

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 DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2017

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**SAHLELOU SOUAD**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité :-EXPLOITATION DES ÉCOSYSTÈMES MICROBIENS LAITIERS**

THÈME

**Comparaison de deux écosystèmes microbiens  
laitiers entre les étables utilisant l'ensilage et le  
foin sec**

Soutenu le 02 /07/2017

DEVANT LE JURY

Président	ATTOU SAHNOUN	DOCTEUR U. Mostaganem
Examinatrice	MME RECHIDI – SIDHOUM NADRA	M.A.A U. Mostaganem
Encadreur	M.BENMILOUD DJAMAL	M.A U. Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire microbiologie d'université Abd Al-Hamid Ibn Badis (ITA)  
Et  
Laboratoire des Sciences Techniques et Production Animale de l'université de Mostaganem.*

# DEDICACE

*Spécialement à mon père*

*À qui je dois énormément, qui a cru en moi et qui m'a donné les moyens d'aller aussi loin. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.*

*A ma très chère mère Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le Symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.*

*A ma très chère sœur : Asma, Amel, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.*

*A mes très chers frères : Med Zakaria, Abdel Hakim, Lakhal, Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*A mes Sœurs : Meriem, Fatima, Ahlem, Amira, Malika.*

*A mon très cher ami : oussama qui ma encourager, son aide ma était très précieuse. je le remercie et je n'oublierai jamais son soutien moral dans le moments les plus difficiles, que dieu le protège.*

*A toute la promotion EEML 2016/2017*

*A tous les membres de ma famille SAHLELLOU, petits et grands Qui n'a cessé de me soutenir pendant tout mon parcours.*

## Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Mes reconnaissants remerciements à

Mr HOMRANI Abd el kader, MCA le responsable du parcours EEML, directeur de laboratoire LSTPA, mon enseignant.

Mr. BENMILOUD, professeur à agronomie qui ma encadrez, pour son aide et collaboration, et son suivi malgré ses charges professionnelles.

Dr ATTOU, pour son suivie et d'avoir accepté de juger mon travail en tant que président

Je suis particulièrement reconnaissante à Mme RECHIDI -SIDHOUM MAA à l'université de Mostaganem pour bien accepter à évaluer et examiner ce mémoire.

Enfinement, je remercie ma famille et tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin l'accomplissement de ce mémoire. A vous tous, un grand Merci.

Souad

# **SOMMAIRE**

# **Sommaire**

**RESUME**

**ABSTRACT**

## **CHAPITRE II : LES BACTERIES LACTIQUES**

### **I. GENERALITES SUR LES BACTERIES LACTIQUES :**

<b>I. 1 Définition des bactéries lactiques :</b> .....	<b>11</b>
<b>I. 2 Origine des bactéries lactiques :</b> .....	<b>12</b>
<b>I. 3 Habitat :</b> .....	<b>12</b>
<b>I. 4 Diversité et taxonomie :</b> .....	<b>13</b>

### **II. PROPRIETES METABOLIQUES :**

<b>II. 1 Métabolisme des sucres :</b> .....	<b>15</b>
<b>II. 2 Métabolisme du citrate :</b> .....	<b>16</b>

### **III. LES APTITUDES BIOTECHNOLOGIQUES DES BACTERIES LACTIQUES :**

### **IV. CARACTERISTIQUE BIOTECHNOLOGIES DES BACTERIES LACTIQUES :**

<b>c . 1 Activité acidifiante :</b> .....	<b>18</b>
<b>c . 2 L'acide lactique :</b> .....	<b>19</b>
<b>c . 3 Activité protéolytique :</b> .....	<b>19</b>
<b>c . 4 Activité lipolytique :</b> .....	<b>19</b>

## **CHAPITRE III : VARIATION DE L'ECOSYSTEME MICROBIEN LAITIER**

### **I. L'ALIMENTATION :**

<b>I. 1 les aliments et leur utilisation en production laitière :</b> .....	<b>26</b>
---	-----------

## **II- LES RACES BOVINES EN ALGERIE :**

**II. 1 les races locales :.....32**

**II. 2 Les races à hautes potentielles de productivité : .....37**

**II. 3 Les races améliorées ou mixtes :.....37**

## **III- LA TRAITE :**

**III.1 La salle de la traite :.....38**

**III.2 Les origines et les réservoirs de la microflore du lait : .....38**

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## **CHAPITRE I : MATERIEL & METHODES**

**I- LIEU DE L'ETUDE :**

**II- PROVENCE DES ECHANTILLONS :**

### **III- MATERIEL**

**III.1 Matériel utilisé pour les analyses physico-chimiques : .....42**

**III.2 Matériel utilisé pour les analyses microbiologiques : .....42**

### **IV- METHODES D'ANALYSES :**

**IV.1 Les analyses physico- chimiques : .....45**

**IV.2 L'analyse Les analyses microbiologiques : .....46**

## **CHAPITRE II : RESULTATS & DISCUSSIONS**

### **I- LES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES ET MICROBIOLOGIQUE DU LAIT :**

**I.1 Les analyses physico- chimiques du lait :.....56**

**I.2 Les analyses microbiologiques du lait :.....56**

### **II- LES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DE L'ENSILAGE :**

**II.1 Isolement et purification : .....71**

**II.2 Dénombrement : .....71**

**II.3 Pré-identification des souches : .....71**

**II.4 Etude physiologique et biochimique : .....73**

**III- DISCUSSION**

**CONCLUSION**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQU**

**ANNEXE**

## Résumé

Notre étude a permis l'isolement et la purification de 8 souches de bactéries lactiques à partir de lait de vaches alimentées au foin à Hadjadj, Mostaganem et 9 souches, à partir de lait de vaches alimentées à l'ensilage, ainsi que 7 souches isolées à partir de l'ensilage de l'exploitation de l'ITA, Mostaganem.

Ce travail a pour but de vérifier l'influence de l'alimentation sur l'écosystème microbien laitier (*Robinson, 2002*).

Nous sommes arrivés à la conclusion que malgré la différence de l'alimentation, la prédominance des Lactococcus est démontrée, surtout en présence de l'ensilage.

**Mots clés :** bactéries lactiques, lait, ensilage, Mostaganem.

## **Abstract**

Our study resulted in the isolation and purification of 8 strains of lactic acid bacteria from milk from hay-fed cows in Hadjaj, Mostaganem and 9 strains from cows fed with silage in Hassi Mamache, as well as 7 strains Isolated from silage from the operation of the ITA, Mostaganem.

The purpose of this work is to verify the influence of diet on the dairy microbial ecosystem (*Robinson, 2002*).

We have come to the conclusion that despite the difference in feeding, the predominance of Lactococcus is demonstrated, especially in the presence of silage.

**Key words :** lactic acid bacteria, milk, silage, Mostaganem.

## ملخص

سمحت دراستنا من عزل وتنقية 8 سلالات بكتيريا حامض اللاكتيك من حليب بقرة تتغذى على القش الجاف لمزرعة واقعة بحجاج، مستغانم و 9 سلالات بكتيريا حامض اللاكتيك من حليب بقرة تتغذى على العلف وكذا 7 سلالات بكتيريا حامض اللاكتيك من العلف المخزن لمزرعة حاسي ماماش بمستغانم .

ويهدف هذا العمل للتحقق من تأثير النظام الغذائي على النظم الإيكولوجية الميكروبية للألبان (روبيسون، 2002).

و وصلنا إلى استنتاج أنه على الرغم من الاختلاف في النظام الغذائي، تجلت هيمنة بكتيريا اللاكتوكوكيس، خصوصا في ظل وجود العلف.

**الكلمات المفتاحية :** بكتيريا حامض اللاكتيك، حليب بقر، العلف, مستغانم .

## Liste des Tableaux

<b>Tableau N° 1</b> : La composition de lait de vache (Source : Carole l. vignole, 2002) ....	<b>3</b>
<b>Tableau N° 2</b> : Flore originelle du lait cru (Source : Vignola, 2002).....	<b>4</b>
<b>Tableau N° 3</b> : Germes contaminant le lait cru (Source : Jakob et al., 2009) .....	<b>5</b>
<b>Tableau N° 4</b> : principales bactéries du lait (Source : Monsallier, 1994).....	<b>6</b>
<b>Tableau N° 5</b> : Caractéristiques de quelques bactéries lactiques (Source : Hansal, 2015) .....	<b>21</b>
<b>Tableau N° 6</b> : Impacts potentiels des modalités d'ensilage (Source : Cuvelier, 2006) .....	<b>27</b>
<b>Tableau N° 7</b> : Critères d'évaluation sensorielle de la qualité d'un ensilage par l'éleveur (Source : Cuvelier, 2006).....	<b>28</b>
<b>Tableau N° 8</b> : Identité des échantillons étudiés .....	<b>42</b>
<b>Tableau N° 9</b> : Résultat des mesures de l'acidité de deux échantillons de lait de vache .....	<b>56</b>
<b>Tableau N° 10</b> : Résultats obtenus après une analyse sur Lactostare, les valeurs observées sur l'écran de lecture l'appareil.....	<b>56</b>
<b>Tableau N°11</b> : Résultat de dénombrement des échantillons de lait de vache .....	<b>57</b>
<b>Tableau N°12</b> : Aspect macroscopique de deux échantillons de lait de vache.....	<b>58</b>
<b>Tableau N°13</b> : Aspect microscopique de deux échantillons de lait de vache .....	<b>60</b>
<b>Tableau N°14</b> : Caractéristique physiologique et biochimiques des souches lactiques isolés à partir de l'échantillon 1 .....	<b>66</b>
<b>Tableau N°15</b> : Caractéristique physiologique et biochimiques des souches lactiques isolés à partir de l'échantillon 2 .....	<b>67</b>
<b>Tableau N°16</b> : Fermentation de quelques sucres par les souches lactiques isolées de l'échantillon 1 .....	<b>68</b>
<b>Tableau N°17</b> : Fermentation de quelques sucres par les souches lactiques isolées de l'échantillon 2 .....	<b>68</b>
<b>Tableau N°18</b> : Activité protéolytique des souches lactiques isolées à partir du lait de vache .....	<b>69</b>
<b>Tableau N°19</b> : Activité lipolytique des souches lactiques isolées à partir du lait de vache .....	<b>69</b>
<b>Tableau N°20</b> : Dénomination des souches lactique isolées, purifiées et identifiées	<b>70</b>

<b>Tableau N°21 :</b> Résultat des analyses bactériologiques de l'ensilage .....	<b>71</b>
<b>Tableau N°22 :</b> Aspect macroscopique des souches de l'ensilage .....	<b>72</b>
<b>Tableau N°23 :</b> Aspect microscopique des souches de l'ensilage.....	<b>72</b>
<b>Tableau N°24 :</b> Caractéristique physiologique et biochimiques des souches lactiques isolés à partir de l'ensilage.....	<b>77</b>
<b>Tableau N°25 :</b> Fermentation de quelques sucres par les souches lactiques isolées de l'ensilage .....	<b>78</b>
<b>Tableau N°26 :</b> Activité protéolytique des souches lactiques isolées à partir de l'ensilage .....	<b>78</b>
<b>Tableau N°27 :</b> Activité lipolytique des souches lactiques isolées à partir de l'ensilage .....	<b>79</b>
<b>Tableau N°28 :</b> : Dénomination des souches lactique isolées, purifiées et identifiées .....	<b>80</b>

## Liste des Figures

<b>Figure N° 1</b> : Observation des bactéries lactiques au microscope électronique à transmission (x10000) (Source : Larpent, 1989). .....	<b>12</b>
<b>Figure N° 2</b> : Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i> (Source : Axelsson, 2004). <b>15</b>	<b>15</b>
<b>Figure N° 3</b> : Flux microbiens dans les étables de production laitière (Source : Bouton et al., 2007). .....	<b>23</b>
<b>Figure N° 4</b> : Transferts potentiels des principaux genres microbiens (bacilles et coques à gram positif, bacilles à Gram négatif identifiés dans le lait) (Source : Vacheyrou et al., 2011 ; Verdier-Metz et al., 2012 ; Masoud et al., 2012 ; Quigley et al., 2012).. ...	<b>24</b>
<b>Figure N° 5</b> : Flux microbiens dans les étables de production laitière (Source : Cuvelier, 2006).....	<b>26</b>
<b>Figure N° 6</b> : Champ de pois protéagineux (Source : Cuvelier, 2006).....	<b>31</b>
<b>Figure N° 7</b> : Répartition géographique des différents types du bovin local en Algérie (Source : Itebo, 1997).....	<b>33</b>
<b>Figure N° 8</b> : Race locale Algérienne. La Guelmoise (Source : Feliachi, 2003).....	<b>34</b>
<b>Figure N° 9</b> : Race locale Algérienne. La Cheurfa (Source : Feliachi, 2003).....	<b>34</b>
<b>Figure N° 10</b> : Race locale Algérienne. La Sétifienne (Source : Feliachi, 2003).....	<b>35</b>
<b>Figure N° 11</b> : Race locale Algérienne. La Chélifienne (Source : Feliachi, 2003).....	<b>35</b>
<b>Figure N° 12</b> : Race locale Algérienne. La Kabyle (Source : Feliachi, 2003).....	<b>36</b>
<b>Figure N° 13</b> : Race locale Algérienne. La Tlemcénienne (Source : Kirat, 2007).....	<b>36</b>
<b>Figure N° 14</b> : Bovins importés en Algérie (a. Holstein, b. Montbéliarde, c. Tarentaise). (Source : Bencharif, 2001).....	<b>37</b>
<b>Figure N° 15</b> : Produits de croisement :(a. Montbéliarde croisée, b. Holstein croisé) (Source : Bencharif, 2001).....	<b>37</b>
<b>Figure N° 16</b> : Prise de l'échantillon.....	<b>41</b>
<b>Figure N° 17</b> : Représentation Schématique de travail.....	<b>44</b>
<b>Figure N° 18</b> : Mesure d'acidité.....	<b>45</b>
<b>Figure N° 19</b> : Lactostare.....	<b>46</b>
<b>Figure N° 20</b> : Représentation Schématique d'étape de l'isolement des souches.....	<b>48</b>

<b>Figure N° 21</b> : Protocole de la fermentation des hydrates de carbones.....	<b>52</b>
<b>Figure N° 22</b> : Schéma de conservation courte durée des bactéries lactiques purifiées (Source : Badis, 2005).....	<b>54</b>
<b>Figure N° 23</b> : Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées (Source : Badis, 2005).....	<b>55</b>
<b>Figure N° 24</b> : Aspect macroscopique des souches d'échantillon 1 aux milieu M17 après 24h d'incubation, (a) <i>Lactobacillus</i> , (b) <i>Streptococcus</i> , (c) <i>Pediococcus</i> , (d) <i>Enterococcus</i> , (e) <i>Lactococcus</i> .....	<b>59</b>
<b>Figure N° 25</b> : Aspect macroscopique des souches d'échantillon 2 aux milieu M17 après 24h d'incubation, (a) <i>Lactobacillus</i> , (b) <i>Pediococcus</i> , (c) <i>Enterococcus</i> , milieu M17.....	<b>59</b>
<b>Figure N° 26</b> : Observation microscopique des souches d'échantillon 2 après la coloration de Gram (G x100), (a) <i>Lactobacillus</i> , (b) <i>Pediococcus</i> , (c) <i>Enterococcus</i> .....	<b>60</b>
<b>Figure N° 27</b> : Observation microscopique des souches d'échantillon 1 après la coloration de Gram (G x100), (a) <i>Lactobacillus</i> , (b) <i>Streptococcus</i> , (c) <i>Pediococcus</i> , (d) <i>Enterococcus</i> , (e) <i>Lactococcus</i> .....	<b>61</b>
<b>Figure N° 28</b> : Résultats obtenus pour le type fermentaire des souches isolées à partir de deux échantillons de lait de vache.....	<b>62</b>
<b>Figure N° 29</b> : Résultats obtenus pour le type Na cl 4 % des souches examinés de l'échantillon 1.....	<b>62</b>
<b>Figure N° 29</b> : Résultats obtenus pour le type Na cl 4 % des souches examinés de l'échantillon 1.....	<b>62</b>
<b>Figure N° 30</b> : Résultats obtenus pour le type Na cl 6 % des souches examinés de l'échantillon 2.....	<b>63</b>
<b>Figure N° 31</b> : Résultats obtenus pour les déférentes PH des souches examinés de l'échantillon 1.....	<b>63</b>
<b>Figure N° 32</b> : Résultats obtenus pour les déférentes PH des souches examinés de l'échantillon 2.....	<b>63</b>
<b>Figure N° 33</b> : Résultats obtenus pour les déférentes températures des souches examinés de l'échantillon 1.....	<b>64</b>
<b>Figure N° 34</b> : Résultats obtenus pour les déférentes températures des souches examinés de l'échantillon 2.....	<b>64</b>
<b>Figure N° 35</b> : Résultats obtenus pour le test de thermorésistantes des souches examinées.....	<b>65</b>
<b>Figure N° 36</b> : Résultats obtenus pour le test lait bleu de Sherman des souches examinées.....	<b>65</b>
<b>Figure N° 37</b> : Halo clair due à une activité protéolytique.....	<b>69</b>

<b>Figure N° 38</b> : Halo clair due à une activité lipolytique.....	<b>70</b>
<b>Figure N° 39</b> : Observation microscopique des souches d'ensilage après la coloration de Gram (G x100), (a) <i>Lactococcus lactis</i> , (b) <i>Enterococcus sp</i> .....	<b>73</b>
<b>Figure N° 40</b> : Résultats obtenus pour le type fermentaire des souches isolées à partir de l'ensilage.....	<b>73</b>
<b>Figure N° 41</b> : Résultats obtenus pour le type Na cl 4 % des souches examinés de l'ensilage.....	<b>74</b>
<b>Figure N° 42</b> : Résultats obtenus pour le type déférente PH des souches examinés de l'ensilage.....	<b>74</b>
<b>Figure N° 43</b> : Résultats obtenus pour des souches examinés de l'ensilage à déférente température.....	<b>75</b>
<b>Figure N° 44</b> : Résultats obtenus pour le type déférente thermorésistantes des souches examinées.....	<b>75</b>
<b>Figure N° 45</b> : Résultats obtenus pour le test lait bleu de Sherman des souches examinées.....	<b>76</b>
<b>Figure N° 46</b> : Halo clair due à une activité protéolytique.....	<b>79</b>
<b>Figure N° 47</b> : Halo clair due à une activité lipolytique.....	<b>79</b>
<b>Figure N° 48</b> : Répartitions des genres de l'échantillon 1.....	<b>83</b>
<b>Figure N° 49</b> : Répartitions des genres de l'échantillon 2.....	<b>83</b>
<b>Figure N° 50</b> : Répartitions des genres de l'ensilage.....	<b>84</b>

## Liste des abréviations

**ADN**: Acide désoxyribonucléique

**ARN**: Acide ribonucléique

**C** : Carbone

**C°** : degré Celsius

**CO<sub>2</sub>**: dioxyde de carbone

**D°** : degré dornic

**H<sub>2</sub>O** :Hydroxyde d'hydrogène

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** :Dioxyde de carbone

**MRS** : Man, Rogosa and Sharpe.

**MG** : matière grasse

**MS** : matière sèche

**MP** : matière protéine

**M17** : Terzaghi et Sandine

**PCA** : plate count agar

**PH** : potentiel d'hydrogéné

**SM** : solution mère

**T°** : température

**µfc** : unité formant colonie

**Na cl** : Chlorure de sodium

# **INTRODUCTION**

## Introduction

La connaissance du lait passe par la connaissance de son écosystème microbien sur les lieux de sa production.

L'étude des variations de cet écosystème renseigne sur l'influence de dizaine de facteurs liés à l'environnement de la vache, son alimentation, son hygiène et les interventions de l'homme. (*Robinson, 2002 ; Jacob et al., 2009*).

La recherche bibliographique nous a permis de savoir que la richesse et les profils microbiens sont liés au mode d'élevage et surtout l'alimentation : Foin, fourrage, ensilage, aliment concentré, eau etc...

Nous avons ciblé deux élevages : l'un à Hadjadj où les vaches sont nourries de foin et paille et un autre à l'exploitation de l'ITA où elles reçoivent, en plus, de l'ensilage. Toutes choses pareilles par ailleurs : Stabulation, chariot trayeur, heures de traite et climat.

Nous avons isolé et identifier des bactéries lactiques à partir des deux laits et de l'ensilage.

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **CHAPITRE 1 : LE LAIT**

## I. Définition du lait

Le lait a été défini en 1908, au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant :

« *Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit contenir de colostrum* » (Debry, 2006).

Lorsque l'on ne précise pas l'espèce, il s'agit du lait de vache

Le Codex Alimentarius en 1999, le définit comme étant la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur.

Selon *Deforges et Al En 1999*, le lait cru est un lait non chauffé au-delà de 40°C ni soumis à un traitement non thermique d'effet équivalent notamment du point de vue de la réduction de la concentration en micro-organismes.

## II. La qualité du lait de vache :

### II.1. Qualité nutritionnelle :

Le lait de vache est un lait caséineux très riche en éléments minéraux et nutritif. Sa composition générale est représentée au (tableau n°1).

Les données sont des approximations quantitatives, qui varient en fonction d'une multiplicité de facteurs : race animale, alimentation et état de santé de l'animal, période de lactation, ainsi qu'au cours de la traite.

Il reste que la composition exacte d'un échantillon de lait ne peut s'obtenir que par analyse (*Roudaut et Lefrancq, 2005*).

Élément	Composition (g/l)	Etat physique de composition
-Eau	905	Eau libre + eau liée : 3,7 %
-Glucide : lactose	49	Solution
-Lipides	35	Emulsion de globules gras (3 à 5 $\mu\text{m}$ )
-Matière grasse proprement dite	34	
-Lécithine (phospholipides)	0,5	
-Partie insaponifiable (stéroïls, carotènes, tocophérols)	0,5	
-Protéines	34	Suspension méculaire de phospho-caseine de calcium (0,08 à 0,12 $\mu\text{m}$ )
-Caséines	27	Solution colloïdale
-Protides solubles (globuline, albumine)	5,5	
-Substrat azotés non protéique	1,5	
-Sels	9	Solution ou état colloïdale
-Acides citrique	2	
-Acide phosphorique	2,6	
-Acide chlorhydrique	1,7	
-Constituants divers : (Vitamines, enzymes gaz dissous)	Traces	
-Extrait sec total	127	
-Extrait sec non gras	92	

**Tableau N° 1** : La composition de lait de vache (Source : *Carole I. vignole, 2002*)

## II.2. Qualité microbiologique :

Le lait contient un nombre variable de cellules ; celles si correspondent à la fois à des constituants normaux comme les globules blancs, mais également à des éléments d'origine exogène qui sont la plupart des microorganismes contaminants (*Gripon et al., 1975*).

Les microorganismes, principalement, présents dans le lait sont les bactéries. Mais on peut aussi trouver des levures et des moisissures, voire des virus. De très nombreuses espèces bactériennes sont susceptibles de se développer dans le lait qui constitue, pour elles, un excellent substrat nutritif. Au cours de leur multiplication dans le lait, elles libèrent des gaz (oxygène, hydrogène, gaz carbonique, etc), des substances aromatiques, de l'acide lactique (responsable de l'acidification en technologie

fromagère), diverses substances protéiques, voire des toxines pouvant être responsables de pathologie chez l'homme (*Institut de l'élevage, 2009*).

L'importance et la nature des bactéries contaminants le lait, dépendent, de l'état sanitaire de l'animal, de la nature des fourrages (*Agabriel et al., 1995*), mais aussi des conditions hygiénique observées lors de la traite, de la collecte, de la manutention et de la température de conservation du lait (*Robinson, 2002*). Un lait est considéré comme peu contaminé s'il renferme quelques centaines à quelques milliers de germes par millilitre, un lait fortement pollué peut en contenir plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions par ml (*Ramet, 1985*).

Dans cette microflore contaminant, les bactéries conditionnement le plus directement la qualité hygiénique ainsi que l'aptitude à la conservation et à la transformation de la matière première (*Adda et al., 1982*).

### II.3. Flore originelle :

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de  $10^3$  germes/ml). A sa sortie du pis, il est pratiquement stérile et est protégé par des substances inhibitrices appelées lacténines à activité limite dans le temps (une heure environ après la traite) (*Cup, 2007*).

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, les genres dominants sont essentiellement des mésophiles (*Vignola, 2002*). Il s'agit de microcoques, mais aussi streptocoques lactiques et lactobacilles.

Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation (*Guiraud, 2003*) et n'ont aucun effet significatif sur la qualité du lait et sur sa production (*Varnam et Sutherland, 2001*). Le tableau n°2 regroupe les principaux microorganismes originels du lait avec leurs proportions relatives.

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

Tableau N°2 : Flore originelle du lait cru (Source : *Vignola, 2002*)

#### II.4. Flore de contamination :

Le lait peut être contaminé par divers microorganismes pouvant provenir de l'environnement : entérobactéries, Pseudomonas, Flavobacterium, microcoques, corynébactéries, Bacillus, par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière (**tableau n°3**).

Sources de contamination		Psychrotrophes
-Germes Gram positifs -Germes sporulés aérobies	Terre, poussière, foin (très répandu)	Certaines espèces
-Germes sporulés anaérobies (clostridies)	Ensilage, fourrage vert en fermentation, boue	Non
-Entérocoques	Fèces, résidus de lait	Non
-Staphylocoques	Peau, muqueuses	Non
-Microcoques Peau, résidus de lait Certaines espèces	Peau, résidus de lait	Certaines espèces
-Bactéries propioniques	Peau, résidus de lait, fourrage vert en fermentation, ensilage	Non
-Bactéries lactiques Plantes	Ensilages, résidus de lait, muqueuses	Non
-Bactéries corynéformes	Peau, sol	Certaines espèces
Germes Gram négatifs -Colibactéries (E. coli)	Fèces, eaux usées	Non
-Entérobactéries Plantes,	Plantes, fèces, eaux usées	Certaines espèces
-Pseudomonas	Eau, sol (très répandu)	Oui
-Alcaligenes, Flavobacterium, etc.	Eau, sol (très répandu)	Oui
Levures	Sol, plantes, résidus de lait (très répandues)	Oui

**Tableau N°3 : Germes contaminant le lait cru (Source : Jakob et al., 2009)**

Le lait sortant du pis est pratiquement stérile (76). Une fois que le lait sort du pis, passe par la trayeuse et le réservoir, il se contamine par la microflore naturelle de l'animal et la microflore de l'environnement immédiat de la ferme.

**II.5. Les bactéries :**

En raison de la grande diversité des bactéries présentes dans le lait, et en se basant sur un certain nombre de propriétés importantes qu'elles ont en commun, on les divise en deux catégories : les bactéries saprophytes et les bactéries pathogènes (**tableau n°4**)

Caractéristiques		Familles	Genres	Rôles
Coques Gram +		<i>Micrococcacées</i>	<i>Micrococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	Bactéries Lactiques
		<i>Streptococcacées</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Lactococcus</i>	
Bacilles Gram +	Non Sporulés	<i>Lactobacillacées</i>	<i>Lactobacillus</i>	Pathogène
		<i>Brevibacteriacées</i>	<i>Brevibacterium</i> <i>Microbacterium</i>	
		<i>Actinomycetacées</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>Corynebacterium</i>	
			<i>Listeria</i>	
		<i>Mycobacteriacées</i>	<i>Mycobacterium</i>	
	Sporulés	<i>Bacillacées</i>	<i>Campylobacter</i>	Pathogène
			<i>Coxiella</i>	
			<i>Propionibacterium</i>	
		<i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i>	Butyrique	

**Tableau N°4 : principales bactéries du lait (Source : Monsallier, 1994)**

### II.5.1. Bactéries saprophytes :

Elles peuvent avoir un intérêt hygiénique, technologie ou être indifférentes. Cette flore forme un groupe très hétérogène de bactéries (bactéries lactiques).

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacilli (*Badis et al., 2005*). Ce sont des bactéries à gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50 % dans leur ADN (à l'exception des *Bifidobacterium*). Elles sont asporulantes, aéro-aérobie facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10° C et 45° C et à des PH allant de 4.0 à 4.5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme. Leur division se déroule sur un seul plan à l'exception des genres : *pediococcus*, *Aerococcus* et *Tetragenococcus* (*Salminen et al., 2004 ; König et Frohlich, 2009 ; Pringsulaka et al., 2011*).

En général ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (*Dellaglio et al., 1994 ; Salminen et al., 2004*).

### II.5.2. Bactéries pathogènes :

Comme la flore d'altération, la flore pathogène est incluse dans la flore contaminant le lait. La présence de microorganismes pathogènes dans le lait peut avoir trois sources : l'animal, l'environnement et l'homme. Les principaux microorganismes pathogènes associés au lait et produits laitiers sont responsables des affections reliées à la santé des manipulateurs et des consommateurs. On retrouve deux genres de bactéries pathogènes : les infectieuses et toxigènes.

Les bactéries infectieuses doivent être vivantes dans l'aliment lors de sa consommation pour agir, une fois ingérées, elles dérèglent le système digestif. Les principales bactéries infectieuses associées aux produits laitiers sont *salmonella sp.*, *Escherichia coli 0157 ; H7*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* et *campylobacter sp.*

## **II.6. Flore D'altération :**

Ce sont des bactéries et champignons indésirables apportés par la contamination. Cette flore regroupe les bactéries thermorésistantes, les coliformes, les psychotropes, les levures, et moisissures (*Dieng, 2001*).

### **II.6.1. Flore thermorésistante :**

Un certain nombre de bactéries est capables de résister aux traitements thermiques usuels utilisés dans le but d'assainir ou de conserver le lait. Elles sont dites thermorésistantes. Leur développement ultérieur peut provoquer la pro-téolyse et le caillage non acide du lait pasteurisé.

Les composantes de cette flore sont les germes : Micrococcus, Microbacterium et Bacillus réalise en, outre, des activités enzymatiques lactiques pouvant être responsable de l'acidification, la coagulation ou la protéolyse des laits de longue conservation.

C'est la flore de contamination banale provenant le plus souvent de la machine à traire ou du tank et non détruite par la réfrigération. Clostridium perfringens est l'une des causes de toxi-infection alimentaire. Après incubation de 8 à 22 heures, des troubles légers et passagers apparaissent : diarrhée profuse, aqueuse, ballonnement et douleurs abdominales.

### **II.6.2. Les coliformes :**

D'un point de vue technologique, certains coliformes sont lactiques et fermentent le lactose sur un mode hétéro-fermentaire. Ils peuvent se retrouver dans tous les types de lait Un grand nombre d'entre elles étant les hôtes habituels de l'intestin des mammifères. Leur présence est un signe de contamination fécales lors de la traite et pendant les manipulations et transvasements multiples que subissent les produits avant la commercialisation cet indice est mis à profit dans l'examen de la qualité des produits. (*Ba Diao, 2000 ; Mohamadou, 2001*).

### II.6.3. Les levures et moisissures :

Les levures et les moisissures sont des cellules eucaryotes. Regroupées sous le vocable de flore fongique, elles peuvent être retrouvées aussi bien dans le lait en poudre ainsi que dans tous les autres produits laitiers (*Alais, 1984*). En plus, les levures et moisissures supportent des PH de 3 à 8, avec un optimum de 4,5 à 6,5, ce qui explique leur présence dans le lait cru comme dans le lait caillé (*Tchamba, 2007*).

#### II.6.3.1. Les levures :

De forme arrondie ou ovale, volumineuses ou unicellulaires, les levures sont utiles en industrie laitière car elles peuvent servir comme agents d'aromatization. Elles sont aérobies facultatives et se développent en surface formant les boutons de nature mycélienne (*Rozier, 1990*). Par contre, d'autres levures – *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces fragilis*-*Saccharomyces lactis*. Peuvent avoir des effets néfastes dans les aliments. Les levures supportent des PH 3 à 8 avec un optimum de 4,5 à 6,4. ce qui explique leur présence dans le lait caillé (*Bouix et Leveau, 1988*). Elles entraînent des altérations rendant le produit final indésirable : aspect trouble, odeurs ou goûts anormaux, gonflement des produits ou de leur emballage.

#### II.6.3.2. Les moisissures :

Les moisissures en général plus complexes dans leur morphologie et dans leur mode de reproduction. Elles peuvent être utiles ou indésirables en industries alimentaires. Elles se développent en surface ou dans les parties internes aérées en utilisant le lactose ; cette propriété leur confère une utilité incontestable en fromagerie. C'est ainsi que le *penicillium camemberti* et *penicillium roqueforti* sont utilisés dans la fabrication de divers types de fromages. Mais le développement excessif de certaines moisissures comme *Géotrichum* à la surface des fromages, les rend glaireuses et coulantes, ce qui les déprécie fortement. Certaines moisissures élaborant des mycotoxines thermostables et liposolubles donc difficiles à éliminer une fois formées. Dans ce contexte (*Wiseman et Applebaum, 1983*), signalent la résistance de l'aflatoxine M1, élaborée par *Aspergillus flavus*, à la pasteurisation des laits et produits laitiers.

#### II.6.4. Virus :

Le virus est le plus petit des microorganismes connus. Sa taille est de l'ordre de nanomètre, soit un millionième de mètre. Etant un parasite, il a besoin d'un organisme vivant pour se développer.

Selon le virus, il peut parasiter un humain, un animal, une plante ou une bactérie. La présence de virus dans un produit laitier signifie qu'un manipulateur, un animal, l'eau ou des composantes utilisées dans la formulation du produit alimentaire a servi de vecteur d'incorporation. Les principaux virus associés au secteur laitiers sont ceux de l'hépatite A et les bactériophages (*Vignola ,2002*).

# **CHAPITRE 2 :**

## **LES BACTERIES LACTIQUES**

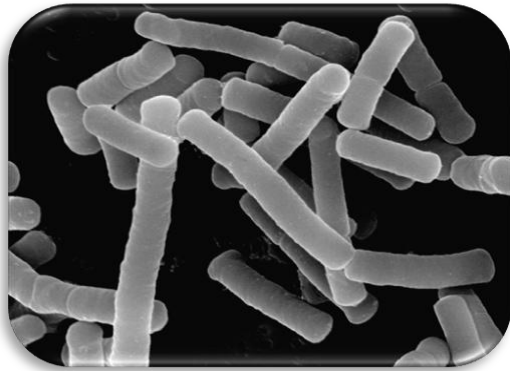
## I. Généralités sur les bactéries lactiques :

### I. 1 Définition des bactéries lactiques :

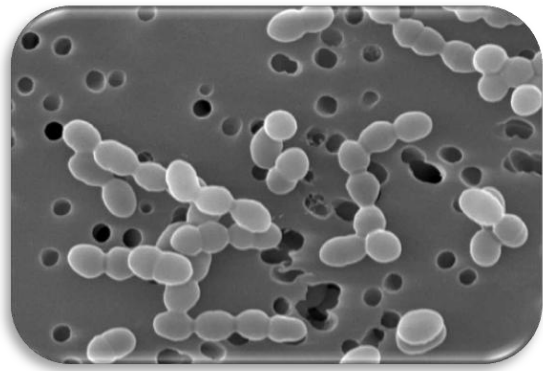
Les bactéries lactiques sont des coques ou des bâtonnets (**Figure 1**), Gram positif, immobiles, non sporulées, catalase négative. Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. Lorsque l'acide lactique est le seul produit terminal, il s'agit des bactéries lactiques homo fermentaires (Certaines espèces peuvent produire au moins 18 moles d'acide lactique par mole de glucose fermenté). Parfois, en plus de l'acide lactique, d'autres composés constitués principalement d'acide acétique, d'éthanol et de gaz carbonique sont produits : c'est le cas des hétéro fermentaires (produisent uniquement 1 mole d'acide lactique par mole de glucose fermenté) (*Larpen, 1989 ; Novel, 1993*).

Les bactéries lactiques sont aéro-anaérobies facultatives ou micro-aerophiles. En présence d'oxygène, elles sont incapables de phosphorylation oxydatives car elles ne peuvent synthétiser les cytochromes et les enzymes à noyau hème (*Hardie, 1986 ; Zarour et al., 2013*). Elles ont des besoins complexes en facteurs de croissance, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques, des vitamines B et des acides gras. C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait (*Larpen, 1989 ; Novel, 1993*). Les bactéries lactiques regroupent 13 genres dont les : *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Bifidobacterium, Carnobacterium, Oenococcus, Weissella, Aerococcus, Tetragenococcus et Vagococcus*. (*Dortu, 2009*). Ces bactéries ont la capacité de fermenter les sucres (glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose) en acide lactique (*Kandler et Weiss, 1986*).

Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes. Cependant, parmi elles quelques espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes (*Aguirre et Collins, 1993*).



A) *Lactobacillus* Rosell- 11  
(forme de bacille)



B) *Leuconostoc lactis* (forme de cocci)

**Figure 1 :** Observation des bactéries lactiques au microscope électronique à transmission (x10000) (Source : *Larpen, 1989*)

## I. 2 Origine des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont été retrouvées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie. De plus, des études sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries (*Quiberoni et al., 2001*). D'autres études montrent que certaines bactéries lactiques, comme *Lactobacillus lactis*, sont en voie d'acquérir une chaîne respiratoire (*Duwat et al., 2001*).

## I. 3 Habitat :

Les bactéries lactiques sont ubiquistes : elles sont retrouvées dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales ainsi que dans le tractus digestif, ce qui explique leur température de croissance hétérogène (*Mayo et al., 2010 ; Klein et al., 1998*). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (*De Roissart, 1986*).

- Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis subsp. Lactis* est isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé (*Sandine, 1988*).

- Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux (Jones, 1978).
- Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification (Suhigara, 1985) et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries (Devoyod et Poullain, 1988).  
*Boubekri et Yoshiyuki (1996)* ont isolé deux souches de *Leuconostoc* sp. À partir de fromage traditionnel El-Klila fabriqué à Batna (Algérie). Tandis que, *Ryhänen et al., (1996)* ont identifié trois espèces (*Leuconostoc curvatus*, *Ln. Citreum* et *Ln. Mesenteroides subsp. Mesenteroides*) isolées à partir de blé fermenté. Seule l'espèce *Leuconostoc oenos* est isolée du vin (Fleming et al., 1985 ; Sugihara, 1985 ; Devoyod et Poullain, 1988 ; Hounhoïgan et al., 1993).
- Les espèces du genre *Pediococcus* sont présentes surtout dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages (Parmesan et autres fromages italiens) et les préparations culinaires (Saucisses, anchois salés ou sauce de soja) (Chapman et Sharpe, 1981 ; Dellaglio et al., 1981A ; Uchida, 1982 ; Bacus et Brown, 1985 ; Villar et al., 1985).
- Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages (*Lb. Casei subsp. Casei*, *Lb. Plantarum*, *Lb. Curvatus* et *Lb. Brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. Kefir*, *Lb. Brevis* et *Lb. Fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. Brevis*, *Lb. Curvatus*, *Lb. Buchneri* et *Lb. San francisco*) (Demazeaud, 1996).

#### I. 4 Diversité et taxonomie :

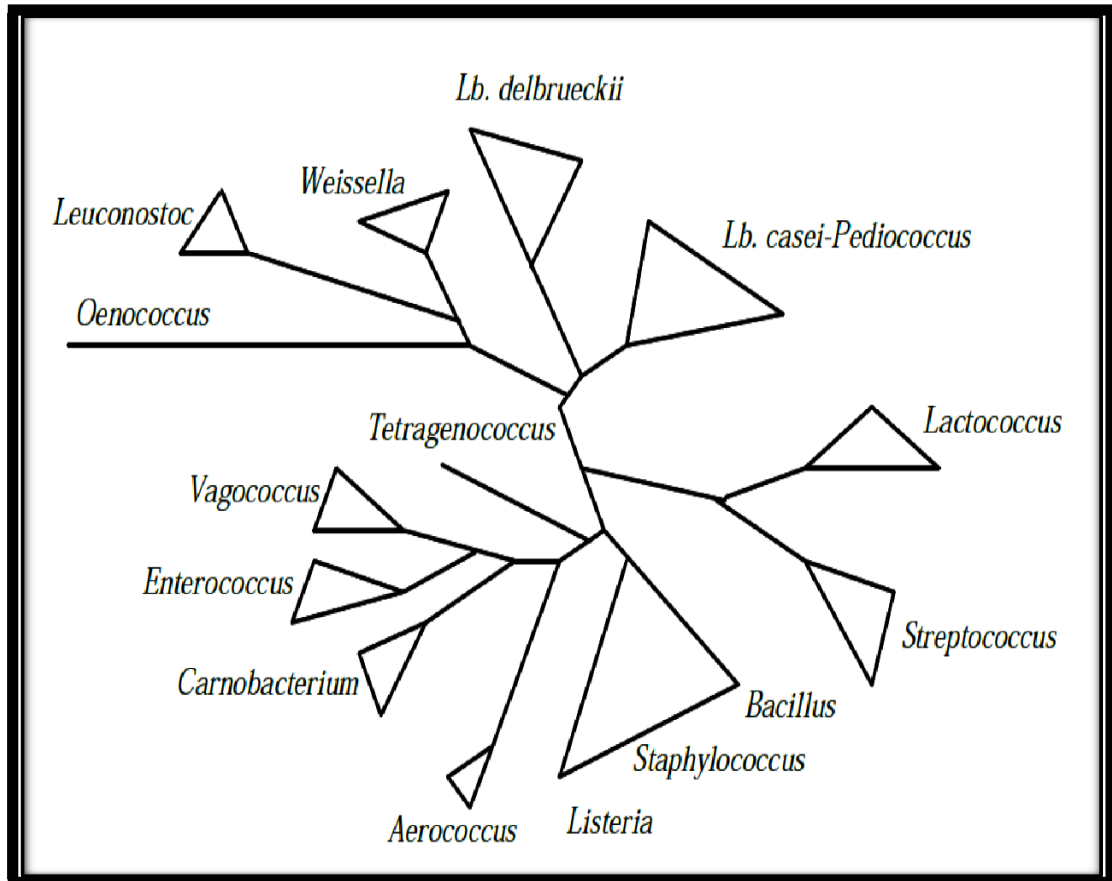
La classification des levures, des bactéries, des virus et des protistes est basée sur la taxonomie polyphasique. Ce terme est apparu dans les années 70 défini par (Colwell, 1970) et se réfère à une taxonomie basée sur un large ensemble de critères regroupant les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques (Pot, 2008).

Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène en raison non seulement de leur métabolisme mais aussi de leur aspect, leur habitat, ... Cette hétérogénéité confère

aux bactéries lactiques une diversité qui a permis de leur dresser une taxonomie ( **Tableau 5**).

De nombreuses classifications des bactéries lactiques ont été proposées. Parmi elles, figure :

- La classification selon la composition de la paroi cellulaire bactérienne (*De Ambrosini et al., 1996*), incluant la nature des acides gras, tels que l'acide lactobacillique (C19 :0) et les acides gras insaturés (C14 :0, C16 :0, C18 :0) qui la composent (*Gilarová et al., 1994*).
- Une autre classification, basée sur les différents modèles de fermentation du glucose définit 3 groupes (*McLeod et al., 2008*).
  - **Le groupe I** : renferme les bactéries réalisant exclusivement l'homofémentation. Ce groupe comporte majoritairement des *Lactobacillus*.
  - **Le groupe II** : inclut les bactéries réalisant l'hétérofémentation et regroupe les *Leuconostoc*, les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*.
  - **Le groupe III** : regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce groupe présente une position intermédiaire entre le groupe I et II réalisant ainsi l'homofémentation ou l'hétérofémentation selon les conditions environnementales (*McLeod et al., 2008*).
- Les études d'hybridation ADN ÷ ADN, puis des structures et des séquences d'ARN ribosomiaux sont aussi devenues depuis quelques années des éléments essentiels permettant l'identification et ainsi la classification taxonomique des bactéries lactiques (*Mäkelä et al., 1992*, *Stanckebrandt et Teuber, 1988*, *Vandamme et al., 1996*, *Woese et al., 1990*).
- Une étude basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S et/ ou 23S des bactéries lactiques propose une classification en 3 groupes restreinte à certaines bactéries lactiques : **groupe des *Leuconostoc***, **groupe des *Lactobacillus delbrueckii* (*Lb. Delbrueckii*)** et **groupe des *Lb. Casei-Pediococcus*** (*Rodrigues et al., 1991* ; *Vandamme et al., 1996*).



**Figure 2 :** Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (Source : Axelsson, 2004)

## II. Propriétés métaboliques :

### II.1 Métabolisme des sucres :

Les bactéries lactiques homofermentaires transforment tout le glucose en excès en acide lactique. Le transport du glucose ou du lactose vers les cellules diffère selon les espèces. Elles utilisent la voie EMP dans la dernière étape de la glycolyse, convertissent le pyruvate en lactate et régénèrent ainsi du  $\text{NAD}^+$  à partir du  $\text{NADH}$  formé auparavant. Dans cette dernière étape les bactéries font intervenir une lactate-déhydrogénase.

Les bactéries lactiques hétérofermentaires utilisent les voies du galactose-6-phosphate, de la glycolyse et des pentoses phosphates. Le résultat de la fermentation lactique aboutit à la formation de quantité équimolaire de lactate, d'éthanol et de gaz carbonique. Une production de formate et d'acétate peut avoir lieu, notamment en aérobiose (Kandler, 1983 ; Desmazeaud, 1996).

- **Chez les *lactocoques***, les sucres sont transportés par un système actif mettant en jeu une phosphotransférase (PTS) qui phosphoryle les sucres aux dépens du phospho-énolpyruvate (PEP). Le PEP dans ce cas intervient surtout dans le métabolisme des sucres transportés. Le lactose (dans le cas du lait), apparaît dans la cellule sous forme de glucosyl- $\beta$ -(1-4)-galactoside-6-P (ou lactose-P) et prêt à être hydrolysé par une  $\beta$ -D-phosphogalactosidase (*Lee et al., 1973 ; Molskness et al., 1973 ; Thompson, 1979*).
- **Chez les *lactobacilles* et les *leuconostocs***, le transport du lactose se fait librement par l'intermédiaire d'une perméase, puisque la présence systématique d'une  $\beta$ -galactosidase a été démontrée dans 28 souches (*Somkuti et Steinberg, 1979*). Le glucose et le galactose, issus de la dégradation du lactose sont transformés respectivement en glucose-6-P selon la voie d'Emden-Meyerhof-Parnas et en galactose-6-P selon la voie du D-tagatose-6-P.
- **Chez les *streptocoques thermophiles***, le même système enzymatique de transport, que celui des lactobacilles et des *leuconostocs*, est utilisé mais seul le glucose est rapidement dégradé par la voie de la glycolyse (*Tinson et al., 1982A ; Hutkins et Morris, 1987*).

## II. 2 Métabolisme du citrate :

L'acide citrique est utilisé par de nombreuses espèces des genres *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus*), *Lactococcus* (*Lc. Lactis subsp. Lactis biovar diacetylactis*), *Enterococcus* (*Ec. Faecium*), *Pediococcus*, *Leuconostoc* (*Ln. Lactis, Ln. Cremoris*) et *Lactobacillus* (*Lb. Plantarum. Lb. Casei*). Cependant il ne peut être dégradé qu'en présence d'un substrat fermentescible et d'une source d'azote (*Leveau et Bouix, 1993*). Le citrate est transporté à l'intérieur des cellules par une citrate-perméase, où il est scindé en acétate (en majeure partie excrétés) et en oxaloacétate par le complexe enzymatique citrate-lyase.

L'oxaloacétate est ensuite converti en pyruvate et en CO<sub>2</sub> par une oxaloacétate décarboxylase.

Des transformations successives du pyruvate aboutissent à la formation de composés aromatisants et le produit fini est le 2,3-butylen-glycol (2,3-butanediol) (*Cogan, 1981 et 1982*).

### III. Les aptitudes biotechnologiques des bactéries lactiques :

Le secteur des industries agroalimentaires utilise un certain nombre d'auxiliaires technologiques, parmi lesquels les bactéries lactiques, pour élaborer des aliments fermentés.

Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (*Abee, 1995 ; Hugenholtz et al., 1999*).

Les cultures starters peuvent être définies comme des préparations microbiennes concentrées constituées d'un ou plusieurs micro-organismes viables, se caractérisant par des propriétés physiologiques et métaboliques particulières et capables d'induire les changements désirés dans le substrat (*Holzappel, 1997*).

L'introduction de cultures starters de bactéries lactiques au cours de la fermentation doit tenir compte des critères d'amélioration du procédé de transformation et de la qualité des produits à travers :

- Une accélération des activités métaboliques (acidification ou production d'alcool).
- L'amélioration et le contrôle du processus de fermentation.
- La formation des caractéristiques organoleptiques désirées.
- Une amélioration de la sécurité et la réduction des risques hygiéniques et toxicologiques (*Holzappel, 1997*).

Selon ce dernier, la sélection des souches doit aussi tenir compte des interactions possibles dans des cultures mixtes, de leur comportement dans des conditions définies et sur la matière première. Toujours selon le même auteur, d'autres facteurs peuvent aussi intervenir, notamment :

- La compétitivité, la viabilité et la survie,
- L'antagonisme avec les agents pathogènes et la flore microbienne de détérioration.
- Le taux de production d'acide ou d'alcool.
- Les modifications organoleptiques.
- Les métabolites primaires de la fermentation.
- La dégradation des facteurs antinutritionnels.
- La détoxification.
- Les propriétés probiotiques.

Les cultures starters peuvent être définies comme des préparations microbiennes concentrées constituées d'un ou plusieurs micro-organismes viables, se caractérisant par des propriétés physiologiques et métaboliques particulières et capables d'induire les changements

désirés dans le substrat (*Holzapfel, 1997*). L'introduction de cultures starters des bactéries lactiques au cours de la fermentation doit tenir compte des critères d'amélioration du procédé de transformation et de la qualité des produits à travers :

- Une accélération des activités métaboliques (acidification ou production d'alcool).
- L'amélioration et le contrôle du processus de fermentation.
- La formation des caractéristiques organoleptiques désirées.
- Une amélioration de la sécurité et la réduction des risques hygiéniques et toxicologiques (*Holzapfel, 1997*).

Selon ce dernier, la sélection des souches doit aussi tenir compte des interactions possibles dans des cultures mixtes, de leur comportement dans des conditions définies et sur la matière première. Toujours selon le même auteur, d'autres facteurs peuvent aussi intervenir, notamment :

- La compétitivité, la viabilité et la survie.
- L'antagonisme avec les agents pathogènes et la flore microbienne de détérioration.
- Le taux de production d'acide ou d'alcool.
- Les modifications organoleptiques.
- Les métabolites primaires de la fermentation.
- La dégradation des facteurs antinutritionnels.
- La détoxification.
- Les propriétés probiotiques.

## IV. Caractéristique biotechnologies des bactéries lactiques :

### IV. 1 Activité acidifiante :

L'acidification est le rôle principal des bactéries utilisées comme ferments. Celle-ci a différents buts (*Papamanoli et al., 2003*).

En technologie laitière, l'acidification lactique joue de multiples rôles : elle participe à la coagulation du lait, active la synérèse du caillé et la solubilisation du calcium micellaire qui ont une influence déterminante sur la texture des fromages. Elles contribuent aussi aux qualités organoleptiques des produits fermentés et inhibe la croissance des microorganismes nuisibles. Selon la variété de fromage et la flore présente, les produits issus de la glycolyse peuvent être métabolisés selon différentes voies pour la formation aromatiques variées (*Zhennai et al., 2000*).

#### IV. 2 L'acide lactique :

Dans le lait et les produits laitiers, l'acide lactique provient de la dégradation du lactose par les bactéries. Plus un lait est frais, moins il contient d'acide lactique. La concentration en acide lactique dans un lait s'exprime en degré Dornic (°D) : 1°D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait. Un lait frais contient de 15 à 18°D, il caille à 60-70° D. (*Shirai et al., 2001 ; Papamanoli et al., 2003 ; Ammor et al., 2004*).

#### IV. 3 Activité protéolytique :

Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser plusieurs acides aminés, mais sont pourtant bien adaptées à un environnement riche en protéines et pauvre en acides aminés libres ; comme le lait ; grâce à un système protéolytique bactérien complexe (*Shirai et al., 2001 ; François et al., 2007*).

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés (*Law et Haandrikman, 1997*).

Dans la plupart des genres de bactéries lactiques (*Lactobacilles, Lactocoques*), le système protéolytique met en œuvre une protéase liée à la paroi cellulaire grâce aux ions  $Ca^{+2}$  qui réalise la première étape du processus de dégradation des protéines. Les peptides résultant seront hydrolysés en acides aminés par différentes peptidases membranaires et cytoplasmiques après leur transport dans le cytoplasme (*Monnet et al., 1993*).

Technologiquement l'activité protéolytique constitue un caractère très important qui fait des bactéries lactiques les seuls agents microbiens d'affinage de la majorité des fromages à pâte pressée (Cheddar, fromage de Hollande ...), des fromages sans croûte ou à croûte artificielle et des fromages frais. (*Georgalaki et al., 2002*).

#### IV. 4 Activité lipolytique :

Elle est relativement faible chez les ferments lactiques, l'activité lipasique contribue à l'élaboration de la saveur des fromages lors de la maturation (*Stackebrandt et al., 2002*).

La lipolyse correspond à une dégradation enzymatique de la matière grasse laitière qui conduit à l'accumulation dans le lait (*Chilliard, 1982 ; Olivecrona, 1980 ; Deeth, 2006*). L'accumulation dans le lait et les produits laitiers de ces AGL issus de cette dégradation provoque l'apparition de goûts rance (*Deeth, 2006*) qui sont déplaisants pour

les consommateurs. De ce fait, dans certaines régions de France, la lipolyse est devenue un critère de paiement du lait. La lipolyse du lait affecte donc à la fois l'aptitude à la valorisation du lait par le transformateur et le revenu de l'éleveur.

On distingue trois types de lipolyse :

- La lipolyse spontanée : consécutivement au refroidissement, elle est produite par la dégradation de la matière grasse par la lipase native du lait.
- La lipolyse induite : les chocs mécaniques (circuit de traite) et thermiques (tank) entraînent une fragilisation de la matière grasse et facilitent sa dégradation par la lipase native du lait.
- La lipolyse bactérienne : la matière grasse est dégradée via les lipases bactériennes.

Ces dernières années, la lipolyse semble augmenter périodiquement dans les élevages, sans qu'aucune cause majeure ne soit relevée (**CNIEL**).

Cette problématique fait donc l'objet d'études au sein de l'interprofession. Le stage est proposé dans le cadre d'une thèse sur la lipolyse spontanée.

Certains facteurs de variations de la lipolyse spontanée ont pu être identifiés dans les années 80. Il s'agit de facteurs liés à l'animal (stade de lactation, faible niveau de production), à l'alimentation, à l'intervalle de traite et à l'état sanitaire du troupeau.

Les mécanismes biochimiques de la lipolyse du lait sont aujourd'hui peu connus. Trois facteurs biochimiques détermineraient la (susceptibilité) d'un lait à la lipolyse : facteurs activateurs ou inhibiteurs (*Cartier et Chilliard, 1990 ; Deeth et Fitzgerald, 1975 ; Sundheim, 1988*).

Tableau N°5 : Caractéristiques de quelques bactéries lactiques (Source : Hansal, 2015)

Bactéries lactique	Propriété cellulaires		Propriétés biochimiques			Information génétique		Référence
	Aspect	Habitat	T° Optimale(C°)	CO2	Configuration acide lactique	%GC	Taille génome (Mpb)	
<i>Bifidobactérium adolescentis</i> ATCC15703	Bacille	Intestin	37	-	D,L(D+L)	59	2.1	Suzuki <i>et al.</i> ,2006
<i>Bifidobactérium Longum</i> DJO10A	Bacille	Intestin, tractus génital	37-41	-	D,L(D+L)	60	2.3	Lee <i>et al.</i> ,2008
<i>Carnobactérium</i> sp.AT7	Bacille chaine	Viande, poisson	25-43	-	L	35	2.4	Bartlett <i>et al.</i> ,2007
<i>Entérocooccus faecalis</i> AR01/DG	Coque isolé	Intestin	37	-	L	37	2.8	Feldgarden <i>et al.</i> ,2006
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC334	Bacille chaine	Lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-42	+/-	D,L(D+L)	46	2.9	Makarova <i>et al.</i> ,2006
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO3956	Bacille	Lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-41	+/-	D,L(D+L)	51	2.1	Morita <i>et al.</i> ,2008
<i>Lactobacillus helveticus</i> DPCe4571	Bacille	Fromage	25-36	+/-	D,L(D+L)	37	2.	Callanan <i>et al.</i> ,2008
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Bacille isolé	Plantes,tractus gastrointestinal	25-35	+/-	D,L(D+L)	44	3.3	Kleerebeze m <i>et al.</i> ,2003
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM20016	Bacille chaine	Lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-37	+/-	D,L(D+L)	38	2	Copeland <i>et al.</i> , 2007

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE | LES BACTERIES LACTIQUES

<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Bacille	Lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-38	+/-	D,L(D+L)	46	3	Kankainen <i>et al.</i> ,2009
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>Sakei</i> 23K	Bacille	Lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-39	+/-	D,L(D+L)	41	1.9	Chaillou <i>et al.</i> ,2005
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	Bacille	gastro-intestinal et vaginal	25-40	+/-	D,L(D+L)	32	1.8	Claesson <i>et al.</i> , 2006
<i>Lactococcus lactis</i> subsp.cremoris SK11	Coque chaine, paire	Lait, fromage, yaourt	40	-	L	35	2.4	Makarova <i>et al.</i> , 2006
<i>Leuconostoc citreum</i> KM20	Coque isolé	Viande, plante	20-30	+	D	38	1.8	Kim <i>et al.</i> , 2008
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.	Coque isolé, chaine,	Viande, plante	40	+	D	37	2	Makarova <i>et al.</i> , 2006
<i>Oenococcus oeni</i> PSU-1	Coque isolé, chaine	Vin	17-25	+	D	37	1.8	Makarova <i>et al.</i> , 2006
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC25745	Tétrade	Viande, plante, fromage	30	-	D, L	37	1.8	Makarova <i>et al.</i> , 2006
<i>Streptococcus agalactiae</i> A909	Coque isolé	peau	37	-	L	35	2.1	Tettelin <i>et al.</i> ,2005
<i>Weissella paramesenteroides</i> ATCC33313	Coque isolé	plante	30	+	D,L(D+L)	37	1.9	Qin <i>et al.</i> ,2009

(+) : Production de dioxyde de carbone / (-) : Absence de production de CO<sub>2</sub>.

(D) : L'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration.

(D ; L) : L'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration

(L ; D+L) : L'acide lactique est sous forme racémique.

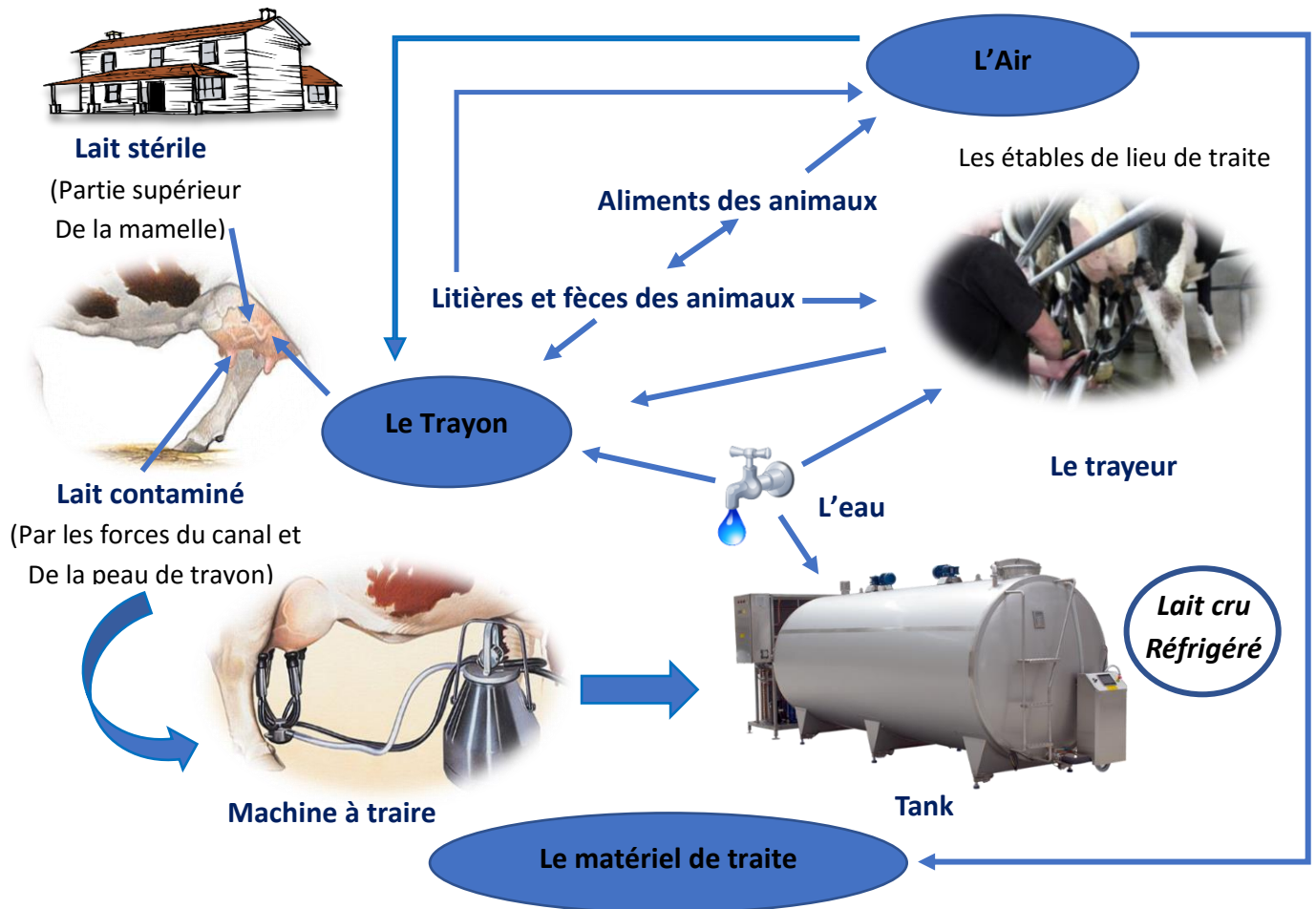
(\*): Une tétrade est formée lorsque quatre bactéries sont associées entre elles.

**CHAPITRE 3 :**  
**VARIATION DE L'ECOSYSTEME**  
**MICROBIEN LAITIER**

Une étude réalisée dans 16 fermes bovines de Franche-Comté, sur le cheminement des microorganismes depuis l'étable jusqu'au lait a montré que la majorité des espèces bactériennes recensées dans le lait avait pour origine l'environnement de la salle de traite (air, nourriture utilisée pendant la traite, trayons) (*Normand et al., 2007*).

De plus, la mise en évidence de souches de la même famille, entre des bactéries isolées du lait et celles isolées de l'environnement (aliments, poussières, trayons, manchons) tendait à montrer l'existence de flux microbiens depuis l'environnement de la ferme jusqu'au lait (*Bouton et al., 2007*).

Sur la **figure 3** sont représentées les sources potentielles de micro-organismes et leurs trajectoires possibles jusqu'au tank à lait.



**Figure 3** : Flux microbiens dans les étables de production laitière  
(Source : *Bouton et al., 2007*)

Un choix judicieux des pratiques d'élevage et des conditions de production du lait ne permettrait-il pas alors de préserver les flores d'intérêt technologique naturellement présentes dans le lait ? Dans cette perspective, la connaissance des réservoirs de flores et des flux de microorganismes existants dans les étables et les salles de traite semble un préalable indispensable pour mieux appréhender l'influence des pratiques de production dans l'enrichissement des laits en flore d'intérêt technologique.

Ce chapitre fait le point sur les connaissances acquises récemment sur la composition microbienne, les réservoirs potentiels de flore (trayon, matériel de traite, air) et les pratiques influentes, ainsi que sur les origines possibles de ces micro-organismes en particulier d'intérêt laitier (litière, aliments du bétail).



## I. L'alimentation :

L'alimentation rationnelle des vaches laitières exerce une influence prépondérante tant sur la production quantitative que sur la Production qualitative du lait destiné à des utilisations industrielles.

D'après *SAVINI*, l'alimentation avec l'ensilage fait augmenter l'acidité du lait et entraîne en plus des variations dans sa valeur cryoscopique ; laquelle est une des rares valeurs constantes de la composition du lait. Ceci démontrerait que l'équilibre physicochimique du lait subit des altérations et prouverait en même temps l'influence des aliments ci-haut nommés.

Selon *LEROY*, les plantes contenant des produits ou principes toxiques (des alcaloïdes surtout) telles que les renoncules, les colchiques, la ciguë, les prêles (celles-ci sont fréquentes dans les prairies humides), etc..., sont dangereuses pour la santé de l'animal et pour la qualité du lait. L'a recommandé alors de se méfier de la végétation poussant sur les levées de fossés et des prairies infestées de mauvaises herbes, et il préconise à cet effet, le drainage, "les hersages ainsi que le chaulage. Il recommande en plus d'éviter aux vaches l'ingestion d'aliments ayant subi la fermentation butyrique ou ne paraissant, pas dans un bon état de conservation.

*BABCOCK*, dans ses expériences, arrive aux conclusions suivantes : le blé d'Inde vert, la plupart des concentrés vendus dans le commerce ainsi que quelques foins (du groupe des pâturins du Canada ; du Kentucky et de Virginie) n'ont aucune mauvaise influence sur la saveur et l'arôme du lait. Par contre, il a énoncé les observations suivantes

- a) L'ingestion de 15 kg de luzerne verte par vache, une heure avant la traite, produit dans le lait une saveur très prononcée. Cette constatation a été confirmée par *LUCAS* et par *WEAVER, KUHLMÀN* et *FOUTS*.
- b) Le navet donné à l'animal une heure avant la traite, produit des odeurs indésirables dans le lait.
- c) L'ingestion d'oignon et autres plantes bulbeuses analogues se traduit, dès une minute après L'ingestion, par l'apparition du goût correspondant dans le lait ; ce goût est encore apparent après 4 heures et il ne disparaît que si la traite est faite sept heures après l'ingestion.
- d) Un bidon de crème possédant une saveur d'oignon assez prononcée peut communiquer cette saveur à un, bassin entier de crème.

## I. 1 les aliments et leur utilisation en production laitière :

Dans cette partie, nous allons nous pencher sur les caractéristiques des différents aliments utilisés en production laitière, en commençant par l'herbe. Nous évoquerons ensuite les différents ensilages utilisés en rations laitières (herbe, maïs, pulpes sur pressées, céréales immatures), les fourrages secs et les racines et tubercules et leurs dérivés. Nous aborderons également les caractéristiques des aliments concentrés, tels que les céréales, les graines de protéagineux et d'oléagineux et leurs co-produits, les tourteaux. Ensuite, nous décrirons une 3ème catégorie d'aliments, les mélanges minéraux.

### I.1.1 Les fourrages :

On distingue classiquement 3 catégories de fourrages, sur la base de leur mode de conservation et de leur teneur en MS : les fourrages verts, les ensilages et les fourrages secs. Une 4ème catégorie d'aliments peut être assimilée aux fourrages : il s'agit des racines et tubercules et de leurs dérivés.

#### I.1.1.1 Les fourrages verts :

Les fourrages verts comprennent les herbes dans les régions à haut potentiel, l'herbe pâturée est un fourrage de valeur nutritionnelle élevée, peu coûteux à produire, et qui peut constituer, comme nous allons le voir, le seul aliment de la ration de la vache laitière.



**Figure 5** : Flux microbiens dans les étables de production laitière  
(Source : *Cuvelier, 2006*)

### I.1.1.2 Les ensilages :

L'ensilage est un système de conservation des fourrages par fermentation anaérobie dans un silo : des bactéries transforment les sucres solubles en acides organiques (principalement de l'acide lactique et de l'acide acétique) qui font chuter le pH dans l'ensilage. Celui-ci devient alors stable. Les sucres solubles étant consommés par les bactéries, un ensilage se caractérise par une teneur en sucres solubles quasi nulle. Les principaux aliments ensilables sont l'herbe, le maïs plante entière (ou grain humide), les dérivés de betteraves (principalement pulpes humides et pulpes sur pressées) et les céréales immatures. On rencontre également parfois de l'ensilage de protéagineux, et plus précisément de l'ensilage de pois plante entière.

L'ensilage est réalisé soit dans différents types de silos : les silos horizontaux (silo taupinière et silo tranchée) et le silo tour, ou soit par enrubannage de balle ronde ou carrée. Remarquons que le type de silo utilisé par l'exploitant peut avoir un impact sur la qualité de son ensilage (**Tableau 6**).

	Impacts potentiels
<b>Silo taupinière</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Terre souvent introduite par les roues du tracteur</li> <li>- Difficultés de tasser le fourrage sur les côtés</li> </ul>
<b>Silo taupinière</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Offre de meilleures possibilités de tassement du fourrage - Tassement régulier et consciencieux nécessaire pour obtenir un ensilage de bonne qualité</li> <li>- Si silo rempli en plusieurs fois, différentes qualités superposées aux animaux en self-service peuvent faire leur choix</li> </ul>
<b>Balle ronde ou carrée enrubannée</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bonne qualité</li> <li>- Fermentations variables entre les différentes balles</li> <li>- Fragile à difficultés de garder les ballots hermétiques (rongeurs)</li> </ul>

**Tableau N° 6 : Impacts potentiels des modalités d'ensilage**  
(Source : *Cuvelier, 2006*)

Indépendamment des analyses qui peuvent être effectuées sur les ensilages par les laboratoires, il est possible d'évaluer la qualité de son ensilage en l'examinant à l'œil nu. Différents éléments doivent ainsi être examinés : l'odeur, la couleur, la structure, l'hygiène et la température (**tableau 7**).

	Ensilage de bonne qualité	Ensilage de mauvaise qualité
Odeur	Agréable (acidulée, aromatique)	Désagréable, odeur d'acide butyrique, d'ammoniac, odeur de renfermé ou de moisi
Couleur	Similaire au fourrage initial, légèrement plus brunâtre	Différente du fourrage Initial, jaunâtre
Structure identique au fourrage ensilé	Oui	Non
Hygiène	Propre et exempt de moisissures	Souillé, moisi
Température	Pas d'échauffement	Echauffement dans le silo et l'aire de chargement

**Tableau N° 7 :** Critères d'évaluation sensorielle de la qualité d'un ensilage par l'éleveur (**Source : Cuvelier, 2006**)

#### I.1.1.2.1 L'ensilage d'herbe :

L'ensilage d'herbe profané consiste à éparpiller l'herbe et à la laisser séjourner sur le sol durant une période limitée pendant laquelle elle sèche partiellement. L'herbe profanée est ensuite mise en andain, puis récoltée afin de réaliser le silo. Une fois le silo réalisé, les fermentations démarrent rapidement, et il faut compter une période de 4 à 6 semaines pour avoir une stabilisation. La production totale sur l'année varie en général entre 10 et 15 T de MS/ha.

#### I.1.1.2.2 L'ensilage de maïs :

Le maïs est un aliment qui permet la production d'un fourrage énergétique au sein de l'exploitation. On le récolte soit sous forme de plante entière, d'épi broyé, ou de grain humide.

La culture du maïs se pratique partout en Région wallonne, mais à faible échelle en Ardenne et Haute Ardenne, où les conditions climatiques sont rarement propices à l'obtention d'un maïs de qualité satisfaisante. Le temps de culture étant en effet limité (gelées tardives au printemps, empêchant un semis précoce, et gelées précoces en automne), il est très difficile d'obtenir une maturité suffisante dans la plante. Par ailleurs, en cas de gel, la teneur en MS peut apparaître suffisante (30 %), alors que les teneurs en amidon sont relativement faibles.

### **I.1.1.3 Les fourrages secs :**

#### **I.1.1.3.1 Le foin :**

Le foin est un aliment résultant de la déshydratation des produits herbacés dont la teneur en eau passe de 80 à 15 %. Un bon foin se caractérise donc par une teneur en MS élevée, de l'ordre de 85 à 90 %.

La période de récolte du foin varie selon la localisation géographique : début juin pour le centre du pays et plutôt mi-juin en Ardenne, en raison de l'évolution plus tardive des stades de végétation. Quelle que soit la région concernée, la récolte doit impérativement s'effectuer par temps sec. La qualité d'un foin est variable. Les principaux facteurs de variation sont les mêmes que ceux de l'herbe. Citons ainsi, à côté des conditions climatiques lors de la récolte, le stade de récolte et la composition botanique de la prairie. Les foins de légumineuses (luzerne et trèfle) seront ainsi plus riches en MAT et en calcium que les foins de graminées.

#### **I.1.1.3.2 La paille :**

La paille est constituée par les tiges et les Raffles des épis égrainés des céréales. La valeur alimentaire de la paille est toujours faible, ce qui explique son utilisation comme litière ou comme aliment de lest. La paille se caractérise en effet par une teneur en fibres très élevée, avec un haut taux de lignification de la cellulose/hémicellulose, une teneur en sucres solubles et en protéines très faible, de même qu'une teneur en énergie faible. Cependant, la paille est un aliment qui présente un certain intérêt : elle stimule la mastication, la rumination et le brossage des papilles. Elle ralentit également les fermentations, ce qui permet de lutter contre l'acidose du rumen lors d'administration de rations très riches en glucides fermentescibles (*cf. infra*). Aussi, chez les animaux très performants, elle est parfois utilisée à raison de 1 à 2 kg de paille fraîche/jour dans une ration mélangée.

#### **I.1.1.4 La luzerne :**

Appartenant au groupe des légumineuses, la luzerne est une plante fourragère semée soit en culture pure, on parle alors de luzernière, soit en association avec une graminée (dactyle, féтуque élevée). Une luzernière peut fournir 3 à 6 coupes/an, la fenaison s'effectuant toutes les 5 semaines, et peut être maintenue en production pendant 4 à 5 ans. La luzerne assurant la fixation de l'azote atmosphérique, tout apport d'azote minéral ou organique est généralement inutile et sans effet sur le rendement ou la teneur en protéines de la plante.

### **I.1.1.5 Les racines et tubercules, et leurs dérivés :**

Les racines et tubercules résultent de l'accumulation de réserves glucidiques dans les parties souterraines des végétaux : racines de betterave sucrière et fourragère, de chicorée, navet, carotte et manioc et tubercules de pomme de terre et de topinambour.

Il s'agit d'aliments caractérisés par une teneur en eau très élevée ( $\geq 75\%$ ) et des teneurs faibles en matières azotées et en fibres de type cellulose. Les betteraves présentent la particularité d'être cependant riches en fibres de type pectines. Les substances de réserve sont principalement l'amidon dans le cas de la pomme de terre et des sucres solubles dans le cas des betteraves, de la carotte, du navet, de la chicorée et du topinambour.

### **I.1.2 Les concentrés :**

Certains d'entre eux sont également riches en protéines, c'est le cas pour les graines de protéagineux et d'oléagineux.

On distingue 2 catégories d'aliments concentrés :

- Les aliments concentrés simples, tels que les graines de céréales et leurs co-produits, les graines de protéagineux, les graines d'oléagineux et leurs co-produits, les tourteaux, et les pulpes séchées. Ces aliments concentrés simples sont donc les matières premières.
- Les aliments concentrés composés, résultant d'un mélange d'aliments concentrés simples.

Les concentrés, qu'il s'agisse d'aliments concentrés simples ou composés, servent à équilibrer en azote et en énergie la ration de base, établie à partir des fourrages. Utilisés dans ce contexte, ils sont fréquemment appelés des « *correcteurs* ».

#### **I.1.2.1 Les aliments concentrés simples :**

##### **I.1.2.1.1 Les céréales et leurs co-produits :**

Les céréales (**figure 6**) sont des aliments secs, pourvus de teneurs en matières azotées faibles à moyennes, de teneurs faibles en fibres (à l'exception de l'épeautre, car il s'agit d'une céréale enveloppée) et de teneurs élevées en énergie. Les céréales sont riches en amidon, celui-ci représente en effet jusqu'à 65 à 70 % de leur MS, selon la céréale considérée. Toutes les céréales se caractérisent en outre par des teneurs négatives en OEB, le maïs présentant la valeur la plus négative.

#### **I.1.2.1.2 Les graines de protéagineux et d'oléagineux :**

Les graines de protéagineux et d'oléagineux sont des aliments concentrés riches en énergie et en matières azotées. En Belgique, les graines les plus fréquemment utilisées dans les rations pour vaches laitières sont le pois, la féverole et le lupin (bleu et blanc) pour les protéagineux, et le lin, le soja et le colza pour les oléagineux.



**Figure 6 :** Champ de pois protéagineux (Source : Cuvelier, 2006)

#### **I.1.2.1.2. a) Les oléagineux :**

Les graines oléagineuses, lin, soja et colza sont des graines qui sont destinées à produire de l'huile en huilerie comme production principale, le co-produit étant le tourteau.

Ces graines se caractérisent donc par des teneurs en MG très élevées, de l'ordre de 20 à 45 % de la MS, et, bien sûr, des teneurs en énergie très élevées également, la substance de réserve étant ici les acides gras, et non pas l'amidon. A titre de comparaison, la graine de lin contient plus de 4 fois plus de MG que le tourteau de lin. Il s'agit aussi d'aliments pourvus de teneurs en matières azotées élevées, mais toutefois moindres que le tourteau correspondant : la graine de lin possède ainsi une teneur en MAT qui représente 68 % de celle du tourteau de lin.

#### **I.1.2.2 Les mélanges minéraux vitaminés :**

Les mélanges minéraux vitaminés du commerce renferment en général des macro-éléments (calcium, phosphore, sodium, ...), des oligo-éléments (sélénium, zinc,

cuire, ...) et des vitamines. Tout comme pour les aliments concentrés composés, leur composition varie selon le fabricant et le produit considéré. Les mélanges minéraux vitaminés se caractérisent en général par leur teneur en calcium et en phosphore. On parle ainsi d'un « 16/8 » ou d'un « 12/8 », pour désigner un mélange avec 160 g de calcium/kg et 80 g de phosphore/kg ou 120 g de calcium/kg et 80 g de phosphore/kg.

## II- Les races bovines en Algérie :

Le bovin local est représenté essentiellement par la petite Brune de l'Atlas. Tandis que le bovin importé est représenté particulièrement par : **la Holstein, la Montbéliarde, la Brune des Alpes, la Limousine, et la Tarentaise**. Il existe même des produits de croisement entre bovin local et importé (*Feliachi, 2003*).

### II. 1 les races locales :

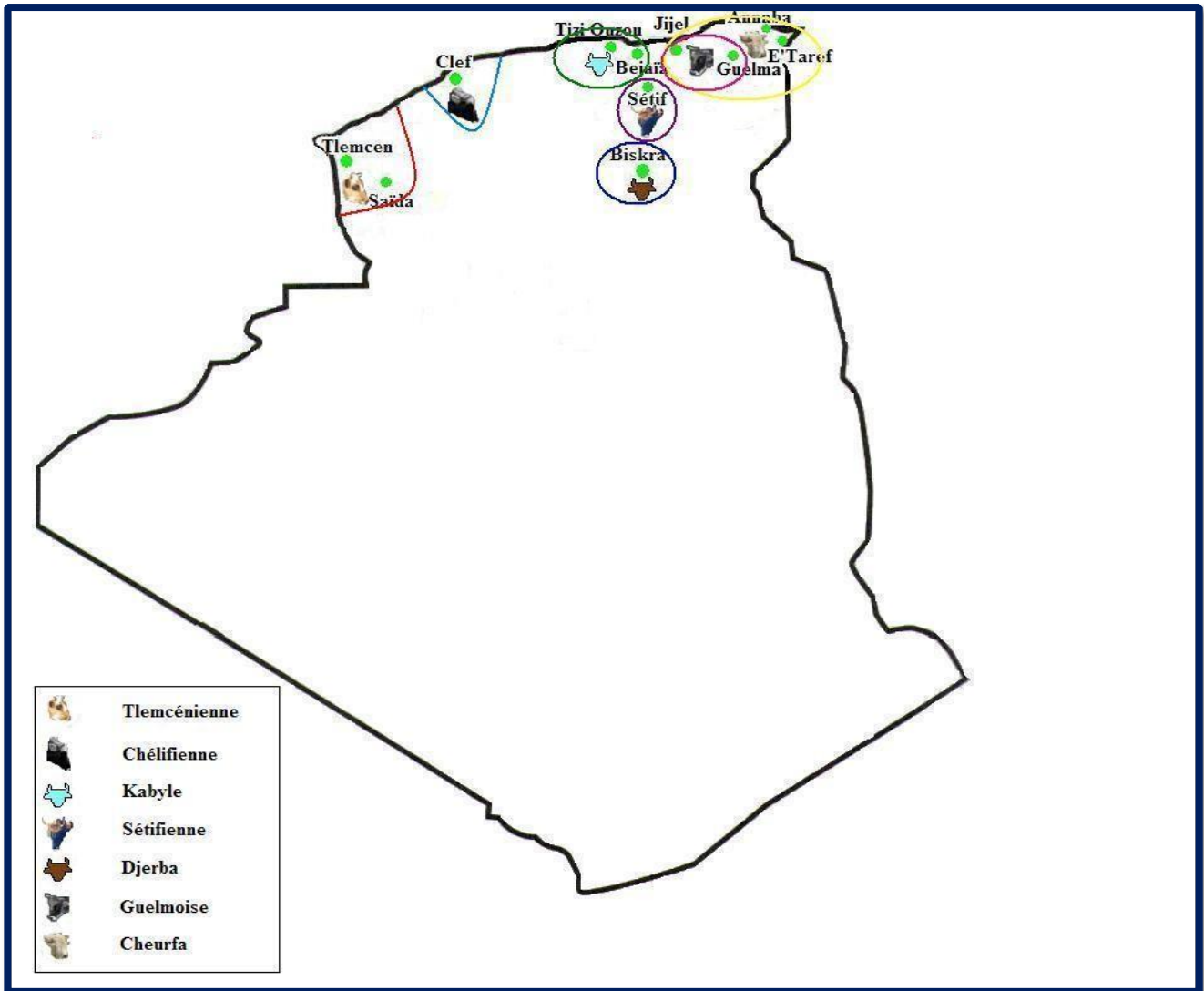
Tous les types de bovins autochtones de l'Afrique du Nord sont appelés race brune de l'Atlas dont l'ancêtre principale est « Bos Taurus Primigineus Mauritanicus » découvert par Thomas dans le quaternaire de l'Afrique du Nord (*Itebo et al., 1997*), d'autres pensent qu'elle a appartenu à deux races Ibérique et Asiatique (*Guerissi et al., 2009*).

D'après *Sanson* cité par *Geoffroy (1919)*, la race bovine du Nord-Africain est décrite ainsi : « Une ligne de chignon faiblement onduleuse, les chevilles osseuses [...] bosses frontales très accusées, front fortement déprimé entre les orbites au niveau des sutures fronto-nasales, ses naseaux courts et larges ». (*Guerissi et al., 2009*).

La brune de l'Atlas a acquis d'autres appellations telles que : Beldi; blonde des Plateaux; d'Oulmes et des Zaers; Oulmes Blond, Oulmes, Blond Moroccan, Blond Zaers, Moroccan Blond; Libyan Brown Atlas, Libyan Shorthorn, Mahalli. (*Dagris et al., 2009*).

La race brune de l'Atlas est caractérisée par : une robe de nuance allant du fauve brunâtre au rouge brun et gris foncé, peau fine, poils courts, muqueux bruns et ardoisés, paupières et mufle noirs. Présence de chignon sur la tête, orbites saillantes, cornes fines en crochet très dur et solide avec extrémité pointue de couleur gris ou noir. Elle est de petite taille, musculature moyenne, hanches étroites, dos horizontal, queue longue. Tandis que leurs Aplombs se caractérisent par des membres frêles et courts, onglons noirs. Le poids varie entre 250 et 300 kg. (*Nabti et al., 1999 ; Abada et al., 2001 ; Nedjraoui et al., 2001*).

Le cheptel bovin local est réparti exclusivement sur la partie nord de l'Algérie (**Figure 7**). La concentration du cheptel local se trouve à l'Est du pays où l'on trouve plus de la moitié de l'effectif (*Itebo et al., 1997*) avec une prédominance de femelles. (*Feliachi et al., 2003*).



**Figure 7** : Répartition géographique des différents types du bovin local en Algérie  
(Source : *Itebo, 1997*)

La brune de l'Atlas a subi des modifications suivant le milieu dans lequel elle vit, et elle a donné naissance à des rameaux qui ne sont ni répertoriés ni catalogués.

On distingue la Guelmoise, la Cheurfa, la Sétifienne, la Chélfienne, la Djerba, la Kabyle et la Tlemcénienne, marquées par l'influence du milieu propre à chaque région (*Itebo et al., 1997*). Ces rameaux se différencient nettement du point de vue phénotypique.

### II.1.1 La Guelmoise :

Présente une robe à pelage gris foncé, vivant en zones forestières. (**Figure 8**), elle a été identifiée dans les régions de Guelma et de Jijel, cette population compose la majorité de l'effectif (*Feliachi et al., 2003*).



**Figure 8** : Race locale Algérienne. La Guelmoise (Source : *Feliachi, 2003*)

### II.1.2 La Cheurfa :

À pelage gris clair presque blanchâtre, le mufle et les paupières sont toujours noirs. Vit en bordure des forêts. (**Figure 9**), elle a été identifiée dans les zones lacustres et littorales d'El-Tarf et d'Annaba où se situe la majorité de l'effectif. Elle est présente à Jijel et couvre le sud de Guelma. (*Itebo et al., 1997*).



**Figure 9** : Race locale Algérienne. La Cheurfa (Source : *Feliachi, 2003*)

### II.1.3 La Sétifienne :

À robe noirâtre uniforme, elle présente une bonne conformation. Sa taille et son poids varient selon la région où elle vit. La queue est de couleur noire, longue et traîne parfois sur le sol. La ligne marronne du dos caractérise cette population. (**Figure 10**).

Le poids des femelles conduites en semi- extensif dans les hautes plaines céréalières avoisine celui des femelles importées. La production laitière pour sa part peut atteindre 1500 kg/an. Elle est localisée dans les monts du Bâbord. (*Feliachi et al., 2003 ; Polaris et al., 2009*).



**Figure 10** : Race locale Algérienne. La Sétifienne (Source : *Feliachi, 2003*)

### II.1.4 La Chélifienne :

Se caractérise par une robe fauve, une tête courte, des cornes en crochets, des orbites saillantes entourées de lunettes 'marron foncé' et une longue queue noire qui touche le sol. (**Figure 11**), elle est rencontrée dans les monts de Dahra. (*Polaris et al., 2009*).



**Figure 11** : Race locale Algérienne. La Chélifienne (Source : *Feliachi, 2003*)

### II.1.5 La Djerba :

Qui peuple la région de Biskra et qui se caractérise par une robe brune foncée, une tête étroite, une croupe arrondie et une longue queue. La taille très réduite, adaptée aux milieux très difficiles du Sud. Elle peuple la région de Biskra et elle est adaptée aux milieux très difficiles du Sud. (*Feliachi et al., 2003*).

### II.1.6 La Kabyle et la Chaouia :

Qui dérive respectivement de la Guelmoise et de la Cheurfa. Suite aux mutations successives de l'élevage bovin (**Figure 12**). Elle est localisée en Kabylie. (*Feliachi et al., 2003*).



**Figure 12** : Race locale Algérienne. La Kabyle (Source : *Feliachi, 2003*)

### II.1.6 La Tlemcénienne :

Ont subi des croisements avec une race ibérique. Elle est localisée dans les montagnes de Tlemcen et de Saïda. (*Kirat et al., 2007*).



**Figure 13** : Race locale Algérienne. La Tlemcénienne (Source : *Kirat, 2007*)

## II. 2 Les races à hautes potentielles de productivité :

Les races hautes productrices ou bovins laitiers modernes (**BLM**), sont des races d'importation à haut potentiel génétique d'origine européenne, l'introduction de ces races était depuis la colonisation du pays (*Eddebbbarh et al., 1989*), elles représentent 9% à 10% du total du cheptel national, soit 120000 à 130000 têtes, ce cheptel assure 40% de la production du Lait (*Bencharif et al., 2001*).



**Figure 14** : Bovins importés en Algérie (a. Holstein, b. Montbéliarde, c. Tarentaise).  
(Source : *Bencharif, 2001*)

## II. 3 Les races améliorées ou mixtes :

Elles sont des races issues de multiples croisements entre la race locale et les différentes races importées pour l'amélioration de la production, ces races importées qui ont un potentiel génétique élevé, mais leurs performances se diminuent par rapport à leurs pays d'origine (*Nadjraoui et al., 2001*), les effectifs sont estimés de 555000 têtes, ils représentent 42 à 43% du cheptel national et assurent 40% de la production du lait (*Bencharif et al., 2001*).



**Figure 15** : Produits de croisement : (a. Montbéliarde croisée, b. Holstein croisé)  
(Source : *Bencharif, 2001*)

### III- La traite :

Durant la période de la lactation, la traite se déroule le plus souvent à heures régulières, 2 fois par jour (matin et soir), 7 jours sur 7. Elle rythme ainsi la vie de l'éleveur toute l'année. Les vaches apprécient ce moment qui soulage leur mamelle remplie de lait.

La traite est effectuée avec une machine à traire qui peut prendre différentes formes selon les spécificités de la ferme (par les éleveurs en salle de traite ou avec une installation mobile en montagne, ou avec un robot automatique). Dans tous les cas, le lait est recueilli dans des conditions sanitaires strictes, conformément aux normes françaises et européennes :

Le lait, dont la température est de 37 à 38 °C quand il sort du pis de la vache, est conduit via des tuyaux vers une grande cuve réfrigérée, le tank à lait. Il y est aussitôt refroidi et conservé à 4°C (le froid permet de limiter le développement des micro-organismes, d'où l'importance de la chaîne du froid qui ne sera jamais interrompue jusqu'à la vente du produit laitier final).

#### III.1 La salle de la traite :

C'est l'installation la plus répandue, ce système permet de traite assez rapidement des grands troupeaux en limitant la pénibilité du travail. Ce local servant exclusivement à la traite, est nettoyé après cette opération ainsi les conditions sont favorables à la production d'un lait de qualité. (*Levesque, 2004*).

Lorsqu'on parle de salle de traite, il faut considérer l'ensemble du bloc traite c'est à dire l'aire d'attente ; l'endroit où sont rassemblées les vaches juste avant d'être traitées, la salle de traite, l'endroit où se réalise l'opération de traite, et la laitière ; l'endroit où se conserve temporairement le lait avant le ramassage. (*Isabelle et al., 2002*).

#### III.2 Les origines et les réservoirs de la microflore du lait :

##### III.2.1 Les flux microbiens à la ferme :

Les différences de profils, entre les flores d'intérêt technologique et la flore d'altération qui demeurent dans les laits crus, ont pu être reliées à la pratique de traite (*Michel et al., 2001*). Ainsi, l'existence de liens entre la composition de la flore des laits et certaines pratiques suggère que la qualité et la nature de la flore ne seraient pas le fruit du hasard mais dépendraient des facteurs de production du lait (*Reboux et al., 2006*).

La connaissance des réservoirs de flore et des flux de microorganismes existants dans l'étable et les salles de traite semble un préalable indispensable pour mieux appréhender l'influence des pratiques de production dans l'enrichissement des laits en flores d'intérêt technologique. Les microorganismes retrouvés dans le lait à la ferme peuvent avoir de multiples sources. Ils peuvent provenir de l'environnement des animaux (bâtiments, eau, fourrages), des animaux eux même, du matériel de traite, du trayeur (*Montel, 2012*). De plus, la mise en évidence de souches de la même famille, entre bactéries isolés du lait et celles isolées de l'environnement (aliments, poussières, trayeurs, manchons) tendait à monter l'existence de flux microbiens depuis l'environnement de la ferme jusqu'à au lait (*Bouton et al., 2007*).

### III.2.2 Le réservoir trayon :

De nombreuses données sur la charge microbienne présente en surface de trayons (*Desmasures et al., 1997 ; Joandel, 2007 ; Michel et al., 2006*) ont montré qu'il existe une large variété microbienne présente en surface des trayons, et que les flores d'intérêt fromager sont largement dominantes dans la population globale.

Les flores qui la composent sont majoritairement des flores qui peuvent être qualifié de flore d'intérêt fromager, telles les flores acidifiantes mésophiles, les flores de surfaces (microcoques et corynébactéries), les entérocoques, les flores intervenant en affichage (lactobacilles hétéro fermentaires facultatifs ou bactéries propioniques) (*Joandel, 2007*).

Les niveaux et la qualité de la flore microbienne présente en surface de trayon sont associés à la saison, les conditions de logement des animaux et la propreté et la nature des laitiers, Ainsi les flores d'intérêt fromager sont présentes en qualités 4 fois supérieure en hiver qu'en été. La présence ou l'absence d'un laitier, ainsi que sa nature peut influencer l'importance relative de certains groupes microbiens présents en surface des trayons (*Bouton et al., 2007*).

### III.2.3 Réservoir machine à traite :

Les groupes microbiens mobilisés par rinçage de la machine à traite ne sont très diversifiés. Sur douze groupes microbiens recherchés, seuls quatre ont été isolés et dans 80 % des cas, avec des niveaux relativement faibles (*Michel et al., 2005*). De plus les flores d'altération (coliformes *Pseudomonas*) ont été retrouvées la plupart du temps à des niveaux identiques à ceux des flores technologique. Néanmoins, une étude a montré que le matériel de traite, via des prélèvements par écouvillonnage

sur des manchons , était un réservoir potentiel en lactobacilles hétéro fermentaires facultatifs , (*Bouton et al., 2007*) qui trouvent leurs origines en amont (alimentation , laitiers, ...).

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## **CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODES**

## I- Lieu de l'étude

Cette étude a été réalisée conjointement, au niveau de laboratoire microbiologie d'université Abd Al-Hamid Ibn Badis (**ITA**) et Laboratoire de Sciences et Techniques de Production Animale (**LSTPA**) de l'université de Mostaganem, pendant une durée de trois mois allant du 12 mars jusqu'au 03 juin 2017.

Le but de cette étude consiste à évaluer et comparer de deux écosystèmes microbiens laitiers entre les étables utilisant le foin sec et l'ensilage.

## II- Provenance des échantillons

Le lait est traité manuellement à partir des vaches saines au stade de lactation, puis il est recueilli proprement dans des flacons de 60ml, on a utilisé deux flacons pour chaque vache, qui ont ensuite été étiquetés et placés dans une glacière et ont été acheminés au laboratoire de recherche (**LSTPA**) au niveau de Hassi Mamache de Mostaganem où ils sont aussitôt analysés.

Suivant l'objectif expérimental visé, le lait est destiné aux analyses physico-chimiques.

Un total de 02 échantillons a été prélevé à différentes dates dans différentes fermes de la région de Mostaganem (**Tableau 8**)



**Figure 16** : Prise de l'échantillon

	Date et heure	Lieu	Race de vache	Age de la vache
<b>Echantillon 1</b>	28/03/2017 à 16 :00 h	Hadjadj Mostaganem	Pie Noire	28 mois
<b>Echantillon 2</b>	29/03/2017 à 17 : 00 h	Hassi Mamache Mostaganem	Pie Noire	34 mois
<b>Echantillon 3</b>	29/03/2017	Hassi Mamache Mostaganem	/	/

**NB** : échantillon n° 3 : l'ensilage

**Tableau N° 8** : caractéristiques des échantillons étudiés

### III- Matériel

#### III.1 Matériel utilisé pour les analyses physico-chimiques

##### III.1.1 Appareillage

Le Lactostare sauf mesure de l'acidité

##### III.1.2 Verrerie usuelle

Béchers, entonnoirs, burette + support, pissette.

#### III.2 Matériel utilisé pour les analyses microbiologiques

##### III.2.1 Appareillage

Plaque chauffante, agitateur magnétique chauffant, bain marie (MEMMERT), autoclave, Etuve, bec benzène, microscope optique (BULBTYPE 12V 20 W), réfrigérateur (ENIE), compteur de colonie, balance électronique, Vortex.

##### III.2.2 Verrerie usuelle

Pipettes Pasteur, béchers, lames et lamelles, tubes à essai, pipettes graduées, éprouvettes, Jarre, flacons en verre de 250 ml, boîtes Pétri stérile, spatule.

### III.2.3 Réactifs

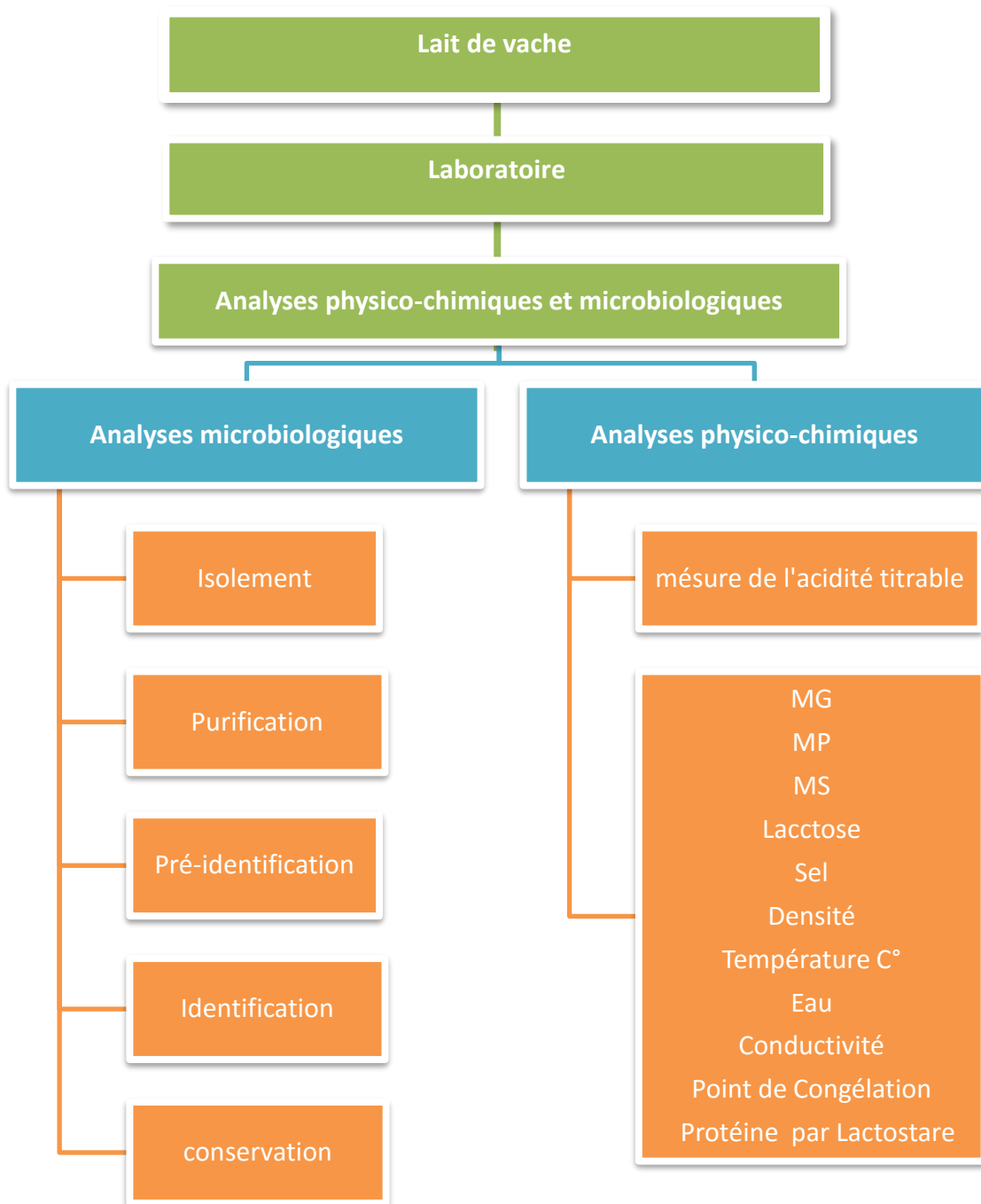
- Phénolphtaléine.
- Solution de Soude (0,1N).
- Bleu de méthylène.
- Eau oxygénée.
- Chlorhydrate.

### III.2.4 Réactifs pour coloration du GRAM

- Violet de gentiane phénique
- Lugol (iodo-iodure de potassium)
- Alcool à 95% (ou mélange alcool absolu+ 1/5 ème d'acétone)
- Safranine (ou Fuchsine phéniquée de ziehl)

#### IV- Méthodes d'analyses

La méthodologie de travail adoptée dans cette étude est récapitulée dans la figure 17 comme suit :



**Figure 17 :** Représentation Schématique du travail réaliser

## IV.1 Les analyses physico- chimiques

### IV.1.1 Mesure de l'acidité titrable

On entend par acidité titrable du lait, celle exprimée conventionnellement en gramme d'acide lactique par litre du lait. Il s'agit d'un titrage acido-basique, l'acide lactique est neutralisé par une solution d'hydroxyde de sodium NaOH en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré.

A l'arrivée dans la laiterie, la mesure de l'acidité du lait permet de vérifier que la fermentation n'a pas commencé et que la charge microbienne n'est pas trop élevée. L'augmentation de l'acidité du lait lorsqu'elle est involontaire est un signe de mauvaise hygiène et d'un développement intense de micro-organismes (mauvais refroidissement, mauvaise pasteurisation, durée trop longue du transport, par exemple). (*Alais, 1957*).

#### IV.1.1.1 Technique

On entend par l'acidité titrable du lait, celle exprimée en quantité d'acide lactique par litre de lait. Il s'agit d'un titrage acido- lactique est neutralisé par une solution d'hydroxyde de sodium Na OH en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré. Et on titre avec la solution Na OH jusqu'à l'apparition d'une coloration rose.



**Figure 18 :** Mesure d'acidité

### IV.1.2 Lactostare

Appareil d'analyse du lait avec nettoyage, rinçage et calibrage du point zéro complètement automatiques pour analyser le lait rapidement et avec précision.



**Figure 19 :** Lactostare

Il donne : les teneurs en MG, MP, Lactose, densité, MS, température, EST.

## IV.2 L'analyse Les analyses microbiologiques

### IV.2.1 Préparation des dilutions décimales

A l'aide d'une pipette stérile 1ml du lait est prélevé et introduit dans un tube à essai contenant 9ml d'eau physiologique, ainsi s'obtient la dilution  $10^{-2}$ , les dilutions  $10^{-3}$  jusqu'à  $10^{-6}$  sont obtenues de la même manière. (*Idoui et al., 2009*).

### IV.2.2 Dénombrement des germes aérobies (flore totale)

Le dénombrement des germes de la flore totale permet de connaître le niveau de pollution du lait. Pour cela, on doit porter aseptiquement 1 ml de chaque dilution dans une boîte Pétri, et on complète avec 20 ml de gélose PCA fondue puis refroidie à 45 ° C.

On fait ensuite des mouvements circulaires de va et vient en forme de huit pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose, les boîtes de pétri sont placées dans l'étuve pour une incubation de 72 h à 30 ° C.

La lecture se fera après 24, 48,72 heures. Les colonies se présentent sous formes lenticulaires en masse et le nombre de colonies obtenues est multiplié par l'inverse de la dilution pour avoir le nombre de germes.

### IV.2.3 Isolement des bactéries lactiques

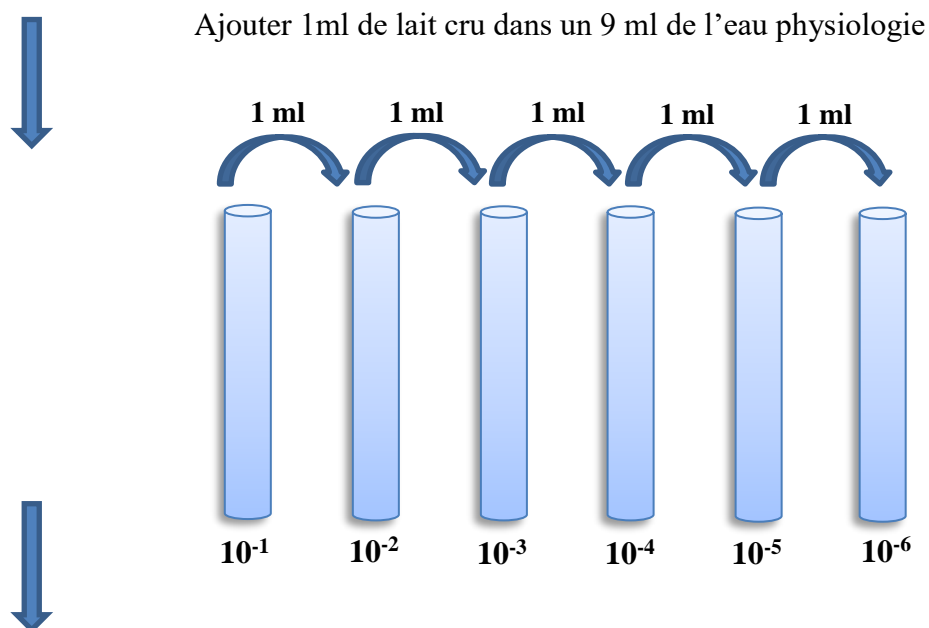
L'isolement a été réalisé sur gélose MRS (pour des bacilles) et M17 (pour les coques) préalablement coulée et solidifiée dans des boîtes de Pétri, en portant quelques gouttes des dilutions à la surface du milieu suivi d'un étalement. L'incubation est faite à 30°C, 37°C et 45°C pendant 24 h à 48h.

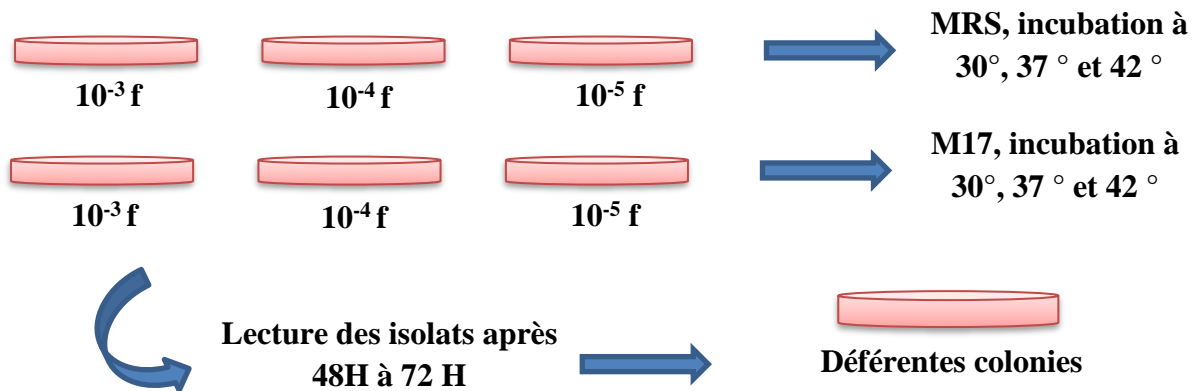
#### IV.2.3.1 Préparation de l'échantillon

Un ml de l'échantillon est pipeté aseptiquement dans 9ml d'eau physiologique et des dilutions décimales sont réalisées ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) seules les dilutions  $10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$ , sont retenues et ensemencées en profondeur sur boîtes (1ml).

##### IV.2.3.1.1 Technique

#### Lait cru (SM)





**Figure 20 :** Représentation Schématique d'étape de l'isolement des souches

#### IV.2.4 Purification

La purification des souches isolées est réalisée par repiquages successifs alternant sur milieux sélectifs MRS liquide et solide (par la méthode des stries), et l'incubation à 30°C. (*Kacem et Karam, 2006, Cheriguene et al., 2007*).

La pureté des souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur (couleur, taille et forme) (*Guiraud, 2004*). Ces colonies pures sont retenues pour la suite de l'étude.

#### IV.2.5 Pré-identification des souches

##### IV.2.5.1 L'aspect macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS solide et liquide ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies sur milieu MRS solide (*Badis et al, 2005*). Et le trouble dans le milieu liquide. L'étude macroscopique nous a permis de noter le diamètre, la pigmentation et l'aspect des colonies. (*Hassaine.O, 2013*).

### IV.2.5.2 L'aspect macroscopique

#### IV.2.5.2.1 La coloration de Gram

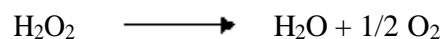
La coloration de Gram est une coloration classique en microbiologie. Elle permet de distinguer deux (2) types de bactéries, les bactéries en Gram négatifs (G-) et les bactéries en Gram positives (G+). Celles-ci diffèrent de part de la composition de leur paroi, notamment par l'épaisseur du peptidoglycane, ou la présence d'une membrane externe. (*Larpen et al., 1990*).

##### IV.2.5.2.1.a Technique :

- La première étape de la coloration consiste à réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune (sur un milieu solide) et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette stérile) puis on étale sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame.
- La seconde étape nécessite le séchage et la fixation par la chaleur (pour tuer les bactéries, fixer leur structure cytotologique, et les faire adhérer à la lame).
- La troisième étape nécessite quelques gouttes de violet de gentiane sur un frotti fixé pendant une minute, après rinçage, on ajoute de Lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) pendant 30 secondes ;
- La quatrième étape, à savoir le bain d'alcool 90°, (ne va traverser que la paroi de certaines bactéries « les Gram - », et décolorer leur cytoplasme). Puis on rince avec de l'eau distillée.
- En fin, quelques gouttes de fuchsine de Ziehl sont versées sur la lame qu'on laisse agir une minute. La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique.

##### IV.2.5.2.2 Test de la catalase :

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H<sub>2</sub>O et 1/2 O<sub>2</sub>.



La recherche de la catalase est un **test fondamental pour l'identification**

### des bactéries à Gram positif.

**NB** : pratiquement toutes les bactéries à Gram négatif sont catalase +.

#### IV.2.5.2.2.a Technique

- Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame.
- Y déposer, à l'aide de l'anse de platine ou d'une pipette Pasteur boulée, une colonie isolée (ou plusieurs si petites colonies) de la souche à tester.
- Observer l'apparition de bulles.

#### IV.2.6 Identification des isolats

L'identification des souches a été réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

##### IV.2.6.1 Croissance à différentes températures

Chaque microorganisme a sa température optimale de croissance, notamment les bactéries lactiques dont on peut les diviser en deux groupes : les thermophiles et les mésophiles. Ce test est pour but de différencier les souches, après l'ensemencement des cultures pures sur gélose M17 les boîtes sont incubées à 30°C, 37°C et 45°C pendant 3 jours. Les bactéries thermophiles poussent à 45°C alors que les bactéries mésophiles ne le font pas, (*Fereidoun et al., 2012*).

##### IV.2.6.2 Croissance sur lait bleu de méthylène

Une série de tubes à essais de 10ml de lait écrémé stérilisé à 0,1% et à 0,3% de bleu de méthylène est ensemencé par des cultures pures puis incubés durant une période de 24 à 48 heures à 30°C, on note que les observations relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait. Seuls les entérocoques peuvent se développer dans le lait à 0,3% de bleu de méthylène (*Rabah.N, 2010*). Et certaines coques sont capables de se développer sur du lait à 0.1% de bleu de méthylène après incubation à 30°C pendant 48 heures (*Hassaine.O, 2013*).

##### IV.2.6.3 Test oxydase

Prélever une colonie avec une anse de platine et la déposer sur la zone réactionnelle du support (la bandelette). Triturer, attendre et lire les résultats : Pourpre/Violet = positif ; Jaune = négatif.

#### **IV.2.6.4 Thermorésistante**

Des tubes contenant 10 ml de M17 liquide sont inoculés par les souches isolées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à 100°C pendant 10 minutes, après refroidissement brusque, elles sont incubées à 30°C, 37°C pendant 48 à 72h. Un résultat positif se traduit par un trouble (*Mahi, 2010*).

#### **IV.2.6.5 Tolérance au PH acide et alcalin**

La croissance des souches a été testée à différents pH (4,8 et 9,6) pour les leuconostocs et à pH (4 et 9,6) pour les lactobacilles. La croissance se manifeste par un trouble en milieu liquide MRS (*Guiraud, 1998*).

#### **IV.2.6.6 Détermination du Type fermentaire**

Un tube contenant le bouillon MRS G (Bouillon MRS + glucose au lieu du lactose) et une cloche de Durham est inoculé avec la souche à étudier pour mettre en évidence la production de CO<sub>2</sub> et de savoir ainsi le type fermentaire. Après incubation de 24h à 30°C, la présence du gaz dans la cloche indique un métabolisme hétérofermentaire (*Hariri et al., 2009*).

Concernant les lactobacilles homofermentaire on utilise du bouillon MRS en remplaçant le glucose par le gluconate pour séparer entre les lactobacilles homofermentaires stricte (pas de dégagement de CO<sub>2</sub>) et entre les lactobacilles hétérofermentaire facultatifs (dégagement de CO<sub>2</sub> en présence de gluconate).

#### **IV.2.6.7 Croissance en présence de diverses concentrations de NaCl**

La croissance des souches a été testée à différentes concentrations de NaCl (4% et 6,5%). La croissance se manifeste par un trouble en milieu liquide MRS (*Guiraud, 1998*).

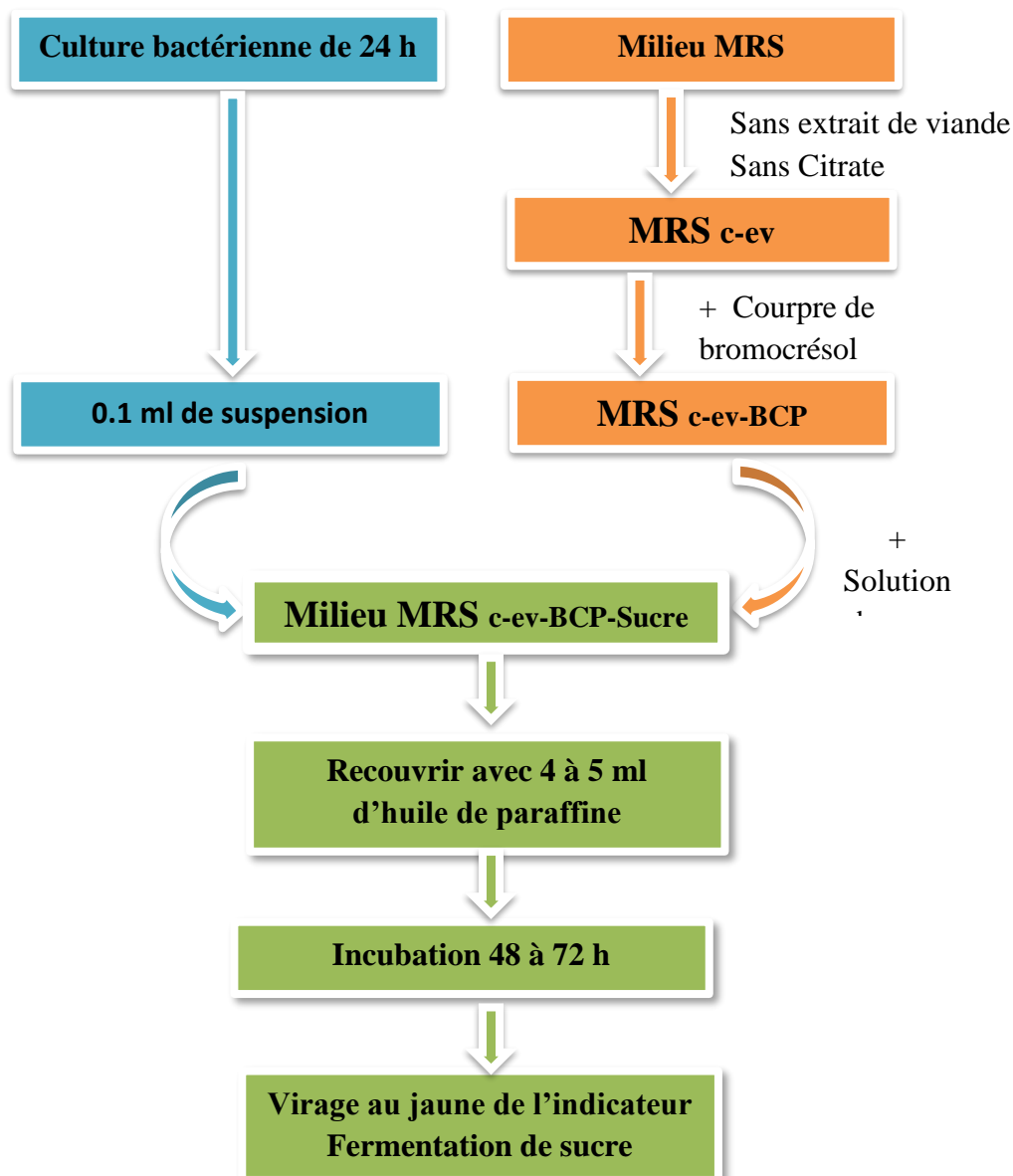
#### **IV.2.6.8 Production du gaz à partir du glucose**

Le dégagement du CO<sub>2</sub> à partir du métabolisme de glucose est un caractère

biochimique chez *Leuconostoc*, ce test a été effectué sur un bouillon M17 contenant le glucose dont les 5g de lactose ont été remplacé par 20 g de glucose (*Terzaghi et Sandine, 1975*). Des cultures pures ont été inoculées dans des tubes de 10 ml contenant une cloche de durham, puis incubés à 30°C, 37°C et 45°C pendant 48h. La production du gaz se traduit par l'enlèvement de la cloche 1/10 hors le milieu.

#### IV.2.6.9 Type de fermentation

Ce test permet de classer les souches lactiques entre homofermentaire et hétérofermentaire. On a utilisé pour ce test un milieu dépourvu de citrate pour éviter la formation de CO<sub>2</sub> liée à ce métabolisme. Dans des tubes remplis de 10ml de bouillon M17 des cloches de durham ont été entreposées, puis les souches à tester étaient ensemencées et incubé pendant 48h. La présence du gaz CO<sub>2</sub> dégager par les souches hétérofermentaires se traduit par l'enlèvement de la cloche 1/10 hors le milieu, (*Belarbi, 2011*).



**Figure 21** : Protocole de la fermentation des hydrates de carbonés

#### IV.2.6.10 Etude de l'activité protéolytique en milieu solide

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est mise en évidence et comparée sur une gélose au lait à 1, 3 et 5% (*Gordon et al, 1973*).

Les bactéries à tester, issues d'une culture jeune, ont été ensemencées à la surface de ces milieux de cultures par touche. Après incubation à 30°C, l'activité protéolytique de ces bactéries se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

#### IV.2.6.11 Etude de l'activité lipolytique en milieu solide

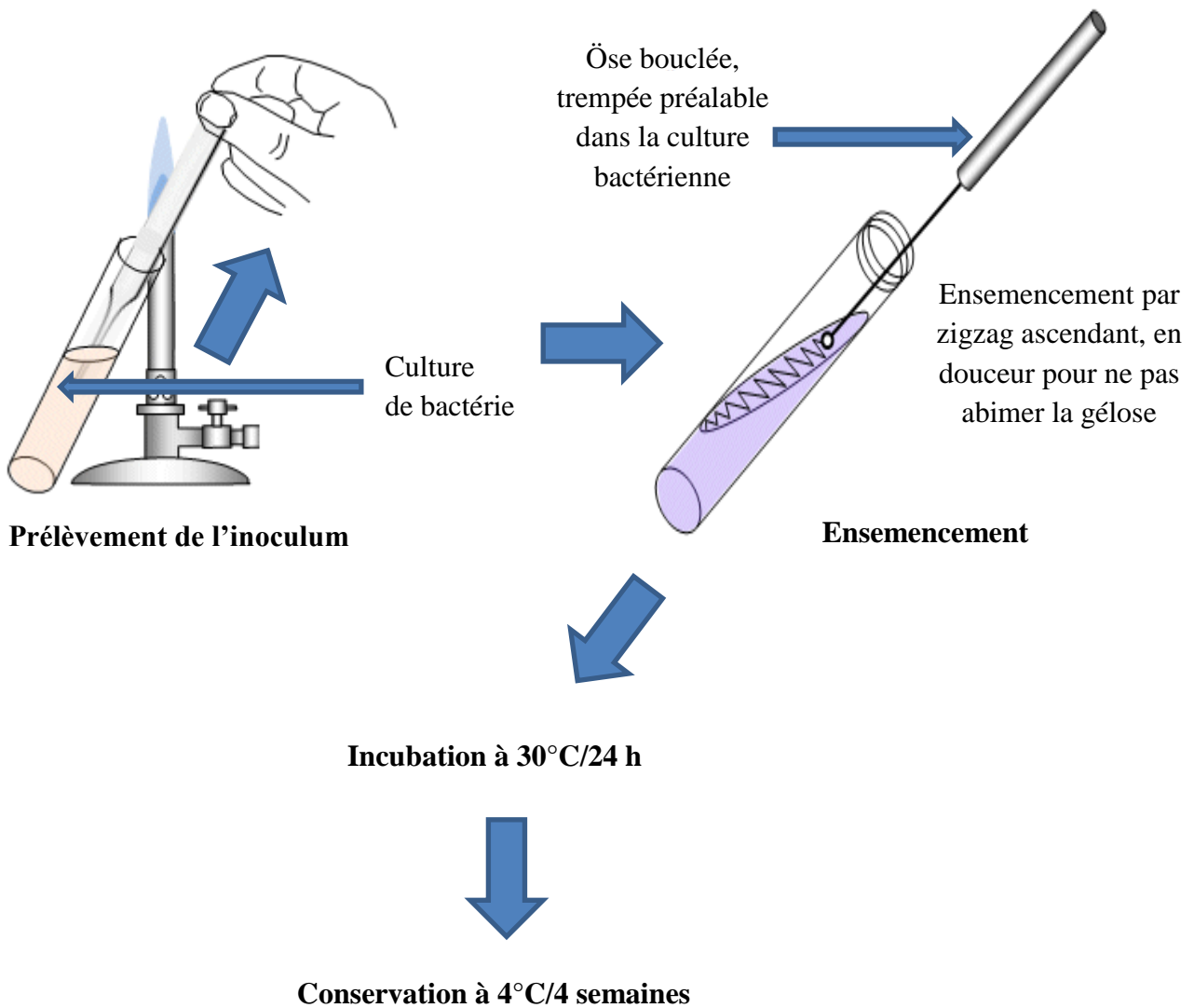
Il s'agit d'apprécier l'aptitude des souches à métaboliser divers substrats carbonés en particulier les sucres. Ce test est réalisé en galeries classiques par des tubes de bouillon MRS sans extrait de viande et sans citrate (MRSc-ev), (*Leveau et al., 1991*), additionnée d'un indicateur de ph (courpre de bromocrésol à 0,04 g/l), le glucose du milieu MRS est remplacé par le sucre à tester, les solutions de sucres (glucose, fructose, arabinose, xylose, saccharose, lactose) sont stérilisées par tyndallisation et après ils sont introduit dans le milieu avec une concentration finale de 1% un 0,1 de suspension bactérienne est ensemencé dans 2 ml du MRSc-ev-BCP –sucre avec l'ajout d'une couche mince d'huile de paraffine (V/V) stérilisé pour assurer l'anaérobiose (*Samelis et al., 1994*).

Après incubation pendant 48h à 72h, le développement de la culture et le virage au jaune de l'incubateur coloré dû à l'acidification du milieu traduit la fermentation du sucre à tester (*Guessas et Kihal, 2004*).

### IV.2.7 Conservation des isolats

#### IV.2.7.1 Conservation courte durée

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu solide MRS incliné. Après croissance à température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les quatre semaines (**Figure 22**) (*Badis et al., 2005*).



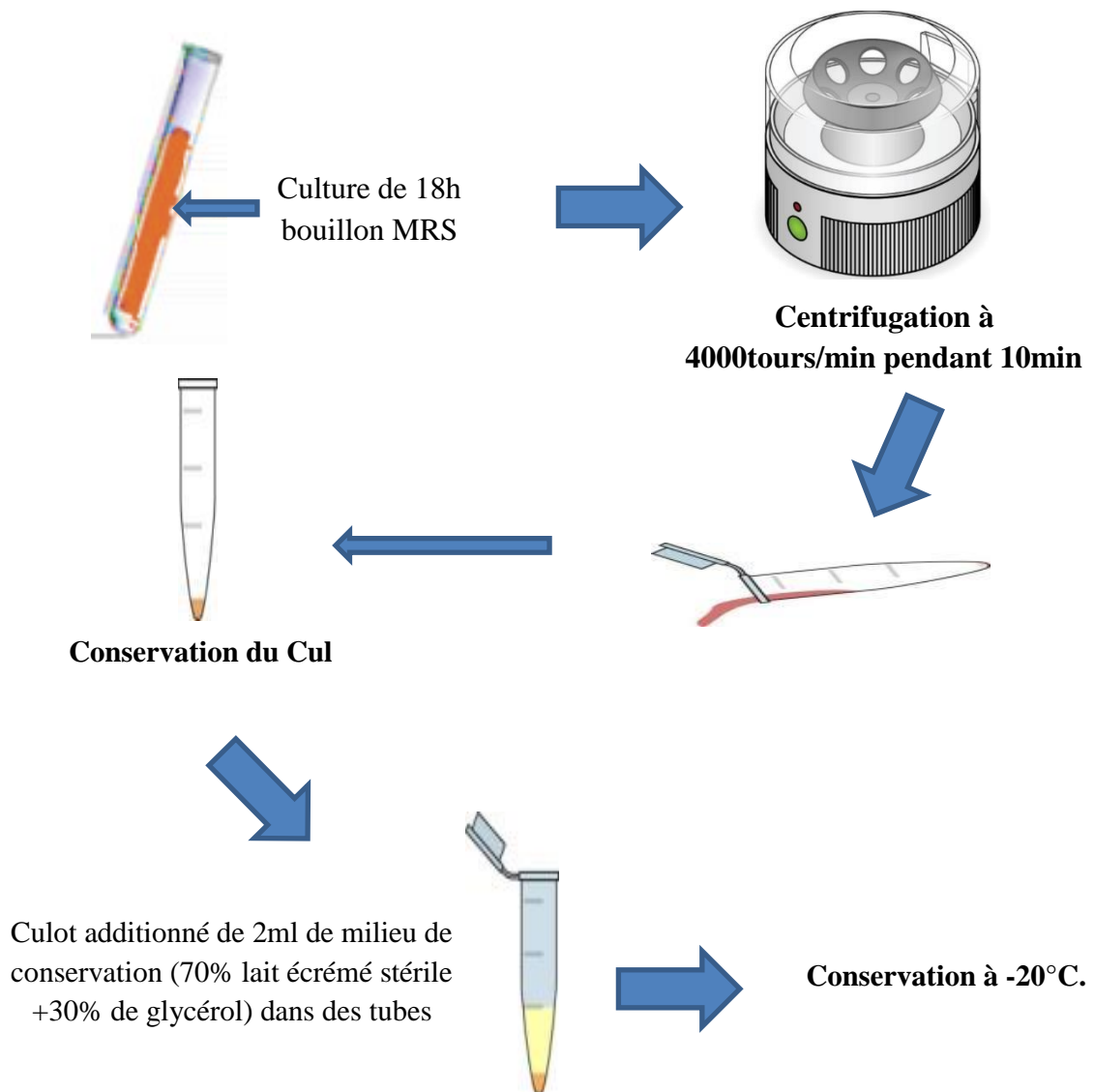
**Figure 22 :** Schéma de conservation courte durée des bactéries lactiques purifiées  
(Source : *Badis, 2005*)

#### IV.2.7.2 Conservation longue durée

A partir des cultures de 18h (milieu liquide), les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 tours par minute pendant 10 min. Une fois le surnageant est éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot.

Le milieu de conservation contient 70% de lait écrémé et 30% de glycérol. Les

cultures sont conservées en suspension dense et en tubes éppendorfs à -20°C. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans du lait écrémé enrichi avec l'extrait de levure, deux fois avant l'utilisation (*Badis et al., 2005*).



**Figure 23 :** Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées  
(Source : *Badis, 2005*)

# **CHAPITRE 2 :**

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## I- Les analyses physico-chimiques et microbiologique du lait

### I.1 Les analyses physico- chimiques du lait

#### I.1.1 Mesure de l'acidité titrable

	L'acidité (D°)
Échantillon 1	16
Échantillon 2	20

Tableau N° 9 : Résultat des mesures de l'acidité de deux échantillons de lait de vache

#### I.1.2 Analyses au Lactostare

	Échantillon 1	Échantillon 2
Matière grasse	02,65 %	03,02 %
Conductivité	03,40 %	04,49 %
Matière sèche	06,99 %	09,10 %
Protéines	01,84 %	02,40 %
Eau	35,46 %	35,57 %
Température	11,9° C	16,2 ° C
Point de congélation	- 0 ,242	- 0 ,335
Sel	0,01%	0,01 %
Ph	6,63	6,60
Lactose	02,45 %	03,30 %
Densité	05,51	7,60

Tableau N° 10 : Résultats obtenus après une analyse sur Lactostare, les valeurs observées sur l'écran de lecture l'appareil

## I.2 Les analyses microbiologiques du lait

### I.2.1 Isolement et purification

À partir de deux échantillons de lait de vache, nous avons isolé 17 souches. C'est isolats, qui sont révélées positives à la coloration de Gram et test catalase négative.

### I.2.2 Dénombrement

		Dilution					
		Souche	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Echantillon 1	S1	Une nappe	Une nappe	Une nappe	225	69	22
	S2	Une nappe	Une nappe	Une nappe	259	75	13
	S3	Une nappe	Une nappe	Une nappe	193	10	02
	S4	Une nappe	Une nappe	Une nappe	275	33	09
	S5	Une nappe	Une nappe	Une nappe	256	38	19
	S6	Une nappe	Une nappe	Une nappe	200	24	07
	S7	Une nappe	Une nappe	Une nappe	89	56	25
	S8	Une nappe	Une nappe	Une nappe	244	57	32
Echantillon 2	S9	Une nappe	Une nappe	Une nappe	157	69	12
	S10	Une nappe	Une nappe	Une nappe	213	75	27
	S11	Une nappe	Une nappe	Une nappe	100	56	22
	S12	Une nappe	Une nappe	Une nappe	221	73	19
	S13	Une nappe	Une nappe	Une nappe	205	38	25
	S14	Une nappe	Une nappe	Une nappe	116	42	27
	S15	Une nappe	Une nappe	Une nappe	182	51	15
	S16	Une nappe	Une nappe	Une nappe	224	97	32
	S17	Une nappe	Une nappe	Une nappe	97	52	21

Tableau N° 11 : Résultat de dénombrement des échantillons de lait de vache

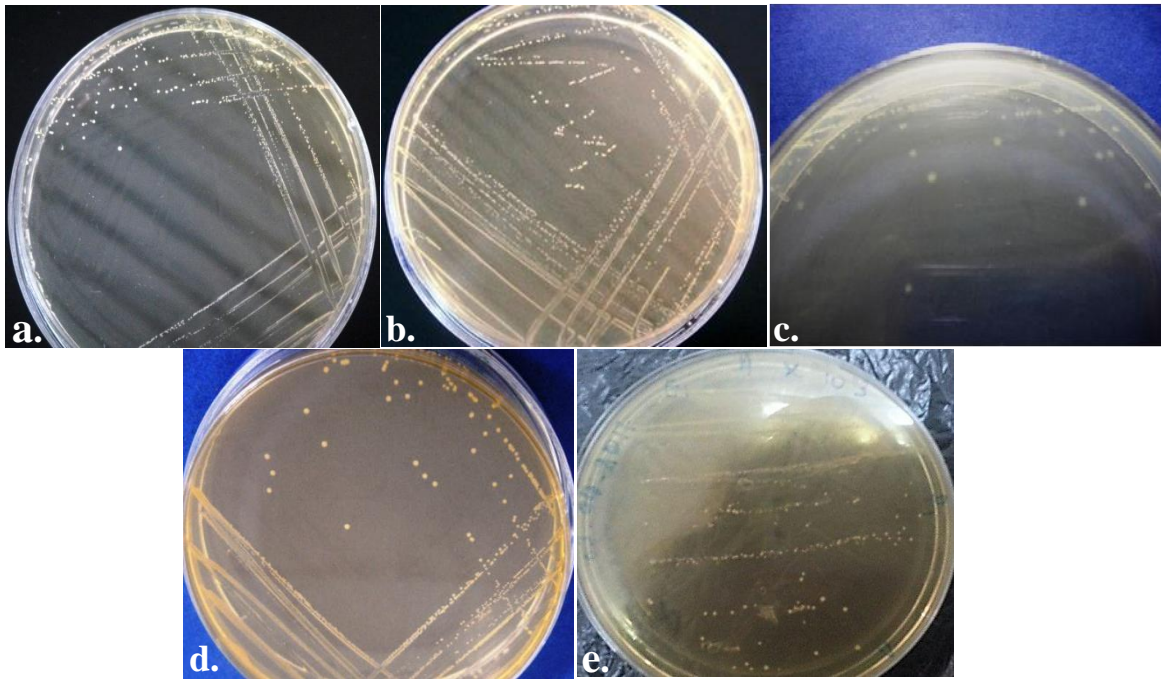
### I.2.3 Pré-identification des souches

#### I.2.3.1 L'examen macroscopique

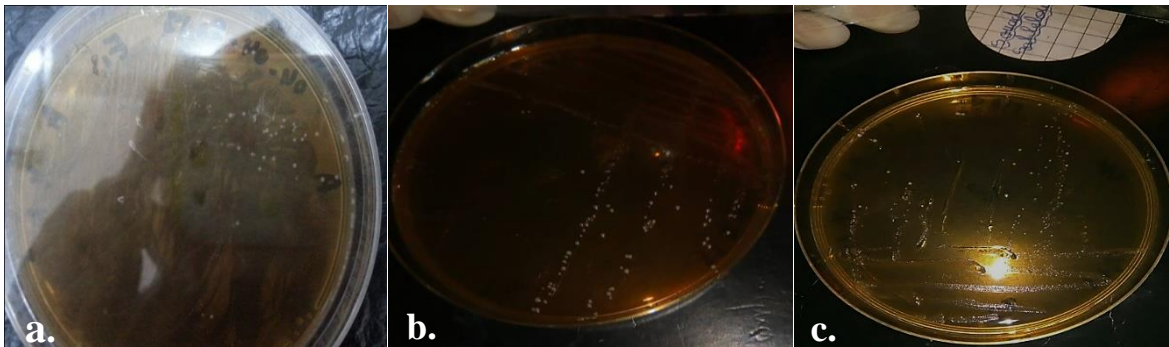
Les tests macroscopique et microscopique de la flore lactique nous ont permis d'isoler 17 souches sur milieu solide MRS ou M17, les 17 souches présentent des caractères séminaires aux bactéries lactiques (Gram +, catalase négative).

	Souche	La forme	La taille	La chromogène	L'élévation	Opacité	La surface
Echantillon 1	S1	Ovale	0,3	Jaune	Semi-bombé	Opaque	Lisse
	S2	Ronde	2,7	Jaune	Plat	Opaque	Lisse
	S3	Ovale	0,4	Blanc	Lenticulaire	Opaque	Lisse
	S4	Irrégulier	1,2	Blanc	Plat	Transparent	Lisse
	S5	Ovale	0,3	Blanc	Bombé	Opaque	Lisse
	S6	Ovale	0,3	Blanc	Semi- bombé	Opaque	Lisse
	S7	Ronde	0,2	Blanc	Plat	Opaque	Lisse
	S8	Ovale	0,3	Jaune	Semi- bombé	Opaque	Lisse
Echantillon 2	S9	Ovale	0,3	Jaune	Semi- bombé	Opaque	Lisse
	S10	Irrégulier	1,2	Blanc	Plat	Transparent	Lisse
	S11	Ovale	0,3	Blanc	Bombé	Opaque	Lisse
	S12	Ronde	0,2	Blanc	Plat	Opaque	Lisse
	S13	Ovale	0,3	Jaune	Semi- bombé	Opaque	Lisse
	S14	Ronde	0,2	Blanc	Plat	Opaque	Lisse
	S15	Irrégulier	1,2	Blanc	Plat	Transparent	Lisse
	S16	Ovale	0,3	Jaune	Semi- bombé	Opaque	Lisse
	S17	Ovale	0,3	Jaune	Semi- bombé	Opaque	Lisse

Tableau N° 12 : Aspect macroscopique de deux échantillons de lait de vache



**Figure 24** : Aspect macroscopique des souches de l'échantillon 1 aux milieu M17 après 24h d'incubation, (a) *Lactobacillus*, (b) *Streptococcus*, (c) *Pediococcus*, (d) *Enterococcus*, (e) *Lactococcus*



**Figure 25** : Aspect macroscopique des souches de l'échantillon 2 aux milieu M17 après 24h d'incubation, (a) *Lactobacillus*, (b) *Pediococcus*, (c) *Enterococcus*, milieu M17

### I.2.3.2 L'examen microscopique

L'aspect microscopique des souches après la coloration de Gram a révélée deux formes de cellules : Coques et Baciles dans l'échantillon, et les coques sont disposées en paires (diplocoques), en courtes chaînettes ou tétracoques.

	Souche	La forme des bactéries lactiques
Echantillon 1	S1	Coque
	S2	Coque
	S3	Coque
	S4	Coque
	S5	Coque
	S6	Coque
	S7	Coque
	S8	Bacille
Echantillon 2	S9	Coque
	S10	Coque
	S11	Coque
	S12	Coque
	S13	Coque
	S14	Coque
	S15	Coque
	S16	Coque
	S17	Coque

Tableau N° 13 : Aspect microscopique de deux échantillons de lait de vache

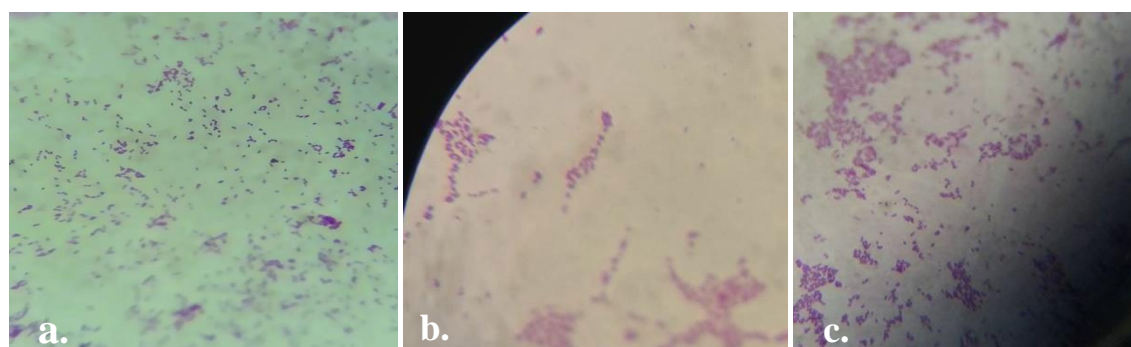
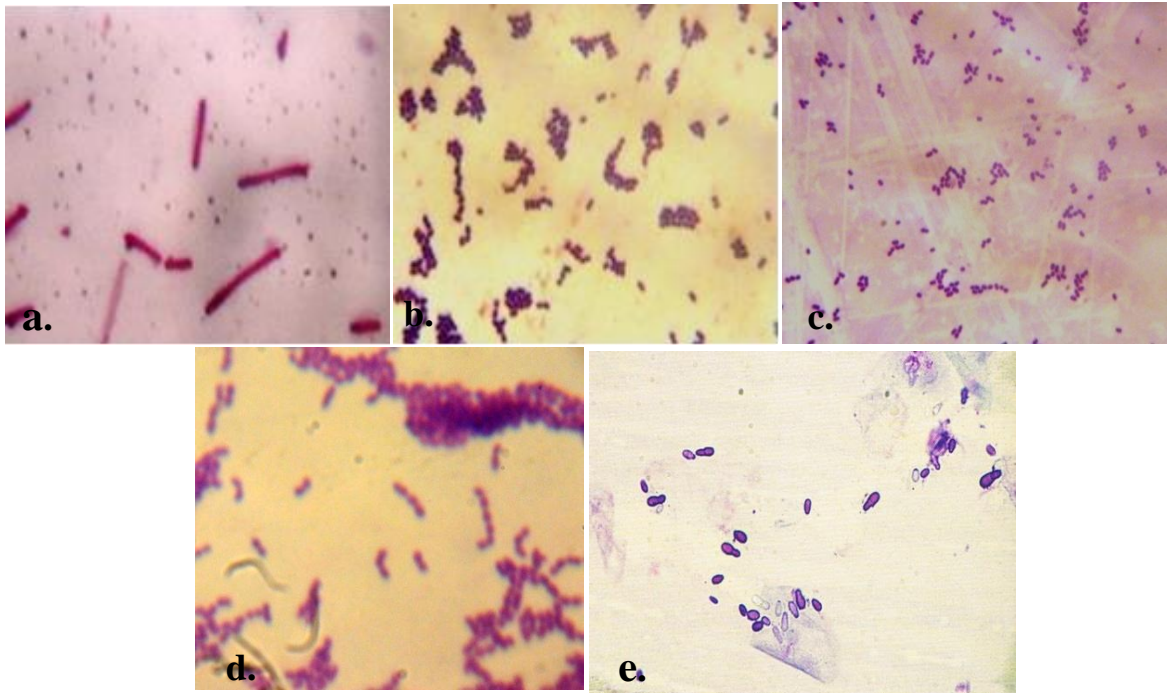


Figure 26 : Observation microscopique des souches de l'échantillon 2 après la coloration de Gram (G x100), (a) *Lactobacillus*, (b) *Pediococcus*, (c) *Enterococcus*



**Figure 27** : Observation microscopique des souches de l'échantillon 1 après la coloration de Gram (G x100), (a) *Lactobacillus*, (b) *Streptococcus*, (c) *Pediococcus*, (d) *Enterococcus*, (e) *Lactococcus*

### I.2.3.3 Test catalase

Conformément aux bactéries lactiques, toutes les espèces étudiées ne possèdent pas la catalase.

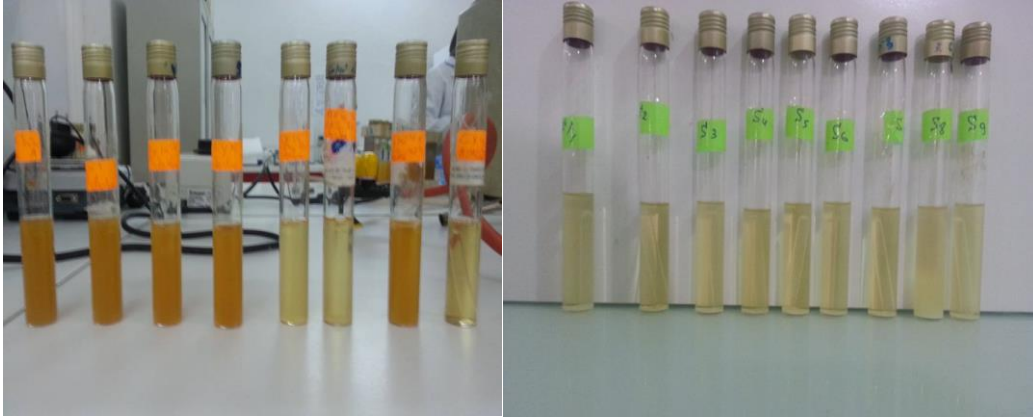
## I.2.4 Etude physiologique et biochimique

Les 17 souches isolées ont été sélectionnées pour l'identification, qui a été réalisée par des tests biochimiques et physiologiques classiques.

### I.2.4.1 Test de type fermentaire

Ce test nous a permis de différencier entre les souches homo-fermentaires et les souches hétéro-fermentaire en utilisant un milieu glucosé qui contient une cloche de Durham.

Chez tous les isolats, aucune production du gaz (CO<sub>2</sub>) à partir du glucose n'a été observée, ainsi elles sont considérées comme homo-fermentaires.



**Figure 28** : Résultats obtenus pour le type fermentaire des souches isolées à partir de deux échantillons de lait de vache

#### I.2.4.2 Tests Température, PH, Na cl, Thermorésistante

Les expériences effectuées ont montré que :

- La plupart des souches isolées est capable de se croître sur le bouillon MRS et M17 avec une concentration de Na cl 4% et 6,5 %. Seulement deux souches des bactéries lactiques parmi les 17 souches sont incapables de se multiplier : **S1** et **S8** à 6,5 %.



**Figure 29** : Résultats obtenus pour le type Na cl 4 % des souches examinés de l'échantillon 1

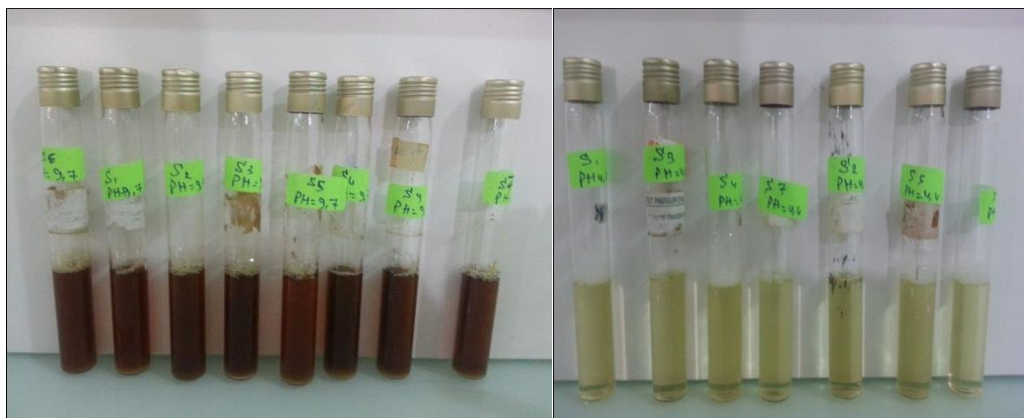


**Figure 30 :** Résultats obtenus pour le type Na cl 6 % des souches examinés de l'échantillon 2

- Une croissance de tous les souches sur le bouillon MRS et M17 à des Ph 4,4 et 9,6 été remarquée. Par contre, seules les souches : **S1, S8, S10, S14.**



**Figure 31 :** Résultats obtenus pour les déférentes PH des souches examinés de l'échantillon 1

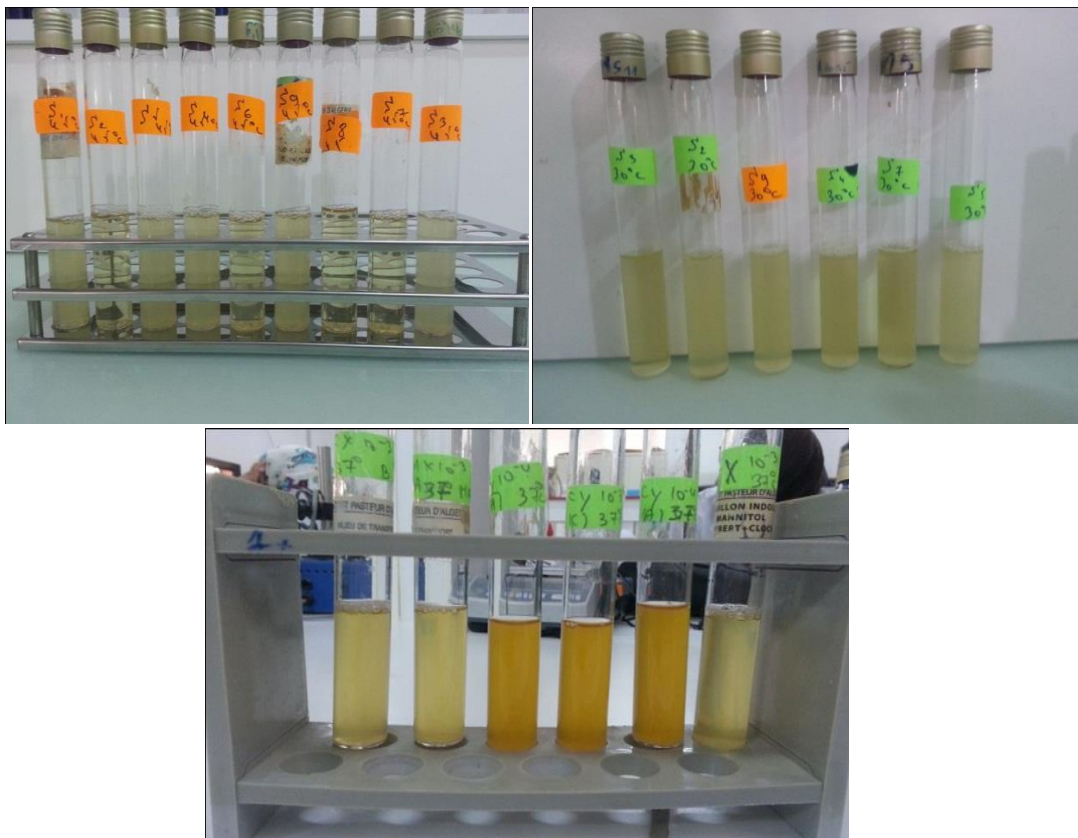


**Figure 32 :** Résultats obtenus pour les déférentes PH des souches examinés de l'échantillon 2

- La plupart des souches sont capables de se multiplier à la température 45 °C à l'exception des souches **S4, S5, S6, S14, S15, S16**. A 37 °C et 30°C nous signalons le développement de toutes les souches isolées.

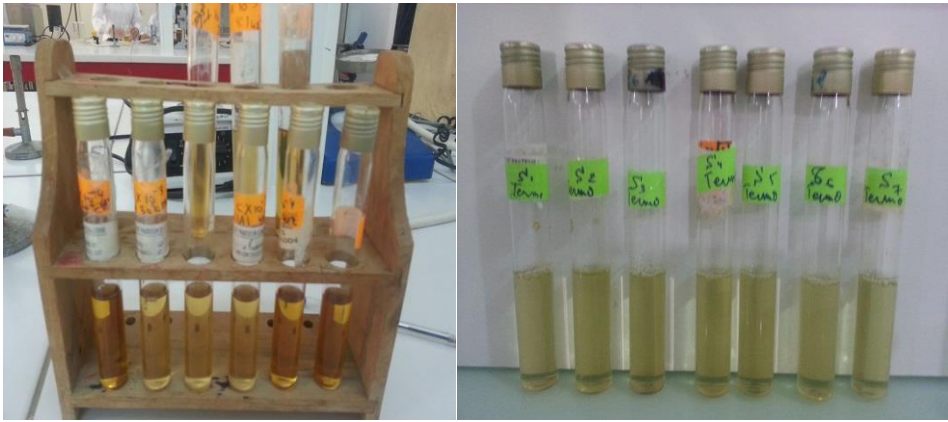


**Figure 33 :** Résultats obtenus pour les différentes températures des souches examinés de l'échantillon 1



**Figure 34 :** Résultats obtenus pour les différentes températures des souches examinés de l'échantillon 2

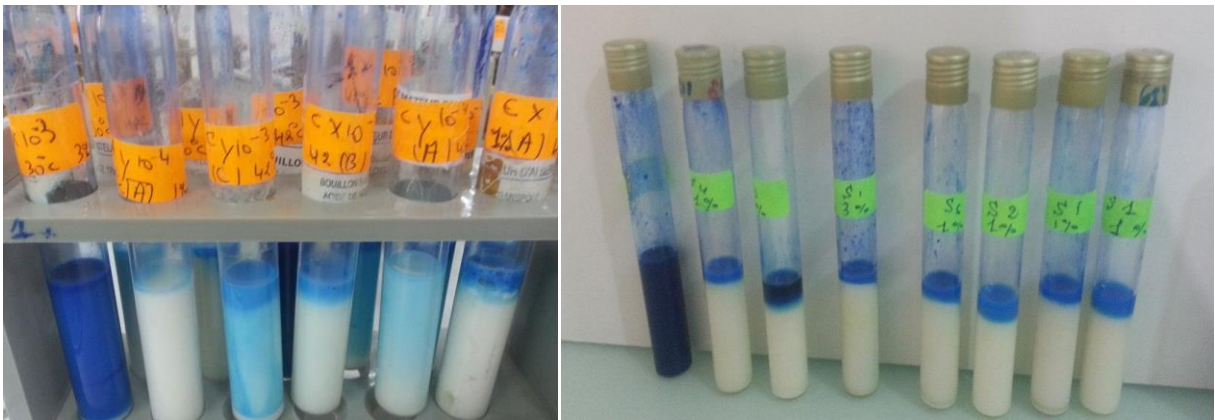
- Tous les souches ne sont pas thermorésistantes, où nous observons qu'il n'y a pas de croissance sur le bouillon MRS et M17 après le traitement thermique pendant 10 minutes à 100°C.



**Figure 35** : Résultats obtenus pour le test de thermorésistance des souches examinées

#### I.2.4.3 Test de bleu de méthylène

Toutes les souches résistent au bleu de méthylène en tant qu'une source d'oxygène, sauf les souches **S1, S3, S4, S5, S6, S8, S9, S10, S12, S13, S14, S15, S16**. Le test lait bleu de Sherman décrit la résistance au bleu de méthylène à 1% par un virage de couleur du lait bleu vert le blanc.



**Figure 36** : Résultats obtenus pour le test lait bleu de Sherman des souches examinées

Code		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Mobilité		-	-	-	-	-	-	-	-
Morphologie		Cocci	Cocci	Cocci	Cocci Tétrades	Cocci Tétrades	Cocci Tétrades	Cocci	Bacille
Catalase		-	-	-	-	-	-	-	-
Gram		+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase		-	-	-	-	-	-	-	-
Température	30°C	+	+	+	+	+	+	+	+
	37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
	45°C	+	+	+	-	-	-	+	+
Lait de Sherman 3 %		+	-	+	+	+	+	-	+
Co2 à partir GLU		-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentation du lait		+	-	+	+	+	+	+	+
Type de fermentation		Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo
PH	Ph 4,4	+	-	+	+	+	+	+	-
	Ph 9,7	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl	4,6 %	+	+	+	+	+	+	+	+
	6,5 %	+	+	+	+	+	+	+	+
Thermo- résistance		-	-	-	-	-	-	-	-
Pouvoir protéolytique		+	+	+	+	+	+	+	-
Pouvoir lipolytique		-	-	-	-	-	-	+	+

(Homo) : Homofermentaire ; (Glu) : Glucose ; (+) : Positive ; (-) : Négative

Tableau N° 14 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches lactiques isolés à partir de l'échantillon 1

Code		S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17
Mobilité		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Morphologie		Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Catalase		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Température	30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45°C	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Lait de Sherman 3 %		+	+	-	+	+	+	-	+	-
Co2 à partir GLU		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentation du lait		+	-	+	+	-	+	+	+	+
Type de fermentation		Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo
PH	Ph 4,4	+	-	+	+	+	-	+	-	+
	Ph 9,7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl	4,6 %	+	+	+	-	+	-	+	+	+
	6,5 %	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Thermo- résistance		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pouvoir protéolytique		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pouvoir lipolytique		-	+	-	-	+	+	+	-	-

(Homo) : Homofermentaire ; (Glu) : Glucose ; (+) : Positive ; (-) : Négative

Tableau N° 15 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches lactiques isolés à partir de l'échantillon 2

#### I.2.4.4 Test de fermentation des sucres

En présence de différentes sources hydrocarbonées, on observe que :

- Toutes les souches isolées n'utilisent pas le lactose
- La plupart des souches utilisent le saccharose sauf **S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17**.
- La plupart des souches n'utilisent pas xylose sauf **S2, S3, S4, S5, S6, S10**.
- La plupart des souches utilisent l'arabinose sauf **S2, S3, S8, S10, S16**.
- Les souches qui utilisent le glucose sont **S2, S3, S8, S16**.
- On observe aussi que les souches utilisent fructose sauf **S9, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17**.

Souche \ Sucre	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	+	+	+	+	+	-	-
Arabinose	+	-	-	+	+	+	+	-
Glucose	-	+	+	-	-	-	-	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+

**Tableau N° 16 :** Fermentation de quelques sucres par les souches lactiques isolées de l'échantillon 1

Souche \ Sucre	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Glucose	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Fructose	-	+	-	-	-	-	-	-	-

**Tableau N° 17 :** Fermentation de quelques sucres par les souches lactiques isolées de l'échantillon 2

### I.2.4.5 Etude de pouvoir protéolytique et lipolytique

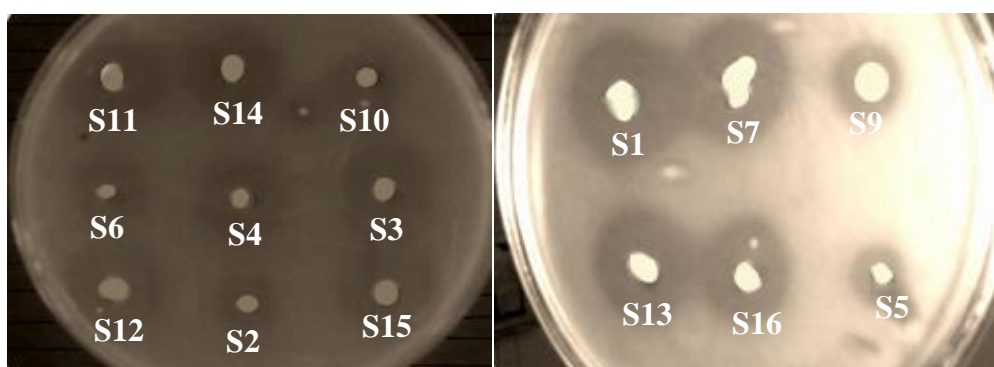
La dégradation des protéines et des lipides du lait par les souches lactiques isolées à partir du lait de vache a été étudiée sur des milieux gélosés. Les souches ont été cultivées en disquettes déposées sur la gélose et incubées pendant 24H.

La lecture des résultats de ces activités se traduisent par l'apparition des halos clairs autour des disques (**Tableaux 18 et 19**).

Souche	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
Diamètre (mm)	18	13	13	12.5	12.5	12.5	20	20	12.5	15	15	18	15	15	17
Evaluation de la protéolyse	++	+	+	+	+	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++

$d \leq 5\text{mm} = 0$  ;  $15\text{mm} \geq d \geq 10\text{mm} = (+)$  ;  $20\text{mm} \geq d \leq 15\text{mm} = (++)$  ;  $d \geq 20\text{mm} = (+++)$

**Tableau N° 18** : Activité protéolytique des souches lactiques isolées à partir du lait de vache



**Figure 37** : Halo clair due à une activité protéolytique

Souche	S7	S8	S10	S13	S14	S15
Diamètre (mm)	18	15	14	15	18	15
Evaluation de la protéolyse	++	++	+	++	++	++

$d \leq 5\text{mm} = 0$  ;  $15\text{mm} \geq d \geq 10\text{mm} = (+)$  ;  $20\text{mm} \geq d \leq 15\text{mm} = (++)$  ;  $d \geq 20\text{mm} = (+++)$

**Tableau N° 19** : Activité lipolytique des souches lactiques isolées à partir du lait de vache

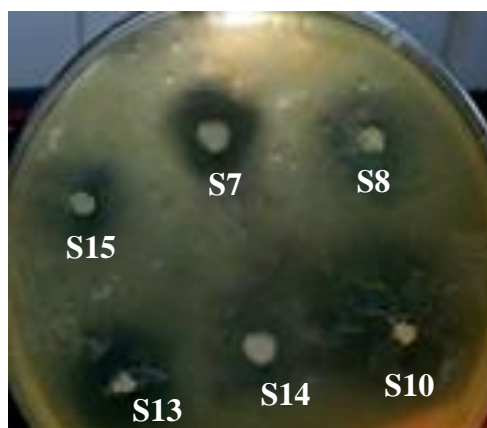


Figure 38 : Halo clair due à une activité lipolytique

	Code	Dénomination de la souche
Echantillon 1	S1	<i>Lactococcus lactis</i>
	S2	<i>Streptococcus fécaux</i>
	S3	<i>Streptococcus fécaux</i>
	S4	<i>Enterococcus sp</i>
	S5	<i>Enterococcus sp</i>
	S6	<i>Enterococcus sp</i>
	S7	<i>Lactococcus lactis</i>
	S8	<i>Lactobacillus lactis</i>
Echantillon 2	S9	<i>Lactococcus lactis</i>
	S10	<i>Enterococcus sp</i>
	S11	<i>Lactococcus lactis</i>
	S12	<i>Lactococcus lactis</i>
	S13	<i>Lactococcus lactis</i>
	S14	<i>Lactococcus lactis</i>
	S15	<i>Lactococcus lactis</i>
	S16	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	S17	<i>Lactococcus lactis</i>

Tableau N° 20 : Dénomination des souches lactique isolées, purifiées et identifiées

## II- Les analyses microbiologiques de l'ensilage

### II.1 Isolement et purification

À partir de deux échantillons de lait de vache, nous avons isolé 17 souches. C'est isolats, qui sont révélées positives à la coloration de Gram et test catalase négative.

### II.2 Dénombrement

Dilution / Souche	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
<b>S18</b>	Une nappe	Une nappe	Une nappe	123	87	25
<b>S19</b>	Une nappe	Une nappe	Une nappe	259	63	21
<b>S20</b>	Une nappe	Une nappe	Une nappe	177	98	38
<b>S21</b>	Une nappe	Une nappe	Une nappe	156	33	29
<b>S22</b>	Une nappe	Une nappe	Une nappe	258	103	12
<b>S23</b>	Une nappe	Une nappe	Une nappe	108	24	07
<b>S24</b>	Une nappe	Une nappe	Une nappe	79	38	15

**Tableau N° 21** : Résultat des analyses bactériologiques de l'ensilage

### II.3 Pré-identification des souches

#### II.3.1 L'examen macroscopique

D'après l'observation macroscopique des cultures sur milieu gélosé, on constate que :

Souche	La forme	La taille	La chromogène	L'élévation	Opacité	La surface
S18	Ovale	0,3	Jaune	Semi-bombé	Opaque	Lisse
S19	Ovale	0,4	Blanc	Lenticulaire	Opaque	Lisse
S20	Irrégulier	1,2	Blanc	Plat	Transparent	Lisse
S21	Ovale	0,3	Blanc	Bombé	Opaque	Lisse
S22	Ovale	0,4	Blanc	Lenticulaire	Opaque	Lisse
S23	Ovale	0,4	Blanc	Lenticulaire	Opaque	Lisse
S24	Ovale	0,3	Jaune	Semi-bombé	Opaque	Lisse

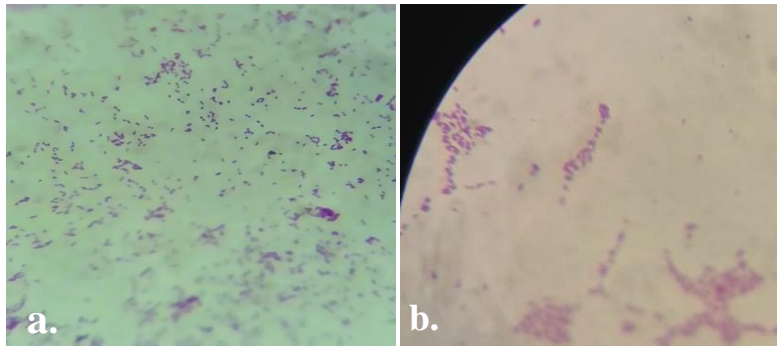
**Tableau N° 22** : Aspect macroscopique des souches de l'ensilage

### II.3.2 L'examen microscopique

La coloration de Gram a montré que toutes les souches ont retenues le violet de gentiane, qu'elles sont donc Gram positifs (**Figure 39**).

Souche	La forme des bactéries lactiques
S18	Cocci
S19	Cocci
S20	Cocci
S21	Cocci
S22	Cocci
S23	Cocci
S24	Cocci

**Tableau N° 23** : Aspect microscopique des souches de l'ensilage



**Figure 39** : Observation microscopique des souches de l'ensilage après la coloration de Gram (G x100), (a) *Lactococcus lactis*, (b) *Enterococcus sp*

### II.3.3 Test catalase

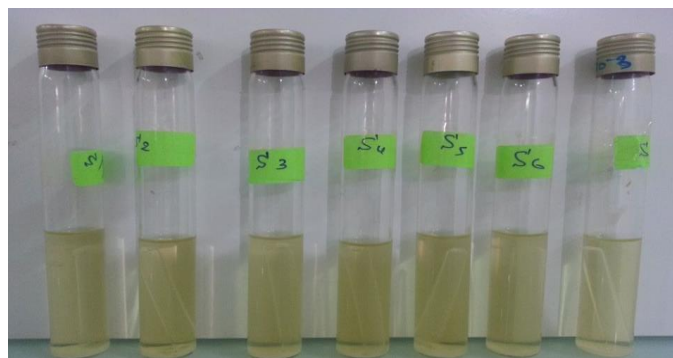
Conformément aux bactéries lactiques, toutes les espèces étudiées ne possèdent pas la catalase.

## II.4 Etude physiologique et biochimique

Les 7 souches isolées ont été sélectionnées pour l'identification, qui a été réalisée par des tests biochimiques et physiologiques classiques.

### II.4.1 Test de type fermentaire

Chez tous les isolats, aucune production de gaz ( $\text{CO}_2$ ) à partir du glucose n'a été observée, ainsi elles sont considérées comme homo-fermentaires.

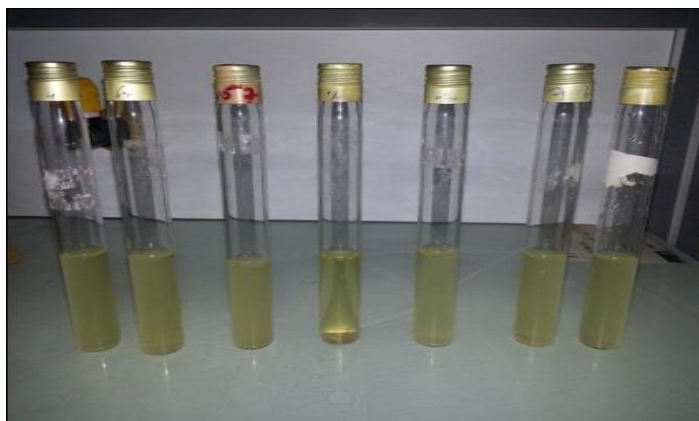


**Figure 40** : Résultats obtenus pour le type fermentaire des souches isolées à partir de l'ensilage

## II.4.2 Tests Température, PH, Na cl, Thermorésistante

Les expériences effectuées ont montré que :

- Toutes les souches isolées est capable de se croitre sur le bouillon MRS avec une concentration de Na cl 4% et 6,5 %. Seulement la souche **S18** de bactéries lactiques est incapable de se multiplier à 6,5 % parmi les 7 souches.



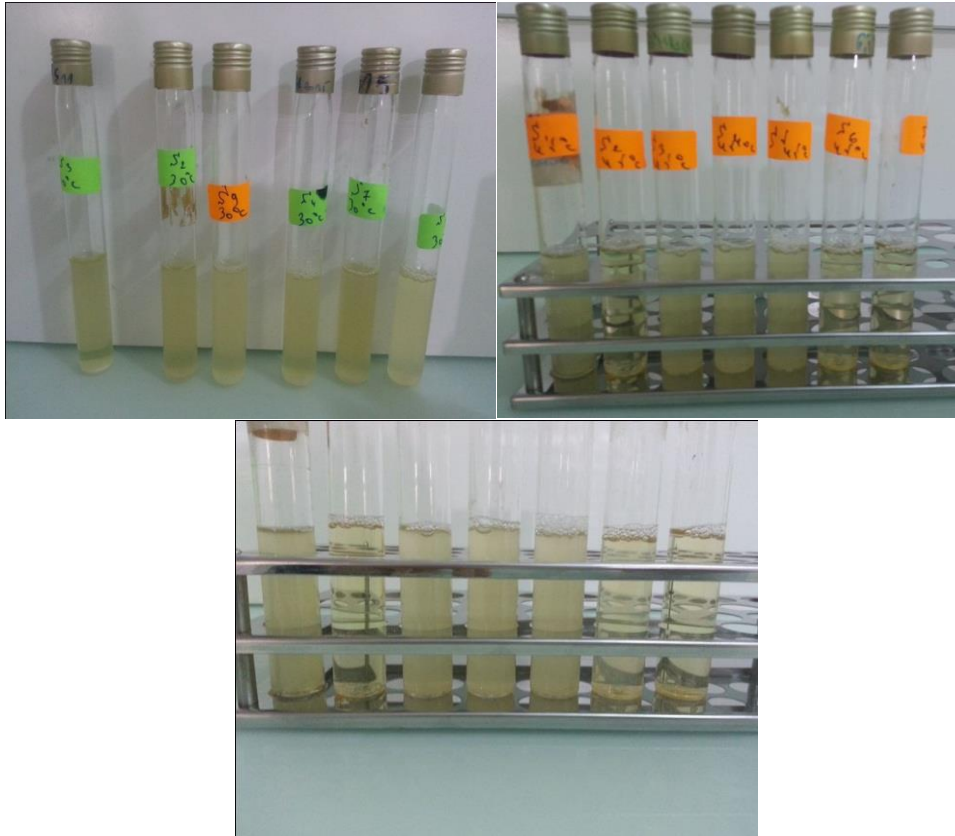
**Figure 41** : Résultats obtenus pour le type Na cl 4 % des souches examinés de l'ensilage

- Une croissance de toutes les souches sur le bouillon MRS à des Ph 4,4 et 9,6 été remarquée. Par contre, seules les souches : **S19**, et **S24** à ph 4,4.



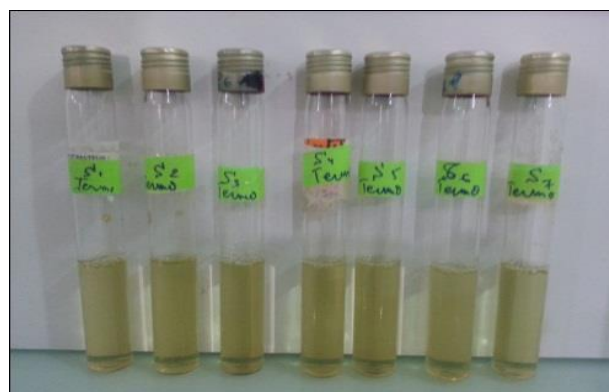
**Figure 42** : Résultats obtenus pour le type déférente PH des souches examinés de l'ensilage

- Toutes les souches sont capables de se multiplier à la température 45 °C, A 37 °C et 30°C nous signalons le développement de toutes les souches isolées.



**Figure 43 :** Résultats obtenus pour des souches examinés de l'ensilage à différente température

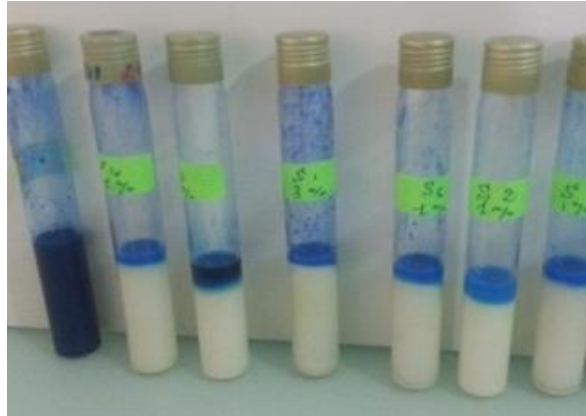
- Tous les souches ne sont pas thermorésistantes, où nous observons qu'il n'y a pas de croissance sur le bouillon MRS et M17 après le traitement thermique pendant 10 minutes à 100°C.



**Figure 44 :** Résultats obtenus pour le type déférente thermorésistantes des souches examinées

### II.4.3 Test de bleu de méthylène

Toutes les souches résistent au bleu de méthylène en tant qu'une source d'oxygène, sauf la souche **S21** dont le test lait bleu de Sherman décrit la résistance au bleu de méthylène à 3% par un virage de couleur du lait bleu vert le blanc.



**Figure 45** : Résultats obtenus pour le test lait bleu de Sherman des souches examinées.

Code		S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24
Mobilité		-	-	-	-	-	-	-
Morphologie		Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Catalase		-	-	-	-	-	-	-
Gram		+	+	+	+	+	+	+
Oxydase		-	-	-	-	-	-	-
Température	30°C	+	+	+	+	+	+	+
	37°C	+	+	+	+	+	+	+
	45°C	+	+	+	+	+	+	+
Lait de Sherman 3 %		-	-	-	+	-	-	-
Co2 à partir GLU		-	-	-	-	-	-	-
Fermentation du lait		+	+	+	+	+	+	+
Type de fermentation		Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo
PH	Ph 4,4	+	-	+	+	+	+	-
	Ph 9,7	+	+	+	+	+	+	+
NaCl	4,6 %	+	+	+	-	+	+	+
	6,5 %	-	+	+	+	+	+	+
Thermo- résistance		-	-	-	-	-	-	-
Pouvoir protéolytique		+	+	+	+	+	+	+
Pouvoir lipolytique		-	-	-	+	-	-	-

(Homo) : Homofermentaire ; (Glu) : Glucose ; (+) : Positive ; (-) : Négative

**Tableau N° 24** : Caractéristique physiologique et biochimiques des souches lactiques isolés à partir d'échantillon 1

#### II.4.4 Test de fermentation des sucres

En présence de différentes sources hydrocarbonées, on observe que :

- Toutes les souches isolées n'utilisent pas le lactose.
- Toutes les souches isolées n'utilisent pas le lactose.
- Toutes les souches isolées n'utilisent pas le lactose.
- La plupart des souches utilisent l'arabinose.
- Toutes les souches isolées n'utilisent pas le le glucose.
- On observe aussi que la plupart des souches n'utilisent pas le fructose sauf **S19, S22, S23**.

Souche \ Sucre	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24
Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	-	+	-	-	+	+	-

**Tableau N° 25** : Fermentation de quelques sucres par les souches lactiques isolées de l'ensilage

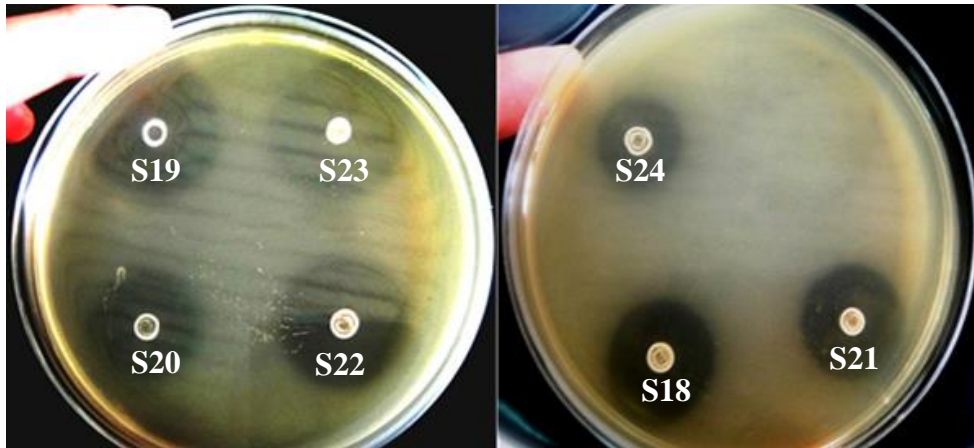
#### II.4.5 Etude de pouvoir protéolytique et lipolytique

La lecture des résultats de ces activités se traduisent par l'apparition des halos clairs autour des disques (**Tableaux 26 et 27**).

Souche	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24
Diamètre (mm)	20	15	15	18	15	15	20
Evaluation de la protéolyse	++	++	++	++	++	++	++

$d \leq 5\text{mm} = 0$  ;  $15\text{mm} \geq d \geq 10\text{mm} = (+)$  ;  $20\text{mm} \geq d \geq 15\text{mm} = (++)$  ;  $d \geq 20\text{mm} = (+++)$

**Tableau N° 26** : Activité protéolytique des souches lactiques isolées à partir de l'ensilage

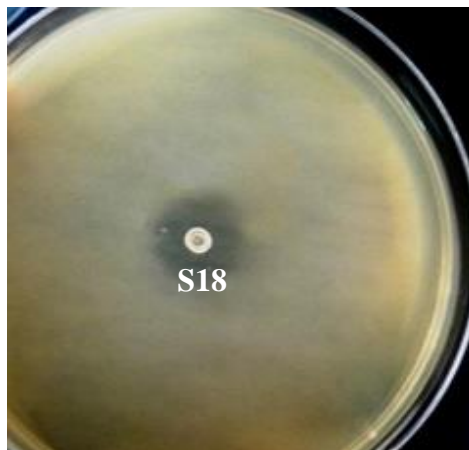


**Figure 46 :** Halo clair due à une activité protéolytique

<b>Souche</b>	<b>S18</b>
<b>Diamètre (mm)</b>	13
<b>Evaluation de la protéolyse</b>	++

$d \leq 5\text{mm} = 0$  ;  $15\text{mm} \geq d \geq 10\text{mm} = (+)$  ;  $20\text{mm} \geq d \leq 15\text{mm} = (++)$  ;  $d \geq 20\text{mm} = (+++)$

**Tableau N° 27 :** Activité lipolytique des souches lactiques isolées à partir de l'ensilage



**Figure 47 :** Halo clair due à une activité lipolytique

Code	Dénomination de la souche
S18	<i>Lactococcus lactis</i>
S19	<i>Enterococcus sp</i>
S20	<i>Enterococcus sp</i>
S21	<i>Enterococcus sp</i>
S22	<i>Enterococcus sp</i>
S23	<i>Enterococcus sp</i>
S24	<i>Lactococcus lactis</i>

Tableau N° 28 : Dénomination des souches lactique isolées, purifiées et identifiées.

### III- DISCUSSION

- Dix-sept souches de bactéries lactiques ont été isolées du lait cru de vache et sept souches de l'ensilage. Elles ont été cultivées et isolées sur milieu MRS, M17, Elliker et MSE. Du fait des exigences nutritionnelles des bactéries lactiques, les milieux de culture doivent être très riches en sucres, en matières azotées et surtout en facteurs de croissances (*Pilet M-F et al., 2005*).

- Les souches étudiées sont catalase négative car on n'a pas obtenu des bulles d'air après le dépôt de l'eau oxygénée sur la colonie cible, qui est conforme aux résultats trouvés par (*Carr et al., 2002*), ce qui nous oriente à déduire que les souches isolées sont des bactéries lactiques.

- L'étude des principaux caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques ont montré une diversité de genres et d'espèces isolées à partir du lait cru de vache. Les espèces de bactéries lactiques détectées dépendent essentiellement de la nature du lait cru et des conditions d'analyse (*Saidi et al., 2002*).

- Les résultats d'identification de cette étude montrent une présence majoritaire de coques avec 97% par rapport les basiles est ont été retrouvées à des faibles pourcentages 3%. Le même type de résultat est apporté par *Franciosi et al., (2009)* ; *Cheriguene A. (2008)* ; *Bekhouché F. Boulahrouf A. (2005)* et *Kacem M. et al., (2002)*.

- Aspects macroscopiques a montré que les *Lactocoques* développent sur le milieu M17 de petites colonies à contour régulier de couleur blanchâtres, lisses et légèrement bombées. Macroscopiquement sont des Gram positif, de forme cocci sphérique, associé en paire, groupées en chaînettes plus aux moins longues (*Teuber M. et Geis A., 2006*).

- *les Entérocoques*, macroscopiquement ces bactéries forment sur milieu M17 (*Terzagli et Sandine, 1975*) solide des colonies bombées, circulaire, surface lisse et de couleur blanche environ 0,5 à 1 mm de diamètre. L'aspect microscopique des souches après coloration de Gram a révélée des coques associées en deux ou courte chaîne (*Franz C.M.A.P. et Holzappel W. H., 2004*).

- D'après l'observation macroscopique faite sur la souche de *Lactobacillus* développée sur milieu MRS (*Man et al., 1960*), on remarque que les colonies sont colonie irrégulière, érodée, de couleur crème et de 1 à 3 mm de diamètre, et l'observation sous microscope après coloration de Gram, indique qu'il s'agit de bacilles apparents Gram positif (*Klein et al., 1998* ; *Axelsson, 2004* ; *Hammes et Hertel, 2006* ; *Tabasco et al., 2007*).

- L'identification phénotypique des souches conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

- Par ailleurs, nous distinguons par nos isolats, des souches typiques et d'autres sont atypiques car certains de leurs caractères ne correspondent pas à la donnée rapportée par Teuber *M. et Geis A., (2006)* ; Stiles *M.E. et Holzapfel W.H., (1997)*. Selon ces auteurs, les Lactocoques sont des bactéries homofermentaires, ne poussent pas à 45°C, et ne poussent en présence de 6,5% NaCl. Cependant au cours de cette étude, nous avons isolé des souches atypiques qui poussent à 45°C même résultat a été obtenu par Franciosi *et al., (2009)* et en présence de 6,5% NaCl. Des résultats similaires ont été rapportés par Kacem *M. et al., (2002)* ; Zadi Karam *H. et al., (2006)*.

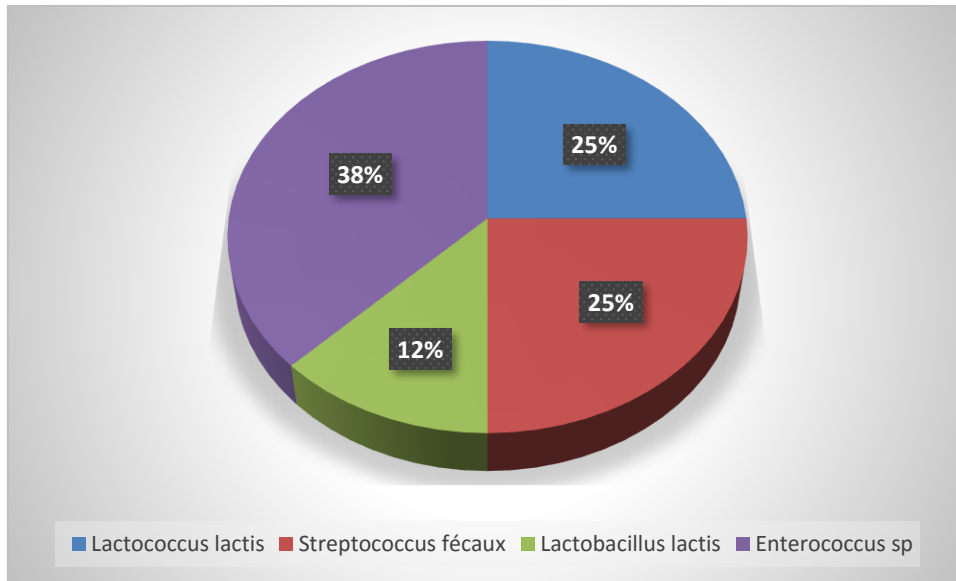
- Ces souches atypiques résistent aussi à 100°C pendant 10 min (*Bensalah, 2006*). *Lactocoques* atypiques présentent un double intérêt, vu leur croissance en milieu à haut salinité et leur taux de survie dans des conditions hostiles à haute température (*Bensalah, 2006*).

- La souche de *Lactobacillus* fermente le glucose sans production de gaz (CO<sub>2</sub>), donc cette souche est homofermentaire (*Hammes et Hertel, 2006*).

- La protéolyse a été étudiée sur milieu YMA riche en caséines du lait. L'évaluation de la protéolyse montre aussi que l'activité protéolytique chez *Enterococcus* est plus forte que chez *Pediococcus* soit des taux respectifs de l'ordre de 20, 20 et 10%. En revanche, les souches *Lactococcus lactis* et *Pediococcus acidilactici* sont dépourvues d'activité protéolytique. Cette absence peut être due à une perte de plasmide codant pour la synthèse de la protéase ou la peptidase (*Tidjani, 2006*).

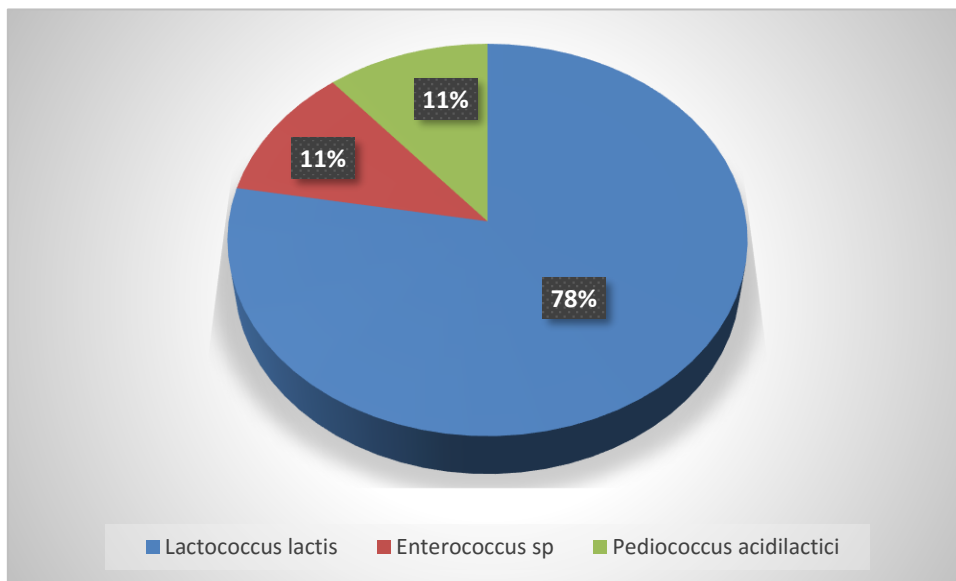
- L'activité lipolytique est considérable en milieu M17 supplémenté du substrat lipidique artificiel le Tween 20, c'est ainsi que *Lactococcus lactis* et *Enterococcus* et *Pediococcus acidilactici* ont manifesté une activité lipolytique importante en présence de 3% de Tween 20 parmi les souches lactiques isolées à partir du lait de vache. (Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par *Karam et al., 2012*). Par ailleurs, *Enterococcus* et *Pediococcus acidilactici* ont exprimé une activité lipolytique moyenne, alors que *Lactococcus*, *Enterococcus*, et *Pediococcus pentosaceus* sont dépourvues de lipolyse, cela peut être expliqué par une présence de mutants dans le gène codant l'enzyme lipase ou que cela fait partie des caractéristiques métaboliques de la bactérie (*El Soda et al., 1978*).

- La présence de divers genres de bactéries lactiques dans le lait de la vache était prévisible car des bactéries lactiques ont été trouvées dans la microflore de tous les laits étudiés.



**Figure 48 :** Répartitions des genres de l'échantillon 1

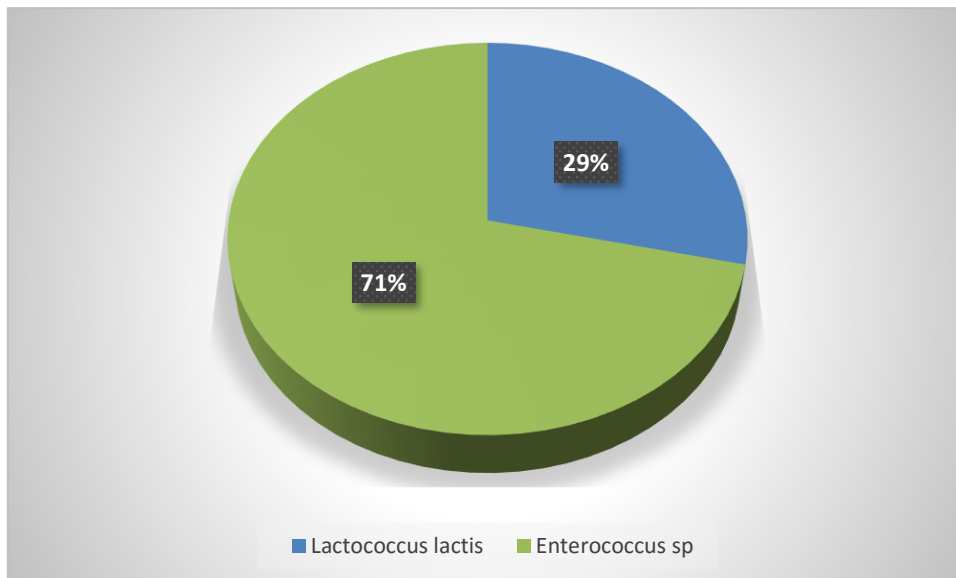
- La présence des lactocoques avec une conception d'élevage en stabulation libre met en évidence l'origine végétale de ce genre, les travaux de *Fallico et al* démontrent l'origine végétale de *Lactococcus*.



**Figure 49 :** Répartitions des genres de l'échantillon 2

- La pratique de la traite au niveau des étables a enrichi le lait par diverses espèces ; *entérocoques*, *lactocoques* et *pédiocoque* avec des proportions variables, ces résultats s'interfèrent avec ceux de *Bouton et al (2007)* qui confirme que le matériel et la traite dans les étables sont des réservoirs potentiels en bactéries lactiques.

- Nous remarquons la déférence entre les deux écosystèmes :
  - Echantillon 1 : présence de *Lactobacillus* et une répartition équitable entre les autres coques à Hadjadj.
  - Echantillon 2 : prédominance les *Lactococcus* à Hassi Mamache



**Figure 50** : Répartitions des genres de l'ensilage

- La prédominance de la flore lactique était pour les *entérocoques*, car la présence d'une litière humide ainsi que le mode d'élevage en stabulation entravé potentialisent la présence de genre de bactérie, ces résultats interfèrent avec ceux obtenus par *Bouton (2000)*.

# **CONCLUSION**

## Conclusion

Au terme de notre étude, nous sommes arrivés à la conclusion que les écosystèmes des deux élevages ne diffèrent que par les profils des bactéries lactiques : formes coques ou bacilles

Les coques sont prédominantes, mais les genres varient en faveur des *Lactococcus*, pour l'élevage à ensilage. Le peu de bacilles, 12% ne proviennent pas de l'alimentation.

Nous sommes convaincus que l'étude des écosystèmes microbiens laitiers doit décortiquer tous les éléments de l'environnement des élevages et comparer les modes de stabulation, de traite etc...

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

1. **Adda J., Gipon J. C. ET Vasse L. (1982).** The chemiser of favori and texture génération in chéfesse. Food Chemistry. Pp : 9, 115 \_ 129.
2. **Agabriel C., Coulons J.B., Brunshvicg G., Sabra C. et Nafada C. (1995).** Relations entre la qualité du lait livré et les caractéristiques des exploitations. INRA Prodi. Amina.,8 (4). Pp :251-258.
3. **AGUIRRE, M., and COLLINS, M. D., 1993.** Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol.*75 : 95-107.
4. **ALAIS C, 1984 :** Sciences du lait : Principes des techniques laitières- 4e éd- Paris SEPAIC 814p.
5. **. Axelsson, L. ,2004.** Classification and physiology. In: Salsinen, S., Wright, A.V., Ouwehand, (Eds). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (3ed edition)*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. vol. 633, 1 - 66.
6. **BA DIAO M., (2000) :** La qualité du lait et produits laitiers. Communication à l'atelier de restitution de L'étude sur la filière lait au Sénégal. GRET / ENDA- GRAF Dakar.
7. **Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». *Sci. Technol.*, 23 : 30-37.
8. **BOUIX M. et LEVEAU J. Y., (1988) :** Les microflores responsables des transfonnations ; In : techniques d'analyses et de contrôle dans les IAA : le contrôle microbiologique. Vol. III, Tec. Et doc. Paris.
9. **Bouton Y, Guyot P, Vacheyrou M, Normand AC, Piarroux R, Beuvier E. 2007.** Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de FrancheComté. Exemple des LHF. 15ème colloque du Club des Bactéries Lactiques, 13-15 novembre, Rennes.

- 10. CARR F.J., HILL D, MAIDA N 2002.**The lactic acid bacteria : A literature survey. *Crit.Rev.Microbiol.* **28**,281-370.
- 11. COLWELL, R. R., 1970.** Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol.***104**:410-433.
- 12. Cuq J.L. (2007).** Microbiologie Alimentaire. Edition Sciences et Techniques du Languedoc. Université de Montpellier. Pp : 20-25.
- 13. COGAN T.M., 1980.** Les levains lactiques mésophiles. Une revue. *Lait*, **60**, 397-425.
- 14. COGAN T.M., 1980.** Les levains lactiques mésophiles. Une revue. *Lait*, **60**, 397-425.
- 15. DE AMBROSINI, V. M., GONZALEZ, S., PERDIGON, G., DE RUIZ HOLGADO, A. P., AND OLIVER, G. ,1996.** Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chem Pharm Bull* **44**: 2263-2267.
- 16. COLWELL, R. R., 1970.** Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol.***104** :410-433.
- 17. Deforges J., Derens E., Rosset R .et Serrand M. (1999).** Maitrise de la chaine du froid des produits laitiers réfrigérés. Edition Cemagref Tec et Doc, Paris.
- 18. DELLAGLIO, F., DEROISSART, H., TORRIANI, S., CURK, M. C., JANSSENS, D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. DeRoissart, H. et Luquet, F. M., Lorica Uriage, France.
- 19. Derby G., 2006.** *Lait*, nutrition et santé. Ed : tec et doc Lavoisier paris.566p.
- 20. Devoyod, J.J. Françoise Poullain.,1988.** « *Les leuconostocs, Propriétés : leur rôle en technologie laitière* », *Le lait*, vol. 68, n<sup>o</sup> 3. 249-280.

- 21. DIENG M. (2001) :** Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés industrielle commercialisés sur le marché Dakarois Th. Méd. Vét., n°10, Dakar, Sénégal 111p.
- 22. DUWAT, P., SOURICE, S., CESSÉLIN, B., LAMBERET, G., VIDO, K., GAUDUP., LE LOIR Y., VIOLET F., LOUBIERE P. AND GRUSS A., 2001.** Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol.* **183**: 4509-4516.
- 23. DORTU C., THONART P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13** 143-154.
- 24. Francois, Z.N., Nour El houda, Florance, F.A., Paul M.F., Félicite T.M and EL soda M. (2007).** Biochemical properties of some thermophilic lactic acid bacteria strains from traditional fermented milk relevant to their technological performance as starters cultures. *Biotechnology.* **6**(1) :14-21.
- 25. Georgala, A., Tsakalidou, E., Kandarakis, I. and Kalantzopoulos, G. (1995).** Flavour production in ewe's milk and ewe's milk yoghurt, by single strains and combinations of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* isolated from Traditional Greek yoghurt, *Lait*, **75**: 271- 283.
- 26. GILAROVÁ, R., VOLDRICH, M., DEMNEROVÁ, K., CEROVSKÝ, M., AND GOLDBERG M., FESSENDEN J.M., RACKER E., 1966.** Phosphoketolase. *Method Enzymol.*, **9**, 515- 520.
- 27. Gripon JC., Desmazeaud Mj., Le Bars D. et Bergère JL. (1975).** Etude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. Influence de la présure commerciale. *Le Lait* **55**. Pp : 502-516.
- 28. Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. Paris. Pp : 136-139.
- 29. Guiraud, J.Y. et Galzy, P., 1980.** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edition de l'usine : p 39.
- 30. HARDIE, J. M., 1986.** Methods for the isolation and identification of anaerobes. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* **13** : 397-410.
- 31. HAMMES, W. P., AND HERTEL, C., 2006.** The genera *Lactobacillus*

and *Carnobacterium*. In : Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The prokaryotes, Vol. (4)*. Springer Science and Business Media. New York, USA. Pp 320-403.

32. **HOLZAPFEL W.H., 1997.** Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* **8**, 241-258.
33. **Institut de l'élevage. (2009).** Traite des vaches laitière. Matériel. Installation. Entretien. 1ere Edition France Agricole. Produire mieux. Pp : 55-506.
34. **Jakob E., Winkler H. et Haldemann J. (2009).** Critères Microbiologiques Pour La Fabrication Du Fromage. Edition, Agroscope Liebfeld-Posieux. Groupe de discussions.
35. **JENNESS R., SLOAN R.E., 1969 :** The composition of milk of various species ; à review. *Dairy Sci. Abst.*, 32, 599–612.
36. **KANDLER, O., AND WEISS, N. ,1986.** Genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, 212AL. In : Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (Eds).
37. **KANDLER, O., 1983.** Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*.**49**: 209-224.
38. **KÖNIG, H. ET FRÖHLICH, J. (2009).** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
39. **LARPENT J. P. ET LAIRPENT M.G., 1990.** Memento technique de microbiologie. Second Ed Technique et Documentaire Lavoisier. 417.
40. **Law, J., et Haandrikman, A., 1997.** Proteolytique enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J*.7: 1-11.
41. **LEVEAU J.Y. & BOUIX M. 'LA FLORE LACTIQUE'1980,** dans technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Bourgeois C M, Leveau J Y, A.p r i a. Paris. 3-106.
42. **LEE M. T., CHEN F.Y., and HUANG, H.W., 2004.**Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. *Biochemistry*. **43**,3590-3599.

- 43. MAHI Mohammed, 2010.** Etude Technologique Des Bactéries Lactiques isolées à Partir Du Lait De Brebis.Mémoire de Magister. Université d'Es-Senia Oran. Faculté des Sciences. Département de Biologie. 59p.
- 44. MÄKELÄ, P., SCHILLINGER, U., KORKEALA, H., AND HOLZAPFEL, W. H., 1992.** Classification of ropy slime-producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homology, and identification of *Lactobacillus sake* and *Leuconostoc amelibiosum* as dominant spoilage organisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*. **16** : 167-172.
- 45. Mayo B., Aleksandrak - piekarczyk T., Fernández M., Kowalczyk M., Alvarez- Martín P. et Bardowski J., 2010.** Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria : Novel Applications* Blackwell Publishing (3 - 34).
- 46. MCLEOD A., NYQUIST O. L., SNIPEN L., NATERSTAD, K., AND MEHAIA M. A., 1995.** The fat globule size distribution in camel, goat, ewe and cow milk. *Milchwissenschaft*, **50**, 260-263.
- 47. Michel V, Hauwuy A, Chamba JF. 2001.** La flore microbienne de laits de vache : diversité et influence des conditions de production. *Lait* **81**, 575-592.
- 48. MOHAMADOU DIENG ; (2001) ;** contribution à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés industriels commercialisés sur le marché dakarais, Université CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR, école inter-état des sciences et médecine vétérinaires de DAKAR p 43 44.
- 49. MONSALLIER.G.- 1994.** Maîtrise de la teneur en germes mésophiles du lait à la production. *Rec. Méd. Vét. Alfort*, **170** (6/7), 401-418.
- 50. Monnet, V., Chapot Chartier, M. et Gripon, J.C., (1993).** Les peptidases des lactocoques. Elsevier INRA LAIT **73**.: 97-108.
- 51. Normand AC, Waser M, Reboux G, Ruffaldi P, von Mutius E, Piarroux R and the PASTURE study group. 2009.** High levels of grass pollen inside European dairy farms : a role for the allergy-protective effects of environment ? *Allergy* **64**, 1068-73.
- 52. Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P., 2003.**

Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of thie technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 65,859\_867.

53. **POT, B. ,2008. The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu, G., and Luquet, F.M. (Eds). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments.* Lavoisier. Paris, France pp 1-152.**
54. **PRINGSULAKA, O., THONGAM, N., SUWANNASAI, N., ATTHAKOR, W., POTHIVEJKUL, K., RANGSIRUJI, A. (2011). Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented Meat and fish products. *Food Control*, 23 : 547-551.**
55. **PRODRIGUES, U. M., AGUIRRE, M., FACKLAM, R. R., AND COLLINS, M. D., 1991. Specific and intraspecific molecular typing of lactococci based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *J Appl Bacteriol.*71: 509-516.**
56. **QUIBERONI, A., REZAIKI, L., EL KAROUI, M., BISWAS, I., TAILLIEZ, P., and GRUSS, A., 2001. Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. *Res Microbiol.*152 : 131-139.**
57. **Ramet J.P. (1985). La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen. Collection FAO Alimentation et nutrition n°48.**
58. **Reboux G, Reiman M, Roussel S, Taattola K, Millon L, Dalphin JC, Piarroux R. 2006. Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish and French farms. *Ann. Agric. Environ. Med.* 13, 267-273. Sudre B, Vacheyrou M, Braun-Fahrländer C.**
59. **Robinson R.K. (2002). Dairy microbiologie handbook. The microbiology of milk and milk products. Third edition. Edition John Wiley and sons, INC. NEW York. Pp : 780.**
60. **RODRIGUES, U. M., AGUIRRE, M., FACKLAM, R. R., AND COLLINS, M. D., 1991. Specific and intraspecific molecular typing of lactococci based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *J Appl Bacteriol.*71: 509-516.**

- 61. Roudaut H. et Lefrancq E. (2005).** Alimentation théorique. Edition Sciences des Aliments.
- 62. SALMINEN, S., WRIGHT, A. V., OUWEHAND, A. (2004).** Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.
- 63. SANDINE W.E., ELLIKER P.R., HAYS H., 1962.** Cultural studies on *Streptococcus diacetylactis* and other members of the lactic streptococcus group. *Cano J. Microbiol.*, **8**: 161-174.
- 64. Shirai. K, Guerrero. I, Huerta. S, Saucedo. G, Castillo. A, O Gonzalez. R, George M. (2001)** Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation Hall Enzyme and Microbial Technology 446\_452.
- 65. Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kampfer, P., Maiden, MC., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C et Whitman, W.B., 2002.** Report of the Ad Hoc Committee for the re- Evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1043- 1047.
- 66. TCHAMBA C. (2007).** Caractérisation de la flore lactique des laits fermentés artisanaux au Sénégal : cas de la zone Niayes. Université Cheikh Anta Diop de Dakar, 70, 56.
- 67. Varnam A.H. et Sutherland P. (2001).** Milk and Milk Products : Technology, Chemistry, and Microbiology. Volume 1 Food products series. An Aspen Publication. New York. Pp : 35-37.
- 68. VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K., AND SWINGS J., 1996.** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.***60** : 407-438.
- 69. Vignola C. (2002).** Science et Technologie du Lait Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada. pp. 3-75.
- 70. Vignola C. L, 2002.** Science et technologie du lait. Ed : Ecole polytechnique Montréal. 600p (28-30).

- 71. WISEMAN D. W. ET APPLEBAUM T. (1983) :** Distribution and resistance to pasteurisation of aflatoxin M<sub>1</sub>. In naturally contaminated, completely milk, cream and skin milk. *Journal of food science*. 46, 530-532.
- 72. WOESE, C. R., KANDLER, O., AND WHEELIS, M. L., 1990.** Towards a natural system of organisms : proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl AcadSci U S A*.87: 4576-4579.
- 73. Zhennai, Y., 2000.** Antimicrobial compounds and Extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Academic Dissertation. Department of food.

# **ANNEXES**

## **Annexe n° 1 : L'hygiène de traite présentée par le Dr KEBIR Nasr-Eddine (2001)**

(Source : <https://www.youtube.com/watch?v=AmEOgOE2bM>)

### **1- Le trayeur doit :**

- Déposer d'une tenue propre
- Avoir les mains et les avant-bras bien propres
- Avoir les ongles courts et propres
- N'est pas atteint de maladies contagieuses, ce qui l'exclut de la traite
- Ne souffrant pas vomissement
- Ne souffrant pas de diarrhée

### **2- Les commandements de la traite : l'hygiène de la traite obéit à des lois bien précises que soit avant, pendant ou après la traite :**

- **Avant la traite :**
  - **Programmer l'ordre de traite**
  - Contrôler l'état sanitaire de la mamelle
  - L'a mouillage
  - Nettoyage des trayons et l'extrémité des trayons par des solutions antiseptique approuvées
- **Pendant la traite :**
  - Contrôler l'installation de la traite
  - Poser le faisceau trayeur au bon moment
  - Eviter la soustraite
  - Optimiser la fin de traite
- **Après la traite :**
  - Désinfecter les trayons après la traite par trempage
  - Nettoyer les équipements de traite immédiatement après la traite
  - Refroidir le lait selon des procédures appropriées
  - Contrôler régulièrement la qualité du lait et les équipements de traite.

## Annexes n° 2 : Composition des milieux de culture

Le milieu MRS Gélose	
Constituants	Quantité en g/l
Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 ml
Phosphate dipotassique K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate teiamonique	2 g
Sulfate manganèse	0,05 g
Sulfate magnésium	0,2 g
Agar	18 g
Eau distillée	1 l

**Dissoudre 67,3 dans un litre d'eau distillée ; autoclave 20 min a 120 ° ; ph = 6,5**

Le milieu M17 Gélose	
Constituants	Quantité en g/l
Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Acide ascorbique	0,5
Lactose	5 g
Glycérophosphate de sodium	19 g
MgSO <sub>4</sub>	0,025 g
Agar	18 g
Eau distillée	1 l

**Dissoudre 57,3 dans un litre d'eau distillée ; autoclave 20 min a 120° ; ph = 7,2**

<b>Le milieu MRS bouillon</b>	
<b>Constituants</b>	<b>Quantité en g/l</b>
Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 ml
Phosphate dipotassique K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate teiamonique	2 g
Sulfate manganèse	0,05 g
Sulfate magnésium	0,2 g
Eau distillé	1 l

**Dissoudre 67,3 dans un litre d'eau distillée ; autoclave 20 min a 120 ° ; ph = 6,5**

<b>Le milieu M17 bouillon</b>	
<b>Constituants</b>	<b>Quantité en g/l</b>
Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Acide ascorbique	0,5
Lactose	5 g
Glycérophosphate de sodium	19 g
MgSO <sub>4</sub>	0,025 g
Eau distillée	1 l

**Dissoudre 57,3 dans un litre d'eau distillée ; autoclave 20 min a 120° ; ph = 7,2**

<b>Le milieu PCA (Gélose activité prothiolitique)</b>	
<b>Constituants</b>	<b>Quantité en g/l</b>
Tryptone	5 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose	1,05 g
Lait écrémé	10 g
Agar	12 g
Eau distillée	1 l

**Dissoudre 30,55 dans un litre d'eau distillée ; autoclave 20 min a 120° ; ph = 7**

<b>Le milieu MRS (Gélose activité lypolitique)</b>	
<b>Constituants</b>	<b>Quantité en g/l</b>
Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 ml + 3 ml
Phosphate dipotassique K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate teiamonique	2 g
Sulfate manganèse	0,05 g
Sulfate magnésium	0,2 g
Agar	18 g
Eau distillé	1 l

**Dissoudre 67,3 dans un litre d'eau distillée ; autoclave 20 min a 120 ° ; ph = 6,5**

<b>Le milieu 17 (Gélose activité lypolitique)</b>	
<b>Constituants</b>	<b>Quantité en g/l</b>
Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Acide ascorbique	0,5
Lactose	5 g
Glycérophosphate de sodium	0,025 g
MgSO <sub>4</sub>	18 g
Agar	3 ml
Tween 80	1 l
Eau distillée	

**Dissoudre 67,3 dans un litre d'eau distillée ; autoclave 20 min a 120 ° ; ph = 6,5**

<b>Lait bleu de Sherman</b>	
<b>Constituants</b>	<b>Quantité en g/l</b>
Lait écrémé stérile en tube	9ml
Bleu de méthylène (1%)	1ml

**Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.**

<b>Milieu hyper salé</b>	
<b>Constituants</b>	<b>Quantité en g/l</b>
Extrait de viande	5g
Glucose	5g
Peptone	15 g
Na Cl	45//65 g
Eau distillée	1L
<b>Dissoudre 70/95 dans un litre d'eau distillée ; autoclave 20 min a 120 ° ; ph = 7,2</b>	

<b>Milieu M17 à 3% Tween 20</b>	
<b>Constituants</b>	<b>Quantité en g/l</b>
Milieu M17 déshydraté	57.2g
Tween 20 (3%)	1.71g
Eau distillée	1 l
<b>Dissoudre 59 dans un litre d'eau distillée ; autoclave 20 min a 120 ° ; ph = 7</b>	

<b>Eau Physiologique</b>	
<b>Constituants</b>	<b>Quantité en g/l</b>
Chlorure de sodium	8,5 g
Peptone	0,5 g
Eau distillée	1 l
<b>Dissoudre 09 dans un litre d'eau distillée ; autoclave 20 min a 120 ° ; ph = 7</b>	

**Annexe n° 3 : Les éléments de description des colonies**  
**(JOFFIN RT LEYRAL, 2006)**

Aspect	Description
<b>La taille</b>	Mesure a l'aide d'une règle gradué pour les grandes colonies
<b>La forme</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Allure de contours : lisse, dentelés, déchiquetés, irréguliers.</li> <li>• Relief : sur face bombé, demi bombée, plate.</li> <li>• Centre : parfois surélève, parfois ombiliquée (en creux)</li> </ul>
<b>L'aspect de la surface</b>	La surface d'une colonie bactérienne peut être lisse, rugueux, renvoyer, la lumière de façon à leur donner un reflet métallique ou un aspect irisé.
<b>L'opacité</b>	<p>Les colonies sont décrites comme :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Opaque : ne laissent pas passer la lumière</li> <li>• Translucides laissent passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers, comme le verre dépoli</li> <li>• Transparentes (laissent passer la lumière et voir les formes au travers, comme le verre, on ne parle de gouttes de rosée</li> </ul>
<b>La croissance</b>	Au moment du prélèvement il est possible d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses (on obtient facilement des suspensions homogènes), sèches ou encore muqueuses (on obtient difficilement des suspensions homogènes)
<b>La couleur et / ou pigment</b>	Plusieurs colonies n'ont pas une couleur bien définie (blanc, gris). Par contre, certaines bactéries produisent un pigment insoluble qui donnent un aspect bien caractéristique a la colonie (rose, jaune rouge ...), tandis que d'autres produisent un pigment soluble qui diffuse et colore le milieu

## Annexes n° 4 : Coloration de Gram

- 1- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélangé avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bac benzène
- 3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
- 5- 5- Couvrir de Lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 9- Couvrir avec de la fuchsine pendant 15 secondes
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement

Les cellules **Gram +** absorbent la couleur du Cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules **Gram -** qui apparaissent distinctement rosâtres.

## Annexe n° 5 :

Observation à l'état frais Sur une lame, mètre une goutte d'eau distillée stérile puis avec lance réaliser un frotti, pour voire la mobilité et la forme puis ont observé au microscope.