

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

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



Réf :

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

MASTER

Thème

**Isolement et caractérisation des bactéries
lactiques du genre *Lactobacillus* à partir
des produits laitiers traditionnels
artisanaux**

Présenté par :

BENSIDHOUM Keltoum & BOUDRAHEM Nedjma

Soutenu le : 20 juin 2017

Devant le jury composé de :

Mr. BENDJEDDOU K.	MCB	président
Mme. BENACHOUR K.	MAA	Encadreur
Mme. IDRES_KERAMENE B.	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2016/2017.

Remerciement

On remercie, Dieu, le tout puissant de nous avoir donné la foi qui nous a guidé jusqu'à la réalisation et l'aboutissement de ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

On tient à remercier notre promotrice Madame BENACHOUR Karima, pour avoir assuré l'encadrement de ce mémoire. Depuis les premiers instants, sa pédagogie, son écoute, et son ouverture d'esprit, ont été importants pour nous que ses connaissances et ont largement contribué à l'évolution de cette étude. On ne peut sincèrement vous exprimer nos respects et notre gratitude.

On voudrait exprimer nos remerciements les plus vifs à Monsieur BENDJEDOU K, pour l'honneur qu'il nous a fait d'accepter de présider le jury d'évaluation et d'examiner ce mémoire, vos remarques ne feront qu'améliorer ce travail.

Mes plus sincères remerciements vont également à Madame KERAMENE B. pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect et de notre profonde reconnaissance.

Nos remerciements vont également à Madame RAHMANI M. pour son aide, et ces précieux conseils.

Nos remerciements s'adressent aussi à nos camarades de Master Microbiologie. A nos amis(es) du laboratoire et à tous ce qui a contribué à l'évolution de cette étude de près ou de loin pour leurs soutien et encouragements

MERCI

KELTOUM & NEDJMA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

*A mon cher **Papa** : pour ses précieux conseils et encouragements. Aucune dédicace ne saura exprimée l'amour, l'estime et le respect que j'ai pour toi.*

*A ma très chère **Maman**, qui a œuvré pour ma réussite, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.*

*A mes chères sœurs, **Samia** et **Rahima**, pour leurs encouragements et pour leurs aides.*

*A mes adorables frères **Nadjim** et **Amirouche**.*

A mes chères cousins et cousines.

*A mes chères amies (es) : **Mima**, **warda**, **Wisseem**, **Fatifa**, **Khaled**, **Hamou** et **Farouk** qui n'ont pas cessé de m'encourager.*

*A mon cher binôme **Keltoum** pour le travail que nous avons fourni*

Et à tous mes camarades de Microbiologie Alimentaires Santé.

Nedjma

Notre pays a une tradition bien établie sur les produits laitiers, transmise d'une génération à une autre à travers des siècles. Le lait, abondant durant certains moments de l'année, est facilement périssable et difficile à conserver singulièrement dans les zones à climat très chaud, alors il a été toujours traité pour augmenter la durabilité et la valeur nutritive pour une consommation domestique et en même temps de permettre la commercialisation du surplus. De ce fait parmi les produits laitiers fermentés couramment consommés, Dhan et Smen traditionnels, ils sont fabriqués à partir du lait cru de vache et de chèvre non pasteurisé, leur fabrication se base sur la fermentation spontanée, non contrôlée ce qui implique beaucoup de microorganismes, parmi lesquels les bactéries pathogènes très répandues aux lieux, par contre, Dhan et Smen sont consommés par la population Algérienne depuis la nuit des temps sans aucun effet indésirable sur la santé humaine, même ils sont utilisés à des fins thérapeutiques. (**Bencharif, 2001**).

La technologie laitière utilisée dans la fabrication du produit repose essentiellement sur la fermentation avec les bactéries lactiques en particulier les lactobacilles, ces bactéries sont déjà reconnues pour la production des acides organiques qui abaissent le pH des aliments ce qui empêche la prolifération des germes nuisibles. La production du CO₂ par les lactobacilles réduit le potentiel d'oxydoréduction et inhibe les germes aérobies tels que les moisissures (**Desmazeaud, 1992**).

En agroalimentaire, les lactobacilles sont à l'origine des processus de transformation conditionnant la texture et les qualités des produits alimentaires fermentés (lait fermenté, beurre, olive, choucroute, différents types de fromage, dans certains cas de charcuteries et dans l'ensilage) (**Ganzele et al., 2000 ; Delgado et al., 2001 ; Taillez, 2001**).

L'objectif de ce travail consiste à isoler des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* à partir de deux produits laitiers traditionnels (Smen et Dhan), et d'estimer quelques aptitudes technologiques ainsi que son activité.

Ce mémoire comporte deux parties, une synthèse bibliographique consacrée à la présentation des produits laitiers traditionnels artisanaux et le comportement des lactobacilles dans ces produits, et une autre partie pratique dans laquelle sont décrites les différentes méthodes utilisées ainsi que la discussion des résultats obtenus lors de ce travail et en fin une conclusion générale résumera les résultats développés et des perspectives seront apportées à ce travail.

Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNr: acide ribonucléique ribosomique

AFNOR: Association Française de Normalisation

ARN : Acide Ribonucléique

ARNr 16 S: Acide ribonucléique ribosomiale de la petite sous-unité 16S

°D : degré Dornic

DO: Degré D'oxydation

FAO: Food and Agriculture Organization

G/C: Guanine - Cytosine

ISO: international organization of standardization

Lb : *Lactobacillus*

M17 : Milieu de Terzaghi

MRS: de Man Rogosa et Sharpe

N : Normalité

NaCl: Chlorure de sodium

OMS : Organisation mondiale de la santé

pH: potentiel d'Hydrogène

UFC : Unité Formant Colonie

UHT : Ultra Haute Température

Liste Des Tableaux

Tableau I : Composition du lait de divers mammifères.....	02
Tableau II : Caractéristiques physicochimiques de beurre traditionnel algérien.....	07
Tableau III : Habitat des Lactobacillus.....	09
Tableau IV : Origines et caractérisation des échantillons utilisés.....	14
Tableau V : Résultats de dénombrement des lactobacilles sur gélose MRS.....	21
Tableau VI : Description de formes microscopique du total des souches identifiées.....	24
Tableau VII : Résultats de type fermentaire des souches isolées.....	25
Tableau VIII : Résultats des teste de température, pH, NaCl et Thermorésistance des souches isolées	27
Tableau IX : Résultats de l'activité protéolytique et lipolytique pour l'ensemble des souches.....	31

Liste de tableaux en annexes

Tableau X : Résultats de la galerie API 50..... **Annexe VI**

Tableau XI : Résultats de la microplaque.....**Annexe VII**

Tableau XII : Mesure du pH des différentes souches.....**Annexe VIII**

Tableau XIII : Activité antibactérienne.....**Annexe IX**



Synthèse bibliographique

Liste de figures

Figure 01 : Aspect des colonies isolées à partir des produits laitiers traditionnels.....	20
Figure 02 : Aspect macroscopique des colonies de lactobacilles.....	21
Figure 03 : Aspect de culture pure sur bouillon MRS.....	22
Figure 04 : Aspect microscopique des lactobacilles (Grossissement $\times 100$).....	22
Figure 05 : Résultats de testes des sucres sur microplaque.....	27
Figure 06 : Résultats de teste biochimique de la galerie API 50CH.....	38
Figure 07 : Activité protéolytique des souches isolées sur gélose MRS à concentration de 1% de lait demi écrémé	39
Figure 08 : Histogramme représente les valeurs de pH des différentes souches isolées sur bouillon MRS.....	31
Figure 9 : Résultats des interactions entre les lactobacilles et <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Figure 10 : Activité antibactérienne des souches lactobacilles vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i>	32

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Partie I : Synthèse bibliographique

1. Lait et produit laitiers traditionnels artisanaux..... 2

1.1. Lait matière première des produits laitiers traditionnels artisanaux..... 2

1.2. Microflore de lait..... 3

1.3. Produits laitiers traditionnels artisanaux 4

1.3.1. J'ben..... 5

1.3.2. Lben..... 5

1.3.3. Klila..... 5

1.3.4. Bouhazza 5

1.3.5. Smen..... 5

1.3.6. Dhan 6

2. Bactéries lactiques..... 8

2.1. Définition et Historique..... 8

2.2 Classification..... 9

2.3.1 Habitat 9

2.3.2 Caractères morphologiques 10

2.3.3. Caractères biochimiques 10

2.3.4. Caractères cultureux et exigences nutritionnelles 11

2.3.5 Identification 11

2.3.6. Intérêt technologique des lactobacilles 12

2.3.7. Substances antimicrobiennes des lactobacilles 12

Partie II : Matériel et méthodes

1. Echantillonnage	14
2. Isolement des Lactobacilles	14
3. Conservation des souches.....	14
4. Purification	15
5. Tests phénotypiques	16
5.1. Examen Macroscopique	16
5.2. Examen microscopique (Coloration de Gram).....	16
5.3. Etat frais	16
6. Tests biochimiques	16
6.1. Test de la catalase.....	16
6.2. Type fermentaire	17
6.3. Croissance en différentes concentration en NaCl, différents pH et différentes températures	17
6.4 Thermorésistance	17
6.5 Type fermentaire	17
6.6. Galerie API 50.....	18
7. Evaluation de quelques aptitudes technologique	18
7.1. Activité protéolytique.....	18
7.2. Activité lipolytique.....	19
7.3. Mesure de pH	19
8. Effet antibactérien	19
8.1. Préparation des précultures de bactérie test (<i>Staphylococcus aureus</i> multirésistante)	19
8.2. Méthode des spots	19

Partie III : Résultats et discussion

1. Isolement et purification.....	20
2.Dénombrement de la flore lactique	20
3. Identification des lactobacilles	21

3.1. Etude des caractères morphologiques	21
3.1.1. L'aspect macro et microscopique	21
3.2. Etudes des caractères biochimiques	23
3.2.1 Recherche de la catalase.....	23
3.2.2. Type fermentaire	24
3.2.3. Croissance à différentes températures et Thermorésistance	25
3.2.4. Croissance aux différentes conditions de cultures	25
3.2.5. fermentation des sucres	26
3.2.6. Résultats de l'API 50	27
4. Evaluation de quelques aptitudes technologiques	28
4.1. Activité protéolytique.....	28
4.2. Activité lipolytique.....	30
4.3. Mesure de pH	30
5. Effet antibactérien	31
Conclusion.....	34

Référence bibliographiques

Annexes



Introduction

Matériel et méthodes

1. Lait et produit laitiers traditionnels artisanaux

1.1. Lait matière première des produits laitiers traditionnels artisanaux

Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière, vache, jument, chèvre, brebis, etc. bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum (Mahaut et al., 2000 ; Bourgeois et Larpent 1996).

Il est un liquide blanc opaque, plus ou moins jaunâtre (selon la teneur en matière grasse et en β -carotènes), de saveur légèrement sucrée et d'odeur peu marquée, mais caractéristique (Louaileche, 1998).

Le lait est produit par les ruminants qui transforment les protéines végétales en protéines animales. Il est sécrété par les glandes mammaires. Sa composition varie légèrement d'une espèce de mammifère à une autre (Tableau I). Selon Alais (1984) cette variabilité peut trouver son explication dans les facteurs suivants :

- Variations spécifiques : le lait des ruminants est «caséineux» alors que celui des carnivores est. «Albumineux».
- Variations physiologiques individuelles (stade de lactation et abondance de la sécrétion lactée).
- L'alimentation, l'âge et l'état sanitaire de la laitière etc.

Tableau I : Composition du lait de divers mammifères (Dillon, 2008).

Composition moyenne du lait en (g/l)								
	Eau	Extrait sec	Matière grasse	Protéines			Glucide : lactose	Matières minérales
				Totale	Caséine	albumine		
Equidés								
Jument	925	100	10-15	20-22	10_12	7-10	60-65	3-5
Anesse	925	100	10-15	20-22	10-12	9-10	60-65	4-5
Ruminante								
Vache	900	130	35-40	30-35	27-30	3-4	45-50	8-10
Chèvre	900	140	40-45	35-40	30-35	6-8	40-45	8-10

Cet aliment est également variable dans sa composition physico-chimique dont les composants principaux représentés par sa densité (1,028 à 1,036), son point de congélation

(-0,51 à -0,55°C), son point d'ébullition (100,5°C), son pH (6,5 à 6,7) et son acidité (15 à 18° Dornic) (Louaileche, 1998).

1.2. Microflore de lait

Le lait est, de par sa composition, un aliment de choix : il contient des graisses, du lactose, des protéines, des sels minéraux, des vitamines et 87% d'eau. Son pH de 6,7 le rend un substrat très favorable à la croissance microbienne (flore originelle et pathogène) (Guiraud, 2003).

➤ Flore originelle

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10^3 germes/ml). Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : notamment les microcoques, mais aussi streptocoques lactiques (*Lactococcus*) et lactobacilles. Le lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées lacténines, mais leur action est de très courte durée (1heure environ) (Guiraud, 2003).

D'autres micro-organismes peuvent se trouver dans le lait, lorsqu'il est issu d'un animal malade. Ils sont généralement pathogènes et dangereux de point de vue sanitaire. Il peut s'agir d'agents de mammites, c'est-à-dire d'infections du pis : streptocoques pyogènes (*Streptococcus*), corynébctéries pyogènes, staphylocoques. Il peut s'agir aussi de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en l'absence d'anomalies du pis : *Salmonella*, *Brucella*, *Listeria monocytogene*, *Mycobacterium*,... et quelques virus (Guiraud, 2003).

➤ Flore de contamination

Le lait se contamine par des apports microbiens d'origines diverses (Guiraud, 2003) :

- Fèces et téguments de l'animal : coliformes, entérocoques, *Clostridium* et éventuellement les entérobactéries pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* etc.)
- Sol : *Streptomyces*, *Listeria*, bactéries sporulées, spores fongiques.
- Litières et aliments : flore banale variée, en particulier lactobacilles, *Clostridium butyriques* (ensilages).
- Air et eau : flores diverses dont, *Pseudomonas*, bactéries sporulées.

- Equipement de traite et de stockage du lait : microcoques, levures et flore lactique avec lactobacilles, streptocoques (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*), *Leuconostoc*. cette flore est souvent spécifique d'une usine.
- Manipulateurs : Staphylocoques dans le cas de traite manuelle, mais aussi germes provenant d'expectorations et de contaminations fécales.
- Vecteurs divers (insectes en particulier) : flore de contamination fécale. Parmi ces micro-organismes, il en est d'inoffensifs, d'autres de dangereux du point de vue sanitaire, d'autres capables d'entraîner la détérioration du lait.

1.3. Produits laitiers traditionnels artisanaux

C'est l'augmentation de la production du lait durant certaines saisons, et la difficulté de son préservation sous la forme fraîche qui a conduit au développement des technologies de production traditionnelles (**Dharam et Narender, 2007**).

Historiquement, les premiers produits laitiers fermentés ont été obtenus accidentellement et de façon non contrôlée, par le caillage du lait avec les bactéries lactiques contaminantes. Ces produits étaient fort prisés en raison de leurs facilité de conservation puisque leurs pH acide inhibe une grande proportion des microorganismes de dégradation ainsi que la plupart des pathogènes (**Amiot et al., 2002**).

Ces produits sont une partie intégrante d'héritage Algérien, et ont une grande importance, culturelle, médicinale et économique. Ils ont été développé sur une longue période avec les compétences culinaires des femmes, pour qu'aujourd'hui Lben, Klila, Bouhezza , Jben, Rayeb, Dhan et Zebda, Takammarit et autres font les produits traditionnels les plus importants à l'échelle commerciale algérienne (**Medouni et al., 2005**).

1.3.1. J'ben

Selon la norme FAO/OMS A-6 (1978 modifiée en 1990), "Le fromage est le produit frais ou affiné, solide ou semi-solide, dans le quel le rapport protéines de lactosérum/caséine n'excède pas celui du lait".

La fabrication de fromage remonte à une époque très ancienne ; cet aliment était connu dans diverses régions du monde (Afrique, Asie, Europe) depuis environ 3000 avant Jésus Cris. Sa préparation, à l'origine domestique, s'est développée au niveau artisanal à partir d'une époque pouvant se situer entre 12ème ou 13ème siècle. L'industrialisation de la fromagerie a

commencé dans les pays européens à la fin du 19^{ème} siècle, mais elle n'a pris son véritable essor qu'au milieu de 20^{ème} siècle (**Roissart et Luquet, 1994**).

1.3.2. Lben

Lben est un produit rafraichissant cultivé obtenu par la fermentation spontané du lait de vache ou de chèvre. Pour la fabrication de lben, on laisse le lait à température ambiante jusqu'à coagulation, le produit obtenu s'appelle Rayeb, et ce dernier peut être consommé tel qu'il est ou soumis à l'écémage pour l'obtention du lben et du beurre frais (Dhan). Le barattage est effectué manuellement dans une peau de chèvre ou de brebis appelé Chekoua (**Benkerroum et Tamime, 2004**).

1.3.3. Klila

C'est un fromage ferment produit dans plusieurs régions d'Algérie. Il est fabriqué par le chauffage du lben pour obtenir la séparation de la phase aqueuse du caillot, le caille est ensuite égoutté spontanément ou pressé à l'aide d'une pierre. Le klila peut être consommé comme fromage ou utilisé comme ingrédient dans des recettes (**Claps et morone, 2011**).

1.3.4. Bouhazza

Bouhazza est un fromage à pâte molle avec une coagulation acide, caractérisée par une saveur amer, qui était préparé à l'origine à base de lait de chèvre et, éventuellement de brebis. Actuellement on utilise le lait de vache. Traditionnellement c'est un produit préparé dans certaines zones rurales dans l'Est de l'Algérie, en particulier par la population Chaouia (**Claps et morone, 2011**).

1.3.5. Smen

Le Smen est un produit laitier fermenté, fabriqué à partir du lait cru entier par des méthodes empiriques de l'ancien temps. Le beurre fermier obtenue par barattage du lait fermenté est lavé, salé, malaxé puis conditionné dans des pots en terre cuit fermés hermétiquement pour éviter une oxydation indésirable, et entreposé dans un endroit frais et obscur à température ambiante (**Tantoui-Elaraki et El Marrakchi, 1987**).

Ce produit très apprécié par les consommateurs pour ses qualités gustatives et diététique, est utilisé comme additif des produits alimentaires pour remonter le goût et l'arôme de certaines recettes traditionnelles (couscous, poulet ...). Sa propriété d'aliment de forte énergie est exploitée en médecine traditionnelle pour atténuer les douleurs de la sensation du froid qui

accompagne la toux, le rhumatisme et le traumatisme osseux (voie orale et massage) (Lahsaoui, 2009).

➤ Composition chimique du smen

La composition du smen est également variable ; des valeurs moyennes typiques pour les composants principaux sont les suivantes : 81% de graisse, 14% d'eau, 5% de matière sèche non lipidique, 1,5% de chlorure et sodium. La lipolyse est le phénomène principal qui se passe dans la transformation du smen (indice moyen d'acide : 52,3 mg KOH par g dégraissé) tandis que l'oxydation est toujours très faible (moins de 3 meq. par kg dans 70% des échantillons commerciaux) (Tantoui-Elaraki et El Marrakchi, 1987).

➤ Microflore du smen

La microflore du smen évolue pendant la transformation. En effet dans le produit final, les bactéries du genre *Bacillus* prédominent. Par allier les lactobacilles, les levures et moisissures ont également quelques importances. La flore lipolytique est représentée principalement par *Aeromonas*, *Bacillus*, et *Staphylococcus* spp. (Tantoui-Elaraki et El Marrakchi, 1987).

1.3.6. Dhan

C'est un beurre frais (traditionnel) qui 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, sont séparés par une cuillère perforée. Le beurre frais obtenu présente une consistance molle du fait de la forte concentration en eau (Benkerroum et Tamine, 2004). Une caractérisation physicochimique d'un beurre Algérien est donnée par le tableau III :

Tableau II : Caractéristiques physicochimiques de beurre traditionnel Algérien (**Lahsaoui, 2009**).

Paramètre	Valeurs moyennes
Humidité	14,0 %
NaCl	1,5 %
Lactose	1,2 g/100g
Matière grasse	81.0 g/100g
Protéines	3,2 g/100g
Lipides insaponifiables	0,3 g/100g
Indice d'acide	52,0 mg KOH/g lipide
Indice peroxyde	3,7mg KOH/g lipide

➤ Microflore du Dhan

Bettache et ses collaborateurs (**2012**), ont rapporté que les bactéries lactiques dominent la microflore du dhan en particulier le genre *Leuconostoc* (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Dextranicum*), *Lactococcus* (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*), et *Lactobacillus* (*Lactobacillus delbruekii* subsp. *Lactis* et *Lactobacillus plantarum*). D'autres groupes identifiés comprenaient des *Streptocoques* pyogènes et des *Entérocoques*.

Résultats et discussion

2. Bactéries lactiques

2.1. Définition et Historique

Les bactéries lactiques sont de très anciens micro-organismes, dont les ancêtres auraient pu voir le jour il y a trois milliards d'années. Elles seraient donc apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques qui ont transformé l'atmosphère terrestre ancienne sans oxygène en atmosphère aérobie (**Dridier et Prévost, 2009**).

Les bactéries lactiques regroupent les bactéries à Gram positif, généralement immobiles, asporulées et micro-aérophiles. Ces bactéries montrent des exigences nutritionnelles complexes en glucides fermentescibles, en acides gras, en acides aminés, en peptides, en vitamines et en sels. Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase (**Pilet et al., 1998**).

Leur classification est réalisée en fonction de leur morphologie, de leur type de fermentation et de leur température optimale de croissance. Elles forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres, ou se distinguent deux groupes homofermentaires et hétérofermentaires (**Badis et al., 2005 ; Priyanka et Prakash, 2009**).

Elles sont ubiquistes, et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses Humaines et animales et dans le tractus digestif (**Drouault et Corthier, 2001**). Aussi, elles jouent un rôle déterminant dans l'élaboration de nombreux produits fermentés, tels que les produits laitiers, les salaisons, la choucroute. Elles participent également à la production du pain, du café, du cacao, du vin, de l'ensilage (**Dridier et Prévost, 2009**).

2.2. Classification

Selon la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilli et l'ordre des *Lactobacillales* renfermant trente cinq genres répartis sur six familles. Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, à savoir *Aerococcus*,

Carnobacterium, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* (Drider et Privost, 2009).

2.3. Genre *Lactobacillus*

Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles forment un ensemble très disparate. Ils appartiennent au groupe des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae* (De Vos *et al.*, 2009).

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Créé, pour la première fois, par Beijerinck en 1901, il comprend actuellement, au moins 145 espèces reconnues qui présentent une diversité phylogénétique, phénotypique et écologique extrême (Corrieu et Luquet, 2008 ; Barinov *et al.*, 2011). Cette diversité est due à la variation en contenu guanine/cytosine (G/C) qui varie entre 30 et 55 % selon les espèces (De Vos *et al.*, 2009).

2.3.1. Habitat

Les lactobacilles ont un habitat vaste et ils sont présents dans de nombreux biotopes (Tableau III).

Tableau III : Habitat des *Lactobacillus* (Perry *et al.*, 2004).

Habitat	Espèces rencontrées	Activité ou produit
Matériel végétal en décomposition	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> ,	Cornichons, ensilage et choucroute
Laiterie	<i>Lb. delbrukii</i> , <i>Lb. lactis</i>	Fromage, yoghourts, etc .
Tractus gastro-intestinal des animaux	<i>Lb. salivarius</i> <i>L. gasseri</i> , <i>L. rhamnosus</i>	Formation de Carie dentaire Flore normale
-(Oral)	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb plantarum</i> ,	
-(Intestinal)	<i>Lb. gasseri</i>	
Vagin des mammifères	<i>Lb. vaginalis</i> <i>Lactobacillus</i> spp.	Flore normale

2.3.2. Caractères morphologiques

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, non sporulées et généralement non mobiles. Les souches mobiles le sont grâce à une ciliature péritriche. Ils peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs et fins ou très courts ou coccobacilles, où la formation de chaînes de cellules est courante (De Vos *et al.*, 2009).

2.3.3. Caractères biochimiques

Les lactobacilles sont catalase négative, certains ont une pseudocatalase. Ils sont dépourvus de cytochrome généralement, nitrate réductase négative, gélatinase négative et ils sont microaérophiles ou anaérobies. Le métabolisme énergétique des lactobacilles est exclusivement fermentaire (Prescott *et al.*, 2003).

Les lactobacilles sont subdivisés, selon leur type fermentaire, en trois groupes selon la classification d'Orla-Jensen remaniée par Kandler et Weiss (Sutra *et al.*, 1998).

- **Groupe I** : il comprend les espèces homofermentaires obligatoires. Elles sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (croissance à 45°C), dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus*.
- **Groupe II** : ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces, dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles.
- **Groupe III** : il est constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*.

2.3.4. Caractères cultureux et exigences nutritionnelles

La plupart des lactobacilles se multiplient dans une gamme de température comprise entre 15°C et 42°C. Certaines souches de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55 °C (Adams et Moss, 2000 ; Tailliez, 2004). De plus, les lactobacilles se développent

au mieux dans des conditions acides, quand le pH avoisine les 4,5 à 6,4, mais leur croissance s'arrête, lorsque le pH avoisine 3,5. Quant au milieu le plus adapté à leur culture est celui De Man, Rogosa et Sharpe (MRS), où les colonies se développent en 24 à 48 heures. Elles sont généralement petites, incolores, blanchâtres ou jaunâtres, lisses ou rugueuses, arrondies ou lenticulaires (**De Vos et al., 2009**).

Par ailleurs, les lactobacilles sont caractérisés par des exigences nutritionnelles nombreuses, à savoir les exigences en vitamine telles que la pantothenate (B5), en niacine (B3) et en cobalamine (B12). Les déficiences en vitamine B12 peuvent induire une diminution de la synthèse de l'ADN et entraîner des changements morphologiques et les cellules deviennent filamenteuses. Une telle élongation cellulaire a été observée avec *L. helveticus* sp *jugurti*, lors de déficiences en cobalamine (B12) ou en acide folique.

A cela s'ajoute les exigences en bases azotées et en cations, notamment les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} ou Fe^{2+} qui sont nécessaires pour la croissance des lactobacilles le manganèse et le magnésium interviennent comme activateurs d'un grand nombre de réactions enzymatiques et comme stabilisateurs de la structure des acides nucléiques, de l'intégrité des ribosomes et de la membrane cellulaire des lactobacilles (**De Man et al., 1960 ; De Vos et al., 2009**).

2.3.5. Identification

L'identification d'espèces de lactobacilles peut être difficile à réaliser par les méthodes biochimiques, en raison du très grand nombre d'espèces existantes. Elle repose essentiellement sur des tests de fermentation des sucres, dont la galerie API 50 CH avec l'utilisation du milieu pour lactobacilles, est la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable (**Roissart et Luquet, 1994 ; Ozgan et Vural, 2011**).

L'utilisation des outils de taxonomie moléculaire comme l'hybridation quantitative ADN/ADN et le séquençage des gènes d'ADNr 16S ont permis de lever des ambiguïtés et de nommer précisément les espèces de lactobacilles d'intérêt en santé et en alimentation Humaine, parmi plus d'une centaine d'espèces de lactobacilles actuellement décrites (**Dellaglio et Felis, 2005**).

2.3.6. Intérêt technologique des lactobacilles

L'intérêt pratique des lactobacilles est considérable pour plusieurs raisons :

- La production d'acide lactique est une des principales fonctions des lactobacilles, car la quantité produite par ces derniers est supérieure à celles formée par les autres genres utilisés industriellement (**Luquet et Roissant, 1994**).
- L'activité protéolytique des lactobacilles participent à l'accélération de l'affinage des fromages avec un moindre risque de développement d'amertume, et d'être à l'origine d'une flaveur plus intense (**Bartels et al., 1987**).
- Certaines espèces du genre *Lactobacillus* comme *Lb. delbrukii ssp. bulgaricus* possèdent une aptitude à produire un polysaccharide, qui confère l'épaississement du milieu dans le cas de yaourt (**Schmidt J.L. et al., 1994**).

2.3.7. Substances antimicrobiennes des lactobacilles

Les lactobacilles, peuvent produire des substances antimicrobiennes, actives *in vitro* et *in vivo* sur les pathogènes. Ces substances sont les acides organiques (acide lactique, acide acétique et le diacétyl), le peroxyde d'hydrogène et des substances de nature protéiques appelées bactériocines (**Servin, 2004 ; Mathot et al., 1996**).

En effet les acides lactique et acétique sont produits lors de la fermentation lactique. Leurs activités antibactériennes contre les germes pathogènes s'expriment de deux manières :

- une action directe où les acides organiques diffusent passivement à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée. Ils acidifient le cytoplasme après dissociation et inhibent l'activité enzymatique cellulaire des pathogènes acidosensibles. Cette diminution du pH peut donc affecter la viabilité des pathogènes bactériens (**Aiba et al., 1998 ; Alakomi et al., 2000 ; Lavermicocca et al., 2008**).
- une action indirecte due à la tolérance de l'acidité par les lactobacilles et par conséquent, dans un milieu acide leur compétitivité bactérienne est avantagée par rapport aux autres bactéries (**Servin, 2004 ; Tejero-Sarinena et al., 2012**).

D'une autre part les lactobacilles sont catalase négative et certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . La formation du peroxyde d'hydrogène serait due à l'action d'oxydase et d'une superoxyde-dismutase (**Condon, 1987**). Le peroxyde d'hydrogène est capable d'inhiber de nombreux pathogènes.

Quant au diacétyl ou 2,3-butanedione est un composé aromatique possédant aussi une activité antibactérienne. Il a des effets inhibiteurs plus importants sur la croissance des bactéries à Gram négatif que sur celles des bactéries à Gram positif (**Jay, 1982**).

Par ailleurs les bactériocines qui aussi sont des peptides synthétisés par un très grand nombre de souches des bactéries lactiques, qui possèdent une activité antimicrobienne. Ils sont généralement thermorésistants, actifs uniquement sur des bactéries à Gram positif avec un spectre d'activité étroit (**Federighi, 2005**).

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram négatif. Ces substances vont interagir avec des récepteurs de peptidoglycane en provoquant l'augmentation de la perméabilité de la membrane et par conséquent, la mort cellulaire. Cependant, les modes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés (**Dortu et Thonart, 2009**).

Les lactobacilles sont largement connus par leur production de bactériocines (**Todorov, 2005**) telles que : l'acidocine B (*Lb. acidophilus* M46), la lactacine F (*Lb. johnsonii*), la lactacine S1 et lactacine S2 (*Lb. salivarius* BGHO1), la gasséricine A (*Lb. gasseri* LA39), la brévicine 27 (*Lb. brevis* SB27), la plantaricine ASM1 (*Lb. plantarum* A1) (**Dortu et Thonart, 2009**) et la caseicine 80 (*Lb. casei* B80) (**Rammelsberg et al., 1990**).



Conclusion

1. Echantillonnage

- **Provenances des échantillons**

Des échantillons de produits laitiers traditionnels notamment Dhan et Smen sont préparés à partir du lait cru de vache et de chèvre respectivement, collectés de différentes régions de la Wilaya de Bejaïa (Tableau IV). Ces échantillons (Dhan et Smen) ont été conservés à 4°C au niveau du laboratoire jusqu'à utilisation.

Tableau IV : Origines et caractérisation des échantillons utilisés

Numéro d'échantillon	Application traditionnel	Origine d'échantillon	Age	Matière de production
E₁	Smen traditionnel	Taghziout	1 an	Lait de chèvre
E₂	Smen traditionnel	Kendira	10 ans	Lait de chèvre
E₃	Beurre traditionnel (Dhan)	Amizour ₁	7 jours	Lait de vache
E₄	Beurre traditionnel (Dhan)	Amizour ₂	15 jours	Lait de vache

2. Isolement et dénombrement des Lactobacilles

Afin d'isoler et dénombrer les lactobacilles, 10g de chaque échantillon de produit laitier traditionnel ont été mélangés avec dans 90mL d'eau physiologique. Après homogénéisation, une série de dilution décimale de 1/10 à été préparée, à partir de cette solution mère, en utilisant l'eau physiologique jusqu'à 10^{-3} et 10^{-7} respectivement pour les échantillons Smen et Dhan. Un volume de 1mL de ces dernières à fait objet d'un ensemencement sur gélose MRS (pH 5.4) et M17 à raison de deux boites par dilution, qui seront par la suite incubées en anaérobiose à 37 et 30°C, respectivement pendant, 24 à 48h.

Les lactobacilles sont généralement des microaérophiles ; leur incubation en anaérobiose a été assurée par la mise des boites de Pétri dans de papiers film.

- **Mode de calcul**

Pour qu'un résultat soit valable, il est nécessaire de compter les colonies sur au moins une boîte contenant au minimum 15 à 300 colonies au maximum. Le nombre N calculé de microorganismes présents dans l'échantillon pour essai, est la moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives, à l'aide de la formule suivante :

$$N = \frac{\sum c}{V(n1+0.1n2)d}$$

Où :

C : Somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives et dont au moins une contient 15 colonies ;

V : Volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres ;

n1 : Nombre des boîtes retenues à la première dilution ;

n2 : Nombre des boîtes retenues à la seconde dilution ;

d : Taux de dilution correspondant à la première dilution retenue (**Norme AFNOR NF ISO 7218, 2004**).

3. Conservation des souches

Deux types de conservations sont à noter. Une à courte et l'autre à longue durée.

- **Conservation à courte durée**

Les souches pures, ont été isolées et ensemencées dans des tubes de bouillon MRS, à pH 6,2. Après incubation à 37°C, les tubes ont été placés à 4°C et le renouvellement des souches se fait toutes les 4 semaines.

- **Conservation à longue durée**

La conservation a long terme des isolats purifiés a été réalisée dans le bouillon MRS contenant 30% de glycérol et stockés à une température de -20°C.

4. Purification

La purification des lactobacilles est réalisée alternativement sur gélose et bouillon MRS à pH 5,4, afin de s'assurer de la pureté des cultures (colonies identiques) (**Badis et al., 2005**).

Sur chacune des boîtes servant aux dénombrements, nous classons les colonies en catégories selon leur aspect macroscopique. Dans chaque catégorie, nous choisissons aléatoirement une colonie supposée représentative parmi celles observées pour réaliser les premiers tests d'orientation.

L'identification a été établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques.

5. Tests phénotypiques

5.1. Examen Macroscopique

Il s'agit d'une observation visuelle de la culture des isolats sur gélose et bouillon MRS, pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies ainsi, l'aspect du trouble dans le bouillon (**Badis et al., 2005**).

5.2. Examen microscopique (Coloration de Gram)

Les isolats ont été soumis à la coloration de Gram qui permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et de nous renseigner le mode de regroupement (**Singleton, 1999**). La coloration de Gram a été réalisée selon la méthode classique.

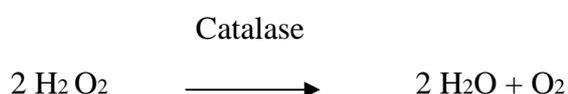
5.3. Etat frais

Un tube de 3 ml de bouillon MRS a été inoculé par une colonie. On incube à 37°C, pendant 24 à 48h, jusqu'à l'apparition d'un trouble microbien. Pour vérifier la mobilité et la forme, une goutte de la suspension bactérienne est mise entre lame et lamelle est observée au microscope au G×40.

6. Tests biochimiques

6.1. Test de la catalase

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase. Celle-ci décompose l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte du H₂O₂, à 10 volumes. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz (Marchal *et al.*, 1991).

Les bactéries Gram positifs et catalase négative sont présumées des bactéries lactiques. (Belarbi, 2011).

6.2. Type fermentaire

Ce test a été effectué par l'ensemencement des souches dans le bouillon MRS glucosé contenant la cloche de Durham et l'incubation été faite à 37°C, pendant 24h à 48h. Le développement d'une bactérie hétérofermentaire se manifeste par l'apparition de gaz dans la cloche de Durham, qui est absente chez les bactéries homofermentaires (Bourgeois *et al.*, 1991).

6.3. Croissance en différentes concentration en NaCl, différents pH et différentes températures

La croissance des isolats à été testées à concentrations de NaCl (6,5, 8 et 10%), les valeurs de pH (3, 5,2 et 6,2) et la température (4, 30, 37 et 44°C) (Badis *et al.*, 2005).

6.4 Thermorésistance

Des tubes contenant du bouillon MRS sont inoculés par les souches isolées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à 63,5°C pendant 10 min, après refroidissement brusque, elles sont incubées à 37°C pendant 48 à 72 h. Un résultat positif se traduit par un trouble (Badis *et al.*, 2005).

6.5 Fermentation des sucres

Le test de la fermentation de différents sucres à été procédé sur milieu MRS plus rouge de phénol exempt d'extrait de viande et du glucose avec l'ajout d'un indicateur de pH.

on teste la fermentation de différents sucres additionnées comme seule source de carbone au MRS plus rouge de phénol, ces sucres sont : Mannitol, Sorbitol, Fructose, Arabinose, Maltose et Mannose.

Les solutions de sucre sont préparées à 1% dans l'eau distillée stérilisées par un chauffage à 100°C pendant 30 min en deux fois.

A partir des cultures jeunes des souches, une colonie de culture est mise dans un tube Eppendorf stérile avec de l'eau physiologique, puis 2 centrifugations successives (6000 rpm à 4°C pendant 10 minutes) ont été effectuées à fin d'assurer un lavage, en suite 3ml de MRS plus rouge de phénol ont été ajoutés au culot.

Sur une microplaque 10µl de différents sucres sont répartis dans les puits, contenant déjà 100µl de la suspension bactérienne.

Enfin les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 48h. Le résultat positif se traduit par virage de couleur (Stiles *et al.*, 1997).

6.6. Galerie API 50

La galerie API 50 CH est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques). Les galeries sont inoculées par des cultures bactériennes qui réhydratent les substrats. Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans les capsules dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi. Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif.

7. Evaluation de quelques aptitudes technologiques

7.1. Activité protéolytique

L'activité protéolytique des souches isolées a été révélée sur milieu MRS contenant 1% (m/v) de lait semi écrémé en utilisant la méthode des spots.

Un volume de 5µl d'une culture fraîche de chaque souche a été déposé en spots puis les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h à 48h. La protéolyse se manifeste par une zone claire autour des spots (Moulay *et al.*, 2006).

7.2. Activité lipolytique

L'activité est recherchée sur milieu MRS solide contenant une concentration de 1% de Tween80 comme unique source lipidique. Les souches isolées ont été ensemencées par touche à partir des cultures fraîches (**Guiraud et Galzy, 1980**).

Après incubation à 37°C pendant 7 à 10 jours l'activité lipolytique se traduit par l'apparition d'un halo opaque autour de la colonie (**Guiraud et Galzy, 1980**).

7.3. Mesure de pH

Le pH des échantillons a été déterminé directement en utilisant un pH mètre (BANTE) ou l'électrode est insérée directement dans chaque culture bactérienne.

8. Effet antibactérien

8.1. Préparation des précultures de bactérie test (*Staphylococcus aureus* multirésistante)

Dans un premier temps ces bactéries sont cultivées à 37°C sur 10 ml de bouillon Cœur Cerveau (BHIB), pendant 18 à 24h. La culture d'une nuit obtenue servirait d'inoculum

8.2. Méthode des spots

Pour étudier l'activité antimicrobienne des souches isolées, la méthode décrite par **Fleming et al., (1975)** a été adoptée avec quelques légères modifications.

L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées est évaluée contre la souche pathogène. Ces bactéries sont mises en culture dans le bouillon MRS et les pathogènes sont eux aussi initialement cultivés dans le bouillon BHIB. Un spot de 5 µl de la suspension de bactéries lactiques à tester provenant d'une culture jeune est déposé à la surface de la gélose MRS. Pour permettre le développement de colonies visibles macroscopiquement, les géloses sont incubées pendant 24 h à 37°C en aérobiose.

La gélose est ensuite recouverte avec 9 ml de gélose Mueller Hinton qui était préalablement ensemencée avec 1 ml de la suspension bactérienne fraîche du pathogène à testée. L'incubation se fait à 37°C en aérobiose pendant 24 H.

Une zone claire autour du spot de bactéries lactiques est considérée comme une inhibition positive et ce traduit par la mesure des diamètres.

1. isolement et purification

A partir des 4 échantillons du Dhan et du Smen, des bactéries lactique ont été isolées sur gélose MRS et M17.

La purification des souches isolées a été réalisé par plusieurs repiquages successifs sur bouillon et gélose M17et MRS, un total de 34 souches pures ont été isolées dont (S1, S2, S3, S4, S5) ont été isolées à partir du Smen de Taghziout, de (S6 jusqu'à S14) à partir du Smen de Kendira, de (S20 jusqu'a S36) à partir du beurre d'Amizour₁ et de (S43 jusqu'à S46) qui ont été isolées à partir du beure d'Amizour₂. Les colonies sont d'un aspect (couleur, taille et forme) typique et homogènes, ils ont été gardés pour la suite de l'étude (Figure 2).



Figure 1 : Aspect des colonies isolées à partir des produit laitiers traditionnels

2. Dénombrement de la flore lactique

Sur gélose MRS à pH 5.4 des dénombrements ont été effectués suivant la Norme AFNOR NF ISO 7218, 2004. Les résultats sont résumés dans la tableau IV. Une charge importante en lactobacilles observée dans cette étude, traduit un indice de bonne qualité microbiologique.

Tableau V : Résultats de dénombrement des lactobacilles sur gélose MRS

Échantillons	E ₁	E ₂		E ₃	E ₄		
Dilutions	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
UFC/g	2.46×10 ⁴	10 ³	4.6×10 ⁴	2.3×10 ⁷	3.4×10 ⁵	3.22×10 ⁶	2.2×10 ⁶

E₁ : Smen de Taghziout ; E₂ : Smen de Kendira ; E₃ : Beurre d'Amizour₁ ; E₄ : Beurre d'Amizour₂

UFC : Unité formant colonies

Le dénombrement de la flore lactique sur gélose MRS (5.4), dévoile une richesse en bactéries lactiques allant de 10^3 jusqu'à $2,3 \times 10^7$ UFC/g dont la flore globale est essentiellement représentée par les lactobacilles prédomine. Comme il a été apporté par El **Marrakhi et collaborateurs (1988)** dans son étude, alors qu'il a expliqué la prédominance des lactobacilles dans la microflore du Smen et Dhan par leur résistance à certains facteurs d'inhibition ainsi que leur tolérance à des valeurs de pH égale à 2.

3. Identification des lactobacilles

L'appartenance ou non des 34 isolats au genre *Lactobacillus* a été étudiée selon les caractéristiques morphologiques et biochimiques.

3.1. Etude des caractères morphologiques

3.1.1. L'aspect macro et microscopique

➤ Macroscopique

Les différents isolats avaient de différents aspects macroscopiques, ils montrent divers aspects de colonies. Nous avons remarqué des colonies lenticulaires de couleur jaune claire, des colonies rondes parfois bombées de couleur blanchâtre soit de taille variable de 1,2 mm et avec une surface lisse, parmi lesquelles on trouve des colonies à contour régulier ou non. Il y a aussi l'aspect de colonies de forme irréguliers gluantes et d'une couleur crème (figure 3).

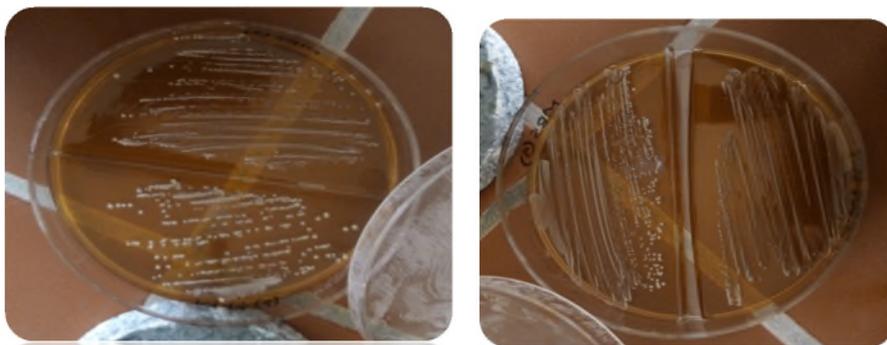


Figure 2 : Aspect macroscopique des colonies de lactobacilles

La croissance des bactéries en bouillon, se traduit par une voile microbienne. Chez les cultures pures un précipât microbienne apparaît au fond des tubes avec une zone clair au-dessus duquel (figure 4).

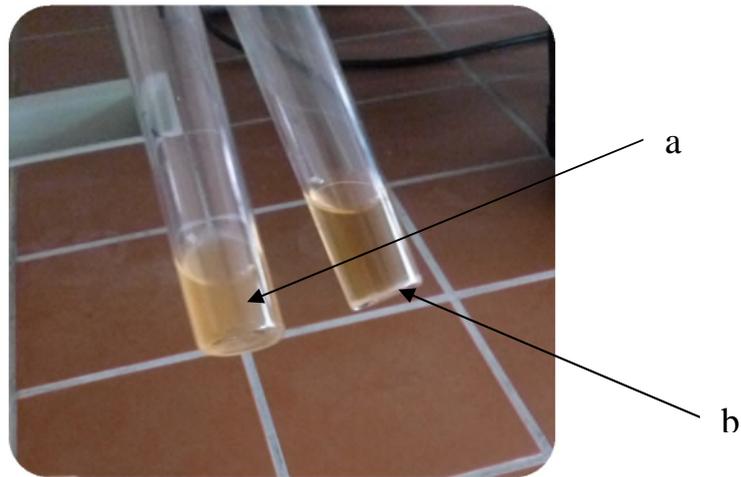


Figure 3 : Aspect de culture pure sur bouillon MRS

a : Précipitation microbienne

b : Voile microbienne

➤ Microscopique

L'étude microscopique repose sur les critères de la coloration de Gram : le Gram positif ou négatif, la forme (bacille, coccobacille, cocci ...) et le mode d'association (grappe, chênnette, diplocoque, tétrade...).

Différents aspects microscopiques ont été trouvés selon les différentes espèces qui forment l'écologie de produit étudié (Tableau IV).

Certaines formes des bactéries isolées sont représentées dans la figure 5

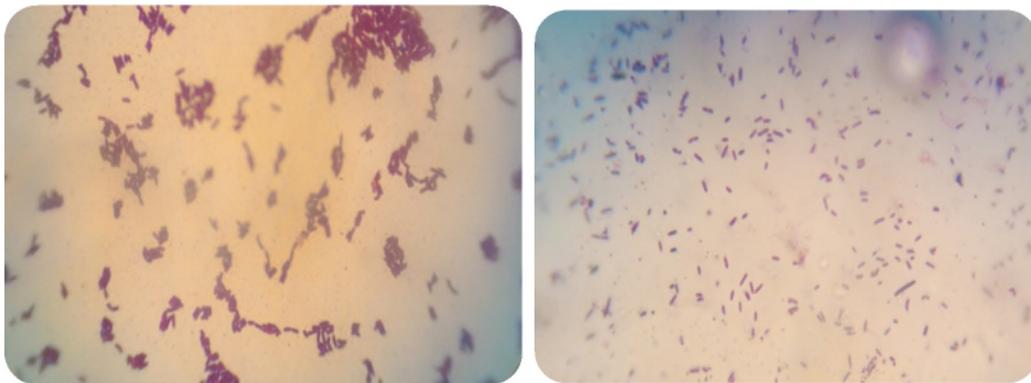


Figure 4 : Aspect microscopique des lactobacilles (grossissement $\times 100$)

Tableau VI : Description des formes microscopiques du total des souches identifiées

Souches	Gram	Forme de cellules et regroupements	Mobilité
M17	+	Bacilles ; isolées ou Diplots	Immobile
S1	+	Bacilles ; isolées ou Diplots	Immobile
S2	+	Bacilles ; isolées ou Diplots en V	Immobile
S3	+	Bacilles ; isolées ou Diplots	Immobile
S4	+	Long Bacilles ; isolées ou Diplots en V	Immobile
S5	+	Long Bacilles ; isolées ou Diplots en V	Immobile
S6	+	Bacilles ; isolées ou Diplots	Immobile
S7	+	Bacilles ; isolées ou Diplots	Immobile
S8	+	Long Bacilles ; isolées ou Diplots en V	Immobile
S10	+	Bacilles ; isolées ou Diplots	Immobile
S11	+	Bacilles fin et long ; Diplots	Immobile
S12	+	Bacilles ; isolées en chaînettes ou en Diplots	Immobile
S13	+	Bacilles ; isolées ou Diplots	Immobile
S14	+	Long Bacilles ; isolées ou Diplots en V	Immobile
S20 ₁	+	Coccobacilles en chaînettes	Immobile
S20 ₂	+	Coccobacilles en chaînettes	Immobile
S21	+	Coccobacilles en chaînettes	Immobile
S22	+	Coccobacilles en chaînettes	Immobile
S23		Bacilles; isolées ou diplots	Immobile
S24 ₁	+	Coccobacilles en chaînettes	Immobile
S24 ₂	+	Coccobacilles en chaînettes	Immobile
S25	+	Coccobacilles en chaînettes	Immobile
S26 ₁	+	Coccobacilles en chaînettes	Mobile
S26 ₂	+	Bacilles ; isolées ou Diplots	Immobile
S28	+	Coccobacilles en chaînettes	Immobile
S29	+	Coccobacilles en chaînettes	Mobile
S31	+	Coccobacilles en chaînettes	Mobile
S32	+	Coccobacilles en chaînettes	Immobile
S34	+	Coccobacilles en chaînettes	Immobile
S35	+	Coccobacilles en chaînettes	Mobile
S36	+	Coccobacilles en chaînettes	Immobile
S43 ₁	+	Coccobacilles en chaînettes	Mobile
S43 ₂	+	Coccobacilles en chaînettes	Immobile
S46	+	Bacilles en Chaînettes	Immobile

3.2. Etudes des caractères biochimiques

3.2.1 Recherche de la catalase

Les 34 souches isolées, ont été retenues pour la recherche de la catalase. Elles étaient positives à la coloration de Gram, de forme bacillaire ayant des colonies circulaires ou lenticulaires, de couleur blanchâtre ou jaunâtre. Le test de la catalase a révélé qu'elles étaient négatives à la réaction de la catalase.

3.2.2. Type fermentaire

Les résultats de l'étude du pouvoir fermentaire sont mentionnés dans le tableau V. La répartition selon le type fermentaire était inégale entre souches. Les souches homofermentaires représentent presque la quasi-totalité, en nombre, des souches hétérofermentaires.

Ce test permet de différencier les isolats homolactiques des hétérolactiques après une incubation à 37°C pendant 24 heures jusqu'à 48 heures.

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pediocoques, ainsi que certains lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (Thompson *et al.*, 1994).

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostoc et certains lactobacilles (Thompson *et al.*, 1994)

Tableau VII : Résultats de type fermentaire des souches isolées

Souches	Type fermentaire	Souches	Type fermentaire	Souches	Type fermentaire
M17	Homofermentaire	S13	Hétérofermentaire	S27	Homofermentaire
S1	Homofermentaire	S14	Homofermentaire	S28	Homofermentaire
S2	Homofermentaire	S20 ₁	Homofermentaire	S29	Homofermentaire
S3	Homofermentaire	S20 ₂	Homofermentaire	S31	Homofermentaire
S4	Homofermentaire	S21	Homofermentaire	S32	Homofermentaire
S5	Homofermentaire	S22	Homofermentaire	S34	Homofermentaire
S6	Hétérofermentaire	S23	Homofermentaire	S34	Homofermentaire
S7	Homofermentaire	S24 ₁	Homofermentaire	S35	Homofermentaire
S8	Hétérofermentaire	S24 ₂	Homofermentaire	S36	Homofermentaire
S10	Hétérofermentaire	S25	Homofermentaire	S43 ₁	Homofermentaire
S11	Homofermentaire	S26 ₁	Homofermentaire	S43 ₂	Homofermentaire
S12	Homofermentaire	S26 ₂	Homofermentaire	S46	Homofermentaire

3.2.3. Croissance à différentes températures et Thermorésistance

L'emploi de ce test permet de diviser les souches en deux groupes : groupe des souches mésophiles et le groupes des souches thermophiles. La croissance des isolats a été testée à 10, 30 et 44°C.

Dans cette étude, la majorité des souches testées sont signalées thermophiles, elles poussent bien à 44°C après 48 h d'incubation sauf la souche S4 qui est incapable à se développer à 44°C (type mésophile) (Tableau VI).

Tous les isolats ont résisté à un traitement thermique au bain marie à 63,5°C pendant 30 minutes. Selon **Tailliez, (2004)**, la plupart des lactobacilles se multiplie dans une gamme de températures comprise entre 15 °C et 42 °C. Certaines souches de lactobacilles dites «thermophiles » restent viables à 55 °C.

3.2.4. Croissance aux différentes conditions de cultures

La mise en culture des souches à pH 6,2 , 5,4 et 3et à la présence de différentes concentration de NaCl 6.5 , 8 et 10% , nous a permis d'évaluer leurs aptitudes à croitre . Les résultats obtenus montrent trois groupes de bactéries (Tableau VI)

- Des souches avec une croissance maximale (+++)
- Des souches avec une croissance moyen (++)
- Des souches avec une légère croissance (+)
- Des souches sans croissance (-)

La plus part des souches isolées sont capable de croitre sur bouillon MRS avec les différentes concentrations de NaCl, seulement quatre souches parmi les 34 qui n'ont pas pu se développées : S10₂, S24₂, S26₂, S27 à 8%, et S27 pour une concentration de 10% de NaCl.

Toutes les souches isolées son capables de croitre sur bouillon MRS à pH 6.2 et 5.4, alors que pour les souches : S8, S24₂, S16₁, S62₂ et S3₂ sont incapables de croitre à pH 3.

Les résultats de ces testes sont résumés dans le tableau VIII :

Tableau VIII : Résultats des testes de température, pH, NaCl et Thermorésistance des souches isolées

Souches	Température			pH			Na Cl %			Thermorésistance
	10°C	37°C	44°C	6.2	5.4	3	6.5	8	10	
M17	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
S1	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+
S2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
S3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
S4	+	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	+/-
S5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
S6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+/-
S7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+/-
S8	+++	+++	+++	+++	+++	-	++	+++	+	+
S10 ₁	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	+++
S11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	+++
S12	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
S13	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
S14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+++
S20 ₁	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++
S20 ₂	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+
S21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	++	+
S22	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
S23	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++
S24 ₁	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+/-
S24 ₂	+	+++	+++	+++	+++	-	+	-	+++	+
S25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+/-
S26 ₁	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	+++	++
S26 ₂	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	-	+	+++
S28	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	+++	+++
S29	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++
S31	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	+++
S32	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	++	+++
S34	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++
S35	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++
S36	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++
S43 ₁	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+++
S43 ₂	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+++
S46	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+++

3.2.5. Fermentation des sucres

La détermination des genres et des espèces bactériennes, réside essentiellement dans leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique et autres acides organiques. L'analyse des profils fermentaires (annexe VII ; Tableau XIII), révèle une grande diversité métabolique des carbohydrates chez isolat retenus.



Figure 5 : Résultats de teste des sucres sur microplaque

Les souches (M17), (1), (3), (4), (5), (6), (7), et (8) ont des profile similaire à celui de *Lactobacillus casei* alors qu'elles fermentent toutes le mannitol et le sorbitol et ne fermentent pas le mannose, l'arabinose, maltose et le fructose.

Les isolats (12), (20₁), (20₂), (21), (26₂), (28), (24₁), (24₂) et (46) ont tous la même propriété de ne pas fermenté les six sucres testés se qui permet de les classés probablement comme étant *Lactobacillus delbrukii subsp bulgaricus*.

Enfin les souches (10₁), (11), (13), (22), (23), (25), (26₁), (31), (32), (34), (35), (43₁) et (43₂) quant a eux, elles fermentent les six sucres testés se qui implique qu'elles peuvent apparaitre à l'espèce *Lactobacillus rhammnosus*.

3.2.6. Résultats de l'API 50

Les résultats de l'étude fermentaire des sucres par système API 50 sont mentionnés dans le tableau IX indiqué dans l'annexe VI. La fermentation des hydrates de carbone et dérivés de la galerie a permis d'identifier les 3 espèces des lactobacilles testés dont la répartition est la suivante (la figue 6) : (S2) appartienne à l'espèce *Lactobacillus delbrukii sbsp delbrukii*, (S14) appartienne à l'espèce *Lactobacillus paracasei* et (S29) appartienne à l'espèce *Lactobacillus acidophilus*.

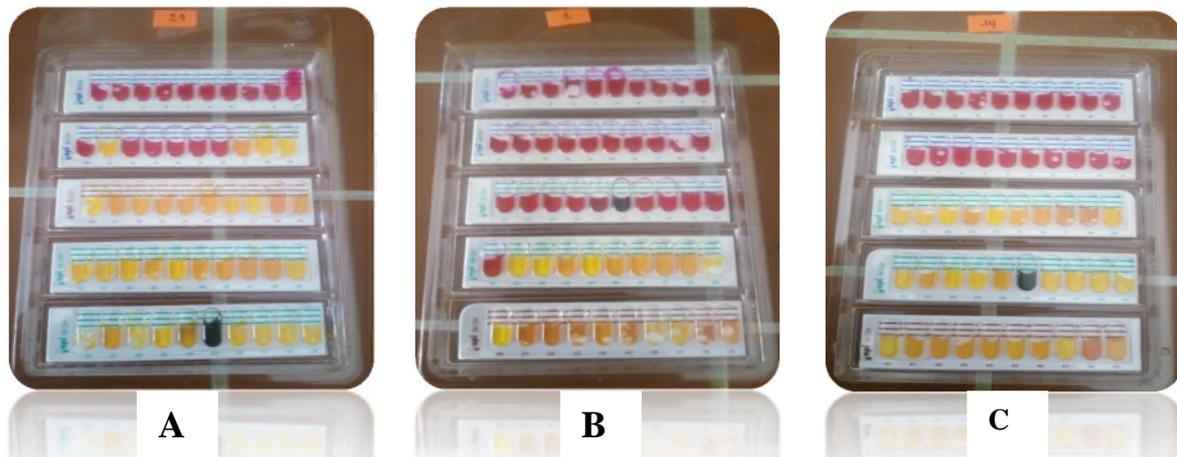


Figure 6 : Résultats de test biochimique de la galerie API 50 CH. **A :** Souche *Lactobacillus acidophilus*, **B :** Souche *Lactobacillus delbrukii sbsp delbrukiii*, **C :** Souche *Lactobacillus paracasei*

4. Evaluation de quelques aptitudes technologiques

4.1. Activité protéolytique

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire. Les peptides issus de la protéolyse sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en acides aminés et en peptides courts (Yvon, 2006). L'hydrolyse des caséines du lait modifie la texture et les acides aminés et les peptides libérés sont des précurseurs des composés responsables de l'arôme des produits fermentés. L'activité protéolytique est également une caractéristique technologique importante chez les bactéries lactiques puisqu'elle leur confère la capacité de croître efficacement dans le lait, ce milieu étant déficient en sources azotées disponibles. Elle était reconnaissable par la présence d'un halo clair autour des colonies sur la gélose MRS additionnés de lait demi écrémé (Thapa *et al.*, 2006). Les résultats de l'activité protéolytique des isolats sont résumés dans le tableau VII. La plupart des souches ont montré une capacité importante de dégrader les caséines trouvées dans le milieu de culture utilisé et selon les souches figure 8.

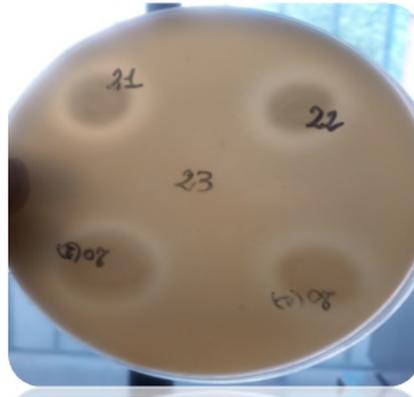


Figure 7 : Activité protéolytique des souches sur MRS
à concentration de 1% de lait demi-écrémé

Ces résultats nous permettent de confirmer le caractère protéolytique des bactéries lactiques comme il a été rapporté par les travaux de (Shirai *et al.*, 2001 ; François *et al.*, 2007).

Ces auteurs ont montré que les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser plusieurs acides aminés, mais sont pourtant bien adaptées à un environnement riche en protéines et pauvre en acides aminés libres ; comme le lait ; grâce à un système protéolytique bactérien complexe.

4.2. Activité lipolytique

Le pouvoir lipolytique est d'une grande importance dans le développement du flaveur et la libération des acides gras mais il n'est pas très répandu chez les bactéries lactiques par rapport à d'autre groupe de bactérie (Fox *et al.*, 2004 ; De Roissart et Luquet, 1994) , et c'est le cas des souches isolées, alors qu'elles partagent toutes la même propriété de ne pas avoir un pouvoir lipolytique appréciable. Le tableau VII montre les résultats enregistrés pour l'activité lipolytique. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Guessas et ces collaborateurs, (2011) qui ont montré que les lactobacilles isolés du beurre traditionnel n'ont aucune activité lipolytique.

Tableau IX : Résultats des activités protéolytique et lipolytique pour l'ensemble des souches.

Souches	Activité protéolytique	Activité lipolytique	Souches	Activité protéolytique	Activité lipolytique
M17	+++	-	S23	-	-
S1	+++	-	S24 ₁	+++	-
S2	+++	-	S24 ₂	++	-
S3	+++	-	S25	++	-
S4	+++	-	S26 ₁	+++	-
S5	+++	-	S26 ₂	-	-
S6	+++	-	S28	+++	-
S7	+++	-	S29	+++	-
S8	+++	-	S31	+++	-
S10	+++	-	S32	-	-
S11	+++	-	S34	+++	-
S12	+++	-	S34	+++	-
S13	+++	-	S35	+++	-
S14	+++	-	S36	+++	-
S20 ₁	+++	-	S43 ₁	+++	-
S20 ₂	+++	-	S43 ₂	+++	-
S21	+++	-	S46	+++	-
S22	+++	-			

4.3. Mesure de pH

L'étude technologique des bactéries lactiques s'appuie sur le pouvoir acidifiant de celles-ci. La production de l'acide lactique et le paramètre majeur pour la sélection des souches lactiques capables de s'exploiter en industrie alimentaire. Sa production à partir du lactose du lait, sert à coaguler le lait, ainsi qu'elle provoque un abaissement de pH, en conséquences le pH bas va rendre le milieu défavorable à la croissance des pathogènes. Les résultats de la mesure du pH sont représentés dans la figure 9.

Parmi les 34 souches testées la plus part des souches révèlent un pouvoir acidifiant remarquables dont les valeurs comprise entre pH 3,5 et 4,51 pour le reste des souches montrent un pouvoir moins important qui se manifeste entre pH de 4,95 et 5,04.

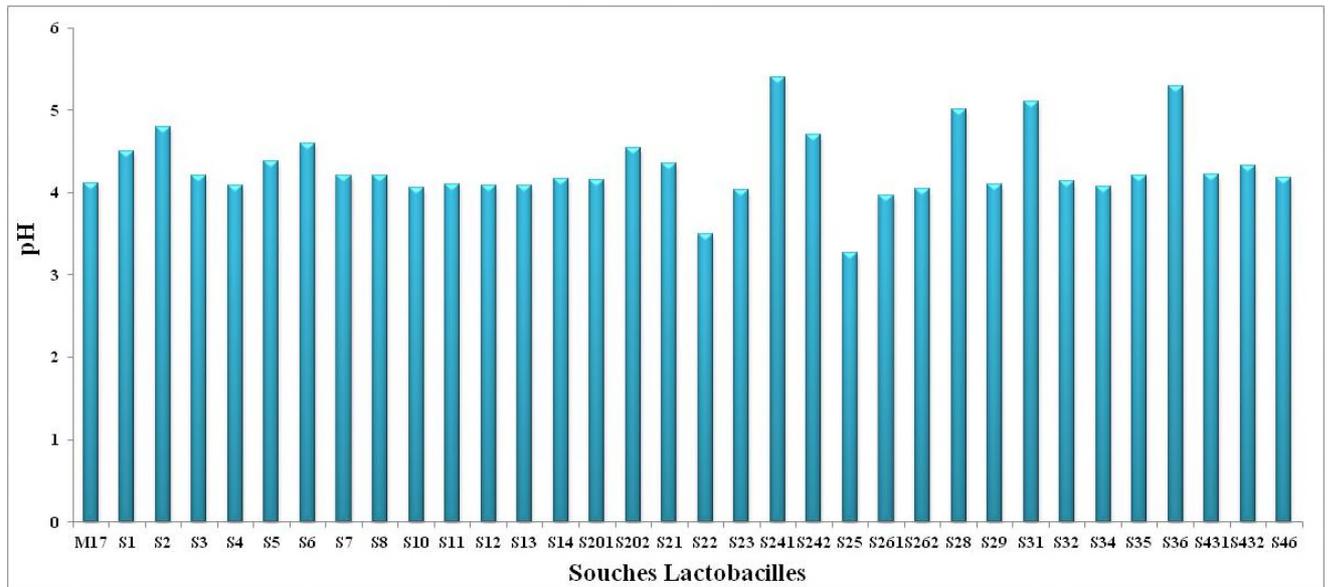


Figure 8 : Histogramme représente les valeurs de pH des différentes souches isolées sur bouillon MRS

5. Effet antibactérien :

Le pouvoir antagonisme des bactéries lactiques envers les bactéries à potentiel pathogène, notamment celle qui existe aux environnements laitiers, est un caractère très recherché autant qu'un caractère crucial dans la bionconservation alimentaire. L'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes montre une activité antagonisme qui se manifeste par l'apparition des halots d'inhibition (**Fleming et al., 1975**).

D'après les résultats de l'activité antimicrobienne que les figures 10 et 11 montrent, il y a certains souches présentent des zones d'inhibition dont le diamètre peut atteindre 20mm vis à vis de *Staphylococcus aureus*.

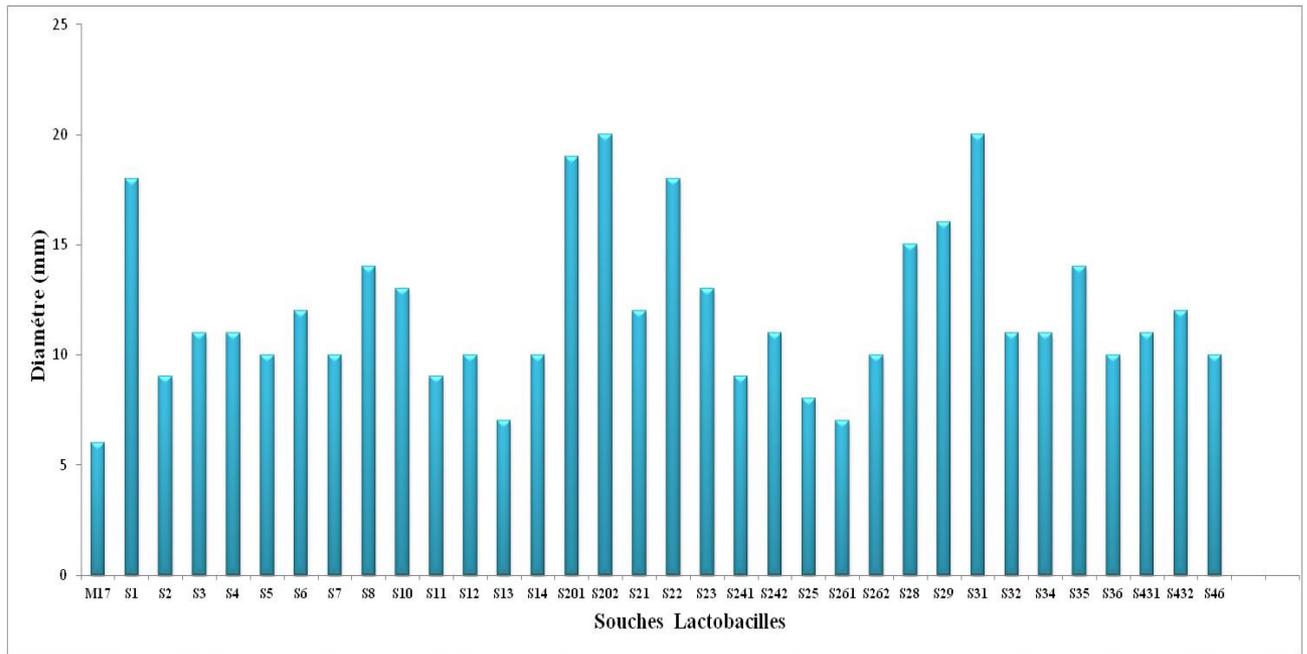


Figure 9 : Résultats des interactions entre les lactobacilles et *Staphylococcus aureus*



Figure 10 : Activité antibactérienne des souches lactobacilles vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

Les espèces de lactobacilles sont généralement connus par leur production des acides organiques dans le milieu de culture et elles peuvent produire aussi le peroxyde d'hydrogène et d'autre composés antimicrobien (Berefoot et klaenhmtnar, 1984 ; Saidi et al., 2011). L'effet inhibitrice des lactobacilles peut avoir deux origines le premier est la production d'acide lactique et /ou acétique ; on effet les lactobacilles sont connus pour une grande résistance au pH acide (jusqu'à un pH voisin de 3,5) contrairement aux autre genres qui son plus sensible (Benthin et Villadsen, 1995 ; Wilson et al., 2005).

Alors que la deuxième et que les lactobacilles produisent une autre substance inhibitrice active de nombreuses espèces comme les bactériocines (**Larsen et al., 1993 ; Avila et al., 2005**).



Annexes

Le but de cette étude été d'isoler et de caractériser des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* à partir des produits laitiers traditionnels locaux (Smen et Dhan). Un total de quatre échantillons été pris en considération à partir desquels 34 souches bactériennes été isolées. L'identification des différents isolats est basée sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques(AP50CH). L'évaluation de quelques aptitudes technologiques ainsi que l'effet antibactérien à l'égard des bactéries pathogènes, des isolats de *Lactobacillus* a été réalisé.

Les résultats obtenus de l'identification révèlent que les isolats étudiés peuvent appartenir aux espèces suivantes : *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrukii subsp bulgaricus*, *Lactobacillus rhammnosus*, *Lactobacillus delbrukii sbps delbrukiii*, *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus acidophilus*.

L'évaluation de quelques aptitudes technologiques nous à permis de déduire que les souches isolées ont une bonne activité protéolytique, de même pour le pouvoir acidifiant dont les valeurs du pH varient entre 3,26 et 5,04,

L'étude de l'activité antibactérienne à l'égard de *Staphylococcus aureus* multirésistant a montré que les isolats ont une activité inhibitrice remarquable et les diamètres des zones d'inhibition varient entre 6mm et 20mm.

Cet étude est préliminaire, mérites d'autres travaux complémentaires.

Perspectives :

- ✓ Identification génétique des souches de *Lactobacillus* isolées
- ✓ Etude des profils biotechnologiques tels que le pouvoir acidifiant et l'activité protéolytique en utilisant des techniques plus approfondies
- ✓ Etude de propriétés probiotiques des souches isolées

A

AFNOR. (1996). NF ISO 7218. Microbiologie des aliments. Règles générales pour les examens microbiologiques. 47 pages.

Aiba Y., Suzuki N., Kabir AM., Takagi A. et Koga Y. (1998). Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.* 93 : 2097-2101.

Alais C. (1984). Sciences du lait: Principes et techniques laitiers. IVe édition, Edition SEPARC, Paris., 814 p.

Alakomi HL., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. et Helander IM. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 2001-2005.

Amiot J., Angers P., Bazinet L., Boutonnier J.L., Britten M., Castaigne F., Champagne C., Dupuis C., Fliss I. et al. (2002). Science et technologie du lait transformation du lait. Edition Ecole polytechnique de Montréal.

Avila M., Garde S., Medina M. et Nunez M. (2005). Effect of milk inoculation with bacteriocine producing lactic acid bacteria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture. *J. Food Prot.* 68: 1023-1033.

B

Badis A., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R. (2005). Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Scien &Tech*, **23** : 30-37.

Bartels H.J., Johnson M.E. et Olson N.F. (1987). *Milchwissenschaft*, 42, 83.-**Bencharif A.** (2001). Stratégies des acteurs de la filière lait en Algérie : états des lieux et problématique. *Options Méditerranéennes Série B. Etudes et recherches* 32 : 25-45.

Bencharif A. (2001). Stratégie des acteurs de filier lait en Algérie : états des lieux et problématique. *Options Méditerranéennes Série B. Etudes et Recherche* 32: 25-45.

Benkerroum N. et Tamime A.Y. (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol.* **21**:399–314.

Benthin S. et Villadsen J., (1995). Different inhibition of *Lactobacillus delbruckii* subsp. bulgaricus by D- and L- lactic acid : effects on lag phase. growth rate and cell yield. *J. Appl. Bacteriol.* **78** : 647-654.

Berefoots S.F. et Klaenhammer T.R. (1983). Detection and activity of lactacin b, a bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1808.

Bettache G., Adjoudj F., Hadadji M. et Kihal M. (2012). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Their Major Technological Traits. *World Applied Sciences Journal* **17** (4): 480-488.

Bourgeois C.M. et Larpent J.P. (1996). Microbiologie Alimentaire, vol. 2, Aliments fermentés et fermentation alimentaire 2eme édition, *Technique documentation*.

Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zuca, J. (1991). Lait et les produits laitiers non fermentés, Microbiologie alimentaires. vol. 1, aspect micro biologique de la sécurité et de la qualité des aliments.

C

Claps S. et Morone G. (2011). Produit laitiers et fromagers traditionnels d'Algérie. Corfilac.

Condon S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS. Microbiol. Lett.* **46**:269-280.

D

De Roissant H. (1986). bactéries lactiques In Écosystème microbien d'un atelier fermier de salaison identification et propriétés lactiques. thèse de doctorat. Université de Rennes. France. pp. 437-488.

De Roissart H. et Luquet F.M. (1994). Bactéries Lactiques II. Edition Lorica. pp. 39-45.

Delgado A., Dulce B., Pedro F., Cidalia P.J. et Fegueiredo M. (2001). Antimicrobial activity of *L. plantorum* isolated from a traditional lactic fermentation of table olives *Lait* 81 : 203-215.

Dellaglio F. et Felis GE. (2005). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *In* : « Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects». Caister Academic Press éd. Norfolk, UK. pp. 25-49.

Desmazeaud M. (1992). Les bactéries lactiques in : Les groupes microbiens d'intérêt laitier.

Dillon J.C. (2008). Place du lait dans l'alimentation humaine en région chaude. Edition A. P.G (Agro Paris Tech). **Drider D. et Hevré P.** (2009). Bacteries lactiques. Edition. Economica. pp. 235-240.

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

E

El Marrakchi A., Tantaoui-Elarraki A., El Mane et Tifrit L. (1988). La flore microbienne du smen marocain I. Flore naturelle et fore d'intérêt hygiénique. *Le Lait*, Inra Editions, 68 (2), pp. 205-217.

F

Fredereghi M. (2005). Les bactéries lactiques. *In* : « Bactériologie alimentaire, Compendium d'hygiène des aliments ». Lavoisier éd., Paris.France. pp. 101-130.

Flemin H.P., Erchells J.L. et Caslilow R.N. (1975). Microbiol inhibition on isolate *Pediococcus* from cucumber bune. *Appl. Environ. Microbiol*, 30:1040-1042.

Fleming H.R., Etchell G.L. et Costilow R.N. (1985). Microbial inhibition by isolate of *pediococcus* from cucumber brine. *Appl and Microbiology*, 30:104-1042.

Fox, Patrik F., Mcsweeney, Paul L.H., Cogantimothy M. and Guinee, timothy P. (2004). Cheese : chemistry, physic and microbiology third edition vol 2 Major cheese groups. Third edition. Elsevier Ltd.

Francois Z.N. N., Florance F.A., Paul M.F., Felicitet M., EL Soda M. (2007). Biochemical properties of some thermophilic lactic acid bacteria strains from traditional fermented milk relevant to their technological performance as starters cultures. *Biotechnol*, vol.6, n°1, p. 14-21.

G

Guessas B., Adjoudj F., Hadadji M. and K. (2012). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Their Major Technological Traits. *World Applied Sciences Journal* 17 (4): 480-488.

Guiraud J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Edition. Dunod., Pari. pp. 315-320.

Guiraud J.Y. et Galzy P. (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edition de l'usine : 39 p.

J

Jay JM. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:525-532. *Journal of Dairy Technology*, vol. 61, n°2, pp. 89-96.

L

Lahsaoui S., (2009). Etude du procédé de fabrication d'un produit laitier traditionnel algérien (Kilila). Thèse de doctorat d'état : Département d'Agronomie : Université de Batna. Algérie.

Larpent J.P. (1997). Mémento technique de microbiologie .3eme Ed. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 910 p.

Larsen A., Vagensen G. et Josephsen J. (1993). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs : purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocine produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *J. Appl. Bacteriol.* 75 : 113-122.

Lavermicocca P., Valerio F., Lonigro SL., Di Leo A. et Visconti A. (2008). Antagonistic activity of potential probiotic lactobacilli against the ureolytic pathogen *Yersinia enterocolitica*. *Curr. Microbiol.* 56: 175-181

Louaileche H. (1998). Lait et laits fermentés. Edition Centre Universitaire Abderrahmane MIRA-BEJAIA Institut des Sciences de la Nature. pp. 3-6.

M

Mahaut M., Jeantet R., Brulé G. et Schuck P. (2000). Les produits industriels laitiers. Editions Tec et Doc.

Marchal N., Bourdon J.L. et Richard, C.L. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème édition, Doin éditeurs, Paris.

Mathot G. A., Béliard E. et Thuault D. (1996). Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. in : Microbiologie alimentaire, Bourgeois C. M. et Larpent P. J. Tec et Doc. Ch. 2, pp. 432-447,

Medouni Y., Boulahchiche N. et Brahimi R. (2005). Role de la femme rurale dans le système de production agropastoral. Cas de la fabrication Ouled-Baida de la zone d'El Guedid Region de Djelfa (Steppe central). Option : Méditerranéennes, série A., n°70.

Moulay M., Aggas H., Benmechernene Z., Guessas B., Henni E. et Kihal E. (2006). Cultivable Lactic Acid bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity. *World Journal of Dairy and Food Sciences*. 1 (1). 12-18.

O

Ozgun D. et Vural HC. (2011). Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. *J.M.G.G.* 3(3): 46-49.

P

Pilet M. F., Mgras C. et Federighi M. (1998). Les bactéries lactiques. in : Manuel de bacteriologie alimentaire, Sutra L., Federighi M. et Jouve J. L. *Polytechnica*. Ch. 9, pp. 235-240.

R

Rammelsberg M., Muller E. et Rader F. (1990). Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Arc. Microbiol.* 154(3): 249-252.

Roissart H. et Luquet F.M. (1994). Méthodes d'Identification des Bactéries Lactiques
In : « Bactéries Lactiques ; Aspects fondamentaux et technologiques ». Vol 2. Coquand édition, Grenoble. France. p. 141-167.

S

Saidi N., Hadadji et Guessas B. (2011). Screening of Bacteriocin-producing lactic Acid Bacteria isolated from west Algerien Goat's Milk. *Global J. Biotechnol. Bioch* 6(3): 154-16.

Servin AL. (2004). Antagonistic activity of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS. Microbiol. Rev.* 28: 405-440.

Schmidt J.L., Tourneur C. et Lenoir J. (1994). Fonctions et choix des bactéries lactiques et technologies laitières. in : Bactéries lactiques II. De Roissart H. et Luquet F.M., Ch. IV-2, P. 39-45. Edition Lorica.

Shirai K., Guerrero I., Huerta S., Saucedo G., Castillo A.O., Gonzalez R. et George M. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation Hall Enzyme and Microbial Technology, p. 446–452.

Singleton P. (1999). Bactériologie.4eme Edition. Dunod, Paris. 317 p.

Stiles M.F. et Holzapfet W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food. Microbil.* 36: 1-29.

Sutra L., Federighi M. et Jouve J-L. (1998). Manuel de bacteriologie alimentaire. Polytechnica. Edition, Paris. France.

T

Tailliez P. (2001). Les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait*, 81 : 1-11

Tailliez P. (2004). Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Actualités microbiologiques*. pp. 35-41.

Tantoui-Elaraki A. et El Marrakchi A. (1987). Study of Moroccan dairy products: Iben and smen. *MIRCEN Journal*, 3: 211-220.

Tejero-Sarinena S., Barlow S.J., Costabile A., Gibson G.R., et Rowland I. (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*. 18(5): 530-538.

Thapa N., Pal J., et Tamang J.P. (2006). Phenotypic indentification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fish products of the eastern himalayas. *International J. Food Microbiol*, vol. 107, n°1, p. 8-33.

Thompson J.K., Collins M.A., et Mercer W.D. (1994). Characterisation of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ 450. *J. Appl. Bacteriol*, 80 : 338-348.

Todorov S.D. et Dicks L.M.T. (2005). Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *J. Basic. Microbiol*. 45: 312-322.

W

Wilson A.R., Signee D. et Epton H. A. S. (2005). Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* due to lactic acid production. *J. Appel. microbiol*. 99 : 1516-1522.

Y

Yvon M. (2006). *Key enzymes for flavor formation by lactic acid bacteria Australian.*

Annexes I

Composition des milieux de culture (pour 1l d'eau distillée) et produits chimiques

❖ Milieux de cultures

Gélose MRS

Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Citrate d'ammonium	2 g
Acétate de sodium	5 g
Sulfate du magnésium	0,2 g
Sulfate de manganèse	0,05g
Phosphate dipotassique	2 g
Agar	5 g
Tween	1 ml
pH	6,2±0,2
Autoclavage	120°C/20min

Bouillon MRS

Polypeptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait autolytique de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1,08g
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0,2g
Sulfate de manganèse	0,05g
pH	6,4±0,2

Gélose M17

Tryptone	2,50 g
Peptone pepsique de viande	2,50 g
Peptone papainique de soja	5,00 g
Extrait autolytique de levure	2,50 g
Extrait de viande	5,00 g
Lactose	5,00 g
Glycérophosphate de sodium	19,00 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Acide ascorbique	2,50 g
Agar agar bactériologique	15,00 g
pH	7,1 ± 1,2
Autoclavage	120°C/20min

Gélose Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf	300g
Hydrolysate de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
pH	7,3±0,1

Bouillon BHIB

Protéose-peptone	10g
Infusion de cervelle de veau	12,5g
Infusion de cœur de bœuf	5g
Glucose	2g
Chlorure de sodium	5g
Hydrogénophosphate de sodium	2,5g
pH	7,4

Annexes II**❖ Produits chimiques****Fushine phénique**

Fushine cristallisée	1g
Alcool éthylique	10ml
Phénon	5g
Eau distillée	10ml

Violet de gentiane phénique

Violet de gentiane	1g
Phénol	11g
Ethanol	10ml
Eau distillée	100ml

NaCl (0.9%)

Sodium	154mmol/l
Chlorure	154mmol/l
pH	4,5-7,0

H₂O₂ (10%)**Tellurite de potassium (4%)**Formule moléculaire : K₂O₃Te

Annexes III

Coloration de Gram

❖ Préparation de frottis

Prélever une goutte de la suspension bactérienne et la déposer au centre de la lame ;
Étaler avec la pipette sur la lame, de façon à obtenir un étalement mince ;
Sécher et fixer en portant la lame au-dessus de la flamme du Bec Bunsen.

❖ Coloration

Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane sur le frottis fixé, et laisser agir 1 min puis jeter l'excès ;
Déposer quelques gouttes de lugol, laisser agir quelques secondes ;
Rincer à l'eau
Contre-colorer en déposant la Fushine pendant 1 minute ;
Rincer à l'eau ;
Laisser sécher à l'air ;
Déposer une goutte de l'huile à émersion ;
Observer au microscope optique ($G \times 100$), la forme, la disposition, et le Gram (Gram+ : couleur violette ; Gram- : couleur rose).

Annexes IV

1. Appareillage :

- **Bain Marie (GFL) :** pour liquéfier les milieux de culture.
- **Balance de précision :** Pour peser des ingrédients de milieux de culture.
- **Distillateur (NUVE)**
- **Etuve (MEMMERT) 44°C :** Pour l'incubation des boites ensemencées.
- **Etuves (INCUCCELL) (30 et 37°C) :** Pour l'incubation des boites ensemencées.
- **Four Pasteur (POL-EKO-APARATURA SP.J.) :** Pour la stérilisation (par la chaleur sèche : 180°C/20min) des équipements en verrerie (erlenmeyers, tubes dans des contenaires).
- **L'Autoclave (NUVE) :** Pour stérilisation (par la chaleur humide : T°120C/15min) des équipements en verrerie ainsi que des milieux de culture.
- **pH-mètre (BANTE)**
- **Microscope Optique :** observation des bactéries aux différents grossissements
- **Plaque chauffantes agitatrices (VELP scientifique) :** Faire agiter les milieux de culture durant leur préparation jusqu'à l'ébullition.
- **Réfrigérateur (CONDOR) :** Pour la conservation des milieux de culture.
- **Thermomètre :** Pour vérifier la T° de la chambre chaude.
- **Haute Microbiologique(BIOHAZARD) :** Pour manipuler dans des conditions stérile.

2. Equipements :

Anse de platine, bec Bunsen, boites de petri, papier absorbant, contenaires pour pipettes, papier aluminium, portoirs, seringues (10ml), spatules de laboratoire, pipettes pasteur.

3. verreries :

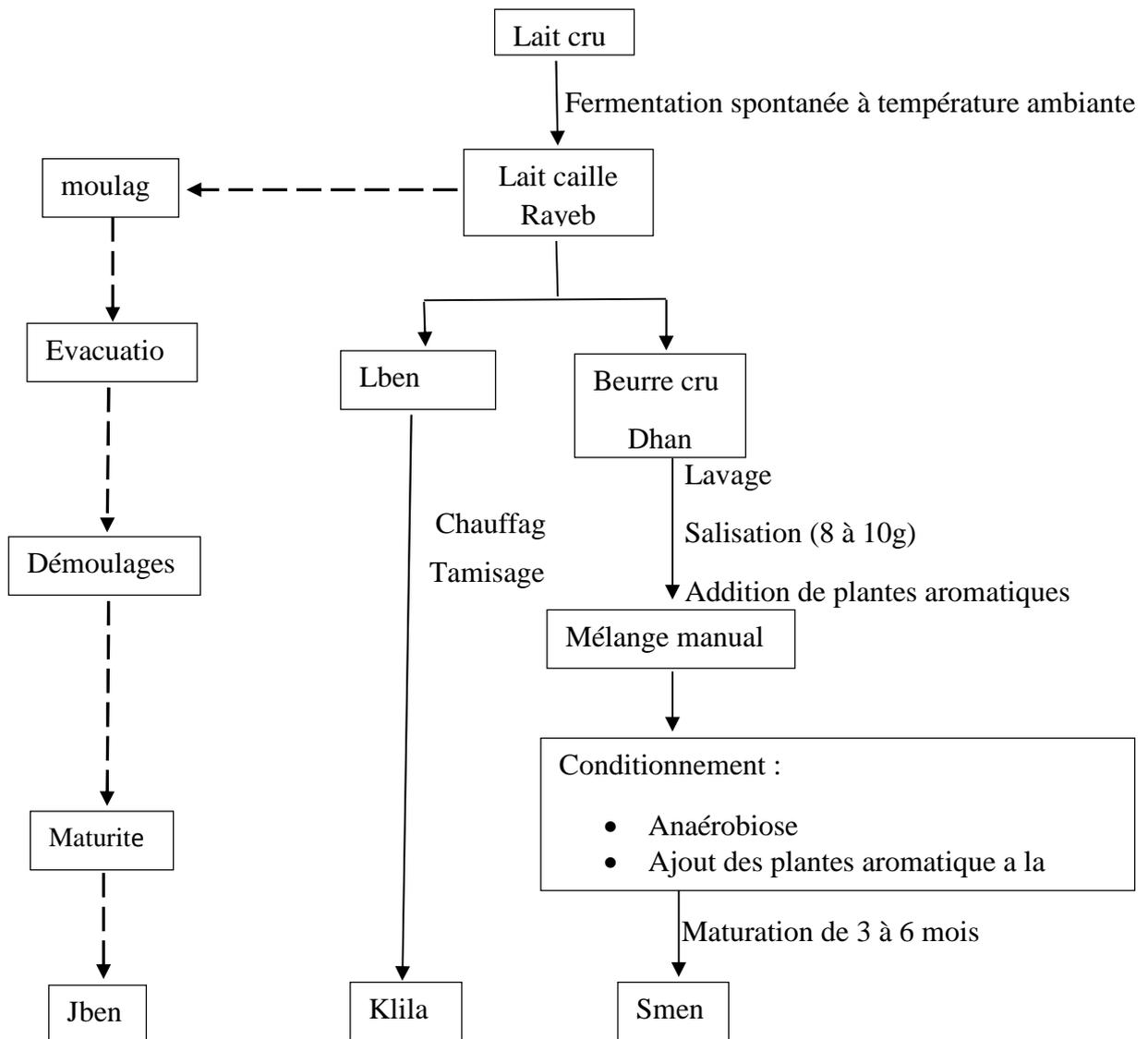
Béchers à différents volumes, burette, erlenmeyers, flacons en verre (250ml), lames et lamelles en verre, tubes à essai, Pipettes Pasteur.

4. Réactifs :

Alcool, Eau distillée, Lugol, Solution d'eau oxygénée (30%) , L'huile à émulsion, Solution NaOH.

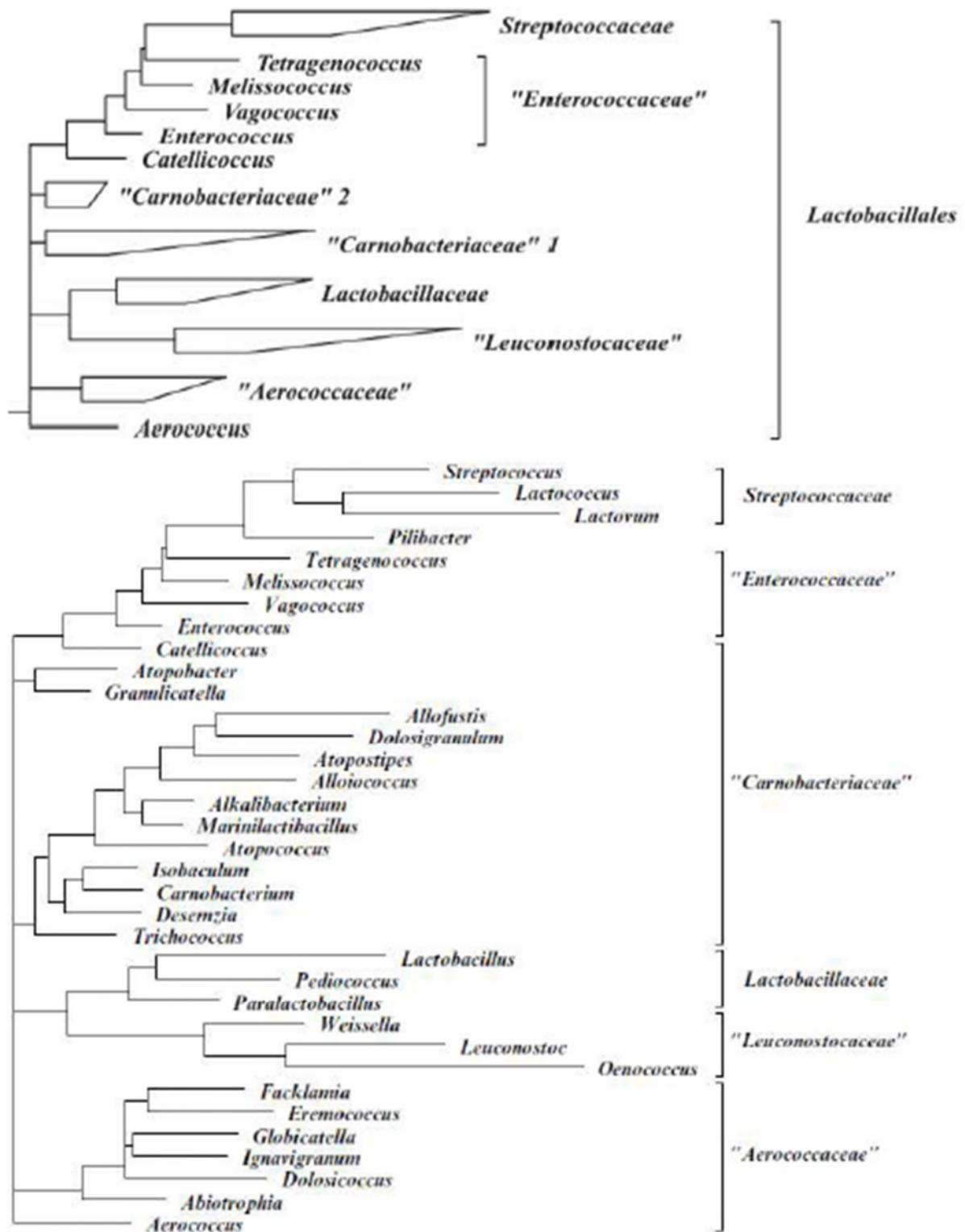
Annexe bibliographique V

Schéma récapitulatif des procédés de fabrication traditionnelle des produits laitiers artisanaux (Tantoui-Elaraki et El Marrakchi, 1987).



Annexe VI

Dendrogramme illustrant les relations phénotypiques de l'ordre « *lactobacillales* » en se basant sur la composition des séquences d'ARNr 16 S « Bergey's manual of systematic bacteriology (2009) »



Annexe VII

Tableau X : résultats de la Galerie API 50

Souches	S14	S2	S29
Sucres			
0	-	-	-
GLY	-	-	-
ERY	-	-	-
DARA	-	-	-
LARA	-	-	-
RIB	-	-	-
DXYL	-	-	-
LXYL	-	-	-
ADO	-	-	-
MDX	-	-	-
GAL	-	-	-
GLU	-	-	+
FRU	-	-	-
MNE	-	-	-
SBE	-	-	-
RHA	-	-	-
DUL	-	-	-
INO	-	-	+
MAN	-	-	+
SOR	-	-	+
MDM	+	-	+
MDG	+	-	+
NAG	+	-	+
AMY	+	-	+
ARB	+	-	+
ESC	+	+	+
SAL	+	-	+
CEL	+	-	+
MAL	+	-	+
LAC	+	-	+
MEL	+	-	+
SAC	+	+	+
TRE	+	+	+
INU	+	+	+
MLZ	+	+	+
RAF	+	+	+
AMD	+	+	+
GLYG	+	+	+
XLT	+	+	+

GEN	+	+	+
TUR	+	+	+
LYX	+	+	+
TAG	+	+	+
DFUC	+	+	+
LFUC	+	+	+
DARL	+	+	+
LARL	+	+	+
GNT	+	+	+
2KG	+	+	+
5KG	+	+	+

Annexe VIII

Tableau XI : Résultats de le microplaque

Sucres Souches	Mannitol	Sorbitol	Fructose	Arabinose	Maltose	Mannose
M17	+	+	-	-	-	-
S1	+	+	-	-	-	-
S3	+	+	+	-	-	-
S4	+	+	-	-	-	-
S5	+	+	-	-	-	-
S6	+	+	-	-	-	-
S7	+	+	-	-	-	-
S8	+	+	-	-	-	-
S10	-	-	-	-	-	-
S11	+	+	+	+	+	+
S12	+	-	-	-	-	-
S13	+	+	+	+	+	+
S20 ₁	-	-	-	-	-	-
S20 ₂	-	-	-	-	-	-
S21	-	-	-	-	-	-
S22	+	+	+	+	+	+
S23	+	+	+	+	+	+
S24 ₁	-	-	-	-	-	-
S24 ₂	-	-	-	-	-	-
S25	+	+	+	+	+	+
S26 ₁	+	+	+	+	+	+
S26 ₂	-	-	-	-	-	-
S28	-	-	-	-	-	-

S31	+	+	+	+	+	+
S32	+	+	+	+	+	+
S34	+	+	+	+	+	+
S35	+	+	+	+	+	+
S36	+	+	+	+	+	+
S43₁	+	+	+	+	+	+
S43₂	+	+	+	+	+	+
S46	-	-	-	-	-	-

Annexe IX

Tableau XII : Mesure du pH des différentes souches

Souches	pH	Souches	Ph	Souches	pH
M17	4,11	S13	4,09	S28	5,01
S1	4,5	S14	4,17	S29	4,10
S2	4,8	S20₁	4,15	S31	5,10
S3	4,8	S20₂	4,54	S32	4,14
S4	4,09	S21	4,35	S34	4,07
S5	4,38	S22	3,5	S35	4,20
S6	4,6	S23	4,03	S36	5,29
S7	4,2	S24₁	5,04	S431	4,22
S8	4,20	S24₂	4,7	S432	4,33
S10	4,06	S25	3,26	S46	4,18
S11	4,1	S26₁	3,97		
S12	4,09	S26₂	4,05		

Annexe X

Tableau XIII : Activité antibactérienne

Souches	Diamètre (cm)	Souches	Diamètre (cm)
M17	0,6		
S1	1,8	S24 ₁	0,9
S2	0,9	S24 ₂	1,1
S3	1,8	S25	0,8
S4	1,1	S26 ₁	0,7
S5	1	S26 ₂	1
S6	1,2	S28	1,5
S7	1	S29	1,6
S8	1,4	S31	2
S10 ₁	1,3	S32	1,1
S11	0,9	S34	1,5
S12	1	S35	1,4
S13	0,7	S36	1
S14	1	S43 ₁	1,1
S20 ₁	1,9	S43 ₂	1,2
S20 ₂	2	S46	1
S21	1,2		

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Microbiologie
Filière : Microbiologie
Spécialité : Microbiologie Alimentaire Santé

Autorisation de dépôt

L'étudiant (e) : BOUDRAHEM Nedjma est autorisé (e) à déposer son mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de master après vérification des corrections apportées suite aux recommandations du jury.

Thème : Isolement et caractérisation des bactéries lactiques du genre *lactobacillus* à partir des produits laitiers traditionnels artisanaux.

Le président du jury

Le chef de département

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Microbiologie
Filière : Microbiologie
Spécialité : Microbiologie Alimentaire Santé

Autorisation de dépôt

L'étudiant (e): BENSIDHOUM Keltoum est autorisé (e) à déposer son mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de master après vérification des corrections apportées suite aux recommandations du jury.

Thème : Isolement et caractérisation des bactéries lactiques du genre *lactobacillus* à partir des produits laitiers traditionnels artisanaux.

Le président du jury

Le chef de département

Résumé

A partir de lait de vache et de chèvre, plusieurs types de produit traditionnel sont issus dans le but de prolonger leur durée de conservation, parmi ces produits : Dhan et Smen qui peuvent être des sources des bactéries lactiques particulièrement les lactobacilles.

Notre étude a conduit à l'isolement et l'identification de 34 souches du genre *Lactobacillus* dont les espèces peuvent être *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrückii subsp bulgaricus*, *Lactobacillus rammnosus*, *Lactobacillus delbrückii subsp delbrückii*, *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus acidophilus*.

Les résultats d'estimation de quelques aptitudes technologiques ainsi que probiotiques indiquent que l'ensemble des souches présentent un bon pouvoir acidifiant et protéolytique, même chose pour l'activité inhibitrice vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, où les zones d'inhibition peuvent atteindre un diamètre de 20mm.

Mots clés : *Lactobacillus*, Activité protéolytique, Smen, Dhan, Souches inhibitrices.

Abstract

From cow's milk and goat's milk, several types of traditional products are produced in the aim of prolonging their shelf life, among these products: Dhan and Smen which can be strain of lactic bacteria especially lactobacilli.

Our study led to the isolation and identification of 34 strains of the genus *Lactobacillus* whose species may be *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrückii subsp bulgaricus*, *Lactobacillus rammnosus*, *Lactobacillus delbrückii subsp delbrückii*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus acidophilus*

The results of estimation of some technological and probiotic ability indicate that all the strains exhibit a good acidifying and proteolytic power, the same thing for the inhibitory activity against *Staphylococcus aureus*, whereas the zones of inhibition may reach a diameter of 20mm.

Keywords : Lactobacilles, Proteolytic activity, Smen, Dhan, inhibitory stem.