

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique**

**Université ABDELHAMID IBN BADIS Mostaganem**

**Faculté des sciences de la nature et de la vie**

**Département de Biologie**

**Mémoire de master**

**Option : Biotechnologie des Microorganismes**

**Thème :**

**Etude de la flore des laits fermentés consommés par la population algérienne.**

**Présenté par :**

- *YAGOUB Nadia*
- *LAOUMANI Amina*

*Devant la commission d'Examen :*

Président	<b>RACHED W.</b>	<b>MCA U. Mostaganem</b>
Encadreur	<b>DIB W.</b>	<b>MCB U. Mostaganem</b>
Examineur	<b>GRAR H.</b>	<b>MAA U. Mostaganem</b>

**Année universitaire 2015/2016**

## **REMERCIEMENT**

Nous remercions tout d'abord le bon Dieu de nous avoir donnée la capacité d'écrire et de réfléchir et la chance et le courage d'accomplir ce devoir envers la science afin de conclure ce modeste travail.

Nous tenons à remercier tout particulièrement, notre encadreur Melle **DIB Wafaa** pour son soutien et ses remarques constructives, sa disponibilité et surtout sa jovialité.

Nos sincères remerciements vont également à :

Melle **RACHED Wahiba**, pour l'honneur qu'il nous fait en présidant notre jury,

Melle **GRAR Hadria**, d'avoir accepté d'examiner notre travail,

Le chef de département **Mr Medjahed**,

Mr **Djillali**, le technicien du laboratoire de microbiologie pour nous avoir donné les moyens nécessaires pour réaliser ce travail.

## *Dédicace*

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail réalisé grâce à Dieu tout puissant;

*A mon père Mr. Mohamed*

Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon parcours, que Dieu te donne santé et longue vie.

*A ma mère M<sup>me</sup>. Oumria*

Affable, honorable, aimable : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner.

A Mes chers sœurs : *Sara* et son mari *Kadiro, Sabrina et Ahlem* ;

A mon fiancé *Djamel* ;

A mes grands parents ;

A mes chères copines *Souria* et *Fatima* qui j'ai passé des bons moments ;

A ma collègue *Loumani Amina*

A mes chers amis, collègues et frères pour leurs aides et soutiens ;

En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Et à toute la promotion master II 2015-2016 Option Biotechnologie Des Microorganismes.

***NADIA***

# *Dédicace*

*On dédie ce modeste travail à :  
Tous les musulmans du monde*

*A mes familles surtout mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour*

*A mes chers frères*

*Zakaria, Abed nouer, Hadjer et Assai*

*J'ai beaucoup apprécié l'estime et l'amour fraternel que vous me portez.*

*Que Dieu vous préserve.*

*Mes collègues de la promotion BIOTECHNOLOGIES DES MICROORGANISMES  
2015/2016 et surtout mon amie AICHA*

*Toute ma famille LOUMANI, BOUDJNAH et MANSOUR.*

*Tous mes amis et à Tous ceux qui ont connus, aimés appréciés,  
encouragés de près ou de loin pendant tous notre cursus.*

*AMINA*

## *Liste des figures*

<b>Figure 1:</b> Diagramme des principales étapes dans la fabrication du yaourt .....	07
<b>Figure 2 :</b> Technique d'isolement de la flore totale à partir des échantillons de yaourt .....	16
<b>Figure 3 :</b> résultat positif des levures et moisissures des échantillons E3 sur milieu OGA.....	22
<b>Figure 4 :</b> aspect de couleur grise des colonies de l'entérobactérie sur milieu EMB. ....	23
<b>Figure 5:</b> Dénombrement de <i>la flore mésophile aérobie</i> totale dans différentes marques de lait fermenté.....	24
<b>Figure 6:</b> Dénombrement des bactéries lactiques dans différentes marques de lait fermenté..	26
<b>Figure 7 :</b> Dénombrement des entérobactéries dans différentes marques de lait fermenté. ....	27
<b>Figure 8 :</b> Aspect des bactéries lactiques sur milieu MRS, lenticulaires de couleur blanche	28
<b>Figure 9 :</b> Aspect microaérophiles des bactéries lactique sur milieu MRS liquide après incubation à 37°C pendant 24 h. ....	29
<b>Figure 10:</b> Observations microscopiques des bactéries lactiques (G : 10x100).....	29
<b>Figure 11:</b> <b>a.</b> croissance à différentes températures (30°C, 45°C), <b>b.</b> La thermo résistance des isolats retenus.....	31
<b>Figure 12:</b> les tests du type fermentaire des différentes souches de <i>Lactobacillus sp</i> sur milieu MRS contenant une cloche de Durham, le témoin négatif milieu MRS stérile (tube 1).	32
<b>Figure 13 :</b> le test de l'arginine déshydrogénase (ADH) des isolats.....	33

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1:</b> la méthode de contrôle microbiologique de yaourt.....	18
<b>Tableau 2 :</b> Résultats du dénombrement des cinq échantillons .....	21
<b>Tableau 3:</b> Critères macroscopiques et microscopiques des bactéries isolées de laits fermentés .....	30
<b>Tableau 4:</b> Croissance à différentes températures et la thermo résistance des isolats retenus..	31
<b>Tableau 5:</b> Résultats du test de type fermentaire sur milieu MRS.....	32

## Liste d'abréviation :

°C : Degré Celsius.

**ADH** : [arginine dihydrolase](#).

**ATP** : Adénosine triphosphate.

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone.

**Cm** : Centimètre.

**EMB** : éosine de bleu méthylène.

**EDTA** : acide éthylène-diamine-tétra acétique.

**FAD** : Flavine adénine dinucléotide.

**FAO** : Food and Agriculture Organization.

**FTAM** : flore aérobie mésophile totale.

**GN** : Gélose nutritive.

**IgA** : immunoglobulines A.

**IgM** : immunoglobulines M.

**ISO** : Organisation Internationale de Normalisation.

**Lb** : Lactobacillus.

**L** : Litre.

**ml** : Millilitre.

**mm** : Millimètre.

**MRS** : Milieu de Man, Rogosa and Sharpe (1960).

**NAD** : Nicotinamide adénine dinucléotide.

**OGA** : Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar.

**pH** : potentiel d'oxygène.

**S. aureus** : Staphylococcus aureus.

**T** : température.

**UFC** : unité formant colonie.

**UV** : Ultraviolet.

**V** : volume.

## Résumé

En Algérie le yaourt est le produit laitier fermenté le plus souvent consommé (à cause de sa richesse en matières nutritionnelles, soit dans son état frais ou bien après séchage pour allonger sa durée de conservation).

Le but de notre travail est de contrôler la qualité microbiologique et hygiénique des ferments et caractériser les espèces présentes dans les échantillons, puis effectuer une identification microbiologique classique des isolats.

A partir de 25 échantillons, nous avons isolé et purifié des isolats. En effet, la qualité bactériologique du lait fermenté peut être évaluée par le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale. Dans cette dernière nous avons dénombré exhaustivement tous les germes qui peuvent être présents dans les échantillons des laits à analyser, à savoir la flore totale aérobie mésophile, les entérobactéries, *Staphylococcus aureus*, levures et moisissures et bactéries lactiques.

L'identification des souches a été établie par l'étude macroscopique et microscopique, la caractérisation physiologique et biochimique nous renseigne sur le type fermentaire et l'étude de la Croissance à 30°C, 45°C. Le pouvoir technologique des isolats a été mis en évidence sur des milieux spécifiques tels que la dégradation de l'arginine qui a été mise en évidence sur le milieu Möller.

### **Les résultats obtenus sont comme suit :**

-La valeur moyenne de la FMAT est  $3,96 \cdot 10^7$  UFC /ml. Par ailleurs, la charge moyenne des bactéries lactiques dans les échantillons analysés est de  $3,08 \cdot 10^7$  UFC/ml, l'absence de la flore photogène est les entérobactéries et *Staphylococcus*.

-Nous notons une dominance des bactéries lactiques dans tous les échantillons étudiés. Par ailleurs, nous avons noté une absence de germes indice de contamination fécale, et germes pathogènes comme le *Staphylococcus*.

En conclusion, les échantillons de yaourt étudiés sont de bonne qualité hygiénique et répondent aux normes microbiologiques fixées par la réglementation.

**Mots clé :** lait fermenté ; bactéries lactiques, bactérie pathogène.

## Summary

In Algeria yogurt is fermented dairy product most often consumed (because of that richness in nutritional substances, so in its fresh state or after drying to extend this shelf life.

This work has allowed us to study the hygienic and microbiological quality of five samples of yogurt consumed by the Algerian population at the microbiology laboratory (University Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem).

From 25 samples, we isolated and purified isolates. Indeed, the bacteriological quality of the fermented milk can be assessed by counting of the total aerobic mesophilic flora. In the latter we counted exhaustively any germs that may be present in samples of milk for analysis, namely the Enterobacteria, *Staphylococcus*, lactic acid bacteria, yeasts and molds.

Identification of strains was established by macroscopic and microscopic study, the physiological and biochemical characterization tells us the fermentation type and the study of growth at 30 ° C, 45 ° C. The technological power of the isolates was demonstrated on specific areas such as the degradation of arginin.

### **The results obtained are as follows:**

-The Average value of 3.96 FMAT is  $3,96 \cdot 10^7$  UFC /ml. In addition, the average load of lactic acid bacteria in the samples analyzed is  $3,08 \cdot 10^7$  UFC / ml, absence of the photogenic bacteria is Enterobacteria and *Staphylococcus*.

-We Note dominance of lactic acid bacteria in all samples studied. otherwise, we noted a germ index of fecal contamination and pathogens like *Staphylococcus*.

In conclusion, the studied samples of yogurt are good hygienic quality and meet the microbiological standards set by the regulations.

**Keywords:** fermented milk; lactic acid bacteria, pathogenic bacteria.

## الملخص

في الجزائر الزبادي ومنتجات الألبان المخمرة غالبا ما تستهلك (بسبب هذا الثراء في المواد الغذائية، وذلك في حالتها الطازجة أو بعد التجفيف لتمديد هذه الصلاحية).

قد سمح هذا العمل لنا لدراسة الجودة الصحية و علم الأحياء الدقيقة من خمس عينات من الحليب المخمر (Dannone, Activia, Soummam, Trefle, Dailna) . الذي يستهلكه سكان الجزائر في مختبر علم الأحياء المجهرية (جامعة عبد الحميد بن باديس بمستغانم).

من خلال 25 عينة قمنا بعزل و تنقية العزلة، يتم تقييم النوعية البكتريولوجية للحليب المخمر عن طريق عد *la flore mésophile aérobie totale* و قد أحصينا الحصر أي البكتيريا التي قد تكون موجودة في عينات من الحليب المحلل، و هي كالتالي:

les entérobactéries, *Staphylococcus aureus*, levure et moisissure et les bactéries lactique.

اعتمدنا في تحديد السلالات على الدراسة العيانية و المجهرية، والوصف الفسيولوجي والبيوكيميائي مثل نوع التخمر، ودراسة النمو عند 30 درجة مئوية، 45 درجة مئوية و 63 درجة مئوية. و قدرة البكتيريا على تفكيك الأرجينين في وسط غذائي خاص .

النتائج المتحصل عليها كمايلي :

القيمة المتوسطة لل FTAM هي  $3.96 \cdot 10^7$  UFC/ ml .بالإضافة الى ذلك فإن متوسط البكتيريا

حمض اللكتيك في العينات المدروسة هو  $3.08 \cdot 10^7$  UFC/ ml، والغياب التام للبكتيريا الممرضة

*Staphylococcus aureus*.

لاحظنا هيمنة بكتيريا حمض الاكتيك في جميع العينات المدروسة، و علاوة على ذلك غياب مؤشر الجرثومية من ثلوث برازي و مسببات الأمراض مثل المكورات العنقودية.

في الختام، العينات المدروسة من اللبن جيدة الجودة الصحية وتلبية المعايير الميكروبيولوجية التي تقرها اللائحة.

**الكلمات المفتاحية:** الحليب المخمر، بكتيريا حمض اللكتيك، بكتيريا الممرضة.

# Introduction

Le lait fermenté est un produit laitier qui a subi une fermentation lactique en assurant une sécurité alimentaire par acidification et production de bactériocines antagonisant la croissance des bactéries pathogènes. Cette fermentation améliore la qualité finale des produits laitiers par production de composés aromatiques (**Ouazzani et al., 2014**).

De nos jours, la fermentation lactique est une activité grandissante tant industrielle qu'artisanale. Plusieurs microorganismes participent à la fabrication de produits laitiers fermentés. Les bactéries lactiques homofermentaires composent majoritairement les ferments utilisés pour transformer le lactose en acide lactique. Elles sont également responsables, en partie, du goût et de la texture des produits laitiers fermentés (**Audrey, 2012**).

La microflore du lait cru, composée essentiellement de bactéries lactiques, participe de façon importante à l'élaboration des caractéristiques organoleptiques des produits laitiers fermentés (lait fermenté, fromage) (**Chammas et al., 2006 ; Patrignani et al., 2006**).

La propriété des bactéries lactiques à produire des composés antagonistes tels que les acides organiques (acide lactique et acide acétique), qui font baisser le pH du milieu, et par la synthèse de bactériocines qui renforce la conservation (**Bekhouche et Boulahrouf, 2005**) ainsi que la synthèse du peroxyde d'hydrogène qui est reconnue depuis très longtemps.

Par cette capacité, l'utilisation des bactéries lactiques permet de satisfaire les besoins de point de vue sanitaire en industrie alimentaire, permet d'inhiber la prolifération des microorganismes pathogènes et d'assurer une bonne conservation des aliments (**Ross et al., 2002**).

Dans ce travail nous nous sommes intéressées dans un premier temps par la sélection de cinq différentes marques de lait fermenté produit dans les industries laitières au niveau national, afin de contrôler la qualité microbiologique et hygiénique des ferments et caractériser les espèces présentes dans les échantillons. Dans un second temps, nous avons effectué une identification microbiologique classique des isolats.

# Rappel bibliographique

## I.1. Définition du lait :

Le lait est un liquide alimentaire, opaque blanc mat, légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre, à une odeur peu marquée et au goût douceâtre, sécrété, après parturition par la glande mammaire des animaux mammifères femelles, pour nourrir leur(s) nouveau né(s) (Mazyoyer, 2007).

Selon le Codex Alimentarius en 1999, le lait est produit à partir des sécrétions mammaires normales des animaux de traite obtenues 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. (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.

## I.2. Lait fermentés:

Divers types de produits laitiers fermentés existent à travers le monde (Tamime, 1997; Stanely, 1998). Leur nature dépend du type de lait utilisé, le prétraitement, les conditions de fermentation et le traitement ultérieur. La fermentation du lait implique principalement les bactéries lactiques (LAB), mais les *Micrococcus*, les corynéformes, les levures et les moisissures peuvent également jouer un rôle (Zamfir et al., 2006).

Historiquement, les produits laitiers fermentés ont été produits pour prolonger la durée de conservation du lait. Ces aliments traditionnels ont persisté au cours des siècles et ils ont souvent évolué d'un niveau artisanal et traditionnel à la fabrication à grande échelle industrielle avec production utilisant des cultures spécifiques (starter) et équipements modernes (Cogan, 1996; Oberman, 1998). L'utilisation de starters a amélioré la qualité technologique des produits laitiers, mais en même temps, a limité leur biodiversité ainsi que les caractéristiques organoleptiques et la variabilité du produit fini (Wouters, 2002).

Par conséquent, il existe une demande croissante en nouvelles souches pouvant avoir des caractéristiques recherchées au niveau du produit fini. Les produits laitiers traditionnels sont une source indéniable d'un tel genre de micro-organismes (Leroy, 2004). En effet, la

fermentation du lait par des micro-organismes particuliers induit des changements dans le goût, la texture, la couleur, la saveur, et les propriétés nutritives du lait. Elle fournit toute une gamme de produits finis (**Duboc et al., 2001**). C'est un moyen peu coûteux et une technologie qui préserve les aliments, améliore leurs valeurs nutritives et améliore leurs propriétés sensorielles. Elle peut également conduire à la désintoxication, la destruction d'éléments indésirables présents dans les aliments crus comme le cyanure, les tanins et les polyphénols (**Blandino et al., 2003**) ainsi à la dégradation du lactose.

De plus, les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé humaine. Ils sont en effet utilisés comme ferments lactiques pour remédier aux troubles gastro-intestinaux (**Rastall et al., 2005**).

### **I.2.1. Composition chimique :**

En France, la majorité des yaourts et des laits fermentés commercialisés est préparée à partir de lait enrichi en poudre de lait. De ce fait, ils sont plus riches en protéines, calcium et en lactose que le lait. Ces produits peuvent être plus ou moins sucrés. Leur teneur en saccharose varie alors de 7 à 12 %. La fermentation du lait va entraîner des modifications de sa composition, énumérées ci-dessous.

### **I.2.2. Les glucides:**

La principale modification est la baisse de la teneur en lactose de 20 à 30 %. En partant d'un lait enrichi de poudre de lait écrémé au taux de 2 %, la teneur du yaourt en lactose résiduel est de l'ordre de 4,5 g pour 100 g. La dégradation du lactose conduit à la formation de galactose, de glucose et d'acide lactique qui passe d'un niveau pratiquement nul à un niveau de 0,8 à 1 %, dont 50 à 100 % d'acide L+ lactique selon les ferments. Les quantités finales de galactose sont aux alentours de 1 à 1,5 %. Les concentrations en glucose et oligosaccharides sont très faibles (**Toba et al., 1983; Vidalval et al., 1984**). L'acide lactique se trouve sous les formes racémiques L+ et D- en proportions variables, selon les conditions de fabrication et de stockage (**Blanc, 1981**). Chez l'homme, ces deux formes sont naturellement retrouvées dans les urines. La forme D- est métabolisée plus lentement que la forme L+. Son excrétion urinaire est plus élevée (**Judge et Van, 1962**). On admet que l'adulte peut consommer les deux formes sans inconvénient (**FAO/OMS, 1974**). De faibles quantités d'autres oligosaccharides ont été détectées dans le lait et les laits fermentés.

### **I.2.3. Les protéines :**

Les bactéries lactiques produisent des enzymes qui hydrolysent partiellement les protéines du lait. Ainsi, (**Poznanski et al., 1965**) ont rapporté une dégradation de la caséine *in vitro* par une protéase et une peptidase provenant respectivement de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. De ce fait, un yaourt contient plus de peptides et d'acides aminés libres que le lait (**Rasic et al., 1971**). Il est admis que la préhydrolyse des caséines améliore la digestibilité des protéines du yaourt. En effet, leur valeur biologique est, *in vitro*, supérieure à celle des protéines du lait (**Breslaw et Kleyn, 1973**). En revanche, ce résultat n'a pas été confirmé *in vivo* chez le rat (**Alm, 1981**). En outre, il a été montré chez le porc (**Gaudichon et al., 1994**) et chez l'homme (**Mahé et al., 1994**) que la digestibilité des protéines de lait n'était pas différente, qu'il s'agisse d'un lait ou d'un yaourt. Le taux de préhydrolyse des caséines du yaourt est en fait minime. Il existe cependant une différence dans le processus de digestion des protéines de lait et de yaourt. Celle-ci réside au niveau gastrique, comme l'ont montré de récents travaux réalisés chez des sujets sains munis d'une sonde intestinale (**Mahé et al., 1994**). La vitesse de libération des protéines dans l'intestin est plus lente et plus régulière, comparée à la vitesse de vidange des protéines de lait. C'est donc la cinétique de la vidange gastrique qui est modifiée, ce qui se répercute logiquement sur la cinétique d'apport d'acides aminés dans le sang portal. Cette cinétique est plus progressive dans le cas d'un yaourt sans que la digestibilité globale soit affectée.

### **I.2.4. Les lipides :**

Il existe une hydrolyse très modérée des triglycérides qui n'a pas d'incidence nutritionnelle observable (**Alm, 1982 ; Boccignone et al., 1984**).

La poudre de lait ajoutée au lait lors de la fabrication des yaourts et autres laits fermentés augmente en effet la teneur en calcium par rapport au lait d'origine. Un pot de yaourt de 125 g apporte 180 à 200 mg de calcium. Les quantités de calcium recommandées pour l'adulte en France sont de l'ordre de 900 mg/j (**Dupin, 1992**).

### **I.2.5. Les vitamines :**

La composition des vitamines du yaourt dépend principalement de celle du lait utilisé. De plus, elle sera modulée au cours de la fermentation, dépendant aussi des souches

employées. La composition en vitamines liposolubles A et D varie en fonction de leur teneur dans le lait utilisé (entier ou partiellement écrémé).

## **II. Phénomène de fermentation:**

La fermentation est une réaction biochimique qui se produit dans des milieux dépourvus d'oxygène et qui transforme une substance organique sous l'effet d'enzymes, aussi appelées ferments. Ce terme désigne l'ensemble des transformations qui s'effectuent sous l'influence de microorganismes. Ces derniers contiennent des enzymes comme sortes de clés biologiques permettant à divers réactions chimiques de s'effectuer. La fermentation est due à l'action des levures et des bactéries sur des composés fermentescibles (**Audrey, 2012**).

### **II.1. Les fermentations lactiques:**

Selon, **Guy et al., (2007)**, la dégradation du lactose en acide lactique représente la fonctionnalité la plus importante des bactéries lactiques.

Elle se déroule en quatre étapes:

- L'entrée du lactose dans la cellule est réalisée grâce à l'activité d'une enzyme membranaire appelée lactose perméase.
- Le lactose est hydrolysé en glucose et galactose sous l'action d'une enzyme (bêta-galactosidase ou phospho-bêta-galactosidase). Le glucose rejoint alors la voie glycolytique pour former du pyruvate. Chez *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, le galactose est excrété hors de la cellule, le bilan énergétique de ces réactions est égal à deux molécules d'ATP par molécule de lactose. Le pyruvate est réduit en lactate par une réaction catalysée par l'enzyme lactate déshydrogénase. Cette réaction permet en outre de réoxyder le cofacteur NAD<sup>+</sup> précédemment réduit.
- Finalement, le lactate est expulsé hors de la cellule, en symport avec des protons. L'accumulation de ce lactate provoque une inhibition de la croissance bactérienne et de sa propre production, qui s'arrêtent de façon précoce, bien avant l'épuisement des substrats. Cette inhibition est liée, à la fois, à l'accumulation de l'acide lactique et à la diminution du pH du milieu intracellulaire qui en résulte (**Benkhalfoune, 2014**).

### **II.2. Différents types de laits fermentés:**

#### **II.2.1. Yaourts:**

Le yaourt ou yoghourt est un produit fermenté d'origine animale à base de lait. Sa fabrication fait intervenir des bactéries lactiques dont l'action conduit à la formation d'acide lactique à partir du lactose ou sucre du lait et d'arômes (**Righi, 2006**), et modifient la structure des protéines qui forment alors un gel.

L'origine du mot date de 1798 et vient du mot yogurt, de yogurmak (pétrir). La fabrication maison du yaourt est facile, économique et permet d'obtenir du yaourt exempt de sucre ajouté et contenant des vitamines A et B (**Righi, 2006**).

- Une température de préparation de (42 à 44°C) favorise le développement du streptocoque et donc la production d'arômes.

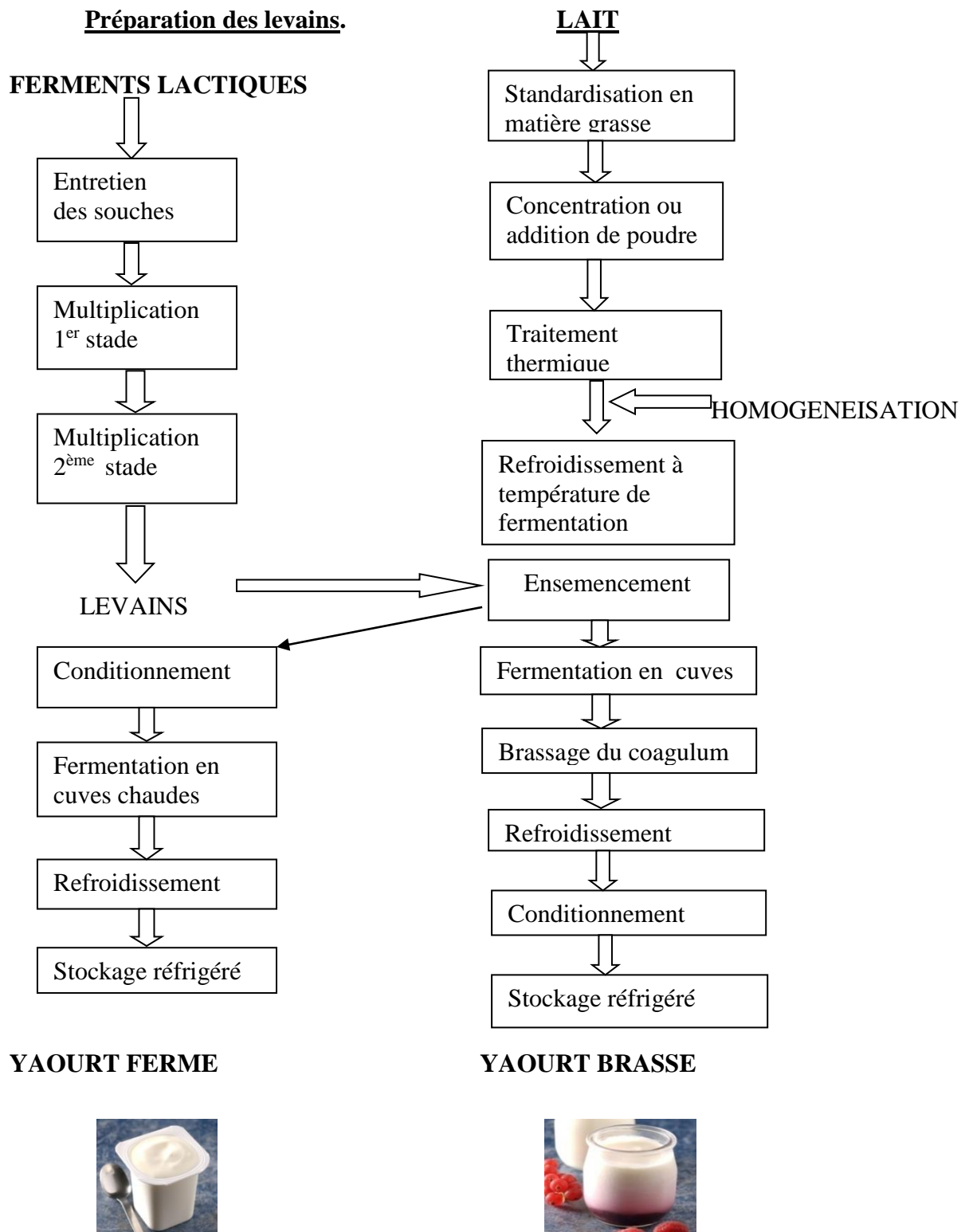
- Une température plus haute (45 à 46°C) favorise le développement du lactobacille et donc la production d'acide (**Righi, 2006**).

La fabrication du yaourt désigne un produit laitier coagulé obtenu par fermentation lactique grâce à l'action de 2 bactéries exclusives, *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, sur le lait (pasteurisé ou concentré ou partiellement écrémé enrichi en extrait sec) (**Desmazeaud, 1998**).

### **II.2.2. Les étapes de fabrication:**

Le lait est standardisé au taux de matière grasse requise pour le produit fini et peut être enrichi en extrait sec laitier.

Il est homogénéisé pour favoriser la dispersion de la matière grasse et traité à 90° C pendant quelques minutes. Ce traitement thermique entraîne notamment la destruction de germes pathogènes, l'inactivation des enzymes, la fixation de la plus grande partie des protéines solubles sur les molécules de caséine. Le lait est ensuite refroidi pour atteindre la température optimale de fermentation (vers 45 °C). Quelle que soit la forme commerciale des ferments, l'ensemencement est effectué dans un préalable porté à la température de fermentation, laquelle dépend des bactéries lactiques utilisées. Les ferments sont ajoutés, en quantité suffisante (**Corrieu et Luquet, 2008**). L'ensemencement (taux de 1 à 5 %) se fait le plus souvent à partir d'un levain déjà préparé en cuve. La fermentation se fait en 2 à 4 heures : pour les yaourts fermes, le laitensemencé est mis directement dans des pots; dès la formation du caillé, ceux-ci sont stockés à 4 °C, de façon à stopper l'acidification; pour les yaourts brassés, le laitensemencé fermente **en tanks** où il sera brassé en fin de fermentation.



**Figure 1:** Diagramme des principales étapes dans la fabrication du yaourt

Le mélange est ensuite refroidi puis mis en pot et stocké à 4°C. Suivant le type de yaourt, l'adjonction de fruits, de sucres, d'édulcorants et d'arômes se fait avant ou après fermentation (**Bullard, 2011**).

Le yaourt peut être consommé sous forme de yaourt fermé ou après brassage lui donnant une consistance crémeuse ou liquide. Deux bactéries lactiques sont associées à la fabrication du yaourt. Il s'agit de *Streptococcus salivarius, subsp. thermophilus* (anciennement dénommé *Str.thermophilus*), et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (anciennement dénommé *L. bulgaricus*) (**Béal et Hélinck, 2015**).

Dans le yaourt, ces deux bactéries doivent être à l'état viable et en quantités abondantes. Au moment de la vente au consommateur, le yaourt ne doit pas contenir moins de 0,8g d'acide lactique pour 100g de lait. Outre le goût acidulé qu'elles donnent au gel, ces bactéries lui assurent une saveur caractéristique due à la production de composés aromatiques (acétaldéhyde principalement; cétone, acétoïne, diacétyl). Enfin, ces deux bactéries produisent des polysaccharides (glucanes).

Ces deux bactéries ont des rôles très complémentaires. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, ne produit que de l'acide lactique. Il se développe bien à la température de 45 à 50 °C en acidifiant fortement le lait jusqu'à 1,8 % (pH voisin de 4,5), voire, avec certaines souches, jusqu'à 2,7 % d'acide lactique (pH 3,8 à 3,6). Quant à *Streptococcus salivarius, subsp. thermophilus*, il se développe à des températures comprises entre 37 à 40 °C. Nettement moins acidifiant que *Lactobacillus*, il produit généralement 0,5 à 0,6 % d'acide lactique (pH voisin de 5,2).

Le yaourt contient divers composés volatiles et aromatiques intervenants dans sa saveur et son appétence. Parmi ceux-ci, outre l'acide lactique qui confère au yaourt son goût acidulé, nous avons l'acétaldéhyde qui a un grand pouvoir aromatisant. D'autres composés (acétone, acétoïne, butane-2-one, etc.) contribuent à l'équilibre et à la finesse de la saveur du yaourt. C'est principalement le lactose qui joue un rôle dans la formation de composés aromatiques dont la production est due principalement aux lactobacilles (**Jeantet et al., 2006**).

### II.2.3. Bactéries lactiques et pasteurisation

La pasteurisation du [lait](#) engendre la perte d'une grande partie de la flore microbienne, qu'elle soit utile ou pas. Pour permettre la [fermentation](#) et la production d'arômes, le lait pasteurisé doit donc être réensemencé par des levains, fournis sous forme [liquide](#) ou lyophilisée. De la même façon, les yaourts sont généralement fabriqués à partir de lait pasteurisé, qui est réensemencé avec les deux souches bactériennes utiles à leur formation (**Ray, 2013**).

## II.3. Lait fermentés par une flore acidifiante autre que celle du yaourt :

### II.3.1. Lait issus de fermentations lactiques:

D'apparition plus récente, le lait fermenté au *Bifidobacterium longum* et *Lactobacillus acidophilus* présente des qualités thérapeutiques supplémentaires : ces microorganismes, naturellement présents dans les intestins, jouent en effet un rôle important dans l'équilibre de la flore intestinale et la prévention du cancer du côlon. Avec l'âge, les bifidobactéries diminuent. Cet inconvénient peut être limité en intégrant dans l'alimentation des produits laitiers fermentés qui contiennent ces bifidobactéries vivantes. Les effets cliniques préventifs des probiotiques exercent une influence bénéfique sur l'équilibre de la flore intestinale, le système immunitaire et le bien-être en générale (**Tomé, 2002**).

### II.3.2. Produits issus de fermentations lactiques et alcooliques:

Certains laits fermentés sont caractérisés par un des levain(s) spécifique (s) utilisé(s) de la manière suivante pour la fermentation:

#### II.3.2.1. Kefir :

C'est un lait fermenté alcoolisé, avec un goût fortement acide et de légers arômes de levures et d'alcool. Il est le fruit d'une fermentation lactique par *lactobacilles*, *streptocoques* et d'une levure qui transforme le lactose en alcool. On le retrouve en Asie du sud-ouest, en Europe de l'est (**Lamontagne, 2002**).

#### II.3.2.2. Kumys:

Elle est inoculée par *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* et *Kluyveromyces marxianus* (**Anonyme , 2003**), Le koumis, qui peut être considéré comme une variante du kéfir, est une boisson fermentée alcoolisée très répandue chez les populations européenne.

On le prépare avec du lait de jument, qui renferme plus de lactose que le lait de vache, de ce fait, le koumis soumis à une fermentation prolongée peut renfermer jusqu'à 3 % d'alcool. **(Comité mixte FAO/OMS, 1960).**

### **II.3.2.3. Leben ou Dahi:**

C'est un produit très proche du yaourt traditionnel en Europe du SUD/EST et au Proche-Orient, Il est fabriqué à partir des laits disponibles dans ces différents pays : vache, chèvre, brebis ou bufflonne, entiers ou écrémés. Le lait partiellement concentré par ébullition estensemencé en ferments contenus dans des fabrications de la veille. On conserve jusqu'à coagulation la température de 45° à 50°C. Le produit obtenu peut être dilué à l'eau ; c'est le cas du Dough et de l'Eyran en Turquie. On le consomme souvent aromatisé avec des essences végétales (essence de Kakuti, de menthe ou de rose). On peut également le mélanger à la farine de froment qu'on laisse fermenter puis sécher au soleil ; en Irak ce produit est appelé le Kushuk, le Kishk au Liban et le Tarhana en Turquie **(Evette, 1975).**

### **II.4. Intérêts nutritionnels et thérapeutique du yaourt :**

Un pot de yaourt nature possède la même valeur nutritive qu'un verre de lait:

- Protéines: 4 à 5 %;
- Lipides à un taux variable;
- Glucides: 5 à 20 % selon qu'il soit sucré ou non.

Au cours de la fermentation, la composition du lait subit un certain nombre de modifications. Certaines de ces modifications font un produit de meilleure valeur nutritionnelle que le lait **(Jeantet et al., 2008).**

#### **II.4.1 Les effets du yaourt sur la santé :**

Les résidus de pesticides, de métaux lourds, de dioxine,... etc., jouent un rôle dans les problèmes de santé tels que les troubles du système nerveux, hormonal, immunitaire (d'où l'asthme et l'allergie) et de la reproduction (stérilité, malformations génitales) et les cancers. Les résidus d'antibiotiques peuvent provoquer des réactions allergiques **(Cardinal, 2014).**

##### **II.4.1.1 Traitement des diarrhées:**

Les souches de bactéries lactiques probiotiques proviennent des aliments et appartiennent principalement aux genres de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Les effets bénéfiques de ces souches probiotiques sur la santé du consommateur, notamment l'amélioration de la digestion du lactose, l'équilibration de la microflore intestinale, la prévention ou le raccourcissement de la durée de diarrhée (notamment les diarrhées provoquées par le rotavirus et par *Clostridium difficile*), la diminution du risque d'allergie alimentaire, la stimulation et la modulation du système immunitaire, l'amélioration de la maladie inflammatoire intestinale et la prévention du cancer n'ont toutefois été démontrées que pour un nombre limité de souches.

Une seule étude a analysé l'impact de l'utilisation de la bouillie de mil appelée « koko » associée à l'administration d'antibiotiques sur la diarrhée infantile au Ghana. Les résultats ont montré que l'administration du traitement n'avait aucun effet sur la fréquence des selles et la durée de la diarrhée durant les cinq premiers jours. Cependant, une légère amélioration a été notée au bout de deux semaines chez les enfants traités (bouillie + antibiotiques) contrairement à ceux qui n'ont pas reçu la bouillie ou les antibiotiques. Ces auteurs concluaient que le « koko » associé aux antibiotiques jouerait un rôle important dans la prévention des diarrhées et gastro-entérites aiguës chez les enfants et qu'il pourrait aider à réduire la diarrhée persistante (Yao et al., 2009).

#### **II.4.1.2 Equilibre de la flore intestinale:**

Notre flore intestinale est fragile : une alimentation déstructurée, le stress et la prise d'antibiotiques peuvent perturber l'équilibre de la flore intestinale, laissant le champ libre aux micro-organismes indésirables. C'est à ce moment-là que les probiotiques se révèlent utiles. Comme toutes les bactéries consommées par l'être humain, les ferments lactiques ne font que passer dans le tube digestif, sans le coloniser.

Cependant, durant ce transit, ils peuvent exercer un rôle protecteur. Pour que les bactéries aient une incidence, leur nombre dans le tube digestif doit être supérieur à dix millions. Or, les souches du yaourt et des laits fermentés résistent assez bien à l'acidité de l'estomac : sur dix milliards, il peut en rester au moins un milliard, ce qui est grandement suffisant (Moreau, 2012).

#### **II.4.1.3 Le yaourt améliore la digestion du lactose :**

La synthèse de lactase, l'enzyme qui digère le lactose, a tendance à décliner avec l'âge. Ce phénomène physiologique naturel est d'ordre génétique et n'est pas une pathologie. En France, 20 à 50% des adultes ne conservent que 10% de la capacité qu'ils avaient à digérer le lactose étant nourrisson. Certains sont atteints de symptômes désagréables (ballonnements, flatulences, douleurs abdominales, ...) après l'ingestion d'une quantité plus ou moins grande de lait ; on parle d'intolérance au lactose. Ces personnes ont tendance à limiter leur consommation de lait et produits laitiers. Elles risquent de ne pas couvrir correctement leur besoin en calcium.

Or, parce que les ferments lactiques des yaourts sont vivants et actifs tout au long du transit digestif, leur capacité à digérer le lactose profite à l'organisme. Non seulement la consommation de yaourt ne cause aucune difficulté digestive aux personnes qui digèrent mal le lactose, mais elle leur est recommandée pour pouvoir bénéficier de tous les avantages nutritionnels du lait. Ce bénéfice des ferments du yaourt a été confirmé dernièrement par un avis positif de l'autorité européenne de sécurité des aliments rendu le 19 octobre 2010: « Les ferments vivants dans le yaourt, améliorent la digestion du lactose chez les personnes qui le digèrent mal » (**Guarner et al., 2005**).

#### **II.4.1.4 Des effets anticancéreux :**

Plusieurs travaux ont mis en évidence une association inverse entre la consommation de produits laitiers fermentés, en particulier de yaourt, et le risque de tumeurs colorectales, cancers ou adénomes. Plusieurs études chez le rat, la souris et quelques unes chez l'homme suggèrent que les bactéries lactiques pourraient avoir un effet bénéfique et à plusieurs niveaux sur la réduction du risque de cancer du côlon. Ainsi, chez l'homme et sur des modèles animaux, l'ingestion de bactéries lactiques diminue la concentration d'enzymes responsables de la libération d'agents mutagènes dans le côlon. Dans une étude de supplémentation avec *L. acidophilus* chez 21 volontaires en bonne santé, la concentration fécale de trois de ces enzymes (bêta-glucuronidase, nitroréductase et azoréductase) a été diminuée. Cet effet a été observé après 10 jours de traitement. Cependant, il est réversible et n'est plus constaté 30 jours après la fin de l'étude, suggérant qu'une prise continue soit nécessaire à son maintien. D'autres travaux sur l'homme et le rat avec *L. acidophilus* ont montré une réduction de ces enzymes. Sept autres mécanismes ont également été suggérés pour expliquer l'effet préventif des probiotiques (**Goldin, 1984**).

#### **II.4.1.5 Renforcer le système immunitaire :**

Les sujets âgés sont plus vulnérables face aux infections en raison du déclin de leur système immunitaire et en particulier de celui de l'activité des cellules lymphoïdes. Des études ont montré qu'une supplémentation avec des probiotiques diminue certains effets de l'affaiblissement du système immunitaire et, en particulier, renforce l'activité des cellules tueuses (*Gill, 2001*).

Les probiotiques ont induit une réponse immunologique (IgA, IgG) de même qu'une production accrue d'anticorps neutralisant le virus. D'autres études indiquent une stimulation de l'activité phagocytaire des monocytes sanguins et une stimulation des IgA intestinales (*Yoon, 1999*).

## **Matériel et méthodes**

Notre travail a été effectué au niveau de laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem).

Dans ce travail, nous avons entrepris de :

- Sélectionner des échantillons de ferments lactiques importés utilisés dans l'industrie laitière algérienne pour la fabrication de différents produits laitiers fermentés.
- Nous avons utilisé les techniques microbiologiques pour le contrôle de la qualité microbiologique et hygiénique des ferments et la caractérisation des espèces présentes dans les laits fermentés.

### **I- Echantillonnage**

*05 échantillons provenant de différentes entreprises spécialisées dans la fabrication du yaourt ont été procurés du marché local:*

*1<sup>er</sup> Echantillon: Danone.*

*2<sup>ème</sup> Echantillon: Soummam*

*3<sup>ème</sup> Echantillon: Activia*

*4<sup>ème</sup> Echantillon: Trèfle*

*5<sup>ème</sup> Echantillon: Dialna.*

### **I-1 Produits et consommables**

Le matériel de laboratoire est constitué de verrerie, d'appareils de laboratoires, de milieux de culture et de réactifs.

La verrerie est composée de boîtes de Pétri, de tubes à essai, de pipettes graduées, d'erlenmeyers, de lames, des béchers, de spatules et des tubes à essai.

Les appareils de laboratoire sont quant à ceux constitués d'étuves, d'un réfrigérateur, d'un bain-marie, d'autoclaves, d'une balance électronique et d'un pH-mètre.

### **I-2 les Milieux de culture :**

**Gélose nutritive (GN) :** la recherche de la flore mésophile aérobie.

**Milieu Chapman:** la recherche des *staphylocoques*.

**Milieu OGA:** la recherche des levures et moisissures.

**MRS (Man, Regosa et Sharpe) gélose:** l'isolement et purification des *bactéries lactiques*.

**EMB :** la recherche des *Enterobacter* et *E.coli*.

**Bouillon MRS :** purification des bactéries lactiques.

**Möeller :** consiste à étudier les décarboxylases.

## **II- Dénombrement et contrôle microbiologique des échantillons :**

Il consiste à dénombrer les colonies contenu dans une boîte de pétri après incubation puis à multiplier le nombre trouvé par le coefficient de dilution pour trouver le nombre approximatif du germe étudié par ml de lait.

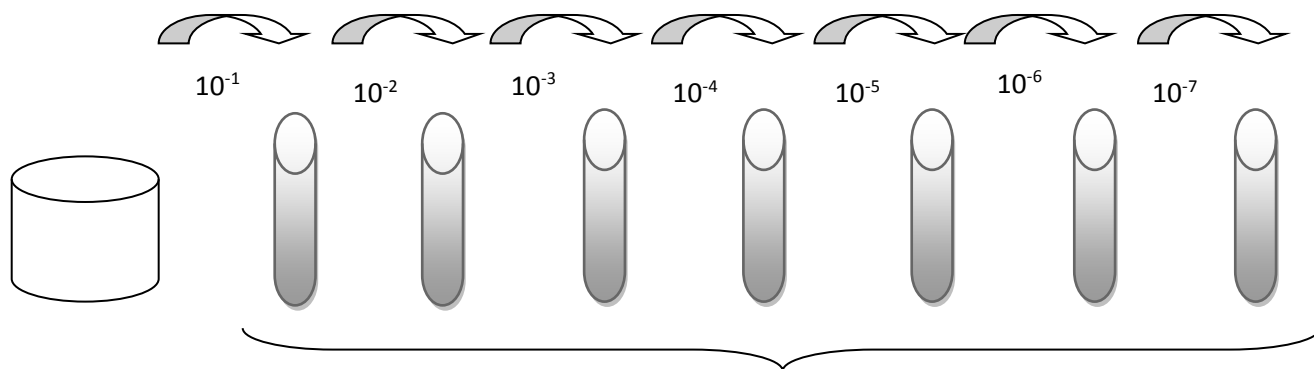
### **II-1 Préparation des dilutions**

#### **II-1-1 Préparation de la solution mère**

01g de l'échantillon (yaourt) a été homogénéisé à l'aide d'un vortex avec 09 ml d'eau physiologique. Cette suspension correspond à la première dilution qui correspond aux dilutions 1/10 ou  $10^{-1}$ .

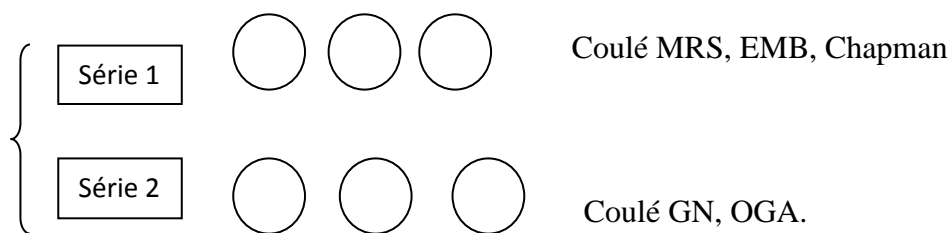
#### **II-1-2 Préparation des dilutions décimales**

Nous effectuons une série de dilution décimale dans de l'eau physiologique stérile jusqu' à  $10^{-7}$  est réalisée à partir des échantillons homogénéisés par agitation (**Guiraud, 2003**). Des dilutions  $10^{-5}$  et  $10^{-7}$  nous ensemençons en profondeur sur les différentes géloses afin de sélectionner différents isolats.



Echantillon

Ensemencement 1 ml  
à partir des tubes  $10^{-5}$  et  $10^{-7}$ .



Laisser Solidifier

Série 1                      Série 2



Incubation 72 à 37°C.

Incubation 72 à 30°C.

Lecture de résultat.

**Figure 2** : Technique d'isolement de la flore totale à partir des échantillons de yaourt

### **III-recherche de la flore microbienne dans les laits fermentés:**

#### **III-1 la recherche de la flore mésophile aérobie totale(FTAM):**

Ce dénombrement reflète la qualité microbiologique générale du produit. La recherche de la flore mésophile aérobie totale est effectuée sur gélose nutritive, une prise d'essai de 1ml des dilutions décimales (de  $10^{-5}$  à  $10^{-7}$ ) à été réalisée en profondeur dont l'incubation a été faite à 30°C pendant 24 à 48 heures.

#### **III-2 la recherche de *Staphylococcus aureus* :**

La recherche des staphylocoques est réalisée sur milieu solide Chapman, cette recherche a été réalisée en profondeur dont l'incubation a été faite à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Le résultat positif se manifeste par la présence des colonies dorées ou bien blanche avec le changement de couleur du milieu.

#### **III-3 La recherche des Entérobactéries:**

Leur dénombrement s'effectue sur milieu Eosine de bleu de méthylène (EMB), après ensemencement en profondeur nous incubons les boites de Pétris à 37°C, pendant 24 à 48 heures.

#### **III-4 La recherche des levures et Moisissures:**

Le milieu utilisé est Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar (OGA).

A partir des dilutions choisies nous prélevons le produit à analyser qu'on introduit dans les boites de pétri. Puis nous coulons la gélose OGA préalablement fondue puis refroidie à 45°C. L'homogénéisation de fait par mouvements circulaire ensuite nous laissons la gélose se solidifie puis nous incubons les boites à 25°C pendant 5 jours. Nous dénombrons toutes les colonies apparentes.

**Tableau 1:** la méthode de contrôle microbiologique de yaourt.

<b>Bactérie</b>	<b>Milieux utilisés</b>	<b>Type d'ensemencement</b>	<b>Incubation (°C) Durée (h)</b>
<b>FTAM</b>	GN	En profondeur	30°C 24h
<b>Entérobactérie</b>	EMB	En profondeur	37°C 24h/48h
<b>Staphylococcus aureus</b>	Chapman	En profondeur	37°C 24h/48h
<b>Levure et moisissures</b>	OGA	En profondeur	30°C 24 /48h

## **V Méthodes statistiques :**

### **V-1.Statistiques élémentaires**

Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne  $\pm$  erreur standard ( $X \pm ES$ ). Les comparaisons de deux moyennes sont réalisées en moyen d'un test de *t de student*. Les comparaisons de plusieurs moyennes sont réalisées par l'analyse de variance (ANOVA). Le seuil de signification retenu est celui qui est habituellement considéré, soit 5%. Les différentes données sont analysées à l'aide d'un logiciel STATISTICA (5.1 .2006).

### **V-2. Corrélations**

Le coefficient de corrélation est calculé à partir des dénombrements après transformation logarithmique, pour estimer le lien entre les différentes flores des échantillons.

## **IV- L'isolement des bactéries lactiques:**

L'isolement des bactéries lactiques a été réalisé sur le milieu MRS solide. L'ensemencement se fait en profondeur. L'incubation se fait pendant 24 heures à 37 °C. (Kacem et Karam, 2006).

### **IV-1 Purification**

La purification des bactéries lactiques est réalisée alternativement sur le milieu MRS solide et liquide afin de s'assurer de la pureté des cultures (Badis et al, 2005).

Après croissance est comptage des colonies en biote et par dilutions, on prend de chaque biote 07 colonies isolées sur les quelles sera effectuée une coloration de Gram et une recherche de la catalase les bactéries à Gram +, catalase – et non sporulées sont retenues et repiquées sur bouillon MRS. L'opération est renouvelée jusqu'à à l'obtention d'une culture pure dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram (Balows et al, 1992).

## **IV-2 Identification et caractérisation des isolats**

### **IV-2-1 Test phénotypiques**

#### **IV-2-1-1 Examen 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 ainsi l'aspect du trouble dans le milieu liquide (Badis et al., 2005).

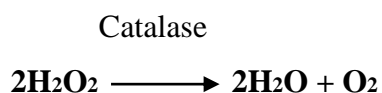
#### **IV-2-1-2 Examen microscopique (Coloration de Gram)**

Cette étude est pour écarter tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram (voir annexe 05),

Cette étude permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement (Hilali, 2002)

#### **IV-2-1-3 Test catalase**

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) des autres bactéries (catalase +). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame propre. La réaction positive se traduit par

un dégagement immédiat de bulles de gaz (O<sub>2</sub>) (**Marchal et al, 1991**). Les bactéries à Gram positives et catalase négatives sont présumées des bactéries lactiques.

## **IV-2-2 Tests physiologiques**

### **IV-2-2-1 Thermo résistance**

Des tubes contenant 9 ml de MRS liquide sont inoculés par les souches isolées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain-marie à 63,5°C pendant 30 minutes, après refroidissement brusque, elles sont incubées à 30°C±1°C pendant 48 à 72h. Un résultat positif se traduit par un trouble (**Badis et al, 2005**).

### **IV-2-3-3 Type fermentaire**

Ce test permet de s'avoir le type du métabolisme (homofermentaire ou hétérofermentaire) par le quel le substrat carboné est transformé, et la production du gaz à partir de la dégradation du glucose. Ce test est effectué par l'ensemencement des souches dans un milieu MRS liquide contenant la cloche de durham et l'incubation se fait à 30°C pendant 24h à 48h. Le développement d'une bactérie hétérofermentaire se manifeste par l'apparition de gaz dans la cloche de durham qui est absent chez les bactéries homofermentaires.

## **IV-2-3 Tests technologiques**

### **IV-2-3-1 Recherche de l'Arginine déhydrolase (ADH)**

La mise en évidence de cette enzyme est intéressent pour la caractérisation des bactéries lactiques. Le rôle de cette enzyme est de libérer l'ammoniac à partir de l'arginine. Pour effectuer ce test on a utilisé le bouillon de Möeller en présence d'arginine (milieu liquide). Ces milieux contiennent un indicateur de pH, le bleu de bromothymol, si la couleur du milieu vire au jaune puis vers le violet (réalcalinisation de milieu) ceci indique la présence de l'enzyme et la dégradation de l'arginine. Si elle reste jaune cela veut dire que la bactérie est ADH négative.

# Résultats et discussion

## I. Dénombrement et contrôle microbiologique des échantillons

### I.1. Recherche de la flore d'altération:

Nous avons effectué un contrôle microbiologique des échantillons à étudier pour déterminer leur qualité hygiénique.

Les 5 laits fermentés examinés contiennent:

-Une charge variable de la flore totale aérobie mésophile (FTAM) située entre  $1,41.10^7$  à  $3,96.10^7$  UFC/ ml.

-L'analyse a révélé une contamination deux échantillons en entérobactéries avec des valeurs moyenne de  $4,08.10^5$  et  $3,8.10^6$  UFC/ ml.

-Les staphylocoques sont absents dans tous les échantillons.

-La charge moyenne en bactéries lactique est de  $8,16.10^6$  et  $3,08.10^7$  UFC/ml.

Concernant la flore d'altération par les levures et moisissures, un nombre réduit a été enregistré soit des valeurs respectives de l'ordre de  $9.10^5$  et  $4,5.10^6$  UFC/ml.

**Le tableau 2 :** Résultats du dénombrement des cinq échantillons:

Echantillon / UFC/ml	E1	E2	E3	E4	E5
FTAM	$7,2.10^6$	$6,36.10^7$	$3,27.10^7$	$5,09.10^7$	$7,72.10^7$
Bactéries lactiques	$3,09.10^7$	$1,45.10^7$	$9,2.10^4$	$1,18.10^7$	$2,27.10^7$
Entérobacteries	$4,08.10^5$	Absence	Absence	$3,8.10^6$	Absence
Staphylocoques	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
Levures et moisissures	Absence	$4,54.10^6$	Absence	Absence	Absence

#### ➤ Résultat sur milieu OGA

La contamination par cette flore fongique est d'environ 4 % (2 échantillons), elle se trouve à un taux incomptable.

Ces échantillons sont non satisfaisants si on les compare avec la norme qui exige leur absence. Cependant, ces deux dernières études qui réalisent une discrimination entre levures et moisissures ne peuvent être comparées de façon rigoureuse avec notre étude.

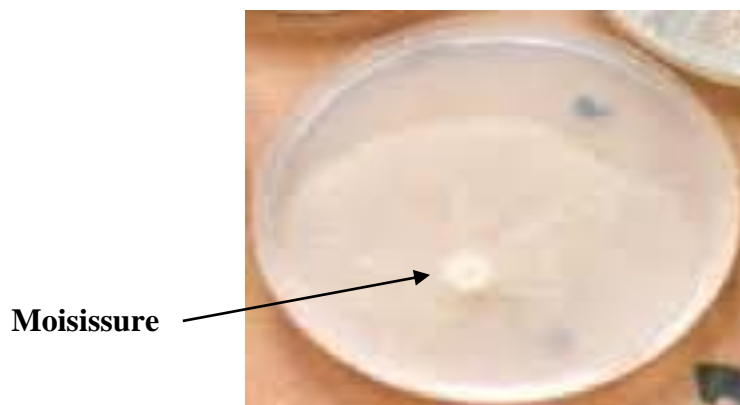
La flore fongique provient des mauvaises conditions d'hygiène lors des manipulations, lors de la vente et surtout de l'air ambiant (**Carole, 2002**).

L'inefficacité du traitement thermique (pasteurisation incomplète) ainsi que des désinfections dans la chaîne du froid, sont des facteurs favorables au développement de ces micro-organismes.

Bien que leur présence est minime dans le lait. Certaines d'entre elles sont capables de fermenter le lactose en alcool (production de l'éthanol).

Nous n'avons pas identifié pour l'instant de levures pathogènes associées au domaine laitier. Il y a des levures qui participent à l'affinage de certains fromages et d'autres entrent dans la fabrication de certains produits laitiers fermentés.

De même, nous retrouvons dans le domaine laitier des levures nuisibles responsables de certaines dégradations détectées par des odeurs d'alcool, par un gonflement des emballages et du fromage dû à la production de gaz et par le limonage (**Lapointe-Vignola, 2002**).



**Figure 3 :** Résultat positif des levures et moisissures de l'échantillon E3 sur milieu OGA.

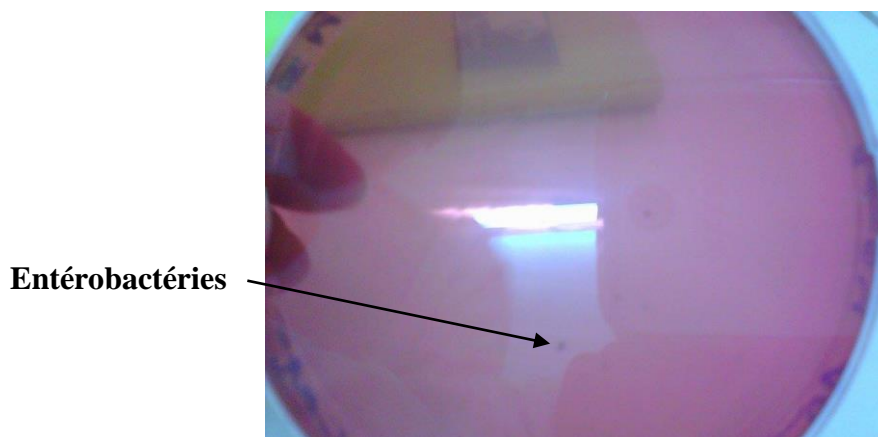
➤ **Résultat sur milieux EMB:**

Colonies violettes, semi-bombées de 2 à 3mm de diamètre avec éclat métallique, autre colonies avec un centre sombre, très bombées muqueuses de diamètre 5 mm centre gris marron sans reflet, colonies grisâtres 1 à 2 mm de diamètre transparentes, grises ambrées.

Les germes pathogènes que sont salmonelles, staphylocoques pathogènes n'ont pas été retrouvés dans les échantillons de laits fermentés industriels analysés.

Ces résultats sont conformes à la norme des laits fermentés en général et le yaourt en particulier qui exige leur absence.

L'absence de staphylocoques peut trouver sa justification dans un certain nombre de facteurs comme la pasteurisation qui est une étape fondamentale dans la fabrication du lait fermenté industriel (**Dieng, 2001**).



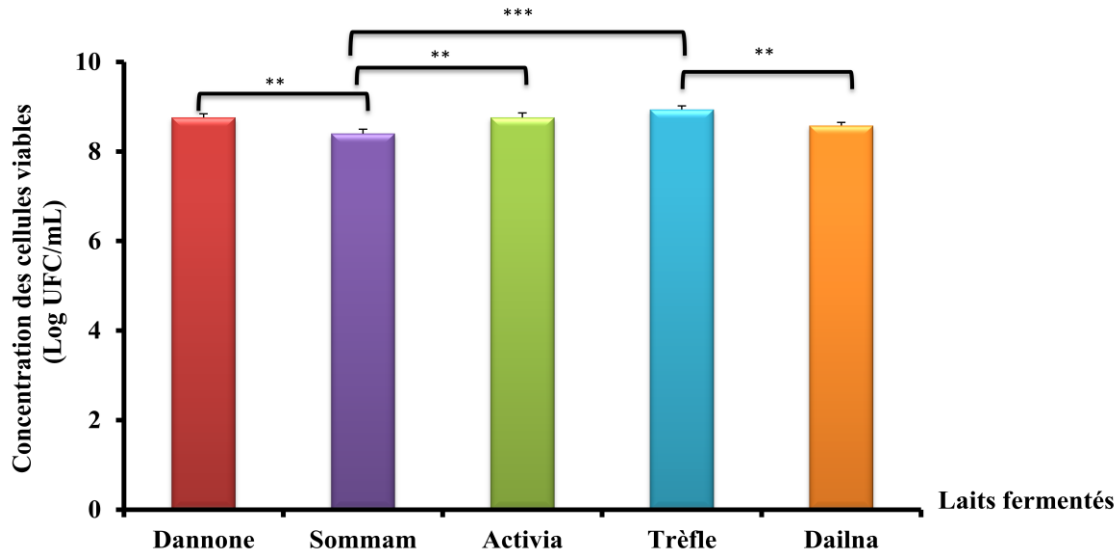
**Figure 4 :** Aspect de couleur grise des colonies de l'entérobactérie sur milieu EMB.

## **I.2. Résultats de dénombrement de la flore totale:**

La recherche de microorganismes indicateurs de la contamination d'origine fécale permet de juger l'état hygiénique d'un produit. Même à des niveaux faibles, ces bactéries reflètent les conditions hygiéniques dégradées lors de la traite ou au cours de transport.

- L'histogramme 1 résume les résultats du dénombrement de la flore *mésophile aérobie totale*.

La flore mésophile aérobie totale a été dénombrée sur le milieu GN (30°C).



**Figure 5:** Dénombrement de la flore *mésophile aérobie totale* dans différentes marques de lait fermenté.

\*\*\* : Sommam vs Trèfle ( $p \leq 0,0001$ ) ; \*\* : Sommam vs Dannon ( $0,001 \leq p \leq 0,01$ );

\*\* : Sommam vs Activia ( $0,001 \leq p \leq 0,01$ ); \*\* : Dailna vs Trèfle ( $0,001 \leq p \leq 0,01$ ).

Les valeurs indiquées sont des moyennes  $\pm$  erreurs standard (n= 5)

-Nous notons une différence très significative entre le lait fermenté « Sommam » et les autres laits fermentés.

-Le nombre de la flore totale mésophile est très élevée dans le lait fermenté « Trèfle » par rapport au lait fermenté « Dailna » ( $0,001 \leq p \leq 0,01$ ).

- L'histogramme 2 résume les résultats du dénombrement de la flore lactique.

La flore lactique a été dénombrée sur le milieu MRS (37°C).

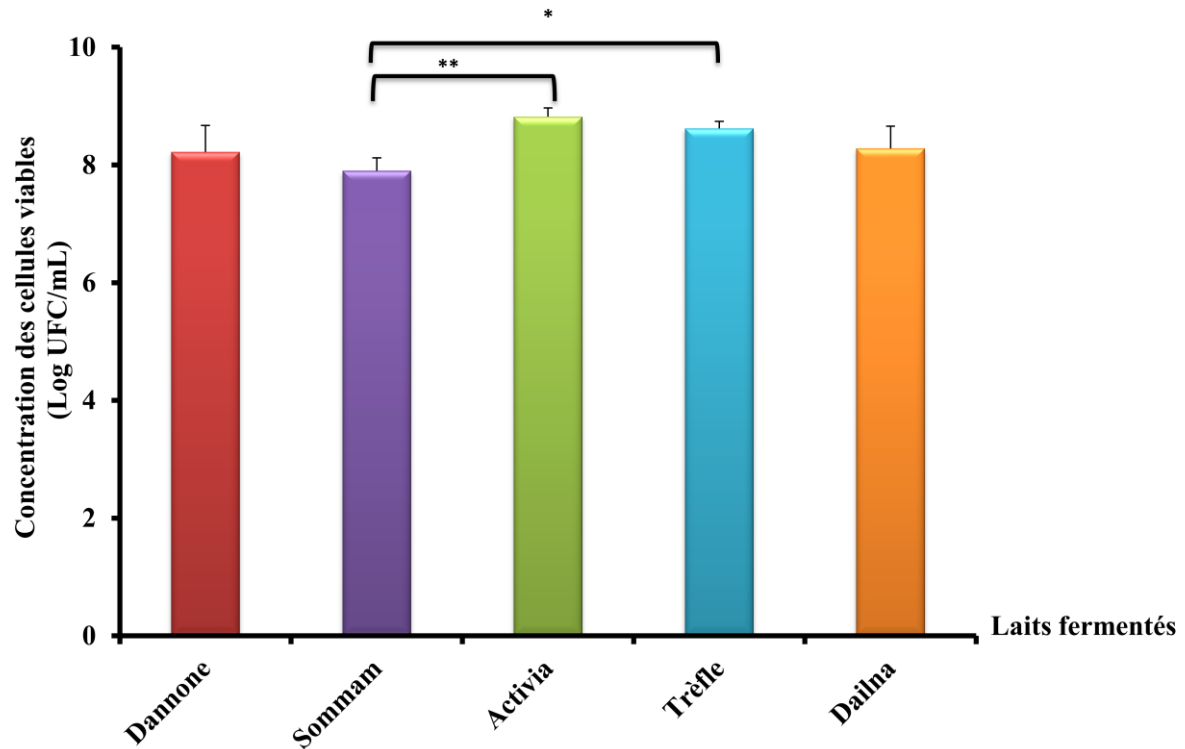
La population des lactobacilles dans les laits fermentés analysés montre un chiffre élevé qui varie entre une dizaine et centaines de milliers par gramme de produit. C'est la preuve que les laits fermentés contiennent des microorganismes vivants et en quantité importante. Ces germes proviennent naturellement du lait cru ou sont ajoutés lors de l'ensemencement.

Le développement des lactobacilles débute lentement dans le lait après la traite et va s'augmenter avec la fermentation. Les lactobacilles atteignent leur optimum entre pH 3,8 et 4 dont leur croissance s'arrête à pH 3,6.

Cette différence, par rapport à nos résultats, peut s'expliquer d'une part par le choix des ferments lactiques qui est variable en fonction des fabricants. Ces variations imputables au développement des bactéries lactiques conduisent à l'acidification du milieu par la production d'acide lactique d'où la baisse du pH du lait (**Chekroun et al., 2011, Dib et al., 2014**).

Cependant, elle peut être imputable aussi à l'acidité développée par l'activité résiduelle des ferments qui affecte la viabilité des bactéries.

Enfin, nous pouvons dire que la pasteurisation permet d'améliorer la qualité hygiénique du lait. Cependant, il faut prendre les mesures de prévention contre la présence et le développement des germes pathogènes et/ou d'altération (**Dieng, 2001**).



**Figure 6:** Dénombrement des bactéries lactiques dans différentes marques de lait fermenté.

\*\* : Sommam vs Activia ( $0,001 \leq p \leq 0,01$ ); \* : Sommam vs Trèfle ( $p < 0,05$ ).

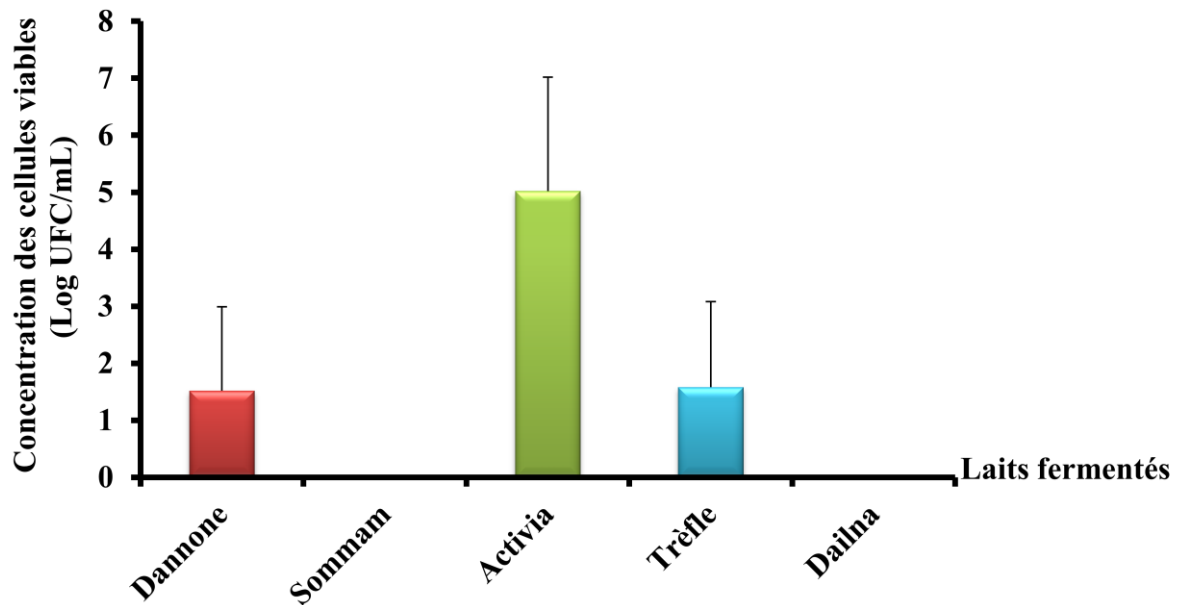
Les valeurs indiquées sont des moyennes  $\pm$  erreurs standard (n= 5)

- Nous observons qu'il ya une différence très significative entre le lait fermenté « Sommam » et le lait fermenté « Activia » ( $0,001 \leq p \leq 0,01$ ).

- Dans le lait fermenté « Trèfle », le nombre des bactéries lactiques est augmenté par rapport au lait fermenté « Sommam » ( $p < 0,05$ ).

➤ L'histogramme 3 résume les résultats du dénombrement des entérobactéries.

Les entérobactéries à été dénombrée sur le milieu EMB (37°C).



**Figure 7 :** Dénombrement des entérobactéries dans différentes marques de lait fermenté.

Les valeurs indiquées sont des moyennes  $\pm$  erreurs standard (n= 5)

- Nous ne notons aucune différence significative entre les différents laits fermentés.

## II-Isolement et identifications des bactéries lactiques:

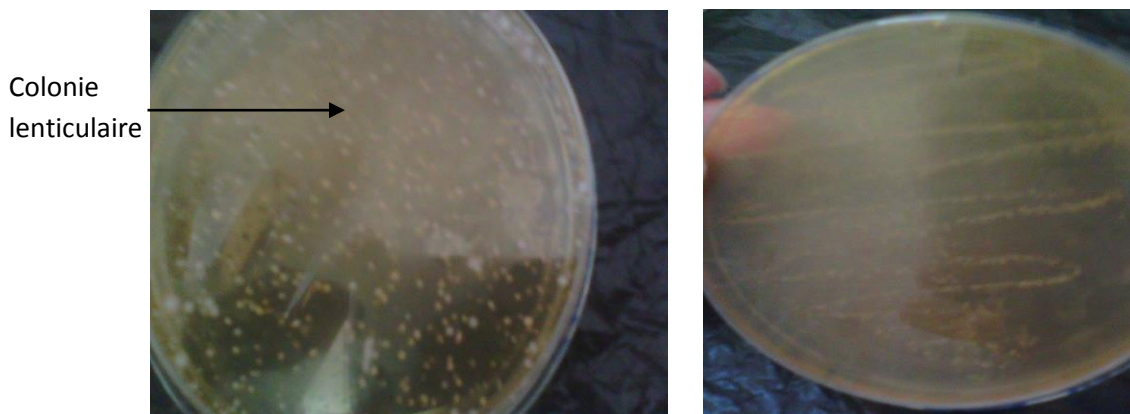
Les souches ont été identifiées à ce stade sur la base de leurs aspects macroscopique et microscopique ainsi que des tests physiologiques tels que la croissance à différentes températures (Ennadir *et al.*, 2014).

### II-1 Résultat d'étude macroscopique

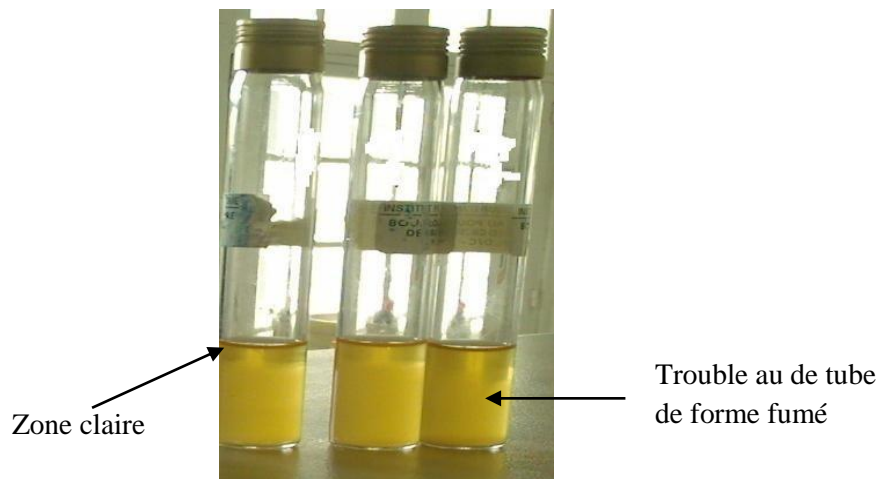
L'observation macroscopique nous a permis de décrire les colonies obtenues sur milieu solide ; se sont de petites tailles, de couleur blanchâtre et de forme ronde ou lenticulaire.

Le repiquage successif sur milieu MRS solide a révélé des colonies rondes avec une couleur blanchâtre et d'un pourtour circulaire régulier. En milieu liquide nous avons remarqué la présence d'un trouble fumeux surmonté d'une zone claire. Il s'accroît au fur et à mesure de la purification des souches, ceci traduit le caractère micro-aérophile des bactéries lactiques. (Alexandre *et al.*, 2008).

L'étude macroscopique consiste en une observation à l'œil nu, l'aspect des cultures en milieu gélosé. Les bactéries lactiques sont des petites colonies d'environ 1 mm de diamètre, de forme lenticulaire de couleur blanchâtres ou laiteuses, avec une surface lisse et un pourtour circulaire régulier.



**Figure 8 :** Aspect des bactéries lactiques sur milieu MRS, lenticulaires de couleur blanche

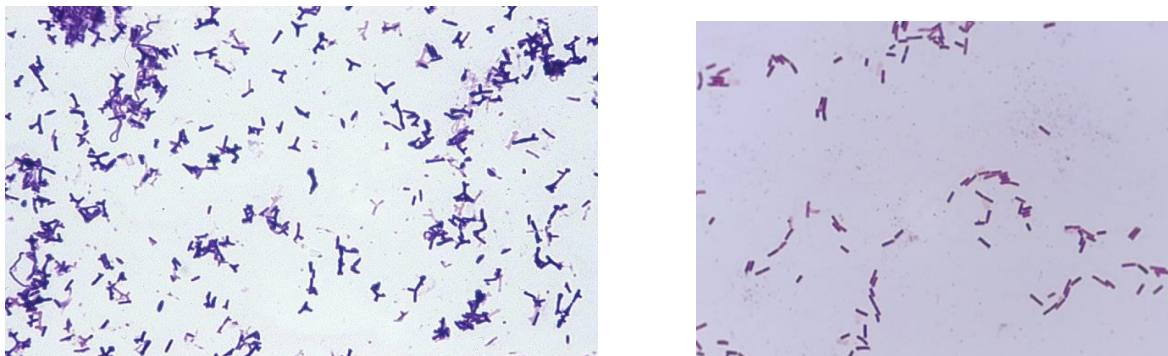


**Figure 9 :** Aspect microaérophiles des bactéries lactique sur milieu MRS liquide après incubation à 37°C pendant 24 h.

## II.2. Etude microscopique

Les souches dominantes représentatives ont fait l'objet d'une étude microscopique, les résultats obtenus suite à la coloration des Gram, montrent que nos isolats sont à Gram positif, toutes les souches présentent une forme cellulaires en bâtonnet, le mode d'association varie d'une souche à l'autre, les résultats sont représentés dans le tableau (03).

Nos résultats sont en accords avec ceux obtenus par **Joffin et Leyral (1996)**, qui ont montré que la classification initiale des bactéries est selon le Gram, leurs morphologies cellulaire et leur mode d'association.



**Figure 10:** Observations microscopiques des bactéries lactiques (G : 10x100)

**Tableau 3:** Critères macroscopiques et microscopiques des bactéries isolées de laits fermentés.

Code de souche	Gram	Forme	Mode d'association
<b>Lb 1</b>	+	Bâtonnets fins et long	En chaine
<b>Lb 2</b>	+	Bâtonnet	En diplobacille.
<b>Lb 3</b>	+	Bâtonnet courts	En diplobacille
<b>Lb 4</b>	+	Bâtonnet courts	En chaine et diplobacille
<b>Lb 5</b>	+	Bâtonnet	En chaine
<b>Lb 6</b>	+	Bâtonnets fins et long	En chaine et diplobacille
<b>Lb 7</b>	+	Bâtonnet	En diplobacille.

### II.3. Test de catalase

Les souches étudiées sont catalase négative car nous n'avons pas obtenu de bulles d'air après le dépôt de l'eau oxygénée sur la colonie cible, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Carr et al., (2002)**, ce qui nous oriente à déduire que les souches isolées sont des bactéries lactiques.

L'identification des souches basées sur des tests biochimiques et physiologiques indique que les bactéries lactiques ne possèdent pas l'enzyme catalase. L'absence de catalase est caractéristique, mais certaines espèces acquièrent cette activité sur des milieux riches en hème (**Larpen et al., 1997**).

### II.4. Thermorésistante

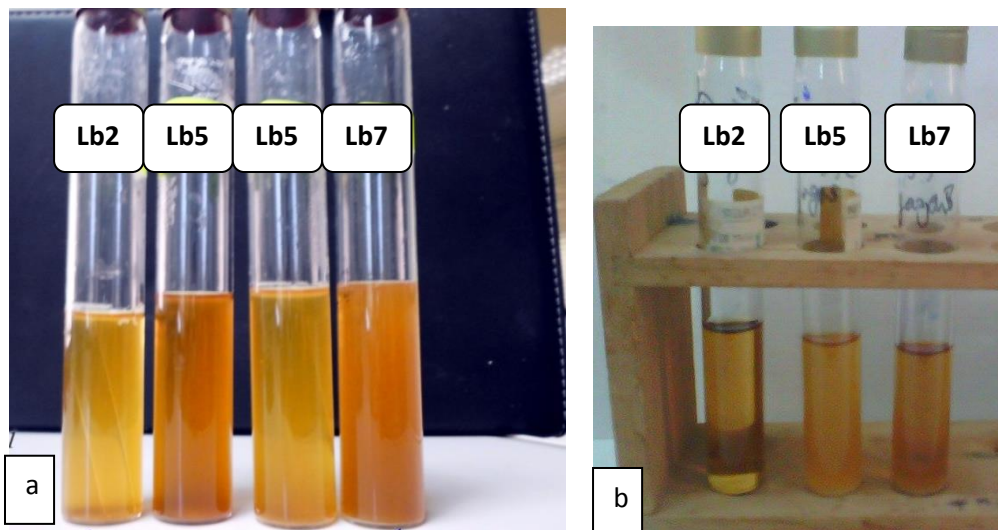
La plus part des souches ne sont pas thermorésistantes (**tableau 4**), où nous observons qu'il n'y a pas de croissance sur le bouillon MRS après un traitement thermique pendant 30 minutes à 63°C (Fig.11) (**Badis et al., 2005**).

### II.5. Le type fermentaire:

Ce test a permis de différencier entre les souches homofermentaire et les souches hétérofermentaire en utilisant un milieu de culture stérile qui contient une cloche de Durham. Nous avons noté une absence de production du gaz (CO<sub>2</sub>) à partir du glucose chez les isolats, ce résultat indique que nos isolats sont considérés comme homofermentaires.

**Tableau 4:** Croissance à différentes températures et la thermo résistance des isolats retenus.

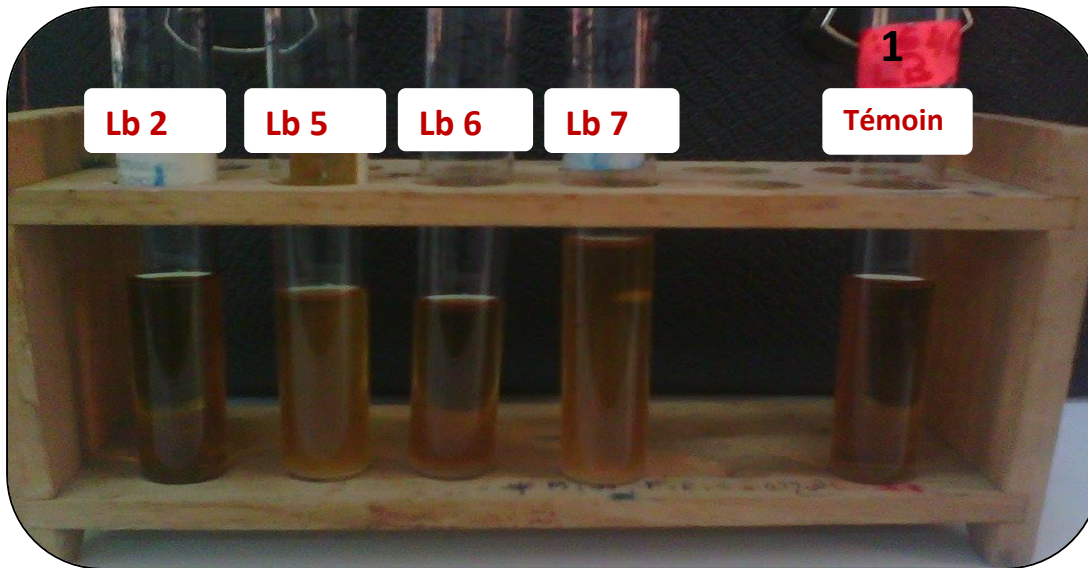
Souches	Culture à 30°C	Culture à 45°C		Culture à 63°C
Lb 1	+	-	Mésophile	-
Lb 2	+	-	Mésophile	-
Lb 3	+	-	Mésophile	-
Lb 4	+	+	Thermophile	-
Lb 5	+	+	Thermophile	-
Lb 6	+	-	Mésophile	-
Lb 7	+	-	Mésophile	-



**Figure 11:** a. croissance à différentes températures (30°C, 45°C), b. La thermo résistance des isolats retenus.

Elles sont homofermentaire (**ou homolactique**) c'est à dire plus de 90% du lactose fermenté est transformé en acide lactique. Les autres produits apparaissent seulement dans des proportions mineures (tableau 5).

Pratiquement toutes les bactéries lactiques utilisées comme cultures acidifiantes appartiennent à ce type (Goy *et al.*, 2015).



**Figure 12:** Les tests du type fermentaire des différentes souches de *Lactobacillus sp* sur milieu MRS contenant une cloche de Durham, le témoin négatif milieu MRS stérile (tube 1).

**Tableau 5:** Résultats du test de type fermentaire sur milieu MRS.

Souches	Homofermentaire	Hétérofermentaire
Lb 1	+	-
Lb 2	+	-
Lb 3	+	-
Lb 4	+	-
Lb 5	+	-
Lb 6	+	-
Lb 7	+	-

### III.6. Le test d'Arginine Déshydrogénase (ADH):

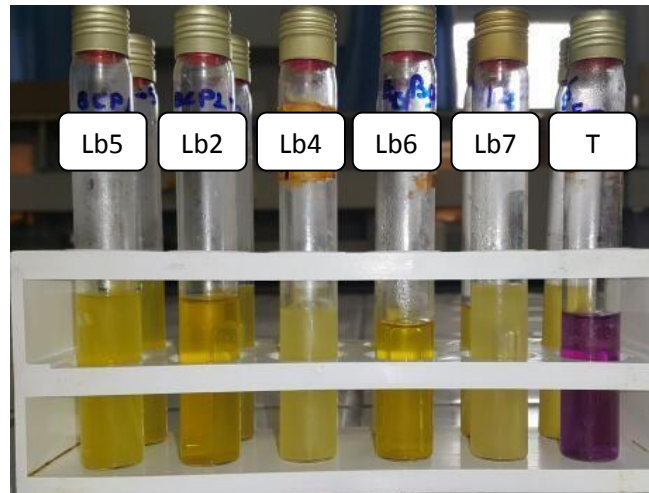
L'activité de l'arginine déshydrogénase effectuée sur les souches isolées, sur milieu M16 PCP a révélé que toutes les souches est ADH négatifs (Fig.13).

Virage au jaune (acide) décarboxylase –

Virage au violet (basique) décarboxylase +

Par ailleurs elles ne produisent pas l'arginine d'ammonium à partir de l'arginine. La fermentation du glucose entraîne une baisse de pH importante. La production, ainsi que l'activité, de l'ADH sera favorisée par un pH acide. D'autre part la lecture de l'alcalinisation nécessite une anaérobiose relative :

- une bactérie non décarboxylante utilisera les peptones du milieu, et produira des acides organiques ainsi que des bases faibles comme l'ammoniac.



**Figure 13 :** Le test de l'arginine déshydrogénase (ADH) des isolats.

## Conclusion

Durant notre étude, nous avons isolé la flore totale à partir du lait fermenté consommé par la population algérienne.

Les études macroscopiques et microscopiques ont montré que les bactéries lactiques sont principalement des streptocoques et des lactobacilles. Les streptocoques sont sous forme de petites colonies blanchâtres, sphériques ou ovoïdes, associées en chainettes et parfois en amas. Tandis que, les lactobacilles sont des colonies punctiformes blanchâtre sous forme de bâtonnets courts, disposées en paires et en chaînes.

L'étude physiologique a été réalisée afin de connaître les conditions optimales et a montré que les souches des bactéries lactiques étaient capables de pousser à des températures de 37°C et de 45°C.

Enfin les analyses microbiologiques des échantillons ont montré l'absence de germes indice de contamination fécale, et germes pathogènes comme le *Staphylococcus aureus* et par conséquent les échantillons de yaourt sont de bonne qualité hygiénique et répondent aux normes microbiologiques fixées par la réglementation.

En plus de l'agroalimentaire, Cette boisson pourra jouer un rôle très important dans le domaine de la santé pour toutes les propriétés thérapeutiques et nutritionnelles des bactéries lactiques, afin de pouvoir concrétiser ce produit, d'autres études doivent être menées à savoir l'identification des différentes espèces qui ont participé à cette fermentation, l'étude approfondie des caractères organoleptiques du produit et l'étude de sa qualité hygiénique afin d'évaluer sa durée de conservation.

En conclusion, les échantillons de yaourt étudié sont de bonne qualité hygiénique et répondent aux normes microbiologiques fixées par la réglementation.

## Références bibliographique

### A

**Alm L (1981).** The effect of fermentation on the biological value of milk proteins evaluated using rats. A study on Swedish fermented milk products. *J Sci Food Agric.* **32:** 1247-1253

**Alexandre H, Granvalet C, Guilloux-Benatier M, Remize-Barnavon F, Tourdot-Maréchal R (2008).** Les bactéries lactiques en œnologie. Lavoisier. p 114.

**Anonyme (2003).** Norme codex pour les laits fermentés, codex alimentarius , Codex stan 243-2003; organisation mondiale de la santé , Révision 2008, 2010. ISSN 1020-2560.

**Audrey V (2012).** La fermentation : définition et applications, GRALON.

### B

**Bullard Julie (2011).** Interactions de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides et effets sur les propriétés rhéologiques du yogourt. Mémoire de maîtrise en Sciences et technologie des aliments. Université Laval Québec.

**Badis A, Guetarni D, Moussa Boudjema B, Henni DE, Tornadijo ME, Kihal M (2004).** Identification of cultivable of lactic acid bacteria isolated from algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food microbiol.* **3:**72-73.

**Blandino A, Al-Aseeri ME, Pandiella SS, Cantero D, Webb C (2003).** Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* **36:** 527–543.

**Blanc B (1981).** Valeur nutritionnelle du yaourt aliment vivant. In : Internatl. Symp sur les effets nutritionnels de la flore digestive. Paris. 118-149.

**Breslaw ES, Kleyn DH (1973).** *In vitro* digestibility of prote in yogurt at various stages of processing. *J Food Sci.*, **38:** 1016-1021.

**Boccignone M, Brigidi R, Sarra C (1984).** Studi effettuati sulla composizione in trigliceridi ed acidi grassi liberi nello yoghurt preparato da latte vaccino. pecorino e caprino. *Ann Fac Med Vet (Turin)*, **28:** 223-233.

**Béal C, Hélinck S (2015).** Yogurt and other fermented milks. In: Ray, RC, Montet, D, dir., *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods* (p. 141-187). Boca Raten, USA: CRC Press

---

**Balows A, Trupa HG, Dworkin M, Harder W, Scheifer KH (1992).** A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. *The prokaryotes*, DOI 10.1007/978-1-4757-2191-1.

**Bekhouche F, Boulahrouf A (2005).** Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d'élevage de Constantine. *Sciences & Technologie C*, **23:** 38-45.

### C

**Corrieu G, Luquet F-M (2008).** Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Lavoisier. p 664.

**Comité mixte FAO/OMS (1960).** Comité mixte d'experte de l'hygiène du lait organisation mondiale de la santé. Palais des nations.

**Chammas G, Saliba R, Béal C (2006).** Characterization of the fermented milk "laban" with sensory analysis and instrumental measurements. . *J. Food Sci.*, **110 (1)**: 52–S61.

**Cardinal M (2014).** Le lait vivant: source et ressources. Collectif "Santé des enfants face aux pollutions", Éd. asbl Vivre, Agora Media.

**Carr P, Geman H, Madan D, Yor M (2002).** The fine structure of asset returns: an empirical investigation. *J. Business*, **75**: 305–32

**Chekroun MD, Simonnet E, Ghil M (2011).** Stochastic climate dynamics: Random attractors and time-dependent invariant measures. *Physica D*, Doi:10.1016/j.physd.2011.06.005.

**Cogan TM (1996).** History and taxonomy of starter cultures. p1-23. *In*. Cogan TM, Accolas J-P (ed.), *Dairy starter cultures*. VCH Publishers, Inc., New York, New York.

**Corrieu G, Luquet F-M (2008).** Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments, *Ed. Tec. et Doc.* Lavoisier, Paris France, 849 p.

## D

**Desmazeaud M (1998).** Bactéries lactiques et qualité des fromages. Laboratoire de recherches laitières, INRA.

**DIB W, Biscola V, Choiset Y, Chobert J-M, Haertlé T, Chekroun A, Saidi D, Kheroua O (2014).** Characterization of a new isolate of *Lactobacillus brevis* WD19 from Algerian goat milk with proteolytic activity. *Glo. Adv. Res. J. Agric. Sci.*, **3(12)**: 423-432.

**Duboc P, Mollet B (2001).** Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int. Dairy J.* **11**: 759–768.

**Dupin H (1992).** Apports nutritionnels conseillés pour la population française. *In* : *Tech & Doc.* Lavoisier, Paris, France.

**Deforges J, Derens E, Rosset R, Serrand M (1999).** Maitrise de la chaine du froid des produits laitiers réfrigérés. Ed. *Cemagref Tec et Doc*, Paris.

## E

**Evette JL (1975).** La fromagerie. Paris : Presses universitaires de France, technique vivante.140p.

**Ennadir J, Hassikou R, Al Askari G, Arahou M, Bouazza F, Amallah L, Amine SA, Khedid K (2014).** Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées des farines de blé d'origine. *J. Mater. Environ. Sci.*, **5 (4)** : 1125-1132

## F

**FAO, 1995** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine.

**FAO (1975) Norme FAO. II , FAO/OMS , 1974;** Expert Committee on Food Additives. Tech Bull, **5**: 461-465.

## G

**Goldin BR (1984).** Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics and *Lactobacillus* decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes and glucuronides, *J. Natl. Cancer Institute.*, **73**: 689-95.

**Gill HS (2001).** Dietary probiotics enhance natural killer cell activity in elderly: an investigation of age-related immunologic changes, *J. Clin. Immunol.*, **21**: 264-271.

**Guy L, Vierling E (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments. Ed : 4<sup>ème</sup> éd –Rueil-Malmaison : Doin ; CRDP d’Aquitaine.

**Gaudichon C, Roos N, Mahé S, Sick H, Bouley C, Tomé D (1994).** Gastric emptying is a major regulatory system of nitrogen absorption kinetic of [15N]-labelled milk or yogurt in miniature pigs. *J. Nutr.*, **124**: 1970-1977.

**Guarner FG, Perdigon G, Corthier S, Salminen B, Koletzko A, Morelli L (2005).** Should yoghurt cultures be considered probiotic ?. *British J. Nutr.*, **93**:783-786.

**Guiraud (2003).** Méthode d'analyse en microbiologie alimentaire. In : Microbiologie alimentaire. Paris.

**Goy D, Jakob E, Haldemann J (2015).** Les fermentations lactiques. *Agroscope Transfer*, **59** : 1-16

## H

**Hilali L, Khattabi A, Nssarlah N, Maliki A, Finance C (2002)** Isolement des nouvelles souches d'Actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Rev. biol. Biotechnol.*, **2(1)** : 49-53.

## J

**Jeantet R, Croguennec T, Mahaut M, Schuck P, Brulé G (2006).** Science des aliments. Ed. Lavoisier, Paris 382 p.

**Jeantet R, Croguennec T, Mahaut M, Schuck P, Brulé G (2008).** Les produits laitiers. 2<sup>ème</sup> édition, Ed. TEC & DOC, Paris. p 23.

**Joffin JN, Leyral G (1996).** Microbiologie technique, Tome I, Dictionnaire des techniques, Bordeaux : centre régionale de documentation pédagogique, France, pp. 219–223

**Judge MA, Van Eys J (1962).** Excretion of n-lactic acid by humans. *J. Nutr.*, **76**: 310-313.

## K

**Kacem M, Karam NE (2006).** Physicochemical and microbiological study of “shmen”, a traditional butter made from camel milk in the sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. *Grasas y Aceites*, **57 (2)** : 198-204.

## L

**Lapointe-Vignola C, 2002**, Science Et Technologie Du Lait : tranformation du lait. Presses inter Polytechnique, Québec. p600.

**Larpent JP, Laprent MG (1990)**. Memento technique de microbiologies. Second Ed Tech et Doc, Lavoisier 417-420.

**Leroy F, De Vuyst L (2004)**. Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry, *Trends Food Sci. Technol.*, **15**: 67–78.

**Lamontagne M (2002)**. Produits laitiers fermentés, In Sciences et technologie du lait ; transformation du lait – Canada : presses internationales polytechniques- 600p.

## M

**Mazyoyer Marcel (2007)**. Larousse agricole Edition Larousse paris France p115-116-374-375-405

**Moreau M-C (2012)**. Unité d'écologie et de physiologie du système digestif à l'Inra.jrn: top santé.

**Mahé S, Fauquant J, Gaudichon C, Roos N, Maubois JL, Tomé D (1994)**. [15N]labelling and preparation of milk, casein and whey proteins. *Lait*, **74**: 307-312.

**Marchal N, Obre A., Buttion R., Boudon J.L. et Richard C.L, 1982**; Les Milieux de Cultures pour l'Isolément et l'Identification Biochimique des Bactéries. DOIN, 2ème Ed., Paris

## O

**Oberman H, Libudzisz Z (1998)**. Fermented milks, In: B.J.B. Wood (Ed.), *Microbiology of Fermented Foods*, second ed., vol. 1, Blackie Academic & Professional, pp. 308–350.

**Ouazzani Taybi N, Arfaoui A, Fadli M (2014)**. Evaluation de la qualité microbiologique du lait cru dans la région du Gharb, Maroc. *Int. J Innov. Sci. Res.*, **9**: 487-493.

## P

**Patrignani F, Lanciotti R, Mathara JM, Guerzoni ME, Holzappel WH (2006)**. Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. *Int. J. Food Microbiol.*, **107**: 1 – 11.

**Poznanski S, Lenoir J, Mocquot G (1965)**. La protéolyse de la caséine par les enzymes intracellulaires de certaines bactéries. *Lait*, **45** : 3-26.

## R

**RAY M-C (2013)**. Lait cru ou pasteurisé, entre tradition et hygiène. *Futura-Sciences*.

**Rastall RA, Gibson GR, Gill HS, Guarner F, Klaenhammer TR, Pot B, Reid G, Rowland IR, Sanders ME (2005)**. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **52**: 145–152.

**Righi M (2006)**. Microorganismes en action : le yaourt, PISTES, FSE, Université Laval. p 1.

**Rasic J, Curcic R, Stojavljevic T, Obradovic B (1971).** A study on the amino acids of yoghurt. *Milchwissenschaft*, **26** : 496-499.

**Ross PR, Morgan S, Hill C (2002).** Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.*, **79**: 3-16.

## T

**Tamime AY, Marshall VME (1997).** Microbiology and technology of fermented milks, In: B.A. Law (Ed.). *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Blackie Academic and Professional, pp. 57–152.

**Tome D (2002).** Lait fermentés : des antiques vertus aux nouvelles propriétés. *Le Quotidien du médecin*.

**Toba T, Watanabe A, Adachi S (1983).** Quantitative changes in sugars, especially oligosaccharides, during fermentation and storage of yogurt. *J. Dairy Sci.*, **66** : 17-20.

## V

**Vidal-Valverde C, Martin-Villa C, Herranz J (1984).** Determination of soluble carbohydrates in yogurts by high performance liquid chromatography. *J. Dairy Sci.*, **67**: 759-763.

## W

**Wouters JTM, Ayad EHE, Hugenholtz J, Smit G (2002).** Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.*, **12**: 91–109.

## Y

**Yao AA, Egounlety M, Kouame LP, Thonart P (2009).** Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l’Afrique de l’Ouest : leur utilisation actuelle. *Ann. Méd. Vét.*, **153** : 54-65.

**Yoon H (1999).** *New insights in the validation of systemic biomarkers for the evaluation of the immunoregulatory properties of milk fermented with yogurt culture and Lactobacillus casei (Actimel): a prospective trial.* *Int. J. Immunotherapy*, **XV**, 79-89.

## Z

**Zamfir M, Vancanneyt M, Makras L, Vaningelgem F, Lefebvre K, Pot B, Swings J, De Vuyst L (2006).** Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.*, **29**: 487–495.

# *Annexes*

## *Annexe 1*

### **1- Milieux généraux de croissance :**

La composition, exprimée en grammes par litre d'eau distillée, des milieux de culture utilisés dans ce travail pour la croissance des bactéries est la suivante:

#### **1-1 GN:**

Extrait De Viande : 1,0g/L

Extrait De Levure : 2,5g/L

Peptone : 5,0g/L

Chlorure De Sodium : 5,0 G/L

Agar : 15,0 g/L

pH : 7,0

#### **1-2 EOSINE DE BLEU DE METHYLENE:**

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pancréatique de gélatine 10,0 g

- Lactose 10,0 g

- Phosphate dipotassique 2,0 g

- Eosine Y 0,4 g

- Bleu de méthylène 65,0 mg

- Agar agar bactériologique 15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2

#### **1.3 CHAPMAN:**

(Pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales) Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone 5,0 g

- Peptone pepsique de viande 5,0 g

- Extrait de viande 1,0 g

- Mannitol 10,0 g

- Chlorure de sodium 75,0 g

- Rouge de phénol 25,0 mg

- Agar agar bactériologique 15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2.

#### **1-4 MRS :**

Peptone 10,0 g  
Extrait de viande 8,0 g  
Extrait de levure 4,0 g  
Glucose 20,0 g  
Acétate de sodium trihydraté 5,0 g  
Citrate d'ammonium 2,0 g  
Tween 80 1,0 ml  
hydrogénophosphate de potassium 2,0 g  
Sulfate de magnésium heptahydraté 0,2 g  
Sulfate de manganèse tétrahydraté 0,05 g  
Agar 10,0 g  
pH = 6,2

#### **1.5 OGA:**

- Extrait autolytique de levure 5,0 g
- Glucose 20,0 g
- Oxytétracycline 0,1 g
- Agar agar bactériologique 15,0 g

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C :  $6,6 \pm 0,2$ .

#### **1.6 Eau physiologies:**

Chlorure de sodium 9 g  
Eau distillée 1000 ml  
pH 7,0

#### **1.7 Composition milieu Möller:**

Valeur données en g.L<sup>-1</sup>:

Peptone pepsique de viande 5  
Extrait de viande 5  
Bromocrésol pourpre 0.01  
Rouge de crésol 0.005  
Glucose 0.5  
Pyridoxal 0.005  
pH 7.3

-Ajouter à 1% la lysine ou l'arginine ou l'ornithine selon la préparation.

## *Annexe 2*

### **Coloration de Gram :**

- 1- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
- 3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
- 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 fuschine 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.