



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Benslimane Badra

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie Appliquée

THÈME

**Etude de quelques propriétés
technologiques des bactéries lactiques
isolées à partir d'un lait cru de vache**

Soutenue publiquement le 11/07/2019

DEVANT LE JURY

Président	Nammiche Said	Professeur	Univ. Mostaganem
Encadreur	Henni Nassiba	MAA	Univ. Mostaganem
Examinatrice	Hennia Aicha	MCB	Univ. Mostaganem

Thème réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie « université de Mostaganem »

2018-2019

Avant tout, je remercie Dieu le tous puissant de m' avoir donné la force, le courage, la santé et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma reconnaissance à la directrice de ce mémoire, Madame Henni Nassiba, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils.

Je remercie tout les membres de mon jury d' avoir accepté d' évaluer ce travail

Je remercie aussi l' ensemble du personnel travaillant au laboratoire pédagogique de microbiologie de l' université d' Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.

Je dédie ce travail à ma famille qui m'a encouragé et soutenu durant mes études et particulièrement à :

Mon père, qui sera toujours présent dans mon cœur.

Ma mère, la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur.

Mes chères sœurs Fatima Zohra Nessrine, Houaria, Touria.

Mes chers frères Mohamed Amine, Houssine, Samir.

Les bactéries lactiques ont acquis une grande importance par leur présence dans l'industrie agro-alimentaire et ce depuis longtemps. Elles assurent des caractéristiques particulières telles que l'arôme, la texture et une bonne sécurité alimentaire grâce aux acides organiques produits qui abaissent le pH dans le milieu.

L'objectif de cette étude est d'isoler des bactéries lactiques à partir d'un lait cru de vache, et les sélectionner selon des tests phénotypiques, physiologiques et biochimiques. Ainsi l'étude de quelques caractéristiques technologiques intéressantes.

35 souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir d'un lait cru de vache, parmi ces souches Nous avons pré-identifié 12 souches par des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Les résultats indiquent la dominance du genre *Lactobacillus* (59%) avec trois espèces du genre : *Lb. plantarum*, *Lb. acidilactis*, *Lb. lactis*. suivie par le genre *Streptococcus* (33%) avec deux espèces : *S. thermophilus*, *S. diacetylactis*. et la dernière le genre *Enterococcus* avec l'espèce : *E. faecium*

Nous avons par la suite examiné ces souches pour leurs caractéristiques d'intérêt technologiques afin d'évaluer leurs pouvoirs aromatisant, texturant, l'activité protéolytique et lipolytique. Les résultats révèlent que les souches A7, A10, A12, A17, A19 ont un très bon potentiel d'un grand intérêt dans l'industrie fromagère.

Mots clés : Lait cru de vache, Bactéries lactiques, l'industrie alimentaire, Tests phénotypiques, physiologiques, et technologique.

Lactic acid bacteria have become very important because of their presence in the agro-food industry for a long time. They provide special characteristics such as aroma, texture and good food safety thanks to organic acids produced that lower the pH in the environment.

The objective of this study is to isolate lactic acid bacteria from raw cow's milk, and select them according to phenotypic, physiological and biochemical tests. This study of some interesting technological features.

35 strains of lactic acid bacteria were isolated from raw cow milk, among these strains. We identified 12 strains by morphological, physiological and biochemical tests and evaluated their technological potential.

The results indicate the dominance of the genus *Lactobacillus* (59%) with three species of the genus: *Lb. plantarum*, *Lb. acidilactis*, *Lb. lactis*. Following by the genus *Streptococcus* (33%) with two species: *S. thermophilus*, *S. diacetylactis*. And the last the genus *Enterococcus* with the species: *E. faecium*.

we have subsequently examined these strains for their characteristics of technological interest in order to evaluate their flavoring, texturing, proteolytic and lipolytic activity. The results reveal that the strains A7, A10, A12, A17, A19 have a very good potential of a great interest in the plant. cheese industry

Key words: Raw cow milk, Lactic bacteria, Food industry, Technology test.

➤ **Liste d'abréviations**

ADH	Arginine Dihydrolase
BCP	Pourpre de bromocrésol
BL	Bactérie lactique
°C	Degré Celsius
CO₂	Dioxyde de carbone
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
EPS	Exopolysaccharides
Lb	Lactobacillus
MRS	Man Rogosa et Sharpe
NaCl	Chloride de Sodium
St	Streptococcus
En	Enterococcus
VP	Voges-Proskauer

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Composition physico-chimique moyenne du lait.	3
2	Principaux composants du lait de vache	4
3	Caractères organoleptiques du lait cru	5
4	Principaux milieux de dénombrement des bactéries lactiques	17
5	Résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur l'échantillon du lait.	24
6	Critères morphologiques des bactéries lactiques isolées à partir de lait de vache.	25
7	Les résultats de pré-identification des souches isolées	31
8	Profils fermentaires des souches	33
9	Les résultats d'identification des souches lactiques (genre et espèce)	34
10	Résultats de l'activité protéolytique des souches sur milieu PCA additionné de lait écrémé à 1% et 2%.	36
11	Résultats de l'activité lipolytique.	38
12	Résultats de production de dextrane par les souches lactiques isolées.	39
13	Résultat de l'antibiogramme des souches lactiques isolées.	40

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Proportion relative des principaux composants du lait	2
2	Voies homofermentaire, hétérofermentaire et bifide de la dégradation du glucose.	8
3	Application industrielles des bactéries lactiques	10
4	protocole d'isolement et purification des bactéries lactiques.	18
5	Aspect macroscopique des bactéries lactiques isolées à partir d'un lait cru de vache sur milieu MRS.	25
6	Aspect microscopique des isolats après coloration de Gram indiquant (X100)	26
7	Résultats de purification sur milieu : a) M17 b) MRS	27
8	Résultat du test de catalase.	27
9	Résultat du type fermentaire.	28
10	Résultats du test de l'ADH	28
11	Test de croissance en milieu hyper salé : a) 6,5 % b) 4,6 %	29
12	Test de croissance à différents pH : a) pH 4,6 ; b) pH 9,6	29
13	Résultat de la thermorésistante à 60°C pendant 30 min	30
14	Résultat de test de croissance sur lait de Sherman à 1% de bleu de méthylène.	30
15	Résultat de test de croissance sur lait de Sherman à 3% de bleu de méthylène.	31
16	Proportions des souches lactiques isolées à partir du lait cru de vache.	32
17	Résultats de profil fermentaire des isolats.	34
18	Proportions des résultats d'identification des souches lactiques « genre et espèce »	35
19	Résultats du test de production d'acétoïne	35
20	Zones claires traduisant l'activité protéolytique des souches.	36
21	Résultats de l'activité lipolytique sur milieu MRS	37
22	Résultat des EPS sur milieu hypersaccharosé MSE.	38
23	résultat de la zone d'inhibition de la souche A5 vis-à-vis les antibiotiques.	39

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Table des matières

Introduction

Partie 1 : Rappels bibliographique

1. Définition du lait	2
2. Caractéristiques physico-chimique du lait	2
3. Composition du lait	4
4. Caractéristiques organoleptiques	5
5. Flore microbienne du lait	5
5.1. Flore originelle	5
5.2. Flore de contamination	6
2 Les bactéries lactiques	6
2.2 Généralité sur les bactéries lactiques	6
2.2 Définition et caractéristiques principales	6
2.3 Caractères morphologiques	6
2.4 Classification des bactéries lactiques	7
2.5 Taxonomie des bactéries lactiques	7
2.6 Origine	7
2.7 Voies métaboliques des bactéries lactiques	8
2.8 Métabolisme des composés azotés	9
3. Fermentation lactique	9

3.1 Importance industrielle des bactéries lactiques	9
3.2 Genre Leuconostoc	10
3.3 Genre Lactobacillus	11
3.4 Genre Streptococcus	11
3.5 Genre Lactococcus	12
3.6 Genre Pediococcus	12
3.7 Genre Enterococcus	12
4. Rôle des bactéries lactiques	13
5. Propriétés technologiques attendues des bactéries lactiques	13
5.1 Activité acidifiante	13
5.2 Activité protéolytique	13
5.3 Activité lipolytique	14
5.4 Activité aromatisante	14
5.5 Activité texturante	14
5.6 Activité antimicrobienne	14
5.7 Activité probiotique	15
Partie 2 : Matériel et méthodes	
1. L'échantillonnage et techniques de prélèvement du lait	16
2. Analyses physico-chimique	16
3. Isolement et purification des bactéries lactiques	16
3.1. Préparation des dilutions décimales	17
3.2. Isolement	17
3.3. Purification	18

4. Conservation des isolas	19
4.1. Conservation à court terme	19
4.2. Conservation à long terme	19
5. Pré-identification des souches	19
5.1. Examen macroscopique	19
5.2. Examen microscopique	19
6. Identification physiologiques et biochimiques	20
6.1. Recherche de la catalase	20
6.2. Croissance à différentes températures	20
6.3. Type fermentaire	20
6.4. Recherche de l'Arginine di hydrolase (ADH)	20
6.5. Test de production d'acétoine	21
7. Croissance dans des conditions hostiles	21
7.1. En présence de NaCl	21
7.2. En différentes pH : (pH=9,6 ; 4,6)	21
7.3. Test de thermorésistante	22
7.4. Test de croissance sur le lait de Sherman	22
8. Profil fermentaire	22
9. Etude de quelques propriétés technologiques des bactéries lactiques	22
9.1. Pouvoir protéolytique	22
9.2. Pouvoir lipolytique	23
9.3. Production de dextrane	23
9.4. Résistance aux antibiotiques	23

Partie 3 : Résultats et discussion

1. L'analyse physico-chimique du lait cru de vache	24
2. l'isolement des bactéries lactiques	24
2.1. Caractères macroscopiques	24
2.2. Caractères microscopiques	25
2.3. Purification des isolats	27
3. Les tests physiologiques et biochimiques	27
3.1. Résultat du test de catalase	27
3.2. Croissance à différentes températures	27
3.3. Type fermentaire	28
3.4. Test de l'Arginine dihydrolase (ADH)	28
4. Croissance dans des conditions hostiles	29
4.1. En présence de NaCl	29
4.2. En différentes pH : (pH=9,6 ; 4,5)	29
4.3. Test de thermorésistante	29
4.4. Test de croissance sur le lait de Sherman	30
5. Profil fermentaire	33
6. Résultats de quelques propriétés technologiques des bactéries lactiques	35
6.1. Test de production d'acétoïne	35
6.2. Pouvoir protéolytique	36
6.3. Pouvoir lipolytique	37
6.4. Production de dextrane	38
6.5. Résultats du test de résistance aux antibiotiques	39

Discussion générale 41

Conclusion 43

Références bibliographiques

Annexes

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

Les bactéries de l'acide lactique (BAL), contaminant naturellement le lait ou additionnées sous forme de souches sélectionnées, jouent un rôle primordial dans la bio-conservation des aliments fermentés dérivés de matières agricoles tel que le lait. Elles possèdent les atouts technologiques essentiels pour l'obtention d'une bio-conservation optimale (Achemchem, 2014).

Les enjeux industriels correspondants à la production et à l'usage de bactéries lactiques sont très importants en raison du nombre élevé de produits dans lesquels elles sont utilisées et de la taille de marchés correspondants, en particulier dans le secteur des produits laitiers (Monnet et *al.*, 2008).

L'objectif de ce travail consiste à isoler des bactéries lactiques à partir du lait cru de vache, et d'estimer quelques aptitudes technologiques. Ce mémoire comprend deux parties, un rappel bibliographique consacré à la présentation d'une généralité sur le lait et les bactéries lactiques, et une autre partie pratique sur l'étude expérimentale.

Le présent vise l'étude de pouvoir technologique des souches isolées. La sélection d'un ferment lactique doit prendre en compte des critères de performance des bactéries (Béal et *al.*, 2008).

Les bactéries lactiques utilisées dans l'industrie laitière génèrent un ensemble de propriétés que l'on peut : production de l'acide lactique à partir du lactose, génération d'un large éventail de composés d'arômes qui contribuent à l'établissement des propriétés organoleptiques, production d'exopolysaccharides qui agissent comme des agents de texture, production de CO₂ contribuant à la formation d'ouverture dans les fromages et au caractère pétillant des laits fermentés (Monnet et *al.*, 2008).

Rappels
bibliographiques

1. Définition du lait :

C'est en 1909 que le congrès international de la répression des fraudes a défini le lait : « *le lait est le produits intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum (premier lait de la femelle* » (Joffin et Joffin, 2010).

Le lait est un liquide blanc, opaque, deux fois plus visqueux que l'eau, de saveur sucrée et d'odeur peu accentuée (Billon, 2009).

2. Caractéristiques physico-chimique du lait :

Le lait peut être considéré comme une émulsion de matière grasse dans une solution comprenant de nombreux éléments dont certains dissous (lactose, certains composés azotés, matière minérales et sels), et d'autre présents sous forme colloïdale (particules organisées et en suspension) comme les caséines (Billon, 2009).

Les proportions de ces éléments sont illustrées par la figure 1. L'eau est l'élément le plus important quantitativement : elle représente près de 9/10 du lait. Les autres éléments constituent la matière sèche totale qui s'élève couramment entre 125 et 130 g par litre de lait (Billon, 2009).

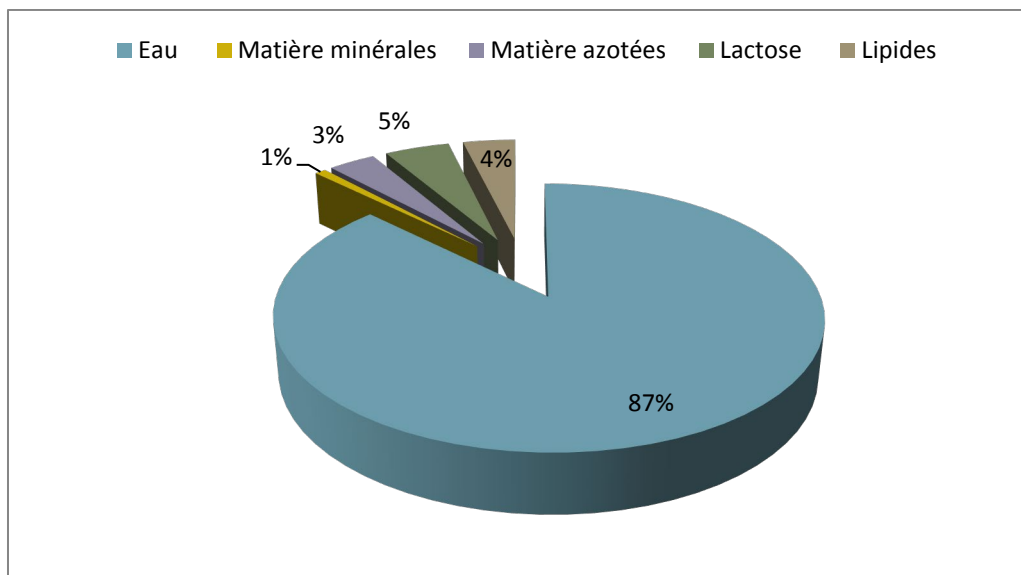


Figure 1 : Proportion relative des principaux composants du lait

Le lait contient de nombreuses vitamines : A, C, D, E, B1, B2, B6, B12. Le gaz carbonique, l'oxygène et l'azote, tous dissous dans le lait, représente environ 5 % de son volume (Billon, 2009).

Les principales caractéristiques physique et physico-chimique du lait sont résumées au tableau 1 : (Billon, 2009).

Tableau 1 : Composition physico-chimique moyenne du lait.

paramètre	Valeurs moyennes
Densité à 20°C	1,028 à 1,034
Chaleur spécifique	0,93
Point d'ébullition	+100,55°C
pH	6,6 à 6,8
Acidité (exprimées en degrés Dornic*)	16 à 18°C
Conductivité électrique	4,0 à 5,5 ms/cm à 25°C
Valeur énergétique	275 KJ/ml

* : 1°Dornic correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait

3. Composition du lait :

Le lait est fluide biologique dont la composition et la structure sont complexes et variables, le tableau 4 présente les principaux composants du lait. (Monnet et *al.*, 2008).

Tableau 2 : Principaux composants du lait de vache (d'après Alais, 1984)

composants	Concentrations (g/L)
Eau	905
Glucides (lactose)	49
Lipides :	35
dont matières grasses	34
dont lécithine (phospholipides)	0,5
dont partie insaponifiable (stérols, carotènes, tocophérols)	0,5
Protides :	34
dont caséines	27
dont protéines solubles (globulines, albumines)	5,5
dont substances azotées non protéiques	1,5
Sels :	9
dont acide citrique	2
dont acide phosphorique	2,6
dont chlorure de sodium	1,7
Constituants divers (vitamines, enzymes, gaz dissous)	Traces

4. Caractéristiques organoleptiques :

Tableau 3 : Caractères organoleptiques du lait cru (Joffin et Joffin, 2010).

Caractère examiné	cas normal	Cas anormal
Couleur	<ul style="list-style-type: none"> - Blanc mat : lait normal - Blanc jaunâtre : lait riche en crème - Blanc bleuâtre : lait écrémé ou fortement mouillé (anormale) 	<ul style="list-style-type: none"> - Gris jaunâtre : lait de rétention, lait de mammite - Bleu, jaune : lait coloré par des substances chimiques (bleu de méthylène, dichromate....) ou des pigments microbiens - Blanc bleuâtre : lait écrémé (normale) ou fortement mouillé
Odeur	Odeur faible	Odeur de putréfaction
Saveur	Saveur caractéristiques et agréable (variable selon le degré de chauffage du lait)	<ul style="list-style-type: none"> - saveur salée : lait de rétention ou lait de mammite - Gout amer : lait très pollué par des bactéries
Consistance	Aspect homogène	<ul style="list-style-type: none"> - Aspect grumeleux : lait de mammite - Aspect visqueux ou coagulé : lait très pollué par des bactéries

5. Flore microbienne du lait :

5.1. Flore originelle :

Le lait contient peu de micro-organisme lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10^3 germes/ml). Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques mais aussi streptocoques lactiques (*Lactococcus*) et lactobacilles. Le lait cru est protégé contre les bactéries par

substances inhibitrices appelées « lacténines » mais leur action est de très courte durée (1 heure environ). D'autres micro-organismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade : ils sont généralement pathogènes et dangereux au point de vue sanitaire (Guiraud, 1998).

5.2. Flore de contamination :

Le lait se contamine par des apports microbiens d'origines diverses (Guiraud, 1998) :

- fèces et téguments de l'animal : coliformes, entérocoques, clostridium, éventuellement Entérobactéries pathogènes (Salmonella, Shigella, Yersinia), etc.
- sol : Streptomyces, Listeria, bactéries sporulées, spores fongiques, etc.
- litières et aliments : flore banale variée, en particulier lactobacilles, Clostridium butyriques (ensilages).
- air et eau : flores diverses dont Pseudomonas, bactéries sporulées, etc.
- équipement de traite et de stockage du lait : microcoques, levures et flores lactiques avec lactobacilles, streptocoques (Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus), Leuconostoc, etc. cette flore est souvent spécifique d'une usine.
- manipulateurs : staphylocoques dans le cas de traite manuelle, mais aussi germes provenant d'expectorations, de contamination fécale.

2 Les bactéries lactiques :

2.1 Généralité sur les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans les procédés de fermentation permettant la conservation de produits alimentaire. Ces denrées bénéficient ainsi d'une meilleure conservation, mais elle acquièrent aussi certains de leurs propriétés, comme le goût et la texture, voire une action favorable sur la santé. De plus elles ont souvent une forte identité culturelle, renforçant ainsi leur importance dans les sociétés humaines. La fermentation lactiques est principalement le fait de quelques groupes de bactéries gram-positives dont les représentants les plus connus sont *L. lactis*, *S. thermophilus*, et quelques espèces de lactobacilles et de leuconostoc. La plupart des études de génétiques ont porté sur ces quelques espèces, bien que de très nombreuses autres espèces existent, en particulier dans les produits traditionnels ou les flores sont < naturelles > (Renault, 2008).

2.2 Définition et caractéristiques principales :

Les bactéries lactiques appelées aussi bactéries de l'acide lactique (BAL) constituent un groupe très hétérogène de micro-organismes partageant divers aspects morphologiques, métaboliques et physiologiques, et dont la caractéristique fondamentale est la production de l'acide lactique comme produits principal de leur métabolisme fermentaire. Les BAL sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes, elles sont Gram positive, généralement immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotoleérantes (microaérophiles). Elles sont dépourvues de nombreuses activités enzymatiques comme le catalase, la nitrate réductase et la cytochrome oxydase (Achemchem, 2014).

2.3 Caractères morphologiques :

Il existe chez les bactéries lactiques deux types morphologiques bien distinctes : les coques et les bacilles ; les premiers de 0,5 à 1,5 μm de diamètre, les seconds de 0,5 à 2 μm de diamètre, et de 1,5 à environ 10 μm de long (Desmazeaud, 1992) :

Dans les genres *Streptococcus* et *Lactococcus*, la division cellulaire donne des sphères ovoïdes groupées en paires ou en chaînette, dans un seul plan.

Le genre *Leuconostoc* présente des cellules de forme lenticulaire groupées en paires ou en chaînette courtes.

Le genre *Pediococcus* donne des sphères groupées en paires ou en tétrade dans deux plans.

Le genre *Lactobacillus* recouvre des espèces de morphologie plus variée. Les cellules sont des bâtonnets plus ou moins allongés, groupés en paires, ou en chainettes.

2.4 Classification des bactéries lactiques :

Il est possible de classer les BAL suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides. En effet les bactéries homolactiques strictes produisent uniquement de l'acide lactique, alors que les bactéries hétérolactiques peuvent produire de l'acides acétique, de l'éthanol et du CO₂ en plus de l'acide lactique. Les BAL homolactiques sont représentées par les genres *Lactococcus*, *pediococcus*, *Enterococcus* et certaines espèces de *Lactobacillus*, alors que le genre *Leuconostoc* et certaines espèces de *Lactobacillus* appartiennent aux hétérolactiques (Achemchem, 2014).

2.5 Taxonomie des bactéries lactiques :

L'application d'hybridation des acides nucléiques et des techniques de séquençage conduit à diviser les coques en 5 groupes : *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pedococcus* et *Leuconostoc*. Le genre *Streptococcus* comprend les Streptocoques pathogènes (pyogènes, mutans des caries dentaires) et *Streptococcus salivarius*. Le second groupe est formé des entérocoques typiques, ils sont englobés dans le genre *Enterococcus*. Le troisième groupe englobe les streptocoques lactiques intéressant le domaine laitier (Desmazeaud, 1992).

Le quatrième groupe est formé des *Leuconostoc*. Il subsiste quatre espèces : *Ln. Mesenteroides*, *Ln. Paramesenteroides*, *Ln. Lactis* et *Ln. Oenos*. Le cinquième groupe est formé des pédiocoques. Ces germes ont une fermentation homolactique. Le genre *Lactobacillus* comprend 50 espèces qui peuvent être scindées en trois groupes : Les lactobacilles homofermentaires stricts, les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et les lactobacilles hétérofermentaires stricts (Desmazeaud, 1992).

2.6 Origine :

La présence de bactéries lactiques est révélée dans de nombreux milieux :

Les espèces des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* ou *Leuconostoc* se rencontreront plutôt chez les hommes, les animaux et les oiseaux ; on peut les isoler de la peau des animaux, des matières fécales et des poussières, mais aussi de l'ensilage, du foin ou des grains.

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont encore plus répandues dans la nature. Par exemple, on les trouve dans les végétaux où elles assureront l'acidification de l'ensilage. On les trouve aussi dans l'intestin des animaux et de l'homme, car *Lb. acidophilus* résiste aux sels biliaires. On les isole également des cavités naturelles de l'organisme. Les espèces du genre *pediococcus* ne se rencontrent pratiquement que sur les plantes (Desmazeaud, 1992).

2.7 Voies métaboliques des bactéries lactiques :

L'une des caractéristiques des bactéries lactiques (LB) est qu'elles ne sont capables de cataboliser qu'un nombre plutôt réduit de source de carbone, et via des voies métaboliques linéaires relativement simples. Suivant les genres ou espèces, elles utilisent l'une des trois voies suivantes du métabolisme des sucres : la voie homofermentaire, la voie hétérofermentaire et la voie bifide (Atlan et al., 2008). (Figure 2)

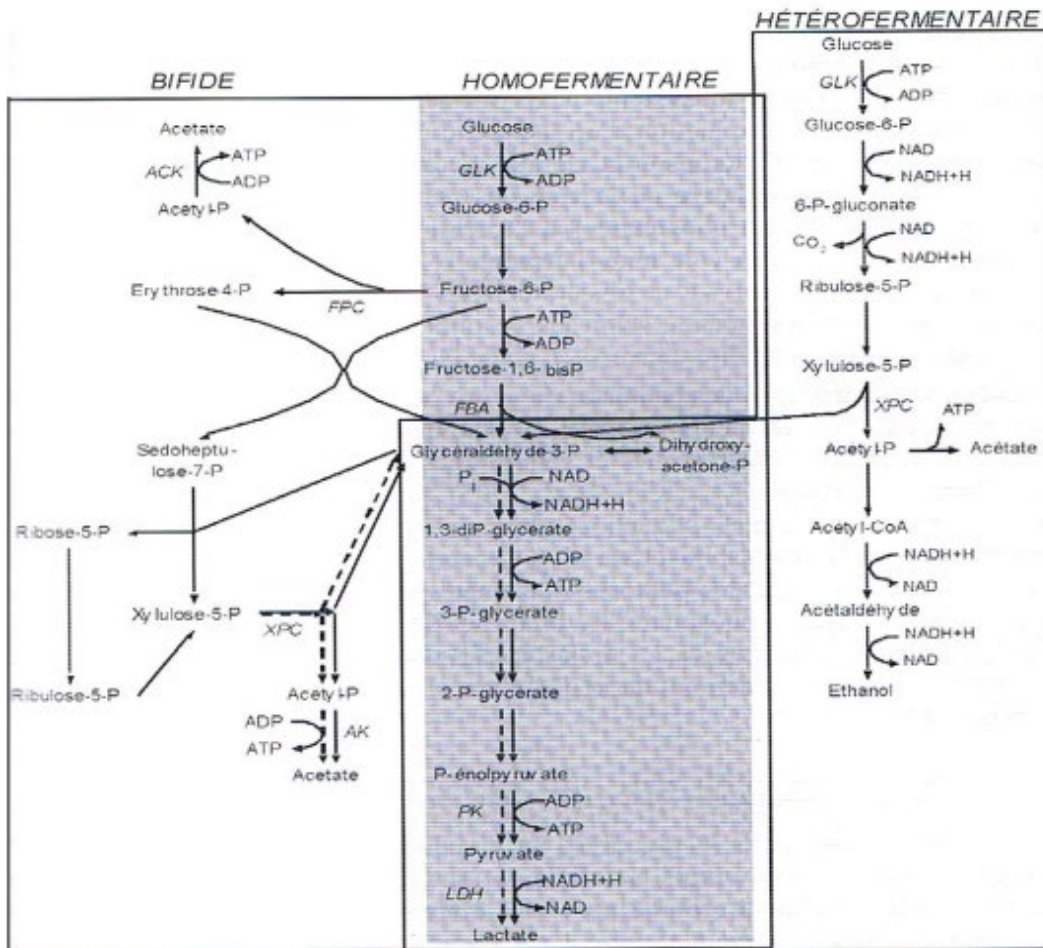


Figure 2 : Voies homofermentaire, hétérofermentaire et bifide de la dégradation du glucose.

GLK : glucokinase, FBA : fructose-1,6-bisphosphate aldolase, FPC : fructose-phosphate phosphocétolase, XPC : xylose-5-phosphate phosphocétolase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase, ACK : acétate kinase.

La voie homofermentaire, qui emprunte la glycolyse dans sa totalité (du glucose-6-P jusqu'au pyruvate), est généralement associée aux bactéries des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus* (Atlan et *al.*, 2008).

La glycolyse est une voie métabolique centrale chez les bactéries lactiques homo-fermentaire. Elle permet, en particulier, de fournir l'essentiel de l'énergie dont la cellule a besoin (Renault, 2008).

La glycolyse conduit, en condition optimale de croissance, à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose (Thompson et Gentry-Weeks, 1994) (Atlan et *al.*, 2008).

2.8 Métabolisme des composés azotés :

Le métabolisme azoté et l'approvisionnement en acides aminés sont essentiels pour une bonne croissance des bactéries. Cet approvisionnement peut se faire soit en important une source exogène d'acides aminés, soit en synthétisant des acides aminés à partir d'une source azotée plus simple. L'utilisation des protéines du milieu est la voie la plus efficace pour assurer une bonne croissance chez les bactéries lactiques bien qu'elles soient capables de synthétiser de nombreux. La protéolyse, processus essentiel lors de la croissance de *L. lactis* dans le lait, est le fait d'un système combinant différentes perméases et peptidases (Renault, 2008).

3 Fermentations lactiques :

Elles sont provoquées par de très nombreuses bactéries. La fermentation lactique est une étape essentielle dans la fabrication des fromages et yaourts (Guiraud, 1998).

3.1 Importance industrielle des bactéries lactiques :

La maîtrise de la préparation industrielle des ferments lactiques en bioréacteur et le statut GRAS « *generally recognized as safe* » des bactéries lactiques offrent la possibilité de les manipuler pour en faire des usines cellulaires pour la production d'ingrédients à usage alimentaire, chimique ou pharmaceutique (Atlan et *al.*, 2008).

Les bactéries lactiques, spécialement les genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*, sont les composants fondamentaux des cultures initiatrices (*starter*) utilisées dans l'industrie alimentaire (Achemchem, 2014).

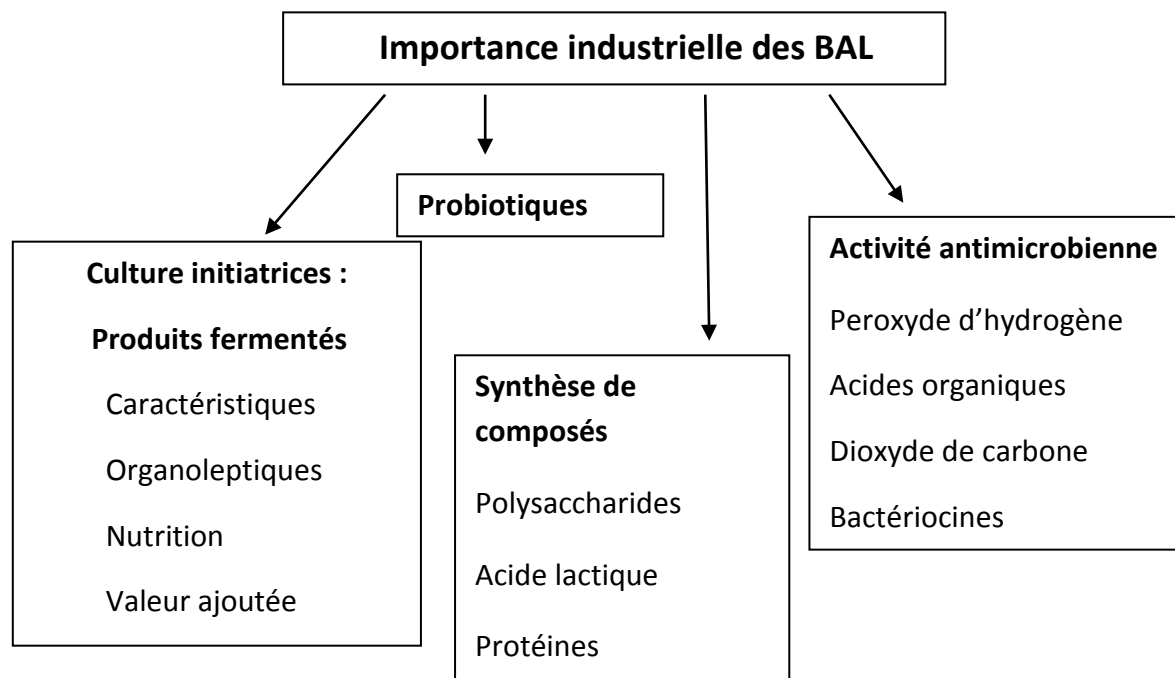


Figure 3 : Application industrielles des bactéries lactiques (Achemchem, 2014).

Les bactéries lactiques ont toujours joué un rôle considérable et multiple dans la conservation et la transformation du lait et des produits laitiers, notamment des laits fermentés, des crèmes, du beurre et des fromages (Weber, 1992).

Les avantages liés à l'utilisation des bactéries lactiques par les industries alimentaires est la croissance rapide, la nécessité de procédés de fermentation courts et simples, la non production de toxines et le développement des outils génétiques (Achemchem, 2014).

3.2 Genre *Leuconostoc* :

Les cellules de *Leuconostoc* sont des coques en paires ou en chaînes comme les entérocoques mais cette bactérie est hétérofermentaire produisant l'acide D(-) lactique, l'éthanol et le CO₂. Les leuconostocs sont mésophiles (optimum : 20-30°C) (Achemchem, 2014).

Sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel (Guiraud, 1998).

Les leuconostocs sont essentiellement utilisés pour leur production de composés aromatiques (diacétyle, acétoïne) (Chamba, 2008).

3.3 Genre *Lactobacillus* :

Lactobacillus est le genre principal de la famille des Lactobacillaceae. Il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique.

Il s'agit de bacilles souvent allongés, Gram +, asporulés, parfois groupés en paires ou en chaînes, généralement immobiles. Ils sont catalase -, micro-aérophiles ou anaérobies. Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique. Certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactiques produisant des acides volatils, de l'éthanol et du CO₂ à côté de l'acide lactique (Guiraud, 1998).

Comme ils produisent de l'acide lactique, ils préfèrent les conditions acides relatives (pH 5,5 à 6,5) (Pot, 2008).

Les lactobacilles homofermentaire obligés (exemple : *L. delbrueckii*) utilisent la voie de la glycolyse ; les pentoses et le gluconate ne sont pas fermentés. Parmi les hétérofermentaires, certains sont facultatifs (exemple *L. casei*) : ils utilisent la glycolyse ou le cycle des pentoses (Guiraud, 1998).

3.4 Genre *Streptococcus* :

Les bactéries du genre *Streptococcus* sont des cocci Gram positif, non mobiles catalase négatives et anaérobies facultatifs. La fermentation des glucides est homofermentative. Le contenu en G + C % de l'ADN est compris entre 33 et 42 (Poutrel, 1992).

Le genre *Streptococcus* était réservé aux cellules chimio-organotrophes coccoides ou coccobacillaires ne formant pas de spores, disposées en paires ou en chaînes. Fermenter les glucides avec l'acide lactique comme produit final principal et sont généralement aérotolérants (Pot, 2008).

Streptococcus thermophilus est le seul streptocoque habituellement utilisé en fromagerie. Bien que thermophile, sa température optimale de croissance étant comprise entre 40 et 44 °C, elle est capable de développer entre 20 et 30°C, mais beaucoup plus lentement (Chamba, 2008).

3.5 Genre *Lactococcus* :

Les lactocoques peuvent être clairement séparés des genres pathogènes de streptocoques. Le genre *Lactococcus* comprend actuellement cinq espèces validées. Le plus connu est *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*. Ces sous espèces se trouvent principalement dans les produits laitiers (lait cru, lait fermenté, fromage) (Pot, 2008).

Lactococcus lactis est la seule espèce de lactocoque utilisée industriellement en fromageries (Holler et Steele, 1995). C'est une bactérie lactique mésophile dont la température optimale de croissance est comprise entre 30 et 35°C (Chamba, 2008). De forme sphérique ou ovoïde, isolé ou en paire, ou en chaîne (Zergoug, 2016). *L. lactis* n'acidifie pas très rapidement mais peut abaisser le pH du lait jusqu'à 4,2 (Chamba, 2008).

3.6 Genre *Pediococcus* :

Immobilisés de forme sphériques parfois ovoïdes, isolés ou en paires qui se divisent en deux directions perpendiculaires formant ainsi les tétrades mais jamais les chaînes, la température optimale de croissance est comprise entre 25°C à 35°C (Zergoug, 2016).

Les *pediococcus* sont des germes microaérophiles à besoins nutritifs complexes. Leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. De nombreuses espèces sont acidophiles et osmophiles (Chougrani, 2008).

3.7 Genre *Enterococcus* :

Les *Enterococcus* sont des coques gram +, catalase -, ce sont des bactéries non sporulés parfois mobiles, aéro-anaérobies (anaérobies aéro-tolérantes), généralement homofermentaires (la fermentation du glucose conduit à la formation d'acide lactique), fermentant les sucres sans production de gaz (Chougrani, 2008).

Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6,5% de NaCl, un pH 9,6 et un intervalle de température compris entre 10°C et 45°C, avec une optimale de croissance de 35°C à 37°C (Zergoug, 2016).

4 Rôle des bactéries lactiques :

La fabrication du fromage est le moyen le plus anciennement connu pour conserver le lait (Chamba, 2008).

L'importance technologique et industrielle des bactéries lactiques et probiotiques est considérable. Ces micro-organismes sont en effet très largement utilisés comme auxiliaire technologique dans les industries alimentaires, pour transformer des matières premières très diverses, soit d'origine animale (lait, viandes, poissons), soit d'origine végétale (fruits, légumes, céréales). Ces transformations aboutissent à une grande diversité de produits, parmi lesquels on peut citer les fromages (dans lesquels les bactéries lactiques sont associées à d'autres micro-organismes tels que des bactéries de surface, des bactéries propioniques, des levures et des moisissures), les laits fermentés (yaourts, lait fermentés probiotiques), les produits carnés et végétaux (Béal et *al.*, 2008).

5 Propriétés technologiques attendues des bactéries lactiques :

5.1 Activité acidifiante :

La croissance des bactéries lactiques dans le lait, puis le caillé, entraîne la consommation du lactose et l'excrétion de l'acide lactique conduisant à l'abaissement du pH. Cette fonction acidifiante des bactéries lactiques est déterminante dans le processus d'élaboration des fromages (Chamba, 2008).

Il existe entre les espèces de bactéries lactiques de grandes différences d'activité acidifiante qui se traduisent au niveau des vitesses et des quantités d'acide lactique produites. Par exemple, à sa température optimale, *S. thermophilus* acidifie plus rapidement que les lactocoques et les lactobacilles, mais il produit moins d'acide lactique qu'eux ; ce sont les lactobacilles homofermentaires qui produisent la plus grande quantité d'acide lactique (Chamba, 2008).

5.2 Activité protéolytique :

La protéolyse constitue l'un des phénomènes majeurs de l'affinage des fromages. Elle agit aussi bien sur la texture de la pâte que sur sa saveur et son arôme (Chamba, 2008). Les bactéries lactiques disposent des systèmes enzymatiques permettant d'hydrolyser les caséines et les polypeptides. Elles possèdent une ou plusieurs protéinases de paroi nécessaires à leur métabolisme azoté (Chamba, 2008).

La protéolyse due aux bactéries lactiques va surtout conduire à des peptides courts et à des acides aminés libres. Ces derniers sont des précurseurs pour de nombreux produits d'arôme (Desmazeaud, 1992).

5.3 Activité lipolytique :

La lipolyse de la matière grasse du lait libère des acides gras qui participent, soit par eux-mêmes, soit parce qu'ils sont à l'origine d'autres composés aromatiques, tels qu'alcools, cétones, esters, lactones, aux caractéristiques sensorielles des fromages. Les fromages maigres sont généralement moins aromatiques que les fromages gras. Parmi les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *S. thermophilus* et les lactobacilles thermophiles (Chamba, 2008).

5.4 Activité aromatisante :

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés d'arômes, principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses (Béal et al., 2008).

5.5 Activité texturante :

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des exopolysaccharides (EPS) dont l'accumulation provoque une augmentation de la viscosité des milieux. Cette activité est particulièrement intéressante lors de l'élaboration des laits fermentés tels que les yaourts brassés (Béal et al., 2008).

Les EPS jouent un rôle important dans les propriétés texturantes (viscosité, formation d'un gel). Par exemple, la texture du yoghourt est liée à la quantité et au type d'EPS produit (Atlan et al., 2008).

5.6 Activité antimicrobienne :

Les bactéries lactiques ont, depuis toujours, fait preuve d'une remarquable activité antimicrobienne dirigée, à la fois, contre des germes pathogènes et d'autres responsables de la détérioration de la putréfaction des aliments (*Clostridium*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus*,...) contaminant les produits alimentaires. L'action inhibitrice des BAL est fondamentalement due à la diminution du pH occasionnée par la production des acides organiques (acide lactique, acide acétique, et acide formique) au cours du métabolisme des hydrates de carbones (Achemchem, 2014).

5.7 Activité probiotique :

Un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation des cultures lactiques ou « probiotiques » ayant des effets bénéfiques pour la santé pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore en alimentation animale. La notion de probiotique s'applique à des micro-organismes qui peuvent être employés comme étant un « supplément alimentaire vivant pour affecter de façon bénéfique la santé de l'homme et de l'animal en améliorant son équilibre intestinal» (Achemchem, 2014).

Matériel
et
Méthodes

Matériels et méthodes

✓ L'objectif

Les objectifs de cette étude se basent autour des points suivant :

- Isolement des bactéries lactiques à partir du lait cru de vache de la région Ouest d'Algérie (Mostaganem).
- L'étude des caractéristiques phénotypiques, physiologiques et biochimiques des isolats.
- L'identification phénotypique, physiologique et biochimique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de vache.
- L'étude de quelques propriétés technologiques de bactéries lactiques isolées.

✓ Lieu et période d'étude

Ce travail à été réalisé au laboratoire de microbiologie de l'université d'Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem durant une période de quatre mois (mars-juin) de l'année 2019.

Méthodologie

1. L'échantillonnage et techniques de prélèvement du lait

La collecte du lait a été réalisée dans des conditions aseptiques afin d'évité toute contamination qui peut influencer sur la flore lactique du lait, en lavant les mamelles de l'animal avec de l'eau javellisée. Le lait a été recueilli dans des flacons stériles de 250 ml et transporté au laboratoire.

2. Analyses physico-chimique

Pour déterminé les paramètres : la matière grasse, protéine, lactose, densité, pH, acidité dornic. L'échantillon du lait de vache à été analysé par l'appareil Lactoscan.

3. Isolement et purification des bactéries lactiques

L'isolement des bactéries lactiques à été fait après incubation à 30°C de l'échantillon jusqu'à coagulation.

3.1. Préparation des dilutions décimales

Après homogénéisation de l'échantillon du lait, par une pipette pasteur stérile, un volume de 1 ml est pris et additionné aseptiquement à 9 ml de milieu de dilution peptone-sel (0,5 g/L peptone et 8,5g/L de chlorure de sodium) pour l'obtention de la dilution 10^{-1} . Ensuite, 1 ml de cette dernière est pris et additionné à 9 ml de milieu de dilution pour réaliser la dilution 10^{-2} , et le processus a été continu ainsi jusqu'à l'obtention de la dernière dilution 10^{-6} .

3.2. Isolement

L'ensemencement a été réalisé à partir de trois dilutions décimales : 10^{-3} , 10^{-4} , et 10^{-5}

Chaque dilution a été ensemencée sur deux milieux gélosés :

- Le milieu M17 additionné de 1% (P/V) de lactose et ajusté à pH 6,8 est préalablement coulé et solidifiée dans des boites de pétri, prendre 0,1 ml des dilutions et ensemencer à la surface avec un râteau. Incubées les boites à 37°C et 42°C pendant 24 à 48 heures en aérobie.
 - Le glycérophosphate de sodium, présente dans le milieu M17 (Terzaghi et al.,1975), inhibe la croissance des lactobacilles, ce qui permet la numération spécifique de *Streptococcus thermophilus* (Monnet et al., 2008).
- Le milieu MRS acidifié (pH=5,6) par un ensemencement en masse, 1 ml de la dilution a été déposé dans le fond de la boite de pétri puis coulé aseptiquement du milieu MRS gélosé, après une homogénéisation et solidification du milieu incubées les boites à 37°C pendant 24h à 48h en anaérobiose.
 - Un milieu gélosé peut être rendu sélectif du fait de son pH. Par exemple lors des cultures mixtes *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ferments du yaourt), l'utilisation de gélose MRS acidifiée à pH 5,5 permet de dénombrier spécifiquement les lactobacilles (Monnet et al., 2008).

Tableau 4 : Principaux milieux de dénombrement des bactéries lactiques (Béal et al., 2008).

Espèce bactérienne	Milieux gélosés sélectifs	Références
<i>Lactobacillus</i>	MRS pH 5,5	De Man et al. (1960)
<i>Enterococcus</i> et <i>Pediococcus</i>	MRS	De Man et al. (1960)
<i>Streptococcus</i>	M17 pH 6,8	Terzaghi et Sandine (1975)

3.3. Purification

Les colonies bactériennes bien isolées de morphologie différentes sont repiquées sur les milieux MRS et M17 liquide et solide pour l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes. A l'aide d'une anse de platine, une quantité de la culture du bouillon a été prélevée est ensemençer par la technique des stries pour l'obtention des souches pures sur des boites contenant du MRS et M17 agar. **Figure 4**

Après cela, une coloration de Gram avec une recherche de la catalase. Les bactéries à Gram+ et catalase – sont retenue (Chougrani, 2008).

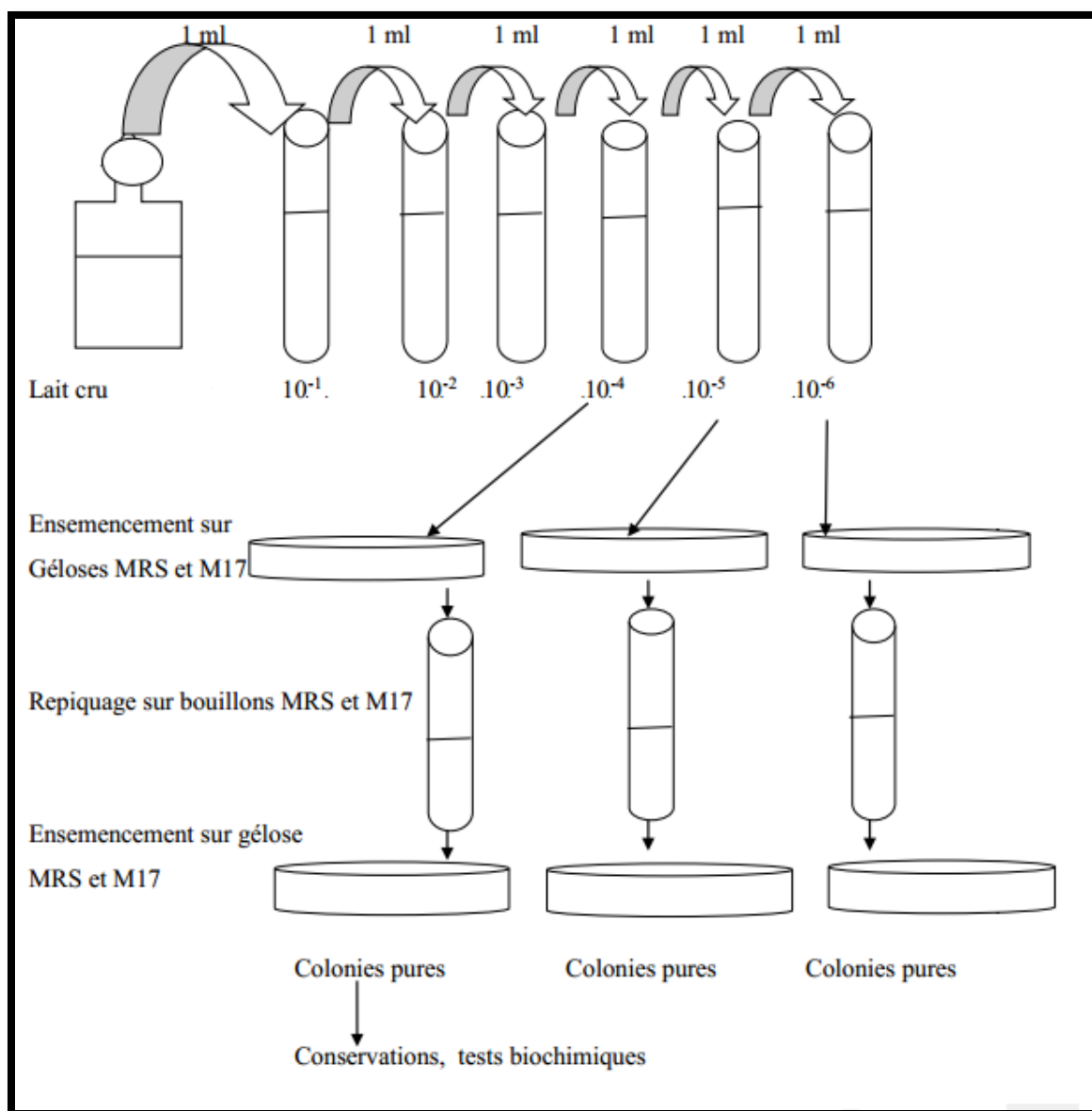


Figure 4 : protocole d'isolement et purification des bactéries lactiques.

4. Conservation des isolas

4.1. Conservation à court terme

Les isolats purifiés ont été ensemencé sur gélose inclinée (MRS, M17 et MRSc), incubé pendant 18 h à 30°C (Lactocoques) et 37°C (Lactobacilles et Bifidobactéries) et conservé à 4°. Le renouvellement des cultures se fait toutes les quatre semaines (Saidi et *al.*, 2002).

4.2. Conservation à long terme

A partir des cultures jeunes de 18h, préalablement purifiées sur milieu liquide, une centrifugation à 4000 tours/min pendant 10 min a été réalisée. Une fois le surnageant éliminé et les cellules récupérées, le milieu de culture de conservation est additionné au culot. Le milieu de conservation contient 2 ml de lait écrémé, 0,2% d'extrait de levure et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dans des micro tubes à -20°C (Saidi et *al.*, 2002).

5. Pré-identification des souches

5.1. Examen macroscopique

Ce test permet de déterminer la morphologie des colonies obtenues sur des milieux solides. A l'œil nu, on peut distinguer les caractéristiques d'une colonie : la forme, la taille, la couleur, l'aspect et l'odeur (Chougrani, 2008).

5.2. Examen microscopique

Après l'examen macroscopique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram (annexe), celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement.

Les méthodes microscopiques très utiles pour différencier des bactéries lactiques en fonction de leur morphologie (coques ou bacilles) (Monnet et *al.*, 2008).

6. Identification physiologiques et biochimiques

6.1. Recherche de la catalase

Le test consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (10 volume) dans laquelle sera dissocié un petit prélèvement de la colonie. La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en H₂O et O₂, le test est positif dans le cas de dégagement de bulles d'oxygène (Achemchem, 2014).

6.2. Croissance à différentes températures

Les bactéries lactiques se composent d'espèces mésophiles, dont la température optimale de croissance est proche de 30°C, et d'espèces thermophiles, dont la température optimale est proche de 42°C (Monnet et *al.*, 2008).

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (Benreguieg, 2014). Inoculation du bouillons MRS et M17 par les souches pures et incubés pendant 24h aux températures 4°C, 37°C et 42°C. Une croissance se traduit par la présence d'un trouble dans le bouillon.

6.3. Type fermentaire

La majorité des bactéries lactiques utilisées dans les produits laitiers ont un métabolisme homofermentaire, c'est-à-dire qu'elles produisent presque exclusivement de l'acide lactique à partir des sucres. Les bactéries lactiques hétérofermentaires dont les leuconostocs, principalement *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc lactis*, en plus de l'acide lactique ces bactéries produisent de l'éthanol, de l'acétate et du CO₂ à partir du lactose (Monnet et *al.*, 2008).

Les souches ont étéensemencées dans des tubes contenant chacune 10 ml du milieu du bouillon MRS et M17 et une cloche de Durham puis incubé à 37°C pendant 24h à 48h. la production de gaz (CO₂) se traduit par l'apparition de bulles dans la cloche.

6.4. Recherche de l'Arginine di hydrolase (ADH)

La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine (Benreguieg, 2014). Ensemencement du milieu Moeller à l'arginine et le milieu Moeller témoin (sans arginine)

par les souches puis recouvrir avec l'huile de paraffine stérile et incubé à 37°C pendant 24h à 48h.

La culture dans le milieu témoin se manifeste par le virage du milieu au jaune dû au métabolisme du glucose. Par contre la dégradation de l'arginine et la libération de l'ammoniac empêchent le virage au jaune.

6.5. Test de production d'acétoine

La fermentation du glucose par certaines Entérobactéries produit de l'acide pyruvique, qui sera ensuite transformé en acétyl-méthyl-carbinol (AMC) généralement appelé acétoine puis en 2,3-butanediol ; cette fermentation est dite butanediolique (anciennement fermentation 2,3-butylène-glycolique) (Delarras, 2007).

Ce test permet de mettre en évidence la présence de l'acétoine, est un caractère d'intérêt industriel puisque le diacétyle (précurseur de l'acétoine) est considéré comme une substance d'arome importante dans la flaveur des produits laitiers, beurre et fromage (Slimane, 2010).

Ensemencement des souches sur le milieu Clark et Lubs et incubé à 37°C pendant 24h. Après l'incubation on ajoute 5 gouttes de VP1 et 5 gouttes de VP2, on agite les tubes et on laisse 10 à 15 min à température ambiante.

7. Croissance dans des conditions hostiles

7.1. Culture sur milieu hyper salé NaCl

Ensemencement des souches dans les bouillons MRS et M17 en présence de différentes concentration de chlorure de sodium (NaCl) à 6,5% et 4,6% à 37°C pendant 24h, pour testé la croissance qui se traduit par la l'apparition d'un trouble dans le tube.

7.2. Croissance à différents pH

Ensemencer les bouillons MRS et M17 ajusté au pH=9,6 et pH=4,6 ; puis incubées les cultures à 37°C pendant 24h. La croissance se traduit par la l'apparition d'un trouble dans le tube.

7.3. Test de thermorésistante

Ensemencées les souches dans des tube contenant le bouillons MRS et M17, et exposées au bain marie a une température de 60°C durant 30min puis incubées à 30°C pendant 24h. Seules les souches thermophiles sont capables de se développer ; par contre les souches mésophiles ne se développent pas (Chougrani, 2008).

7.4. Test de croissance sur le lait de Sherman

Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène qui est bleu en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit. Les lactocoques réduisent le bleu de méthylène avec coagulation, en revanche les streptocoques thermophiles sont sensibles à ce colorant ; on note les observations relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait (Benreguieg, 2014).

Une série de tubes à essai contenant 9 ml de lait écrémé stérile (Candia) en double a été additionné de 1ml de solution de bleu de méthylène à 1% stérile, et 1ml de solution de bleu de méthylène à 3% stérile, puis ensemencer par les souches, réaliser une homogénéisation et incubés à 37°C pendant 24h à 48h.

8. Profil fermentaire

Ce test à été réalisé afin de déterminer la capacité des souches à fermenté quelques sucres, qui sont : Xylose, Raffinose, Cellobiose, Galactose, Glycérol, Lévulose, Amidon, Mannitol, Arabinose, Rhamnose, Adonitol, Dulcitol.

La vitesse de croissance des bactéries lactiques dépend de la source glucidique présente dans le milieu. Le glucose constitue un substrat utilisable par l'ensemble des bactéries lactiques. Les espèces isolées de produits laitiers (lactocoques, leuconostocs, lactobacilles, *Streptococcus thermophilus*) sont généralement capable de métaboliser le lactose (Monnet et al., 2008).

9. Etude de quelques propriétés technologiques des bactéries lactiques

9.1. Pouvoir protéolytique

Les bactéries lactiques disposent des systèmes enzymatiques permettant d'hydrolyser les caséines (Chamba, 2008).

Pour déterminer l'activité protéolytique des bactéries lactiques on utilise le milieu PCA additionné de lait écrémé à 1% et 2%, et ensuite ensemencer les souches par touches et incubé à 37°C pendant 24h. La protéolyse est révélée par des zones claires autour des colonies.

9.2. Pouvoir lipolytique

L'activité lipolytique est recherchée sur milieu MRS tamponné à pH 7 et additionné de 2% de Tween 80 (source lipidique artificielle), 2% de Tween 20, et 2% de l'huile d'olive. Les souches à tester sont ensemencées simultanément en touches à la surface du milieu. Après une incubation à 30°C pendant 48h, la lipolyse est révélée par une zone d'éclaircissement entourée des souches ensemencées (Benmammar, 2017).

Le tween 80 est un substrat également utilisé pour la mise en évidence d'un tween 80-estérase chez certaines bactéries, l'apparition d'un halo opaque autour des colonies traduit la présence d'une estérase (Delarras, 2007).

9.3. Production de dextrane

La production de dextrane est également testée sur milieu : MSE (Mayeux, Sandine et Elliker), après ensemencement en stries, les boîtes de pétri sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures. Les souches dextranigènes sont caractérisées par la formation des colonies larges et gluantes (Chougrani, 2008).

9.4. Résistance aux antibiotiques

Pour réaliser ce test, un antibiogramme en milieu solide est réalisé, chaque souche d'une culture jeune de 18h d'incubation à 37°C, est ensemencée par étalement à l'aide d'un écouvillon en surface de la gélose MH (annexe 3) déjà coulée et solidifiée, et déposés les disques d'antibiotiques par un pince stérile la surface des boîtes ensemencées par les souches lactiques.

Résultats

et

Discussion

1. L'analyse physico-chimique du lait cru de vache

Les résultats d'analyses physico-chimiques du lait sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur l'échantillon du lait.

Paramètres	Pourcentage
Matière grasse	3,96 %
Matière sèche non grasse	9,38 %
Protéine	3,19 %
Lactose	4,74 %
Densité	1,0224 %
Point de congélation	-0,558°C
Acidité Dornic	20,7°D
pH	6,82

La valeur recueillie lors de cette mesure donne une moyenne de pH pour l'échantillon de lait de vache qui est de 6,82.

Les pH du lait à la traite peuvent résulter de l'infection de la mamelle de l'animal (Morgan, 1999).

2. L'isolement des bactéries lactiques

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

Les isolats Gram positif, catalase négatif sont étudiées.

2.1. Caractères macroscopiques

L'ensemencement par La technique des stries permet la formation des colonies séparées (Prescott et *al.*, 2010). Des colonies de contour irréguliers et d'une couleur crème observé à la surface de la gélose MRS. Des colonies rondes de couleur blanchâtres et de contour régulier, lisse et légèrement bombé apparaissent sur la surface des géloses MRS et M17. (Figure 5).

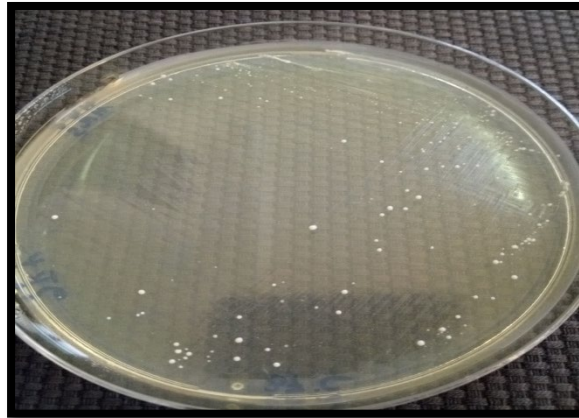


Figure 5 : Aspect macroscopique des bactéries lactiques isolées à partir d'un lait cru de vache sur milieu MRS.

2.2. Caractères microscopiques

Seules les bactéries qui présentent un Gram positive sont retenues, quel que soit leur forme et leur mode d'association. Dans notre étude, les souches isolées sont de forme : Coques, Bacilles. (Figure 6) (Tableau 6).

Tableau 6 : Critères morphologiques des bactéries lactiques isolées à partir de lait de vache.

Souche	Gram	Catalase	Forme
A5	+	-	Cocci en chaînette
A6	+	-	Cocci en chaînette
A7	+	-	Coccobacille
A8	+	-	Diplocoque
A9	+	-	Bacille
A10	+	-	Bacille
A12	+	-	Coque en chaînette
A13	+	-	Bacille
A16	+	-	Bacille
A17	+	-	Bacille allongé
A18	+	-	Bacille
A19	+	-	Bacille

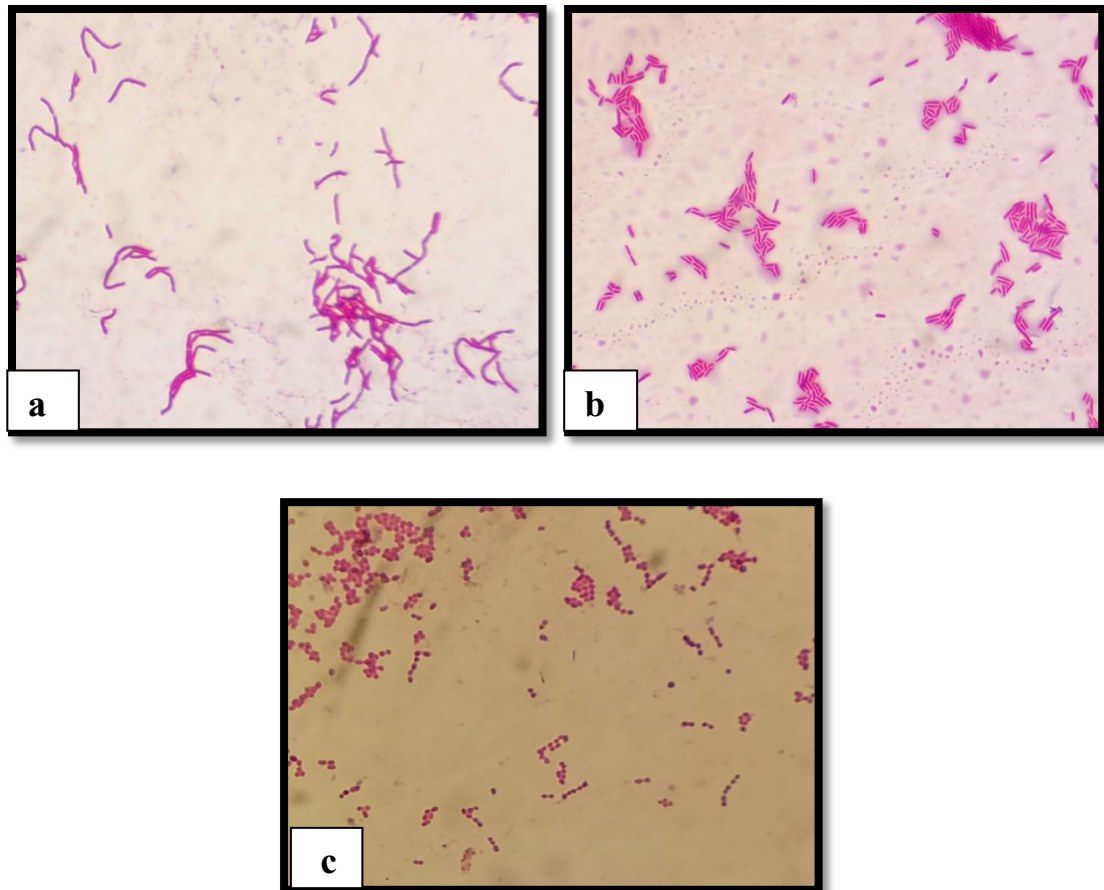


Figure 6 : Aspect microscopique des isolats après coloration de Gram indiquant (X100)

a et b) bacille sur milieu MRS ; **c)** cocci sur milieu M17

2.3. Purification des isolats

Après repiquage successifs des isolats sur les milieux M17 et MRS pour avoir des colonies pures. (Figure 7).

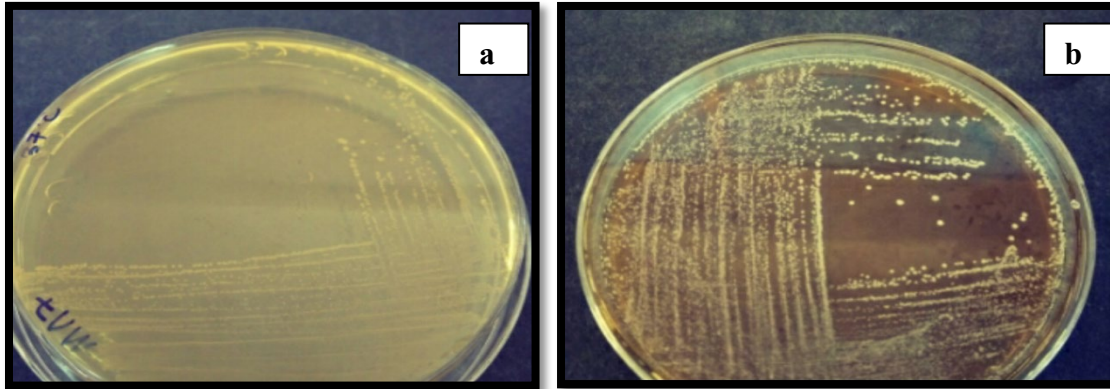


Figure 7 : Résultats de purification sur milieu : a) M17 b) MRS

3. Les tests physiologiques et biochimiques

3.1. Résultat du test de catalase

Le test de catalase a été noté négatif, car aucun dégagement gazeux n'a été observé après le traitement des colonies par l'eau oxygénée (Figure 8).



Figure 8 : Résultat du test de catalase.

3.2. Croissance à différentes températures

Les souches qui ont été testées n'ont pas poussés à 4°C, par contre la plupart des souches ont une croissance sous une température de 37°C et 42°C.

3.3. Type fermentaire

La totalité de nos souches testées sont homofermentaires (A5, A6, A7, A8, A9, A10, A12, A16, A17, A13, A19) qui fermentent le sucre sans production de gaz, juste une seule souche

A18 qui a manifesté un métabolisme hétérofermentaire qui fermentent le sucre avec production de gaz. (Figure 9).

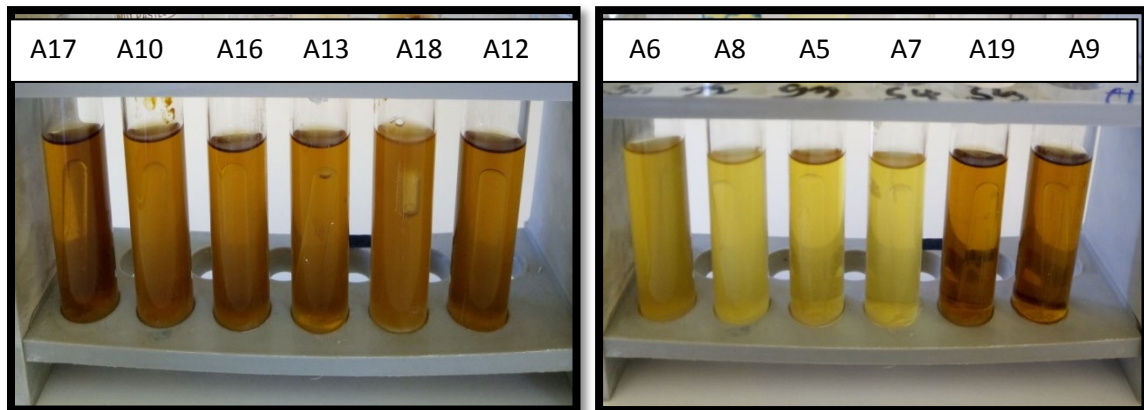


Figure 9 : Résultat du type fermentaire.

3.4. Test de l'Arginine dihydrolase (ADH)

La mise en évidence de l'arginine dihydrolase se traduit par le virage de l'indicateur de pH du jaune vers le violet par libération d'ammoniac, la plupart des souches testées sont ADH positif, sauf les souches A5 et A6 sont ADH négatif (Figure 10).

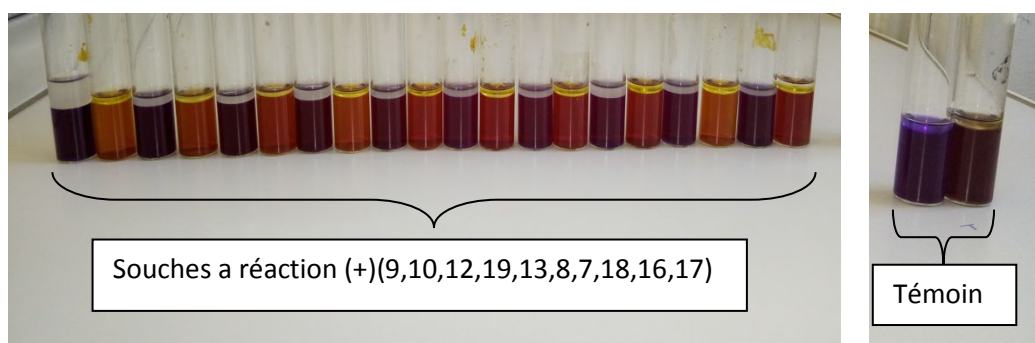


Figure 10 : Résultats du test de l'ADH

4. résultats des tests de croissance en milieux hostiles

4.1. Croissance en milieu hyper salé

Ce test permet de différencier les entérocoques des lactocoques et des leuconostocs (Boullouf, 2015).

Un résultat négatif pour la totalité des souches testées en milieu hypersalé contenant 6,5% de NaCl, et la moitié des souches testées en 4,6% de NaCl sont capables de croître. (Tableau 11)

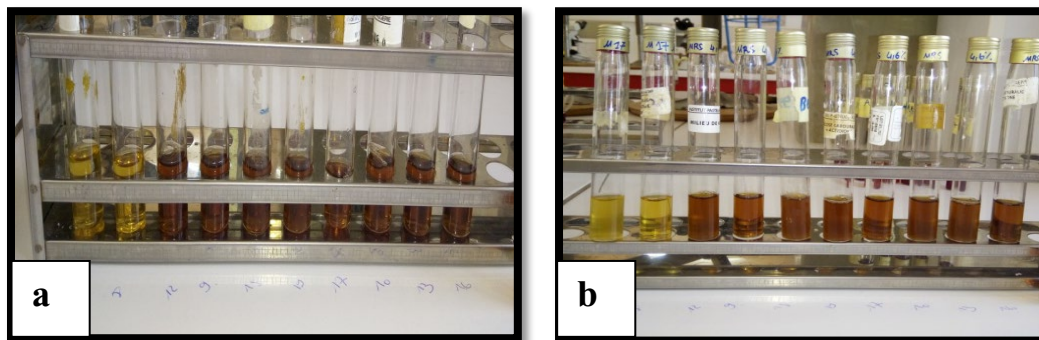


Figure 11 : Test de croissance en milieu hyper salé : a) 6,5 % b) 4,6 %

4.2. Croissance à pH=9,6 et 4,6

La plus part des souches testées sont incapable de croître à pH=9,6. Par contre un résultat de croissance négatif pour la majorité des souches qui ont testé à pH=4,6. (Tableau12).

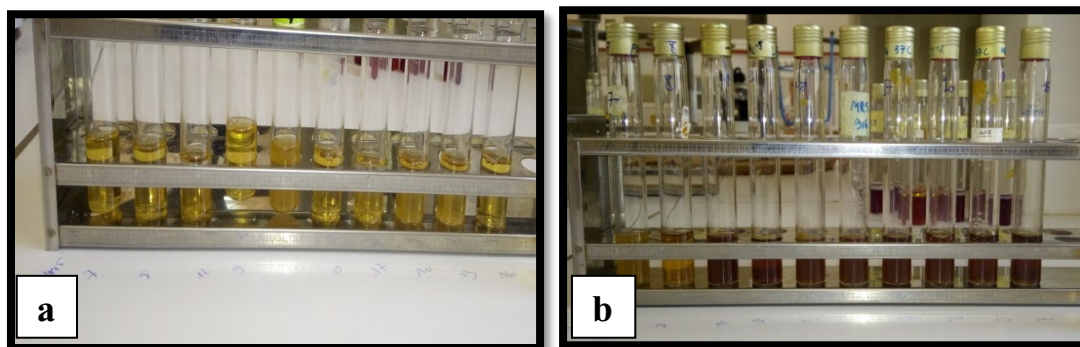


Figure 12 : Test de croissance à différents pH : a) pH 4,6 ; b) pH 9,6

4.3. Test de thermorésistance

Les souches A8, A9, A12, A16, A17, A19 n'ont pas résisté a une température de 60°C durant 30 minutes, le reste des souches ont résisté. (Figure 13).



Figure 13 : Résultat de la thermorésistance à 60°C pendant 30 min

4.4. Test de croissance sur le lait de Sherman

Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène. Seules certaines espèces appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* sont capables de se développer (Boullouf, 2015).

La culture des souches sur lait de Sherman à des concentrations de 1% et 3%, a montré le développement à 1% des souches A7 et A13, leur capacité à ce développer en utilisant l'oxygène du bleu de méthylène permet à ce dernier de perdre sa couleur. Un résultat négatif a été observé pour le reste des souches à la concentration de 1% et 3% de bleu de méthylène (figure 14 et 15).



Figure 14 : Résultat de test de croissance sur lait de Sherman à 1% de bleu de méthylène.

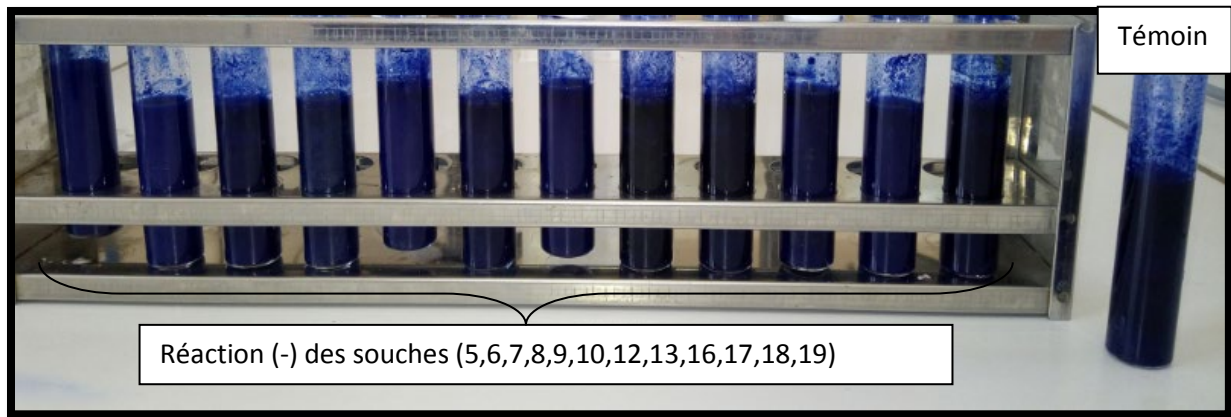


Figure 15 : Résultat de test de croissance sur lait de Sherman à 3% de bleu de méthylène.

Tableau 7 : Les résultats de pré-identification des souches isolées

Souche	Type ferment	Thermo résistant	Croissance à différentes T°C			pH		NaCl		Lait de Sherman		ADH	Acétoïne	Genre
			42° C	37° C	4° C	9,6	4,5	4,6 %	6,5 %	1%	3%			
A5	Homo	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>St</i>
A6	Homo	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	<i>St</i>
A7	Homo	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	++	<i>En</i>
A8	Homo	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>St</i>
A9	Homo	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Lb</i>
A10	Homo	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	<i>Lb</i>
A12	Homo	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	<i>St</i>
A13	Homo	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	<i>Lb</i>
A16	Homo	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>Lb</i>
A17	Homo	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	++	<i>Lb</i>
A18	Hété	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	<i>Lb</i>
A19	Homo	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	++	<i>Lb</i>

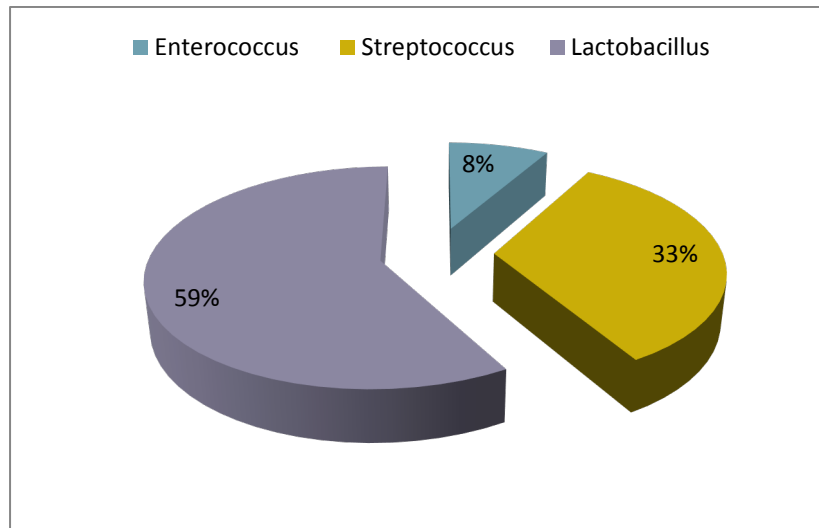


Figure 16 : Proportions des souches lactiques isolées à partir du lait cru de vache.

5. Profil fermentaire

Le métabolisme carboné a deux fonctions principales chez les bactéries lactiques, un apport de molécules qui serviront de squelette à de nombreuses biosynthèses et un rôle central dans la production d'énergie. Les molécules de base intervenant dans ce métabolisme sont les sucres (Renault, 2008).

La détermination des genres et des espèces, réside essentiellement dans leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique (Boullouf, 2015).

Tableau 8 : Profils fermentaires des souches

souches	CEL	GAL	GLY	LEV	AMI	MAN	ARA	XYL	RAF	RHA	ADO	DUL
A5	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
A6	-	+	-	+	V	V	-	V	+	V	V	V
A7	+	+	-	+	+	V	V	V	+	V	V	-
A8	+	+	V	+	+	+	V	V	+	V	V	V
A9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A10	+	+	V	+	-	-	+	-	+	-	V	V
A12	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
A13	-	+	-	V	+	-	-	-	+	-	-	+
A16	V	+	+	-	+	-	+	+	V	+	+	+
A17	+	-	-	-	V	-	-	+	+	-	+	+
A18	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
A19	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-

CEL: Cellobiose, **GAL:** Galactose, **GLY:** Glycérol, **LEV:** Levulose, **AMI:** Amidon, **MAN:** Mannitol, **ARA:** Arabinose, **XYL:** Xylose, **RAF:** Raffinose, **RHA:** Rhamnose, **ADO:** Adonitol, **DUL:** Dulcitol. +: Reaction positive, -: Reaction négative, V: Reaction variable

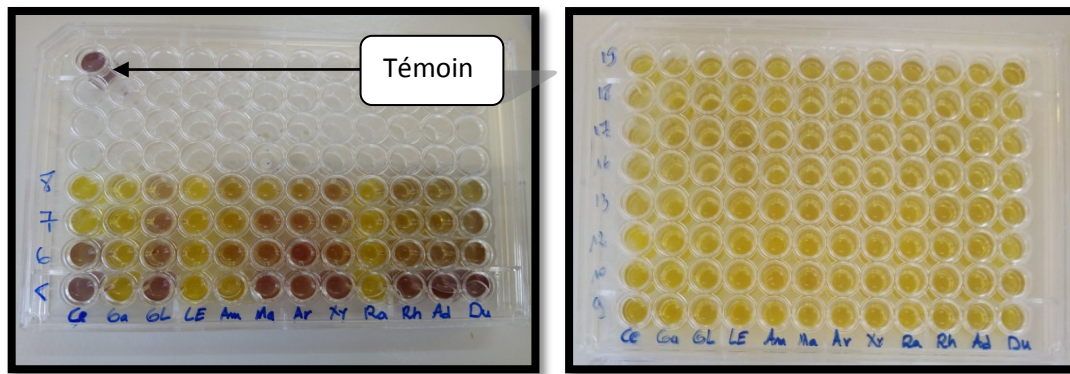


Figure 17 : Résultats de profil fermentaire des isolats.

Le tableau 9 évoque les résultats d'identification des souches lactiques (genre et espèce), obtenus par une comparaison avec critère de différenciation des bactéries lactiques entre genres et espèces d'intérêt laitier (Roissart, 1986).

Genre	Code de la souche	Espèce
<i>Streptococcus</i>	A5	<i>S. thermophilus</i>
	A6	<i>S. thermophilus</i>
	A8	<i>S. diacetylactis</i>
	A12	<i>S. diacetylactis</i>
<i>Enterococcus</i>	A7	<i>E. faecium</i>
<i>Lactobacillus</i>	A9	<i>Lb. plantarum</i>
	A10	<i>Lb. acidilactis</i>
	A13	<i>Lb. lactis</i>
	A16	<i>Lb. plantarum</i>
	A17	<i>Lb. plantarum</i>
	A19	<i>Lb. plantarum</i>
	A18	<i>Lb. acidilactis</i>

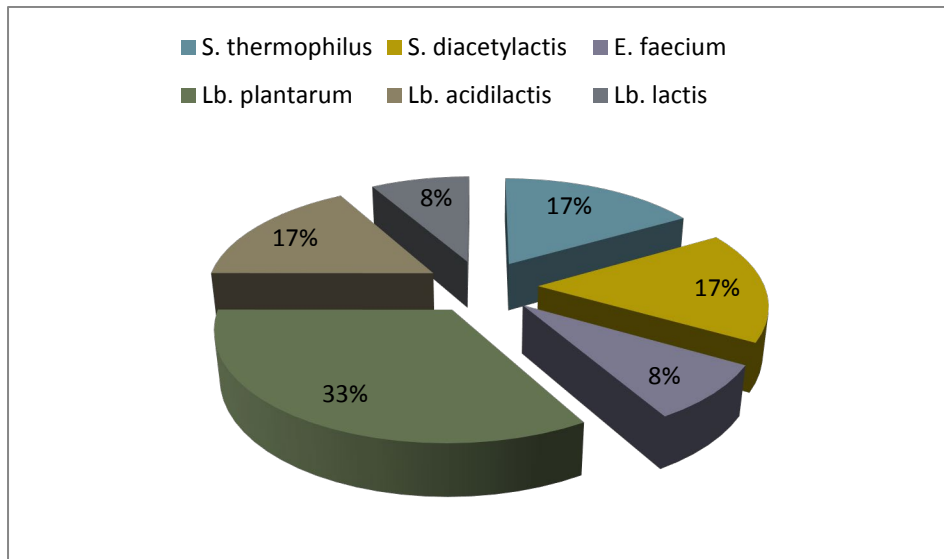


Figure 18 : Proportions des résultats d'identification des souches lactiques « genre et espèce »

6. Résultats de quelques propriétés technologiques des bactéries lactiques :

6.1. Test de production d'acétoine

La production d'acétoine se traduit par l'apparition d'un anneau ou la diffusion de la couleur rose à la surface du milieu (Merzouk, 2014). La majorité de nos souches testé produisent de l'acétoine, le reste ont réagit négativement a ce test. (Figure 19).

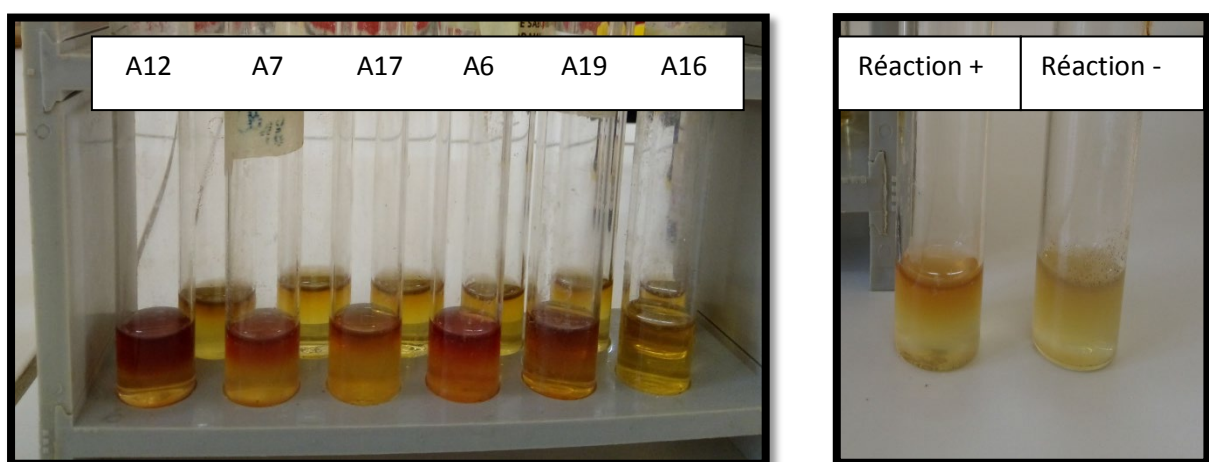


Figure 19 : Résultats du test de production d'acétoine

6.2. Pouvoir protéolytique

La protéolyse se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des souches ensemencées dû à la dégradation de la caséine, et la mesure de dimension de la zone claire permet de quantifier l'activité protéolytique de la souche. La majorité des souches testées ont une activité protéolytique (Figure 20, tableau 10).

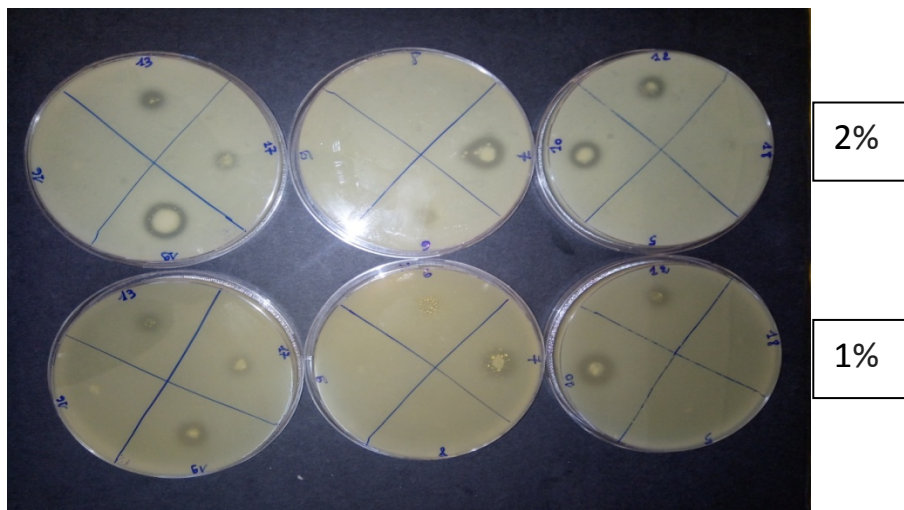


Figure 20 : Zones claires traduisant l'activité protéolytique des souches.

Tableau 10 : Résultats de l'activité protéolytique des souches sur milieu PCA additionné de lait écrémé à 1% et 2%.

Souches	Activité protéolytique
A5	-
A6	+
A7	+++
A8	-
A9	-
A10	++
A12	+
A13	+
A16	-
A17	++
A18	-
A19	++

6.3. Pouvoir lipolytique

La majorité des souches lactiques isolées représentent une activité lipolytique vis-à-vis le Tween 80, le Tween 20 et l'huile d'olive. (Figure 21, tableau 11).

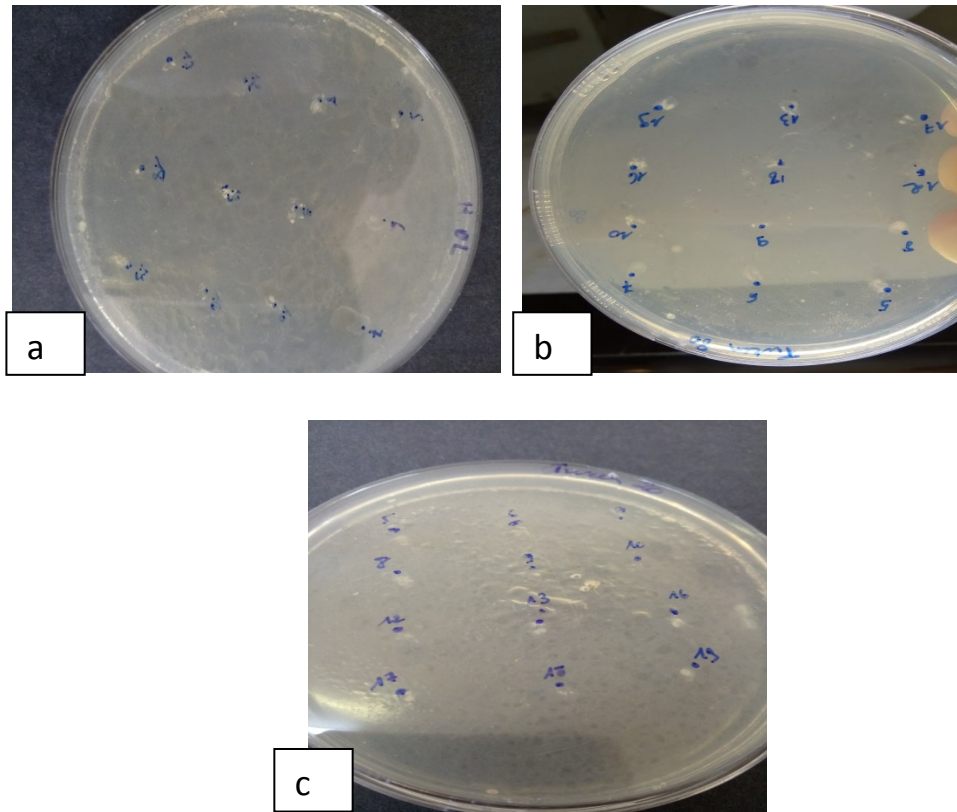


Figure 21 : Résultats de l'activité lipolytique sur milieu MRS additionné :

a) 2% de l'huile d'olive b) 2% de Tween 80 c) 2% de Tween 20.

Tableau 11 : Résultats de l'activité lipolytique.

Souches	Activité lipolytique		
	Huile d'olive	Tween 80	Tween 20
A5	-	-	-
A6	-	+	-
A7	+	+	+
A8	-	+	+
A9	-	-	-
A10	+	+	-
A12	+	+	+
A13	-	+	-
A16	-	-	-
A17	+	+	-
A18	-	-	-
A19	-	+	+

6.4. Production de dextrane

La mise en évidence de la croissance des souches isolées sur gélose MSE pour évaluer leurs capacités de la production des EPS qui se traduit par l'apparition de colonies larges et gluantes. Cela a été essentiellement observé chez les souches A5, A6, A7, A16, A19

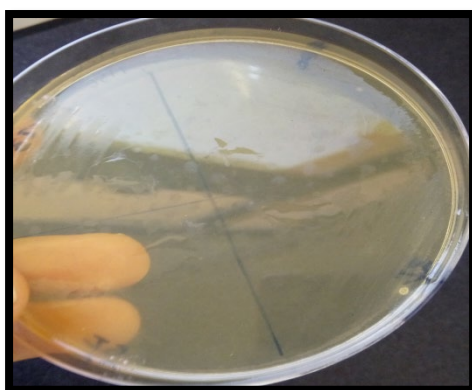


Figure 22 : Résultat des EPS sur milieu hypersaccharosé MSE.

Tableau 12 : Résultats de production de dextrane par les souches lactiques isolées.

Souches	Production de dextrane
A5	+
A6	+
A7	+
A8	-
A9	-
A10	-
A12	-
A13	-
A16	+
A17	-
A18	-
A19	+

6.5. Résultats du test de résistance aux antibiotiques

Le test de l'antibiogramme est réalisé pour nos souches pour avoir la résistance/sensibilité aux antibiotiques suivants : E : Erythromycine ; SPT : Spectinomycin ; TET : Tétracycline ; N : Neomycine ; AUG : Amoxiciline ; OFX : Ofloxacin. (Figure 23, Tableau 13).

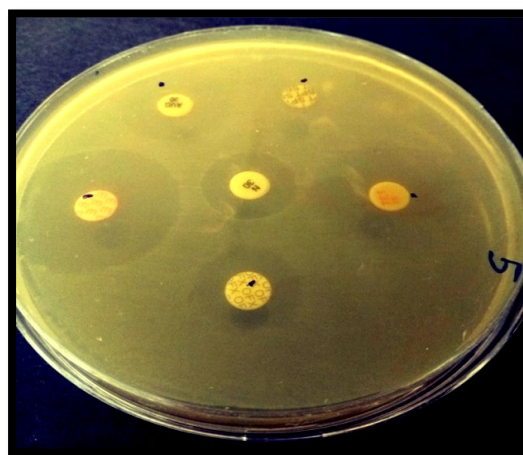


Figure 23 : résultat de la zone d'inhibition de la souche A5 vis-à-vis les antibiotiques.

Tableau 13 : Résultat de l'antibiogramme des souches lactiques isolées.

Souches	ATB					
	Erythromycine	Spectinomycin	Tetracycline	Augmentin	Neomycine	Ofloxacin
A5	S	R	S	S	S	S
A6	S	R	S	S	S	
A7	S	S	S	S	S	S
A8	S	S	S	S	S	S
A9	R	R	R	R	R	R
A10	S	S	S	S	R	R
A12	S	S	R	R	R	R
A13	R	R	R	R	R	R
A16	R	R	R	R	R	R
A17	S	S	S	R	R	S
A18	R	R	R	R	R	R
A19	S	S	R	S	S	R

Sensible (S) / Résistant (R)

Discussion générale

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).

L'étude macroscopique réalisée sur milieu solide nous a permis d'observer de petites colonies blanchâtres, parfois même transparentes, lisses et régulières. L'examen microscopique nous a permis de sélectionner des bactéries qui présentent une forme bacillaire ou sphérique, qui se colorent positivement à la coloration de Gram, et sont immobiles et sporulées.

L'identification au stade du genre des isolats à partir du lait cru de vache d'après les caractéristiques morphologiques, physiologiques, biochimiques a révélé la présence de trois genres : *Streptococcus* à 33,30 %, *Enterococcus* à 8,30 %, *Lactobacillus* à 58,30 %.

Parmi nos souches identifiées, on a trouvé l'espèce *Streptococcus thermophilus* décrites comme cocci sphérique Gram positif associé en chainettes, se développe à une température de 42°C et résistant à une température de 60°C durant 30 minutes, se développent pas en milieux hostiles. On a pu remarquer que nos souches *Streptococcus thermophilus* ne se développaient pas en milieu alcalin à un pH 9,6 ni dans un milieu avec une concentration de 4% et de 6,5% NaCl, du au fait que les *Streptococcus thermophilus* sont très sensibles au sel (Slimane, 2011).

Dans un milieu lait de sherman, nos souches *Streptococcus thermophilus* ont également été incapables de croître aussi bien à 0,1% de bleu de méthylène, qu'à 0,3% de bleu de méthylène. On conclut alors que l'espèce *Streptococcus thermophilus* est très sensible au colorant utilisé dans ce test (Slimane, 2011).

Une seule souche du genre *Enterococcus* a été identifiée parmi nos souches. Caractérisé par une forme de cocci associée en paire ou en chainette, se développe à un pH de 9,6, à une concentration de 4,6 % de NaCl, croissance dans température de 42°C et résiste à une température de 60°C durant 30 minutes, AHD+, VP+. La plupart des espèces d'entérocoques sont capables de se développer à pH 9,6 en présence de 6,5 % de NaCl, et peuvent survivre 30 minutes à 60°C (Benreguiég, 2015).

Pratiquement selon les résultats trouvés par Stlies et Holzapfel 1997 ; Larpent et al., 1997. Elle fermente le mannitol, le galactose, le saccharose, le mannose, le mannose ; ce qui le rapproche à l'espèce *Enterococcus faecium*.

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques (Boullouf, 2016). Le genre *Lactobacillus* caractérisé par sa forme bâtonnet, représente le genre le plus dominant qui possèdent les caractéristiques suivantes : homofermentaire, pousse à 37°C, ADH+.

Les lactobacilles hétérofermentaire facultatifs. Ils fermentent aussi les hexoses presque totalement en acide lactique, mais en plus ils sont capables de former de l'acide acétique à partir des pentoses. Les représentants typiques sont *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. sake* (Desmazeaud, (1992).

La capacité de fermenter le mannitol dissocie les lactobacilles en deux groupes principaux (Carr et al., 2002).

Le groupe mannitol positif : renferme l'espèce : *Lb. plantarum*

Le groupe mannitol négatif : comprend : *Lb. bavaricus*, *Lb. sake*, *Lb. cuvatus*, et *Lb. casei subsp. tolerans*.

Identification des espèces « fermentation des sucres »

L'identification est complétée avec l'étude de la formation des hydrates des carbones par les souches isolées (Tableau 8). Les souches *Lactobacillus* (A9, A16, A17, A19) fermentent la majorité des sucres, elles sont classées par l'espèce *Lactobacillus plantarum*.

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques, principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette production est fortement influencée par les conditions de fabrication des fromages et des laits fermentés (Ott et al., 1997). L'acétoïne est l'un des molécules aromatiques du catabolisme des acides aminés (acide aspartique), comme il peut être l'origine de la dégradation totale ou partielle de l'acide citrique pendant la fermentation lactique (Hadeif, 2012).

L'activité protéolytique se manifeste par l'apparition d'une zone claire de protéolyse de la protéine du lait (caséine). Il ressort du tableau que la majorité des souches étudiées présentent une croissance avec une activité protéolytique se situant entre 0,8 et 2,1 de diamètre en moyenne.

Conclusion

Les bactéries lactiques sont généralement sélectionnées pour leur propriété technologique: Bonne croissance et participation au développement de flaveur au cours de la fermentation du lait (Mezaini, 2010).

L'isolement et purification des isolas sur les milieux sélectifs à partir du lait cru de vache permis l'obtention de douze souches correspondent à des bactéries lactiques, sélectionnés par le test de catalase et la coloration de Gram qui a montré que les souches sont des coques et des bacilles a Gram positif. Le type de milieu de culture joue un rôle important dans l'activité de la croissance et la production de biomasse. Divers milieux, comme de Man Rogosa, Sharp (MRS), le bouillon M17 (Kassas, 2016)

La pré-identification des souches isolées par les tests phénotypiques, physiologiques et biochimiques : catalase, coloration de Gram, Croissance à différentes températures, croissance dans des conditions hostiles, et le type fermentaire, test de l'Arginine di hydrolase (ADH). Ils divisent nos souches en trois genre avec un pourcentage de 33 % Streptococcus, 59 % Lactobacillus et 8% Enterococcus (figure 12).

Le profil fermentaire (fermentation des sucres) de nos souches, nous à permis de déterminé l'espèce grâce a une comparaison des résultats avec recommandation de Roissart (1986) :

S. thermophilus (2), *S. diacetylactis* (3), *Lb. plantarum* (4), *Lb. acidilactis* (2), *Lb. lactis* (1).

L'évaluation de quelques aptitudes technologiques nous à permis de déduire que les souches A7, A10, A12, A13, A17 et A19 ont une bonne activité protéolytique. Les souches qui ont une activité lipolytique remarquable sont A7, A8, A10, A12, A17, A19. Les souches A6, A7, A12, A16, A17 ont un très bon résultat par apport au test de production d'acétoine.

Les résultats de caractérisation obtenus, nous ont permis d'avoir une idée sur la nature de la flore lactique présente dans le lait de vache, et des caractéristiques technologiques intéressantes faisant d'elles de très bonnes candidats pour d'éventuelles applications technologiques.

Cette étude est préliminaire mérite d'autres travaux complémentaires tels que l'identification génétiques, étude de pouvoir acidifiant, étude de propriétés probiotiques, une étude d'antagonisme entre les souches identifiées pour les utiliser comme ferments locaux pour l'obtention différents types de lait fermenté.

*Références
bibliographiques*

A

Achemchem, F. (2014). Bactériocines de bactéries lactiques de lait et de fromage de chèvre. Presses Académiques Francophones. Paris. p 346.

Atlan, D., Beal, C., Vergès, M.C.C., Chartier, M.P.C., Chouayekh, H., Bousquet, M.C., Deghorain, M., Gaudu, P., Gilbert, C., Goffin, P., Guédon, E., Guillouard, I., Guzzo, J., Hols, P., Juillard, V., Ladero, V., Lindley, N., Lortal, S., Loubière, P., Maguin, E., Monnet, C., Monnet, V., Rul, F., Maréchal, R.T., Yvon, M. (2008). Métabolisme et ingénierie métabolique. In Corrieu G. et Luquet F.M. Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. p 272-448.

B

Bemammar, K.B. (2017). Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bactéries lactiques productrice de bactériocine. Thèse de doctorat, Université de Sidi Bel Abbes.

Benreguieg, M. (2014). Propriétés antibactériennes et probiotiques de bactéries lactiques isolées à partir de lait de vache, de chèvre et de brebis dans la région de l'ouest algérien. Thèse de doctorat, Université de Mostaganem.

Béal, C., Marin, M., Fontaine, E., Fonseca, F., Obert, J.P. (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In Corrieu G. et Luquet F.M. Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. p 661-766.

Billon. P. (2009). Traite des vaches laitières : matériel, installation, entretien. France agricole. Paris. p 555.

Boullouf, A. (2015) :Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel « *Bouhezza* », Mémoire de Magister : Technologie alimentaire, Université de Constantine.

C

Chamba, F.J. (2008). Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères. In Corrieu, G. et Luquet, F.M. Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. p 787-815.

Carr, F.J., Chill, D., et Maida, N. (2002). The Lactic Acid Bacteria. A literature Survey. Critical Rev.Microbiol., 28:4, 281370.

Chougrani, F. (2008). Utilisation de souches lactiques isolées a partir du lait de brebis algérien dans la fabrication d'un yaourt nature. Thèse de doctorat, Université d'Oran.

D

Delarras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire : d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. p 449.

Desmazeaud, M. (1992). Les bactéries lactiques. In Hermier J. Lenoir J. Weber F. Les groupes microbiens d'intérêt laitier. CEPIL, Paris. p 9-58.

G

Guiraud, J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. p 652.

J

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

H

Hadef, S. (2012). Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales.

K

Kassas, Z. (2016). Croissance de souches de bactéries lactiques d'intérêts technologiques et/ou probiotiques sur MRS végétal modifié. Thèse de doctorat, Université de Annaba.

L

Larparent-Gourgaud, M., Michaux, O., Larparent, J.P., Desmasures, N., Desmazeaud, M., Mangin, I., Masson, F., Montel, M.C., Taillier, P. (1997). Les ferments lactiques et bactéries apparentées. In *Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire*. Larparent J-P. Tec & Doc, Lavoisier, p 199-255.

M

Merzouk, Y. (2014). Optimisation des conditions de fermentation et de préservation du lait cru de chamelle par les bactéries lactiques adaptées aux conditions de stress, Thèse de doctorat, Université d'Oran.

Mezaini, A. (2010). Essai de mise en évidence du rôle de certaines bactéries lactiques dans le contrôle des infections. Thèse de doctorat, Ecole nationale supérieure Alger.

Monnet, C., Latrille, E., Béal, C., Corrieu, G. (2008). Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In Corrieu G. et Luquet F.M. *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. p 511-593.

Morgan F. (1999). Cellules somatique du lait de chèvre : conséquences sur la composition du lait et la technologie. *L'égide*, n°17, décembre.

O

Ott, A., Fay, LB., Chaintreau, A. (1997). Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor. *Journal Agriculture Food Chemical*. 45 : 850-858.

P

Poutrel, B. (1992). Les staphylocoques de mammite. In Hermier J. Lenoir J. Weber F. *Les groups microbiens d'intérêt laitier*. CEPIL, Paris. p 415-450.

Pot, B. (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In Corrieu G. et Luquet F.M. *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. p 1-108.

Prescott, M., Sherwood, L., Willey, J., Woolverton, C., Harley, J.P., Klein D.A. (2010). *Microbiologie*. De Boeck. Paris. p1088

R

Renault, P. (2008). Génétique des bactéries lactiques. In Corrieu G. et Luquet F.M. Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. p 153-245.

S

Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E, Prevost H. et Kihal M., 2002. Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du Lait Cru de Chèvre des Régions Arides d'Algérie. *Journal Algérien des Régions Arides.*, 01: 01-14

Slimane, N., 2011 :Etude technologique de plusieurs souches Streptococcus thermophilus isolées à partir de différents laits fermentés commercialisés en Algérie, Mémoire de Magister : Microbiologie alimentaire et industrielle, Université d'Oran.

Stiles, M.E. et Holzapfe, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy international. *Journal of Food Microbiology* 36: 1-29.

T

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

Thompson, J., Gentry-Weeks, CR. (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques, In : Bactéries lactiques, vol. 1. éditeurs : De Roissart H, Luquet F, Loricet M, Uriage, France, 239-290.

W

Weber, F. (1992). Les germes utiles susceptibles d'entre à l' origine d'altération. In Hermier J. Lenoir J. Weber F. Les groupes microbiens d'intérêt laitier. CEPIL, Paris. p 371-393.

Z

Zergoug, A. (2016). Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires. Thèse de doctorat, Université de Mostaganem.

Annexes

Peptone-sel (milieu de dilution)

Chlorure de sodium	8,5 g
Peptone	0,5 g
Eau distillée	1000 ml

Autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
Glucose	20 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,1 g
MnSO ₄	0,05 g
Agar	20 g
Tween 80	1 ml
Eau distillée	1000 ml

pH=5,6

Autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

Extrait de levure	2,5 g
Extrait de viande	5 g

Peptone de caséine	2,5 g
Peptone de viande	2,5 g
Peptone de soja	5 g
Acide ascorbique	0,5 g
B-glycérophosphate de sodium	19 g
Agar	20 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Eau distillée	1000 g

pH= 6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Milieu Clark et Lubs

Peptone	10 g
Phosphate di potassique	2 g
Glucose	5 g
Eau distillée	1000 ml

pH= 7

Autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Réactif VP1 : Solution de soude NaOH à 16% dans l'eau distillée.

Réactif VP2 : Alpha-naphtol à 6% dans l'alcool 95%.

Milieu MSE

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Saccharose	100 g

Citrate de sodium	1 g
Glucose	5 g
Gélatine	2,5 g
Azide de sodium	0,075 g
Agar	15 g

pH= 6,9

Autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Milieu PCA (plate count agar)

Peptone	5 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose	1 g
Agar	15 g

pH= 7

Autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Milieu MRS modifié-bcp

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
Glucose	20 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,1 g

MnSO ₄	0,05 g
Agar	20 g
Tween 80	1 ml
Eau distillée	1000 ml
Pourpre de bromochrésol	0,025 g

Coloration de Gram

- préparer un frottis d'une culture bactérienne pure
- Recouvrir le frottis avec du violet de Gentiane, laisser agir une minute puis éliminé l'excès
- Le frottis est traité deux fois avec une solution de lugol, pendant 30 secondes
- Décolorées les lames par l'éthanol à 95°, 5 à 10 secondes
- Rincer à l'eau distillée
- Recolorer avec la fuchsine pendant une minute
- Rincer à l'eau distillée
- Sécher au dessus de la flamme d'un bec Bunsen
- L'observation se fait à l'immersion en utilisant l'objectif 100

Les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé, les bactéries « Gram-négatif » en rose.