

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

جامعة جيجل

Université de Jijel

M. MB.05/14

01  
32

Faculté des Sciences de la Nature et de la  
Vie

Département : Microbiologie Appliquée et  
Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة و الحياة  
قسم: الميكروبيولوجيا التطبيقية  
و علوم التغذية

## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Biologie**

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Identification des bactéries lactiques isolées de *klila*  
et évaluation de leurs propriétés probiotiques.**

### Membres de Jury

Président : D<sup>r</sup>. SIFOUR Mohamed

Examineur: M<sup>r</sup>. KHENNOUF Tarek

Encadreur : M<sup>lle</sup>. AMIRA Samiya



### Présenté par:

M<sup>lle</sup>. AKIKA Imène

M<sup>lle</sup>. ZEKIOUK Malika

Année Universitaire 2013-2014

Numéro d'ordre (bibliothèque):

## Tables des matières

Liste des tableaux .....	I
Liste des figures .....	II
Liste des photos .....	III
Liste des abréviations .....	
Introduction .....	01
<b>Partie I : Synthèse Bibliographique</b>	
<b>Chapitre : Bactéries lactiques</b>	
I. Propriétés générales .....	02
I.1 Classification des bactéries lactiques.....	02
I.2. Caractéristiques de quelques genres des bactéries lactiques .....	03
I.2.1. <i>Streptococcus</i> .....	03
I.2.2. <i>Leuconostoc</i> .....	03
I.2.3. <i>Wissella, Oenococcus</i> .....	04
I.2.4. <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i> .....	04
I.2.5. <i>Carnobacterium</i> .....	04
I.2.6. <i>Lactococcus</i> .....	04
I.2.7. <i>Enterococcus</i> .....	05
I.2.8. <i>Vagococcus</i> .....	05
I.2.9. <i>Aerococcus</i> .....	05
I.2.10. <i>Lactobacillus</i> .....	05
I.2.11. <i>Bifidobacterium</i> .....	06
I.3. Habitat des bactéries lactiques .....	07
I.4. Aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques .....	07
I.4.1. Production d'acide lactique .....	07
I.4.2. La protéolyse.....	08
I.4.3. La lipolyse.....	08
I.4.4. La production de composés antagonistes .....	08

I.4.5. Le pouvoir aromatisant .....	08
I.4.6. Le pouvoir texturant.....	09
I.4.7. La tolérance aux acides.....	09
I.4.8. La tolérance aux sels biliaires.....	09

**Chapitre : Produits laitiers et fromages traditionnels** ..... 17

I. Produits laitiers Algériens.....	10
I.1. <i>Rayeb</i> .....	10
I.2. <i>Lben</i> .....	11
I.3. <i>Jben</i> .....	11
I.4. <i>Bouhezza</i> .....	11
I.5. <i>Ighounane</i> .....	11
I.6. <i>Takammart</i> .....	12
I.7. <i>Ibakhbakhane</i> .....	12
I.8. <i>Imadhghass</i> .....	12
I.9. <i>Adhghass</i> .....	12
I.10. <i>Aghoughlou</i> .....	12
I.11. <i>Klila</i> .....	12
I.11.1. Les étapes de production.....	13

**Partie II : Matériel et méthodes** ..... 19

II. Matériel et méthodes .....	14
II.1. Matériel.....	14
II.1.1. Matériel biologique .....	14
II.1.1.1. <i>Klila</i> .....	14
II.1.2. Les milieux de culture .....	14
II.1.3. Disques d'antibiotiques .....	15
II.1.4. Les souches indicatrices .....	15
II.1.5. Les sucres utilisés .....	15
II.1.6. Appareillage .....	16

II.1.7. Produits chimiques, réactifs et tampons .....	16
II.2. Méthodes .....	16
II.2.1. Revivification et purification des souches.....	16
II. 2.1.1. Examen macroscopique.....	17
II. 2.1.2. Examen microscopique .....	17
II. 2.2. Tests physiologiques et biochimiques .....	17
II. 2.2.1. Test de la catalase.....	17
II.2.2.2. Recherche de l'arginine dihydrolase .....	17
II. 2.2.3. Le développement des souches à différentes températures .....	18
II. 2.2.4. Culture en présence de NaCl .....	18
II. 2.2.5. Profil fermentaire des sucres .....	18
II. 2.2.6. Recherche de type fermentaire .....	18
II. 2.3. Etude de quelques aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries Lactiques ....	19
II. 2.3.1. Aptitude acidifiante .....	19
II. 2. 3.1.1. Détermination du pH .....	19
II. 2.3.1. 2. Détermination d'acidité lactique .....	19
II.2.3.2. Propriété texturante .....	19
II.2.3.3. Aptitude protéolytique.....	19
II.2.3.4. Aptitude lipolytique.....	19
II.2.3.5. Tolérance aux acides .....	20
II.2.3.6. Activité antimicrobienne .....	20
II.2.3.7. Résistance et sensibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques.....	20

### **Partie III : Résultats et discussions**

III.1. Identification des souches .....	21
III.1.1. Examen macroscopique .....	21
III.1.2. Examen microscopique .....	21
III.1.3. Tests physiologiques et biochimiques.....	22
III.1.3.1. Test d'ADH .....	24

III.1.3.2. Test de croissance à différentes températures .....	24
III.1.3.3. Test de croissance en milieu hypersalé .....	25
III.1.3.4. Type fermentaire .....	25
III.1.3.5. Profil de fermentation des sucres .....	25
III.1.3.6. Identification des souches .....	26
III.2. Etude de quelques Aptitudes technologiques et probiotiques.....	27
III.2.1. Activité acidifiante .....	27
III.2.2. Aptitude texturante.....	30
III.2.3. Aptitude protéolytique .....	30
III.2.4. Aptitude lipolytique .....	30
III.2.5. Tolérance aux acides .....	31
III.2.6. Activité antimicrobienne .....	32
III.2.7. Résistance et sensibilité des souches aux antibiotiques .....	34
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>36</b>

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

Tableau III.1 : Profil physiologique et **Liste des abréviations** isolées.....23

Tableau III.2: Profil fermentaire des souches.....24

ADH : Arginine Dihydrolase

ATCC : American Type Culture Collection

UI : Unité Internationale

D.O. : Densité Optique

G+C : Guanine + Cytosine

sp, subsp: Sous espèce

**Souches bactériennes**

*Bd* : *Bifidobacterium*

*Cb* : *Carnobacterium*

*En*: *Enterococcus*

*Lb, L*: *Lactobacillus*

*Lc* : *Lactococcus*

*Ln* : *Leuconostoc*

**Milieux de cultures**

MEVAG : Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides

MRS : Man Rogosa Sharp

YMA : Yeast Milk Agar

PCA : Plate Count Agar

---

Tableau III.1 : Profil physiologique et biochimique des souches isolées.....	23
Tableau III.2: Profil fermentaire des sucres.....	24
Tableau III.3 : Nom scientifique et pourcentage des espèces identifiées.....	26
Figure III.2: production d'acide lactique par les souches isolées du <i>A.lla</i> à 0 heure.....	28
Tableau III.4: Résultats de l'évolution du pH et de l'acidité dornic en fonction du temps.....	27
Figure III.3: Evolution d'acide lactique par les souches isolées du <i>A.lla</i> après 3 heures.....	28
Tableau III.5: Résultats de la tolérance des bactéries lactiques aux différents pH .....	27
Tableau III.6: Diamètres des zones d'inhibition des bactéries pathogènes par les souches.....	33
Tableau III.7 : Résultats de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques.....	34
Figure III.6: Le taux de survie des souches lactiques à pH 3 après 24h d'incubation .....	31
Figure III.7: Le taux de survie des souches lactiques à pH 4 après 24h d'incubation .....	31

Figure I.1: Etapes de fabrication du fromage traditionnel <i>Klila</i> .....	13
Figure III.1 : Répartition des espèces des bactéries lactiques isolées du <i>Klila</i> en pourcentage.....	27
Figure III.2: production d'acide lactique par les souches isolées du <i>Klila</i> à 0 heure.....	28
Figure III.3 : production d'acide lactique par les souches isolées du <i>Klila</i> après 3 heures .....	28
Figure III.4 : production d'acide lactique par les souches isolées du <i>Klila</i> après 6 heures. ....	28
Figure III.5: production d'acide lactique par les souches isolées du <i>Klila</i> après 24 heures .....	28
Figure III.6: Le taux de survie des souches lactiques à pH 3 après 24h d'incubation .....	31
Figure III.7: Le taux de survie des souches lactiques à pH 4 après 24h d'incubation .....	31

---

Photo I.1: Fromage traditionnel <i>Klila</i> sèche .....	14
Photo III.1: Aspect macroscopique des cultures pures des bactéries lactique sur milieu MRS solide après incubation à 37°C pendant 24 heures .....	21
Photo III.2 : Aspect macroscopique des cultures pures des bactéries lactiques sur milieu MRS bouillon après incubation à 37°C pendant 24 heures .....	21
Photo III.3 : Aspect microscopique d'une souche isolée à partir du <i>Klila</i> .....	22
Photo III.4 : Type fermentaire sur le milieu Gibson et Abd El Malek .....	25
Photo III.5: Profil fermentaire des bactéries lactiques isolée du <i>Klila</i> .....	25
Photo III.6: Antibiogramme de la souche K25 .....	34

## I. Propriétés générales

Les bactéries lactiques sont utilisées dans différents produits fermentés depuis l'antiquité. Actuellement, elles forment un groupe d'organismes utilisés pour l'enrichissement de certains yaourts et laits (Klaenhammer et al., 2007). Cette utilisation est due aux effets nutritionnels et thérapeutiques de ces bactéries car elles enrichissent le milieu où elles se trouvent en vitamines (B et K), acides aminés, composés organiques (acides lactiques et acétiques), enzymes (lactase) et bactériocines responsables de l'inhibition des bactéries pathogènes (Soomro et al., 2002).

Les bactéries les plus fréquemment utilisées comme probiotiques sont des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* (Khan et Ansari, 2007).

Les produits laitiers fermentés traditionnellement ont une part très importante dans l'alimentation quotidienne des gens de différents pays. En effet, ils ont fait l'objet de plusieurs études : au Maroc, en Roumanie, au Liban, en Egypt, au Burkina Faso, au Kenya, en Afrique du sud ...etc (Zamfir et al, 2006; Ouadghiri et al., 2009 ).

En Algérie, les fromages traditionnels sont peu nombreux recensés et aussi peu étudiés; environs dix types sont connus dans les différentes régions du pays. Parmi ces fromages, on rencontre le fromage *Klila*.

L'isolement et l'identification des bactéries lactiques à partir du fromage traditionnel *Klila* correspond à un sujet intéressant, car peu d'informations sont disponibles dans la littérature sur les microorganismes ayant une importance technologique et probiotique isolées à partir de ce fromage.

L'objectif de notre étude est d'identifier la flore lactique du fromage traditionnel *Klila* ramené de la région de Ghardaïa, et d'évaluer leurs propriétés technologiques et probiotiques.

La classification du Bergey's sépare le monde bactérien en 35 groupes. Les bactéries lactiques (BL) se retrouvent dans les groupes 17 (coques Gram positive), 19 (bâtonnets réguliers, Gram positive, non sporulantes) et 20 (bâtonnets irréguliers, Gram positive, non sporulantes) (Vignola, 2002).

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique/biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétone et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres

## I. Propriétés générales

Le terme bactéries lactiques (Lactic acid bacteria LAB) a été progressivement utilisé au début du vingtième siècle pour désigner les bactéries du lait acidifié «milk souring bacteria » et bactéries productrice de l'acide lactique « lactic acid producing bacteria ». En 1919 les bactéries lactiques ont été classées selon la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la température de croissance, et la gamme d'utilisation de sucre, cette monographie constitue une référence pour la classification actuelle des LAB (Stiles et Holzapfel, 1997; Axelsson, 2004).

Les bactéries lactiques peuvent avoir des formes de bâtonnets ou de coques, sont Gram positive, asporulées, catalase et oxydase négative qui produisent de l'acide lactique comme métabolite principal de la fermentation d'hydrate de carbone et elles sont anaéro-aérotolérants (Leroi, 2010).

Les bactéries lactiques ont des métabolismes chimio-organotrophes, ce qui signifie qu'elles utilisent comme source énergétique des substances hydrocarbonées telles que les sucres, les alcools et les acides organiques. Elles possèdent souvent des exigences nutritionnelles complexes en terme d'acides aminés, de peptides, de vitamines, de sels, d'acides gras et de sucres (Dellaglio et al., 1994).

Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les bactéries lactiques sont:

- homofermentaires lorsqu'elles produisent très majoritairement de l'acide lactique.
- hétérofermentaires si elles produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (acétate et éthanol en général) (Novel, 1993).

### I.1. Classification des bactéries lactiques

La classification du *Bergey's* sépare le monde bactérien en 35 groupes. Les bactéries lactiques (BL) se retrouvent dans les groupes 17 (coques Gram positive), 19 (bâtonnets réguliers, Gram positive, non sporulantes) et 20 (bâtonnets irréguliers, Gram positive, non sporulantes) (Vignola, 2002).

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique /biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à: fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres

critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Vandamme et al., 1996).

Du point de vue phylogénétique, les bactéries lactiques appartiennent à la branche Clostridiale des bactéries Gram positives, avec un G + C% inférieur à 55 %. La taxonomie actuelle regroupe les principaux genres de bactéries lactiques en fonction de leur parenté phylogénétique: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* et *Pediococcus* d'une part; *Streptococcus* (espèce *thermophilus*), *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Carnobacterium* et *Bifidobacterium* d'autre part. (Pilet et al., 2005).

## I.2. Caractéristiques de quelques genres de bactéries lactiques

### I.2.1. *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* comprend la majorité des espèces de streptocoques. Ces organismes ont un contenu en GC de 35 à 46% (Bourgeois et Larpent, 1996).

Les streptocoques ont été classés en quatre groupes selon les caractères hémolytiques et culturels :

- **Le groupe pyogenes:** Il contient des streptocoques pathogènes, hémolytiques. Ces streptocoques peuvent occasionnellement entraîner des infections d'origine alimentaire, ils sont toujours classés comme « vrais » *Streptococcus*.
- **Le groupe viridans :** Comprend des streptocoques hémolytiques, hôtes habituel de la cavité orale humaine.
- **Le groupe lactique:** avec des espèces communes du lait de vache.
- **Le groupe entérocoque:** qui rassemble les espèces d'origine intestinale (Guiraud, 1998 ; Campaniello et al., 2005).

### I.2.2. *Leuconostoc*

Les *Leuconostoc* sont des coques en paires ou en chaînes, bactéries hétérofermentaires produisant de l'acide lactique, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>. Ces espèces sont mésophiles et caractérisées par la production à partir du citrate du lait, du diacétyle (et parfois d'acétate : *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*) et parfois par la synthèse de dextranes et de lévanes extracellulaires en présence du saccharose.

Selon le GC% de l'ADN et l'hybridation ADN-ADN, 3 espèces ont été distinguées: *Ln. mesenteroides* (et ses 3 sous-espèces : subsp. *mesenteroides*, subsp. *dextranicum* et subsp. *cremoris*), *Ln. Lactis*, *Ln. paramesenteroides* et une espèce acidophile *Ln. oenos* (Novel, 1993).

Les *Leuconostocs* sont soit acidifiantes (*Ln. lactis*), soit aromatisantes (*Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*). Certaines espèces peuvent utiliser le citrate du lait et produisent du diacétyle, élément principal de la flaveur du beurre et d'autres produits laitiers (Bourgeois et Larpent, 1996).

### 1.2.3. *Weissella*, *Oenococcus*

Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, conditions de croissance, la capacité à croître à différentes températures, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Ho et al., 2007). Récemment, l'espèce *Leuconostoc oenos* isolée du vin a été classée dans un nouveau genre, *Oenococcus oeni* et certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Pilet et al., 2005).

### 1.2.4. *Pediococcus*, *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des germes microaérophiles à besoins nutritifs complexe. Leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. De nombreuses espèces sont acidophiles. Leur fermentation homolactique donne parfois de l'acide lactique racémique. Ils sont saprophytes et contaminent les produits végétaux. Ce sont des agents de dégradation en brasserie (Guiraud, 1998).

Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

### 1.2.5. *Carnobacterium*

Regroupe des lactobacilles atypiques dont le pourcentage G+C de l'ADN varie de 33 à 37%, leur métabolisme est hétérofermentaire avec une production variable de gaz. Deux caractères distinguent ce genre du genre *Lactobacillus*: l'absence de croissance sur acétate et la composition en acides gras. Ce genre comprend quatre espèces: *Cb. divergens*, *Cb. piscicola*, *Cb. mobile* et *Cb. gallinarum* (Novel, 1993).

### 1.2.6. *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* représente les streptocoques dits « lactiques », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène, ils sont mésophiles. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet et al., 2005).

métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique. Certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactiques produisant des acides volatils, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> à côté de l'acide lactique.

Les lactobacilles exigent pour leur développement des milieux bien adaptés, riches en vitamines et en acides gras : ils sont acidophiles. Ces bactéries sont généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques (Guiraud, 1998).

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont caractérisées par l'hétérogénéité de la composition de leur ADN: le GC% varie de 32 à 53% (Novel, 1993). La plupart des lactobacilles se multiplient dans une gamme de températures comprise entre 15°C et 42°C. Certaines souches de lactobacilles sont dites « thermophiles » restent viables à 55°C.

Une classification fondée sur les caractères biochimiques et physiologiques subdivise le genre *Lactobacillus* en trois groupes (Campaniello et al., 2005).

#### ▪ Groupe I

Anciennement appelé « *Thermobacterium* ». Ces bactéries ont un métabolisme strictement homofermentaire. Elles se développent à 45°C mais pas à 15°C (Bourgeois et Larpent, 1996). Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (laits, yaourts, fromages) sont : *L. helveticu*, *L. jugurti*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. leichamni*, *L. delbrueckii*, *L. kefirifaciens*, *L. mali*, etc (Guiraud, 1998).

#### ▪ Groupe II

Anciennement appelé « *Streptobacterium* », ce groupe comprend des espèces à métabolisme hétérofermentaire facultatif (Bourgeois et Larpent, 1996). Ces bactéries sont mésophiles et se développent à 15°C. Il comporte les espèces *L. casei* qui est le lactobacille prédominant du lait, *L. plantarum* rencontré dans la choucroute, *L. curvatus*, *L. sake*, *L. acetotolerans*, *L. graminis*, *L. rhamnosus*, etc (Guiraud, 1998).

#### ▪ Groupe III

Anciennement appelé « *Betabacterium* », ces espèces ont un métabolisme strictement hétérofermentaire. Elles produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique, du CO<sub>2</sub> et de l'éthanol (Bourgeois et Larpent, 1996). Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont : *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. viridiscens*, *L. kefir*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. sanfrancisco*, etc (Guiraud, 1998).

### 1.2.11. *Bifidobacterium*

Le rattachement de ce genre aux bactéries lactiques proprement dites peut se justifier par son ancien classement dans les *Lactobacillus* sous le nom de *Lb. bifidus* mais surtout par l'existence chez cette bactérie d'une fermentation lactique (Novel, 1993).

*Bifidobacterium* est phylogéniquement proche des actinomycètes alors que les autres bactéries lactiques sont proches des Clostridies (Guiraud, 1998). Ces bactéries sont des bâtonnets de morphologie variée, cellules courtes, cocoïdales, cellules ramifiées, bifurquées, spatulées, isolées ou en chaînes (Bourgeois et Larpent, 1996). Ce sont des bactéries anaérobies, certaines espèces tolèrent l'oxygène mais seulement en présence de CO<sub>2</sub>. Elles sont mésophiles montrant une température optimale de croissance entre 37°C et 41°C (Novel, 1993).

### I.3. Habitat des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif (Drouault et Corthier, 2001).

✓ Les *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., et *Streptococcus* spp. appartiennent à la flore commensale normale des mammifères (humaine et animale) et de l'intestin de d'autres vertébrés. En particulier, les *Lactobacillus* spp. sont présents dans les aliments fermentés, les végétaux, la cavité buccale, le tractus gastro-intestinal, et le tractus urogénital (Manoj et al., 2012).

✓ Les *Leuconostoc* sont isolés du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes en particulier de la betterave, des végétaux en fermentation (la choucroute), des produits de la panification, et des solutions visqueuses de sucres dans les sucreries, *Leuconostoc oenos* est isolé du vin.

✓ Les *Pediococcus* sont présents dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons: bière, cidre et vin.

✓ Les *Bifidobacterium* sont découverts dans les selles d'enfants nouveau-né, on peut les isoler de l'intestin, du vagin, de la bouche des adultes, ou du tractus intestinal de nombreuses espèces animales.

✓ Les espèces du genre *Carnobacterium* ont été isolées de viande de bœuf, de poisson et de volaille emballés et stockés à basse température (Novel, 1993).

### I.4. Aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques

#### I.4.1. Production de l'acide lactique

L'action de la flore lactique sur la conservation d'un aliment est liée à l'abaissement du pH consécutif à la production d'acide lactique (Drouault et Corthier, 2001).

La fermentation lactique est fortement recommandée, car elle diminue considérablement la viabilité de germes nocifs. Elle représente donc une sécurité supplémentaire en diminuant les risques de consommation de produits dangereux (Raimbault, 1995).

#### I.4.2. La protéolyse

La protéolyse du lait par les bactéries lactiques en particulier par les lactocoques permet une coagulation lors de la croissance de ces bactéries. La protéolyse d'origine bactérienne est essentielle à l'affinage des fromages par le développement de saveurs, et de la texture. Elle serait le fait des enzymes de paroi mais aussi des protéases et des peptidases intracellulaires libérées par la lyse cellulaire (Novel, 1993).

#### I.4.3. La lipolyse

L'activité lipolytique des lactocoques dans le lait joue un rôle important dans la formation de la saveur des fromages affinés. Ces bactéries hydrolysent plus facilement les mono- et diglycérides que les triglycérides du lait. Chez les *Lactobacillus*, les triglycérides contenant des acides gras à chaînes courtes sont les plus facilement hydrolysés, ceux de la matière grasse du lait le sont très faiblement (Novel, 1993).

#### I.4.4. La production de composés antagonistes

Les bactéries lactiques sont connues pour produire, lors de leur croissance, des substances antimicrobiennes comme l'acide lactique, des dérivés du métabolisme de l'oxygène tel que le peroxyde d'hydrogène inhibant la croissance des microorganismes pathogènes (Novel, 1993).

#### I.4.5. Le pouvoir aromatisant

Les bactéries lactiques sont, avec les levures, des micro-organismes utilisés par l'homme depuis fort longtemps, en raison de leurs propriétés métaboliques. Elles contribuent au développement des qualités organoleptiques par la formation d'acide lactique, d'acétoïne, d'acétaldéhyde, de diacétyl, de peptides et d'acides aminés, qui sont des précurseurs d'arômes, lesquels se développent lors des étapes ultérieures des procédés de fabrication des produits alimentaires (Raimbault, 1995).

- Les *Leuconostocs* et particulièrement (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*) sont utilisées en industrie laitière pour leur capacité à produire du CO<sub>2</sub> et des composés d'arôme (diacétyl et acétoïne) grâce au co-métabolisme du citrate et du lactose (Levata-Jovanovic et Sandine, 1996).

#### I.4.6. Le pouvoir texturant

Il est assuré par les exopolysaccharides (EPS) des bactéries lactiques qui sont des macromolécules hautement diversifiés dont les propriétés fonctionnelles sont exploitées pour améliorer les qualités organoleptiques des produits laitiers frais fermentés (Corrieu et Luquet, 2008). Les exopolysaccharides augmentent le temps qu'un produit laitier reste en bouche, conduisant à une meilleure perception de la flaveur du produit ainsi qu'elles augmentent la viscosité du lait (Lapointe, 2009).

#### I.4.7. La tolérance aux acides

La tolérance des bactéries lactiques probiotiques à l'acidité gastrique varie beaucoup entre les genres et les souches. Elle dépend de leur capacité à tolérer les pH bas. Le temps de passage peut être d'une heure à quatre heures selon l'individu et son régime. Par conséquent, quelques auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2.5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (Ammor et Mayo, 2007).

#### I.4.8. La résistance aux sels biliaires

La survie des bactéries lactiques probiotiques dans l'intestin grêle est influencée par leur résistance aux sels biliaires. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion de repas gras.

Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait, diminuant leur solubilité (Ammor et Mayo, 2007 ; Gu et al., 2008).

#### I.5. Rayeb

Le Rayeb, lait caillé, est obtenu par coagulation du lait durant une période variant de 24h à 72h selon la saison, il est très connu et fortement apprécié par les consommateurs pendant des siècles, produit par la fermentation spontanée du lait ; il peut être consommé comme boisson fraîche ou accompagné avec quelques aliments comme le pain et le couscous. Le Rayeb peut être battu pour séparer l'ben du beurre traditionnel. Le processus de fermentation spontanée résulte de l'action des bactéries lactique et des levures (Samer-Ball et al., 2009; B-Bekaloul et al., 2010).

Il existe une très grande variété de produits laitiers, laits fermentés, beurre, fromages, dans le monde (forme, goût) selon la source du lait (vache, brebis, chèvre, etc.) et la technologie appliquée (Traitement (s) du lait mis en œuvre, utilisation de levains, température appliquée, etc.). Ainsi jusqu'à plus de 1000 variétés de fromage ont pu être répertoriées (Fox et Mc Sweeney, 2004). Les fromages constituent une forme ancestrale de conservation des constituants du lait, et possèdent par ailleurs un haut intérêt à la fois nutritif et épicurien (Fox et Mc Sweeney, 2004).

### I. Produits laitiers algériens

Les produits laitiers traditionnels algériens ont été peu caractérisés. Ils sont cousins de produits laitiers largement consommés dans beaucoup de pays méditerranéens et subsahariens (Koussou et al., 2007; Abou-Donia, 2008).

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

En Algérie, les laits fermentés et les fromages sont fabriqués traditionnellement le plus souvent par les femmes à la maison (Medouni et al., 2005) et servent à l'autoconsommation; le surplus pouvant être vendu (Bencharif, 2001).

Plusieurs produits traditionnels sont en voie de disparition pour différentes raisons dont la non disponibilité fourragère, l'exode rural et le changement des habitudes alimentaires (Aissaoui, 2006; Khaldi et al., 2006).

Ces produits sont partie intégrante d'héritage algérien, et ont une grande importance, culturelle, médicinale et économique, ils ont été développés sur une longue période avec les compétences culinaires des femmes. Les produits laitiers traditionnels algériens importants qui ont la signification commerciale sont: *Lben*, *Klila*, *Bouhezza* et *Jben* (Bendimerad, 2013).

#### I.1. Rayeb

Le *Rayeb*, lait caillé, est obtenu par coagulation du lait durant une période variant de 24h à 72h selon la saison, il est très connu et fortement apprécié par les consommateurs pendant des siècles, produit par la fermentation spontanée du lait ; il peut être consommé comme boisson fraîche ou accompagné avec quelques aliments comme le pain et le couscous. Le *Rayeb* peut être battu pour séparer *Lben* du beurre traditionnel. Le processus de fermentation spontanée résulte de l'action des bactéries lactique et des levures (Samet-Bali et al., 2009; Belkaaloul et al., 2010).

## 1.2. Lben

Le *Lben* est une boisson préparée par fermentation spontanée du lait cru jusqu'à coagulation, suivie d'un léger mouillage, puis d'un barattage, permettant de recueillir une part plus ou moins importante de matière grasse sous forme de beurre. Il est apprécié par les consommateurs pour son goût frais, acide et son arôme incomparable. Ces caractéristiques sont principalement liées à l'activité des bactéries lactiques autochtones de type mésophile (Tantaoui-Elaraki et al., 1983).

## 1.3. Jben

Le *Jben* est un fromage blanc et frais, traditionnel du Nord Algérien, il est connu et consommé au Maroc depuis fort longtemps aussi bien en milieu rural qu'en milieu urbain (El Marrachi, 1996).

Traditionnellement, le fromage *Jben* est fabriqué avec du lait cru de brebis ou de chèvre, acidifié spontanément et coagulé par des enzymes coagulantes d'origine végétale issues des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus L*) (Nouani, 2009) ; cette plante (*Cynara cardunculus L.*) est utilisée dans la coagulation du lait est largement distribuée dans les pays méditerranéens produisant une fleur pendant la saison d'été (Mouzali et al., 2006) mais aussi d'une plante épineuse sauvage (*Cynara humilis*) ou d'artichaut (*Cynara scolymus*), ou du latex de figuier (*Ficus carica*) ou des graines de citrouille (coagulation par voie enzymatique).

## 1.4. Bouhezza

C'est un fromage affiné traditionnel, à pâte molle, des régions de l'Est Algérien (Oum El Bouaghi, Khenchella, Batna, Biskra, etc) jadis réputées par une pratique importante de l'élevage extensif des caprins et des ovins. En effet, à l'origine, le *Bouhezza* était traditionnellement le produit de la transformation du lait de chèvre et de brebis; toutefois la tendance actuelle semble s'orienter vers l'utilisation du lait de vache.

Le fromage est obtenu après transformation du *Lben* dans une outre, la *Chekoua*, faite de peau de chèvre préalablement traitée avec du sel et du genièvre (Aissaoui et al., 2006).

A côté des produits précédents, il existe des préparations locales circonscrites à certaines régions de l'Algérie.

## 1.5. Ighounane

Fromage fabriqué en Kabylie à partir du colostrum, la préparation d'*Ighounane* se fait dans un ustensile en terre cuite enduit d'huile d'olive dans lequel sera versée une petite quantité d'eau salée puis le lait qui sera chauffé et coagulé., le caillé formé sera découpé et prêt à être consommé (Agroligne, 2001).

### I.6. *Takammart*

Littéralement «Fromage» en langue *Tamahaq* (Touareg), le *Takammart* est un fromage de la région désertique du Hoggar (Tamanrasset), il est produit par l'introduction d'un morceau de caillette de jeunes chevreaux dans le lait de chèvre. Le caillé obtenu est retiré à l'aide d'une louche et déposé en petits tas sur une natte, il est ensuite pétri pour évacuer le sérum puis déposé sur une natte à base de tiges de fenouil qui lui transmet un arôme particulier. Les nattes sont, par la suite, exposées au soleil durant deux jours puis placées à l'ombre jusqu'au durcissement du fromage (Agroligne, 2001).

### I.7. *Ibakhbakhane*

Originnaire de la région des Aurès, l'*Ibakhbakhane* est produit à partir d'une mixture de Frik d'orge (*Marmaz*) et de *Lben* soumis à une fermentation à des températures inférieures à 20°C par immersion dans un puits pendant 2 à 5 jours (Bendimerad, 2013).

### I.8. *Imadhghass*

Produit dans la région des Aurès, l'*Imadhghass* est produit à partir d'une mixture de *Klila* fraîche et de lait frais. Le produit est consommé comme un dessert (Bendimerad, 2013).

### I.9. *Adhghass*

Produit dans la région des Aurès, l'*Adhghass* est fabriqué à partir d'un mélange de colostrum et d'œufs qui est ensuite cuit (Bendimerad, 2013).

### I.10. *Aghoughlou*

Fromage fabriqué en Kabylie, *Aghoughlou* est obtenu à partir de lait frais de vache ou de chèvre coagulé par la sève du figuier (Bendimerad, 2013).

### I.11. *Klila*

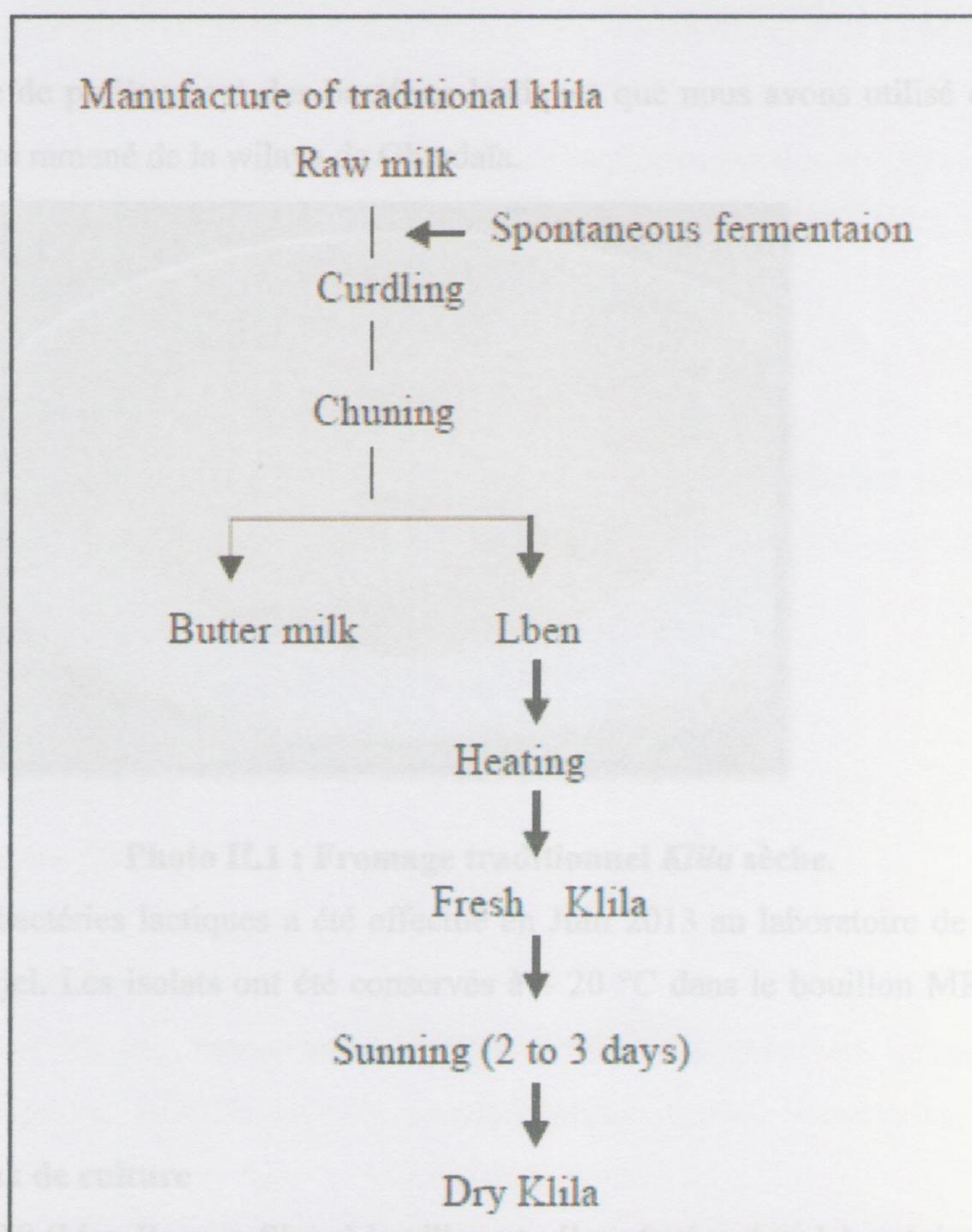
La *Klila* est un fromage fermenté produit empiriquement dans plusieurs régions de l'Algérie. Il peut être consommé frais ou découpé puis séché (de 2 à 3 jours), et ensuite utilisé après réhydratation comme un ingrédient dans des préparations culinaires. Sous sa forme déshydratée, il peut être conservé plusieurs années à température ambiante, dans des jarres en poterie ou en verre ou des sacs en peau de chèvre/mouton. C'est un fromage similaire au *Jameed* au Moyen-Orient et au *Chhana* en Inde.

Les méthodes traditionnelles de fabrication de ce fromage sont encore en usage de nos jours par les industries qui fabriquent *Klila*. Néanmoins, il existe une demande croissante des consommateurs

pour ce type de fromage, car pour ses propriétés organoleptiques agréables, sa haute teneur en protéines et en calcium (Mennane et al., 2007).

### I.11.1. Les étapes de fabrication

Le fromage *Klila* est fabriqué à partir de lait de vache cru. Ce dernier est soumis à une fermentation spontanée à une température ambiante suivi d'un barattage manuel du caillé en donnant du beurre et du *Lben*. Ensuite, le *Lben* obtenu est chauffé de 50°C à 60°C pendant 30 minutes ; enfin, le caillé obtenu est essoré et séché (Figure I.1) (Mennane et al., 2007).



**Figure I.1 : Etapes de fabrication du fromage traditionnel *Klila* (Mennane et al., 2007).**

## II. Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie à l'université de Jijel, durant la période Mai– Juin de l'année 2014 dont l'objectif est d'identifier les bactéries lactiques qui ont été isolées l'année 2013 du fromage traditionnel *Klila* et d'évaluer leurs aptitudes technologiques et probiotiques.

### II. 1. Matériel

Pour la réalisation des différentes parties expérimentales, on s'est servi du matériel suivant :

#### II. 1.1. Matériel biologique

##### ❖ *Klila*

La source de prélèvement des bactéries lactiques que nous avons utilisé était *Klila* sèche. L'échantillon a été ramené de la wilaya de Ghardaïa.



**Photo II.1 : Fromage traditionnel *Klila* sèche.**

L'isolement des bactéries lactiques a été effectué en Juin 2013 au laboratoire de Microbiologie à l'Université de Jijel. Les isolats ont été conservés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  dans le bouillon MRS additionné de glycérol (30%).

#### II.1.2. Les milieux de culture

- ✦ Milieu MRS (Man-Rogosa-Sharp) bouillon et gélose (préparé au laboratoire) : utilisé pour la culture des bactéries lactiques, c'est un milieu qui permet surtout la bonne croissance des lactobacilles.
- ✦ Milieu Gibson et Abd El Malek (préparé au laboratoire) : ce milieu permet la réalisation du test de différenciation des types homofermentaires et hétérofermentaires.
- ✦ Milieu YMA (Yeast Milk Agar) : utilisé pour la recherche de l'activité protéolytique des bactéries lactiques.

- ✚ Milieu PCA (Plate Count Agar) additionné de 1% de Tween 80 : utilisé pour la recherche de l'activité lipolytique des bactéries lactique.
- ✚ Milieu MEVAG sans sucre (Milieu d'étude de la voie d'attaque de glucides): pour la réalisation du profil de fermentation des sucres.
- ✚ Bouillon Mœller à arginine (ADH) : pour la recherche de l'arginine dihydrolase.
- ✚ Bouillon MRS à pH 2, pH 3, pH 4 et pH 6.5: pour la réalisation des tests de résistance à l'acidité.
- ✚ Bouillon MRS supplémenté de 4% et 6,5% de NaCl.
- ✚ Bouillon nutritif (BN) : pour la culture des souches indicatrices (pouvoir antagoniste).
- ✚ Gélose nutritive (GN) : pour la préparation du milieu Gibson et Abd El Malek.
- ✚ Gélose Muller Hinton : pour la réalisation de l'activité antimicrobienne.
- ✚ Gélose Hypersaccharosée: pour la recherche de la production des polysaccharides.
- ✚ Lait écrémé à 12% : pour l'étude du pouvoir acidifiant.
- ✚ Gélose blanche: pour favoriser l'anaérobiose.

### II.1.3. Disques d'antibiotiques

Pour étudier le comportement des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques, quatre disques (Institut Pasteur d'Alger) ont été utilisés pour réaliser un antibiogramme sur milieu solide, il s'agit de :

- ✓ Pénicilline G 10 UI
- ✓ Amoxicilline 25µg
- ✓ Colistine sulfate 50µg
- ✓ Streptomycine 500 µg
- ✓ Eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour le test de catalase.

### II.1.4. Les souches indicatrices

Pour étudier les interactions microbiennes, nous avons utilisé les germes tests suivants: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire de recherche de l'Université de Bejaia. Ces souches ont été cultivées sur le bouillon et gélose MRS ont été faits dans le but d'avoir les résultats à 37°C pendant 24 à 48 heures. La présence de trouble dans les tubes est un indicateur de croissance.

### II.1.5. Les sucres utilisés

Saccharose 0.5%, Xylose 20%, Glucose 20%, Galactose 20%, Mannose 20%, Sorbose 20%, Amidon 10%, Maltose, Sorbitol, Salicine 6%, Adonitol 6%, Méthyle D mannoside, Glycérol 50%, Raffinose 20%, Dextrine 6% (Institut Pasteur).

### II.1.6. Appareillage

Le matériel suivant a été utilisé tout au long du travail :

- ✚ Autoclave (Slli AVX electronic)
- ✚ Bain marie (Gerhardt Bonn)
- ✚ Balance (Scout Pro)
- ✚ Centrifugeuse (Hettich EBA20)
- ✚ Disques de papier Whatman
- ✚ Etuve (37°C, 45°C) (Memmert)
- ✚ Four Pasteur (Controls)
- ✚ Microscope optique(Paralux)
- ✚ pH mètre (Hanna)
- ✚ Plaque chauffante agitatrice (Bunsen)
- ✚ Réfrigérateur (Condor)
- ✚ Spectrophotometre (Jenway 7315)
- ✚ Vortex (VWR W3)

### II.1.7. Produits chimiques, réactifs et tampons

Au cours de notre travail, nous avons utilisé :

- ✓ Violet de Gentiane, Lugol, Alcool, Fuschine et l'huile à immersion (coloration de Gram).
- ✓ Tween 80.
- ✓ NaCl et HCl.
- ✓ La soude dornic (N/9) et phénophtaléine 1% pour l'acidité.
- ✓ Eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour le test de catalase.
- ✓ Eau physiologique stérile : pour la préparation des dilutions décimales.

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Revivification et purification des souches

Les souches conservées ont été inoculées dans le bouillon MRS suivie d'une incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures. La présence de trouble dans les tubes est un indicateur de croissance. Des repiquages successifs sur le bouillon et gélose MRS ont été faits dans le but d'avoir des souches pures. Après l'obtention de colonies homogènes, ces dernières ont été soumises aux principaux tests d'identification qui sont les suivants: examens macroscopique et microscopique (coloration de Gram) et production de catalase (Bukola et Abidun, 2008).

### II. 2.1.1. Examen macroscopique

L'étude morphologique est portée sur l'observation macroscopique qui consiste à décrire les colonies obtenues sur milieu solide après incubation de 37°C pendant 24 heures (taille, forme, contour, aspect,.....) (Hariri et al, 2009).

### II. 2.1.2. Examen microscopique

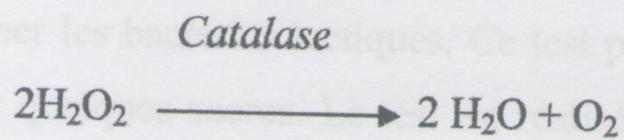
L'examen microscopique est révélé par la coloration de Gram. Cette coloration permet la distinction de deux groupes majeurs de bactéries : à Gram positif et à Gram négatif et aussi entre les coques et les bacilles ainsi que le mode de regroupement (Ahmed et Kanawal, 2004).

Elle est basée sur la différence de structure de la paroi, selon la composition et la perméabilité (Guiraud, 1998). La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par (Prescott et al., 2003).

## II. 2.2. Tests physiologiques et biochimiques

### II. 2.2.1. Test de la catalase

La catalase est une enzyme qui permet la dégradation de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui résulte de l'oxydation par l'O<sub>2</sub> de l'air, des électrons: e<sup>-</sup>, et des protons: H<sup>+</sup>, issus des voies d'oxydation directe, selon l'équation suivante :



On dépose sur une lame quelques gouttes de la suspension bactérienne puis on rajoute de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'apparition d'un dégagement gazeux témoigne la présence de la catalase dans le métabolisme bactérien (Delarras, 2007).

### II.2.2.2. Recherche de l'arginine dihydrolase

La recherche de cette enzyme est d'une grande importance pour la caractérisation des bactéries lactiques, cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine (Hariri et al., 2009).

Pour la détermination de cette activité, le germe à tester estensemencé dans un tube contenant le milieu Mœller à l'arginine, les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Les cultures qui utilisent l'arginine, changent la couleur du milieu d'abord au jaune en raison de la production d'acide lactique et au violet en raison de la production d'ammoniac. D'autre part, les cultures qui n'utilisent pas l'arginine prendront une couleur jaune foncé signifiant une production uniquement d'acide lactique (Cardinal et al., 1997).

### II. 2.2.3. Le développement des souches aux températures optimales

Ce test permet de distinguer des lactobacilles mésophiles, des thermophiles. Pour l'étude de cette activité, deux séries de tubes de bouillon MRS ont été ensemencés. Les tubes sont incubés pendant 24 à 48 heures aux températures 10°C et 45°C, au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux.

Les bactéries mésophiles poussent à 10°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas (Leveau et al., 1991).

### II. 2.2.4. Culture en présence de NaCl

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Des précultures jeunes (18 heures) sont utilisées pour inoculer des bouillons MRS supplémentés de 4% et 6,5% de NaCl, l'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures (Carr et al., 2002 et Mathara et al., 2004).

Nous notons l'aptitude à croître sur ces milieux par l'apparition de trouble.

### II. 2.2.5. Profil fermentaire des sucres

Les lactobacilles sont connues pour leur capacité de fermenter les glucides. Chaque souche fermente des sucres différents. En se basant sur ce critère d'identification, nous pouvons sélectionner les bactéries lactiques. Ce test permet d'apprécier la capacité des souches purifiées à fermenter quelques sucres. Le test est réalisé sur milieu MEVAG (Milieu d'étude de la d'attaque des glucides) contenant les sucres souhaités.

Dans notre étude, nous avons utilisé des microplaquettes, nous avons remplis chaque unité par 1 ml de milieu MEVAG contenant le sucre correspondant, la souche est ensuite repiquée. Pour favoriser l'anaérobiose, la gélose blanche est ajoutée.

Les résultats sont lus après 24 heures d'incubation, le virage de la couleur vers le jaune indique l'utilisation du sucre par la bactérie (Guiraud, 1998).

### II. 2.2.6. Recherche de type fermentaire

Ce test permet de classer les espèces *Lactobacillus* en hétéro ou homofermentaire. Pour réaliser ce test, nous avons utilisé le milieu Gibson et Abd El Malek, ce milieu est ensemencé par piqure centrale des souches à tester, puis pour favoriser l'anaérobiose, une couche de la gélose blanche est ajoutée à la surface de chaque tube. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 07 jours. Le décalage de la gélose (production de gaz) indique le type hétérofermentaire (Guiraud, 1998).

## II. 2.3. Etude de quelques aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques

### II. 2. 3.1. Aptitude acidifiante

Pour l'étude de cette aptitude, nous avons tout d'abord préparé le lait écrémé 12% suivie d'une stérilisation par tyndallisation 20 minutes pendant 3 jours. Le lait écrémé stérile est ensuiteensemencé par la souche lactique à tester suivi d'une incubation.

Nous avons procédé à la détermination du pH et au dosage de l'acide lactique chaque 3 heures d'incubation.

#### II. 2. 3.1.1. Détermination du pH

Le pH est déterminé à interval régulier par immersion de l'électrode du pH-mètre dans les échantillons à température ambiante (Al-Otaibi, 2009). L'expérience est indépendamment répétée quatre fois.

#### II. 2.3.1.2. Détermination d'acidité lactique

L'évaluation du pouvoir acidifiant est estimée par mesure de l'acidité dornic du produit. Cette dernière est déterminée par titration d'un échantillon de 10 ml, par la soude dornic N/9, en présence de 5 gouttes de phénol phtaléine, jusqu'à virage à la couleur rose pâle qui doit persister 20 secondes (Accolas *et al.*, 1977). L'acidité titrable du lait a été exprimée en degrés dornic (°D) puis convertie en g/l selon la formule : 1ml de NaOH correspond à 10 °D et un degré dornic correspond à 0,01 % d'acide lactique (Bourgeois *et al.*, 1996).

#### II.2.3.2. Propriété texturante

La gélose hypersaccharosée a étéensemencée en stries avec les souches bactériennes à tester. L'incubation est faite à 37°C pendant 24 heures, la présence des colonies larges et gluantes indique la production de polysaccharides par les bactéries lactiques (Leveau *et al.*, 1991).

#### II.2.3.3. Aptitude protéolytique

A la surface de la gélose YMA coulé et solidifié, des disques de papier Whatman stérile ont été déposés, sur ces disques, nous avons déposé 0.02 ml de chaque souche lactique. Les boites sont incubées à 37°C pendant 24 heures, la présence de cette activité se traduit par la présence des zones claires autour des disques (Roissart, 1986).

#### II.2.3.4. Aptitude lipolytique

La production de lipases extracellulaires est déterminée sur gélose PCA supplémenté de 1% de Tween 80. Une fois la gélose coulé et solidifié, des disques de papier Whatman stérile ont été déposés, sur ces disques, nous avons déposé 0.02 ml de chaque souche lactique.

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures, la présence d'un précipité autour du disque est un indicateur de lipolyse (Ben Moussa *et al.*, 2008).

#### II.2.3.5. Tolérance aux acides

La tolérance des souches à l'acidité a été réalisée selon la méthode décrite par (Hariri *et al.*, 2009). Avant de réaliser ce test, les 13 souches bactériennes testées sont cultivées dans le bouillon MRS à 37°C pendant 18 heures. Chaque souche a été préparée en quadruple par culture sur bouillon MRS, 10ul des cultures bactériennes jeunes (de 18 heures) sont inoculées dans 10ml du bouillon MRS ajusté à différents pH (pH2, pH3, pH4 et pH6.5). La croissance bactérienne est suivie par la détermination de la densité optique (D.O. 650 nm) après 24 heures d'incubation.

#### II.2.3.6. Activité antimicrobienne

Pour l'étude de l'effet de *Lactobacillus* sur les germes tests, nous appliquons la technique décrite par (Roissart, 1986). La gélose Mueller Hinton est coulée dans les boîtes de Pétri stérile et laissée prendre en masse, les souches tests (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) sont ensuite étalées en surface et laissées sécher puis incubées une heure à 37°C.

Des disques de papier Whatman stériles ont été déposés sur la gélose Mueller Hinton, à l'aide de micropipette, nous avons ensuite déposé 0,01 ml de chaque souche lactique sur chaque disque, suivie d'une incubation à 37°C pendant 24 heures.

Le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré selon la méthode décrite par Musikasang *et al.*, (2009). L'antagonisme entre les lactobacilles et les germes tests est traduit par la présence des zones d'inhibition.

#### II.2.3.7. Résistance et sensibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide a été appliquée. L'inoculum des souches testées a été standardisé dont la D.O.<sub>660</sub> varie entre 0.08 et 0.1 puis ensemencée par écouvillonnage sur la gélose MRS déjà coulée et solidifiée.

Sur chaque boîte, quatre disques d'antibiotiques ont été déposés ; à savoir: Pénicilline G (10UI), Amoxicilline (25µg), Colistine sulfate (50µg), Streptomycine (500µg).

Les zones d'inhibition ont été mesurées après incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures (Leroy *et al.*, 2007).

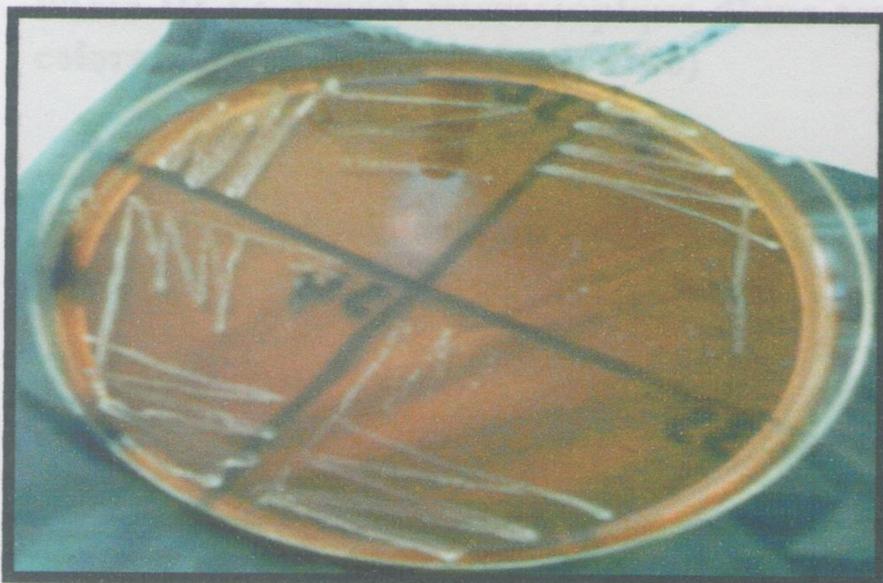
### III.1. Identification des souches

#### III.1.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique, permet de décrire l'aspect des colonies obtenue sur milieu solide MRS après 24 heures d'incubation à 37°C (Ana Belen et *al.*, 2006) et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, contour, aspect, viscosité).

Pour les isolats testés, nous avons observé sur milieu solide des petites colonies d'environ 1 mm de diamètre, de forme lenticulaire de couleur blanchâtres, brillantes et présentent des tailles différentes. Toutefois, sur chaque boîte et après purification, nous avons observé des colonies de même taille et de même couleur ; signe de pureté des souches (Photo. III.1).

La croissance en milieu MRS bouillon est caractérisée par l'apparition de trouble au fond du tube avec une zone transparente à la surface du milieu liquide (Photo.III.2).



**Photo III.1 : Aspect macroscopique des cultures pures des bactéries lactiques sur milieu MRS solide après incubation à 37°C pendant 24 heures.**



**Photo III.2 : Aspect macroscopique des cultures pures des bactéries lactiques sur milieu MRS bouillon après incubation à 37°C pendant 24 heures.**

#### III.1.2. Examen microscopique

L'observation microscopique a révélé une seule forme de cellules qui est la forme bâtonnet « Bacille ». Ces bacilles sont disposés en paires ou en chaînettes. Les cellules sont colorées en violet ce qui indique que ce sont des bactéries à Gram positif (Photo. III. 3).

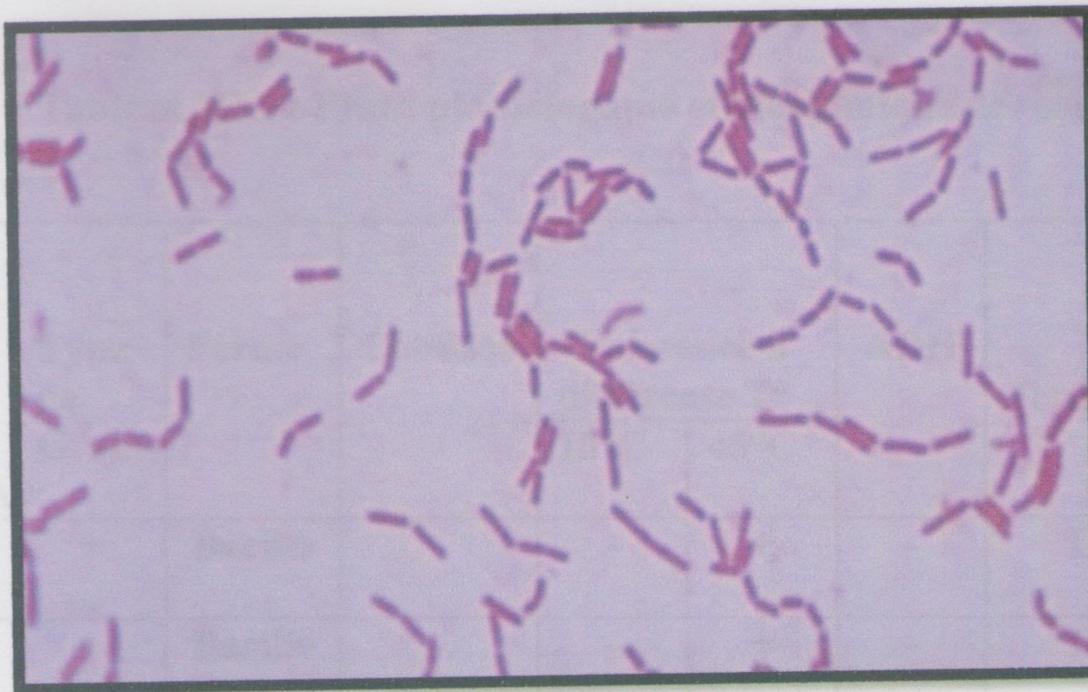


Photo III.3 : Aspect microscopique d'une souche isolée à partir du *Klila*. Observation après coloration de Gram. (Objectif x100)

### III.1.3. Tests physiologiques et biochimiques

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats sont présentées dans les tableaux III.1 et III.2.

Le tableau III.1 regroupe le profil physiologique et biochimique des souches isolées.

L'analyse de ces résultats a montré que tous les isolats se sont avérés à Gram positif et catalase négative ce qui est caractéristique des bactéries lactiques. Ces dernières ont été soumises aux tests :

- Croissance à différentes températures (10°C et 45°C).
- Test de l'arginine dihydrolase (ADH).
- Etude du type fermentaire.
- Croissance en milieu hypersalé (4%, 6.5%).

Le tableau III.2 regroupe le profil fermentaire des sucres.

Tableau III.1 : Profil physiologique et biochimique des souches isolées

Tests Souche	Type de Gram	Forme	Catalase	Croissance à différente T°		ADH	Type fermentaire	Croissance en NaCl	
				10°C	45°C			4%	6.5%
K2	+	Bacille	-	-	+	-	Homo	+	-
K5	+	Bacille	-	-	+	-	Homo	+	-
K7	+	Bacille	-	-	+	-	Homo	+	-
K10	+	Bacille	-	-	+	-	Homo	+	-
K25	+	Bacille	-	-	+	-	Homo	+	-
K26	+	Bacille	-	-	+	-	Homo	+	-
K27	+	Bacille	-	-	+	-	Homo	+	-
K28	+	Bacille	-	-	+	-	Homo	+	-
K31	+	Bacille	-	-	+	-	Homo	+	-
K32	+	Bacille	-	-	+	-	Homo	+	-
K33	+	Bacille	-	-	+	-	Homo	+	-
K34	+	Bacille	-	-	+	-	Homo	+	-
K35	+	Bacille	-	-	+	-	Homo	+	-

K : souche isolée du *Klila*  
 Homo : homofermentaire

+ : Test positif  
 - : Teste négatif

Tableau III.2: Profil fermentaire des sucres

Souches Sucres	K2	K5	K7	K10	K25	K26	K27	K28	K31	K32	K33	K34	K35
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	±	±	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	±
Maltose	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amidon	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+
Glycérol	+	+	+	+	±	±	+	±	+	+	+	+	+
Salicine	+	+	+	+	+	+	±	-	+	+	+	+	+
Adonitol	+	+	+	+	±	+	+	-	+	+	+	+	+
Méthyl D Mannoside	+	+	+	+	±	+	+	-	+	+	+	+	+

+ : Test positif    - : Test négatif    ± : résultat intermédiaire

### III.1.3.1. Test de l'arginine dihydrolase (ADH)

Le test pour la recherche de l'arginine déshydrogénase a révélé que les treize souches sont ADH négatif « couleur jaune » ce qui explique l'incapacité des souches à produire l'ammoniac qui augmente le pH du milieu et qui provoque le virage de couleur au violet.

### III.1.3.2. Test de croissance à différentes températures

D'après les résultats représentés dans le tableau III.1 nous avons noté :

- 100 % des souches sont thermophiles parce qu'elles ont montré une capacité à croître à 45°C mais pas à 10°C après 24h d'incubation.

### III.1.3.3. Test de croissance en milieu hypersalé

Les résultats relatifs à cette recherche ont montré que:

- 100% des isolats ont la capacité de croître en présence de NaCl à 4% ;
- 100% des isolats sont incapables de tolérer une concentration de 6,5% de NaCl.

### III.1.3.4. Type fermentaire

Les résultats de type fermentaire sur le milieu Gibson et Abd El Malek ont montré que les treize souches isolées sont homofermentaires strictes. Nous avons observé pour les treize tubes correspondants à ces souches : une absence de déplacement du bouchon de la gélose blanche (pas de production du gaz) et une absence de fragmentation du milieu (Photo III.4). Les lactobacilles thermophiles homofermentaires ; leur seul sous-produit, formé à partir de la fermentation est l'acide lactique ( Kullen et al., 1999) .



Photo III.4 : Type fermentaire sur le milieu Gibson et Abd El Malek

### III.1.3.5. Profil de fermentation des sucres

La différenciation entre les différentes espèces du genre *Lactobacillus* repose essentiellement sur leur faculté de fermenter différemment les carbohydrates.

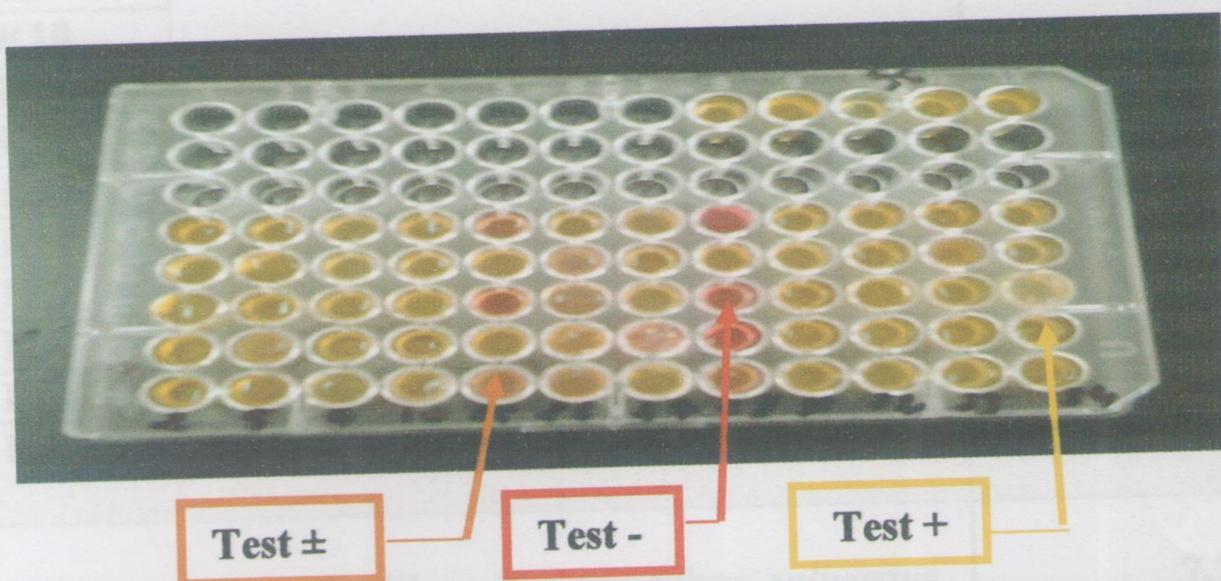


Photo III.5 : Profil fermentaire des bactéries lactiques isolée du Klila

Les résultats du profil de fermentation des sucres nous ont permis de distinguer :

- Les isolats codés respectivement : K2, K5, K7, K10, K25, K26, K27, K31, K32, K33, K34 et K35 fermentent tous plus ou moins les sucres suivants : Saccharose, Mannose, Glucose, Galactose, Xylose, Sorbose, Maltose, Dextrine, Raffinose, Amidon, Glycérol, Salicine, Adonitol, Méthyl D Mannoside.
- L'isolat codé par K28 fermente les sucres : Saccharose, Mannose, Glucose, Galactose, Maltose, Dextrine, Raffinose, Amidon, Glycérol mais il est incapable de fermenter les sucres suivants : Sorbose, Salicine, Adonitol, Méthyl D Mannoside.

### III.1.3.6. Identification des souches

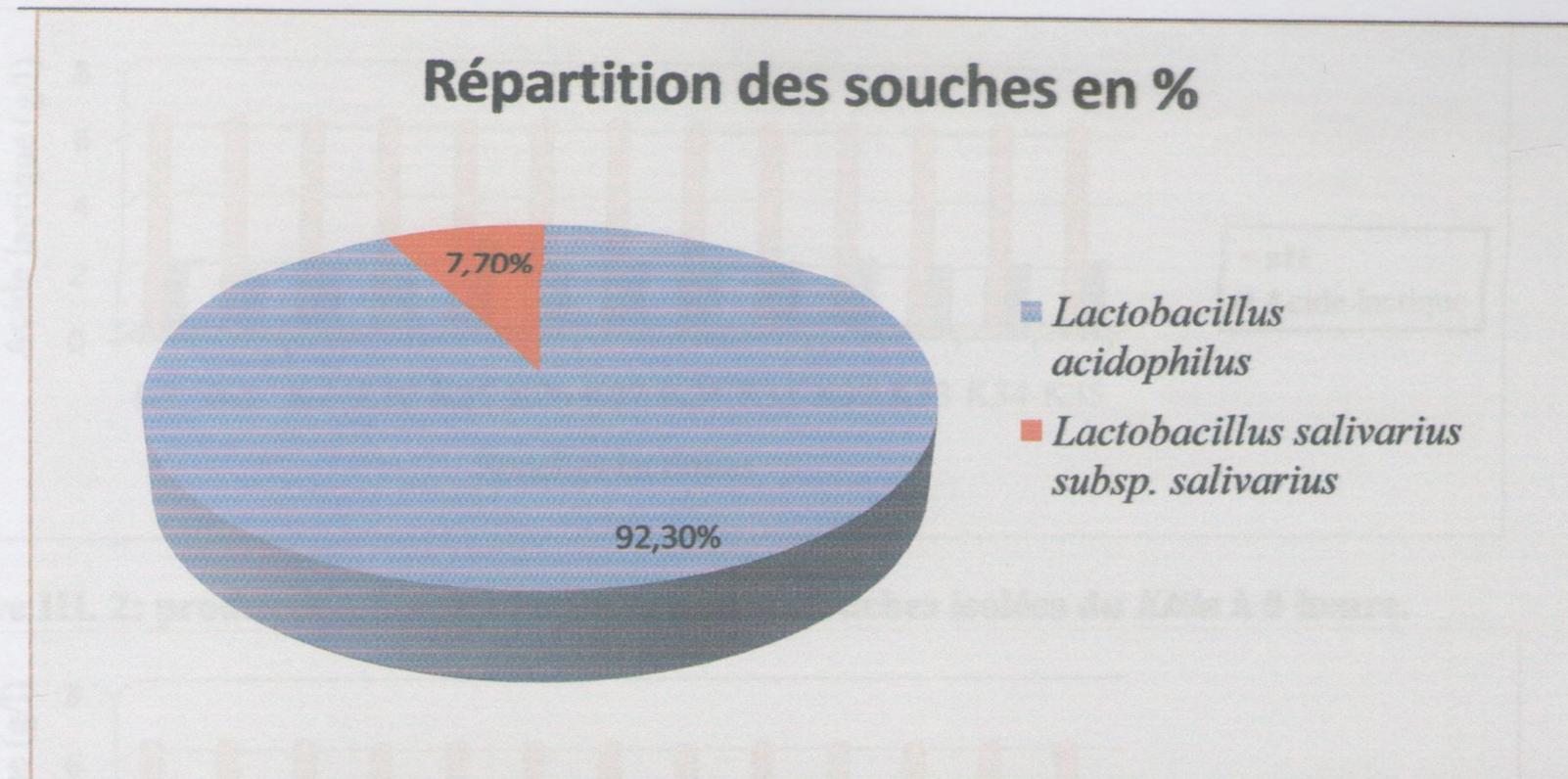
L'analyse des profils fermentaires (Tableau III.2) révèle une diversité métabolique des carbohydrates chez les isolats retenus.

La comparaison de nos résultats avec les souches de référence présentées dans The Procaryotes (Dworkin et al., 2006) et le Bergey's Manual of Systematic Bactériology (De Vos et al., 2009), nous a amené à définir les différentes espèces appartenant au genre « *Lactobacillus* » :

- Les souches codées respectivement : K2, K5, K7, K10, K25, K26, K27, K31, K32, K33, K34 et K35 sont homofermentaires, thermophiles et possèdent un profil fermentaire qui correspond à celui de *Lactobacillus acidophilus*.
- La souche codée par K28 est homofermentaire, thermophile, ne fermente ni : Sorbose, Salicine, Adonitol, Méthyl D Mannoside et est identifiée comme *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius*.

Tableau III.3: Nom scientifique et pourcentage des espèces identifiées.

Codes	Espèces identifiées	Pourcentages
K2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	92.3%
K5		
K7		
K10		
K25		
K26		
K27		
K31		
K32		
K33		
K34		
K35		
K28		



**Figure III.1: Répartition des espèces des bactéries lactiques isolées du Klila en pourcentage**

D'après les résultats obtenus représentés dans le (Tableau III.3) et illustrés par la (figure III.1), nous avons noté une prédominance de l'espèce *Lactobacillus acidophilus* avec un pourcentage de 92.3% et une présence moindre de l'espèce *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius* avec un pourcentage de 7.7% .

Nos résultats sont comparables avec ceux de Mami et al., (2008) qui ont identifié avec un pourcentage de 90% l'espèce *L. acidophilus* dans le lait cru de chèvre Algérien.

D'autre part, Vinderola et al., (2000) et Coeuret et al., ( 2003) ont trouvé, après isolement et identification des bactéries lactiques à partir du fromage, la présence de souches *L. acidophilus* et *L. salivarius subsp. salivarius* .

Le genre *Lactobacillus* est l'un des grands groupes de bactéries lactiques utilisées dans les produits fermentés. La souche *L. acidophilus* se trouve en abondance dans les produits laitiers en raison de l'avantage potentiel de production d'acide lactique qui a un effet barrière contre la prolifération des souches pathogènes (Schillinger, 1999).

### III. 2. Etude de quelques Aptitudes technologiques et probiotiques

#### III. 2.1 : Activité acidifiante

C'est principalement pour leur activité acidifiante que les industries agroalimentaires utilisent les bactéries lactiques, car elle est considérée comme un critère primordial de sélection des souches à intérêt. Les résultats obtenus sont illustrés par les (figures III.2, III.3, III.4, III.5). Les résultats chiffrés de l'évolution du pH sont résumés dans l'annexe.

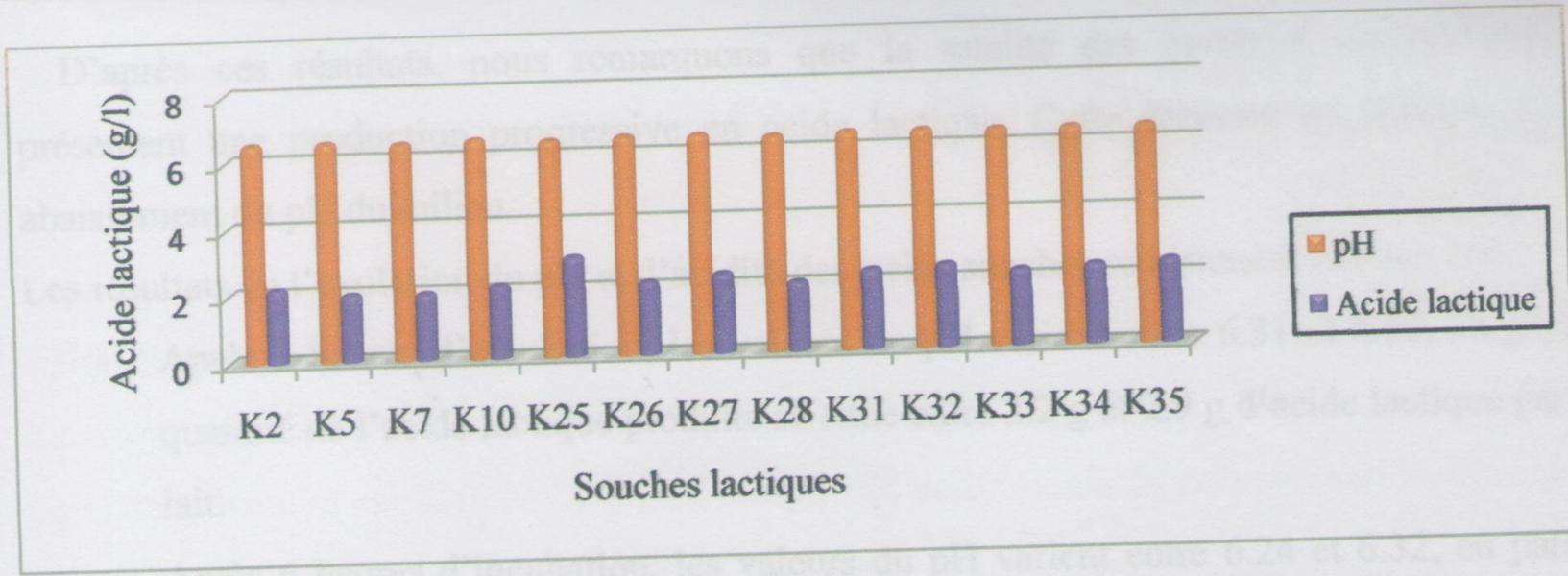


Figure III. 2: production d'acide lactique par les souches isolées du *Klila* à 0 heure.

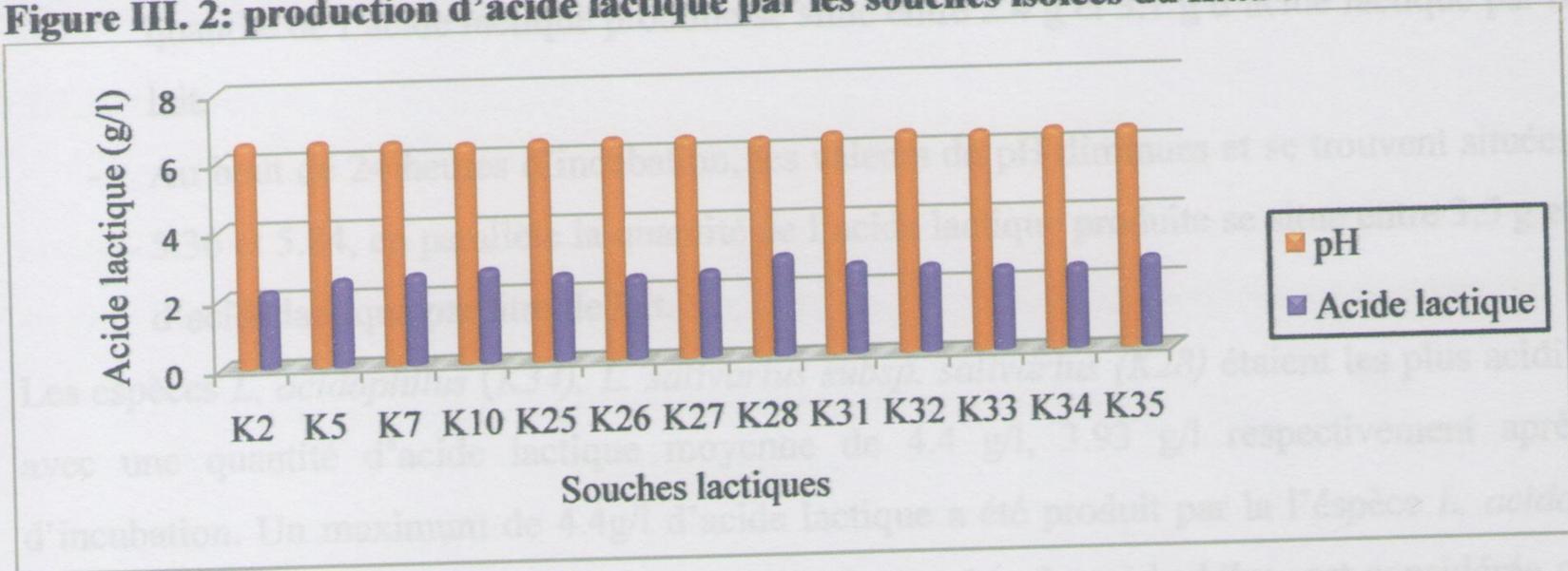


Figure III.3 : production d'acide lactique par les souches isolées du *Klila* après 3 heures.

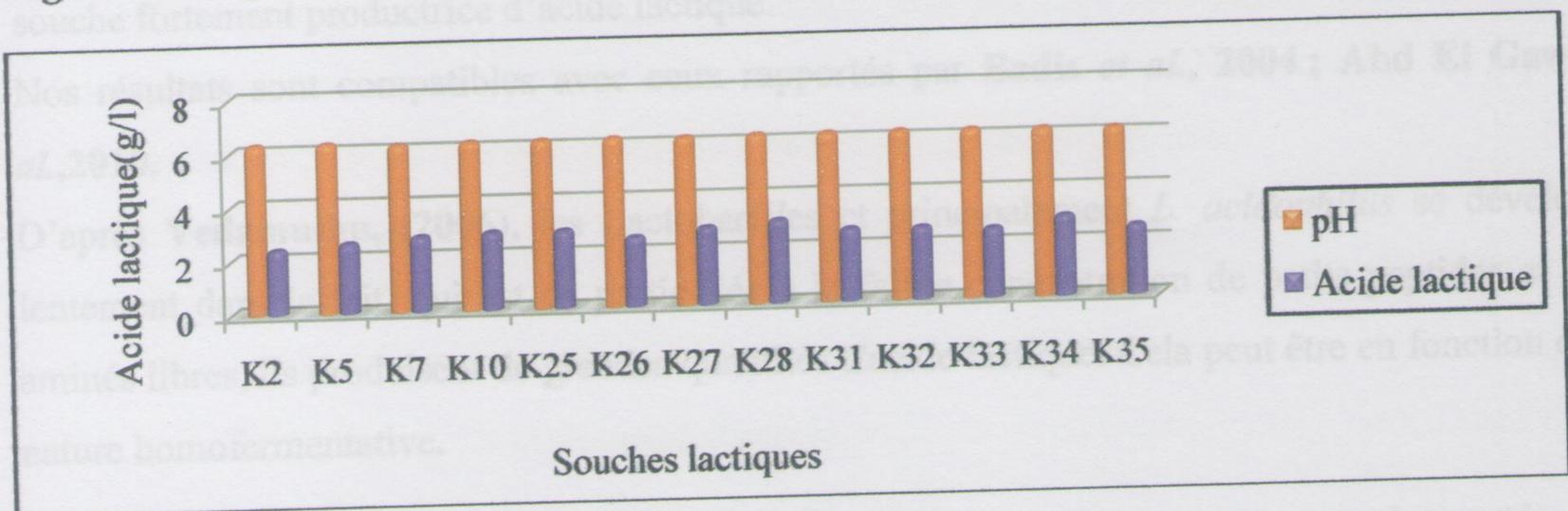


Figure III.4 : production d'acide lactique par les souches isolées du *Klila* après 6 heures.

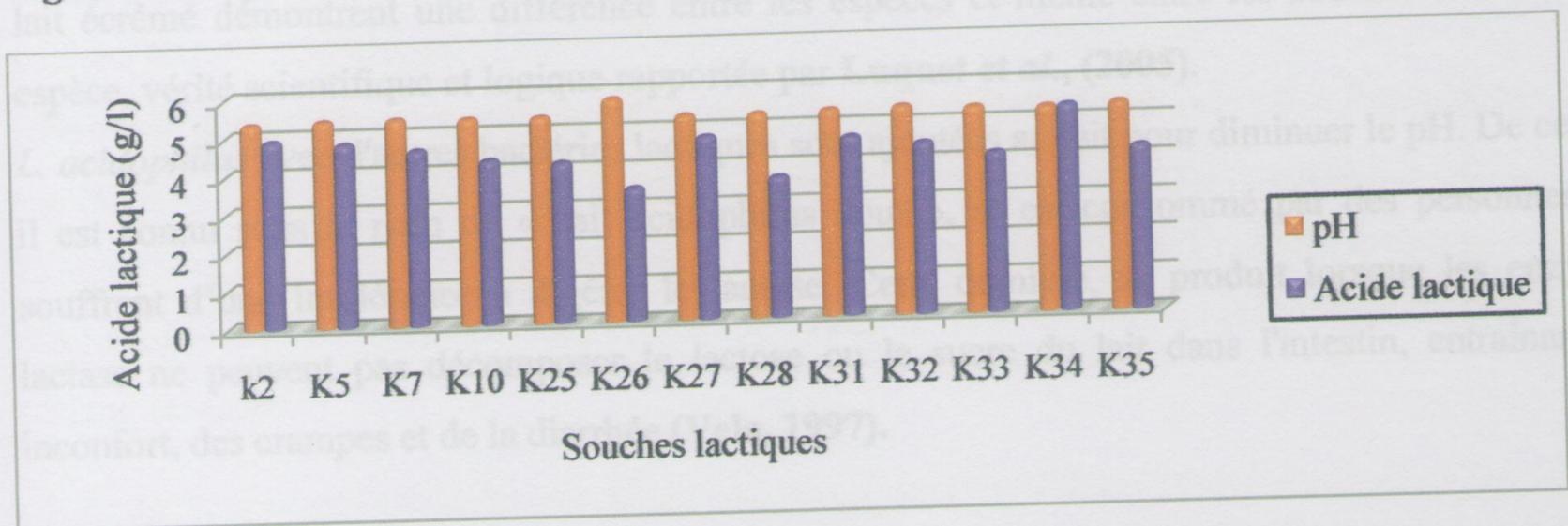


Figure III.5: production d'acide lactique par les souches isolées du *Klila* après 24 heures.

D'après ces résultats, nous remarquons que la totalité des bactéries lactiques identifiées présentent une production progressive en acide lactique. Cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu.

Les résultats de l'évolution du pH et d'acidité des treize souches se résument comme suit :

- Après 3 heures d'incubation, les valeurs du pH varient entre 6.31 et 6.50, en parallèle la quantité de l'acide lactique produite se situe entre 2.2 g et 2.9 g d'acide lactique par litre de lait.
- Après 6 heures d'incubation, les valeurs du pH varient entre 6.24 et 6.32, en parallèle la quantité de l'acide lactique produite se situe entre 2.4 g et 3.1 g d'acide lactique par litre de lait.
- Au bout de 24 heures d'incubation, les valeurs du pH diminues et se trouvent situées entre 5.36 et 5.84, en parallèle la quantité de l'acide lactique produite se situe entre 3.5 g et 5.4 g d'acide lactique par litre de lait.

Les espèces *L. acidophilus* (K34), *L. salivarius subsp. salivarius* (K28) étaient les plus acidifiantes avec une quantité d'acide lactique moyenne de 4.4 g/l, 3.93 g/l respectivement après 24h d'incubation. Un maximum de 4.4g/l d'acide lactique a été produit par la l'espèce *L. acidophilus* (K34) après 24 heures d'incubation. De ce fait, la souche *L. acidophilus* est considérée comme souche fortement productrice d'acide lactique.

Nos résultats sont compatibles avec ceux rapportés par **Badis et al., 2004 ; Abd El Gawad et al., 2010.**

D'après **Vedamuthu, (2006)**, les Lactobacilles et principalement *L. acidophilus* se développent lentement dans le lait, qui est en partie liée à la faible concentration de petits peptides et acides aminés libres, ils produisent de grandes quantités d'acide lactique. Cela peut être en fonction de leur nature homofermentative.

L'évolution de l'acidité et les variations de pH au cours de la croissance des souches testées sur le lait écrémé démontrent une différence entre les espèces et même entre les souches d'une même espèce, vérité scientifique et logique rapportée par **Luquet et al., (2005).**

*L. acidophilus* avec d'autres bactéries lactiques sont ajoutées au lait pour diminuer le pH. De ce fait, il est connu sous le nom de « Lait acidophilus doux », et est consommé par des personnes qui souffrent d'une intolérance à digérer le lactose. Cette dernière, se produit lorsque les enzymes lactase ne peuvent pas décomposer le lactose ou le sucre du lait dans l'intestin, entraînant un inconfort, des crampes et de la diarrhée (**Vela, 1997**).

### III. 2. 2. Aptitude texturante

La présence de cette activité se traduit par la capacité des souches à se développer sur milieu hypersaccharosé en formant des colonies à aspect plus ou moins gluant témoignant une production d'un agent épaississant, les exopolysaccharides.

D'après nos résultats sur le milieu hypersaccharosé, les treize souches montrent une absence de colonies larges et gluantes, donnant des colonies de taille normale ; cela peut être traduit par une perte de plasmides car d'après **Lenoir et al, (1992)**, la formation de polysaccharides épaississante a été rapportée à la présence de plasmide.

### III.2. 3. Aptitude protéolytique

Le développement de la texture et la saveur des fromages lors de l'affinage est essentiellement dû à l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Cette activité est assurée par les enzymes de la paroi mais aussi des protéases et des peptidases intracellulaires libérées par la lyse cellulaire (**Novel, 1993**).

Les résultats que nous avons obtenus sur les treize souches présentent une absence d'activité protéolytique ; cela est probablement dû au traitement thermique qui fait parti des étapes de préparation du fromage *Klila*.

Selon **Chandan et al., (2013)**, *L. acidophilus* n'a pas un bon système protéolytique pour l'hydrolyse de protéines de lait car le traitement à haute température utilisé dénature les peptides et libère les protéines du lait, ce qui contribue à la croissance de l'organisme.

### III.2.4. Aptitude lipolytique

Les bactéries lactiques sont considérées comme faiblement lipolytiques (**De Roissart et Luquet, 1994**) par comparaison avec d'autres espèces bactériennes telles que *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ou *Flavobacterium* (**Brennan et al., 2002**).

D'après les résultats obtenus, il apparaît que l'ensemble des treize souches lactiques ne présentent pas une activité lipolytique.

**Meyers et al (1996)**, ont montré que l'activité lipolytique était plus élevée chez *Lactococcus lactis ssp lactis* et *Lactococcus lactis ssp hordniae* que chez *Lactobacillus sp* ou *L. casei*.

D'autre part, les travaux de **Fernandez et al. (2000)**, ont montré que l'activité estérasique n'était pas nécessaire à la croissance des bactéries lactiques ni dans un milieu synthétique, ni dans du lait écrémé ou entier.

### III.2.5. Tolérance aux acides

Une des caractéristiques importantes d'une bactérie lactique à effet probiotique est sa capacité de survivre dans des conditions difficiles d'acidité simulant celles du jus gastrique, ce dernier pouvant varier entre pH 1 après un jeûne et pH 4.5 à la suite d'un repas (Maragkoudakis et al., 2006). Les lactobacilles sont connues pour leur résistance aux pH acide (jusqu'à un pH voisin de 3.5) contrairement aux autres genres de bactéries lactiques qui sont plus sensibles (Podolak et al., 1996, Wilson et al., 2005).

Les figures III.6, III.7, montrent les taux de survie des isolats, après 24h d'incubation, dans le milieu MRS de différents pH: 2, 3, 4. Le pH 6.5 a été utilisé comme contrôle avec un maximum de viabilité (100%). Les résultats chiffrés du pH 3 et pH 4 sont résumés dans l'annexe.

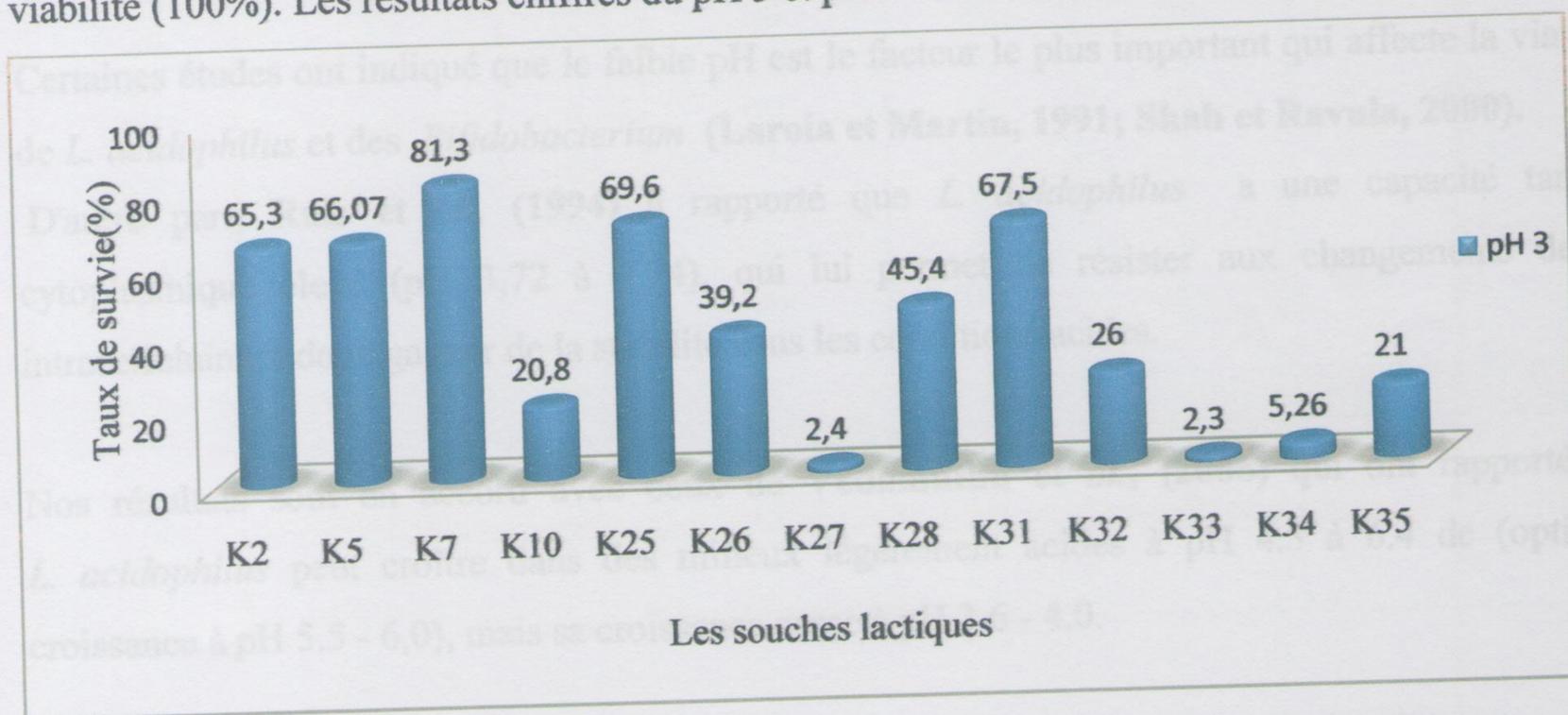


Figure III.6 : Le taux de survie des souches lactiques à pH 3 après 24h d'incubation.

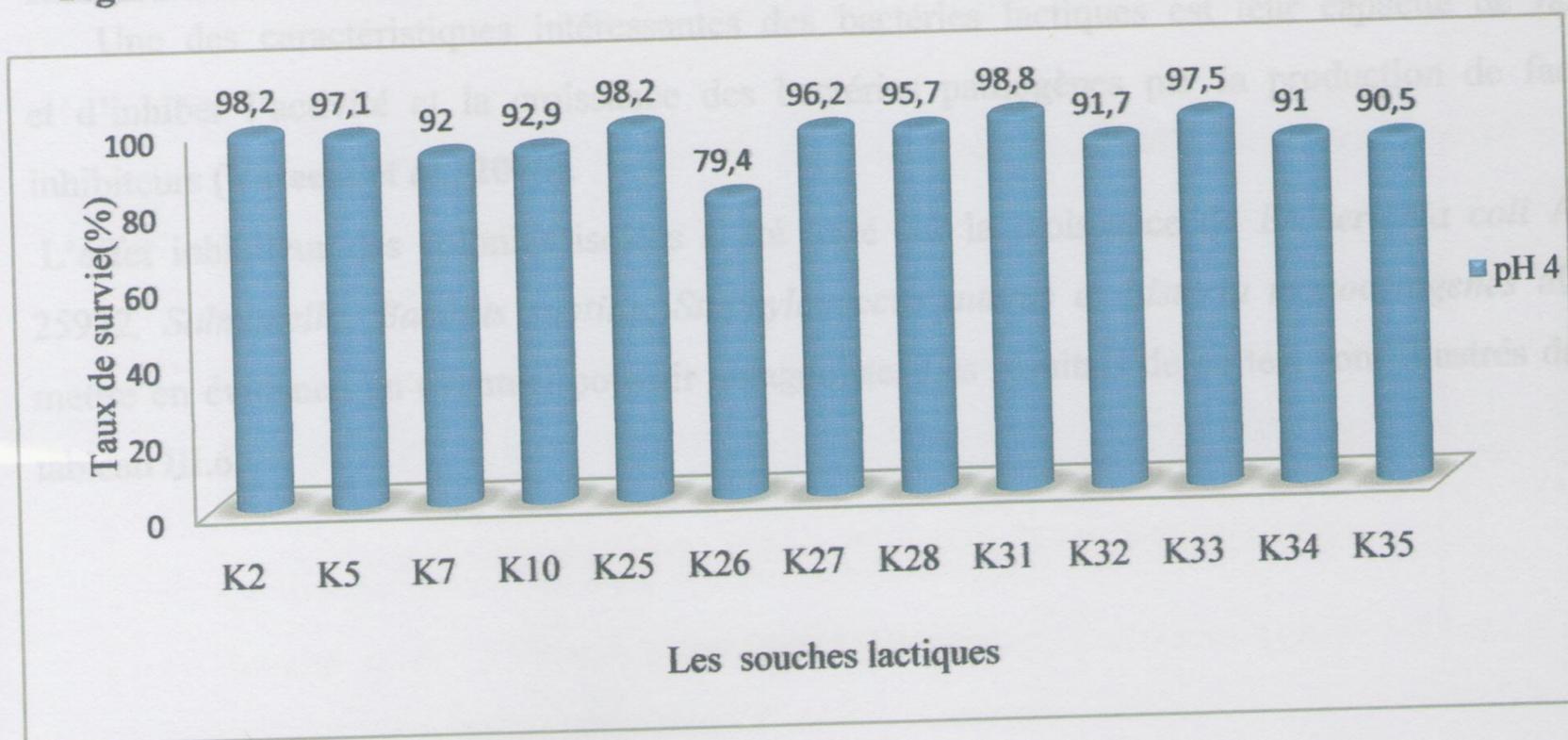


Figure III.7 : Le taux de survie des souches lactiques à pH 4 après 24h d'incubation.

Les résultats obtenus montrent une absence totale de croissance de nos isolats à pH 2 et une croissance plus ou moins prononcée à pH 3 et pH 4.

Les résultats illustrés dans les figures III.6 et III.7 montrent que le taux de viabilité à pH 3 est compris entre [2.3, 81.3]. Contrairement à celui de pH 4, les isolats montrent une viabilité presque maximale, allant jusqu'à 98.8 %.

D'après **Podolak et al., (1996)**, **Wilson et al., (2005)** les lactobacilles sont connues pour leur résistance aux pH acide (jusqu'à un pH voisin de 3.5) contrairement aux autres genres de bactéries lactiques qui sont plus sensibles.

Certaines études ont indiqué que le faible pH est le facteur le plus important qui affecte la viabilité de *L. acidophilus* et des *Bifidobacterium* (**Laroia et Martin, 1991**; **Shah et Ravula, 2000**).

D'autre part, **Ruis et al., (1994)** a rapporté que *L. acidophilus* a une capacité tampon cytoplasmique élevé (pH 3,72 à 7,74), qui lui permet de résister aux changements de pH intracellulaire et donc gagner de la stabilité sous les conditions acides.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Vedamuthu et al., (2006)** qui ont rapporté que *L. acidophilus* peut croître dans des milieux légèrement acides à pH 4.5 à 6.4 de (optimum croissance à pH 5.5 - 6,0), mais sa croissance cesse à pH 3.6 - 4.0.

### III.2.6. L'activité antimicrobienne

Une des caractéristiques intéressantes des bactéries lactiques est leur capacité de ralentir et d'inhiber l'activité et la croissance des bactéries pathogènes par la production de facteurs inhibiteurs (**Yateem et al., 2008**).

L'effet inhibiteur des colonies isolées a été testé sur la croissance de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* afin de mettre en évidence un éventuel pouvoir antagoniste. Les résultats de ce test sont illustrés dans le tableau III.6.

- Les souches codées K32 et K34 qui appartiennent à l'espèce *L. acidophilus* ont un pouvoir antagoniste prononcé vis-à-vis des souches pathogènes.
- La souche codée K28 qui appartient à l'espèce *L. salivarius* subsp. *salivarius* inhibe uniquement les souches pathogènes *E. coli* et *S. aureus*.

**Orda et al. (2003)** suggèrent que les bactéries Gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques.

Tableau III.6 : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries pathogènes par les souches lactiques

Souches lactiques	Noms d'espèces	Diamètres des zones d'inhibition (mm)				
		<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>L.monocytogenes</i>
K2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	00	6	00	8	7
K5		00	8	00	00	7
K7		6	6	00	00	9
K10		7	8	00	00	7
K25		00	6	00	7	00
K26		00	00	00	00	8
K27		00	00	00	6	00
K31		4	00	00	5	00
K32		6	7	10	5	9
K33		8	00	6	8	8
K34		10	8	6	6	7
K35		10	00	00	6	00
K28		<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	8	00	00	6

D'après les résultats illustrés dans le tableau III.6, nous constatons que l'ensemble des souches pures ne présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis des bactéries pathogènes dont nous avons pu distinguer :

- La présence des zones d'inhibition qui est le résultat d'un antagonisme exercé par les bactéries lactiques envers les souches pathogènes. Les diamètres des zones d'inhibition étaient de 4 à 10 mm.
- L'absence des zones d'inhibition, qui est le résultat d'une interaction positive qui s'exprime par la stimulation de la croissance des souches mises en contact, a été observée.
- Les souches codées K32 et K34 qui appartiennent à l'espèce *L. acidophilus* ont un pouvoir antagoniste prononcé vis-à-vis des souches pathogènes.
- La souche codée K28 qui appartient à l'espèce *L. salivarius* subsp. *salivarius* inhibe uniquement les souches pathogènes *E. coli* et *S. aureus*.

Onda et al. (2003) suggèrent que les bactéries Gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques.

Par ailleurs, les bactéries lactiques sont connues par la production d'une multitude de composés antimicrobiens : les acides organiques, les bactériocines, le diacétyle et le peroxyde d'hydrogène (Titiek *et al.*, 1996 ; Aslam et Qazi, 2010).

Ammor *et al.*, (2006) ont constaté que la capacité inhibitrice *in vitro* des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes semble être une bonne propriété probiotique, comme elle peut jouer un rôle dans la préservation de la qualité hygiénique des denrées alimentaires.

**III.2.8. Résistance et sensibilité aux antibiotiques**

Plusieurs études ont montré la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques (Botes *et al.*, 2008).

Les résultats de la résistance et la sensibilité des souches lactiques aux antibiotiques sont groupés dans le tableau III.6.



**Photo III.6 : Antibiogramme de la souche K25.**

**Tableau III.6 : Résultats de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques**

ATB / Souches	Pénicilline G	Amoxicilline	Colistine sulfate	Streptomycine
K2	I	S	R	S
K5	I	S	R	S
K7	S	S	R	S
K10	I	S	R	S
K25	I	S	R	S
K26	I	S	R	S
K27	I	S	R	S
K28	I	S	R	S
K31	I	S	R	S
K32	I	S	R	S
K33	I	S	R	S
K34	I	S	R	S
K35	I	S	R	S

K : souche isolée du *Klila*  
 I : Intermédiaire

R: Résistant  
 S : Sensible

D'après les résultats illustrés dans le tableau III.6, on peut conclure que :

- 100% des souches identifiées sont résistants à l'antibiotique Colistine sulfate.
- 100% des souches identifiées sont sensibles aux antibiotiques Amoxiciline et Streptomycine.
- 7.7% des souches identifiées sont sensibles aux antibiotiques Pénicilline G, Amoxiciline et Streptomycine.

Il faut signaler que cette résistance et sensibilité trouvées dans notre étude, peuvent être liées à la concentration de chaque antibiotique d'où la nécessité de tester plusieurs concentrations pour confirmer les résultats.

Concernant la Pénicilline, et selon **Danielsen et Wind., (2003)**; **Coppola et al. (2005)**, les *Lactobacillus* montrent une sensibilité à cet antibiotique qui comprend des inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire. Par contre, nos résultats sont similaire à ceux de **Temmerman et al., (2002)** qui ont trouvé que les lactobacilles isolés des produits probiotiques ont une résistance modérée à la Pénicilline.

Concernant la Streptomycine, les résultats de **Charteris et al., (1998)** vis-à-vis des *Lactobacillus*, ont montré une résistance à cet antibiotique, contrairement à nos résultats. Cela peut être traduit par l'inhibition de la synthèse des protéines exercée par l'antibiotique.

**Charteris et al., (1998)** ont rapporté que les *Lactobacillus* montrent une résistance à l'antibiotique Colistine sulfate (qui exerce un effet inhibiteur sur la membrane cytoplasmique). Cela est en accord avec nos résultats obtenus.

Depuis que les lactobacilles sont connus pour leur résistance naturelle à certains antibiotiques ; ils sont utilisés dans le traitement de diarrhée, infection du tractus urogénital féminin, et l'endocardite infectieuse (**Charteris et al., 1998**).

Dans les interactions entre bactéries, le matériel génétique est transféré d'une bactérie à une autre, et également des gènes codant pour la résistance à certain antibiotique peuvent être transmises à d'autres espèces bactériennes. Cependant, il est à craindre que la résistance aux antibiotiques dans les lactobacilles pourrait être transférée éventuellement à des espèces bactériennes pathogènes, ce qui compliquera le traitement d'une maladie ou d'une infection et favorisera la propagation de bactéries résistantes aux antibiotiques (**European Commission. 2005, European Commission 2008**).

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis plusieurs siècles comme des agents protecteurs dans les aliments fermentés. Ces dernières sont présentes dans une grande variété d'aliments : le lait fermenté, les yaourts, les fromages et les produits carnés fermentés.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressées aux bactéries lactiques isolées du *klila* où la flore lactique qui a été identifiée est peu variable (92.3% des isolats appartiennent à l'espèce *Lactobacillus acidophilus*, 7.7% représente l'espèce *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*), mais prometteuse du fait de sa tolérance à une forte acidité et de la possibilité d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes par la synthèse de substances antimicrobiennes. Ce produit peut porter le nom de fromage probiotique en lui apportant des modifications au niveau de la microflore lactique à des fins de tolérances à l'acidité stomacale.

Nos résultats sur ce fromage traditionnel sont peu fiables pour être une référence dans les recherches à venir, car la purification effectuée ne prend pas en considération la totalité des souches isolées ; nous proposons pour compléter ce travail sur la flore lactique du fromage traditionnel *Klila* :

- Une protection par encapsulation des bactéries lactiques pour une meilleure tolérance aux conditions acides, particulièrement ; l'acidité stomacale.
- Une mesure de leur résistance aux bactériophages, car cette caractéristique est directement reliée à la réussite ou non de la production fromagère.
- Une meilleure caractérisation des activités enzymatiques des souches bactériennes, car la qualité des produits fermentés passe par une meilleure connaissance des activités métaboliques des bactéries lactiques.
- Une étude *in vivo* des propriétés probiotiques des souches possédant de bonnes aptitudes *in vitro* (par exemple l'adhésion aux cellules épithéliales humaines).

## A

- Abd El Gawad I. A., Abd El Fatah A. M. et Al Rubayyi K. A.** (2010). Identification and Characterization of Dominant Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Rayeb Milk in Egypt. *J. Amer. Sci.* 6(10): 728-735.
- Abou-Donia S.** (2008). Origin, history and manufacturing process of Egyptian dairy products. *Alexandria J. Food Sci. Technol.* 5: 51-62.
- Accolas J. P., Bloquel R., Didinne R. et Regnier J.** (1977). Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques *Thermophilus* en relation avec la fabrication du yoghourt. *Lait.* 76: 1-23.
- Agroligne.** (2001). Revue N°14: Avril –Mai.
- Ahmed T. et Kanawal R.** (2004). Biochemical characteristics of lactic acid bacteria producing bacteria and preparation of camel milk cheese by using starter culture. *Pak. Vet. J.* 24(2): 87-91.
- Aissaoui O., Zitoun M. et Zidoune N.** (2006). Le fromage traditionnel algérien «Bouhezza». Séminaire d'Animation Régional. Technologies douces et procédés de séparation au service de la qualité et de l'innocuité des aliments. INSAT-Tunis. Tunisie. 27-29.
- Al-Otaibi M. M.** (2009). Evaluation of some probiotic fermented milk from El Ahsa Markets, Saudi Arabia. *Amer. J. Food Tech.* 4(1): 1-8.
- Ammor M. S. et Mayo B.** (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat Sci.* 76: 138-146.
- Ammor S., Tauveron G., Dufor E. et Chevalier I.** (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Contr.* 17: 454-461.
- Ana Belen F., Lopez-Diaz M. C., Alvarez-Martin P. et Mayo B.** (2006). Caractérisation microbienne du fromage traditionnel espagnole à pâte persillée fromage de Cabrales : Identification des dominantes des bactéries lactique. *Eur. Res. Technol. Aliment.* 223-503.

Aslam S. et Qazi J. I. (2010). Isolation of acidophilic lactic acid bacteria antagonistic to microbial contaminants. *Pak. J. Zool.* 42(5): 567-573.

Axelsson L. T. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects. Edited by Salminen S., Wright A. V. et Ouwehand A. Marcel Dekker. Inc. 1-66.

## B

Badis A., Guetarni D., Moussa-Boudjem B., Henni D.E., Tornadijo M. E. et Kihal M. (2004). Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiol.* 21(3): 343-349.

Belkaaloul K., Chekroun A., Ait-Abdessalam A., Saidi D. et Kheroua O. (2010). Growth, acidification and proteolysis performance of two cocultures (*Lactobacillus plantarum*-*Bifidobacterium longum* and *Streptococcus thermophilus*-*Bifidobacterium longum*). *Afr. J. Biotechnol.* 9(10): 1463-1469.

Ben Moussa O., Mankai M., Setti K., Boulares M., Maher M., Hassouna M. (2008). Characterisation and technological properties of psychotropic lactic acid bacteria strains isolated from Tunisian raw milk, Tunis. *Annal Microbiol.* 58(3): 461-469.

Bencharif A. (2001). Stratégies des acteurs de la filière lait en Algérie: états des lieux et problématiques. Options Méditerranéennes Série. B. *Etudes Rec.* 32: 25-45.

Bendimerad N. (2013). Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type «Jben. ». Thèse de doctorat. Produits laitiers. Université Aboubekr Belkaid. Tlemcen. Algérie: 77-78.

Botes M., Van-Reenen C. A. et Dicks L. M. T. (2008). Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastro-intestinal model with infant milk formulations as substrate. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 362-370.

**Boubekri K., Ohta Y.** (1996). Identification of lactic acid bacteria from Algerian traditional cheese, El-Klila. *J. Sci. Food Agric.* 70: 501-505.

**Bourgeois C. M. et Larpent J. P.** (1996). Microbiologie alimentaire: Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2. 2<sup>ème</sup> édition. Apria. Paris. France. 4-16.

**Bourgeois C. M., Mescle J., Zucca J. et Larpent J. F.** (1996). Microbiologie Alimentaire. Tome 1. Lavoisier. Paris. 29-245.

**Brennan N. M., Ward A. C., Beresford T. P., Fox P. F., Goodfellow M. et Cogan T. M.** (2002). Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2): 820-830.

**Bukola C. A. et Abidun A. O.** (2008). Screening of lactic acid bacteria strains isolated from some Nigerian Fermented Foods for EPS production. *W. App. Sci. J.* 4(5): 741-747.

## C

**Campaniello D., Bevilacqua A., Damato D., Corbo M. R., Altieri C. et Sinigaglia M.** (2005). Microbial characterization of table olives. *food technol. Biotechnol.* 43(3): 289-294.

**Cardinal M. J., Meghrous J., Lacroix C. et Simard R. E.** (1997). Isolation of *Lactococcus lactis* strain producing inhibitory activity against *Listeria*". *Food Biotechnol.* 11(2): 129-146.

**Carr F. J., Chill D. et Maida N.** (2002). The lactic Acid Bacteria: A literature Survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28(4): 281-370.

**Chandan R. C., Kilara A.** (2013). Manufacturing Yogurt and Fermented Milks. Second edition. Wiley-Blackwell. UK. 404.

**Charteris W. P., Kelly P. M., Morelli L. et Collins J. K.** (1998). Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. *J. Food Prot.* 12: 1597-1697.

**Coeuret V., Dubernet S., Bernardeau M. Micheline Gueguen M. et Vernoux J. P.** (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*. 83: 269-306.

**Coppola R., Succi M., Tremonte P., Reale A., Salzano G. et Sorrentino E.** (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*. 85: 193-204.

**Corrieu G. et Luquet F. M.** (2008). Bactéries lactiques: de la génétique aux ferments. *Tec et Doc. Lavoisier. Paris*. 270.

## D

**Danielsen M., et Wind A.** (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82: 1-11.

**De Roissart H. et Luquet F.M.** (1994). Bactéries lactiques. Edition Loriga. Vol I et II.

**De Vos P., Garrity M. G., Jones D., Krieg R. N., Ludwig W., Schleifer K. H. et Whitman B. W.** (2009). *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. 2<sup>ème</sup> édition .Vol 3: the *Firmicutes*. Springer. 484-485.

**Delarras C.** (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier. 128.

**Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M. C. et Janssens D.** (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In: Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques.* Roissart H., Luquet F. M., Loriga: Uriage. France. 25-116.

**Dharam P. et Narender R. P.** (2007). Indian traditional dairy products: An overview. *Int. Conf. Trad. Dairy Foods*. NDRI. KARNAL (INDIA). 14-17.

**Drouault S., Corthier G.** (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *INRA. EDP Sciences*. 32: 101-117.

**Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H. et Stackebrandt E.** (2006). The prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. Vol 4: Bacteria, Firmicutes, Cyanobacteria. *Springer*. 357-359.

## E

**El marrachi et Himmama A.** (1996). Aspects hygiéniques du fromage frais de chèvre: Perspectives d'amélioration de la qualité. Les perspectives de développement de la filière lait de chèvre dans le bassin méditerranéen. Une réflexion collective appliquée au cas marocain. *Étude FAO: Production et santé animales*. 131 .

**El-Baradei G., Delacroix-Buchet A. et Ogier J. C.** (2008). Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 295–301.

**European Commission.** (2005). Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA J.* 223: 1-12.

**European Commission.** (2008). Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA J.* 1-15.

## F

**Fernandez de Palencia P., Pelaez C. et Martin-Hernandez M. C.** (1997). Purification and characterization of the cell wall proteinase of *Lactobacillus casei* ssp. *casei* IFPL731 isolated from raw goat's milk cheese. *J. Agri. Food Chem.* 45: 3401-3405.

**Fox P. F. et Sweeney P. L. H.** (2004). Cheese an overview. *In: Cheese: Chemistry Physics and Microbiology, general aspects*, third edition. 1: 1-8.

**Kullen M. J. and Klaenhammer T. R.** (1999). Identification of the pH-inducible, proton-translocating  $F_1F_0$ ATPase (atpBEFHAGDC) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display; gene structure, cloning and characterization. *Mol. Biol.* 33: 1152-1161.

## L

**Lapointe G.** (2009). Métabolisme des bactéries lactiques. *In: Bactéries lactiques: physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles.* Drider D., Prévost H. Ed Economica. Paris. 73-74.

**Laroia S. et Martin J. H.** (1991). Methods for enumerating and propagating bifidobacteria. *Cult. Dairy Pro. J.* 32-33.

**Lenoir J., Hernier J. et Weber F.** (1992). Les groupes microbiens d'intérêt laitier. CIPIL. 9-40.

**Leroi F.** (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiol.* 27(6): 698-709.

**Leroy F. et De Vuyst L.** (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 194-199.

**Levata-Jovanovic M., Sandine W. E.** (1996). Citrate utilization and diacétyle production by various strains of *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Cremoris*. *Dairy Sci.* 79: 1928-1935.

**Leveau J. Y., Bouix M. et Deroissart M.** (1991). La flore lactique. Technique d'analyse de contrôle dans les I. A. A. O. 2<sup>ème</sup> édition. Tome 3. Tech et Doc. Lavoisier. 172-175.

**Luquet F. M.** (2005). Bactéries lactiques et probiotiques. Technique et documentation. Lavoisier. 90-91

## M

**Mami A., Henni J. E. et Kihal M.** (2008). Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*. *W. J. Dairy & Food Sci.* 3(2): 39-49.

- Manoj K., Ravinder N., Vinod V., Ashok K., Navrinder K., Rajkumar H., Sanjeev K. Gautam, et Birbal S.** (2012). Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colo cancer. *Nutr. rev.* 71(1): 23–34.
- Maragkoudakis P. A., Zoumpopoulou G., Miaris C., Kalantzopoulos G., Pot B. et Tsakalidou E.** (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J.* 16: 189-199.
- Mathara J. M., Schillinger U., Kutima P. M., Mbugua S. K., et Holzapfel W. H.** (2004). Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of *Kule naoto*: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 94(3): 269- 278.
- Medouni Y., Boulahchiche N. et Brahimi R.** (2005). Rôle de la femme rurale dans le système de production agropastorale. Cas de la fraction Ouled Baida de la zone d'El Guedid. Région de Djelfa (steppe centrale). *Option: Méditerranéennes. Série A. n° 70.*
- Mennane Z., Faid M., Lagzouli M., Ouhssine M., Elyachioui M., Berny E., Ennouali M. et Khedid K.** (2007). Physico-Chemical, Microbial and Sensory Characterisation of Moroccan Klila. *Middle-East. J. Sci. Res.* 2(3-4): 93-97.
- Mennane Z., Khedid K., Zinedine A., Lagzouli M., Ouhssine M. et Elyachioui M.** (2007). Microbial Characteristics of Klila and Jben Traditionnal Moroccan Cheese from Raw Cow's Milk. *W. J. Dairy & Food Sci.* 2(1): 23-27.
- Meyers S. A., Cuppett S. L. et Hutkins R. W.** (1996). Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. *Food Microbiol.* 13: 383–389.
- Mouzali L., Aziza M., Bensiamer-Touati K., Benateya H.** (2006). A cardoon (*cynara cardunculus* l.) used as vegetable rennet in an Algerian traditional cheese making "djben". *ISHS Acta Horticulturae. International Congress on Artichoke (abstract).* 660.
- Musikasang H., Tani A., H-Kittikun A. et Maneerast S.** (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 25(8): 1357- 1345.

## N

**Nouani A., Dako E., Morsli A., Belhamiche N., Belbraouet S., Bellal M.M. et Dadie A.** (2009). Characterization of the purified coaguland extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *Int. J. Food Technol.* 7: 20-29.

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

## O

**Onda T., Yanagida F., Tsuji M., Shinohara T. et Yokotsuka K.** (2003). Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005 isolated from Miso-paste. *Int. J. Food Microbiol.* 87(1-2): 153-159.

**Ouadghiri M., Vancanneyt M., Vandamme P., Naser S., Gevers G., Lefebvre K. et Swings J.** (2009). Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk "lben". *J. Appl. Microbiol.* 106: 486-495.

## P

**Pilet M. F., Magras C. et Federighi M.** (2005). Bactéries lactiques. *In: Manuel de bactériologie alimentaire.* Federighi M. 2<sup>ème</sup> édition. Economica. Paris. 219-240.

**Podolak P. K., Zays J. F., Kastner C. L. et Fung D. Y. C.** (1996). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59: 370-373.

**Poznanski E., Cavazza A., Cappa F. et Cocconcelli P. S.** (2004). Alpine environment microbiota influences the bacterial development in traditional raw milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 141-151.

**Prescott M., Harley J. P. et Klein D.** (2003). *Microbiologie.* 2<sup>ème</sup> édition. Boeck. Paris. 383.

## R

**Raimbault M.** (1995). Importance des bactéries lactiques dans les fermentations du manioc. Edition ORSTOM. 263-264.

**Roissart H. B.** (1986). Bactéries lactiques. *In: lait et produits laitiers*. Luquet F. Tech et Doc.

Lavoisier. 3-21.

**Ruis N., Sole M., Francis A. et Loren J. G.** (1994). Buffering capacity and membrane H<sup>+</sup> conductance of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 120: 291-296.

## S

**Salmeron J., De Vega C., Pérez-Elortondo F. J., Albisu M. et Barron L. J. R.** (2002). Effect of pasteurisation and seasonal variations in the microflora of ewe's milk for cheese making. *Food Microbiol.* 19: 167-174.

**Samet-Bali O., Ayadi M., Attia H.** (2009). Traditional Tunisian butter: physicochemical and microbial characteristics and storage stability of the oil fraction. *LWT. Food Sci. Technol.* 42: 899-905.

**Schillinger U.** (1999). Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. *Int. J. food microbiol.* 47: 79-87.

**Shah N. P. et Ravula R. R.** (2000). Influence of water activity on fermentation organic acids production and viability of yogurt and probiotic bacteria. *Aust. J. Dairy Technol.* 55: 127-131.

**Soomro A.H., Masud T. and Anwaar K.** (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. *Pak. J. Nutr.* 1(1): 20-24.

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

## T

**Tamime A. Y.** (2002). Microbiology of starter cultures. *In: Dairy microbiology handbook*. Robinson R. K., John W. et Sons. 3<sup>ème</sup> édition. Inc. New York. 261-366.

**Tantaoui-Elaraki A., Berrada M., El Marrakchi A., et Berramou A.** (1983). Etude sur le Lben Marocain. *Lait.* 63: 230-245.

**Teixeira L. M., Carvalho M. G. S. et Facklam R. R.** (1999). *Vagococcus*. *In: Enc. Food Microbiol.* Robinson R. K. Oxford. Elsevier. 2215-2220.

**Temmerman R., Pot B., Huys G., Swings J.** (2002). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 1-10.

**Teuber M., Geis A. et Neve H.** (1992). The Genus *Lactococcus*. In: The prokaryotes, a Hand book on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria. Éd. T. H. G. BalowsA., Dworkin M., HarderW. et Schleifer K. H. NewYork. *Springer-Verlag*. II: 1482-1501.

**Titiek F. D., Endang S. R., Djoko W. et Slamet S.** (1996). Antimicrobial substance produced by *Lactobacillus* sp. TGR-2 isoleted from *Growol*. *Indonesian. Food Nutr. Prog.* 3(2): 29-34.

## V

**Vandamme P., Pot B., Gillis M., Vos P., Kersters K. et Swings J.** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407-438.

**Vedamuthu E. R.** (2006). Starter cultures for yogurt and fermented milks. In: Manufacturing yogurt and fermented milks. Chandan, R. C. ed. Blackwell Publishing: Oxford. 89-115.

**Vela G. R.** (1997). Applied Food Microbiology. Star Publishing Company. 457.

**Vignola C. L.** (2002). Science et technologie du lait. Transformation du lait. Presses Inter Polytech. Canada. 96- 111.

**Vinderola C. G., Prosello W., Ghiberto T. D., Reinheimer J. A.** (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and no probiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *J. Dairy Sci.* 83: 1905–1911.

## W

**Wilson A. R. Sigee D. et Epton H. A. S.** (2005). Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1516-1522.

## Y, Z

**Yateem A., Balba M. T., AL-Surrayai T., Al-Mutairi B. et Al-Daher R.** (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Sci.* 3(4): 194-199.

**Zamfir M., Vancanneyt M., Makras L., Vaningelgem F., Lefebvre K., Pot B., Swings J. et De Vuyst L.** (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 487–495.

## Annexe I : Composition des milieux de culture et réactifs

## ▪ Milieu MRS (pH 6.5)

Peptone.....	10g
Extrait de viande .....	10g
Extrait de levure .....	5g
Acétate de sodium .....	5g
Phosphate bipotassique .....	2g
Citrate d'ammonium .....	2g
Sulfate de magnésium, 7 H <sub>2</sub> O.....	0.2g
Sulfate de manganèse, 4 H <sub>2</sub> O .....	0.5g
Glucose .....	20g
Tween 80.....	1 ml
Agar (dans le cas de gélose) .....	0.5g
Eau distillée .....	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

## ▪ Milieu Gibson et Abd El Malek (pH 6.5)

Extrait de levure .....	2,5g
Glucose.....	50g
Jus de tomate .....	100ml
Lait .....	800ml
Gélose nutritive ordinaire.....	200ml

Stérilisation par tyndallisation, 3fois pendant 30min à 100°C.

## ▪ Milieu hypersalé (pH 7.2)

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

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

▪ Milieu hypersaccharosé (pH= 6,8)

Extrait de viande .....	10g
Extrait de levure .....	3g
Peptone .....	2,5g
Saccharose .....	150g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2g
NaCl .....	1g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0,2g
Agar .....	15g
Eau distillée .....	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

▪ Milieu YMA (Yeast Milk agar) pH= 7.1

Extrait de levure .....	5g
Lait écrémé .....	1g
Agar .....	15g
Eau distillée .....	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min

▪ Milieu PCA (pH 7)

Tryptone .....	5g
Extrait de levure .....	2,5g
Glucose .....	1g
Agar .....	12g

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

▪ Gélose nutritive ordinaire (pH 7,2)

Peptone .....	10g
Extrait de viande .....	5g
Chlorure de sodium .....	5g

Agar .....15g

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

▪ Milieu M.E.V.A. G sans sucre :

Extrait de viande .....3g  
 Chlorure de potassium .....5 g  
 Rouge de phénol.....120mg  
 Agar.....3g

▪ Lait écrémé stérile à 12%

Lait écrémé stérile en poudre .....12g  
 Eau distillée.....100ml

Stérilisation par tyndallisation 3 fois 20 min à 80°C

Réactifs

▪ Violet de gentiane

Violet de gentiane .....1g  
 Ethanol à 90% .....10ml  
 Phénol.....2g  
 Eau distillée.....100ml

▪ Fushine de Ziehl

Fushine basique.....1g  
 Alcool éthylique à 90%.....10ml  
 Phénol.....15g  
 Eau distillée.....100ml  
 Lugol  
 Iode.....1g  
 Iodure de potassium .....2g  
 Eau distillée.....300ml

## Annexe II : Pouvoir acidifiant

Tableau II.1: Résultats de l'évolution du pH et d'acidité dornic en fonction du temps

Temps	T <sub>0</sub> =9H : 30		T <sub>1</sub> après 3H		T <sub>2</sub> après 6 H		T <sub>3</sub> après 24 H	
	PH	°D	PH	°D	PH	°D	PH	°D
souche								
K2	6.55	22	<b>6.50</b>	<b>22</b>	<b>6.32</b>	<b>24</b>	<b>5.36</b>	49
K5	6.56	<b>20</b>	6.49	25	6.32	26	5.41	48
K7	6.50	20	6.45	26	<b>6.24</b>	28	5.43	46
K10	<b>6.57</b>	22	6.36	27	6.29	29	5.40	43
K25	6.49	<b>30</b>	6.40	25	6.29	29	5.40	42
K26	6.56	22	6.41	24	6.31	26	<b>5.84</b>	<b>35</b>
K27	6.55	24	6.40	25	6.28	29	5.36	37
K28	<b>6.47</b>	21	<b>6.31</b>	<b>29</b>	6.31	<b>31</b>	5.36	37
K31	6.53	24	6.40	26	6.30	27	5.41	47
K32	6.53	25	6.40	25	6.31	27	5.46	45
K33	6.51	23	6.35	24	6.31	27	5.46	45
K34	6.52	24	6.40	24	6.30	26	5.40	42
K35	6.53	23	6.39	26	6.28	30	5.37	<b>54</b>
					6.26	26	5.45	43

## Annexe III : Tolérances aux acides

Tableau III.1 : Résultats de la tolérance des bactéries lactiques aux différents pH

souches	pH	pH=3	pH=4	pH=6.5
K2		0.78	0.047	0.56
K5		1.26	0.08	0.63
K7		0.420	0.18	0.49
K10		0.49	0.172	0.49
K25		0.37	0.051	0.57
K26		0.27	0.42	0.45
K27		0	0.115	0.60
K28		1.88	0.14	0.68
K31		0.50	0.01	0.58
K32		0.47	0.19	0.47
K33		0.57	0.030	0.30
K34		0.46	0.17	0.40
K35		0.38	0.175	0.43

**Réalisé par :**

AKIKA Imène  
ZEKIOUK Malika

**Président : D<sup>r</sup>. SIFOUR Mohamed**

**Examineur : M<sup>r</sup>. KHENNOUF Tarek**

**Encadreur : M<sup>lle</sup>. AMIRA Samiya**

**Thème :**

**Identification des bactéries lactiques isolées de *Klila* et évaluation de leurs propriétés probiotiques**

**Résumé**

L'objectif de ce travail est d'identifier et d'évaluer les aptitudes technologiques et probiotiques de treize souches lactiques isolées du fromage traditionnel *Klila* ramené de Ghardaia.

L'identification morphologique, biochimique et physiologique des isolats nous a permis d'obtenir les espèces: *Lactobacillus acidophilus* 92.3%, *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius* 7.7%.

Les résultats de l'évaluation des aptitudes technologiques indiquent que l'ensemble des souches présentent une acidification variable. Cependant, le pouvoir lipolytique, protéolytique et texturant ont été absents.

Les aptitudes probiotiques sont révélées peu intéressantes: le taux de survie a été presque maximal, allant jusqu'à 98.8% à pH 4, la résistance aux antibiotiques ainsi que le pouvoir antimicrobien ont montré des zones d'inhibition de diamètre différent.

**Mots clés :** Bactéries lactiques, *Klila*, aptitudes technologiques, probiotiques.

**Abstract**

The objective of this work is to identify and evaluate technological traits of thirteen lactic acid strains isolated from traditional cheese *klila* from Ghardaia.

The morphological, biochemical and microbiological identification of the isolates allowed to obtain the species: *Lactobacillus acidophilus* 92.3%, *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius* 7.7%.

The evaluation of technological traits indicated that all strains present a variable acidification, however, the lipolytic, protéolytic, and texturing traits have been absents.

The probiotic properties are less interesting: the rate of viability is almost maximum, going up to 98.8% at pH 4, both, resistance to Antibiotics and antimicrobial properties showed different diameters of inhibition.

**Key words:** lactic acid bacteria, *Klila*, technological aptitudes, probiotic.

**ملخص**

سمحت لنا الدراسة المنجزة بكشف و تقييم القابلية التكنولوجية و البروبيوتكية لثلاثة عشر سلالة معزولة من الجبن التقليدي "كليلة" لمنطقة غرداية.

من خلال الدراسة المورفولوجية، البيوكيميائية و الميكروبيولوجية للسلاطات تمكنا من الحصول على السلالتين:

*Lactobacillus acidophilus* 92.3%, *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius* 7.7%

نتائج الاختبارات حول القابلية التكنولوجية أظهرت أن السلالتين المعزولتين متفاوتتا القدرات على رفع حموضة الوسط إلا أن

قدرتهما على تحليل الدهون، هدم البروتينات و رفع الزوجة كانت منعدمة.

الخصائص البروبيوتكية كانت مهمة نوعا ما حيث أن: معدل بقاء السلاطات وصل إلى أقصى حد له بنسبة 98.8% عند

درجة الحموضة 4. كما أن مقاومتها للمضادات الحيوية و فاعليتها ضد الجراثيم أثبتت أقطار نشيطة مختلفة.

**الكلمات المفتاحية:** البكتريا اللبنية، كليلة، القابلية التكنولوجية، البروبيوتكية.