

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



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

MASTER

Thème

**Etude de la résistance à la salinité de quelques bactéries
lactiques isolées du smen traditionnel**

Présenté par :

AMAR Rima & MANAA Aida

Soutenu le : 15 Juin 2016

Devant le jury composé de :

M ^r NABTI H.	MCA	Président
M ^{me} BENACHOUR Karima	MAA	Encadreur
M ^{me} LOUILLECHE-TITELI Fatiha	MAA	Examineur

Année universitaire : 2015 / 2016



Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous exprimons toute notre reconnaissance et notre plus grand respect à M^{me} Benachour Karima, pour avoir assuré l'encadrement de ce mémoire. Depuis les premiers instants, sa pédagogie, son écoute, et son ouverture d'esprit, ont été importants pour nous que ses connaissances et ont largement contribué à l'évolution de cette étude. On ne peut sincèrement vous exprimer nos respects et notre gratitude.

Nous exprimons nos profondes reconnaissances à M^r Nabti H., pour l'honneur qu'il nous a fait d'accepter de présider le jury d'évaluation et d'examiner ce mémoire, vos remarques ne feront qu'améliorer ce travail.

Mes plus sincères remerciements vont également à M^{me} Louilleche- Titeli F., pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect et de notre profonde reconnaissance.

Nos remerciements s'adressent aussi à nos camarades de Master Microbiologie, à nos amis (es) du laboratoire et à tous ce qui a contribué à l'évolution de cette étude de près ou de loin.

Enfin, on n'oublie pas les deux simples bactéries *Leuconostoc* et *Lactobacillus* qui étaient nos partenaires dans ce travail !

MERCI



*D*édicaces

Grace à Allah

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents

Pour leur patience

J'espère que je suis la bonne fille que vous avez rêvée d'avoir

Un spécial clin d'œil à mon bien aimé, mon fiancé Houssam, d'être toujours à mes côtés. Pour son soutien sans faille, sa compréhension, ses encouragements, et surtout pour donner du goût à ma vie par sa tendresse

A mon petit frère : Abdelhak

A mon frère Adel et sa femme Habiba

A notre nièce bien aimé Rou'ya

Et bien sur à la copine de mon chemin, mon binôme Aida qui est toujours à côté de moi

A toutes mes amies surtout : Linda, Meriem, Warda, Famina, Fasmina, Wissem, Amira et Sihem d'être toujours à mes côtés pour me soutenir

A tous ceux qui mon aide de près ou de loin

Rima

Dédicaces

Grace à Allah

Je dédie ce modeste travail à ma famille

D'abord, mon père et ma mère que j'adore et qui m'ont beaucoup aidé en me donnant des conseils et qui m'ont soutenu le long de vingt trois ans pour atteindre ce point.

A mes frères : Adel et Hichem

Mon grand frère Nacer-eddine et sa femme Lynda

A notre nièce bien aimée Nâda

A mes sœurs : Lamia et surtout mon petit ange adorable Loubna

Toutes mes copines de chambre

A tous mes amis : Hasmina, Sylia, Sihem, Sedda , Nésserine , ma cousine Rayenne sans oublier Samel qui m'ont vraiment aidé durant cette période

Et bien sûr à la copine de mon chemin, mon binôme Rima qui est toujours à mes côtés

En fin à la personne qui m'est chère au cœur et qui m'a aidé de près ou de loin.

Aida

Liste des abréviations

Br. Beurre

°D. Degré Dornic

DO. Densité Optique

G⁺. GRAM positif

h, min, s. heure, minute, seconde

H₂O₂. Le peroxyde d'hydrogène

LAB. Lactic Acid Bacteria

Lb. *Lactobacillus*

lb. lben

LN. *Leuconostoc*

MRS. Man Rogosa and Sharpe

pH. Potentiel d'hydrogène

rpm. Rotation par minute

ssp. subspecies

U. Unité

UFC. Unité formant colonie

Liste des tableaux

Tableau I : Habitat des lactobacilles.....	5
Tableau II : présentation des bactéries lactiques utilisées.....	9
Tableau III : Les résultats de la standardisation.....	19
Tableau IV : Résultat de la croissance à différente concentration de NaCl.....	20

Liste des tableaux en annexe

Tableau I : Résumé de l'observation microscopique des souches isolées sur milieu MRS.	
Tableau II : Dénombrement des bactéries lactiques à différentes concentration de NaCl.	
Tableau III : Cinétique de croissance des cultures pures dans le lait à 10% de NaCl.	
Tableau IV : Les résultats de la vitesse d'acidification des souches isolée de beurre et de lben.	
Tableau V : Cinétique de croissance des cultures pures dans M17 à 10% de NaCl.	
Tableau VI : Evaluation de la concentration cellulaire dans le bouillon M17.	
Tableau VII : Cinétique de croissance dans le bouillon M17 à 10% NaCl dans des cultures mixtes.	
Tableau VIII : Cinétique de croissance dans le lait à 10% NaCl dans des cultures mixtes.	

Liste des figures

Figure 01: Classification des bactéries lactiques selon leurs métabolites de fermentation	4
Figure02 : Protocole de revivification des bactéries lactiques.....	10
Figure 03 : Epreuve d'efférvaisance après addition du H ₂ O ₂	12
Figure 04 : Standardisation de l' <i>inoculum</i> bactérien sur le lait et MRS.....	13
Figure 05 : Image démonstrative de la mesure du pH	14
Figure 06 : L'aspect macroscopique des bactéries lactiques sur gélose MRS.....	17
Figure 07 : Aspect d'une culture pure dans un bouillon MRS.....	17
Figure 08 : Observations des bactéries lactiques au microscope optique (10X100).....	18
Figure 09 : Type fermentaire sur bouillon MRS contenant une cloche de Durham	18
Figure 10 : Variation du pH au cours de la fermentation du lait à 30°C.....	21
Figure 11 : Evolution de l'acidité Dornic au cours de la fermentation du lait à 30°C.....	23
Figure 12 : Variation de la vitesse d'acidification des 15 souches à 24h et 48h.....	24
Figure 13 : Evolution de la Densité Optique dans le bouillon M17 des cultures pures incubées à 30°C	25
Figure 14 : Taux de survie des Lactobacille et <i>Leuconostoc</i> dans le milieu M17 à 10% de NaCl.....	27
Figure 15 : Evatuation du pH du bouillon M17 des cultures pures incubées à 30°C.....	28
Figure 16 : Variation de l'acidité Dornic dans le bouillon M17 des cultures pures incubées à 30°C.....	29
Figure 17 : Evaluation de la Densité Optique dans le bouillon M17 des cultures mixtes incubées à 30°C.....	30

Figure 18 : Evotution du pH du bouillon M17 des cultures mixtes incubées à 30°C.....	31
Figure 19 : variations de l'acidité Dornic dans le bouillon M17 des cultures mixtes incubées à 30°C.....	31
Figure 20 : Evatuation du pH du lait des cultures mixtes incubées à 30°C.....	32
Figure 21 : Variations de l'acidité Dornic dans le lait des cultures mixtes incubées à 30°C.....	33

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I : synthèse bibliographique

1. Généralités sur les bactéries lactiques.....	3
2. Classification.....	3
3. Rôle et intérêt des bactéries lactiques dans l'alimentation.....	4
4. Les lactobacilles.....	5
4.1) Habitat des lactobacilles.....	5
5. <i>Leuconostoc</i>	6
5.1) Habitat des <i>Leuconostoc</i>	6
6. Utilisation industrielle des bactéries lactiques.....	6
7. La résistance à la salinité des bactéries lactiques.....	7
7.1) Déterminisme de la résistance au sel.....	7
7.2) Réponse des bactéries lactique au stress hyperosmotique.....	8

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Origine des souches.....	9
2. Revivification des souches.....	10
3. Vérification de la pureté des souches utilisées.....	11
3.1) Observation macroscopique.....	11
3.2) Observation microscopique.....	11

3.2.1) La coloration de Gram.....	11
3.3) Test de catalase.....	12
3.4) Test de production de gaz (CO ₂).....	12
4. Standardisation de l' <i>inoculum</i> bactérien.....	12
5. La croissance des souches à différentes concentrations de NaCl.....	14
6. Cinétique de croissance des cultures pures dans le lait et M17 à 10% NaCl.....	14
6.1) Mesure du pH.....	14
6.2) Mesure d'acidité Dornic.....	15
6.3) Evaluation de la concentration cellulaire.....	15
6.3.1) Préparation des dilutions.....	15
6.3.2) Dénombrement des bactéries lactiques.....	15
6.3.3) Détermination du taux de viabilité des bactéries lactiques utilisées.....	15
6.3.4) Mesure de la Densité Optique.....	16
7. Cinétique de croissance dans le lait et M17 à 10% NaCl dans des cultures mixte.....	16

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Vérification de la pureté des bactéries lactiques utilisées.....	17
1.1) L'aspect macroscopique.....	17
1.2) L'aspect microscopique.....	18
1.3) Test de catalase et de production de gaz.....	18
2. Standardisation.....	19
3. La croissance des souches à différentes concentrations de NaCl.....	19
4. Cinétique de croissance des cultures pures dans le lait à 10% de NaCl.....	21
4.1) Mesure du pH.....	21
4.2) Mesure de l'acidité Dornic.....	22
4.3) Etude de la vitesse d'acidification.....	24
5. Cinétique de croissance des cultures pures dans M17 à 10% de NaCl.....	25
5.1) Mesure de la Densité Optique.....	25
5.2) Taux de viabilité.....	26

5.3) Mesure du pH.....	28
5.4) Mesure d'acidité Dornic.....	29
6. Cinétique de croissance dans le bouillon M17 à 10% NaCl dans des cultures mixtes.....	30
6.1) Mesure de la Densité optique.....	30
6.2) Mesure du pH.....	31
6.3) Mesure de l'acidité Dornic.....	31
7. Cinétique de croissance dans le lait à 10% NaCl dans des cultures mixtes.....	32
7.1) Mesure du pH.....	32
7.2) Mesure de l'acidité Dornic.....	32
Conclusion.....	35
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Introduction

Les produits laitiers traditionnels usuels, particulièrement les types fermentés, ont été la fierté de la tradition culinaire pendant des siècles dont le but est la bio-préservation du lait. Il est évident que ces produits aient joué un rôle important dans le régime des communautés des régions rurales. Parmi ceux, lben, smen et jben et qui sont les plus communs et de plus en plus lancés sur le marché dans tous les pays de manière non-programmée. Leur composition chimique devrait être adaptée à l'environnement économique international et conformément aux conditions de sécurité alimentaire (grande importance culturelle, médicinale et économique) (**Benkarroum et Tamime, 2004**).

D'après le manuel de Bergay du 2004, les bactéries lactiques (BAL) sont un groupe de bactéries unies par un ensemble de caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques. Elles appartiennent à la lignée des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales*, et occupent des niches écologiques extrêmement variées, selon leur propres conditions optimales de développement suivant la température, le pH, la pression osmotique ou encore l'exposition lumineuse. Reste que ces dernières sont constamment soumises à des variations des paramètres physico-chimiques de l'environnement auxquelles elles doivent répondre efficacement afin de pouvoir survivre et se développer (**Romeo et al., 2001**).

Les BAL sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés depuis plusieurs siècles où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques (la texture, la saveur) et d'augmenter la durée de conservation des aliments (**Zarour et al., 2012**). Elles forment actuellement un groupe d'organismes utiles pour l'enrichissement de certains yaourts, laits (**Klaenhammer et al., 2007**), incorporés dans des fromages (**Gomes & Malcata, 1998 ; Nayra et al., 2002**) et des glaces (**Christiansen et al., 1996**). En effet, leur propriétés probiotiques améliorent les fonctions digestives (**Lairini et al., 2014**).

Cette utilisation est due aux effets nutritionnels et thérapeutiques de ces bactéries car elles enrichissent le milieu où elles se trouvent en vitamines (B et K), acides aminés, composés organiques (acides lactique et acétique), enzymes (lactase) (**Soomro et al., 2002**). Ainsi, elles ont un rôle hygiénique en abaissant le pH et en sécrétant une variété de composés inhibiteurs qui empêchent le développement de bactéries indésirables (**Zarour et al., 2012**). **Tortora et**

Grabowski (2001) ont montré que certaines souches peuvent avoir une influence sur de nombreuses bactéries nocives car elles produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines qui inhibent la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes. Les souches les produisant peuvent donc également être utilisées dans des produits non fermentés en tant que culture protectrice (**Dortu et Thonart, 2008**).

Dans leur environnement naturel, les bactéries lactiques peuvent être soumises à de forts stress salin (**Romeo et al., 2001**). Les données actuelles sur la réponse des souches (*Lactobacillus* et *Leuconostoc*) à ce genre de stress, auxquelles nous nous intéresserons sont démontrées dans cette étude.

Ce travail consiste à faire une étude sur la résistance au sel de quelques bactéries lactiques en suivant le comportement des souches face à la présence du sel (NaCl) à différentes concentrations.

Par des approches physiologiques, technologiques et biochimiques nous avons étudié :

- La croissance à différentes concentrations en NaCl ;
- Cinétique de croissance dans le lait et le bouillon M17 à 10% NaCl (pour des cultures pures, mixtes) à travers laquelle, le suivi du pH et l'acidité Dornic sont réalisés.

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, généralement aérobies facultatifs, ou microaérophiles, hétérotrophes et chimio-organotrophes à Gram positif, généralement immobiles, non sporulés, catalase (-). Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles, leur importante propriété est la production d'acide lactique à partir des sucres (Dellaglio et al., 1994).

Elles sont présentes sous forme bacilles (bâtonnets) ou coques. Ces bactéries occupent une place importante dans l'alimentation, et sont responsables de la fermentation de produits alimentaires, qu'ils soient d'origine carnée (saucisson), laitière ou végétale (choucroute) (Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001).

A ce groupe de bactéries lactiques, appartient plusieurs genres comme *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Pot, 2008).

Des genres nouveaux, par exemple *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupe des bactéries lactiques (Broadbent, 2001 ; Axelsson, 2004).

2. Classification

De nombreuses classifications des bactéries lactiques ont été proposées. Parmi elle, figure la classification selon la composition de la paroi cellulaire bactérienne, incluant la nature des acides gras qui la composent. Une autre classification, basée sur les différents modèles de fermentation du glucose définit 3 groupes :

Le groupe I : Renferme les bactéries réalisant exclusivement l'homofémentation. Ce groupe comporte majoritairement des *Lactobacillus*.

Le groupe II : Inclut les bactéries réalisant l'hétérofémentation et regroupe les *Leuconostoc*, les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*.

Le groupe III : Ce groupe présente une position intermédiaire entre le groupe I et II réalisant ainsi l'homofémentation ou l'hétérofémentation selon les conditions environnementales. Il regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

Il est possible de les classer suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides. En effet, les bactéries homolactiques strictes produisent uniquement de l'acide lactique, alors que les bactéries hétérolactiques peuvent produire en plus, de l'acide acétique, de l'éthanol et du dioxyde de carbone (figure 01) (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

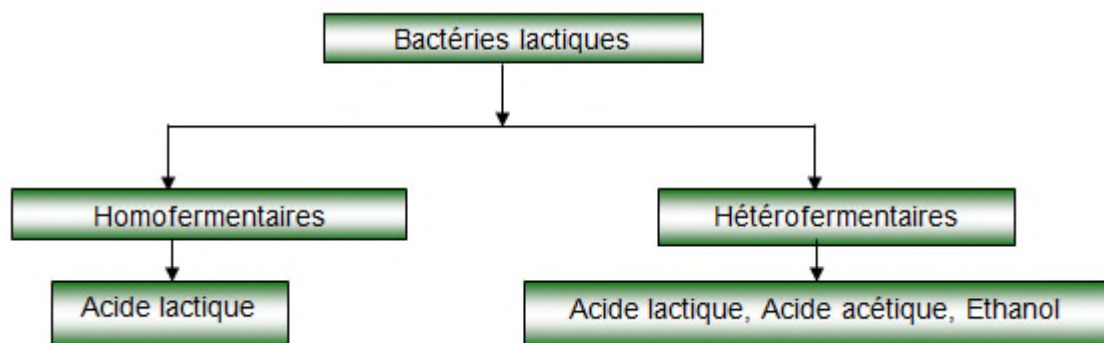


Figure 01 : Classification des bactéries lactiques selon leurs métabolites de fermentation (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

3. Rôle et intérêt des bactéries lactiques dans l'alimentation

Tous les types de produits alimentaires sont concernés par la fermentation lactique. Le lait conduira aux fromages et aux yaourts, les produits carnés aux saucissons et saucisses, les poissons à des sauces ou à des pâtes. Les produits végétaux peuvent aussi être transformés par cette fermentation qui assurera une bonne sécurité alimentaire, par acidification et production de bactériocines, ainsi que la qualité finale des aliments, par production de composés d'arôme (Desmazeaud, 1996).

Les bactéries lactiques sont généralement reconnues comme non toxiques. De plus, on peut désormais leur attribuer un rôle indéniable, bénéfique pour la santé Humaine (probiotique). Cependant, des cas extrêmement rares d'infections ont été relevés. Ils surviennent toujours dans un contexte clinique de lésion préalable ou de maladie sous-jacente

débilitante. Certaines souches ont été transformées par génie génétique, ce qui améliore leurs performances technologiques, mais ceci peut conduire à un risque écologique, nécessitant la mise en œuvre de vecteurs de clonage acceptables pour l'alimentation (Desmazeaud, 1996).

4. Les Lactobacilles

Les lactobacilles représentent un genre important des bactéries lactiques tant au niveau industriel qu'au niveau de la flore commensale infantile (Belarbi, 2011). Ce genre regroupe plus de 70 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous-espèces). Il est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques (Bekhouche, 2006).

Les souches de Lactobacilles sont constituées de bacilles long et fin (parfois incurvés) ou de coccobacilles dont la forme est proche à celle des corynébactéries. La production d'acide lactique issue du métabolisme fermentaire représente au moins 50 % des produits de fermentation (Bekhouche, 2006).

4.1) Habitat des Lactobacilles

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents (tableau I) : dans le lait et les fromages (*Lb. casei subsp. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. buchneri* et *Lb. san francisco*) (Bekhouche, 2006 ; Penaud, 2006).

Tableau I : Habitat des lactobacilles (Bekhouche, 2006 ; Penaud, 2006).

Environnement	Exemples
Plantes et produits végétaux	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. fructosus</i>
Sols, eau, eaux usées et compost	<i>Lb. sharpeae</i> , <i>Lb. agilis</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i>
Lait	<i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. kefir</i>
Viande	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. halotolerans</i> , <i>Lb. reuteri</i>
Légumes	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. cellobiosus</i>
Levain (pain)	<i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i>
Malt	<i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. brevis</i>
Ensilage	<i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. fermentum</i>
Cavité orale	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. oris</i> , <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. crispatus</i>
Tractus digestif	<i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. ruminis</i> , <i>Lb. acidophilus</i>
Vagin	<i>Lb. crispatus</i> , <i>Lb. jensenii</i> , <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. vaginalis</i> , <i>Lb.</i>

5. *Leuconostoc*

Le genre *Leuconostoc* a été défini par **Van Thieghem** en 1878. Le terme *Leuconostoc* vient du mot *Nostoc* qui est une algue bleue mucilagineuse et de *Leuco* qui veut dire blanc. Les *Leuconostocs* sont apparus à l'origine, sous forme de chaînette, d'aspect mucilagineux, non pigmentés. Les premières souches ont été isolées à partir d'accidents apparus dans des sucreries (**Devoyod et Poullain, 1988**).

Le développement des *Leuconostocs* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les *leuconostocs* principalement *Ln. mensentteroides* ssp. *cremoris* et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les Lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (**Pilet et al., 1998**).

4.2) Habitat des *Leuconostocs*

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries (**Bekhouche, 2006**).

Ce genre joue un rôle très important dans la fermentation des produits alimentaires variés. La source de la flore microbienne peut être de la matière première quant à la production des fromages de lait cru, de la choucroute et de quelques saucisses fermentées ou des cultures de ferments référencies (**Hanaachi, 2008**).

5. Utilisation industrielle des bactéries lactiques

L'utilisation des bactéries lactiques(BAL) dans l'alimentation est intéressante à plus d'un titre. En effet, outre les fermentations dont elles sont responsables, les BAL empêchent la multiplication d'autres espèces bactériennes pathogènes ou susceptibles de dégrader les produits alimentaires. Par exemple, bien que constitué de viande, le saucisson ne s'altère pas grâce à la présence de bactéries lactiques. Ces dernières s'opposent au développement de *Pseudomonas* par le biais de la production d'acide lactique, d'une petite quantité d'eau oxygénée et de lantibiotiques telle la nisine et ce, en exerçant une action protéolytique et lipolytique. De plus, ces bactéries contribuent à la texture, la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques. Pour toutes ces propriétés, elles sont exploitées dans la

technologie des fromages. Les BAL sont recherchées aussi pour leurs qualités nutritionnelles et thérapeutiques dans des préparations appelées probiotiques et pour la production de bactériocines (**Ennadir et al, 2014**).

Les bactéries lactiques demeurent encore utilisées sous forme de levains artisanaux, mais le développement de l'industrie de transformation a conduit à la production de ferments industriels capables d'assurer à la fois la qualité et la consistance du produit. Ces ferments sont des cultures pures ou un mélange appartenant aux genres : *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Bifidobacterium*. Vue l'importance attribuée aux bactéries lactiques dans les domaines de l'industrie pharmaceutiques et agroalimentaires, leur valorisation pourrait avoir de fortes retombées socio-économiques, scientifiques et environnementales (**Ennadir et al, 2014**).

6. La résistance à la salinité des bactéries lactiques

Le sel destiné à la consommation Humaine a un double rôle de nutrition et de conservation des aliments. La teneur en NaCl des aliments est très variable, allant de quelque pourcent pour les plats préparés, le pain, les fromages, à plus de 40% dans le cas de préparations très concentrées comme les bouillons en sachets (**Djelil, 2010**).

Suivant son degré de concentration en sel, l'eau salée n'autorise le développement que de certains micro-organismes au détriment d'autres qui sont soit détruits, soit inactivés. On dit que le sel est un antimicrobien sélectif ou un agent bactériostatique. Ce rôle, à la fois d'inhibiteur-retardateur et de régulateur-orientateur sur le développement et la prolifération des micro-organismes, est mis à profit en conserverie (**Erwan, 2001**).

Il arrive parfois que des micro-organismes indésirables et/ou leurs produits contaminent les aliments à l'origine d'altérations ou pire de maladies (**Erwan, 2001**).

6.1) Déterminisme de la résistance au sel

En raison de leur comportement en présence de sel, les micro-organismes peuvent être classés en deux groupes bien distincts l'un de l'autre auxquels s'adjoint un troisième ayant des caractéristiques intermédiaires :

➤ Les halophobes (ou halosensibles) ne supportent pas le sel, ils sont inhibés par des concentrations relativement faibles.

- Les halophiles ne se développant pas en l'absence du sel. La concentration en sel optimum pour leur croissance se situe toujours au delà de 2 %.
- Les halotolérants représentent un groupe intermédiaire qui supporte des teneurs très variables de sel. Ils se développent bien à des teneurs supérieures à 6 % de sel et même parfois jusqu'à saturation mais alors beaucoup plus lentement (**Erwan, 2001**).

6.2) Réponse des bactéries lactiques au stress hyperosmotique

Chez les bactéries lactiques la réponse à un choc hyperosmotique diffère l'égerment de celle des bactéries à Gram négatif. En effet, le cytoplasme des bactéries lactiques présente en conditions normales des cultures une concentration en potassium très élevés (environ 1ml), ainsi qu'un important pool d'acide aminé, le plus important étant le glutamate (**Boublenza, 2013**).

Des études récentes chez *Lb. plantarum* ont montré que, contrairement aux entérobactéries, la majeure partie du potassium se trouve à l'état lié dans la cellule et qu'il n'aurait donc peut être pas de rôle majeur dans le maintien de l'équilibre osmotique de ces cellules (**Boublenza, 2013**).

Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'augmentation de la concentration cytoplasmique en potassium en réponse à un choc hypertonique n'est observée que lorsque l'élévation de la salinité du milieu environnant est provoquée par du KCl et non du NaCl, suggérant que le transport des ions K^+ n'intervient pas en réponse à l'augmentation de la pression osmotique. La réponse initiale des bactéries lactique à une augmentation de pression osmotique dans le milieu environnant correspond à une accumulation immédiate de solutés compatibles tels que la proline et essentiellement la glycine bêtaïne dans leur cytoplasme (**Boublenza, 2013**).

En réponse aux chocs osmotiques, les bactéries ont développé des systèmes de défense efficaces qui reposent essentiellement sur l'accumulation de solutés compatibles dans leur cytoplasme. L'activation de ces systèmes nécessite que les cellules perçoivent les variations d'osmolarité de l'environnement et que l'information soit alors transmise et convertie en un signal qui déclenche une réponse au niveau moléculaire. Le premier point, la perception du signal osmotique, reste très mal compris. La deuxième étape de la réponse à un choc hypertonique est le traitement du signal osmotique qui aboutit au déclenchement d'une réponse moléculaire (**Romeo et al., 2001**).

A grayscale photograph showing a hand holding a needle, with a thin stream of liquid being dispensed into a petri dish containing a bacterial culture. The text 'Matériel et méthodes' is overlaid in the center in a purple, 3D-style font.

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie générale de l'université Abderrahmane Mira de Bejaïa au niveau du bloc 9, sous la direction de M^{me} Benachour K.

L'objectif de cette étude s'articule sur l'étude de la résistance au sel (NaCl) de quelques bactéries lactiques (*Lactobacillus* et *Leuconostoc*) isolées du beurre et du l'ben en cultures pure et mixte.

1. Origine des souches

11 souches de *Lactobacillus* et 4 souches de *Leuconostoc* isolées localement au laboratoire de microbiologie générale de l'université A. Mira de Bejaïa à partir du beurre et du l'ben, puis conservées à 4°C dans du bouillon MRS (Man, Rogosa et Sharpe) ont été utilisées dans cette étude (tableau II).

Tableau II: Présentation des bactéries lactiques utilisées

Genre	Souche	Origine
<i>Lactobacillus</i>	Lb 3Br	Souk el tnine
	Lb 16lb ₁	Souk el tnine
	Lb 10lb	Souk el tnine
	Lb 16lb	Oued ghir
	Lb 9Br	Souk el tnine
	Lb 15Br	Oued ghir
	Lb 13Br	Souk el tnine
	Lb 12lb	Souk el tnine
	Lb 6lb	Souk el tnine
	Lb 8lb	Souk el tnine
	Lb 7Br	Souk el tnine
<i>Leuconostoc</i>	LN 12lb	Souk el tnine
	LN 7Br	Souk el tnine
	LN 3lb	Souk el tnine
	LN 18Br	Taghzout

2. Revivification des souches

Etape 01 : Les souches utilisées sont des souches qui ont été en dormance à 4°C, revivifier dans 9ml de bouillon MRS stérile, puis incubés dans l'étuve (Memmert) à 30°C pendant 24 heures.

Etape 02 : Ensemencement en striés des souches de 24h sur les boîtes de Pétri (gélose MRS), puis incubés à 30°C pendant 48 heures (figure 3).

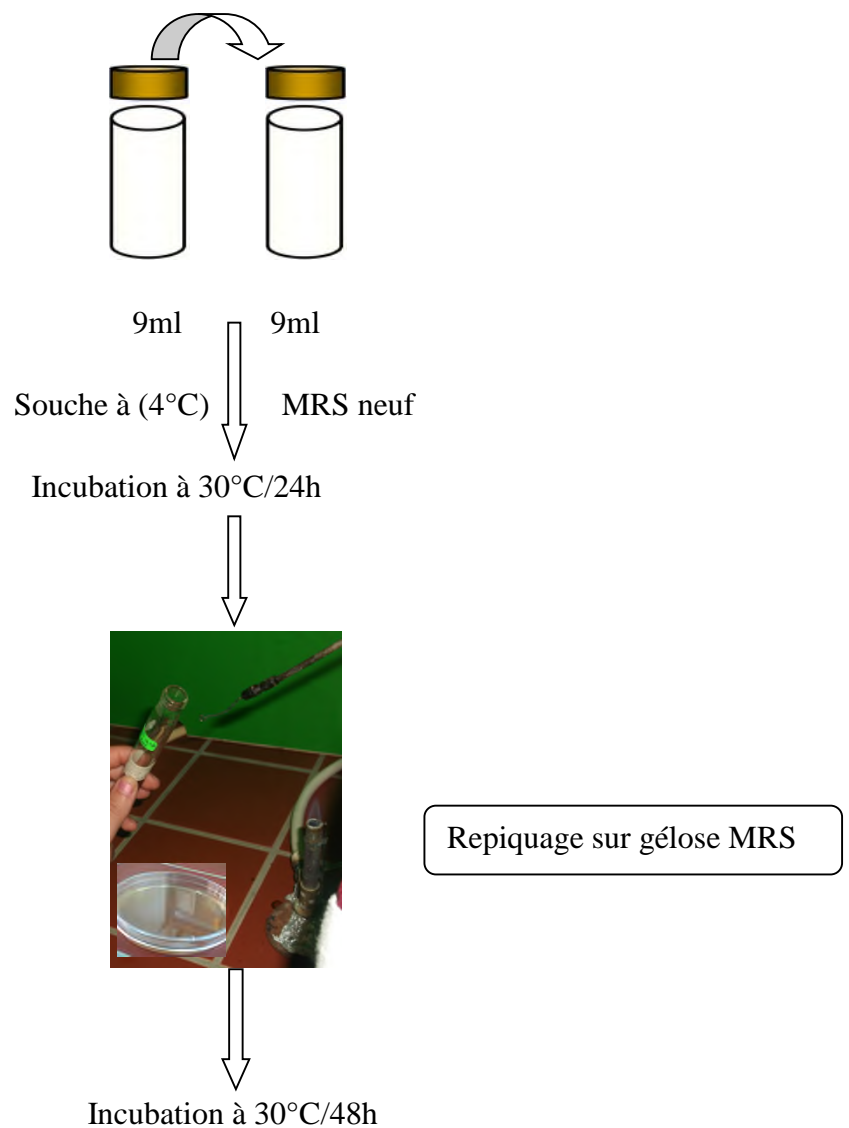


Figure 02 : Protocole de revivification des bactéries lactiques

3. Vérification de la pureté des souches utilisées

Il est obligatoire de vérifier la pureté des souches avant toutes utilisations. Après des repiquages successifs, un ensemencement sur gélose MRS est réalisé. Ainsi des tests simples et rapides sont mises au point et sont basés sur :

- Observation macroscopique de l'aspect des colonies ;
- La coloration de Gram ;
- Test de catalase ;
- Test de production du gaz.

3.1) Observation macroscopique

C'est une observation réalisée pour décrire l'aspect des colonies obtenues sur la gélose MRS et les caractères pris en compte sont : le relief, la taille, la couleur, l'aspect (collant, muqueux), l'odeur, la transparence et l'allure des contours.

3.2) Observation microscopique

L'examen microscopique est effectué par le microscope optique au grossissement (10X100). Il permet d'observer la morphologie des cellules : leur mode de regroupement et leurs caractères structuraux, et cela peut être effectué après la coloration de Gram d'une culture fraîche de 24h.

L'étude morphologique des bactéries nécessite la préparation d'un frottis coloré. Le frottis consiste en un étalement de la souche à étudier sur une lame propre, suivie d'un séchage, d'une fixation et éventuellement d'une coloration.

➤ La coloration de Gram

La coloration de Gram a pour but de classer les bactéries selon leur Gram (G⁻, G⁺), leur morphologie (cocci, bacille), et leur mode d'association (en chaînette, libre).

Elle est préparée par la coloration d'un frottis à l'aide de réactifs spécifiques, en commençant par l'application du violet de gentiane pendant 30s à 1min. Après recouvrement direct avec Lugol de ce dernier, on procède à une décoloration en versant l'alcool éthylique goutte à goutte sur la lame inclinée obliquement, puis rinçage avec l'eau distillée et

recoloration par la fuschine (30s à 1min). Après cette coloration, un rinçage et un séchage sont effectués en utilisant l'eau et le papier absorbant.

Pour l'observation microscopique (10 X100), on ajoute une goutte d'huile à immersion

3.3) Test de catalase

Une goutte d'eau oxygénée H_2O_2 à 10V est déposée sur une colonie développée pendant 24h à 48h sur gélose MRS, le résultat est immédiat et se caractérise par un dégagement gazeux (O_2) si la catalase est présente (figure 03).

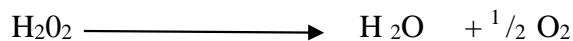


Figure 03 : Épreuve d'efférvaisance après addition du H_2O_2

3.4) Test de production de gaz (CO_2)

Des colonies bien isolées ont été ensemencées sur bouillon MRS renfermant une cloche de Durham. L'incubation se fait à une température de $30^\circ C$ pendant 24 à 48h

4. Standardisation de l'*inoculum* bactérien

Afin de travailler dans des conditions contrôlées en termes de population bactérienne, la standardisation des *inocula* est indispensable (figure 04).

Chaque souche est repiquée au terme de 2 à 3 colonies selon la taille bien isolées et bien distinctes dans des tubes à essais de 9ml de bouillon MRS et 9ml de lait, puis incubées à $30^\circ C$ pendant 18 à 20h pour celles qui sont dans le bouillon MRS, et 48h pour celles qui sont dans le lait.

Au terme de la période d'incubation, une série de dilution décimales allant jusqu'à 10^{-9} est effectuée, les dilutions 10^{-7} , 10^{-8} et 10^{-9} sont ensemencées en masse. Après incubation à $30^\circ C$ pendant 48h, le dénombrement des colonies obtenues est effectué.

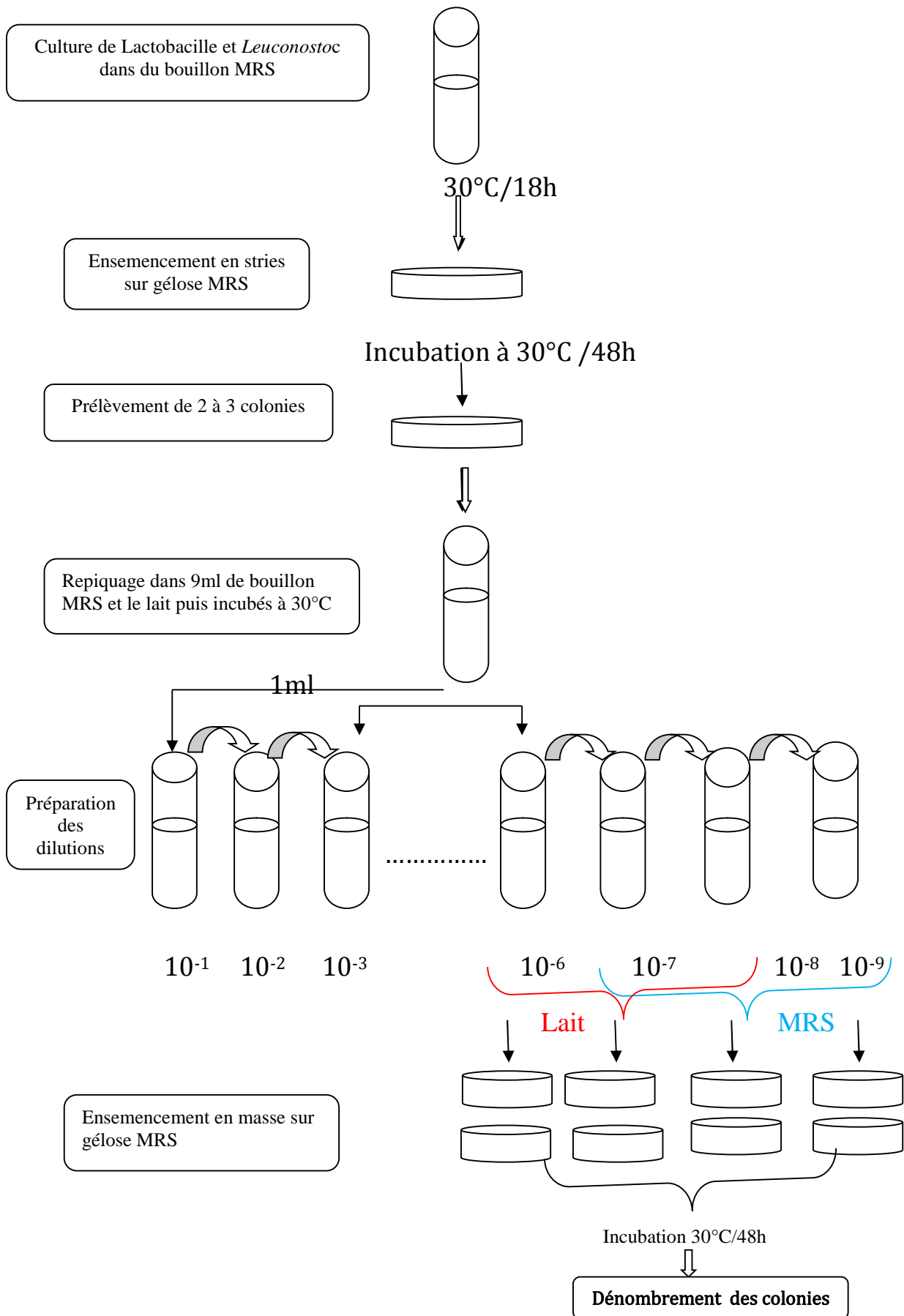


Figure 04 : Standardisation de l'*inoculum* bactérien sur le lait et le bouillon MRS

5. La croissance des souches à différentes concentrations de NaCl

Sur des tubes à essais contenant du bouillon MRS à différente concentration de NaCl (6,5% ; 8% et 10%), les souches choisies sont cultivées puis incubées à 30°C pendant 48h. Après l'incubation, leur croissance est déterminée par l'observation de leur turbidité en se référant à un tube témoin non ensemencé et incubé dans les mêmes conditions.

6. Cinétique de croissance des cultures pures dans le lait et le bouillon M17 à 10% NaCl

Un caractère spécial des bactéries lactiques est leur aptitude à résister à certaines concentrations de sel (NaCl). Les culots récupérés de la centrifugation (8000rpm/10min) des cultures fraîches des 15 souches utilisées, ont été ensemencé dans 10ml du bouillon MRS et incubées à 30°C pendant 24h. Après d'avoir versé chaque souche dans un flacon de 90ml du milieu (bouillon M17 et lait écrémé (Candia)) additionné de 100g/l de NaCl, une incubation à 30°C pendant 48h est réalisée. Le pH, l'acidité Dornic (et la croissance bactérienne (DO et dénombrement) pour les cultures sur le bouillon M17) sont mesurées chaque 3heures pendant le premier jour puis après 24h et 48h en prélevant à chaque fois 10ml de chaque culture bactérienne.

6.1) Mesure du pH

Le pH des échantillons a été déterminé directement en utilisant un pH mètre (HANNA) ou l'électrode est inséré directement dans chaque échantillon.



Figure 05 : Image démonstrative de la mesure du pH

6.2) Mesure de l'acidité Dornic

L'acidité Dornic a été mesurée selon la méthode normalisée au NaOH (N/9) en ajoutant 2 à 3 gouttes de phénolphthaléine à 1%(1g de phénolphthaléine/100ml d'éthanol). Après, un titrage est réalisé avec du NaOH à N/9 contenu dans la burette jusqu'à virage de couleur en rose persistant 30s.

L'acidité est calculée selon l'équation :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

V_{NaOH} : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.et le bouillon M17.

6.3) Evaluation de la concentration cellulaire

Un suivie de la croissance cellulaire est réalisé pour déterminé le taux de viabilité.

6.3.1) Préparation des dilutions

La préparation des dilutions décimales est effectuée à partir du prélèvement de 1ml de la solution mère (lait ; bouillon M17). Les dilutions préparées sont de 10^{-1} jusqu'à 10^{-9} .

6.3.2) Dénombrement des bactéries lactiques

Après la préparation des dilutions décimales, en prenant les dernies dilutions 10^{-6} à 10^{-8} pour le lait et 10^{-7} à 10^{-9} pour le bouillon M17, 1ml de ces dilutions est ensemencé en masse dans gélose M17 et incubation à 30°C/48h.

Les colonies sont comptées pour déterminer le nombre d'UFC/ml dans le lait ou le bouillon M17 au terme de l'incubation.

6.3.3) Détermination du taux de viabilité des bactéries lactiques utilisé

Le nombre de cellules viables est calculé à partir de colonies appropriées obtenues après incubation sur milieu adéquat et exprimé en UFC/ml. Le taux de survie est calculé selon l'équation donnée par **Ustunol et Gandhi (2001)** :

$$\text{Viabilité (\%)} = (\text{UFC après 48h d'incubation} / \text{UFC initial}) \times 100$$

6.3.4) Mesure de la Densité Optique (DO)

Le suivi de la croissance bactérienne dans le bouillon M17 à 10% de NaCl sur bouillon M17 est estimé par la mesure de la Densité Optique à 620 nm de chaque souche à des intervalles de temps régulier (0h, 3h, 6h, 24h et 48h), en utilisant un spectrophotomètre UV-VIS (UV Shimadzu, Jasco UV630).

7. Cinétique de croissance des cultures mixte dans le lait et M17 à 10% NaCl

Afin d'étudier l'effet d'une culture mixte sur le changement du pH, Densité Optique et de l'acidité Dornic, un suivie est réalisé sur bouillon M17 et du lait écrémé. Deux souches (un *Leuconostoc* et un lactobacille) sont recombinaées dans des flacons de 90ml du lait (et 45ml de bouillon M17). Les 5 souches choisis (4 lactobacilles : **Lb 9Br**, **Lb 7Br**, **Lb 16lb**, **Lb 10lb** et une *Leuconostoc* : **LN 7Br**) selon leur pouvoir acidifiant, ont étéensemencés sur du bouillon MRS, puis incubées à 30°C/24h. 5ml de chaque tube du lait (et 2,5 ml pour M17) sont versés dans des flacons de lait (de M17), puis incubés à 30°C/48h. Le pH, l'acidité Dornic (et la Densité Optique pour le bouillon M17) sont mesurés chaque 3heures pendant le premier jour puis après 24h et 48h.

A petri dish containing a bacterial culture on a dark agar surface. The culture shows a dense, confluent growth of small, white, circular colonies. The colonies are arranged in a somewhat circular pattern, with a higher density in the center and a more sparse distribution towards the edges. The petri dish is made of clear plastic and is set against a dark blue background.

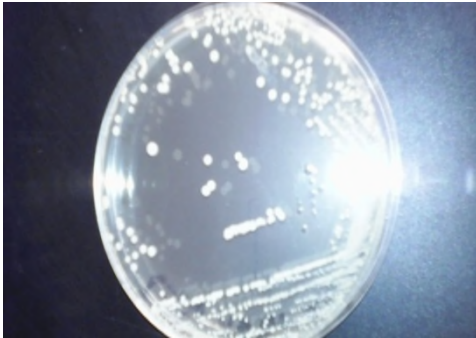
Résultats et discussion

1. Vérification de la pureté des bactéries lactiques utilisées

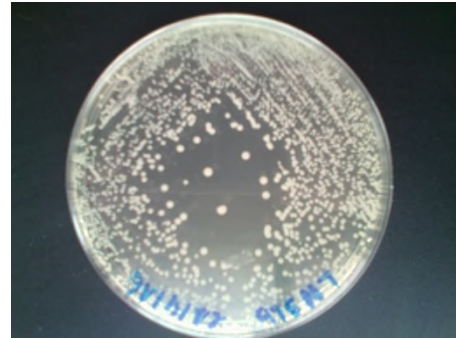
1.1) L'aspect macroscopique

❖ Sur milieu solide

L'examen macroscopique des bactéries lactiques sur gélose MRS révèle que les colonies formées présentent toutes un aspect lisse, de couleur blanchâtre, à contour régulier et d'un diamètre qui varie entre 0,5 et 2mm (**figure 06**) (**tableau I en l'annexe I**).



Aspect d'une souche de *Lactobacillus*

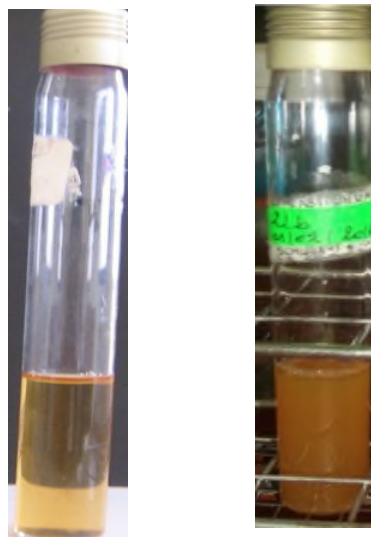


Aspect d'une souche de *Leuconostoc*

Figure 06 : L'aspect macroscopique des bactéries lactiques sur gélose MRS

❖ Sur milieu liquide

La croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble homogène fumeux dans le bouillon MRS, ce trouble est concentré au fond du tube à la recherche des conditions anaérobiques de ces bactéries. La **figure 07** montre l'aspect du trouble.



Témoin Croissance bactérienne

Figure 07 : Aspect d'une culture pure dans un bouillon MRS

1.2) L'aspect microscopique

L'étude microscopique est basée sur la coloration de Gram qui nous a permis de confirmer que les bactéries étudiées sont de Gram positif (**figure 08**) et se présentent sous forme de bacilles (pour les Lactobacilles) ou de coccobacilles (pour les Leuconostocs) avec différents modes d'association. Les résultats sont illustrés dans le **tableau I en annexe I**.

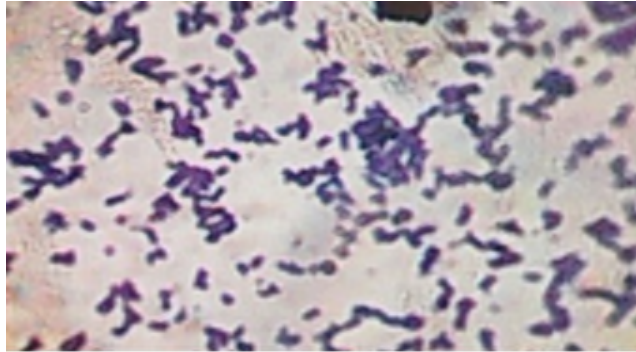


Figure 08 : Observations des bactéries lactiques au microscope optique (10X100).

1.3) Test de catalase et de production de gaz

Les souches étudiées sont catalase négative car il n'y a pas de dégagement gazeux. Elles sont dépourvues d'activité catalasique. Les résultats obtenus confirment la pureté et l'appartenance des souches au groupe lactique (**tableau I en annexe I**).

La présence du gaz dans la cloche de Durham (**figure 09**), indique que ces bactéries sont des hétérofermentaires (**tableau I en annexe I**).

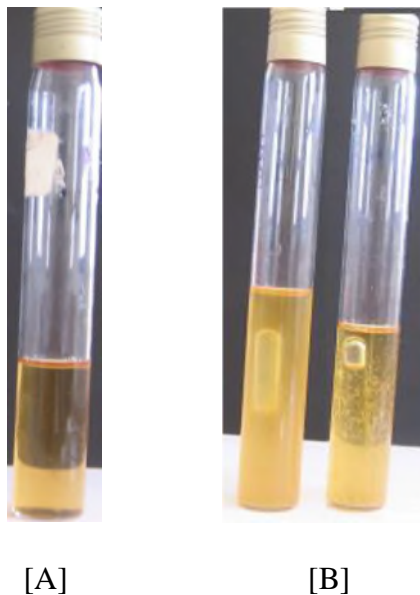


Figure 09 : Type fermentaire sur bouillon MRS contenant une cloche de Durham ([A] témoin, [B] production de gaz).

2. Standardisation

Les résultats de la standardisation de l'inoculum ont montré que 2 à 3 colonies (selon la taille) prélevées sur gélose MRS (48h/ 37°C), puis ensemencées sur bouillon MRS (18h) ou le lait (48h) ensuite incubées à 30°C, donnent un inoculum au alentour de 10^{10} UFC/ml (**tableau III**).

Tableau III : Les résultats de la standardisation.

Souches	Nombre de colonies prises	MRS normal UFC/ml	Lait écrémé UFC/ml
Lb 6lb	2colonies	2×10^{10}	$5,3 \times 10^{10}$
Lb 9Br	3colonies	$1,04 \times 10^{10}$	$7,4 \times 10^{10}$
Lb 16lb	3colonies	$0,5 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^{10}$
Lb 8lb	2colonies	$1,5 \times 10^{10}$	$6,1 \times 10^{10}$
LN 18Br	2colonies	$3,2 \times 10^{10}$	1×10^{10}
LN 7Br	3colonies	$1,5 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^{10}$
Lb 15Br	3colonies	$1,07 \times 10^{10}$	$6,2 \times 10^{10}$
LN 3lb	3colonies	$2,1 \times 10^{10}$	$0,5 \times 10^{10}$
Lb 7Br	2colonies	$12,9 \times 10^{10}$	$9,8 \times 10^{10}$
Lb 10lb	3colonies	$13,9 \times 10^{10}$	$5,1 \times 10^{10}$
Lb 16lb1	3colonies	$1,55 \times 10^{10}$	$4,2 \times 10^{10}$
Lb 13Br	3colonies	$4,98 \times 10^{10}$	$5,1 \times 10^{10}$
Lb 12lb	3colonies	$1,05 \times 10^{10}$	9×10^{10}
LN 12lb	3colonies	$1,2 \times 10^{10}$	$0,7 \times 10^{10}$
Lb 3Br	3colonies	$1,34 \times 10^{10}$	2×10^{10}

3. La croissance des souches à différentes concentrations de NaCl

La mise en culture des souches en présence de 6,5%, 8%, 10% de NaCl, nous a permis d'évaluer leurs aptitudes à croître en présence de ces différentes concentrations. Les résultats obtenus montrent trois groupes de bactéries (**tableau IV**).

Tableau IV : Résultat de la croissance à différente concentration de NaCl.

Souches	% de NaCl		
	6,5%	8%	10%
Lb6lb	++	+++	++
Lb9Br	++	++	++
Lb16lb	+++	++	+
Lb8lb	++	++	++
LN18Br	++	+	+
Lb3Br	++	++	++
LN7Br	++	++	++
Lb15Br	++	++	+++
LN3lb	++	++	++
Lb7Br	++	++	++
Lb10lb	++	++	++
Lb16lb1	++	++	+
Lb13Br	++	++	++
Lb12lb	++	++	++
LN12lb	++	++	+

- Des souches avec une croissance maximale (+++)
- Des souches avec une croissance moyen (++)
- Des souches avec une légère croissance (+)

Les résultats enregistrés ont montré que :

La plus part des souches isolées sont capable de croitre sur bouillon MRS avec une concentration de NaCl de 6,5% ,8% et 10%, seulement trois souches parmi les 15 ont une croissance maximal : **Lb 16lb** à 6,5% ($1,5 \times 10^9$), **Lb 6lb** à 8% ($0,5 \times 10^7$), et **Lb 15Br** pour une concentration de 10% de NaCl (6×10^7).

Les résultats obtenues de la croissance des souches à 6,5% ; 8% ; 10% de NaCl ont une similarité concernant les lactobacilles avec les recherches de **Elizete et Carlos (2005)**, au cas où des lactobacilles isolés du tractus gastro-intestinale du porc qui sont tolérante à 4-8% NaCl. Et concernant les *Leuconostocs* avec les recherches de **Zadi Karam et Karam (2006)**, sur la confirmation de l'identification des lactocoques résistants à 6,5% de NaCl qui appartenait aux espèces *Leuconostoc*.

4. Cinétique de croissance des cultures pures dans le lait à 10% de NaCl

4.1) Mesure du pH

Les résultats de la mesure du pH à différentes phases de croissance bactérienne dans le lait à 10% de NaCl sont révélés dans la figure 10 (courbes a, b, c).

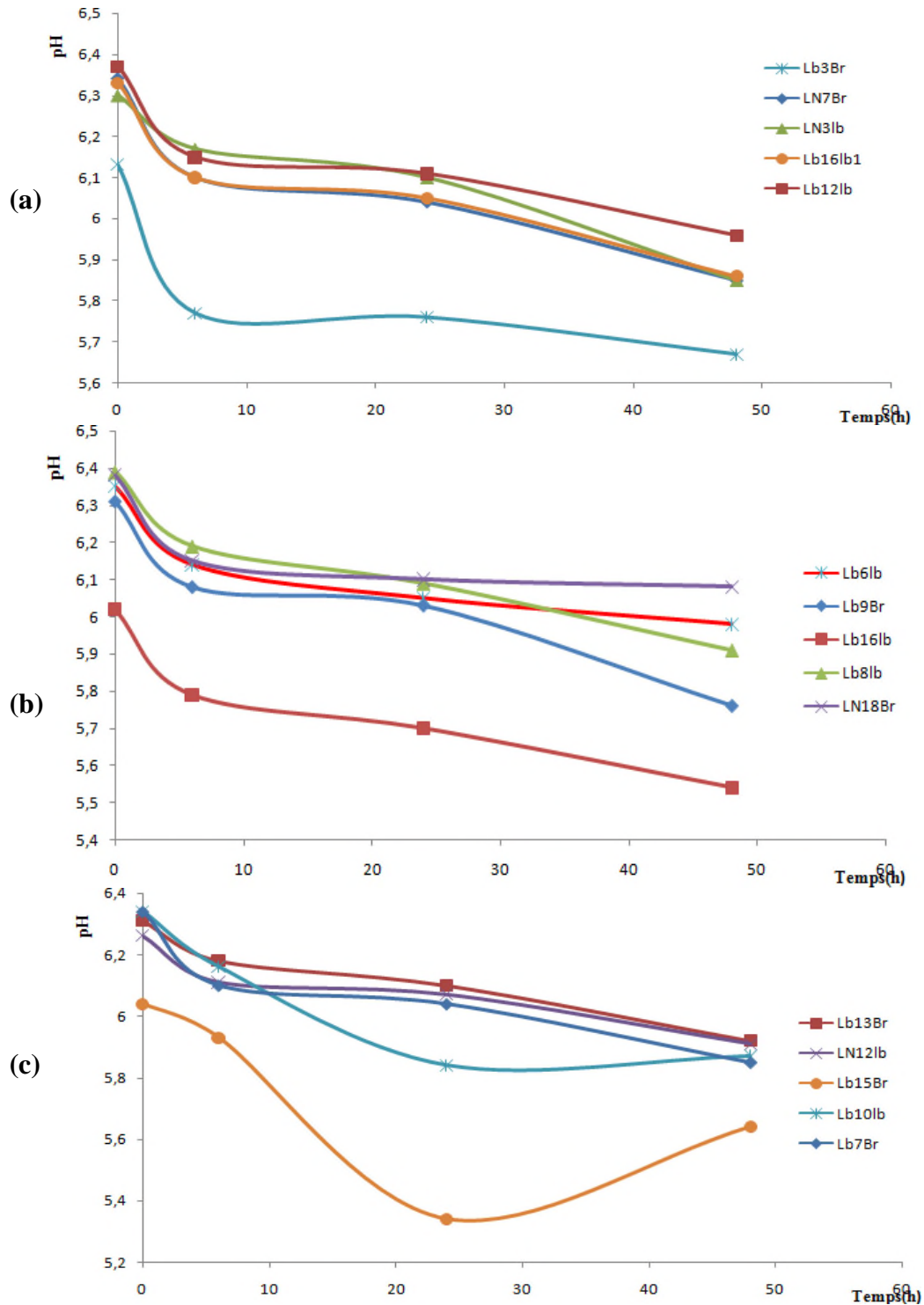


Figure 10 : Variations du pH au cours de la fermentation du lait à 30°C

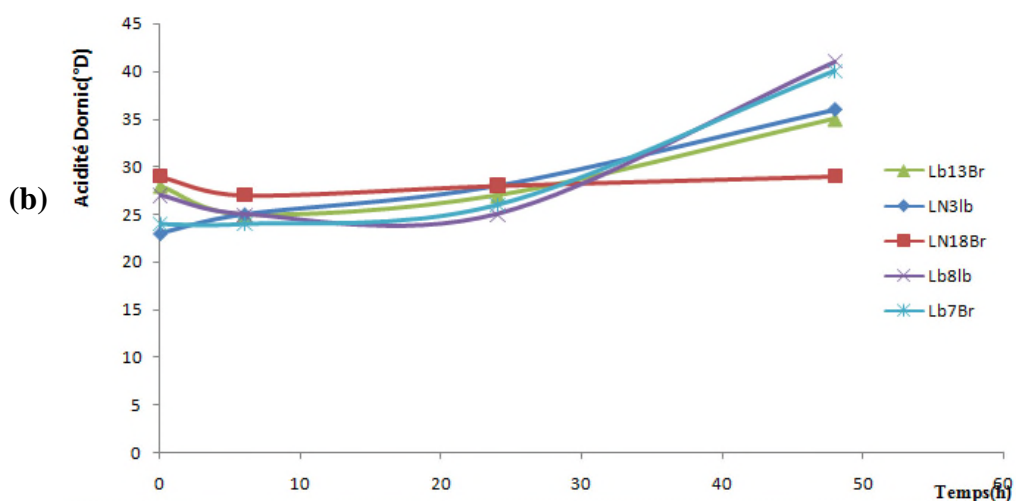
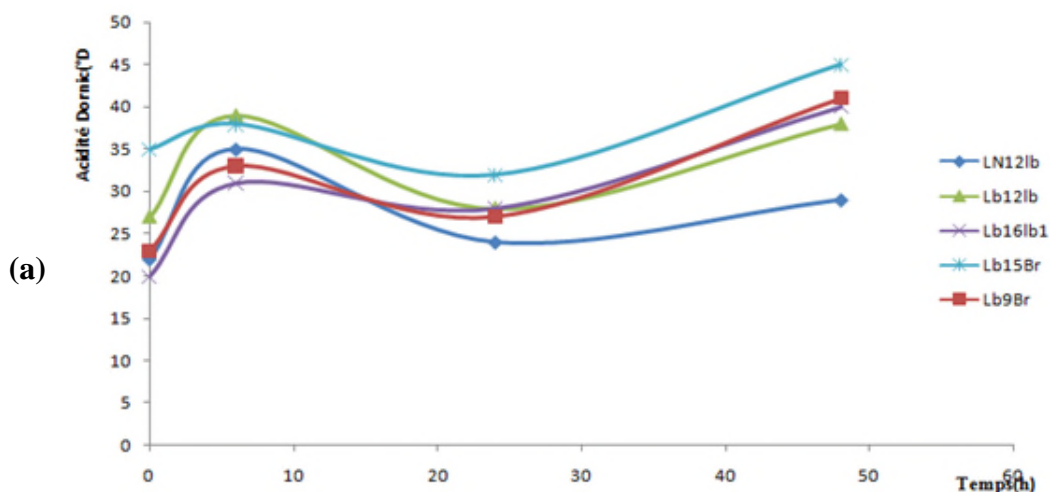
La moyenne enregistrée du pH des 15 souches à t=0h est de 6,28.

Les graphes représentant les 12 souches, montrent une même allure au cours des 48h d'incubation. Les taux de diminution les plus remarquables sont enregistrés chez **Lb 16lb1** et **Lb 3Br** (figure 10 (a)) entre 0h et 48h avec des ΔpH 0,48 et 0,46 respectivement.

Les variations du pH pour les deux souches **Lb 15Br** et **Lb 10lb** (figure 10 (c)) se ressemblent, et s'agit d'une diminution remarquable de 0,4 et 0,48U à 24h, puis augmente à 5,64 et 5,87. **Lb 7Br** (figure 10 (c)) montre une forme inverse entre 6 et 48h par rapport aux deux premières. Elle enregistre une augmentation de 1,78U de 6 à 24h suivie d'une diminution qui atteint 5,67 à 48h.

4.2) Mesure de l'acidité Dornic

Les résultats de la variation de l'acidité Dornic au cours des 48h d'incubation dans le lait à 10% de NaCl sont rapportés dans la figure 11 (graphe a, b et c).



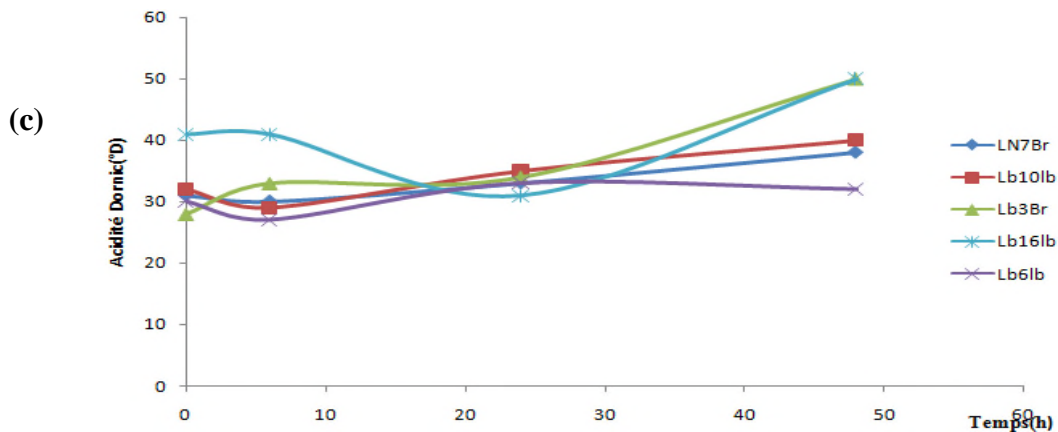


Figure 11 : Evolution de l'acidité Dornic au cours de la fermentation de lait à 30°C

Il apparait dans la Figure 11 que la présence de NaCl entraîne un ralentissement de la production de l'acide lactique atteint au terme de la fermentation. Nous avons cependant constaté que **LN 3lb**, **Lb 7Br**, **LN 18Br**, **Lb 13Br** (figure 11 (b)), **LN 7Br**, **Lb 3Br** et **Lb61b** (figure 11 (c)), exhibent une production élevée malgré le stress salin. Cependant, la forme générale des courbes indiquent que les cellules gardent une aptitude à produire l'acide lactique même en présence de NaCl.

Les résultats de la production d'acide lactique sont légèrement variables d'une souche à une autre. Mais les souches remarquables et qui donnent une meilleure acidification sont **Lb 9Br**, **Lb 16lb1** (figure 11 (a)), **Lb 3Br** (figure 11 (c)) et **Lb 7Br** (figure 11 (b)) avec des $\Delta^{\circ}\mathbf{D}$ de 19 ; 20 ; 23 ; 16°D à 48h respectivement.

Les résultats montrent que le Ph diminue chez les 15 souches. Ce phénomène s'explique par la poursuite de la fermentation du lactose et la production d'acide lactique malgré la présence de NaCl.

On constate que les souches du genre *Lactobacillus* ont une activité acidifiante plus importante que celle obtenues par le genre *Leuconostoc* dont la valeur maximal pour *Leuconostoc* est de 38°D à Ph 5,85 ; et de 50°D à Ph 5,54 pour le genre *Lactobacillus*.

Nos résultats ont une ressemblance avec les résultats obtenus par **Lairini et al. (2014)** qui montrent que tous les Lactobacilles provoquent une diminution du Ph du lait de 6,5 au 4,2 au bout de 24 heures de fermentation. Tandis que le lait ensemencé par les *Leuconostoc* montre une très faible diminution du Ph. Selon **Cogan et al (1997)**, les bonnes bactéries lactiques acidifiantes sont celles qui sont capables de réduire le Ph du lait de sa valeur initiale d'environ 6,6 à 5,3 sur une durée de 6 heures.

Par contre, concernant l'augmentation du Ph des 2 souches **Lb15Br** (figure 11 (a)) et **Lb10lb** (figure 11 (c)) après 24h, et selon **Sicard (2010)**, elle est due à la digestion enzymatique des constituants du caillé qui va donner les caractéristiques organoleptiques, et non la coagulation qui se réalise principalement par diminution du Ph (**Leksir, 2012**).

4.3) Etude de la vitesse d'acidification

Afin d'étudier le potentiel technologique des 15 souches en calculant la vitesse d'acidification (ΔpH) (**figure 12**), les propriétés de ces souches sont évaluées sur le lait écrémé à 10% de NaCl. Selon ce critère les souches sont classées en deux groupes : lentes et moyennes (**Tableau IV en annexe I**).

La figure 12 montre les ΔpH à 24h et à 48h après incubation à 30°C

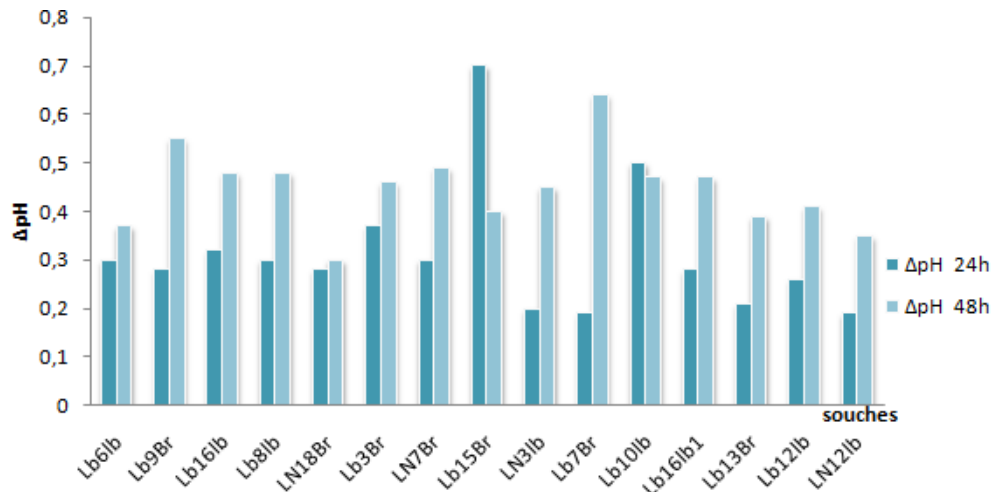


Figure 12 : Variation de la vitesse d'acidification des 15 souches à 24h et 48h

Les résultats pris sont ceux de 48h car l'acidité Dornic est plus élevée à ce temps.

Nos résultats ont révélé que la majorité des souches ont un pouvoir acidifiant lent, du fait que leur ΔpH ne dépasse pas 0,5U. Par contre, **Lb 9Br** et **Lb 7Br** montre une vitesse d'acidification moyenne avec des ΔpH de 0,55 et 0,64U respectivement.

5. Cinétique de croissance des cultures pures dans le bouillon M17 à 10% de NaCl

5.1) Mesure de la Densité Optique

La cinétique de croissance cellulaire dans le bouillon M17 inoculés par les différents ferments étudiés est illustrée dans la Figure 13 (a, b, c) représentatif de la Densité Optique.

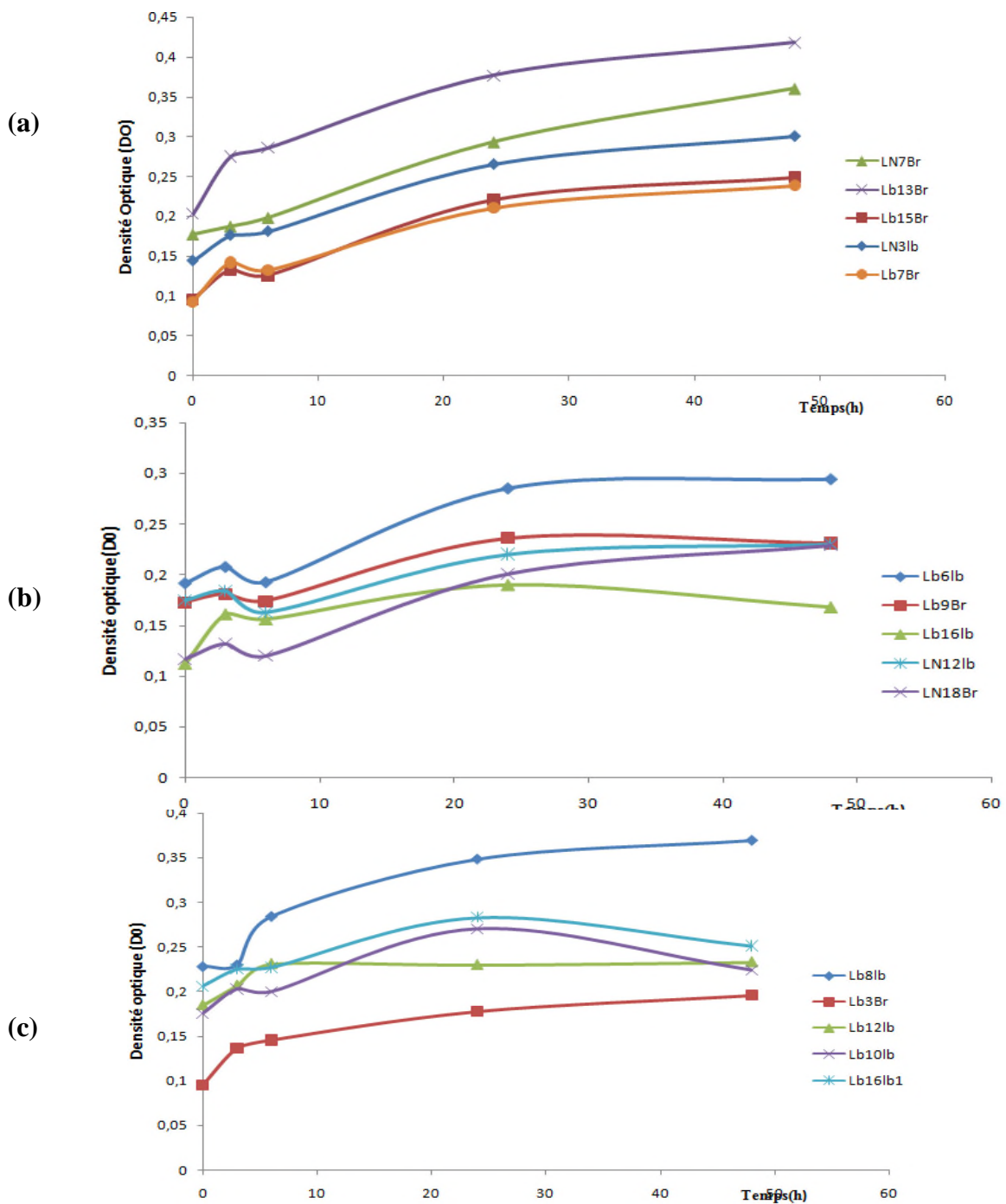


Figure 13 : Evolution de la Densité Optique dans le bouillon M17 des cultures pures incubées à 30°C

Les 15 souches montrées dans la figure 13, révèlent tous une résistance à NaCl. La croissance qui est exprimée en DO augmente pour toutes les souches. Juste que l'on remarque une diminution entre 24h et 48h chez **Lb 16lb** (figure 13 (b)), **Lb 10lb** et **Lb16lb1** (figure 13 (c)) de 0,022 ; 0,046 U et 0,032 respectivement.

Les valeurs maximales de la Densité Optique sont rencontrées chez **Lb 13Br** (figure 13 (a)), **Lb 6lb** (figure 13 (b)) et **Lb 8lb** (figure 13 (c)) avec des DO de 0,418 ; 0,294 et 0,369.

Selon **Boublenza et al(2011)** dans son étude sur les réponses physiologiques au stress salin et l'osmoprotection avec la proline sur des souches de *Lactococcus*, la croissance dans le milieu M17 sans sel dépend des souches ; la majorité des souches montre une bonne croissance (DO_{600nm} >1), alors que peu montre une croissance limitée (DO_{600nm} plus de 0,8). Les résultats obtenus montrent tous une croissance moins de 0,5 à 620nm avec une croissance maximale de 0,418 remarquée chez **Lb 13Br**. Selon elle, l'addition de 1,1 ou 1,2M de NaCl au bouillon M17, affecte la croissance de la majorité des souches.

D'après **Romeo et al(2001)** sur la réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum*, une augmentation de la concentration en sel dans le milieu externe entraîne un arrêt de croissance des bactéries. Ainsi, la croissance de *L. lactis* dans un milieu à 2,5% NaCl (concentration proche de celle rencontrée dans certains fromages) est réduite de 25% à 50% par rapport à une croissance à pression osmotique normale.

5.2) Taux de viabilité

Les études du taux de viabilité (**figure 14 et tableau VI en Annexe I**) indiquent que la résistance ou la sensibilité des cellules à un stress donné diffère d'une souche à une autre ce qui indique qu'il peut s'agir d'un effet souche.

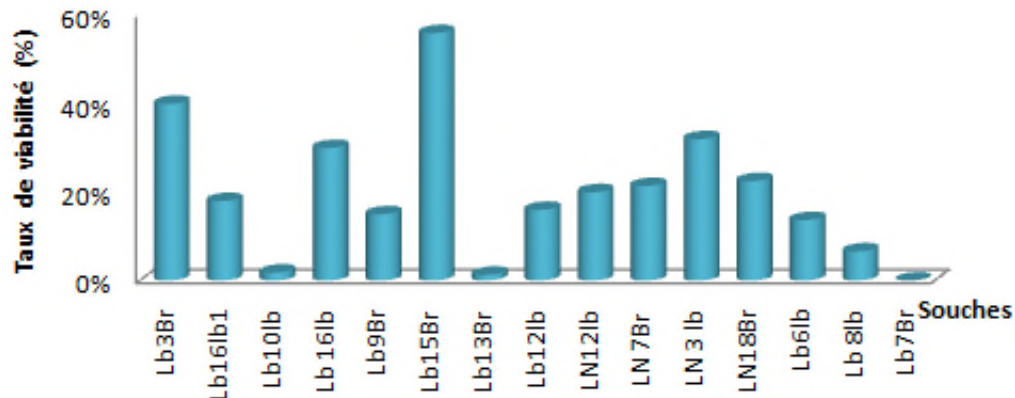


Figure 14 : Taux de survie des Lactobacilles et Leuconostocs dans le bouillon M17 à 10% de NaCl

Les souches les plus résistantes au NaCl sont enregistrées chez **Lb 15Br** et **Lb 3Br** avec des taux de viabilité de 56 et 40% respectivement, contrairement à **Lb 7Br**, **Lb 13Br** et **Lb 10lb** qui diminuent de 0,75 ; 1,3 et 1,8 (**figure 14**).

Les effets du stress sur la croissance sont essentiellement dépendants de la nature et de l'intensité du stress (**Kim et al., 1993**). Les stress physico-chimiques semblent permettre la croissance tant que les niveaux létaux de stress ne sont pas atteints, à l'inverse la viabilité semble profondément affectée lors de stress physico-chimique alors qu'elle est altérée dans une proportion moindre lors des carences nutritionnelles (**boublenza, 1993**).

Un choc hyper-osmotique à 10% NaCl, a peu d'effet sur la viabilité des cellules stressées. Ces données suggèrent que les Lactobacilles et les Leuconostocs sont particulièrement résistants au choc hyper-osmotique. Ces deux genres sont donc capables de survivre à des stress salins intenses de longue durée.

5. 3) Mesure du pH

L'évolution du pH sur bouillon M17 inoculé par les différents ferments lactiques analysés est illustrée dans la figure 15 (a, b, c).

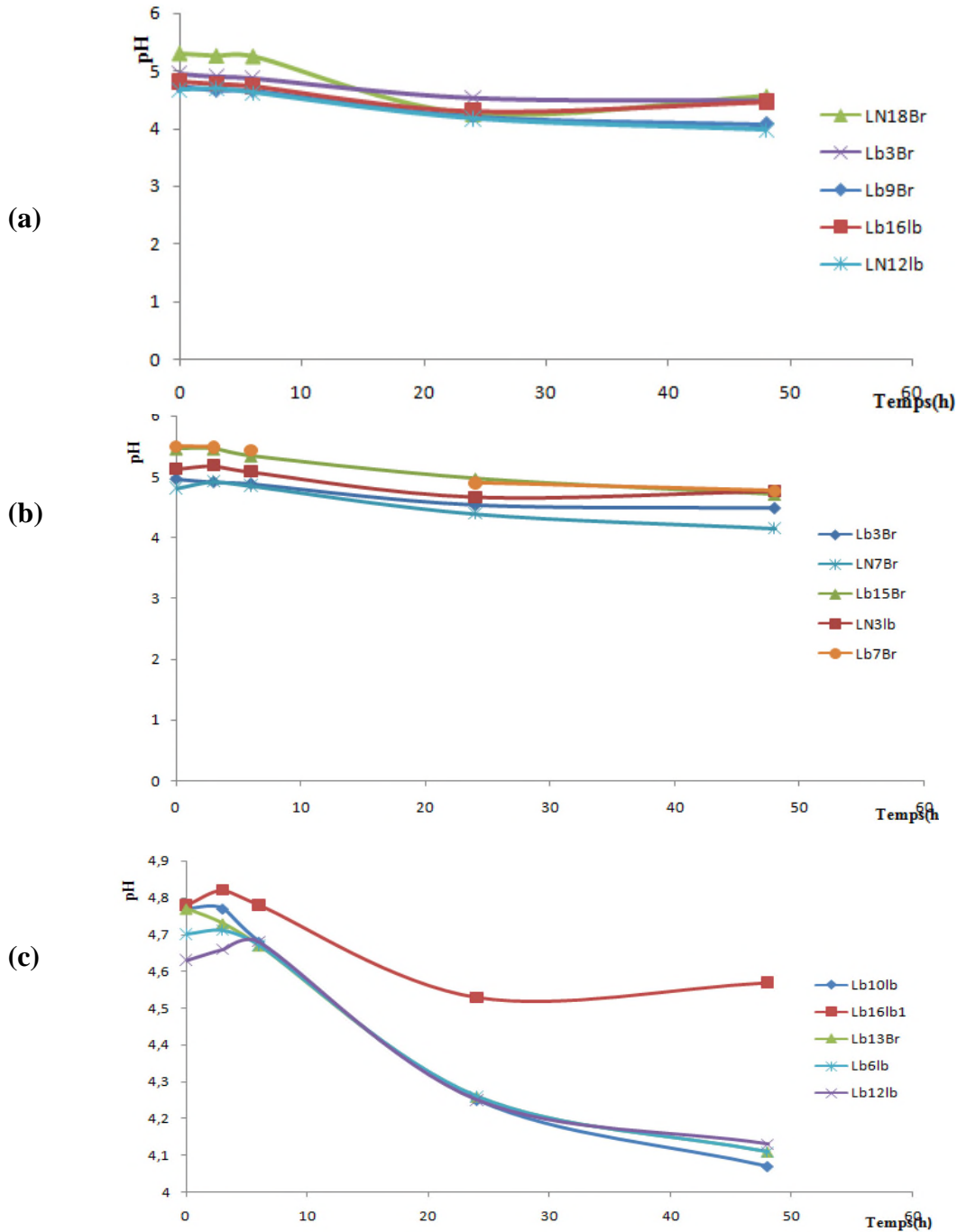


Figure 15 : Evolution du pH dans le bouillon M17 des cultures pures

Le pH chez **Lb 6lb**, **Lb 12lb**, **Lb 13Br** et **Lb 10lb** (figure 15 (c)) entre 0h et 48h et **LN 18Br** (figure 15 (a)) entre 6h et 24h présentent les valeurs les plus basses avec des Δ pH de

l'ordre de 0,45 ; 0,1 ; 0,1 ; 0,55 et 1U respectivement. Par contre, **Lb 16lb**, **LN 18Br** (figure 15 (a)), **Lb 16lb1** (figure 15 (c)) révèle une légère augmentation de 0,16 ; 0,06 ; et 0,07U de 24h à 48h.

5.3) Mesure d'acidité Dornic

L'évaluation de l'acidité Dornic enregistrés pour les 15 souches est indiquée dans la figure 16 (a, b, c).

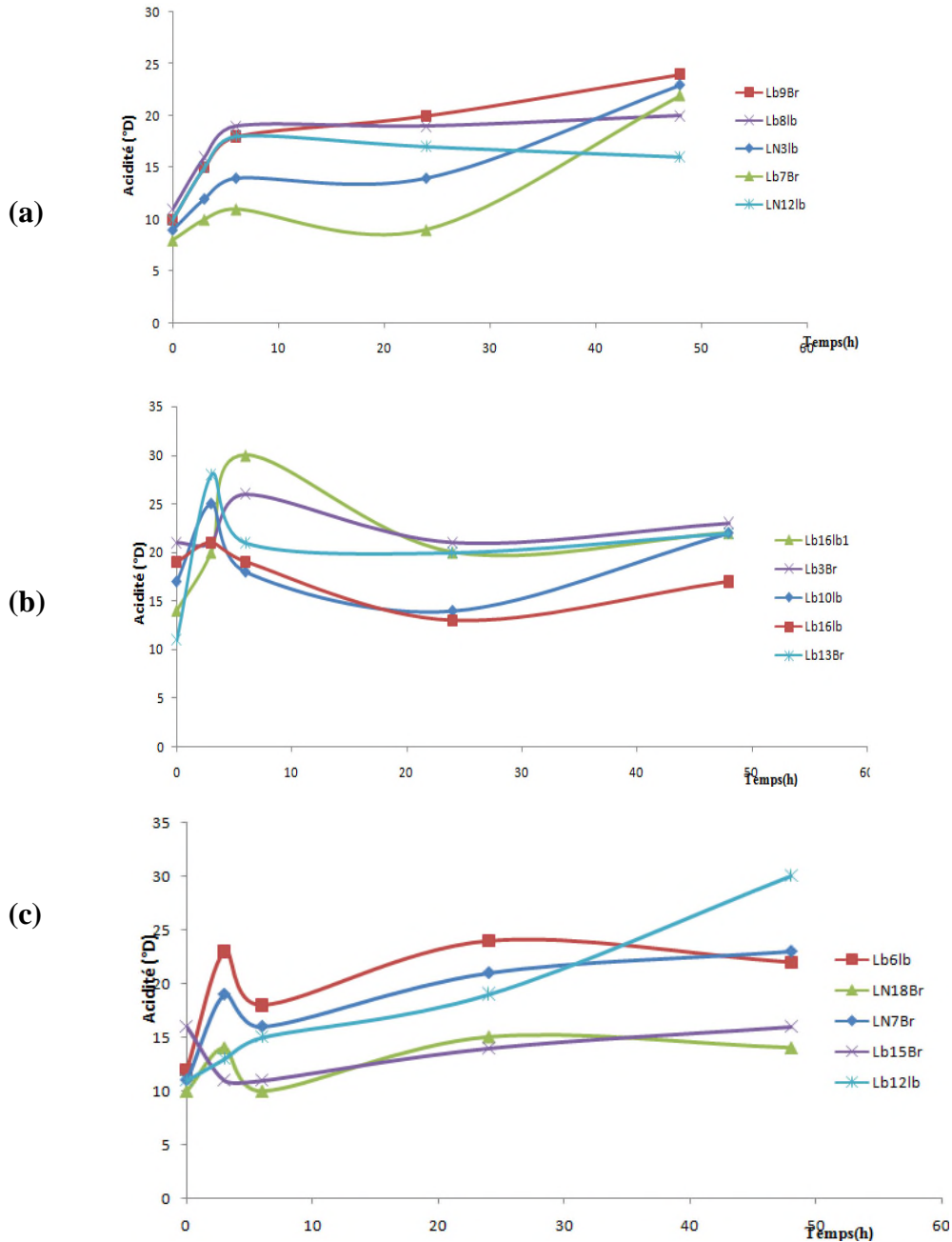


Figure 16 : Variation de l'acidité Dornic dans le bouillon M17 des cultures pures incubées à 30°C.

Les résultats montrent que le pH diminue chez les 15 souches. Ce phénomène s'explique par la poursuite de la fermentation du lactose du milieu M17 et production d'acide lactique malgré la présence de NaCl.

Les résultats de la production d'acide lactique sont légèrement variables d'une souche à un autre. Mais les souches remarquables et qui donne une meilleure acidification sont **LN 3lb**, **Lb 9Br**, **Lb 7Br** (figure 16 (a)) et **Lb 12lb**(figure 16 (c)) de 0h à 48h, **Lb 13Br** pendant les 3 premières heures et **Lb 16lb1** (figure 16 (b))durant 6heurs, avec des augmentations de 9 ; 14 ; 13 ; 19 ; 17 et 16°D respectivement.

6. Cinétique de croissance des cultures mixtes dans le bouillon M17 à 10% NaCl

6.1) Mesure de la Densité optique

Les valeurs de la DO_{620nm} sont représentées sous forme de cloches (figure 17) ; de 0 à 24h, on note une augmentation du taux de croissance, et une diminution progressive jusqu'à des valeurs très basses (0,357) entre 24h et 48h. Cette observation est la même pour les trois souches (**Lb 16lb**, **Lb 9Br** et **Lb 10lb**). Les graphes obtenus indiquent que c'est un phénomène bi phasique. En revanche, on remarque une augmentation de la DO chez **Lb7Br** jusqu'à atteindre 0,49 à 24h puis diminue directement jusqu'à 0,349 à 48h.

Ceci implique que le NaCl modifie et affect directement la croissance des bactéries.

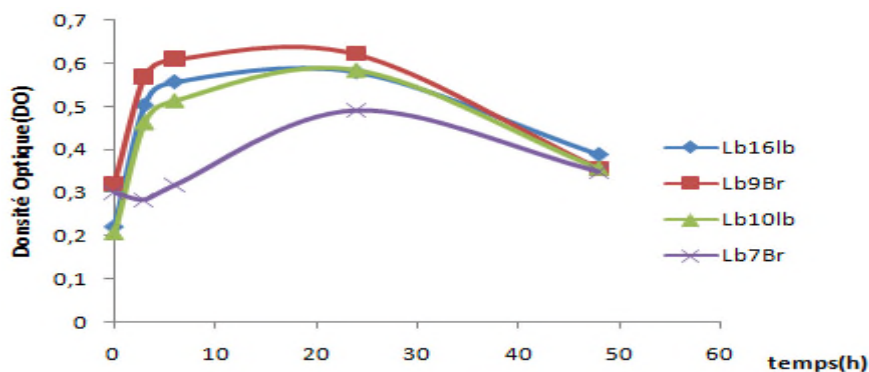


Figure 17 : Evolution de la Densité Optique dans le bouillon M17 des cultures mixtes incubées à 30°C

6.2) Mesure du pH

D'après les résultats obtenus (figure 18), nous remarquons que les graphes représentant les quatre souches (**Lb 16lb**, **Lb 10lb**, **Lb 7Br** et **Lb 9Br**) montrent une même allure, où elles diminuent de 0,8 ; 0,62 ; 0,79 et 1,18U respectivement.

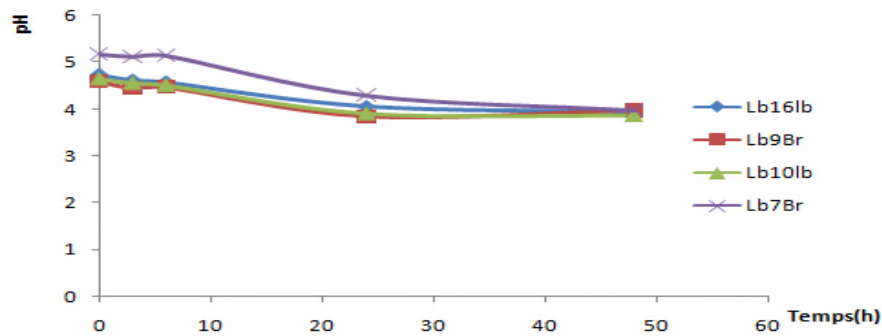


Figure 18 : Evolution du pH dans le bouillon M17 des cultures mixtes incubées à 30°C.

6.2) Mesure de l'acidité Dornic

Selon la figure 19, l'acidité Dornic des 3 souches (**Lb 9Br**, **Lb 10lb** et **Lb 7Br**) diminue au cours des 3 premières heures puis augmente progressivement. A partir de 24h on remarque un autre rebais chez **Lb 10lb** et **Lb 9Br**, alors qu'il y a stabilisation chez **Lb 7Br**. D'autre part, **Lb 16lb** montre une augmentation linéaire de l'acidification et qui se stabilise à partir de 6h où la valeur enregistrée est de 28°D.

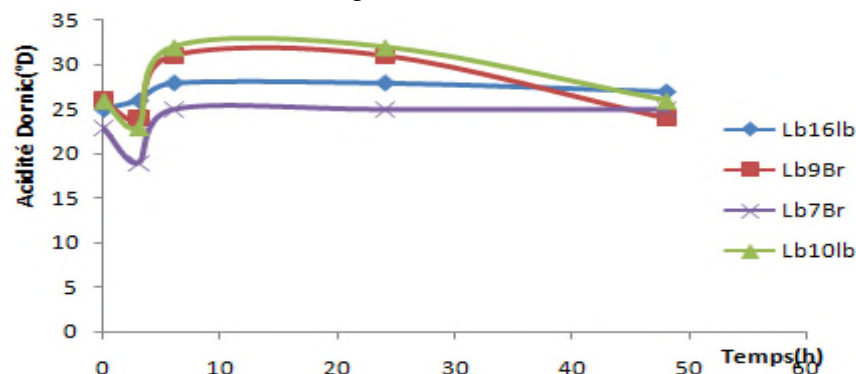


Figure 19 : Variation de l'acidité Dornic dans le bouillon M17 des cultures mixtes incubées à 30°C

Les profils d'acidification du bouillon M17 diffèrent selon le type de la culture (pure ou mixte). La culture pure constituée uniquement de Lactobacilles ou de Leuconostocs acidifie le lait jusqu'à pH 4,07 avec une fermentation lente au début. Le profil

d'acidification est presque le même chez toutes les combinaisons, avec une acidification rapide au début de la fermentation et un pH 3,86 après 48 heures.

Nos résultats sont similaires à ceux de **Lairini et al., (2014)** sur l'isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir, où il a trouvé que la culture pure constituée uniquement de Lactobacilles acidifie le lait jusqu'à pH 4,4 avec une fermentation lente au début. Les cultures mixtes constituées de 50% de Lactobacilles et 50% de Leuconostocs ont une acidification rapide au début de la fermentation et un pH 4,4 après 24 heures de fermentation.

7. Cinétique de croissance des cultures mixtes dans le lait à 10% NaCl

7.1) Mesure du pH

D'après les résultats obtenus (figure 20), nous remarquons que les quatre souches (**Lb 16lb, Lb 10lb, Lb 7Br et Lb 9Br**) montrent un changement analogue au cours des 3 premières heures d'incubation, où elles augmentent de 0,25 ; 0,25 ; 0,19 et 0,23U respectivement. Puis une stabilisation est remarquée jusqu'à 6h, et juste après, une diminution est enregistrée jusqu'à 48h de 0,38 ; 0,33 ; 0,3 et 0,33U respectivement.

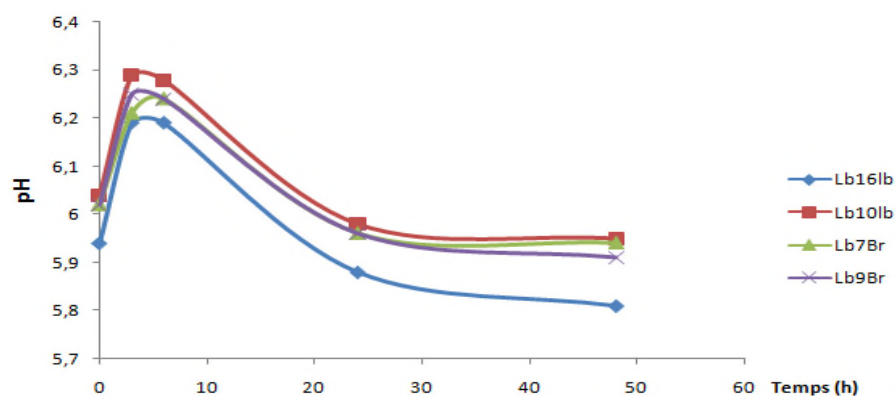


Figure 20 : Evolution du pH dans le lait des cultures mixtes incubées à 30°C

7.2) Mesure de l'acidité Dornic

Les résultats obtenus (figure 21), illustrent que les 2 souches **Lb 16lb** et **Lb 10lb** suivent une augmentation durant les 3 premières heures d'incubation de 8 et 4°D respectivement.

Lb 16lb tend à se stabilisé après ce temps là ; par contre, **Lb 10lb** suit une augmentation remarquable avec **Lb 7Br** de 9 et 6°D, contrairement à **Lb 7Br** et **Lb 9Br** qui diminue de 2 et 3°D. Ces deux premières montrent un déclin jusqu'à 24h de 17 et 14°D suivie d'une réaugmentation de 10°D à 48h. Alors que, **Lb9Br** marque une augmentation de 7°D à 6h jusqu'à 24h, puis une diminution de 6°D à 48h.

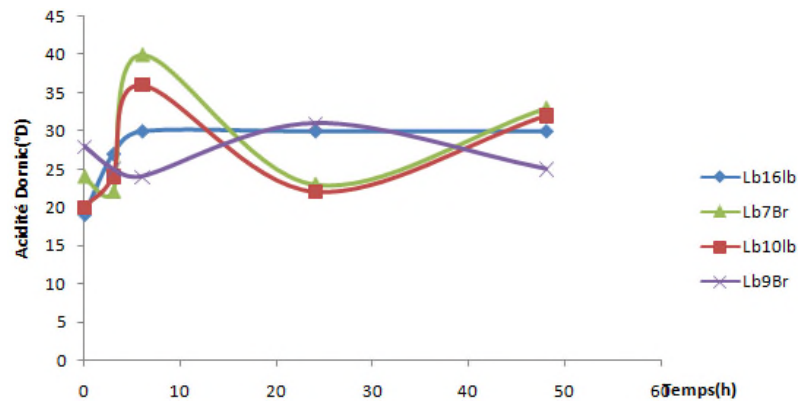


Figure 21 : Variation de l'acidité Dornic dans le lait des cultures mixtes incubées à 30°C

Les études de combinaisons des souches pour l'acidification nous ont permis de dégager une relation de coopération entre les souches de *Leuconostoc* et de *Lactobacillus* isolés. En effet, en présence de *Leuconostoc*, la vitesse d'acidification du lait par les *Lactobacillus* augmente de façon considérable. **Diks et al(1995)** ont démontré que certaines espèces de *Lactobacillus* et de *Leuconostoc* sont en étroite relation.

Il est assez rare qu'on utilise pour la fabrication des produits laitiers une seule souche de bactérie lactique. En règle générale, on associe plusieurs souches. L'association qui a été la plus étudiée est celle du yaourt, constituée de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Dans un mélange de deux souches, c'est celle dont le taux de croissance est le plus rapide qui devient dominante (**Juillard et al., 1987**)

Au cours d'une fermentation lactique, un phénomène important intervient : l'abaissement du pH. Dans les cultures mixtes, l'abaissement du pH est généralement plus rapide et plus prononcé, ce qui s'explique par la stimulation d'au moins une des souches du mélange (**Djidjel, 2007**).

Cette étude a montré que la concentration la plus élevée en acide lactique est obtenue en culture pure (5g/l) chez **Lb 16lb**, alors qu'elle est en culture mixte de **Lb 16lb** et **LN**

7Br de 3g/l. Alors que selon l'étude de **Roukas et Kotzekidou (1998)** sur la production d'acide lactique à partir du lactosérum en culture pure et mixte de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*. Ils ont montré que la concentration la plus élevée en acide lactique est obtenue en culture mixte (22,5 g/l), alors qu'en culture pure de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*, les concentrations sont respectivement 16 et 10,5 g/l.

D'après ces résultats on peut estimer que cette contestation revient à la présence du sel dans le milieu, ce qui a influencé la croissance des souches.

En fin, les souches que nous avons remarqué (**Lb 3Br, Lb 15Br, Lb 13Br, Lb 6lb, Lb 8lb**) ayant une résistance remarquable à un stress salin, peuvent être utilisées pour leur pouvoir à survivre en milieu salé dans la fabrication de certain produit fermenté salé, tel que le Smen, le fromage, les saucissons, quelques fruits de mère, et quelques végétaux.

Conclusion

Ce travail a comme but la caractérisation de la tolérance aux stress salin de deux genres de bactéries lactiques peu étudiées dans ses contraintes, *Lactobacillus* et *Leuconostoc*.

L'étude de l'effet du stress osmotique sur les cellules montre que l'exposition des bactéries à un stress donné affecte leur viabilité, leur vitesse de croissance, ainsi que leur pouvoir technologique, et les réduisent par rapport aux résultats des conditions normales de culture.

Enfin les caractéristiques de croissance des souches sélectionnées sont très inhabituelles pour des bactéries lactiques. Elles se développent rapidement à forte concentration de NaCl (8% et 10%), avec des pourcentages de viabilité de 23,96% pour les *Leuconostocs*, 18% pour les Lactobacilles. Cela représente un avantage pour la biopréservation des produits salé, leur permettant d'entrer en concurrence avec la flore d'altération halophile.

Ces résultats montrent que l'étude à la résistance saline est intéressante et mérite d'être plus approfondie. Les prochaines étapes de l'étude devrait porter sur une :

- Utilisation d'autres techniques permettant d'évaluer plus précisément la viabilité bactérienne en situation de contraintes ;
- Etude de l'impact d'une préadaptation au stress sur le début de la croissance en milieu hostile ;
- Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans cette réponse des bactéries au stress en particulier l'activation des différents systèmes de transport de solutés compatibles de nos souches ;
- Réalisation des autres tests phénotypiques et génotypique afin de suivre la variation morphologique de la souche ;
- Etude des profils biotechnologiques tels que la vitesse d'acidification.

Références bibliographiques

A

Axelsson L.T. (2004). Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiologie. In *Lactic Acid Bacteria – Microbiologie and functional aspects*, Edited by S. Salminen, S. Von Wright, A. And Ouwehand A. (Eds), Marcel Dekker, Inc. **633**. pp 1-66.

B

Bekhouche F (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase : Thèse de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie Option : génie alimentaire, institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro- alimentaires. pp 21-27.

Belarbi F., (2010). Isolement et sélection des souches de bactéries lactique productrice des métabolites antibactériennes. Mémoire de magistère en microbiologie alimentaire et industrielles. Université d'Oran et Sénia. p 11.

Benkarroum N. et Tamime A.Y. (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiol.* 21. pp 399-413.

Boublenza F. (2013). Etude du stress osmotique chez des lactocoques isolés de lait de chamelle de Timimoune. Thèse de Doctorat en biotechnologie. Université d'Oran. p 16.

Broadbent J.R. (2001). Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: *Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.). 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New.

C

Christiansen P.S., Edelsten D., Kristiansen J.R. and Nielsen E.W. (1996). Some properties of ice cream containing *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft*, 51. pp 502-504.

Cogan T.M., Barbosa M., Beuvier E., Bianchi-Salvadori B., Cocconcelli P.S., Fernandes I., Gomez J., Gomez R., Kalanzopoulos G., Ledda A., Medina M., Rea M.C., Et Rodriguez (1997). Caractérisation of lactic acid bacteria in artisanal dairy products, *Journal of Dairy Research*, 64. pp 409-421.



Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. et Janssens, C. (1994). In : *Bactéries lactiques aspects fondamentaux et technologiques*, 1. pp 25-114.

Desmazeud M. (1996). Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité. Vol 5 N°5. pp 331-343.

Devoyod J.J., Poullain F. (1988). Les *Leuconostocs*. Propriétés: leur rôle en technologie laitière. *Le Lait*, 1988, 68 (3). pp 249-280.

D.F.R.P. Elizete et Carlos R.S. (2005). Biochemical characterization and identification of probiotic *Lactobacillus* for swine. *B.CEPPA, Curitiba*, 23. pp 299-310

Djelil H. (2010). Résistance au stress salin et osmoprotection chez les bactéries lactiques : influence du sel sur les aptitudes technologiques des souches. Mémoire de Magister en Biotechnologie. Université d'Oran. p 10.

Dicks L. M , Dellaglio F. Et Collins M.D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*, *Journal of Systematic Bacteriology*, 45. pp 395-397.

Dortu C., Thonart P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(1). pp 143-154.



EnnadirJ., Hassikou R., Al Askari G., Arahou M., Bouazza F., Amallah L., amine S. A., Khedid K., (2014). Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées des farines de blé d'origine marocaine (Phenotypic and genotypic characterization of

lactic acid bacteria isolated from wheat flour from Morocco) .J.Mater. Environ.Sci.5 (4). pp1125-1132.

Erwan L. (2001). Le sel et les microorganismes: Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole Nationale vétérinaire de maison Alfort. pp 62-65.



Garry P. et le guern L. (1999). Les bactéries lactiques, vol .9, N°6. pp 423-429

Glaasker E., Konings W.N., Poolman B. (1996). Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*, J. Bacteriol. 178. pp 575–582.

Glaasker E., Konings W.N., Poolman B. (1996). Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmostasis and hyper- and hypoosmotic shock, J. Biol. Chem. 271. pp 10060–10065.

Glaasker E., Tjan F.S., Ter Steeg P.F., Konings W.N., Poolman B. (1998). Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress, J. Bacteriol. 180. pp 4718–4723.

Gomes A.M.P. and Xavier Malcata F. (1998). Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. J. Dairy Sci., 81. pp 1992-1507.

Glaasker E., Konings W.N., Poolman B. (1996). Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmostasis and hyper- and hypoosmotic shock, J. Biol. Chem. 271. pp 10060–10065.

Glaasker E., Konings W.N., Poolman B.(1996).Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*, J. Bacteriol. 178. pp 575–582.

Glaasker E., Heuberger E.H., Konings W.N., Poolman B. (1998). Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (QacT) of *Lactobacillus plantarum*, J. Bacteriol. 180. pp 5540–5546.



Hannachi S. (2008). Inhibition des bactéries indésirables par l'activité antimicrobienne des espèces de *Leuconostoc* isolées du lait cru de chèvre. Mémoire de Magister en Microbiologie fondamentale et appliquée. Université d'Oran-Es-Sénia. p 5.

Hassan, A. N. et Frank, J. F., (2001). Starter cultures and their use. Appl. Dairy Microbiol. 2nd ed. Dekker, 2001. pp 151-207.



Kim S.G. and Batt C.A.(1993).cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis subsp. Lactis* gro ESL operon. Gene.127. pp 121-126.

Klaenhammer T.R., Azcarate-Peril M.A., Altermann E. and Barrangou R. (2007). The influence of dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. The Journal of Nutrition Effects of Probiotics and Prebiotics, 137. pp 748S-750S.



Lairini S., Beqqali N., Bouslamti R., belkhou R. et Zerrouq F. (2014). Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. Afrique science.10(4). pp 267 – 277.

Leksir C. (2012). Caractérisation et contrôle de la qualité de ferments lactiques utilisés dans l'industrie laitière algérienne. Mémoire de Magistère en Biotechnologie Alimentaire. Université Mentouri de Constantine. pp 96-97.

Leveau J.Y. et Bouix M. (1993). Les levures. Dans : Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. Eds.Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. pp 2-39.



Measures J.C. (1975). Role of amino acids in osmoregulation in non-halophilic bacteria, Nature 257. pp 398–400.

Molenaar D., Hagting A., Alkema H., Driessen A.J., Konings W.N. (1993). Characteristics and osmoregulatory roles of uptake systems for proline and glycine betaine in *Lactococcus lactis*, J. Bacteriol. 175. pp 5438–5444.



Nayra S., Sharaf O.M., Ibrahim G.A. and Tawfik N.F. (2002). Incorporation and viability of some probiotic bacteria in functional dairy food: I. Soft cheese. Egyptian Journal of Dairy Science, 30. pp 217-229.



Obis D., Guillot A., Gripon J.-C., Renault P., Bolotin A., Mistou M.-Y. (1999). Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters, J. Bacteriol. 181. pp 6238–6246.



Penaud S. (2006). Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus ATTC11842*. Thèse de doctorat d'état. Institut National Agronomique De-Paris-Grignon. p 267.

Pilet M.F., Magras C. Et Federighi M. (1998). Bactéries lactiques. Dans : Manuel de bactériologie alimentaires. Sutra *et al.*, Eds. Polytechnica. Paris. pp 235-260.

Poolman B., Hellingwerf K.J., Konings W.N.(1987). Regulation of the glutamate-glutamine transport system by intracellular pH in *Streptococcus lactis*, J. Bacteriol. 169. pp 2272–2276.



Rokn Y. et al (2015). Caractérisation Physico-Chimique et Microbiologique du Processus de Fermentation Naturelle des Olives Vertes de la Variété Picholine Marocaine Physico-Chemical and Microbiological Characterization of the Natural Fermentation of MoroccanPicholineGreen Olives Variety. J. Mater. Environ. Sci. 6 (6). pp 1740-1751

Romeo Y., bouvier J., & Gutierrez C. (2001). La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum*. Lait, 81. pp 49-55.



Sicard M. (2010). Méthodes, concepts et outils des systèmes complexes pour maîtriser les procédés alimentaires. Application à l'affinage de camemberts. Thèse de Doctorat en Génie des Procédés Alimentaires. p 28.

Soomro, A.H, Masud, T. and Anwaar, K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. Pakistan Journal of Nutrition, 1(1). pp 20-24.

Stiles M. E. et Halzafel E.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Food Microbiol. 36 (1). pp 1-29.



Thompson J., Gentry-Weeks C.R. (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques, Vol. I. pp 239-290 (Editeurs : De Roissart H., Luquet).



Ustunol Z. et Gandhi H., (2001). Growth and viability of commercial Bifidobacterium spp in honey-sweetened skim milk, Journal of Food Protection, 64. pp 1775-1779.



Van der Heide T., Poolman B. (2000), Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity, J. Bacteriol. 182. pp 203–206.



Zadi-Karam H. et Karam N-E. (2006). Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel Tropiculture. pp 153-156.

Zarour K., Benmechernene Z., Hadadji M., Moussa-Boudjema B., Henni J-D et Kihal M. (2012). Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. Revue «Nature & Technologie». B- Sciences Agronomiques et Biologiques, N° 08 (01)2013. pp 39-47.

Annexes

Annexe I

Tableau I : Résumé de l'observation microscopique des souches isolées sur milieu MRS.

Souche	Gram	catalase	Production de gaz	Forme	Mode de regroupement
LN 3lb	+	-	+	Coccobacilles sphérique, cocci allongé, bacilles courte	En chainettes
LN 12lb	+	-	/		
LN 18Br	+	-	+		
LN 7Br	+	-	/		
LB 8lb	+	-	/	Bacilles, courte, coccobacilles, allongé, bâtonnet, filamenteuses, étirer	Isolé, en paires ou en chainettes
LB 16lb1	+	-	/		
LB 15Br	+	-	+		
LB 3Br	+	-	+		
LB 13Br	+	-	+		
LB 16lb	+	-	+		
LB 10lb	+	-	+		
Lb 9Br	+	-	+		
LB 7Br	+	-	+		
LB 6lb	+	-	/		
LB 12lb	+	-	+		

Annexe II

Composition des milieux de culture

1) Eau physiologique

Composition	(gramme/litre)
NaCl	9
Eau distillée	1000ml
pH 7±0,2	Autoclavage à 120°C/20min

2) Bouillon et gélose MRS

Composition	(gramme/litre)
Peptone	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2
Acetate de sodium	5
Citrate triammonique	2
Sulfate de magnesium	200mg
Sulfate de manganese	50mg
Eau distillée	1000ml
Aga	15
pH 6,5±0,2	Autoclavage à 120°C/20min

3) Bouillon et gélose M17

Composition	(gramme/litre)
Tryptone	2,5
Peptone pepsique de viande	2,5

Peptone papainique de soja	5
Extrait autolytique de levure	2,5
Extrait de viande	5
Lactose	5
Glycérophosphate de sodium	19
Sulfate de magnésium	0,25
Acide ascorbique	0,5
Caséine	0,5
Agar	15
Eau distillée	1000ml
pH 7,1±0,2	Autoclavage à 120°C/20min

Tableau II : Dénombrement des bactéries lactiques (UFC/ml) à différentes concentration de NaCl

Souches	Les concentrations de NaCl		
	MRS à 6,5 % de NaCl	MRS à 8 % de NaCl	MRS à 10 % de NaCl
Lb 3Br	4,1x10 ⁹	0,4x10 ⁷	6x10 ⁷
Lb 16lb₁	2x10 ⁹	1,1x10 ⁷	2,74x10 ⁷
Lb 10lb	4,8x10 ⁹	0,8x10 ⁷	2,52x10 ⁷
Lb 16lb	1,5x10 ⁹	1,6x10 ⁷	1,5x10 ⁷
Lb 9Br	1,2x10 ⁹	0,3x10 ⁷	1,56x10 ⁷
Lb 15Br	7,1x10 ⁹	1,4x10 ⁷	6x10 ⁷
Lb 13Br	5,6x10 ⁹	1x10 ⁷	0,67x10 ⁷
Lb 12lb	2,9x10 ⁹	2,2x10 ⁷	1,68x10 ⁷
LN 12lb	8x10 ⁹	2,3x10 ⁷	2,4x10 ⁷
LN 7Br	0,6x10 ⁹	3,5x10 ⁷	3,21x10 ⁷
LN 3lb	6,1x10 ⁹	6,5x10 ⁷	6,7x10 ⁷
LN 18Br	0,9x10 ⁹	7,2x10 ⁷	7,2x10 ⁷
Lb 6lb	0,2x10 ⁹	0,5x10 ⁷	2,74x10 ⁷
Lb 8lb	1,5x10 ⁹	2,4x10 ⁷	0,99x10 ⁷
Lb 7Br	3,2x10 ⁹	6,7x10 ⁷	0,97x10 ⁷

Tableau III : Cinétique de croissance des cultures pures dans le lait à 10% de NaCl

Souches	T=0h		T=6h		T=24h		T=48h		T=24h	T=48h	T=24h	T=48h
	pH	°D	pH	°D	pH	°D	pH	°D	ΔpH	ΔpH	Δ°D	Δ°D
Lb 6lb	6,35	30	6,14	27	6,05	33	5,98	32	0,3	0,37	3	2
Lb 9Br	6,31	23	6,08	33	6,03	27	5,76	41	0,28	0,55	4	19
Lb 16lb	6,02	41	5,79	41	5,70	31	5,54	50	0,32	0,48	10	9
Lb 8lb	6,39	27	6,19	25	6,09	25	5,91	41	0,3	0,48	2	14
LN18Br	6,38	29	6,15	27	6,10	28	6,08	29	0,28	0,3	1	0
Lb3Br	6,13	28	5,77	33	5,76	34	5,67	50	0,37	0,46	6	23
LN 7Br	6,34	31	6,10	30	6,04	33	5,85	38	0,3	0,49	2	7
Lb 15Br	6,04	35	5,93	38	5,34	32	5,64	45	0,7	0,4	3	10
LN 3lb	6,30	23	6,17	25	6,10	28	5,85	36	0,2	0,45	5	13
Lb 7Br	6,31	24	5,90	23	6,12	26	5,67	40	0,19	0,64	2	16
Lb 10lb	6,34	32	6,16	29	5,84	35	5,87	32	0,5	0,48	3	0
Lb 16lb₁	6,33	20	6,10	31	6,05	28	5,86	40	0,28	0,47	8	20
Lb 13Br	6,31	28	6,18	25	6,10	27	5,92	35	0,21	0,39	1	7
Lb 12lb	6,37	27	6,15	39	6,11	28	5,96	38	0,26	0,41	1	11
LN 12lb	6,26	22	6,11	35	6,07	24	5,91	29	0,33	0,19	2	7

Tableau IV : Les résultats de la vitesse d'acidification des souches isolée de beurre et de lben

Souches	pH T=0h	pH T=24h	pH T=48h	ΔpH (24h)	ΔpH (48h)	Evaluation
Lb 6lb	6,35	6,05	5,98	0,3	0,37	lente
Lb 9Br	6,31	6,03	5,76	0,28	0,55	moyenne
Lb 16lb	6,02	5,70	5,54	0,32	0,48	lente
Lb 8lb	6,39	6,09	5,91	0,3	0,48	lente
LN 18Br	6,38	6,10	6,08	0,28	0,3	lente
Lb 3Br	6,13	5,76	5,67	0,37	0,46	lente
LN 7Br	6,34	6,04	5,85	0,3	0,49	lente
Lb 15Br	6,04	5,34	5,64	0,7	0,4	lente
LN 3lb	6,30	6,10	5,85	0,2	0,45	lente
Lb 7Br	6,31	6,12	5,67	0,19	0,64	moyenne
Lb 10lb	6,34	5,84	5,87	0,5	0,48	lente
Lb 16lb1	6,33	6,05	5,86	0,28	0,47	lente
Lb 13Br	6,31	6,10	5,92	0,21	0,39	lente
Lb 12lb	6,37	6,11	5,96	0,26	0,41	lente
LN 12lb	6,26	6,07	5,91	0,33	0,19	lente

Tableau V : Cinétique de croissance des cultures pures dans M17 à 10% de NaCl

Souches	T=0h			T=3h			T=6h			T=24h			T=48h		
	pH	DO	°D	PH	DO	°D	PH	DO	°D	PH	DO	°D	pH	DO	°D
Lb 6lb	4,7	0,192	12	4,71	0,208	23	4,67	0,193	18	4,26	0,285	24	4,11	0,294	22
Lb 9Br	4,73	0,173	10	4,66	0,181	15	4,65	0,174	18	4,21	0,236	20	4,07	0,231	24
Lb 16lb	4,81	0,112	19	4,77	0,161	21	4,73	0,156	19	4,3	0,19	13	4,46	0,168	17
Lb 8lb	4,69	0,228	11	4,76	0,23	16	4,71	0,284	19	4,3	0,348	19	4,15	0,369	20
LN 18Br	5,3	0,117	10	5,26	0,132	14	5,25	0,12	10	4,25	0,201	15	4,56	0,229	14
Lb 3Br	4,96	0,096	21	4,91	0,137	21	4,88	0,146	26	4,53	0,178	21	4,48	0,196	23
LN 7Br	4,81	0,177	11	4,92	0,187	19	4,85	0,198	16	4,39	0,293	21	4,15	0,36	23
Lb 15Br	5,46	0,096	16	5,46	0,133	11	5,34	0,126	11	4,97	0,221	14	4,71	0,249	16
LN 3lb	5,13	0,144	9	5,18	0,176	12	5,08	0,181	14	4,67	0,265	14	4,34	0,3	23
Lb 7Br	5,5	0,093	8	5,49	0,142	10	5,44	0,132	11	4,9	0,21	9	4,77	0,238	22
Lb 10lb	4,77	0,176	17	4,77	0,203	25	4,68	0,2	18	4,25	0,27	14	4,07	0,224	22
Lb 16lb₁	4,78	0,206	14	4,82	0,225	20	4,78	0,227	30	4,53	0,283	20	4,57	0,251	22
Lb 13Br	4,77	0,203	11	4,73	0,275	28	4,67	0,286	21	4,26	0,377	20	4,11	0,418	22
Lb 12lb	4,63	0,185	11	4,66	0,207	13	4,68	0,231	15	4,25	0,23	19	4,13	0,233	30
LN 12lb	4,68	0,175	10	4,7	0,184	15	4,63	0,163	18	4,17	0,22	17	3,97	0,23	16

Tableau VI : Evaluation de la concentration cellulaire en UFC/ml dans le bouillon M17

Souches	Standardisation	MRS à 10 % de NaCl	Taux de viabilité 10%NaCl
Lb 3Br	$1,34 \times 10^{10}$	6×10^7	40%
Lb 16lb₁	$1,55 \times 10^{10}$	$2,74 \times 10^7$	18%
Lb 10lb	$13,9 \times 10^{10}$	$2,52 \times 10^7$	1,8%
Lb 16lb	$0,5 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^7$	30%
Lb 9Br	$1,04 \times 10^{10}$	$1,56 \times 10^7$	15%
Lb 15Br	$1,07 \times 10^{10}$	6×10^7	56%
Lb 13Br	$4,98 \times 10^{10}$	$0,67 \times 10^7$	1,3%
Lb 12lb	$1,05 \times 10^{10}$	$1,68 \times 10^7$	16%
LN 12lb	$1,2 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^7$	20%
LN 7Br	$1,5 \times 10^{10}$	$3,21 \times 10^7$	21,4%
LN 3lb	$2,1 \times 10^{10}$	$6,7 \times 10^7$	32%
LN 18Br	$3,2 \times 10^{10}$	$7,2 \times 10^7$	22,5%
Lb 6lb	2×10^{10}	$2,74 \times 10^7$	13,7%
Lb 8lb	$1,5 \times 10^{10}$	$0,99 \times 10^7$	6,6%
Lb 7Br	$12,9 \times 10^{10}$	$0,97 \times 10^7$	0,75%

Tableau VIII : Cinétique de croissance dans le lait à 10% NaCl dans des cultures mixtes

souches	T=0h		T=3h		T=6h		T=24h		T=48h	
	pH	°D	pH	°D	pH	°D	pH	°D	pH	°D
Lb 16lb	5,94	19	6,19	27	6,19	30	5,88	30	5,81	30
Lb 10lb	6,04	20	6,29	24	6,28	36	5,98	22	5,95	32
Lb 7Br	6,02	24	6,21	22	6,24	40	5,96	23	5,94	33
Lb 9Br	6,02	28	6,25	25	6,24	24	5,96	31	5,91	25

Tableau VII : Cinétique de croissance dans le bouillon M17 à 10% NaCl dans des cultures mixtes

souches	T=0h			T=3h			T=6h			T=24h			T=48h		
	pH	DO	°D	pH	DO	°D	pH	DO	°D	pH	DO	°D	pH	DO	°D
Lb 16lb	4,73	0,222	25	4,61	0,503	26	4,57	0,557	28	4,05	0,58	28	3,93	0,389	27
Lb 9Br	4,59	0,323	26	4,45	0,569	24	4,47	0,609	31	3,84	0,621	31	3,97	0,357	24
Lb 10lb	4,65	0,206	26	4,56	0,463	23	4,51	0,514	32	3,9	0,585	32	3,86	0,357	26
Lb 7Br	5,16	0,301	23	5,11	0,284	19	5,13	0,318	25	4,29	0,49	25	3,98	0,349	25

Résumé

Les bactéries sont capables de vivre dans des milieux extrêmement variés car elles possèdent des systèmes de protection efficaces contre les différents stress qu'elles peuvent rencontrer. Un total de 15 souches de deux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* isolés du beurre et du lben, ont fait l'objet de notre étude sur la résistance saline. Des cinétiques d'évolution du pH, acidité Dornic et Densité Optique ont été réalisées au cours de l'étude sur le lait et le bouillon M17 additionnés de 10% de NaCl. Les résultats des mesures montrent que sur le lait la moyenne des ΔpH est de 0,44U, et celle de $\Delta^\circ\text{D}$ est de 10,53°D. Alors que sur le bouillon M17 ils montrent une moyenne de ΔpH de 0,60U et de $\Delta^\circ\text{D}$ de 9,33°D. En générale, les résultats obtenus dans cette étude montrent que l'activité acidifiante la plus importante est enregistrée sur le lait que le bouillon M17.

La croissance des bactéries s'arrête lorsqu'elles subissent un stress salin qui est dû à une forte concentration de NaCl dans le milieu, car des mécanismes de détresse se mettent en place pour éviter la mort cellulaire. La principale réponse à un choc osmotique consiste en l'accumulation dans le cytoplasme de molécules protectrices.

Mots clés : Bactéries lactiques, acidification, stress salin, résistance, cinétique, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*.

Summary

Bacteria are able to live in extremely varied mediums because they have an effective protection systems against various stresses which they can meet. A total of 15 strains of two kinds *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolated from butter and lben, were the object of our study about saline resistance. Kinetics of the pH, Dornic acidity and Optical Density evolution were realized during this study on milk and M17 broth supplemented with 10% NaCl. The results of measures show that on milk the average of ΔpH is about 0.44U, and the one of $\Delta^\circ\text{D}$ is 10.53°D. Whereas, on M17 broth, they show an average of ΔpH about 0.60U and the one of $\Delta^\circ\text{D}$ is 9.33°D. In general, the results got in this study show that the acidifying activity is most important on milk than M17 broth.

Bacteria stops growth when they feel a saline stress which is due to a strong concentration of NaCl in the medium, and this because the mechanisms of distress which set up to avoid cellular death. The principal answer to an osmotic shock consists on an accumulation of protective molecules in the cytoplasm.

Key words: Lactic Acid Bacteria, acidification, saline stress, resistance, kinetics, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*.