

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

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



Ref :.....

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

Thème

*Isolement et essais d'identification de quelques bactéries
lactiques à partir d'un fromage artisanal*

Présenté par :

BATTAH Alima et BOUHAMDANI Kahina

Soutenu le : 18 Juin 2017

Devant le jury composé de :

Mme TETILI F.

Mme FARADJI S.

Mr BENDJEDDOU K.

MAA Président

MCB Examineur

MCB Encadreur

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

On remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant, pour avoir guidé nos pas vers un avenir inchaallah prometteur, où le travail, la persévérance et la quête du savoir seront notre devise.

Suite à l'achèvement de ce modeste travail, on tient tout particulièrement à remercier notre promoteur M^r BENDJEDDOU.K.

Nos remerciements vont également aux membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, à la présidente Mme Titeli.F, à l'examinatrice, Mme Ferradji.S

On tient également à rendre hommage à toute les personnes qui été la a répondre a nos questions et qui ont donné un plus pour se travail, particulièrement à M^{me} FERRADJI.S, M^{me} TITELI. F, M^{me} Gharout. A, sans oublier m^{elle} Maïbeche Ryma.

On tient à remercier l'ensemble de la promotion microbiologie Alimentaire et santé 2016/2017.

On n'oubliera pas de citer les techniciennes du laboratoire de Microbiologie et particulièrement M^{me} Djerrada et toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sincèrement merci

Dédicace

A mes très chers parents.

A mes très chères sœurs.

A mon petit frère.

A mon cher fiancé et ma belle famille.

A mon binôme Alima.

A toute mes amies.

A tout les étudiants de ma promotion 2016 particulièrement Hdjila.M,

Tiziri.B, Sarah.T, Salha.B, Lamia.A.

Sincèrement kahina ✍

Je dédie ce mémoire à :

: Mes parents

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanents venus de toi.

Mes frères et sœurs qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

Mes enseignants qui m'ont accompagné tout au long de mon cursus d'études, qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien

Acquis.

Enfin à toutes les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans

Ma vie à un moment ou à un autre et qui m'ont accompagné et

Soutenu.

Et

Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer.

Sincèrement Alima ✍

Liste des Figures

<i>N°</i>	<i>Titre</i>	<i>page</i>
Figure 3	Préparation des dilutions décimale	11
Figure 4	Protocole adapté de l'isolement jusqu'à la purification des souches.	12
Figure 5	Des colonies de bactérie lactique sur le milieu MRS pH 5.4	17
Figure 6	Aspect microscopique de quelques souches isolées : de longs bacilles en chaînette (A), de coco bacille (B) (coloration de Gram) (G× 100).	18
Figure 7	Distribution du pourcentage des isolats lactiques (%)	18
Figure 8	Aspect d'une culture pure dans le bouillon MRS.	20
Figure 9	Résultats du test de thermorésistance des souches : S20, S10	22
Figure 10	Résultats du test du type fermentaire des souches : S17, S19 et le témoin	22
Figure 11	Résultats du test de l'hydrolyse de l'arginine par les souches testées	23
Figure 12	Résultat du test « profile fermentaire » des souches	23
Figure 14	Résultat de la galerie API 50 CHL de la souche 42	26

Liste des figures en annexe

<i>N°</i>	<i>Titre</i>
Figure 1	Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre « <i>Lactobacillales</i> » dans la classe des « <i>bacilli</i> ».
Figure 2	Clef d'identification des bactéries lactiques.
Figure 13	Résultat du test « profile fermentaire ».

Liste des tableaux

<i>N°</i>	<i>Titre</i>	<i>page</i>
II	Morphologie des souches lactiques étudiées	18
III	Résultats des tests physiologiques	21
IV	Profil fermentaire des bactéries lactiques isolée	24
V	Résultat de la galerie API 50 CHL	27

Liste des tableaux en annexe

<i>N°</i>	<i>Titre</i>
I	Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques

Liste des abréviations

ADH : Arginine déshydrolyse

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

Cb: *Carnobacterium*

FDP aldolase : Fructose-diphosphate aldolase

GRAS: Generally recognized as safe

LAB: Lactic Acid Bacteria

MRS: Man, Rogosa, Sharpe

NSLAB: Non-starter lactic acid bacteria

T: Témoin

Lb: *Lactobacillus*

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Taxonomie, classification et méthodes d'identification des bactéries lactiques

1. Définition et caractéristiques générales des bactéries lactiques.....	2
2. Habitat et origine.....	2
3. Classification des bactéries lactiques.....	2
3.1. Classification des principaux genres utilisés en biotechnologie alimentaire.....	3
3.1.1. Les genres <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> et <i>Vagococcus</i>	3
3.1.2. Les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	5
3.1.3. Le genre <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	6
3.1.4. Le genre <i>Lactobacillus</i> et <i>Carnobacterium</i>	6
3.1.5. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	9
4. Méthodes d'identification des bactéries lactiques.....	9
4.1. Analyse phénotypique.....	9
4.2. Méthodes moléculaires.....	10

Matériel et méthodes

I. Echantillonnage.....	11
II. Matériel et méthodes	11
1. Isolement des bactéries lactiques.....	11
1.1 Préparation de la solution mère et des dilutions.....	11
1.2 Isolement sur milieu MRS.....	12

2. Purification des souches isolées.....	13
3. Conservation des souches.....	13
4. Identification des souches.....	13
4.1 Pré-identification des isolats	13
a) L'aspect macroscopique	13
b) Test de catalase	13
c) L'aspect microscopique	13
4.2 Identification des souches sélectionnées	14
4.2.1 Caractérisation phénotypique des souches sélectionnées.....	14
➤ Croissance sur bouillon MRS	14
4.2.2 Tests physiologiques.....	14
a) Croissance à différentes températures	14
b) Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl	14
c) Croissance à pH 4 et 9,6	14
d) Thermorésistance.....	22
4.2.3 Tests biochimiques.....	22
a) Hydrolyse de l'Arginine (ADH)	22
b) Type fermentaire.....	22
c) Fermentation des sucres.....	16
4.2.4 La galerie API 50 CHL	16

Résultats et discussion

I. Pré-Identification des isolats.....	17
a) Aspect microscopique.....	17
b) Aspect macroscopique.....	17
c) Test de catalase.....	20
II. Identification des souches.....	20
II. 1.Caractérisation phénotypique des souches	20
II.2. Croissance à différentes conditions	20
II.2.1. Croissance à différentes températures.....	20
II.2.2. Croissance à différentes concentrations de NaCl.....	20
II.2.3. Croissance à différents pH.....	20

II. 3. Thermorésistance.....	22
II. 4. Tests biochimiques.....	22
II.4.1 Type fermentaire	22
II.4.2 Hydrolyse de l'Arginine (ADH)	23
II.4.3 Fermentation des sucres.....	23
II. 5. La galerie API 50 CHL (bio Mérieux)	26

Conclusion	30
------------------	----

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Les fromages traditionnels sont caractérisés par un lien fort avec leur terroir d'origine et attestent de l'histoire et de la culture de la communauté qui les produit. Chaque fromage traditionnel a des caractéristiques organoleptiques spécifiques. Ces caractéristiques sont liées à divers facteurs, comme l'environnement, le climat, la prairie naturelle, la race des animaux, l'utilisation de lait cru et de sa microflore naturelle (Licitra, 2010).

La microflore microbienne du lait cru, composée essentiellement de bactéries lactiques, participe de façon importante à l'élaboration des caractéristiques organoleptiques des produits laitiers fermentés (lait fermenté, fromage). Rehman *et al.* (2000) ont montré que les fromages au lait cru avaient un arôme plus intense et du goût plus fruités et piquants que des fromages au lait pasteurisé. Aussi Chammas *et al.* (2006) et Patrignani *et al.* (2006) ont signalé que les produits laitiers fabriqués traditionnellement à partir du lait cru ont des saveurs typiques et des qualités nutritionnelles de plus en plus recherchées par le consommateur. La flore lactique de ces produits, principalement les fromages, a fait l'objet de plusieurs études d'identification et de sélection dans le but d'enrichir d'autres produits laitiers.

Un fromage traditionnel contient un grand nombre de groupes bactériens qu'il importe de définir et de décrire tout au long de sa fabrication et de son affinage. Un grand nombre de fromages au lait cru sont fabriqués en Algérie mais la majorité d'entre eux sont peu connus c'est le cas du fromage traditionnel "Alatig", un fromage de terroir, connu dans la région de Boussaâda.

Alatig est un produit naturel sans ferment ni conservateur seulement la présure et du sel sont ajoutés, il est aromatisé par différentes herbes locales : « Chih » (*Armoise* ou *Artemisia vulgaris*) et « Tgouft » (*Artemisia campestris*), sa qualité microbiologique est globalement acceptable avec une flore lactique dominante au voisinage de 10⁸ UFC/g (Barache et Bouatmane., 2016).

De ce fait, ce travail a pour objectif d'identifier des bactéries lactiques isolées du fromage artisanal « Alatig » collectés de la région de Boussaâda.

Pour cela notre recherche a consisté dans une première partie dite synthèse bibliographique a rappelé les caractéristiques des bactéries lactiques ainsi que les différents groupes, puis une partie pratique où nous exposons les analyses effectuées et les résultats obtenus.

Synthèse

Bibliographique

1. Définition et caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène (Badis *et al.*, 2005). Elles peuvent avoir différentes formes: sphériques (*Streptococcus* et *Lactococcus...*), en bâtonnets (*Lactobacillus*) ou encore ovoïdes (*Leuconostoc*) (Luquetf et Corrieu, 2005; Galvez *et al.*, 2011).

Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont asporulée, aéro anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à un pH de 4,5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme (Salminen *et al.*, 2004; Konig et Frohlich, 2009 ; Pringsulka *et al.*, 2011).

Les LAB ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio *et al.*, 1994 ; Hogg, 2005).

Elles sont considérées comme non pathogènes et se voient attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe) (Adams et Marteau, 1995 ; Aguirre et Collins, 1993). Cependant, quelques membres du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* ainsi que d'autres bactéries lactiques sont considérées comme pathogènes opportunistes (Aguirre et Collins 1993).

2. Habitat et origine

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux ou des aliments.

Elles se développent avec les levures dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Leveau et Buix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001).

3. Classification des bactéries lactiques

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (6,5%, 18%), la tolérance aux pH

acides, alcalins et à l'éthanol, la configuration de l'acide lactique produit à partir de glucose , l'hydrolyse de l'arginine ... etc .

Les marqueurs chimio-taxonomiques comme la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire peuvent aussi être utiles dans la classification (Konig et Frohlich, 2009).

L'identification des espèces de bactéries lactiques peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates à l'aide du système API50CH (Curk et al. ,1993).

Selon la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilli et l'ordre des *Lactobacillales* renfermant trente cinq genres répartis sur six familles (**figure 01 annexe 1**).

Parmi ces genres , seulement treize sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de : *Aerococcus* , *Carnobacterium* , *Enterococcus* , *Lactobacillus* , *Lactococcus* , *Leuconostoc* , *Oenococcus* , *Pediococcus* , *Streptococcus* , *Vagococcus* , *Tetragenococcus* , *Weissella* (Drider et Privost,2009) et *Bifidobacterium* (Leveau et Bouix, 1993).

La différenciation entre ces genres est basée sur des critères physiologiques, biochimiques et morphologiques regroupés dans le **tableau I (annexe 2)**.

3.1. Classification des principaux genres utilisés en biotechnologie alimentaire

3.1.1. Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Vagococcus*.

Les différentes espèces appartenant à ces genres étaient, il y a encore peu de temps, regroupées en un seul genre qui est *Streptococcus*. Ce genre regroupe de nombreuses bactéries en forme de coques et ayant pour principales caractéristiques : asporogènes, catalase-, Gram+. La présence dans leur enveloppe d'antigène spécifique a été d'une grande utilité dans leur identification et leur classification par groupes sérologiques de Lancefield (1933) (Collins et al., 1987 ; Kandler & Weiss , 1986).

Schleifer & Kilpper-Balz (1987) ont proposé de subdiviser le genre *Streptococcus* en 4 genres. Il s'agit de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* et *Enterococcus*.

Le genre *Streptococcus sensu stricto* comprend la majorité des espèces et en particulier :

- Le groupe pyogènes: comprend 5 espèces α et/ou β hémolytique, pathogènes pour l'homme et/ou les animaux.
- Le groupe oralis comprend : *Sc. viridans* , *Sc. mitior* , *Sc. intermedius* , *Sc. Pneumoniae* souvent α hémolytiques pathogènes opportunistes.

- Le groupe des autres streptocoques et en particulier *Sc. salivarius* qui est étroitement apparenté à *Sc. thermophilus*. C'est la raison pour laquelle Farrow & Collins, (1984) proposent de considérer *Sc. thermophilus* comme sous espèce de *Sc. salivarius*. Cette proposition était renforcée par les résultats d'étude de l'hybridation ADN / ADN (Axelsson , 1998).

Le groupe des Lactocoques correspond au streptocoques mésophiles de la flore lactique. En dehors des cinq espèces actuellement reconnues seule l'espèce *Lactococcus lactis* est utilisée en industrie laitière. Cependant pour l'espèce *Lactococcus lactis* trois sous espèces ont été attribuées : *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Seules les deux premières *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* sont importantes dans l'industrie laitière (Axelsson , 1998).

La capacité des lactocoques à croître à une température de 10°C et pas à 45°C est une caractéristique qui les distingue des autres *Enterococcus* des *Streptococcus*. La plupart des lactocoques réagissent avec les anti-sérums du groupe N (Desmazeaud, 1992).

Schleifer & Kilpper-Bälz (1987) ont proposé de transférer certaines espèces du genre *Streptococcus* dans le nouveau genre : *Enterococcus*. Il s'agit de *Streptococcus faecalis*, et *Streptococcus faecium*, qui sont devenues ainsi *Enterococcus faecalis* (espèce type), et *Enterococcus faecium* (Leclerc *et al.*, 1996).

Enfin, les traits phénotypiques caractéristiques des *Enterococcus* (croissance entre 10°C et 45°C, en présence 6,5% de NaCl et à pH 9,2) ont été confirmés par des études sur l'hybridation ADN/ADN et sur le catalogue de ARNr.16s (Gasser *et al.*, 1994) .

Le troisième groupe des Streptocoques, regroupant des coques présentant une ciliature péritriche, a été désigné sous les noms de "streptocoques lactiques mobiles" ou de "streptocoques mobiles du groupe N" ou de "lactocoques mobiles" ou de "souches apparentées à *Lactococcus lactis*". L'étude de la séquence de l'ARNr 16S a permis à Collins *et al.*, (1990) de placer ces coques mobiles dans un nouveau genre, le genre *Vagococcus*, phylogénétiquement proche des genres *Enterococcus* et *Carnobacterium*. Initialement, le genre *Vagococcus* comprenait une seule espèce, *Vagococcus fluvialis*. Ultérieurement, cinq nouvelles espèces ont été incluses dans ce genre sur la base d'études phylogénétiques et/ou des hybridations ADN/ADN : *Vagococcus carniphilus*, *Vagococcus elongatus*, *Vagococcus fessus*, *Vagococcus lutrae* et *Vagococcus salmoninarum* (Aguirre et Collins, 1992).

Les souches mobiles de *Vagococcus ssp* se différencient des entérocoques mobiles

(*Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus flavescens*, *Enterococcus gallinarum*) par leur incapacité à acidifier le L-arabinose et le raffinose. Les espèces de ce genre récemment décrites se confondent facilement avec les lactocoques et se distinguent principalement par leur composition en acides gras et leur mobilité (Collins *et al.*, 1990).

3.1.2. Les genres *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les pediocoques sont formés de cellules groupées en paires ou en tétrades. Il s'agit de bactéries microaérophiles, leur métabolisme homofermentaire produit principalement de l'acide DL lactique, bien que l'acide L (+) lactique prédomine (Garvie, 1986 ; Deroissard, 1994 ; Holt *et al.*, 1994).

L'étude de la composition en bases de l'ADN, montre que les pediocoques ont un GC% compris entre 37,8% - 41,2% contre 42,0 - 43,2% pour les streptocoques. D'autre part la nature du peptidoglycane constitue un critère important qui distingue le genre *Pediococcus* du genre *Streptococcus*. Actuellement, les tests immunologiques sont d'une grande importance, ils sont utilisés pour trancher entre les différentes espèces de deux genres. Les espèces se différencient par leur tolérance à la température, au pH et au NaCl et par leur spectre fermentaire. Les différentes espèces du genre *Pediococcus* sont présentes dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons : bière, cidre et vin. *P. pentasaceus* avec *P. acidilactici* sont bien représentées dans les matières végétales mais peuvent aussi être trouvées dans le lait et les produits laitiers (Simpson et Taguchi 1995).

Le genre *Aerococcus* a été proposé en 1953 pour classer des coques à Gram positif, catalase négative, aéro-anaérobies, se différenciant des streptocoques par son mode de groupement. Les souches d'*Aerococcus ssp* se présentent sous la forme de coques à Gram positif, immobiles, groupés en tétrades ou en amas. *Aerococcus viridans* est souvent considérée comme un simple contaminant de l'air et cette bactérie est également présente dans divers prélèvements : eau douce et eau de mer, sol, sédiments marins, végétaux, produits d'origine animale (Vela *et al.*, 2007).

Le genre *Tetragenococcus* regroupe des souches étroitement apparentées à l'espèce *Pediococcus halophilus*. Une seule espèce a été récemment reconnue, il s'agit de *Tetragenococcus halophilus* (Collins *et al.*, 1990).

Il a été démontré, qu'en plus de leur tolérance extrême au sel (>18% de NaCl), qui les distingue des autres bactéries lactiques ; *Tetragenococcus* a besoin de sel pour sa croissance, généralement 5% de NaCl, c'est la raison pour laquelle cette espèce s'est avérée très

importante dans la fabrication des produits fermentés et surtout ceux contenant une concentration élevée en sel (Garvie, 1986).

3.1.3. Le genre *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Les cellules de *Leuconostoc* sont des coques en paires ou en chaînes comme les streptocoques mais les *Leuconostoc* sont des bactéries hétérofermentaires produisant de l'acide D (-) lactique, de l'éthanol et du CO₂. Des études phylogénétiques, basées sur les séquences des ARNr 16S et 23S, ont montré que les espèces du genre *Leuconostoc* sont hétérogènes et peuvent être divisées en trois groupes : un groupe comprenant *Leuconostoc paramesenteroides*, un groupe formé par *Leuconostoc oeni* (actuellement reclassé dans le genre *Oenococcus*) et un groupe rassemblant *Leuconostoc mesenteroides* (espèce type du genre) ainsi que les autres espèces du genre *Leuconostoc*. Ces études révélaient également que cinq espèces hétérofermentaires du genre *Lactobacillus* (*Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor* et *Lactobacillus viridescens*) étaient apparentées à *Leuconostoc paramesenteroides* (Martinez- Muracia et Collins, 1990).

En 1993, Collins *et al.*, réalisent une étude taxonomique sur des souches bactériennes ressemblant à des *Leuconostoc ssp.* et isolées de saucissons secs fabriqués en Grèce. L'étude des séquences des ARNr 16S a permis de classer ces souches dans le groupe constitué par *Leuconostoc paramesenteroides* et les cinq espèces de lactobacilles hétérofermentaires. En se basant sur les résultats de leur étude et sur les résultats des études antérieures, Collins *et al.* (1990) transfèrent l'ensemble de ces espèces dans le nouveau genre *Weissella* et ils proposent la création de six nouvelles combinaisons (*Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella kandleri*, *Weissella minor*, *Weissella viridescens* et *Weissella paramesenteroides*) pour reclasser *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor*, *Lactobacillus viridescens* et *Leuconostoc paramesenteroides* ainsi que la création d'une nouvelle espèce (*Weissella hellenica*) pour les souches isolées de saucissons grecs (Walter *et al.*, 2001).

Les espèces du genre *Weissella* sont constituées de courts bacilles ou de coccobacilles ou des coques ovoïdes, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés, immobiles, possédant un peptidoglycane du type A3 alpha, catalase négative (Walter *et al.*, 2001).

3.1.4. Le genre *Lactobacillus* et *Carnobacterium*

Les lactobacilles et les *Carnobacterium* sont des bactéries Gram+, polymorphes

asporogènes, non pigmentées, immobiles (sauf *Lb. agilis*), catalase-, nitrate réductase -, gélatinase -, leur morphologie va de cocci plus ou moins allongés à des formes longues, ce qui les rend parfois difficile à les distinguer des *Leuconostoc*. Leur GC% varie de 32 à 53% (Axelsson, 1998).

Quant à leur classification, la division du genre *Lactobacillus* en trois sous genres, *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium*, a été proposé pour la première fois par Orla Jensen (1919). Cette classification tenait compte essentiellement de la répartition des voies de fermentation chez ces bactéries.

Cette classification des sous genres a disparue de l'édition du *Bergey's manuel* (Kandler & Weiss, 1986). Cette même classification a été reprise, mais sous une forme numérotée. Ainsi, on distingue dans le tableau 02 trois groupes de Lactobacilles classées en fonction de leurs caractéristiques fermentaires (Schleifer, & Ludwig 1995 ; Axellsson, 1998).

a) Les Lactobacilles homofermentaires stricts (ancien sous-genre : *Thermobacterium*) qui utilisent le glucose grâce à la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas. Leur seul produit final à partir du glucose est l'acide lactique (D ou L). Ils ne métabolisent pas les pentoses et ne dégagent pas le CO₂ lors de la fermentation du glucose.

b) Les *Lactobacillus* hétérofermentaires facultatifs (ancien sous-genre : *Streptobacterium*) peuvent changer de voie en fonction du substrat. Ils métabolisent le glucose en acide lactique grâce à la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas et dégradent les pentoses par la voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose, mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate.

c) Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts (ancien sous-genre : *Betabacterium*) qui fermentent le glucose en acide lactique, CO₂ et acide acétique ou éthanol via la voie hétérofermentaire. Ces bactéries produisent du CO₂ lors de la fermentation du glucose et du gluconate. La production de l'acide lactique est d'environ 50% avec des quantités importantes en acide acétique, éthanol et CO₂.

Tableau II : Classification des groupes du genre *Lactobacillus* .

Caractères	Groupe I Homofermentaires Strict	Groupe II Hétérofermentaires facultatifs	Groupe III Hétérofermentaires strict
Fermentation des pentoses	-	+	+
Glucose (production de CO ₂)	-	-	+
Gluconate (production de CO ₂)	-	+	+
FDP aldolase	+	+	-
Phosphocétolase	-	+	+
Espèces	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbruekii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sake</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i>

(Axellsson, 1998).

Le genre *Carnobacterium* est constitué de bacilles minces, droits ou légèrement incurvés, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou parfois en courtes chaînes. Il est non sporulé, mobile ou immobile, aéro-anaérobie facultatif, catalase négative, oxydase négative, nitrate réductase négative, à métabolisme fermentatif (production d'acide lactique). Les *Carnobacterium* sont incapables de croître sur des milieux à base d'acétate, ne peuvent pas croître ni en présence de 8 % NaCl ni à 45°C et peuvent croître à 10°C et parfois à 0°C. Il est difficile de distinguer le genre *Carnobacterium* du genre *Lactobacillus*. On peut noter que les *Carnobacterium ssp.* ne se développent pas sur les milieux à l'acétate de Rogosa et sont capables de se développer à des pH plus élevés que ceux des *Lactobacillus ssp.* (Croissance possible jusqu'à pH 9,1). Ils sont parfois mobiles (*Cb. alterfunditum*, *Cb. funditum*, *Cb. inhibens* et *Cb. mobile*), et produisent principalement de l'acide L-lactique. Leur principal acide gras est l'acide oléique et leur peptidoglycane est du type A1 gamma. (Collins *et al.*, 1987).

En 1991, le genre *Carnobacterium* s'est enrichi de deux espèces (*Cb. funditum* et *Cb. alterfunditum*) (Franzmann *et al.*, 1991). Jôborn *et al.*, (1999) ont proposé l'espèce *Cb. Inhibens* pour identifier une souche isolée du tube digestif d'un saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*), en se basant sur l'analyse de la séquence des ARNr 16S et des caractères phénotypiques. La nomenclature de *Cb. viridans* a été publiée pour trois souches isolées d'une sauce bolonaise emballée sous vide (Holley *et al.*, 2002).

3.1.5. Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro intestinal. Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, le fructose - 6- phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson *et al.*, 2004 ; Pilet *et al.*, 2005 ; Ho *et al.*, 2007)

4. Méthodes d'identification des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont de nombreuses propriétés métaboliques dont les industriels et les nutritionnistes cherchent à exploiter. Ces propriétés (technologiques, sensorielles, antimicrobiennes ou probiotiques) sont spécifiques de l'espèce ou de la souche bactérienne, ce qui implique qu'on puisse les mettre en évidence par des techniques d'identification et de différenciation.

4.1 Analyse phénotypique

Les tests traditionnels phénotypiques constituent la base de description et de différenciation des bactéries lactiques. Différents tests clefs sont largement adoptés. La morphologie ainsi que les méthodes physiologiques, métaboliques/biochimiques et chimiotaxonomiques sont les plus utilisées. Les méthodes physiologiques incluent, principalement, la croissance à certaines températures et à certaines concentrations de sel.

Les méthodes métaboliques ou biochimiques incluent, principalement, la production de gaz à partir de glucose (Sperber et Swan, 1976), le profil d'hydrolyse des sucres, l'hydrolyse de l'arginine (Montel et Champomier, 1987) et la détermination de la configuration de l'acide lactique (Gutmann et Wahlfeld, 1974).

Schillinger et Lucke (1987) ont été les premiers à proposer une clef d'identification des bactéries lactiques basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques et

biochimiques typiques des différentes espèces. Néanmoins cette clef permettait uniquement d'orienter l'identification et non une identification précise. Elle différenciait aussi entre *Lactobacillus carnis* et *Lactobacillus piscicola* alors que ces microorganismes ont été génétiquement désignés comme *Cb. maltaromaticum* (ex. *Cb. Piscicola*) (Collins *et al.*, 1987). Montel *et al.*, (1991) ont proposé par la suite une simple clef pour l'identification des *Lactobacillus* et *Carnobacterium* homofermentaires (figure 2 annexe 2). Cette clef, basée sur des tests biochimiques, physiologiques et chimiotaxonomiques mentionnés précédemment, a été vérifiée par hybridation ADN/ADN et reste encore valable, si ce n'est le fait que *Lactobacillus viridescens* et *Lactobacillus halotolerans* ont été reclassés dans un autre genre, en l'occurrence *Weissella* (Collins *et al.*, 1993). Aussi, *Cb. piscicola* a été reclassé comme *Cb. maltaromaticum* (Mora *et al.*, 2003).

4.2 Méthodes moléculaires:

Les méthodes modernes d'identification des bactéries lactiques font appel à l'étude des constituants des cellules.

Le séquençage de l'ARN 16S reste une des méthodes les plus appliqués pour obtenir une identification précise en complément des méthodes classiques.

Pour la différenciation intraspécifique, les différentes méthodes moléculaires, comme composition en base de l'ADN : G+C%, l'hybridation ADN/ARN et ADN/ADN, l'analyse des fragments de restriction de l'ADN par l'électrophorèse en champ pulse (R-ECP), les profils protéiques par SDS-PAGE, sont généralement couplées et permettent l'analyse de la biodiversité des isolats dans un écosystème donné.

Matériel et méthodes

Notre étude a porté sur une durée de 3 mois du 12 Mars au 1 Juin, réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie 1 (Bloc 09) de la faculté des sciences de la nature et de la vie, de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia.

I. Echantillonnage

Le 11 Mars 2017, le fromage artisanal (Alatig) a été collecté à partir d'une ferme appelée « laiterie et fromagerie de Kardada » (كردادة أجبان و ألبان) dans la campagne de Boussaâda. Un échantillon de 1 kg a été récupéré et transporté dans une glacière, puis conservé à 4°C.

II. Matériel et méthodes

1. Isolement des bactéries lactiques

1.1 Préparation de la solution mère et des dilutions

10g du fromage Alatig ont été dissous et homogénéisé dans 90 ml d'eau physiologique stérile, cette suspension dite solution mère (SM) correspond à la dilution 10^{-1} (Lebres, 2002), a partir de cette solution, des dilutions décimales allant jusqu'à 10^{-8} ont été préparées (**figure 3**)



Figure 3: Préparation des dilutions décimales

1.2 Isolement sur milieu MRS

Une goutte à été prélevée de la solution mère et ensemencé par étalement sur gélose MRS (pH 5,4 et pH 5,6), de la même façon on a ensemencé la gélose M17 (Institut pasteur Algérie).

Une goutte de la dilution 10^{-1} à été prélevée et ensemencée en strie sur gélose MRS (Liofilchem, Italy), à raison de deux boites par dilution (une boite gélose MRS à pH 5,4 et l'autre boite gélose MRS à pH 6,5), puis incubé pendant 48h à 30°C (Kacem et Karam, 2006, Cheriguene et *al.*, 2007).

La même méthode d'isolement à été adoptée pour le reste des dilutions, ainsi sur gélose M17.

(Figure 4).

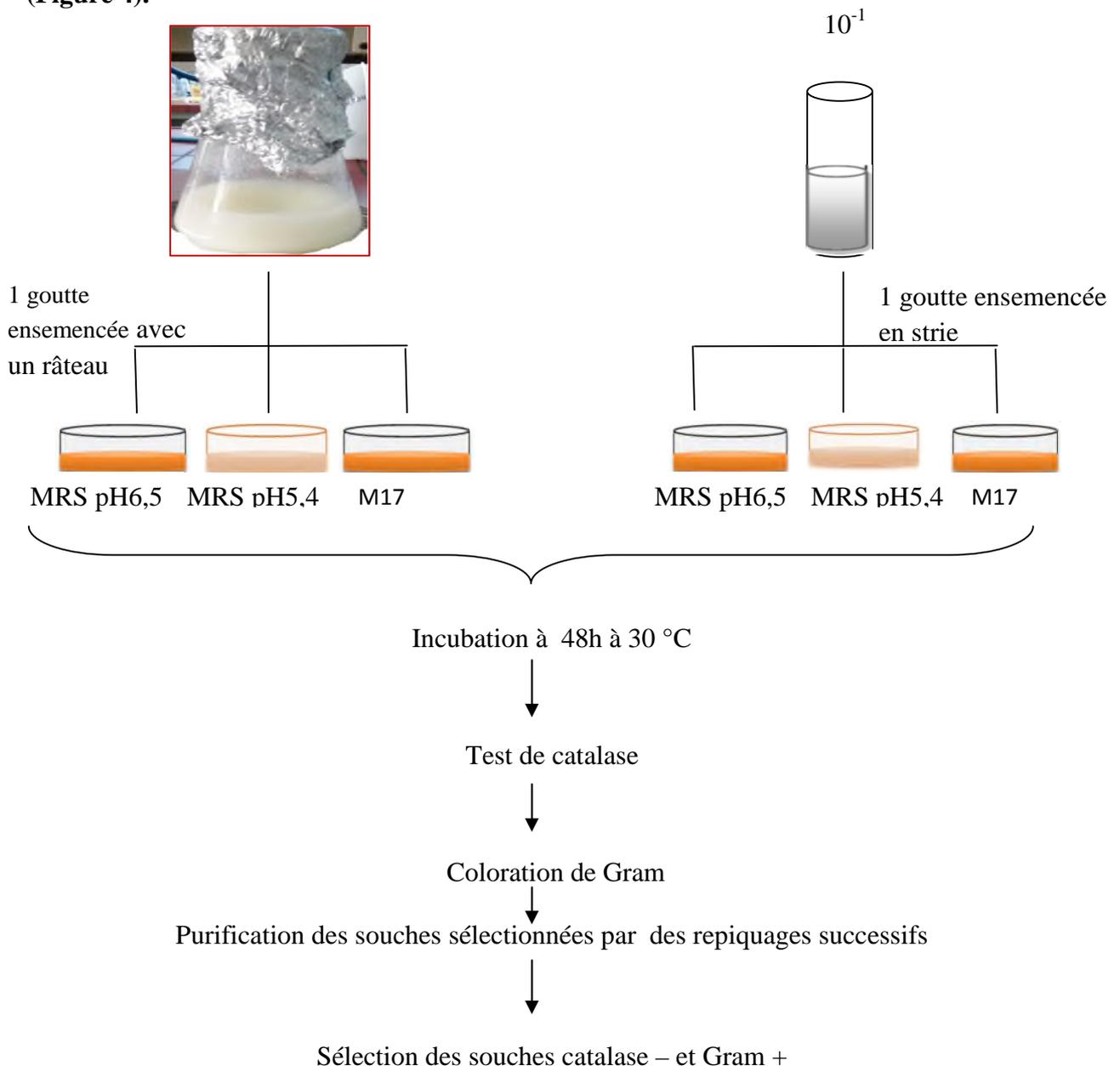


Figure 4: Protocole adapté de l'isolement jusqu'à la purification des souches.

2. Purification des souches isolées

La purification des souches isolées a été réalisée par repiquages successifs sur gélose MRS et M17 par la méthode des stries. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 48h (Kacem et Karam, 2006, Cheriguene et *al.*, 2007).

La pureté des souches est révélée par la présence sur gélose de colonies homogènes ayant le même aspect, la même couleur, la même taille et la même forme (Guiraud, 2004).

La coloration de Gram a été faite pour confirmer la pureté des souches.

Les souches à Gram + et catalase - sont retenues pour la suite de l'étude.

3. Conservation des souches

La conservation a été réalisée à 4°C sur bouillon MRS (Biokar, France), et bouillon M17 dans des eppendorfs stériles.

4. Identification des souches

4.1 Pré-identification des isolats

a) L'aspect macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation de la culture des isolats sur gélose MRS et M17 pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies (Badis *et al.*, 2005)

b) Test de catalase

La catalase permet la décomposition de l'eau oxygénée selon la réaction :



L'activité catalasique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en déposant une à deux colonies de l'isolat de la souche à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée (Guiraud, 2003).

Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) des autres bactéries.

c) L'aspect microscopique

L'aspect microscopique est révélé par la coloration Gram qui a pour but de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif et d'observer la forme et le mode de regroupement.

4.2 Identification des souches sélectionnées

L'identification a été établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : température de croissance, production de gaz carbonique, croissance dans les milieux hostiles, fermentation de divers sucres et hydrolyse de l'arginine.

4.2.1 Caractérisation phénotypique des souches sélectionnées

➤ Croissance sur bouillon MRS et M17

Un tube stérile contenant 10ml du bouillon MRS à été inoculé par une colonie isolée sur gélose MRS, de même un tube stérile contenant 10ml du bouillon M17 à été inoculé par une colonie isolée sur gélose M17 puis incubé à 30°C pendant 24 à 48 heures, jusqu'à l'apparition d'un trouble bactérien (Attallah et belyagoubi, 2003).

4.2.2 Tests physiologiques

a) Croissance à différentes températures

Ce test est important de point de vue taxonomique, car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermotolérant, il a été réalisé après inoculation du bouillon MRS par des cultures fraîches, les cultures ont été incubés à différentes températures 15, 30, 37 et 44°C.

La croissance est révélée par un trouble du milieu après 24 à 48 heures en comparaison avec un témoin non ensemencé (Guiraud et Galzy, 1980).

b) Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl

Des eppendorf stérile ont été ensemencés avec du bouillon MRS à 2 %, 4%, 6.5% et 10 % de NaCl, l'incubation a été faite à 30°C pendant 24 heures (Guiraud et Galzy, 1980).

La croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin non ensemencé.

c) Croissance à pH 4 et 9,6

Ce test a été réalisé sur bouillon MRS, dont le pH est ajusté à 4 et 9,6, et cela en ensemencant un eppendorf stérile contenant 1ml du bouillon MRS à pH voulue avec une colonie prise de la gélose MRS.

La croissance se traduit par un trouble du milieu après 24 à 48 heures à 30°C (Guiraud et Galzy, 1980).

d) Thermorésistance

Le test de thermorésistance permet de sélectionner des espèces thermorésistantes. Les souches à tester ont été préalablement réparties dans des tubes stériles contenant du bouillon MRS. Ces tubes ont été par la suite exposés à une température de 62°C pendant 30 min puis refroidis rapidement sous un jet d'eau de robinet, l'incubation a été faite à 30°C pendant 48 heures (Guiraud et Galzy, 1980).

4.2.3 Tests biochimique**a) Hydrolyse de l'Arginine (ADH)**

La mise en évidence de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Le rôle de cette enzyme est de libérer l'ammoniac à partir de l'arginine.

Des eppendorf stérile contenant 1ml du milieu de Möeller à l'arginine (Institut Pasteur, Algérie) et 0.5ml de bouillon MRS ; pour démarrer la croissance des souches ; et un témoin T; le milieu Moeller témoin (Institut Pasteur, Algérie) ont été inoculés avec une colonie d'une culture de 24h, dans des eppendorf stérile, superposer chaque eppendorf inoculé avec une fine couche de d'huile de paraffine stérile, le tout a été incubé à 30°C pendant 6 jours à raison d'une lecture chaque 24h.

Le milieu de Möeller à l'arginine contient un indicateur de pH, le bleu de bromocrésol, un résultat positif se traduit par une couleur mauve à jaune pâle-violet, tandis qu'un résultat négatif se traduit par un virage au jaune vif, le tube témoin vire au jaune et garde la couleur (Moller, 1955).

b) Type fermentaire

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires.

Il consiste à mettre en évidence la production du gaz (CO₂). Des souches fraîches préalablement cultivées sur gélose MRS ont étéensemencées dans des tubes stériles contenant du bouillon MRS sans citrate (Biokar, France) et une cloche de Durham. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 24–48 heures.

Les souches homofermentaires produisent l'acide lactique à partir du glucose, par contre les souches hétérofermentaires produisent l'acide lactique et le CO₂ à proportions égales (Guiraud, 2003).

c) Fermentation des sucres

Les bactéries lactiques dégradent différemment les sources de carbone. L'étude de la fermentation des sucres est réalisée sur le bouillon MRS modifié (sans glucose et sans extrait de viande), additionné de rouge phénol comme indicateur de pH, le glucose du milieu est remplacé par le sucre à tester à raison de 0,1 (g/l) (Leveau et *al.*, 1991).

Neuf sucres ont été testés dont : l'Arabinose, le Glucose, le Maltose, le Mannose, le Sorbitol, le Mannitol, le Fructose, l'Adonitol et le Cellobiose.

Pour ce test 6 microplaques stériles ont été utilisées, chaque microplaque stérile contient 96 puits dont 12 colonnes et 8 lignes chacune.

La répartition des sucres à tester dans chaque colonne a été comme suit :

1 ^{ère} colonne : Glucose	7 ^{ème} colonne : Maltose
2 ^{ème} colonne : Arabinose	8 ^{ème} colonne : Adonitol
3 ^{ème} colonne : Mannose	9 ^{ème} colonne : Cellobiose
4 ^{ème} colonne : Mannitol	10 ^{ème} colonne : Témoin (Bouillon MRS sans sucre + la souche a testé)
5 ^{ème} colonne : Sorbitol	
6 ^{ème} colonne: Fructose	

Une couche d'huile de paraffine stérile (BIOCHEM chemopharma, France) à été ajoutée.

Après ensemencement des microplaques un résultat positif se traduit par un virage de l'indicateur coloré vers le jaune.

4.2.4 La galerie API 50 CHL

La galerie API 50 CHL (bioMérieux, France) est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

Une suspension bactérienne à été préparée en inoculant une à deux colonies dans un éppendorf stériles contenant 1ml du bouillon MRS sans sucre.

Chaque microtube a été inoculé avec une suspension bactérienne, puis couvert par une fine couche de l'huile de paraffine stérile, l'incubation à été faite à 30 °C pendant 48 heures à raison de deux lectures la première à 24h et la seconde à 48h.

Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide révélée par virage au jaune du milieu.

Résultats et discussion

I. Pré-Identification des isolats

Cent-trente souches de bactéries ont été isolées sur gélose MRS et M17 à partir du fromage artisanal « Alatig », seule les bactéries Gram (+) et catalase (-) ont été retenues.

La purification des souches isolées, nous a permis d'avoir cent souches pures (cinquante sur gélose MRS et cinquante sur gélose M17), chaque souche présente des colonies de la même couleur, la même taille et la même forme.

Note : les cinquante souches isolées sur gélose M17 non pas fait l'objet de cette étude par faute de temps.

A) Aspect macroscopique

Les souches pures donnent sur gélose MRS des colonies de tailles variables avec une couleur blanchâtre ou laiteuse, de 2 à 3 mm de diamètre (**Figure 5**).



Figure 5: Aspect des colonies de bactéries lactiques sur le milieu MRS pH 5,4

B) Test de catalase

Toutes les souches isolées ne représentaient pas d'effervescence lors de l'ajout d'une goutte de H₂O₂, ce qui s'explique par le fait que ces bactéries ne possèdent pas d'activité catalasique.

C) Aspect microscopique

Après une coloration de Gram, l'aspect microscopique des souches a révélé deux formes de cellules : coques et bâtonnets (**figure 6**), dont 33% sont des coques (regroupées en diplocoque, chainettes, et en amas), et 67% sont des bacilles (sous forme de cellules individuelles, groupés en chainettes ou en amas (**Figure 7**).

Les résultats de l'examen microscopique des 50 souches sont illustrés dans le **tableau II**.

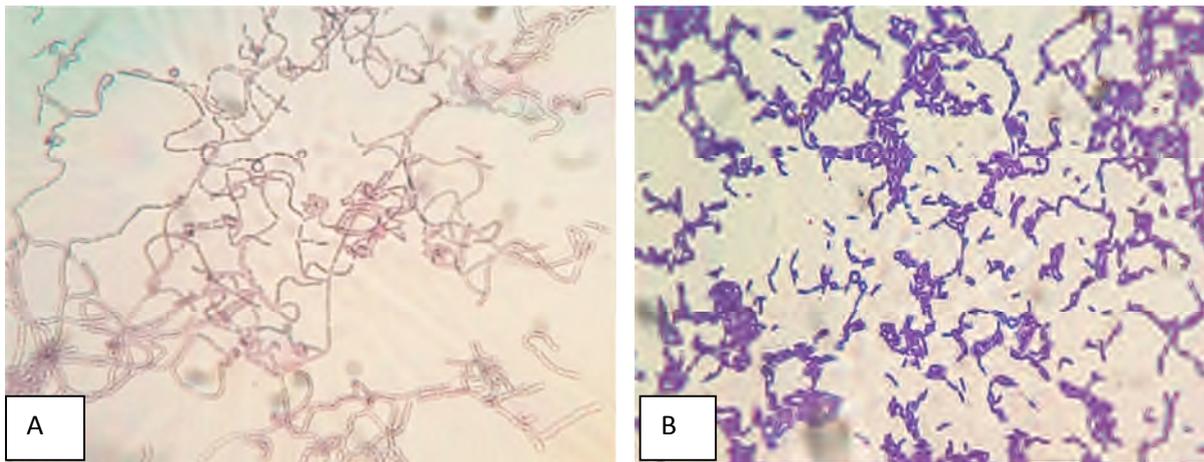


Figure 6 : Aspect microscopique de quelques souches isolées : de longs bacilles en chaînette (A), de coco bacille (B) (coloration de Gram) (G× 100) (ZEISS, West Germany).

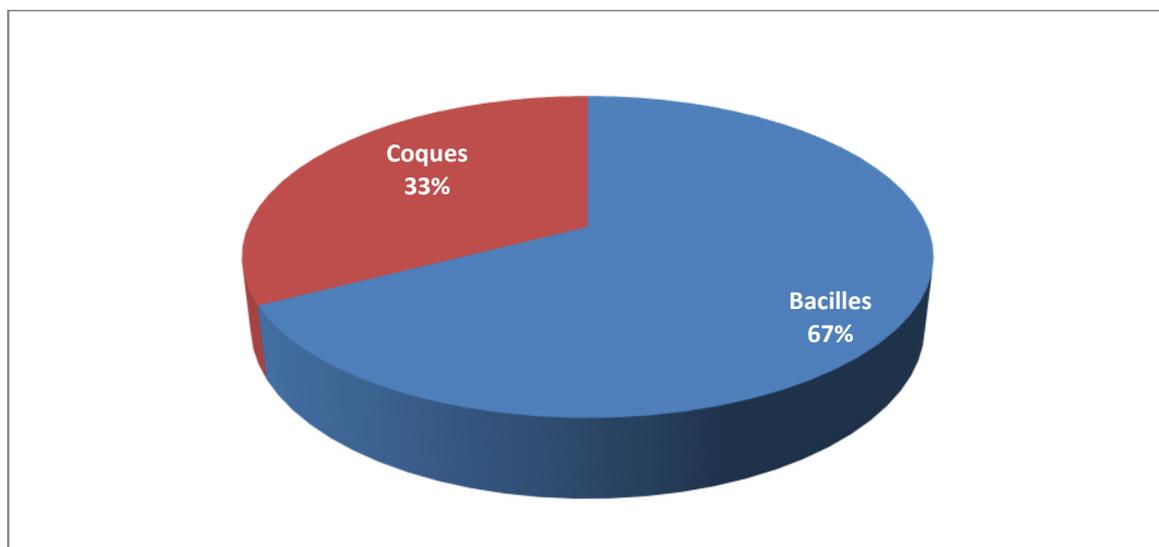


Figure 7: Distribution du pourcentage des isolats lactiques (%)

Tableau II : Morphologie des souches lactiques étudiées

Morphologie	pH du milieu d'isolement	Souche	Mode de regroupement
Bacille	5,4	S1	En paire et en chaînette
		S2	En chaînette et en amas
		S3	En chaînette et en amas
		S4	En chaînette et en amas
		S5	En chaînette et en amas
		S6	En chaînette et en amas
		S7	En chaînette et en amas
		S8	Ovoïde allogée dans la direction de la chaîne
		S9	En paire et en courte chaîne
		S10	En paire et en courte chaîne
		S11	En paire et en courte chaîne

Bacille	5,4	S12	En chaînette et en amas	
		S13	Individuel et en chaînette	
		S14	En paire et en courte chaîne	
		S25	En paire et en chaînette	
		S26	En paire et en courte chaîne	
		S27	En paire et en courte chaîne	
		S28	En paire et en courte chaîne	
		S29	En chaînette et en amas	
		S30	En chaînette et en amas	
		6,5	S21	En chaînette et en amas
S22	En chaînette et en amas			
S23	En paire et en courte chaîne			
S24	En paire et en chaînette			
S38	En paire et en courte chaîne			
S39	Individuel, en paire et en courte chaîne			
S40	Individuel, en paire et en courte chaîne			
S41	En courte chaîne			
S42	En paire et en courte chaîne			
S43	En paire et en courte chaîne			
S44	En paire et en courte chaîne			
Cocci	5,4		S21	En chaînette et en amas
			S22	En chaînette et en amas
			S23	En paire et en courte chaîne
		S24	En paire et en chaînette	
		S45	En paire et en courte chaîne	
		S46	En paire et en chaînette	
		S47	En paire et en chaînette	
		S48	Allongée en paire, en courte chaîne et en petits groupes	
		S49	En paire et en chaînette	
		S50	En paire et en chaînette	
	5,4	S15	En courte chaîne	
		S16	En paire et en chaînette	
		S17	En paire et en chaînette	
		S18	En paire et en courte chaîne	
		S19	En paire et en chaînette	
		S20	En courte chaîne	
		S31	En courte chaîne	
		S32	En paire et en courte chaîne	
S33	En paire et en courte chaîne			
S34	En paire et en chaînette			
S35	En paire et en courte chaîne			
S36	En paire et en courte chaîne			
S37	En paire et en chaînette			

(Suite)

II. Identification des souches

II.1. Caractérisation phénotypique des souches

La croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble homogène dans le milieu MRS liquide, ce trouble est concentré au fond du tube à la recherche des conditions anaérobiques (Figure 8).



Figure 8: Aspect d'une culture pure dans le bouillon MRS.

II.2. Croissance à différentes conditions

II.2.1 Croissance à différentes températures

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches isolées poussent à 30°C. Cependant, 72% des souches poussent à 15 °C, 96% poussent à 37°C et 72% poussent à 44°C.

Néanmoins, 42% des souches ont une large gamme de température de croissance, elles poussent à 15 °C, 30°C, 37 °C, 44°C. (Tableau III).

II.2.2 Croissance à différentes concentrations de NaCl

Les résultats obtenus ont montré que 84% des souches isolées poussent à 2% de NaCl. Cependant, 64% des souches poussent à 4% et 6,5%. Néanmoins, 70% des souches poussent à 10% de NaCl.

26% des souches ont une large gamme de croissance à différentes concentrations de NaCl, elles poussent à 2%, 4%, 6,5%, 10% (Tableau III).

II.2.3 Croissance à différents pH

92% des souches poussent à pH acide (pH= 4), à l'exception des souches suivantes S15, S17, S22, S33, S34, S45, tandis qu'à pH basique (pH= 9,6) , 72% des souches poussent sauf les souches S1, S8, S13, S19, S23, S24, S25, S33, S37, S38, S47, S48, S50 (Tableau III).

Tableau III : Résultats des tests physiologiques

Teste Souches	Croissance a différente températures				Croissance a différente concentration de NaCl				Croissance a différent pH	
	15°C	30°C	37°C	44°C	2%	4%	6,5%	10%	4	9,6
S1	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
S2	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+
S3	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+
S4	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+
S5	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+
S6	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+
S7	-	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+
S8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
S9	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
S10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S11	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
S12	-	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+
S13	+	+	-	+	+	+/-	+	+	+	+/-
S14	+	+	+	-	+/-	+/-	-	+	+	+
S15	+	+	+	+	+	+/-	+	+	-	+
S16	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+
S17	+	+	+	+	-	+/-	-	+	-	-
S18	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
S19	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+/-
S20	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
S21	-	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+
S22	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-	+
S23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S24	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
S25	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
S26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S27	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S29	-	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+
S30	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+
S31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S32	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
S33	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
S34	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
S35	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S36	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+
S37	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
S38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S39	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
S40	+	+	+	-	+	+/-	+	+	+	+
S41	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S42	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+/-
S43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S44	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
S45	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
S46	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
S47	+	+	+	-	+/-	+	+	+	+	-

S48	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	-
S49	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S50	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-

+ : test positif ; - : test négatif ; ± : résultat intermédiaire

II. 3. Thermorésistance

Après exposition à une température de 62°C pendant 30 min suivie d’une incubation de 48h, uniquement 6 souches (S17, S20, S34, S37, S47 et S49) ont révélée un résultat positif (figure 9).

Les résultats montrent que ces 6 souches sont des souches thermorésistantes, contrairement au reste des souches qui ne possèdent pas ce caractère.

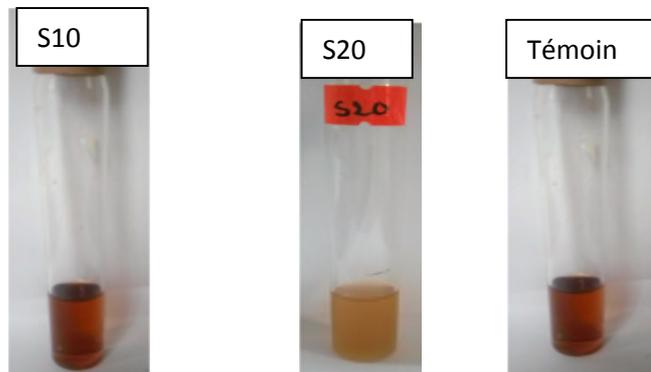


Figure 9 : Résultats du test de thermorésistance des souches S20, S10.

II. 4. Tests biochimiques

II.4.1 Type fermentaire

La majorité des bactéries isolées ne produisent pas de gaz lors de la fermentation du glucose c'est-à-dire elles sont homofermentaires. Trois souches (S19, S33 et S35) fermentent le glucose avec production du gaz (figure 10) ce qui indique le type hétérofermentaire de ces dernières.

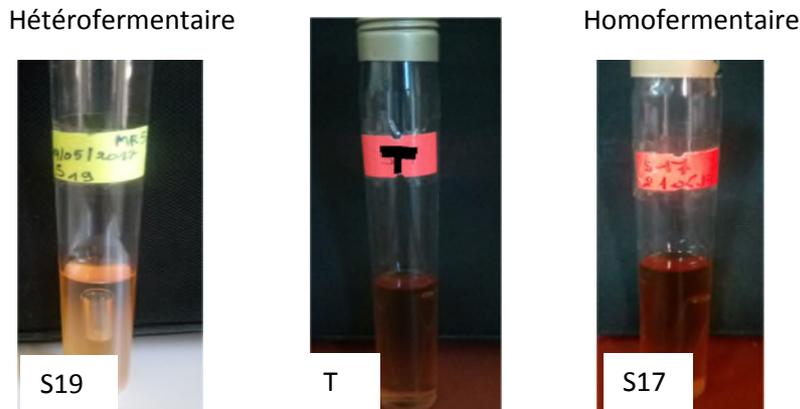


Figure 10 : Résultats du test du type fermentaire des souches S17, S19 et le témoin

II.4.2 Hydrolyse de l'Arginine (ADH)

Sur le milieu Möeller à l'arginine et le milieu Möeller témoin, on observe un virage au jaune après 24h d'incubation et qui devient vif au bout de 48h (**Figure 11**) et dure jusqu'au 6^{ème} jour pour toute les souches. (**Tableau IV**).

Le virage au jaune vif du milieu provient de la fermentation du glucose par les bactéries en entraînant une acidification du milieu qui se manifeste par un changement de couleur du violet au jaune, ce qui traduit un résultat négatif c'est à dire que toutes les bactéries testées n'ont pas la capacité à hydrolyser l'arginine, car elle ne possèdent pas l'ADH (arginine déshydrolyase) (**Kheddid et al., 2006**).

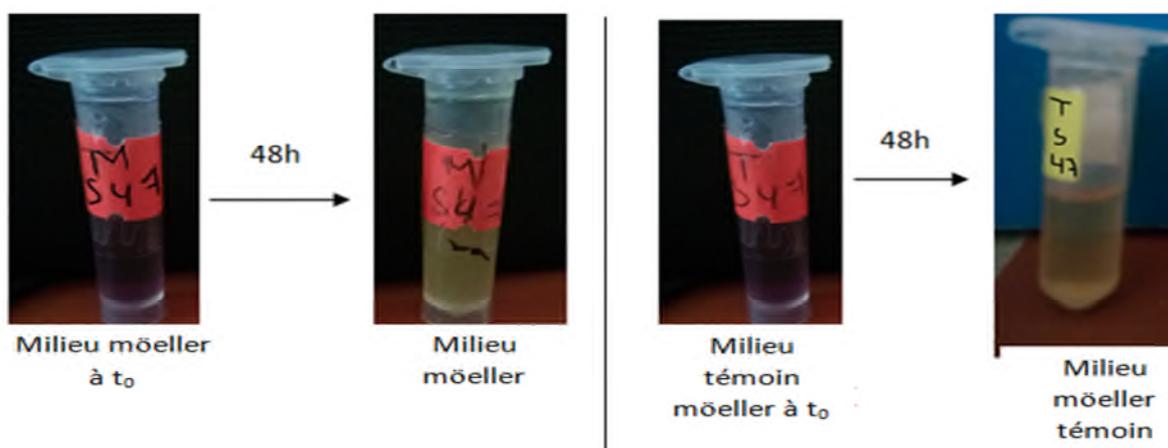


Figure 11 : Résultats du test de l'hydrolyse de l'arginine par les souches testées.

II.4.3 Fermentation des sucres

La détermination des genres et des espèces bactériennes, réside essentiellement dans leurs capacités à fermenter les sucres en acide lactique et d'autres acides organiques (**figure 12 et figure 13 en annexe**)

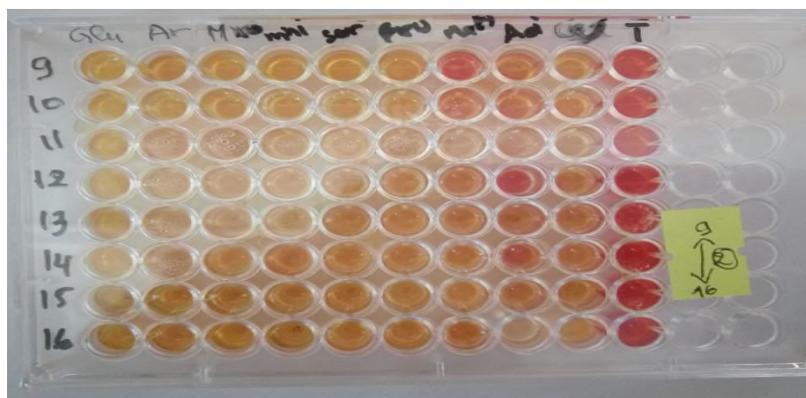


Figure 12 : Résultat du test « profile fermentaire » des souches.

Les souches isolées ont été identifiées au niveau de l'espèce en utilisant le site internet Abis online bacterial identification (http://www.tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html).

L'identification a révélé 24 espèces différentes sur 48 souches, ce qui montre une grande diversité des bactéries composant ce fromage, l'espèce majoritaire est *Lactobacillus nagelii* avec un pourcentage de 22,45%, suivie par *Enterococcus avium* (8,16%), *Lactobacillus aquaticus* (6,12%), *Lactobacillus mali* (6,12%), *Enterococcus phoeniculicola* (6,12%), et à 4,08% les espèces : *Lactobacillus ghanensis*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus moraviensis*, *Enterococcus sulfureus*, et enfin a un pourcentage très minime (2,04%) les souches : *Lactobacillus curvatus* subsp *melibiosus*, *Lactobacillus saniviri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus composti*, *Lactobacillus durianis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* subsp *tractae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus malodorantus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus termitis*, *Streptococcus parvulus*.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau IV**.

Tableau IV : Profil fermentaire des bactéries lactiques isolées

Sucres Souches	Sucres									Pourcentage d'identification
	Glucose	Arabinose	Mannose	Mannitol	Sorbitol	Fructose	Maltose	Adonitol	Cellulose	
S1	+	+	+	+	-	+	+	-	+	<i>Lactobacillus aquaticus</i> (91%)
S2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Lactobacillus nagelii</i> (91%)
S3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Lactobacillus nagelii</i> (91%)
S4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Lactobacillus nagelii</i> (91%)
S5	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Lactobacillus nagelii</i> (84%)
S6	+	-	+	+	+	-	+	-	+	<i>Lactobacillus nagelii</i> (91%)
S7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus nagelii</i> (91%)
S8	+	+	+	-	-	+	-	-	+	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp <i>melibiosus</i> (89%)
S9	+	+	+	+	+	+	-	+	+	<i>Lactobacillus ghanensis</i> (91%)
S10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus mali</i> (80%)
S11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus saniviri</i> (91%)
S12	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Lactobacillus nagelii</i> (91%)

(Suite)

S13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (91%)
S14	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Lactobacillus composti</i> (91%)
S15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus avium</i> (90%)
S16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus phoeniculicola</i> (99%)
S17	+	+	+	+	+/-	+	+	-	+	<i>Enterococcus phoeniculicola</i> (99%)
S18	+	-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>tractae</i> (91%)
S19	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	<i>Enterococcus avium</i> (97%)
S20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus avium</i> (88%)
S21	+	+	+	+	+	+	-	+	+	<i>Lactobacillus nagelii</i> (91%)
S22	+	+	+	-	-	+	+	+/-	+	<i>Lactobacillus nagelii</i> (84%)
S23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus ghanensis</i> (91%)
S24	+	+	-	-	-	+	+	-	+	<i>Lactobacillus aquaticus</i> (91%)
S25	+	+	+	+/-	-	+	+/-	+/-	+	<i>Lactobacillus aquaticus</i> (91%)
S26	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	<i>Lactobacillus paralimentarius</i> (90%)
S27	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+/-	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (85%)
S28	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (85%)
S29	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	<i>Lactobacillus nagelii</i> (84%)
S30	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+	<i>Lactobacillus nagelii</i> (92%)
S31	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+	<i>Enterococcus avium</i> (90%)
S32	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+	<i>Enterococcus faecium</i> (86%)
S33	+	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-	+	<i>Enterococcus moraviensis</i> (87%)
S34	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+/-	+	<i>Enterococcus phoeniculicola</i> (99%)
S35	+	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	<i>Enterococcus malodorantus</i> (86%)
S36	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	+	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (86%)
S37	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	<i>Enterococcus moraviensis</i> (87%)
S38	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	<i>Lactobacillus paralimentarius</i> (90%)
S39	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	<i>Lactobacillus plantarum</i> (85%)
S40	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	<i>Lactobacillus plantarum</i> (85%)
S41	+	-	-	+/-	+	+	+	+/-	+/-	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> (84%)
S42	+	+	-	-	-	-	+	+/-	+/-	<i>Lactobacillus mali</i> (87%)

(Suite)

S43	+	-	-	-	-	-	+	+/-	+	<i>Lactobacillus mali</i> (87%)
S44	-	-	-	-	+/-	-	+	+/-	-	<i>Lactobacillus durianis</i> (90%)
S45	+	-	+/-	-	-	-	+	+/-	-	<i>Streptococcus parvulus</i> (81%)
S46	+	-	-	-	+/-	-	+	+/-	-	<i>Enterococcus sulfureus</i> (90%)
S47	+	-	+	+/-	+	+	+	+/-	+/-	<i>Enterococcus sulfureus</i> (90%)
S48	+	-	+	-	-	+	+	+/-	+/-	<i>Enterococcus termitis</i> (90%)

(Suite)

II. 5. La galerie API 50 CHL

Parmi les 50 souches isolées, 5 souches (S9, S10, S42, S43, S50) ont été sélectionnées pour une identification approfondies avec la galerie API 50 CHL, cette sélection est basée sur leurs activités biotechnologiques en se référant à une étude antérieure réalisée au laboratoire (S9, S10 pour leurs activités lipolytique, S42 et S43 pour leurs activités protéolytique, S50 pour son activité acidifiante).

Les résultats obtenus (**tableau V** et **figure 14**) sont comme suit : la souche S9 correspond à *Lactobacillus ghanensis* avec un pourcentage de 91%, la S10 correspond à *Lactobacillus mali* avec un pourcentage de 80%, la S42 et la S43 correspondent à *Lactobacillus mali* avec un pourcentage de 87%, la S50 correspond à *Lactococcus plantarum* avec un pourcentage de 86%.

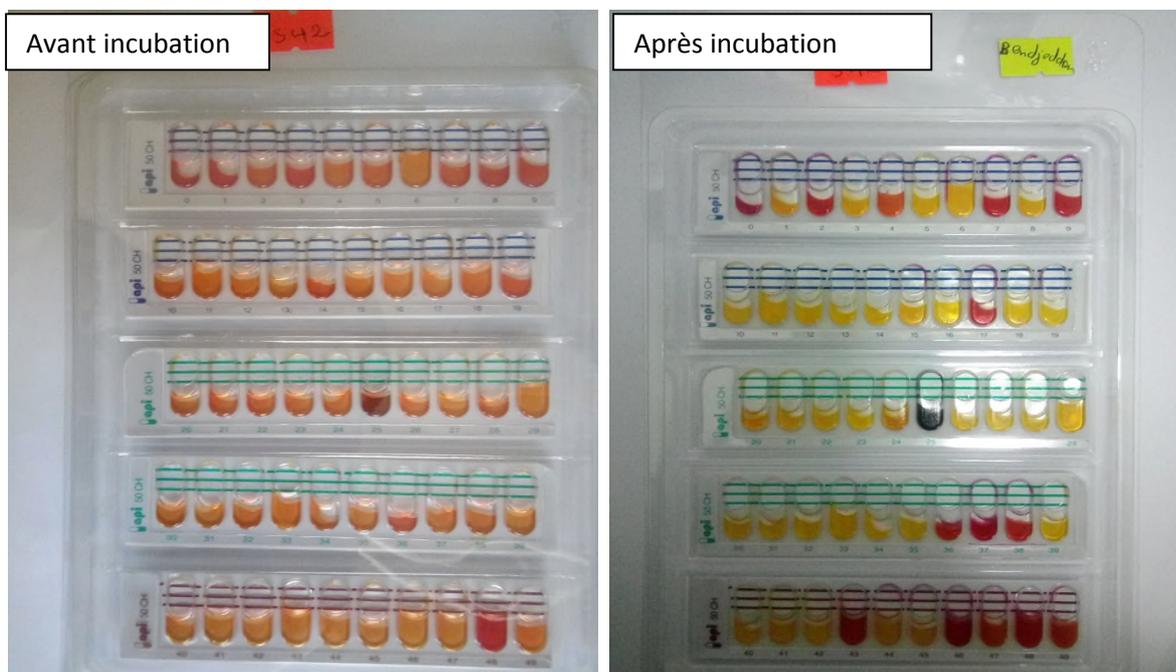


Figure 14: Résultat de la galerie API 50 CHL de la souche 42.

Tableau V : Résultat de la galerie API 50 CHL

Les sucres testés	S 9		S10		S42		S43		S50	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h 48h	24h 48h	24h	48h
Glycérol	-	-	-	-	-	+	+/-	+	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D- Arabinose	-	-	-	-	+/-	+	-	-	-	-
L-a-Arabinose	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+	-	-
Ribose	-	-	-	-	-	+	+/-	+	-	-
D-Xylose	-	-	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	+/-	+	-	-	-	-
Methyl –D –xylopyranose	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
Galactose	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	-	-
Glucose	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-
Fructose	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
Manose	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
Sorbose	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	+/-	+	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	+/-	+	+/-	+	-	-
Inositol	-	-	-	-	+/-	-	+/-	+	-	-
Manitol	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
Sorbitol	-	-	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
Méthyl – D- Manopyranoside	-	-	-	-	+/-	+	+/-	+	-	-
Méthyl –D – Glucopyranoside	-	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	-	-
N – acetyl- Glucosamine	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
Amygdalin	-	-	+	+	+/-	+	+/-	+	-	-
Arbutin	-	-	+	+	+/-	+	+/-	+	-	-
Esculin	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	-	-
Salicin	-	-	+	+	+/-	+	+/-	+	-	-
Cellobiose	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	-	+
Maltose	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+

(Suite)

Lactose	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
Mélibiose	-	-	+	+	+/-	+	+/-	+	-	-
Saccharose	-	-	+	+	+/-	+	+/-	+	-	-
Tréhalose	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
Inulin	-	-	+	+	+/-	+	+/-	+	-	-
Melzitose	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
Raffinose	-	-	+	+	+/-	+	+/-	+	-	-
Amidon	-	-	+	+	-	+/-	+/-	+	-	-
Glycogène	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	-	-	+	+	+	+	+/-	+	-	-
Turanose	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+
Lyxose	-	-	-	-	+	+	+/-	+	-	-
Tagatose	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+
L- Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D –fucose	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
D- Arabitol	-	-	-	-	+	+	+/-	+	-	-
L –Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Potassium gluconate	+/-	+	-	-	-	-	+/-	+	+/-	+
Potassium 2 – Ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Potassium 5 - Ketogluconate	-	-	-	-	-	-	+/-	+	-	-
Souches identifiés	<i>Lactobacillus ghanensis</i> (91%)		<i>Lactobacillus mali</i> (80%)		<i>Lactobacillus mali</i> (87%)			<i>Lactococcus plantarum</i> (86%)		

(Suite)

L'identification des souches avec la galerie API 50 CHL a permis d'identifier 5 espèces qui sont : *Lactobacillus ghanensis*, *Lactobacillus mali*, *Lactococcus plantarum*.

A l'issue de ce travail, cinquante (50) souches ont été isolées et purifiées, par la détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques.

L'identification a été réalisée sur quarante-neuf (49) souches (coques et bacilles).

Les isolats identifiés étaient des coques et des bacilles appartenant aux 4 genres ; *Lactobacillus* (65%), *Enterococcus* (29%), *Lactococcus* (4%) et *Streptococcus* (2%).

L'identification a révélée des espèces appartenant au genre *Lactobacillus* sont connues, notamment les espèces : *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *Lactobacillus acidophilus* on été retrouvées parmi notre collection.

Certains espèces isolée de ce fromage « Alatig » ont déjà été isolée d'autre fromages dont :

- *E. avium*, cette espèce a été également isolée du fromage Feta (Litopoulou-Tzanetaki. et Tzanetakis, 2011), du fromage Tulum à la fin d'affinage (Cakmakci et *al.*, 2008) et des fromages espagnols ; Roncal et Idiazábal (fromages à base de lait de brebis) (Arizcun *et al.*, 1997).
- *Lb. plantarum*, espèce prédominant des lactobacilles isolés des fromages Grec traditionnels Batzos, Feta, Teleme, Kopanisti, Krassotyri, Graviera, Kefalotyri et Manoura, (Litopoulo – Tzanetaki et Tzanetakis, 2011) et du fromage TMM (Carafa *et al.*, 2015). Elle constitue une espèce majeure des NSLAB dans le fromage Cheddar (MC Carthy *et al.*, 2015). Elle a été identifiée aussi dans l'écosystème du fromage *Bouhezza* comme espèce dominant (Aissaoui Zitoun *et al.*, 2011b ; Saoudi, 2012), dans le biofilm de la *Chekoua* et le *Lben* de fabrication (Senoussi, 2013).
- L'espèce *Lb. rhamnosus* fait partie de l'écosystème microbien du fromage Feta (Litopoulou-Tzanetaki. et Tzanetakis, 2011), du fromage PDO Grana Padano (fromage traditionnel de 13 mois d'affinage) (Pogaci *et al.*, 2013), du fromage Coalho (fromage au lait de chèvre) (Rolim *et al.*, 2015) et du fromage TMM (Carafa *et al.*, 2015).

D'après Cakmakci *et al.* (2008), Les lactobacilles et les lactocoques prédominent dans les fromages non affinés et les lactocoques disparaissent rapidement après trois mois d'affinage. Les lactobacilles sont le principal groupe des bactéries lactiques présent dans plusieurs types de fromages et c'est ce qui a été trouvé dans cette étude.

Conclusion

Conclusion

La présente étude a été réalisée dans le but de connaître la population lactique présente dans un fromage traditionnel « *Alatig* » originaire de la région de Boussaâda.

Au cours de ce travail, des bactéries lactiques ont été isolées et ont fait l'objet d'études morphologiques, physiologiques et biochimiques afin de les identifier. Sur la base de la coloration de Gram et la catalase, 50 isolats ont été sélectionnés. Les isolats ont été identifiés par l'étude de leurs caractères biochimiques et physiologiques. Les isolats présentant des aptitudes technologiques ont été identifiés par la galerie API 50CHL.

Les résultats obtenus ont permis d'attribuer ces isolats à quatre genres différents à savoir *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Le genre bactérien le plus dominant est *Lactobacillus* (65%), suivi de *Enterococcus* (29%) puis *Lactococcus* (4%) et en fin *Streptococcus* (2%). L'espèce bactérienne la plus dominante est *Lactobacillus nagelii*.

Cinq souches : S9 (activité lipolytique), S10 (activité lipolytique) S42 (activité protéolytique), S43 (activité protéolytique) et S50 (pouvoir acidifiant) ont fait l'objet d'une identification approfondie avec la galerie API 50CHL. Les résultats obtenus ont montré que ces isolats appartiennent respectivement aux espèces suivantes: *Lactobacillus ghanensis* avec un pourcentage de 91%, *Lactobacillus mali* avec un pourcentage de 80%, *Lactobacillus mali* avec un pourcentage de 87%, et *Lactococcus plantarum* avec un pourcentage de 86%.

Cette étude reste préliminaire, elle nécessite une étude complémentaire basée sur :

- identification génotypique des isolats
- étude des aptitudes antimicrobiennes des isolats
- étude des aptitudes probiotiques des isolats
- Fabrication de produits laitiers fermentés en utilisant ces isolats

Références bibliographiques

A

Adams ,M. R., and Marteau, P. , 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol.*27:263-264.

Aguirre, M ., and Collins, M. D. , 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol.*75 :95/107.

Aguirre, M et Collins, M.D. 1992. Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms for urinary tract infections: description of *Aerococcus urinae* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.*, **138**: 401-405.

Aissaoui Zitoun O. et Zidoun M.N., 2006. Le fromage traditionnel algérien *Bouhezza*. Séminaire d'Animation Régional Technologies douces et procédés de séparation. *AUF-GP3A-INSAT*, Tunis, Tunisie, 118-124.

Arizcun C., Barcina Y. and Torre P., 1997. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *Int .J Food Microbiology* 38: 17–24.

Attallah, A., Belyagoubi, L. (2003). Isolement et caractérisation de souches de *Listeria* dans le lait cru provenant de différentes régions de l'Ouest Algérien au niveau de la réception de G. P.I. Lait de Tlemcen. Mémoire d'ingénieur, Institut de Biologie, Université de Tlemcen. 63p.

Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. *In*: Lactic acid bacteria. Ed. S. Salminen and A. von Wright. Ed., Marcel Deccer. pp .1-72.

Axelsson L., 2004. Classification and physiology. *In* : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). *3e Ed.*, *Marcel Dekker, Inc.* New York. pp. 1-66.

B

Badis A., Laouabdi-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R., 2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, 23: 30-37.

Barache N., et Bouatmane S., 2016. Etude de la qualité physicochimique et microbiologique de deux fromages artisanaux algériens Algafs et Alatig. Mémoire de master en microbiologie alimentaire santé. Université A. MIRA – Bejaia. 40p.

C

Cakmakci S., Dragdemi E., Hayaloglu A.A., Gurses M. and Gundogdu E., 2008. Influence of ripening container on the lactic acid bacteria population in Tulum cheese. *World J Microbiol Biotechnol.* 24:293-299.

Carafa I., Nardin T., Larcher R., Viola R., Tuohy K. and Franciosi E., 2015. Identification and characterization of wild lactobacilli and pediococci from spontaneously fermented Mountain Cheese. *Food Microbiology* 48: 123-132.

Chammas, G.I., Saliba, R. and Béal, C. (2006). Characterization of the fermented milk —Laban|| with sensory analysis and instrumental measurements. *J. Food Sci.* 71: S156–S162.

Cheriguene, A., Chougrani, F., Bekada, A.M.A., El Soda, M. and Bensoltane, A. (2007). Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goat's milk. *African J. of Biotechnology*, 6 (15) : 1854-1861.

Collins M.D., Farroc J.A.E., Phillips B.A., Fergus S. et Jones D., 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J.Syst. bacteriol.*,37:310-316.

Collins, M. D., Williams, A. M. et Wallbanks, S. (1990). The phylogeny of *Aérococcus* and *Pediococcus* as determined by 16sr RNA sequence analysis:description of *Tétragenococcus*, gen, nov., *EFMS. Microbiol., Lett.*, 70: 255-262.

Curk M.C., Peladnan F., Hubert J.C. (1993). Caractérisation biochimique des lactobacilles brassicoles. *Lait.* 73. p 215-231.

D

Dellaglio F., De Roissard H., Torriani S., CURK M.C. et JANSSENS D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.).Ed., *Lorica, Uriage*. 1 :pp. 25-116.

Deroissart, H. B. (1994). Les bactéries lactiques. *In*-Laits et produits laitiers, Vol. 3. (F. M. Luquet , éd.). *Technique et documentation Lavoisier, Paris*, pp. 343-407.

Desmazeaud, M (1992). Les bactéries lactiques.*In*-Les groupes microbiens d'intérêt laitier (Hermier, J., Lenoir, J & Weber, F , eds.).*C.E.P.I.L. Technique & Documentation. Lavoisier*.pp.9-60.

Drider J., Prevost H. (2009). Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. Ed . Economica., Paris , 504p.

E

Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I. ET Villani, F. (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cows milk. *Food Microbiol*, **26**:p 228–231.

F

Farrow, J. A. E. et Collins, M. D. (1984). ADN-base composition,ADN-ADN homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 357-362.

Franzmann, P.D., Hôpfl, P., Weiss, N. et Tindall, B.J. (1991). Psychrotrophic, lactic acid producing bacteria from anoxia waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **156**: 255- 262.

G

Galvez A., Abriouel H., Ben Omar N. and Lucas R., 2011. Food Applications and Regulation In: Drider D., et Rebuffat S. (eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp. 253-390.

Garvie, E.I. (1986). Genus *pediococcus*. *In-Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol.2. (P. H. A. Sneath., N. S. Mair., M. E. Shar & K. G. Holt, eds.), *Williams & Wilkins, Baltimore*, pp. 1075-1079.

Gasser, F., Montel, M. C., Talon, R et Champoier, M 1994 .Taxonomie moléculaire appliquée à la classification des bactéries lactiques : *In-Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques*. Vol .1. (H. Deroissart & F. M. Luquet, éd.), *Technique & Documentation, Loriga, Paris*, 1 pp .127-139.

Guiraud JP. (2003). Microbiologie Alimentaire. Edition : Dunod, Paris, 652p.

Guiraud, J.P., Rosec, J.P. 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Afnor. Saint-Denis la plaine, Paris. 300 p.

Gutmann, I et Wahlefield, A.W. 1974. L(+) lactate : détermination with lactic dehydrogenase and NAD. In. Bergemeyer, H.U. (Ed). *Methods of enzymatic analysis*. *Academic Press, New York*, pp. 1452-1456.

H

Hassan A.N. and Frank J.F., 2001. Starter Cultures and their use. *In: Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) *2e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 151-205.

Hogg T., 2005. Essential microbiology. *John Wiley & Sons, Ltd.* 188-190.

Holley, R.A., Guan, T.Y., Peirson, M. et Yost, C.K. 2002. *Carnobacterium viridans* sp. nov., an alkaliphilic, facultative anaerobe isolated from refrigerated, vacuum-packed bologna sausage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1881-1885.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A, Stanley, J.T.et Williams, S.T. 1994. Group 17, Gram-positive cocci: *In-Bergey's manual of determinative bacteriology*, Vol.1 (P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt, éd.), *Williams & Wilkins, Baltimore*, pp. 527-557.

Hot .N.T., N. Tuan N., Deschamps A. et Caubet R., 2007. Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology*. 134-142.

J

Joborn, A., Dorsch, M., Olsson, J.C., Westerdhal, A et Kjelleberg, S. 1999. *Carnobacterium inhibens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmosalar*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1891-1898.

K

Kacem, M. et Karam, N. 2006. Physicochemical and microbiological study of «Shmen», a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeast. *Grasas y Aceites*, Vol 57, No 2. pp 192-197.

Kandler, O et Weiss, N. 1986. Regular, nonsporing Gram-positive rods bacteria: *Inbergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.2.(P.H. A. Sneath., Mair, N., Scharpe, M. E., Holt. M. E., éd.). *Williams. & Wilkins ,Baltimore*, pp.1208-1260.

Kandler, O., and Weiss , N. , 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: Sneath, P. H. A., Mair ,N. S., Sharp, M.E., and Holt, J.G.(Eds). *Iranian Journal of Veterinary Research*, Shiraz University, Vol. 10. 156p.

Konig H., Frohlich J. 2009. *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Ed Springer-Verlag., Berlin Heidelberg. 109p.

ℒ

Lancefield R.C.,1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. exper .Med.*,57 : 571-595.

Lebres EA. 2002. Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments « Microbiologie des laits et produits laitiers », Institut Pasteur d'Algérie, pp704-706.

Leclerc, H., Deveriese, L.A et Mmsel, D.A.A. 1996. Txonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* **81**: 459-466.7.

Leveau J.Y, Bouix, 1993. Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 612p.

Leveau J.Y, Bouix M, De Roissart H. 1991. La flore lactique In Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Bourgois C.M, Leveau J.Y.Edition : Techniques et documentations, Lavoisier. Paris. pp 152-186.

Licitra G., 2010. World-wide traditional cheeses: Banned for business. *DairySci. Technol* 90, 357–374.

Litopoulou-Tzanetaki. and Tzanetakis N., 2011. Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research* 101. 17– 32.

Luquetf.M. et Corrieu G., 2005. Bactéries lactiques et probiotiques. *Santé et Nutrition.* France.306p.

ℳ

Marchal, N., Bourdon, J.L.et Richard, CL. 1991. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris. pp 225-226.

Martinez- Muracia, A.J et Collins, M.D. 1990. Phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS. Microbiol. Lett.* **70**: 73:84.

MC Carthy C.M., Wilkinson M.G., Kelly P.M. and Guinee T.P., 2015. Effect of salt and fat reduction on the composition, lactose metabolism, water activity and microbiology of Cheddar cheese. *Dairy Sci. & Technol.* 015-0245-2.

Moller ,V. 1955. Simplified tests of some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand., J Clin. Microbiol*16(5) : 909–919.

Montel, M.C et Champomier, M.C. 1987. Arginine catabolism in *Latobacillus sakei* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 2683-2685.

Montel, M. C., Talon, R., Fournaud, J et Champomier, M.C. 1991. A simplified key of identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. From meat. *J. Appl. Bacteriol.* **70** : 469-472.

Mora, D., Scarpellini, M., Franzitti, L., Colombo, S et Galli, A. 2003. Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al., 1973) DMS 20342 (T) and DMS 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al., 1987) DSM 20730 (T) and DSM 20722 *carnobacterium maltoromanicum* comb. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 675-678.

Mozzi F., Raya R. R., Vignolo G.M. 2010. Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Blackwell publishing. Singapore. p 3-73.

P

Patrignani, F., Lanciotti, R., Mathara, J. M., Guerzoni, M. E. and Holzapfel. W. H. (2006). Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks, *Int. J. Food Microbiol.* **107**: 1 – 11.

Pilet M.F., Magras C., Fererich M., 2005. Bactéries lactiques. *In* : bactériologie alimentaire (Federighi M.). *2e Ed., Economica.* Paris. pp219-240.

Pogaci T., Mancini A., Santarelli M., Bottari B., Lazzi C., Neviani E. and Gatti M., 2013. Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard

cheese produced from raw milk and undefined natural starter. *Food Microbiology* 36, 207-215.

Poullain F. 1994. Evolution de la préparation commerciale des ferments lactiques in : les bacteries lactiques, T1, Aspects fondamentaux et technologies. Ed, Loriga, Lavoisier. p 604.

Pringsulaka O., Thonggam N., Suwannasai N., Atthakor W., Pothivejkul K. and Rangsiruji A., 2011. Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control*, 23: 547-551.

R

Randazzo, C.L., Caggia, C. et Neviani, C.L.E. 2009 . Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J. Microbiol. Methods*, 78: 1–9.

Rehman S-UR., Mcsweeney P.L.H., Bank J.M., Brechan E.Y., Muird.D.,Fox P.F., 2000. Ripening of Cheddar cheese made from blends of raw and pasteurized milk. *Int. D. J.* 10 : 33-44.

Rolim F.R.L., Santos K.M.O., Barselos S.C., Egito A.S., Ribeiro T.S., Conceição M.L., Magnani M., Oliveira M.E.G. and Queiroga R.C.R.E., 2015. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. *LWT - Food Science and Technology* 63, 807-813.

S

Salminen S., Wright A.V. and Ouwehand A., 2004. Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. *Marcel Dekker. Inc., U.S.A .* p 628

Saoudi Z., 2012. Caractérisation microbiologique de la protéolyse du fromage traditionnel algérien « Bouhezza » de ferme. *Thèse de magistère.* INATAA. Université Mentouri Constantine. 90p.

Schleifer K.H. et Kilpper-Bälz R.,1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of *Streptococci*, *Enterococci* and *Lactococci*: a review. *Syst. Appl. Microbiol.*,10: 1-19.

Schleifer, K. H. et Ludwig, W. 1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System Appl Microbiol* **18**: 461-467.

Senoussi A., 2013. Caractérisation microbiologique de la peau de chèvre utilisée dans la fabrication du fromage traditionnel Algérien « *Bouhezza* ». *Mémoire de Magister*. INATAA. Université Mentouri de Constantine. 72p

Simpson, W.J et Taguchi, H. 1995. The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. In the *Genera of lactic acid bacteria*; Wood BJB., Holzabef HW, Eds; Chapman & Hall, London,125-172.

Singleton, P. 1999. *Bactériologie*. 4^{eme} Edition. Dunod, Paris. 317 p.

Sperber, W.H. et Swan, J. 1976. Hot-loop test for the determination of carbon dioxide production from glucose by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 990-991.

V

Vela, A.I., Garcia, N., Latre, M.V., Casamayor, A., Sanchez-porro, C., Briones, V., Ventosa, A., Dominguez, L et Fernandez –garayzabal, J.F. 2007. *Aerococcus suis* sp. nov., isolated from clinical specimens from swine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**: 1291-1294.

W

Walter J., Hertel, C., Tannock, GW., Lis, C.M., Munro, K et Hammes, W.P 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67** : 2578-2585.

Annexes

Annexe 1 : Les relations phylogénétiques de l'ordre « *Lactobacillales* » dans la classe des « *bacilli* »

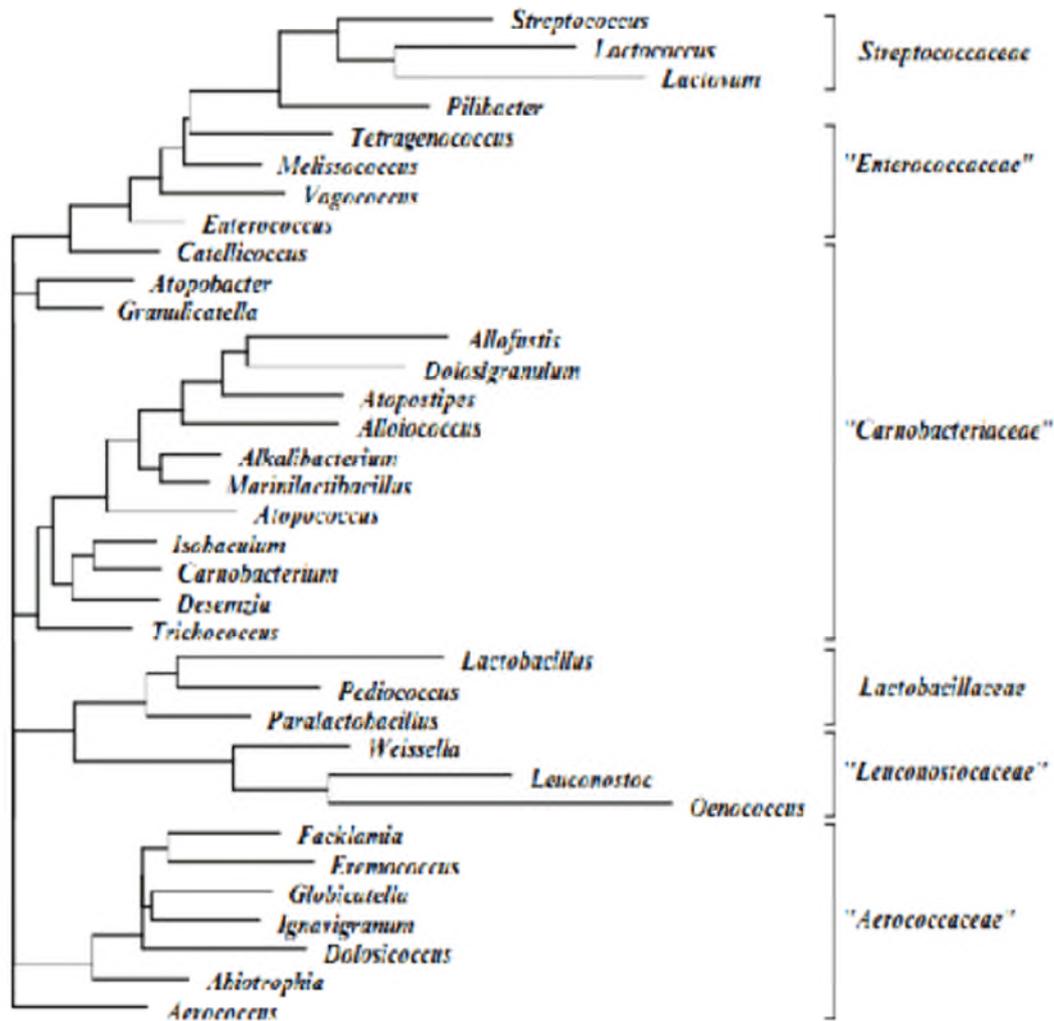


Figure 1 : Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre « *Lactobacillales* » dans la classe des « *bacilli* » (De VOS et al. ,2009).

Annexe 2 : Caractéristiques différentielles et clef d'identification des bactéries lactiques

Tableau I: Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques (Dérivée à partir de Axelsson, 1998 ; Leisner *et al.*, 2000)

Caractéristiques	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>	<i>Leuconastoc</i> <i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
Morphologie	bacilles	bacilles	coques	coques	coques	Coques ovales	coques	coques	coques	Coques/ bacilles
Formation des tétrades	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Gaz à partir de glucose	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Croissance à 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Croissance à 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Croissance 6.5% NaCl	ND	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Croissance 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Croissance à pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Isomère d'acide lactique	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L	D, DL
Hydrolyse d'arginine	+	±	ND	±	-	-	±	±	ND	-
mDAP	+	±	ND	-	-	-	-	-	ND	-

+ positive ; - négative ; □ résultats variés selon l'espèce ; ND, non déterminé.

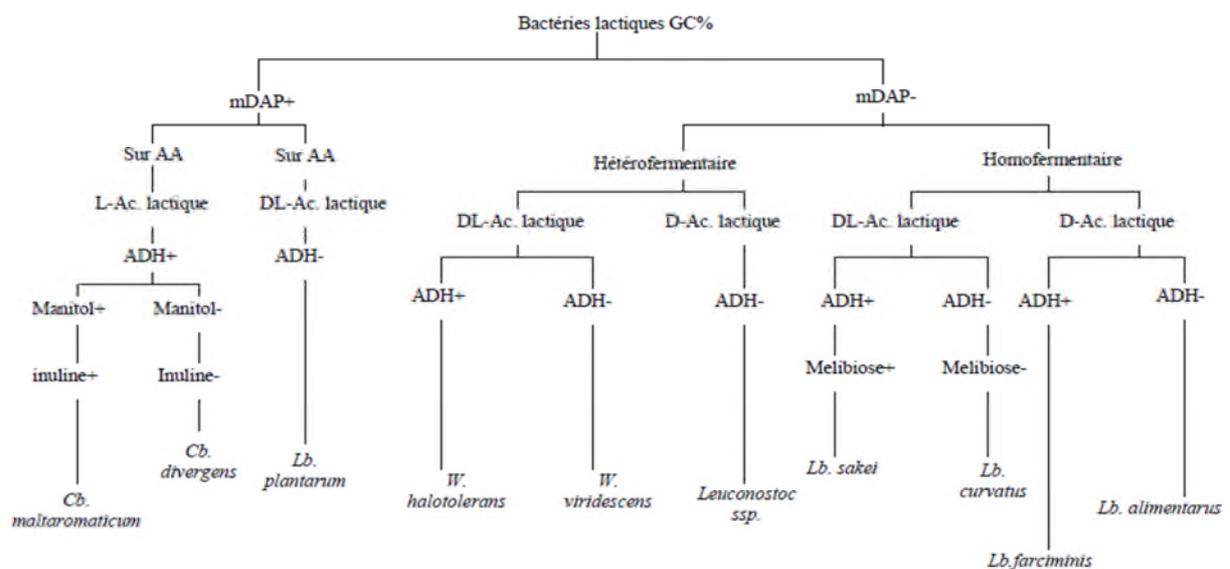


Figure 2: Clef d'identification des bactéries lactiques (Montel *et al.*, 1991).

Annexe 3 : Composition des milieux de culture

- **Bouillon MRS (BIOKAR, France)**

Composition du milieu

○ Polypeptone.....	10,00 g/l
○ Extrait de viande	10,00 g/l
○ Extrait autolytique de levure	5,00 g/l
○ Glucose.....	20,00 g/l
○ Tween 80.....	1,08 g/l
○ Phosphate dipotassique	2,00 g/l
○ Acétate de sodium.....	5,00 g/l
○ Citrate d'ammonium.....	2,00 g/l
○ Sulfate de magnésium.....	0,20 g/l
○ Sulfate de manganèse.....	0,05 g/l

pH du milieu : $5,7 \pm 0,1$

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

- **Gélose MRS pH 6.5 (Liofilchem, Italy)**

Composition du milieu

○ Polypeptone.....	10,00g/l
○ extrait de viande	10,00g/l
○ extrait de levure	5,00g/l
○ glucose	20,00g/l
○ tween 80.....	1,08g/l
○ phosphate dipotassique	2,00g/l
○ acétate de sodium	5,00g/l
○ citrate d ammonium	2,00g/l
○ sulfate de magnésium	2,00g/l
○ sulfate de manganèse.....	0,05g/l
○ agar agar bactériologique	15,00g/l

pH du milieu : $6.5 \pm 0,1$

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

- **Gélose M17 (Institut pasteur Algérie)**

○ Peptone de soja.....	5,00g/l
○ Peptone de viande.....	2,50g/l
○ Tryptone.....	2,50g/l
○ extrait de viande	5,00g/l

- extrait de levure5,00g/l
- Lactose.....5,00g/l
- Acide ascorbique.....0,50g/l
- Glycérophosphate de sodium.....19g/l
- Sulfate de magnésium.....0,25g/l
- Agar.....20g/l

pH du milieu : $6,4 \pm 0,1$

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

- **Bouillon MRS sans sucre (BIOKAR, France)**

Composition du milieu

- Polypeptone.....10,00 g/l
- Extrait de viande10,00 g/l
- Extrait autolytique de levure5,00 g/l
- Tween 80.....1,08 g/l
- Phosphate dipotassique2,00 g/l
- Acétate de sodium.....5,00 g/l
- Citrate d'ammonium.....2,00 g/l
- Sulfate de magnésium.....0,20 g/l
- Sulfate de manganèse.....0,05 g/l

pH du milieu : $5,7 \pm 0,1$

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

- **Bouillon MRS sans citrate (BIOKAR, France)**

Composition du milieu

- Polypeptone.....10,00 g/l
- Extrait de viande10,00 g/l
- Extrait autolytique de levure5,00 g/l
- Glucose.....20,00 g/l
- Tween 80.....1,08 g/l
- Phosphate dipotassique2,00 g/l
- Acétate de sodium.....5,00 g/l
- Sulfate de magnésium.....0,20 g/l
- Sulfate de manganèse.....0,05 g/l

pH du milieu : $5,7 \pm 0,1$

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe 4 : Résultat du test « profile fermentaire » des souches.

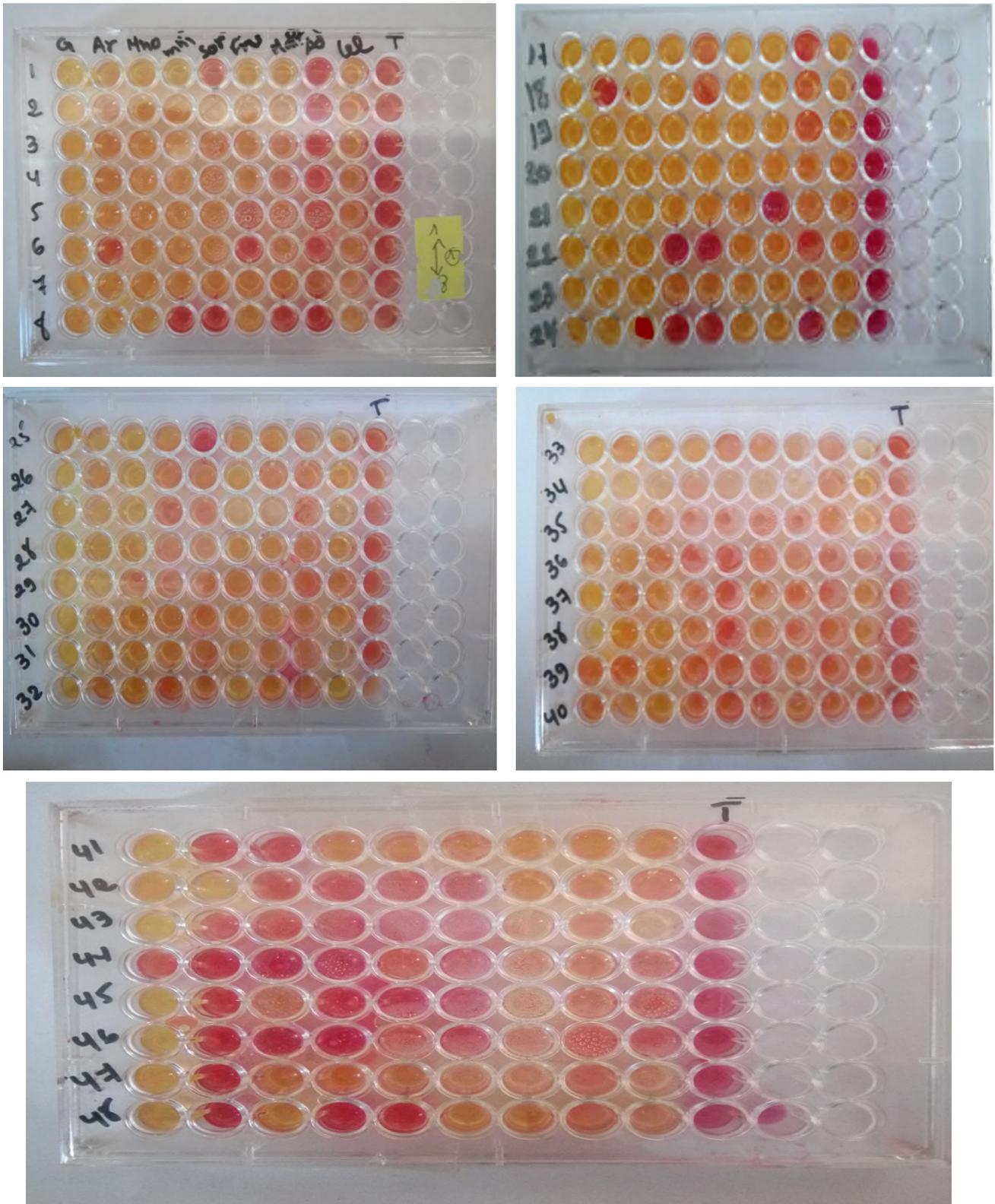


Figure 13 : Résultat du test « profile fermentaire » .

Résumé

Notre étude a porté sur l'isolement et l'identification de bactéries lactiques, isolée à partir du fromage artisanal « Alatig » collecté à partir d'une ferme appelée « laiterie et fromagerie de Kardada » (كردادة أجبان و ألبان) dans la campagne de Boussaâda. Les différentes souches ont été identifiées sur la base des méthodes classiques afin de les attribuer aux différents genres voir espèces. Au total 50 souches de bactéries lactiques ont été isolées suivant la coloration de Gram et le test de la catalase, purifiées puis soumises à un ensemble de test biochimiques et physiologiques. Les résultats de cette étude montrent une présence majoritaire de bacilles (67%) par rapport aux cocci (33%). L'identification de l'ensemble des isolats a permis de les rattacher en 4 genres (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*).

Mots clés : bactéries lactique, identification, *Lactobacillus*, fromage artisanal.

Abstract

Our study focused on the isolation and identification of lactic acid bacteria they were isolated from traditional cheese at Kardada's farm in the region of Boussaâda. The different strains were identified using conventional methods assigned to them to see different kinds here. A total of 50 strains of lactic acid bacteria were isolated following Gram staining and catalase test, purified and then subjected to a series of biochemical and physiological tests. The results of this study show a majority presence of rod (67%) by contribution to cocci (33%). The identification of all isolates allowed the attached into 4 groups (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Enterococcus*).

Keywords: lactic acid bacteria, identification, *Lactobacillus*, artisanal cheese.