

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة 8 ماي 1945  
Université 8 Mai 1945 Guelma  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



## Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences Biologiques  
Département : Écologie et Génie de l'Environnement  
Spécialité/Option : Microbiologie appliquée

Intitulé

---

# *Caractérisation de la flore lactique du lait cru produit en de montagne*

---

Présenté par : Mlles *Guessibi Wala et Kanouni Bochra*

Devant le jury composé de :

**Présidente**

**Dr Benhalima Lamia** MCA Université 8 Mai 1945 Guelma

**Encadreur**

**Dr Chemmam Mabrouk** Pr Université 8 Mai 1945 Guelma

**Examinatrice**

**Dr Torche Asma** MCA Université 8 Mai 1945 Guelma

**Juin 2022**

# SOMMAIRE

Résumé Français

Résumé Anglais

Résumé Arabe

Liste des abréviations

Liste des photos

Liste des figures

Liste des tableaux

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I. Lait Cru</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Définition</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Composition physique et chimique du lait cru</b>	<b>3</b>
1.2.1. La matière grasse	3
1.2.2. Les protéines	4
1.2.3. Les glucides	4
1.2.4. Les vitamines	4
1.2.5. Les enzymes	5
1.2.6. Les minéraux	5
<b>1.3. Les caractéristiques physiques et chimiques du lait</b>	<b>6</b>
1.3.1. Densité	6
1.3.2. pH du lait	6
1.3.3. Point d'ébullition	6
1.3.4. Point de congélation	6
1.3.5. L'acidité	6
<b>1.4. Microflore de lait</b>	<b>7</b>
1.4.1. La Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT)	8
<b>CHAPITRE II. La flore lactique</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Généralités</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Classification</b>	<b>9</b>

<b>2.3. La fermentation lactique</b>	<b>12</b>
2.3.1. Les types de fermentation lactique	13
<b>2.4. Principaux facteurs influençant le métabolisme des bactéries lactiques</b>	<b>15</b>
2.4.1. Facteurs physiques	15
2.4.2. Facteurs chimiques	16
<b>2.5. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques</b>	<b>17</b>
2.5.1. Les acides organiques, effet pH	17
2.5.2. Les bactériocines	17
2.5.3. Le dioxyde de carbone	18
2.5.4. Diacétyl	18
<b>CHAPITRE III. Les activités lactiques</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Le lait fermenté</b>	<b>19</b>
<b>3.2. Les ferments lactiques</b>	<b>19</b>
3.2.1. Les ferments du commerce	20
3.2.2. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques	20
3.2.2.1. Aptitude acidifiante	21
3.2.2.2. Aptitude aromatisante	21
3.2.2.3. Aptitude texturante	21
3.2.2.4. Aptitude lipolytique	22
3.2.2.5. Aptitude antagonistique	22
3.2.2.6. Activité gazogène	23
3.4.4. Microbiologie du fromage	23

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

<b>Chapitre I. Matériel et Méthodes</b>	<b>25</b>
<b>Introduction</b>	<b>25</b>
<b>1.1. Echantillonnage et prélèvement</b>	<b>25</b>
<b>1.2. Analyses microbiologiques</b>	<b>25</b>
1.2.1. Technique de dénombrement	27

# Sommaire

---

1.2.1.1. Dénombrement de la flore mésophile aérobique totale	27
1.2.1.2. Dénombrement de la flore lactique	29
1.2.2. Isolement et purification de la flore lactique	31
1.2.2.1. Principe d'isolement	31
1.2.2.2. Principe de purification	32
1.2.3. L'identification de la flore lactique	32
1.2.3.1. Observation macroscopique (description des colonies)	32
1.2.3.2. Observation microscopique	32
1.2.3.3. Test catalase	33
1.2.3.4. Test oxydase	33
1.2.3.5. Etude de l'activité antibactérienne des souches	34
<b>Chapitre II. Résultats et discussion</b>	<b>35</b>
<b>2.1. Dénombrement</b>	<b>35</b>
2.1.1. La flore mésophile totale	35
2.1.2. La flore lactique	38
<b>2.2. Isolement et identification</b>	<b>40</b>
2.2.1. Examen macroscopique (Critères morphologiques)	40
2.2.2. Examen microscopique	42
<b>2.3. Test catalase</b>	<b>43</b>
<b>2.4. Test oxydase</b>	<b>44</b>
<b>2.5. L'activité antibactérienne des bactéries lactiques</b>	<b>45</b>
<b>Conclusions</b>	<b>47</b>
<b>Références bibliographiques</b>	

## Résumé

Le lait cru est un produit altérable, au vue de la charge bactérienne présente au moment de la traite. Cette flore évolue suivant la cinétique de transvasement et de conservation. La fore lactique joue un rôle important dans la conservation et la transformation en divers produits comme le leben, le yaourt, le beurre et les fromages.

Ce travail a porté sur la caractérisation du lait cru produit en zones de montagne. Pour cela 3 zones ont été retenues Ain-Larbi, Oued-Cheham et Ain-Seymour) sur les wilayats de Guelma et souk-Ahras.

Le démembrement de la flore mésophile aérobie totale et la flore lactique ont été effectués sur divers milieux (PCA, MRS et M17) sur le lait cru, le lactosérum et le fromage frais. L'isolement et l'identification de la flore lactique ont été effectués à l'œil nue et au microscope. Enfin nous avons testé l'activité antibactérienne sur deux pathogènes ATCC.

Mots clés : Flore lactique, FMAT, Lait cru, Lactosérum, fromage

## Summary

Raw milk is an alterable product, in view of the bacterial load present at the time of milking. This flora evolves according to the kinetics of transfer and conservation. The lactic acid flora plays an important role in the conservation and transformation into various products such as lben, yoghurt, butter and cheeses.

This work focused on the characterization of raw milk produced in mountain areas. For this, 3 areas were selected (Ain-Larbi, Oued-Cheham and Ain-Seymour) in the wilayats of Guelma and souk-Ahras.

The dismemberment of the total aerobic mesophilic flora and the lactic flora, were carried out on various media (PCA, MRS and M17), on raw milk, whey and fresh cheese. The isolation and identification of the lactic flora were carried out with the naked eye and under the microscope. Finally we tested the antibacterial activity on two ATCC pathogens bactéria.

Keywords: Lactic flora, FMAT, raw milk, whey, cheese

## الملخص

الحليب الخام هو مادة قابل للتغيير بالنظر إلى الحمل البكتيري الموجود في وقت الحلب . تتطور هذه البكتيريا وفقا لحركية النقل والحفظ . يلعب حمض اللاكتيك دورا مهما في الحفاظ على المنتجات المختلفة ومعالجتها مثل اللبن والزبادي والزبدة والجبن .

وركز هذا العمل على توصيف الحليب الخام المنتج في المناطق الجبلية . ولهذا الغرض ، تم اختيار 3 مناطق في عين العربي ، واد شحم وعين سينور ( في ولايتي قالمة وسوق أهراس . تم تعداد البكتيريا المتوسطة ( FMAT ) و البكتيريا اللبنية ( BL ) على وسائط مختلفة ( M17 , PCA , MRS ) على الحليب الخام ومصل اللبن والجبن الطازج . تم عزل وتحديد البكتيريا اللبنية بالعين المجردة والمجهر . أخيرا ، اختبرنا النشاط المضاد للبكتيريا على اثنين من مسببات الأمراض ATCC .

**الكلمات المفتاحية :** البكتيريا اللبنية ، FMAT ، الحليب الخام ، مصل اللبن ، الجبن الطازج



## *Liste des abréviations*

UFC : Unité Formant Colonie

BL : Bactérie lactique

FMAT : Flore mésophile aérobie totale

MRS : Man, Rogosa, Sharpe

PCA : Plate Count Agar

G.N : Gélose nutritif

°C : Degré Celsius

pH : Potentiel Hydrogène

Wa : Water activity

EPS : exopolysaccharide

AA : Acides aminés.

ATR : Acid Tolerance Response

g : Gramme

h : Heure

ml : Millilitre

mm : millimètre

µl : Microlitre

FAO : Food and Agriculture Organization

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : eau oxygéné

NaCl : Le chlorure de sodium

Sc : Streptococcus

Lb : Lactobacillus

Ln : Leuconostoc

## Liste des photos

Numéro	Titre	Page
<b>1</b>	Dénombrement du FMAT sur le milieu PCA à partir : (a) Lait cru, (b) Lactosérum, (c) Fromage ( <b>Guessibi et Kanouni, 2022</b> ).	35
<b>2</b>	Résultat d'incubation des BL sur le milieu MRS à partir : (d) Lait cru, (e) Lactosérum, (f) Fromage ( <b>Guessibi et Kanouni, 2022</b> ).	38
<b>3</b>	Résultat d'incubation des BL sur le milieu M17 : (h) Lait cru, (k) Lactosérum, (m) Fromage ( <b>Guessibi et Kanouni, 2022</b> ).	38
<b>4</b>	Aspect macroscopique du LC sur milieu M17 ( <b>Guessibi et Kanouni, 2022</b> ).	41
<b>5</b>	Aspect macroscopique du LC sur milieu MRS ( <b>Guessibi et Kanouni, 2022</b> ).	41
<b>6</b>	Aspect macroscopique du fromage frais sur le milieu MRS ( <b>Guessibi et Kanouni, 2022</b> ).	42
<b>7</b>	Aspect macroscopique du fromage frais sur le milieu M17 ( <b>Guessibi et Kanouni, 2022</b> ).	42
<b>8</b>	Aspect microscopique des Streptococcus à partir du milieu M17 (Gx100) ( <b>Guessibi et Kanouni, 2022</b> ).	43
<b>9</b>	Aspect microscopique des Leucnoscoc, à partir du milieu MRS (Gx100) ( <b>Guessibi et Kanouni, 2022</b> ).	43
<b>10</b>	Aspect microscopique des Lactobacillus, à partir du milieu MRS (Gx100) ( <b>Guessibi et Kanouni, 2022</b> ).	43
<b>11</b>	Les résultats de test catalase( <b>Guessibi et kanouni, 2022</b> ).	44
<b>12</b>	Les résultats de test oxydase ( <b>Guessibi et kanouni, 2022</b> ).	44
<b>13</b>	Activité antimicrobienne des souches lactiques S1, S2, S3, S4 vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> (A) et <i>klebssiella pneumoniae</i> (B) ( <b>Guessibi et kanouni, 2022</b> ).	46

## Listes des figures

Numéro	Titre	Page
1	Les principaux composants de lait ( <b>Lavoie, 2011</b> ).	1
2	Les BL : (A) <i>Lactobacillus</i> , (B) <i>Streptococcus</i> , (C) <i>Leuconostoc</i> ( <b>Wallace et al, 2003 ; Corrieu et Luquet, 2008</b> ).	11
3	Les principales voies de fermentation lactiques ( <b>Goy et al, 2015</b> ).	15
4	Technique de démembrement de la FMAT.	28
5	Technique de démembrement de la flore lactique.	30
6	Technique d'ensemencement en cadran.	31
7	Variations de la FMAT du lait cru (LC), lactosérum (LS) par zone d'élevage.	36
8	Variations de la FMAT du fromage par type.	37
9	Variations des BL du (LC) et (LS) par zone d'élevage sur les milieux MRS, M17.	39
10	Variations des BL du (LFT) et (LM) par zone d'élevage sur les milieux MRS, M17.	40

## Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
<b>1</b>	Composition lipidique du lait ( <b>Vignola, 2002</b> ).	4
<b>2</b>	Concentration en vitamines du lait de vache ( <b>FAO, 1995</b> ).	5
<b>3</b>	Constituants majeurs des matières salines du lait de vache ( <b>FAO, 1995</b> ).	5
<b>4</b>	Niveaux de température (°C) pour le développement des micro-organismes ( <b>Laithier, 2011</b> ).	7
<b>5</b>	Les principaux genres de bactéries lactiques et les caractéristiques physiologiques qui forment la base de la classification et de l'identification ( <b>Matamoros, 2008</b> ).	12
<b>6</b>	Température des bactéries lactiques ( <b>Morge, 2004</b> ).	16
<b>7</b>	pH de croissance des microorganismes ( <b>Tourette, 2002</b> ).	16
<b>8</b>	Résultats moyens de dénombrement de la FMAT et des BL sur les géloses PCA, MRS, M17. Lait cru et Lactosérum : <b>AA</b> : Ain-Larbi ; <b>AS</b> : Ain-Seymour ; <b>OC</b> : Oued-Cheham.	35
<b>9</b>	Résultats de dénombrement de la FMAT et des BL sur les géloses PCA, MRS, M17 sur fromage frais a base lactosérum mère (LM) et de lactosérum fille thermisé (LFT) (Ain seynour).	35
<b>10</b>	Synthèse d'auteurs pour la FMAT.	37
<b>11</b>	Synthèse d'auteurs pour les BL.	39
<b>12</b>	Caractérisations des bactéries lactiques.	45
<b>13</b>	Les résultats en diamètres d'activité antibactérienne des BL ( <b>Guessibi et kanouni, 2022</b> ).	46

# **Etude bibliographique**

## Introduction

Le lait est un aliment qui participe de façon importante à l'alimentation humaine, grâce à ses apports significatifs (**Sibra, 2014**) en lactose, matières protéiques, matières grasses, vitamines et minéraux.

Le lait est aussi un milieu favorable pour le développement des microorganismes désirables et indésirables (bactéries, levures et moisissures). Cette flore microbienne participe de façon importante à l'établissement des caractéristiques organoleptiques des fromages (**Gagnon et al, 2018 ; Michel et al, 2001**).

La fermentation lactique est connue depuis des milliers d'années. Cette méthode de transformation des aliments est utilisée pour améliorer la qualité de conservation, la palatabilité et la valeur nutritive d'aliments périssables tels que le lait, la viande, le poisson et certains légumes. Les micro-organismes qui produisent l'acide lactique sont les bactéries lactiques (BL). Les BL sont principalement associées à un groupe de produits laitiers tels que le fromage, le yaourt, le kéfir et le babeurre (**Halasz, 2009**).

Les BL représentent un groupe diversifié de bactéries, bien que certaines caractéristiques communes soient présentes dans chacun de leurs membres. En produisant des acides organiques, ils acidifient la matière première, principalement par l'acide lactique (**Corrieu et Luquet, 2008**). Elles produisent également de l'acide acétique, de l'éthanol, des composés aromatiques, des bactériocines, des exo-polysaccharides et de nombreuses autres enzymes importantes qui améliorent la sécurité microbienne, la durée de conservation ainsi que la texture (**Azam et al, 2017**). Parmi les propriétés métaboliques à intérêts technologiques attribuées aux bactéries lactiques, la production de bactériocines, substances antagonistes de germes indésirables ou pathogènes, est importante car ces antimicrobiens pourraient être une alternative aux conservateurs chimiques (**Karam et al, 2008 ; Pougheon et al, 2001**).

Le présent travail a été réalisé sur des laits prélevés sur divers élevages répartis sur trois zones de montagne : Oued cheham, Ain arbi et ainseynour, qui s'étendent sur les wilayates de Guelma-Souk-Ahras.

La première partie du manuscrit traitera trois chapitres :

- ✚ Le lait cru : leurs composants, et leur caractéristique physicochimique.
- ✚ La flore lactique : leur classification, leur métabolisme, la fermentation lactique.

# Etude Bibliographique

---

✚ Les activités lactiques.

La deuxième partie présentera l'approche expérimentale réalisée,

- ✚ Dénombrement les charges microbiennes (Flore mésophile) à partir du lait cru, lactosérum et fromage.
- ✚ Dénombrement, Isolement, et identifications des bactéries lactiques à partir du lait cru, et lactosérum et fromage.
- ✚ Essais d'activité antibactérienne avec les souches lactiques isolées sur deux souches pathogènes ATCC.

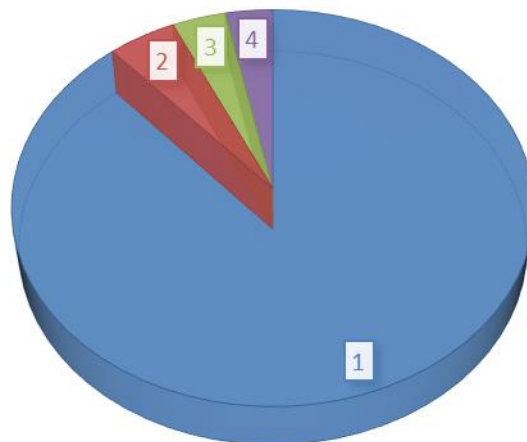
## CHAPITRE I. Lait Cru

### 1.1. Définition

Lait cru est un lait animal qui n'est pas chauffé au-delà de 40°C, qui n'a pas subi de traitement : ni pasteurisation, ni stérilisation, ni thermisation, ni microfiltration. Ainsi les composants (flore microbienne, vitamines, minéraux, protéines) sont préservés du choc thermique et ne sont pas altérés (Herault et al, 2019).

### 1.2. Composition physique et chimique du lait cru

Le constituant principal du lait de vache est l'eau, avec 87,5 % du poids total, et vient en deuxième, mais en bien plus faible quantité, le lactose, avec 4,6 %. Les lipides et les protéines forment deux parts à peu près égales, avec 3,7 % et 3,2 % respectivement, Figure 1 (Lavoie, 2011).



**Figure1** : Les principaux composants de lait (Lavoie, 2011).

1 : Eau (87,5%), 2 : Lactose (4,6%), 3 : Les lipides (3,7%), 4 : Les protéines (3,2%)

Le lait cru contient également des composés antibactériens et des antibiotiques et également des anticorps, des hormones (Corrieu et Luquet, 2008 ; Vilain, 2010).

#### 1.2.1. La matière grasse

Le lait entier contient 35 à 45 g/L de matière grasse qui présente des intérêts nutritionnels certains (Tableau 1 (Vignola, 2002)). Considérée comme source d'énergie, elle est constituée à 98 % de triglycérides (molécule de glycérol avec trois acides gras associés)



# Etude Bibliographique

et minoritairement de phospholipides, cholestérol(Vignola, 2002 ; Gaucheron et Tanguy, 2009).

**Tableau 1** : Composition lipidique du lait (Vignola, 2002).

Constituants	Proportions de lipides du lait (%)
Triglycérides	98%
Phospholipides	1%
Fraction insaponifiable	1%

## 1.2.2. Les protéines

La valeur nutritionnelle des protéines du lait est excellente (supérieure à celle des protéines végétales) car elles contiennent tous les acides aminés (AA) indispensables à l'organisme en proportions satisfaisantes (les protéines solubles sont un peu plus riches en AA soufrés que les caséines) et elles sont particulièrement digestibles (Royant et Soustre,2015).

## 1.2.3. Les glucides

Les glucides du lait sont essentiellement représentés par le lactose. C'est le sucre principal des laits de la plupart des mammifères et il y en a environ 50 g par litre de lait de vache. Au niveau technologique, sa présence dans le lait est indispensable à la fabrication de produits laitiers fermentés (yaourts, fromages (Gaucheron et Tanguy,2009). Le lactose est transformé par les bactéries lactiques en acide lactique qui acidifie le lait (Renard,2014).

## 1.2.4. Les vitamines

Le lait est une excellente source de vitamines hydrosolubles (sauf la vitamine C) et liposolubles pour les laits non écrémés (sauf la vitamine E) **Tableau 2**(FAO, 1995 ; Royant et Soustre,2015 ; Charles,1991).

## Etude Bibliographique

**Tableau2** : Concentration en vitamines du lait de vache (FAO, 1995).

Vitamines	Moyennes (mg/litre)
<b>Vitamines hydrosolubles</b>	
B, (thiamine)	0,42
B, (riboflavine)	1,72
B, (pyridoxine)	0,48
Acide nicotinique	0,92
Acide folique	0,053
Acide pantothénique	3,6
Inositol	160
Biotine	0,036
Choline	170
C (acide ascorbique)	8
<b>Vitamines liposolubles</b>	
A	0,37
B-carotène	0,21
D (cholécalférol)	0,0008
E (tocophérol)	1,1
K	0,03

### 1.2.5. Les enzymes

Ceux sont des substances organiques de nature protidique, produites par des cellules ou des organismes vivants, agissant comme catalyseurs dans les réactions biochimiques (Pougheon et al, 2001). Environ 60 enzymes principales ont été répertoriées dans le lait dont 20 sont des constituants natifs.

### 1.2.6. Les minéraux

Les minéraux (ou matières salines) sont présents dans le lait (7,3 g/litre environ), soit en solution dans la fraction soluble, soit sous forme liée dans la fraction insoluble (ou colloïdale) (FAO, 1995). Le lait contient une grande partie des minéraux indispensables à l'organisme (calcium, phosphore, magnésium, sodium, potassium) (Tableau 3). Les teneurs varient légèrement en fonction du stade de lactation, des races, de la saison, la nature du sol... L'intérêt du lait réside essentiellement en sa richesse en calcium (environ 120 mg/100 ml) particulièrement bien absorbé (Royant et Soustre, 2015).

**Tableau 3** : Constituants majeurs des matières salines du lait de vache (FAO, 1995).

Constituants	Teneurs moyennes (g /Litre)
Potassium (K <sub>2</sub> O)	1,50
Sodium (Na <sub>2</sub> O)	0,50
Calcium (CaO)	1,25
Magnésium (Mg <sub>2</sub> O)	0,12
Phosphore (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	0,95
Chlore (Na Cl)	1,00
Soufre	0,35
Acide citrique	1,80

## 1.3. Les caractéristiques physiques et chimiques du lait

### 1.3.1. Densité

La densité d'un lait est la résultante de la superposition des influences contraires de la matière grasse qui la diminue, du sucre de lait, de la caséine et des sels qui l'augmentent. Le chiffre de la densité ne donne rien sur la proportion de ces divers éléments, ni même sur leur quantité totale (**La société scientifique de bruxelles,1893**).

### 1.3.2. pH du lait

Le pH du lait de vache varie entre 6,45 et 6,65 (**Déribéré, 1946**), cette valeur comprise entre des limites est assez resserrée, en raison de la constance des substances tampons incluses et surtout des phosphates.

### 1.3.3. Point d'ébullition

On définit le point d'ébullition comme la température atteinte lorsque la pression de vapeur de la substance ou de la solution est égale à la pression appliquée. Il est légèrement supérieur au point d'ébullition de l'eau, soit 100,5°C. Cette propriété physique diminuant avec la pression, on applique ce principe dans les procédés de concentration du lait (**Vignola,2002**).

### 1.3.4. Point de congélation

La mesure du point de congélation du lait est couramment utilisée pour contrôler l'absence de mouillage lors de la traite, de la conservation ou de la collecte (**Parciel et al,1994**), Elle varie entre -0,51 et -0,55°C, selon les conditions zootechniques. Si elle tend vers 0°C, cela peut permettre de détecter une adjonction d'eau, ou mouillage, qui constitue une fraude (**Cazet,2007**).

### 1.3.5. L'acidité

Le lait peut avoir un comportement à la fois acide et basique, en raison des protéines, dont les acides aminés possèdent des groupements acides COOH et des groupements basiques NH<sub>2</sub>, sur leurs chaînes latérales (**Vignola,2002**).

## 1.4. Microflore de lait

Le lait sortant du pis est pratiquement stérile. Une fois que le lait sort du pis, passe par la trayeuse et le réservoir, il se contamine par la microflore naturelle de l'animal et la microflore de l'environnement immédiat de la ferme. Effectivement, il contient les éléments essentiels à la croissance de nombreux microorganismes autant procaryotes qu'eucaryotes et constitue donc un bon milieu de croissance pour de nombreuses espèces(Lavoie,2011).

Les mots « germes », « microbes », « microflores » ou encore « flores microbiennes » sont souvent employés pour désigner ces organismes, qui sont de nature très diverse : virus, bactéries, de nombreuses algues, champignons microscopiques, protozoaires (Laithier,2011).

La diversité microbienne est utile pour la transformation des produits laitiers mais peut aussi impliquer la présence de bactéries potentiellement dangereuses pour la santé humaine (Renard, 2014).Donc, le lait est un milieu nutritif qui favorise la prolifération des germes, il est donc nécessaire de lui faire subir des traitements thermiques pour le conserver (Noblet,2012).

D'après Laithier(2011), la croissance des micro-organismes peut être influencée par divers facteurs du milieu, comme le pH, la température, la quantité d'eau libre, la concentration en nutriments, la présence de substances antimicrobiennes et les interactions entre micro-organismes vont également intervenir. Parmi ces facteurs, celui dont l'action est la plus évidente et la plus facile à mesurer est : la température de conservation du lait. Cinq groupes peuvent être distingués selon les exigences vis-à-vis de la température (Tableau 4) : les psychrophiles, les psychrotrophes, les mésophiles, les thermophiles et les hyperthermophiles. Les groupes les plus rencontrés dans le lait sont les mésophiles (bactéries lactiques comme les *lactocoques*).

**Tableau 4** : Niveaux de température (°C) pour le développement des micro-organismes (Laithier, 2011).

Groupes	Minimum	Optimum	Maximum
Psychrophiles	-5 - +5	12 – 15	15 – 20
Psychrotrophes	-5 - +5	25 – 30	30 – 35
Mésophile	5 – 15	30 – 40	40 – 47
Thermophiles	40 – 45	55 -65	60 – 90
Hyperthermophiles	60 – 70	≥ 80	100 – 110

### 1.4.1. La Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT)

Les bactéries aérobies capables de croître entre 30 et 35 °C en deux à trois jours constituent le groupe des bactéries mésophiles (FMAT) (**Lavoie,2011**).

La FMAT quantifiée lors des analyses de lait sous le terme « germes totaux » représente une image (non exhaustive) de l'ensemble des micro-organismes vivants présents dans l'échantillon de lait (**Laithier,2011**).

Ce paramètre est un bon indicateur de l'hygiène de la traite. La présence de ces germes indique un manque de respect des bonnes pratiques de production et de stockage du lait (**Renard, 2014**). Les sources de contaminations du lait par des FMAT sont nombreuses, on peut notamment mentionner une contamination du pis et des équipements de traite par de la terre et de la poussière, et donc un non-respect des règles d'hygiène et des procédures de lavage (**Lavoie,2011**).

## CHAPITRE II. La flore lactique

### 2.1. Généralités

Le terme « BL » décrit un groupe de microorganismes gram positif qui produisent de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Il est assez hétérogène et ses genres présentent des variations dans les caractéristiques à l'exception de deux caractères principaux qui ne peuvent pas être contestés : le gram-positif et la non-sporulation. En général, les bactéries lactiques sont des microorganismes non mobiles, oxydase négative et anaérobies facultatives : micro-aérophiles. Ces bactéries sont non pigmentées, catalase négative à l'exception de certains genres à pseudo-catalase, généralement mésophiles mais largement représentées au sein du groupe des psychrotrophes. Elles peuvent se développer dans une gamme de température allant de 5°C à 45°C. Le pH optimal de croissance varie de 5,0 à 9,0 mais elles tolèrent les milieux acides (pH 3,2) et alcalins (pH 9,6). Les BL ont des besoins complexes en facteurs de croissance tels que la vitamine B, les acides aminés, les bases azotées, les peptides (**Ahmed Gaid, 2020 ; Rahmani, 2022**).

Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (**Dortu et Thonart, 2009**).

Les BL utilisent le sucre du lait (lactose) comme source d'énergie et le convertissent en acide lactique (lactate). Certaines sont dites homo-fermentaires car elles produisent très majoritairement de l'acide lactique alors que d'autres sont dites hétéro-fermentaires et produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (acétate et éthanol en général) (**Goy et al, 2015 ; Drouault et Corthier, 2001**).

L'importance des BL dans la technologie de l'alimentation humaine et animale est liée à leur production de grandes quantités d'acide lactique à partir de sucres (**Corrieu et Luquet, 2008**).

### 2.2. Classification

Les systèmes de classification ont tendance à être dynamiques. De même, pour les BL, les méthodes biochimiques et moléculaires modernes ont révélé des liens phylogénétiques très différents par rapport aux schémas d'identification traditionnels (**Corrieu et Luquet, 2008**).

La classification des bactéries lactiques est en grande partie basée sur la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures,

## Etude Bibliographique

---

la configuration de l'acide lactique produit, la capacité de se développer aux concentrations élevées en sel, la tolérance des conditions acide ou alcaline, et la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire(Ahmed Gaid, 2020).

Orla-Jensen (1919) utilisait les caractéristiques suivantes comme base de classification : morphologie (cocci ou bâtonnets, formation de tétrades), croissance à certaines températures "cardinales" (par exemple 108 °C et 458°C), et gamme d'utilisation des sucres, mode de fermentation du glucose (homo- ou hétéro-fermentation), ces caractéristiques sont encore très importantes dans la classification des BL (Salminen et al,2004).

Dans ces conditions, les BL peuvent être divisés en deux groupes, (Morge, 2004) : (i) les bactéries homo-fermentaires et (ii) les bactéries hétéro-fermentaires. Les BL homo-fermentaires transforment les sucres en acide lactique de façon presque quantitative.

Le second groupe, les bactéries hétéro-fermentaires, produit non seulement de l'acide lactique mais aussi de l'éthanol/acide acétique et du dioxyde de carbone. En pratique, un test de production de gaz à partir du glucose permettra de distinguer les deux groupes. Des différences ont également été observées dans le taux de croissance à différentes températures, le pH des milieux et la tolérance au chlorure de sodium. La croissance est normalement testée à 18 °C et 45 °C, à une concentration de chlorure de sodium de 6,5 % et 18 %, et à un pH de 4,4 et 9,3. Enfin, la formation de différentes formes isomériques d'acide lactique (acide L-lactique ou acide D-lactique) peut être utilisée pour distinguer les différents genres. La classification des espèces au sein des genres est très complexe et, dans de nombreux cas, même les livres traitant de microbiologie ne donnent pas une vue d'ensemble complète (Halasz, 2009).

Selon la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology, les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des *Firmicutes*, la Classe des *Bacilli* et l'ordre des *Lactobacillales* renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles. Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, à savoir *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* (Dridier et Privost, 2009).

### *Lactobacillus*

Lactobacille sont des bactéries micro-aérophiles que l'on trouve couramment dans une diversité d'environnements, notamment les environnements laitiers (Salminen et al,2011).

## Etude Bibliographique

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif appartenant au genre des *Firmicutes*. Elles sont immobiles et ont une forme de bacilles ou de coccobacilles isolés ou en chaînettes(**Figure 2**).Elles sont utilisées comme bactéries fermentaires dans plusieurs produits laitiers comme le fromage et le yaourt. Il existe 145 espèces connues du genre *Lactobacillus*(**El Kafsi, 2014 ; Corrieu et Luquet, 2008**).Le genre *Lactobacillus* appartient au phylum *Firmicutes*, à la classe Bacilli, à l'ordre *Lactobacillales*. Caractérisé par une forte dichotomie génétique entre les espèces. L'arbre phylogénétique du genre *Lactobacillus* est complexe et est divisé par d'autres genres tels que *Leuconostoc*, *Ocnococcus*, et *Pediococcus*(**Salminen et al,2011**).

### ✚ *Streptococcus*

Les streptocoques sont des cocci à Gram positif non mobiles(**Figure 2**), appartenant à la famille des *Streptococcaceae*. Actuellement, 66 espèces et 12 sous-espèces sont reconnues comme membres du genre *Streptococcus*.

*Sc thermophilus* est une bactérie lactique d'importance économique majeure provenant des produits laitiers. Cette espèce est généralement reconnue comme sûre pour les produits alimentaires. Elle est historiquement largement utilisée pour la fabrication de fromage en association avec d'autres bactéries lactiques (**Savadogo et Traore, 2011 ; Corrieu et Luquet, 2008**).

### ✚ *Leuconostoc*

Les bactéries du genre *Leuconostoc*sont des bactéries lactiques mésophiles et hétéro-fermentaires(**Tableau 5**). Ce sont des cocci ovoïdes ou sphériques(**Figure 2**) Gram positif, catalase négative (**Savadogo et Traore, 2011 ;Matamoros, 2008**).Ils se cultivent à des températures comprises entre 20 et 30°C et tolèrent une température minimale de 10°C(**Djosso, 2011 ; Wallace et al, 2003**).



(A)

(B)

(C)

**Figure 2 : (A)*Lactobacillus*, (B)*Streptococcus*, (C)*Leuconostoc*(Wallace et al, 2003 ; Corrieu et Luquet, 2008).**



## Etude Bibliographique

Les *Leuconostoc* sont couramment présentes dans le fromage. Ces bactéries sont souhaitables dans la plupart des aliments en raison de leur participation au développement et à la conservation des saveurs. Dans les produits laitiers fermentés, qui est responsable de la formation de l'œil dans de nombreux fromages, et le diacétyle, qui est un composant important de l'arôme dans de nombreux produits, le babeurre dur, le fromage cottage, crème aigre et le beurre de crème affiné (**Timothy et al, 1994**).

**Tableau5:** Les principaux genres de bactéries lactiques et les caractéristiques physiologiques qui forment la base de la classification et de l'identification (**Matamoros, 2008**).

Genre	Forme de lacellule	Type de fermentation	Espèce type
<i>Aerococcus</i>	Coques	Homofermentaire	<i>Ac. viridans</i>
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaire	<i>Cb. Divergens</i>
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaire	<i>Ec. Faecalis</i>
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homo ou hétérofermentaire	<i>Lb. delbrueckii</i>
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaire	<i>Lc. lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaire	<i>Ln. mesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaire	<i>Oe. oeni</i>
<i>Pediococcus</i>	Coques	Homofermentaire	<i>Pc. damnosus</i>
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaire	<i>Sc. salivarius</i>
<i>Tetragenococcus</i>	Coques	Homofermentaire	<i>Tc. Halophilus</i>
<i>Vagococcus</i>	Coques/ovoïdes	Homofermentaire	<i>Vc. fluvialis</i>
<i>Weissella</i>	Petits bacilles	Hétérofermentaire	<i>We. viridescens</i>

### 2.3. La fermentation lactique

La croissance des bactéries lactiques dans le lait induit de nombreux changements souhaités dans les produits, car en utilisant les constituants du lait (sucres, composés azotés, composés minéraux, vitamines) pour se développer, elles produisent des métabolites d'intérêt (acide lactique, composés d'arômes, exo-polysaccharides, molécules ayant un rôle de conservation). Les conséquences de la synthèse de ces différents métabolites se traduisent par l'acidification du lait, sa coagulation ainsi que par des modifications des propriétés sensorielles et nutritionnelles des produits (**Béal et Helinck, 2003**).

La fermentation du lait par des bactéries est une méthode universelle de conservation et de consommation du lait. Cette fermentation résulte de l'action de bactéries apportées par l'environnement de la traite (vaisselle, peau de l'animal, air...) (**Madec, 2013**).

Les bactéries lactiques sont caractérisées par la production importante d'acide lactique à partir de la dégradation d'hydrates de carbone. Cette fermentation est spontanée dans de nombreux produits alimentaires tel que le lait. Les BL peuvent atteindre une

## Etude Bibliographique

---

population de  $1.10^8$  à  $1.10^9$  UFC par gramme de produit en fin de fermentation. Selon le potentiel redox du substrat, d'autres métabolites sont produits comme l'acétate en conditions aérobies ou l'éthanol en conditions anaérobies. Le rôle important des bactéries lactiques dans la conservation des produits fermentés ou semi-conserves tient à leur action antagoniste vis-à-vis des flores indésirables par la production importante d'acide lactique et à un degré moindre d'acétate ou d'éthanol, de diacétyle, de peroxyde d'hydrogène et pour certains isolats de bactériocines (**Mathieu, 1994**). Dans de nombreux cas, la fermentation varie en fonction du substrat, de la température et des conditions de stockage (**Alberto, 2013**).

Plusieurs facteurs affectent la fermentation lactique : l'organisme, le milieu utilisé pour la propagation des micro-organismes, la source d'hydrates de carbone, la température, la concentration en sucre, la présence d'oxygène, le pH, les facteurs de croissance et la concentration (**Concepcion et al, 2000**).

L'une des caractéristiques des bactéries lactiques est qu'elles ne sont capables de cataboliser qu'un nombre plutôt réduit de sources de carbone, et via des voies métaboliques linéaires relativement simples. Suivant les genres ou espèces, elles utilisent l'une des deux voies suivantes du métabolisme des sucres : la voie homo-fermentaire, la voie hétéro-fermentaire (**Corrieu et Luquet, 2008**).

Les principales voies de fermentation des hexoses peuvent être résumées comme suit :

Homo-fermentation :  $1 \text{ Hexose} + 2 \text{ ADP} + 2\text{Pi} \longrightarrow 2 \text{ Lactate} + 2\text{ATP}$

Hétéro-fermentation :  $1 \text{ Hexose} + 1 \text{ ADP} + \text{Pi} \longrightarrow \text{Lactate} + \text{Ethanol} + \text{CO}_2 + 1 \text{ ATP}$

### 2.3.1. Les types de fermentation lactique

#### La voie homo-fermentaires (ou homolactique)

Divers sucres comme le glucose, le mannose, le fructose, le galactose, ou le saccharose peuvent être catabolisés par cette voie (**Harlé, 2020**). C'est la fermentation qui donne un seul produit.

Les BLhomo-fermentaires utilisent la glycolyse dans sa totalité, du lactose au pyruvate puis lactate. Pour être qualifiée d'homolactique, cette voie doit convertir au moins 90 % du lactose consommé en lactate. Mais dans des conditions de croissance non optimales, cette voie est généralement associée aux bactéries des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* (**Didier, 2016**).

## Etude Bibliographique

---

### ✚ La voie hétéro-fermentaires (ou hétérolactique)

Au moins 50%, mais pas plus de 90% du lactose fermenté est transformé en acide lactique. Les autres produits issus de cette transformation sont : l'acide acétique, du CO<sub>2</sub> et éventuellement de l'alcool.

Certaines BL, sont capables d'accomplir des fermentations homo- ou hétéro-fermentaires selon le type de sucre à disposition comme source d'énergie. Sur le lactose leur fermentation est homolactique. Leur pouvoir acidifiant est souvent modeste **Figure 3(Goy et al, 2015)**.

Les BL hétéro-fermentaires produisent outre l'acide lactique, des quantités significatives de CO<sub>2</sub> et d'éthanol ou d'acétate. Certaines bactéries *Leuconostoc* et *Lactobacillus* empruntent cette voie hétéro-fermentaire (**Didier, 2016**).



## Etude Bibliographique

*Pseudomonas* libèrent plus de protéases et lipases lorsque la température est inférieure à 10°C ; ils altèrent les laits réfrigérés. *Leuconostoc* et *Pediococcus* produisent des dextrans qui donnent un aspect visqueux au lait (Tourette, 2002 ; Morge, 2004).

**Tableau 6:** Température des bactéries lactiques (Morge, 2004).

Espèces bactériennes	Températures		
	Minimales	Optimales	Maximales
<b>Les lactocoques mésophiles :</b>			
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	10°C	25 – 30°C	40°C
<i>Lactococcus lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>	10°C	20 – 22°C	38°C
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>Cremonis</i>	10°C	25 – 30°C	38°C
<b>Les streptocoques thermophiles :</b>			
<i>Streptococcus thermophilus</i>	18°C	40 – 45°C	50°C (pas de croissance à 53°C)
<b>Les lactobacilles thermophiles :</b>			
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i>	20°C	40 – 45°C	52,5°C
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>Lactis</i>	20°C	40 – 45°C	52°C
<i>Lactobacillus</i> helveticus	20°C	40 – 45°C	50°C

✚ **L'activité de l'eau ( $W_a$ )** elle correspond à la quantité d'eau libre disponible pour le développement des micro-organismes et nécessaire pour le bon fonctionnement des processus chimiques et enzymatiques. Dans le lait, une partie de l'eau est liée aux différents constituants. L'activité de l'eau est plutôt un facteur limitant pour le développement des microorganismes dans le fromage. En début d'affinage, c'est principalement la teneur en NaCl qui règle l' $w_a$  du fromage (Beuvier et Feutrier, 2005).

### 2.4.2. Facteurs chimiques

✚ **Le pH** La majorité des bactéries lactiques se multiplient préférentiellement à des pH voisins de la neutralité (6,5 à 7,5) **Tableau 7, (Tourette, 2002)**, mais elles sont capables de croître dans une large gamme de pH. La croissance bactérienne est inhibée lorsque le pH du milieu devient acide. Le pH influence sur la croissance des bactéries lactiques mais il peut aussi agir sur la voie de fermentation des sucres (homo ou hétéro-fermentaire), le rendement de la fermentation, et l'isomérisation de l'acide lactique formé (Ratisbonne-Zafimahova, 2009 ; Tourette, 2002).

**Tableau 7:** pH de croissance des microorganismes (Tourette, 2002).

pH Bactéries	Minimum	Optimum	Maximum
<i>Lactobacillus</i>	3	5,5 à 6	8
<i>Streptococcus</i>	4,2	6,8 à 7,5	9,3 à 9,8
<i>Staphylococcus</i>			
<i>Klebsiella</i>	4,3	6,0 à 8,0	9 à 10

### 2.5. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Lors d'un processus fermentaire, les bactéries lactiques établissent entre elles des interactions positives ou négatives, toutes deux directement liées aux métabolites produits lors de la croissance (**Mathieu, 1994**).

Les interactions négatives (Inhibitions) peuvent avoir pour origine la production de composés toxiques (bactériocines, antibiotiques ou autres métabolites), la compétition vis-à-vis du substrat ou le rejet de catabolites (**Juillard et al, 1987**).

Les bactéries lactiques sont capables de produire et d'excréter des substances inhibitrices autres que l'acide lactique et acétique. Ces substances comprennent le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, le dioxyde de carbone, les substances de type bactériocine ou antibiotique et les bactériocines (**Zamfir et al, 1999**).

#### 2.5.1. Les acides organiques, effet pH

Les principaux acides organiques produits par les bactéries lactiques sont l'acide lactique ( $C_3H_6O_3$ ) et l'acide acétique ( $C_2H_4O_2$ ). Selon **Léonard (2013)** le pH était le premier facteur limitant la croissance de *L. monocytogenes* dans une co-culture avec *Lactococcus lactis*. Après l'entrée des acides dans le cytoplasme où le pH est supérieur, ils se dissocient en protons et dérivés chargés auxquels la membrane est imperméable. L'accumulation intracellulaire des protons abaisse le pH intracellulaire et la croissance bactérienne est alors fortement réduite. L'acide lactique à  $5\ 000\ \mu\text{g. mL}^{-1}$  (0,5 %) inhibe la croissance de *L. monocytogenes*. L'acide acétique a, quant à lui, un effet bactériostatique dès 0,2 % et un effet bactéricide à 0,3 % contre des bactéries à Gram positif lors d'une addition dans un aliment. Néanmoins, cette activité dépend du pH et est plus prononcée à un pH faible en-dessous de 4,5. La plupart des BL possèdent un système de Tolérance à l'Acide (ATR : Acid Tolerance Response) qui leur permet de survivre et de continuer à faire fonctionner leur métabolisme.

#### 2.5.2. Les bactériocines

Les bactériocines sont des protéines, ou complexes de protéines, possédant une activité bactéricide dirigée contre des espèces proches de la souche productrice (**Taale et al, 2016**). Elles sont produites par certaines bactéries lactiques qui inhibent la croissance de

certaines bactéries à Gram (+) ou (-). Elles peuvent être également actives contre les bactéries lactiques (**Fessard, 2017**).

### **2.5.3. Le dioxyde de carbone**

Le pouvoir antimicrobien du dioxyde de carbone produit par les bactéries lactiques s'explique par la création d'une atmosphère anaérobie, qui inhibe la croissance de certains microorganismes aérobies, tels que la flore d'altération psychrophiles à Gram négatif. De plus, l'accumulation du dioxyde de carbone dans la membrane lipidique de la cellule cible pourrait modifier sa perméabilité (**Léonard, 2013**).

### **2.5.4. Diacétyl**

Le diacétyl est un composé aromatique essentiel, plusieurs bactéries des genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*, peuvent le synthétiser. Sa capacité inhibitrice se manifeste vis-à-vis des levures, des bactéries à Gram-négatif, les bactéries à Gram-positif non lactiques sont quant à elles moins sensibles (**Hammi, 2016**).

## CHAPITRE III. Les activités lactiques

### 3.1. Le lait fermenté

Le lait cru est fragile, pour être conservé, il doit être pasteurisé, stérilisé, concentré, déshydraté ou transformé en divers produits plus stables (fromages, laits fermentés, etc.). Les laits fermentés, dont font partie les yaourts, sont issus de la fermentation contrôlée du lait sous l'action d'une ou plusieurs populations bactériennes spécifiques, permettant ainsi sa stabilisation microbiologique en lui conférant une texture et des propriétés organoleptiques et/ou nutritionnelles particulières. Ils sont largement produits dans de nombreux pays, Ce procédé est l'un des plus vieux utilisés pour augmenter la durée de conservation. Les recherches antérieures réalisées sur les bactéries lactiques ont montré que si celles-ci sont bien exploitées pourraient contribuer à l'amélioration de la qualité et de la conservation des produits fermentés en général et des produits laitiers en particulier (Savadogo et Traore, 2011).

### 3.2. Les ferments lactiques

De par les activités métaboliques, les bactéries lactiques tel que *Lb. Lactis*, qui possède de nombreuses propriétés technologiques intéressantes, sur la base desquelles elle est sélectionnée comme ferment pour la fabrication de produits laitiers fermentés et notamment le fromage. En effet, cette bactérie contribue à l'acidification du lait, à la coagulation des protéines présentes dans le lait, à la formation de nombreux composés aromatiques, à la texturation, à la conservation et à la sécurité alimentaire du fromage (Velly, 2014).

En fromagerie par exemple, l'acidification s'effectuait à partir du lait cru qu'on laissait fermenter spontanément par des bactéries qui avaient contaminé le lait à la ferme ou à la fromagerie. Actuellement, on définit les ferments lactiques comme étant des cultures pures ou des mélanges de bactéries lactiques sélectionnées et utilisées pour la fabrication de produits fermentés (Doleyres, 2003).

Traditionnellement, les ferments lactiques provenaient de lait n'ayant subi aucun traitement thermique et étaient de composition complexe, souvent indéfinie. Ces ferments sont typiquement composés de bactéries lactiques acidifiantes auxquelles peuvent être associées des souches présentant des caractéristiques aromatiques. Les



## Etude Bibliographique

---

ferments lactiques sont généralement classés en deux groupes ; les ferments mésophiles et thermophiles. Sont généralement formés des bactéries *Sc. thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* ou *Lb. delbrueckii* (sous espèces *bulgaricus* ou *lactis*).

Les ferments mésophiles sont majoritairement composés de *lactocoques* de sous espèces variées, dont la température optimale de croissance est d'environ 30°C. Les sous espèces *lactis* et *cremoris* sont essentiellement utilisées pour leur caractéristique d'acidification, alors que le *biovardiacetylactis* et les bactéries du genre *Leuconostoc* sont principalement utilisés pour leur capacité de métaboliser le citrate (**Gagnon, 2006**).

La physiologie des ferments acidifiants, leur métabolisme et leur aptitude à convertir les différents composants du lait (protéines, matière grasse) contribuent à différencier les produits laitiers fermentés. Ces micro-organismes ont une action déterminante sur les caractéristiques organoleptiques des produits fermentés, via de la formation de composés d'arômes, d'exopolysaccharides, de gaz (**Salas, 2018**).

### 3.2.1. Les ferments du commerce

On distingue trois types de ferments dans l'industrie laitière (**Gagnon, 2006**).

- ✚ Les ferments O, qui ne contiennent qu'une flore acidifiante, formée de *Lb. lactis* sp. *lactis* et *cremoris*.
- ✚ Les ferments D, auxquels sont ajoutés le *biovardiacetylactis*.
- ✚ Les ferments DL, qui contiennent en plus de la flore acidifiante *Leuconostoc mesenteroides* sp. *cremoris* et *Lb. lactis* sp. *Lactis biovardiacetylactis*

### 3.2.2. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone et, à un moindre degré, de dégrader les protéines et les lipides, mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exopolysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (**Bouhanna et Boussaa, 2017**).

### 3.2.2.1. Aptitude acidifiante

Les ferments lactiques sont tous acidifiants, ils produisent de l'acide lactique, suivant les voies métaboliques empruntées (**Joubert, 2016**). La production d'acide lactique est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière, car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien (**Bouhanna et Boussaa, 2017**).

Pour un ferment donné, il s'agit de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfini. Ce niveau d'acidité finale dépend des spécificités du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches. Le développement de l'acidité est important non seulement pour la fermentation du lait, mais également nécessaire pour un arôme, une texture et une saveur bien-équilibrés du yaourt.

Le choix de souches faiblement post-acidifiantes permet, lors de la fabrication des laits fermentés, de limiter les phénomènes d'acidification qui peuvent intervenir lors de leur stockage à basse température (4 à 6°C), modifiant ainsi leur qualité organoleptique. La sélection d'un ferment fait généralement appel à plusieurs de ces propriétés simultanément (**Corrieu et Luquet, 2008 ; Bouhanna et Boussaa, 2017**).

### 3.2.2.2. Aptitude aromatisante

Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurres, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (**Corrieu et Luquet, 2008**).

Divers composés volatiles et aromatiques interviennent dans la saveur, c'est principalement le lactose qui joue un rôle dans la formation de ces composés. Parmi ceux-ci, outre l'acide lactique qui confère goût acidule, c'est l'acétaldéhyde qui a été identifié comme le plus important des composés carbonyliques qui contribuent l'arôme typique. Le diacétyl contribue à donner un goût délicat dû à la transformation de l'acide citrique et, secondairement, du lactose par certaines souches de *streptocoques* (**Bouhanna et Boussaa, 2017**).

### 3.2.2.3. Aptitude texturante

La texture et l'onctuosité constituent, pour le consommateur, d'importants éléments d'appréciation de la qualité. Certaines souches bactériennes produisent à partir du glucose,

## Etude Bibliographique

---

des polysaccharides qui sont constitués de longues chaînes d'unités répétitives de sucres simples et /ou de dérivés de glucides plus ou moins ramifiées. L'utilisation de ces souches bactériennes produisant les polysaccharides exocellulaires (EPS) augmente la résistance du coagulat de yaourt aux chocs physiques et thermiques, et joue un rôle important en réalisant la fermeté satisfaisante et la viscosité apparente du yaourt. Ils ont l'avantage d'être « naturels », requis en faible concentration (de l'ordre de mg/L) et de pouvoir remplacer les agents stabilisants par leurs propriétés de modifier, positivement la texture, la viscosité et la sensation des laits fermentés.

La fonctionnalité des EPS serait plutôt reliée à leurs caractéristiques structurales ainsi qu'à leurs interactions avec les autres constituants du milieu comme les protéines. Le poids moléculaire, la conformation (flexibilité et ramification) de la chaîne et la charge des EPS influenceraient les propriétés rhéologiques et physiques des produits laitiers fermentés de type yaourt (Bouhanna et Boussaa, 2017).

### 3.2.2.4. Aptitude lipolytique

Les ferments lactiques possèdent des lipases et des estérases qui peuvent hydrolyser les triglycérides en acides gras. Ils peuvent produire certains acides gras volatils, et contribue à la saveur des produits laitiers fermentés, cependant la lipolyse est généralement faible dans le yaourt et elle est donc non significative en termes de flaveur. Généralement, les propriétés lipolytiques faibles chez les bactéries lactiques, elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Bouhanna et Boussaa, 2017 ; Corrieu et Luquet, 2008).

### 3.2.2.5. Aptitude antagonistique

Les composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques peuvent empêcher la croissance des bactéries pathogènes dans les produits fermentés. Ces composés incluent le peroxyde d'hydrogène, CO<sub>2</sub>, le diacétyle, l'acétaldéhyde, les D-isomères des acides aminés et les bactériocines. La production d'acide lactique diminue le pH en créant un milieu défavorable au développement des microorganismes pathogènes (Bouhanna et Boussaa, 2017).

### 3.2.2.6. Activité gazogène

## Etude Bibliographique

---

Certains ferments lactiques sont capables de produire du  $\text{CO}_2$  à partir d'une source de carbone, participant ainsi à la formation d'ouvertures dans les fromages (Corrieu et Luquet, 2008).

### 3.2.3. Microbiologie du fromage

Les microorganismes du lait cru sont les agents majeurs de l'élaboration des fromages. Ils interviennent au niveau technologique (caillage du lait, texture du fromage...), au niveau organoleptique (production d'arômes) (Saubusse, 2007).

Le fromage est l'un des aliments transformés les plus anciens qui soit encore aisément accessible sur le marché. Malgré tout, il est toujours fabriqué selon un procédé qui n'a que très peu changé depuis sa création. Si les produits se sont diversifiés pour offrir au consommateur des fromages frais, à pâte molle, ferme, demi-ferme et dure, le principe derrière sa fabrication demeure le même : le lait estensemencé de levains et d'enzymes afin d'y faire coaguler les protéines. Le coagulum obtenu est par la suite transformé pour obtenir différents types de fromages (Emond, 2014).

Les fromages hébergent une microflore naturelle variée en nombre et en composition. Ce microbiote est un élément important de la typicité et de la qualité des fromages. Les variations dans la composition de ce microbiote naturel sont la source de défis constants pour les fromagers puisqu'elles ont un impact sur le goût du produit (la saison affecte la nature du microbiote du lait et les variations saisonnières affectent l'affinage des fromages) (Labrie et Champagne, 2022). Les qualités sanitaire et sensorielle des produits laitiers et des fromages en particulier dépendent en grande partie de la composition et de la vie des communautés microbiennes, en perpétuelle évolution lors de la fabrication et de l'affinage des fromages. Le contrôle de ces communautés microbiennes, pour favoriser les flores utiles et inhiber les flores pathogènes, est un des facteurs-clés de la maîtrise de la qualité des fromages (Montel et al, 2003).

La microflore bactérienne se compose généralement des ferments lactiques, appartenant aux genres bactériens *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. Le genre *Lactococcus* est couramment utilisé comme ferment lactique d'acidification (fermentation lactique) et permet la coagulation des caséines.

*Streptococcus thermophilus* est une espèce souvent utilisée en combinaison avec d'autres bactéries lactiques pour la fabrication de fromages à pâte pressée (ex. Emmental, Gruyère,

## Etude Bibliographique

---

Gorgonzola) et à pâte molle stabilisée. Son rôle au cours de l'affinage est semblable à celui des *lactocoques*, mais leur production en acétaldéhyde est beaucoup plus importante et confère des arômes de fraîcheur recherchés chez les variétés des fromages concernées (Fleury, 2020).

Les lactobacilles sont le plus souvent utilisés comme culture d'appoint. Ils ont un rôle mineur dans l'acidification du caillé, mais interviennent pendant l'affinage des fromages par leurs activités protéolytiques, peptidasiques, lipasiques et estérasiques (la production d'arômes fruités). *Lactobacillus helveticus* et *Lb. delbrueckii* sont les espèces les plus utilisées dans les ferments lactiques et les cultures d'appoint (Fleury, 2020).

La production d'acide lactique conduit à un abaissement du pH qui contribue à la coagulation des protéines du lait. Du fait de cette capacité, certaines BL telles que *Lactococcus lactis*, et en particulier *Lactococcus lactis* spp. *Lactis* et *Lactococcus lactis* spp. *Cremoris* sont souvent utilisées comme ferment d'acidification. Elles sont souvent associées avec d'autres BL mésophiles (*Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc pseudomesenteroides*) ou thermophiles (*Streptococcus thermophilus*).

Au cours de l'affinage des fromages, les BL contribuent également au développement de la saveur et de la texture des fromages. A la surface des fromages, les BL acidophiles (*Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*) et halophiles (*Marinilactibacillus* et *Facklamia*) sont sous-dominantes (Fretin, 2016).

Les populations microbiennes interagissent entre elles, ainsi qu'avec la composante biochimique du lait puis du fromage. Le sens et l'importance de ces interactions sont influencés par les facteurs environnementaux : température de stockage du lait, paramètres technologiques de fabrication, conditions environnementales d'affinage (Verdier-Metz et al, 2012).

**PARTIE**  
**EXPERIMENTAL**

# **MATERIELS ET METHODES**

## Chapitre I. Matériel et Méthodes

### Introduction

L'élevage des vaches joue un rôle socio-économique important dans la stabilité des habitants des régions montagneuses de l'est Algérien. Dans ces régions les vaches représentent une source de lait cru pour l'alimentation des habitants. L'excédent du lait cru est transformé par la flore autochtone naturelle en lait fermenté ; fromage ; beurre cru et salé et d'autres produits laitiers. L'étude de la flore totale et lactique est nécessaire pour l'appréciation de sa qualité sanitaire et technologique avant consommation ou sa transformation artisanale ou industrielle.

Les techniques microbiologiques et biochimiques ont été appliquées pour atteindre cet objectif.

Cette étude a été réalisée dans le but d'apprécier les qualités microbiologiques du lait cru de mélange récolté au niveau de trois fermes localisées dans les localités rurales de Oued-Cheham, Ain-Larbi et Ain-Saynour, dans les wilayates de Guelma et Souk-Ahras.

A travers cette modeste étude on cherchera à atteindre trois objectifs :

- ✚ Dénombrer la flore mésophile aérobie totale à partir du : lait cru, lactosérum et fromage frais.
- ✚ Dénombrer, Isoler et identifier la flore lactique à partir du : lait cru, lactosérum et fromage frais.
- ✚ Essayer l'activité antibactérienne des souches lactiques isolées sur 2 souches pathogènes

### 1.1. Echantillonnage et prélèvement

Les prélèvements de lait cru de mélange se sont effectués dans des récipients propres et stériles, soigneusement étiquetés (lieu et date de prélèvement), conservés et transportés dans une glacière au laboratoire où ils sont analysés.

### 1.2. Analyses microbiologiques

Avant et pendant les manipulations au laboratoire, nous avons respecté les règles de base pour éviter les contaminations, et le transfert de germes d'un récipient à un autre.

- ✓ Se laver soigneusement les mains en entrant/sortant du laboratoire :
- ✓ Nettoyer et aseptiser les paillasses avec l'eau de javel avant et après manipulation ;



## Partie Expérimentale

---

- ✓ Stériliser en autoclave tout le matériel (les flacons, les tubes à vis, les pipettes, bouillonsensemencés...);
- ✓ Travailler de façon absolument aseptique;
- ✓ Travailler le plus près possible du bec bunsen avec des ustensiles stériles.

### Préparation des dilutions

Tout d'abord, il faut préparer une suspension mère homogène (10 ml de l'échantillon + 90 ml d'eau physiologique), les dilutions sont réalisées en série à partir de cette suspension. Le transvasement est effectué à l'aide d'une micropipette, en prélevant 1mL de la suspension mère dans un tube contenant 9mL de diluant stérile (eau physiologique) à la température appropriée, On mélange soigneusement la prise d'essai et le diluant.

Pour les dilutions suivantes on répète l'opération en utilisant des embouts stérile pour chaque nouvelle dilution.

### Réalisation de l'ensemencement

Un ensemencement en masse a été réalisé, un volume de 1 ml d'inoculum est dispersé dans le fond d'une boîte de Pétri, et le milieu de culture est ensuite coulé par-dessus.

Les microorganismes se développent dans la masse du milieu gélosé, on obtient donc des Unités Formant Colonies (UFC).

Dans la zone stérile :

- ✓ Homogénéiser la suspension microbienne à prélever;
- ✓ Ouvrir et flamber l'ouverture du tube;
- ✓ Prélever 1 ml de suspension à l'aide de la pipette stérile;
- ✓ Flamber et refermer le tube, jeter la pipette souillée dans le bac à eau de Javel.
- ✓ On transfère aseptiquement, 1 ml de la première dilution sous forme de gouttes dans le fond d'une boîte de Pétri vide;
- ✓ Ensuite on coule environ 15 ml de milieu gélosé maintenu à 47°C dans chaque boîte de Pétri selon la flore recherchée, cette addition doit avoir lieu dans les 15 mn après le dépôt des gouttes.

Homogénéiser les germes avec toute la masse du milieu par des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de (8) pour permettre à l'échantillon de se mélanger à la gélose, on laisse le milieu solidifier : les boîtes sont sur une surface plane, non chaude,

## Partie Expérimentale

---

dans la zone de stérilité, le couvercle légèrement déplacé (ne pas excéder 10 mm). On retourne les boîtes et on les incube dans l'étuve, La température d'incubation est variable suivant les microorganismes à dénombrer.

### 1.2.1. Technique de dénombrement

Le but des techniques de numération (ou dénombrement) est de déterminer la concentration en bactéries contenues dans une préparation initiale. Elles nécessitent une ou plusieurs dilutions décimales.

Le dénombrement s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte les facteurs suivants : Ne retenir que les boites contenant entre 15 à 300 colonies. Calcul du nombre des colonies par millilitre. La moyenne de dénombrement est réalisée selon l'équation suivante :

$$N = \Sigma C / (n1 + 0.1n2) d$$

$\Sigma C$  : est la somme des colonies dénombrées sur les boites.

d: est la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements ont pu être obtenus.

n1 : est le nombre de boites dénombrées pour la première dilution

n2 : est le nombre de boites dénombrées pour la deuxième dilution

Soit pour une boite/dilution :

$$N = \Sigma C / 1.1.d$$

Ou :

$\Sigma C$  : est la somme des colonies dénombrées sur les deux boites retenues ;

D : est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

Les résultats calculés sont arrondis à deux chiffres significatifs.

#### 1.2.1.1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT)

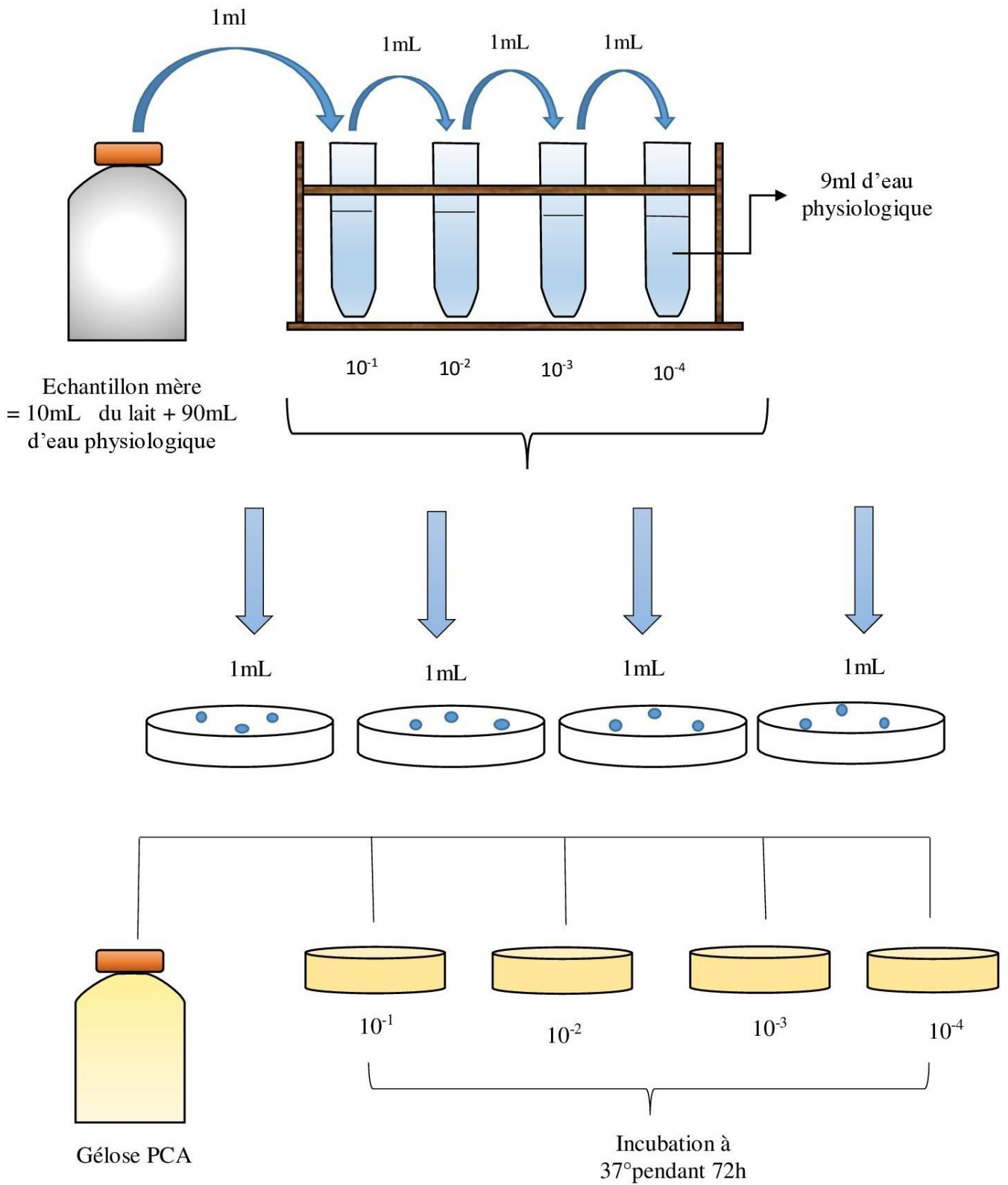
##### Milieu de culture utilisé (Figure 4)

La gélose appelée "Plate Count Agar" ou PCA, dont l'intérêt est de favoriser le développement à 30 /37°C, est utilisée en bactériologie alimentaire pour le dénombrement des bactéries aérobies mésophiles dans les produits laitiers.

##### Incubation

Une fois le milieu solidifié, les boites sont retournées puis incubées à 37°C pendant 24 à 72 h.

## Partie Expérimentale



**Figure 4:** Technique de démembrement de la FMAT.

## Partie Expérimentale

---

### 1.2.1.2. Dénombrement de la flore lactique

#### Milieux de culture utilisés (Figure 5)

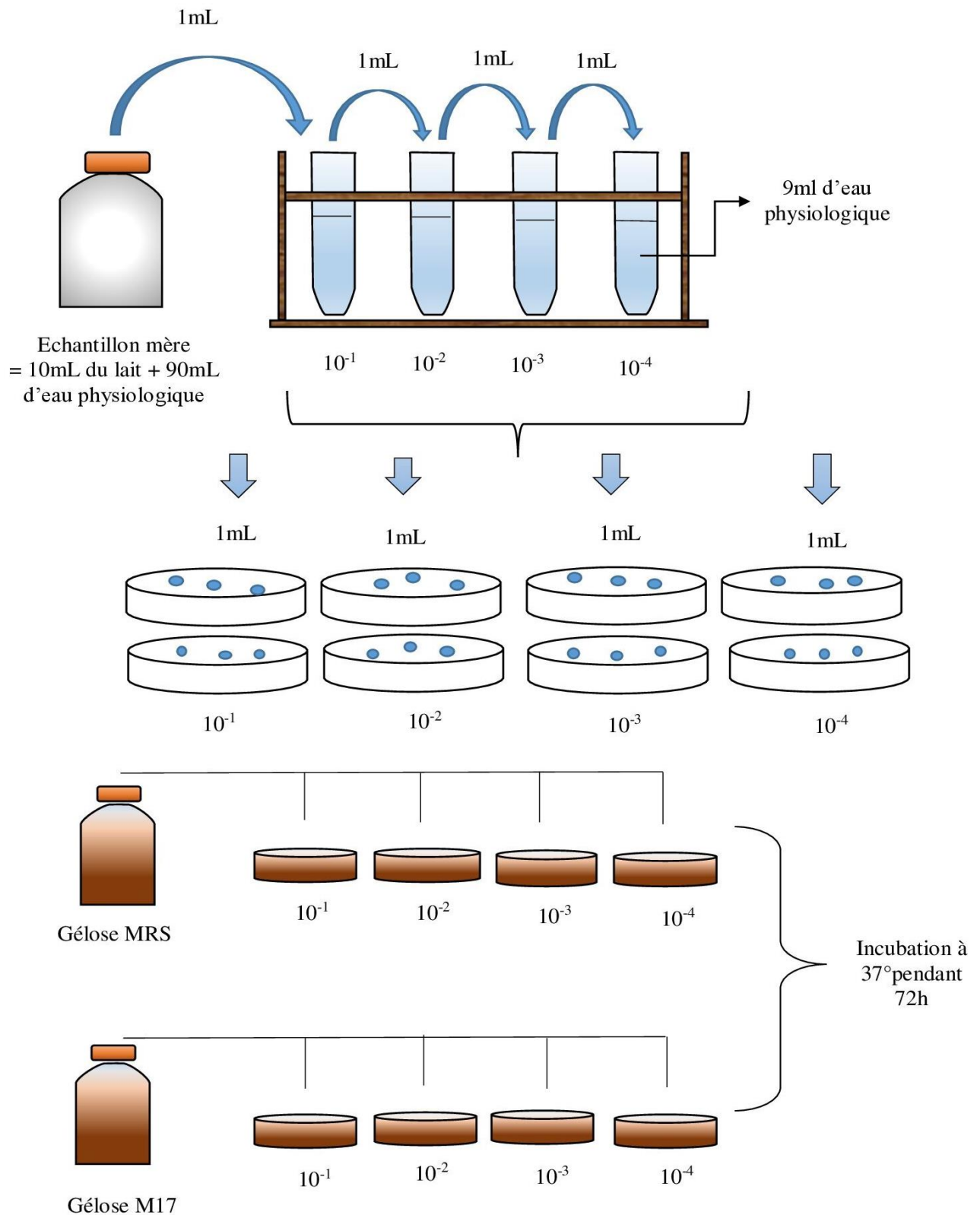
La gélose MRS (de De Man, Rogosa et Sharpe) permet une excellente croissance des bactéries lactiques (BL), est utilisée pour la culture, le dénombrement, et l'isolement des *Lactobacillus* dans les produits laitiers.

- La gélose M17 est utilisée in vitro pour la culture et l'isolement des *lactocoques* dans les produits laitiers.

#### Incubation

Une fois les milieux solidifiés, les boîtes sont retournées puis incubées à 37°C pendant 24 à 72 h.

## Partie Expérimentale



**Figure 5:** Technique de démembrement de la flore lactique

## Partie Expérimentale

### 1.2.2. Isolement et purification de la flore lactique

#### ✚ Les milieux d'isolement et de purification

Les milieux sélectifs utilisés sont : le milieu M17 pour l'isolement des *lactocoques*, le milieu MRS pour l'isolement des *lactobacilles*.

#### 1.2.2.1. Principe d'isolement (Figure 6)

En microbiologie, l'isolement est une technique permettant de séparer les microorganismes présents dans un mélange microbien.

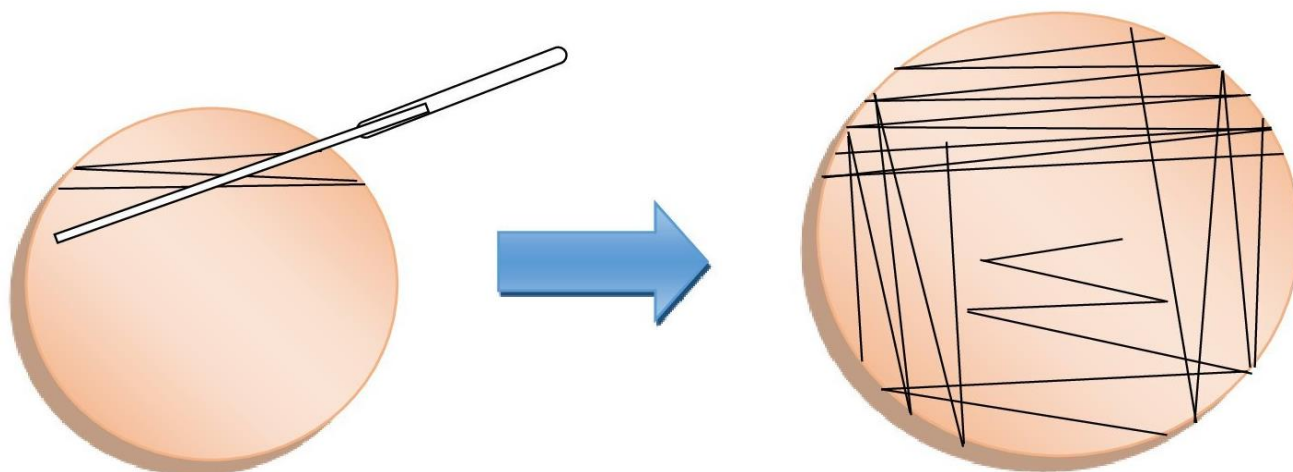
L'isolement se fait par la méthode des cadrans, cette méthode est la plus classique. Elle consiste à diviser une boîte de Pétri en deux (50 % et 50 %), puis de diviser de nouveau par deux afin d'obtenir 4 cadrans.

À partir de plusieurs colonies cultivées et développées sur un milieu solide (MRS ou M17), et à l'aide d'une pipette de pasteur stérile on prend une colonie à part et on la repique à nouveau dans le même milieu (MRS ou M17), sur le plus grand cadran la colonie est posée puis étalée. Ensuite on retourne la boîte afin d'étaler les bactéries sur un cadran plus petit, puis on retourne afin d'ensemencer le dernier petit cadran.

Les stries doivent être serrées et la pipette doit être flambée entre chaque cadran pour de meilleurs résultats.

#### ✚ Incubation

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 72 h.



**Figure 6:** Technique d'ensemencement en cadran.

## Partie Expérimentale

---

### 1.2.2.2. Principe de purification

La purification des souches isolées est réalisée par repiquages successifs sur gélose MRS et M17 par la méthode des stries, jusqu'à ce qu'on obtient à la fin des souches pures (on s'assure par le microscope). L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 24 à 72h.

### 1.2.3. L'identification de la flore lactique

Les cultures pures sélectionnées vont subir une observation macroscopique sur boîte Pétri suivie d'une observation microscopique sur microscope photonique après avoir réalisé une coloration de Gram

- ❖ Aspect macroscopique : observation sur boîte Pétri : l'aspect de colonie, la couleur...
- ❖ Aspect microscopique : on réalise une coloration de Gram pour les souches isolées puis on fait une observation au microscope et ce sur des cultures de 72h sur MRS et M17 (les formes caractéristiques des colonies bactériennes, leur coloration de Gram.).

#### 1.2.3.1. Observation macroscopique (description des colonies)

Afin d'identifier une souche microbienne, la première étape du diagnostic microbien d'une souche est la description macroscopique des colonies bien isolées ; parfois cette seule étude permet de connaître le germe qu'on a en présence car les colonies sont typiques. Les principaux caractères à étudier sont : la forme, la taille, la couleur, la surface le relief (élévation), le contour ....

#### 1.2.3.2. Observation microscopique

##### La coloration de gram

La coloration de Gram est très utilisée en bactériologie médicale, elle permet de colorer les bactéries et de les distinguer par leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram +) ou la fuschine (Gram -). Les bactéries peuvent donc être groupées en 2 catégories selon la méthode de coloration de Gram : positive ou négative.

## Partie Expérimentale

---

### Technique :

- ✓ Préparation d'un frottis : Déposer une goutte d'eau physiologique sur une lame propre et prélever à l'aide d'une l'anse de platine stérile une colonie à partir d'une culture jeune puis on étale sur 1 à 2cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame, sécher et fixer la préparation devant le bec Bunsen (par la chaleur) pour tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique et les faire adhérer à la lame.
- ✓ La deuxième étape nécessite quelques gouttes de violet de gentiane sur le frotti fixé pendant 1 min, après rinçage on ajoute de lugol pendant 1min. puis on ajoute quelque gouttes d'alcool pendant 10secondes(ne va traverser que la paroi de certaines bactéries « les Gram négatives » et décolorer leur cytoplasme), puis on rince avec de l'eau distillé , Enfin on met quelques gouttes de Fuchsine et on laisse pendant 1 min, la lame est lavée à l'eau physiologique, après séchage on passe à l'observation microscopique.

### 1.2.3.3. Test catalase

Le test de catalase facilite la détection de l'enzyme catalase dans les bactéries recherchées. Il est essentiel pour différencier la catalase positive -négative. Bien qu'il soit principalement utile pour différencier les genres (**Karen, 2010**).

### Technique :

La technique consiste à prélever à l'aide d'une pipette stérile une colonie à partir de la gélose MRS ou M17 et déposée sur une lame stérile, puis ajouter une goutte d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ; l'apparition de bulles révélant le dégagement d'oxygène c'est à dire catalase positive.

### 1.2.3.4. Test oxydase

La recherche d'oxydase est un test fondamental pour orienter l'identification des bactéries

### Technique :

Un disque oxydase est posé sur une lame stérile ; puis une colonie est prélevée à partir de la gélose MRS ou M17 et fixée sur le disque avec une pipette pasteur stérile. Si le disque présente une tache violette : le substrat a été oxydé, la bactérie possède une oxydase.



## Partie Expérimentale

---

### 1.2.3.5. Etude de l'activité antibactérienne des souches

Cette méthode est réalisée sur les bactéries lactiques inhibitrices possédant les plus grande zones d'inhibition montrant la présence de substances inhibitrices, ces substances peuvent diffuser dans un milieu de culture solide.

#### La technique :

##### ✓ Préparation des extraits des cultures des bactéries lactiques :

Les souches de bactéries lactiques sont cultivées sur bouillon MRS durant trois jours à 37°C, ces suspensions ont été centrifugé à 4000 tr/mn pendant 15 minutes, les surnagent récupéré à partir des cultures des bactéries lactiques seront testés pour leur pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion sur gélose en utilisant le milieu Mueller-Hinton Agar (MH) comme support (Bouzaid et al, 2016).

##### ✓ Activation de souches pathogènes :

Les souches pathogènes de références utilisées sont : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* 70063.

Ces deux souches pathogènes pures utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne proviennent du laboratoire de bactériologie. Elles ont été cultivées et incubées à 37°C sur le milieu de culture Gélose Nutritif (GN) pendant 18 heures.

##### ✓ Préparation des suspensions :

Quelques colonies de chaque bactérie ont été mis en suspension dans du NaCl (eau physiologique) et mélangées pendant 15 secondes pour assurer l'homogénéité de la suspension bactériennes. La turbidité a été ensuite ajustée à une valeur de densité optique égale à 0,08-0,1 à 625nm en utilisant le spectrophotomètre.

##### ✓ Diffusion en puits :

Dans une zone stérile, on coule dans la boites pétri environ de 17ml de milieu (MH), on laisse les milieux solidifier ;

Les suspensions bactériennes ont étéensemencées uniformément avec des écouvillons stériles sur la gélose MH. En utilisant un emporte-pièce stérile, des puits de 6mm de diamètre ont été réalisés dans les gélosesensemencées. ces puits ont été remplis avec 40 µL du l'extrait des cultures de bactéries lactiques à tester.

Les boites de pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h. et les diamètres des zones d'inhibition entourant les puits ont été mesurés, les tests ont été effectués en duplicata.

# RESULTATS ET DISCUSSION

## Chapitre II. Résultats et discussion

### 2.1. Dénombrement

Pour le comptage des colonies, on a retenu les boîtes de Pétri contenant un nombre de colonies compris entre 15 et 300. Le dénombrement s'est fait à partir de deux dilutions, les résultats moyens des analyses microbiologiques des échantillons sont représentés dans les **Tableaux 8 et 9**, (exprimés en UFC/ml pour le lait cru et le lactosérum et en UFC /g pour le fromage).

**Tableau 8** : Résultats moyens de dénombrement de la FMAT et des BL sur les géloses PCA, MRS, M17. Lait cru et Lactosérum : **AL** : Ain-Larbi; **AS** : Ain-Seymour; **OC** : Oued-Cheham.

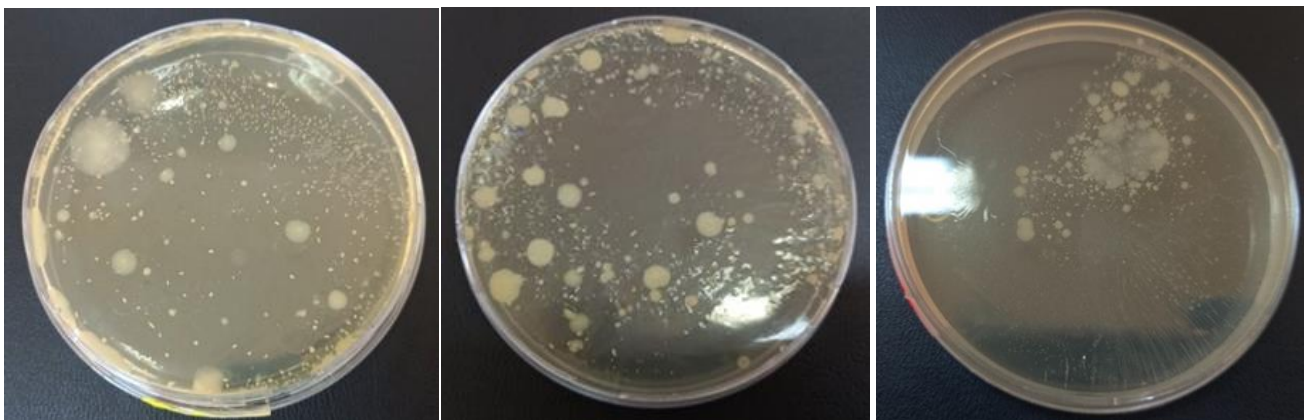
Zone	FMAT		BL MRS		BL M17	
	Lait cru	Lactosérum	Lait cru	Lactosérum	Lait cru	Lactosérum
<b>AL</b>	1,55x10 <sup>3</sup>	2,53x10 <sup>3</sup>	2,84x10 <sup>3</sup>	2,53x10 <sup>3</sup>	2,92x10 <sup>3</sup>	1,11x10 <sup>3</sup>
<b>AS</b>	4,37x10 <sup>3</sup>	3,79x10 <sup>3</sup>	4,32x10 <sup>3</sup>	4,03x10 <sup>3</sup>	3,44x10 <sup>3</sup>	3,61x10 <sup>3</sup>
<b>OC</b>	5,46x10 <sup>3</sup>	4,26x10 <sup>3</sup>	4,22x10 <sup>3</sup>	4,4x10 <sup>3</sup>	3,97x10 <sup>3</sup>	5,1x10 <sup>3</sup>
<b>Moy (LOG)</b>	3,49 ± 0,26	3,55 ± 0,10	3,54 ± 1,14	3,55 ± 0,12	3,50 ± 0,08	3,47 ± 0,32

**Tableau9** : Résultats de dénombrement de la FMAT et des BL sur les géloses PCA, MRS, M17 sur fromage frais a base lactosérum mère (LM) et de lactosérum fille thermisé (LFT) (Ain seynour).

FMAT		BL MRS		BL M17	
LM	LFT	LM	LFT	LM	LFT
5,76 x 10 <sup>6</sup>	3,29 x 10 <sup>6</sup>	4,11 x 10 <sup>7</sup>	1,58 x 10 <sup>7</sup>	4,98 x 10 <sup>6</sup>	4,37 x 10 <sup>6</sup>

#### 2.1.1. La flore mésophile totale

Le dénombrement de la FMAT reflète la qualité microbiologique générale du lait, le nombre de ces germes totaux nous renseigne toujours sur la qualité hygiénique du lait cru, du lactosérum et du fromage frais (photos 1, a-b-c ; respectivement).



(a)

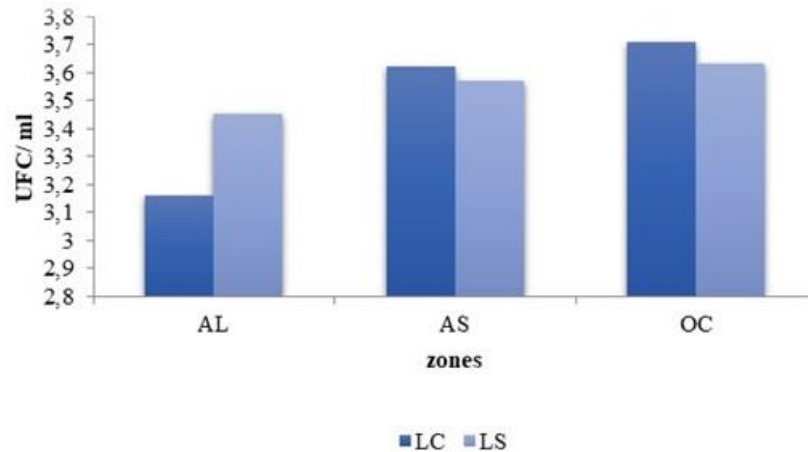
(b)

(c)

**Photo1** : Dénombrement du FMAT sur le milieu PCA à partir : (a) Lait cru, (b) Lactosérum, (c) Fromage (**Guessibi et kanouni, 2022**).

## Partie Expérimentale : Résultats et discussion

C'est la flore la plus recherchée dans les analyses microbiologiques (Afif et al, 2008). A partir de là, il s'agirait, soit de dénombrer un type de flore bactérienne, afin d'évaluer la qualité sanitaire du lait, soit d'identifier des germes pathogènes dont on souhaite l'absence (Tourette, 2002). Les taux de flore totale retrouvés sur le milieu PCA après 24h à 37°C est représenté dans la Figure 7.



**Figure 7:** Variations de la FMAT du lait cru (LC), lactosérum (LS) par zone d'élevage.

En comparant les moyennes par zone (Figure 7) nous constatons que la charge microbienne, aussi bien dans le lait cru que dans le lactosérum de Oued-Cheham et Ain-Seymour, est beaucoup plus élevée que celle de Ain-Larbi (lait cru :  $5,46 \cdot 10^3$  UFC/ml ;  $4,37 \cdot 10^3$  UFC/ml;  $1,55 \cdot 10^3$  UFC/ml vs lactosérum :  $4,26 \cdot 10^3$  UFC/ml;  $3,79 \cdot 10^3$  UFC/ml;  $2,53 \cdot 10^3$  UFC/ml). Cependant pour la zone d'Ain-Larbi, on remarque une augmentation de la charge microbienne du lactosérum par rapport au lait cru ( $2,53 \cdot 10^3$  UFC/ml vs  $1,55 \cdot 10^3$  UFC/ml, respectivement). Ceci peut s'expliquer par les éventuelles contaminations au cours du caillage, ainsi que les variations dans la température ambiante au niveau du laboratoire.

Dans l'ensemble, et pour les trois zones, et comme rapporté par Millogo et al, (2018) la présence de telles charges en germes totaux s'explique par les conditions d'élevage (l'environnement de la traite, l'état sanitaire de l'animal, l'hygiène du trayon, des ustensiles et de l'eau utilisée). De plus, le lait restait à une température ambiante élevée pendant toute la durée du transport (1 à 3 heures). L'effet conjugué de la température, associé à l'absence de chaîne de froid crée des conditions particulièrement favorables au développement des bactéries (Koussou et al, 2007).

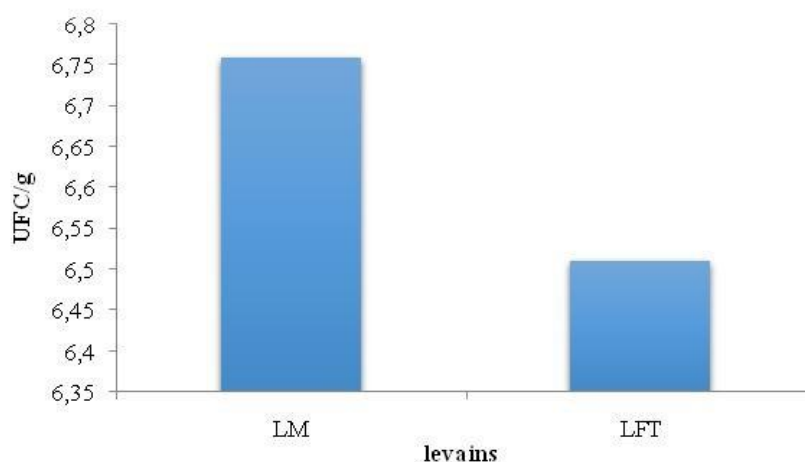
## Partie Expérimentale : Résultats et discussion

Nos résultats en FMAT ne dépassent pas la norme fixée par le **JORA (1998)** à  $1.10^5$  UFC/ml. Comparés à ceux rapportés en Algérie, au Maroc et en France (**Tableau 10**), nos moyennes renseignent sur un état hygiénique satisfaisant.

**Tableau 10** : Synthèse d'auteurs pour la FMAT.

Pays	Auteurs	UFC /mL
Algérie	Ghazi et Niar, (2011)	$81,2\% \geq 10^5$
Maroc	Taybie et al, (2014)	$2,15.10^7$
	El Marnissi et al, (2013)	$4,5.10^5$
	Bouzaid et al, (2015)	$4,4.10^5$
France	Michel, (2001)	$5,8.10^3$

L'analyse microbiologique des deux types de fromagesensemencés avec le LFT et le LM, a montré une charge en FMAT de  $3,29 \times 10^6$  UFC/g vs  $5,76 \times 10^6$  UFC/g ; respectivement (**Figure8**). L'énumération de cette flore pour les échantillons collectés a montré qu'il y a une concentration importante dans les deux fromages. Donc on conclut que le fromage repiqué avec le LM présente une charge en FMAT beaucoup plus importante que le fromage repiqué avec le LFT.



**Figure 8** : Variations de la FMAT du fromage par type.

Nos échantillons de fromage sont légèrement plus contaminés que ceux de **Abakar (2012)** qui avait trouvé un nombre élevé de germes aérobies mésophiles de  $1,7.10^5$  UFC/g sur le fromage frais. En comparant la charge en FMAT entre les deux fromages, on constate qu'elle est plus élevée dans le typeensemencé avec le LM.

L'obtention du fromage de mauvaise qualité hygiénique est probablement le résultat du non-respect des règles et des mesures d'hygiène des locaux, du matériel et des manipulateurs lors de la fabrication (**El Marnissi, 2013**).

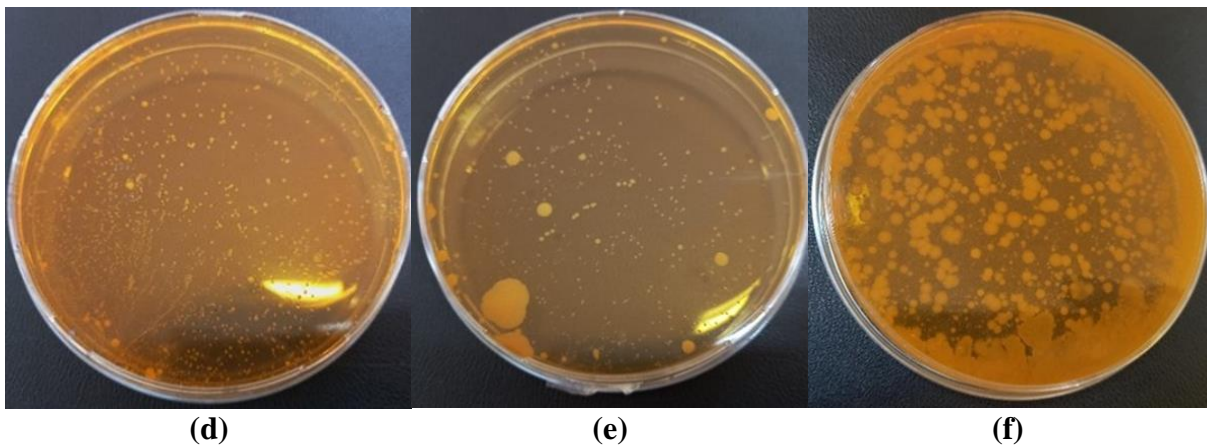
## Partie Expérimentale : Résultats et discussion

### 2.1.2. La flore lactique

Cette étape nous a permis de mettre en évidence l'existence d'une flore lactique dans les produits laitiers (lait cru, lactosérum et fromage). Le comptage réalisé sur les boîtes de Pétri contenant la gélose MRS, et l'autre la gélose M17, on a observé la présence de colonies dans tous les échantillons du lait cru, du lactosérum et du fromage (Photo 2, d-e-f) ; (photo 3, h-k-m ; respectivement).

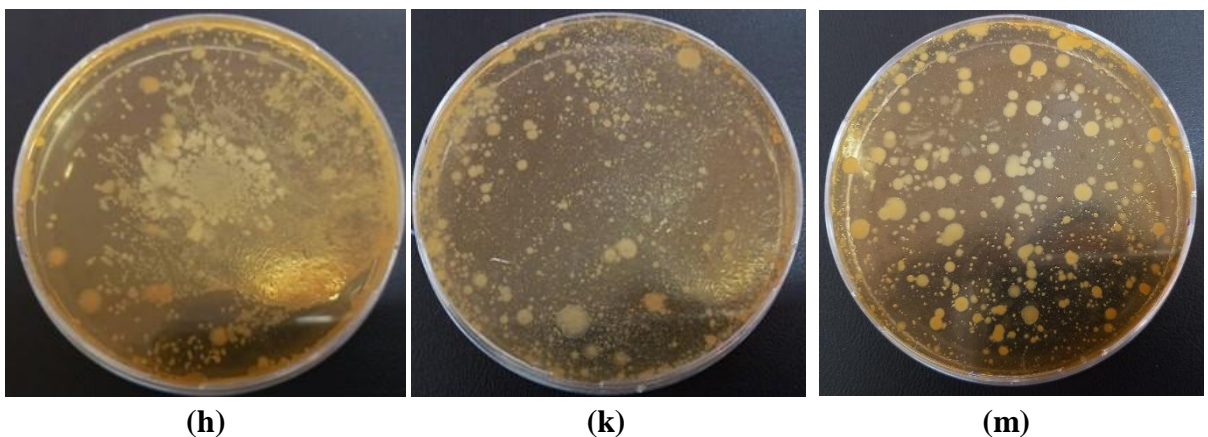
Les figures suivantes montrent le taux des bactéries lactiques trouvé dans nos échantillons :

#### ✚ Sur le milieu MRS



**Photo 2:** Résultat d'incubation des BL sur le milieu MRS à partir : (d) Lait cru, (e) Lactosérum, (f) Fromage (Guessibi et Kanouni, 2022).

#### ✚ Sur le milieu M17 :

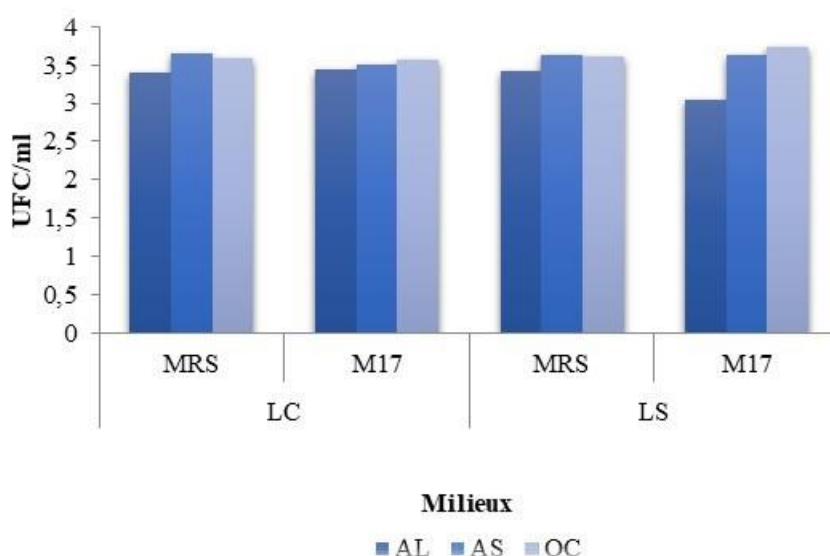


**Photo 3:** Résultat d'incubation des BL sur le milieu M17: (h) Lait cru, (k) Lactosérum, (m) Fromage (Guessibi et Kanouni, 2022).

## Partie Expérimentale : Résultats et discussion

Le dénombrement de la flore lactique sur gélose MRS et M17, dévoile une richesse en bactéries lactiques du lait cru (LC) des trois zones : Ain-Larbi, Ain-Saynour et Oued-Cheham : ( $2,84.10^3$  UFC/ml ;  $4,32.10^3$  UFC/ml ;  $4,22.10^3$  UFC/ml ; respectivement) sur le milieu MRS et ( $2,92.10^3$  UFC/ml ;  $3,44.10^3$  UFC/ml ;  $3,97.10^3$  UFC/ml ; respectivement) Sur le milieu M17.

La charge microbienne du lactosérum (LS) est presque proche à celle du lait cru (LC) sur le milieu MRS :  $2,53.10^3$  UFC/ml ;  $4,03.10^3$  UFC/ml ;  $4,4.10^3$  UFC/ml, et un peu différente sur le milieu M17 :  $1,11.10^3$  UFC/ml-  $3,61.10^3$  UFC/ml -  $5,1.10^3$  UFC/ml, pour les trois zones AL-AS et OC, respectivement (Figure 9).



**Figure 9:** Variations des BL du (LC) et (LS) par zone d'élevage sur les milieux MRS, M17.

Les milieux de cultures (MRS et M17) utilisés sont sélectifs et favorisent le développement de la flore lactique (les lactobacilles et streptocoques). Nos résultats sont en dessous de ceux rapportés au Maroc et au Sud-Togo (Tableau 11).

**Tableau 11.** Synthèse d'auteurs pour les BL.

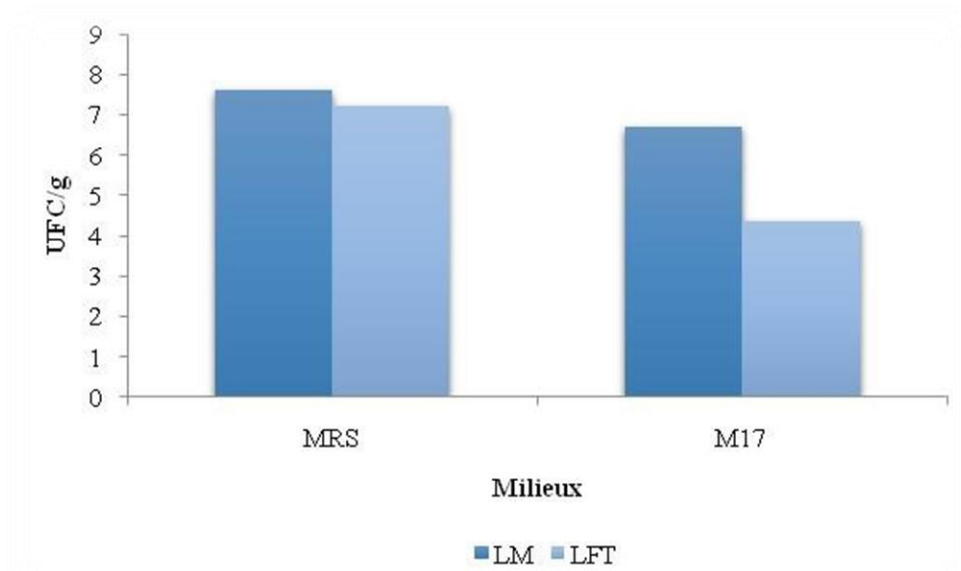
Pays	Auteurs	UFC /mL
Maroc	Taybie et al, (2014)	$5,02.10^5$
	Bouzaid et al, (2012)	$3,93.10^5$
	El Marnissi, (2013)	$5.10^5$
Sud-Togo	Seme et al, (2015)	$1,60.10^4$

En ce qui concerne les bactéries lactiques qui jouent un rôle important dans l'industrie de fermentation, on trouve que le lait cru contient une charge moyenne importante de  $3,93.10^5$  UFC/ml. Ce qui montre la possibilité de transformer et d'améliorer

## Partie Expérimentale : Résultats et discussion

le lait cru en d'autres produits fermentés de bonne qualité hygiénique et organoleptique (Bouzaid et Al, 2012).

D'autre part on observe que le fromage (FF) possède une charge microbienne sur MRS :  $4,11.10^7$  UFC/g pour le levain mère (LM) et  $1,58.10^7$ UFC/g, pour le levain fille thermisé (LFT). Sur M17 :  $4,98.10^6$ UFC/g pour le levain mère et  $4,37.10^6$  UFC/g, pour le levain fille thermisé (LFT)(Figure 10).



**Figure 10:** Variations des BL du (LFT) et (LM) par zone d'élevage sur les milieux MRS, M17.

Les différentes phases d'élaboration du fromage vont dépendre de la présence de microorganismes utiles (BL). Ces germes vont conditionner la réussite du fromage en lui donnant ses caractéristiques de texture, de saveur, d'aspect (Abakar, 2012).

## 2.2. Isolement et identification

### 2.2.1. Examen macroscopique (Critères morphologiques)

#### ✚ Lait cru (LC) et lactosérum (LS)

Les cultures obtenues sur milieu MRS et M17 solide sont observées à l'œil nu puis au microscopique. Après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h ; Les boîtes de Pétri ont été examinées.

L'examen macroscopique sur milieu solide MRS montre des colonies circulaires, bombées et de couleur blanchâtre, leur taille est d'environ 0,5mm à 1mm de diamètre(photo4), et sur le milieu M17 elles ont une deuxième forme de colonie circulaire,



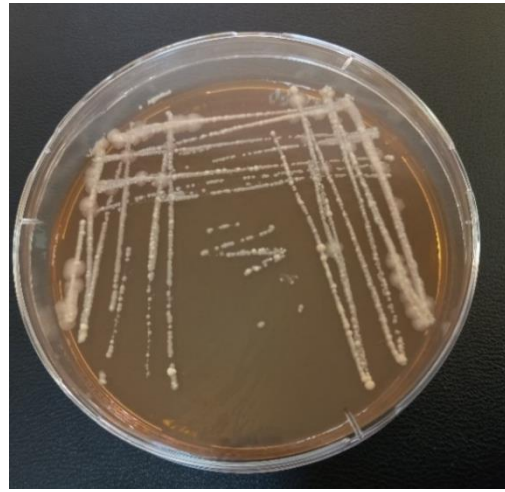
## Partie Expérimentale : Résultats et discussion

---

de couleur crème (**photo 5**).



**Photo4:** Aspect macroscopique du LC sur milieu M17 (**Guessibi et Kanouni, 2022**).



**Photo 5:** Aspect macroscopique du LC sur milieu MRS (**Guessibi et Kanouni, 2022**).

Les résultats du test morphologique de **Menad,(2017)** sur la gélose M17 et MRS, se traduisent par l'apparition des colonies bien visibles, de formes circulaires ou lenticulaires, bombées, à bords réguliers, de couleur blanchâtre ou laiteuse, avec une surface lisse. Une deuxième forme de colonie irrégulière, érodée, de couleur crème et de 1 à 2 mm de diamètre.

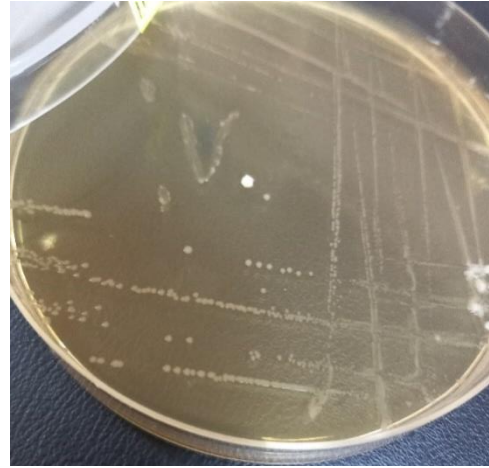
Les Critères morphologiques des bactéries isolées dans les échantillons de lait cru et du lactosérum sont les mêmes.

### **Fromage**

Sur le milieu MRS, les colonies sont de forme ronde, lenticulaire de couleur blanchâtre, bombées, leur taille est d'environ 1 à 2 mm de diamètre (**Photo 6**). Par contre sur le milieu M17 elles sont très petites et de forme circulaire et de couleur crème (**Photo 7**).



**Photo 6:** Aspect macroscopique du fromage frais sur le milieu MRS (Guessibi et Kanouni, 2022).



**Photo 7 :** Aspect macroscopique du fromage frais sur le milieu M17 (Guessibi et Kanouni, 2022).

### 2.2.2. Examen microscopique

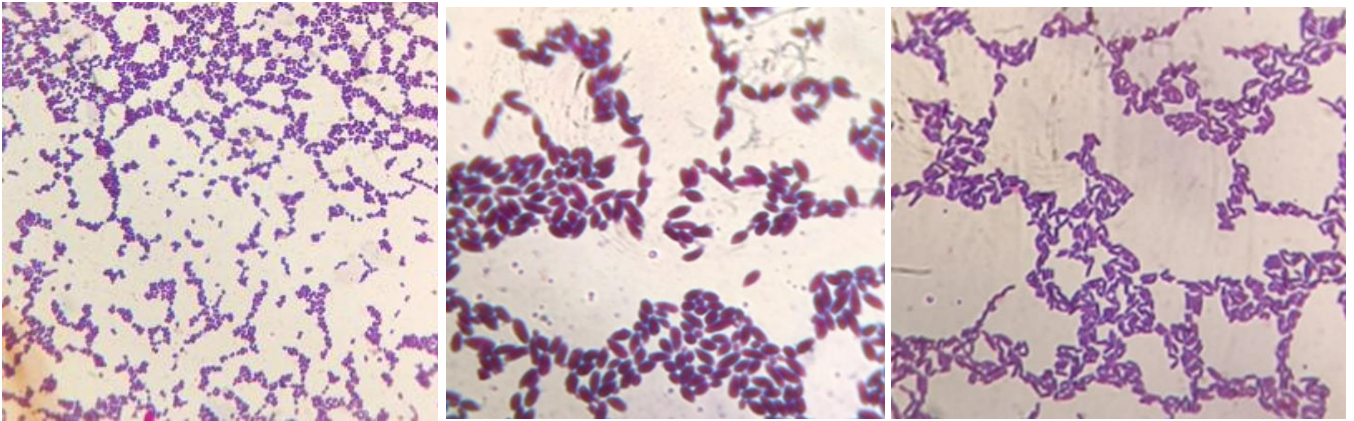
#### Coloration de gram

La caractérisation microscopique est basée sur la coloration de Gram. Après la coloration de Gram, nous avons observé au microscope (Gx10), (Gx40) et (Gx100) avec l'huile à immersion qui a montré que les souches étudiées possèdent les mêmes caractères :

- Gram positif (de couleur violette).
- En forme de coques ou bacilles ou de cocci ovoïdes, disposés en paires, en diplocoque ou en chaînettes.

L'aspect microscopique des souches, après coloration de Gram a révélé trois formes de bactéries : bâtonnet, Coque et ovoïde de Gram positif, colorées en violet. Les coques sont disposées en paires (diplocoques) ou en courtes et longues chaînettes (**Photos 8**), mais la forme ovoïde et les bacilles présents, sont associés en paires ou en courtes chaînettes (**Photos 9 et 10**).

## Partie Expérimentale : Résultats et discussion



**Photo 8:** Aspect microscopique des *Streptococcus* à partir du milieu M17 (Gx100) (Guessibi et Kanouni, 2022).

**Photo 9:** Aspect microscopique des *Leuconostoc*, à partir du milieu MRS (Gx100) (Guessibi et Kanouni, 2022).

**Photo 10:** Aspect microscopique des *Lactobacillus*, à partir du milieu MRS (Gx100) (Guessibi et Kanouni, 2022).

Nos résultats indiquent que les cellules observées après coloration de Gram sont voilettes pour tous les isolats donc ceux sont des bactéries à Gram positif (+). Ce qui conforme aux résultats de **Ahmed Gaid (2020)**.

L'observation microscopique des échantillons du lait cru et du lactosérum a révélé trois formes de bactéries : des Bacilles représentés par le genre *Lactobacillus* et Coques représentées par le genre *Streptococcus*, et des cocci ovoïde par le genre *Leuconostoc*. Par contre dans le fromage une forme dominante a été observée qui représente le genre *Leuconostoc*.

Nos résultats sont conformes à ceux d'**El Kafsi, (2014)** qui a constaté que les lactobacilles ont une forme de bacilles ou de coccobacilles isolés ou en chaînettes.

**Savadoغو et Traore (2011)**, ont défini les bactéries du genre *Leuconostoc* comme des bactéries lactiques mésophiles cocci ovoïdes et les streptocoques, de Gram positif.

Les *Leuconostoc* sont couramment présentes dans le fromage, ces bactéries sont souhaitables dans la plupart des aliments en raison de leur participation au développement et à la conservation des saveurs (**Timothy et al, 1994**).

### 2.3. Test catalase

Après l'ajout d'une colonie à 1 ml d'une solution d'eau oxygénée, on n'observe pas la formation éventuelle de bulles de gaz (d'oxygène) (**Photo 11**).

L'absence de bulles d'air après l'ajout de l'eau oxygénée sur l'inoculum indique que ces

## Partie Expérimentale : Résultats et discussion

---

bactéries sont catalase négative.

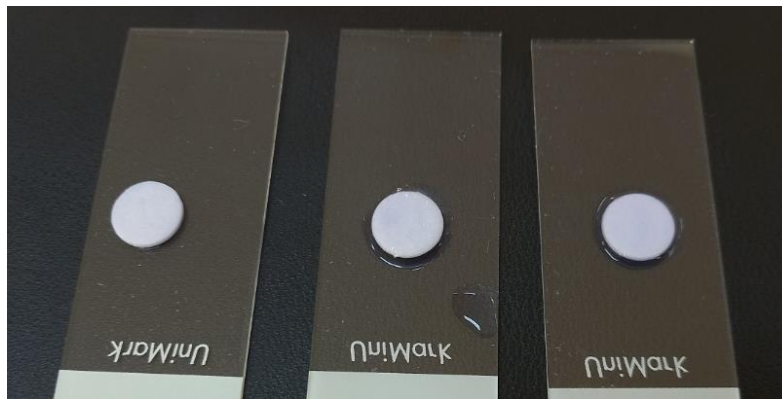


**Photo 11** : Résultats de test catalase (Guessibi et Kanouni, 2022).

Les résultats de ce test ont révélé que toutes les souches isolées sont catalase négatives.

### 2.4. Test oxydase

Après l'ajout d'une colonie sur un disque d'oxydase posé sur une lame stérile, le disque reste incolore : il n'y a pas eu de réaction, la bactérie ne possède pas l'enzyme (Photo 12).



**Photo12** : Résultats de test oxydase (Guessibi et Kanouni, 2022).

Les résultats de ce test ont révélé que toutes les souches isolées sont oxydase négatives.

Lors de cette étude nous avons identifié les souches isolées à partir du lait cru, du lactosérum et du fromage frais par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques et biochimiques.

Ces analyses et observations macro et microscopiques nous indiquent la présence

## Partie Expérimentale : Résultats et discussion

de 18 souches des bactéries lactiques dans nos échantillons : *Streptococcus* (8souches), *Leuconostoc* (5souches), *Lactobacillus* (5 souches). Toutes les souches représentatives à gram positive (+), et les tests catalase et oxydase négative (-).

**Tableau 12 :** Caractérisations des bactéries lactiques.

Les Souches	Observationmicroscopique	Genrede bactérie
S 1	Bacille	<i>Lactobacillus</i>
S 2	Bacille en chaînette	<i>Lactobacillus</i>
S 3	Bacille en paire	<i>Lactobacillus</i>
S 4	Petit bacille	<i>Lactobacillus</i>
S 5	Petit bacille en chaînette	<i>Lactobacillus</i>
S 6	Cocci diplocoque	<i>Streptococcus</i>
S 7	Cocci en amas	<i>Streptococcus</i>
S 8	Cocci monocoque	<i>Streptococcus</i>
S 9	Cocci triplocoque	<i>Streptococcus</i>
S 10	Cocci tétrade	<i>Streptococcus</i>
S 11	Cocci chaînette	<i>Streptococcus</i>
S 12	Petit Cocci	<i>Streptococcus</i>
S 13	Petit Cocci en chaînette	<i>Streptococcus</i>
S 14	Coccobacille	<i>Leuconostoc</i>
S 15	Coccobacille en paire	<i>Leuconostoc</i>
S 16	Coccobacille en amas	<i>Leuconostoc</i>
S 17	Petit Coccobacille en chaînette	<i>Leuconostoc</i>
S 18	Petit Coccobacille	<i>Leuconostoc</i>

### 2.5. L'activité antibactérienne des bactéries lactiques

Dans cette étude on a retenu quatre souches isolées à partir du lait cru : « S1 : *lactobacillus* », « S2 : *Streptococcus* », du lactosérum « S3 : *Leuconostoc* », et du fromage « S4 : *Leuconostoc* ».

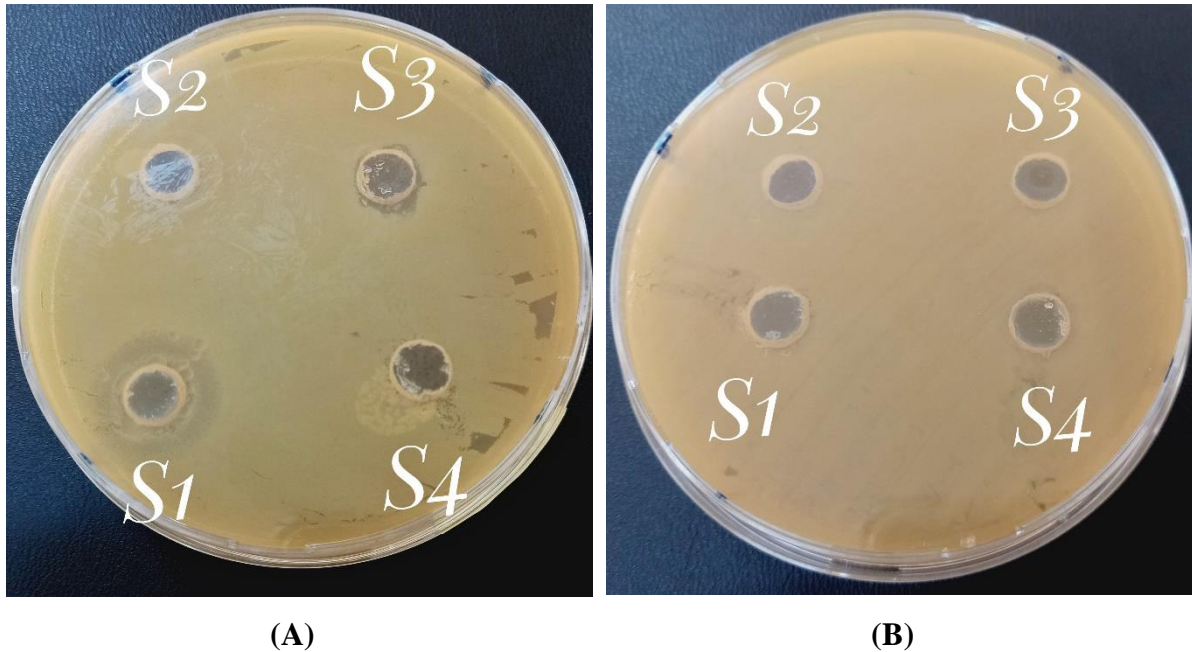
Ces souches ont été testées pour leur capacité à inhiber les bactéries pathogènes Gram négatif tel que : *klebsiella pneumoniae* ATCC70063, et les Gram positifs : *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

Les résultats de l'interaction obtenue, révèlent la présence d'une zone claire autour des souches des bactéries lactiques qu'est considérée comme une inhibition positive et se traduit par la mesure des diamètres.

Après l'incubation du milieu MH à 37°C pendant 24h, on observe que les souches S1, S3 présentent des zones d'inhibition vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* , par contre on n'observe aucune zone autour des quatre souches lactiques vis-à-vis à la bactérie indicatrice *Klebseilla pneumoniae* (**Photos 14**).

Les résultats des zones d'inhibitions représentées dans les photos et le tableau ci-dessus :

## Partie Expérimentale : Résultats et discussion



**Photo 13 :** Inhibitions obtenues par la méthode de puits sur milieu gélose MH par des souches de S1, S2, S3, S4 vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*(A) et *klebsiella Pneumoniae* (B) (Guessibi et Kanouni, 2022).

**Tableau 13 :** Les résultats en diamètres d'activité antibactérienne des BL.

Les souches	Diamètres des zones d'inhibition (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
S1	19	0
S2	0	0
S3	11	0
S4	0	0

Sur la base des résultats obtenus(**Tableau 13**),on observe qu'il y a deux isolats (souches lactiques) qui possèdent une activité antibactérienne contre les *S. aureus*, avec des diamètres d'inhibition variant, 19mm pour « S1 » et 11mm pour « S3 », par contre une absence totale des zones d'inhibition est remarquée sur les souches lactiques « S2 » et « S4 ».Donc il faut noter que les lactobacilles possèdent une zone d'inhibition élevé, par contre les coccobacilles ont une zone d'inhibition réduite.

Les travaux de **Allouche et al, (2010)**, montre que toutes les souches de *Lactobacillus* isolées du lait cru produisent et excrètent dans le milieu de culture des substances inhibitrices capables d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*.

Nos résultats corroborent parfaitement avec les résultats obtenus par **Belarbi (2011)** qui constate que la majorité des souches de *Leuconostoc* présentent un potentiel à inhiber la croissance des bactéries ciblées telles que *Staphylococcus aureus*.

### Conclusions

Le but de notre étude était d'effectuer un démembrement de la FMAT ensuite un isolement de bactéries lactiques à partir de différents produits laitiers (lait cru, lactosérum et fromage fraisensemencé avec deux types de levains),provenant de trois régions (Ain Arbi, Ain Seynour, Oued Cheham) situées dans les Wilayats de Guelma/Souk-Ahras.

Après la réalisation des tests quantitatifs : dénombrement de la flore mésophile aérobie totale et la flore lactique, dans les trois milieux (PCA, MRS, M17), les résultats obtenus montrent que les produits laitiers sont chargés en flore microbienne totale et lactiques.

L'identification des BL révèle que les isolats étudiés peuvent appartenir aux genres suivants : bâtonnet aux genres pour *lactobacillus*, des coques pour *streptococcus*, et d'autre forme cocobacille de *leuconostoc*.

L'étude de l'activité antibactérienne à l'égard de *Staphylococcus aureus* a montré que les *Lactobacillus* et les *leuconostoc* ont une activité inhibitrice remarquable et les diamètres des zones d'inhibition varient entre 11mm et 19mm. Par contre à l'égard de *Klebsiella pneumoniae* aucune zone d'inhibition n'a été observée. Cette étude est préliminaire et mérite d'autres travaux complémentaires.

# REFERENCES



## Références

---

- Abakar M.N.M., (2012).** Essai de fabrication d'un fromage frais traditionnel sénégalais, à partir du lait de vache, coagulé par la papaïne naturelle. Mémoire de master. Université cheikh antadiop de dakar. Tchad. 9-25 p.
- Afif A., Faid M., Najimi M., (2008).** Qualité microbiologique du lait cru produit dans la région de Tadla au Maroc. *Reviews in Biology and Biotechnology*. Vol 7, No 1.2-7p.
- Ahmed Gaid K., (2020).** Les bactéries lactiques. Généralités sur les bactéries lactiques. 5. 3 p.
- Alberto M.R., Perera M.F., et Arena M.E, (2013).** Lactic Acid Fermentation of Peppers. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 47-55 p.
- Allouche F.N., Hellal A., et Laraba A., (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie.*, 3 :13-20 p.
- Azam M., Mohsin M., Ijaz H., Ume R.T., Adnan Ashra F.M., Fayyaz A., Abadeen Z., et Kamran Q., (2017).** Lactic acid bacteria in traditional fermented Asian foods. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.30, No.5. Pakistan. 1803-1814 p.
- Béal C., Helinck S., (2003).** Fabrication des yaourts et des laits fermentés. *Techniques de l'Ingénieur*. 9 p.
- Belarbi F., (2011).** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes. Mémoire de Magistère. Université d'ORANE Senia.83-84 p.
- Beuvier E., feutrier F., (2005).** Quelques bases sur la microbiologie du lait et du fromage, 3p.
- Bouhanna I., BoussaaA., (2017).** Les bactéries lactiques : isolement et application dans la technologie laitière, éditions universitaires européennes. Saarbrücken. Allemagne. 10-14 p.
- Bouzaid M., Chatoui R., Hasib A., et Mennane Z., (2012).** Qualité hygiénique du lait de colportage prélevé des points de vente de la ville de Rabat. *Les technologies de laboratoire*, Volume 7, N°2.10p.
- Bouzaid M., Latrache H., Chatoui R., Hasib A., (2016),** Activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées de viande hachée de dromadaire et du lait cru de vache (Maroc), Vol 10, N°1.1-12 p.
- Cazet L, D, M., (2007).** Bilan du taux de contamination et étude préparatoire au dosage de résidus de produits phytosanitaires dans le lait de grand mélange bovin. Thèse Présentée à l'université Claude Bernard : Médecine. Lyon. 45 p.

## Références

---

- Charles B., O'Connor C.B., et Tripathi B.R., (1991).** Introduction à l'étude du lait. Série Techniques de transformation du lait en milieu rural. Centre international pour l'élevage en Afrique. Addis-Abeba. 9 p.
- Concepcion N.B.R., Okos M.R., et Wankat P.C., (2000).** Kinetic Study of the Conversion of Different Substrates to Lactic Acid Using *Lactobacillus bulgaricus*. Biotechnol. Prog. Vol. 16, No 3. 305-306 p.
- Corrieu G., et Luquet F.M., (2008).** Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments, édition Tec. Et Doc. Lavoisier, Paris France. 297-872 p.
- Déribéré M., (1946).** Les applications industrielles du pH. Troisième édition. Ed dunod, 1946. 152 p.
- Didier J., (2016).** Les ferments lactiques, revue des écoles nationales d'industrie laitières ENIL, de leurs amicales d'anciens élèves et organismes associés, N 345. 1p.
- Djossou O., (2011).** Mycoflore post-récolte du café robusta et utilisation des bactéries lactiques pour le contrôle des moisissures mycotoxinogènes et de l'Ochratoxine A. Thèse doctorat. Université paul Cézanne, aix marseille III. 32 p.
- Doleyres Y., (2003).** Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse doctorat. Université Laval. Québec. 9p.
- Dortu C., Thonart P., (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 11. 1p.
- Dridier D., et Hevré P., (2009).** Bacteries lactiques. Edition. Economica. 235-240 p.
- Drouault S., Corthier G., (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. Veterinary Research, BioMed Central, 16.101-117 p.
- El Kafsi H., (2014).** Etudes comparatives de *Lactobacillus delbrueckii* sous-espèces *lactis* et *bulgaricus* : identification des déterminants du phénotype anti-inflammatoire. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 41 p.
- El Marnissi B., Belkhou R., Ialami E.O., Bennani L., (2013).** Caractérisation Microbiologique Et Physicochimique Du Lait Cru Et De Ses Dérivés Traditionnels Marocains (Lben Et Jben) Les Technologies De Laboratoire, Volume 8, N°33, 107-109 p.
- Emond C., (2014).** Développement de particules de lactosérum aux propriétés contrôlées par injection de vapeur. Thèse doctorat. Université Laval. Québec, Canada. 6 p.

## Références

---

- Fessard A., (2017).** Recherche de bactéries lactiques autochtones capables de mener la fermentation de fruits tropicaux avec une augmentation de l'activité antioxydante. Sciences agricoles. Université de la Réunion. France. 26-27 p.
- Fleury A.R., (2020).** Étude de la microflore des fromages du terroir québécois par métabarcoding. Thèse doctorat. Université Laval. Québec, Canada. 4 p.
- Food and agricultural organization FAO, (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : Alimentation et nutrition N.28. Rome (Italie). 55-66p.
- Fretin M., (2016).** Construction de la qualité sensorielle des fromages de type Cantal : rôle des interactions entre les communautés microbiennes et la composition de la matière grasse laitière des fromages. Thèse doctorat. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II. 37-38 p.
- Gagnon D., (2006).** Formulation et propagation de ferments lactiques mésophiles à haut caractère aromatique. Thèse doctorat. Université Laval. Québec. 24 p.
- Gagnon M., Kennangouamba A.J., et Roy R., (2018).** Le voyage des bactéries de l'ensilage jusqu'au fromage. Qualité de lait. Le producteur de lait québécois. 14-15p.
- Gaucheron F., Tanguy G., (2009).** Modifications de la qualité biochimique des laits et des produits laitiers par la technologie. Renc. Rech. Ruminants, 16.133p.
- Ghazi K., Niar A., 2011.** Qualité hygiénique du lait cru de vache dans les différents élevages de la wilaya de Tiaret (Algérie). Tropicultura, 29. 194 p.
- Goy D., Jakob E., et Haldemann J., (2015).** Les fermentations lactiques. Agroscope. N°59.Suisse. 5 p.
- Halasz A., (2009).** Lactic acid bacteria. Food Quality *and* Standards, Volume 3. Central Food Research Institute. Budapest, Hungary. 70-75 p.
- Hammi I., (2016).** Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français. Thèse en cotutelle. Université de Strasbourg, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah. 26 p.
- Harle O., (2020).** Identification des interactions positives entre bactéries lactiques en fermentation de jus de soja. Thèse doctorat. Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation. Agro campus Ouest. France. 29 p.
- Herault A., Teinturier M., Graugnard J., et Jénot F., (2019).** Nouvelle-Aquitaine, Terre des Chèvres. Le bulletin des éleveurs de chèvres et fromagers fermiers caprins. Des Chevriers Nouvelle-Aquitaine et Vendée – Fédération Régionale Caprine. N° 16. 1p.
- J.O.R.A. N° 35, (1998).** Critères microbiologiques des laits et des produits laitiers.

## Références

---

- Joubert. D., (2016).** Les ferments lactiques. Revue de enil. V30. 1-30 p.
- Juillard V., Spinnler H.E., Desmazeaud M.J., et Boquien C.Y., (1987).** Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. Le Lait, INRA Editions, 67 (2). 149-172 p.
- Karam N.E., Zadi karam H., Lazreg L., et Dalache F., (2008).** Bacteriocins of lactic acid bacteria: characterisation of a *bacteriocin* from *Enterococcus* BO2. Renc. Rech. Ruminants, 15. 1p.
- Karen R., (2010).** Catalase Test Protocol, American Society for Microbiology. 1p.
- Koussou M.O., Grimaud P., Mopaté L.Y., (2007).** Evaluation de la qualité physico-chimique et hygiénique du lait de brousse et des produits laitiers locaux commercialisés dans les bars laitiers de N'Djamena au Tchad. Revue Élev. Méd.vét. Pays trop., 60 (1-4) : 45-49 p.
- La Société Scientifique de Bruxelles, (1893).** Vol 18. p24.
- Labrie S., Champagne C.P., (2022).** Comprendre la contribution de la microflore et de la composition du lait pendant l'affinage du fromage. Grappe de recherche laitière 3. Canada. 1p.
- Laithier C., (2011).** Microflore du lait cru, Vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation. Filières fromagères valorisant leur terroir. 11-20 p.
- Lavoie K.,(2011).** Caractérisation microbiologique des laits du terroir québécois servant à la production de fromages de spécialité. Mémoire de masterpublie. Université Laval, Québec. Canada. 3-50 p.
- Léonard L., (2013).** Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique. Thèse doctorat. Université de Bourgogne. France.15-18 p.
- Madec M.N., (2013).** Consortia microbiens indispensables à la fabrication de lait fermenté "type" gros-lait : caractérisation et préservation pérenne de ces consortia. Bio INRA-Agro campus Rennes. 1p.
- Matamoros S., (2008).** Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid. Thèse doctorat. Université de Nantes. France.17-19 p.
- Mathieu F., (1994).** Études des propriétés d'une bactériocine anti-Listeria, biosynthétisée par une souche de *Carnobacterium*. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine. France.4-17 p.

## Références

---

- Menad N., (2017).** Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de *Salmonella* sp. Thèse doctorat. Université Abdelhamid ibn badis Mostaganem. 58 p.
- Michel V., Hauwuy A., et Chamba J.F., (2001).** La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Lait* 81. France. 575-756 p.
- Millogo V., Sissao M., et Ouédraogo G.A., (2018).** Qualité nutritionnelle et bactériologique des échantillons de quelques produits laitiers locaux de la chaîne de production au Burkina Faso. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 12(1). 249 p.
- Montel M.C., Beuvier E., et Hauwuy A., (2003).** Pratiques d'élevage, microflore du lait et qualités des produits laitiers. INRA, 16 (4), France. 279-282 p.
- Morge S, (2004).** Guide d'appui technique pour l'accident de fromagerie à la ferme « Défauts d'acidification ».
- Noblet B., (2012).** Le lait : produits, composition et consommation en France. Cahiers de Nutrition et de Diététique. Elsevier Masson SAS. 47(5). 242–249 p.
- Parciel, P., Corrot, G., et Sauvee, O., (1994).** Variations du point de congélation et principales causes du mouillage du lait de vache. *Rencontre Recherche Ruminants*, (1), 129-132 p.
- Pougheon S., (2001).** Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière. Thèse doctorat d'état en médecine vétérinaire. Université paulsabatie de Toulouse, France. 66 p.
- Rahmani S., (2022)** .Inhibitory power and probiotic proprieties of lactic acid bacteria strain isolated from cow's milk from the chelf region algeria. lulu publication. 12 p.
- Ratisbonne-Zafimahova K.A., (2009).** Caractérisation de deux souches de *Lactobacillus sakei* utilisées dans la fermentation des produits carnés. Mémoire de master. Universités montpellier II et montpellier I. 6 p.
- Renard J., (2014).** À propos du lait cru. Direction générale opérationnelle de l'Agriculture, des Ressources naturelles et de l'Environnement du Service public de Wallonie. 15 p.
- Royant A., Soustre Y., (2015).** Questions sur les produits laitiers. Le lait. Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière. France. 1-2 p.
- Salas M.L., (2018).** Cultures antifongiques applicables comme ferments de bioprotection dans les produits laitiers : sélection, évaluation à l'échelle pilote et identification de composés supports de l'activité. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest. 11-23 p.
- Salminen S., Wright A.V., Ouwehand A., (2004).** Lactic Acid Bacteria. 2<sup>ème</sup> édition. Marcel Dekker, Inc. USA. 23-32 p.

## Références

---

- Salminen S., Wright A., et Ouwehand A., (2011).**Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 4 Edition, Marcel Dekker, Inc.USA, 3-93 p.
- Saubusse M., (2007).** Effet de barrière des populations microbiennes des laits crus vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* dans un fromage à pâte pressée non cuite. Thèse doctorat. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II ; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I. 21 p.
- Savadogo A., Traore A., (2011).** La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés, International Formulae Group. 2058-2063 p.
- Seme K., Pitala W., et Osseyi G. E., (2015).** Qualité nutritionnelle et hygiénique de laits crus de vaches allaitantes dans la région maritime au sud-togo. Europe an Scientific Journal edition vol.11, No.36.366 p.
- Sibra C., (2014).** Composés d'intérêt nutritionnel du lait et des fromages de terroir. Les composés du lait et leur intérêt nutritionnel. Filières fromagères valorisant leur terroir.17- 31 p.
- Taale S., Savadogo A., Zongo C., Tapsoba F., Karou S.D., et Traore A.S., (2016).** Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne : cas des bactériocines. Int. J. Biol. Chem. Sci.15. P385. 384-399 p.
- Taybi N.O., Arfaoui A., et Fadli M., (2014).**Evaluation de la qualité microbiologique du lait cru dans la région du Gharb, Maroc.ISSN : 2351-8014. Vol. 9 No. 2, 490 p.
- Timothy M., Cogan, Kieran N., et Jordan, (1994).** Metabolism of *Leuconostoc* Bacteria. J Dairy Sci .77. Centre Moore park Fermoy, Ireland. P 2704.
- Tourette I., (2002).** Filières laitières en Afrique et points critiques pour la maîtrise des dangers sanitaires des laits et produits laitiers. Diplôme d'études supérieures. Université Montpellier II. 10 p.
- Velly H., (2014).** Etude de l'évolution de l'état physiologique de *L. lactis* TOMSC161 au cours de la fermentation et de son incidence sur la résistance à la lyophilisation et au stockage. Microbiologie et Parasitologie. AgroParisTech.20 p.
- Verdier-Metz I., Monsallier F., et Montel M.C., (2012).** Place des pâturages des bovins dans les flux microbiens laitiers. Fourrages .209. 53-58 p.
- Vignola L.C., (2002).** Science et technologie du lait, transformation. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada. 3-29 p.
- Vilain A.C., (2010).** Qu'est-ce que le lait. Revue Française d'Allergologie, 50(3), France. 127-124 p.

## Références

---

- Wallace, T. D., Bradley, S., Buckley, N. D. & Green-Johnson, J. H.(2003).** Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. *Journal of Food Protection* 2003. Vol. 66 (3) : 466-472p.
- Zamfir M., Callewaert R., Cornea P.C., Savu L., Vatafu I., et De Vuyst L., (1999).** Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 923–931 p.

# ANNEXES



## Annexes

### Matériel utilisé

Appareillage :	Verrerie :	Autre matériel :
- Agitateur électrique ; - Autoclave ; - Bain marie ; - Balance ; - Centrifugeuse ; - Etuve ; - Microscope optique ; - Réfrigérateur ; - Vortex électrique ; - Spectrophotomètre.	- Tubes à vis ; - Béchers ; - Pipettes graduées ; - Pipettes pasteurs ; - Flacons ; - Lames et lamelles.	- Bec bunsen ; - Anse de platine ; - Boîtes de pétrie ; - Portoirs ; - Micropipettes et les embouts ; - Ecouvillons ; - Huile à immersion.

### Les Milieux de cultures utilisés pour l'analyse microbiologique du lait cru, lactosérum et du fromage :

- Milieu PCA « Standard Method Agar » (PH 7)

Peptone de caséine	5,00 g
Extrait de levure	2,50 g
Glucose	1,00 g
Agar	15,00 g
Eau distillée	1000mL

- Milieu M17 (pH 7,2)

Peptone papainique de soja	5 g
Peptone pepsique de viande	2,5 g
Peptone trypsique de caséine	2,5 g
Extrait de viande	5 g
Extrait de levure	2,5 g
ù-Glycérophosphate de sodium	19 g
Sulfate de magnésium, 7H <sub>2</sub> O	0,25 g
Acide ascorbique	0,50 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée	950 mL

## Annexes

---

- **Milieu MRS (pH 6,5)**

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1mL
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
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
Agar	15g
Eau distillée	1000mL

- **Milieu Mueller-Hinton (MH Géluse) (pH 7,3)**

Peptone	17,50 g
Extrait de viande	2,00 g
Amidon	1,50g
Agar	17,00g
Eau distillée	1000mL

- **Milieu Mueller-Hinton (MH bouillon) (pH 7,3)**

Peptone	17,50g
Extrait de viande	2,00g
Amidon	1,50g
Eau distillée	1000mL

- **Eau physiologique (pH 7)**

Chlorure de sodium	8,5g
Eau distillée	1000mL
Peptone	0,5g

## Annexes

- **Gélose nutritif (pH 7)**

Extrait de viande	1,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Peptone	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar-agar	15,0 g
Eau distillée	1000mL

Tous les milieux sont stérilisés à 121°C durant 15 min.

➤ **Les étapes de la coloration de Gram :**

1. Coloration par le violet de gentiane, laisser 30 secondes à 1 minute, puis rincer à l'eau.
2. Fixation au lugol (solution iodo-iodurée) : recouvrir de lugol et laisser agir le même temps que le violet de gentiane ; rincer à l'eau.
3. Décoloration (rapide) à l'alcool. Cette l'étape est la plus importante de la coloration. Rincer abondamment avec de l'eau pour stopper la décoloration.
4. Recoloration à la fuchsine. Mettre quelques gouttes de fuchsine, laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau.
5. Sécher la lame.

Observation microscopique avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement  $\times 1000$ ).

➤ **Les compositions des colorants de Gram :**

**Violet de gentiane au cristal**

Violet de gentiane	10g
Phénol	20g
Ethanol à 0.95	10 ml
Eau distillée	1 ml

**Fuchsine de Ziehl**

Fuchsine bosique	10g
Phénol	50g
Ethanol à 0.5	10 ml
Eau distillée	1 ml

**Lugol**

Iode	5g
I0 dure de potassium	10g
Eau distillée	1ml
Flacon brun	