.

- **Looijesteijn P.J., Trapet L., De Vries E., Abee T., Hugenholtz J.2001.** physiological function of exopolysaccharides produced by lactococcus lactis. Int J Food Microbiol.64 :71-80.
- **Looijesteijn P.J., Van castereu W.H.M ; Tuinier , R ; Doeswijk-voragen,C.H.L. and Hugenholtz,J.2000.** Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by lactococcus lactis subsp. Cremories in continuous cultures.J.Appl.Microbiol.98 :116-122.
- **Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., et Gobbetti,M.2000 :** purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough lactobacillus plantarum strain 21B. Appl environ Microbiol.66 :4084-4090.
- **Kawai M., Yamaguchi N.,Nasu M .1999 :** Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process.J.App. microbiol. 86 :496-504.
- **Hughes M.C.,Kerry J.P., Arendt E.K., Kenneally P.M.,Mcsweeney P.L.H.,O'neill E.E.2002 :** Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sousages. Meat sciences.62 :205-216.
- **Holtzef A., Ganzel M.G., Nicholson G.J. ,Hammes W.P., and Jung.G.2000.** The first low molecular weight antibiotic from lactic acid bacteria : reutericyclin, a new tetramic acid, angew chem Int Ed Engl.39 :2766-2768.
- **El soda M. Abd El wahab H, Ezzat N, Desmazeaud MJ,Ismail A 1986 :** the esterolytic and lipolytic activities of the lactobacilli.Lait.66 :341-443.
- **Dacosta Y.2000 :** la bioconservation des aliments. L'antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologiques. Ed.Yves Dacosta. Paris .196p.
- **De Vuyst I., Degeest B 1999B :** Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria.FEMS Microbiol Rev 23 :153-177.
- **Delarras C.2007 :**Microbiologie pratique pour laboratoire d'analyse ou de contrôle.Ed. tec & doc.lavoisier(paris).
- **Corsetti,A., Gobbetti, M., Sossi, J., And Damiani,P.1998 :** Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria ; App,Microbiol biotechnol,50 :253-256.
- **Walman A. Det Maddox I.S.2003.** exopolysaccharides from lactic acid bacteria : perspectives and challengers.Trends in biotechnology.21 :269-274.
- **Cerning J.,bouillanne M., London M., Deslazeaud M.J.1990 :** comparaison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. Sci Aliments.10 :443-451.

- **Chich, J-F., Marchesseau, K., & Gripon, J.C. 1997** : Intercellular esterase from lactococcus lactis subsp. Lactic NCDO 763 : Purification and characterization. International Dairy Journal.7 :169-174.
- **Ammor S., Rachman C., Chaillon S., Prévost H., Dousset X., Zagorec M. 2005** : phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small scale producing traditional dry sausages. Food Microbiology.23 :373-382.
- **Atrih A. et Foster S.J. 2001** a : analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. J. Appl. Microbiol. 91 :364-372.
- **Umemoto Y. et Sato Y. 1975** : lipolysis by lactic acid bacteria recognized through color changes of dye-strained butter fats on double-layered agar plates. Milchwissenschaft.30 :591-594.
- **Bissonnette, F., Labrie S., Deveau, H., Lamoureux, M. et Moineau, S., 2000**. Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged cheddar, J. Dairy Sci., Vol.83.No4,620-627.
- **Jenness R., 1980**. composition and characteristics of goat milk : review 1368-1979. J. Dairy Sci., 63,605.
- **Remeuf F., Cossin, V., Dervin, C., Lenoir, J. et Tomassone, R., 1991**. Relations entre les caractéristiques physico-chimique des laits et leur aptitudes fromagère, lait., 71,397-421.
- **Gomes, A.M., Malcata, F.X. et Klaver F.A., 1998**. Growth enhancement of Bifidobacterium Lactic bio and lactobacillus acidophilus ki by milk hydrolysates. J. Dairy .Sci., 81,281-25.

## Annexes

Composition des milieux de culture :

Milieu MRS : (ph=6,5) (De Man, Rogosa et Sharp,1960)	
Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0,2g
Sulfate de manganèse	0,5g
Agar-agar	15g
Eau distillé qsp	1000ml
Stérilisation par autoclavage à 120C° pendant 15 min	

Milieu M17 : (ph=7,1) (Terzaghi et Sandine,1975)	
Extrait de viande	5g
Extrait de levure	2,5g
Tryptone	5g
Peptone de soja	2,5g
Peptone pepsine de viande	5g
Acide ascorbique	0,5g
lactose	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Mg SO4	0,25g
Agar-agar	15g
Eau distillé	1000ml
Stérilisation par autoclavage à 120C° pendant 15 min	

Milieu PCA-lait : (ph=7,2) (Gemelas et., 2013)	
Tryptone	5g
Extrait de levure	2,5g
Glucose	1g
Poudre de lait écrémé(0%)	1g
Agar-agar	15g
Eau distillé qsp	1000ml
Stérilisation par autoclavage à 115C° pendant 20 min.	

Milieu MSE : (Ph=6,9) (Mayeu,sandine & Elliker1962)	
Tryptone	10g
Gelatine	2,5g
Extrait de levure	5g
Saccharose	100g
Glucose	5g
Citrate de sodium	75g
Azide de sodium	0,075g
Agar-agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml
Stérilisation par autoclavage à 110C° pendant 20 min.	

Milieu clarck et lubs : (ph=7,5) (Guiraud.,2003)	
Peptone trypsine	5g
glucose	2g

Phosphate bipotassique	10g
Eau distillée qsp	1000ml
Stérilisation par autoclavage à 121C° pendant 20 min.	

Bouillon hypersalé-Naylor & Sharp : (ph=7,2) (Sherman.,1937)	
Extrait de viande	
glucose	
peptone	
Na Cl	
Eau distillée	
Stérilisation par autoclavage à 120C° pendant 20 min	

Eau physiologique	
Chlorure de sodium	9g
Eau distillée	1000ml
Stérilisation à 120C° pendant 20 min	