

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDE

Présenté par

Hama Hanane

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Production et Transformation Laitières

THÈME

**Etude de la flore lactique de blé
traditionnellement fermenté « Hamoum »**

Soutenu publiquement le 18/09/2019.

DEVANT LES MEMBRES DU JURY

Président	Dr Boucherf	<i>Docent</i>	<i>U. Mostaganem</i>
Encadreur	Dr TAHLAITI Hafida	Maitre-Assistante A	<i>U. Mostaganem</i>
Examineurs	Dr DAHOU A.EL.Amine	Maitre-Assistant A	<i>U. Mostaganem</i>

*Travail réalisé au laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales.
Année universitaire 2018-2019*

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme. Tahlalti. Un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis, vous avez toujours été présente. Que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond respect.

Ma gratitude revient à Mr Boucherf, d'avoir bien voulu accepter de présider mon jury. Vous avez bien voulu porter à ce travail un intérêt, je vous prie de croire en mon éternel respect et ma sincère gratitude.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Mr Dahou, pour sa gentillesse, sa disponibilité, son enseignement et de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette soutenance.

Nos profonds remerciements vont également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Nos sincères remerciements s'adresse à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenu de près ou de loin principalement au responsable du laboratoire (LSTPA), le professeur Mr Homrani ainsi qu'à l'ingénieur Mr Benharrat.

Dédicace

Je dédie ce mémoire de fin d'étude,

A ma mère

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour ma formation

A Mon père

Mon exemple éternel que dieu te garde dans son vaste paradis.

A Mes chères sœurs et mon frère, sans vos encouragements ce travail n'aurait vu le jour.

A tous les membres de ma famille

.

Je dédie ce travail pour vous en espérant la réussite et le succès.

Résumé

Les grains de blé appelé « hamoum » est un blé qui a passé un long séjour dans un silo souterrain. Notre étude s'est intéressée aux bactéries lactiques isolées à partir de ce substrat. Vingt isolats ont été retenus après une observation macroscopique, microscopique et la catalase. Ensuite ces isolats ont subi une série de tests (croissance à différents pH, à différentes températures, hydrolyse de l'arginine (ADH), thermorésistance, effet NaCl, croissance sur le lait bleu de Sherman, test de profil fermentaire, production de dextrane, fermentation des sucres.) Les résultats montrent que la flore lactique montre une diversité assez large quant aux bactéries lactiques dont la distribution est comme suit : *Lactobacillus* (30%), *Pediococcus* (15%), *Enterococcus* (15%), *Lactococcus* (25%), *Streptococcus* (15%).

Mots clés : blé fermenté, Hamoum, bactéries lactiques, pré-identification .

Abstract

Wheat grains called « Hamoum » is a wheat that has spent a long time in a an underground silo .Our study was interested in lactic acid bacteria isolated from this substrate .Twenty isolates were selected and pre-identified by conventional phenotypic methods using the different usual tests (catalase test ,gram stains ,growth at differnt PH ,growth at different temperature ,Acétoin ,hydrolysis (ADH),thermoresistance,Nacl effect ,growth on sherman blue milk ,fermentation profile test,dextran,fermentation of sugar) the results show that it essentially belongs to

Lactobacillus (30 %), *Pidiococcus* (15%), *Enterococcus* (15%), *Lactococcus* (25%), *Sterptococcus* (15%).

Key words: Hamoum, lactic bacteria .fermented wheat .Pre identification .

المخلص

بذور القمح « الحموم » هو القمح الذي قضى وقتا طويلا في صومعة تحت الأرض د راستنا مهتمة بكتيريا البنية معزولة عن هذه الركيزة 20 معزولة تم اختيارها عن طريق الا سلوب المظهرى الكلاسيكى باستخدام مختلف الاختبارات اختبار كتالاز تلوين القواعد النمو فى مختلف الحمض القاعدى نمو درجات الحرارة المختلفة نمو درجات الحرارة المختلفة اسيتوين لتحلل المائي الارجنين المقاومة الحرارة نمو ازرق على حليب شيرمان الأزرق اختبار التخمر الشخصي ديكستران تخمير السكر تظهر النتائج انه ينتمي اساسيا *Lactobacillus*(3%, *Pidiococcus*(15%), *Enterococcus*(15%), *Lactococcus*(25%), *Sterptococcus*(15%)

مفتاح الكلمات بكتيريا البنية الحموم قبل التعريف القمح المخمر

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ADHE : alcool déshydrogénase

ATP : L'adénosine triphosphate

BH : Bactérie de hamoum

BHC : Bactérie de hamoum coque

BHL : Bactérie de hamoum bacille

BL : Bactérie lactique

En : *Entérocooccus*

Lc : *Lactococcus*

Lb : *Lactobacillus*

Ln : *Leuconostoc*

FBA: **Lfractose** -1, 6-biophosphat aldolase (FBA) .

LDH :Lactate déshydrogénase

PFL :Pyruvate formiate lyase

Liste des figures

Liste des figures

Figure 01 : Structure du grain de blé	13
Figure 2 : Forme d'une matmora	14
Figure 3 : Aspect de blé fermenté	15
Figure 4 : Arbre généalogiques des bactéries lactiques	20
Figure 5 : Image au microscope électronique à balayage de certains <i>Lactobacillus</i>	23
Figure 6 :Aspect de <i>Streptococcus thermophilus</i> , au microscope	24
Figure 7 : Morphologie de <i>Lactococcus lactis</i>	25
Figure 8 : Aspect de <i>Enterococcus faecalis</i>	26
Figure 9 : Aspect de <i>Leuconostoc</i>	27
Figure 10 : Morphologie en microscopie électronique	28
Figure 11 : Aspect de <i>Bifidobacteriu sp.</i>	29
Figure 12 : Types de fermentations	31
Figure 13 : Schéma de la fermentation des acides mixtes	32
Figure 14 : Dénombrement des bactéries lactiques isolées de hamoum	39
Figure 15 : Résultats macroscopiques	40
Figure 16 : Résultats des colonies	43
Figure 17 : Les proportion des bactéries lactiques isolées de hamoum.....	44
Figure 18 : Résultats des tests de croissance température	45
Figure 19 : Résultats des tests de croissance à différent pH.....	46
Figure 20 : Résultats du type fermentaire.....	47
Figure 21 : Résultats du test de NaCl	48
Figure 22 : Résultats du test thermorésistance	48
Figure 23 : Résultats du test de production d'acétoïne.....	49
Figure 24 : Résultats du test d'hydrolyse de l'arginine (ADH).....	49

Liste des figures

Figure 25 : Résultats du test de croissance le lait de Sherman à 0,1% de bleu de méthylène	50
Figure 26 : Résultats du test de croissance le lait de Sherman à 0,1% de bleu deméthylène.....	50
Figure 27 : Résultats du profil fermentaire.....	52
Figure 28 : Résultats de la répartition des isolats lactiques au niveau des genres.....	54

Liste des tableaux

Liste de tableaux

Tableau 1 : Composition en acide aminés essentiels de grain de blé dur (Brink et Belay , 2006).....	10
Tableau 2 : Distrubution des glucides dans les fraction de blé (g/100 grs)(Manay et shadakara swaniny ,2001).....	11
Tableau 3 : Principals caractéristique biologiques et métaboliques des bactéries lactiques (Axelsson , 2004).....	19
Tableau 4 : Résultats d'étude morphologique	42
Tableau 5 :Résumé des différents tests des souches lactique isolées	51
Tableau 6 : Résultats obtenus pour la fermentation des différents sucres	52
Tableau 7 : Récapitulatif des résultats des tests de pré-identification des bactéries lactiques	53

Sommaire

Résumé

Liste d'abréviations

Liste de figures

Liste des tableaux

Sommaire

Introduction09

I. Synthèse bibliographique

Chapitre I. Le blé fermenté

I.La production Algérienne du blé.....10

2.Composition biochimique du grain de blé10

2.1.Protèienes:.....10

2.2.Les glusides.....10

2.3.Les protides.....11

2.4.Les lipides.....12

2.5.Les vitamines.....12

2.6.Matières minèrales.....12

2.7.Les enzymes.....12

2.8.L'eau.....12

3.Composition morphologique13

4.Les systèmes de stockage de blé.....14

5.Facteurs favorisant l'altération des grains.....15

5.1.Influence de l'humidité :.....15

5.2.Influence de la température15

5.3.Influence de l'atmosphère confinée.....15

6.Matmora.....16

7.Caractéristiques fermentaires des ensilages.....17

Chapitre II. Les bactéries lactiques

11.1.Généralités.....	18
2.Habitat et origine des bactéries lactiques	18
3. Caractéristiques principales de bactéries lactiques.....	18
4.Classification des bactéries lactiques :.....	20
5.Taxonomie des bactéries lactiques.....	21
6.Les différents genres :.....	21
6.1. <i>Lactobacillus</i> :.....	21
6.2. <i>Carnobacterium</i>	23
6.3. <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> et <i>Vagococcus</i>	24
6.4Le Genre <i>Streptococcus</i>	24
6.5. Le Genre <i>Lactococcus</i>	25
6.6.Le Genre <i>Enterococcus</i>	26
6.7. <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	26
6.8.L'espèce <i>Leuconostoc oenos</i> isolée.....	27
6.9. <i>Aerococcus</i> , <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i> :.....	28
10.6.Le Genre <i>Bifidobacterium</i>	29
7 .Métabolisme des bactéries lactiques :.....	30
7.1.Principales voie fermentaires des bactéries lactiques.....	30
7.1.1.Voie homofermentaire	32
7.2.Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate :.....	33

Chapitre III : Matériel et méthodes

1. lieu de travail.....	34
2. Objectif de ce travail :.....	34
3.Lieu de prélèvement.....	34
4. Isolement des Bactéries lactiques :.....	34
4.1.Suspension mère et dilutions décimales :.....	34
4.2.Ensemencement	34
5. Dénombrement des bactéries lactiques :.....	35
6 .pré-identification des isolats.....	35
7. test de catalase.....	35

8.La purification.....	36
9. Conservation des souches :	36
9.1.Conservation à court terme :	36
10. Identification.....	36
10.1.Etude physiologique et biochimique.....	36
10.1.1Test de croissance à différentes températures :	36
10.1.2. Test de croissance à différentes ph :	36
10.1.3.Recherche de type fermentaire	37
10.1.4. Effet de NaCl.....	37
10.1.5.Test de la thermorésistance.....	37
10.1.6.Recherche d'acétoine.....	37
10.1.7.Recherche de l'hydrolyse d'arginine (ADH)	38
10.1.8.Croissance sur le lait de sherman :	38
10.1.9.Production de d'extrane.....	38
10.1.10.Test de fermentation des sucres	38

Chapitre III :Résultats et discussion

1.Dénombrement	39
2.Etude,macroscopique.....	40
3.Résultats d'étude morphologique.....	42
4.Etude microscopique.....	44
4. Résultats d'identification physiologique et biochimique	45
4.1.Test de biochimique et phisiologieque	45
4.1.1. Croissance à différentes températures	45
4.1.2 .Test croissance à différent Ph	46
4.1.3. Le type fermentaire.....	47
4.1.4.Test Nacl	48
4.1.5 .Test thermorésistance	48
4.1.6.Production d'acétoine	49
<u>4.1.7.Haysrolyse de l'arginine (ADH)</u>	49
4.1.8. Croissance sur le Lait bleu de Shermen	50
4.1.9 . Production de dextrane	50
4.1.10..fermentation de sucre.....	52

5.Récapitulatif des résultats des tests.....53

6.Discussion56

Conclusion

1.Conclusion.....57

Référence bibliographique.....65

Annexe.....68

Introduction

Introduction

Introduction :

le blé est considérées comme les produit alimentaires les plus importants pour une large part de la population algérienne (**Benbelkacem ,2007**) . ont la plus cultivée par le monde et ses produits sont très importants dans la nutrition humaine , (**Alfonso et al ,2013**) .

le blé récolté est conservé dans les silos souterrains «matmoura» et son stockage revêt une grande importance .

Les systèmes de stockage utilisés nécessitent un contrôle de plusieurs en particulier la température et l'humidité (**Niquet , 2006**) . Le stockage souterrain est une méthode ancestrale utilisée pour constituer des réserves domestiques ,sociales et commerciales . Cette technique de stockage appelée « Matmora » (**Bartali et al , 1989**) .

Le mode de stockage de blé en Algérie est bien connu de la population , Il est utilisé à petites échelles au sein de certaine petite exploitations familiales en milieu rural et péri – rural de certaines régions de l'Algérie (Tiaret , Relizane , Mascara et Ghardaïa) .

En Algérie le grain de blé traditionnelle qui conservé dans les silos souterrains « matmoura » ,permet la prolifération de nombreux microorganismes qui entraînent la fermentation du blé ,dénommé «Hamoum » .

Le blé fermenté « Hamoum » est utilisé dans la préparation de pain et de couscous ,sont caractérisés par une variété de saveur, de texture et d'arômes particuliers pour la consommateurs des régions spécifiques (**Bekhoche et al ,2013**).

. la fermentation est un procédé ancestral et l'une des méthodes économique les plus utilisés dans la consommation et la transformation des matières alimentaire .

Parmi ces microorganismes associés au blé fermenté (**Gourchala et al, 2014**), les bactéries lactiques jouent un rôle dans la fermentation des matières premières animales et végétales .Elles sont omniprésentes dans la nature , et sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire . Les bactéries lactiques ont un rôle important dans la préparation , la conservation et la transformation de nombreux aliments fermentés , Elles jouent également un rôle important dans la fabrication de fromage et divers produits laitiers fermentés (**Stiles et Holzapfel , 1997 ,Ali ,2010**) .

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris notre étude afin de connaître l'influence de la fermentation due au stockage par la technique traditionnelle (Matmora) . Nous avons mis en place une collection des souches des bactéries lactiques isolées du hamoum par les méthodes phénotypiques classiques . de notre travaille nous avons isolées 20 Bactéries lactique a différente genre et sp

Introduction

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de science et Technologie de production Animal (LSTPA) de l'université A.Ibn .Badise de Mostaganem .

Notre travail est reparti en quatre chapitre :

- Le premier chapitre : une recherche bibliographique concernant le blé .
- Le deuxième chapitre : étude générale des caractéristiques des bactéries lactiques .
- Le troisième chapitre : La partie pratique présente le matériel et la méthodologie pour la réalisation de ce travail .
- Le quatrième partie concerne la présentation des résultats obtenus, ainsi que des commentaires et discussions .

Partie
Bibliographique

Chapitre I
Le blé fermenté

Le blé fermenté

I. La production Algérienne du blé :

Parmi toutes les espèces céréalières, les blés représentés respectivement par le blé dur et le blé tendre sont considérées comme les produits alimentaires les plus importants pour une large part de la population algérienne (**Benbelkacem, 2007**). En Algérie, les céréales constituent la base de l'alimentation elles présentent à elles seules 73.6% de l'apport calorique globale et fournissent en moyenne 80% des protéines totales consommées, la semoule issue du blé dur serait à l'origine de produits alimentaires de très divers plats et aliments traditionnels : couscous, pain, galette, pâtisserie, (**Feuillet, 2000; Jeantet et al., 2007**) frik, pâtes divers et gâteaux traditionnels (**Selmi, 2000**).

2. Composition biochimique du grain de blé :

Le grain de blé est principalement constitué d'amidon (environ 70 %), de protéines (10 à 15 %) et de pentosanes (8 à 10 %) ; les autres constituants, sont les lipides, la cellulose, les sucres libres, les minéraux et les vitamines (**Feuillet, 2000**)

2.1 Protéines :

Les gliadines et les gluténines représentent 80 à 95 % des protéines du blé globulines (**Roudaut et Lefrancq, 2005**)

Composition en acides aminés essentiels: Selon (**Brink et Belay (2006)**), le grain de blé dur est déficitaire en certains acides aminés comme le tryptophane et la méthionine et dans certaine mesure en lysine et en thréonine (**Tableau I**).

Tableau 1 :Composition en acides Aminés essentiels des grain de blé dur (**Brink et Belay,2006**).

Acide aminés	Composition en mg /100g
Tryptophane	176
Lysine	303
Méthionine	221
Phénylalanine	681
Théonine	366
Valine	594
Leucine	934

Le blé fermenté

Selon Manay et Shadakshara swamy (2001); Dunford (2012) les glucides présentent 60 à 80 % de la matière sèche du grain de blé. L'amidon est le glucide principal trouvé dans l'albumen, les sucres (oses, dioses et trioses) sont présents dans le germe, les glucides des enveloppes sont principalement la cellulose et l'hémicellulose (Tableau. II).

Tableau. II. Distribution des glucides dans les fractions de blé (g/100 grs) (Manay et Shadakara swaniny ,2001) .

GLUCIDES	Albumen	Germe	Enveloppes
Amidon	95,8	31 ,5	14 ,1
Sucres	1 ,5	36 ,14	7,6
Cellulose	0.3	16.18	35 ,2
Hémicellulose	2 ,4	15 ,3	43 ,1

2.2 Les glucides :

Les glucides contenus dans les céréales sont essentiellement de nature macromoléculaire; ils se présentent et galemment sous la forme de quelques sucres simples (Glucose, fructose, saccharose, etc.), mais surtout de composés plus ou moins complexes. Le plus important est l'amidon qui est la substance énergétique par excellence, facilement digestible (Cottyet Bhatnagar, 1994). Les parois cellulaires des céréales sont constituées principalement de cellulose, hémicellulose, pentosane et de lignine. Toutes ces molécules forment dans la paroi une structure à la fois résistante et plastique, rigide et évolutive qui garantissant la protection sans compromettre la croissance (Leloup et Buleon, 1991,).

2.3. Les protides :

Elles jouent un rôle important, tant du point de vue alimentaire que pour les différentes technologies de transformation des céréales. Les protides de blé sont essentiellement composés de protéines (8à12%). Les principales sont: des protéines de réserves insolubles plus abondantes: gliadines ou prolamines et les glutélines; des protéines solubles présentes en petite quantité: albumines et globuline (AlvesetXavier, 2002) Ces protéines constituent le gluten qui confère au blé

Le blé fermenté

ses propriétés panifiables. Malgré cette différenciation, le grain souffre de déficits importants en acides aminés: plus de 67% pour la lysine, plus de 40% pour l'isoleucine (**Lescar,2002**)

. Ces acides aminés sont donc des facteurs limitant du blé et leur déficit sera accru dans la farine. La teneur en protéines des grains varie selon l'espèce. Elle peut aussi être influencée par la fertilisation et les condition climatiques (**Lescar,2002**) .

2.4.les lipides :

Ils sont peu abondants dans les grains et sont fortement concentrés dans le germe. Leur teneur se situe autour de 2%. Certains sont libres, mais la majorité est associée aux protéines et à l'amylose (**Leygue, 1995**).

2.5. Les vitamines :

Ce sont des composés chimiques complexes, surtout concentrés dans le péricarpe et le germe à des teneurs très faibles. Les grains de blé contiennent surtout des vitamines du groupe B à l'exception de la vitamine B12 et sont dépourvus de vitamine D et A (**Bonneau 2003**).

2.6. Matières minérales :

Elles représentent 1,5 à 2 % du total de graine blé (**Nuret , 1991**). Les minéraux sont présents dans les grains de blé en faible quantité. Les principaux sont le phosphore, le potassium ,le manganèse et le cuivre. Ils sont souvent associés ou présents sous forme des sels tels que les phosphates de chlores ou de sulfates (**ITCF, 2003**) .

2.7. Les enzymes :

Ce sont aussi des substances complexes, mais dont le rôle est très important; Ils sont responsables des transformations que subissent les autres substances (hydrolyse de l'amidon et des protéines, destruction des sucres simples et des acides aminés)

(**Feuillet, 2000**) .

2.8.L'eau :

Les grains sont naturellement peu hydratés, leur teneur en eau varie avec le taux d'humidité de l'air. L'équilibre se situe entre 13 et 15%. Du point de vue chimique et physique, son action solvant favorise les réactions enzymatiques et les attaques microbiennes lorsque sa teneur dans le grain dépasse le seuil d'équilibre (**Feuillet 2000**) .

Le blé fermenté

3. Composition morphologique :

Morphologiquement le blé dur se différencie du blé tendre (olmedo1995 ;soltner,2005) le grain de blé dur est gros , de section triangulaire très riche en albumen et de texture vitreuse (soltner , 2005 , , 2006) .il possède un système racinaire assez développé par rapport à celui du maïs ou graminée (prats et Grandcourt , 1971 ; soltner , 2005 , Hadria , 2006) .

physiologiquement Hadria, le grain est constitué par le germe qui donne la plantule , l'amande appeler Endsperme ou albumen , tissu de stockage qui fournit au germe les réserves nécessaires pour sa Croissance et les enveloppes protectrices ou son , composée par la paroi de la graine (testa) et par La paroi du fruit (péricarpe) (Doumandji et al,2003) .

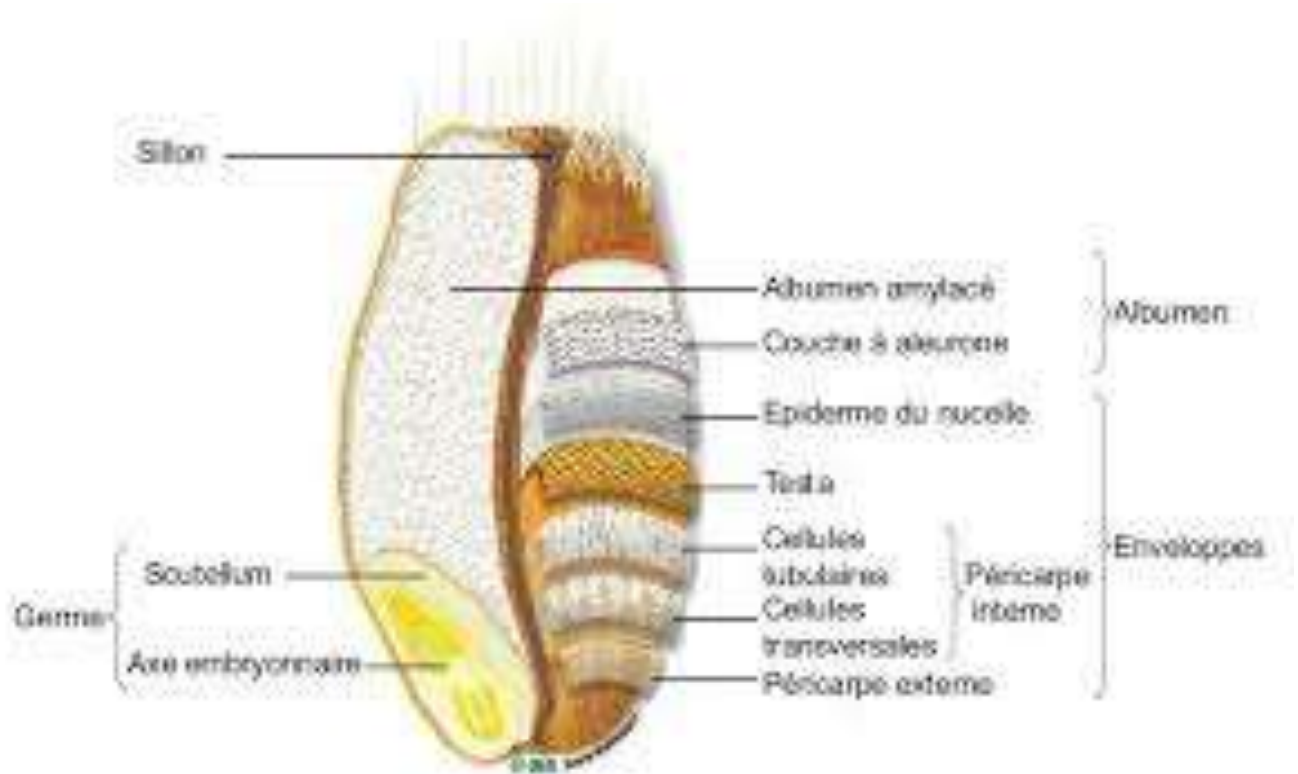


Figure 01 : Structure du grain de blé . D'après surget et Barron ,2005 .

Le blé fermenté

4. Les systèmes de Stockage de blé :

Le stockage adéquat des denrées agricoles est une partie intégrant de leur processus de production .Il est déployé pour assurer la sécurité alimentaire . Ainsi, il considéré comme un bouclier contre l'echec et la famine. Les modalités techniques de stockage ont évolué avec les une augmentation des capacités de stockage et une accélération des échanges. De nos jours, les silos modernes permettent de stoker plusieurs types de céréales en même temps (**Doumanji, 2003**) .

Il existe différents types de silos.

- ✓ Les silos aériens, en béton armé pouvant contenire de grande quantité de blé du fait de sa hauteur atteignant parfois 100 m (**Reimbert , 1982**) .Ces silos se prêtent à l'utilisation comme silos portuaires du fait de leur bonne consistance à la corrosion .
- ✓ Les silos métalliques de forme géométrique .Les greniers domestiques à base , à de terre , à armature de bombou ou en paille (**Kodio ,1989**) . Les grains sont conservés en épis ou en vrac, d' une capacité de 3 à 7 tonnes . Ils sont généralement surélevés pour éviter l'attaque des rongeurs.
- ✓ Silos souterrains appelé « Matmora » (**Figure 2**) . Le stockage souterrain des céréales est une technique largement utilisée en milieu rural dans plusieurs région céréalières du monde en général (**Bartali et Debbarh , 1991**) . Cette technique de stockage des céréales est appelé « Matmora » «La Matmora» présente une forme cylindrico –conique , cylindrique , sphérique ou amphorique (**FAO ,1994 . Bartali et al, 1989**) revêtue d'un enchevêtrement de paille de blé et d'orge où bien par des feuilles de plastique .

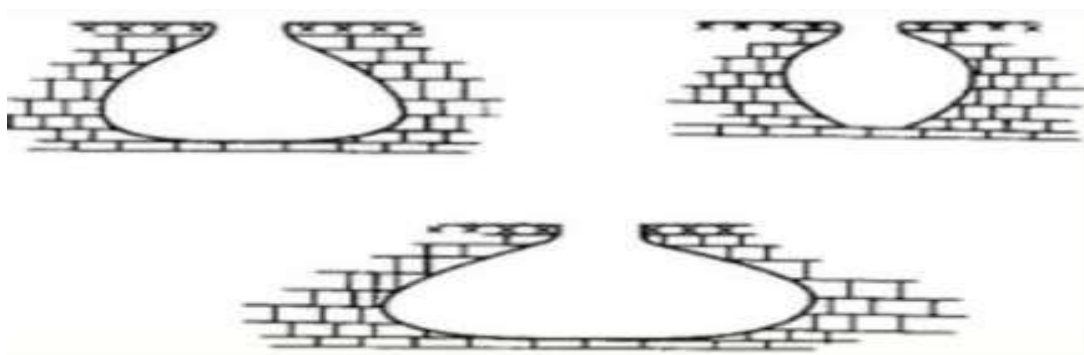


Figure 2 : Forme d'une matmora (**Baratali , 1987**) .

Le blé fermenté



Figure 3 : Aspect de blé fermenté (Bekhouche et al ; 2003) .

5.Facteurs favorisant l'altération des grains :

5.1. Influence de l'humidité :

La faible teneur en humidité est le facteur le plus important pour la conservation des grains lors du stockage . Les grains , stockés avec le contenu d'humidité élevé , sont soumis à des pertes élevées par l'attaque des insectes et les champignon (**Vàsquez et al ;2008**) . Elle favorise la respiration des grains et accentue en conséquence le dégagement de chaleur double pour chaque accroissement de 1,5 % de l'humidité du grain et donc que la durée probable de conservation d'un stock est diminuée de moitié .Les altération sont accentuée par le fait que les graines humides favorisent le développement des micro-organismes présents à la surface du grains (**Cruz et al , ; 2002**) .

5.2.Influence de la température :

La température joue un rôle important dans la conservation des grains (**Cruz et al , 2002**) .

Elle est le facteur le plus important qui affecte la qualité du grain au cours du stockage (**Kusińska , 2001**) . Elle intervient d'une part sur valeur de l'Aw et d'autre part , sur les vitesses des réactions chimiques et enzymatique et donc la croissance des microorganismes (**Richard-Molard , 1998**) .

5.3.Influence de l'atmosphère confinée :

La respiration des grains stockés dans une structure étanche appauvrit l'atmosphère interstitielle en oxygène et l'enrichit en gaz carbonique .Cette modification de la composition des gaz du milieu peut bloquer le développement des moisissures et détruire les insectes présente .Ce principe est appliqué

Le blé fermenté

dans les méthodes de stockage souterrain (fosses) pratiquées de manière traditionnelle. Cependant, si les grains sont emmagasinés avec une humidité excessive, des risques de

fermentation apparaissent et donnent lieu à des pertes importantes qui peuvent atteindre l'ensemble du stock (Cruz *et al*, 2002).

5.4. Influence de la composition du grain :

La structure anatomique des grains de blé, leur composition biochimique (Richard –Molard, 1998) et l'état physique, influent sur la croissance et l'activité des microorganismes (Cahagnier, 1998).

➤ Le temps :

La vitesse s'accroît en fonction de la durée de stockage par suite de l'accumulation de conditions de plus en plus défavorables.

➤ La teneur en O₂ et CO₂ :

Ce facteur intervient sur la nature des métabolismes aérobie et anaérobie (des grains, insectes acariens).

6. Matmora :

La technologie de stockage des céréales dans les entrepôts souterrains « Matmora » une localité souterraine, sous forme sphéro – tronconique, creuse généralement à l'entrée de la maison au voisinage.

6.1. Avantages des matmoras :

- La technique de stockage souterrain présente plusieurs avantages.
- Température basse et constante Dans un entrepôt souterrain le produit se trouve à une température constante voisine de 20°C contre 30°C et 40°C à l'extérieur, cette stabilité thermique permet d'éviter des migrations d'eau qui peuvent rendre la conservation des grains médiocre.

7. Caractéristiques fermentaires des ensilages :

Dès sa mise en silo, le blé subit un certain nombre de transformations dont les plus importantes sont : La dégradation par les enzymes de la graine d'une fraction plus ou moins importante des protéines jusqu'au stade acides aminés, la protéolyse étant d'autant plus importante que la

Le blé fermenté

diminution du PH est lente ,les acides aminés sont ensuite dégradés en ammoniac par la flore de l'ensilage (**Gouet et Fatianoff, 1965**), la transformation par les microorganismes qui se développent dans l'ensilage de la totalité ou presque, des glucides fermentescibles du blé , c'est –à-dire essentiellement des glucides solubles , en acide lactique , acide gras volatils .

Chapitre II
Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques

II. Généralités :

Les bactéries lactiques sont très anciennes et sont apparues avant les cyanobactéries, Il ya près de 3 milliards d'années (**Tailliez ,2001**) , Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des millénaires dans l'alimentation humaine(**Penaud , 2006**) , La découverte de leur action fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de levains , simple récupération d'une partie du milieu de fermentation .

La première culture pure était des *Bacterium lacti* sp probablement des *Lactococcus lactis* , obtenue par **Lister** en 1873 (**Ho , 2008**) . Les bactéries lactiques ont été isolées pour la première fois à partir du lait (**Metchnikoff , 1998 ; Sandine et al, 1972 ; et carr et al ,2002**) . Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivante, procaryotes, hétérotrophes et chimio- organotrophes (**De Roissart ,1986**) .

2. Habitat et origine des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux ou des alimentsensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (**Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001**).

3. Caractéristiques principales des bactéries lactiques:

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par **Orla-Jensen (1919)** et réuni plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Novel G., 1993**).

Les bactéries lactiques colonisent de nombreux produits alimentaires tels que les produits laitiers, la viande , les végétaux , et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (**Dortu & Thonart , 2009**) .Elle sont un groupe de bacilles ,coques ou cocco bacille sont pour principales caractéristiques d'être: à Gram positif, généralement immobiles, asporulés, anaérobies mais aërotolérantes, dépourvus de cytochromes-oxydase et de nitrate-réductase , ne possède pas le catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase) (**Dellaglio et al., 1994; Carr et al., 2002; Axelsson, 2004**).

Les bactéries lactiques

Pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides Fermentescibles) et de nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras (**Prescott et al.1999**).

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme fermentaire. Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les bactéries lactiques sont dites: -homofermentaires: l'acide la 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- hétéro fermentaires strict: elles produisent, en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂.

Beaucoup de ces caractères sont typiques et servent à définir le «cœur» du groupe lactique que les recherches taxonomiques et phylogéniques (ou phylogénétiques) sont en train de modifier de façon significative, soit au niveau des genres et des espèces, soit au niveau de la ligne de démarcation avec d'autres groupes de bactéries (**Dellaglio et al , 1994**).

Tableau 3 : Principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques .(Axelsson ,2004 .)

	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
Morphologie	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Tétrades	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Croissance à 10°C	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	-	+
Croissance à 45°C	-	+/-	-	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-
Croissance à pH 4,4	nd	+/-	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	-	-	+/-
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à 6,5% NaCl	nd	+/-	+	+	-	-	+/-	+	+	-	+	+/-
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Production de CO ₂	-	+/-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Production d'acide lactique	L	D, L,	L	L	L	L	D	L,	L,	L	L	+/-

Les bactéries lactiques

4. Classification des bactéries lactiques :

La systématique est en évolution permanente. Il n'y a jamais eu de règles unanimement reconnues sur la façon dont deux bactéries différentes devraient être phénotypiquement classées. Par exemple, quelles caractéristiques sont importantes dans la définition des sous-espèces, des espèces et du genre ? La littérature scientifique suit généralement les recommandations des comités de taxonomie qui opèrent sous les auspices de l'union International de Sociétés Microbiologiques (**Sneath, 2001**).

La première classification des bactéries lactiques basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques a été établie en **1919** par Orla-Jensen. D'après **Ludwig et al. (2008)**, le phylum Firmicutes comprend trois classes : Bacilli, Clostridia et Erysipelotrichi. Appartenant à la classe Bacilli, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

- Famille des *Lactobacillaceae* comportant les *Lactobacillus*, *Para lactobacillus* et *Pediococcus*
- Famille des *Leuconostocaceae* contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- Famille des *Streptococcaceae* comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

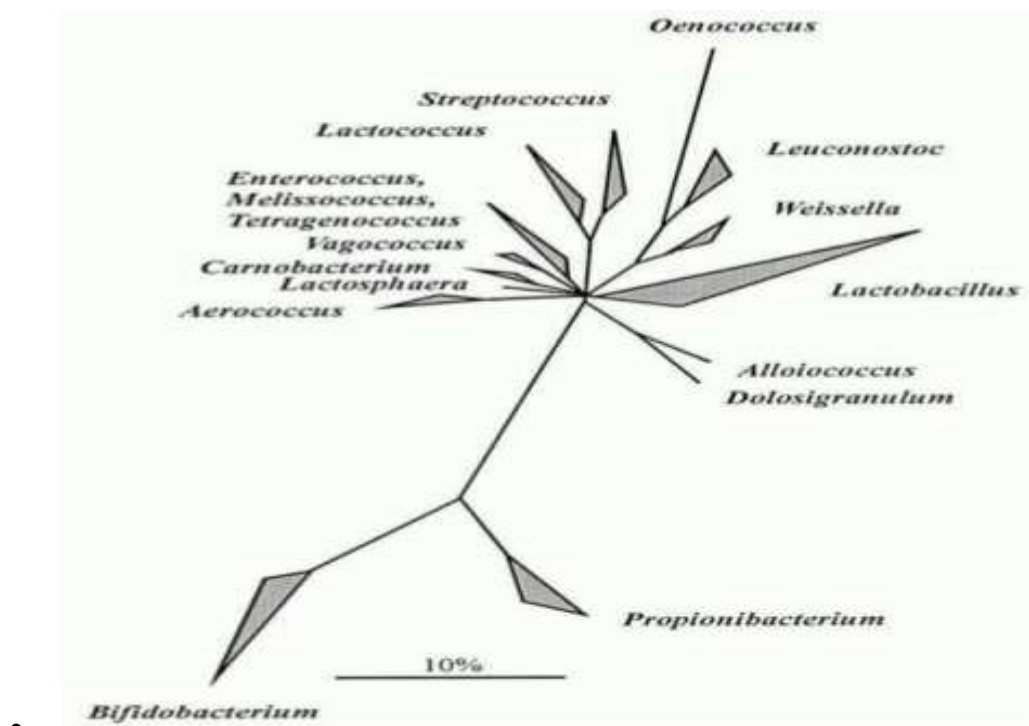


Figure 4 : Arbre phylogénétique consensus , basé sur la comparaison de séquence d'ARNr 16S , montrant les principaux groupes de bactéries lactiques , ayant un faible contenu mol % de G+C de l'ADN ainsi que les bactéries Gram positives non reliées des genres *Bifidobacterium* et *propionibacterium* (**Holzapfelet al , 2001**) .

Les bactéries lactiques

5. Taxonomie des bactéries lactiques :

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

Fermentescibles) et de nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras (Prescott et al., 1999). Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal métabolisme fermentaire .

Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les bactéries lactiques sont dites: -

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. Beaucoup de ces caractères sont typiques et servent à définir le «cœur» du groupe lactique que les recherches taxonomiques et phylogéniques (ou phylogénétiques) sont en train de modifier de façon significative, soit au niveau des genres et des espèces, soit au niveau de la ligne de démarcation avec d'autres groupes de Bactéries (Dellaglio et al., 1994).

6. Les différents genres :

Selon la taxonomie courante, le groupe de bactérie lactique engloberaient 35 genres bactériens (Ludwig et al ; 2009) par contre les douze principaux genres incluent *Aerococcus* , *Carnobacterium* , *Enterococcus* , *Lactobacillus* , *Leuconostoc* , *Pediococcus* , *Oenococcus* , *Streptococcus* , *Teragenococcus* *Vagococcus* et *Weissella* (Stiles et Holzappel , 1997) .

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 +
- Ce qui peut varier de 32 à 53 % (Schleifer et Stackebrand, 1983; Pilet-F. et al., 2005) La classification remaniée par Kandler et Weiss (1986) les subdivise en 3 groupes selon leur type fermentaire:

Les bactéries lactiques

●**groupe I:** anciennement appelé *Thermobacterium*. Il regroupe 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 (**Bottazzi, 1988**).

●**groupe II:**

anciennement appelé *Streptobacterium*. rassemble le lactobacille 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 (**Bottazzi, 1988**).

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 c'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles. Les cellules sont courtes, droites et séparées (**Bottazzi, 1988**).

Les bactéries lactiques

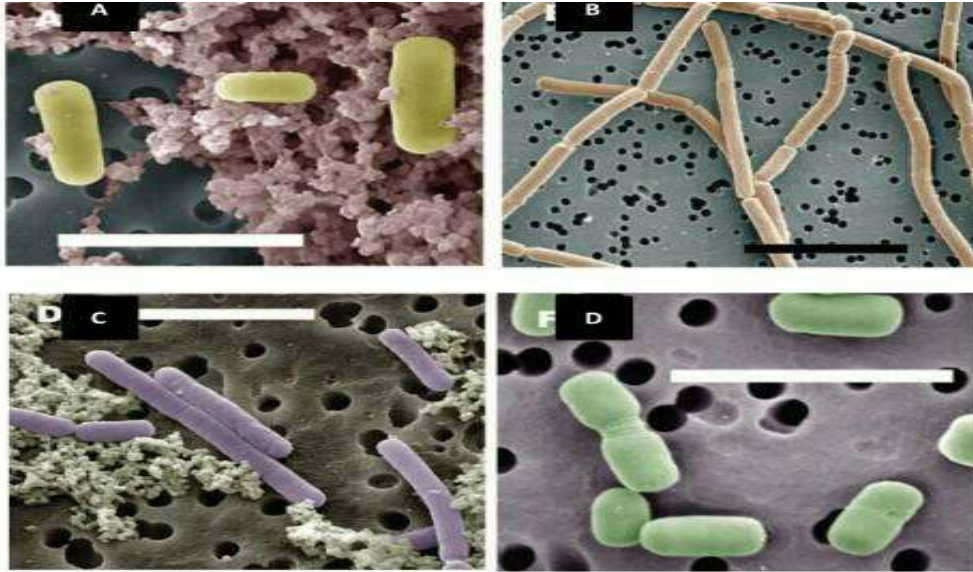


Figure 5 : Image au microscope électronique à balayage de certain lactobacillus ; *Lb helveticus* B , *Lb .delbruckii subsp . bulgaricus c*, *Lb . casei* ; D . *Lb brev*) (Broadbent et Steele , 2005) .

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 ont originellement décrit comme *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 en courtes chaînes), 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., 1996a) Leur contenu G+C est compris entre 33 et 37% (Dellaglio et al., 1994). Ce genre comprend 4 espèces fréquemment associées aux aliments *C. divergens*, *C. Piscicola*, *C. mobile* et *C. gallinarum* Ils sont isolés de produits carnés, ou de produits de la mer, saumon fumé mais certains sont également été isolés de fromages .

Les bactéries lactiques

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 coque senpaire ou en chaîne, leur fermentation est homolactique, produisant en majorité de l'acidelactique. Ces espèces diffèrent principalement entre elles par la présence d'un antigène de groupe dit antigène de Lancefield .

6.4.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*. Les Sp. *Thermophilus* ont été inclus dans le groupe de « autres streptocoques » par Scheilfer et Kilpper-Bälz (1987). Du fait de son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène seul cette espèce est considérée comme appartenant aux bactéries lactiques.

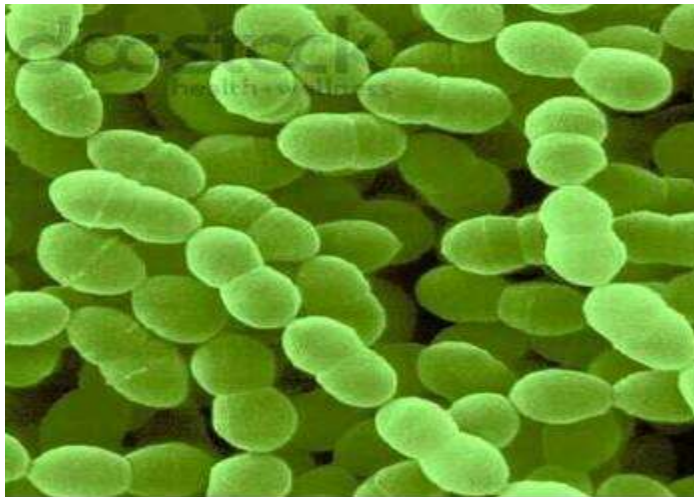


Figure 6 : *Streptococcus thermophilus*, au microscope électronique (Corrieu et Luquet , 2008) .

L'espèce *Streptococcus thermophilus* (Figure 6) . largement présent dans le lait et les produits laitiers comme agent d'acidification, possède le statut GRAS (Generally Recognized As safe) Cette espèce se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène .

Les bactéries lactiques

6.5 .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 La. Lactis peuvent être distinguées : *L. lactis*ssp. *Lactis*,*L.lactis*ssp. *cremoris* et *L. lactis* ssp. *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 β , et quise 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 son essentiellement *En.faecalis* ;(auparavant *Streptococcus faecalis*), et ses variétés *Endurants* et *En. bovis*).

Leur habitat est très varié: intestin de l'homme et des animaux, produit végétaux, sol, produits laitiers (**Giraffaet al., 1997**).

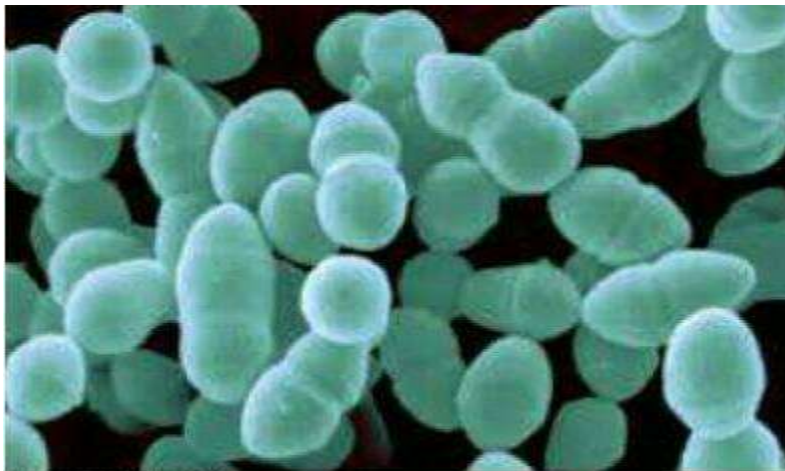


Figure 7: Morphologie en microscopie électronique de *lactococcus lactis* (**Corrieu et Luquet ,2008**) .

Les produits végétaux constituent leur réservoir principal , mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (**Pilet et al ; 2005**) .

Les bactéries lactiques

6.6 .Genre *Enterococcus* :

Ce genre forme des coques, généralement groupés isolés, en paires, en chaînettes ou en amas et leur Morphologie peut varier selon les conditions de culture (**Devries et al, 1993**).

Par ailleurs, il est caractérisé par ses capacités à croître à des valeurs de PH élevées, de résister à l'acidité , et de développer en présence de concentration salines élevées (**Ruiz – Moyano et al ; 2008**)



Figure 8 : *Enterococcus faecalis* au microscope électronique (**Wallace et al , 2003**) .

Les espèces du genre *Enterococcus* se caractérisent par leur grande résistance aux facteurs environnementaux , Elles sont présentes notamment dans l'intestin de l'Homme et des animaux , les produits végétaux , le sol et les produits laitiers .

, Les espèces *Enterococcus faecalis* (**Figure 7**) et *Enterococcus faecium* , anciennement désignées « streptocoque fécaux sont toutes les deux utilisées comme probiotiques .

Les entérocoques jouaient un rôle important dans la maturation des fromages.-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**) .

6.7 *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 VanThieghemen 1878Ce genre a auparavant inclus des coccobacilles 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 contenus G+C sont assez voisins (37 à 45%) (**Garvie, 1986**)

Leur croissance est toujours lente. Ils ne sont pas hémolytiques ni pathogènes.

Les bactéries lactiques

Ces espèces sont caractérisées par la production à partir du citrate du lait de di acétyle et parfois par la synthèse de dextrane et de lévanes extra cellulaires en présence de saccharose (Novel G., 1993)

Les études phylogénétiques des *Leuconostoc* montrent une diversité dans ce genre (Eom et al., 2007)

Ce genre comprend 4 espèces fréquemment associées aux aliments *C. divergens* *C. piscicola* *C. mobile* et *C. gallinarum* Ils sont isolés de produits carnés, ou de produits de la mer, saumon fumé mais certains sont également été isolés de fromages

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 lactique

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

de Lancefield 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 mesenterois des

sp. *Cremoris*, ensilage et les végétaux fermentés (olives, choucroute, etc) (Hemme et Foucaud –

Scheunemann, 2004) .

6.8. *Leuconostoc* :

de vins a été renommée *Oenococcus oeni* et certains lactobacilles hétérofermentaires ont été groupés avec *Leuconostoc parmesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzappel, 1997) .

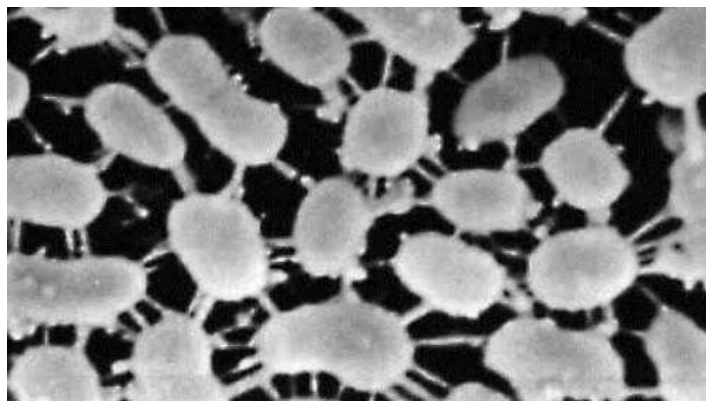


Figure 9 : Fixation des *leuconostocs* sur les moules en grés-vernissé .(Examen en microscopie électronique de balayage , 11 500 X) . photo Micheline Rousseau – Christiane Le Gallo INRA – C.R Jouy – en – Josas

Les bactéries lactiques

6.9. *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus*:

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

-Sept espèces de *Pediococcus* sont connues :

P. acidilactici, *P. damnosus*, *P. dextrinicum*, *P. inopinatus*, *P. parvutus*, *P. pentosaceus* et *P. urinae* qui 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* sont 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**).

L'espèce *Pediococcus halophilus* 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, Ets.

-Le genre *Aerococcus* qui contient cinq espèces est généralement moins intéressant dans l'agroalimentaire (**Axelsson, 2004**).

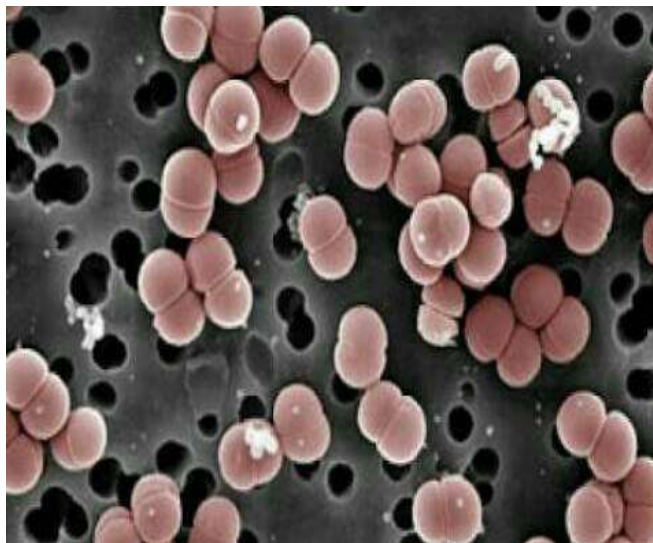


Figure 10: Morphologie en microscopie électronique . (Wallace et al , 2003) .

Les bactéries lactiques

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée sel comme les souces de soja , alors que les pediocoques sont parfois utilisés comme levains lactiques les charcuteries (Tosukhowong et al ; 2005) .

6.10. Genre *Bifidobacterium* :

Traditionnellement, le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques . par la suite , il a été séparé en raison du contenu G + C > mol 50% a effectué au phylum des Actinobacteria (**Gomez et Malcata , 1999 . Leahy et al , 2005**) . Néanmoins , les bifidobactéries sont également considérées comme des bactéries Lactiques , en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables et du fait qu'elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques tel que le tractus gastro – intestinal (Klein et al , 1998) . En effet , elles ont généralement un PH optimal de croissance autour de 6,5 à 7 et une température de croissance compris entre 37°C et 41°C . Elles ont la forme irrégulière d'un V ou une morphologie bifide en forme de Y . Elles sont hétéro fermentaires et dégradent les hexoses en produisant de l'acide lactique et acétique (**Gomez et Malcata , 1999 . Leahy et al , 2005**) .

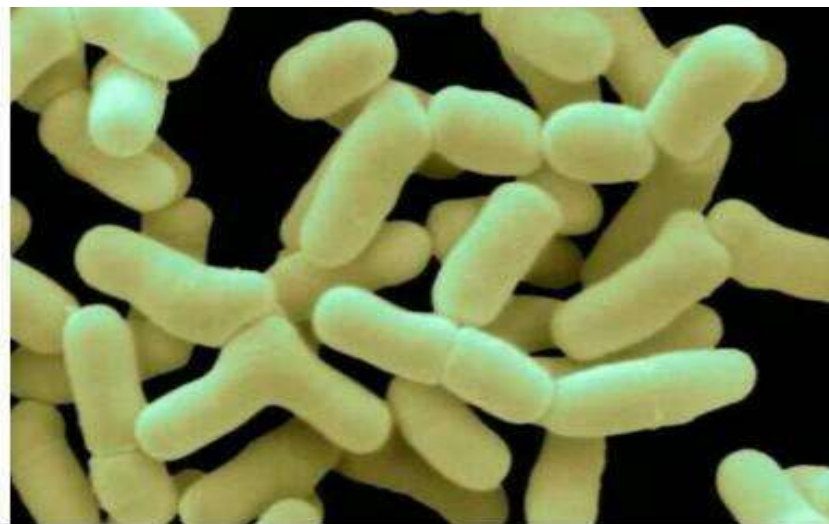


Figure 11 : Bifidobacterium SP (Wallace et al , 2003) .

Les espèces de *Bifidobacterium adolescentis* , *Bifidobacterium breve* et *bifidobacterium longum* se trouvent dans l'intestin des enfants et des adultes .

Les bactéries lactiques

7 .Métabolisme des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques regroupent des microorganismes appartenant à plusieurs genres ayant la capacité de fermenter les sucres en acide lactique .Les sucres peuvent être des monosaccharides tels que les hexoses (glucose , galactose), des pentoses (xylose , ribose , arabinose), des hexitols ou des pentitols (mannitol ,sorbitol ,xylitol) ou des dissaccharides (lactose , saccharose , cellobiose ,maltose ,tréhalose) . La capacité à métaboliser les sucres est fonction des souches considérées .

7. 1. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques :

La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (**Atlan et al ,2008**) :

- Le transport du sucre à travers la membrane cellulaire ,
- Le catabolisme intracellulaire de sucre ,
- Formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

Pour pénétrer dans la cellule ,les sucres doivent d'abord franchir la membrane cellulaire qui possède une perméabilité sélective :elle laisse passer les composés apolaires par diffusion mais se révèle imperméable aux composés polaires hydratés , Deux systèmes de transport actifs des sucres sont présents (PTS) , qui couple le transport et la phosphorylation du glucide (phosphorylation en cascade), et le système perméase énergie –dépendant , qui fait pénétrer les glucides sous forme de sucres libres (**Thompson , 1987**) .

Selon les genres ou espèces , les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (**Figure 11**) .Il s'agit des voies homofermentaire (**Embden – Meyerhof-Parnas , EMP**) et hétéro fermentaire (voie des pentoses – phosphate) (**Atlan et al , 2008**).

Les bactéries lactiques

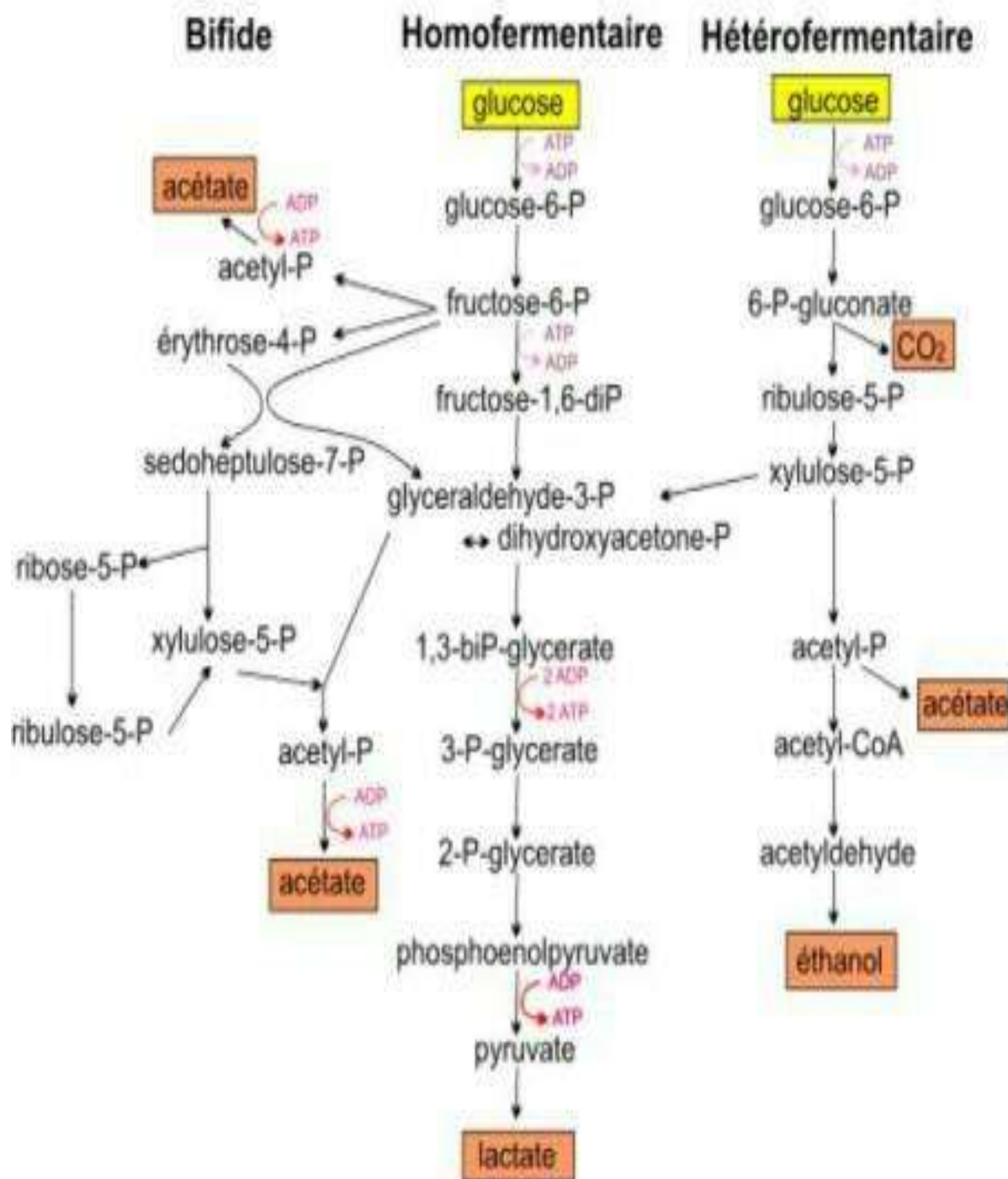


Figure 11 : Différents types de fermentation (Axelsson, 2004)

Les bactéries lactiques

7.1.1. Voie homofermentaire :

La voie homofermentaire emprunte la glycolyse dans sa totalité (du glc-6-P jusqu' au pyruvate) et généralement associée aux bactéries des genre *Streptococcus* , *Lactococcus* , *Pediococcus* , de 2 molécules de lactate et 2 molécules d'ATP par molécule de glucose . Ce métabolisme est qualifié d'homolactique lorsqu' au moins 90% du glucose consommé est converti en lactate . L'enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (Fructose-1,6-bisphosphat aldolase (FBA)) est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (Thompson et Gentry –Weeks , 1994) .En condition de croissance non optimales (limitation de carbone ou certains sucres) , le métabolisme des bactéries homofermentaire peut se diversifier vers un métabolisme appelé mixte , avec production , en plus du lactate , de formiate , ou / de co2d'acétate et d'éthanol (Cocaign – Bousquet et al ;1996) (Figure 12) . Cette fermentation est essentiellement réalisée par les entérobactéries (*Enterococcus sp*) .

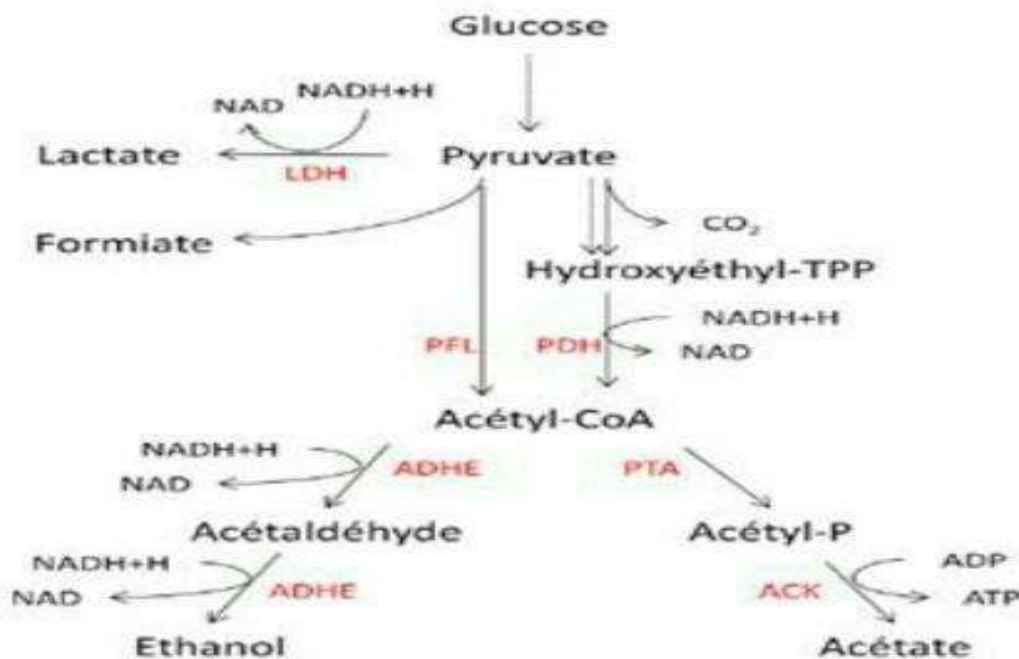


Figure 13 : Schéma de la fermentation des acides mixtes (Cocaign –Bousquet et al, 1996)

Les principales enzymes sont indiquées en rouge : LDH :lactate déshydrogénase , PFL :pyruvate formiate lyase , PDH : pyruvate déshydrogénase ,PTA :phosphotrans acétylase ,ACK :acétate kinase ,ADHE : alcool déshydrogénase .

Les bactéries lactiques

7.1.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate :

Les principaux groupes de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc* elles que *Leuconostoc mesenteroides* (*Ln . mesenteroides*) et *Leuconostoc pentosaceus* et certains

Lactobacillus tels que *Lactobacillus brevis* , *Lactobacillus fermenti* . Ce groupe de bactérie dégrade les hexoses en empruntant la voie hétéro fermentaire communément appelée voie des pentoses phosphate (**Figure 11**) .

Chapitre III

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Lieu de travail :

Nous avons effectué nos travaux dans le Laboratoire des Sciences et Techniques de production Animales (LSTPA) de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem

2. Objectif de ce travail :

- But de Notre travail est d'isoler et d'identifier et de purifier des bactéries lactiques à partir de blé fermenté dénommé « Hamoum ».

3. Lieu de prélèvement :

Notre échantillon a été prélevé au niveau d'une région rurale de la wilaya de Relizane .

4. Milieu de culture :

➤ Les milieux solides :

- MRS (De Man Rogosa et Sharpe, 1960) , MSE (Mayeux , Sandine et Elliker , 1960).
 - La composition de ces milieux est dans l'annexe A

➤ Les milieux liquides :

Milieu MRS BCP , bouillon Clark et Lubs ; bouillon hypersalé , MRS sans sucre (BCP), Milieux de Möeller (Möeller, 1955), lait de Sherman à 0,1% et 0,3% .

- La composition de ces milieux est dans l'annexe B

5. Isolement des bactéries lactiques :

5.1. Préparation de la solution mère :

Une quantité de 10g de blé fermenté « Hamoum » est mise dans 90 ml bouillon MRS pour une durée de 24h pour la préparation de la solution mère à la température ambiante du laboratoire. Une série de dilutions allant de 10^{-1} jusqu'à 10^{-6} est ensuite réalisée pour effectuer un dénombrement des colonies.

5.2. Ensemencement :

L'isolement sélectif des bactéries lactiques par culture sur milieu MRS. Un volume de 1ml de chaque dilution est ensemencé en stries sur boîte de Pétri contenant du milieu MRS solide. Après étalement des échantillons avec une pipette râteau stérile que l'on a confectionné avec une pipette Pasteur, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h à 48 h

6. Dénombrement des bactéries lactiques :

Après incubation à 37°C pendant 24 h à 48 h ,on calcule le nombre des colonies présente dans notre échantillon. Après le comptage des colonies, on applique la formule mathématique suivante :

$$N = \frac{\sum \text{Colonies}}{V_{\text{ml}} \times (n_1 + 0,1n_2) \times d_1}$$

- **N**: nombre de microorganismes présents dans l'unité de mesure de l'échantillon
- **C**: nombre total des colonies comptées sur une boîte retenue des dilution effectuées.
- **Vml**: volume de l'inoculum appliquée à chaque boîte en ml
- **n1**: nombre de boites comptées à la dilution retenue la plus faible.
- **n2**: nombre de boites comptées à la seconde dilution retenue.
- **d1**: facteur de la première dilution retenue.

7. Pré-identification des isolats lactiques :

7.1. Observation macroscopique :

L'étude morphologique est portée sur l'observation macroscopique qui consiste à décrire l'aspect des colonies obtenues (taille, couleur) sur milieu gélosé.

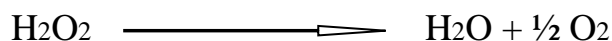
7.2. Observation microscopique :

La différenciation entre les bactéries à Gram positif (cellules violettes) de celles à Gram négatif (cellules roses).

8. Test de catalase :

Certaines bactérie produisent du peroxyde d'hydrogène(H₂O₂) Pendant leur respiration aérobie celui-ci est très toxique que certaines bactéries sont capables de le dégrader grâce aux enzymes, elles synthétisent et notamment la catalase, Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction positive se traduit par un dégagement de bulles de gaz O₂) (**Marchal et al ; 1991**) .

Catalase .



9. Purification :

La purification des colonies bactériennes est faite par les techniques de repiquages successifs. On prend à chaque fois une colonie pour l'ensemencer dans le milieu MRS solide. Après 24h à 48 h d'incubation à 37°C, les colonies bien distinctes et bien développées, sont retenues pour des examens macroscopiques, microscopiques et une recherche de la catalase afin de confirmer leur appartenance au groupe lactique.

10. Conservation des souches :

10.1. Conservation à court terme :

La conservation à court terme est réalisée sur milieu MRS solide incliné, après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à +4°C. Leur renouvellement se fait par repiquage toutes les 4 semaines,

10.2. Conservation à long terme :

La conservation à long terme est réalisée sur milieu MRS liquide. Après incubation à 37°C pendant 24h, les isolats retenus sont conservés à -20°C dans une solution contenant 30% de glycérol.

11. Identification des bactéries lactiques

La pré-identification a été établie en se basant sur des caractères biochimiques et physiologiques.

11.1. Etude physiologique et biochimique :

11.1. Test de croissance à différentes températures :

Ce test consiste à différencier entre les bactéries lactiques mésophiles et thermophiles. Les isolats ont été ensemencés dans le milieu MRS liquide à pH=6,5. On a testé leurs croissances à trois températures 25°C, 30°C, 45°C pendant 24 à 48 heures. La croissance se manifeste par un trouble.

11.1.2. Test des pH :

Ce test est utilisé pour définir l'habilité des bactéries lactiques à croître dans un milieu alcalin (pH=9,6) et dans un milieu acide (pH=4,5).

Matériel et méthodes

Le test est réalisé par l'ensemencement des isolats dans deux milieux MRS liquide :

Les milieux sont obtenus comme suit :

- **MRS liquide** ajusté à **ph=9,6** obtenue par l'addition de solution de Na OH (1N)
- **MRS liquide** ajusté à **ph=4,5** obtenue par l'addition de solution d'acide lactique (1N).

Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 h.

11.1.3. Recherche du type fermentaire :

Ce test permet de différencier les bactéries homolactiques des hétéro lactiques.

Le type fermentaire consiste à mettre en évidence la formation de gaz (CO₂). Le test s'effectue en inoculant 1ml de la culture bactérienne à tester dans un tube contenant 9ml de MRS et muni d'une cloche de Durham puis incubées pendant 24h à 48h.

11.1.4. Effet de NaCl :

Ce test est utilisé pour définir l'habilité des bactéries lactiques à croître dans le milieu hypersalé.

Les cultures sont ensemencées dans le milieu hypersalés à 6,5% de NaCl. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h à 48h.

11.1.5. Test de la thermorésistance :

Après ensemencement les isolats dans le milieu MRS liquide. Les tubes sont introduits dans un bain marie à 63°C pendant 30 min puis incubés à 37°C pendant 24 h à 48 h. Ce teste permet d'identifier les bactéries lactiques thermophiles.

11.1.6. Recherche de l'acétoïne :

Des tubes contenant chacun 5 ml de milieu Clark et Lubs sont ensemencés à l'aide d'une anse, après incubation à 37°C pendant 24 h. On ajoute trois gouttes de réactif VP1 (solution de soude NaOH à 16% dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VP2 (alpha-naphtol à 6% dans l'alcool à 95°). Les tubes ont été soigneusement agités et ont été laissés en contact avec l'air libre pendant 5 à 10 min température ambiante. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu.

Matériel et méthodes

11.1.7. Recherche de l'hydrolyse d'arginine (ADH) :

Chaque isolat est ensemencé dans les tubes contenant 1ml de milieu Moëller arginine et un tube témoin (Moëller sans arginine) sont incubée pendant 24h à 72 heures à 37°C. Après 24h d'incubation, si la couleur du milieu vire au jaune (24 heures) puis vers le violet (48 heures) on en déduit la présence de l'enzyme et la dégradation de l'arginine .SI elle reste jaune cela veut dire que la bactérie est ADH négative.

La culture se manifeste par un virage au jaune du à l'acidification du milieu (métabolisme du glucose) La dégradation de l'arginine aboutit à la formation d'ammoniaque est révélée par alcalinisation du milieu qui devient violet.

11.1.8. Croissance sur le lait de Sherman :

Ce test permet la différenciation entre certains genres lactiques. Le lait écrémé additionné de 0.1 % et 0,3% de bleu de méthylène(1ml de solution à 0,1% et 0,3% par tube de 9ml de lait) est ensemencé et incubé à 37°C pendant 24 à 48 h.

11.1.9. Production de dextrane :

La synthèse de dextrane à partir du saccharose est mise en évidence dans le milieu MSE gélosé par l'ensemencement des isolats et une incubation réalisée à 37°C pendant 24h à 48 h. La synthèse de dextrane se traduit par la formation des colonies larges, visqueuses et gluantes.

11.1.10. Test de fermentation des sucres :

Il s'agit d'apprécier l'aptitude des isolats à métaboliser divers substrats carbonés. Un volume de 0,1 ml de suspension bactérienne est ensemencé dans 2 ml du MRSc-ev- BCPet incubé pendant 48h. Le développement de la culture et le virage au jaune de l'indicateur coloré due à l'acidification du milieu traduit la fermentation du sucre.

Chapitre IV

Résultats Discussion

Résultats et discussion

1. Dénombrement :

Le dénombrement des bactéries lactiques isolés à partir de blé fermenté montre une charge microbienne assez importante.

A l'aide de la formule mathématique on a trouvé un nombre :

$$N = 319,09 \cdot 10^{-15} \text{ UFC/g}$$

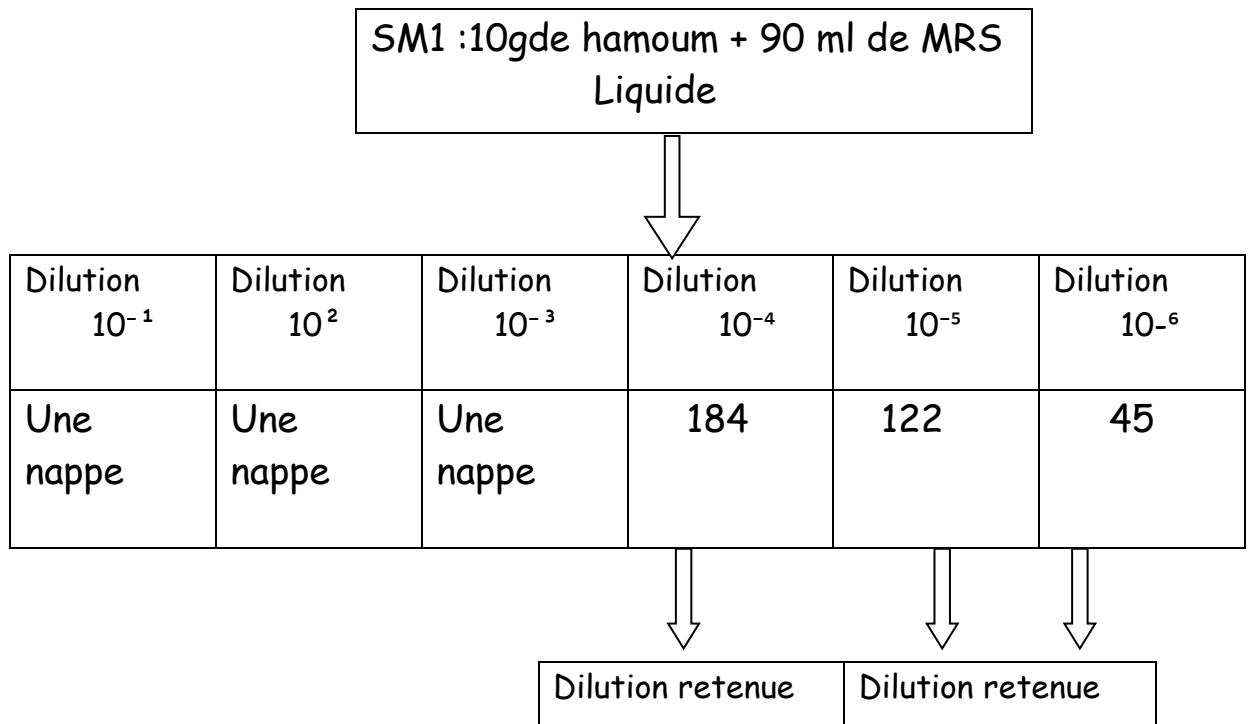
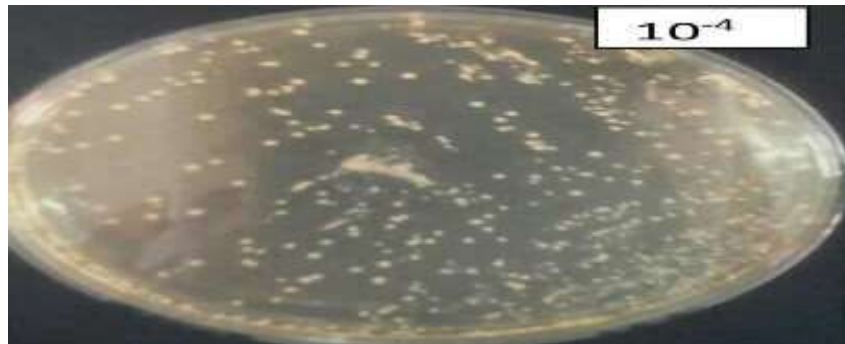


Figure 14 : Dénombrement des bactéries lactiques isolées de Hamoum

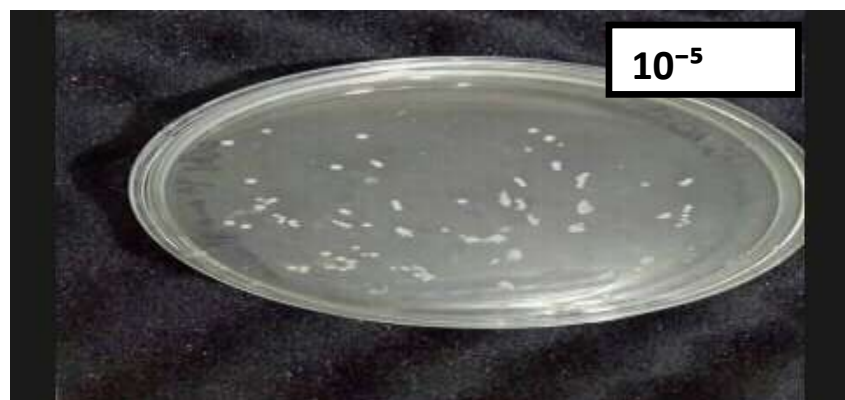
Résultats et discussion

2. Etude macroscopique :

Nous avons isolées à partir de notre échantillon 20 isolats lactiques. L'examen macroscopique sur gélose MRS montre des colonies de différentes tailles (grandes, moyennes et petites) et différentes couleurs et d'aspects (opaques, transparentes ou visqueuses).



A



B



Figure 15 : Résultats morphologiques des colonies bactériennes.

Résultats et discussion

- Les isolats bactériens sont désignés par la lettre H en référence au substrat « Hamoum » et codés selon la forme des bactéries :

BHL : en référence à la forme bacille, **BHC** : en référence à la forme coque

Résultats et discussion

Tableau 4 : Résultats de l'étude morphologique des isolats lactiques

Isolats	Gram	Catalase	Mobilité	Forme	Couleur	Arrangement
BHL1	+	-	-	Bâtonnet	Blanchâtre	Chainettes
BHL2	+	-	-	Bâtonnet	Blanchâtre	Chainettes
BHL3	+	-	-	Bâtonnet	Blanchâtre	Chainettes
BHC4	+	-	-	Cocci	Blanchâtre	Diplocoques ou tétrades
BHC15	+	-	-	Bâtonnet	Blanchâtre	Chainettes
BHL6	+	-	-	Bâtonnet	Blanchâtre	Chainettes
BHC7	+	-	-	Cocci	Blanchâtre brillante	Diplocoques ou tétrades
BHC8	+	-	-	Cocci	Blanchâtre	Diplocoques ou chainettes
BHC9	+	-	-	Cocci	Blanchâtre	Chainettes
BHC10	+	-	-	Cocci	Blanchâtre	Diplocoques ou chainettes
BHC11	+	-	-	Cocci	Blanchâtre	Diplocoques ou chainettes
BHC12	+	-	-	Cocci	Blanchâtre	Diplocoques ou chainettes
BHC13	+	-	-	Cocci	Blanchâtre	Diplocoques
BHL14	+	-	-	Bâtonnet	Blanchâtre	Chainettes
BHc15	+	-	-	Cocci	Blanchâtre ou jaunâtre	Diplocoques
BHC16	+	-	-	Cocci	Blanchâtre	Chainettes
BHC17	+	-	-	Cocci	Blanchâtre	Chainettes
BHc18	+	-	-	Cocci	Blanchâtre	Diplocoques ou chainettes
BHC19	+	-	-	Cocci	Blanchâtre	Diplocoques
BHc20	+	-	-	Cocci	Blanchâtre	Diplocoques ou tétrades

Résultats et discussion

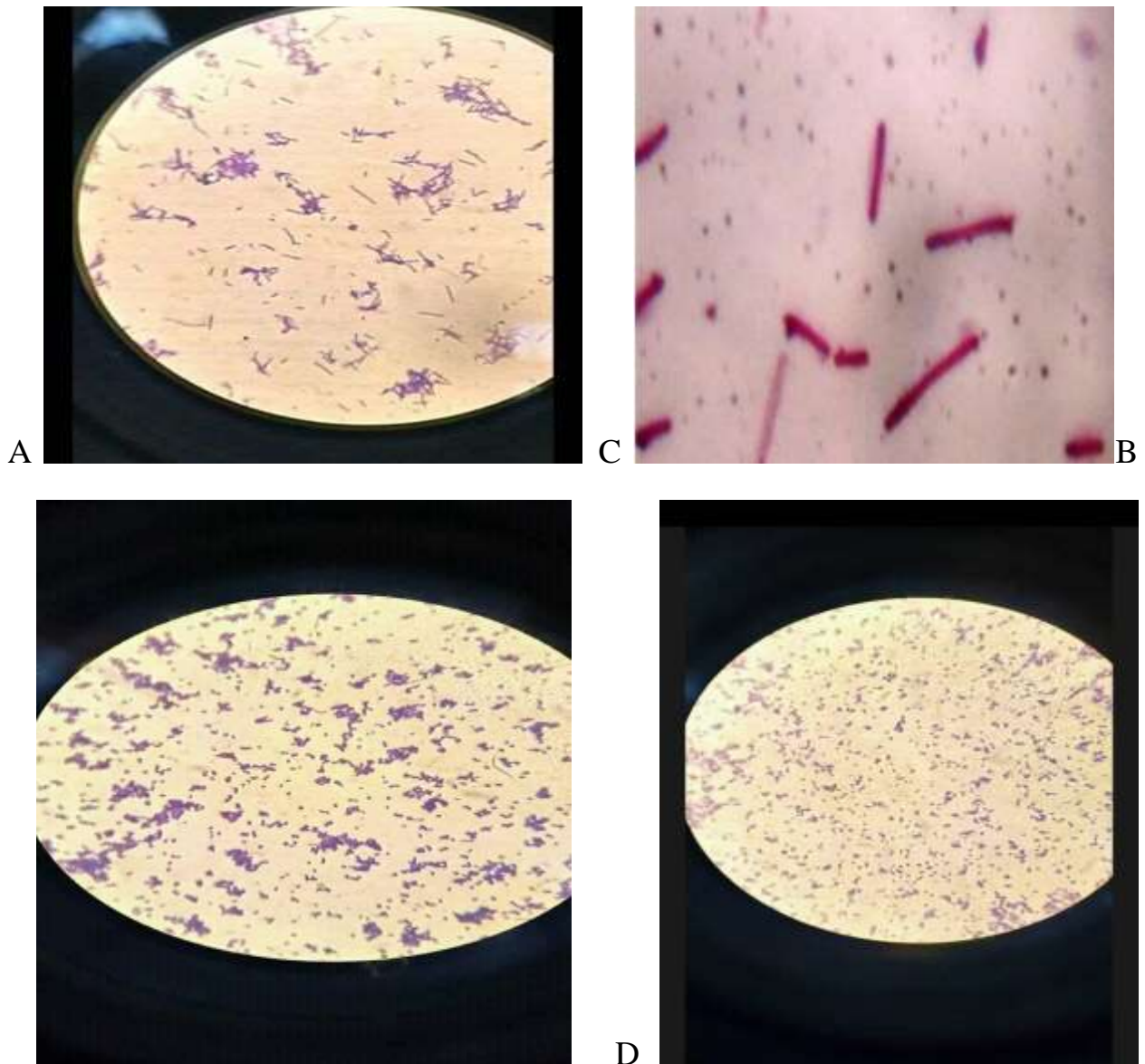


Figure 16 : Observation microscopique des bactéries lactiques (G x 100). A et B forme bâtonnet ; C et D forme Cocci.

Résultats et discussion

3. Etude microscopique :

Après coloration de Gram, les bactéries ont été observées les caractères des bactéries lactiques isolées 70% sont forme Coccis et 30% sont forme bâtonnet (**figure4**).

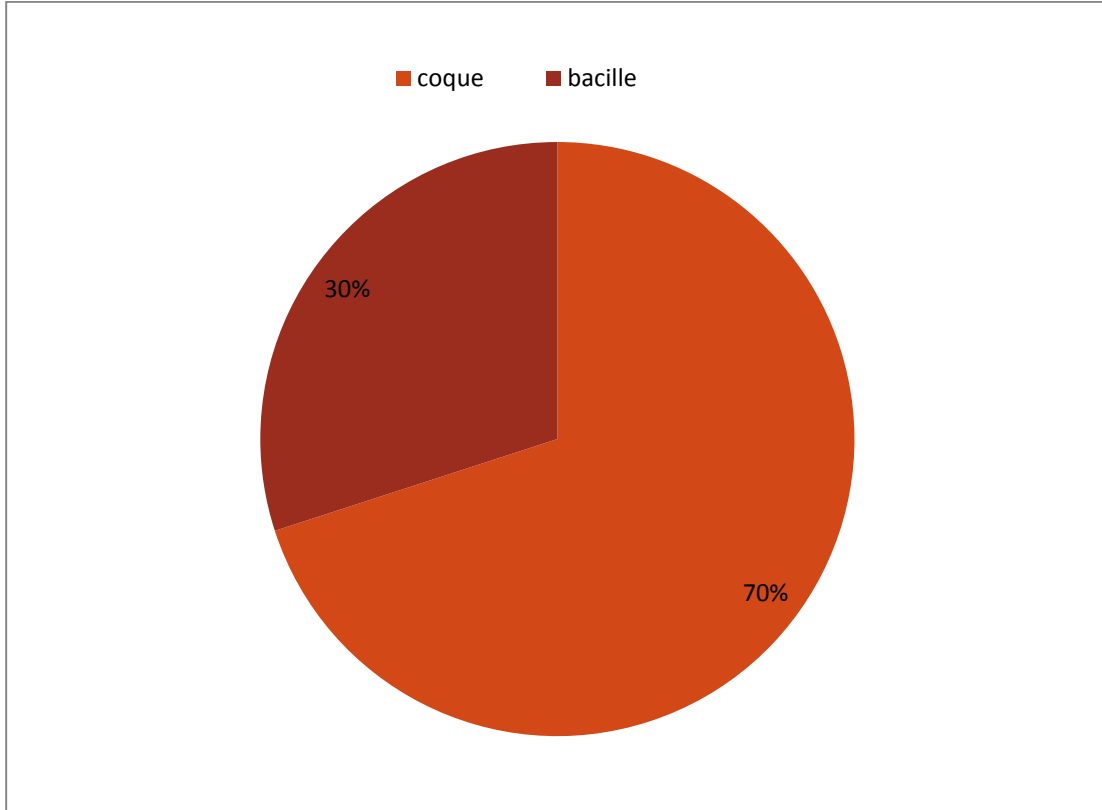


Figure 17 :Proportions des bactéries lactiques isolées de hamoum

Résultats et discussion

4. Résultats de l'identification physiologique et biochimique :

1.4. Tests biochimiques et physiologiques

1.1.4. Croissance à différentes températures :

Après incubation, la majorité des bactéries (BH1 à BH20) sont capables de se développer à 25°C, 30°C à l'exception la température de 45°C. On remarque la croissance des isolats sauf (BHC7, BHC8, BHC10, BHC11, BHC12, BHC13, BHC9, BH17, BH16, BHC15, BHC18, BHC19).

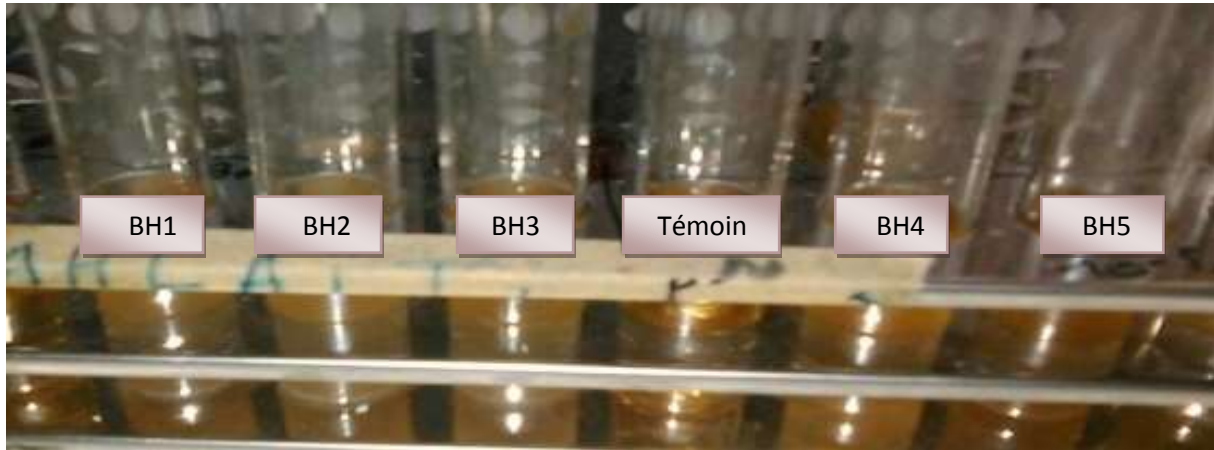


A



B

Résultats et discussion



C

Figure 18: La croissance des isolats isolées à différentes températures : (A) : 45°C , (B) : 30°C et (C) : 25°C .

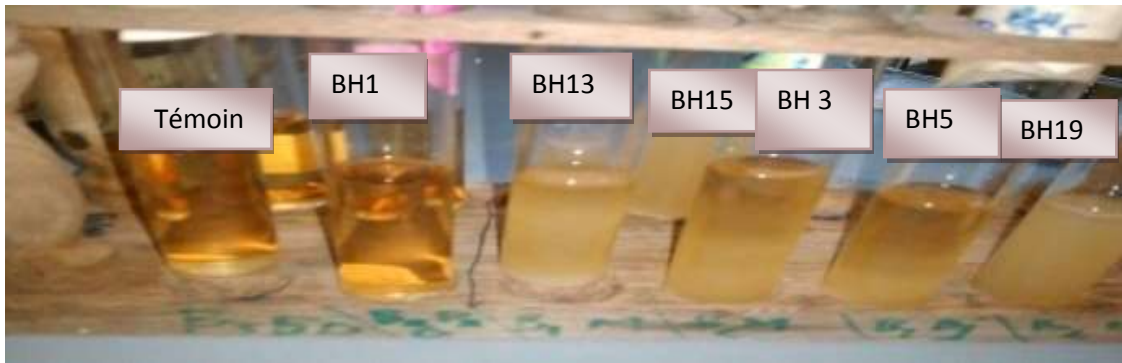
2.1.4. Test croissance à différent pH :

Les résultats montrent que seuls les isolats (BHC4, BHC7, BHC13, BHL14, BHC15, BHC19, BH20) sont capables de se développer à pH = 4,5. Au pH = 9,5, seuls les isolats (BHC9, BHC13, BHC15, BHC16, BHC17, BHC19) se développent.



pH=4,5

Résultats et discussion



pH=9,5

Figure 19 : Croissance des isolats à différents pH

3.1.4.Type fermentaire :

Les résultats obtenus montrent que tous les isolats BH1 à BH20 ne produisent pas de CO₂. Ils sont donc homofermentaires.



Figure 20:Test fermentaire .

(-) : Pas de croissance , (T) : témoin

Résultats et discussion

4.1.4. Test Na Cl :

Tous les isolats cités sont capables de croître à une concentration de 6.5 % de NaCl (BHL1 ,BHL2 ,BHL3,BH4,BHL5 ,BHL6,BHC7 ,BHC9,BHC13 ,BHL14,BHC15 ,BH17 ,BH19 , BHC20) à l'exception des isolats. (BHC8, BHC10, BHC11, BHC12, BHC16,BHC18) qui sont sensibles à 6,5% .

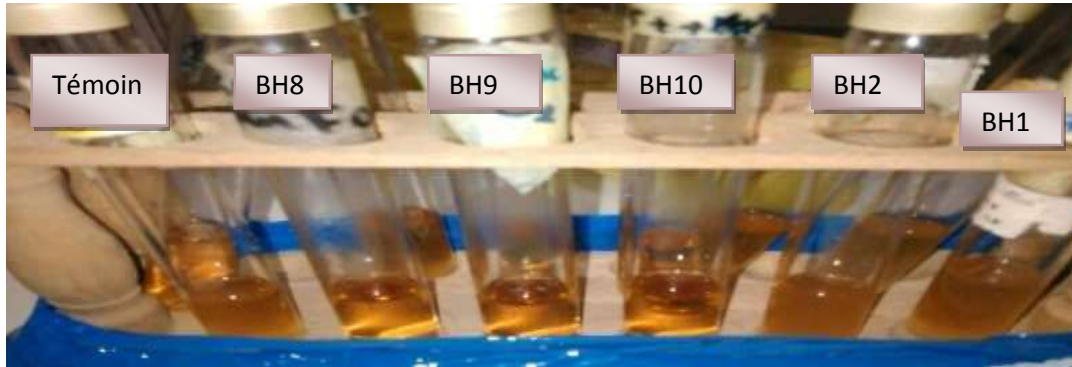


Figure 21: Résultats de test NaCl

5.1.4 : Test de thermorésistance :

L'exposition des isolats à une température de 60°C pendant 30 min permet de révéler que tous les isolats ont résisté à cette température à l'exception des isolats (BH8 , BH10, BH11 , BH12 , BH18).

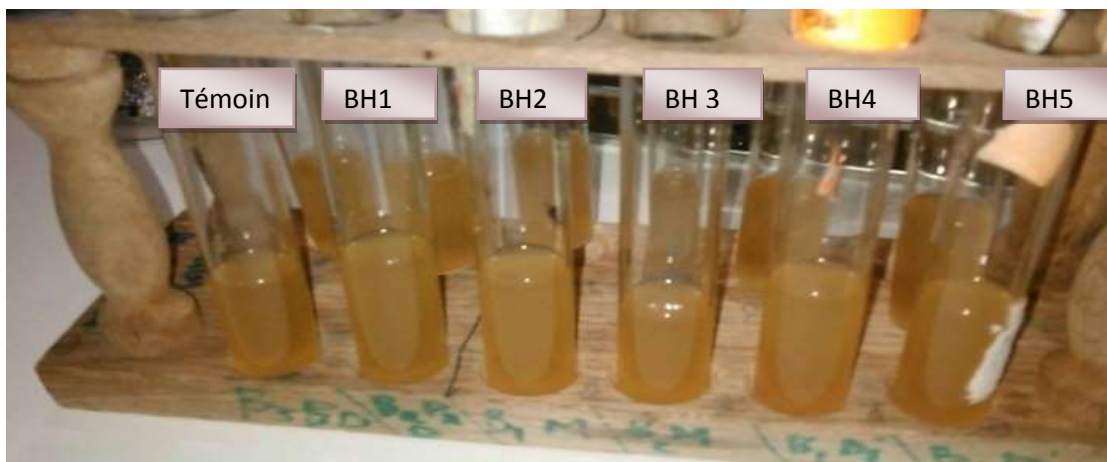


Figure 22 : Résultats de test de thermorésistance

Résultats et discussion

6.1.4 : Production de l'acétoïne :

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches (BH1 à BH20) sont incapables de produire l'acétoïne .

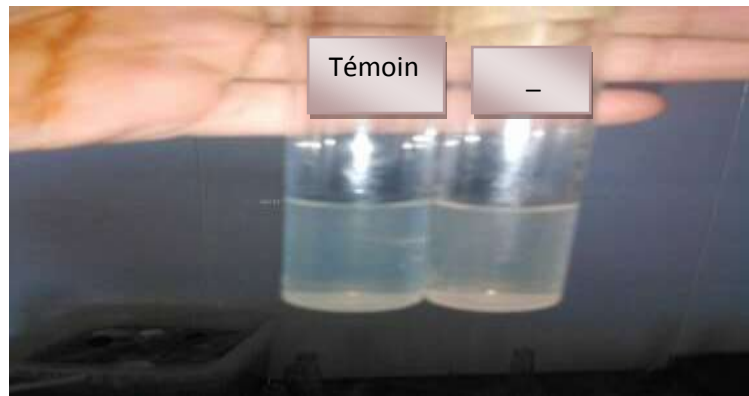
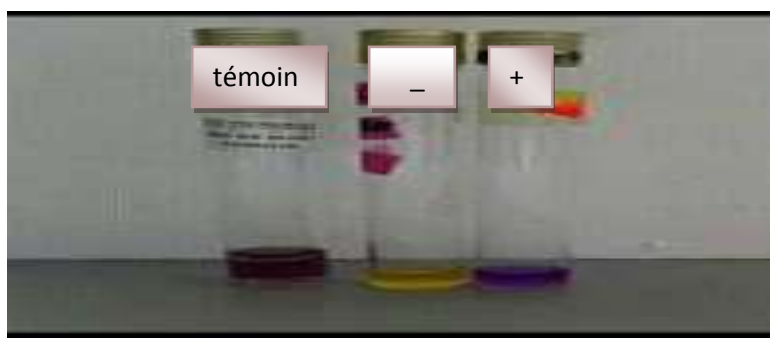
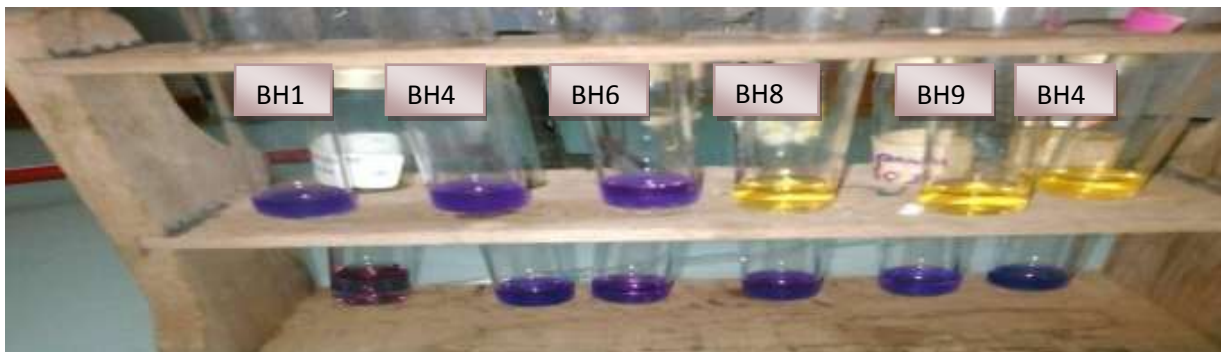


Figure : 23 : Résultat de l'acétoïne. Test négatif (-), test positive (+). (T) : témoin

7.1 .4 : Hydrolyse de l'arginine (ADH) :

D'après nos résultats, Les isolats(BHC8, BHC9, BHC10, BHC11, BHC12, BHC16, BHC17, BHC18) sont ADH négative. Par contre les isolats (BHL1, BH L2, BHC4, BHC5, BHC6, BHC7, BHC13, BHC14, BHC15, BHC19, BHC20) sont ADH positive.



Figur24 : Résultats de L'ADH. T : témoin, (+) ADH positive, (-) ADH négative.

Résultats et discussion

8.1 .4 : Croissance sur le lait bleu de Sherman :

Les résultats du test de lait bleu de Sherman révèlent que tous les isolats ayant une forme cocci coagulent le lait et réduisent le milieu à une concentration de 0,1% de bleu de méthylène. Par contre, pour la concentration de 0,3 % seuls les isolats (BHC13, BHC15, BHC19) se sont révélés sensibles.



Figure 25 : Réduction au bleu de méthylène à 0,1%

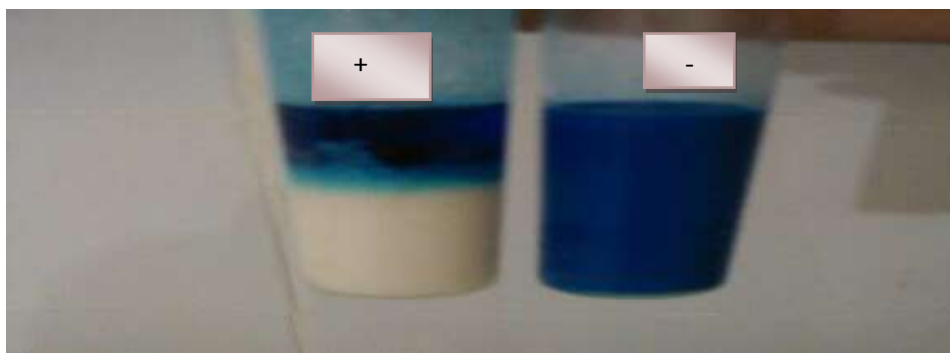


Figure 26 : Réduction au bleu de méthylène à 0

9.1.4 : Production de dextrane :

Après incubation les résultats obtenus montrent que toutes les isolats sont incapables de produire le dextrane

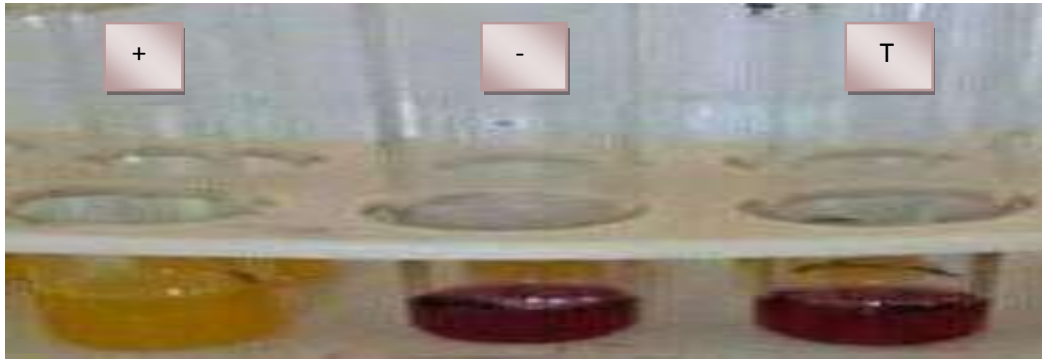
Résultats et discussion

Tableau5:Résumé des différents tests d'identification des isolats lactiques.

Test Isolats	Type Fermentaire	Température				pH			Thermo résistance	Réduction		Acétoine	NaCl (6,5)	Dex Tra ne	ADH
		25°C	30°C	37°C	45°C	4,5	6,5	9,6		1%	3%				
BHL1	Homo	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
BHL2	Homo	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
BHL3	Homo	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
BHC4	Homo	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
BHL5	Homo	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
BHL6	Homo	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
BHC7	Homo	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
BHC8	Homo	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
BHC9	Homo	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
BHc10	Homo	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
BHc11	Homo	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
BHc12	Homo	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
BH13	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
BHL14	Homo	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
BHc15	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
BHc16	Homo	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
BHc17	Homo		+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
BHc18	Homo	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
BHc19	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
BHc20	Homo	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+

Résultats et discussion

10.1.4. Fermentation des sucres



Figures 27 : Fermentation des sucres

(+) :résultats positive , (-) :négative ,(T) : témoin

Tableau 6 : Résultats obtenus pour la fermentation des différents sucres

sucres Isolats	Gal	G	Mal	Man	Lac	Tré	Cell	Xyl	Sa	Ins	Lev	Ado
BHL1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BHL2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BHL3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BHC4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
BHL5	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
BHL6	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
BHC7	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
BHC8	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
BHC9	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
BHC10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
BHC11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
BHC12	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
BHC13	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
BHC14	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
BHC15	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
BHC16	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
BHC17	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
BHC18	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
BHC19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
BHC20	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-

+ : Réaction positive , - réaction négative, G : Glucose, Mal : Maltose, Lac : Lactose, Man : Mannose

Xyl : Xylose ; Cell : Cellobiose , Gal : Galactose , Sac : Saccharose , Tré : Tréhalose ,Ins : Inositol , Ado : Adonitol,
Lev :levulose

Résultats et discussion

Tableau 7 : Récapitulatif des résultats des tests de pré-identification des bactéries lactiques.

Codes	Genre	Espèces présumées
BHL1, BHL2, BHL3	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus.amylophilus</i>
BHL5, BH6, BHL14	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
BHC7	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
BHC4, BHC20	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
BHC8, BHC10, BHC11,	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus.Lactis.sp</i>
BHC12, BHC18	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
BHC13, BHC15	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
BHC19	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus. Sp</i>
BHC9. BHC16, BHC17	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus bovis</i>

Résultats et discussion

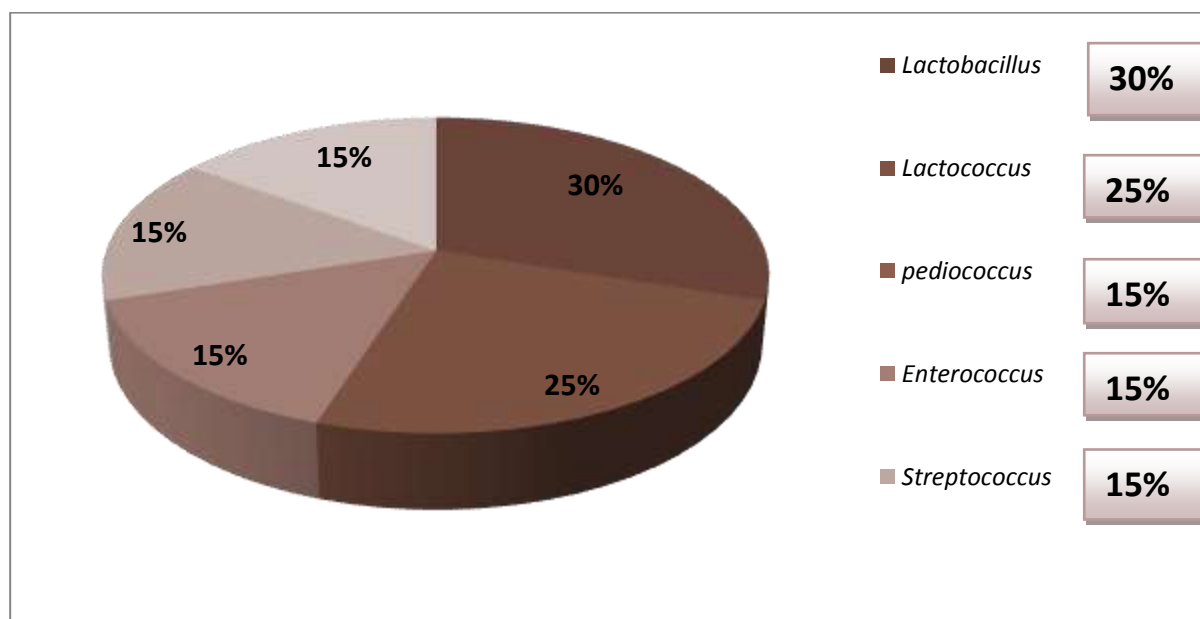


Figure 28 : Répartition des isolats lactiques au niveau des genres

Résultats et discussion

Discussion :

Vingt isolats lactiques ont été isolées à partir de blé fermenté. L'étude des principaux caractères morphologiques, biochimiques et physiologique sont montrés une diversité des genres et d'espèces. Notre étude montre une présence majoritaire en forme de coques dont la proportion est de **70%** par rapport aux bâtonnets qui est de **30%**.

Nos 20 isolats sont répartis de la manière suivante :

Quatorze isolats en forme cocci sont en paire, en chaînette, groupés et /ou amas.

Deux isolats **BHC13 et BHC15** ont donné des résultats positifs aux différents tests suivants : thermorésistance, différentes températures 25°C, 30°C, 45°C, pH= 9,6, ils se sont développés en présence de **6,5%** de **NaCl** et ont également coagulés et réduits le lait contenant **0,1%** de bleu de méthylène. En revanche, à la concentration de 0,3% de BM, ces 2 isolats n'ont ni réduit, ni coagulé le lait. Ces caractéristiques répondent aux critères que possèdent les entérocoques, ils présentent également un caractère homofermentaire, hydrolysent l'arginine et ne produisent pas l'acétoïne. Ils fermentent le lactose, le maltose, le glucose, le tréhalose mais incapable d'utiliser le xylose, le galactose, le mannose, ils sont classés comme *Enterococcus faecium* (Thapa et al, 2006, Ennadir et al, 2014). L'isolat **BHC19** possède les mêmes caractéristiques que les 2 précédents isolats sauf qu'il fermentent le mannose, ce qui permet de classer cet isolat à l'espèce *Enterococcus sp* (Badis et al., 2004).

Les isolats **BHL5, BHL6, BHL14** appartiennent à *Lactobacillus* qui poussent à 45°C, ne se développent pas à pH=9,5, ils tolèrent une concentration de **6,5% de NaCl**. Ils sont capables d'utiliser le glucose, le maltose, le lactose, le galactose, le cellobiose et le tréhalose. Ces isolats se rapprochent de l'espèce *Lactobacillus plantarum* (Ennadir et al, 2014).

Les isolats **BHL1, BHL 2, BHL3** poussent à 45°C, incapables de décarboxyler l'arginine, se développent à une concentration de **6,5%** de **NaCl** et réduisent le milieu lait à **0,1 et 0,3%** de **BM**, ils sont incapables d'utiliser le xylose, le lactose, le cellobiose, le tréhalose et le saccharose. Ces isolats ont été pré-identifiés parmi l'espèce

Lactobacillus amylophilus (Hammes et Vogel, 1995, Hammes et Hertel, 2006).

Les isolats **BHC 8, BHC10, BHC11** sont des bactéries homofermentaires, ne poussent pas à 45°C ni à 6,5% de NaCl, résistent à 63°C pendant 30 min, incapable de produire de l'acétoïne, fermentent le

Résultats et discussion

tréhalose, cellobiose , lactose ,xylose ,maltose. Ces caractéristiques montrent que ces isolats appartiennent à l'espèce *Lactococcus lactis*. (Guiraud,1998).

Les isolats **BHC12, BHC18** ont donné des résultats positifs aux différents tests effectués sauf à la production de dextrane, la croissance en milieu hypersalé (**6,5%**) NaCl, à la température de 45°C et PH=9,6. Ces isolats ont capacité de fermenter le maltose, lactose, galactose, peuvent être identifiés à *Lactococcus raffinolactis*, (Guiraud ,1998).

Concernant les trois derniers isolats cocci, **BHC4, BHC7, BHC20**, ils forment des colonies rondes qui au microscope optique révèlent une forme en tétrades caractéristique du genre *Pediococcus*.

Ces isolats homofermentaires sont capables de se développer à 45°C, à la concentration de 6,5% NaCl, d'hydrolyser l'arginine, ne tolèrent pas un pH de 9,6 fermentent le maltose. Ces isolats peuvent être pré-identifiés à l'espèce à *Pediococcus acidilactici*, (Carr et al. 2002). En outre, ils ont la capacité de fermenter le glucose, cellobiose, le tréhalose et le saccharose et sont incapable utiliser le maltose.(Kheddid et al ,2006 ,Ennadir et al , 2014) .Quant à l'isolat **BHC7**, il est incapable d'hydrolyser l'arginine (Carr et al ,2002) , ne tolère pas un pH 9,6 de et ne se développe pas à 6,5% de NaCl . Le profil de cet isolat se distingue par sa capacité à fermenter le maltose, il peut être identifié à *pediococcus pentosaceus* (Ennadir et al , 2014, Kheddid et al , 2006 .)

Les isolats **BHC9, BHC16 et BHC17** sont des bactéries homofermentaires, mésophiles, ne poussent pas à 6,5 NaCl , à 45°C et ADH négative. Ils ont la capacité à fermenter le mannose, cellobiose et lactose et sont incapable utiliser l'inositol ,tréhalose, ces isolats peuvent être identifiés à *Streptococcus bovis* (Scheilfer et kilpper – Bälz ,1998).

Conclusion :

Le « Hamoum » est un blé fermenté qui a subi une fermentation due au stockage souterrain « Matmora ». Ce produit constitue un produit terroir que nos aînés utilisaient pour leur consommation en région rurale.

Au cours de ce travail nous avons commencé notre étude par une identification phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du « Hamoum ». Nous avons sélectionné 20 isolats lactiques dont nous avons réalisé une identification classique qui a été réalisée à l'aide d'une étude morphologique, biochimique et physiologique à permis ont d'orienter nos bactéries vers 5 principaux genres : (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*).

La distribution quantitative a permis de caractériser ces isolats et de les pré-identifier. Parmi le genre *Lactobacillus* 3 appartiennent à l'espèce *Lactobacillus plantarum* et trois représentent une espèce *Lactobacillus amylophilus*.

Les coques sont représentés par :

- Deux espèces dont *Pediococcus acidilactici* .
- Une espèce *P. pentosaceus*.
- Trois espèces *Lactococcus* , *lactis*. *Sp*.
- Deux espèces *Lactococcus raffinolactis* .
- Deux espèces *Enterococcus faecium* .
- Une espèce *Enterococcus. sp* .
- Trois espèces *Streptococcus bovis* .

Cette distribution montre une grande diversité de la flore lactique.

Références

bibliographiques

Référence Bibliographiques

A

Alfonso, A, G.Ventimiglia, O .Corona , R.Di Gerlando,R ,Gaglio,N .Francesca,G.Moschetti and L Settani, (2013) .Diversity and technological potentiel of lactic acid bacteria of wheat flours . Food Microbiology 36 ,343-354 .

Alves L et Xavier M (2002) . Les Céréales Cours de Bromatologie , Lyon Ecole ,nationale vétérinaire . En ligne < <http://www.vet.Lyon.fr/ens/nut/WebBromato/cours/cmgrain/preseces.html> .

Atlan D . Béal C ,Champonier-Vergés M.C , Chapot-Chartier M.P ,Chouayekh H , Cocaign-Bousquet M , Deghorain M , Gadu P , Gilbert C ,Goffin P , Guédon E,Guillourd L , Guzzo J , Juillard V , Ladero V , Lindeley N, Lortal S ,Loubière P ,Maguin E ,Monnet V, Rul F, Tourdot-Maréchal R .et Yvon M . 2008 .

Axelsson Lars (2004) .Lactic Acid Bacteria : Classification and physiology In Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects , Salminen S, Wright A , v , Ouwehand A . 3^e Ed , Marcel Dekker : 1-66

B

Badis A, Guetarni D ,Moussa Boudjema B ,:Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw gout milk of four Algerian races ,Food Microbiology ,21 :579-588

Bartali ,E,H , (1987). Underground Storage pits in morocco .Tunnelling and Underground Space Technology 2 : 381-383 .

Bartali , E,H ,:Safie , E .and Persoons , E (1989) , Stockage des céréales dans des entrepôts souterrains . Céréales en régions chaudes : conservation et transformation Aupelf J Libbey Eurotext,pp 27-38 .

Bartali , H , Debarh , A . (1991) Evaluation et amélioration de la technique traditionnelle du stockage souterrain des céréales au Maroc , Terre et Eaux Revue Marocaine des Sciences et Terre et Eaux . Revue Marocaine des Sciences et Techniques du Développement Rural , n°82 ,pp 3-20 .

Référence Bibliographiques

Bekhouché 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 du Constantine .Science & Technologie , 23 : 38-45 .

Benbelkacem A (2007) :Les tricales : cultures performances et différentes possibilités d'utilisation en Algérie .Journée techniques sur la culture du triticales en zone semi aride et son utilisation par les animaux domestique : Oum Elbouagui-Elkhroub , 23 :38-45.

Bonneau L (2003) . Information technique sur le blé
Boulangerie .<[http://www,Boulangerie .net /MP/Infoblefar .html](http://www.Boulangerie.net/MP/Infoblefar.html) .

Bottazzi v(1988) .An introduction to rod –shaped lactic bacteria , Biochimie , 70 : 303-315 .

C

Cahagnier B .(1996) .Céréales et produit dérivé In « microbiologie alimentaire »tome 1 « aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments »Edition Technique et Documentation Lavoisier , Paris , pp 392 – 414 .

Carr ,FJ , Chill , D , et Maida ,N(2002) .The Lactic Acide Bacteria .A literature Survey .
Critical Rev .Microbiol ; 28 :4.281370 .

Collins M,D,Farrow J.A ,E,Philips B.A,Ferusu S and Jones D (1987) .

Classification of *Lactobacillus divergens* , *Lactobacillus pisciola* , and some catalase –
négative , asporogenous , Rod-shaped bacteria from poultry in new genus *Carnobacterium* .
Int , J .Syst ; Bacteriol , 37 : 310-316 .

Corrieu ,G,& Luquet , F .M .(2008) :Bactéries lactiques : De la génétique au ferment .
paris ;Edition Tec et Doc p ,849 .

Cotty PJ and Bhatnagar D (1994) :Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* Strains
to prevent aflatoxine contamination and production of aflatoxine biosynthetic pathway
enzyme . Appel Environ Microbiol n°60 :2248- 2251 .

**Cruz J .F, Dimanche , P , Ducamp – Collin M .N , Fliedel ,G ; Joas J .Marchand J.L,Mestres
C, et Troude , F , (2002)** , La récolte , le stockage et la première transformation In
« Mémento de l'agronome » . CIRAD-GRET. Edition Quae ,Paris ,pp 717-746 .

Référence Bibliographiques

D

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

De Roissart et Luquet .(1994) . Bacteries lactiques-Aspect fondamentaux .

Dellagio .F,Roissart . H ,Torriani S ,Curk MC and Janssens D .(1994) .

Caracteristiques générales des bactéries lactiques dans :Bacteries lactiques ;Roissart H et luquet FM . Ed : Lorica Uriage : 25-116 .

Devriese ,LA, et pot , B et collins,M ,D (1993) . phénotipic identification of the genus Enterococcus and differentiation phylogenically distinct enterococcal species and species group : J.Appl . 75 :399-408 .

Dervies , LA . et pot , B . (1995) , The genus Enterococcus ,In the Genera of Lactic Acid Bacteria A .B, pp , 327-367, Etuted by B.J.B.Wood et w.H . Holzapfel .London Blackie Academie et Profesioonal .

Devoyod J ,J et Poullain F (1988) . Les Leuconostocs propriétés : leur rôle en technologie laitière , Le lait , 68 (3) : 249-280 .

Doumandji A, Doumandji-mitiche B et Salaheddine D (2003) .Cours de technologie des céréales technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage . Office des Publication Universitaires : 1-22 .

Dortu , C .and P . Thonart , (2009) . Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristique et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires . Biotechnol . Agron Soc . Environ .13 (1) ,pp 143-154 .

E

Ennadir J ,Hassikou .R ,Al Askari .G ,Araho .M ,Bouazza .F,Amallah .L,Amine S.A ,Khedi .k,(2014) .Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées des farines de blé d'origine marocaine (Phenotypique and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat flour from Morocco) ,J.Mater .Environ .Sci .5(4) 1125-1132.ISSN :2028-2528 CODEN :JMESCN.P1126 .

Référence Bibliographiques

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

F

FAQ . (1994) .Syntheses de l'expérience de l'expérience africaine en amelioration des techniques après récolte ;Journées Techniques accra , Ghana , 4-8juillet , 41 Pp .

Feillet P (2000) . Le grain du blé : composition et utilisation . INRA paris 196- 198 . 308 . ISBN 2 -7380-0896-8,55-75 .

G

Garavie E .I(1986) . Gram positive cocci –Genus *Leuconostoc* , In : *Bergey's Manual* , 9th edit , the Williane and Wikins Co ,Baltimore : 1071-1075 .

Guiraud JP (2003).Microbiologie alimentaire :Série agro-alimentaire .Ed Dunod .696.

H

Hadria R (2006) .Adaptation et spatialisaton des modèles stricts pour la gestion d'un périmètre céréalier irriguée en milieu semi aride .Thèse de doctorat . UNIV Cadi Ayad Samlalia –Marrakech .

Hemme Denis and Foucaud –Scheunemann (2004) .*Leuconostoc* ,characteristics , use in diary technologie and prospects in functional foods , *International Dairy Journal* .14 :467-494.

Holzappel W.H .Haberer P ,Geisen R,Bjorkroth J . et Schillinger U .(2001) .Taxonomy and important features of probiotic microorganismes in food and nutrition .*Am .J.Clin.Nutr* .73 (Suppl) :365-373 .

Ho Thi Nguyet Thu 2008 . Etude de la flour lactique du Nem Chua ,Produit carné fermenté cru traditionnel du sud Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit .Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments et Nutrition .Université Bordeaux 1 –France.

Hammes WP et Hertel C (2006). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* .*The Prokaryotes* , 4 :320-403 .

Référence Bibliographiques

J

Jeantet ,R,Croguennec ,T,Schuck .p,Brulé .G,Coord (2006) .Sciences des aliments :Biochimie-Microbiologie-Procédés-Produits .Ed .Tec et Doc Lavoisier,Paris .453 .

K

Klein G,Pack A ,Bonaparte C and Reuter G (1998).Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria International .Journal of Food Microbiology .41 :103-125 .

Larpent JP et Larpent MG (1990).Mémoento technique de microbiologie .Second ED technique et documentaire Lavoisier , 417-420 .

Larpent JP (1996).Les bactéries lactiques .In : Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires ,tome 2 .Second Edition .(Eds :Bourgeois CM,and Larpent JP)Ed :Tec et Doc Lavoisier Paris . :6-33 .

Leloup V,Collona p ,et Buleon A (1991). «Les transformations enzymatiques des glucides » .In Biotransformation des produits Céréaliers .Paris techniques et documentation Lavoisier .Chapitre III :79-128 .

Leveau J .y.Boiux M .et De Roissart H.B .(1991).La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires .2^e Ed ,Tec & Doc ,La voisiner .Paris . 3 :240P .

Ludwig w,SchleiferK-H and Whitman W.B (2008) . Bergey's taxonomic outlines – Revised Road Map to the phylum Firmicutes ,vol . 3 .Disponibile [http //www,bergeys.org /outlines/Bergeys_ 3_Outline .Pdf](http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_3_Outline.Pdf) .

M

Metchnikoff E (1908).**Prolongation of life** :Optimistic studie .william Heinemann ,London :161-183 .

Référence Bibliographiques

Molinié A et Pfohl –Leszkowies A (2003). Les mycotoxines dans les céréales : les points importants de contrôle de la production au stockage ,le devenir dans les produits dérivés .Laboratoire de toxicologie et sécurité alimentaire-Auzeville-Tolosane .Note de l'ASEDIS-SO N°spécial Mycotoxines :9 .

N

Niquet ,G . (2006) . Stockage à la ferme des grains Issus de l'agriculture biologique .Office national interprofessionnel des céréales . Institut du Végétal ARVALIS ,PP 1-4 .

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

Nuret M (1991). «Les techniques de mouture »In Les industrie de première transformation des céréales .Paris Tec et Doc Lavoisier : 333-335 .

O

Orla-Jensen S (1919).The LacticAcide Bacteria .Dairy Bacteriology , Fred Host and Son ,Copenhagen .

P

Pilet M-F,Magras Catherine et Michel Federighi (2005).Bactéries lactiques In Bactériologie alimentaire « comendim d'hygiène des aliments » .Federighi M .Economica.

Prescott L,M,Harley J .Pand klein D .A (1999).Microbiology ,4th edn .New york :WCB /McGraw –Hill.

Reimbert M .A (1982).Silo théorie et pratique .Calcul fonctionnement et réalisation , Eyrolles Paris.

Richard-Molard M , (1988).Microbiologique des céréales et des farines In « Les industries de première transformation des céréales .Edition Techniques et Documentation La voisier .paris ,PP 159-173 .

Ruiz -Moyano ,S,Martin ,A,Benita ,M .J,Nevado ,F.P,Cordoba ,M .G .(2008).

Référence Bibliographiques

O

Orla-Jensen S (1919).The LacticAcide Bacteria .Dairy Bacteriology , Fred Host and Son ,Copenhagen .

P

Pilet M-F, Magras Catherine et Michel Federighi (2005).Bactéries lactiques In Bactériologie alimentaire « comendim d'hygiène des aliments » .Federighi M .Economica. Meat Sciences ,(80),715-721 .

S

Schillinger U and LÛcke F-K (1987).Identification of Lactobacilli from and meat products .Food Microbiologie .4 :199-208 ;

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

Soltner D(2005).Les grandes productions végétales .20 èm Ed CCTA ,Pp : 20-140 .

Stiles Michael E and Holzapfel Wilhem H (1997).Lactic bacteria of foods and their current taxonomy . Inter .J .Food Microbiol ,36 :1-29 .

T

Tabasco R,Rarup T,Janer C , Pelaez C and Requena T (2007).Selective enumeration and identification of mixed cultures of Streptococcus thermophilus ,Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus ,L.acidophilus ,L . paracasei subsp Paracasei and Bifidobacterium lactis in fermented milk . Dairy Journal . 23 : 250-255 .

Tailliez Patrick , (2001) . Mini-revue : les bactéries lactiques , ces être vivants apparus il ya après de 3miliards d'années .Lait .81 :1-11 .

W

Référence Bibliographiques

Wallace , T .D,Bradley , S,Buckley ,N .D .& Green –Jonhson , J .H .(2003) .
Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells : Effects on
cytokine production .Journal of Food Production 2003 .Vol .66 (3) :46 **Annexe A :**

Annexes

Annex

Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharpe , 1960

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	5g
Peptone	10g
Acétat de soduim	5g
Citrate de sodium	2g
Glucose	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSo ₄	0,1g
MnSo ₄	0,05g
Agar	12g
Tween 80.....	1ml
Eau distillée q .S.P.....	1000ml
Ph=6,5 à 37°C	

Autoclavage à 121°C/20 min .

❖ Milieu MSE (Mayeux , Sandine et Elliker,1960)

Tryptone	20g
Gélatine	2,5g
Extrais de levure.....	5g
Saccharose	100g
Glucose	5g
Citrate de sodium.....	1g
Acide de sodium.....	0,075
Agar-Agar.....	15g
Eau distillée qsp	1000ml
Ph=6,5 ,Aoutoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

Annex

Annexe B : Milieux liquide

Milieu liquide

MRS- Bouillon

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	8g
Extrait de levure	4g
Glucose	20g
Acétate de sodium trihydraté.....	5,0g
Citrate d'ammonium.....	2,0g
Tween 80	1,0ml
Hydrogénophosphate de potassium	2,0g
Sulfate de magnésium heptahydraté.....	0,2g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0,05g

PH=6,5

Bouillon hypersalée

Employée pour différencier les lactocoques thermophiles

Peptone	15g
Extrait de viande.....	5g
Glucose.....	5g
NaCl	65g

On Ajoute le Ph=6,5

Stréilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min

Annex

❖ Milieu de Clark et Lubs

Peptone.....	5g
Peptone di potassique	5g
Glucose	5g
Eau distillée.....	1000ml

On dissout tous les ingrédients dans l'eau distillée on ajuste le ph=6,5

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20min.



❖ Milieu MRS BCP

MRS(milieu liquide) 1000 ml

Bromocrésol pourpre 0 ,05g

PH=6,5

Autoclave 120°C pendant 20min

Lait écrémé

Lait en poudre 110 g

Eau distillée 1000 ml

Autoclaver à 110 °C pendant 10min.

6-472.