

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Microbiologie appliquée
Option : Microbiologie Alimentaire santé



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Criblage des bactéries lactiques douées
d'une activité antibactérienne isolées du
l'ben et beurre traditionnels**

Présenté par :
ABDELLI Djedjiga et ABID Fairouz

Soutenu le : **11 Juin 2015**
Devant le jury composé de :

| | | |
|-------------------|-----|--------------|
| Mme. FARADJI. S | MCB | Présidente |
| Mme. BENACHOUR. K | MAA | Encadreur |
| Mme. KERAMANE. B | MAA | Examinatrice |

Année universitaire : 2014 / 2015

REMERCIEMENT

Au terme de ce modeste travail, nous rendons louange à Dieu le tout Puissant de nous avoir donné le courage et la volonté de l'avoir accompli.

Comme nous tenons à adresser nos vifs remerciements à :

M^{me} BENACHOUR, notre promotrice, pour son encadrement apprécié, ses orientations et encouragements qui nous ont permis de mener à bien ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent à M^{me} FARADJI et M^{me} KERAMANE qui vont évaluer ce présent travail.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la concrétisation de ce travail.



Dédicace

Chaque jour qui passe, je remercie Dieu, et je le pris tout le temps de me donner la force de suivre le chemin qu'il m'a tracé afin de mener à bien le destin qu'il m'a prévu.

Je dédié ce travail à :

A mes très chers parents que j'aime et qui m'ont soutenu tout au long de mes années d'études.

A mes sœurs : Djamila et sa petite famille surtout ma petite et adorable nièce Sara. Sabrina, Nadjet et Meriem.

A tous mes amis : Nesrine, Zina, Syla, Samira, Amel, Linda... Et à mon âme HK,

A mes amis de la promotion de Microbiologie Alimentaire Santé.

Amon binôme Fairouz et toute sa famille.

Djedjiga



Dédicaces

Ce modeste travail, achevé avec l'aide de Dieu le tout puissant est dédié :

A mes chers, respectables, honorables parents qui ont été toujours fières de ma réussite. Que ce travail soit pour vous le témoignage de mon infinie reconnaissance pour votre aide précieux et toutes ces années de compréhension. Je vous remerciez beaucoup d'être toujours à mes coté pour me soutenir et me donner le courage pour terminer mes études. Que Dieu nchalah vous gardera toujours pour moi.

A mon cher frère Nassim, qui m'a beaucoup aidé dans mes études, et mon petit adorable frère Rayen je vous aime trop.

A mes chers sœurs, Hanane, Amel, et sans oublier ma grande sœurs Sihem avec son mari Ferradji Yassine et je leurs souhaite que de bonheurs dans leurs vie.

A mes chers cousines et cousins, Linda, Zahra, Fousia, Wissam, et à toute ma famille qui ont été avec moi dans les moments difficile.

Sans oublier tous mes chers amies, Nesrine, Samira, Aida, Celia, Fousia, Nacera, Bassma de m'avoir apporté tous l'aide possible pendant toute la durée de mon travail.

A celle laquelle j'ai partagé ce travail, djidjiga et toute sa famille.

Sans oublier, toute ma promotion de microbiologie alimentaire et de santé.

Fairouz

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

ADK: Adekar

AMZ: Amizour

BL : Bactéries lactiques

BHI : Bouillon Heart Infusion

B : Beurre

C° : Degré Celsius

CO₂ : Dioxyde de carbone

D° : Degré Dornic

J.O.R.A : Journal Officiel de la République Algérienne

KJ : kilojoule

M17 : Gélose M17

ml : Millilitre

min : Minute

mm: Millimètre

MRS: Man Rogosa Scharp

MH: MUELLER-HINTON

NaCl : Chlorure de sodium

ODG: Région d'Oued-ghir

pH: Potentiel d'hydrogène

S: Smen

SET : Région de Souk El Tenine

SM : Solution Mère

t : temps

UFC : Unité Formant Colonie

μl : Microlitre

μm : micromètre

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I : Principaux genres de bactéries lactiques | 5 |
| Tableau II : Caractéristiques physico-chimiques du l'ben..... | 8 |
| Tableau III : La Composition du beurre | 9 |
| Tableau IV : Les différents groupes de bactéries lactiques isolées du beurre traditionnel | 9 |
| Tableau V : L'origine des échantillons prélevés de différentes régions de la wilaya de Bejaia. | 11 |
| Tableau VI : Milieux d'isolement des bactéries lactiques | 12 |
| Tableau VII : Les différentes souches utilisées dans le test d'antagonisme..... | 17 |
| Tableau VIII : Résultats des analyses physico-chimiques des différents échantillons | 19 |
| Tableau IX : Les caractères physiologiques et biochimiques des souches isolées (bacille)... | 26 |
| Tableau X : Les caractères physiologiques et biochimiques des bactéries isolées à partir du milieu Mayeux..... | 27 |
| Tableau XI : Les caractères physiologiques et biochimiques des bactéries isolées dans M17..... | 28 |
| Tableau XII : Les résultats d'antibiogramme réalisé aux souches isolées sur milieu Mayeux | 31 |
| Tableau XIII : Les résultats d'effet antibactérien des bactéries lactiques à l'égard des Bactéries pathogènes..... | 32 |

Liste des Figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Aspect du beurre dans l'eau physiologique | 10 |
| Figure 2 : Aspect du smen..... | 10 |
| Figure 3 : Dénombrement des bactéries lactiques à partir de l'ben | 13 |
| Figure 4 : Dénombrement des bactéries lactiques à partir de beurre et Smen | 13 |
| Figure 5 : Schéma représentant la microplaque utilisé pour le test de fermentation des sucres | 16 |
| Figure 6 : La concentration cellulaire de chaque échantillon sur le milieu M17 | 21 |
| Figure 7 : La concentration cellulaire de chaque échantillon sur milieu MRS | 22 |
| Figure 8 : La concentration cellulaire de chaque échantillon sur milieu Mayeux | 23 |
| Figure 9 : Observation macroscopique des colonies sur milieu Mayeux..... | 24 |
| Figure 10 : Observation macroscopique des colonies sur milieu MRS | 24 |
| Figure 11 : Observation microscopique des souches de forme cocci..... | 24 |
| Figure 12 : Observation macroscopique des souches de forme bacille..... | 24 |
| Figure 13 : La fréquence des deux formes des souches isolées à partir du l'ben..... | 25 |
| Figure 14 : La fréquence des souches isolées à partir du beurre | 25 |
| Figure 15 : La microplaque utilisée pour l'étude du profil fermentaire avant (A) et après (B) l'incubation..... | 26 |
| Figure 16 : Répartition des souches isolées selon le genre à partir du l'ben..... | 29 |
| Figure 17 : Répartition des souches isolées selon le genre à partir du beurre..... | 30 |
| Figure 18 : Antibiogramme des souches sur milieu MRS..... | 31 |
| Figure 19 : Résultats de test d'antagonisme vis à vis <i>Staphylococcus aureus</i> | 32 |
| Figure 20 : La zone d'inhibition d'une bactérie lactique vis-à-vis <i>Enterococcus faecalis</i> ... | 33 |
| Figure 21 : Evolution de pH du lait écrémé par les souches des bactéries lactiques | 35 |
| Figure 22 : Evolution de l'acidité Dornic dans le lait écrémé par les souches des bactéries lactiques..... | 36 |

Listes des tableaux en annexes

Annexe 1

Tableau I : Nombre moyen de colonies dénombrées (UFC/ml) dans les différents milieux.

Tableau II : Résumé de l'observation microscopique des isolats bacilles.

Tableau III : Résumé de l'observation microscopique des souches isolées sur milieu MRS.

Tableau IV: Résumé de l'observation microscopique des souches isolées sur milieu Mayeux.

Tableau V: Résumé de l'observation microscopique des souches isolées sur milieu M17.

Tableau VI : Les caractères physiologiques et biochimiques des souches isolées dans milieu MRS.

Sommaire

| | |
|--------------------|---|
| Introduction | 1 |
|--------------------|---|

Première partie : Synthèse bibliographique

| | |
|--|----------|
| I. Les bactéries lactiques | 3 |
| I.1. Les principales caractéristiques des bactéries lactiques | 3 |
| I.2. L'habitat | 3 |
| I.3. Classification | 4 |
| I.4. Méthodes d'identification des bactéries lactiques | 5 |
| I.5. L propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques | 6 |
| II. L'ben | 7 |
| II.1. Caractéristique physico-chimique de l'ben | 7 |
| II.2. La microbiologie de l'ben | 8 |
| III. Le beurre | 8 |
| III.1. La composition du beurre | 8 |
| III.2. La microbiologie du beurre | 9 |

Deuxième partie : partie pratique matériel et méthode

| | |
|--|-----------|
| I. Objectif du travail | 10 |
| II. Lieu d'étude | 10 |
| III. Origine des échantillons | 10 |
| IV. Analyse des échantillons | 11 |
| IV.1. Analyse physico-chimiques | 11 |
| IV.2. Analyses microbiologiques | 11 |

| | |
|--|----|
| IV.2.1. Dénombrement des bactéries lactiques | 11 |
| V. Purification et conservation des souches | 12 |
| VI. Identification des bactéries lactiques | 12 |
| VI.1. Critères morphologiques | 14 |
| VI.1.1. Caractérisation macroscopiques | 14 |
| VI.1.2. Caractérisation microscopiques | 14 |
| VI.2. Critères physiologiques et biochimiques | 14 |
| VII. Antagonisme | 16 |
| VII.1. Préparation des précultures des bactéries tests (pathogènes)..... | 16 |
| VII.2. Antagonisme bactéries lactiques / bactéries pathogènes | 17 |
| VIII. Etude de la cinétique d'acidification du lait par les bactéries lactiques | 17 |

Troisième partie : Résultats et discussion

| | |
|--|----|
| I. Analyse physico-chimiques des échantillons | 19 |
| II. Analyse microbiologique | 21 |
| II.1. Dénombrement et isolement des bactéries lactiques | 21 |
| II.2. Identification des isolats | 23 |
| III. Antagonisme | 32 |
| III.1. L'effet antibactérien des bactéries lactiques sélectionnées contre des bactéries | 32 |
| IV. L'étude de la cinétique d'acidité dans le lait | 34 |
| Conclusion | 38 |

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Une grande variété de produits laitiers fermentés sont préparés traditionnellement en Algérie dont le but est la bio-préservation du lait pour une utilisation ultérieure, ces produits font partie d'héritage Algérien qui ont une grande importance culturelle, médicinale et économique (**Benkarroum et al., 2004**).

Ils ont été développés sur une longue période avec les compétences culinaires de femmes. La fabrication des produits laitiers améliore la valeur nutritionnel du lait (**Benkarroum et al., 2004**).

De nombreuses études scientifiques montrent que les produits laitiers préparés traditionnellement à partir du lait cru ont des saveurs typiques et des qualités nutritionnelles de plus en plus recherchés par le consommateur (**Chammas et al., 2006 ; Patrignani et al., 2006**). Les produits laitiers traditionnels Algérien les plus importants sont : Rayeb, L'ben, Klila, Zebda et Jben (**Benkarroum et al., 2004**).

Le l'ben est un lait fermenté préparé par acidification spontanée du lait cru entier jusqu'à coagulation et d'un léger mouillage, puis d'un barattage, permettant de recueillir une part plus au moins importante de matière grasse sous forme de beurre (**Boubekri et al., 1984**).

Le beurre est un aliment énergétique, fragile, et altérable par la chaleur, ou par d'autres facteurs capables de nuire à sa qualité physicochimique, microbiologique et organoleptique. Du point de vue microbiologique peu d'information sont disponibles, ceci est dû à la méthode de fabrication, la qualité du lait et la nature de ce dernier qui conditionne fortement le développement de la flore lactique ou d'autre flore (**Adjoudj, 2010**).

L'objectif de ce travail, en premier lieu, est l'isolement et l'identification des bactéries lactiques indigènes du l'ben et du beurre collecté dans différentes régions de la wilaya de Bejaia de fabrication artisanale, afin de déterminer les genres bactériens lactiques qui s'y trouvent dans ces produits. Dans la partie suivante, nous avons étudié l'effet antagonisme de certaines bactéries lactiques isolées à l'égard de quelques bactéries pathogènes d'origine clinique et alimentaire.

Première partie
Synthèse bibliographique

I. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes utiles à l'Homme lui permettant de fabriquer et de conserver un grand nombre des aliments. Elles ont été isolée pour la première fois à partir du lait (**Metchnikoff, 1908 ; Sandine et al., 1972 ; et Carr et al., 2002**).

La première définition de bactéries lactiques (BL), basée sur la capacité des bactéries à fermenter et à coaguler le lait, englobait les bactéries coliformes et lactiques (**Stiles et Holzapfel, 1997**).

I.1. Les principales caractéristiques des bactéries lactiques

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

Les bactéries lactiques sont des microorganismes unicellulaires, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont Gram positives, immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes, et ne possédant pas de catalase (certaines souches possèdent une pseudocatalase), de nitrate réductase, et sont oxydase négatif. Elles ont des exigences nutritionnelles nombreuses (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) (**Holzapfel et al., 2001 ; Gevers 2002**). Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement glucidique qui, en utilisant les glucides, elles peuvent produire soit de :

- L'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes).
- l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives).
- L'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et de CO₂ (bactéries hétérolactiques strictes) (**Vandamme et al., 1996**).

I.2. L'habitat

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires susceptibles d'être retrouvées dans tous types d'habitats. Elles sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'Homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères ou des canaux galactophores. Ainsi que dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromage) (**Dellaglio et al., 1994**).

I.3. Classification

La première classification des bactéries lactiques a été établie en **1919** par **Orla-Jensen**. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimiotaxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (**Krieg, 2001**).

Il existe deux grands groupes morphologiques :

- Les coques (cocci) sont des sphères plus ou moins ovoïdes, de 0,5 à 1,5 μ m de diamètre dont la division peut engendrer des paires, des tétrades, des chaînettes ou des amas.
- Les bacilles sont des bâtonnets qui peuvent avoir différents aspects : des bâtonnets droits qui sont des formes classiques, des coccobacilles ou de longues chaînes de bacilles. Le bâtonnet peut s'incurver dans certains cas ou s'allonger en filament. Ils ont de 0,5 μ m à 2 μ m de diamètre, et de 1,5 à environ 10 μ m de long (**Desmazeaud, 1992**).

La classification des bactéries lactiques est basée sur le pourcentage en base G+C de l'ADN génomique, qui est inférieur à 50% à part *Bifidobacterium*.

Le tableau I présente les principaux genres de bactéries lactiques et les caractéristiques physiologiques qui forment la base de la classification.

Tableau I : Principaux genres de bactéries lactiques (Matamoros, 2008).

| Genre | Forme de la cellule | Type de fermentation |
|------------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>Aerococcus</i> | Coques | Homofermentaire |
| <i>Carnobacterium</i> | Bacilles | Hétérofermentaire |
| <i>Enterococcus</i> | Coques | Homofermentaire |
| <i>Lactobacillus</i> | Bacilles | Homo ou hétéro fermentaire |
| <i>Lactococcus</i> | Coques | Homofermentaire |
| <i>Leuconostoc</i> | Coques | Hétérofermentaire |
| <i>Oenococcus</i> | Coques | Hétérofermentaire |
| <i>Pediococcus</i> | Coques | Homofermentaire |
| <i>Streptococcus</i> | Coques | Homofermentaire |
| <i>Tetragenococcus</i> | Coques | Homofermentaire |
| <i>Vagococcus</i> | Coques ovoïdes | Homofermentaire |
| <i>Weissella</i> | Petits bacilles | Hétérofermentaire |

I.4. Méthodes d'identification des bactéries lactiques

L'approche classique de la taxonomie des bactéries lactiques a été toujours basée sur les caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques.

Les caractéristiques phénotypiques ont généralement servi de point de départ pour plusieurs tests et constituent la base de différenciation et d'identification des bactéries lactiques. Les méthodes physiologiques incluent principalement, la croissance à certaines températures, à certain concentration de NaCl, à différentes pH. Les méthodes métaboliques/biochimiques incluent principalement, la production de CO₂ et le profil de fermentation de nombreux sucres (Axelsson, 2004).

Une identification fiable est dépendante de l'information génotypique. Les techniques sont basées sur : l'homologie ADN-ADN, la détermination du pourcentage de base G+C de l'ADN génomique, le séquençage du gène codant pour ARN16S ribosomal, et la caractérisation du plasmide (Staley and Krieg, 1987) et le séquençage partiel ou complet des protéines cellulaires (Vandamme et al., 1996 ; Dicks & van Vuuren, 1987).

I.5. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques.

L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due aux métabolites excrétés : l'acide lactique et autres acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl, reutéline et les bactériocines (Leveau *et al.*, 1991 ; Klaenhammer *et al.*, 1994 ; De Vuyst et Leroy, 2007).

I.5.1. Les acides organiques

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques. La production de ces derniers permet une acidification du milieu qui peut limiter la croissance de certaines bactéries entre autres les bactéries indésirables et pathogènes. Ainsi, les acides organiques ont différentes actions telles qu'un excellent pouvoir bactéricide ou un effet bactériostatique contre les micro-organismes pathogènes qui se trouvent dans le tube digestif (Brul et Coote, 1999).

I.5.2. Le diacétyl

Le diacétyl (C₄H₆O₂) est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus sp*, *Leuconostoc sp*, *Lactobacillus sp* et *Pediococcus sp*, il un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif. Les concentrations nécessaires à l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm, et sont supérieures à celles présentes dans le beurre (Caplice et Fitzgerald, 1999).

I.5.3. Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Kostinek *et al.*, 2005).

I.5.4. La reutérine

Axelsson *et al.*, (1989) ont mis en évidence l'action inhibitrice d'une substance produite par *Lactobacillus reuteri*. Cette substance (reutérine) a été purifiée et identifiée. La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol. Elle a un large spectre d'activité (Vollenweider, 2004).

I.5.5. Les Bactériocines

Le terme **bactériocine** regroupe en fait tous les peptides antimicrobiens d'origine bactérienne issus de la voie ribosomique. La première définition (Tagg *et al.*, 1976) les désigne en effet comme des substances protéiques présentant une activité bactéricide dirigée contre des espèces phylogénétiquement proches (Jack *et al.*, 1995; Klaenhammer, 1988, 1993; Sablon *et al.*, 2000). Dans la pratique, les bactériocines désignent aujourd'hui le plus souvent les peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram positif et plus particulièrement les bactéries lactiques.

II. L'ben

C'est un lait fermenté, appelé selon les différentes zones géographiques : l'ben ou leben (les pays du nord d'Afrique) et Laban (Moyen-Orient) (Ben Kerroum et Tammime, 2004).

Le l'ben est préparé d'une façon traditionnelle par une fermentation du lait cru jusqu'à la coagulation, suivie d'un léger mouillage, puis d'un barattage, permettant de recueillir une part plus ou moins importante de matière grasse sous forme de beurre dit « zebda » (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1983).

II.1. Caractéristiques physico-chimiques du l'ben

La composition chimique du l'ben est variable, dépend des localités, des régions, des fermes, de la composition chimique du lait du départ et de la procédure de fabrication (El Baradei *et al.*, 2008) (Tableau II).

Tableau II : Caractéristiques physico-chimiques du l'ben (Tantaoui-Elaraki et al., 1983).

| Paramètres | Valeurs |
|----------------------|---------|
| pH | 4,4 |
| Acidité Dornic (D°) | 75 |
| Matière grasse (g/l) | 9,6 |
| Extrait sec (g/l) | 87,9 |

II.2. La microbiologie de l'ben

Les principaux groupes responsables de l'acidification du lait au cours de sa transformation en l'ben sont les *Lactococcus lactiques* et les *Leuconostoc*. Les espèces les plus importants *Lactococcus lactis*, *Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc lactis* et *Leuconostoc cremoris*. Les *Lactobacillus* spp, sont présents à de faibles nombres. (Tantaoui-Elaraki et al., 1983 a et Tantaoui-Elaraki et al., 1983 b).

III. Le beurre

Le beurre frais *Zebda* est obtenu après barattage du *Rayeb*. Ce dernier est occasionnellement augmenté d'une quantité d'eau tiède (40-50 °C) à la fin du barattage pour favoriser l'agglomération des globules lipidiques et accroître le rendement en beurre. Les globules gras apparaissant en surface, à la suite du barattage. Le surplus du beurre produit est transformé en beurre rancie (Smen) par lavage du beurre frais à l'eau tiède, saumurage (Benkerroum et Tamine., 2004).

III.1. La composition du beurre

Le beurre est obtenu par barattage de la crème ou du lait. Il ne contient au maximum que 18% de matière non lipidique dont 16% d'eau (Guiraud, 1998) (Tableau III)

Tableau III : La Composition du beurre (Adjoudj, 2010).

| Composants (pour 100g) | Valeurs |
|--|------------------|
| Eau | 16 % au maximum |
| Matière sèche dégraissée (lactose, protéine, minéraux) | 2 % au maximum |
| Protéines | 0,6 % |
| Glucides | 0,4 % |
| Lipides | 82 % |
| Cholestérol | 220-280 mg |
| Calcium | 16 mg |
| Carotène | 0,3-0,9 mg |
| Vitamine A | 0,4-1,05 mg |
| Energie | 755 Kcal= 3150KJ |

III.2. La microbiologie du beurre

Le beurre peut contenir tous les germes rencontrés dans le lait. Des bactéries lactiques d'acidité et d'arôme (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus diacetylactis*, parfois *Leuconostoc*) participent à l'élaboration des qualités organoleptiques du beurre (Guiraud, 1998).

Tableau IV : les différents groupes de bactéries lactiques isolées du beurre traditionnel (Adjoudj, 2010).

| Espèces | Pourcentage % |
|----------------------|----------------------|
| <i>Lactobacillus</i> | 52 |
| <i>Lactococcus</i> | 19 |
| <i>Leuconostoc</i> | 15 |
| <i>Enterococcus</i> | 13 |
| <i>Pediococcus</i> | 1 |

Deuxième partie

Partie pratique

Matériel et méthodes

I. Objectif du travail

L'étude réalisée répond à deux objectifs :

- ❖ Isolement et identification de bactéries lactiques à partir des produits fermentés traditionnel (l'ben, beure et smen) collectés dans différentes régions de la wilaya de Bejaïa.
- ❖ Sélection de bactéries lactiques ayant un effet antibactérien très important.

II. Lieu d'étude

Ce travail a été effectué au laboratoire de microbiologie bloc 9 de l'université d'Abderrahmane Mira de Bejaia.

III. Origine des échantillons

17 échantillons ont été collectés dans des différentes régions dans la wilaya de Bejaia. Les prélèvements ont été effectués à partir de trois produits laitiers de fabrication artisanale à base de lait de vache cru et de lait de chèvre : 7 échantillons de l'ben et 8 échantillons pour le beurre traditionnel (figure 1), et enfin 2 Smen (figure2). Ces derniers ont été transportés dans des flacons stériles suivis directement de l'analyse. (Tableau V).



Figure 1 : Aspect du beurre dans l'eau physiologique



Figure 2 : Aspect du smen

Tableau V : L'origine des échantillons prélevés de différentes régions de la wilaya de Bejaia.

| Echantillon | Origine | Matière de production |
|--------------------|----------------|------------------------------|
| Beurre | Adekar | Lait de vache |
| | Amizour | |
| | Souk-El tenine | |
| L'ben | Adekar | Lait de vache |
| | Amizour | |
| | Souk-etnine | |
| | Taghzouth | Lait de chèvre |
| Semen | Oudeghir | Lait de vache |

IV. Analyse des échantillons

IV.1. Analyse physico-chimiques

Deux paramètres ont été mesurés : le pH et l'acidité Dornic .

Le pH des échantillons a été déterminé directement en utilisant un pH-mètre (HANNA Inst. pH 211, microprocessor pH meter) où l'électrode a été insérée directement dans chaque échantillon.

L'acidité Dornic a été mesurée selon la méthode normalisée au NaOH (N/9) en ajoutant 3 gouttes de phénolphtaléine (1%) comme indicateur coloré, dans un 10 ml de chaque échantillon. L'acidité titrable du lait a été exprimée en degrés Dornic (°D) (**Bourgeois et al., 1996**).

IV.2. Analyses microbiologiques

IV.2.1. Dénombrement des bactéries lactiques

Des dilutions décimales ont été préparées en prélevant 1 ml « L'ben » dans 9 ml d'eau physiologiques, ces dilutions sont de 10^{-1} jusqu'à 10^{-8} . Ainsi que 10g de beurre ou de smen sont introduit dans 90 ml d'eau physiologique stérile, suivis d'un chauffage à 45°C dans le but d'homogénéiser. A partir de cette solution mère des dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-8} ont été effectuées pour le beurre, et de 10^{-1} à 10^{-3} pour le smen (figure04). Ensuite, 1ml de

ces dilutions ont été ensemencés en masse sur des boites de Pétri en utilisant différents milieux (tableau VI).

Après croissance, les colonies ont été comptées pour chaque dilution pour déterminer le nombre d'UFC/ml pour le l'ben et d'UFC/g pour le beurre ainsi que le smen.

Tableau VI : Milieux d'isolement des bactéries lactiques

| Milieux d'isolement | Bactérie | T°C /durée | Références |
|---------------------|-------------------------|------------|-----------------------------|
| Milieu MRS | Lactobacilles | 37/24h-48h | Man <i>et al.</i> , 1960 |
| Milieu M17 | Streptocoques lactiques | 30/24h-48h | Terzaghi et Sandine, 1975 |
| Milieu MSE | Leuconostocs | 30/48h-72h | Mayeux <i>et al.</i> , 1962 |

V. Purification et conservation des souches

Les bactéries ont été purifiées par une séries de repiquage par stries sur milieu MRS(3 à 5 colonies sont prélevées de chaque boite), l'opération a été renouvelée jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur qui renseigne sur la pureté des souches, puis conservées sur milieu MRS incliné à 4°C, où elles peuvent être conservées de 3 à 4 semaines (Devoyod et Muller., 1969).

VI. Identification des bactéries lactiques

L'identification des bactéries a été réalisée par l'application des techniques phénotypiques, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Larpent-Gourgaud *et al.*, (1997) et Axelsson., (2004).

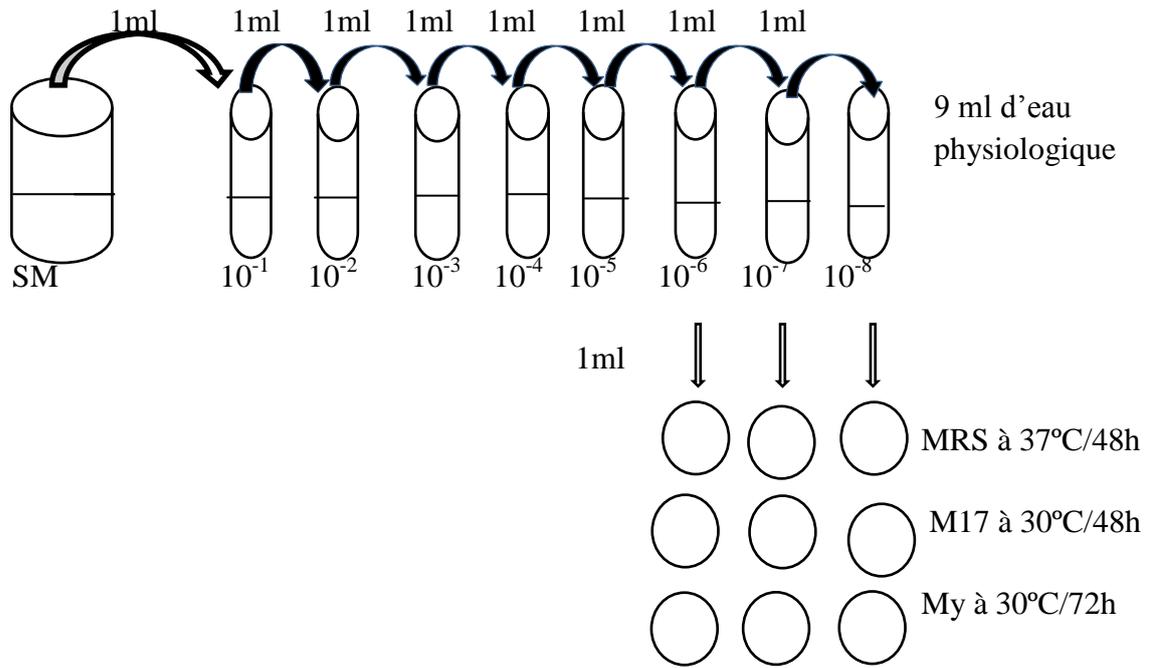


Figure 3 : Dénombrement des bactéries lactiques à partir de l'ben.

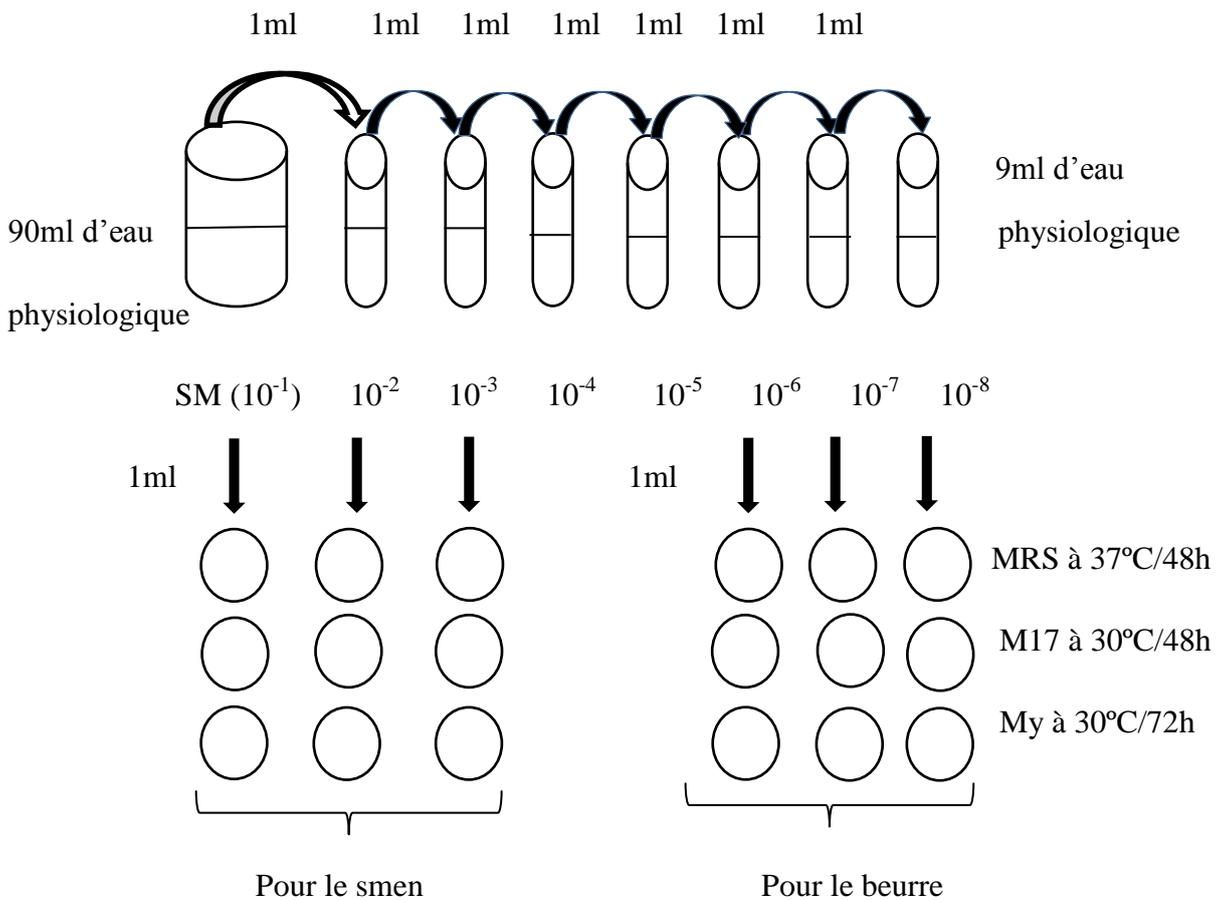


Figure 4: Dénombrement des bactéries lactiques à partir de beurre et Smen.

VI.1. Critères morphologiques

VI.1.1. Caractérisation macroscopiques

C'est une observation qui permet de décrire l'aspect des colonies, obtenues sur milieu gélosé (taille, pigmentation, contour, viscosité...).

IV.1.2. Caractérisation microscopiques

L'examen microscopique a été effectué après coloration de Gram sur une culture fraîche de 24h. La coloration de Gram (Annexe 2) a été utilisée pour classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie, et leur mode d'association (**Joffen et Lyrat, 1996**).

VI.2. Critères physiologiques et biochimiques

VI.2.1. Test de catalase

Une goutte d'eau oxygénée à 10V était déposée sur une colonie développée pendant 24h à 48h sur le milieu gélosé, le résultat est immédiat et se caractérise par un dégagement gazeux (O₂) si la catalase est présente (**Devoyod et Muller., 1969**).

VI.2.2. Test de production de gaz

Des colonies bien isolées ont été ensemencées sur MRS bouillon renferme une cloche de Durham inversé. L'incubation se fait à une température de 30°C pendant 24h à 48h (**Holzappel and Gerber, 1983 Muller., 1990**).

VI.2.3. Test de croissance en présence de NaCl

Sur des bouillons MRS contenant du NaCl à concentration 3, 4 et 6,5%. Nous avons cultivées les souches isolées puis les incubées à 30°C pendant 24h à 48h. Le développement des cultures a été apprécié par comparaisons avec un tube témoin non ensemencé, incubé dans les mêmes conditions (**Sherman, 1937 ; Larpent et Gourgaud et al., 1997**).

VI.2.4. Test de croissance à différentes pH

Le test a été réalisé sur des bouillons ajusté à un pH= 4,5 et à 9,6. Après ensemencement des milieux avec une culture jeune, on incube à 30°C. L'observation d'un trouble signifie que la bactérie résiste à ces milieux (**Carr et al., 2002 et Mathara et al., 2004**).

VI.2.5. Test de croissance à différentes températures

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation du bouillon MRS par les cultures pures, les tubes sont incubés à 30°C, 37°C et à 45°C pendant 24h à 48h, seul les bactéries thermophile poussent à cette température 45°C (**Larpent, 1991**).

VI.2.6. Test de la thermorésistance

La thermorésistance est réalisée pour les cocci, un chauffage des cultures dans MRS, à une température de 63, 5 °C est effectué dans le bain- marie pendant 30 min, suivi d'une incubation à 30°C pendant 48h. Le résultat positif se traduit par un trouble (**Stiles et Holzapfel, 1997; Teuber et Geis, 2006**).

VI.2.7. La résistance à la vancomycine

Seuls les isolats de genre *Leuconostoc* ont été testés pour la résistance à la vancomycine. Un antibiogramme est réaliser sur gélose MRS, suivis d'une incubation à 30°C pendant 24h (**Orberg et Sandine., 1984; Swensor et al., 1990**).

VI.2.8. Test de fermentation des sucres

Ce test permet d'apprécier la capacité des souches à fermenter quelques sucres. Cette fermentation a été réalisé sur milieu MRS modifié (sans sucre et sans l'extrait de viande) additionner de rouge de phénol comme indicateur du pH, 100ul de ce milieu a été déposer dans les puits d'une microplaque on ajoutant 5µl de différentes sucres (Sucrose, Mannitol, Lactose, Galactose, Arabinose et enfin Cellulose). Les solutions sucres ont été préparées à 5% et stérilisés par autoclavage. Les suspensions bactériennes ont été préparées par isolement d'une colonie à l'aide d'une l'ance de platine attentivement sans racler la gélose, ensuite ces colonies sont introduites dans des tubes d'eau physiologique, on prélevant 25µl de la suspension et les déposer dans chaque puits. L'incubation se fait à 30°C pendant 48h (**Larpent., 1996**).

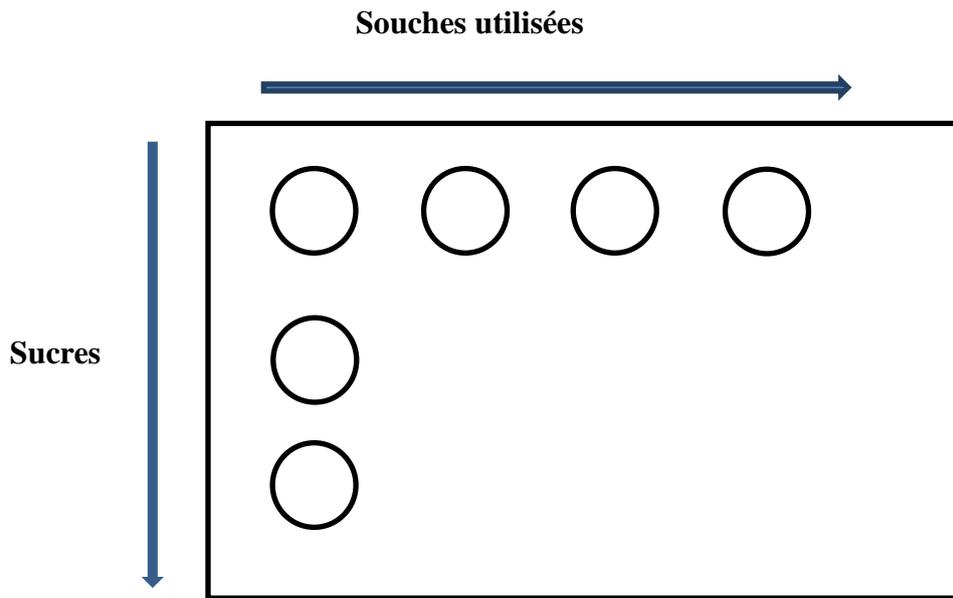


Figure 5: schéma représentant la microplaque utilisé pour le test de fermentation des sucres.

VII. Antagonisme à l'égard des bactéries pathogènes

Avant de réaliser ce test les souches isolées ont été sélectionnées, dans le but d'avoir des souches plus performantes. Les 61 souches ont été ensemencées sur milieu MRS par la méthode des touches (spots) en utilisant les écouvillons, puis sont incubées à 30°C pendant 24h. Ensuite la souche cible utilisée, *Staphylococcus aureus*, a été revifiée dans 5ml de bouillon BHI et l'incubé à 37°C pendant 24h. Après l'incubation, 1ml d'une concentration de 10^8 UFC/ml de cette souche a été introduit dans 9ml de gélose Mueller Hinton(MH) en surfusion, puis on la verse dans les boîtes de Pétri qui renferment déjà les spots des souches productrices, ces dernières ont été incubées à 37°C pendant 24h. Les souches qui ont une grande zone d'inhibition sont sélectionnées pour les tester contre les autres pathogènes.

VII.1. Préparation des précultures des bactéries cibles (pathogènes)

Avant l'utilisation des souches de bactéries pathogène (Tableau VII), sont revifiées dans 5ml du bouillon BHI et incubé à 37°C pendant 24h. Des cultures bactériennes de 10^8 UFC/ml sont préparées.

Tableau VII : Les différentes souches utilisées dans le test d'antagonisme.

| Bactéries | Gram | Origine | Références |
|--------------------------------|-------------|------------------------------|--|
| <i>Escherichia coli</i> | - | Clinique | Hôpital |
| <i>Salmonella</i> | - | Clinique | Hôpital |
| <i>Pseudomonas</i> | - | Clinique | Hôpital |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | - | Clinique | Hôpital |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | Olive | Laboratoire de Microbiologie Alimentaire |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | Clinique | Hôpital |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | Alimentaire (Iben et beurre) | Laboratoire de Microbiologie Alimentaire |

VII.2. Antagonisme des bactéries lactiques sélectionnées vis à vis les bactéries pathogènes

Nous avons confronté les souches de bactéries lactiques isolées, les plus actives à l'égard de *Staphylococcus aureus*, avec *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Enterococcus faecalis*, autres *Staphylococcus aureus*, et *Lactobacillus plantarum*.

Les souches lactiques ont été ensemencées en touche (spots) à l'aide d'un écouvillon stérile), les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24h. 1ml de la souche pathogènes est introduite dans 9 ml dans la gélose MH puis verser dans les boîtes de Pétri précédentes, après solidification, ces dernières sont incubées à 37°C pendant 24h. La lecture des résultats consiste à déterminer la présence d'une zone d'inhibition que l'on mesure pour évaluer le potentiel inhibiteur de la souche (**Fleming et al., 1975**).

VIII. Etude de la cinétique d'acidification du lait par les bactéries lactiques

L'un des caractères technologiques essentiels des bactéries lactiques est leur aptitude à l'acidification du lait qui dépend de l'aptitude à la fermentation du lactose et de la résistance à l'acidité développée dans le lait écrémé stérile.

Les 08 souches sélectionnées ont étéensemencées dans le lait écrémé(Candia) et incubées à 30°C pendant 48h. Après l'incubation, on prélève 1ml de chaque souche et les introduites dans des tubes contenant 9 ml de lait écrémé (Candia), puis les incubées à 30°C pendant 24h. Le pH et l'acidité Dornic du laitensemencé par les bactéries lactiques isolées ont été mesurés chaque 2heures à partir de t=0heure jusqu'à t=48h.

Résultats et discussion

I. Analyse physico-chimiques des différents échantillons

Les valeurs des paramètres physico-chimiques mesurés de tous les échantillons sont variables. Elles sont présentées dans le Tableau VIII.

Tableau VIII : Résultats des analyses physico-chimiques des différents échantillons.

| Paramètres Code de l'échantillon | pH | Acidité Dornic D° |
|-------------------------------------|------|----------------------|
| 01Lb SET ₁ | 4,47 | 95 |
| 02B SET ₁ | 4,66 | 100 |
| 03B SET ₂ | 4,83 | 70 |
| 04Lb SET ₁ | 4,44 | 97 |
| 05B SET ₁ | 4,32 | 100 |
| 06B ADK | 5,65 | 90 |
| 07Lb AMZ | 4,65 | 105 |
| 08B AMZ | 4,72 | 50 |
| 09Lb SET ₂ | 4,95 | 102 |
| 10B SET ₂ | 5 | 80 |
| 11Lb SET ₁ | 4,48 | 60 |
| 12BSET ₁ | 4,79 | 99 |
| 13Lb TGZT | 4,35 | 76 |
| 14S ODG | 4,25 | 130 |
| 15Lb ADK | 4,75 | 100 |
| 16B ADK | 5,01 | 40 |
| 17S ODG | 4,91 | 102 |

I.1. pH

Le pH des échantillons du l'ben analysés montre des valeurs variantes entre 4,35 et 4,95 avec une moyenne de 4,58. Pour les échantillons du beurre et du smen, le pH se situe entre 4,25 à 5,65 avec une moyenne de 4,81.

Les valeurs de pH obtenues à partir du l'ben sont élevées par rapport à celles de **Tantaoui- Elaraki et al., (1983)** d'une moyenne de 4,4.

Benkerroum et Tamime(2004) ont reporté que la composition chimique du « L'ben » dépend de la qualité du lait cru utilisé et varie entre les différentes localités, régions et fermes. D'après **J.O.R.A (1993)**, les résultats révélés dans ce travail ne respectent pas les standards du pH de l'ben normal dont les valeurs varient entre 4,4 et 4,6.

Selon les résultats obtenues, le pH des différentes échantillons se diffèrent d'une région à une autre et même s'ils sont issues de la même région :

- Le pH des échantillons du l'ben de la région de Souk El Tenine (SET) varie entre 4,44 à 4,95 avec une moyenne de 4,58.
- Le pH du beurre de SET est varié entre 4,32 à 5 avec une moyenne de 4,72.
- Le pH du l'ben d'origine Taghzouth provenant de lait de chèvre est plus acide (4,35) que celui d'Amizour (4,65) et celui d'Adekar (4,75).
- La valeur de pH des deux échantillons de beurre d'origine Adekar est supérieure (5,01 et 5,65) à celle d'Amizour d'où le pH est 4,72.
- Enfin, pour les deux échantillons de smen d'origine Oud-ghir, leurs pH est de 4,25 à 4,91. Ces résultats se rapprochent de celle rapportée par **(Belyagoubi, 2014)** où le pH varie entre 4,71 et 5,03.

On note que les valeurs de pH du l'ben se rapprochent, et sont aussi plus acides que les valeurs obtenues dans le smen et le beurre.

La différence de la valeur du pH trouvée dans les différents échantillons étudiés peut être due à plusieurs facteurs tels que la méthode et l'âge, l'origine du lait et la nature de l'alimentation donnée aux animaux **(Ouadghiri, 2009)**.

I.2. Acidité Dornic

L'acidité Dornic des échantillons de l'ben est comprise entre 60 D° à 105D° avec une moyenne de 90,71D°. Ces résultats sont supérieurs aux valeurs moyennes obtenues par **Tantaoui- Elaraki et al., (1983)** et **BenKerroum et Tamime (2004)** au Maroc avec des acidités Dornic qui varie entre 75, 82 et 81,65D°. Cependant les valeurs de l'acidité Dornic des échantillons du beurre sont comprises entre 40 et 100°D. L'acidité des deux échantillons de smen varie entre 101 à 130°D.

Les résultats d'acidité Dornic obtenues sont variables selon les régions :

- L'acidité du l'ben d'origine Souk El Tenine (SET) est varié entre 60 et 102°D d'une moyenne de 88,5°D.
- Les échantillons du l'ben d'origine Amizour (105°D) et Adekar (100°D) ont des valeurs d'acidité qui se rapprochent.
- Selon **J.O.R.A (1993)** ; la norme de l'acidité Dornic est tolérée entre 75 et 85D°, ce qui explique que l'ben d'origine Taghzouth conforme aux normes par contre les résultats des échantillons des autres régions sont supérieurs aux valeurs tolérées.

- Les valeurs d'acidités obtenues à partir des 3 échantillons de beurre SET sont similaires (100°D, 100°D et 99°D).
- L'acidité d'échantillon de beurre d'Adekar (90,40°D) et enfin Amizour (50°D) ont des valeurs voisines.
- Les grandes valeurs d'acidités sont obtenues dans les deux échantillons de smen (102, 130°D).

Cette différence pourrait être due à une différences d'âge des échantillons analysés ; plus un échantillon est âgé, plus il serait acide (Boubekri *et al.*, 1984).

II. Analyse microbiologique

II.1. Dénombrement et isolement des bactéries lactiques

Les résultats de dénombrement de la flore lactique de différents échantillons sont rassemblés dans le Tableau IX (annexe1). Le nombre moyen de colonies obtenu, pour l'ensemble des échantillons sont plus important sur les géloses M17 et MRS que sur la gélose Mayeux.

➤ Le dénombrement des bactéries lactiques dans le milieu M17

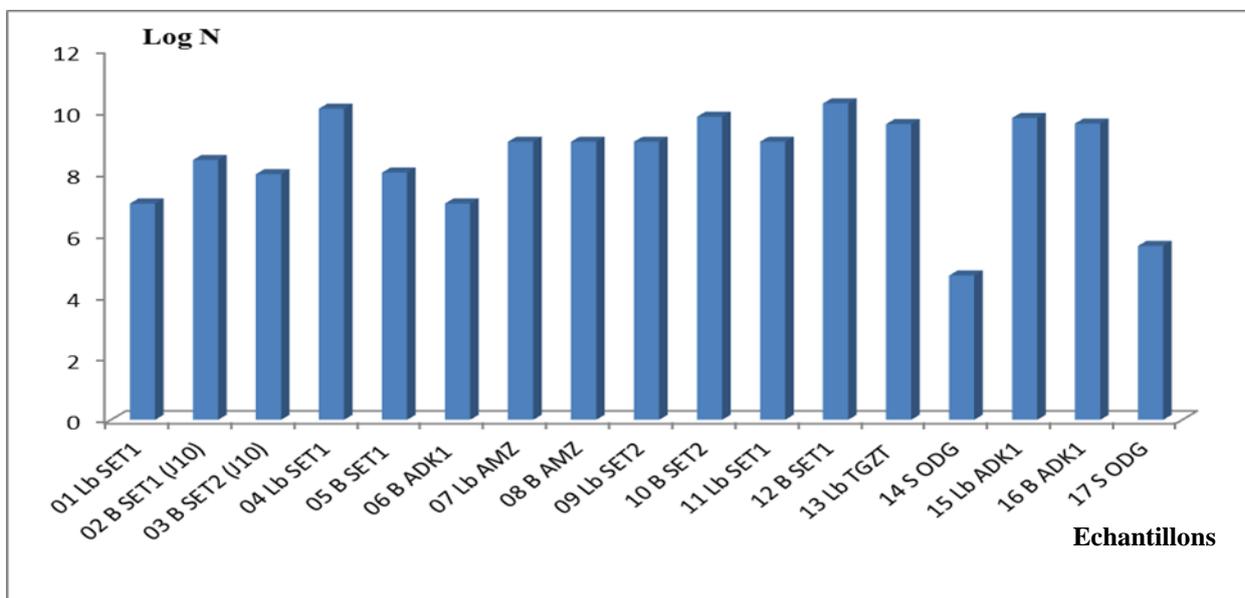


Figure 6: La concentration cellulaire de chaque échantillon sur le milieu M17.

Concernant le dénombrement, le nombre total de bactéries lactiques comptées sur M17 varie entre 10^7 UFC/ml (1Lb SET₁) à $1,8 \cdot 10^{10}$ UFC/ml (4Lb SET₁) pour les échantillons de l'ben. Une valeur de $3,76 \cdot 10^9$ UFC/ml est enregistrée pour l'échantillon 13Lb TGZT.

Nous avons obtenues une valeur minimale de 10^6 UFC/g (14 S ODG) et une valeur maximale de $1,76 \cdot 10^9$ UFC/g (12 B SET₁) pour les échantillons de beurre. Une valeur de $4,68 \cdot 10^3$ UFC/g pour 14 S ODG et $4,36 \cdot 10^4$ UFC/g pour l'échantillon 17 S ODG, ces résultats sont supérieures à ceux obtenus par (Belyagoubi, 2014) dont leurs nombres de colonies sur M17 varie entre $8 \cdot 10^2$ et $3 \cdot 10^4$ UFC/g.

➤ **Le dénombrement des bactéries lactiques dans le milieu MRS**

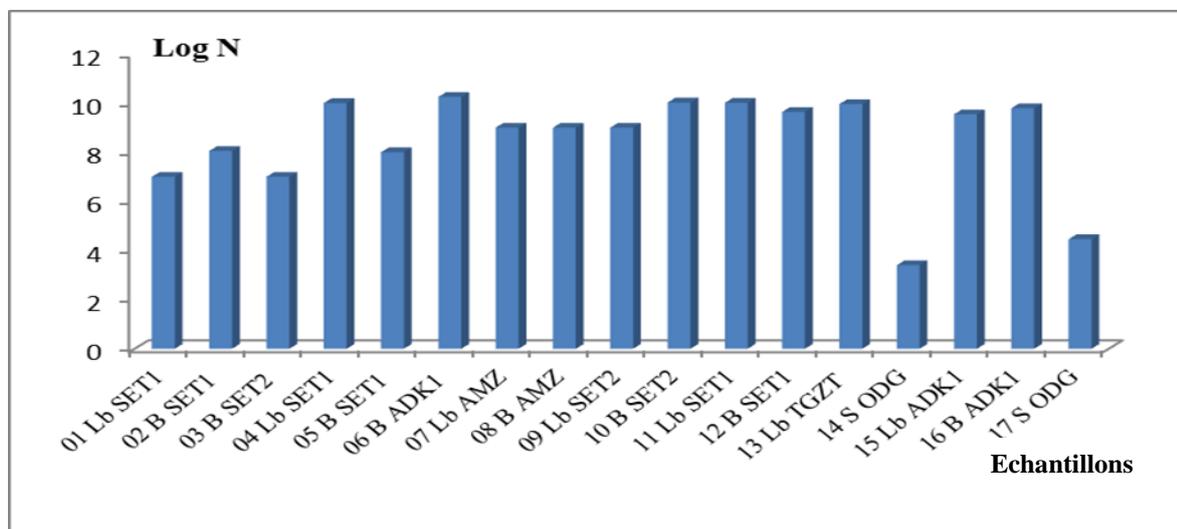


Figure 7 : La concentration cellulaire de chaque échantillon sur milieu MRS.

La concentration bactérienne, en utilisant le milieu MRS, pour le l'ben varie entre 10^7 UFC/ml (1Lb SET₁) et $1,04 \cdot 10^{10}$ UFC/ml (11Lb SET₁), ainsi que $9,30 \cdot 10^9$ UFC/ml pour l'échantillon 13Lb TGZT. Pour le beurre une valeur minimale est de 10^6 UFC/g (3B SET₂) et une maximal de $1,80 \cdot 10^9$ UFC/g (06B ADK). Une valeur de $2,55 \cdot 10^2$ UFC/g pour 14 S ODG, et $2,90 \cdot 10^3$ UFC/g pour 17 S ODG est révélée, Ces résultats sont en accord avec les travaux de (Belyagoubi, 2014) où les valeurs trouvées sont de $6 \cdot 10^2$ à $2 \cdot 10^4$ UFC/g.

➤ Le dénombrement des bactéries lactiques dans le milieu Mayeux

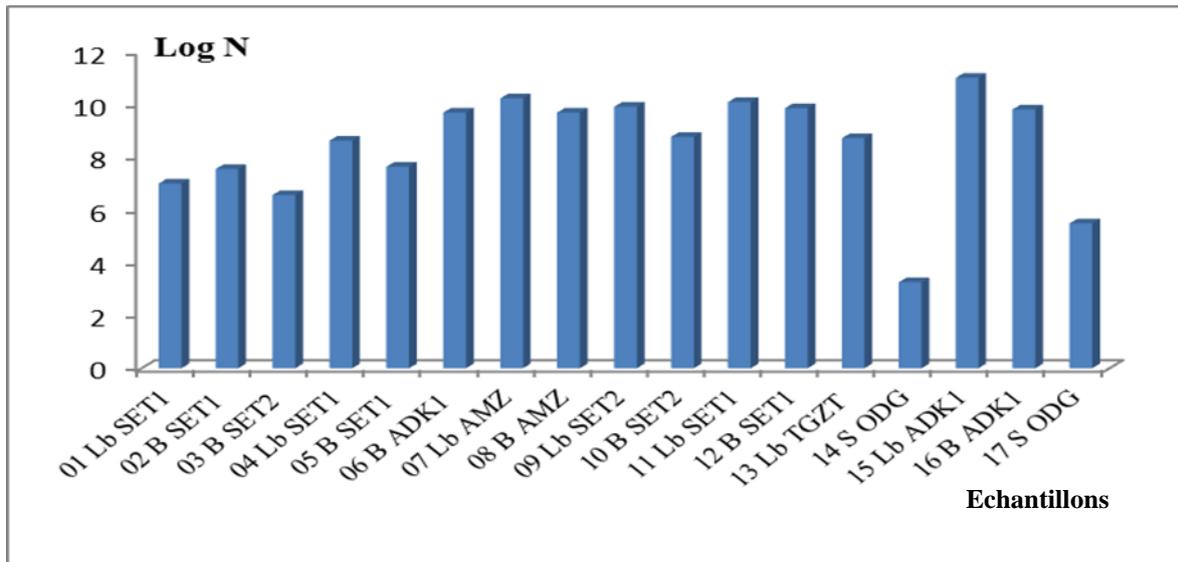


Figure 8 : La concentration cellulaire de chaque échantillon sur milieu Mayeux.

Le nombre moyen de colonies, obtenue dans l'échantillon de l'ben varie entre 10^7 UFC/ml (01Lb SET₁) et $1,03 \cdot 10^{11}$ UFC/ml (15Lb ADK₁), une valeur de $5,53 \cdot 10^9$ UFC/ml est enregistrée pour 13Lb TGZT. Pour les échantillons de beurre les valeurs sont comprises entre $8,75 \cdot 10^5$ UFC/g (03Br SET₂) et $7,35 \cdot 10^8$ UFC/g (12Br SET₁).

Et enfin, pour les deux échantillons de smen, les valeurs se situent entre $1,85 \cdot 10^2$ UFC/g pour l'échantillon 14 S ODG et $3,16 \cdot 10^5$ UFC/g pour 17 S ODG.

Selon les travaux réalisés par (Oudghiri, 2010), le nombre de clonie d'échantillon du l'ben ne dépasse pas 10^9 UFC/ml contrairement à nos résultats qui peuvent atteindre $1,03 \cdot 10^{11}$ UFC/ml.

II.2. Identification des isolats

Seuls les isolats à Gram positif et catalase négative ont été identifiées, par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

II.2.1. Critères morphologiques

- L'examen macroscopique sur les différents milieux montre des colonies circulaires bombées et de couleur blanche - crémeuse (figure 09 et 10).



Figure 9 : Observation macroscopique des colonies sur milieu Mayeux.



Figure10 : Observation macroscopique des colonies sur milieu MRS.

- L'aspect microscopique des souches après coloration de Gram a révélés deux formes de cellules : Coques et Bâtonnets. Les coques de forme ovoïdes ou rondes sont disposées en paires (diplocoques) ou en chainettes (courtes ou longues). Pour les bâtonnets nous avons soit la forme bacille (moyennes ou longues) ou bien coco-bacille (**tableaux II, III en annexe 01**).

Ces observations permettent de classer initialement les isolats selon le Gram, leurs morphologies cellulaires, et leur mode d'association (**Joffin et Leyral, 1996**).

Les résultats obtenus montrent une présence majoritaire de coques avec 85,86% par rapport aux bâtonnets qui ont été retrouvé à faible pourcentage 14,13%. La figure 13 présente un pourcentage de 46,66 de forme cocci et de 53,33 pour la forme bacille pour l'échantillon du l'ben. Cependant, 56,25% de forme bacille et 43,75% de cocci pour l'échantillon du beurre (figure 14).

Ces résultats ont été supérieurs aux travaux réalisés par (**Adjoudj, 2010**) dont le pourcentage des coques est 47,66 et 52,34% pour les bacilles.

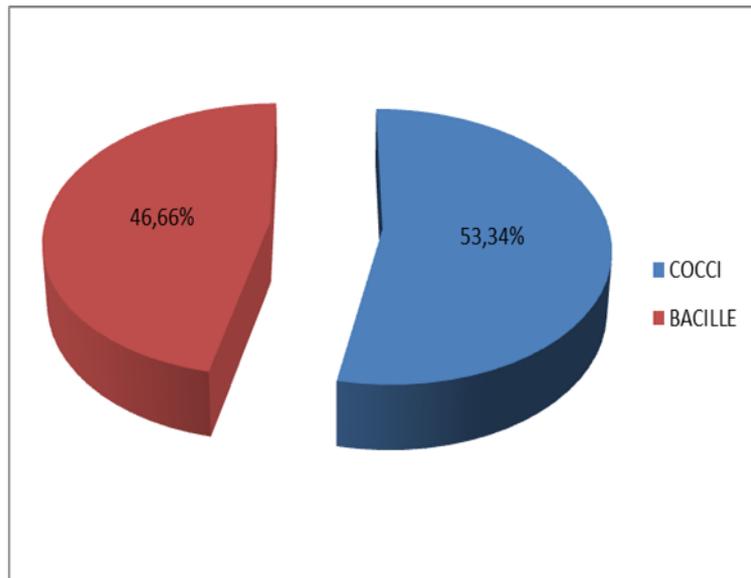


Figure 13 : La fréquence des deux formes des souches isolées à partir du l'ben.

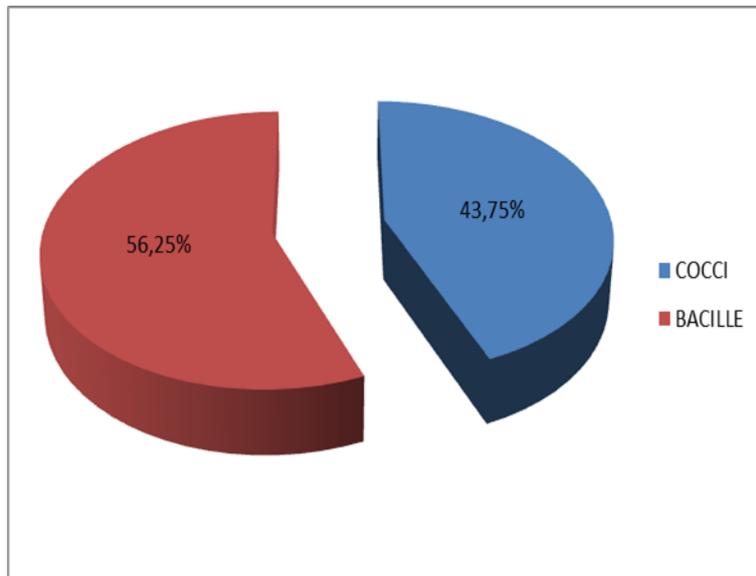


Figure 14 : La fréquence des souches isolées à partir du beurre.

II.2.2. Critères physiologiques et biochimiques

En plus des tests basés sur la morphologie des bactéries, nous nous sommes basés aussi sur les tests physiologiques et biochimiques pour déterminer le genre de nos isolats. Le profile fermentaire est le test essentiel, permettant d'identifier les espèces des bactéries lactiques. Ce test est réalisé par l'utilisation d'une microplaque (figure 15).

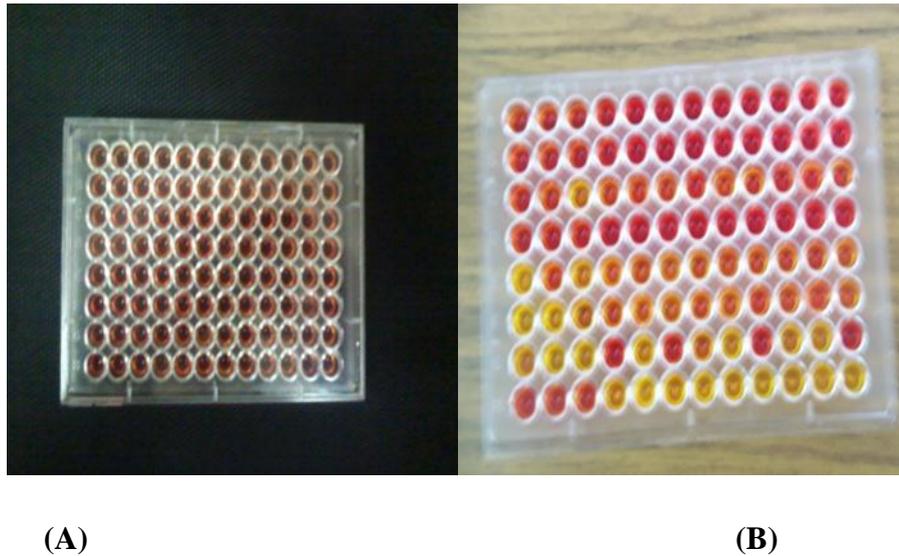


Figure 15 : La microplaque utilisée pour l'étude du profil fermentaire.

(A) avant l'incubation, (B) après l'incubation.

➤ Les lactobacilles

Tableau IX : Les caractères physiologiques et biochimiques des souches isolées (bacille).

| Code de la souche | | 15 Lb, ADK | 12 B SET1 | 14 S1 ODG | 14 S 2ODG | 12 B SET1 | 14 S ODG | 15 Lb1ADK | 15 Lb2 ADK | 15 Lb 3ADK | 15 Lb4 | 06 B 1ADK | 06 B2 ADK | 01 Lb ET1 (Strent) | 06 B 3ADK | 08 B AMZ | 07 Lb AMZ |
|-------------------------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|------------|------------|--------|-----------|-----------|--------------------|-----------|----------|-----------|
| Production de gaz | | - | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + |
| Température | pH | 4,5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 30°C | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 37°C | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 45°C | | - | - | + | + | - | + | ++ | ++ | - | + | + | + | + | + | + |
| | 63,5°C | | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Fermentation des sucres | Galactose | | + | + | + | + | + | + | +/- | +/- | + | +/- | +/- | + | +/- | + | + |
| | Cellulose | | - | - | - | - | - | - | - | +/- | - | - | - | - | - | - | - |
| | Lactose | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Mannitol | | + | + | + | + | + | + | + | +/- | + | + | + | + | + | + | + |
| | Arabinose | | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | +/- | + | + | + |
| | Sucrose | | + | + | - | + | - | + | + | - | + | + | + | + | - | + | + |

Les isolats en forme bâtonnets des échantillons (7Lb AMZ, 15Lb2 ADK₁, 15Lb3 ADK₂, 12B1 SET₁, 12B2 SET₁, 14S1 ODG, 14S1 ODG) sont hétérofermentaire facultatif

mésophile, et qui croissent à 30°C et à 37°C, ce qui les rassemble dans le groupe *Bétabacterium*.

Les isolats bâtonnets mésophiles (15Lb4 ADK, 15Lb1 ADK) croissent à des températures de 30°C et à 37°C, mais elles ne se développent pas à 45°C, le type fermentaire de ces souches est homofermentaire. Cela révèle qu'elles appartiennent au genre *Streptobacterium*.

Les isolats (14S ODG, 6Br ADK, 6B 1ADK, 8Br AMZ, 15Lb1 ADK, 6B2 ADK) de forme bâtonnet thermophile et homo fermentaire elle appartienne au groupe *Thermobacterium*.

D'après les résultats de profil fermentaire des sucres (tableau IX), et par comparaison aux caractéristiques des lactobacilles (Khedid et al., 2009), les lactobacilles isolés peuvent appartenir aux espèces : *Lactobacillus plantarum*(15Lb 1 ADK), *Lactobacillus brevis*(15Lb 3 ADK), *Lactobacillus debruekii*(14 S1ODG) et *Lactobacillus casei*(15 Lb 4 ADK).

➤ **Les Leuconostocs**

Tableau X: Les caractères physiologiques et biochimiques des bactéries isolées à partir du milieu Mayeux.

| Code de la souche | | 11 Lb SET1 | 01 Lb SET1 | 06 B ADK | 07 Lb AMZ | 03 B SET2 | 02 B 1 SET1 | 17 S ODG | 01 Lb SET1 | 02 B2 SET1 | 06 B ADK |
|-------------------------|-----------|------------|------------|----------|-----------|-----------|-------------|----------|------------|------------|----------|
| Fermentation du glucose | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ph | 4,5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 9,6 | + | - | - | - | - | + | - | + | - | - |
| Température | 30°C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 37°C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 45°C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 63,5°C | - | + | + | - | - | + | - | + | - | + |
| Concentration NaCl | 3% | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | 4% | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| | 6,5% | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Fermentation des sucres | Galactose | + | | - | + | | | + | | + | + |
| | Cellulose | +/- | | - | - | | | +/- | | - | - |
| | Lactose | + | | + | + | | | + | | + | + |
| | Mannitol | + | | + | + | | | + | | - | + |
| | Arabinose | + | | - | + | | | + | | + | + |

| | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---|--|---|---|--|--|---|--|---|---|
| | Sucrose | + | | - | + | | | + | | + | + |
|--|---------|---|--|---|---|--|--|---|--|---|---|

Toutes les souches indiquées dans le tableau croissent à 30°C et à 37°C mais, elles ne peuvent pas se développer à 45°C. Leurs types fermentaires est hétéro fermentaires, et elles résistent à la vancomycine ce qui révèle qu'elles appartiennent au genre *Leuconostoc*.

Les cocci mésophiles homo-fermentaires (Lb, 11 Lb SET1) qui ne poussent pas à 6,5% NaCl, appartiennent au genre *Lactococcus*.

Les isolats homo-fermentaires (08 B AMZ, 09 Lb SET2, MRS, 09 Lb SET2, 12 B SET₁, 15 Lb ADK) se développent à 45°C, dans le milieu hyper-salé (4% et 6,5% NaCl), dans le milieu hyperalcalin (pH 9,6), et sont thermorésistants font partie du genre *Enterococcus*.

Les cocci mésophiles hétéro-fermentaires (02 B1SET1, 12 Br SET1, 17 S ODG, 02 B2 SET1, 01 Lb SET1, 1B 1SET₁, 1B2 SET₁, 7B SET₁, 2S ODG, 7B SET₁, 1Lb SET₁, 4Lb SET₁, 1Lb SET₁) ne se développent pas à 45°C, résistent à la vancomycine appartiennent au genre *Leuconostoc*.

Les résultats du profil fermentaire des sucres (tableau X) révèlent l'appartenance des isolats du genre *Leuconostoc* à l'espèce *Leuconostoc mésentéroïdes*. Les isolats obtenus appartiennent à deux sous espèces présumées ; *Leuconostoc mésentéroïdes subsp dextranicum* (06 B ADK) et *Leuconostoc mésentéroïdes subsp mesontéroïdes*, ce qui est montré dans les travaux de **Kihal(1996) et Carr et al.,(2002)**.

Tableau XI : les caractères physiologiques et biochimiques des bactéries isolées dans M17.

| Code de la souche | 02 B SET1 | 14 S ODG | 07 Lb AMZ | 14 SODG | 09 Lb SET ₂ | 11 Lb SET1 | 17 S ODG | 11 LbSET1 | 10 B SET2 | 16 B ADK | 17 S ODG | 02 B SET1 |
|-------------------|-----------|----------|-----------|---------|------------------------|------------|----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|
| Production de gaz | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + |
| pH | 4,5 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | + | + |
| | 9,6 | + | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + |
| Température | 30°C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 37°C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 45°C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 63,5°C | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + |
| C os | 3% | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

| | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|-----------|---|----|----|----|----|-----|----|-----|----|-----|----|----|
| | 4% | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| | 6,5% | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Fermentation des sucres | Galactose | | - | | + | + | + | - | + | | +/- | + | + |
| | Cellulose | | - | | - | - | - | - | - | | - | - | - |
| | Lactose | | + | | + | + | + | + | + | | + | + | + |
| | Mannitol | | + | | + | + | + | + | + | | + | + | + |
| | Arabinose | | + | | + | + | + | + | + | | + | - | - |
| | Sucrose | | + | | + | + | +/- | - | +/- | | - | + | + |

Les isolats homofermentaires (09 Lb SET₂ et 17 S ODG) ne se développent à 45°C, dans le milieu hypercalcin 9,6 et poussent à pH4, dans le milieu hypersalé 6,5% appartiennent au genre *Pédiococcus*.

Les souches hétérofermentaires (10B SET₁, 16Br ADK, 17S ODG, 2B SET₁, 14S ODG, 2B SET₁, 14S ODG) ne poussent à 45°C, ce qui relève qu'elles appartiennent au genre *Leuconostoc*.

La caractérisation physiologique et biochimiques des souches bactériennes isolées a révélé qu'elles appartiennent aux 5 genres : *Lactobacillus* (24,59%), *Lactococcus*(3,27%), *Enterococcus* (8,19%), *Leuconostoc* (49,18%), *Pediococcus* (3,27%). On remarque une dominance du genre *Leuconostoc* (Oudghiri, 2010).

Un pourcentage de 8,19 est obtenu pour le genre *Enterococcus* par contre ce genre n'est pas été isolé dans les travaux rapportés par (Oudghiri, 2010).

II.2.3. Répartition des souches selon le genre

La répartition des genres dans chaque produit est résumée dans la (Figure16 et 17).

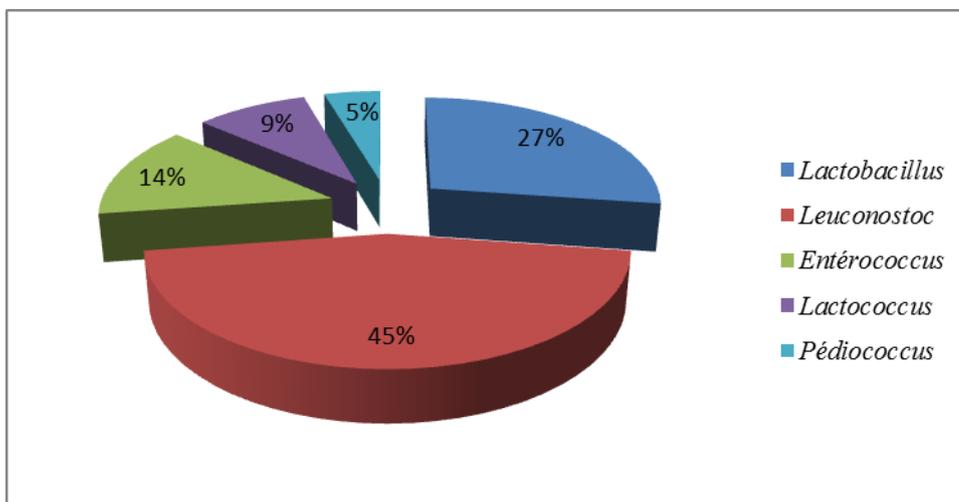


Figure 16 : Répartition des souches isolées selon le genre à partir du l'ben.

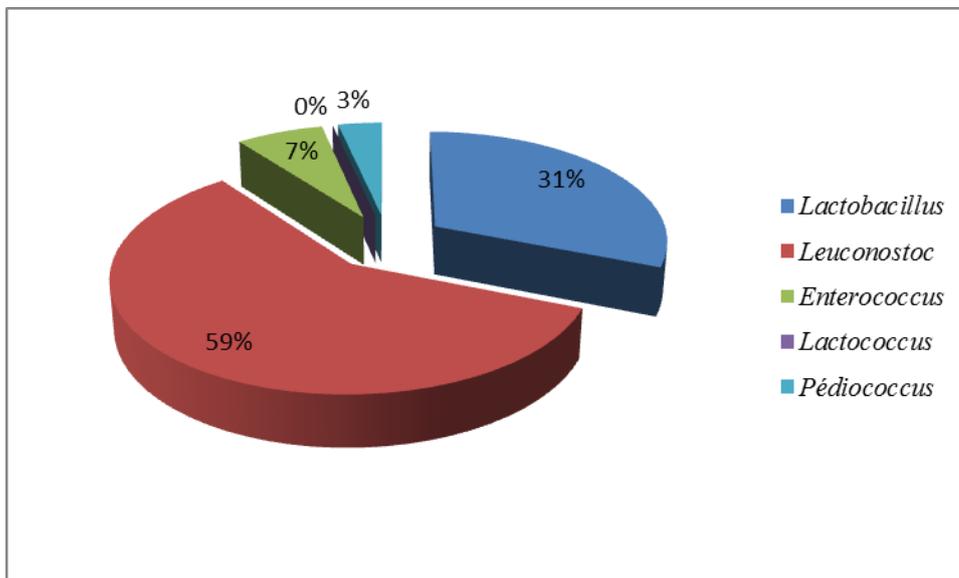


Figure 17 : Répartition des souches isolées selon le genre à partir du beurre.

Selon les résultats enregistrés, On remarque une dominance des cocci, en premier lieu les *Leuconostoc*, suivie par les *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Pédiococcus* par rapport aux bâtonnets (*Lactobacillus*) dans les deux produits (l'ben et beurre). On note la présence de ces 5 genres dans le l'ben par contre, absence du genre *Lactococcus* dans le beurre. En a obtenue 59% des isolats appartenant au genre *leuconostoc*, ce résultat est supérieur à celui rapportés par (Maghniya, 2011) d'un pourcentage de 25%. Et inférieur aux autres genres (*Lactobacillus* (32,15%), *Enterococcus* (14,28%), *Lactococcus* (28,57%), et absence totale de genre *Pediococcus*).

II.2.5. La résistance à la Vancomycine

Un antibiogramme est réalisé sur les souches isolées sur le milieu Mayeux. Les résultats montrent que seul les *Leuconostoc* résiste à la vancomycine (VA30) (Tableau XII, figure 18).

Tableau XII : Les résultats d'antibiogramme réalisé aux souches isolées sur milieu Mayeux.

| Code de la souche | Vancomycine VA 30 |
|-------------------|----------------------|
| 14 S, ODG | R |
| 11 Lb, SET1 | R |
| 11 Lb, SET1 | R |
| 15 Lb, ADK | R |
| MRS | R |
| 07Lb, AMZ | R |
| 11 Lb, SET1 | R |
| 01Lb, SET1 | R |
| 16 B, ADK | R |
| 06 B, ADK | R |
| 15 Lb, ADK | R |
| 07 Lb, AMZ | R |
| 03 B, SET2 | R |
| 02 B, SET1 | R |
| 17 S, ODG | R |
| 08 B, AMZ | R |
| 05 B, SET1 | R |
| 06 B, ADK | R |

R : Résistant.

La résistance des souches de *Leuconostoc* à la Vancomycine, a été bien montrée (**Ogier et al., 2008**).

La figure 18 montre la résistance et la sensibilité des souches isolées sur milieu MRS.

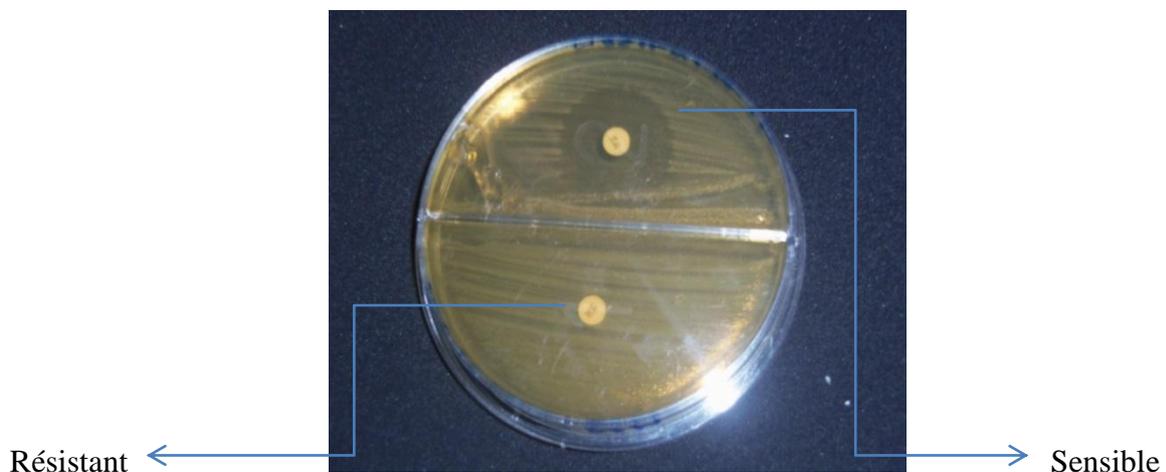


Figure 18 : Antibiogramme des souches sur milieu MRS.

III- Antagonisme

Un antibiogramme a été réalisé pour 61 isolats dans le but de sélectionner les souches qui ont une grande activité antibactérienne.

Les souches isolées ont été sélectionnées selon leurs activités antibactériennes à l'égard de *staphylococcus aureus*. Les résultats obtenus montrent que seulement 3 isolats parmi les 61 isolats qui n'ont pas d'effet antibactérien et 8 isolats présentent des activités antibactériennes très importantes (figure 19). Ces derniers sont utilisés dans l'antagonisme à l'égard des autres bactéries pathogènes.

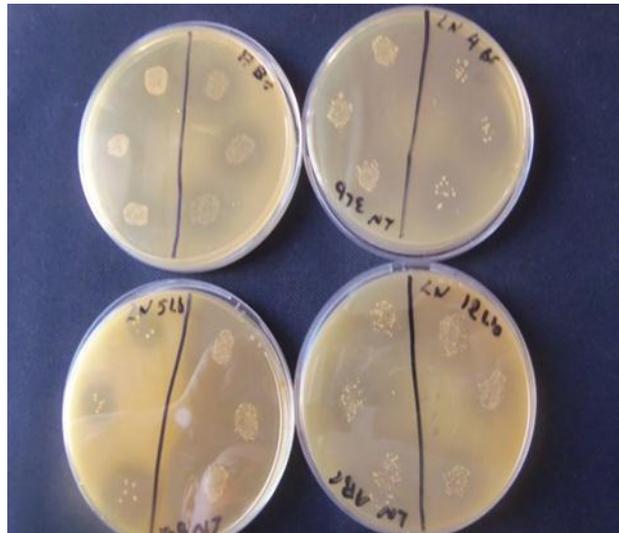


Figure 19 : Résultats de test d'antagonisme vis-à-vis *Staphylococcus aureus*.

III.1. L'effet antibactérien des bactéries lactiques sélectionnées contre des bactéries pathogènes

Les résultats de l'activité inhibitrice des souches lactiques sont résumés dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Les résultats d'effet antibactérien des bactéries lactiques à l'égard des Bactéries pathogènes.

| Bactéries Souche | Diamètre de la zone d'inhibition en mm | | | | |
|-----------------------|--|-------------------|--------------------|------------------------------|--------------------------------|
| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Salmonella</i> | <i>Pseudomonas</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| 13B1 SET ₁ | 17,83 ± 0,28 | 18 ± 0 | 20 ± 0 | 21,66 ± 0,57 | - |
| 07Lb AMZ ₁ | 20 ± 0 | 19,66 ± 1,15 | 22,33 ± 1,15 | 25 ± 0 | 11,66 ± 1,15 |
| 15Lb ADK | 20 ± 1 | 19 ± 1 | 20,66 ± 1,52 | 19,66 ± 0,57 | 10,33 ± 1,15 |
| 7Lb AMZ ₂ | 19 ± 1 | 21,33 ± 1,15 | 19,33 ± 1,15 | 20,33 ± 1,52 | - |
| 17S ODG | 18,33 ± 2,08 | 21 ± 1 | 24 ± 0 | 24 ± 1 | - |
| 11Lb SET ₁ | 18,5 ± 0,5 | 21 ± 0 | 20 ± 0 | 22,83 ± 0,28 | - |
| 6Br ADK | 18,33 ± 0,57 | 16 ± 1 | 16,66 ± 1,52 | 22 ± 0 | - |
| 13B2 SET ₂ | 18,33 ± 1,15 | 24,33 ± 1,15 | 22,33 ± 1,52 | 21,66 ± 1,15 | - |

(-) : absence de zone inhibition.



Figure 20: Les résultats d'effet antibactérien vis-à-vis *Enterococcus faecalis*.

D'après ces résultats enregistrés, les interactions ont montré que les souches isolées possèdent un effet Inhibiteur contre les 4 souches pathogènes utilisées ainsi que *Lactobacillus plantarum*.

- La souche *Lactobacillus sp* 7Lb AMZ₁ présente une grande activité inhibitrice vis-à-vis *Enterococcus faecalis*, d'un diamètre de 25mm et un minimal de 19,66 ± 0,57mm pour la souche *Lactobacillus sp* 15Lb ADK.

- Les deux souches de *Lactobacillus sp* 7Lb AMZ₁ et 15Lb ADK) présentent une inhibition de toutes les bactéries pathogènes (19 ± 1 à 25mm), et spécifiquement sur *Lactobacillus plantarum* dont le diamètre des zones d'inhibition varie $10,33 \pm 1,15$ mm et $11,66 \pm 1,15$ mm.
- Un diamètre maximale (20 ± 1 mm) appartient à la souche *Lactobacillus sp* 15Lb ADK et un minimal de ($17,83 \pm 0,25$) pour la souche *Lactobacillus sp* 13Br SET₁ à l'égard de *Escherichia-coli*.
- A l'égard de *Salmonella*, un diamètre maximale de $24,33 \pm 1,15$ mm est obtenus en utilisant *Lactobacillus sp* 13B SET₂ et un minimale de 16 ± 1 mm pour *Leuconostoc sp* 6BADK.
- A l'égard de *Pseudomonas*, le diamètre maximal (24 ± 0 mm) est enregistré pour *Leuconostoc sp* 17S ODG, et un minimal de $16,66 \pm 1,52$ mm pour *Leuconostoc sp* 6B ADK.

Ces résultats sont supérieurs à ceux rapportés par **Savado** *et al.* (2004) pour certaines souches, où les diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques isolées du beurre sont de l'ordre de 8 à 9 mm vis-à-vis d'*Escherichia -coli*. Et pour celui de *Pseudomonas*, le diamètre des zones d'inhibition varie entre 0 et 37 mm avec une activité remarquable, en comparant à nos résultats qui sont inférieures d'où le diamètre est de $16,66 \pm 1,52$ à 24mm.

Ces résultats indiquent que nos bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne. L'ensemble des souches pures ne présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis des bactéries pathogènes. La majorité des souches sont actives sur les bactéries à Gram positif mais pas tous sur les bactéries à Gram négatif. **Onda et al.**, (2003) suggèrent que les bactéries Gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques.

IV- L'étude de la cinétique d'acidité dans le lait

Les industries agro-alimentaires utilisent les bactéries lactiques principalement pour leur activité acidifiante, car elle est considérée comme un critère primordial de sélection des souches à intérêt. Les souches utilisées pour réaliser ce test appartiennent au genre *Lactobacillus* (15Lb ADK, 7Lb AMZ, 13B SET₁) et au genre *Leuconostoc* (11Lb SET₁, 17S ODG, 7Lb AMZ, 6B ADK).

Les résultats de la cinétique d'acidification dans le lait écrémé sont présentés dans les figures (**figure 21 et 22**).

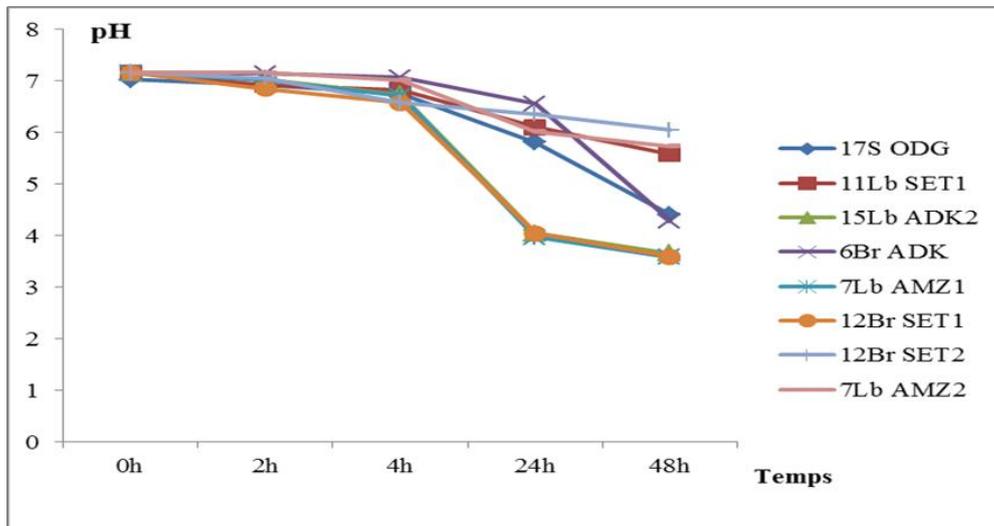


Figure 21 : Evolution de pH du lait écrémé ensemencé par les souches des bactéries lactiques.

Les valeurs du pH enregistrés pour les souches de *Lactobacillus* :

- A 0h (directement après l'ensemencement) varie entre 7,10 et 7,26.
- Après 2h d'incubation à 30°C varie entre 6,85 et 7,06.
- Après 4h d'incubation les valeurs enregistrées varient entre 6,58 et 6,74.
- Après 24h d'incubation varie entre 3,97 et 6,36. Et enfin des valeurs de 3,58 à 6,05 après 48h d'incubation.

Nos résultats sont inférieurs à ceux obtenues par (**Mami, 2013**) dont leur résultat varie entre 6,68 et 6,90 après 6h d'incubation ; 6,28 après 12h d'incubation ; et enfin 5,70 et 5,24 après 24 et 48h d'incubation à 30°C.

Les valeurs du pH enregistrés pour les souches de *Leuconostoc* :

- A 0h (après l'ensemencement direct) varie entre 7,03 et 7,30.
- Après 2h d'incubation elles varient entre 6,92 et 7,14 ; et 6,76 à 7,07 après 4h d'incubation.
- Après 24h d'incubation varie entre 5,81 et 6,56 et enfin des valeurs de 4,29 à 5,74 après 48h d'incubation.

Selon les résultats obtenus les valeurs du pH diminuent en fonction du temps, plus la durée de l'incubation est grande plus le pH diminue.

On constate que les souches du genre *Lactobacille* ont une activité acidifiante plus importante que celle obtenues par le genre *Leuconostoc*, dont la valeur maximal pour les *Lactobacille* est de 3,58 et une valeur de 4,29 pour le genre *Leuconostoc*.

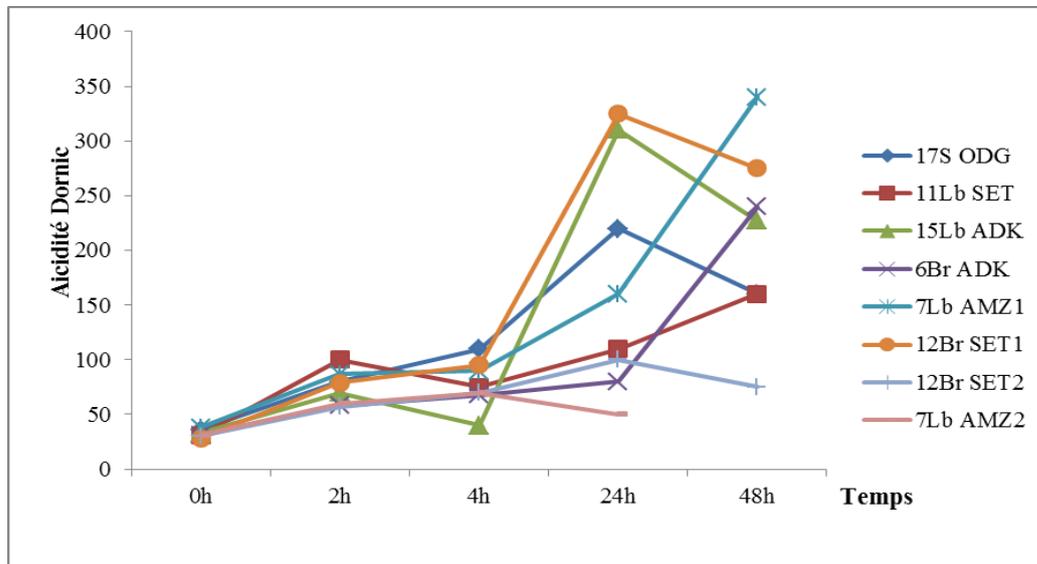


Figure 22: Evolution de l'acidité Dornic dans le lait écrémé par les souches des bactéries lactiques.

Les valeurs d'acidité Dornic enregistrés pour les souches de *Lactobacille* :

- A 0h (après l'ensemencement direct) varie entre 28 et 38°D.
- Après 2h d'incubation les valeurs enregistrées varie entre 57 et 87°D ; et des valeurs de 40 à 95°D après 4h d'incubation.
- Après 24h d'incubation varie entre 100 et 325°D, et enfin des valeurs de 75 à 340°D après 48h d'incubation.

Nos résultats d'acidité Dornic sont supérieurs à ceux rapportés par (Mami, 2013) dont leur résultats est 68°D après 24h d'incubation et 130°D après 48h d'incubation à 30°C.

Les valeurs d'acidité Dornic enregistrés pour les souches de *Leuconostoc* :

- A0h (après l'ensemencement direct) varie entre 31 et 36°D.
- Après 2h d'incubation varie entre 58 et 100°D ; et des valeurs de 68 à 110°D après 4h d'incubation.
- Après 24h d'incubation varie entre 50 et 220°D ; et 130 à 240°D après 48h d'incubation.

Le profil acidifiant des souches du genre *Lactobacillus* montre que la souche 15Lb ADK est la plus acidifiante parmi les souches étudiées avec une diminution de pH=3,66 et une acidité Dornic de 227°D, alors que la souche 12Br SET₂ montre une faible acidification pH6, 05 et 75°D.

Le profil acidifiant des souches *Leuconostoc* montre que la souche 6B ADK est le plus acidifiant pH 4,29 et 240°D, alors que la souche 7Lb AMZ₂ montre une faible acidification pH 5,74 et une acidité de 130°C.

D'après ces résultats, nous remarquons que les souches isolées présentent une production progressive en acide lactique, cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu.

L'évolution de l'acidité et les variations du pH au cours de la croissance des souches testées dans le lait écrémé démontrent une différence entre le genre, les espèces et même entre les souches d'une même espèce (**Luquet et Corrieu 2005**).

Conclusion

Conclusion

Cette étude nous a permis d'avoir une idée sur la composition de la flore lactiques de deux dérivés du lait cru de fabrication artisanale « L'ben » et «beurre » collectées dans 5 régions différentes de la wilaya de Bejaia.

L'objectif de ce travail a été le criblage des souches de bactéries lactiques à activité antibactérienne. Nous avons procédé à l'isolement, l'identification et l'évaluation de l'activité antibactérienne des souches sur des microorganismes pathogènes.

A l'issue de ce travail, 61 souches ont été isolées, purifiées et identifiées par les différents tests biochimiques et physiologiques, La majorité des souches ont la forme coque (85,87%) et 14,13% appartiennent au bacille.

Parmi les coques, quatre genres sont distingués : *Lactococcus* (3,27%), *Enterococcus* (8,19%), *Leuconostoc* (49,18%), et *Pediococcus* (3,27%), ainsi que 24,59% appartenant au genre *Lactobacillus*.

L'évaluation des propriétés des souches isolées à permet de tirer les deux conclusions suivantes :

- Les souches isolées ont montrées une activité antibactérienne importante (diamètre varie de 10 à 25 mm) vis-à-vis des bactéries pathogènes.
- Les souches appartenant au genre *Lactobacillus* ont une activité acidifiante plus importante que les souches de genre *Leuconostoc*.

Perspectives :

- La réalisation des autres tests phénotypiques et génotypiques afin d'identifier les espèces.
- Etude des profils biotechnologiques tels que l'activité protéolytique, lipolytique et aromatisante en utilisant des techniques plus approfondies.
- La recherche des substances antibactériennes secrétées par les souches de bactéries lactiques.
- Etude probiotique des souches isolées.

Références bibliographique

Références

A

- **Adjoudj; (2010).** Ecologie et aptitude technologique des bactéries lactiques isolées du beurre traditionnel. Magister en microbiologie fondamentale et appliquée. faculté des sciences.55p.
- **Axelsson L.T. (2004).** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In *Lactic Acid Bacteria – Microbiology and functional aspects*, Edited by S. Salminen, A. v. Wright et A. Ouwehand, Marcel Dekker, Inc.633. 1- 66.

B

- **Badis A. Geutarrni., Mossa Boudjema B., Hemmi Morsi,** 2006. Caractérisation of lactic acid bacteria isolated from artisanal Egyptian Ras cheese .lait., 86 :317-331.
- **Benkerroum, N. and Tamime, A.Y. (2004).** Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol.* 21: 399–314.
- **Benkerroum N. et Tammime A.Y. (2004).** Technology transfer of some traditional dairy products (Lben, jben, and smen) to small industrial scale. *Food Microbiol* 21. 399-413.
- **Bourgeois, C. M., Larpent, J.P. (1996).** Aliments fermentés et fermentation alimentaire, Microbiologie alimentaires. Tome 2. Edition © Technique Documentation Lavoisier, Paris.
- **Brul et Coote, (1999).** Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int .J. Food Microbial.*, 50 (1-2) 1-17.

C

- **Caplice E., Fitzgerald G., 1999.** Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *Int.J. Food Microbiol.*, 50(1-2): 131-149.
- **Carr Frank J., Chill Don, and Maida Nino, 2002.** The Lactic Bacteria: A Literature Survey. *Critical Review in Microbiology*, 28 (4) : 281-370

D

- **Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C., Janssens, D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In *Bactéries Lactiques*,. Edited by H. de Roissart & F. M. Luquet. Paris: Lavoisier. pp. 25–116
- **DE MAN, J.C., ROGOSA, M. and SHARPE, M.E. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, pp: 130-135.
- **Desmazeaud M. (1992)** Les bactéries lactiques. Indu lait: Les groupes microbiens d'intérêt laitier. Hermier J., Lenoir J., Weber F. (Eds) Centre de formation permanente et de perfectionnement des cadres des industries du lait. pp 9-60.
- **Devoyod et Muller., (1969).** Les leuconostocs Propriétés. Leurs rôles en technologie laitière. *Le Lait* 68: 249-280.
- **Devoyod, J.J., et Poullain, F., 1988.** Les leuconostocs. Propriétés. Leurs rôles en technologie laitière. *Le Lait* 68: 249-280.

E

- **EL-Baradei et al., (2008).** Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *Food Microbiol* 121 , 295-301.

F

- **(Fleming et al., 1975).** Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber Brines. *Appl Microbiol.*, 30(6): 1040-1042.

G

- **Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agroalimentaire, Eds. Dunod Paris, 652 p.
- **Guiraud J.P. (2003) :** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris.652p.

H

- **Holzappel et al., 2001 ; Gevers 2002).** Mycoflore post-récolte du café robusta et utilisation des bactéries lactiques pour le contrôle des moisissures mycotoxinogènes et de l'Ochratoxine A
- **Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkth J. ET Schillinger U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 365-373.

J

- **Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. (1995).** Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*, 59(2): 171–200.
- **Joffin J.N. et Leyral G. (1996).** Microbiologie technique : Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine. Bordeaux, France. pp. 219-223.
- **J.O.R.A., (1993).** Arrêté interministériel 18 août 1993.

K

- **Krieg, N.R.** The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria – Identification of procaryotes. In Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Garrity, G. M., Boone D. R., Castenholz, R. W. Williams and Wilkins, Baltimore (2001), 721: 33–38.

L

- **Larpen-Gourgaud., (1997) ; Axelsson., (2004).** Microbiologie du lait et des produits laitiers In Microbiologie alimentaire Technique de laboratoire. Larpen J- P .Tec & Doc, Lavoisier, pp : 704-805
- **Larpen, J.P., Larpen-Gourgaud, M. (1996).** Mémento technique de microbiologie. 3ème Edition, Tech & doc., Lavoisier. 1039p.
- **Larpen J.P. (1996).** Microbiologie Alimentaire: Aliments fermentés et fermentations alimentaires. **Ed. techniques et documentation.** Lavoisier, Paris. 117 p.
- **Larpen J.P. (1997).**Microbiologie alimentaire : techniques de laboratoire. Ed. Technologie et documentation. Lavoisier. Paris. 1073p.
- **Leveau, J.Y., Bouix, M., De Roissart, H. (1991).** La flore lactique, in Technique d'Analyse et de contrôle des industries agroalimentaires, (Bourgeois, CM & Leveau, JY.Lavoisier) Vol.3, 2e Ed Tec&Doc.Apria.Paris:152- 186.C.M.
- **Luquet F.M. et Corrieu G., 2005.** Bactéries lactiques et probiotiques. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3-37.

M

- **Mami, A . (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections

alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat de Microbiologie appliquée. Université d'ORAN faculté des sciences.117p.

- **Matamoros, S. (2008).** Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université de Nantes. 189 p.
- **Mayeux, J., Sandine, W., et Elliker.P., 1962.** A selective medium for detecting *Leuconostoc* organism in mixed strain cultures. *Journal Dairy Sciences* 45: 655-656.
- **Metchnikoff E. (1908).** Optimistic studies New York: PutmanYs Sons, pp.161-183.

N

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

O

- **Onda T., Yanagida F., Tsuji M., Shinohara T. et Yokotsuka K., 2003.** Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. *Int. J. Food Microbiol.* **87**(1-2) : 153-159.
- **Ouadghiri M. (2009).** Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés (Lben et Jben d'origine marocaine) : thèse de Doctorat en microbiologie et Biologie Moléculaire, Faculté des sciences Rabat, Maroc, 132p.
- **(Orberg Paulo K., Sandine William E ., 1984 :** Common Occurrence of plasmid DNA and VANCOMYCINE Resistance In *Leuconostoc* spp .*J.Appl. Environ. Microbial*, 48: 1129-1133.

- **Owusu-Kwarteng, J., Akabanda, F., Nielsen, D.S., Tano-Debrah, K., Glover, R.L., Jespersen, L. (2012).** Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional fur processing in Ghana. *Food Microbiol*, 32(1): 72–78.

S

- **Savadogo, A., Ouattara, C.A.T., Savadogo, P.W, Ouattara, A.S., Barro, N., Traore, A.S. (2004).** Microorganisms Involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso. *Pak J Nutr*, 3(2): 134–139.
- **Sherman J.M. (1937).** The streptococci. *Bacterial. Rev* 1(1) : 3-97.
- **Staley, J. and Krieg, N.R. (1987)** Bacterial classification I. Classification of procaryotic organisms: an overview.
- **Stiles M. E. et Halzapfel E.H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Food Microbiol.* **36** (1): 1-29.

T

- **Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W. (1976).** Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev*, 40(3): 722–756.
- **Tantaoui-Elaraki, Berrada M., El Marrakchi A. et Berramou A. (1983a).** Etude sur le lben marocain. *Le Lait*, **63**, 230-245.
- **Tantaoui-Elaraki, Berrada M, El Marrakchi A, et Berramou A. (1983b).** Préparation de lben marocain pasteurisé à l'aide de souches bactériennes sélectionnées. *Actes Inst. Agro. Vét.*, **3**, 49-58.
- **Tantaoui –Elaraki A. et El Marakchi A. (1987).** Study of the marocain dairy products Lben and Smen. *Mircon*. **3**, 211-220.
- **Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E. (1975).** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*, 29, pp: 807-813.



- **Vandamme P. Pot, B. Gillis M. n de Vos, P. Kers lers et K.s Wings J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbial Rev* **60**, 407- 438.
- **Vollenweider S., 2004.** 3-hydroxypropionaldehyde : application and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 64:16-27.

Annexes

Annexe 1

Tableau I : Nombre moyen de colonies dénombrées (UFC/ml) dans les différents milieux.

| Prélèvement | <i>M17</i> UFC/ml | <i>MRS</i> UFC/ml | <i>Mayeux</i> UFC/ml |
|--|----------------------|----------------------|-------------------------|
| 01 Lb SET ₁ | 10^7 | 10^7 | 10^7 |
| 02 B SET ₁ (J ₁₀) | $2,63 \cdot 10^8$ | $1,13 \cdot 10^8$ | $3,58 \cdot 10^7$ |
| 03 B SET ₂ (J ₁₀) | $9,00 \cdot 10^7$ | $1,00 \cdot 10^7$ | $8,75 \cdot 10^6$ |
| 04 Lb SET ₁ | $1,18 \cdot 10^{10}$ | $1,02 \cdot 10^{10}$ | $4,30 \cdot 10^8$ |
| 05 B SET ₁ (J ₀₂) | $1,00 \cdot 10^8$ | $1,00 \cdot 10^8$ | $4,45 \cdot 10^7$ |
| 06 B ADK ₁ (J ₁₇) | 10^7 | $1,80 \cdot 10^{10}$ | $4,95 \cdot 10^9$ |
| 07 Lb AMZ | $1,00 \cdot 10^9$ | $1,00 \cdot 10^9$ | $1,27 \cdot 10^{10}$ |
| 08 B AMZ | $1,00 \cdot 10^9$ | $1,00 \cdot 10^9$ | $4,95 \cdot 10^9$ |
| 09 Lb SET ₂ | $1,00 \cdot 10^9$ | $1,00 \cdot 10^9$ | $8,13 \cdot 10^9$ |
| 10 B SET ₂ | $6,55 \cdot 10^9$ | $1,07 \cdot 10^{10}$ | $5,95 \cdot 10^8$ |
| 11 Lb SET ₁ | $1,00 \cdot 10^9$ | $1,04 \cdot 10^{10}$ | $1,25 \cdot 10^{10}$ |
| 12 B SET ₁ | $1,76 \cdot 10^{10}$ | $4,45 \cdot 10^9$ | $7,35 \cdot 10^9$ |
| 13 Lb TGZT (chèvre) | $3,76 \cdot 10^9$ | $9,30 \cdot 10^9$ | $5,53 \cdot 10^9$ |
| 14 S ODG | $4,68 \cdot 10^4$ | $2,55 \cdot 10^3$ | $1,85 \cdot 10^3$ |
| 15 Lb ADK ₁ | $5,96 \cdot 10^9$ | $3,47 \cdot 10^9$ | $1,03 \cdot 10^{11}$ |
| 16 B ADK ₁ | $3,90 \cdot 10^9$ | $6,25 \cdot 10^9$ | $6,55 \cdot 10^9$ |
| 17 S ODG (+ 1 année) | $4,36 \cdot 10^5$ | $2,90 \cdot 10^4$ | $3,16 \cdot 10^5$ |

Tableau II : Résumé de l'observation microscopique des isolats bacilles.

| Code de la souche | Gram | Catalase | Forme | Mode d'association |
|-----------------------------|-------------|-----------------|-----------------------|-----------------------------|
| 07 Lb AMZ | + | - | Bacille | Chainettes |
| 06 B1 ADK | + | - | Coco-bacille | Chainettes |
| 06 B2 ADK | + | - | Coco-bacille, bacille | Longues chainettes |
| 06 B3 ADK | + | - | Bacille | Chainettes |
| 08 B AMZ | + | - | Bacille | Longues chainettes |
| 13 B SET₁ | + | - | Bacille | Isolées, petites chainettes |
| 14 S1 ODG | + | - | Bacille | Chainettes |
| 14 S2 ODG | + | - | Bacille | Chainettes |
| 15 Lb1 ADK | + | - | Bacille | Chainettes |
| 15 Lb1 ADK | + | - | Longue bacille | Chainettes |
| 13 B SET₁ | + | - | Bacille | Chainettes |
| 15 Lb1 ADK | + | - | Longue bacille | Chainettes |
| 15 Lb2ADK | + | - | Bacille | Chainettes |
| 15 Lb3 ADK | + | - | Bacille | Chainettes |
| 14 S3 ODG | + | - | Bacille | Chainettes |

Tableau III : Résumé de l'observation microscopique des souches isolées sur milieu MRS.

| Code de la souche | Gram | Catalase | Forme | Mode d'association |
|--------------------------------|-------------|-----------------|----------------|---------------------------------|
| 13 Lb TGZT (chèvre) | + | - | Cocci | Diplocoques, chainettes |
| 12 B SET₁ | + | - | Cocci | Diplocoques |
| 11 Lb SET₁ | + | - | Cocci (petite) | Diplocoques, longues chainettes |
| 11 Lb SET₁ | + | - | Cocci | Diplocoques, chainettes |
| 12 B 2 1SET₁ | + | - | Cocci | Diplocoques |
| 12 B3 SET₁ | + | - | Cocci | Diplocoques |
| 15 Lb ADK | + | - | Cocci (ovoïde) | Diplocoques, petites chainettes |
| 01 Lb 1SET₁ | + | - | Cocci | Diplocoques |
| 09 Lb1 SET₂ | + | - | Cocci | Diplocoques, petites chainettes |
| 01 Lb 2 SET₁ | + | - | Cocci (ronde) | Longues chainettes |
| 02 B 1SET₁ | + | - | Cocci | Diplocoques, petits amas |
| 02 B 2SET₁ | + | - | Cocci (ronde) | Longues chainettes |
| 09 Lb1 SET₂ | + | - | Cocci (ovoïde) | Diplocoques |
| 08 B AMZ | + | - | Cocci (ovoïde) | Chainettes |
| 07 Lb AMZ | + | - | Cocci | Petites chainettes |
| MRS | + | - | Cocci | Petites chainettes |
| MRS | + | - | Cocci | Diplocoques |
| Lb | + | - | Cocci | Diplocoques |
| Lb | + | - | Cocci (ronde) | Longues chainettes |
| 09 Lb2 SET₂ | + | - | Cocci (petite) | Diplocoques, longues chainettes |
| 17 S ODG | + | - | Cocci | Diplocoques, chainettes |
| 14 S ODG | + | - | Cocci | Diplocoques, petites chainettes |
| 15 Lb ADK | + | - | Cocci (ovoïde) | Diplocoques, petites chainettes |
| 16 B ADK | + | - | Cocci (ronde) | Longues chainettes |

Tableau IV: Résumé de l'observation microscopique des souches isolées sur milieu Mayeux.

| Code de la souche | Gram | Catalase | Forme | Mode d'association |
|-------------------------------|-------------|-----------------|----------------|---|
| 01 Lb, SET₁ | + | - | Cocci (ovoïde) | Diplocoques, courtes chainettes, longues chainettes |
| 06 B ADK | + | - | Cocci (ovoïde) | Diplocoques, chainettes |
| 02 B SET₁ | + | - | Cocci (ovoïde) | Diplocoques |
| 02 B SET₁ | + | - | Cocci (ovoïde) | Diplocoques, courtes chainettes |
| 01 Lb SET₁ | + | - | Cocci (ovoïde) | Diplocoques |
| 07 B AMZ | + | - | Cocci (ovoïde) | Longues chainettes |
| 11 Lb SET₁ | + | - | Cocci (ovoïde) | Diplocoques, courtes chainettes |
| 03 B SET₂ | + | - | Cocci (ovoïde) | Diplocoques |
| 17 S ODG | + | - | Cocci (petite) | Chainettes |
| 06 B ADK | + | - | Cocci (petite) | Diplocoques, courtes chainette |

Tableau V: Résumé de l'observation microscopique des souches isolées sur milieu M17.

| Code de la souche | Gram | Catalase | Forme | Mode d'association |
|------------------------------|-------------|-----------------|-------------------|---|
| 10 B SET₂ | + | - | Cocci (ovoïde) | Diplocoques |
| 11 Lb SET₁ | + | - | Cocci (petite) | Diplocoques, chainettes |
| 14 S2 ODG | + | - | Cocci | Diplocoques, petites chainettes |
| 07 Lb AMZ | + | - | Cocci | Diplocoques, chainettes |
| 02 B SET₁ | + | - | Cocci | Diplocoques, chainettes, petits amas |
| 09 Lb SET₂ | + | - | Cocci (ovoïde) | Diplocoques, chainettes parfois en amas |
| 17 S 1 ODG | + | - | Cocci (ovoïde) | Diplocoques, chainettes, petits amas |
| 17 S2 ODG | + | - | Cocci (ovoïde) | Diplocoques, chainettes, petits amas |
| 11 Lb SET₁ | + | - | Cocci (ovoïde) | Chainettes, petits amas |
| 02 B SET₁ | + | - | Cocci (sphérique) | Chainettes |
| 16 B ADK | + | - | Cocci | Petites chainette |
| 14 S 1ODG | + | - | Cocci | Diplocoques, chainettes |

Annexe 2

Composition des milieux de culture

1. Eau physiologique

| Composition | (Gramme/litre) |
|---------------|----------------|
| NaCl | 9 |
| Eau distillée | 1000ml |
| pH 7 | |

2. Gélose MRS

| Composition | (Gramme/litre) |
|---|----------------|
| Peptone | 10 |
| Extrait de viande de bœuf | 8 |
| Extrait de levure | 4 |
| Glucose | 20 |
| Tween 80 | 1ml |
| Hydrogénophosphate de potassium | 2 |
| Acétate de sodium 3 H ₂ O | 5 |
| Citrate d'ammonium | 2 |
| Sulfate de magnésium 7 H ₂ O | 0,2 |
| Sulfate de manganèse 4 H ₂ O | 0,05 |
| Agar | 15 |
| Eau distillée | 1000ml |
| pH 6, 2 ± 0,2 | |

3. Gélose M17

| Composition | (gramme/litre) |
|----------------------------|----------------|
| Tryptone | 5 |
| Peptone de soja | 5 |
| Infusion de viande | 5 |
| Extrait de levure | 2,5 |
| Acide ascorbique | 0,5 |
| Sulfate de magnésium | 0,25 |
| Glycérophosphate disodique | 19 |
| Agar | 15 |
| Eau distillée | 1000ml |
| pH 6,9± 0,2 | |

4. Gélose Mayeux

| Composition | (Gramme/litre) |
|-------------------|----------------|
| Tryptone | 10 |
| Gélatine | 2,5 |
| Extrait de levure | 5 |
| Glucose | 5 |
| Saccharose | 100 |
| Sodium citrate | 1 |
| Azide de sodium | 0,075 |
| Agar | 15 |
| Eau distillée | 1000ml |
| pH 6,9± 0,2 | |

5. Gélose MH

| Composition | (Gramme/litre) |
|--------------------|----------------|
| Infusion de viande | 300ml |
| Peptone de caséine | 17,5 |
| Amidon de maïs | 1,5 |
| Agar | 15 |
| Eau distillée | 1000ml |
| pH 7,4 | |

6. Bouillon BHI

| Composition | (Gramme/litre) |
|-----------------------|----------------|
| Milieu BHI déshydraté | 37 |
| Eau distillée | 1000ml |
| pH 7,2 ± 0,2 | |

Annexe 3

Matériels utilisés

- Boîtes de pétris stériles
- Tubes à essais stériles
- Anse de platine
- Micropipettes
- Flacons stériles
- Pipettes pasteur
- Lames
- Epprouvettes
- Bec bunsen
- Balance électrique
- Spatule
- Pince en bois
- Bécher
- Plaques chauffantes et agitatrices
- Barreaux magnétiques
- pH mètre
- Autoclave
- Thermomètre
- Four pasteur
- Burette
- Seringues
- Bain Marie
- Etuves à différentes températures

Solutions

- Violet de gentiane
- Lugol
- Fushine
- Bleu de méthylène
- Huile à immersion
- Alcool
- Eau oxygénée
- Phénolphtaléine
- NaOH N/9

Résumé

Deux produits laitiers de fabrication artisanale «l'ben et le beurre» ont été analysés dans le but d'évaluer leur qualité physico-chimique et microbiologique. Ces deux produits proviennent de 5 régions de la wilaya de Bejaïa : Adekar, Souk El Tenine, Amizour, Oudeghir, et enfin Taghzouth. Les résultats des analyses physico-chimique (mesure du pH, et d'acidité Dornic) montrent des valeurs de pH de l'ordre de 4,48 pour les échantillons du l'ben et de 4,65 pour ceux du beurre. Cependant les valeurs de l'acidité Dornic sont respectivement de 84,16°D 114,36°D.

61 isolats de bactéries lactiques sont purifiés, conservés puis identifiés selon les caractéristiques phénotypiques ; biochimiques et physiologiques. Pour l'ben 46,66 % de forme cocci répartie en 4 genre : *Lactococcus* (9%), *Enterococcus* (14%), *Leuconostoc* (45%), *Pediococcus* (5 %), et (43,75%) pour les bacilles qui sont répartie au genre *Lactobacillus* (27%). A propos du beurre, 53,33% de forme cocci répartie en 3 genre : *Leuconostoc* (59%); *Enterococcus* (7%); *Pédiococcus* (3%). La forme bacille (56,25%) appartient au genre *Lactobacillus* (31%). 8 souches ont été testées pour leur effet antibactérien à l'encontre d'*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Enterococcus faecalis*, et *Lactobacillus plantarum*, des zones d'inhibition d'un diamètre variant entre 10 et 25 mm sont révélées. Les souches de *Lactobacillus sp* ont été retenues pour leur forte activité acidifiante.

Mots clés : Bactérie lactique, l'ben, le beurre, isolement et identification, activité antibactérienne, acidification.

Abstract

Two homemade dairy products "the l'ben and butter" were analyzed in order to assess their physicochemical and microbiological quality. Both products are from 5 region of the wilaya of Bejaia: Adekar, Souk El Tenine, Amizour Oudeghir and finally Taghzouth. The results of the physico-chemical analysis (pH measurement and Dornic acidity) show pH values of the order of 4.48 for the samples of the l'ben and 4.65 for those of butter. However the values of the Dornic acidity are of 84, 16°D 114, 36°D.

61 lactic acid bacteria isolates are purified, stored and identified by the phenotypic characteristics; biochemical and physiological. For l'ben 46.66% of cocci form were divided into 4 genus: *Lactococcus* (9%), *Enterococcus* (14%), *Leuconostoc* (45%), *Pediococcus* (5%) and (43.75%) for Bacilli which are distributed to the genus *Lactobacillus* (27%). About butter, 53.33% of cocci form divided into three genus: *Leuconostoc* (59%); *Enterococcus* (7%); *Pediococcus* (3%). The shape bacilli (56.25%) belongs to the genus *Lactobacillus* (31%). 8 strains were tested for their antibacterial effect against *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Enterococcus faecalis*, and *Lactobacillus plantarum*, inhibition zone with a diameter varying between 10 and 25 mm are disclosed. *Lactobacillus sp* strains were selected for their strong acidifying activity.

Keywords: lactic bacteria, the l'ben, the butter, isolation and identification, antibacterial activity, acidification.