

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis
Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de La Vie



جامعة عبد الحميد ابن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté par

BENSTAALI Noria

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Production et transformation laitières

THEME

**Isolement et identification des bactéries
lactiques autochtones isolés de lait de
vache de la région d'Oued Rhiau**

Devant les membres du jury

Président	HENNELN	U. Mostaganem
Examineur	DAHOU Abdelkader El Amin	U. Mostaganem
Encadreur	TAHLAITI Hafida	U. Mostaganem

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Productions Animales

Année universitaire 2021-2022

Remerciement

Au terme de ce travail tout d'abord je tiens à remercier Allah mes remerciements les plus sincères à mes chers parents mes vifs remerciements et profonde gratitude à notre encadrant madame TAHLAITI Hafida d'avoir acceptés de m'encadrer, pour leur disponibilité et patience avec moi durant l'évolution de ce travail.

Je remercie infiniment Mr DAHOU Abdelkader El Amine qui ne nous a pas lésiné sur ses conseils à chaque étape, ce qui nous a permis de développer le travail, et Mme HENNI .N pour l'honneur qu'elles nous font d'être l'examineur du présent mémoire.

Je tiens à exprimer une profonde reconnaissance aux membres du laboratoire de recherche des Sciences et Techniques de production animale de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour leurs gentillesse, générosité, disponibilité et leurs aides surtout Doctorant BEKIHAL Amine.

J'adresse des chaleureux remerciements à tous mes enseignants de département de Biologie durant ce master II.

Merci à Monsieur HOMRANI Abdelkader.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée aux collègues qui ont été un secours pour ce mémoire à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie cette mémoire :

A mes très chers parents, source de vie, d'amour et d'affection.

A mes chères sœurs et frères et à toute ma famille, source d'espoir et de motivation.

A tous mes amis et tout particulièrement Fatima et Hanane et Ahlem.

Résumé

Les bactéries lactiques font naturellement partie de notre environnement et de notre alimentation. On reconnaît depuis longtemps, aux bactéries lactiques la propriété de produire des substances antimicrobiennes et sont utilisées dans la fermentation et la bio préservation des aliments.

Le but de cette étude était d'évaluer la diversité des bactéries lactiques autochtones qui appartiennent à la flore utile ou technologique, d'un échantillon de lait de vache de la région d'Oued Rhiau.

Les analyses physico-chimiques du lait nous ont permis de déterminer la qualité de ce dernier (PH=6,62 ; Acidité Dornic **D**=19 ; Point de congélation **FP**=0,523 ; Température **T**=28,6 ; Matière grasse **F**=2,89 ; Matière minérale **C**=5,58 ; Matière sèche **S**=9,62 ; Protéine **P**=2,95 ; Taux de sel **S'**=0,64 ; Lactose **L**=4,50). Quant à l'étude microbiologique basée sur l'isolement de souches lactiques(12) à partir d'un certain nombre de caractères phénotypiques, physiologiques et biochimiques (type fermentaire, la croissance en présence de NaCl : 4% et 6,5% ; croissance aux pH=4.5 et pH 9.6; test de croissance à différentes températures 10°C,37°C, 45°C ; étude de la thermorésistance; test de l'hydrolyse de l'esculine) et l'utilisation de la galerie API 50 CHL nous ont permis d'identifier 04 genres suivants: *Lactobacillus* (42%), *Lactococcus* (25%), *Enterococcus* (25%) et *Leuconostoc*(8%).

Mots-clés: Bactéries lactiques ; *Leuconostoc* ; *Enterococcus* ; *Lactococcus* ; *Lactobacillus*; lait de vache ; analyses physico-chimiques.

Abstract

Lactic acid bacteria are a natural part of our environment and our diet. It has long been recognized that lactic acid bacteria have the property of producing antimicrobial substances and are used in the fermentation and bio-preservation of food.

The aim of this study was to evaluate the diversity of autochthonous lactic acid bacteria which belong to the useful or technological flora, of a sample of cow's milk from the region of Oued Rhiau.

The physico-chemical analyzes of the milk allowed us to determine its quality (PH=6.62; Acidity Dornic D=19; Freezing point FP=0.523; Temperature T=28.6; Fat F=2, 89; Mineral matter C=5.58; Dry matter S=9.62; Protein P=2.95; Salt level S'=0.64; Lactose L=4.50). As for the microbiological study based on the isolation of lactic strains(12) from a certain number of phenotypic, physiological and biochemical characteristics (fermentation type, growth in the presence of NaCl: 4% and 6.5%; growth at pH=4.5 and pH 9.6; growth test at different temperatures 10°C, 37°C, 45°C; study of heat resistance; test of aesculin hydrolysis) and the use of the API gallery 50 CHL allowed us to identify the following 04 genera: *Lactobacillus* (42%), *Lactococcus* (25%), *Enterococcus* (25%) and *Leuconostoc* (8%).

Keywords: Lactic acid bacteria; *Leuconostoc*; *Enterococcus*; *Lactococcus*; *Lactobacillus*; cow milk; physico-chemical analyses.

ملخص

تعد بكتيريا حمض اللاكتيك جزءًا طبيعيًا من بيئتنا ونظامنا الغذائي. من المعروف منذ فترة طويلة أن بكتيريا حمض اللاكتيك لها خاصية إنتاج مواد مضادة للميكروبات وتستخدم في تخمير الأطعمة وحفظها بيولوجيًا. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تنوع بكتيريا حمض اللاكتيك الأصلية التي تنتمي إلى النباتات المفيدة أو التكنولوجية لعينة من حليب البقر من منطقة واد رهيو.

سمحت لنا التحاليل الفيزيائية والكيميائية للحليب بتحديد جودة هذا الأخير ($PH = 6.62$ ؛ حموضة دورنيك $D = 19$ ؛ درجة التجمد $FP = 0.523$ ؛ درجة الحرارة $T = 28.6$ ؛ الدهون $F = 2.89$ ؛ المواد المعدنية $C = 5.58$ ؛ المادة الجافة $S = 9.62$ ؛ البروتين $P = 2.95$ ؛ محتوى الملح $S = 0.64$ ؛ $Lactose\ L = 4.50$) ما بالنسبة للدراسة الميكروبيولوجية القائمة على عزل سلالات اللاكتيك (12) من عدد معين من الخصائص المظهرية والفسولوجية والكيميائية الحيوية (نوع التخمير ، النمو بوجود كلوريد الصوديوم: 4% و 6.5% ؛ النمو عند الأس الهيدروجيني $= 4.5$ ودرجة الحموضة 9.6 ؛ اختبار النمو عند درجات حرارة مختلفة 10 درجات مئوية ، 37 درجة مئوية ، 45 درجة مئوية ؛ دراسة مقاومة الحرارة ؛ اختبار التحلل المائي للأيسكولين) واستخدام معرض API 50 CHL سمح لنا بتحديد الأجناس 04 التالية: *Lactococcus* ، *Lactobacillus* (42) *Leuconostoc* (8%) و *Enterococcus* (25%) (25%)
الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك ؛ *Leuconostoc* ؛ *Enterococcus* ؛ *Lactococcus* ؛ *Lactobacillus* .
حليب البقرة، التحاليل الفيزيائية و الكيميائية.

Liste des abréviations

ATP: Adénosine-Tryphosphate

Cn (cellules: suspensions): Concentration en nombre de cellules dans la suspension

En: *Enterococcus*

EPS: Exo polysaccharides

EST: Extrait Sec Total

FAO: Food and Agriculture Organization

Fd : Facteur de dilution

Lb: *Lactobacillus*

Ln: *Leuconostoc*

MG: Matière Grasse

MRS: Man, Rogosa et Sharpe (Milieu de culture)

MSE: Mayeux, Sandine et Elliker (Milieu de culture)

NaCl : Chlorure de Sodium

Na OH : Hydroxyde de sodium

P: Probabilité

PCA : Plate Count Agar (Milieu de culture)

Liste des figures

Figure 1. Composition globale du lait en g/l de lait (d'après Cayot & Lorient,1998).	6
Figure 2. Shéma montrant l'Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques (Lahtinen et al., 2012).	17
Figure 3 : Différents types de fermentation (Axelsson, 2004).	18
Figure4. Acide lactique	19
Figure 5 : <i>Lactobacillus acidophilus</i> et cellule épithéliale (Beijerinck, 1901).	21
Figure6 : <i>Enterococcus faecalis</i> (Andrewes&Horder, 1906).....	23
Figure 7 : <i>Lactococcus lactis</i>	23
Figure8 : <i>Streptococcus pyogenes</i> (Rosenbach, 1884).....	23
Figure9 : <i>Leuconostoc</i> au microscope électronique.	24
Figure 10 : Morphologie en microscopie électronique de <i>Pediococcus sp</i> photo sylviane lemarinier université de Caen (Benkarouba, 2017).....	25
Figure11 : <i>Bifidobacterium longum</i> au microscope électronique	26
Figure 12 : Situation géographique de laboratoire de recherche LSTPA de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem (Google maps).	31
Figure 13 : Paramètres physicochimiques étudiés	32
Figure 14: Mesure de l'acidité Dornic.....	34
Figure 15 : Préparation des dilutions de 10^{-1} à 10^{-7}	35
Figure 16 : Protocole d'isolement et purification des bactéries lactiques.	37
Figure 17 : Test de catalase des bactéries lactiques	39
Figure 18. Les galeries API 50 CHL	43
Figure 19 : Aspect macroscopique des colonies d'isolats lactiques isolées sur gélose MRS.	45
Figure 20 : Aspect macroscopique des colonies d'isolats lactiques isolées sur gélose M17.	46
Figure 21 : Aspect macroscopique d'isolat après purification sur milieu MRS solide.	47
Figure 22 : Aspect macroscopique de deux isolats purifiés sur milieu MRS solide.	47
Figure 23 : Aspect microscopique des isolats après la coloration de Gram ($\times 100$).....	48
Figure 24 : Résultats des tests physiologiques et biochimiques réalisés après incubation	53
Figure 25 : Résultats des profils fermentaire des bactéries lactiques sur la galerie API 50 CHL...	56

Liste des tableaux

Tableau I. Composition globale du lait en g/100ml (Vignola,2002).	6
Tableau II. Caractères organoleptiques du lait (Joffin,2010).	7
Tableau III. Les caractéristiques physico-chimiques du lait (Bourgeois et <i>al.</i> , 1990),(Billon,2009).	9
Tableau IV. La flore indigène di lait cru (vignola,2002)	10
Tableau V. Classification des grands groupes bactéries lactique (Stiles et Holzapfel 1997).	17
Tableau VI. Critères différentiels des trois groupes de lactobacilles (Sharpe , 1981 , Kandler et Weiss , 1986).	20
Tableau VII. Liste des espèces du genre <i>leuconostoc</i> (Zang et Cai, 2014).	24
Tableau VIII. Avantage et inconvénients de quelques méthode d'identification bactérienne en microbiologie (Singhal et <i>al</i> , 2015).	28
Tableau IX . L'analyse physico-chimique de lait de vache	44
Tableau X. Dénombrement des bactéries lactiques sur milieu MRS	46
Tableau XI : Résultats des profils fermentaire des bactéries lactiques sur la galerie API 50 CHL.	46
Tableau XII: Critères morphologique des bactéries lactiques isolées à partir de lait de vaches	48
Tableau XIII. Résultats de test de croissance à différentes températures	49
Tableau XIV : Résultats de test de thermorésistante.	50
Tableau XV : Résultat du test de croissance à différents pH	51
Tableau XVI : Résultats du test de culture sur milieu hypersalé	51
Tableau XVII: Résultats du test de type fermentaire.....	52
Tableau XVIII : Résultats de l'hydrolyse de l'esculine	53
Tableau XIX : L'identification des bactéries lactiques par galerie API 50 CHL	55

Liste des annexe

AnnexeA :	62
AnnexeB :	63
AnnexeC :	64
AnnexeD :	65

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexe

Introduction	1
Chapitre I :Partie bibliographique	3
1. Généralités sur le lait.....	4
2. Les bactéries lactiques.....	15
Chapitre II :Matériels et méthodes	15
1. Objectif.....	31
2. Lieu et période de l'étude.....	31
3. Provenance des échantillons.....	32
4. Analyses physico-chimiques d'échantillon de lait de vache	32
5. Analyses microbiologiques d'échantillon de lait de vache.....	34
6. Technique de conservation.....	38
7. Etude des caractéristiques physiologiques et biochimiques.....	39
8. Identification des bactéries lactique par la galerie API 50CHL	40
Chapitre III :Résultats et discussions	43
1. Résultats.....	44
2.Discussions.....	57
Conclusion.....	59
Les annexes	62
Références bibliographies	68

Introduction

Introduction

Le lait occupe une position stratégique et est une denrée essentielle dans l'alimentation quotidienne de l'homme, c'est un liquide biologique collecté à partir des mammifères (principalement les vaches laitières) et un aliment complet constitué des principaux nutriments nécessaires au développement du corps humain, en particulier le calcium alimentaire, ainsi que la teneur en vitamines et minéraux. Selon la FAO (2019), la production mondiale de lait provient essentiellement du lait de vache 81% suivi du lait de bufflonne 15% et d'autres types de laits (chèvre, brebis et chamelle) 4%, en 2018. (Kebchaoui, 2013).

Le lait est un aliment dont la durée de conservation est très limitée. En effet, son PH quasi neutre le rend facilement altérable par les micro-organismes et les enzymes. Sa richesse et sa fragilité en font un milieu idéal de reproduction pour nombreux micro-organismes, dont les moisissures, levures et les bactéries. Bien que ces micro-organismes soient les principaux facteurs de dégradation du lait, ils sont historiquement utilisés dans sa transformation et sa conservation. (Kara et Mehieddine, 2020).

De nombreux produits alimentaires subissent une fermentation lactique avant leur consommation, ce qui leur confère des caractéristiques d'arômes et de textures très spécifiques. Les bactéries qui en sont responsables sont toutes classées et regroupées sous la même appellation de bactéries lactiques (Ghozlane, 2012).

Les bactéries lactiques sont reconnues pour l'effet bénéfique de leur présence dans la production de nombreux produits laitiers depuis de nombreuses années (Atlan et *al.*, 2008).

Les bactéries lactiques peuvent produire plusieurs composés à partir de la fermentation des sucres, de l'hydrolyse des protéines et des lipides. Ces composés peuvent être sous forme d'acides organiques, de peptides, de composés antimicrobiens, de composés aromatiques et d'exopolysaccharides. Ces produits participent notamment à la qualité organoleptique, technologique et nutritionnelle des produits laitiers. (Mozzi et *al.*, 2010).

Notre travail consiste à l'étude de la diversité des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache cru appartenant à la région d'Oued Rhiau.

L'objectif de notre travail consiste à isoler, purifier et identifier les bactéries lactiques par des méthodes biochimiques et physiologiques à partir des échantillons de lait de vache.

Notre travail est divisé en trois (03) parties :

Introduction

- Une étude bibliographique composée de deux parties :
 - La première rappelant les généralités du lait, ses propriétés et ses différentes flores bactériennes.
 - La deuxième représente la classification des bactéries lactiques et leur métabolisme.
- Une étude expérimentale comprend :
 - Une étude physico-chimique
 - Isolement et caractérisation des bactéries lactiques afin de sélectionner des genres prédominants dans le lait étudié.
 - Présentation des résultats obtenus et leurs interprétations, en les comparant aux résultats des travaux similaires pour valoriser ce mémoire.
- Conclusion et perspectives qui en découlent.

Chapitre I

Partie

bibliographique

Chapitre I : Partie bibliographique

1. Généralités sur le lait

1.1. Définition du lait

Le lait est un substrat très riche fournissant à l'homme et aux jeunes animaux naissants, un aliment presque complet. Protéines, glucides, lipides, sels minéraux et vitamines sont présents à des concentrations tout à fait satisfaisantes pour la croissance et la multiplication cellulaire (Bencheba, 2021).

Le lait est la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou de plusieurs traites sans rien y ajouter ou en soustraire, destinée à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur (FAO, 2000). C'est un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en β carotènes, deux fois plus visqueux que l'eau, de saveur sucrée et d'odeur peu accentuée (Billon, 2009). Son goût, variable selon les espèces animales, est agréable et douceâtre.

En 1909, le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini par le Congrès International de la Répression des Fraudes, comme étant le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum (Boukhalfa, 2019).

Le lait est un mélange liquide de nombreuses substances dont la plus abondante est l'eau (Mathieu, 1998). Il est sécrété par les différentes espèces de mammifères présentant des caractéristiques communes et contient les mêmes catégories de composants (Chilliard et Sauvant, 1987), et dont la composition et les caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces animales, et même selon les races. Ces caractéristiques varient également au cours de la période de lactation, ainsi qu'un cours de la traite (Ghaoues, 2011).

1.2. Composition

Franworth et Mainville (2010) mentionnent que le lait a longtemps été considéré comme un aliment bon pour santé. C'est une source de calcium et de protéines et peut être ajouté à notre alimentation sous plusieurs formes. Le lait est le seul aliment naturel complet qui existe, et chacun des laits étant adapté à la race qu'il permet de développer (Providence, 2016).

Chapitre I : Partie bibliographique

C'est un milieu multiphasique : une phase aqueuse contenant essentiellement le lactose, les minéraux ; une phase dispersée de nature lipidique (globules gras) et une phase de nature protéique (micelles de caséines) (Mekhaneg, 2020).

Selon Favier (1985), le lait est une source importante de protéines de haute qualité, est riche en acides aminés essentiels, en particulier la lysine, qui est le meilleur acide aminé pour la croissance. Par rapport aux autres graisses alimentaires, ses lipides se caractérisent par une forte proportion d'acides gras à chaîne courte, avec des niveaux d'acides gras saturés beaucoup plus élevés que les acides gras insaturés. Ils véhiculent par ailleurs des quantités appréciables de cholestérol et de vitamine A ainsi que de faibles quantités de vitamine D et E (Lazar, 2014).

Les principaux constituants du lait par ordre croissant selon Pougheon et Coursaud (2001) :

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

Selon Fredot (2006), Le lait est composé de quatre phases distinctes, Ce sont:

- Une phase d'émulsion grasse, constituée de globules gras et de vitamines liposolubles (A et D).
- Une phase colloïdale, qui est une suspension de caséines sous forme de micelle.
- Une phase aqueuse, qui contient la plupart des composants solubles du lait, tels que les protéines, le lactose, les vitamines B et C et les sels minéraux.
- La phase gazeuse du lait est celle où le CO₂, l'azote et l'O₂ existent à environ 5% du volume de lait.

La composition du lait varie en fonction du régime alimentaire et de la période de lactation de l'animal, ainsi que de la race et de l'espèce animale. On ne peut donc parler que de compositions moyennes de lait (Pellerin, 2001; Hadadji, 2006).

Chapitre I : Partie bibliographique

Tableau I. Composition globale du lait en g/100ml (Vignola,2002).

Constituants majeurs	Variation limites (%)	Valeurs moyennes(%)
Eau	85.5 / 89.5	87.6
Matières grasses	2.4 / 5.5	3.7
Protéines	2.9 / 5.0	3.2
Glucides	3.6 / 5.5	4.6
Minéraux	0.7 / 0.9	0.8
Constituants mineurs	Vitamines, enzymes	Cellules diverses, gaz

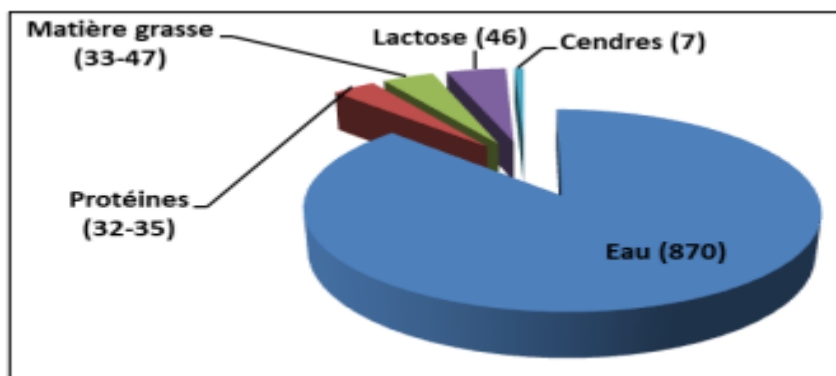


Figure 1. Composition globale du lait en g/l de lait (d'après Cayot & Lorient,1998).

Chapitre I : Partie bibliographique

1.3. propriétés du lait

1.3.1. propriétés organoleptiques

La qualité organoleptique (couleur, odeur et texture) d'un produit se dégrade avec le temps. La durée de stockage, la température et leurs effets combinés affectent de manière significative les attributs sensoriels totaux (Reynolds, 2006). Un lait ayant de bonnes qualités organoleptiques présente des caractéristiques particulières qui concernent la couleur, odeur, saveur, et de viscosité, etc. (Conte, 2008).

Couleur : fraîchement extrait de la mamelle, le lait est un liquide blanc-jaunâtre ou blanc-mat, opaque à cause des micelles de caséine. Il peut être bleuté ou franchement jaunâtre quand il est riche en lactoflavine (Bordjba et *al.*,2020).

- **Odeur** : Elle est faible en général et est variable en fonction de l'alimentation de la femelle productrice (Bordjba et *al.*,2020).
- **Saveur** : Elle est douçâtre, légèrement sucrée en raison de la richesse du lait en lactose dont le pouvoir sucrant est inférieur à celui du saccharose. (Bordjba et *al.*,2020).
- **Viscosité ou consistance** : Le lait est de viscosité variable en fonction de l'espèce animale. Ainsi le lait des monogastriques (jument, ânesse) est plus visqueux que celui des poly gastriques (vache, bufflesse, brebis, chèvre). Dans la même espèce, le lait est d'autant plus visqueux qu'il contient plus de colostrum dont la présence en son sein le rend impropre à la consommation (Bordjba et *al.*,2020).

Tableau II. Caractères organoleptiques du lait (Joffin,2010).

Caractère Examiné	Cas normal	Cas anormal
Couleur	-Blanc mat : lait normal -Blanc jaunâtre : lait riche en crème -Blanc bleuâtre : lait écrémé ou	-Gris jaunâtre : lait de rétention, lait de mammite - Bleu, jaune : lait coloré par des substances chimiques (bleu de

Chapitre I : Partie bibliographique

	fortement mouillé (anormale)	méthylène, dichromate....) ou des pigments microbiens - Blanc bleuâtre : lait écrémé (normale) ou fortement mouillé
Odeur	Odeur faible	Odeur de putréfaction
Saveur	Saveur caractéristiques et agréable (variation selon le degré de chauffage du lait)	saveur salée : lait de rétention ou lait de mammite - Gout amer : lait très pollué par des bactéries
Consistance	Aspect homogène	- Aspect grumeleux : lait de mammite - Aspect visqueux ou coagulé : lait très pollué par des bactéries

1.3.2. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physicochimiques du lait et de ses dérivés sont déterminantes dans l'optimisation des procédés développés pour leur transformation et leur stabilisation. Les principales propriétés physicochimiques du lait sont indiquées dans le tableau suivant :

Chapitre I : Partie bibliographique

Tableau III. Les caractéristiques physico-chimiques du lait (Bourgeois et *al.*, 1990),(Billon,2009).

Paramètres	Valeurs
Densité	1.030 – 1.033
PH	6.6 – 6.8
Acidité (exprimées en degrés Dornic °)	16 à 18 °C
Point de congélation	-0.53
Point d'ébullition	+100.55
Extrait sec total	12.7
Taux de matière grasse	3.9
Teneur en matière azotée totale	3.4
Teneur en caséines	2.8
Teneur en albumines et globulines	0.5
Teneur en lactose	4.9
Teneur en cendres	0.90
Vitamines, enzymes et gaz dissous	Traces

Chapitre I : Partie bibliographique

1.3.3. Propriétés microbiologiques

La composition du lait est l'aliment de choix. Il contient des matières grasses, du lactose, des protéines, des sels minéraux et 87% d'eau, qui a un pH de 6,7 et sera un substrat très favorable au développement microbien (Bouhoun et Mansouri, 2020).

Le lait contient peu de microorganismes (moins de 103 germes/ml) lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (Quq,2007). Il s'agit essentiellement des microcoques mais aussi des *Streptocoques lactiques* (*Lactococcus* et *Lactobacilles*) qui sont des germes saprophytes du pis et des canaux galactophores. Le lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées "Lacténines" mais leur action est de très courte durée (une (01) heure environ) (Djidoul, 2019). D'autres micro-organismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade. Ils sont généralement dangereux au point de vue sanitaire (kara et al.,2020).

1.4. Les microflores du lait

On répartit les microorganismes du lait selon leur importance en quarts classes.

1.4.1. Flore indigène ou originelle

Le lait contient peu de micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 103 germes/ml) (Benhedane,2012).

D'après Lamontagne et al (2002), la flore indigène est l'ensemble des micro-organismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, elle doit être inférieure à 5000 UFC/ml (Vignola, 2002).

Les genres dominants de la flore indigène sont principalement des micro-organismes mésophiles (Vignola, 2002).

Tableau IV. La flore indigène di lait cru (vignola,2002)

Microorganismes	Pourcentage %
<i>Micrococcussp</i>	30 – 90
<i>Lactobacillus</i>	10 – 30

Chapitre I : Partie bibliographique

<i>Streptococcus ou lactococcus</i>	< 10
<i>Gram négatif</i>	< 10

1.4.2. La flore de contamination

La flore de contamination est l'ensemble des micro-organismes dans le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle se compose d'une flore d'altération qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène capable de provoquer des maladies chez les consommateurs (Lamontagne, 2002).

Ces contaminations par divers micro-organismes peuvent provenir de l'environnement : Entérobactéries, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, microcoques, *Corynébactéries*, *Bacillus*, etc..., par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière (Benhedane, 2012).

1.4.3. La flore d'altération

Elles sont des espèces bactériennes du lait cru capables de dégrader le lactose, les protéines ou les lipides de cette matière première, elle causera des défauts sensoriels du goût, d'arôme, d'apparence ou de texture et réduira la vie de tablette du produit laitier (Boudali, 2020).

Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont les coliformes et certaines levures et moisissures (Boudali, 2020).

1.4.4. La flore pathogène

La présence de micro-organismes pathogènes dans le lait peut avoir trois (03) sources : l'animal, l'environnement et l'homme (Bouricha, 2018).

Parmi les bactéries pathogènes associées aux produits laitiers sont :

Salmonella, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigellasonei* (Bouricha, 2018).

1.5. Les différents types de lait

L'évolution des processus technologiques, des techniques de conservation et de distribution a permis l'élaboration d'une large gamme de «laits de consommation» qui se distinguent par leur

Chapitre I : Partie bibliographique

composition, leur qualité nutritionnelle, organoleptique et leur durée de conservation. (Nezechaib, 2019).

Ils peuvent être classés en deux catégories :

- lait cru non traités thermiquement.
- lait traité thermiquement (Boulefreketal., 2020).

- **Lait cru**

C'est un lait qui n'a pas subi de traitement thermique puisqu'il « sort » du pis de la vache à 38°C (kara et *al.*,2020).

Lait cru collecté à la ferme par traite mécanique ou manuelle, ou directement expédier aux centres de collecte pour réfrigération ou stockage dans des réservoirs. Dans le cas des grandes exploitations, réfrigérées avant transport, dans ces conditions, La flore microbienne est stable (Dila, 2012). Le lait doit provenir d'animaux sains, soumis à des contrôles vétérinaires (traite, conditionnement, conservation) Réalisés dans des conditions d'hygiènes satisfaisantes (Dila, 2012).

- **Lait traité thermiquement**

Le lait industriel (traité) peut comporter une composition altérée (lait écrémé, etc.) et un traitement thermique visant à éliminer les éventuels germes pathogènes et augmenté la durée de conservation (Kara et *al.*,2020).

- a) **Lait pasteurisé**

La pasteurisation consiste à porter le lait à une température suffisante et pendant un délai pour détruire les bactéries pathogènes (Veisseyre, 1979).

La pasteurisation a pour objectif la destruction de toutes les formes végétatives des micro-organismes pathogènes du lait sans altérer la qualité chimique, physique et organoleptique de ce dernier.(Boulefreket *al.*,2020).

On distingue deux types de traitement :

- **Pasteurisation basse** : Le lait est chauffé pendant 30 min a 63°C. Ce type de pasteurisation est très couteux

Chapitre I : Partie bibliographique

- **Pasteurisation haute** : Ou HTST (high temperature short time) elle est réservée au lait de bonne qualité hygiénique (Jeantet, 2008).

b) Lait stérilisé

Selon le processus de stérilisation on distingue le lait stérilisé et le lait U.H.T définis en 1979. Ces laits doivent rester stable jusqu'à la date de péremption. (Boulefrek et *al.*, 2020).

Le lait stérilisé est obtenu après 20 minutes de chauffage en packs à 120°C imperméable (Guiraud, 1998). Conditionné dans un contenant étanche et hermétique aux micro-organismes liquides et pathogènes (Leseur & Melik, 1990), qui peuvent être très stockés à température ambiante pendant de longues périodes (Guiraud, 2003).

- **Lait UHT (Ultra Haute Température)**

Le lait UHT est un lait de longue conservation stérilisé par upérisation à haute température. Le lait UHT a un bon goût, se conserve plusieurs mois à une température ambiante (Feraoun, 2020).

c) Lait concentré

Le lait peut y être stabilisé en abaissant l'activité de l'eau. Il est obtenu par élimination partielle de l'eau et l'addition au sucre (Mahaut et al, 2005).

- **Lait concentré non sucré**

Il est obtenu par une pasteurisation à température élevée suivie d'une concentration ; celle-ci se fait par ébullition sous vide partiel dans des évaporateurs. Il est ensuite homogénéisé, refroidi, distribué en boîtes puis stérilisé par autoclavage à 115 °C pendant 20 minutes. Sa conservation est de très longue durée (Anonyme, 2014).

- **Lait concentré sucré**

Il est élaboré par une pasteurisation à température élevée suivie de l'addition d'un sirop de sucre stérile à 70 % de saccharose. Le sucre inhibe la multiplication des micro-organismes, ce qui

Chapitre I : Partie bibliographique

autorise un traitement thermique moins important. Après concentration à 50 % environ, le lait est refroidi et réparti en boîtes ou en tubes stériles. Sa conservation est de longue durée (Idrissi, 2011).

d) Lait sec

Le lait sec destiné à la consommation humaine contient :

- Moins de 250 000 bactéries aérobies mésophiles par gramme.
- Moins de cinq(05) coliformes par gramme (Ferraoun, 2020).

e) Poudre du lait

Selon la Loi sur les aliments et drogues du Canada, le lait en poudre est un produit fabriqué en éliminant partiellement l'eau du lait (Kessas, 2020).

On répartit les poudres de lait en trois catégories :

La poudre de lait entière

La poudre de lait partiellement écrémée

La poudre de lait écrémée (Kessas, 2020).

f) Lait fermenté

La dénomination du lait fermenté est réservée au produit laitier préparé avec des laits écrémés ou non, ou des laits concentrés ,ou en poudre écrémés ou non , sous forme liquide, concentré ou en poudre, ils pourront être enrichis avec des constituants tels que la poudre de lait ou les protéines de lait, le lait subit alors un traitement thermique au moins équivalent à la pasteurisation et estensemencé avec des micro-organismes caractéristiques de chaque produit, la coagulation des laits fermentés ne doit pas être obtenue par d'autres moyens que ceux qui résultent de l'activité des micro-organismes qui sont pour la plupart du probiotique c'est-à-dire bénéfique pour la santé (Fredot, 2006).

Chapitre I : Partie bibliographique

2. Les bactéries lactiques

2.1. Historique des bactéries lactiques

La fermentation était utilisée par l'homme dans l'Antiquité par acidification spontanée des jus des légumes, du vin et de la bière, ou par contamination naturelle du lait qui a conduit aux premiers produits fermentés. La preuve de l'existence des produits laitiers fermentés est apparue vers 8000 avant JC dans le Croissant Fertile au Moyen-Orient, et la production de levure et la fermentation des plantes sont apparues entre 4000 et 2000 avant JC chez les égyptiens (Boudersa et al,2017).

2.2. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes. (Labioui *et al.*,2005).

Ce sont des cellules vivantes, autonomes et procaryotes dont le trait commun est leur aptitude à produire de l'acide lactique suite à la fermentation des glucides. (Dahou,2017).

Elles tirent leur énergie uniquement par la phosphorylation des substances et elles produisent leur énergie par la métabolisation du sucre. (Dahou, 2017)

Ce sont des cocci ou des bâtonnets à Gram positif, sporulant, aéro-anaérobie facultative on micro-aérophiles ;généralement immobiles, acido-tolérantes capable de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C(Salimane,2003).

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, elles sont présentes dans des différentes niches écologiques comme le lait, les produits laitiers, les végétaux, la viande, les muqueuses humaines et animales. Elle se trouve partout dans la nature (Tahlaiti,2019).

La production d'acide lactique par les bactéries lactiques conduisant à un abaissement important du pH du milieu est largement utilisée en industrie agro-alimentaire. Les bactéries lactiques tolérantes en effet que pH acide (pH=5).

De nos jours, Les bactéries lactiques représentent le deuxième plus grand marché de production de biomasse après les levures. Principalement utilisées lors d'applications dans l'industrie alimentaire, comme la fabrication des fromages, des laits fermentés, de certains légumes et produits carnés fermentés et de certains vins, elles interviennent aussi dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique et de bio polymères et acquièrent, depuis quelques années. Jouent un rôle de croissant en santé animale et humaine (Brahimi,2015).

Chapitre I : Partie bibliographique

2.3. Origine

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, et on les trouve dans différentes niches écologiques. Les espèces des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, ou *Leuconostoc* se rencontrent plutôt chez les hommes, les animaux, et les oiseaux. On peut les isoler de la peau des animaux, des matières fécales, mais aussi de l'ensilage, du foin ou des grains. Dans le domaine laitier, elles existent sur les ustensiles en quantité considérable. Certaines espèces des groupes sérologiques A et B peuvent être pathogènes, mais les autres sont plutôt saprophytes (Abdalli et al., 2017). Les espèces du genre *Lactobacillus* sont répandues dans la nature. On les trouve dans les végétaux où elles assureront l'acidification de l'ensilage. On les trouve aussi dans l'intestin des animaux et de l'homme, car *Lactobacillus acidophilus* résiste aux sels biliaries. On les isole également des cavités naturelles de l'organisme. *Lactobacillus acidophilus* entre dans la flore normale du vagin, où sa présence empêche l'invasion par *Candida albicans*. Les espèces du genre *Pediococcus* se rencontrent surtout sur les plantes (Abdalli et al., 2017).

2.4. Taxonomie et classification des bactéries lactiques

Décrites pour la première fois par Orla-Jansen au début de XXe siècle (1919), les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique (Lahtinen et al., 2012).

La taxonomie de bactéries lactiques a été basée sur la coloration de Gram et il est possible de classer suivant la nature du produit de métabolisme bactérien obtenue à partir du glucide ($G+C < 50 \text{ mol\%}$). Traditionnellement, le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu $G+C > 50 \text{ mol\%}$ et affecté au phylum des *actinomyces* néanmoins, les bifidobactéries sont également considérées comme des bactéries lactiques, en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables, (elles produisent de l'acide lactique et sont utilisées dans les laits fermentés) et du fait qu'elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques tel que le tractus gastro-intestinal (Bekaddouri et al., 2020).

La première classification de bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jansen sur divers critères morphologiques et physiologiques (Bekaddouri et al., 2020).

Chapitre I : Partie bibliographique

Tableau V. Classification des grands groupes bactéries lactique (Stiles et Holzapfel 1997).

Famille	Formes	Catalase	Nitrate réductase	Fermentation	Genre bactérien
<i>Betabacterium</i>	Bacille	-	-	Hétérofermentaire	<i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i>
<i>Thermobacterium</i>	Bacille	-	-	Homofermentaire	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	Bacille	-	-	Homofermentaire	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i>
<i>Betacoccus</i>	Coque	-	-	Hétérofermentaire	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
<i>Tetracoccus</i>	Coque	+	+	Homofermentaire	<i>Pedococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>
<i>Bifidobacteria</i>	Polymorphe	-	-	Homofermentaire	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	Coque	-	-	Homofermentaire	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>

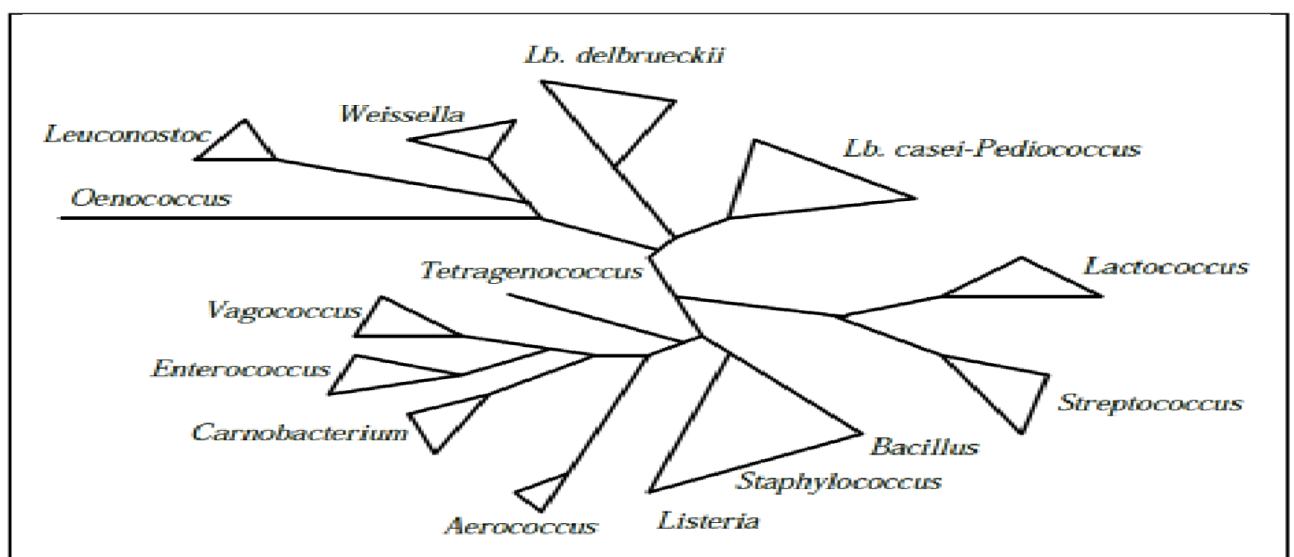


Figure 2. Schéma montrant l'Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques (Lahtinen et al., 2012).

Chapitre I : Partie bibliographique

2.5. Voies métaboliques des bactéries lactiques

- Pour se développer elles ont besoin de source de carbone organique (glucide, fermentescibles) nombreuses bactéries lactiques en des exigences nutritionnelles. (Bouziane et *al.*,2021).
- Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de micro-organismes produisant l'acide lactique comme produit principal du métabolisme issu de la fermentation des sucres selon le type de fermentation préférentiellement utilisée :

Homofermentaires : L'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose.

Hétérofermentaires facultatif : La fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique ou de l'acide lactique et de l'acide acétique.

Hétérofermentaires strict: Elles produisent, en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂(Morsli, 2016).

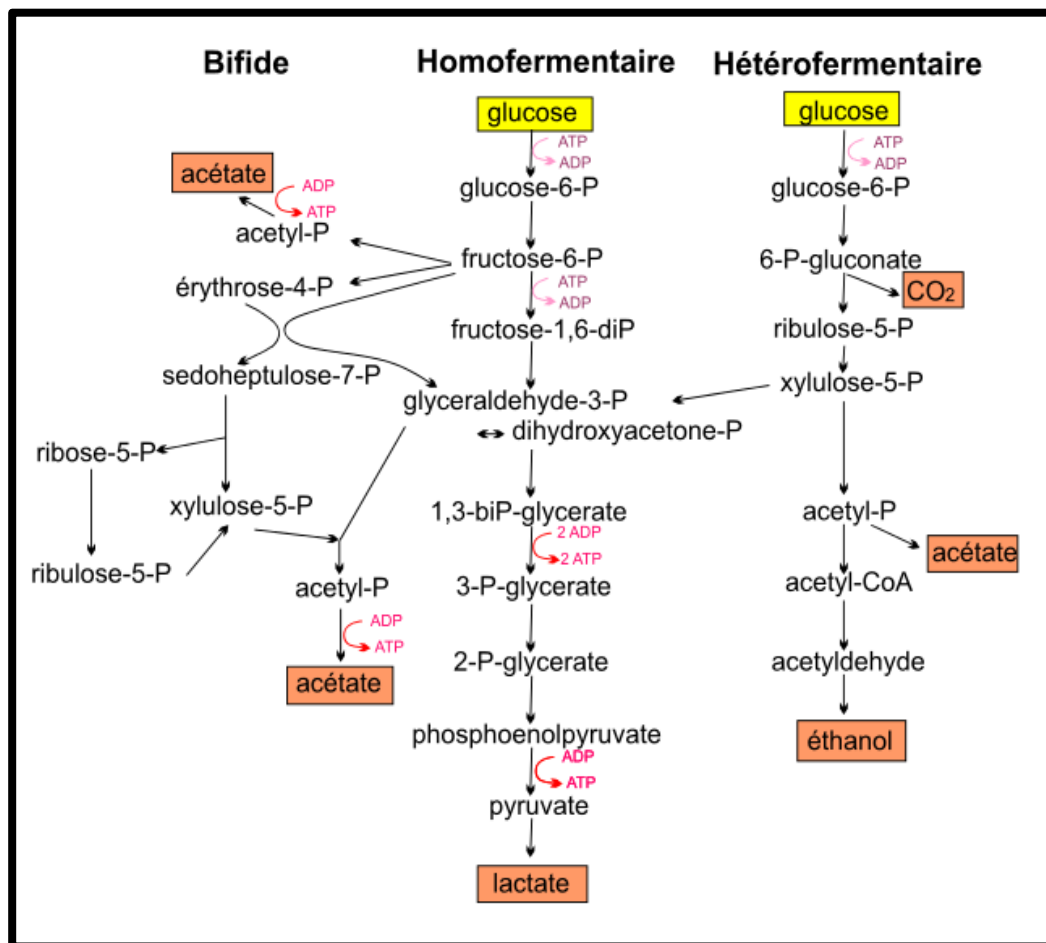


Figure 3 : Différents types de fermentation (Axelsson, 2004).

Chapitre I : Partie bibliographique

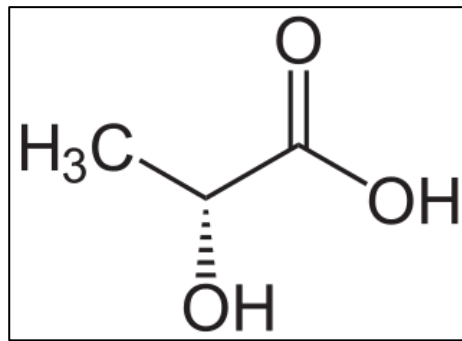


Figure4. Acide lactique

2.6. Les différents genres de bactéries lactiques

2.6.1. *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Les lactobacilles représentent un genre important des bactéries lactiques tant au niveau industriel qu'au niveau de la flore commensale infantile.

L'hétérogénéité des espèces est illustrée par le contenu en G + C qui peut varier de 32 à 53 % (Schleifer et Stackebrandt, 1983 ; Pilet M-F. et *al.*, 2005).

La classification remaniée par Kandler et Weiss (1986) les subdivise en trois(03) groupes selon leur type fermentaire :

- **Groupe I** : Anciennement appelé *Thermobacterium*. Il regroupe les lactobacilles homofermentaires stricts et thermophiles, ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ces bactéries fermentent les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof, en produisant exclusivement de l'acide lactique, elles se développent à 45°C mais pas à 15°C. Leurs cellules sont longues, droites souvent en palissades (Tahlaiti, 2019).
- **Groupe II** : Anciennement appelé *Streptobacterium*. Rassemble les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et mésophiles qui se développent à 15°C. Les hexoses sont fermentés par la voie d'Embden-Meyerhof, en produisant exclusivement de l'acide lactique (mais pour certaines souches : du lactate, de l'acétate, de l'éthanol et du formiate), celle des pentoses et du gluconate peuvent être dégradés par la voie hétérofermentaire avec une production d'acide lactique et d'acide acétique par une phosphokétolase inductible. Leurs cellules sont courtes, souvent arrangées en filaments (Tahlaiti, 2019).

Chapitre I : Partie bibliographique

- **Groupe III** : Anciennement appelé *Betabacterium*. Ces espèces ont un métabolisme strictement hétérofermentaire. la fermentation des hexoses produit de l'acide lactique, de l'acide acétique (ou de l'éthanol) et du CO₂, celle des pentoses, de l'acide lactique et de l'acide acétique. Ces bactéries possèdent une phosphokétolase (tableau 6). C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles. Les cellules sont courtes, droites et séparées (Tahlaiti, 2019).

Tableau VI. Critères différentiels des trois groupes de lactobacilles (Sharpe , 1981 , Kandler et Weiss , 1986).

Caractéristique	Groupe 1 Homofermentaire obligation	Groupe 2 Hétérofermentaire facultatif	Groupe 3 Hétérofermentaire obligation
Fermentation des pentoses	-	+	-
CO ₂ à partir du glucose	-	-	+
CO ₂ à partir du gluconate	-	+	+
FDP aldose	+	+	-
Phosphokétolase	-	+	+
	<i>Lb.acidophilus</i> <i>Lb.delbruckii</i> <i>Lb.helveticus</i> <i>Lb.savarius</i>	<i>Lb.casei</i> <i>Lb.curvatus</i> <i>Lb.plantarum</i> <i>Lb.sakei</i>	<i>Lb.brevis</i> <i>Lb.buchneri</i> <i>Lb.fermentum</i> <i>Lb.reuteri</i>

Les Lactobacilles, de par leur variété, sont présents dans des milieux très différents (Novel G.,1993): cavité buccale, tractus digestif, organes génitaux chez l'homme, produits végétaux, lait et produits laitiers (différents type de fromages), produits carnés, poissons marinés ou fumés.

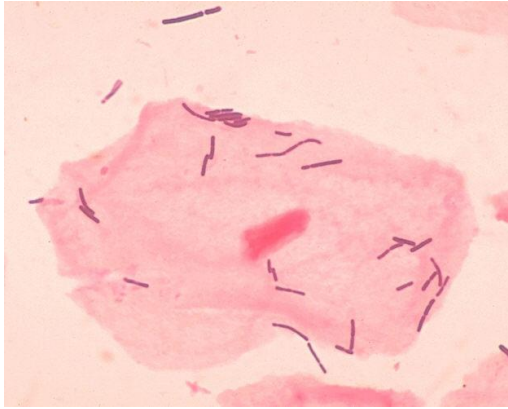


Figure 5 : *Lactobacillus acidophilus* et cellule épithéliale (Beijerinck, 1901).

2.6.2. *Carnobacterium*

Ce genre a été créé par Collins et al. (1987). sont des bacilles hétérofermentaires souvent trouvés dans les viandes de bœuf, de poisson et de volaille emballées sous vide et stockées à basse température (Novel G., 1993 ; Joffraud *et al.*, 2006). Ils sont originellement décrits comme le genre *Lactobacillus* mobile, *Lb. gallinarum*, *Lb. divergens*, *Lb. piscicola* (Novel G., 1993). Une étude taxonomique de ces différentes souches a permis de les regrouper après hybridations ADN-ADN, dans un nouveau genre, *Carnobacterium*. Morphologiquement proche des *lactobacillus* (petits bâtonnets isolés, par paires ou encourtes chaines), ils s'en différencient par leur production de l'acide lactique L(+) et leur incapacité à se développer dans les substrats à base d'acétate. En général, les *carnobacterium* peuvent croître à un PH relativement élevé (par exemple, pH=9) tandis que les lactobacilles ne peuvent pas s'y développer (Schillinger et Lücke, 1987). La croissance est possible à 0°C et 10°C mais pas à 45°C, ni en présence de NaCl 8% (Larpent J-P., 1996). Leur contenu G+C est compris entre 33 et 37% (Dellaglio *et al.*, 1994).

Ce genre comprend quatre (04) espèces fréquemment associées aux aliments *C. divergens*, *C. piscicola*, *C. mobile* et *C. galliarum*. Ils sont isolés de produits carnés, ou de produits de la mer, saumon fumé mais certains ont également été isolés de fromages.

2.6.3. *Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus et Vagococcus*

Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Vagococcus* étaient précédemment inclus dans un seul genre *Streptococcus* (Axelsson, 2004). Ce sont des coques en paire ou en chaîne, leur fermentation est homolactique, produisant en majorité de l'acide L-lactique. Ces

Chapitre I : Partie bibliographique

espèces diffèrent principalement entre elles par la présence d'un antigène de groupe dit antigène de Lance Field.

- Le genre *Streptococcus* comprend la majorité des espèces de *Streptocoques*. Ces organismes ont un contenu en G+C de 35 à 46% (Pilet M-F. et *al.*, 2005). Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène, oral et les autres streptocoques. Le groupe pyogène contient essentiellement des espèces pathogènes, hémolytiques (hémolyse β) comme *Streptococcus pyogenes* ; d'autres *Streptocoques* oraux (α - ou non-hémolytiques) sont associés principalement à la cavité orale de l'homme et de l'animal (*Streptococcus mutans*). L'espèce thermophile qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*. Ce dernier a été inclus dans le groupe des « autres streptocoques » par Scheilfer et Kilpper-Bälz (1987). Du fait par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène seul cette espèce est considérée comme appartenant aux bactéries lactiques.
- Le genre *Lactococcus* appartient au groupe N de Lancefield, représente les streptocoques dits « lactiques ». Récemment Schleifer et *al.* (1985), se fondant sur des critères moléculaires, ont proposé de séparer les *streptocoques* lactiques mésophiles du genre *Streptococcus* et de créer le genre *Lactococcus* (Novel G., 1993). Les lactocoques sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène, mais seuls les *Lactococcus lactis* sont actuellement utilisés dans la technologie laitière. Trois sous-espèces de *L. lactis* peuvent être distinguées : *L. lactis* sp. *lactis*, *L. lactis* sp. *cremoris* et *L. lactis* sp. *hordniae*. Seules les deux premières interviennent dans la plupart des produits laitiers.
- Le genre *Enterococcus* rassemble la plupart des espèces du groupe D de Lancefield (streptocoques fécaux), présentent une hémolyse de type λ , β , et qui se caractérisent par leur développement à 10 et 45°C, leur aptitude à croître en présence de 6,5 % NaCl, et leur grande résistance aux facteurs de l'environnement. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* (auparavant *Streptococcus faecalis*), et ses variétés (*En. durans* et *En. bovis*). Leur habitat est très varié : intestin de l'homme et des animaux, produit végétal, sol, produits laitiers (Giraffa et *al.*, 1997). Les entérocoques jouaient un rôle important dans la maturation des fromages.

Chapitre I : Partie bibliographique

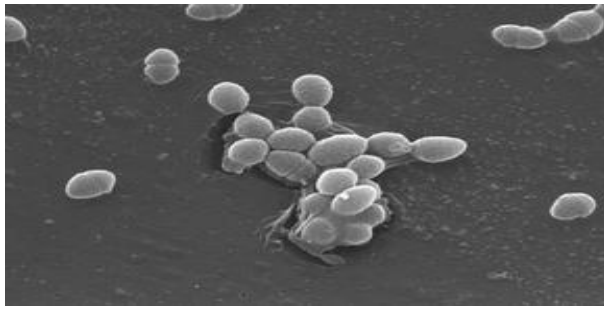


Figure6 : *Enterococcus faecalis* (Andrewes&Horder, 1906).

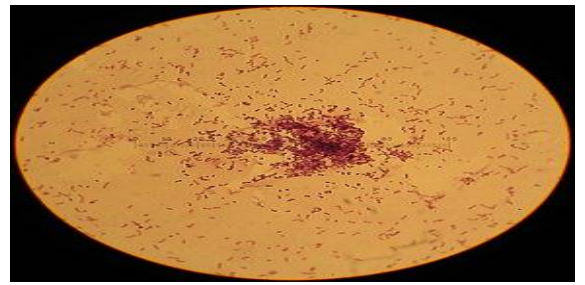


Figure 7 : *Lactococcus lactis*

(Schleifer *et al.*, 1986).



Figure8 : *Streptococcus pyogenes* (Rosenbach, 1884).

Les espèces du nouveau genre *Vagococcus* sont facilement confondues avec les lactocoques au niveau morphologique, mais ces deux genres sont clairement distincts par leur composition en acides gras (Ho, 2008).

2.6.4. *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production de l'acide D(-) lactique.

- Le genre *Leuconostoc* a été défini par Van Thieghem en 1878. Ce genre a auparavant inclus des cocci bacilles hétérofermentaires, produisant uniquement de l'acide lactique, et ne produisant pas d'ammoniaque à partir de l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 30°C, et leurs contenu G+C sont assez voisins (37 à 45%) (Garvie, 1986). Leur croissance est toujours lente. Ils ne sont pas hémolytiques ni pathogènes. ces espèces sont caractérisées par la production à partir du citrate du lait de di acétyle et parfois par la synthèse de d'extrêmes et de lévanes extracellulaires en présence de saccharose (Novel G., 1993). Les études phylogénétiques des *Leuconostoc* montrent une diversité dans ce genre (Eom *et al.*, 2007).

Chapitre I : Partie bibliographique

En général les *leuconostocs* sont utiles dans différents types de fromages (Devoyod et Poullain, 1988 ; Ogier et *al.*, 2008) où ils facilitent l' «ouverture » par la production de CO₂. Ils interviennent aussi dans l'industrie laitière (beurre et crème) principalement les *Ln. Mesenteroidesssp. cremoris*, ensilage et les végétaux fermentés (olives, choucroute, etc) (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

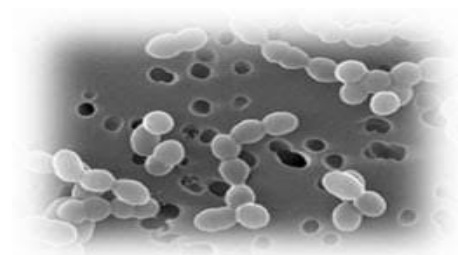


Figure9 :*Leuconostoc*vu au microscope électronique.

L'espèce *Leoconostocoenos* isolé du vins a été renommée *Oenococcusoeni* et certains lactobacilles hétérofermentaires ont été groupés avec *Leoconostocparamesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzapfel, 1997).

Tableau VII. Liste des espèces du genre *leuconostoc*(Zang et Cai, 2014).

Espèce	Année	Origine
<i>Leuc. Fallax</i>	1992	Choucroute
<i>Leuc. Carnosum</i>	1989	Viande stockée à froid
<i>Leuc. gelidum</i>	1989	Viande stockée à froid
<i>Leuc. Mesenteroides ssp.cremoris</i>	1929	Inconnu
àç		
<i>Leuc. Citreum</i>	1989	Source humaine
<i>Leuc. Lactis</i>	1960	Inconnu
<i>Leuc. Kimchii</i>	2000	Kimchi
<i>Leuc. Gasicomitatum</i>	2001	Inconnu
<i>Leuc. Holzapfelii</i>	2007	Café fermenté

Chapitre I : Partie bibliographique

2.6.5. *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Ce sont des coques formées de cellules groupées en paires ou en tétrades. Ils sont mésophiles, homo-fermentaires, et le plus souvent incapable d'utiliser le lactose.

Sept espèces de *Pediococcus* sont connues : *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus damnosus*, *P. dextrinicum*, *P. inopinatus*, *P. parvutus*, *P. pentosaceus* et *P. urinaeequi*. Ils fermentent les sucres en produisant de l'acide lactique DL ou L(+) et sont aussi caractérisés par le GC% de leur ADN (34-42%). Ces dernières sont importantes dans l'agroalimentaire tant sous l'aspect négatif que positif. Ce sont des agents de dégradation en brasserie (*P. damnosus*). Les *P. acidilactici* et *P. pentosaceus* ont démontré leur utilité dans l'élaboration de plusieurs produits carnés fermentés naturels. Ils sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les *Charcuteries*. Les *Pédiocoques* sont également des bactéries lactiques autochtones qui permettent la maturation des fromages (Gonzalez et al., 2007 ; Gurira et al., 2005).

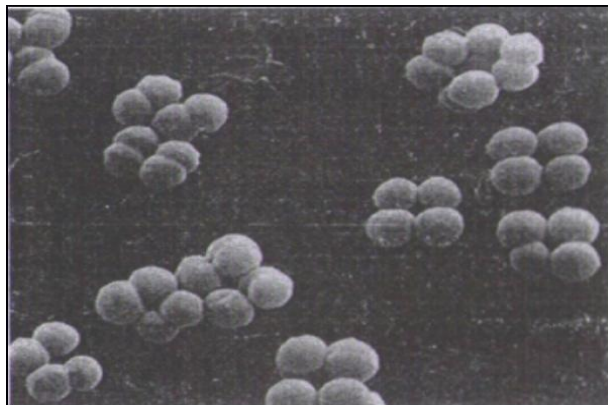


Figure 10 : Morphologie en microscopie électronique de *Pediococcus sp* photo sylviane lemarinier université de Caen (Benkarouba, 2017).

L'espèce *Pediococcus halophilus* a été renommée *Tetragenococcus halophilus*. Seulement deux espèces de *Tetragenococcus* sont connues : *T. halophilus* et *T. muriaticus*. Ces bactéries résistent à des concentrations élevées en sel (supérieures à 18 % NaCl). Ils ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires comme les saumures (anchois salés), les sauces de soja, etc. Le genre *Aerococcus* qui contient cinq (05) espèces est généralement moins intéressant dans l'agroalimentaire (Axelsson, 2004).

Chapitre I : Partie bibliographique

2.6.6. *Bifidobacterium*

Les *Bifidobacterium* (l'ancien nom étant *Lactobacillus bifidus*), la forme des cellules de *Bifidobacterium* est très irrégulière, pouvant être : cellules courtes, conoïdales, cellules ramifiées, spatulées, isolées ou en chaîne, disposées en V ou en palissade (Larpent 1996a ; Pilet. et *al.*, 2005).

Elles se différencient des autres bactéries lactiques par leur caractère anaérobie, leur contenu G+C (55-67%) et la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphocétolase. En fait *Bifidobacterium* permet de fermenter les hexoses en produisant plus d'acide acétique que d'acide lactique (rapport 3:2), de faibles quantités d'éthanol et d'autres acides organiques. Cette fermentation « lactique » a conduit à les rapprocher du groupe des bactéries lactiques (Pilet et al., 2005). Leur température de croissance est comprise entre 37°C et 41°C.

Ils sont isolés à partir de la flore intestinale du nouveau-né, on les retrouve aussi dans l'intestin de l'homme et de nombreuses espèces animales. Ils sont utilisés dans la fabrication du yaourt et produits laitiers fermentés (probiotiques). Leur présence entraînerait une protection contre les agents infectieux au niveau intestinal grâce à la présence d'un facteur bifidogène (Sondergaard, 2005).

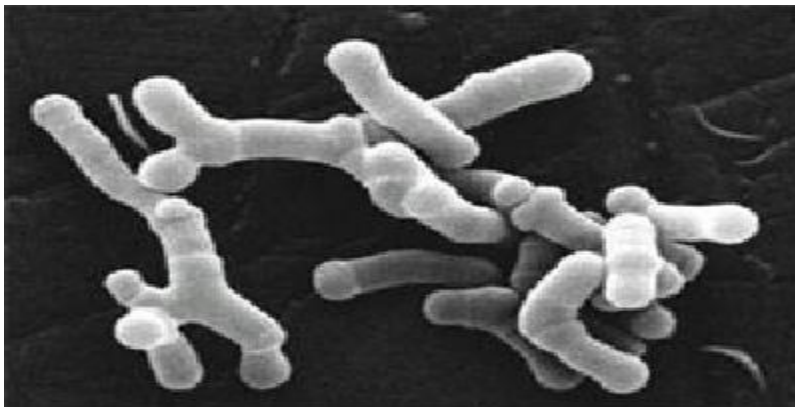


Figure11 : *Bifidobacterium longum* au microscope électronique

2.7. Méthode d'identification des bactéries lactiques

L'identification des bactéries lactiques compte plusieurs méthodes.

Chapitre I : Partie bibliographique

2.7.1. Méthode classique

Les caractéristiques phénotypiques constituent la base de différenciation et d'identification des bactéries lactiques. Différents tests clefs sont largement adoptés. La morphologie ainsi que les méthodes physiologiques, métaboliques/biochimiques et chimio taxonomiques sont les plus utilisées (Belarbi,2011).

Elle repose sur plusieurs tests majeurs dont la biochimie comprend la production de gaz carbonique dans le milieu glucose, le profil de fermentation de nombreux sucres, l'hydrolyse de l'arginine et de l'esculine, le dosage de l'isomère optique de l'acide lactique. La méthode classique comprend des tests biochimiques caractéristiques des bactéries nécessaires principalement à la détection de l'acide meso-diaminopimelique (mDAP) dans le peptidoglycane (Belarbi,2011).

2.7.2. Identification moléculaire

Les méthodes modernes d'identification des bactéries lactique font appel à l'étude des constituants des cellules.

Le séquençage de l'ARN 16S reste une des méthodes les plus appliquées pour obtenir une identification précise en complément des méthodes classiques. Cependant plusieurs méthodes d'identification par PCR, plus abordables en routine se sont développées pour l'identification des bactéries lactiques (Belarbi,2011).

Pour la différenciation intra spécifique, les différentes méthodes moléculaires, comme composition en base de l'ADN G+C%, l'hybridation ADN/ADN et ADN/ARN, l'analyse des fragments de restriction de l'ADN par l'électrophorèse en champ pulsé (R-ECP), les profils protéiques par SDS-PAGE, sont généralement couplées et permettent l'analyse de la biodiversité des isolats dans un écosystème donné (Belarbi,2011).

Chapitre I : Partie bibliographique

Tableau VIII. Avantage et inconvénients de quelques méthode d'identification bactérienne en microbiologie (Singhal et *al* , 2015).

Méthodes	Avantage	Désavantage
Tests biochimique classique	-Sensibles aux bactéries -Peu couteuses	-Lentes et consomment beaucoup de temps
Méthode a base moléculaire	- Une non exigence de culture de l'échantillon -Sont spécifiques,sensibles , rapides , précises . -Peu contamination	-Nécessité d'un cycle thermique -Un personnel formé
Séquençage	-Disponibilité des standards 16S -identification précise	-Personnel formé exigé sachant comment interpréter les résultats -Très couteux
MALDI-TOF MS	-Rapide -Précise -Peu couteux	-Equipement très cher

2.7.3. Intérêt des bactéries lactiques

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

2.7.3.1. Dans l'industrie alimentaire

- **Rôle sur la structure et la texture**

Ce sont des laits fermentés et l'acidification se traduit par la formation de caillé + ou – .

Selon des bactéries lactiques sont présentes, Selon le produit, la fermeté souhaitée (yaourt ferme) ou crème (yogourt brassé; kéfir).pour obtenir une consistance définie.

L'utilisation de souches plus ou moins acidifiées peut être combinée avec l'utilisation de souches productrices de polysaccharides (Belaidouni, 2017).

Chapitre I : Partie bibliographique

- **Rôle dans la conservation**

- ✓ Production d'acide lactique : nt un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques.
- ✓ Production de bactériocine : Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand de nombreuses souches de bactéries lactiques, elles sont généralement thermorésistantes (Belaidouni, 2017).

- **Effets sur les propriétés sensorielles**

En produisant des produits autres que l'acide lactique, tels que le diacétyl et l'acétaldéhyde, qui est responsable de la saveur unique (Boudjemaa., 2008).

2.7.3.2. Dans le domaine thérapeutique

Différents bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de lamicroflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem *et al.*,2008).

Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactériessur plusieurs types de diarrhées (Mkrtchyan *et al.*,2010).

D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish *et al.*,2011).

Certains souche comme *Lactobacillus crispatus* ont démontré la capacité de protection vis-à-vis des infections et utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie (Belaidouni, 2017).

Chapitre II

Matériel et méthode

Chapitre II : Matériel et méthode

1. Objectif

L'objectif principal de cette étude est l'isolement, l'identification par des méthodes Pasteuriennes et l'obtention d'un lot de bactéries lactiques autochtones à partir du lait de vache de la région d'Oued Rhiau.

2. Lieu et période de l'étude

Cette étude a été réalisée au sein de laboratoire de recherche des Sciences et Techniques de production animale de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, sis à Hassi -Maméche. Le travail s'est déroulé durant la période de 18 mai au 14 juillet.



Figure 12 : Situation géographique de laboratoire de recherche LSTPA de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem (Google maps).

Chapitre II : Matériel et méthode

3. Provenance des échantillons

Les échantillons de lait cru de vache proviennent de la localité d'Oued Rhiou une commune de la wilaya de Relizane, ils ont été prélevés auprès des éleveurs de la ferme d'ARNOUZE.

Les mamelles sont lavées avec l'eau savonneuse puis rincées à l'eau javellisée. Les échantillons du lait (100 ml) sont recueillis dans des flacons de 250 ml stériles, conservés à 4°C et transportés au laboratoire où ils sont analysés.

4. Analyses physico-chimiques d'échantillon de lait de vache

Des analyses ont été effectuées, sur les différents échantillons des laits de vache collectés, afin de déterminer les principales propriétés physiques et chimiques ainsi que la valeur nutritionnelle. L'ensemble des paramètres analysés sont présentés en figure 14.

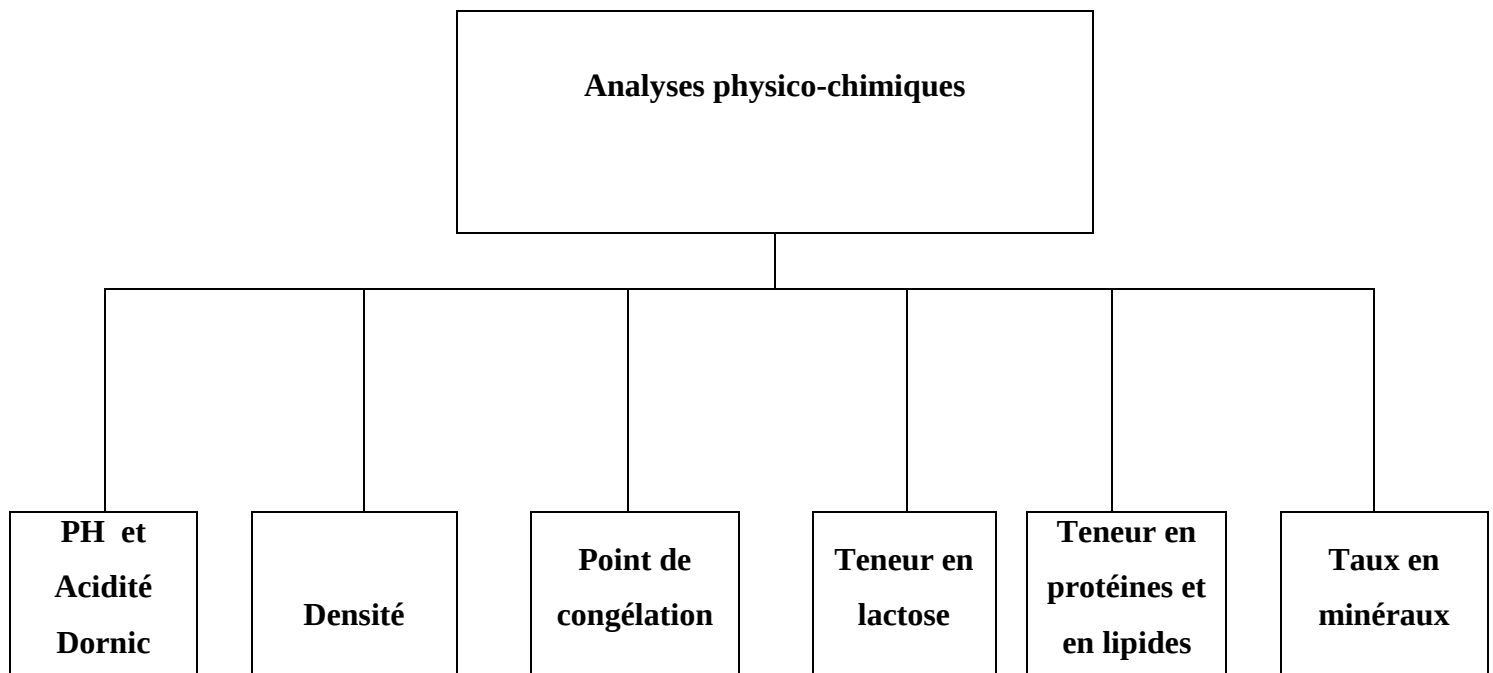


Figure 13 : Paramètres physicochimiques étudiés

On a utilisé l'analyseur des laits par spectrométrie infra-rouge « marque lactoscan » (voir l'annexe C) pour mesurer quelque paramètre physicochimique du lait (sauf l'acidité) :

F : Matière grasse

D : Densité

C : Taux de cendre

S : Matière sèche

Chapitre II : Matériel et méthode

P : Protéine

T : Température

PH : Potentiel hydrogène

FP : Point de congélation

S' : Taux de salinité

W : Activité de l'eau

L : Lactose

4.1.Mesure du pH

La valeur du pH a une importance exceptionnelle par l'abondance des indications qu'elle donne sur la richesse du lait de certains constituants sur l'état de fraîcheur ou sur sa stabilité. (Mathieu, 1998). Le pH des échantillons de lait a été mesuré, à l'aide d'un pH-mètre (type PHSJ-3F), par immersion dans un volume (30ml) de lait prélevé dans un bécher. L'opération est répétée 3 fois pour chaque échantillon et c'est la moyenne des mesures qui est prise en compte (Ketrouti, 2021).

4.2.Détermination de l'acidité titrable

Des méthodes de titrage plutôt que des mesures de pH sont utilisées pour vérifier l'équilibre acido-basique, qui est généralement appelée acidité titrable du lait.

Pour quantifier le degré d'acidité d'un lait, on utilise un titrage acido-basique par la soude Dornic. La procédure comprend les étapes suivantes :

- On a introduit 10ml de lait dans un bécher de 100ml.
- On ajoute 2 gouttes de phénolphthaléine à 1% dans l'alcool à 95%.
- On a fait couler la soude Dornic (la solution NaOH, N/9) dans le bécher et on rajoute goutte à goutte jusqu'au virage en rose. La coloration rose doit persister au moins 10 secondes (Guiraud, 1998).
- La lecture est réalisée sur la colonne graduée où le nombre de ml utilisés, puis on multiplie le nombre par 10 et ceci donne l'acidité du lait qui est exprimée en degré Dornic.

Un degré Dornic équivaut à une teneur de 0.1 g d'acide lactique par litre de lait.

Chapitre II : Matériel et méthode

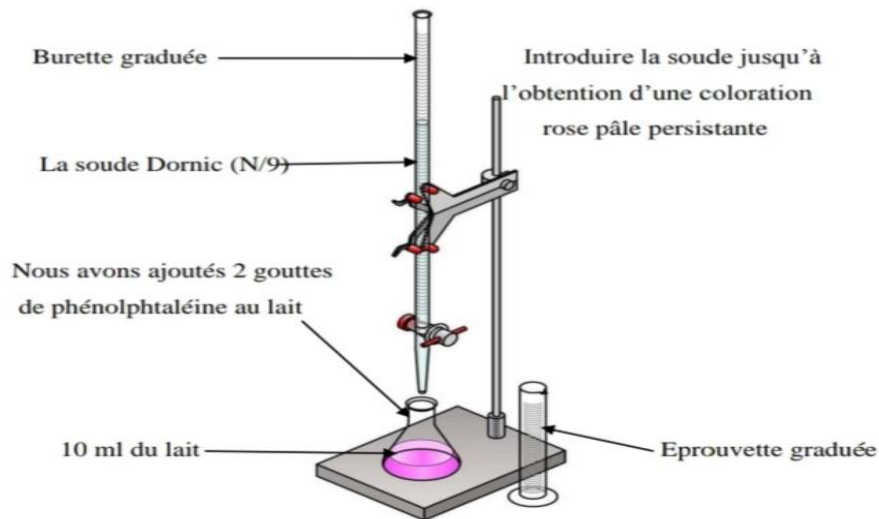


Figure 14: Mesure de l'acidité Dornic

5. Analyses microbiologiques d'échantillon de lait de vache

5.1. Milieux de culture

- Les milieux de cultures utilisés sont sous forme liquide ou solide après l'ajout de 15g/l d'agar agar. Les milieux sont les suivants :
- Le milieu MRS (De Man et *al.*, 1960).
- Le milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975).

Tous les milieux de culture utilisés dans cette étude sont stérilisés à 120°C pendant 20mn. La composition des différents milieux de cultures est présentée en annexe A.

5.2. Isolement et purification des bactéries lactiques

5.2.1. La préparation des dilutions

La dilution est un processus qui consiste à réduire la concentration d'une substance dans une solution. Les dilutions décimales ont été réalisées en triple à l'aide d'une solution d'eau péptonée

Chapitre II : Matériel et méthode

à 9% à raison de 9ml par tube, ensuite une série de dilution est préparée à partir de l'homogénat (10^{-1}) jusqu' à une dilution (10^{-7}) (Guiraud,2003).



Figure 15 : Préparation des dilutions de 10^{-1} à 10^{-7} .

5.2.2. Isolement des bactéries lactiques

Une fois les dilutions réalisées, on étale (ensemencement) cent microlitres (0,1ml) de chaque dilution sur la surface de la boîte Pétri qui contient les milieux de culture (ML pour la flore totale, MRS pour les lactobacilles et M17 pour le développement des lactocoques et streptocoques lactiques) à pH 6,2.

Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C, 37°C et 42°C pendant 24h à 48h.

Les boîtes contenant 30 à 300 colonies ont été retenues.

5.2.3. Dénombrement des bactéries lactiques

Des dilutions décimales ont été réalisées en triple à l'aide d'une solution d'eau péptonée à 9 % à raison de 9 ml par tube, après homogénéisation, on étale 0,1 ml de chaque dilution sur les milieux de culture (MRS et M17). Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C et 37°C et 42°C pendant 24 h à 72h.

Les dilutions qui ont été retenues sont de : 10^{-2} à 10^{-5} pour le comptage des colonies qui est exprimé en UFC (unités formant colonies) par gramme d'échantillons selon la formule suivante (Guiraud, 2003).

$$C_N (\text{Cellules suspension}) = \frac{\text{Nombre d'UFC comptées}}{V \text{ d'inoculum déposé}} \times Fd$$

Chapitre II : Matériel et méthode

- **CN** : Concentration en nombre de cellule dans la suspension
- **V** : Volume d'inoculum déposé
- **Fd** : Facteur de dilution

5.2.4. Purification

Les colonies bactériennes bien isolées de morphologie différentes sont repiquées sur les milieux MRS et M17 liquide (voir l'annexe B) et solide pour l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes. A l'aide d'une anse de platine, une quantité de la culture du bouillon a été prélevé et ensemencé par la technique des stries pour l'obtention des isolats purs sur des boîtes contenant du MRS et M17(Benslimane ,2019).

Chapitre II : Matériel et méthode

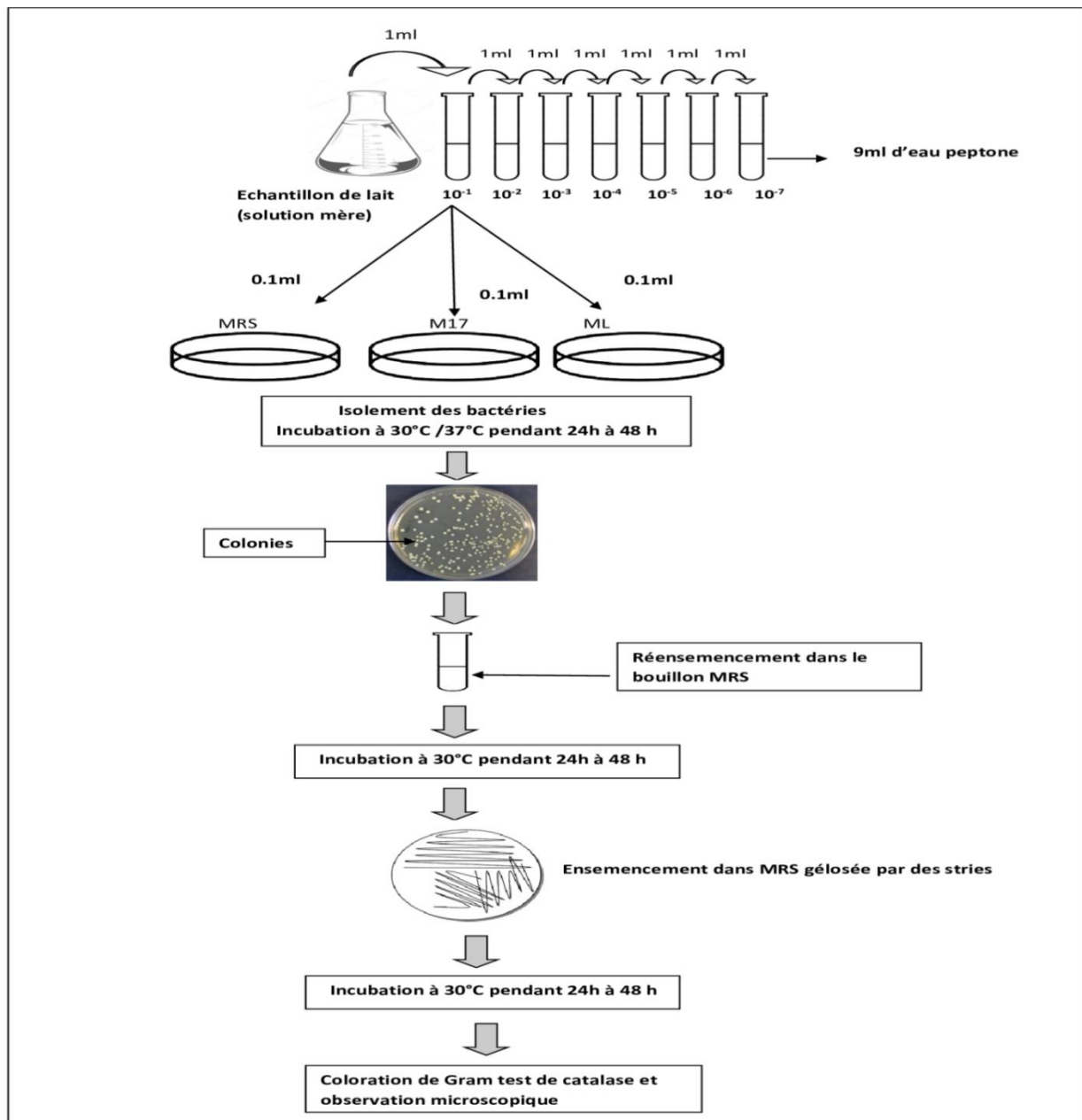


Figure 16 : Protocole d'isolement et purification des bactéries lactiques.

5.3. Pré-identification phénotypique des bactéries lactiques

L'identification des isolats lactiques a été menée par l'étude de différents tests morphologiques et physiologiques. Cette opération a été réalisée sur des colonies jeunes de (18-24h) et s'est effectuée en deux étapes. Tout d'abord, des tests physiologiques comme la croissance à différentes températures, à différents pH alcalin et à différentes concentrations de Na Cl, ainsi que des tests biochimiques comme l'hydrolyse de l'esculine, type fermentaire et la fermentation des carbohydrates à l'aide des galeries API. Ces tests ont nécessité l'utilisation de milieux spécifiques.

Chapitre II : Matériel et méthode

La lecture est appréciée par la présence d'un trouble, dû à la croissance, dans le milieu liquide (ketrouci, 2021).

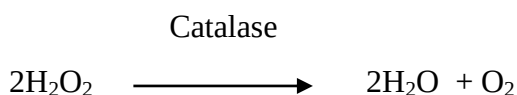
- a- **Observation macroscopique** : permet de déterminer l'aspect des colonies (la couleur, la forme, l'aspect et la taille des colonies).
- b- **Observation microscopique** : l'examen de préparation microscopique révélée par la coloration de Gram est utilisé pour classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie et leur mode d'association (leveau et *al.*, 1991).

5.4. Coloration de Gram

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de gentiane, puis traité pendant une minute par une solution de lugol ensuite il est rincé. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol à 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. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la fuchsine. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif à immersion (grossissement X 1000). Toutes les bactéries lactiques sont à Gram positif (ketrouci, 2021).

5.5. Test catalase

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capables de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase -) des entérobactéries (catalase +). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de gaz (O₂) (Bourgeois et *al.*, 1980). Les bactéries lactiques sont à catalase négative.

Chapitre II : Matériel et méthode

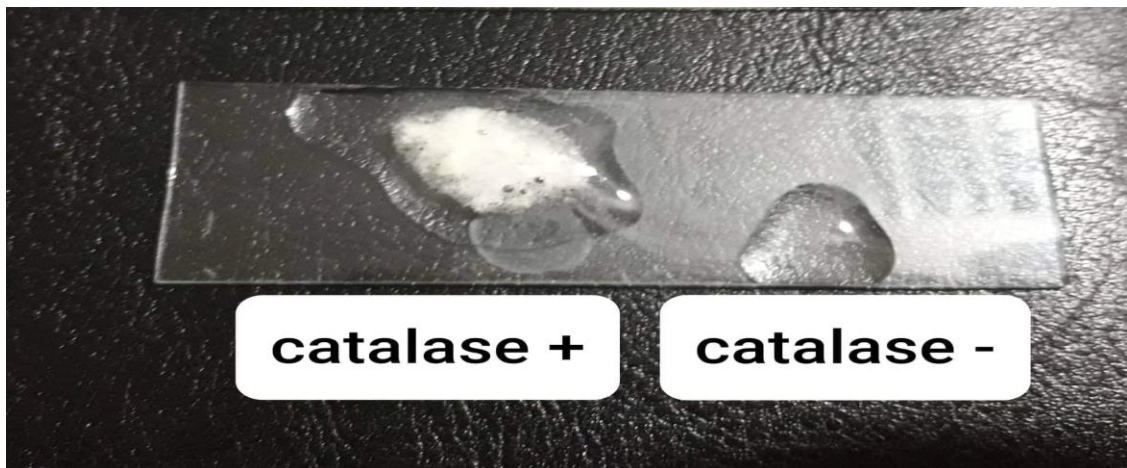


Figure 17 : Test de catalase des bactéries lactiques

6. Technique de conservation

Seules les bactéries à Gram positif et catalase négative ont été retenues. Après la purification, les isolats sont conservés par deux méthodes :

6.1.La conservation à courte terme

Les isolats sont ensemencés dans des tubes de gélose inclinée, après l'incubation à 30°C, les tubes sont placés à +4°C et les renouvellement se fait toutes les 4 semaines.

6.2.La conservation à long terme

Les cellules des isolats purifiés sont congelée à -20°C dans un milieu contenant 70% de lait écrémé (enrichi par 0.05 % d'extrait de levure) et 30% de glycérol (Samelis et al., 1994) après la centrifugation à 3000 tr/min pendant 10 min. La culture peut être conservée plusieurs mois.

7. Etude des caractéristiques physiologiques et biochimiques

7.1.Croissance à différentes températures

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles et thermophiles (Leveau *et al.*, 1991). Les tubes contenant des cultures jeunes sont incubés pendant 24h à 48h aux températures 10°C, 30°C et 45°C. La croissance est appréciée par l'apparition de trouble.

Chapitre II : Matériel et méthode

7.2. Test de la thermorésistance

Ce test permet de sélectionner des espèces thermorésistantes. Des tubes contenant 10 ml de MRS liquide sont inoculés par les souches isolées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à 63,5°C pendant 30 minutes, après refroidissement brusque, elles sont incubées à 30°C ± 1°C pendant 48 heures à 72 heures. Un résultat positif se traduit par un trouble. (Rouisset et al., 2006). Seules certaines bactéries lactiques sont thermorésistantes comme *S. thermophilus*, *En. faecalis*, *En. faecium* et *Lb. bulgaricus*. (ketrouci, 2021)

7.3. Test de croissance à différents pH

Ce test permet d'apprécier l'aptitude des bactéries isolées à croître à différentes valeurs de pH

- A pH 9,6 pour les genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* sur bouillon M17.
- A pH 4,5 pour le genre *Lactobacillus* sur bouillon MRS avec incubation à 30°C et 40°C pendant 24h à 48h (Mechai, 2009).

La croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble. (Bekhouche, 2006, Bourgenis et al., 1996).

Le pH est ajusté par l'addition des solutions de NaOH et d'acide lactique. La croissance bactérienne est appréciée par un trouble dans les tubes et par comparaison avec une culture réalisée dans du MRS à pH 6.5 (Tahlaiti ; 2019).

7.4. Culture sur milieu hypersalé

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 hypersalés à 4% et 6,5% de NaCl. Après une incubation à 30°C et 45°C pendant 24h.

Ce test permet de séparer les *lactocoques*, *streptocoques*, des **entérocoques** (Devrise et al., 2002). La croissance est appréciée par l'apparition de trouble.

7.5. Type de fermentaire

Dans des tubes à essai on a versé un milieu MRS et entreposé des cloches de Durham pour mettre en évidence la production de gaz. Ensuite on aensemencé les souches. Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO₂, par contre les

Chapitre II : Matériel et méthode

souches hétéro fermentaires vont produire l'acide lactique et le CO₂ proportions égales. (Carr et al.,2002).

7.6.Hydrolyse de l'esculine

L'hydrolyse de l'esculine rompt la liaison glucosidique et libère du glucose et de l'esculine qui donne une coloration noire en présence de citrate de fer ammoniacal. Répartir le bouillon d'esculine en tubes à essai à raison de 10ml par tube. Après ensemencement, on incube à 30°C pendant 48 à 72 heures. Un résultat positif se traduit par un noircissement du milieu. Pour les bactéries à esculine négative le milieu reste inchangé bien qu'il y a une croissance bactérienne (Ketrouti,2021).

8. Identification des bactéries lactique par la galerie API 50CHL

Les galeries API 50 CHL (BioMérieux, REF 50 300, France) permettent une identification des bactéries lactiques au niveau de l'espèce et même parfois de la sous-espèce sur la base de la fermentation de 49 sucres différents.

La galerie API 50 CHL est constituée de 50 micros tubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés

(Hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

Préparation des galeries

Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés.

- Préparer une boîte d'incubation (fond et couvercle).
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Répartir environ 10 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.
- Sortir les bandes de leur emballage, séparer en deux les bandes 0-19 et 20-39 et les déposer dans le fond de la boîte d'incubation.
- Compléter la galerie avec la bande 40- 49.

Chapitre II : Matériel et méthode

Préparation de l'inoculum :

- Cultiver les bactéries sur un milieu adapté à sa croissance.
- Après 24 h d'incubation, la culture est récupérée par centrifugation à 3100 tr/mn pendant 10 mn, le culot est rincé 2 fois à l'eau physiologique stérile.
- Préparer l'inoculum dans le milieu de l'API 50 CHL.

Inoculation des galeries :

Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie en se conformant aux précautions suivantes :

- Incliner légèrement vers l'avant la boîte d'incubation.
 - Eviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la Cupule.
 - Lorsque les tubes doivent être inoculés, les cupules sont remplies avec de l'huile de Paraffine stérile.
- Incuber les galeries à la température optimum de croissance de bactéries étudiées.

Durant la période d'incubation, la fermentation des sucres est indiquée par une couleur jaune exceptée pour l'esculine (brun foncé). Les résultats sont lus à 24 h et vérifiés après 48 h d'incubation.

L'interprétation des résultats peut se faire par le logiciel Api Web (BioMérieux) pour identifier les bactéries lactiques (voir annexe D) (Belarbi, 2010).

Chapitre II : Matériel et méthode



Figure 18. Les galleries API 50 CHL

Chapitre III

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Etude physico-chimique du lait

Les résultats des analyses du lait de vache collecté ont pour but de déterminer la qualité de ce dernier.

Tableau IX . L'analyse physico-chimique de lait de vache

Les paramètres physico-chimiques	Echantillons
PH	6,62
Acidité Dornic D	19
Point de congélation FP	-0,523
Température T	28,6
Matière grasse F	2,89
Matière minérale C	5,58
Matière sèche S	9,62
Protéine P	2,95
Taux de sel S'	0,64
Lactose L	4,50

Chapitre III : Résultats et discussion

1.2. Les analyses microbiologiques

1.2.1. Isolement des bactéries lactiques

Les colonies des bactéries lactiques ont été isolées à partir du lait de vache. Pour l'obtention des isolats lactiques, nous avons opté pour une approche phénotypique basée essentiellement sur l'aspect macroscopique et microscopique des colonies ensemencées sur gélose MRS et M17.

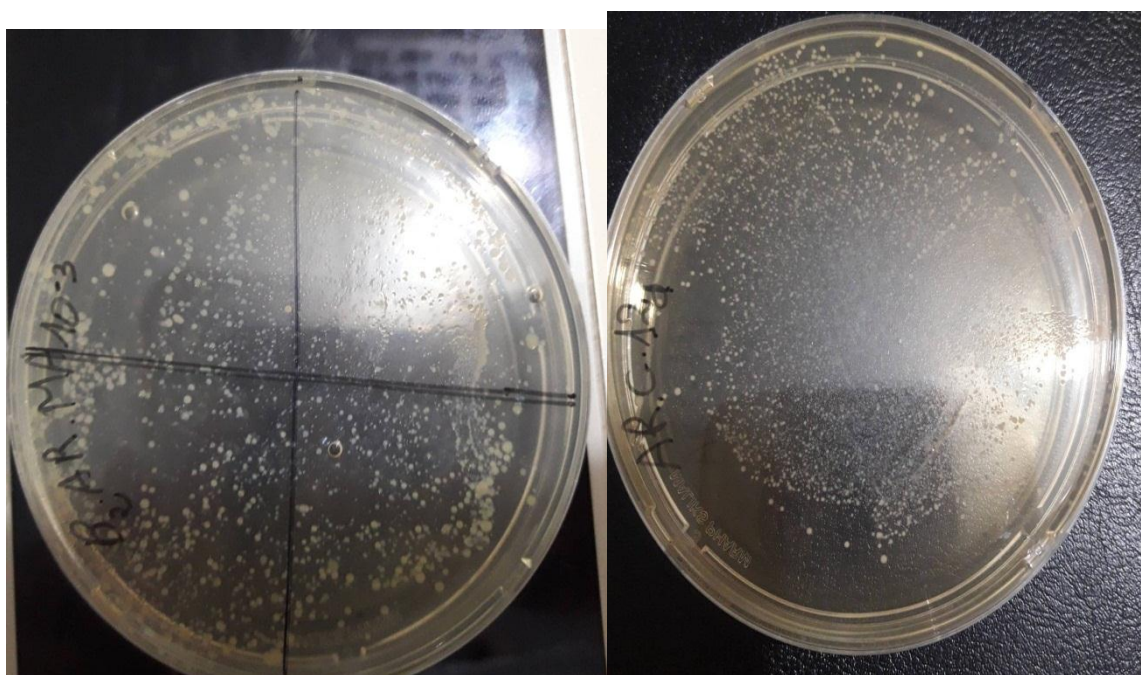
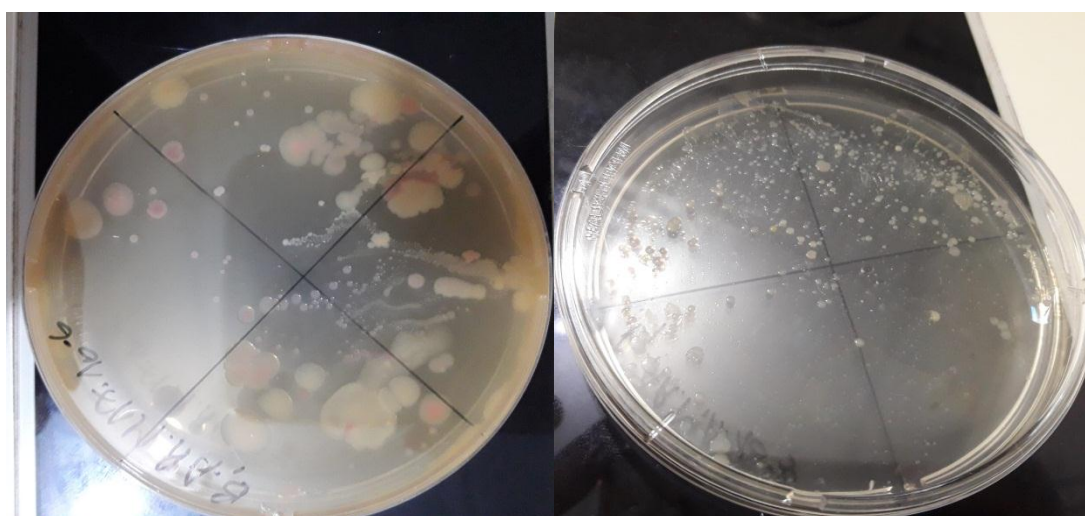


Figure 19 :Aspect macroscopique des colonies d'isolats lactiques isolées sur gélose MRS.



Chapitre III : Résultats et discussion

Figure 20 : Aspect macroscopique des colonies d'isolats lactiques isolées sur gélose M17.

1.2.2. Dénombrement des boites exploitable

Les dénombrements des bactéries lactiques isolées à partir de lait de vache de la région d'Oued Rhiau ont été effectués selon de (Joffin et leyrat, 2006). Le nombre moyen de bactéries lactiques varie entre 1.28×10^5 à 1.7×10^7 sur milieu solide MRS et varie entre 1.92×10^5 UFC/g à 4×10^7 UFC/g sur milieu solide M17.

Les résultats sont indiqués dans les tableaux ci-dessous :

Tableau X. Dénombrement des bactéries lactiques sur milieu MRS

Dilution	$1/100=10^{-2}$	$1/1000=10^{-3}$	$1/10000=10^{-4}$	$1/100000=10^{-5}$
Facteur de dilution	10^2	10^3	10^4	10^5
Nombre d'UFC comptées	128	88	38	17
C_N (cellules : suspension)	1.28×10^5	8.8×10^5	3.8×10^6	1.7×10^7

V = 0.1 ml

Tableau XI : Résultats des profils fermentaire des bactéries lactiques sur la galerie API 50 CHL.

Dilution	$1/100=10^{-2}$	$1/1000=10^{-3}$	$1/10000=10^{-4}$	$1/100000=10^{-5}$
Facteur de dilution	10^2	10^3	10^4	10^5
Nombre d'UFC comptées	192	180	98	40
C_N (cellules : suspension)	1.92×10^5	1.8×10^6	9.8×10^6	4×10^7

V= 0.1 ml

1.3.Purification des isolats

La purification des isolats a été établie par la réalisation des subcultures sur milieu MRS solide par la méthode des stries jusqu'à l'obtention des colonies bien distincte et homogène.

Chapitre III : Résultats et discussion

La purification a permis d'obtenir de 12 isolats lactiques.



Figure 21 : Aspect macroscopique d'isolat après purification sur milieu MRS solide.

1.3.3. Pré-identification des isolats

❖ Examen macroscopique

L'observation macroscopique des cultures en milieu solide a révélé plusieurs aspects morphologiques des colonies.

- Des colonies circulaires, blanchâtre, bombées, à contour régulier et de même taille.
- Des petites colonies lisses, arrondies de couleur crème.
- Grosses colonies irrégulières de couleur crème.

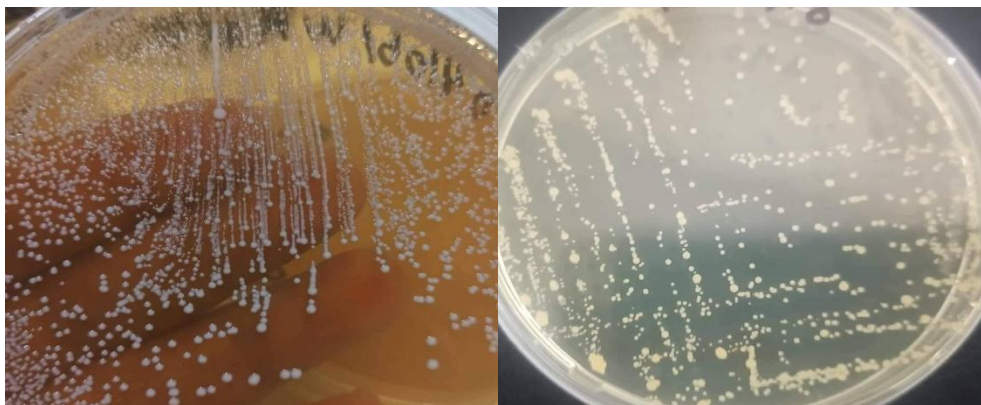


Figure 22 : Aspect macroscopique de deux isolats purifiés sur milieu MRS solide.

Chapitre III : Résultats et discussion

❖ Examen microscopique

L'observation microscopique des caractères cultureux montre la forme, le mode d'association et la pureté des isolats.

Ces colonies se sont distinguées par deux formes coques (58.3%) et bacilles (41.6%).

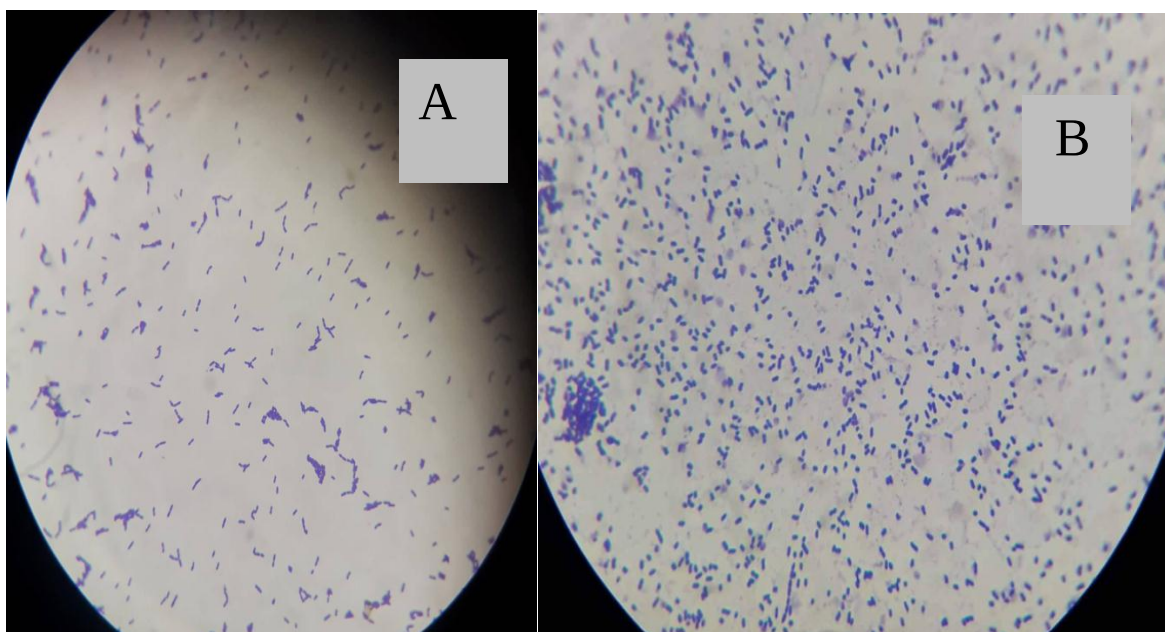


Figure 23 : Aspect microscopique des isolats après la coloration de Gram ($\times 100$)

A : bacille ; **B :** coques

Tableau XII: Critères morphologique des bactéries lactiques isolées à partir de lait de vaches

Code de souche	Gram	catalase	Forme	Mode d'association
AR01	+	-	Bacille	En chaine et en diplo
AR02	+	-	Bacille	En chainettes
AR03	+	-	Bacille	En chainettes
AR04	+	-	Coques	En chainettes
AR05	+	-	Coques	En amas
AR06	+	-	Bacille	En amas

Chapitre III : Résultats et discussion

AR07	+	-	Bacille	En chaine et en diplo
AR08	+	-	Coques	En chaine et en diplo
AR09	+	-	Coques	En chainette
AR10	+	-	Coques	En chainettes
AR11	+	-	Coques	En chainettes
AR12	+	-	Coques	En diplo

AR : ARNOUZE (la ferme)

01, 02, 03...12 : numéro d'isolat.

1.4. Etude des caractéristiques physiologiques et biochimiques

1.4.1. Croissance à différentes températures

Ce test permet de distinguer entre la flore mésophile et thermophile.

A 37°C : toutes les bactéries se développent à cette température.

A 45°C et 10°C : la majorité des bactéries sont capable de se développer à ces températures indiquant qu'elles sont thermophiles à l'exception des isolats numéro 09,10 et 11 qui sont mésophiles.

Tableau XIII. Résultats de test de croissance à différentes températures

Echantillons	Températures		
	10°C	37°C	45°C
AR01	+/-	+	+
AR02	+/-	+	+
AR03	+/-	+	+
AR04	+	+	+
AR05	+	+	+
AR06	+	+	+
AR07	+/-	+	+
AR08	+/-	+	+

Chapitre III : Résultats et discussion

AR09	+	+	-
AR10	+	+	-
AR11	+	+	-
AR12	+	+	+

AR : ARNOUZE + : réaction positive - : réaction négative +/- : faible croissance

01, 02, 03...12 : numéro d'isolat.

1.4.2. Test de thermorésistante

L'exposition des isolats à une température de 63.5°C pendant 30 min permet de révéler que la majorité des isolats ne supportent pas cette température à l'exception des isolats 01, 02, 04 05 et 12.

Tableau XIV : Résultats de test de thermorésistante.

Echantillons	Thermorésistante 63.5°C
AR 01	+
AR 02	+
AR 03	-
AR 04	+
AR 05	+
AR 06	-
AR 07	-
AR 08	-
AR 09	-
AR 10	-
AR 11	-
AR 12	+

AR : ARNOUZE (la ferme)

01, 02, 03...12 : numéro d'isolat.

1.4.3. Test de croissance à différents pH

La majorité des isolats ont poussé dans un milieu acide (pH 4.5) excepté les isolats 05, 09, 11, 12 et par contre on a noté une croissance chez seulement 50% (6/12) isolats dans un milieu alcalin (PH 9.6)

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau XV : Résultat du test de croissance à différents pH

Echantillons	pH	
	9.6	4.5
AR 01	-	+
AR 02	-	+
AR 03	-	+
AR 04	+	+
AR 05	+	-
AR 06	-	+
AR 07	-	+
AR 08	-	+
AR 09	+	-
AR 10	+	+
AR 11	+	-
AR 12	+	-

AR : ARNOUZE (la ferme)

01, 02, 03...12 : numéro d'isolat.

1.4.4. Culture sur milieu hypersalé

Les résultats des tests montrent que tous les isolats ont pu croître en présence de 4% et 6.5% de NaCl à l'exception des isolats 06 (4%), 01, 02 et 08 (6.5%).

Tableau XVI : Résultats du test de culture sur milieu hypersalé

Echantillons	NaCl	
	4%	6.5%
AR 01	+	-
AR 02	+	-
AR 03	+	+
AR 04	+	+

Chapitre III : Résultats et discussion

AR 05	+	+
AR 06	-	+
AR 07	+	+
AR 08	+	-
AR 09	+	+
AR 10	+	+
AR 11	+	+
AR 12	+	+

AR : ARNOUZE (la ferme)

01, 02, 03...12 : numéro d'isolat.

1.4.5. Type fermentaire

Ce test constitue la première clé d'identification phénotypique des bactéries lactiques. Ce test a permis de différencier entre les isolats hétérofermentaires et homofermentaires.

Ce test a permis de sélectionner 3 isolats hétérofermentaire AR01, AR02 et AR04.

Toutefois le groupe homofermentaire est prépondérant dans les cultures de nos bactéries lactiques.

Tableau XVII: Résultats du test de type fermentaire

Echantillons	AR01	AR02	AR03	AR04	AR05	AR06	AR07	AR08	AR09	AR10	AR11	AR12
Type fermentaire	hétéro	hétéro	homo	hétéro	homo	homo	homo	homo	homo	homo	homo	homo

AR : ARNOUZE (la ferme)

01, 02, 03...12 : numéro d'isolat.

1.4.6. Hydrolyse de l'esculine

L'hydrolyse de l'esculine se traduit par un noircissement sur milieu à esculine gélosé. Nous remarquons que tous les isolats se sont révélés positifs à ce test à l'exception d'AR 01, AR 06, AR 07.

Chapitre III : Résultats et discussion

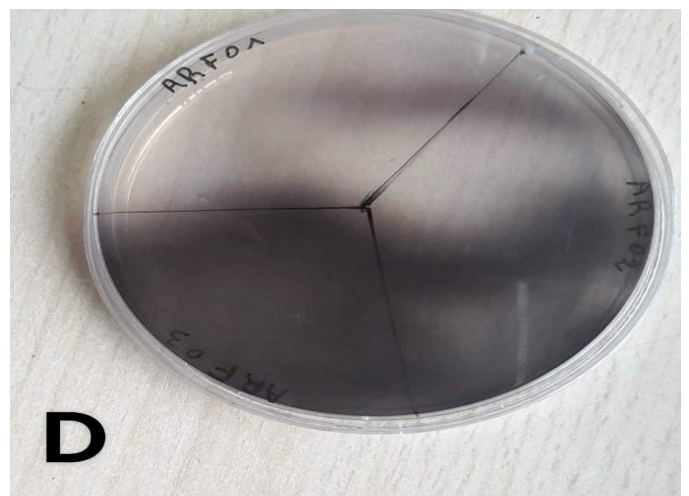
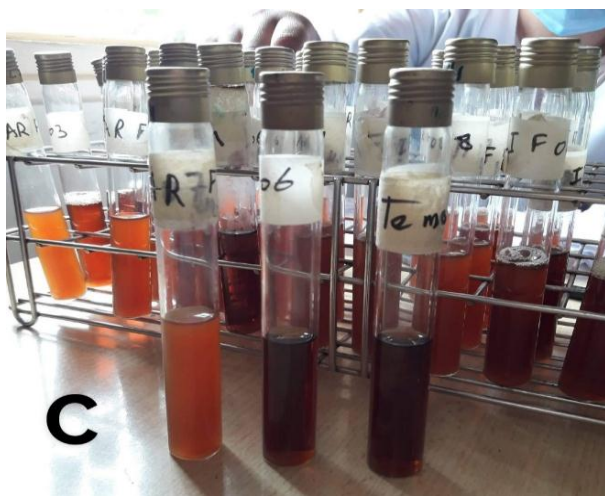
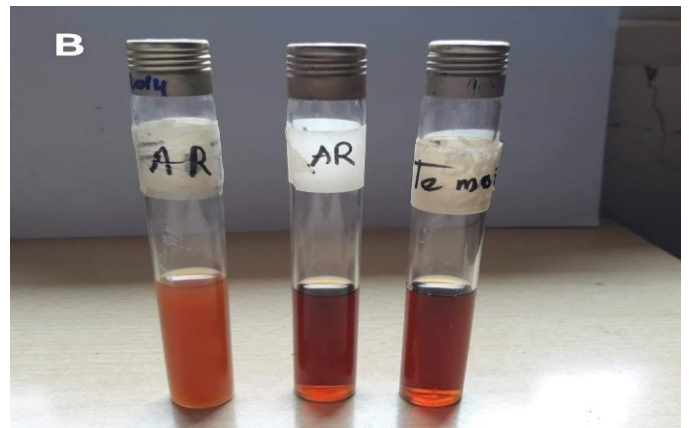
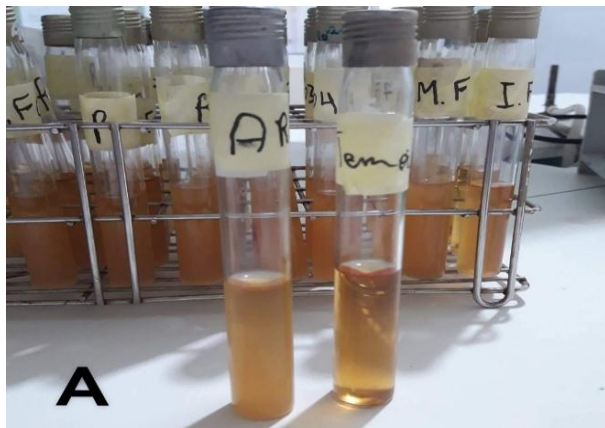


Tableau XVIII : Résultats de l'hydrolyse de l'esculine

Echantillon	AR01	AR02	AR03	AR04	AR05	AR06	AR07	AR08	AR09	AR10	AR11	AR12
L'esculine	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

AR : ARNOUZE (la ferme)

01, 02, 03...12 : numéro d'isolat.

Figure 24 : Résultats des tests physiologiques et biochimiques réalisés après incubation

A-Test de thermorésistance.

B-Test de milieu NaCl 6,5.

C-Test de milieu pH 9,6.

Chapitre III : Résultats et discussion

D-Test d'esculine.

1.5. Identification par les galeries API

Les galeries API 50 CHL a été utilisé pour déterminer la production d'acide à partir des hydrates de carbone des microorganismes et pour l'identification de nos isolats.

L'identification par la galerie API 50 CHL est faite pour confirmer les profils obtenus avec les résultats des tests physiologiques et biochimiques.

Les résultats des méthodes phénotypiques appliquées pour l'identification des isolats sont regroupés dans le tableau 19.

Chapitre III : Résultats et discussion

Echantillon	Gram	Catalase	Forme	NaCl		pH		Thermo résistance	Température			Type fermentaire	Esculine	Le genre
				4%	6,50%	9,6	4,5		10 C°	37°C	45° C			
AR 01	+	-	Bacille	+	-	-	+	+	+/-	+	+	Hétero+	-	<i>Lactobacillus</i>
AR 02	+	-	Bacille	+	-	-	+	+	+/-	+	+	Hétero +	+	<i>Lactobacillus</i>
AR 03	+	-	Bacille	+	+	-°	+	-	+/-	+	+	Homo	+	<i>Lactobacillus</i>
AR 04	+	-	Coque	+	+	+	+	+	+	+	+	Hétero +	+	<i>Leuconostoc</i>
AR 05	+	-	Coque	+	+	+	-	+	+	+	+	Homo	+	<i>Enterococcus</i>
AR 06	+	-	Coque	-	+	-	+	-	+	+	-	Homo	+	<i>Enterococcus</i>
AR 07	+	-	Bacille	+	+	-	+	-	+/-	+	+	Homo	-	<i>Lactobacillus</i>
AR 08	+	-	Bacille	+	-	-	+	-	+/-	+	+	Homo	+	<i>Lactobacillus</i>
AR 09	+	-	Coque	+	+	+	-	-	+	+	-	Homo	+	<i>Lactococcus</i>
AR 10	+	-	Coque	+	+	+	+	-	+	+	-	Homo	+	<i>Lactococcus</i>
AR 11	+	-	Coque	+	+	+	-	-	+	+	-	Homo	+	<i>Lactococcus</i>
AR 12	+	-	Coque	+	+	+	-	+	+	+	+	Homo	+	<i>Entérocooccus</i>

Tableau XIX : L'identification des bactéries lactiques par galerie API 50 CHL

Chapitre III : Résultats et discussion



Figure 25 : Résultats des profils fermentaire des bactéries lactiques sur la galerie API 50 CHL.

AR 01: *Lactobacillus*.

AR 04 : *Leuconostoc*.

AR 09 : *Lactococcus*

Chapitre III : Résultats et discussion

2. Discussion

2.1. Propriétés physicochimiques de lait de vache

Les paramètres physico-chimiques de lait de vache collectés ont pour but de déterminer la qualité de ces derniers.

Du point de vue physique, le lait présente une hétérogénéité, puisque certains composants sont dominants sur le plan quantitatif, ce sont l'eau, la matière grasse, les protéines et le lactose. Les propriétés physiques comme la densité, le potentiel d'hydrogène et le point de congélation dépendent de l'ensemble des constituants (Mathieu, 1998).

Les analyses ont été effectuées selon les normes Algériennes (NA) décrites par le ministère du commerce.

La valeur recueillie lors de cette mesure donne une moyenne de pH pour l'échantillon de lait de vache qui est de 6,62, donc on peut dire que d'après nos résultats, notre lait est conforme aux normes (FAO, 2006) $6,6 < \text{pH} < 6,8$.

Selon Alais ;1984, le pH n'est pas une valeur constante et peut varier selon le cycle de lactation et sous l'influence de l'alimentation. Dans le cas où le pH est inférieur à la norme cela indique une acidification du lait, qui peut être due à un stockage inadéquat (Diao, 2000).

L'acidité du lait de vache est de 19°D, selon le J.ORA (2017), cette valeur est légèrement supérieure à celle du lait normal (15-18°C).

D'après Mathieu, 1998, les variations de l'acidité titrable sont liées au climat, au stade de lactation, à la disponibilité alimentaire, à l'apport hydrique, à l'état de santé des vaches et aux conditions hygiéniques lors de la traite. Selon ces mêmes auteurs, l'acidité dépend aussi de la flore microbienne totale et de son activité métabolique, ainsi que de la manutention du lait.

Les résultats du dénombrement des colonies obtenues montrent la prédominance des bactéries sur milieu M17 par rapport sur milieu MRS avec des valeurs de l'ordre de $1,28 \times 10^5$ à $1,7 \times 10^7$ sur milieu solide MRS et varie entre $1,92 \times 10^5$ UFC/g à 4×10^7 UFC/g sur milieu solide M17.

Notre résultat peut être expliqué selon Bouabellou et Bouzzenir, 2018 par la sélectivité des milieux utilisés, MRS spécifiques aux lactobacilles et M17 spécifique aux lactocoques.

Chapitre III : Résultats et discussion

2.2. Isolement et identification des bactéries lactiques

Dans un deuxième temps nous nous sommes dirigés vers l'objectif de notre étude qui est l'isolement et l'identification des bactéries lactiques.

Les isolats des bactéries lactiques ont été isolés à partir du lait de vache. On a obtenu 12 isolats.

Les milieux de cultures a été effectué sur le milieu MRS et M17, doivent être très riches en sucres, en matières azotées et surtout en facteurs de croissance (Pilet *et al.*, 2005).

L'observation microscopique a révélée deux formes de cellules Coques et Bâtonnets, disposées par paire (diplocoques), en chainettes et en amas.

L'étude des principaux caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques ont montré une diversité de genres isolés à partir du lait de vache.

Les résultats d'identification de cette étude montrent une présence majoritaire de coques avec 58.3% (7/12) par rapport aux bacilles qui sont à des pourcentages de 41.6% (5/12). Le même type de résultats est apporté par Franciosi *et al.* ; 2009 ; Cheriguene. 2008 ; Bekhouche. Boulahrouf. 2005 et Kacem *et al.*, 2002.

Les espèces lactiques de lait de vache sont très variées. Notre présente étude a permis d'isoler et identifier 12 souches ont été rattachés à 4 groupes de bactéries lactiques réparties essentiellement entre de lactobacilles (5 souches, 42%) la même constatation a été mentionné par Benslimane, 2019, et de *lactocoques* (3 souches, 25%) et de *enterocoques* (3 souches, 25%) et de *leuconostoc* (1 souche, 8%), Nos résultats concordent avec ceux de (Bekhouche et Boulahrouf, 2005).

Une étude similaire a démontré la présence de différentes espèces de bactéries lactiques appartenant aux genres lactobacilles, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Lactocoques* dans le lait de vache (Lairini *et al.*, 2014).

Le test de la dégradation des carbohydrates par les galeries API 50 CHL a été étudié est confirmer les résultats des tests physiologiques et biochimiques des isolats et pu identifier les genres des bactéries lactique isolées.

Conclusion

A travers cette étude, nous avons apporté une contribution à l'isolement et l'identification des bactéries lactiques autochtones isolée de lait de vache issu de la région d'Oued Rhiau.

Notre étude nous a permis d'isoler 12 souches lactiques que l'on a purifiées et identifiées par les méthodes biochimiques et physiologiques et complétée par les tests de fermentations des sucres à l'aide de galerie API 50 CHL avec l'utilisation des milieux spécifiques des bactéries lactiques.

Les résultats obtenus nous ont permis de répartir les souches en quatre (04) genres : *Lactobacillus* (42%), *Lactococcus* (25%), *Enterococcus* (25%) et *Leuconostoc* (8%).

Cette étude préliminaire mérite d'être complétée par d'autres telles que la mise en évidence de l'aptitude technologique de nos souches (étude de pouvoir acidifiant, protéolytique et lipolytique) ainsi que l'étude de propriétés probiotiques et l'antagonisme entre les souches identifiées. Cependant ; cette étude peut être complétée par une identification moléculaire comme le séquençage d'ARN16S.

Les annexes

Les Annexes

Annexe A :

Les milieux de culture

Milieu MRS: (PH 6,5). Eau distillée qsp 1000ml

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80 Iml	2g
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	0,2g
Sulfate de manganese, 4 H ₂ O	0,5g

Pour obtenir un milieu solide on ajoute l'agar-agar Agar 18g Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min (Meghoufel,2019).

Milieu M17: (pH 7,1). Eau distillée qsp 1000ml

Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5g
Tryptone	5g
Peptone papainique de soja	2,5g
Peptone pepsique de viande	5g
Acide ascorbique	0,5g
Lactose	5g
Glycerophosphate de sodium	19g
Mg SO ₄	0,25g

Pour obtenir un milieu solide on ajoute l'agar-agar Agar 18g Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min (Meghoufel,2019).

Les Annexes

Annexe B :

Les bouillon

Bouillon MRS (Man, Rogasa et Sharpe)

- Peptone
- Extrait de viande
- Extrait de levure
- Glucose
- Tween 80
- Phosphate bipotassique
- Acétate de sodium
- Citrate d'ammonium
- Sulfate de magnesium
- Sulfate de manganès
- Eau distillée qsp
- Le milieu est stérilisé à 121°C durant 15 min.(Ketrouti,2021)

Les Annexes

Annexe C :

Appareillage



Lactoscane



Agiteur électrique

- Autoclave ;
- bec bunsen ;
- bain marie ;
- balance de précision ;
- microscope optique ;
- PH mètre ;
- Réfrigérateur ;
- Micropipettes ;

Annexe D :

Les galeries API 50 CHL

REF 50 300

07945F - FR - 2002/11

api® 50 CH

IVD

Carbohydrates

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API 50 CH est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes. API 50 CH est utilisé en combinaison avec API 50 CHL Medium pour l'identification des *Lactobacillus* et apparentés, avec API 50 CHB/E Medium pour l'identification des *Bacillus* et apparentés, des *Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae*. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'identification en fin de notice des milieux associés.

PRINCIPE

La galerie API 50 CH est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques). Les tests de fermentation sont inoculés avec API 50 CHL Medium ou API 50 CHB/E Medium qui réhydrate les substrats.

Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi. Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif.

NOTE : La galerie API 50 CH peut être utilisée pour étudier deux autres voies :

- l'oxydation se traduisant par un changement de couleur dans la cupule, dû à une production d'acide en aérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.
- l'assimilation se traduisant par une croissance du microorganisme dans la cupule quand le substrat est utilisé comme seule source de carbone présente.

Dans ce cas, le milieu employé pour l'inoculation des galeries doit être choisi en fonction du métabolisme et des exigences du groupe microbien étudiés (voir paragraphe bibliographie).

PRESENTATION (Coffret de 10 tests)

- 10 galeries API 50 CH
- 10 boîtes d'incubation
- 10 fiches de résultats
- 1 notice

COMPOSITION DE LA GALERIE

La composition de la galerie API 50 CH est reportée dans la liste des tests ci-dessous :

Bande 0 - 9

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
0		TEMoin	-
1	GLY	GLYcérol	1,64
2	ERY	ERYthritol	1,44
3	DARA	D-ARAbinose	1,4
4	LARA	L-ARAbinose	1,4
5	RIB	D-RiBose	1,4
6	DXYL	D-XYLose	1,4
7	LXYL	L-XYLose	1,4
8	ADO	D-ADOnitol	1,36
9	MDX	Méthyl- β -D-Xylopyranoside	1,28

Bande 10 - 19

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
10	GAL	D-GALactose	1,4
11	GLU	D-GLUcose	1,56
12	FRU	D-FRUctose	1,4
13	MNE	D-MaNNose	1,4
14	SBE	L-SorBoSE	1,4
15	RHA	L-RHAmnose	1,36
16	DUL	DULcitol	1,36
17	INO	INOsitol	1,4
18	MAN	D-MANNitol	1,36
19	SOR	D-SORbitol	1,36

Bande 20 - 29

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
20	MDM	Méthyl- α -D-Mannopyranoside	1,28
21	MDG	Méthyl- α -D-Glucopyranoside	1,28
22	NAG	N-AcetylGlucosamine	1,28
23	AMY	AMYgdaline	1,08
24	ARB	ARButine	1,06
25	ESC	ESCuine	1,16
		citrate de fer	0,152
26	SAL	SALicine	1,04
27	CEL	D-CELlobiose	1,32
28	MAL	D-MALtose	1,4
29	LAC	D-LACtose (origine bovine)	1,4

Bande 30 - 39

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
30	MEL	D-MELibiose	1,32
31	SAC	D-SACcharose	1,32
32	TRE	D-TREhalose	1,32
33	INU	INUline	1,28
34	MLZ	D-MELéZitose	1,32
35	RAF	D-RAFfinose	1,56
36	AMD	AmiDon	1,28
37	GLYG	GLYcoGène	1,28
38	XLT	XyLiTel	1,4
39	GEN	GENtiobiose	0,5

Bande 40 - 49

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
40	TUR	D-TURanose	1,32
41	LYX	D-LYXose	1,4
42	TAG	D-TAGatose	1,4
43	DFUC	D-FUCose	1,28
44	LFUC	L-FUCose	1,28
45	DARL	D-ARAbitol	1,4
46	LARL	L-ARAbitol	1,4
47	GNT	potassium GlucoNaTe	1,84
48	2KG	potassium 2-CétoGluconate	2,12
49	5KG	potassium 5-CétoGluconate	1,8

Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactifs :

- Milieu d'inoculation :
API 50 CHL Medium (Réf. 50 410)
API 50 CHB/E Medium (Réf. 50 430)
(+ produits mentionnés dans les notices de ces milieux)
ou autre milieu adapté
- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- McFarland Standard (Réf. 70 900) ou
DENSIMAT (Réf. 99 234) ou Densitromètre ATB®
- Logiciel d'identification (consulter bioMérieux)

Matériel :

- Pipettes ou PSIPettes
- Portoir pour ampoules
- Protège-ampoules
- Ecouvillons
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle microbiologique.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée par un personnel compétent et averti. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline* - December 1997". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)," ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage des différents composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, sachet déshydratant ouvert, ...
- Les performances sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.

CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API 50 CH ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autre. Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.

MODE OPERATOIRE

Selon le milieu utilisé, API 50 CHL Medium ou API 50 CHB/E Medium, lire attentivement la notice correspondante.

Préparation des galeries

Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés.

- Préparer une boîte d'incubation (fond et couvercle).
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation.)
- Répartir environ 10 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂ ...)] dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.
- Sortir les bandes de leur emballage, séparer en deux les bandes 0-19 et 20-39 et les déposer dans le fond de la boîte d'incubation.
- Compléter la galerie avec la bande 40-49.

Préparation de l'inoculum

- Cultiver le microorganisme sur un milieu adapté à sa croissance.
- Vérifier la pureté de la souche.
- Récolter cette culture par écouvillonnage d'un milieu solide, ou par centrifugation d'un milieu liquide.
- Préparer l'inoculum dans le milieu approprié (voir notices API 50 CHL Medium et API 50 CHB/E Medium). Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

Inoculation des galeries

Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie en se conformant aux précautions suivantes :

- Incliner légèrement vers l'avant la boîte d'incubation.
- Eviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule.
- Lorsque le tube seul doit être inoculé, ne pas dépasser la limite supérieure du tube afin de conserver une bonne anaérobiose.
- Lorsque le tube et la cupule doivent être complètement remplis, éviter la formation d'un ménisque concave ou convexe.
- Incuber les galeries à la température optimum de croissance du groupe de microorganismes étudiés : 30°C, 37°C, 55°C.

LECTURE ET INTERPRETATION

Lecture des galeries

La lecture des galeries est réalisée à des temps d'incubation définis (24 H, 48 H par exemple), dépendant du microorganisme et du type de réaction étudié.

Interprétation

Interpréter chaque test (positif (+), négatif (-), douteux (?)) et les noter sur la fiche de résultats.

Le profil biochimique ainsi constitué sert à l'identification des *Lactobacillus* et apparentés, des *Bacillus* et apparentés, des *Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae*, à l'aide du logiciel d'identification.

NOTE : Autres exploitations possibles des résultats :

- Type épidémiologique de microorganisme.
- Analyse taxonomique d'un groupe de microorganismes.
- Classification d'une population bactérienne inconnue en groupes homogènes.

CONTROLE DE QUALITE

Les galeries font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique des tests de la galerie est de plus réalisable par l'utilisateur :

Pour *Lactobacillus* : avec la souche *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* NFCB 206 ou ATCC BAA-52 (avec API 50 CHL Medium)

[illegible]

Pour *Bacillus* : avec la souche *Bacillus polymyxa* (*) ATCC 43865 (avec API 50 CHB/E Medium)

[illegible]

(*) *Bacillus polymyxa* identifié à *Paenibacillus polymyxa* sur API 50 CH et API 50 CHB/E Medium.

Résultats obtenus après incubation à 30°C.

Pour *Enterobacteriaceae* : avec la souche *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* ATCC 35567 (avec API 50 CHB/E Medium)

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
20	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+		
40	-	+	-	V	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	V	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+		

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA

NCFB: National Collection for Food Bacteria (=NCDO), Institute of Food Research, Reading Laboratory, Earley Gate, Reading RG6 6BZ ENGLAND

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

LIMITES DU TEST

- Toute identification d'espèces non répertoriées dans les bases de données API 50 CHL et API 50 CHB/E est sous la responsabilité de l'utilisateur.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.

RESULTATS ATTENDUS

Se référer aux Tableaux d'identification des milieux associés à cette galerie pour les résultats attendus des différentes réactions biochimiques.

PERFORMANCES

Se référer aux performances des milieux associés à cette galerie.

ELIMINATION DES DECHETS

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

BIBLIOGRAPHIE
TABLE DES SYMBOLES

P. II



 **bioMérieux® sa**
au capital de 11 879 045 €
673 620 399 RCS LYON
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11

Imprimé en France



Le logo est une marque déposée et protégée qui est la propriété exclusive de bioMérieux sa ou de l'une de ses filiales.

Références bibliographies

Références bibliographiques

A

Abdalli.I et Malek.S, (2017). Effets antimicrobiens de l'extrait à l'eau de *thymus vulgaris* (Thym) récolte dans la région de Naama sur la croissance des germes spécifiques du yaourt : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, mémoire de master, faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.

Alais C., 1984. Science du lait : principes des techniques laitières. 4e Ed., SEPAIP. Paris. 814.

Anonyme ; 2014 .paquet hygiène. Com .règlement (CE) N° 853/2004 du parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant des règle spécifique d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale.

Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Cocaïgn-Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M., 2008. Métabolisme et ingénierie métabolique. In :Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier.Paris. 271-447

Axelsson L (2004). Classification and Physiology. In Lactic Acid Bacteria – Microbiology and functional aspects. Edited by S. Salminen, A.v. Wright et A; Ouwehand. Marcel Dekker, Inc. 1-66.

B

Belarbi.F,2011 ;Isoloment et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes, Mémoire de Magister ,Université d'Oran Es SENia Faculté des sciences .p 16.

Bekaddouri.K et Belayachi.A, (2020). Isolement et identification des bactéries lactiques à partir de blé fermenté type « Hammoum », mémoire de master, faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.

Bekhouché, F. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase, thèse de doctorat. Université de Mentouri Constantine institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro- alimentaires, 149p.

Références bibliographiques

- Bekhouche F. et Boulahrouf A.,** 2005. Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant a six stations d'élevage de Constantine. Sciences & Technologie., 23: 38-45
- Belaidouni.N,** (2017). Interactions des bactéries lactiques vis-à-vis à des bactéries pathogènes, mémoire de master, faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.
- Bencheba.K,** (2021). Identification et caractérisation de la flore d'intérêt technologique des bactéries lactiques du lait de vache, mémoire de master, département de Sciences Alimentaires, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, n°58 p 3
- Benhedane.N, Bachtarzi.N,** (2012). Qualité microbiologiques du lait cru destine à la fabrication d'un camembert dans une unité de l'est algérien, mémoire de master, institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaire, université Mentouri Constantine, n° 83 p 13.
- Benslimane.B,** (2019). Etude de quelques propriétés technologiques des bactéries lactiques isolées à partir d'un lait cru de vache, mémoire de master, faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem..
- Billon. P.** (2009). Traite des vaches laitières : matériel, installation, entretien. France agricole. Paris. p 555.
- Boukhalfa.k,** (16-07-2019). Qualité physicochimique et microbiologique du lait cru de vache des races bovines locales et importées, mémoire de master, département de Biologie. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, n°55 p 2.
- Bordjiba.K, Bounab.Y et Zeghdoudi.k** (2020). Recherche et identification des bacilles thermophiles dans le lait de vache pasteurisé et le lait recombinaé pasteurisé, mémoire de master, faculté des sciences de la nature et de la vie et science de la terre et de l'univers, université 8 MAI 1945 Guelma,.n° 74 p 4.
- Boudali.R,** (2020). Contrôle physicochimique et microbiologique du lait cru de vache au niveau de la laiterie Giplait Mostaganem, mémoire de master, Faculté des sciences de la nature et de la vie Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.
- Boudjema K..** (2008). Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum par streptococcus thermophilus. Mémoire de magister.Université M'Hamed Bougara Boumerdès.
- Bouhoun.A, Mansouri.A,** (2020). Qualité du lait de la laiterie GIPLAIR, mémoire de master, Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université de Mostaganem, n°54 p15.

Références bibliographiques

Bouricha.H, (2018). Caractérisation du lait cru de la ferme expérimentale de Hassi-Mamèche :Précisément la flore thermophile et mésophile, mémoire de master, faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.

Boulefrek.A, Lakehal.H , (2020). Les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques du lait de vache, brebis et chèvre, mémoire de master, faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.

Bouziane.F et Chaoui.B, (2021). Biopréservation des aliments par les bactéries lactiques à caractère antifongique, mémoire de master, faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.

Bourgeois C.M. et Larpent J.P (1990). Microbiologie alimentaire. T.2. Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Ed. Tec et Doc, Lavoisier (Paris), 523p

Brahimi, S. (2015). Isolement et Caractérisation Biotechnologiques des Bactéries Lactiques Isolées à Partir des Margines d'Olives «AMOREDJ » Fermentés, thèse de doctorat. Université d'Oran1 Ahmed Ben Bella, Faculté de science département de biologie, 203p

C

Carr, F., J., Chill, D., et Maida, N. (2002). The lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. Critical Rev .Micribiol .,28 :4,281-370.

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

Collins M.D., Farrow J.A.E., Phillips B.A., Fergus S. et Jones D., 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. Int. J. Syst. Bacteriol., 37: 310-316.

Conte.S, (2008). Evolution des caractérisatiques organoleptiques, physico-chimiques et microbiologiques du lait caille traditionnel, mémoire de magister. Ecole Inter-Etats des sciences et médecine vétérinaires, Faculté des sciences et Techniques. Université cheikh Anta Diop de Dakar.

Corrieu G, Luquet FM, (2008). Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Collection « Sciences et Techniques Agroalimentaires ». 2ème éditions. P83

Chemlal-Kheraz, D. (2013). Isolement et identification phénotypique des bactéries lactiques isolées du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et mise en évidence de leur potentiel probiotique, thèse de doctorat. Université d'Oran faculté des science département de biologie, 217p

Références bibliographiques

Cheriguene Abderrahim, 2008. Caractérisation et Etude du Potentiel Technologique des Bactéries Lactiques isolées à Partir du Lait de Chèvre de l'Ouest Algérien. Thèse de Doctorat en Microbiologie Alimentaire et Industrielle. Université d'Oran Es-Senia

Chilliard Y. et Sauvant D. (1987). La sécrétion des constituants du lait in le lait, matière première de l'industrie laitière. INRA-CEPIL. Paris. 13- 26.

Cuq J.L., (2007). Microbiologie Alimentaire. Edition Sciences et Techniques du Languedoc. Université de Montpellier. P: 20-25.

D

Dahou A. E., 2017. Etude de l'évolution de la flore microbienne indigène d'un fromage industriel à pâte molle type camembert au cours de son affinage et évaluation de ses aptitudes technologiques. Thèse de doctorat en Sciences agronomiques, spécialité Production et Biotechnologie animale,

DAHOU A, HOMRANI A, BENSALAH F, BEKADA A et MEGHOUFEL N., (2016). Caractérisation phénotypique et génotypique de deux *Lactobacillus* isolés d'un fromage traditionnel frais type J'ben, *Afrique SCIENCE*, p14 – 22.

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Abdelhamid Ben Badis - Mostaganem. P 99-100.

De Man, J., Rogosa, M. et Sharpe, M.E., 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*, *J. Appl. Bacteriol.*, 23:130-135

Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M.C., Janssens D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques In *Bactéries lactiques*. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Lrica. pp 25-70

DEVOYOD, J.J., POULLAIN, F., (1988). Les *leuconostocs*: propriétés, leur rôle en technologie laitière. *Lait*, p249–280.

Diao M. (2000). La qualité du lait et produits laitiers. Institut Sénégalais de recherches agricoles. Edition GRET/ ENDA-ERAF Dakar. pp :1-7.

Djidoul.L., (2019). Contrôle microbiologique du lait cru et lait pasteurisé de l'unité de Zelfana, mémoire de master, Institut de Technologie, Université Akli Mohand Oulhadj Bouira, n°31 p 5.

Références bibliographiques

E

Eom H-J., Seo D.M., Han N.S., 2007. Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* spp. producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. *Int .J. Food Microbiol.*, 117: 61-67

F

FAO. 2006. World reference base for soil resources 2006. A framework for international classification, correlation and communication. Rome, FAO

FAO. (2019). Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), Le lait et les produits laitiers.

Favier J.C.,(1985). Composition du lait de vache-Laits de consommation, <http://www.horizon.documentation.f>.

Ferraoun.M, (2020).Comparaison entre une fabrication fromagère à pâte molle « camembert » de type traditionnel et de type stabilisé, mémoire de master, faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.

Franworth E. et Mainville I ., (2010). Les produits laitiers fermentés et leur potentiel thérapeutique, Centre de recherche et de développement sur les aliments.

Franciosi Elena, Settanni Luca, Cavazza Agostino, Poznanski Elisa, 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal.*, 19: 3-11

Fredot. E., (2006). Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. Lavoisier: 25 (397 p).

G

Garvie E.I., 1986. Gram positive cocci - Genus *Leuconostoc*. In: *Bergeys'Manual*, 9th edit., the Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp: 1071-1075

Giraffa G., Carminati D., Neviani E., 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.*, 60: 732-737

Guiraud JP (1998) ''Microbiologie alimentaire''. Technique et ingénierie, série Agroalimentaire. Paris, pp. 652. Guiraud JP, Galzy P (1980) L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Editions de l'usine nouvelle. Paris, pp. 239.

Guiraud JP., 2003. Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. Paris, pp : 136-139

Références bibliographiques

Gurira O.Z., Buys E.M., 2005. Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. *Food Microbiology*., 22: 159-168

Ghaoues.S, (2011). Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien, mémoire de magister, Institut de la Nutrition, de l'alimentation et des Technologies Agro-Alimentaire. Université Mentouri-Constantine, n° 187 p12.

GHAOUES S, (2011). Thèse de Magister:Evaluation de la qualité physico -chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien

Ghozlane et Benazzouz.D, (28-06-2012). Isolement et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arôme (diacétyl), mémoire de magister, faculté des Science Alimentaire.Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie El-Harrache Alger, n°138 p 11.

H

Haddaji M (2006). Caractérisations technologiques des bifidobactéries à intérêt thérapeutique. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran Algérie.

Hemme Denis, Foucaud-Scheunemann Catherine, 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*., 14: 467-494

Ho, T.N.T., Tuan, N., Deschamps, A &Caubet, R. (2008). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the New chua fermented meat product of Vietnam, Int.Workshop on Food Safety and Processing Thechnology .

Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. et Huis. in't. Veld, J. H. J., 1997: Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 85-101.

Holzapfel W.H., Franz C.M., Ludwig W. and Dicks L.M.T.. 2009. Genus *Pediococcus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes*. Second Edition. Volume Three. Springer.

J

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

Références bibliographiques

Joffraud J.-J., Cardinal M., Cornet J., 2006. Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 51-61.

Joffin, J.N and Layeral,G., (2006).Microbiologie technique. Tom 1. Dictionnaire des techniques. Bordeaux, France: Centre Régional De Documentation Pédagogique, 368

Joffin, C., Joffin, J.N. (2010). Microbiologie alimentaire. CRDP d'Aquitaine. Bordeaux. p 344.

JORA N°39 (2017). Critères microbiologiques relatifs à certaines denrées alimentaires: légumes, fruits, végétaux et produits à base de végétaux.

JORA (Journal Officiel de la République Algérienne). N°69. 1993. Spécifications et la présentation de certains laits de consommation, pp17-18.

K

KABIR. A, (2015). Thèse de Doctorat: Contraintes de la production laitière en Algérie et évaluation de la qualité du lait dans l'industrie laitière (constats et perspectives).

Kandler, O. & Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus* .In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ed. P.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt pp. 1208 1234. Baltimore: Williams & Wilkins.

Kandler O., Weiss N., (1986). Regular, non-sporing gram-positive rods In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G., Williams and Wilkins (Eds), Baltimore, 2: 1208-1234

Kara.s, Mehieddine.T, (2020). Etude de la qualité physico-chimique et microbiologique des laits commercialisés dans l'ouest d'Algérie-Mostaganem-, mémoire de master, Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université de Mostaganem, n°40 p 16.

Kacem M., Zadi-Karam H., Karam N-E., 2002. Bactéries lactiques isolées de lait de vaches, de brebis et de chèvre de l'Ouest Algerien. *Renc. Rech. Ruminants*, 9: 375

Kebchaoui.J.(2013). Le lait compositions et propriétés, p37.

Ketrouci.L,2021,Etude physico-chimique et microbiologique du lait de brebis collecté dans différentes régions d'Algérie, détermination de la flore lactique et des caractéristiques technologiques des bactéries lactiques, Thèse doctorant ,UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS – MOSTAGANEM,Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Domaine : S.N.V Filière : Sciences Agronomiques Spécialité : Production et Biotechnologie Animales.p35.

Références bibliographiques

L

- La DILA** (2012). Collecte de lait cru et fabrication de produits laitiers. N°5957 Les éditions des Journaux officiels France 336p 22.
- LABIOUI H, ELMOUALDI L, BENZAKOUR A, EL YACHIOUI M, BERNY E ET OUHSSINE M (2005)**. "Etude physicochimique et microbiologique de laits crus." Bull. Soc. Pharm. Bordeaux p148 : 7-16.
- Lamontagne Michel Claud P, Champagne J, Reitz A, Sylvain M, Nancy G, Marysel, Julie J et Ismail F.**(2002).Microbiologie de lait. Science et technologie de lait École polytechnique deMontréal.
- LARPENT J.P.**, 1996. Microbiologie alimentaire. Tec & doc, Lavoisier. Paris. 10-72.
- LAFARGE V., OGIER J.C., GIRARD V., MALADEN V., LEVEAU J.Y., GRUSS A. and DELACROIX-BUCHET A.**, 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. Applied and Environmental Microbiology.
- Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S. and Wright A.V.** 2012. Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects Fourth edition Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York
- Lazar.L,** (2014). Effet de l'alimentation de la vache sur la qualité du lait, mémoire de master, faculté des sciences de la nature et de vie. Université de Abobakr Belkaid Tlemcen.
- Leseur.R, Melik.N.**(1990). Chapitre1 : lait de consommation dans : Lait et produits laitiers de vache volume (2). Edition : Tec et Doc. La Voisier, Paris.
- Leveau, J.Y., Boiux, M., De roissart, H.B.** 1991. La flore lactiquedans : *technique d'analyse et decontrôledanslesindustries agroalimentaires*.2eed.,Tec&Doc,Lavoisier. Paris, p 3.
- Leveau, J.Y et Bouix,M.** 1993. Microbiologie industrielle dans : *les microorganismes d'intérêtindustriel*. Tec&doc, lavoisier.Paris , p85-87.
- Leroy F. et De Vuyst L.**, 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Tre.FoodSci. Technol. 15 : 67-78.

M

- Mahaut M, Jeantet R et Brule G,** (2005). Initiation à la technologie fromagère. Tec & doc lavoisier. P194.
- Mathieu, J.** (1998). Initiation à la physicochimie du lait. Paris: Tec et doc Lavoisier.
- Mathieu** 1998 : initiation à la physico-chimique du lait ED. Tec et Doc .Lavoisier. Paris.

Références bibliographiques

Meghoufel,N. Etude de la diversité taxinomique et technologique des bactéries lactiques isolées au cours de la production de Jben et approche moléculaire de leurs interactions au microcosme fromager. Thèse de doctorat : université ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM;2019

Mekhaneg.B, (2020). Variation de la composition du lait en fonction de la race et de l'alimentation : aptitude à la coagulation par une protéase purifiée extraite du proventricule de dinde (*Meleagris gallopavo*), thèse de doctorat, faculté des Science Alimentaire. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie El-Harrache Alger.

Morsli.N, (2016). Caractéristiques phénotypiques et aptitudes technologiques de bactéries lactiques isolées à partir du lait de brebis, mémoire de master, faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.

Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M..2010. Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Blackwell. Publishing. 13.

N

Neze Chaib.M, (2019). Contrôle de l'intégration de lait cru demi écrémé (15 g/l) dans le lait pasteurisé conditionné (LPC) : cas de la laiterie Giplait Mostaganem, mémoire de master, faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.

Novel G., 1993. Les bactéries lactiques In Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau J-Y., Bouix M. Tec & Doc, Lavoisier, pp : 170-374

P

Pellerin P (2001). Mise au point Intérêt nutritionnel de lait de chèvre connaissances actuelles et perspectives. Fr.59 :51-62

Pilet M.F., Magras C. et Federigh M.. (2005). Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.

Pougheon et Goursaud, 2001. Le lait et ses constituants caractéristiques Physico-chimiques», In : DEBRY, G. Lait, nutrition et santé, Tec & Doc, Paris, 342 p.

Providence.M, (2016). Analyse physico-chimique et microbiologique du lait caillé produit dans le groupement de miti et commercialisé dans la ville de Bukavu, mémoire de master, Université Evangélique en Afrique-Ingénieur A1.

Références bibliographiques

R

Raynaud S., 2006. Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'auto acidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de doctorat Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries; Université de Toulouse. 27-35

S

Salminen, S., Playne, M. Et Lee, Y. 2003. Successful probiotic lactobacilli: human studies on probiotic efficacy. Shortt.C et O'Brien.J. Handbook. Function. Dairy. Prod , 2003, p13-21

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

Sondergaard A.K., 2005. Application of probiotics in food. In Bactéries lactiques et probiotiques. Luquet Francois-Marie, Corrieu Georges. Tec & Doc, Lavoisier, pp: 195-209

Schillinger U., Lücke F-K., 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. Food Microbiology., 4: 199-208

Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Bälz R., Collins M.D., Fischer W., 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. Syst. Appl. Microbiol., 6: 183-195

Schleifer K.H., Stackebrandt E., (1983). Molecular systematics of procaryotes. Annu. Rev. Microbiol., 37: 143-187.

Sharpe, M.E. (1981). The genus *Lactobacillus*. In The Procaryotes, Vol II. ed. M.P. Stan, H. Stolp, H.G. Truper, J.A. Balonis and H.G. Schlegel pp. 1614 1630. New York: Springer-Verlag.

T

TAHLAITI, H. (2019). Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté, Thèse de doctorat. Université Abdelhamid ibn badis Mostaganem, faculté des sciences de la nature et de la vie, p16.

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

Tormo H., 2010. Diversité des flores microbiennes des laits crus de chèvres et facteurs de variabilité. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en pathologie, toxicologie, génétique et nutrition. Université de Toulouse. p 28, 31-34.

Références bibliographiques

V

Vignola C. (2002). Science et Technologie du Lait Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada

Vignola C., (2002). Sciences et technologie du lait : la fraction de technologie laitière du Québec-ing. p. 25, 58, 61, 89, 90, 144, 145. Ed. École polytechnique de Montréal..

VEISSEYRE, (1979), La technologie du fromage. 3^{ème} édition. La maison rustique, 701p

Table de matières

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexe

Introduction.....1

Chapitre I :Partie bibliographique..... 3

1. Généralités sur le lait.....	4
1.1. Définition du lait	4
1.2. Composition	4
1.3. propriétés du lait.....	7
1.3.1. propriétés organoleptiques	7
1.3.2. Propriétés physico-chimiques.....	8
1.3.3. Propriétés microbiologiques.....	10
1.4. Les microflores du lait.....	10
1.4.1. Flore indigène ou originelle	10
1.4.2. La flore de contamination.....	11
1.4.3. La flore d'altération.....	11
1.4.4. La flore pathogène.....	11
1.5. Les différents types de lait.....	11
2. Les bactéries lactiques.....	15
2.1. Historique des bactéries lactiques	15
2.2. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques	15
2.3. Origine.....	16
2.4. Taxonomie et classification des bactéries lactiques	16

2.5.	Voies métaboliques des bactéries lactiques.....	18
2.6.	Les différents genres de bactéries lactiques	19
2.6.1.	<i>Lactobacillus</i>	19
2.6.2.	<i>Carnobacterium</i>	21
2.6.3.	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> et <i>Vagococcus</i>	21
2.6.4.	<i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	23
2.6.5.	<i>Aerococcus</i> , <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	25
2.6.6.	<i>Bifidobacterium</i>	26
2.7.	Méthode d'identification des bactéries lactiques	26
2.7.1.	Méthode classique	27
2.7.2.	Identification moléculaire.....	27
2.7.3.	Intérêt des bactéries lactiques	28
2.7.3.1.	Dans l'industrie alimentaire	28
2.7.3.2.	Dans le domaine thérapeutique	29
Chapitre II : Matériels et méthodes.....		15
1.	Objectif.....	31
2.	Lieu et période de l'étude	31
3.	Provenance des échantillons.....	32
4.	Analyses physico-chimiques d'échantillon de lait de vache	32
4.1.	Mesure du pH	33
4.2.	Détermination de l'acidité titrable.....	33
5.	Analyses microbiologiques d'échantillon de lait de vache	34
5.1.	Milieux de culture	34
5.2.	Isolement et purification des bactéries lactiques	34
5.2.1.	La préparation des dilutions.....	34
5.2.2.	Isolement des bactéries lactiques	35
5.2.3.	Dénombrement des bactéries lactiques.....	35
5.2.4.	Purification	36
5.3.	Pré-identification phénotypique des bactéries lactiques	37
5.4.	Coloration de Gram	38
5.5.	Test catalase	38
6.	Technique de conservation.....	39
6.1.	La conservation à courte terme	39
6.2.	La conservation à long terme	39
7.	Etude des caractéristiques physiologiques et biochimiques.....	39
7.1.	Croissance à différentes températures	39

7.2.	Test de la thermorésistance	40
7.3.	Test de croissance à différents pH.....	40
7.4.	Culture sur milieu hypersalé.....	40
7.5.	Type de fermentaire.....	40
7.6.	Hydrolyse de l'esculine	41
8.	Identification des bactéries lactique par la galerie API 50CHL	41
Chapitre III :Résultats et discussions.....		44
1.	Résultats.....	44
1.1.	Etude physico-chimique du lait	44
1.2.	Les analyses microbiologiques	45
1.2.1.	Isolement des bactéries lactiques.....	45
1.2.2.	Dénombrement des boites exploitable.....	46
1.3.	Purification des isolats	46
1.3.3.	Pré-identification des isolats.....	47
1.4.	Etude des caractéristiques physiologiques et biochimiques	49
1.4.1.	Croissance à différentes températures	49
1.4.2.	Test de thermorésistante	50
1.4.3.	Test de croissance à différents pH	50
1.4.4.	Culture sur milieu hypersalé.....	51
1.4.5.	Type fermentaire.....	52
1.4.6.	Hydrolyse de l'esculine	52
1.5.	Identification par les galeries API	54
2.	Discussions	57
2.1.	Propriétés physicochimiques de lait de vache	57
2.2.	Isolement et identification des bactéries lactiques.....	58
Conclusion.....		60
Les annexes.....		61
Références bibliographies.....		68