



République Algérienne Démocratique et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université de Khemis-Miliana

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la terre

Département de Biologie

Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Option : Analyses Biologiques et Biochimiques

Thème

***Mise en évidence de la production des substances
d'intérêt technologique par quelques bactéries
Lactiques isolées de lait de brebis***

Présenté par : M^{elle} Dhouib Assia

Devant les jury :

Président: Dr. Aoun.O

MCA UDB Khemis Miliana

Promotrice : M^{me}SAADI. F

MAA UDB Khemis Miliana

Examineur : M^{er}.Mahi. M

MAA UDB Khemis Miliana

Examineur : M^{me}.Brahimi.S

MAA UDB Khemis Miliana

Année universitaire : 2016- 2017

Remerciements

*Avant tout nous remercions {Allah} le tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté
La patience, pour faire ce travail.*

*Je tiens à remercier infiniment ma promotrice M^{me} . Saadi Fadhila qui a bien accepté
d'encadrer ce sujet.*

*Mes remerciements vont également aux membres de jury : M^{me} .Brahimi Samira, M^{er} Mahi
Miloud et M^{er} Aoun Omar pour l'honneur qu'ils m'ont fait pour l'évaluation de ce mémoire*

*Je tiens à remercier vivement à tout le personnel de laboratoire de microbiologie de
l'université de khemis Miliana en particulier : Aicha, Afef, Nadjiba*

*En fin Je remercier toutes les personnes qui ont participé de loin ou de près dans la
réalisation de ce travail.*

ASSIA



DEDICACES

Il m'est très difficile de dédier ce travail tant sont nombreux les proches, amies ou famille.

*Cependant, je tiens à commencer par les êtres les plus chères
au monde :*

A ma chère et adorable pour son amour et ses sacrifices ma mère

*A mon père qui m'a beaucoup soutenu, et qui m'a permis de donner le meilleur
de moi*

A ma Sœurs Rawène et les chères petite Nazim et Rayane

Je lui souhaite tout le bonheur durant sa vie.

A mes très chères grands mère(fatma et fatma zahraa).

A mes oncles et mes tantes surtout khali moussa et tata latifa et salima

A tout la famille dhouib et sans oublié la famille maghni

A mes très chères amies : Nadjia Aggoun , Meriem ghol , Rebiha Noura , Amina Mechi

Imene Mesaoudi

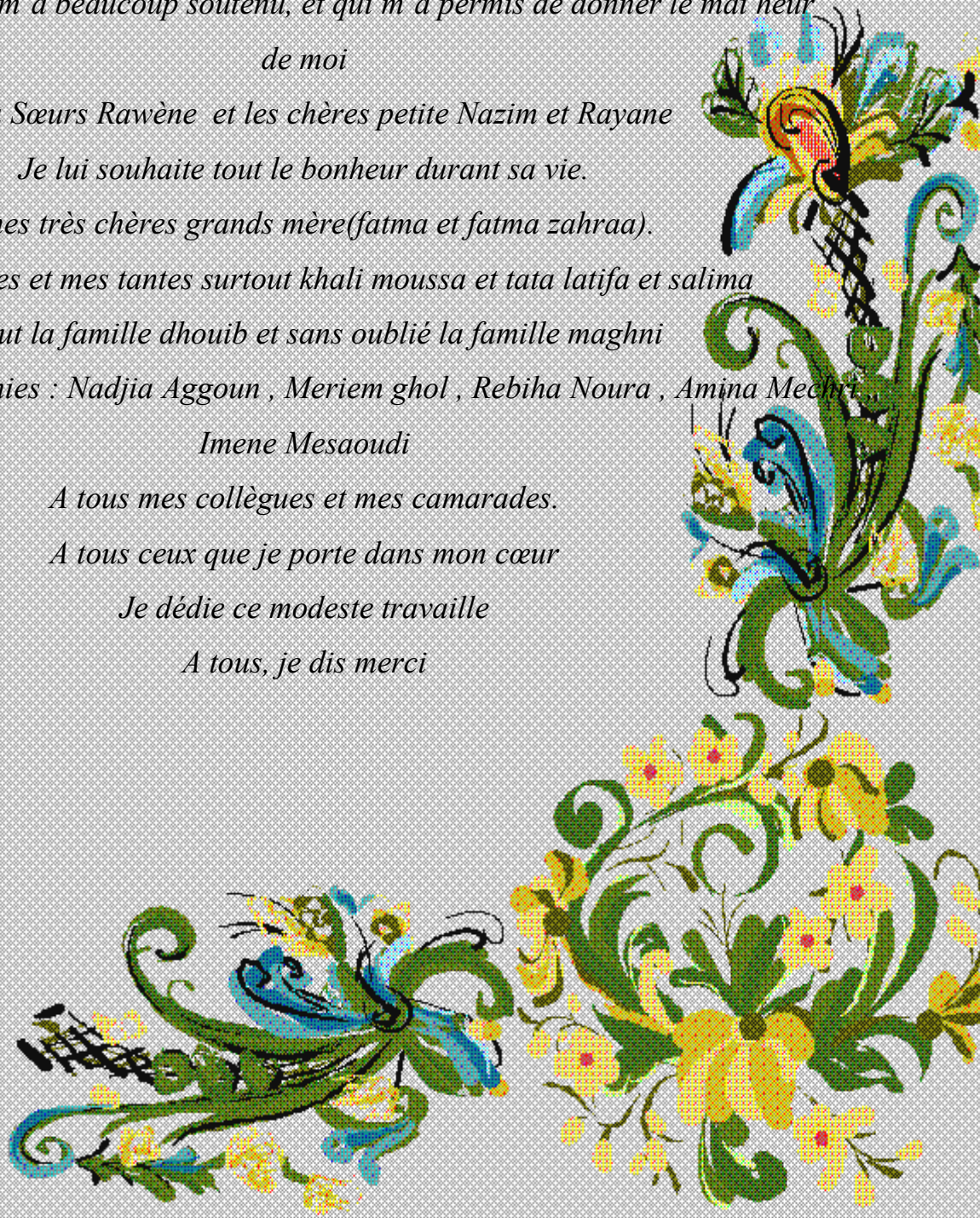
A tous mes collègues et mes camarades.

A tous ceux que je porte dans mon cœur

Je dédie ce modeste travaille

A tous, je dis merci

Assia



Résumé

- Les bactéries lactiques sont utilisées depuis plusieurs siècles comme agents protecteurs dans les aliments fermentés. Ces bactéries ont un rôle dans la préservation des aliments, l'augmentation de la valeur nutritive et l'amélioration de la qualité organoleptique des aliments. Notre étude a porté sur la Mise en évidence de la production des substances d'intérêt technologique par quelques bactéries lactiques isolées de lait de brebis. Parmi onze isolats, nous avons pu identifier huit. Ces derniers possèdent des caractéristiques communes aux bactéries lactiques et sont apparentées à: *Lactobacillus sp*, *Lactococcus sp*, *Streptococcus sp*
- L'ensemble des souches identifiées présentent des capacités plus ou moins importantes dans la production des substances d'intérêt technologique notamment la production d'arôme (acétoïne), les enzymes protéolytiques et l'acide lactique. Ces derniers constituent un facteur essentiel dans les transformations laitières.

Mots clés : bactéries lactiques, lait de brebis, identification, intérêt technologique.

Summary

Lactic acid bacteria have been used for centuries as protective agents in fermented foods. These bacteria have a role in preserving food, increasing the nutritional value and improving the organoleptic quality of foods. Our study has focused on the production of substrates of technological interest by a few lactic bacteria isolated from sheep's milk. Among eleven isolates, we were able to identify eight. The latter have characteristics common to lactic acid bacteria and are related to: *Lactobacillus* sp, *Lactococcus* sp, *Streptococcus* sp.

All the strains identified have varying capacities in the production of molecules of technological interest, in particular the production of aroma (acetoin, CO₂), proteolytic enzymes and lactic acid. The latter are an essential factor in dairy processing.

Key words: lactic acid bacteria, sheep milk, identification, technological interest.

ملخص

تم استخدام بكتيريا حمض اللاكتيك لقرون باعتبارها عوامل وقائية في الأطعمة المخمرة. هذه البكتيريا لها دور في حفظ الأغذية، وزيادة القيمة الغذائية وتحسين جودة الحسية للغذاء. ركزت دراستنا على مظاهر إنتاج جزيئات ذات الاهتمام التكنولوجية من قبل بعض بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من حليب الغنم. بين العازلات أحد عشر، حددنا ثمانية. لديهم الخصائص المشتركة للبكتيريا حمض اللاكتيك والمتعلقة بما يلي: الملية المجنبة، الملية اللعابية الملية اللعابية، الملية المحمضة، *Lactococcus* اللبنيّة، العقديّة الحرية، الملية الحمضية.

مجموعة من السلالات التي تم تحديدها يكون أكثر أو أقل قدرة كبيرة في إنتاج جزيئات ذات الاهتمام التكنولوجية بما في ذلك إنتاج توابل (أستوين، CO₂)، والأنزيمات المحللة للبروتين وحمض اللبنيك. وهي عامل رئيسي في تصنيع الألبان.

كلمات البحث: بكتيريا حمض اللبنيك، حليب الأغنام، وتحديد الفوائد التكنولوجية.

Liste des abréviations

❖ Symboles :

% : pourcentage

°C : Degré Celsius

μm : Micromètre

AC : acidification coagulation

ADH : Arginine Di hydrolase

ARC : acidification réduction coagulation

B : Bactéries

BL : Bactéries lactiques

G : grossissement

H : hydrogène

h : heure

Hétéro : hétérogène

Homo : homogène

Lb : *Lactobacillus*

Lc : *Lactococcus*

Ln : *Leuconostoc*

min : minute

ml : millilitre

pH : potentiel hydrogène

R : résistance

RC : réduction coagulation

S : sensibilité

sp : Espèce non précisé

ssp : Sous espèce

St : *Streptococcus*

T : temps

UFC : Unité formant colonie

V : volume

μl : Microlitre

(B) : souches lactiques issus de lait de brebis

Liste des abréviations

❖ Indices :

Ax : Amoxicilline

CTX : Cefotaxime

CIP : Ciprofloxacine

COT : co-trimaxazole

NIT : nitrofurantoin

FO: fosfomycine,

NA: acide nalidixique,

GEN: gentamicine

AMC: amoxyclav

CFM : cefixime,

CZ : cefazoline,

AK : amikacine

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Composition moyenne en pourcentage des acides gras.....	4
Tableau 2 : Différents genre de bactéries lactiques d'intérêt en microbiologie des aliments et Leurs principales caractéristiques.....	10
Tableau 3 : aspect microscopique des souches.....	26
Tableau 4 : caractères biochimiques et physiologiques des souches étudiées.....	29
Tableau 5 : profil fermentaire des souches étudiées.....	32
Tableau 6 :les résultats de test de résistances aux antibiotiques.....	37

Liste des figures :

Figure 1 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des Hexoses chez les bactéries lactiques.....	8
Figure 2 : Aspect des isolats sur milieu MRS liquide.....	25
Figure 3 : observation macroscopique des colonies sur milieu MRS.....	25
Figure 4 : observations microscopiques des isolats après une coloration de Gram (Gx100).....	27
Figure 5 : Résultat du test de nitrate réductase.....	28
Figure 06 : résultat de différents tests de l'identification.....	30
Figure 7 : exemples de résultats de fermentation des sucres.....	31
Figure 8 : résultat de production d'acétoïne.....	33
Figure 9 : résultat de production de CO ₂ à partir du citrate.....	34
Figure 10 : résultats de l'activité protéolytique	34
Figure 11 : résultats de l'activité lipolytique.....	35
Figure 12 : évolution de l'acidité Dornic en fonction du temps.....	36
Figure 13 : exemple de résultat de résistances de souches aux antibiotiques.....	37

SOMMAIRE

Sommaire

Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
1. Lait de brebis	2
1.1. Définition.....	2
1.2. Propriétés de lait de brebis	2
1.2.1. Propriétés physiques	2
1.2.1.1. Densité	2
1.2.1.2. pH	2
1.2.1.3. viscosité	3
1.2.2. Propriété chimique	3
1.2.2.1. L'eau	3
1.2.2.2. Matière sèche et la matière sèche dégraissée	3
1.2.2.3. Lipides	3
1.2.2.4. Glucides	4
1.2.2.5. Sels minéraux.....	4
1.2.2.6. Protéines	4
1.2.2.7. Vitamines	4
1.3. Caractéristiques microbiologiques	5
1.4. Propriété nutritionnelles du lait de brebis	5
2. Bactéries lactiques	5
2.1. Généralités	5
2.2. Caractéristiques des bactéries lactiques.....	6
2.3. Classification	7
2.4. Voix de fermentation	7

Sommaire

2.4.1. Homofermentation.....	7
2.4.2. Hétéro fermentation	8
2.5. Principaux genres	9
2.5.1. <i>Lactobacillus</i>	9
2.5.2. <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i>	9
2.5.3. <i>Enterococcus</i>	10
2.5.4. <i>Leuconostoc</i>	11
2.6. Besoins nutritionnels.....	11
2.6.1. Glucides	11
2.6.2. L'oxygène.....	11
2.6.3. L'azote.....	11
2.6.4. Vitamines	12
2.6.5. Minéraux	12
2.7. Rôles des bactéries lactiques	12
2.7.1. Rôles technologiques.....	12
2.7.1.1. Bactéries lactiques et fermentations alimentaires	12
2.7.1.2. Bactéries lactiques et conservation des aliments	13
2.7.1.2.1. Propriété inhibitrices	13
2.8. Aptitudes technologiques	13
2.8.1. Activité acidifiante	13
2.8.2. Activité protéolytique	14
2.8.3. Activité lipolytique	14
2.8.4. Aptitude aromatisante.....	14

Chapitre I : Matériels et méthodes

1. Matériel	16
1.1. Source des souches lactiques.....	16
1.2. Milieux de culture et Réactifs.....	16
2. Méthodes.....	17

Sommaire

2.1 Repiquage et revivification des souches lactiques.....	17
2.2. Préparation de l'inoculum.....	17
2.3. Identification des bactéries lactiques.....	17
2.3.1. Caractères morphologiques.....	17
2.3.2. Caractères biochimiques	18
2.3.2.1. Test de catalase.....	18
2.3.2.2. Test oxydase	18
2.3.2.3. Nitrate réductase	19
2.3.2.4. Croissance à différentes températures.....	19
2.3.2.5. Recherche de type fermentaire.....	20
2.3.2.6. Utilisation du citrate	20
2.3.2.7. Recherche de l'arginine di hydrolase (ADH)	20
2.3.2.8. Culture sur milieu hyper salé	20
2.3.2.9. Fermentation des sucres.....	21
2.3.2.10. Culture sur lait de Sherman.....	21
2.3.2.11. Culture sur lait tournesolé	21
2.3.2.12. Thermo résistance.....	22
2.3.2.13. Résistance au tellurite.....	22
2.3.2.14. Dégradation de gélatine.....	22
2.4. Mise en évidence de la production de molécules d'intérêt technologique.....	22
2.4.1. Production de CO ₂ à partir du citrate	22
2.4.2. Production d'acétoïne	23
2.4.3. Enzymes protéolytiques.....	23
2.4.4. Enzymes lipolytiques (lipase et lecithinase).....	23
2.4.5. Acide lactique.....	24
2.5. Résistance aux antibiotiques.....	24

Sommaire

Chapitre II : Résultats et discussions

1. Aspects des isolats.....	25
2. Caractères physiologiques et biochimiques.....	28
3. Mise en évidence de la production de molécules d'intérêt technologique.....	32
3.1. Production d'acétoine.....	33
3.2. Production de CO ₂ à partir du citrate.....	33
3.3. Enzymes protéolytiques.....	34
3.4. Enzymes lipolytiques.....	34
3.5. Acide lactique	35
4. Résistance aux antibiotiques.....	36

Conclusion

Référence bibliographique

Annexes

INTRODUCTION

Introduction

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées. Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone et, à un moindre degré, de dégrader les protéines et les lipides mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exopolysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés **(Mozzi et al., 2010)**.

Des efforts considérables ont été consacrés au cours de ces cinquante dernières années pour affermir la compréhension de la physiologie, de la biochimie et de la génétique des bactéries lactiques **(Collins et al., 1989; Berthier et Erlich., 1999; Bolotin et al., 2001; Bourel et al., 2001; Axelsson, 2004; Marroki et al., 2010 ; Djadouni et Kihal, 2012)**.

Toutes ces recherches ont permis aux microbiologistes et aux industriels de choisir les meilleures souches et d'améliorer le rendement de la productivité, la qualité, et la sécurité des produits finis.

La caractérisation des bactéries lactiques a favorisée le développement de souches bactériennes définies, connues sous le nom de levains ou de culture starter. Elles remplacent de plus en plus les mélanges non définis traditionnellement employées en industrie laitière **(Crow et al., 1993, Desmazeaud et Cogan, 1996 et Fitzsimmons et al., 1999)**. Actuellement, la production de ferments lactiques s'est développée au sein d'usines spécialisées, à partir de souches bactériennes isolées et sélectionnées **(Beal et al., 2008)**.

Dans ce même ordre d'idée, nous avons jugé utile de poursuivre la recherche dans ce domaine, de bactéries lactiques, et d'apporter ainsi un modeste travail dont l'objectif s'inscrit tout d'abord à étudier les principaux caractères biochimiques et physiologiques de quelques bactéries lactiques isolées à partir du lait de brebis et ensuite caractériser quelques substance d'intérêt technologique pour des utilisations ultérieures.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

LAIT DE BREBIS

Chapitre I : Revue bibliographique

1. Lait de brebis

1.1. Définition

Selon la définition établie par le congrès international pour la répression des fraudes alimentaires tenu à Genève, en 1908, définit le lait comme étant le produit intégrale de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir du colostrum (**Debry,2006**).

Le lait de brebis se distingue du lait de vache et de chèvre par des traits caractéristiques liés à ses particularités physiques et chimiques (**Assenat, 1985**):

- ✓ IL est de couleur blanc nacré ou porcelaine.
- ✓ Présente une opacité blanche plus marquée que celle des laits de vache et de chèvre.
- ✓ Sa viscosité est plus élevée que celle du lait de vache.
- ✓ Riche en composants fromagers.
- ✓ Donne un caillé très ferme.
- ✓ Son acidité fonctionnelle est de 18° à 22° Dronic.

1.2.Propriétés de lait de brebis

1.2.1.Propriétés physiques

1.2.1.1. Densité

La densité moyenne du lait de brebis, à la température de 20°C se situe à 1.036, elle varie avec la période de lactation : 1.035 à 1.036 au début de lactation, lorsque le lait est moins riche, 1.036 à 1.038 pendant la période médiane et 1.034 à 1.035 en fin de période de lactation lorsque le lait est très riche en matière grasse (**Luquet, 1985**).

1.2.1.2. pH

Le pH d'un lait normal varie entre 6.6 et 6.8 ; on considère comme anormales les valeurs de pH inférieur à 6.5 et supérieure à 6.9. Dès sa sortie du pis, le lait démontre une certaine acidité. Cette acidité est due principalement à la présence de protéines, surtout les caséines et la lactalbumine, de substances minérales telles que les phosphates et le CO₂ ; et

d'acides organiques, le plus souvent l'acide citrique. On l'appelle l'acidité apparente ou acidité naturelle du lait. Elle varie entre 0.13 et 0.17 % d'équivalent d'acide lactique (Vignola, 2003).

Le pH du lait de brebis frais est sensiblement le même que celui de lait de vache. Sa valeur moyenne est de l'ordre de 6.65, son amplitude de variation est assez faible, les écarts maximaux observés ont été de 6.60 à 6.68 (Luquet, 1985).

1.2.1.3. viscosité

La viscosité s'exprime usuellement en centpoise, 1poise=1dyne/cm², la matière grasse et les macromolécules protéiques en sont responsables. La viscosité du lait limite la montée des Globules gras. Elle diminue de moitié à 20°C, de deux tiers à 40°C, par rapport à la viscosité à 0°C, et augmente lorsque le pH est inférieur à 6 (Matieu, 1997).

1.2.2. Propriété chimiques

1.2.2.1. L'eau

Le lait de brebis contient en moyenne 82 % d'eau qui est le constituant le plus important parce qu'elle donne au lait sa forme liquide d'une part et d'autre part, elle joue un rôle important dans le développement bactérien (Lagriffoul et al., 2008)

1.2.2.2. Matière sèche et la matière sèche dégraissée

L'ensemble des composants du lait à l'exception de l'eau et du gaz dissous constitue la matière sèche totale. Un litre de lait de brebis en contient 125 à 130 g. la matière sèche dégraissée est la différence entre la matière sèche totale et la matière grasse (Matieu, 1988).

1.2.2.3. Lipides

La matière grasse est le constituant du lait de brebis qui subit les grandes amplitudes de variation (Luquet, 1985). La proportion plus élevée d'acides gras à chaîne courte tels que caproïque, caprylique et caprique dans le lait de brebis que dans le lait de vache donne au lait de brebis son goût et l'arôme spécial, bien que certains composés tels que les phospholipides et les phénols ont un rôle important (Assenant, 1985) (tableau 1).

Tableau 1 :Composition moyenne en pourcentage des acides gras (FAO,1998)

Acides gras	Brebis (%)
C4 :0 (butyrique)	4.0
C6 :0 (caproïque)	2.6
C8 :0 (caprylique)	2.5
C10 :0 (caprique)	7.5
C12 :0 (laurique)	3.7
C14 :0 (Myristique)	11.9
C16 :0 (Palmitique)	25.2
C16 :0 (Palmitoleïque)	2.2
C18 :0 (Stéarique)	12.6
C18 :1 (Oléïque)	20.0
C18 :2 (Linoléïque)	2.1

1.2.2.4. Glucides

Les glucides sont essentiellement représentés dans le lait par le lactose environ 50 g/l, la proportion des autres glucides étant toujours très faible (**Gérard,2001**).

1.2.2.5.Sels minéraux

Les minéraux sont présents, soit en solution dans la fraction soluble, soit sous forme liée dans la fraction insoluble (ou colloïdale). La composition moyenne en (%), du lait de brebis en sels minéraux est 0.9 (**Jeunesse,1986**).

1.2.2.6. Protéines

Les protéines sont totales du lait de brebis dont la valeur moyenne varie de 3.45 à 8.05% avec une valeur moyenne de 5.75 % (**Azzouz,2006**).

1.2.2.7. Vitamines

On distingue d'une part les Vitamines hydrosolubles (Vitamine du groupe B et vitamine C) en quantité constante, et d'autre part les vitamines liposolubles (A, D, E et K) (**Jeantet et al., 2008**). Le lait de brebis contient, en concentration relativement élevée, une grande variété de vitamines (**Gérard,2001**).

1.3. Caractéristiques microbiologiques

Le lait contient des micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions, (moins de 5000 germes par ml et moins de un coliforme par ml). Il s'agit essentiellement des germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques, streptocoques lactiques et lactobacilles. D'autres micro-organismes se trouvent 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'un agent de mammite due à des infections par staphylocoques (*Staphylococcus aureus*), streptocoques (*Streptococcus galactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*), *E. coli*, *Corynebacterium bovis* ou *pyogenes*, *Mycoplasma*, *Nocardia asteroides* (Larpen, 1997).

1.4. Propriétés nutritionnelles du lait de brebis

Les particules de gras de lait de brebis sont plus fines donc plus digeste que le lait de vache et plus riche en protéines que le lait des autres (FAO, 1998).

Le lait de brebis est un excellent aliment, assurant un rapport azoté équilibré en acides aminés indispensables ainsi qu'en sels minéraux tels que le calcium, le phosphore et le zinc et les vitamines du groupe B. Les protéines du lait de brebis sont très digestibles, sa matière grasse est une source énergétique importante, apportant des acides gras à courtes chaînes assimilés ; en revanche, elle est pauvre en acide insaturé (linoléique et arachidonique). Pour le cas du cholestérol, on note une faible quantité (Mills, 1989).

2. Bactéries lactiques

2.1. Généralités

Les bactéries lactiques constituent l'un des groupes incontournables de la microbiologie alimentaire (Dridier et Prevost, 2009). Comme depuis longtemps pour leur capacité de fermentation lactique associée à de nombreux aliments fermentés (yaourts, saucisson, choucroute...), leur participation à l'acquisition des propriétés nutritionnelles ou de la qualité sanitaire de l'aliment est plus récemment utilisée.

Elles sont à ce titre généralement classées dans les flores technologiques, ce qui ne doit cependant pas occulter leur implication dans les phénomènes d'altérations de certaines catégories de denrées alimentaires.

Les bactéries lactiques regroupent des bactéries à coloration de gram positive, généralement immobiles, asporulées, dépourvues de catalase et de cytochromes oxydases. Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XX^{ème} siècle, elles constituent un groupe Hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique (**Orla-Jensen, 1924**). Réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Novel, 1993**).

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes ubiquitaires qui se retrouvent dans différents types d'habitat (**Dellaglio et al., 1994; Matamoros, 2008**). Ce sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (**De Roissart, 1986**). Elles jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers (**Raynaud, 2006**). Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (**Stiles et al., 1997**), ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (**Generally Recognized As Safe**).

2.2. Caractéristiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries possédant une réponse positive à la coloration de Gram, immobiles, asporulées, au point de vue enzymatique catalase et oxydase et nitrate réductase négative, anaérobies ou aéro-tolérantes (**Laurent et al., 1998**). Les bactéries lactiques sont des formes différentes des cocci ou des bâtonnets (**Bourgeois et Larpent, 1996**). Elles ont des besoins complexes en facteur de croissance : vitamine B, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques. Elles se caractérisent par un métabolisme exclusivement fermentaire qui les conduit à produire à partir du glucose des quantités importantes d'acide lactique, accompagné dans certains cas d'autres métabolites (éthanol, CO₂, autres acides organiques). Elles ont une capacité de biosynthèse faible et formes différentes (**Luquet, 1986**).

2.3. Classification

La première classification des bactéries lactiques basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques a été établie en **1919 par Orla-Jensen**. Les marqueurs chimio-taxonomiques tels que les compositions des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été aussi utilisés pour la classification (**Krieg, 2001**).

Les nouvelles techniques pour l'identification et la classification des bactéries lactiques remettent couramment en cause et/ou complètent les approches phénotypiques anciennement utilisées (**Garrity et al., 2008**), qui sont pour identifier les espèces à l'intérieur des genres (**Vandamme, 1996; Stiles et Holzopfel, 1997; Ho et al., 2007**).

Une autre classification, basée sur les différents modèles de fermentation du glucose définit 3 groupes (**McLeod et al., 2008**) :

Le groupe I renferme les bactéries réalisant exclusivement homofermentation. Ce groupe comporte majoritairement des *Lactobacillus* ;

Le groupe II inclut les bactéries réalisant l'hétérofermentation et regroupe les *Leuconostoc*, Les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* ;

Le groupe III regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce groupe présente une position intermédiaire entre le groupe I et II réalisant ainsi l'homofermentation ou l'hétérofermentation selon les conditions environnementales.

2.4. Voix de fermentation

2.4.1. Homofermentation

Les bactéries lactiques entrent dans la glycolyse pour dégrader les hexoses (glucose) qui subit une différente étape de transformation pour donner le pyruvate qui est réduit en acide lactique qui est le produit unique (figure 1). Dans les conditions défavorables ces bactéries produisent également l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol et/ou le CO₂ par la voie de fermentation des acides mixtes (**Mozzi et al., 2010**).

2.4.2. Hétéro fermentation

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acidelactique, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaire. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les Leuconostoc et certains lactobacilles. Ces micro-organismes sont dépourvus d'une FBA et le système de transport PTS (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

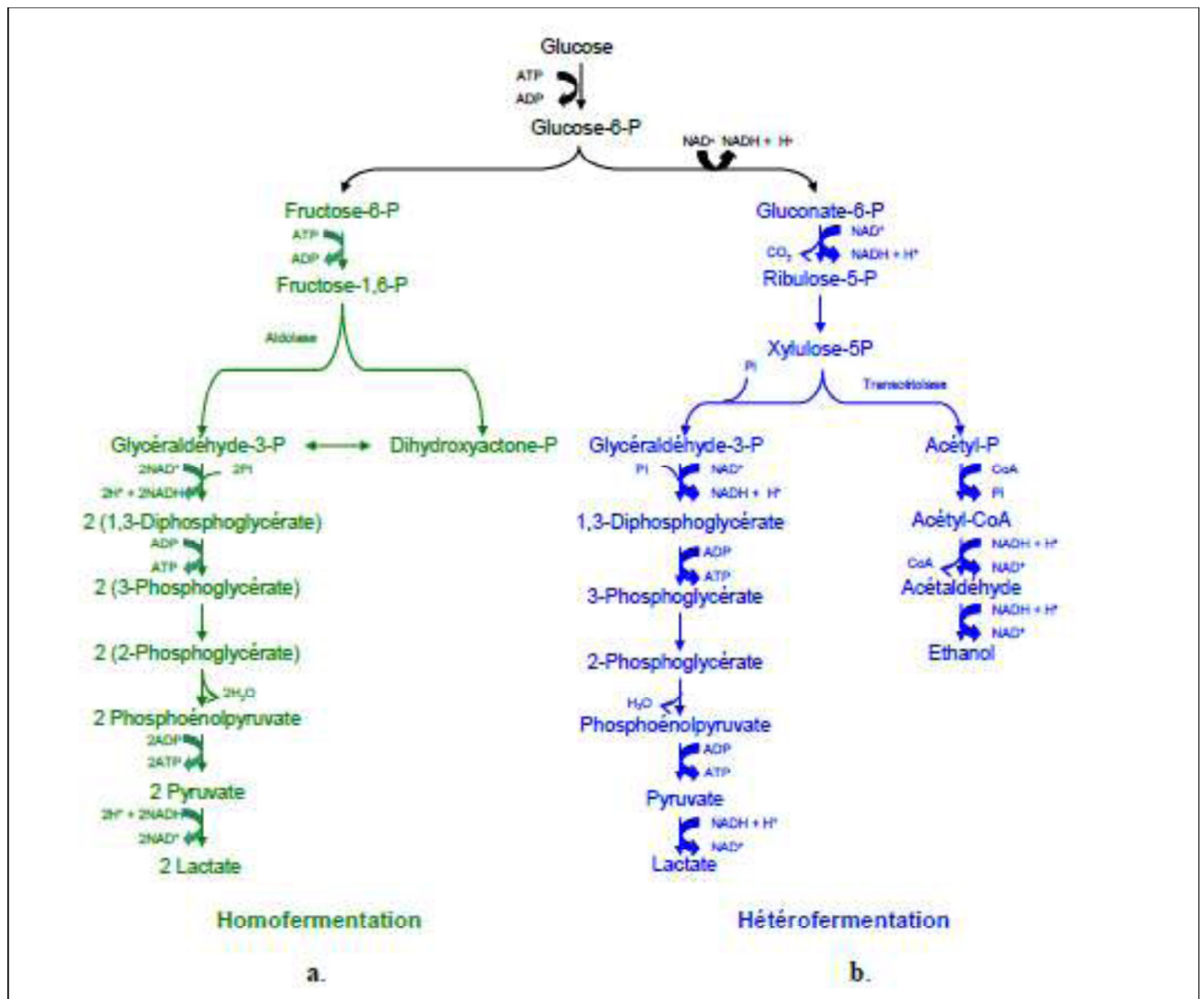


Figure1 :Représentation schématique des principales voies de fermentation des Hexoses chez les bactéries lactiques(Makhloufi, 2011).

ATP : adénosine triphosphate.

ADP : adénosine di phosphate

NAD+ / NADH, H+ : Couple oxydant/ réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide.

Pi : phosphate inorganique).

2.5. Principaux genres

2.5.1. *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* appartient à la famille des Lactobacillaceae elle-même classée dans l'ordre des lactobacillales. Les lactobacilles sont très hétérogènes et les diverses espèces qui constituent ce groupe présentent des caractères phénotypique et génotypique variés. Cette variété se reflète dans le pourcentage de G⁺ qui peut aller de 32 à 53%, le spectre le plus large des bactéries lactiques. Il s'agit de bacilles souvent allongés, allant de 0.5-1.2 à 1-10µm mais sous certaines conditions de croissance elles peuvent prendre une forme de coccobacilles, qui forment fréquemment des chaînes. Généralement immobiles, non sporulés, micro-aérophiles ou anaérobies (**Gomes et Malacta, 1999**).

Leur croissance est optimale pour une température de 30 à 40°C et à un pH de 5.5-5.8, cependant d'une manière générale, elles peuvent développer à un pH inférieur à 5.0 et sur une gamme de température allant de 5-53°C (**Hofvendhal et Hahn-Hagrerdal, 2000**). Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique. Certains espèces sont homolactique, d'autres hétérolactique produisant des acides volatiles, De l'éthanol et du CO₂ en plus de l'acide lactique.

2.5.2. *Lactococcus* et *Streptococcus*

Ils rassemblent des coques homofermentaires, produisant en majorité de l'acide L-lactique.

Le genre *Lactococcus* (streptocoques du groupe N) représente les streptocoques dits lactiques, car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Ils sont mésophiles, se développent à 10°C et non à 45 °C. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers.

Le genre *Streptococcus* ils sont très fréquents dans l'industrie alimentaire comme contaminant et surtout comme agents de fermentation homolactique (avec production d'acide lactique de type dextrogyre). Ils sont très exigeants sur le plan nutritionnel et se développent bien à 37°C. Parmi le genre *Streptococcus*, le groupe viridans comprend les agents d'acidification fréquents dans certains fromages et yaourts comme le cas de l'espèce *Sc. thermophilus* (**Skinnel et Quesnel, 1978**) (tableau 2).

Tableau 2 : Différents genre de bactéries lactiques d'intérêt en microbiologie des aliments et leurs principales caractéristiques (Federighi, 2005).

Genre	Morphologie	Fermentation	Caractéristiques principales	Habitats principaux
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homo ou Hétéro	Thermophiles ou mésophiles	Homme, produits laitiers, carnés, végétaux
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétéro	Psychrophiles, peu acidophiles	Produits carnés, poissons, produits laitiers
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homo	Mésophiles croissance à 10°C et non 45 °C	Produits laitiers, végétaux
<i>S.thermophilus</i>	Coques	Homo	Thermophiles	Produits laitiers
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homo	Mésophiles croissance à 45 °C et non 10 °C Thermorésistante	Intestin de l'homme et des animaux, produits laitiers
<i>Pediococcus</i>	Coques en tétrades	Homo	Mésophiles, holophiles	Bière, produits végétaux saucissons
<i>Tetragenococcus</i>	Coques en tétrades	Homo	Mésophiles	Saumures
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétéro	Mésophiles	Produits végétaux produits laitiers
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétéro	Mésophiles	Vin

Homo : Homofermentaire, Hétéro : Hétérofermentaire

2.5.3. *Enterococcus*

Ils rassemblent la plupart des espèces du groupe sérologique D et comprend notamment les espèces anciennement désignées sous le terme streptococcus fécaux, comme

Enterococcus faecalis et *Enterococcus faecium*. Ce sont également des coques homofermentaires qui se caractérisent par leur développement à 10 et 45°C, leur aptitude à croître en présence de 6.5 % de NaCl et pH 9.6 (**Giraffa,2003**).

2.5.4. Leuconostoc

Les *Leuconostoc* sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel. Ils se développent entre 20 et 30°C pas à 45°C. Ils sont généralement capsulés cette propriété entraîne fréquemment l'apparition d'une viscosité dans le milieu. Leur fermentation hétérolactique donne de l'acide L-lactique. Ce sont des contaminants fréquents qui produisent des accidents de fabrication dans les produits acides et sucrés (pique lactique gazogène, viscosité, filage) ou les végétaux (produit de vie gamme). Ils sont responsables de la fermentation malo-lactique des vins (*L. oenos*). Ils sont utiles dans certains fromages (bleu) ou ils facilitent l'ouverture par la production de CO₂ (**Guiraud, 1998**) (tableau 2).

2.6. Besoins nutritionnels

2.6.1. Glucides

Pour croître, les bactéries lactiques ont besoin d'un apport de nutriments comportant au moins un sucre fermentescible comme source d'énergie (**Monnet et Gripon, 1994**). Deux types de métabolismes fermentaires sont rencontrés (métabolisme homofermentaire et l'autre)(**Renouf,2006**).

2.6.2. L'oxygène

Les bactéries lactiques sont communément appelées microaérophiles. Ainsi, elles tolèrent de petites quantités d'oxygène, mais de trop grandes teneurs en ce gaz peuvent leur être néfaste. La relation des bactéries lactiques avec l'oxygène a probablement un lien avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit dans la cellule en présence d'air (**Vignola,2002**).

2.6.3. L'azote

Les bactéries lactiques exigent aussi l'apport exogène d'acides aminés pour leur croissance car elles sont incapable, pour la plupart, d'en effectuer la synthèse à partir d'une

source azotée plus simple (**Desmazaud, 1983**). Leur nutrition azotée exige donc l'hydrolyse des grandes protéines du lait, et notamment les caséines, par des enzymes (les protéases) situées dans la paroi extérieure de la cellule (**Desmazaud,1998**).

2.6.4. Vitamines

Les vitamines jouent un rôle irremplaçable de coenzyme. Les bactéries lactiques sont, à quelques exceptions près, incapables de synthétiser des vitamines (**Desmazaud et De Roissart,1994**).

2.6.5. Minéraux

La nécessité des ions dans le métabolisme s'explique d'abord par leur fonction de cofacteur pour de nombreuses enzymes (**Novel,1993**). Du point de vue transport, le fer est un élément important puisqu'il a des affinités pour un grand nombre de molécules chélatrices. Il augmente la croissance et la production d'acide lactique pour les lactocoques et une carence en cet élément donne lieu à une diminution de ce même acide (**Boyaval,1989**).

2.7. Rôles des bactéries lactiques

2.7.1. Rôles technologiques

2.7.1.1.Bactéries lactiques et fermentations alimentaires

*** Produits laitiers :**

Il s'agit du domaine d'application le plus courant des fermentations lactiques, du fait de la contamination fréquente du lait par les bactéries lactiques et de leur capacité à utiliser le lactose. Les ferments lactiques naturels ou commerciaux interviennent dans l'élaboration de tous les produits laitiers fermentés (**Federighi, 2005**).

*** Panification :**

La composition de la pâte et les conditions d'anaérobiose conviennent bien à ces bactéries lactiques qui se caractérisent notamment par leur utilisation du maltose (**Vogel,2002**).

*** Produit carnés :**

Les bactéries lactiques interviennent comme agents de fermentation dans la préparation des viandes salées, épicées et ne subissant aucun traitement thermique d'assainissement, comme les saucissons (**Montel, 1998**).

*** Vinification et cidrerie :**

Les bactéries lactiques interviennent dans la fermentation malo-lactique qui provoque la transformation de l'acide malique en acide lactique et CO₂ (**Detreure,1996**).

*** Produit végétaux :**

Les bactéries lactiques interviennent dans la préparation de nombreux produits végétaux fermentés. L'exemple le plus connu est la choucroute, obtenue par fermentation lactiques de lanière de chou en présence de sel (**Leclair,1996**).

2.7.1.2. Bactéries lactiques et conservation des aliments :**2.7.1.2.1. Propriété inhibitrices*****Production d'acide :**

Le métabolisme principal des bactéries lactiques a pour effet une production importante d'acide lactique conduisant à une acidification rapide et durable. Le pH final dépend de la Matière première fermentée et des souches utilisées (**Hiu,1984**).

*** Production de bactériocines :**

Ce sont des peptides synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactiques, qui possèdent une activité antimicrobienne. La production de bactériocines est une propriété très courante chez les bactéries lactiques utilisées comme ferments ou présentes naturellement dans les aliments. La nisine est l'une des premières bactériocines caractérisée et de la plus étudiée (**Klaenhammer,1993**).

*** Production d'autres substances inhibitrices :**

Le peroxyde d'hydrogène ou les dérivés de l'oxygène produits par les bactéries lactiques peuvent exercer un effet inhibiteur sur certaines flores d'altération (**Piard et Desmazeaud, 1992**).

2.8. Aptitudes technologiques**2.8.1. Activité acidifiante**

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques. Dans la fabrication des produits fermentés, les bactéries lactiques provenant des matières premières

ou de l'environnement sont responsables de la production d'acide lactique résultant de l'utilisation des hydrates de carbone et, par conséquent, de la chute du pH. Cette acidification provoque la coagulation des protéines et induit ainsi la fermentation. En outre, l'accumulation des acides organiques produits inhibe la croissance des bactéries pathogènes et celle de la flore d'altération (Nguyethu,2008).

2.8.2. Activité protéolytique

La protéolyse joue un rôle clé dans plusieurs processus biologiques chez les bactéries lactiques : nutrition azotée, activation de protéines et dégradation de protéines, la machinerie protéolytique des bactéries lactiques est constituée d'un ensemble d'enzyme qui diffèrent par leur mécanisme catalytique, leur spécificité d'hydrolyse, leur localisation cellulaire et leur rôle. Les bactéries lactiques possèdent un système protéolytique complexe qui assure leur croissance dans des milieux à faibles concentrations en acides aminés libres et oligopeptides comme le lait (Kawai et al., 1999 ; Vasiljevic et al., 2005).

2.8.3. Activité lipolytique

La lipolyse a été largement étudiée dans le domaine alimentaire. Elle joue un rôle important dans la formation des substances aromatiques des produits transformés tels les jambons secs et les saucissons secs. L'addition des lipases exogènes augmente significativement et rapidement la concentration en acides gras libres des produits fermentés (Nguyet,2008).

Les bactéries lactiques possèdent des enzymes lipolytiques capables d'hydrolyser une multitude d'esters d'acides gras, des substrats de tri-, di et mono acylglycérols (Liu et al.,2001).

2.8.4. Aptitude aromatisante

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l' α -acétolactate , l'acétaldéhyde , le diacétyle , l'acétoïne et 2,3-butanediol , l'éthanol , l'acétate , le formiate.....etc) principalement à partir du lactose , du citrate ,des

acides aminés et des matières grasses . Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (**Bourgeois, 1996**).

PARTE PRATIQUE

CHAPITRE I

/// MATÉRIEL ET MÉTHODE ///

Chapitre I : Matériel et méthodes

L'intégralité de ce travail a été réalisée au laboratoire de microbiologie, département de biologie à l'université de Khemis Miliana depuis le mois de Janvier jusqu'au mois de Mai de l'année 2017.

Notre objectif consiste d'abord à étudier les principaux caractères biochimiques et physiologiques de quelques bactéries lactiques isolées à partir du lait de brebis et ensuite caractériser quelques molécules d'intérêt technologique pour des utilisations ultérieures.

1. Matériel**1.1. Source des souches lactiques**

Les souches utilisées dans notre étude sont des souches lactiques déjà isolées et purifiées, qui proviennent de la collection de laboratoire de microbiologie de l'université de Khemis Miliana, et qui sont à l'origine de lait cru de brebis. Les différents échantillons du lait ont été collectés au niveau des fermes d'élevage situées dans la région de Bir Oued Khelifa, Ain Defla.

Onze souches lactiques désignées par B ont fait l'objet de ce travail

1.2. Milieux de culture et Réactifs

Les produits utilisés au cours de cette étude sont :

- **milieu MRS** (Man Rogosa Sharpe) : pour la recherche des bactéries lactiques.
- Bouillon nitraté** : le test de la réductase de nitrate en nitrites.
- Milieux citrate de Simmons** : l'utilisation de citrate.
- Bouillon Moeller à arginine (ADH)** : la recherche de l'arginine déshydrogénase.
- Bouillon fermentaire sans sucre** : Test de fermentation des sucres.
- Lait écrémé stérile** : Le test de production d'acétoïne.
- Lait tournesolé** : Test réductase.
- Lait de Sherman à 0.1% et à 0.3% de bleu de méthylène** : la réduction de bleu de méthylène.
- Gélose au tellurite** : pour étudier la résistance des bactéries au tellurite
- Tween 80** : pour étudier l'activité lipolytique
- Gélose au lait** : pour étudier l'activité protéolytique.

- Gélose au jeune d'œuf** : le test de lécithinase.
- Milieu à base de Gélatine** : Dégradation de gélatine.
- **colorants de Gram** : Violet de Gentiane, Lugol, fuchsine, éthanol
- réactif de Vogues Proskauer (VPI et VPII), Nitrate réductase (NR1 et NR2), zinc, l'eau Oxygénée (H₂O₂), oxydase.

2. Méthodes

2.1 Repiquage et revivification des souches lactiques

Les bactéries lactiques utilisées sont sous forme congelées en culture pure à -18⁰C. Elles sont activées et maintenues par un repiquage avec 1ml d'inoculum dans 10ml de milieu de croissance MRS et incubées à 30⁰C pendant 72 heures. Avant leur utilisation, un examen microscopique est nécessaire pour identifier les bactéries et contrôler leurs états de développement.

2.2. Préparation de l'inoculum

Dans un tube à essai contenant 9 ml de bouillon de croissance MRS, 1 ml de la culture pure est ajouté à l'aide d'une pipette stérile. Le bouillon est préalablement chauffé à 30⁰C. Une agitation est nécessaire pour rendre parfaitement homogène le mélange. L'incubation se fait dans une étuve à 30⁰C pendant 24 heures. L'inoculum est prêt à être utilisé pour les différentes expérimentations.

2.3. Identification des bactéries lactiques

2.3.1. Caractères morphologiques

* Aspect macroscopiques des colonies

La détermination des caractères macroscopiques, se fait à l'œil nu. Les souches ont été cultivées sur le milieu gélosé MRS nous permet de renseigner sur la couleur, la forme, la taille, l'aspect, la consistance, l'opacité et l'odeur.

*Aspect microscopique des bactéries (coloration de Gram)

La coloration de Gram est la première étape de l'identification, Avant de commencer la coloration, un frottis doit être préparé comme suit :

- ✓ Déposer sur une lame propre une goutte d'eau physiologique stérile.
- ✓ Prélever un fragment de colonie à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée.
- ✓ Dissocier soigneusement l'inoculum dans la goutte d'eau, puis sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme du bec benzène sans trop chauffer (**Leyral et Joffin, 2001**).

Une fois refroidi, on entame la coloration de Gram :

- ✓ Recouvrir la lame de violet de Gentiane et laisser agir 1 minute.
- ✓ Rincer rapidement à l'eau du robinet et éliminer l'excès d'eau.
- ✓ Recouvrir la lame de lugol et laisser agir 30 secondes.
- ✓ Rincer rapidement à l'eau du robinet et éliminer l'excès d'eau.
- ✓ Recouvrir la lame de l'alcool à 95° pendant 10 secondes.
- ✓ Rincer rapidement à l'eau du robinet et recouvrir la lame de fushine pendant 1 minute.
- ✓ Rincer rapidement à l'eau du robinet.
- ✓ Sécher puis observer au microscope (objectif x100 à immersion).

Lecture :

- Certaines bactéries présentent dans la préparation une **couleur violet** sont les bactéries à Gram positif.
- D'autres, présentent une **couleur rose** sont les bactéries à Gram négatif

2.3.2. Caractères biochimiques

2.3.2.1. Test de catalase

Cette activité a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par **Prescott et al., (2003)**. La Catalase consiste à mettre sur une colonie prélevée du milieu MRS gélosé à l'aide d'une pipette pasteur, quelques gouttes d'eau oxygénée à 10 % (**Guiraud et al., 2003**).

Lecture :

- le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il ya a production de l'enzyme catalase et que le Test est positif.
- l'absence de bulles de gaz signifie que le test est négatif.

2.3.2.2. Test oxydase

L'activité oxydase a été déterminée selon le protocole décrit par **Kovacs et al., (1995)**. Une colonie pure prise de chaque milieu gélosé est mise sur papier Wattman imprégné de réactif Oxydase. Les bactéries produisant l'enzyme oxydase oxydent ce réactif pour former un

Composé violet, l'indophénol ; la suspension devient alors violette après 20 à 60 secondes et la couleur persiste pendant 15 minutes environ (**Delarras, 2007**).

Lecture :

- le développement d'une couleur bleue signifie que le test est positif ce qui signifie que l'isolat possède l'enzyme oxydase.
- Si la couleur ne change pas, le test est négatif.

2.3.2.3. Nitrate réductase

Ce test se fait par ensemencement de bouillon nitraté et incubation à 30°C pendant 24h. Ajouter quelques gouttes de réactifs NR1 et NR2 pour la détermination de la capacité des bactéries à réduire les nitrates en nitrites.

Lecture :

- l'apparition d'une couleur rouge indique la présence de nitrate réductase.
- Absence de coloration, ajoute le zinc
- Réaction positive : absence de coloration
- Réaction négative : apparition en 5min d'une coloration rose ou rouge

2.3.2.4. Croissance à différentes températures

Elle a été testée par ensemencement d'une culture jeune de 24h dans le bouillon MRS. Les tubes étaient incubés à 10°C et à 45 pendant 24h /48. Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. aussi, pour différencier les lactobacilles des Carnobactéries qui sont incapables de croître à 45°C (**Carr et al., 2002 ; Badis et al., 2003**).

Lecture :

Le développement des souches est apprécié après 24 à 48 h par comparaison avec un tube de milieu non ensemencé, incubé à la même température (appréciation visuelle de la turbidité) (**Guiraud, 2003 ; Bjorkroth et al., 1998**).

2.3.2.5. Recherche de type fermentaire

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé. Il consiste à mettre en évidence la formation de gaz (CO₂). Chaque souche jeune de 18-24h était cultivée dans le bouillon MRS modifié (sans citrate d'ammonium et l'extrait de viande) additionné de glucose et muni d'une cloche de Durham. L'incubation se fait à 30°C pendant 24h à 7 jours.

Lecture : la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (Harrigan et Mc-Cancel, 1976; Gravie,1984; Schillinguer et Lucke,1987).

2.3.2.6. Utilisation du citrate

Elle est testée par culture sur milieu gélosé incliné de KMK (Kempeler et McKay,1980). Le citrate est la seule source de carbone : son utilisation se traduit par une alcalinisation du milieu. L'ensemencement se fait par stries à partir d'un milieu solide et incubé durant 24h à 30°C (Guiraud, 1998).

Lecture :La dégradation de citrate se traduit par un virage du milieu du vert au bleu.

2.3.2.7. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

Pour chaque souche, on ensemence un tube de bouillon Moeller avec arginine et un tube témoin (bouillon Moeller sans arginine). Les deux tubes sont recouverts avec 4 à 5 mm de paraffine stérile. L'incubation se fait à 30°C pendant au moins 4 jours. La culture dans le milieu de base se manifeste par un virage au jaune dû au métabolisme du glucose. Les souches qui possèdent l'ADH (Arginine dihydrolase) vont acidifier le milieu en fermentant le glucose (virage au jaune). Cette acidification favorise l'activité de l'arginine dihydrolase qui va dégrader l'arginine et libérer l'ammoniac ce qui entraîne une alcalinisation du milieu qui se manifeste par un virage de l'indicateur de pH au violet (Moeller, 1995;Gelman et al., 2000)

2.3.2.8. Culture sur milieu hyper salé

La croissance à différentes concentrations de chlorures de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les cultures à tester ont été ensemencées sur des bouillons MRS hyper salés à 4% et à 6.5% et à 8% de NaCl.

Lecture : Après une incubation à 30°C pendant 24h l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble.

2.3.2.9. Fermentation des sucres

Il s'agit d'apprécier l'aptitude des souches à métaboliser divers composés carbonés, en particulier des sucres. Dans ce cas, le milieu de base utilisé est le bouillon MRS (sans glucose et sans extrait de viande) additionné de 40 mg/l pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH (MRS-BCP) (Mannu *et al.*, 2000). Ce test a été réalisé sur les sucres suivant : lactose, xylose, saccharose, fructose, mannose, maltose, mannitol, sorbitol, amidon.

Lecture: Après 24h d'incubation, le développement de la culture et le virage de l'indicateur coloré au Jaune traduit la fermentation du sucre testé.

2.3.2.10. Culture sur lait de Sherman

Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène qui est bleu en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit. Chaque culture à tester a été ensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0.1 % et à 0.3%. Le bleu de méthylène capte et fixe les molécules d'hydrogène transportées par la chaîne respiratoire bactérienne en présence de la réductase bactérienne ; il vire alors le bleu à l'incolore. La décoloration du bleu de méthylène est d'autant plus rapide que le nombre de bactéries est élevé (Delarras, 2007).

Lecture : Après une incubation à 30°C pendant 24h à 48h, on note les observations à la réduction de Bleu de méthylène et la coagulation du lait.

2.3.2.11. Culture sur lait tournesolé

Le milieu est préparé à partir du lait écrémé stérile (12%) additionné de teinture de tournesol jusqu'à l'obtention d'une couleur violette, le pH est ajusté à 7,3. L'ensemencement est effectué à partir d'une culture dense de la souche étudiée, suivie d'une incubation à 30°C pendant 3 à 5 jours. Ce milieu permet d'observer plusieurs types de réactions :

- Attaque du lactose avec acidification (coagulation de la caséine et virage au rouge).
- Attaque de la caséine avec alcalinisation (virage au bleu).
- peptonisation de la caséine après ou en dehors de toute coagulation (éclaircissement du milieu ou dégradation du coagulant).

- Réduction du colorant (décoloration).

2.3.2.12. Thermo résistance

C'est un critère de classification qui permet d'étudier la résistance à certain traitement thermique. Pour chaque souche,ensemencer un tube de milieu MRS et incuber à 65°C pendant 30 min. Refroidir ensuite sous l'eau de robinet, et ré-incuber pendant 24h à 30°C.

Lecture : L'apparition d'un trouble indique une thermo résistance (**Guiraud, 2003**).

2.3.2.13. Résistance au tellurite

Une solution de 0.1g/ml de tellurite de potassium, stérilisée 15 min à 120°C, est rajoutée au milieu BM gélosé (**annexe I**), pour obtenir une concentration finale de 0.5mg/ml. Le milieu coulé en boite est ainsi inoculé par touches et mis en incubation pendant 2 jours. La croissance et noircissement des colonies sont comparées à celles se développant sur un milieu MB gélosé témoin (**Mauguin ,1991 ; Guiraud et al., 2003**).

2.3.2. 14. Dégradation de gélatine

Prendre les tubes de gélatine solidification (en culot), ayant séjournés préalablement dans de l'eau froide, les ensemencer par piqure centrale dans le culot avec les souches bactériennes à étudier. Incuber les tubes à 30°C pendant 48h puis les placer pendant une heure environ à 4°C.

Lecture : Observation après passage au froid :

-**Milieu liquide** : gélatine hydrolysée : **Gélatine⁺**

-**Milieu solide** : gélatine non hydrolysée : **Gélatine⁻**

2.4. Mise en évidence de la production de molécules d'intérêt technologique

2.4.1. Production de CO₂ à partir du citrate

Une série de tubes de lait écrémé stérile (10%) est préparée. on ajoute 0.5ml d'une solution de citrate de sodium (10%) dans chaque tube. Après agitation, on laisse reposer 30 minutes. Chaque tube est inoculé par 1ml d'une culture jeune et additionné de 4ml d'une gélose blanche fondue et refroidie. Après mélange et solidification on incube à 30 C° pendant

aux moins 3 jours. La production de gaz se traduit par la fragmentation de la gélose dans le tube (Kempner et Mc Kay, 1980).

2.4.2. Production d'acétoïne

Le milieu Clarck et Lubs estensemencé et incubé à 28°C pendant deux jours. Après l'incubation on ajoute 0.5ml d'une solution alcoolique d'alpha-naphtol à 6 % dans l'alcool à 90° (VP1) et 0.5ml d'une solution de soude à 16 % dans l'eau distillée (VP2). Les tubes sont soigneusement agités et chauffés avec précaution sur la flamme d'un bec bunsen jusqu'à commencement de l'ébullition. Après agitation pendant 30 secondes sur un agitateur vibreur de type Vortex, une coloration rouge cerise franche indique une réaction de VP positive (King, 1984).

2.4.3. Enzymes protéolytiques

Pour déterminer l'activité protéolytique des bactéries lactiques, la gélose MRS additionnée de lait écrémé à 10 % a été coulé, solidifiée et séchée puis des disques de papier Wattman stérile ont été déposés en surface de la gélose. Chaque disque reçoit un volume de 20µl d'une culture jaune. Après une incubation à 37 °C pendant 24h, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des disques (Veilleumard, 1986).

2.4.4. Enzymes lipolytiques (lipase et lécithinase)

Les lipases ont été recherchées selon la méthode de Leuschner et al., (1997). Un milieu gélosé au tween 80 est coulé en boîte de pétri etensemencé par touches. Après une incubation à 30°C pendant deux jours, l'activité se traduit par un halo opaque autour des colonies.

La lécithinase est une enzyme qui hydrolyse la lécithine. La lécithinase est détectée par une technique qui consiste à enrichir une gélose ordinaire par l'incorporation d'un jaune d'œuf, le milieu est présenté en boîte de pétriensemencé par touches ou faire une strie centrale à la surface du milieu, incubé à 30 °C pendant 24h ou plus. Des Opacifications autour de la colonie indiquent la présence de l'enzyme.

2.4.5. Acide lactique

La mesure de taux de l'acide lactique produit par les bactéries lactiques est connue sous le nom activité acidifiante qui consiste à suivre à doser l'acidité totale par la soude. On commence par la préparation de lait écrémé à 10% dans des flacons de 250ml de capacité. Après stérilisation et refroidissement à la température d'ensemencement, chaque flacon estensemencé par une culture lactique (V/100V). Après incubation à 30°C, à un intervalle du temps 2h, 6h, 24h ; 10ml du lait est prélevé puis titrer par la soude Dornic (N/9) en présence de 5 gouttes de phénolphtaléine, jusqu'à au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins 10 secondes (Larpent, 1997).

L'acidité est déterminée par la formule : $\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10$

Où : V_{NaOH} : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.

2.5. Résistance aux antibiotiques

Pour réalisée ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide a été appliquée, l'inoculum bactérien a étéensemencé par inondation (1ml) de la surface de la gélose Mueller-Hinton déjà coulée et solidifiée, les boites en été laissées sécher à température de laboratoire. Chaque boite reçoit six (6) disques d'antibiotiques à savoir : co-trimaxazole(COT 25ug), nitrofurantoin(NIT 100 mcg), ciprofloxacine(CIP 5ug) , fosfomycine(FO 200 mcg), acide nalidixique(NA 30 ug), gentamicine(GEN 10ug).

Après incubation à 37 °C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

CHAPITRE II

RÉSULTAT ET DISCUSSION

Chapitre II : Résultats et Discussion

1. Aspects des isolats

* **Sur Milieu liquide:** La croissance en milieu MRS liquide est caractérisée par l'apparition du trouble au fond du tube avec une zone transparente de 5 mm d'épaisseur à la surface du milieu liquide (Figure 2).



Figure 2: Aspect des souches sur milieu MRS liquide a 37 °C Pendant 24h

* **Sur Milieu solide:** l'observation directe des colonies sur gélose MRS permet de déterminer les caractéristiques macroscopiques des bactéries. Les différentes observations montrent que toutes les souches cultivées sur le milieu MRS solide donnent des colonies petites, rondes et blanchâtres (figure 3)



Figure 3 : observation macroscopique des colonies sur milieu MRS.

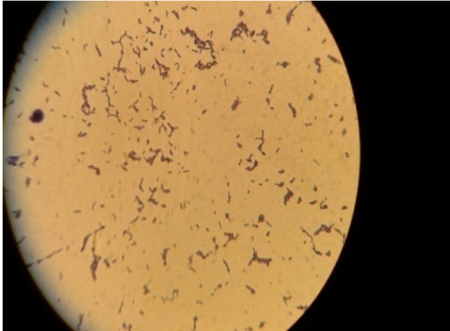
* **Observation microscopique :** Après la coloration de GRAM, l'observation microscopique a révélé que la plupart des cellules se présentent sous forme de bacille à l'exception de deux souches de forme cocci. Elles sont positives à la coloration de Gram, et les tailles des cellules étaient différentes avec des structures isolées et/ ou en courtes chaînes (figure 4).

Le tableau 3 résume les différentes observations microscopiques

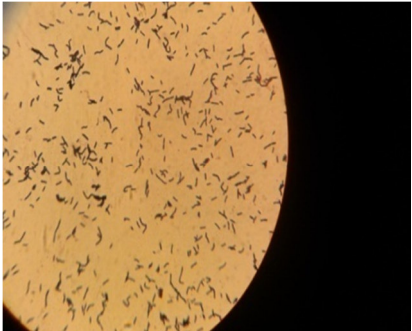
Tableau 3 : aspect microscopique des souches.

souche	Coloration de Gram	Forme	
		Forme	Regroupement
B1	+	Bacille	Isolées
B2	+	Bacille	Isolées, Courtes chaînes
B3	+	Bacille	Isolées
B4	+	Bacille	Isolées
B6	+	Bacille	Isolées, Courtes chaînes
B7	+	Bacille	Isolées, Courtes chaînes
B8	+	coccobacille	Isolées, Courtes chaînes
B9	+	coque	Isolées
B10	+	Bacille	Isolées
B11	+	Bacille	Isolées

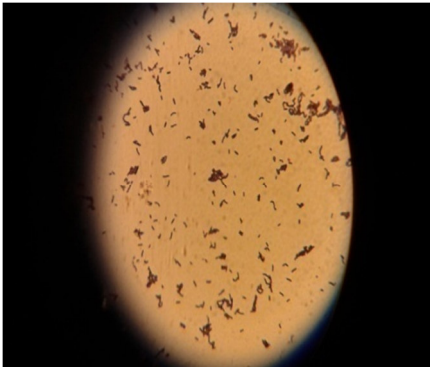
+ : positif, - : négatif.



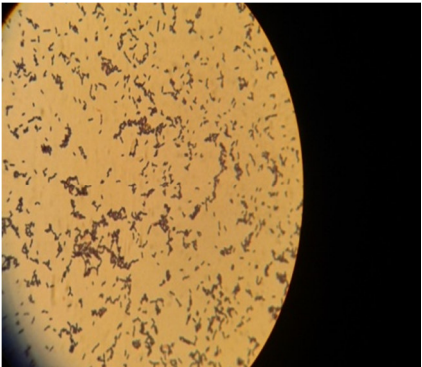
B1



B2



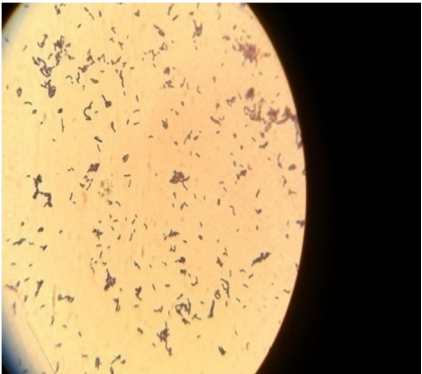
B5



B6



B7



B8

Figure 4 : observations microscopiques des isolats après une coloration de Gram (Gx100).

2. Caractères physiologiques et biochimiques

Les caractéristiques communes aux bactéries lactiques sont : Catalase⁻, Nitrate réductase⁻ et oxydase⁻ (Guiraud, 2003).

La recherche de la catalase constitue une étape importante dans l'identification des bactéries lactiques. Le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y'a production de l'enzyme catalase et que le test est positif (Bourgeois et Larpent, 1996). Pour toutes les colonies testées le test catalase est **négatif**. D'autre part, il en ressort que parmi les onze isolats, trois souches (B3, B4, B7) présentent une activité nitrate réductase (figure 5). Alors, ces souches sont écartées.

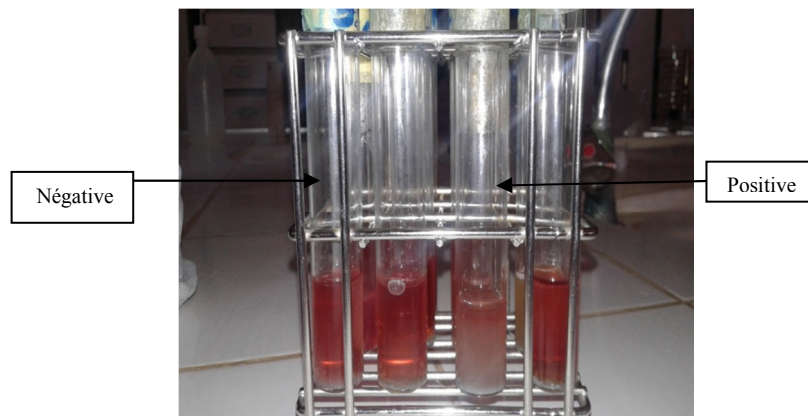


Figure 5 : Résultat du test de nitrate réductase.

Les résultats des différents tests d'identification, portés que sur les souches présentant les caractéristiques communes aux bactéries lactiques : gram⁺, Catalase⁻, Nitrate réductase⁻ et oxydase⁻, sont résumées dans le tableau 4 et illustrées par la figure 6.

Toutes les souches testées ont un caractère homofermentaire et montrent la capacité de croître à 45°C mais ne résistent pas au traitement thermique à 60°C pendant 30 minutes sauf la souche 11. Cette dernière ne peut pas croître à 10°C, le même résultat est observé pour B8 et B9. Elles sont Gélatinase⁻, ADH⁻ et sensibles au tellurite. Elles réduisent la teinture de tournesol.

La coagulation du lait est remarquée chez toutes les bactéries étudiées. Mêmes résultats ont été trouvés pour la réduction de Bleu de méthylène.

Tableau 4 : caractères biochimiques et physiologiques des souches étudiées

		B1	B2	B5	B6	B8	B9	B10	B11
Gram		+	+	+	+	+	+	+	+
catalase		-	-	-	-	-	-	-	-
oxydase		-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate réductase		-	-	-	-	-	-	-	-
Type fermentaire		homo	homo	homo	homo	homo	homo	homo	homo
Croissance	10°C	+	+	+	+	-	-	+	-
à	45°C	+	+	-	-	+	+	-	+
différentes									
T°									
thermorésistance		-	-	-	-	+	+	-	+
Croissance	4.5	+	-	-	-	-	-	-	-
à	6.5	+	+	+	+	+	+	+	+
différents	9.5	+	-	-	-	+	+	-	+
pH									
Croissance	2%	-	-	-	-	-	-	-	-
à	4%	+	+	+	+	-	-	-	-
différents									
CC NaCl	6.5%	+	-	-	-	-	-	-	-
Culture	0.1%	RC	RC	RC	RC	RC	RC	RC	C
sur lait de	0.3%	RC	RC	RC	RC	RC	RC	RC	C
shermen									
Culture sur lait		ARC	ARC	ARC	ARC	AC	AC	ARC	AC
tournosolé									
ADH		-	-	-	-	-	-	-	-
Gélatine		-	-	-	-	-	-	-	-

ARC : Acidification, Réduction, Coagulation

AC : Acidification, Coagulation

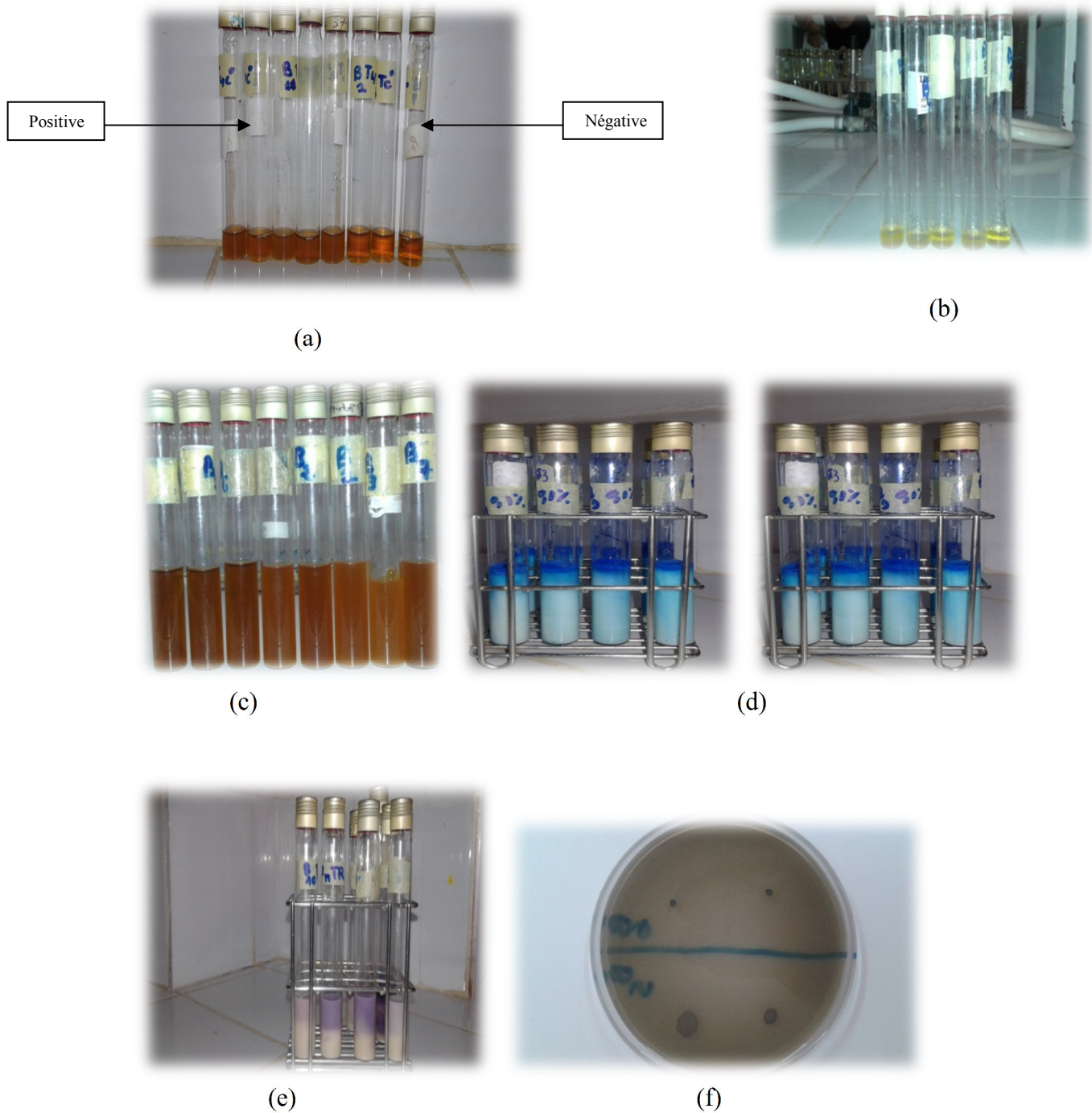


Figure 06 : résultat de différents tests de l'identification

- (a) : croissance a différentes températures
- (b) : test négatif de l'ADH
- (c) : type de fermentation (homo)
- (d) : culture sur le lait de Sherman à 0.1 % et 0.3 %.
- (e) : culture sur lait tournesolé.
- (f) : aspect des colonies sur le milieu au tellurite

Les tests biochimiques et physiologiques ont été complétés par le profil fermentaire des souches vis à vis les carbohydrates (tableau 5).

Ce test est révélé par le changement d'indicateur coloré existant dans le milieu MRS modifié du pourpre au jaune (figure7).



Figure 7 : exemples de résultats de fermentation des sucres.

Tableau 5 : profil fermentaire des souches étudiées

	B1	B2	B5	B6	B8	B9	B10	B11
saccharose	-	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	-
Xylose	+	-	-	+	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	+	-	-	+	+
Amidon	-	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	+	-	-	+	-
Mannitol	-	+	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	-	-	+	+	+	+	+

Nous avons constaté qu'il ya des variabilités importantes concernant la fermentation des sucres et ceci peut être expliqué par la différence de souches.

D'après les résultats de l'identification obtenus, et suite de la comparaison avec la littérature (Guiraud, 1998, 2003), les bactéries étudiées possèdent des caractères communs aux bactéries lactiques et sont apparentées à :

- **B1, B2, B5, B6, B10, B11** : *Lactobacillus sp*
- **B8** : *Lactococcus sp*
- **B9** : *Streptococcus sp*

3. Mise en évidence de la production de molécules d'intérêt technologique

Dans la plupart des procédés industriels de transformation du lait, les bactéries lactiques présentes dans le lait cru sont détruites lors de la pasteurisation. Elles doivent être réintroduites par des ferments composés de souches préalablement sélectionnées suivant les critères d'aptitudes technologiques et organoleptiques : acidification, production de composants de saveur et d'arôme, dégradation des protéines, dégradation des lipides...(Champagne et al., 2000).

Le but de cette partie est de mettre en évidence la production de quelques technologiques intéressantes par les bactéries identifiées pour des fins utiles.

3.1. Production d'acétoïne

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent à la qualité organoleptique de fromage. Les composés responsables de l'arôme des divers produits laitiers sont nombreux parmi lesquels le **diacétyl**, le **CO₂**..... (Kerrache, 2008).

Toutes les bactéries B1 B2 B5 B6 B8 B9 B10 B11 ont la capacité de produire l'acétoïne, on observe une coloration rouge qui apparaît après la transformation acétylméthylcarbinol en acétoïne sous l'action de la soude (VPII) et (VPI) (figure 8).



Figure 8 : résultat de production d'acétoïne.

3.2. Production de CO₂ à partir du citrate

Sauf les Bactéries B6 B8 B9 qui ont la capacité de production de gaz à partir de citrate, ceci est montré par la fragmentation de la gélose dans le milieu lait citraté (figure 9).

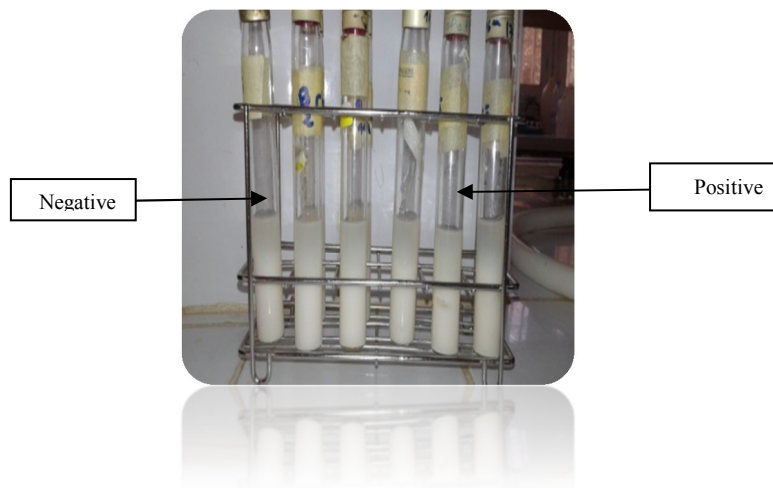


Figure 9: résultat de production de CO₂ à partir du citrate.

3.3. Enzymes protéolytiques

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est essentielle pour leur croissance dans le lait (Savoy et Hébert, 2001 ; Hassaine *et al.*, 2007).

Toutes les souches étudiées présentent une croissance sur un milieu à base du lait avec une activité protéolytique traduite par l'apparition d'un halo clair autour des disques (figure 10)

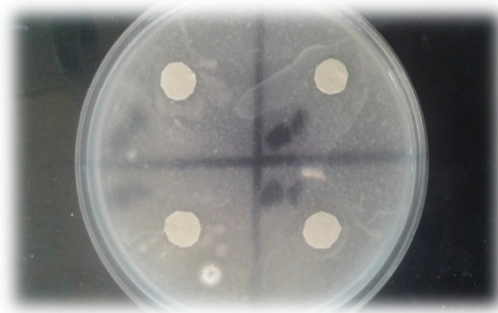
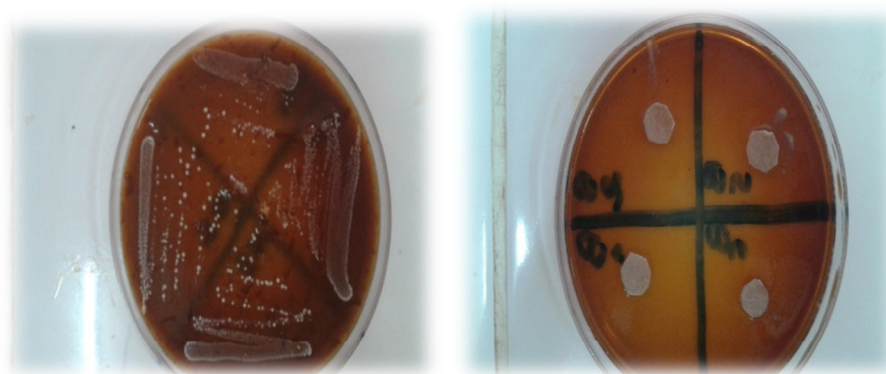


Figure 10: résultats de l'activité protéolytique

3.4. Enzymes lipolytiques

La présence d'un halo autour des colonies des bactéries étudiées permet d'apprécier leur activité lipasique qui n'est pas présente chez toutes les bactéries. Par contre toutes les souches dégradent les lécithines (figure 10). En générale, les bactéries lactiques ont une activité lipolytique faible (Guiraud, 2003).



Lipases

lécithinases.

Figure 11: résultats de l'activité lipolytique

3.5. Acide lactique

La qualité d'un produit laitier fermenté reste toujours le souci des chercheurs, des producteurs et des consommateurs, elle dépend en premier lieu du pouvoir acidifiant de ses ferments qui est un caractère de sélection très important. Cette acidification intervient comme facteur de la coagulation du lait et de la synthèse des caillés (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

Afin sélectionner des souches lactiques intéressantes du point de vue technologique, l'étude du pouvoir acidifiant s'est avérée importante. Elle est évaluée par le suivi de l'acidité Dronic d'un lait ensemencé par souche pure incubé à 30°C pendant un intervalle du temps suivant : 0h, 2h , 6h ,24h.

Les valeurs d'acidité trouvées montrent des variations plus ou moins importantes entre les différents sous espèces (figure 12). Au départ, l'acidité du milieu était environs 17°D. Après 6h d'incubation, l'acidité commence a augmenté progressivement et varie de 20 à 30°D. Ceci correspond à la phase de latence nécessaire a leur adaptation aux conditions de culture. L'espèce *Lactococcus sp* (B8), s'est montré la plus acidifiante avec un taux d'acidité égale à 58°D après 24 h d'incubation.

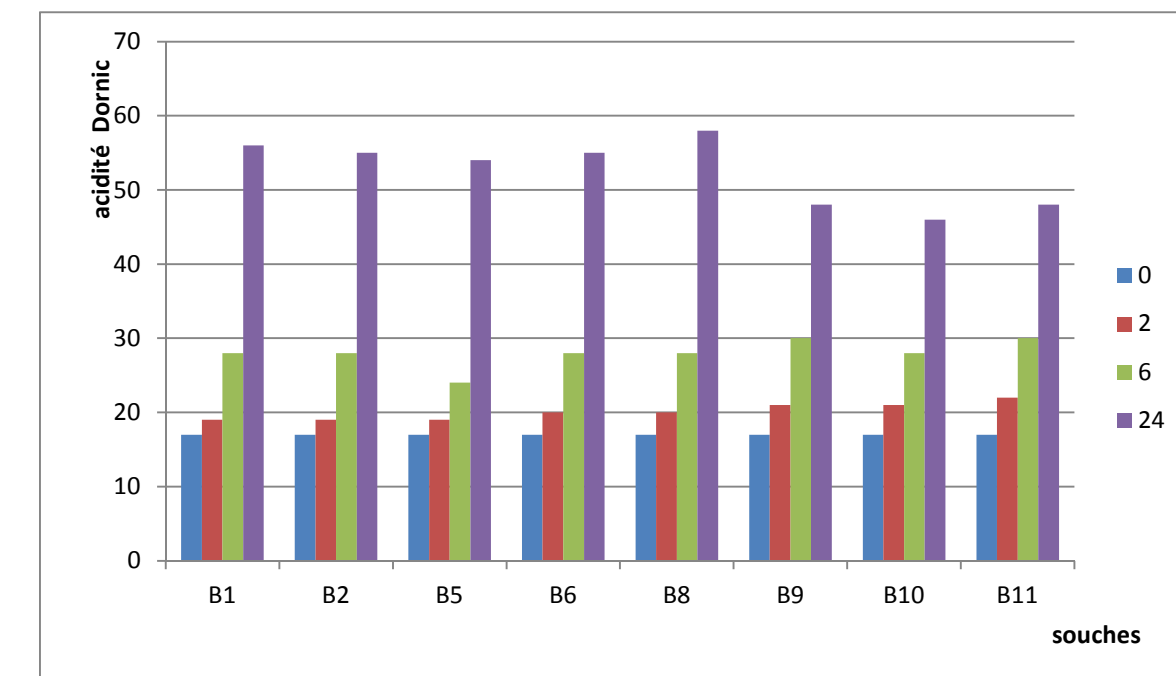


Figure 12 : évolution de l'acidité Dornic en fonction du temps

Les différences observées entre les souches sont expliquées par **De Roissart, (1986)** par les aptitudes de chaque souche à dégrader les composés du milieu pour les rendre assimilables. Ces différences sont aussi dues à la présence ou absence des systèmes de transport des éléments nutritifs (**Albenzino et al., 2001**).

4. Résistance aux antibiotiques

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotique grâce à leur structure et physiologie. Dans la plupart des cas la résistance n'est pas transmissible.

La sensibilité des souches vers les antibiotiques est détectée par formation des zones d'inhibition de la croissance de bactérie en présence de différents antibiotiques.

Les 08 souches étudiées sont résistantes à Amoxicilline (AMC) (100 %), à l'acide Nalidixicique (NA) (88%), à la Fosfomycine (FO) (63%) (figure13).

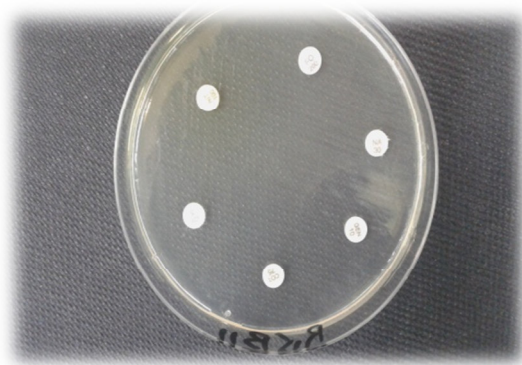


Figure 13: exemple de résultat de résistances de souches aux antibiotiques

Les résultats de l'antibio- résistance sont réunis dans le tableau 6

Tableau 6 : les résultats de test de résistances aux antibiotiques

Antibiotique	COT	NIT	CIP	FO	NA	GEN	AX	AMC	CTX	CFM	CZ	AK	SXT
B1	R	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
B2	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S
B5	S	S	R	S	R	S	S	R	S	R	R	S	R
B6	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	R
B8	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
B9	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
B10	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R
B11	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R

COT : co-trimaxazole, NIT : nitrofurantoin, CIP: ciprofloxacine, FO: fosfomycine, NA: acide nalidixique, GEN: gentamicine, AX: amoxicillin, AMC: amoxyclav, CTX : cefotaxime, CFM : cefixime, CZ : cefazoline, AK : amikacine

CONCLUSION

Conclusion

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt biotechnologique. Elles sont largement utilisées dans des procédés d'élaboration de produits alimentaires. En plus de leur intérêt dans la fabrication et la préservation des produits alimentaires, certaines souches lactiques ont été décrites comme ayant des effets bénéfiques sur la santé humaine (Drouault et Corthier ,2001).

La caractérisation des bactéries lactiques isolées à partir du lait de brebis correspond à un sujet intéressant. De ce fait, la présente étude nous a permis dans la première partie, une identification biochimique et physiologique de huit souches de bactéries lactiques qui sont :

- Une souche de *Lactococcus sp*
- Une souche de *Streptococcus sp*
- 6 souches de *Lactobacillus sp*

Dans la deuxième partie, la mise en évidence de la production des substances d'intérêt technologique a été menée : la production d'arômes notamment l'acétone, le CO₂ à partir de citrate a été prouvée chez toutes les souches. Même résultat a été trouvé concernant la production des enzymes protéolytiques. Ces dernières sont capables d'hydrolyser les caséines du lait. Au contraire, nos bactéries sont dépourvues des enzymes lipolytiques, caractéristique connue chez les bactéries lactiques. Une activité lecithinase remarquable a été soulevée chez toutes les souches.

Les résultats de la production de l'acide lactique nous ont permis de déduire que toutes les souches ont la capacité de coaguler le lait après 24 heures d'incubation.

Enfin, il faut noter qu'il est important de :

-Diversifier les niches écologiques d'isolement et de pousser l'identification de ces souches à l'échelle moléculaire.

-Utiliser des techniques plus performantes pour le dosage qualitatif et quantitatif des différentes enzymes (lipasiques, protéolytiques.....).

-Renforcer l'étude des aptitudes technologiques des souches isolées par d'autres tests car elles pourraient remplacer avantageusement certaines souches importées.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

Références bibliographiques

- Albenzino M., Corbo M. R.M, Rehman S. U., Rehmen P.F., Fox M., Deangeles A., Corsetti A., Sevi et Gobetti M. (2001).** Microbiological and biochemical characteristics of can strato pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey .*Inter.J.Food.Microbiol.*, 67. pp 35-48.
- Ammor S. (2005).** Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*.23:373-382.
- Axelsson L., (2004).** Classification and physiology. *In : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.).3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66.
- Badis A, Guetarni D, Moussa Boudjema B, Henni DE, Kihal M (2004) :** identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races .*Food Microbiol.*,21:579-588
- Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R., (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "Arabie et kabyle". *Sciences et Technologie C : 23 : pp 30-37.*
- Bourgeois C.M et Larpent J .P., (1996).** Microbiologie alimentaire T2; aliments fermentés et fermentations alimentaire. Ed. Technique et documentation : 523p.
- Champagne C.P., Moinneau S., Lange M., Gellinas P. et Aude P. (2000).** Production de ferments lactique dans l'industrie laitière Ed. Fondation des Gouverneurs. pp 201.
- Carr F.J., Chill D., et Maida N. (2002).** the lactic acid bacteria : A literature survey *Critical Rev .Microbiol .*, 28 (4) :281-370
- Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C., Ross P. (2006).** Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058-1071.
- Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d' analyse ou de de contrôle ...produits cosmétique ,eaux produits pharmaceutique Edi .Tec et Doc Lavoisier (paris).
- Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M.C & Janssens D. (1994).** Caractéristiques générales &des bactéries lactiques. In *Bactéries Lactiques*. Ed. H Roissart et F M. Luquet. Paris: Lavoisier : pp 25-116.
- Desmazaud M.J., (1983).** lait, 63,267-316
- Desmazeaud M.J. et Cogan. (1996).** Role of cultures in cheese ripening. I n: Cogan T.M.,Accolas J.P (Eds.), *Dairy Starter Cultures. VCH Publishers, Inc.*, New York. pp. 207-231.

- De Roissart H. B., (1986).** Bactéries Lactiques dans le lait et produits laitiers. Ed. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris : 445 p.
- De Roissart H.B., et Luquet M., (1994).** les bactéries lactiques T1 , Aspects fondamentaux et technologiques. Ed Lorica , Lavoisier,604p.
- Devriese L.A., Pot B. et Collins M.D. (1993).** Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct *enterococcal* species and species groups.*J.Appl.*75:399-408
- Devriese L.A., Pot B. et Collins M.D. (1996).** Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Syst. Appl. Microbiol.* 19 : 213-222.
- Drider D., et Prevost H. (2009).** Bactéries lactiques Physiologie, Métabolisme, Génomique et Application industrielle. Ed, Economisa 49 rue Harica 75015 Paris : pp381-427
- Federighi M., (2005).** Bactériologie alimentaire compendium d'hygiène des aliments 2^e édition .Ed : Economica.P276.
- Fliss. (2001).** Réseau de recherche sur les bactéries lactiques, <http://www.fsaa.Ulval.ca/stea/bacterie.htm>.
- Garrity G.M., Boone D.R. Krieg N. et Staley J. (2008).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.The Firmicutes. Originally published by Williams and Wilkins, 1984, 2nd ed. Hardcover. Vol: 3: 1450 p.
- Garvie, E.L. (1984).** Separation of species of the Genus *Leuconostoc* and Differentiation of the *Leuconostoc*'s from other lactic acid bacteria, in *Methods In Microbiol , Bergan, T.Ed.,*Vol.16,Academic Press, New York.147-177
- Garvie, E.L. (1986).** Genus *Leuconostoc*. In : Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams Wilkins.1071-1075
- Gelman A., Drabkin V., Glatman L. (2000).** Evaluation of lactic Acid Bacteria isolated from lightly preserved fish products, as startar cultures for new fish-based food products. *Innov. Food Sci.Emerg.Technol.,*1: 219-226
- Guessas S. (2006).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk.*Dirasat, Agruicultural Sci.* 32: 3, 304-312
- Guiraud J.P., (1998).** Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agro-alimentaire, Eds. Dunod Paris, 652p.
- Guiraud J.P., (2003).**Microbiologie alimentaire. *Technique d'analyse microbiologiques.* Ed, Dunod, Paris, 2003,651,P
- Hadef S., (2012).** Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des lactiques locales. Mémoire de magister: pp 7-8.

- Harrigan W.F. et Mc-Cance M.E. (1976).** Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology, *Academic Press*, Orlando.
- Hassan A.N. et Frank J.F. (2001).** Starter Cultures and their use. *In: Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York.151-205.
- Holtzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Scillinger U. et Huis int Ve Ld J.H. (1997).** Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of *kulenaoto* : the maasai traditional fermentad milk in kenya *.Int.J.FoodMicrobiol* 94.:3,269-278
- Kandler O., Schillinger U., Weiss N. (1983).** Carbohydrate metabolism in: lactic acid bacteria. *Antonie. Van Leeuwenhoek*: 49: pp 209-224.
- Karrache H., (2008).** Isolement, identification et caractérisation technologique de certaines souches leuconostoc isolées à partir du lait de vache. Thèse d'ingénieur en biologie. Université Hassiba Ben Bouali Chlef. pp49.
- Kempler et McKay. (1980).** Improved medium for detection of citrate-fermenting streptococcus lactis subsp. Diacetylactis. *J.App.Environ.Microbiol.*39:927-956.
- King N. (1948).** Modification of Voges-Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetylmethylcarbimol plus diacetyl in butter *.Dairy Industries*,13:860-866 .
- Klein G., A. Pack C. Bonaparte G. (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria *.Int.J.Food.Microbiol.*91:103-125
- Kovacs L.G., ballati P.A., kroszman H.B. et Pueppke S.G.(1995).** transcriptional organization and expression of nol XWBTUV.A locus that regulate cultivar-specific nodulation soybean by *Rhizobium fredii* USDA257 *Mol.Microbiol.*17:923-933
- Krieg N.R. (2001).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Vol: 1
- Laurent et al., (1998).** Manuel de bactériologies alimentaire, polytechnica. Paris : 308p
- Leveau et Bouix. (1993).** Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel. Tec and Doc. Lavoisier. Paris: pp 85-87.
- Luquet F. M. (1986).** Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre, T3., qualité, énergie et tables décomposition). Ed .Technique et Documentation. Paris :pp 343-442
- 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. Thèse de doctorat. Université de Nantes:17p
- Makhloufi K., M., (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat Université pierre et marie curie : 200p
- Mannu L., Paba, A., Pes M., et Scintu M.F. (2000).** Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional pecorino Sardo cheese. *J. Appl. Microbiol.*89:191-197

- Mauguin S. (1991).** Caractérisation de bactéries lactiques isolées de produits marins. *These de doctorat*.IFREMER.Nantes.1991
- Mayeux J.V., Sandine W.W.E., Elliker P.R. (1962).** A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed isolate starter cultures *.J.DairySci* .,45:56-65.
- Mcllod, A., Nyquist, O. L., Snipen, L., Naterstad, K., and Axelsson, L. (2008).** Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *SystAppl Microbiol*.31.:PP:393-403.
- Moeller V. (1995).** Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system *Acta.Pathol.Microbiol.Scand*.36:158-172
- Monnet M., et Gripon G. (1994).** Biochemical and genetic characterization of PepF , an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*. *J BiolChem* 269, pp:32070-32076.
- Mozzi F., Torino M I. et Valdez G F. (2001).** Identification of exopolysaccharides producinglactic acid bacteria. Methods in *biotechnology.Food.Microbiol*. Protocols Humana. Press. Totowa. Vol: 1: pp 183-190.
- Naveena B. j., Vishnu C., Altaf M. et Reddy G. (2004).** production of L(+) lactic acid by lactobacillus amylophilus *.Food Technol.Biotechnol*.42(3):147-153
- Novel G., (1993).** Les bacteries lactiques in: Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. Technique et Documentation Lavoisier :614p
- Olympia M., Fukuda H., Ono H., Kaneko Y. et Takano M. (1995).** Characterization of starch hydrolyzing lactic acid bacteria from a fermented fish and rice food 'Burong-Isda 'and its amylolytic enzyme. *J.Ferment.Bioengg*,80:124-130
- Orla-Jensen S. (1919).** The Lactic bacteria Hosledsoncopen: 74: pp 131-142.
- Poulain, (1994).** Evaluation de la préparation commerciale des ferments lactiques in : les bactéries lactiques T1. Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Loriga Lavoisier: 604 P
- Prescott L.M., Harley. et Donald A. (2003).** Microbiologie, *De boeck université*, 2eme édition française.128 :28-29
- Raynaud Y. (2006).** Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'auto acidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de doctorat. L'institut national des sciences appliquées de Toulouse : 21p.
- Sallofe Coste. (1994).** Lactis acid bacteria. Dannone News latter n°5 July.
- Samelis J., Maurogenakis F., Metaxopoulos J. (1994).** Characterization of lactic acid bacteria isolates from naturally fermented Greek dry salami . *Int .J.Food Microbiol.*,23:179-196

Schillinger, U. et Lucke, F.K., (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products *J.Food Microbiol.*4:199-208

Stiles M., Holzapfel W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *A review J. Food Microbiol.*36:1-29

Thapa N., Pal J. et Tamang J.P. (2006). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas *Int.J.Food Microbiol.*107:33-38

Thompson et Gentry-Weeks. (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In: Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F M.). Loriga. Uriage: 1:pp 239- 290

Vandamme P., Pot B., Gillis M., deVos P., Kersters K . et Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* 60: 407p.

Vignol C.L., Michel J.C., Paquin P., Moinneau M., Pouliot M et Simpson R. (2002). Science et technologique du lait: Transformation du lait. Technique et Documentatio Lavoisier p1,30,31.

Yateem A., Balda M T., AL-Surrayai T., Al-Mutairi B. and Al-Daher R., (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *International Journal of Dairy. Science:* 3(4): pp 194-199.

ANNEXES

Annexe I: Milieux identification

1-Milieu MRS (De Man ; Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	10g
peptone	10g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
glucose	20g
Phosphate dipotassique	2g
Sulfat de magnésium	0.25g
Sulfat de manganése	0.05g
Tween 80	1ml
Agar-agar	18g
Eaudisitllée	1000ml

Ph =6.8 stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 15min.

2-Milieu BM

peptones	10g
E.L	5g
E.V	5g
Glucose	10g
Tween 80	10g
Phosphate dipotassique	2g
Sulfat de magnesuim	0.10g
Sulfat de manganese	0.05g

Ph=7 autoclavage 20min /120 °C , rajouter aseptiquement 0.5 ml de tellurite de potassium à 1 % stériliser par filtration pour gélosea jouter 15 g d'agar.

Annexes : Milieux identification

3-Milieu KMK (kempler et Mc Kay, 1980).

Extrait de levure	3.00g
Peptone tryptique de caséine	2.50g
Glucose	5.00g
Agar –agar	18g
Eau distillée	1000ml
Ph=6.6.stérilisation à l' autoclave :120°C pendant 15min	
La solution 1 :solution aqueuse contenant de 10 % de ferrocyanure de potassium .	
la solution 2 : elle est composée de 1 g de citrate de soduim dihydrogénéet de 1 g de citrate de fer dans 40ml eau distillée . les deux solutions sont chauffées dans l'eau bouillante pendant 30min et par la suite , filtrées sur des unitésde filtration millipore0.45um (conserver en flacon opaque au réfrigérateur).	

4-Milieu Clarck et Lubs :

Peptone	6g
Glucose	5g
K ₂ HPO ₄	5g
Eau distillée	1000ml
Ph=7 stérilisation à l'autoclave :120°C pendant 15min .	

5-Milieu gélatine :

Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Gélatine	120g
Stérilisation à l'autoclave :120°C pendant 15 min .	

6- Gélose au lait :

Peptone	5g
Glucose	1g
Lait écrémé	5ml
Agar	15g
Stérilisation à l'autoclave :120 °C .	

Annexes : Milieux identification

7-Milieu MSE :

tryptone	10g
Extrait de levure	5g
saccharose	100g
Citrate de soduim	1g
Glucose	5g
Gélatine	2.50g
Agar-agar	15g
Eau distillé	1000ml

8- Lait tournesolé :

Lait écrémé à 12 %	1000ml
Teinture de tournesol à 4 %	10ml

Stérilisation par autoclavage à 110 °C pendant 5min.

9-Bouillon MRS :

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Acétate de sodium tri hydraté	5g
Citrate d'ammonium	2g
Tween 80	1ml
Phosphate de potassium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse	0.05g
Eau distillé stérile	1000ml

Ph du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 6.8.