

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire de Master

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie

THEME

**Isolement et identification des bactéries
lactiques à partir de quelques
produits laitiers.**

Encadreur :

Mr. Djebli Ahmed

Présente par:

Larabi Cherifa

Mehifer Imen

Devant le jury :

Mr: Zerrrouki Houcine	Président
Mr: Madouri Radouane	Examinateur
Mr. Djebli Ahmed	Encadreur

Année universitaire : 2022 / 2023

Remerciement

Nous remercions Dieu Tout-Puissant de nous avoir donné la santé et la volonté de commencer et de terminer cette mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mr Djebli Ahmed, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nos remerciement s'adresse également d tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles, et nous n'oublions pas d'adresser nos remerciements et notre gratitude à tout le personnel du Département de Laboratoire de Biologie de l'Université Ammar Tledji à Laghouat pour leur aide et leur soutien dans les moindres détails et pour leur réponse inlassable à nos exigences, que Dieu les bénisse.



Dédicace

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail
réalisé grâce à l'aide de dieu.*

*A Ceux que personne ne peut compenser les
sacrifices qu'ils ont consentis pour mon
éducation : Mes très chers parents.*

A mes sœurs et mes frères.

A tous ceux qui m'ont aidé dans mes études.

*A tous mes proches, mes amis et tous ceux qui
m'aiment.*

*Tous mes amis d'enfance et compagnons de tous
les instants.*

*A petites filles de la famille, Tasnīm, Amīra,
Aya et Arwa.*

Cherifa

Dédicace

*Louange à Dieu et prières sur le bien-aimé
Mustafa.*

*Dieu soit loué, qui nous a permis d'apprécier
cette étape de notre cheminement d'étude avec
cet humble mémoire.*

*Dédié aux honorables parents, que Dieu les
protège et les perpétue comme une lumière sur
mon chemin,*

*À la personne la plus proche de mon cœur et de
mon âme, que Dieu le protège pour moi,*

*À toute la généreuse famille qui m'a soutenu,
frères et sœurs,*

*Au compagnon de route qui a partagé avec moi
ces moments "cherifa",*

*A mes chers amis qui m'a soutenu À travers
toutes les épreuves,*

*A tous ceux qui ont marqué ma vie, aimés de
mon cœur et oubliés de ma plume*

Imen

Résumé :

Les bactéries lactiques ont acquis une grande importance par leur présence dans l'industrie agro-alimentaire et ce depuis longtemps.

Notre étude a porté sur dénombrement, isolement, purification et identifications de bactéries lactiques, isolée à partir de vingt(20) échantillons de produits laitiers (klila, jben et lebaa (colostrum)), collecté dans deux régions d'Aflou et Laghouat.

L'isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers nous a permis d'obtenir huit(08) souches (Gram positif, catalase négatif) qui ont été purifiées et conservées. Le dénombrement des bactéries lactiques dans klila a montré que le nombre moyen des bactéries lactiques varie de 1.10^2 à 2.10^2 UFC/ml, dans jben $3.82.10^2$ UFC/ml, tandis que dans lebaa, il est en moyenne de $2.51.10^2$ UFC/ml.

Pour l'identification des espèces, nous sommes basés sur les études microscopique et macroscopique, test biochimique (test catalase), tests physiologique :(Croissance en présence de NaCl : 6,5% et 4%, test de croissance des différentes températures (10°C , 30°C , 35°C) ; étude de la thermorésistance ; test de type fermentaire). Le test de fermentation des sucres en utilisant la galerie Api 50 CH a permis d'identifier 4 isolats. Ces isolats ont été affiliés à 2 genres bactériens de lactobacillus comme suit : Lactobacillus plantarum. Lactobacillus collinoides.

Mots clés : produits laitiers (klila, jben, lebaa), bactéries lactiques, purification, identifications.

Abstract :

Lactic acid bacteria have gained great importance through their presence in the food industry for a long time.

Our study focused on the calculation, isolation, purification and identification of lactic acid bacteria, isolated from twenty (20) samples of dairy products (Kalila, jeben , colostrum), collected from two regions (Aflau and Laghouat).

Isolation of lactic acid bacteria from milk derivatives, enabled us to obtain eight (08) strains (Gram positive, catalase negative) that were purified and preserved.

The number of lactic acid bacteria in the klila showed that the average number of lactic acid bacteria ranged from 1.10^2 to 2.10^2 UFC/ml, in jeben $3.82.10^2$ UFC/ml, while in colostrum the number averaged $2.51.10^2$ UFC/ml.

To identify the species, we rely on microscopic and macroscopic studies, biochemical testing (catalase test), and physiological tests: (growth in the presence of NaCl: 6.5% and 4%; growth test at different temperatures (10°C , 30°C , 35°C); heat resistance study; fermentation type test). A sugar fermentation test using Api 50 CH identified 4 isolates, these isolates were associated with two types of Lactobacillus bacteria as follows: Lactobacillus plantarum et Lb collinoides.

Key words: dairy products (klila , jeben , colostrum), lactic acid bacteria, purification, identifications .

ملخص:

اكتسبت بكتيريا حمض اللاكتيك أهمية كبيرة من خلال وجودها في الصناعات الغذائية لفترة طويلة.

ركزت دراستنا على الحساب والعزل والتنقية والتعرف على بكتيريا حمض اللاكتيك، المعزولة من 20 عينة من منتجات الألبان (كريمة، لبن، لبن) تم جمعها من منطقتين (أفرو، الأغواط).

إن عزل بكتيريا حمض اللاكتيك من مشتقات الحليب مكننا من الحصول على ثمان سلالات (موجبة الجرام، سلبية الكاتالاز).

أظهر عدد بكتيريا حمض اللاكتيك في الكريمة أن متوسط عدد بكتيريا حمض اللاكتيك يتراوح من:

1.10^2 إلى 2.10^2 UFC/ml ، في اللبن 3.82×10^2 UFC/ml ، بينما في اللبن متوسط العدد 2.51×10^2 UFC/ml .

لتحديد الأنواع نحن نعتمد على الدراسات المجهرية والعيانية، والاختبار البيوكيميائي (اختبار الكاتالاز) والاختبارات الفيزيولوجية (النمو في وجود كلوريد الصوديوم 6.5% و 4%) اختبار النمو بدرجات حرارة مختلفة (10°C ، 30°C ، 35°C)، دراسة مقاومة الحرارة، اختبار نوع التخمر.

حدد اختبار تخمير السكر باستخدام معرض API 50 CH

أربع عزلات، ارتبطت هذه العزلات بنوعين من بكتيريا Lactobacillus على النحو

التالي Lactobacillus plantarum et Lb. Collinoides.

الكلمات المفتاحية: منتجات الألبان (كريمة، لبن، لبن)، بكتيريا حمض اللبن، التنقية، التحديد.

Liste des abréviations :

%	: Pourcentage
API.	: Analytical profile index
API 50 CH.	: Carbohydrate fermentation strips
A.	: Culture microbienne
C°.	: degré celsius.
CO₂.	: Dioxyde de carbone
C.	: colonie
EPS.	: Eau physiologie stérile
E	: Echantillon
G+.	: Gram positif
h	: Heure
H2O2	: Eau oxygéné.
GC%.	: Pourcentage guanine +cytosine
LAB.	: Lactic Acid Bacteria
Lb.	: Lactobacillus
ml	: millilitre
Mn.	: minute.
MRS.	: Man Rogosa et Sharpe
NaCl.	: chlorure de sodium
S	: Souche
TSE.	: Treptone Sel Eau
T.	: Témoin
UFC/ml	: unite formant colonies par millilitre

Liste des figures

Figure 01 : Les régions des échantillons.....	14
Figure 02 : Produits laitiers traditionnels analysés.....	14
Figure 03 : Préparation de la suspension mère.....	15
Figure 04 : Préparation des dilutions décimales.....	16
Figure 05 : Dénombrement des colonies par le compteur de colonies.....	17
Figure 06 : Diagramme d'isolement et de purification des souches.....	18
Figure 07 : Dénombrement des colonies sur milieu gélose MRS et M17 à 30°C...	24
Figure 08 Aspect macroscopique de souche lactique en milieu MRS solide.....	26
Figure 09 : Aspect des souches lactiques pures en milieu MRS liquide.....	28
Figure 10 : observations microscopiques des bactéries lactiques après une coloration de Gram avec un grossissement ($G : \times 100$).....	29
Figure 11 : observations microscopiques des bactéries lactiques après un examen à l'état frais avec un grossissement ($G : \times 100$)	30
Figure 12 : Résultat de test de catalase.....	32
Figure 13 : Résultats de test de type fermentaire.....	33
Figure 14 : profil de fermentation des sucres de la souche pure de bactéries lactiques sur la galerie API50 CH après 48h d'incubation.....	34

Liste des Tableaux

Tableau 01 : origines des échantillons.....	13
Tableau 02 : Matériel utilisé pour l'étude de l'isolement des bactéries lactiques.....	15
Tableau 03 : Dénombrement des colonies sur milieu gélosé M17 et MRS, de la klila et jben.....	25
Tableau 04 : Aspects macroscopique des souches bactéries lactiques isolées	27
Tableau 05 : Résultats de test catalase, coloration de Gram, Examen Microscopique.....	31
Tableau 06 : Résultats de test physiologique.....	33
Tableau 07 : Résultats d'identification par la plaque API 50 CH.....	35

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des Tableaux

Introduction générales..... 01

CHAPITRE 1 : LES PRODUITS LAITIERS TRADITIONNELS

1.1_ Klila..... 04

1.2_ Jben..... 04

1.3_ Lebaa..... 04

CHAPITRE 2 : LES BACTÉRIES LACTIQUES

2.1. Historique..... 07

2.2. Habitat et l'origine..... 07

2.3. Définition..... 08

2.4. Caractéristiques générales des bactéries lactiques..... 08

2.5. Voies métaboliques des bactéries lactique..... 09

2.5.1. Homofermentaire..... 09

2.5.2. Hétérofermentaire..... 09

2.6. Taxonomie et classification 09

2.7. Intérêt des bactéries lactiques..... 10

2.7.1. Dans l'industrie alimentaire..... 10

2.7.2. Dans domine thérapeutique..... 11

CHAPITRE 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'objectif..... 13

L'ieu de L'étude..... 13

L' Origine d'échantillons..... 13

3.1. Matèrieles utilisès..... 15

3.2. Mèthodes..... 15

3.2.1. Préparation de la suspension mère.....	15
3.2.2. Préparation des dilutions décimales.....	16
3.2.3. Dénombrement.....	16
3.2.4. Isolement et Purification.....	17
3.2.4.1. Isolement.....	17
3.2.4.2. Purification.....	17
3.3. Conservation des souches.....	19
3.3.1. Conservation à court durée.....	19
3.3.2. Conservation à longue durée.....	19
3.4. Identification des bactéries lactiques.....	19
3.4.1. Tests morphologiques.....	19
3.4.1.1. Aspects macroscopiques.....	19
3.4.1.2. Aspects microscopiques.....	19
3.4.2. Tests biochimiques.....	20
3.4.2.1. Test de catalase.....	20
3.4.3. Tests physiologiques.....	20
3.4.3.1. Etude de Type fermentaire.....	20
3.4.3.2. La Thermorésistante.....	21
3.4.3.3. Culture sur milieu hypersalé.....	21
3.4.3.4. Croissance en différentes températures.....	21
3.4.4. Identification par Galerie API 50 CH.....	21

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

5. Les analyses microbiologiques.....	24
5.1. Dénombrement des colonies bactériennes.....	24
5.2. Isolement et purification.....	26
5.3. Pré-identification des bactéries lactiques.....	26
5.3.1. Etude morphologique.....	26
5.4. Identification des bactéries lactique.....	31
5.4.1. Tests physiologiques et biochimiques.....	31
5.4.1.1. Test de la catalase.....	31
5.4.1.2. Test de la thermo résistance.....	32
5.4.1.3. Croissance en milieu hypersalée.....	32
5.4.1.4. Recherche de type fermentaire.....	32

5.4.1.5.La croissance aux différentes températures.....	33
5.4.2 Identification par la galerie API 50 CH	34
Discussion générale.....	36
CONCLUSION.....	39
ANNEXE.....	41
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	45

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des Tableaux

Introduction générales..... 01

CHAPITRE 1 : LES PRODUITS LAITIERS TRADITIONNELS

1.1_ Klila..... 04

1.2_ Jben..... 04

1.3_ Lebaa..... 04

CHAPITRE 2 : LES BACTÉRIES LACTIQUES

2.1. Historique..... 07

2.2. Habitat et l'origine..... 07

2.3. Définition..... 08

2.4. Caractéristiques générales des bactéries lactiques..... 08

2.5. Voies métaboliques des bactéries lactique..... 09

2.5.1. Homofermentaire..... 09

2.5.2. Hétérofermentaire..... 09

2.6. Taxonomie et classification 09

2.7. Intérêt des bactéries lactiques..... 10

2.7.1. Dans l'industrie alimentaire..... 10

2.7.2. Dans domine thérapeutique..... 11

CHAPITRE 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'objectif..... 13

L'ieu de L'étude..... 13

L' Origine d'échantillons..... 13

3.1. Matèrieles utilisès..... 15

3.2. Mèthodes..... 15

3.2.1. Préparation de la suspension mère..... 15

3.2.2. Préparation des dilutions décimales..... 16

Table des matières

3.2.3. Dénombrement.....	16
3.2.4. Isolement et Purification.....	17
3.2.4.1. Isolement.....	17
3.2.4.2. Purification.....	17
3.3. Conservation des souches.....	19
3.3.1. Conservation à court durée.....	19
3.3.2. Conservation à longue durée.....	19
3.4. Identification des bactéries lactiques.....	19
3.4.1. Tests morphologiques.....	19
3.4.1.1. Aspects macroscopiques.....	19
3.4.1.2. Aspects microscopiques.....	19
3.4.2. Tests biochimiques.....	20
3.4.2.1. Test de catalase.....	20
3.4.3. Tests physiologiques.....	20
3.4.3.1. Etude de Type fermentaire.....	20
3.4.3.2. La Thermorésistante.....	21
3.4.3.3. Culture sur milieu hypersalé.....	21
3.4.3.4. Croissance en différentes températures.....	21
3.4.4. Identification par Galerie API 50 CH.....	21

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

5. Les analyses microbiologiques.....	24
5.1. Dénombrement les colonies bactériennes.....	24
5.2. Isolement et purification.....	26
5.3. Pré-identification des bactéries lactiques.....	26
5.3.1. Etude morphologiques.....	26
5.4. Identification des bactéries lactique.....	31
5.4.1. Tests physiologiques et biochimiques.....	31
5.4.1.1. Test de la catalase.....	31
5.4.1.2. Test de la thermo résistance.....	32
5.4.1.3. Croissance en milieu hypersalée.....	32
5.4.1.4. Recherche de type fermentaire.....	32
5.4.1.5. La croissance aux différentes températures.....	33
5.4.2 Identification par la galerie API 50 CH	34

Table des matières

Discussion générale.....	36
CONCLUSION.....	39
ANNEXE.....	41
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	45

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Introduction générale :

Le processus d'isolement des micro-organismes à partir de leurs sources naturelles est un processus continu afin d'obtenir des isolats d'importance économique. En particulier les bactéries lactiques, utilisées dans le monde entier pour la production d'aliments fermentés, les produits traditionnels ont connu un grand développement ces dernières années grâce à l'intérêt des consommateurs sur le plan sensoriel, nutritionnel, thérapeutique ou sanitaire en raison de leur acidité, ces bactéries ne constituent aucun risque pour la santé des aliments, car elles sont mondialement reconnues comme sûres.

Les bactéries lactiques sont l'un des types de bactéries les plus importants dans de nombreux produits alimentaires, au premier rang des produits laitiers en termes d'activité biologique .

Ils sont utilisés depuis des milliers d'années dans la production de nombreux aliments. Ils étaient célèbres pour la préparation de produits laitiers fermentés, mais aussi pour le marinage des légumes, la cuisson et la fabrication du vin, etc. De par ses diverses propriétés technologiques, il contribue à la texture et à la saveur des aliments, notamment par la production de composés aromatiques. (Benkerroum et Tamime 2004) et améliorent la conservation des aliments, en abaissant le pH. (Piard & Desmazeaud, 1991 ; Dortu & Thonart, 2009 , Moraes et al., 2010) que leur introduction dans les aliments soit expérimentalement (Ross et al., 2002) soit industriellement pour améliorer la qualité sanitaire et prolonger la durée de conservation des aliments, ainsi que pour améliorer les fonctions du système digestif et d'avoir un effet très positif sur la microflore intestinale.

Il a été prouvé que la caractéristique la plus importante de ces micro-organismes est la prolongation de la durée de conservation des produits alimentaires fermentés par rapport à ceux qui n'ont pas été manipulés, en raison de leur capacité à inhiber la croissance de nombreuses espèces bactériennes pathogènes et d'altération des aliments grâce , cela se fait en produisant des acides organiques (acide lactique, acide acétique).

D'où l'idée d'isoler les bactéries lactiques des produits conventionnels car l'intérêt de ces souches réside dans leur capacité à produire certains métabolites, notamment ceux responsables de la saveur, qui peuvent différer de ceux produits par les souches industrielles. puis utilisées dans un procédé semi-industriel pour obtenir d'autres produits fermentés de meilleure qualité sanitaire et d'un caractère thérapeutique très avancé, notamment ces

Introduction générale

dernières années ; La recherche s'est intensifiée pour trouver des moyens de thérapies à base de probiotiques pour traiter diverses maladies chroniques.

Enfin, notre objectif dans cette étude était d'obtenir des isolats locaux de bactéries lactiques à partir de différentes sources alimentaires conventionnelles et de déterminer certaines de leurs propriétés morphologiques et physiologiques et identification à l'aide de la technologie API.

CHAPITRE 1

LES PRODUITS LAITIERS

Les Produits Laitiers

1. Les produits laitiers :

La consommation des produits laitiers est également associée à des effets bénéfiques sur la santé en plus de leurs valeurs nutritionnelles (**Takahiro et al. 2007 ; Shanna et al. 2011**).

La transformation du lait en produits laitiers traditionnels algériens, tels que Raib Lben et Jben est réalisée via une fermentation spontanée sans l'ajout d'une entrée sélectionnée (**Badais et al. 2004**).

Ces produits sont partie intégrante d'héritage algérien, Ils ont une grande importance culturelle médicinales, et économique ils ont été développés dans une longue période avec les compétences culinaires de fermes en plus de la conservation des solides du lait longtemps à température ambiante (**Lahsaoui, 2009**).

1.1. Klila ou caséine desséchées :

La Klila est un fromage fermenté produit empiriquement dans plusieurs régions de l'Algérie, il est fabriqué par un chauffage relativement modéré (55 à 75°C) du Leben jusqu'à ce que le Leben s'est coagulé (10 à 15 min), le caillage est ensuite égoutté spontanément ou compressé à l'aide d'une pierre, le fromage obtenu est consommé tel qu'il est frais ou après un séchage il est utilisé comme un ingrédient après réhydratation dans les préparations culinaires traditionnelles.

1.2. Jben :

Jben est un fromage traditionnel frais, sa préparation repose sur la coagulation de lait cru (coagulation enzymatique), tout d'abord le lait de chèvre ou de vache ou un mélange entre les deux est laissé à fermenter spontanément à température ambiante jusqu'à la coagulation, après le lait coagulé est égoutté pour obtenir le caillé qui est le Jben (**Benkerroum et Tamime. 2004**).

1.3. Lebaa ou colostrum :

Le dictionnaire médical définit le "colostrum" comme le premier lait sécrété au moment de l'accouchement, qui diffère du lait sécrété plus tard, car il contient plus de lactalbumine et de lactoprotéine et est également riche en anticorps qui confèrent une immunité passive au nouveau-né, aussi appelé : premier lait (**Godhia et Patel, 2013**)

Les Produits Laitiers

Le colostrum est le lait «précoce» sécrété par les femelles mammifères durant les premiers jours suivant la parturition, le colostrum est le premier aliment naturel du nouveau-né. Fournisseur de nutriments essentiels tels qu'acides aminés, acides gras, vitamines et minéraux, le colostrum apporte également d'importantes molécules bioactives essentielles à des fonctions spécifiques. Parmi ces molécules, les principales sont des promoteurs de croissance, des facteurs Immun modulateurs ainsi que des facteurs antimicrobiens qui protègent le nouveau-né contre les infections et les agressions de son environnement (**Boudry et al. 2009**).

CHAPITRE 2

LES BACTÉRIES LACTIQUES

Les Bactéries Lactiques

2.1. Historique :

Les bactéries lactiques sont de très anciens micro-organismes dont les ancêtres (**Dridier et Prevost, 2009**). Ils ont été utilisés pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans, sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité (**Sallofe, 1994**). Ce n'est qu'à la fin du 19ème siècle, époque des grandes découvertes de la microbiologie, que certaines chercheuses ont isolé un Streptocoque (**Poulain, 1994**), comme Von Freudeinreich en 1897. La production des cultures de bactéries et l'emploi de ferment se développent au début du 20ème siècle (**Dridier et Prevost, 2009**).

2.2. Habitat et origine :

Les bactéries lactiques sont pour habitat de nombreux milieux naturels, des végétaux (Plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales, fèces et dans le lait). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (**De Roissart., 1986**). Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis* sub sp. *Lactis* est isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé). (**Bergey's manual., 2009**) Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux. Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries. Les espèces du genre *Pediococcus* sont présentes surtout dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages (Parmesan et autres fromages italiens) et les préparations culinaires (anchois salés ou sauce de soja). (**Bekhouche., 2006**).

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages (*Lb. casei* sub sp. *casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. brevis*, *Lb. Curvatus*, *Lb. buchneri* et *Lb. San francisco*) (**Demazeaud., 1996**).

Les Bactéries Lactiques

2.3. Définition :

Les bactéries lactiques constituent l'un des groupes incontournables de la microbiologie alimentaire (**Dridet et Prevost, 2009**). Défini pour la 1ère fois par Orla-Jensen (1919), il réunit plusieurs genres caractérisés par leurs capacités à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Novel, 1993**). Micro-organismes ubiquitaires, les bactéries lactiques se trouvent dans différents environnements (**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**) produisant de l'acide lactique comme produit principal

2.4. Caractéristiques générales des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des bactéries possédant une réponse positives à la coloration de Gram, immobiles, non sporulées, au point de vie enzymatique catalase, oxydase et nitrate réductase négative, anaérobies ou aérotolérantes (**Laurent et al. 1998**), se présentant sous formes déférentes, cocci ou bâtonnets (**Bourgeois et Larpent, 1996**). Elles ont des besoins complexes en facteur de croissance : vitamine B, acide aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques. Elles se caractérisent par un métabolisme exclusivement fermentaire les conduisant 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 faible capacité de biosynthèse (**Luquet, 1986**).

2.5. Voies métaboliques des bactéries lactiques :

En se basant sur le produit final de la fermentation, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes :

2.5.1. Homofermentaires :

Regroupe la voie de la glycolyse. Les bactéries lactiques dégradent les hexoses (glucose) qui subit déférentes étapes de transformation pour donner le pyruvate qui est réduite en acide lactique qui est le produit uniques (**Mozzi et al. 2010**). Cette voie est surtout utilisée par les bactéries appartenant aux genres Streptococcus et certaines espèces de Lactobacillus comme Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus casei, Lactobacillus caucasicus, Lactobacillus lactis et Lactobacillus. plantarum et par Thermobacterium yoghurti (**Makhloufi, 2011**).

Les Bactéries Lactiques

2.5.2. Hétérofermentaires :

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires, les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc* et certains *Lactobacillus* (Hadeif, 2012).

2.6. Taxonomie et classification :

En 1919, Orla-Jensen a classé les bactéries lactiques en deux groupes, le groupe des homofermentaires, qui réunit les bactéries formant très peu de métabolites autres que l'acide lactique, le groupe des hétérofermentaires, qui réunit les bactéries formant du lactate, en proportion moindre, ainsi que des concentrations non négligeables de produits secondaires et du CO₂ (Dellaglio et al., 1994).

La classification phénotypique des bactéries lactiques peut se faire selon des critères morphologiques et physiologiques puis phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. (Vandamme, 1996 ; Stiles et Holzopfel, 1997 et Ho et al., 2007). Le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (6,5%, 18%), la tolérance aux pH acides, alcalins et à l'éthanol (Konig et Frohlich, 2009). Selon l'8^e édition de **Bergey's manuel of systématique bactériologie (2009)**, les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la classe des Bacilli et l'ordre des Lactobacillales renfermant trente-cinq genres. Parmi ces genres, seulement treize sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* (Dridier et Privost, 2009) et *Bifidobacterium*, ces derniers repartis entre six familles qui sont : *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae* classées en se basant sur les analyses phylogénétiques des séquences de l'ARNr16s (Ludwig et al., 2009).

En outre, il est à signaler que le nombre d'espèces lactiques d'origine alimentaire nécessite d'augmenter. Très récemment deux nouvelles espèces lactiques ont été isolées de la viande, il s'agit de *Lactobacillus versmoldensis* et *Vagococcus carniphilus* (Shewmaker et al. 2004). Ces deux espèces ont été respectivement isolées du saucisson cru et de la viande hachée (Mora et al. 2003). Récemment les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

Les Bactéries Lactiques

- ✓ Famille des Lactobacillaceae comportant les Lactobacillus, Paralactobacillus et Pediococcus.
- ✓ Famille des Leuconostocaceae contenant les Leuconostoc, Oenococcus et Weissella.
- ✓ Famille des Streptococcaceae comprenant les Streptococcus, Lactococcus et Lactovum.

Les révisions taxonomiques des bactéries lactiques montrent que ces dernières peuvent comprendre environ une quarantaine de genres (**Ludwig et al. 2008**).

2.7. Intérêt des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique :

2.7.1. Dans l'industrie alimentaire :

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bio conservation de différents aliments. Ainsi, les souches de Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (**Yateem et al. 2008**). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (**Badais et al. 2005**). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (**Dortu et Thonart, 2009**).

Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (**Marth et Steele, 2001**).

2.7.2. Dans le domaine thérapeutique :

Étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (**Yateem et al. 2008**). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (**Mkrtchyan et al. 2010**). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (**El-Ghaish et al. 2011**). **Uehara et al.,**

Les Bactéries Lactiques

(2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

CHAPITRE 3

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

Matériel et méthodes :

➤ **L'objectif :**

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

- Isolement des bactéries lactiques à partir de différents échantillons de produits laitiers traditionnels.
- L'étude des caractéristiques phénotypiques, physiologiques et biochimiques des isolats.

➤ **Lieu de l'étude :**

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire pédagogique de microbiologie (Labo 07) du département de Biologie_ Faculté des Sciences - l'**Université d'Ammar thelidji- Laghouat**.

➤ **L'origine des échantillons :**

Vingt échantillons de produits laitiers fabriqués à partir du lait de vache et lait de chèvre ont été utilisés dans ce travail. Ils ont été collectés dans des flacons pendant le mois de Mars 2022 dans la région de Laghouat et d'Aflou puis transportés au laboratoire après refroidissement (Figure 01).

Le tableau suivant indique les différentes origines des échantillons étudiés.

Tableau 01 : origines des échantillons

Échantillons	Date de prélèvement	Produits laitiers	Type de lait utilisé	Région
E1_ E16	22/03/2022	Klila	Lait de vache	Aflou
E17_ E19	27/03/2022	Jben	Lait de vache	Laghouat
E20	28/03/2022	Lebaa	Lait de chèvre	Laghouat



Figure 01 : Les régions des échantillons (Google maps, 1962)



A : Leba



B : Klila



C : Jben

Figure 02 : Produits laitiers traditionnel analysés (original, 2022)

Matériel et Méthodes

3.1. Matériel utilisés :

Pour l'étude de l'isolement des bactéries lactiques, nous avons utilisé l'appareillage, les milieux de cultures et les produits dans le tableau suivant :

Tableau 02 : Matériel utilisé pour l'étude de l'isolement des bactéries lactiques

Appareillage	Les milieux de culture	Verrie	Matériel biologique
. Étuves 30°C, 37°C .Réfrigérateur .Bain-marie .Autoclave .Balance électronique .Bec Bunsen .Plaque chauffante .microscope optique	. Gélose MRS . Gélose M17 . Milieu TSE . Bouillon MRS . Bouillon M17	. Boîtes de Pétri .Tubes à essai .Pipettes pasteur .Erlenmeyers .Flacon stérile .micropipette (0.1ml) . Éprouvette gradué .Anse de platine .Porteurs des tubes	. Klila .Jben . Leba

3.2. Méthodes :

3.2.1. Préparation de la suspension mère :

Dans une zone stérile, découper et peser 10g de chaque échantillon à l'aide d'une spatule stérile dans un flacon stérile, après ajouter 90ml du diluant TSE et bien homogénéiser à l'aide d'un agitateur vortex, Cette première dilution correspond à la suspension mère.



Figure 03 : préparation de la suspension mère (originale, 2022).

Matériel et Méthodes

3.2.2. Préparation des dilutions décimales :

À partir de suspension mère on a effectué des dilutions décimales, ensuite repartir 9ml d'eau physiologie stérile dans une série de deux tubes, après avoir homogénéisé la suspension mère. À l'aide d'une pipette stérile Transféré 1ml dans le tube n°1 ; il représente la dilution 10^{-2} , Après avoir homogénéisé le contenu du tube n°1, transformer 1ml à l'aide d'une autre pipette stérile dans le tube n°2 afin d'obtenir la dilution 10^{-3} .

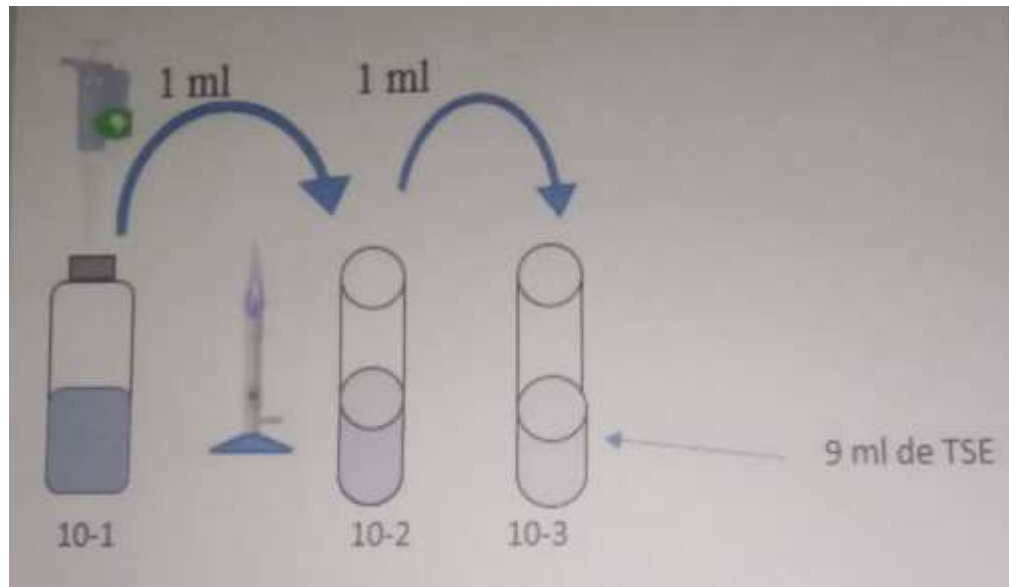


Figure 04 : Préparation des dilutions décimales (k.Rabeh, 2021)

3.2.3. Dénombrement :

Le dénombrement des bactéries lactiques a été effectué sur le milieu MRS et M17. 0,1 ml a été prélevé de chaque dilution choisie et étalé (L'ensemencement a été fait en surface) dans des boîtes de Pétri du milieu MRS et M17. Ensuite, les boîtes ont été incubées à 37°C en condition d'aérobic pendant 48-72 heures. Les Colonies à dénombrer sont de petites tailles, de couleurs blanchâtres et brillantes à pourtours réguliers, elles peuvent apparaître en forme circulaire ou lenticulaire (Kacem et Karam, 2006).

Matériel et Méthodes

Les colonies développées sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies.



Figure 05 : dénombrement des colonies par le compteur de colonie (originale, 2022).

3. 2.4. Isolement et purification des souches :

3.2.4.1. Isolement

L'isolement a été réalisé sur gélose MRS et M17. Préalablement coulée et solidifiée dans des boîtes de pétri, en portant 0.1ml des dilutions à la surface du milieu suivi d'un étalement. L'incubation est fait à 37°C pendant 24h à 48h (**Idoui et al.2009**).

3. 2.4.2. Purification :

Afin de purifier les souches des repiquages successifs sont effectuées sur les bouillons (MRS et M17) et gélose (MRS ou M17). La purification des souches consiste à les ensemençer en stries sur des boîtes de pétri coulées avec des milieux MRS (solide). Les boîtes sont ainsi incubées à 37°C pendant 24h. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures ayant les mêmes caractères (Colonies de même taille, de même forme et de même couleur

Matériel et Méthodes

10g de chaque échantillon (KLILA JBEN/ LBAA) Dans 90ml –TSE.

- ✓ Réalisation d'une série de dilutions des produites.

- ✓ Ensemencement en masse sur gélose

MRS puis incubation à 30°C pendant 72h.

- ✓ prélèvement d'une colonie et repiquage dans 9ml de Bouillon MRS et incubation à 30° C pendant 24h.

- ✓ Ensemencement en surface par la méthode de stries sur Gélose MRS ET M17 et incubation à 30°C pendant 72 h.

- ✓ repiquage successive jusqu'à purification et incubation à 30°C pendant 72h.

- ✓ pré-identification des souches par observation microscopique après coloration de gram et recherche de catalase.

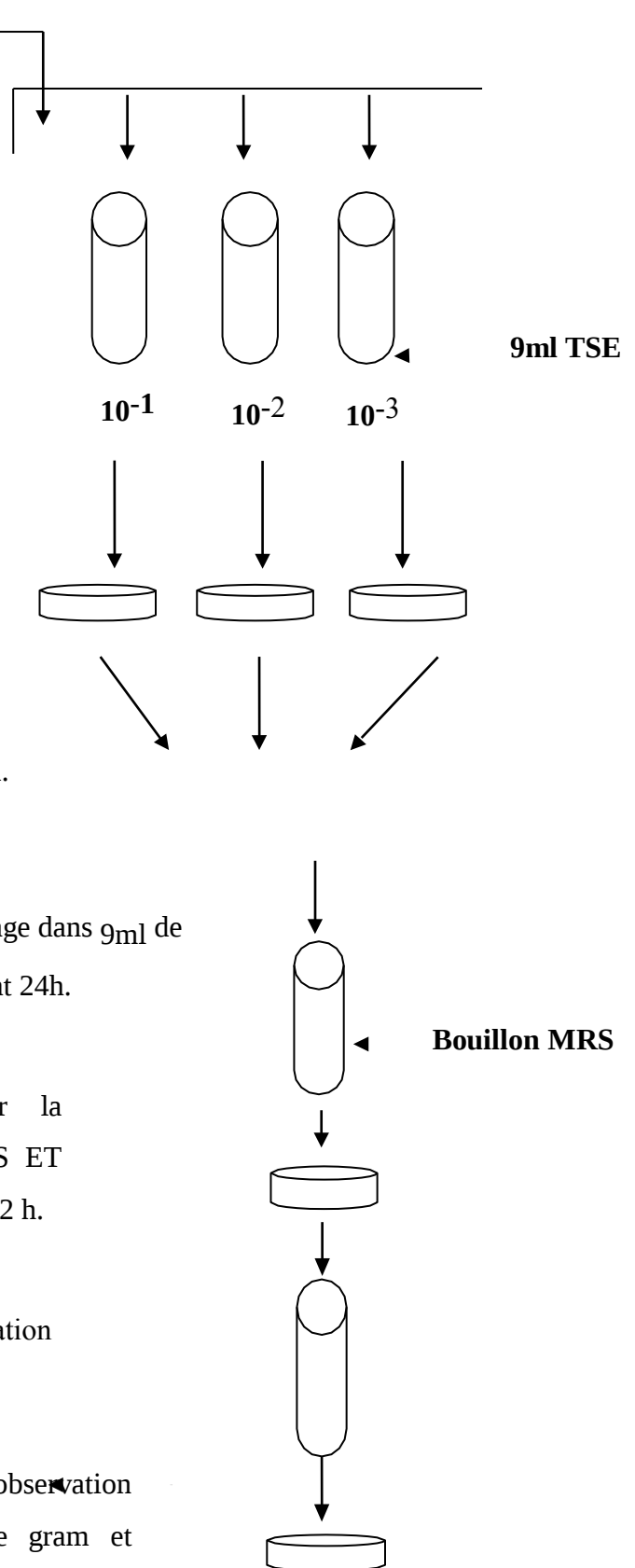


Figure 06 : Diagramme d'isolement et de purification des souches

Matériel et Méthodes

3.3_ Conservation des souches :

Pour assurer une bonne continuité du travail, les isolats doivent être conservées dans des conditions adéquates, La conservation était réalisée par deux méthodes, une conservation à courte et une autre à longue durée.

3.3.1. Conservation à courte durée :

Les souches pures sont cultivées sur gélose MRS inclinée en tube pendant 48 à 30°C à l'étuve, leur conservation se fait à 4°C pour une durée de une à quelques semaines selon la souche. Des repiquages sont effectués périodiquement.

3.3.2. Conservation à Longue durée :

Les souches sont congelées à -20°C. . Elle consiste par ensemencement les souches sur gélose MRS et M17 en boîte de pétri.

3.4_ Identification des bactéries lactiques :

L'identification des souches a été basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimique et physiologique (**Lamouliatte et al. 1992 ; Mégraud. 1994**).

3.4.1. Tests morphologiques :

3.4.1.1. L'aspect macroscopique :

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS solide et liquide ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies sur milieu solide et le trouble dans le milieu liquide (**Badais et al. 2005**).

3.4.1.2. L'aspect microscopique :

On utilise le microscope optique pour déterminer par la suite la forme et la disposition des cellules bactériennes ; ainsi que leur type de Gram (Gram+ pour les bactéries lactiques). (**Berradia Amouria.2016**).

3.4.1.2.1. Etat frais :

Un tube contenant le milieu MRS liquide (10ml) est inoculé par une colonie isolée sur gélose MRS, on incube à 30°C pendant 24 heures, jusqu'à l'apparition d'un trouble

Matériel et Méthodes

microbien. Pour la mobilité et la forme une lame additionnée d'une goutte de la culture est observée au microscope (**Attallah et belyagoubi, 2003**).

3.4.1.2.2. Coloration de Gram :

Un frottis qui est préparé et fixé à la chaleur, est recouvert par le violet cristal oxalate pendant une minute, puis rincé à l'eau distillée et recouvert par Lugol et laissé agir pendant une minute. Le frottis est rincé à l'eau distillée puis décoloré à l'alcool à 95° pendant 15 à 30 secondes et rincé à nouveau par l'eau distillée. Il est recoloré par l'ajout de fushine et laissé agir 10 à 30 secondes (ou l'ajoute de fuchsine pendant 1 min) puis rincé à l'eau distillée. Le frottis est séché au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen, et observé au microscope à l'objectif x100 à immersion. Avec cette coloration doublée, les bactéries « Gram+ » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram- » sont colorées en rose ou en rouge (**Delarras. 2014**).

3.4.2. Tests biochimiques :

3.4.2.1_Test de la catalase :

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage. Sur une lame propre, déposer une goutte d'eau oxygénée (10 volumes) puis ajouter une colonie bactérienne, une catalase positif est indiqué par le dégagement de bulles de gaz (**Delarras. 2014**).

3.4.3. Tests physiologiques :

3.4.3.1. Type fermentaire :

Dans des tubes à essai contenant des cloches de Durham, on verse un milieu MRS liquide pour mettre en évidence la production de gaz. Ensuite on ensemence les souches. Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO₂ par contre les souches hétérofermentaires vont produire l'acide lactique et le CO₂ a proportions égales (**Carr et al. 2002**).

3.4.3.2. La Thermorésistance :

Des tubes contenant 10 ml de MRS liquide sont inoculés par les souches isolées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à 60°C pendant 30 min, après

Matériel et Méthodes

refroidissement, elles sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures. Un résultat positif se traduit par un trouble (**Badis et al. 2005**).

3.4.3.3. Culture en présence de 4% et de 6,5% de NaCl :

Ce test consiste à ensemencer les isolats dans des tubes contenant le bouillon MRS à 4% et 6,5% de NaCl (**BIOCHEM, Canada**) et les incuber à 30°C pendant 2 à 3 jours. La Croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (**Guiraud et Galzy, 1980**).

3.4.3.4. Croissance en différentes températures :

L'aptitude à la culture est testée à 10°C, 35°C en ensemencant des tubes de bouillon M17 et MRS. Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (**Leveau et al, 1991**). Les tubes sont examinés au bout d'un délai de 24 heures, la croissance est appréciée par l'apparition de trouble.

3.4.4. Identification par la galerie API 50 CH :

Les bactéries Gram positives, catalase et oxydase négatives ont fait l'objet d'une analyse biochimique par le système API bio Mérieux en utilisant la galerie API 50CH avec API 50 CHL medium (**biome rieux, Marcy l'étoile, France**). L'ensemencement et la lecture de la galerie ont été réalisés selon les instructions du fabricant.

Ils se font de la façon suivante :

- cultiver la souche pure sur milieu MRS gélosé 24h à 30°C.
- ouvrir une ampoule de Suspension medium (2 ml), prélever toutes les colonies de la culture, à l'aide d'un écouvillon, et réaliser une suspension dense dans l'ampoule.
- ouvrir une ampoule de Suspension medium (5ml) et réaliser une opacité égale à 2 McFarland en transférant un certain nombre de gouttes de la première suspension, noter ce nombre de gouttes (n).
- ouvrir une ampoule d'API 50 CHL Medium et inoculer avec deux fois le nombre de gouttes trouvées (2n), homogénéiser.
- répartir API 50 CHL ainsi inoculé dans les tubules, et recouvrir avec de l'huile de paraffine stérile, incuber à 30°C en aérobiose pendant 48h.

Matériel et Méthodes

- tous les tests sont lus à 24h et 48h (on recherche dans chaque tubule l'acidification produite qui se traduit par le virage au jaune du pourpre bromocrésol contenu dans le milieu. Pour le test esculine, on observe un virage du pourpre au noir).
- enregistrer les résultats obtenus, le profil biochimique ainsi obtenu peut être lu grâce au site API WEB.

CHAPITRE 4

Résultats et Discussion

Résultats et Discussion

Résultats et discussion :

5. Les analyses microbiologiques :

5.1.Dénombrement les colonies bactériennes :

Le dénombrement a été effectué sur milieu gélosé M17 et MRS en partant de la dilution 10^{-2} .

L'incubation a été faite à 30°C pendant 24 à 48h (**figure 07**).

Les résultats du dénombrement des colonies sont montrés dans le (**Tableau 03**).

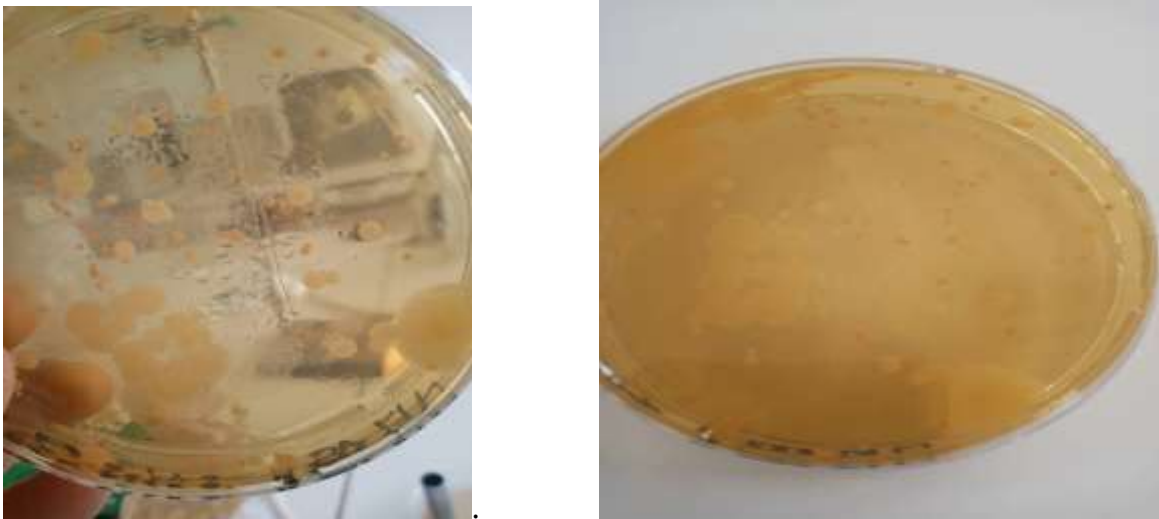


Figure 07 : Dénombrement des colonies sur milieu gélosé M17 et MRS à 30°C. (Photos originale.2022).

Résultats et Discussion

Tableau 03 : Dénombrement des colonies sur milieu gélosé M17 et MRS, de la klila et jben.

MRS			
Échantillons E1_E10	Dénombrement 10 ⁻² ufc/ml	Échantillons E11_E20	Dénombrement 10 ⁻² ufc/ml
E1	7.10 ²	E11	1,6.10 ²
E2	1.10 ²	E12	1,90.10 ²
E3	9.10 ²	E13	3,4.10 ²
E4	1,7.10 ²	E14	2.10 ²
E5	3.10 ²	E15	2,00.10 ²
E6	7.10 ²	E16	4,3.10 ²
E7	1.10 ²	E17	Indénombrable
E8	1,4.10 ²	E18	3,82.10 ²
E9	9.10 ²	E19	Indénombrable
E10	1,6.10 ²	E20	2,51.10 ²
M17			
Échantillons E1_E10	Dénombrement 10 ⁻² ufc/ml	Échantillons E11_E20	Dénombrement 10 ⁻² ufc/ml
E1	0	E11	3,1.10 ²
E2	1.10 ²	E12	3,5.10 ²
E3	3,3.10 ²	E13	1,07.10 ²
E4	2,1.10 ²	E14	5.10 ²
E5	8,8.10 ²	E15	1,99.10 ²
E6	1.10 ²	E16	4,5.10 ²
E7	8.10 ²	E17	Indénombrable
E8	Indénombrable	E18	Indénombrable
E9	Indénombrable	E19	Indénombrable
E10	1,3.10 ²	E20	Indénombrable

La lecture après d'incubation : les boites contenant entre une colonie et 382 colonies.

Résultats et Discussion

5.2. Isolement et purification :

À partir de vingt échantillons des produits laitiers. 8 souches sont peut-être isolées et qui sont révélées positives à la coloration de Gram et test catalase négative

5.3. Pré-identification des bactéries lactiques :

5.3.1. Etude morphologiques :

A. Aspect macroscopique :

Sur milieu solide :

Concernant nos isolats testés, nous avons constaté sur milieu solide :

Des colonies de petite taille d'environ 0,5 à 1 mm de diamètre, de forme circulaire, et de couleur blanchâtre. (**Figure 08 et Tableau 04**).

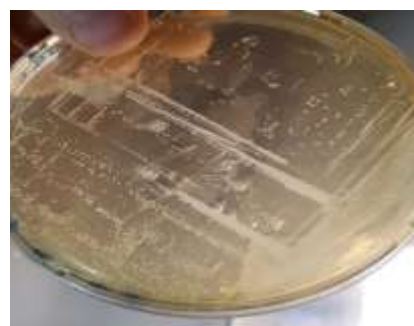


Figure 08 : Aspects macroscopique des souches lactiques en milieu MRS solide (Photos originale.2022).

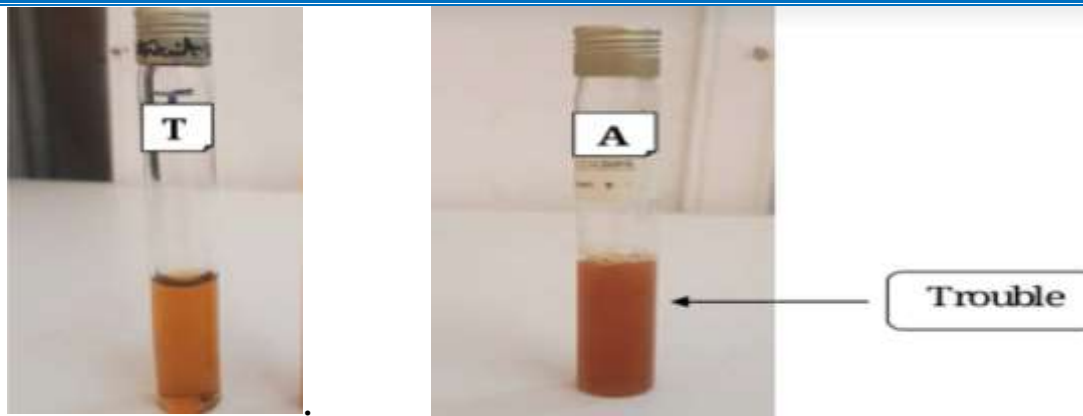
Résultats et Discussion

Tableau 04 : Aspects macroscopique des souches bactéries lactiques isolées.

Échantillons	Code de souches	Milieu 30°C	Observations macroscopique
Klila	7c1	MRS	blanchâtre, grosse Colonie circulaire
	8c1	MRS	blanchâtre très petites colonies
	11c3	MRS	blanchâtre très petites colonies
	12c3	MRS	blanchâtre petites colonies
	15c1	MRS	blanchâtre, grosse colonie circulaire
	16c2	M17	blanchâtre petit colonie
Jben	18c1	MRS	blanchâtre petit colonie
	19c1	MRS	blanchâtre petit colonie

Par contre, l'observation macroscopique en milieu liquide nous a permis d'observer un trouble assez dense comparativement au témoin, ce qui indique une croissance bactérienne au fond du tube. **(Figure 09).**

Résultats et Discussion



T : Témoin.

A : culture microbienne

Figure 09 : Aspect des souches lactiques pures en milieu MRS liquide (Makhlouf.S., Souane.A. (2017).

B. Aspect microscopique :

B.1.Coloration de Gram :

Selon **Drouault et Corthier (2001)**, les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif. Nos résultats indiquent que les cellules observées après coloration de Gram sont voilettes pour toutes les isolats donc ce sont des bactéries à Gram positif. Ces résultats concordent avec celles retrouvées par **Lairini et al. (2014)**. Selon **Savado et Traore (2011)**, il existe deux grands groupes de bactéries lactiques morphologiquement bien distincts : les cocci et les bacilles. L'observation microscopique a révélé deux formes de cellules : bacilles (S1, S2, S5) et cocci (S3, S4, S6, S7, S8)

_les différentes formes observées sont décrites comme suit :

- Des coques disposées en chaines, et en paires.
- Des bacilles disposés en chaines et en paires. Voir **(le Tableau 05 et figure 10)**.

Résultats et Discussion

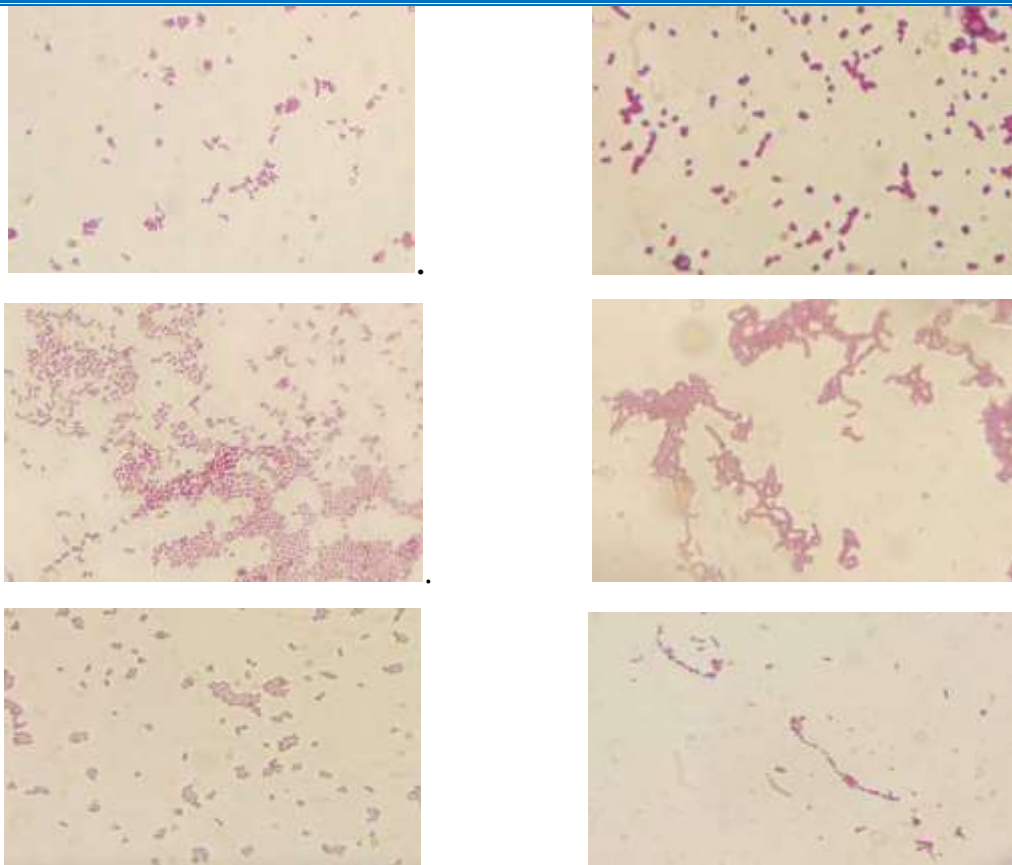
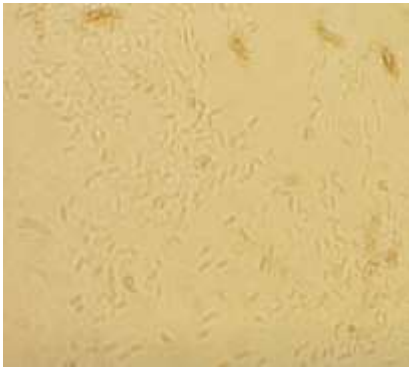


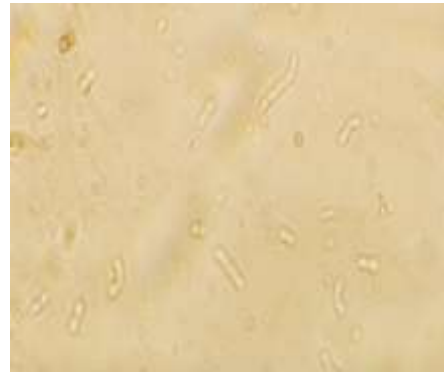
Figure 10 : Observations microscopiques des bactéries lactiques après une coloration de Gram avec un grossissement (G : x100) (Photos originale.2022).

Résultats et Discussion

B.2. Examen à l'état frais :



A : bacille



B : Cocci en chaîne



C : Cocci

Figure 11 : observations microscopique des bactéries lactiques après un examen à l'état frais avec un grossissement (G : $\times 100$) (Photos originale.2022).

Résultats et Discussion

Tableau 05 : Résultats de test catalase, coloration de Gram, Examen microscopique.

Les souches	Produits d'isolement	Test catalase	Coloration de Gram	Milieu de culture	Examen microscopique
7c2	Klila	–	+	MRS	Bâtonnet en chaîne diplobacille immobiles
8c1	Klila	–	+	MRS	Bâtonnet courts en chaîne diplobacille immobile
11c3	Klila	–	+	MRS	cocci en chaînettes immobile
12c3	Klila	–	+	MRS	Cocci en chaînettes immobile
15c1	Klila	–	+	MRS	bâtonnet et courts diplobacille immobile
16c2	Klila	–	+	M17	Cocci diplocoque en chaîne immobile
18c1	Jben	–	+	MRS	Cocci en chaînettes isolées diplocoque immobile
19c1	Jben	–	+	MRS	cocci en chaîne diplocoque isolées immobile

5.4. Identification des bactéries lactique :

5.4.1. Tests physiologiques et biochimiques :

5.4.1.1. Test de la catalase :

Les bactéries lactiques ne possèdent pas d'activité catalasique (absence de bulles).

Elles sont dites catalase négative. Ces caractéristiques permettent leur classification au groupe des bactéries lactiques selon **Savado et Traore (2011)**. Ces résultats concordent avec ceux retrouvés par **Lairini et al. (2014)**.

Résultats et Discussion



Figure 12 : Résultat de test de catalase (Benmimoun Mhamed.2018).

5.4.1.2. Test de la thermorésistance :

La thermorésistance est un caractère physiologique permettant de distinguer entre les souches pouvant tolérer une température de 60°C pendant 30 min de celles qui en sont incapables (**Tableau 06**).

Le résultat positif se traduit par un trouble. Seules les souches (S1, S2, S5, S6, S8) poussent, contrairement aux souches (S3, S4 et S7) qui sont incapables de se développer.

5.4.1.3. Croissance en milieu hypersalée :

C'est un milieu hostile pour la plupart des bactéries, celles qui le tolèrent peuvent y pousser. Après incubation la tolérance est marquée par un trouble dans les tubes.

Les résultats ont révélé que :

- ✓ Les souches (S1, S2 et S7) ont pu résister à cette concentration de NaCl 6,5%.
- ✓ les isolats (S5 et S6) sont résistants à 4% de NaCl
- ✓ Les isolats (S3, S4 et S8) sont résistants à 4% et 6.5% de NaCl. Voir (**le Tableau 06**).

5.4.1.4. Recherche de type fermentaire :

Les souches isolées et testées sont toutes homofermentaires, aucune production de gaz dans les cloches n'a été enregistrée, voir (**le Tableau 06 et Figure 13**).

Résultats et Discussion



Figure 13 : Résultats de test de type fermentaire (Berradia Amouria.2016).

5.4.1.5. La croissance aux différentes températures :

Les variations de température d'incubation pour les différents isolats est un critère physiologique de sélection pour l'identification (**Tableau 06**). Les résultats de ce test permettent de distinguer Toutes les souches isolées et purifiées ont poussé à 10°C et 30°C et 35°C.

Tableau 06 : Résultats de test physiologique

Les souches	Différente températures		Tests fermentaire 30°C à 24_48h	Tests thermorésistante 30°C à 48h	Milieu hypersalé	
	10c°	35c°			4%	6,5%
S1	+	+	homofermentaire	+	—	+
S2	+	+	homofermentaire	+	—	+
S3	+	+	homofermentaire	—	+	+
S4	+	+	homofermentaire	—	+	+
S5	+	+	homofermentaire	+	+	—
S6	+	+	homofermentaire	+	+	—
S7	+	+	homofermentaire	—	—	+
S8	+	+	homofermentaire	+	+	+

+ : Croissance ; — : Pas de Croissance.

Résultats et Discussion

5.4.2 Identification par la galerie API 50 CH :

L'utilisation de la plaque API 50CH est une étape confirmative indispensable dans l'identification des souches. Après 48h d'incubation, il a été remarqué un virage de la couleur du milieu de culture de pourpre au jaune. Ce virage de l'indicateur coloré est attribué à la production d'une quantité plus ou moins forte d'acide lactique par les deux souches en utilisant les sucres fermentescibles. Parmi les 08 souches, 4 souches (15c1, 8c1, 7c2, 19c1) ont été sélectionnées (**Tableau 07 et Figure 14**).

Pour une identification approfondie avec les galeries API 50 CH. L'interprétation de ces tests a été faite par l'utilisation du logiciel Api web TM (**site internet : lab.upbm.org/dentifieur/**) qui suggère une appartenance de la souche (15c1) est l'espèce *Lactobacillus plantarum* donnant une identité probabilistique de 100%. Par contre l'interprétation des résultats de la souche (8c1et7c2) suggère une appartenance à même espèce. *Lactobacillus collinoides* donnant une identité probabilistique de 67.4% pour (8c1) et 100% pour la souche (7c2), mais 4ème souche est non identifier.



Figure 14 : Profil de fermentation des sucres de la souche pure de bactéries lactiques sur la galerie API50 CH après 48h d'incubation. (Photos originale.2022).

Résultats et Discussion

Tableau 07 : Résultats d'identification par la plaque API 50 CH

Les souches	Taxon	Pourcentage d'appartenance
15c1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%
8c1	<i>Lactobacillus collinoides</i>	67,4%
7c2	<i>Lactobacillus collinoides</i>	100%
19c2	Non identifié	/

Résultats et Discussion

Discussion générale :

A partir de vingt échantillons de produits laitiers, nous avons isolé huit souches de bactéries lactiques, les quatre souches identifiées sont des souches de genre *Lactobacillus*, elles se sont révélées positives à la coloration de gram et négative à la catalase (car on n'a pas obtenu des bulles gazeuses après le dépôt de l'eau oxygénée sur la colonie cible, qui est conforme aux résultats trouvés par **(Carr et al. 2002)**).

Les bactéries lactiques dénombrées sur MRS présentent une charge de 1.10^2 UFC/ml jusqu'à $3.82.10^2$ UFC/ml. Par contre sur M17, présentent une de 1.10^2 UFC/ml jusqu'à $1.99.10^2$ UFC/ml. Cette valeur est beaucoup plus inférieure à celle du lait cru de vache en comparant les résultats trouvés par celle de **Moudjahid et al. (2013)** qui varie de $1,04.10^7$ à $1,68.10^8$ UFC/ml. D'après les résultats on constate que le nombre de bactéries lactiques du Leba, Klila et Jeben est inférieur à celui du lait cru de vache.

L'étude macroscopique réalisée sur milieu solide nous a permis d'observer de petites colonies blanchâtres et grosses colonies circulaires, lisses et régulières, notre étude est en accord avec l'étude de **(Klein et al. 1998 ; Axelsson, 2004 ; Hammes et Hertel, 2006 ; Tabasco et al. 2007)**.

L'examen microscopique nous a permis d'observer deux groupes des bactéries lactiques bien distincts : les cocci et les bacilles **(Savado et Traore (2011))**, et tous sont des bactéries immobiles.

Les résultats d'identification de cette étude montrent une présence majoritaire de coques avec 75% par rapport aux bacilles qui ont été retrouvées à des faibles pourcentages 25%. Le même type de résultat est apporté par **Franciosi et al. (2009) ; Cheriguene A. (2008) ; Bekhouche F. Boulahrouf A. (2005) et Kacem M. et al., (2002) ; Sahlellou S. (2017)**.

Les souches isolées dans le présent travail sont de type homofermentaire (absence de dégagement de CO_2 dans la cloche de Durham) ce résultat indique que cette souche appartient au genre *Lactobacillus* **(Hammes et Hertel, 2006)**.

Les souches isolées sont capables de croître à 10°C , 30°C et 35°C , elles peuvent aussi croître en présence de 4% de NaCl et à 6.5 %.

La thermorésistance a été aussi testée à 60°C pendant 30min dont la croissance de nos souches (S1, S2, S5, S6, S8) était positive, par contre les souches (S3, S4 et S7) les résultats

Résultats et Discussion

étaient négatives. La plupart des isolats sont résistants, notre étude concorde avec l'étude de **Higuchi et al. (1997)**.

Les espèces de lactobacilles ont une grande capacité à résister à des conditions environnementales inappropriées telles qu'une salinité élevée et une faible acidité en raison de leur capacité à dépenser de l'énergie pour mener des réactions biologiques qui les aident à s'adapter à de nouvelles conditions.

Les résultats d'identification par API 50 CH ont révélé 2 types de *Lactobacillus* (*Lb. plantarum* et *Lb. collinoides*) les deux espèces ont été isolée du klila. **Solon (Larpent, 1996)**, une souche fermente la majorité des sucres en revanche, elle ne fermente **pas la xylose**, l'inositol, mais dégrade légèrement le rhamnose. Cette souche est identifiée *Lactobacillus plantarum*.

Il est à noter que les deux espèces (*Lb. plantarum* et *Lb. collinoides*) ont poussé à une température comprise entre 10°C et 35°C, ce qui est cohérent avec la preuve de **(Bourji, 2011)** qui a confirmé que, certains isolats poussent entre 10°C à 35°C. L'espèce *Lb. plantarum* a été cultivée à une concentration de 4% d'NaCl et qui a fini par pousser, en outre, elle n'a pas poussé à une concentration de 6.5% d'NaCl et n'a pas produit les gaz, cela concorde avec l'étude d'Azadnia et al (2011). Par contre, *Lb. collinoides* a poussé à une concentration de 6.5% d'NaCl.

Selon **(Valérie Coeuret., (2003))**. Les lactobacilles sont l'un des genres les plus importants de LAB. Dans le lait cru et les produits laitiers, les lactobacilles sont naturellement présents ou ajoutés intentionnellement, pour des raisons technologiques ou pour générer un bénéfice pour la santé du consommateur. Donc, les deux types que nous avons obtenus sont très importants et bons pour la santé humaine.

CONCLUSION

Conclusion

CONCLUSION :

Les bactéries lactiques sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (**Stiles et al. 1997**). Elles sont principalement utilisées dans les produits fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation des aliments.

Le but de ce travail est d'identifier les souches isolées à partir de trois substrats différents des produits laitiers (klila, jben et leba) et de connaître la nature et le genre de bactéries lactiques dans la région de Laghouat.

L'étude expérimentale, divisée en trois parties, a consisté d'abord à dénombrement des bactéries lactiques et vérifier la pureté de nos souches bactériennes, et à confirmer l'identité de nos souches lactiques par des tests biochimiques et physiologiques et par la galerie Api 50 CH.

Après isolement, purification et identification des souches bactériennes. Nous avons pu obtenir deux espèces différentes : *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus collinoides*. Sur un total de vingt isolats étudiés.

Les résultats de caractérisation obtenus, ont permis d'avoir une idée sur la nature des bactéries lactiques présentes dans les produits laitiers, et on conclure que la majorité des espèces des bactéries lactiques sont présentes dans klila. A partir de cette étude, on a démontré que les produits laitiers de la région de Laghouat contiennent un seul type des bactéries lactiques de genre *Lactobacillus*, comme *Lb plantarum* et *Lb collinoides*. Ces isolats peuvent être exploités pour la confection d'un starter de culture qu'on utilise dans la fabrication des aliments (le fromage, le yaourt...).

Ce travail ouvre des Perspectives futures comme :

- ✓ La réalisation des analyses organoleptiques et nutritionnelles des échantillons du «jben, klila et leba» .
- ✓ Les caractéristiques moléculaires des souches.

Enfin, ces résultats peuvent être très intéressants du point de vue microbiologique.

ANNEXES

Annexes

ANNEXES :

Annexe 01 : Composition des milieux de culture :

Milieu M17 : Utilise pour la culture des lactocoques

Extrait de viande.....	5g
Extrait de levure.....	2,5 g
Acide ascorbique.....	0,5g
Peptone de soja.....	5g
B-glycérophosphate.....	19g
Peptone papistique de viande.....	2,5g
Sulfate de magnésium.....	0,25g
Lactose.....	5g
Peptone triasique de caséine.....	2,5g
Agar.....	18g
Eau distillée.....	1000ml

On ajuste le pH à 7,2

Autoclave 20 min à 120°C.

Milieu MRS : Utilise pour la culture des lactobacilles

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	8g
Extrait de levure.....	4g
Glucose.....	20g
Phosphate di potassique.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g

Annexes

Sulfate de magnésium, 7H 2O.....	0,2g
Sulfate de manganèse, 4H 2O.....	0,05g
Tween 80.....	1ml
Agar.....	18g
Eau distillée.....	1000ml

On ajuste le pH à 6,5

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Milieu API 50 CHL :

Polypeptone	10g
Extrait de levure.....	50g
Tween 80.....	1 ml
K ₂ HPO ₄	29g
Acétate de sodium	5g
Citrate diammoniaque.....	2 g
Sulfate de magnésium.....	0.20g
Sulfate de manganèse.....	0.05 g
Bromocrésol Pourpre	0.17 g

Bouillon hypersalée : Employée pour différencier les lactocoques et streptocoques thermophiles.

Peptone.....	15g
Extrait de viande.....	5g
Glucose	5g
NaCl.....	65g
Eau distillée.....	1000ml

On ajuste le pH à 6,5 Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20min

Annexe 02 : Les dilutions

Eau physiologique : Utilise pour la réalisation des dilutions.

Chlorure de sodium..... 8,5 g

Peptone..... 0,5 g

Eau Distillee..... 1000 ml

pH =7 AUTOCLAVAGE : 120°C PENDANT 20 MINUTE

Référence bibliographique

Référence Bibliographique

Référence bibliographique :

1. ALLOUACHE Karima., SMAOUN Ouissam ,2017. Caractérisation de souches locales de bactéries lactiques isolées à partir de quelques produits laitiers artisanaux et mise au point d'un produit type "Raib" .Université A. MIRA - Bejaia 14
2. BELARBI Fatima.,(2011)- Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes. Mémoire de Magistère.Université d'ORAN Es Senia.
3. BELARBI Fatima.2011.Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes. Université d'ORAN Es Senia Faculté des Sciences.
4. BENMERZOUK Amina ., MEHASSOUEL Akila,. (2017).Criblage et Sélection des Bactéries Lactiques ayant des Propriétés Technologiques pour la Fabrication du Fromage. Université Mohammed Seddik Benyahia - de Jijel
5. BOUADJAIB Sarah., (2013)-Etude physico-chimique du produit laitier traditionnel du Sud algérien «Jben» Recherche du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques. Université Abou Beker Belkaid.
6. Boutouatou Linda, Miloudi Hanane, .Ben Aouida Ratiba.2004. Isolement, Purification, Caractérisation et Identification des bactéries lactiques. Université de Jijel Faculté des sciences.
7. Chekhchoukh Meriem, .Souici Nihed Rafika ,.Zitouni Ahlem.2016.Intérêt technologique des bactéries lactiques du lait de chamelle. Université M'hamed Bougara de Boumerdès Faculté des sciences.
8. Djermane Ibtissem.2020.Dénombrement, isolement et identification de bactéries lactiques à activité antibactérienne Isolées à partir de lait et de fromage traditionnel Bouhezza de chèvre. UNIVERSITE LARBI BEN M'HIDI OUM EL-BOUAGHI.
9. Gasmi Malia., Khadir Kelthoum.,(2020). Isolement et dénombrement des bactéries lactiques de la viande de dromadaire réfrigérée.UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA. HANSAL Nabila.,(2015)- Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de *Leuconostoc mesenteroides* isolé à partir du lait cru de chèvre .Université d'oran Ahmed Ben Bella .
10. Ikram HAMMI.2016.Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries Lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français. Thèse de Doctorat. L'Université de Strasbourg.

Référence Bibliographique

11. KANOUN Khedoudja., (2021)-Isolement et identification des bactéries antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes multirésistantes. UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES.
12. KHATER IMANE ,GHEFAR., MOKHTARIA.(2017). Dénombrement et caractérisation de la flore lactique et la flore de contamination du « jben » traditionnel fabriqué par des coagulants de nature végétale. UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN.
13. Makhlouf Sarah., Souane Asmae, 2017. Optimisation du milieu de culture pour la production des bactériocines des bactéries lactiques. Université Abdelhamid Ibn Badis_Mostaganem Faculté des sciences de la Nature et de la vie.
14. Makhlouf Sarah., Souane Asmae, 2017.Optimisation du milieu de culture pour la production des bactériocines des bactéries lactiques. Université Abdelhamid BN Badis-Mostaganem.p3.
15. Mami Anas.2013.Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. THÈSE DE DOCTORAT. Université d'Oran.
16. Mat Allah amina.2017.Contribution à l'étude des potentialités technologique des souches isolées de produits laitiers traditionnels Algériens. UNIVERSITE de TLEMCEN Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de L'Universitaire.
17. MEDJAOUI Ikram., (2018)- Contribution à la caractérisation moléculaire de la flore du lait maternel et des selles des nouveau-nés de la population de l'ouest Algérien. Thèse de doctorat .
18. Melle DJELLOUL-DAOUADJI Soumia.2021.Isolement et identification des bactéries antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes multirésistantes.UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES.
19. Melle BERRADIA AMOURIA.2016.Isolement, purification et Identification des bactéries lactiques à partir de lait cru de chèvre. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.p44
20. Meryem MOUMENE.2016.Isolement et identification des bactéries lactiques et étude de l'effet antagoniste vis-à-vis des germes pathogènes. UNIVERSITE 8 MAI 1945-GUELMA .
21. Mlle BEDOUD Hidaya., Mlle BOUFENINZA Loukha., Mlle BOUZIANE Soumia.,2019.Isolement de bactéries lactiques du « liba » et étude de leurs propriétés technologiques et antimicrobiennes..جامعة محمد الصديق بن يحي جيجل

Référence Bibliographique

22. Mr BENMIMOUN MHAMED.2018.Facteurs favorables à l'isolement des Lactobacilles des laits de vache, brebis et chèvre. Université Abdelhamid Ibn Badis- Mostaganem .
23. N. SAIDI et al . Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du Lait Cru de Chèvre des Régions Arides d'Algérie.Université d'Oran. BP 16 Es-Sénia, 31100, Oran, Algérie, Journal Algérien des Régions Arides.
24. S. LAIRINI et al, Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir, 10(4) 2014.