



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi-Tébessa

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière: Sciences biologiques

Spécialité: Microbiologie appliquée

Thème

Contribution à l'étude de la microflore d'Elklila

Présenté par:

Khelifa Latifa

Arare Chiraz

Maàche Sabrina

Devant le jury:

Dr. *Taleb. S*

M.C.A U.L.T.Tébessa **Président**

Dr. *Benhadj. M*

M.A.A. U.L.T.Tébessa **Rapporteur**

Dr. *Azizi. N*

M.A.A U.L.T.Tébessa **Examineur**

Date de soutenance

22/06/2019

Année universitaire

2018/2019

Remerciement

Avant toutes choses, nous tenant à exprimer notre grand remerciement et notre profonde gratitude et reconnaissance à "Allah" notre créateur, Qui nous a donné force pour réaliser ce travail et qui était avec nous par sa miséricorde dans chaque moment et chaque instant jusqu'à l'accomplir.

Nous désirons à exprimer notre sincère reconnaissance et remerciement à notre encadreur, BENHADJ Mabrouka, pour avoir accepté de nous encadrer et consacré autant de temps pour nous, pour son suivi régulier, sa bienveillance, ses conseils et ses orientations. Nous remercions les membres du jury qui ont bien voulu accepter de juger notre modeste travail et de nous honorer :Président : Dr.

TALEB. S et Examinatrice : Dr. Azizi N

Nous remercions également tous les membres des laboratoires de département de biologie. Faculté des Sciences de la Nature et de Vie à l'université de Tébessa Mes très spéciaux remerciements reviennent à Mme. Moufida et warda, qui nous ont bien aidés pour réaliser notre étude dans des bonnes conditions.

Nous remercions tous ceux qui nous ont rendu service et qui nous ont soutenus de près ou de loin pour réaliser de ce travail.

Dédicace

Grace à Allah ...

Je dédie ce modeste travail :

*A **Mon père** Nadji Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne
et mon parcours, que Dieu te donne la santé et longue vie*

*A **Ma chère mère** Naima , pour l'affection et l'amour qui m'ont donné le
courage et la force dans les moments les plus difficiles*

*A mes beaux-frères : **Khair-Eddine, Housseem, Nadir, Raid***

Ma famille

Mes amis

Mes collègues

*A ma belle binôme : **Latifa et Sabrina***

.....Chiraz

Dédicace

Je dédie ce travail,

À tous ceux qui me sont proches et chers, mes parents, Pour leur soutien permanent dans mes études et dans ma Vie, leur confiance en moi, leur encouragements, et leur amour.

Merci beaucoup Papa et Maman je vous aime beaucoup.

À mes soeurs Chaima ,Asma,Meriem,

Je lui souhaite tout le bonheur durant sa vie.

À mon frère Abde ssalam ,j'il aime trop fort.

À tout ma grandfamille.

À tous mes amis,

Pour notre amitié et tous les bons moments passés et à venir,

Pour votre présence, vos bons conseils et nos fous rires partagés

Un très grand merci à tous et à toutes.

À ma belle binôme :chirazet Sabrina

Et à tous ceux qui me sont chères,

Je dédie ce travail...

..... Latifa

Dédicace

*A ma très chère Tante : **Nabila**.*

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit .ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes cotés a toujours été ma source de force pour affronter les différentes obstacles.

*Du profond de mon coeur, Je dédie ce modeste travail Aux êtres les plus chers : Mes très chers Parents « **Salima et Brahim** » pour l'amour inconditionnel qui m'accompagnent depuis toujours, pour le soutien dans mes choix, les tendres encouragements et les grands sacrifices que vous m'avez apporté durant ces années de formation...Merci pour votre présence, que Dieu vous garde pour moi.*

*A mon adorable petite sœur **Ghofrane** , qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille, qui dieu vous garde et illumine votre chemins.*

À mes frères qui le dieu te garde, je souhaite tous le bonheur qui vous méritent.

A mes grandes mères et pères , mes oncles et mes tantes .Que dui leur donne une longue et joyeuse vie.

A tout Ma famille pour l'amour et le respect qu'ils m'ont toujours accordé.

*A tous mes amies et surtout : **Nassima, basma, Houria, Fadila, Zahia**. Pour une sincérité si merveilleuse... jamais oubliable, en leur souhaite tout le succès... tout le bonheur.*

À tous ceux qui m'aiment....

À tous ceux ou celles qui ont croisé mon chemin.

.....Sabrina

Résumé

A partir du lait cru de vache ,de brebis et de chèvre et de chamelle, plusieurs types de fromages traditionnels font partie de l'alimentation dans différentes régions d'Algérie .El 'klila un fromage traditionnel est utilisé entre autre comme ferment pour accélérer la coagulation du lait. Cependant et afin de prissiez les microflores d'el klila, nous nous sommes orientés vers l'étude de la microflore.

Quatre échantillons ont été prélevés à partir de plusieurs régions du wilaya de Tébessa, L'étude de la microflore a été réalisée par l'isolement de différents microorganismes en utilisant des milieux de culture sélectifs et leur caractérisation a été réalisée par des tests phénotypique et biochimique, et l'études de la sensibilité aux antibiotiques, aussi La recherche des propriétés inhibitrices des bactéries lactiques.

Les résultats montre la présence des staphylocoques dans tout les échantillons du el'klila dont 64% des souches sont des *Staphylococcus aureus* et 36% des souches *staphylocoques* à coagulasse négative (SCN) . L'analyse des espèces des souches *d'entérobactéries* isolées, a montré une prédominance *d'Enterobacter cloacae* (73%), suivie de *Hafinia alvei* (9 %) nous avons trouvée une souche de *flavimonas oryzihabitans*(9 %) et une souche de *Vibrio fluvialis* (9 %),en plus la présence de 11 souches des *Pseudomonas* et on notée la présence la flore fongique (levures et moisissures).aussi a été remarque quant l'identification des bactérie lactique une diversité microbienne 61% *lactobacille*,17% des genre *Leuconostoc*, 11% des souche sont des du genre *lactoccus* et 5% des souche sont des du genre *Streptococcus sp* ,et 6 % *Enterococcus faecium*.

Les bactéries lactiques isolées montrent une activité antagoniste vis-à-vis des bactéries indicatrices ,cette activités est due aux plusieurs facteurs : acidité, peroxyde d'hydrogène et bactériocines.

La mise en évidence de la sensibilité ou la résistance de certaines bactéries identifiée parmi l'ensemble a faite appel à deux gammes d'antibiotique choisies pour les Gram ⁺ et les Gram ⁻ .

Nous pouvons conclure que les produits traditionnels laitiers comme el'klila sont un milieu favorable pour le développement des différents microorganismes..

Mots clé : El klila , Microflore , Isolement ,Identification ,Antibiogramme .

Summary

From the raw milk of cow, sheep and goat and camel, several types of traditional cheese are part of the diet in different regions of Algeria. It is a traditional cheese with large consumption and is used inter alia as a ferment to accelerate the coagulation of milk. However, in order to take the microflora of el'klila, we turned to the study of the microflora .

Four samples were taken from several regions of the wilaya of Tébessa. The study of the microflora was carried out by the isolation of different microorganisms using selective culture media and their characterization was carried out by phenotypic and biochemical tests. , and antibiotic susceptibility studies, also Research of the inhibitory properties of lactic acid bacteria .

The results show the presence of staphylococci in all el klila samples, of which 64% of the strains are *Staphylococcus aureus* and 36% are coagulase negative staphylococci strains (SCN). The species analysis of the enterobacterial strains isolated, showed a predominance of *Enterobacter cloacae* (73%), followed by *Hafnia alvei* (9%) we found a strain of *Flavimonas oryzae* (9%) and a strain of *Vibrio fluvialis* (9%), in addition the presence of 11 strains of *Pseudomonas* and noted the presence of fungal flora (yeasts and molds) .Also was noticed when the identification of lactic bacteria microbial diversity 61% *Lactobacillus*, 17% of genus *Leuconostoc*, 11% of the strain are of the genus *Lactococcus* and 5% of the strain are of the genus *Streptococcus* sp, and 6% *Enterococcus faecium*.

The isolated lactic acid bacteria show an antagonistic activity towards the indicator bacteria, this activity is due to several factors: acidity, hydrogen peroxide and bacteriocins. The detection of the sensitivity or the resistance of certain bacteria identified among the set made use of two antibiotic ranges chosen for Gram + and Gram- .

Thanks to these results we conclude that el klila is a favorable environment for the development of different microorganisms.

Key words: El'klila, Microflora, Isolation, Identification, Antibiogram.

ملخص

من حليب البقر والأغنام والماعز والجمال الخام ، هناك عدة أنواع من الجبن التقليدي هي جزء من النظام الغذائي في مناطق مختلفة من الجزائر ، وهي جبنة تقليدية ذات استهلاك كبير وتستخدم كأشياء مخمرة .

لتسريع تخثر الحليب و من أجل تحديد الكائنات الدقيقة في الكلية قمنا بدراسة و عزل و تحديد البكتيريا الموجودة في هذا المنتج .

تم أخذ أربع عينات من عدة مناطق بولاية تبسة ، وقد أجريت دراسة على البكتيريا الدقيقة عن طريق عزل الكائنات الحية الدقيقة المختلفة باستخدام وسائل استزراع انتقائية وتم توصيفها بواسطة اختبارات النمط الظاهري والكيمياء الحيوية ، ودراسات الحساسية للمضادات الحيوية ، والتحقق أيضا في الخصائص المثبطة للبكتيريا اللبنية.

أظهرت النتائج وجود المكورات العنقودية في جميع عينات الكلية ، 64 ٪ منها المكورات العنقودية الذهبية و 36 ٪ من سلالات المكورات العنقودية السلبية المخثرة.

واظهرت تحليل الأنواع من سلالات *Enterbacterie* المعزولة ، إن الأغلبية لـ

Entérobacter cloacae 73% تليها *hafinia alvei* ووجدنا أيضا 9% من سلالة *sflavimonase oryzihibitan* و 9% من سلالة *fluvrialis Vibrio* بالإضافة الي وجود 11 سلالة من *Pseudomonase* بالإضافة الي وجود النباتات الفطرية (الخمائر والعفن) ، كما لوحظ من خلال تحديد البكتيريا اللبنية أن لديها تنوع ميكروبي 61% *lactobacillus* و 17% من جنس *leucononostoc* و 11% من جنس *lactococcus* و 5% من سلالة *streptococcus* و 6% *Entéroccus facium* .

تظهر بكتيريا اللبنية المعزولة نشاطاً مضاداً تجاه البكتيريا المؤشرة ، ويرجع هذا النشاط إلى عدة عوامل: الحموضة ، بيروكسيد الهيدروجين والبكتريوسين .

إن تسليط الضوء على حساسية أو مقاومة بعض البكتيريا التي تم تحديدها من بين المجموعة قد استفاد من مجموعتين من المضادات الحيوية التي اختيرت من أجل غرام إيجابي و غرام سلبي .

بفضل هذه النتائج نستنتج أن الكلية هي بيئة مواتية لتنمية الكائنات الحية الدقيقة المختلفة.

الكلمات المفتاحية : الكلية ، الكائنات الحية ، العزلة ، التحديد ، المضادات الحيوية

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide Ribonucléique
API 20E :	Appareillage Et Procédé D'Identification
Aw :	Activité D'eau
BL :	Bactérie lactique
C :	Cytosine
°C :	Degré Celsius(unité de la température)
CO₂ :	Dioxyde de Carbone
CFC :	Céphalosparine / Fucidine / Cetrimide
CN :	Gélose contient de l'acide nalidixique
D :	Diamètre
EN :	Entérobactérie
Cm :	Centimètre
g :	Gramme
KS :	El'klila séchée
KF :	El'klila fraîche
G :	Guanine
H :	Heure
I :	Intermediaries
H₂O₂ :	Peroxyde d'Hydrogène
pH :	potentiel d'Hydrogène
Lac⁺ :	Lactose positive
Lac⁻ :	Lactose négative
Min :	minute.
mm :	Millimètre
ml :	Millilitre
Na Cl :	Chlorure de Sodium
l :	Litre
S :	Sensible
ST :	Staphylocoque
SCP :	Staphylocoque à coagulase positive
SCN :	Staphylocoque à coagulase négative
R :	Résistante
PS :	Pseudomonas
% :	Pourcentage
Mm :	Micromètre
µg :	Microgramme

Liste de figure

1	Shéma simplifie les différentes étapes de préparation des laitiers traditionnelles Algériens	9
2	Arbre phylogénétique des bactéries lactiques	15
3	Morphologie des cellules de levure et des mycelium	27
4	Cycles de reproduction de la levure(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	29
5	Cycle de vie des moisissures	31
6	Diagramme de fabrication du fromage traditionnel ' el Klila '	35
7	Fermentation partielles de l'acide lactique (KS1	58
8	KS1 fermentation totale de l'acide lactique (KS1)	58
9	Test de catalase	59
10	Représentation graphique de la forme des bactéries lactiques isolées.	62
11	Représentation graphique de type fermentaire des bactéries lactiques isolées	63
12	Résultat du test d'hydrolyse de l'arginine	64
13	Résultat de l'attaque des sucres	65
14	Distribution du pourcentage des souches lactiques	68
15	Représentation graphique des profile des souche de bactéries lactiques isolées vis à vis des antiboitiq ue utilisés	71
16	Diamètre d'inhibition en (mm)des souches lactique vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i>	74
17	Diamètre d'inhibition en mm des souches lactique vis-à-vis <i>Staphylococcus manitol</i>	75
18	Diamètre d'inhibition en mm des souches lactique vis-à-vis <i>Pseudomonas</i>	76
19	Diamètre d'inhibition en mm des souches lactique vis-à-vis <i>E.coli</i>	77
20	Grande colonie rose bombé	79
21	Petite colonie incolore	79
22	Répartition de l'ensemble des souches des entérobactéries isolées	85
23	Profil de sensibilité des souches testé des entérobactéries aux antibiotique	87
24	Colonie de <i>S. Aureus</i> sur milieu Chapman (KS ₁ ST ₁).	89
25	Colonie de <i>S. Epidermidis</i> sur milieu Chapman (K F ₁ ST ₈).	89
26	Production de catalase par les cocci à Gram positif isolés	90
27	Résultat du test de coagulase libre	93
28	Répartition des espèces isolées étudiées selon leur nature .	94
29	Représentation graphique des profils des souches staphylocoques vis-à-vis des antibiotiques utilisées	96
30	Résultat de production de pyocianine sur milieu King A	100
31	Résultat de production de pyoverdine sur milieu King B	
32	: Représentation graphique des profils des souches des <i>Pseudomonas</i> vis-à-vis des antibiotiques utilisées	103

Liste des planches

N°	Titre	Page
1	Aspects et couleurs des différents échantillons étudiés de 'Klila'	36
2	Méthode d'isolement des bactéries lactiques à partir de klila	37
3	Aspect des colonies des bactéries lactiques après une mise en culture sur milieux solides MRS au vert de bromocrésol et M17.	57
4	la différente observation microscopique (x100) après coloration da Gram	59
5	les différents testent des bactéries lactiques	66
6	Photos représentant des profils des quelque souche de quelque souches des bactérie lactique	72
7	Inhibition obtenue par les souches lactiques vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i>	74
8	Inhibition obtenue par les souches lactiques vis-à-vis <i>Staphylococcusmannitole</i> (-)	75
9	Inhibition obtenue par les souches lactiques vis-à-vis <i>Pseudomonas</i>	76
10	Inhibition obtenue par les souches lactiques vis-à-vis <i>E.coli</i>	77
11	Examen microscopique des souches d'entérobactéries	80
12	Illustration de l'identification par galerie API 20 E des espèces d'entérobactéries isolées	84
13	Photos représentant des profils de quelque souche d'entérobactéries vis à vis des antibiotiques	88
14	Examen microscopique des souches de staphylocoque	90
15	Examen macroscopique des souches de <i>Pseudomonas</i>	97
16	Examen microscopique des souches de <i>Pseudomonas</i>	98
17	Photos représentant des profils d'antibiogramme De quelque souche de <i>Pseudomonas</i> vis à vis des différents antibiotiques	104
18	Examens macro et microscopique des levures et moisissures	106

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Composition du lait chez divers mammifères	4
2	Constantes physiques usuelles du lait de vache	5
3	Composition moyenne du lait de vache	6
4	Caractéristiques de quelque genre des bactéries lactique	18
5	Les principaux groupes des <i>entérobactéries</i>	20
6	Les principaux groupes des <i>Pseudomonas</i>	24
7	Caractéristiques des échantillons prélevés	34
8	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 ^E	47
9	Liste des antibiotiques utilisés vis-à-vis Les bactéries lactiques	51
10	Liste des antibiotiques utilisés vis-à-vis les <i>entérobactéries</i>	52
11	Liste des antibiotiques utilisés vis-à-vis <i>Les staphylocoque</i>	53
12	Liste des antibiotiques utilisés vis-à-vis <i>Les Pseudomonases</i>	54
13	Résultats de test catalase et l'aspect microscopique et macroscopique des isolats lactiques	60
14	Résultats des tests biochimiques et physiologique des souches lactiques	67
15	Résultats de tests de l'attaque des sucres	69
16	Détermination de la sensibilité des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques	70
17	Résultats du test d'antagonisme par la méthode de la diffusion sur gélose	73
18	Résultats de test catalase et l'aspect micro et macroscopique des isolats des entérobactéries	80
19	Résultats de la manipulation avec l'apie 20	82
20	Fréquence de souches isolées	84
21	Détermination de la sensibilité des entérobactéries vis-à-vis des antibiotique	85
22	Résultats de test catalase et l'aspect microscopique et macroscopique des isolats des <i>staphylocoques</i>	90
23	Résultats de pré-identification par les techniques microbiologiques standards	92
24	Résultat de l'antibiogramme des souches des staphylocoques	94
25	Résultats de test catalase et l'aspect microscopique et macroscopique des isolats des pseudomonase.	98
26	Résultat de l'antibiogramme des souches des <i>Pseudomonas</i>	101

Sommaire

Introduction

Partie théorique

Chapitre I : Le lait et les produits laitiers traditionnels

I. Le lait	04
I.1. Définition du lait	04
I.2. Composition du lait	04
I.3. Propriétés physiques et chimiques.....	05
I.3.1. Propriétés physiques.....	05
I.3.2. La composition chimique du lait.....	06
I.4. Importance Nutritionnelle.....	07
I.5. Microflore du lait.....	07
I.5.1 Flore originelle.....	08
I.5.2. Flore de contamination.....	08
II. les produits laitiers traditionnels.....	09
II.1. Klila	10
II.1.1. La composition chimique du Klila.....	10
II.2. Rayeb.....	10
II.3. Bouhezza.....	10
II.4. Takammarit.....	11
II.5. L'ben.....	11
II.6. La crème, la Zebda ou beurre frais.....	11
II.7. Aoules.....	11
II.8. Lebaa.....	11
II. 9. Jben.....	12

Chapitre II : La microflore d'el'Klila

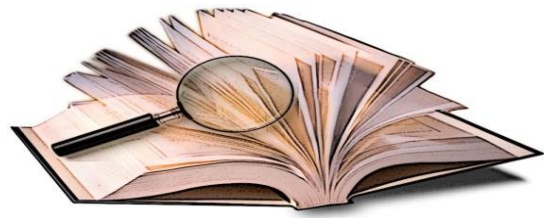
I. Les bactéries lactiques.....	14
I.1. Généralités sur les bactéries lactiques.....	14
I.2. Habitat et origine.....	14
I. 3. Classification et taxonomie.....	15
I.4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques.....	15
I.4.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	15
I.4.2. Le genre <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i>	16
I.4.3. Le genre <i>Streptococcus</i>	16
I.4.4 Le genre <i>Lactococcus</i>	16
I.4.5 Le genre <i>Leuconostocs</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	16
I.4.6. Le genre <i>Leuconostoc</i>	17
I.4.7. Le genre <i>Weissella</i>	17
I.4.8. Le genre <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	17
I.4.9 Le genre <i>Enterococcus</i>	17

I.4.10. Le genre <i>Carnobacterium</i>	18
. I.4.11 Le genre <i>Bifidobacterium</i>	18
II. Les entérobactéries.....	19
II.1.Définition.....	19
II.2. Habitat.....	19
II.3. Classification.....	19
II.4.Caractères culturaux.....	21
II.5. Caractéristiques des principaux genres des entérobactéries	21
II.5.1 <i>Escherichia coli</i>	21
II.5.1.1.Habitat	21
II. 5. 2. <i>Shigella</i>	22
II.5.2.1.Habitat	22
II. 5.3. <i>Salmonella</i>	22
II.5.3.1 Habitat.....	22
II.5.4. <i>Klebsiella</i>	22
II. 5.5 <i>Yersinia</i>	23
III. Les <i>Pseudomonas</i>	23
III. 1.Généralités.....	23
III. 2.Habitat.....	23
III.3.Taxonomie	23
IV. Les <i>Staphylocoques</i>	25
IV.1.Généralités sur le genre	25
IV.2.Habitat.....	25
IV.3. <i>Les staphylocoques</i> , une grande famille	26
IV.3.1. <i>Les staphylocoques</i> coagulasse positive (SC +)	26
IV.3.2 <i>Les staphylocoques</i> coagulasse-négative (SC-)	26
IV.4.Taxonomie et classification.....	26
V. <i>Les levures</i>	27
V.1.Généralité sur <i>les levures</i>	27
V.2. Caractères culturaux.....	28
V.3. Modes de reproduction	28
V.3.1.Reproduction asexuée ou multiplication végétative.....	28
V. 3.2.Reproduction sexuée.....	28
V.4.Classification des principaux genres de <i>levure</i>	29
VI. <i>Les moisissures</i>	29
VI.1.Généralité sur <i>Les moisissures</i>	29
VI.2. Besoins nutritifs et activités biologiques.....	30
VI.3. Cycle de vie.....	31
VI.4. Classification.....	31
VI.4.1 <i>Les Zygomycètes</i>	31
VI.4.2 <i>Les Ascomycètes</i>	32
VI.4.3 <i>Les Basidiomycètes</i>	32
VI.4.4 <i>Les Deutéromycètes</i>	32
VI.5. Les principaux genres fongiques.....	32
Partie pratique	
I.1. Objectif de l'étude	34
II. Matériels et milieux de culture utilisés	34
II.1. Matériels biologique.....	34
II.2. Matériels non biologique.....	34
III .Echantillonnage	34

III.1. Provenances des échantillons.....	34
IV. Isolement des bactéries	37
IV.1. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales.....	37
IV.2. Ensemencement et isolement des bactéries.....	38
IV.2.1. Ensemencement et isolement des souches lactiques.....	38
IV.2.1.1. Ensemencement	38
IV.2.1.2. Etude macroscopique	38
IV.2.1.3. Etude microscopique	38
IV.2.1.4. Purification et conservation des isolats	38
IV.2.2. Ensemencement et isolement des entérobactéries.....	39
IV.2.2.1. Ensemencement.....	39
IV.2.2.2. Etude macroscopique.....	39
IV.2. 2.3.Etude microscopique.....	39
IV.2.2.4. Purification et conservation des isolats.....	39
IV.2.3. Ensemencement et isolement des staphylocoques.....	40
IV.2.3.1. Isolement.....	40
IV.2.3.2. Etude macroscopique	40
IV.2.3.3. Examens microscopiques.....	40
IV.2.3.4. Purification et conservation des souches	40
IV.2.4. Ensemencement et isolement des Pseudomonas.....	41
IV.2.4.1. Isolement.....	41
IV.2.4.2. Etude macroscopique.....	41
IV.2.4.3. Examens microscopiques	41
IV.2.4.4. Purification et conservation des souches.....	41
IV.2.5. Ensemencement et isolement des Levures et Moisissures.....	42
IV.2.5.1. Isolement.....	42
IV.2.5.2. Etude macroscopique.....	42
V. Identification biochimique et physiologique des bactéries	43
V.1. Identification biochimique et physiologique des bactéries lactiques.....	43
V1.1. Catalase.....	43
V.1.2. Type fermentaire	43
V.1.3. Culture en différentes températures (4, 15, 30 ,37 et 45°C).....	43
V.1.4. Culture différents concentration de NaCl 3%, 7% et 10%.....	44
V.1.5. Culture à pH 3,9.....	44
V.1.6. Recherche de l'arginine d'hydrolase (ADH).....	44
V.1.7. Test de l'attaque des sucres	44
V.1.8. Mise en évidence de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques	45
V.2. Identification biochimique et physiologique des entérobactéries.....	46
V.2.1. API 20 E.....	46
V. 3. Identification biochimique et physiologique des staphylocoques.....	49
V.3.1.Catalase.....	49
V.3.2.Staphylocoagulase.....	49
V.3.2.1Coagulase libre.....	49
V.4. Identification biochimique et physiologique des Pseudomonas.....	49
V.4.1.Catalase	49
.	
V.4.2. Teste de pigmentation	49
VI. AntibioGramme des souches isolées.....	50
VI.1. Technique de l'antibiogramme.....	50
VI.2. Antibiotique utilisés.....	51

Résultat et discussions

I.1. Isolement des bactéries lactiques	56
I.1.1. Etude macroscopique	56
I.1.2. Etude microscopique	58
I.1.3. Test de Catalase	58
I.2 Identification biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques.....	62
I.2.1 Type fermentaire.....	62
I.2.2 Croissance à différentes températures 4°C, 15°C et 45°C.....	63
I.2.3 Croissance en présence de différentes concentrations de Na Cl	63
I.2.4 Croissance à pH 3,9	64
I.2.5 Recherche de l'arginine d'hydrolase (ADH)	64
I.2.6 Test de l'attaque des sucres	64
I.3. Détermination de la sensibilité des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques.....	64
I.4 l'activité antagoniste des bactéries lactiques	73
I.4. 1. Activité antagoniste de souches vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i>	74
I.4. 2. Activité antagoniste de souches vis-à-vis de <i>Staphylococcus mannitol (-)</i>	75
I.4.3. Activité antagoniste de souches vis-à-vis de <i>Pseudomonas</i>	76
I.4.4. Activité antagoniste de souches vis-à-vis de <i>E. coli</i>	77
II.1. Isolement et identification des entérobactéries.....	79
II.1.1. Observation macroscopique des colonies.....	79
II.1.2. Observation microscopique des colonies	80
II.2. Identification spécifique des entérobactéries.....	82
II.2.1.1 Résultats des tests d'identification par la galerie API 20 E.....	82
II.3. IL'antibiogramme	85
III.1. Isolement et identification des <i>Staphylocoque</i>	88
III.1.1 Observation macroscopique des colonies.....	88
III.1.2. Observation microscopique des colonies.....	89
III.1.3. Test catalase.....	89
III.2.1. Test de coagulase libre	91
III.2.2. Répartition des espèces selon leur nature.....	93
III.3. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques (L'antibiogramme).....	94
IV. Isolement et identification des <i>Pseudomonas</i>	96
IV.1. Observation macroscopique des colonies.....	96
IV.2. Observation microscopique des colonies.....	97
IV.3. Teste de pigmentation.....	99
IV.3.1. production de pyocyanine.....	99
IV.3.2. Production de poverdine.....	99
IV.4. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	100
V. Isolement et identification des levures et moisissures.....	106
Conclusion	
Référence bibliographique	
Annexe	



Introduction

Introduction

L'Algérie a une tradition des produits laitiers bien établie, transmise de génération en génération, qui a un aspect important de la culture algérienne. Le lait abondant durant certains moments de l'année, il est difficile de le conserver et facilement périssable, surtout dans les zones à climat très chaud. Dans n'importe quelle culture, il a été toujours traité pour augmenter la durabilité et la valeur nutritive et en même temps permettre la commercialisation. Les femmes algériennes comme toutes les cultures pastorale, ont toujours été les principale protagonistes auteurs de la transformation du lait (**Claps et Morone ,2011**).

Une grande variété de produits laitiers fermentés est préparée traditionnellement en Algérie dont le but est la bio-préservation du lait pour utilisation ultérieur. Les produits laitiers traditionnels algériens importants qui ont la signification commerciale sont : Raibe, Lben, Klila, Zebda et j'ben (**Benkerroum et al.,2004**).

Parmi ces produit el klila est préparée à partir du lait chauffé sur feu doux pendant 12 minutes environ pour favoriser la séparation du caillé et du lactosérum et accélérer le processus d'égouttage. Le lait caillé est égoutté dans un tissu fin. El'klila peut être consommée à l'état frais ou additionné à certains plats traditionnels après avoir été coupé en petits cubes et séchés au soleil (**Touati, 1990**).La fermentation de klila comme beaucoup de processus de fermentation de produit traditionnel est spontanée, non contrôlée implique beaucoup de micro-organisme d'aliment qui sont influencés.

Plusieurs facteurs de risques de contamination d'el'klila aux différents stades de sa fabrication entrent en jeu, ce qui nous a poussés à réaliser ce travail, dont l'objectif principal de notre travail est d'isoler, purifier et identifier la microflore à partir d' el klila (les *Staphylocoque, les pseudomonas,les bactéries lactiques, levures et moisissure*)qui est parmi des produits laitiers traditionnels à base de lait de vache de la régions Tébessa, et de tester leur pouvoir antimicrobien dans le but de sélectionner des souches inhibitrices possédant un pouvoir inhibiteur contre les germes pathogènes afin de préserver la santé et l'hygiène publique .

Ce mémoire est répartir en trois grands chapitres qui sont :

-Une synthèse bibliographique :

- qui définit le lait et les produits laitier.

- les germe impliqués dans la fromage traditionnelle algérien (el'klila).

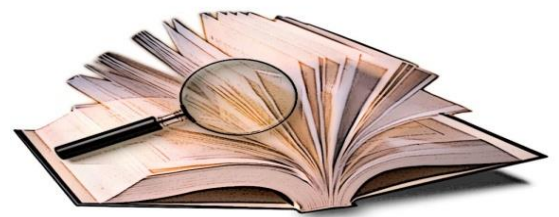
-la partie matériel et méthode décrite les différentes méthodes utilisée pour réalise de ce travaille.

-les résultats et la discussion des donnés microbiologique qui sont traités dans la troisième partie du manuscrit.

Partie

Bibliographique

Chapitre I



Le lait et les produits laitiers traditionnels

I. Le lait

I.1. Définition du lait

C'est en 1909 que le Congrès International de la Répression des Fraudes a défini le lait comme étant : « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » Le lait sans indication de l'espèce animale de provenance correspond au lait de vache (**Larpen et al., 1997**). Le lait apparaît comme un liquide opaque, blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon sa teneur en β -carotènes et en matière grasse. Il a une odeur peu marquée mais reconnaissable (**Cniel, 2006**).

I.2. Composition du lait

Le lait est un substrat très riche, fournissant à l'Homme et aux jeunes mammifères un aliment presque complet (**Larpen et al., 1997**). Il contient une forte proportion d'eau environ 87%. Le reste est représenté par l'extrait sec (environ 130g par litre). Les principaux constituants de cet extrait sec sont : les lipides, les glucides, les protides, les vitamines et les éléments minéraux (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^-) (**Vimahieu, 2005**). **Tableau 01**

Tableau 01 : Composition du lait chez divers mammifères (**Dillon, 2008**).

Composition moyenne du lait (g/l)								
	Eau	Extrait sec	Matière Grasse	Protéines totale caséine albumine			Glucide : Lactose	Matières Minérales
Equidés								
Jument	925	100	10-15	20-22	10-12	7-10	60-65	3-5
Anesse	925	100	10-15	20-22	10-12	9-10	60-65	4-5
Ruminante								
Vache	900	130	35-40	30-35	27-30	3-4	45-50	8-10
Chèvre	900	140	40-45	35-40	30-35	6-8	40-45	8-10

D'autres constituants sont présents mais en quantité minime. Cependant, certains d'entre eux, du fait de leur activité biologique, revêtent une grande importance. Ce sont:

- les enzymes: peroxydase, catalase, phosphatase .

- les vitamines : facteurs A, D, C, BI, B2, B6, BI2..etc.

D'autres constituants sont présents mais en quantité minime. Cependant, certains d'entre eux, du fait de leur activité biologique, revêtent une grande importance. Ce sont:

- les enzymes: peroxydase, catalase, phosphatase

- les vitamines : facteurs A, D, C, BI, B2, B6, BI2..etc.

- les lécithines (phospholipides)

- les nucléotides

- les éléments cellulaires: leucocytes, cellules épithéliales, ...etc.

Outre, ces constituants, le lait renferme aussi des micro-organismes en quantité variable suivant l'état de santé de la femelle laitière, de l'hygiène de la traite et des manipulations diverses subies par le lait (Alais, 1984; Mollamadou ,2001).

I.3.Propriétés physiques et chimiques

I.3.1.Propriétés physiques

La composition du lait est caractérisée par une grande complexité dans la nature et la forme de ses composants, de point de vue physique, le lait présente une hétérogénéité, puisque certains composants sont dominants de point de vue quantitatif, ce sont l'eau, la matière grasse, les protéines et le lactose ; les composés mineurs sont représentés par les matières minérales, les enzymes et les vitamines. Les propriétés physiques comme la densité absolue, la viscosité, la tension superficielle et la chaleur spécifique dépendent de l'ensemble des constituants. **tableau 02.**

Tableau 02: Constantes physiques usuelles du lait de vache (Luquet, 1985).

Constantes	Valeurs
pH (20°C)	6,5 à 6,7
Acidité titrable (°D)	15 à 18
Densité	1,028 à 1,036
Température de congélation (°C)	(-0,51) à (-0,55)
Point d'ébullition (°C)	100,5

I.3.2. La composition chimique du lait

La composition du lait varie d'une espèce de mammifère à une autre car elle est adaptée aux besoins de chacune d'elle. Cependant, il existe des caractéristiques communes aux différents laits à savoir la richesse en calcium, qualité protéique appréciable, le lactose comme sucre prédominant et une richesse en vitamines notamment du groupe B. Sa composition dépend aussi d'autres facteurs tels que la race des vaches, la saison et le climat. Certains de ces facteurs peuvent être contrôlés donc modifiés pour améliorer la rentabilité laitière d'une vache (Mathieu, 1998), tableau 03.

Tableau 03 : Composition moyenne du lait de vache (Alais et al, 2008)

Composants	Composants Concentrations (g/l)	État physique des composants
Eau	905	Eau libre plus eau liée (3,7%)
Glucides (lactose)	49	Solution
Lipides	35	Emulsion des globules gras (3 à 5µm)
Matière grasse proprement dite	34	
Lécithine (phospholipides)	0,5	
Insaponifiable (stérols, carotènes)	0,5	
Protides	34	
Caséine	27	
Protéines solubles (globulines, albumines)	2,5	
Substances azotées non Protéiques	1,5	
Sels	9	Solution ou état colloïdale
De l'acide citrique	2	
De l'acide phosphorique (P₂O₃)	2,6	
Du chlorure de sodium (NaCl)	1,7	
Constituants divers (vitamines, enzymes, gaz dissous)	Traces	
Extrait sec total	127	
Extrait sec non gras	92	

I.4.Importance Nutritionnelle

Le lait joue un rôle très important dans l'alimentation Humaine, tant au point de vue calorique que nutritionnel. Un litre de lait correspond à une valeur d'environ 750 Kcal facilement utilisable.

Comparativement aux autres aliments, il constitue un élément de haute valeur nutritionnelle.

L'intérêt alimentaire du lait est :

- Une source de protides d'excellente valeur biologique.
- La principale source de calcium
- Une source de matière grasse
- Une bonne source de vitamines (**Leroy, 1965**)

Le lait est également une excellente source de minéraux intervenant dans divers métabolismes Humains notamment comme cofacteurs et régulateurs d'enzymes. Le lait assure aussi un apport non négligeable en vitamines connues comme Vitamines A, D, E (liposolubles) et Vitamines B1, B2, B3(hydrosolubles). Il est néanmoins pauvre en fer et en cuivre et il est dépourvu de fibres (**ChefteletCheftel, 1996**).

La haute qualité nutritionnelle des protéines du lait repose sur leur forte digestibilité et leurs compositions particulièrement bien équilibrée en acides aminés indispensables. Pour les nouveau-nés, les protéines du lait constituent une source protéique adaptée aux besoins de croissance durant la période néonatal (**Derby, 2001**).

I.5.Microflore du lait

Le lait contient peu de micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions, à partir d'un animal sain (moins de 5000 germes/ml) (**Larpent, 1997**). Dans des conditions de propreté et d'hygiène normale, le lait cru renferme de nombreux germes constituant la flore originale. Cette microflore est représentée essentiellement par des lactobacilles et des streptocoques lactiques commensaux provenant du pis et des canaux galactophores (**Hermier et al., 1992**).

Le lait cru peut être contaminé par différents microorganismes avant, pendant et après la traite ; selon (**Betsi et al.,1997**) ils peuvent être classés dans les flores suivantes :

I.5.1 Flore originelle

Le lait contient peu de micro-organismes lorsque il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10^3 germes /ml). Il s'agit essentiellement de germes saprophytes de pis et des canaux galactophores : microcoques mais aussi streptocoques lactique (*Lactococcus*) et les lactobacilles. Le lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrice appelées « lacténines » mais leur action est de très courte durée (1 heure environ) (Guiraud, 2003).

D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade : ils sont généralement pathogènes et dangereux au point de vue sanitaire. Il peut s'agir d'agents de mammites, c'est-à-dire d'infections du pis : streptocoques pyogènes (*Streptococcus*), coryné bactéries pyogènes, staphylocoques, etc..... il peut s'agir aussi de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en l'absence d'anomalies du pis : *Salmonella*; *Brucella*, agent de la fièvre de Malte et exceptionnellement *Listeria monocytogenes*, agent de la listériose; *Mycobacterium*, agent de la tuberculose; *Bacillus anthracis*, agent du charbon; *Coxiellaburnettii*, agent de la fièvre Q, et quelque virus. Les germes banaux du pis ne présentent pas de danger sanitaire mais peuvent se développer abondamment dans le lait. Les autres peuvent être responsables de maladies ou d'intoxications graves qui sont généralement limitées par la surveillance vétérinaire des animaux producteurs. (Guiraud, 2003).

I.5.2 Flore de contamination

Le lait se contamine par des apports microbiens d'origines diverses :

- **Fèces et tégument de l'animal**: coliformes, entérocoques, clostridium, éventuellement Entérobactéries pathogène (*salmonella, shigella, Yersinia*).....etc
- **Sol**: *Streptomyces, Listeria*, bactéries sporulées, etc.
- **Litières et aliments** : flores banale variée, en particulier les lactobacilles, *Clostridium butyriques* (ensilages).
- **L'air et eau**: flores diverses dont *Pseudomonas*, bactéries sporulées.....etc.
- **L'équipement de traite et de stockage du lait** : microcoques, levures et flore lactique avec lactobacilles streptocoques (*Sterptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Leuconostoc*.....etc, Cette flore est souvent spécifique d'une usine.
- **Manipulateur** : *Staphylocoques* dans le cas de traite manuelle, mais aussi germes provenant d'expectorations, de contaminations fécales.....etc.
- **Vecteurs divers (insectes en particulier)** : flore de contamination fécale.

Parmi ces micro-organismes, il en est d'inoffensifs, d'autres de fangeux du point de vue sanitaire, d'autres capable d'entraîner la détérioration du lait (Guiraud, 2003).

II. les produits laitiers traditionnels

C'est l'augmentation de la production du lait durant certaines saisons et la difficulté de son préservation sous la forme fraîche a conduit au développement des technologies de production traditionnel (Dharam et Narender, 2007 ; Lahsaoui, 2009). La consommation des produits laitiers est également associée à des effets bénéfiques sur la santé en plus de leurs valeurs nutritionnelles (Takahiro et al., 2007; Shan-na et al., 2011). La transformation du lait de chèvre en produits laitiers traditionnels algériens, tels que Raib, Lben et Jben est réalisée via une fermentation spontanée sans l'ajout d'une entrée sélectionnée (Badis et al., 2004). Ces produits sont partie intégrante d'héritage algérien et ont une grande importance culturelle médicinale, et économique il ont être développée sur un longue période avec les compétences culinaire de fermes en plus de la conservation des solide du lait pour plus longuement à température ambiante (Lahsaoui, 2009).

La figure suivante schématise les méthodes de fabrication de principaux produits laitiers Traditionnels.

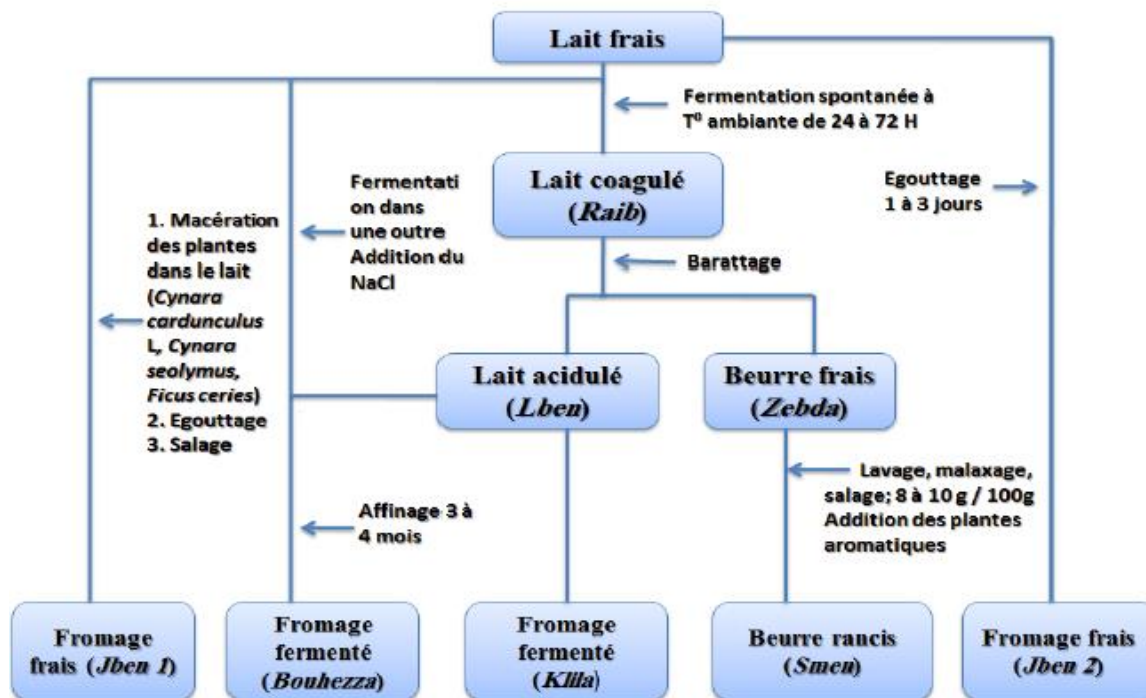


Figure 01: schéma simplifié des différentes étapes de préparation des produits laitiers traditionnels algériens (Bendimerad, 2013)

II.1.Klila

En Algérie, la klila est un fromage traditionnel populaire à la campagne, il est fabriqué à partir du lait cru de vache ou de brebis non pasteurisé. Ce fromage est fabriqué par la conservation du lait dans des pots propres non stériles à la température ambiante (généralement à 2 jours) pour avoir après un goût acide. Le lait acide appelé « Raib », est baraté dans une peau de chèvre spéciale durant 2 à 3 heures. puis l'eau est additionnée pour séparer le beurre qui va être après collectée. Après chauffage du lait écrémé appelé « leben » pendant 15 min à 40-50 C°, le petit-lait est séparé du fromage par filtration à travers d'une mousseline « *chache* ». Le fromage est consommé sous cette forme ou bien séché sous le soleil pour une longue conservation (**Boubekri et Ohta,1996 ; Mechai et al., 2014 ; Mahamedi et al., 2015**).

La fermentation de la klila, comme beaucoup de processus de fermentation produits traditionnels, est spontanée, non contrôlée et implique beaucoup de micro-organismes d'aliments qui sont influencés par les conditions environnementales de l'endroit où le fromage est fabriqué (**Boubekri et Ohta, 1996**).

II.1.1.La composition chimique du Klila

Elle varie considérablement entre les différentes régions, et surtout ce qui concerne la composition la Kila est très riche en protéines, et en matières grasses, avec une teneur d'eau varié selon le mode de fabrication et un pH très bas se qui explique l'augmentation de l'acidité de ce produit (**Mennane et al., 2007**).

II.2.Rayeb

Le Rayeb est un produit qui n'aura aucun traitement thermique préalable et laissé s'acidifier par fermentation spontanée jusqu'à l'obtention d'un caillé (**Touati ,1990**).

Il peut être consommé comme boisson après une simple homogénéisation, ou additionné aux autres plats traditionnels (couscous, mesfouf). Il entre dans la fabrication du L'ben (**Aissaoui, 2004**).

II.3.Bouhezza

C'est un fromage fermier fermenté à égouttage spontané, préparé à l'origine à partir de lait de chèvre et éventuellement de brebis mais actuellement il est préparé à partir du lait de vache, il est très répandu dans l'est algérien plus précisément dans les régions de Oum Bouaghi, Khenchela, et dans certaines régions de Batna (**Mekentichi, 2003**).

Le salage, l'égouttage et l'affinage du Bouhezza sont réalisés simultanément dans une «Chekoua», préalablement traitée aux tannins pendant 3 à 4 mois. Au stade de la

consommation le fromage est pétri avec incorporation de poudre de piment rouge, ce qui lui donne une caractéristique particulière (**Lemouchi, 2008**).

II.4.Takammarit

C'est un fromage de Hoggar, il est fabriqué par introduction d'un bout de caillette de jeunes chevreaux dans le lait. Après quelques heures, le caillé est retiré à l'aide d'une louche et déposé en petits tas sur une natte et sera ensuite pétri pour évacuer le sérum puis déposé dans une autre natte faite de tige de fenouil sauvage qui lui donne de l'arôme. Les nattes sont ensuite placées à l'ombre jusqu'au durcissement du fromage.

Le fromage peut subir un affinage durant un mois (**Bousnane et Djadi, 2009**).

II.5.L'ben

La préparation artisanale de l'ben est simple, le lait est abandonné à lui-même jusqu'à sa coagulation. Celle-ci se fait à température ambiante et dure 24 à 48 h selon la saison. Le barattage qui lui succède dure 30 à 40 minutes. A la fin du barattage, on ajoute généralement un certain volume d'eau (environ 10 % du volume du lait), chaude ou froide, suivant la température ambiante, de façon à ramener la température de l'ensemble à un niveau convenable au rassemblement des grains de beurre (**Ouadghiri, 2009 ; Benkerroum et Tamime, 2004**).

II.6.La crème, la Zebda ou beurre frais

Le beurre est un «produit gras dérivé exclusivement du lait et/ou de produits obtenus à partir du lait, principalement sous forme d'une émulsion du type eau dans l'huile». Il est obtenu par barattage de la crème du lait. Elle contient totalité des lipides du lait (**Luquet et Corrieu, 2005**).

II.7.Aoules

Il est fabriqué à partir du lait de chèvre qui est extrêmement aigre. Après une coagulation intense, le fromage obtenu a une pâte dure (matière sèche représente 92%). L'égouttage se fait dans une paille ensuite, il est reformé sous forme des boules plates séchées au soleil, il peut être consommé en mélange avec les dates (**Abdelaziz et Aitkaci, 1992**).

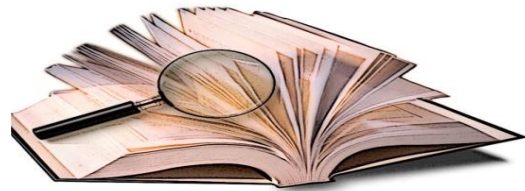
II.8.Lebaa

La matière première est le colostrum, par fois il est mélangé avec des oeufs, il est salé puis bouillit pendant 15 mn environ. Le produit obtenu est appelé lebaa (**Lemouchi, 2008**).

II.9.Jben

Jben est un fromage traditionnel frais obtenu par coagulation enzymatique (présure extrait à partir de la caillette de veau). Le lait destiné à la fabrication est chauffé, une fois tiède, un fragment de caillette bovine est macéré dans le lait. Après coagulation du lait et égouttage, le caillé ainsi obtenu peut être salé ou additionné de quelques épices ou de plantes aromatiques (**Lahsaoui, 2009**).

Chapitre II:



La microflore d'el Klila

El'klila parmi les produits Algérienne, et considère comme le produit laitier traditionnel artisanale dont le mode de fabrication découle de l'héritage culturel de la population, est consommé soit tel qu'il est, ou après un séchage afin de prolonger sa durée de conservation (Benkerroumet *al.*, 2004). Il contient des microflore variée parmi ces microflore.

I .Les bactéries lactiques

I.1.Généralités sur les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont traditionnellement été associées à des fermentations alimentaires humaine et animale, et sont généralement considérés comme des micro-organismes bénéfiques, et même certaines souches sont des bactéries à effet probiotique. Cependant, certains genres (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*) contiennent également des espèces ou des souches qui sont des agents pathogènes humains ou animaux reconnus (Lahtinen *et al.*, 2012).

Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres. Ces bactéries non pathogènes, à coloration de Gram positive (Gram +) ont un métabolisme anaérobie facultatif et ne produisent pas de catalase. Les bactéries colonisent des milieux naturels variés tels que la surface des végétaux et les muqueuses des mammifères (intestin, bouches, vagin et surface de la peau). Leur utilisation est apparue, depuis des millénaires, dans la fabrication des aliments comme les fromages, les charcuteries, les boissons fermentées, le pain au levain, les sauces, les saumures, les légumes fermentés, les ensilages....etc. Elles permettent par leur métabolisme, d'augmenter la durée de conservation des denrées et leur confèrent une saveur et une texture différente (Badis *et al.*, 2005).

I.2.Habitat et origine

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes ubiquitaires susceptibles d'être retrouvés dans tous types d'habitat (Rizk, 2005). Elles sont retrouvées dans différentes niches écologiques comme les produits laitiers, la viande, les végétaux, les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (Kouame, 2013).

I.3. Classification et taxonomie

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen sur divers critères morphologiques et physiologiques (activités catalase et nitrite réductase, type de fermentation) (Stiles et Holzapfel, 1997). Les critères phénotypiques permettant la classification des bactéries se sont ensuite étendus à la composition de la paroi, le type d'acides gras cellulaires, le type de quinones (accepteur d'électrons). Cependant ces méthodes phénotypiques ne rendent pas compte des relations phylogénétiques entre les groupes. En 1977, Woese et Fox introduisent la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques. Cette méthode va révolutionner la taxonomie des bactéries et la classification des bactéries lactiques va être profondément modifiée. D'autres méthodes génotypiques (basés sur les acides nucléiques) sont aussi utilisées en classification, comme le pourcentage en GC ou l'hybridation ADN: ADN (Stiles et Holzapfel, 2001). **Figure 02.**

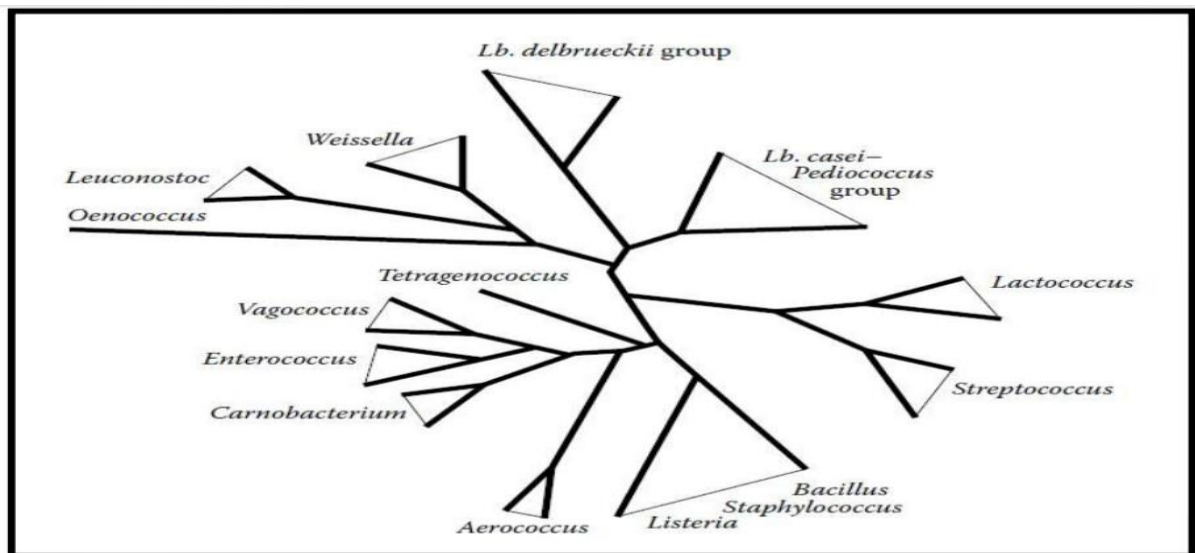


Figure 02 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Lahtinen et al., 2012).

I.4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

I.4.1. Le genre *Lactobacillus*

Les bactéries du genre *Lactobacillus* ont des aspects variés allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Ils sont Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînes et habituellement immobiles. Les lactobacilles se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (Siegumfeldt et al., 2000).

I.4.2. Le genre *Lactococcus* et *Streptococcus*

Ils rassemblent des coques homofermentaires, produisant en majorité de l'acide lactique. Les espèces initialement regroupées dans le genre *Streptococcus* ont été redistribuées au siende ces genres selon les homologies de leur ARN ribosomique 16S. (Michel fedrighi, 2005) .

I.4.3. Le genre *Streptococcus*

Comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *S. pyogenes* et *S. agalactiae*, d'autres sont impliquées dans la formation de la plaque dentaire (*S. mutans*). L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène. Du fait de ses propriétés technologiques, c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique (Laurent et al, 1998).

I.4.4 Le genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* est formé de bactéries à Gram positif dont les cellules, en forme de coques, sont associées par paires ou en chaînettes de longueur variable. Elles sont dépourvues de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence (anaérobies aérotolérantes). Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6.5% de NaCl ou à pH 9.6. Leur température optimale de croissance s'étend de 25 à 35°C, respectivement pour les souches de *Lc. Cremoris* et *Lc. lactis*.

Les *Lactococcus* sont capables de croître à 10°C mais pas à une température supérieure à 40°C (Dellaglio et al., 1994).

I.4.5 Le genre *Leuconostocs*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires en chaînettes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique ,de CO₂ et d'héthanol. Certaines espèces sont capables de fermenter le citrate ce qui leur confère une activité aromatique importante. D'autres synthétisent des d'extranes en présence de saccharose. Ce genre comporte 6 espèces présentes majoritairement dans les produits végétaux, mais elles sont également isolées dans les produits laitiers. Ils participent à la fermentation des produits végétaux (Michel, 2005) .

I.4.6. Le genre *Leuconostoc*

Ces bactéries lactiques sont apparues à l'origine, sous forme de chaînes, d'aspect mucilagineux, non pigmentés. Les premières souches ont été isolées à partir d'accidents apparus dans les sucreries. *Les leuconostocs* responsables de ces accidents produisent du dextrane en milieu saccharosé (entourées d'une gaine comme celle des *Nostocs*) (Zarour, 2010).

I.4.7. Le genre *Weissella*

Les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont hétérofermentaires et sont généralement immobiles (Lahtinem et al., 2012).

La température optimale de croissance est de 15°C, mais quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 45°C. (Bjorkroth et Holzapfel, 2006 Lahtinem et al., 2012).

I.4.8. Le genre *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Ce sont des coques uniformément sphériques ou ovoïdes mais jamais allongés, dont la particularité est le regroupement en tétrade du à une division dans les deux directions perpendiculaires (Pilet et al., 2005).

Les Pediococcus sont des coques homofermentaires dont la particularité est le groupement en tétrade ; ils sont mésophiles et le plus souvent incapables d'utiliser le lactose par contre, certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sel très élevées, comme *P. halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl. Ils sont souvent présents dans la bière, le vin, les produits végétaux et saumures (anchois salés) et participent à la fermentation des saucissons (Michel, 2005).

I.4.9. Le genre *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* rassemble la plupart des espèces du groupe sérologique D et comprend notamment les espèces anciennement désignées sous le terme (*Streptocoques fécaux*), comme *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Ce sont également des coques homofermentaires qui se caractérisent par leur développement à 10 et 45°C, leur aptitude croître en présence de 6,5% de NaCl, et à pH 9,6, et leur grande résistance aux facteurs de l'environnement, en particulier la température (30 min. à 60°C). Leur habitat est très varié : intestin de l'homme et des animaux, produits végétaux, sol, produits laitiers. Au sien des

bactéries lactiques, les bactéries du genre *Enterococcus* ont une position particulière : parfois utilisés comme indicateur de contamination fécale dans les aliments, ils peuvent aussi être associés à la fermentation de certains fromages italiens. (Michel, 2005).

I.4.10. Le genre *Carnobacterium*

Ce genre est constitué de bâtonnets courts parfois incurvés isolés ou en paires, psychrotolérants, pouvant se développer à pH= 9, et incapables de croître à 8% de NaCl ; quelques espèces sont catalase (+) en présence d'hème (Ababsa, 2012).

I.4.11 Le genre *Bifidobacterium*

Les cellules de *Bifidobacterium* se caractérisent par leur forme très irrégulière, souvent en V et Y, mais pouvant être coccoïde. Elles se différencient des autres bactéries lactiques par leur caractère anaérobie, leur G + C % élevé, et la présence d'une enzyme, la fructose 6-phosphate phosphocétolase. Celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique, ainsi qu'en moindre proportion de l'éthanol et d'autres acides organiques. Cette fermentation « lactique » a conduit à les rapprocher du groupe des bactéries lactiques. Leur température optimale de croissance est comprise entre 37°C et 41°C. Elles se développent à pH supérieur à 5. Elles sont isolées de l'homme et des animaux (Laurent, 1998). Le tableau suivant résume les caractéristiques de quelques genres de bactéries lactiques.

Tableau 4 : Caractéristiques de quelques genres de bactéries lactiques (Lahtinen et al., 2012).

Famille	Genre	Caractéristiques								
		Forme	CO ₂ à partir du Glucose	Croissance à 10°C	Croissance à 45°C	Croissance à 6.5% de NaCl	Croissance à 18% de NaCl	Croissance à pH 4.4	Croissance à pH 9.6	Type d'acide lactique
Aerococcaceae	<i>Aerococcus</i>	Cocci (tétrades)	-	+	-	+	-	-	+	L
Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium</i>	Bacille	-	+	-	ND	-	ND	-	L
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	Cocci	-	+	+	+	-	+	+	L
	<i>Tetragenococcus</i>	Cocci (tétrades)		+	-	+	+	Variable	+	
	<i>Vagococcus</i>	Cocci		+	-	-	-		-	
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	Bacille	Variable	Variable	Variable	Variable	-	Variable	-	D, L, DL
	<i>Pediococcus</i>	Cocci (tétrades)	-	Variable	Variable	Variable	-	+	-	L, DL
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	Cocci ²	+	+	-	Variable	-	Variable	-	D
	<i>Oenococcus</i>		+	+	-	Variable	-	Variable	-	D
	<i>Weissella</i>		+	+	-	Variable	-	Variable	-	D, DL
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i> ^b	Cocci	-	+	-	-	-	Variable	-	L
	<i>Streptococcus</i>		-	-	Variable	-	-	-	-	L

II. Les entérobactéries

II.1. Définition

Les entérobactéries constituent une famille bactérienne hétérogène regroupant un grand nombre d'espèces. Au niveau phénotypique, ce sont des bacilles Gram négatif droits, mobiles par flagelles péritriches, ou immobiles, non sporulés, aérobies facultatifs, produisant de l'acide à partir du glucose, pas de besoin en sodium, ni de stimulation, catalase positive, oxydase négative, réduisent habituellement les nitrates en nitrite (pas en N₂); ARNr 16S de gamma-protéobactéries. (Cristian, 2008 ; Madigan et Martinko, 2007).

Les différences entre les nombreux genres et espèces viennent de critères plus précis, comme la fermentation des différents sucres, la production ou non de sulfure, la production d'indole, la production d'uréase, la présence ou l'absence d'enzymes du métabolisme (désaminases, décarboxylases)...etc. (Meziani, 2012).

II.2. Habitat

Les Entérobactéries sont des hôtes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux où ils sont retrouvés soit à l'état pathogène, soit à l'état commensal. Mais cette localisation digestive n'est pas exclusive (Drame, 2001). On les retrouve également dans l'environnement (sols et eau) où ils participent à la dégradation des matières organiques, à l'altération des plantes suite à des nécroses, à une dégénérescence ou à un ramollissement (Gueye, 2007).

II.3. Classification

Les Entérobactéries appartiennent au règne des bacteria, à l'embranchement des Protéobacteria, à la classe des gamma-protéobacteria à l'ordre des enterobacteria et à la Famille des Enterobacteriaceae. Leur classification est basée sur l'étude de leurs caractères Phénotypiques (fermentation de différents sucres, production ou non de sulfures, présence ou absence de certains enzymes du métabolisme et ou génotypiques (ribotypage, hybridation ADN/ADN). (Perriere, 1992). Cette classification est résumée dans le **tableau 05**.

Tableau 05: les principaux groupes des entérobactéries (Perriere, 1992) .

<i>Groupes</i>	<i>Familles</i>	<i>Genre</i>	<i>Espèces</i>
GROUPE I	<i>Edwardsiellae</i>	<i>Edwardsiella</i>	
	<i>Salmonelleae</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i> <i>S. paratyphi</i> <i>S. enteritidis</i>
GROUPE II	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Levineae</i>	<i>Shigella</i>	<i>Shigelladysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>
		<i>Levinea</i>	
GROUPE III	<i>Klebsiella</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Enterobacter</i>		<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
	<i>Serratia</i>		<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Erwinia</i>		
GROUPE IV	<i>Proteae</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus rettgeri</i>
		<i>Providencia</i>	
GROUPE V	<i>Yersinieae</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>

II.4. Caractères culturels

Les *Enterobacteriaceae* développent bien dans un bouillon ou sur gélose ordinaire incubé 18 heures à 37°C. Sur gélose, on peut obtenir différentes formes. Les formes S (smooth) sont l'aspect habituel au sortir de l'organisme. Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides elles ont 2 à 4 mm de diamètre. Les formes R (rough) s'observent surtout avec les souches ayant subi plusieurs repiquages. Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate. En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux.

Les colonies rugueuses sont habituelles avec *les Klebsiella*. Leur diamètre peut dépasser 10 mm ; elles ont une tendance à la confluence. On peut les rencontrer aussi avec d'autres espèces, notamment *Salmonella paratyphi B*. Les colonies naines s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leur chaîne métabolique. Elles ne sont pas exceptionnelles chez *Escherichia coli* isolé d'infections urinaires (Avril et al., 2000).

II.5. Caractéristiques des principaux genres des entérobactéries

II.5.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli, isolée par Escherich en 1885, est l'espèce type du genre *Escherichia* qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est un Bacille à Gram négatif, assez grand ($1-1.5 \times 2-6 \mu\text{m}$), aéro-anaérobie facultatif, oxydase négatif, nitrate positif et qui fermente le glucose. *Escherichia coli* (colibacille) est une entérobactérie mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole (Jerome et al., 2004). Il se développe entre 10 et 48°C à pH 5,5- 9 et a une A_w supérieure à 0,94 (Monfred et Moll, 2002).

II.5.1.1 Habitat

Les *E. coli* sont des hôtes normaux du tube digestif, de la partie distale de l'iléon et du colon de l'homme et de la plupart des animaux à sang qu'ils colonisent dès les premières heures de la naissance. (Minor et Veron, 1989).

La présence de cette bactérie dans le sol, l'eau et/ou les aliments témoigne d'une contamination fécale et suggère la possibilité que d'autres bactéries ou virus d'origine digestive s'y trouvent. On considère que leur présence rend l'eau ou les aliments impropres à l'utilisation ou à la consommation. (Cristian, 2008).

II. 5.2. Shigella

Les *shigella* sont des entérobactéries immobiles extrêmement proches de *Escherichia coli* mais qui ne fermentent pas le lactose. Elles n'ont pas d'uréase et ne produisent pas de gaz. Elles sont parasites de l'homme et entraînent une colite infectieuse endémoépidémique, la dysenterie bacillaire (shigellose) (**Lampel et Maurelli, 2003; Levine et al., 2007**).

II. 5.2.1. Habitat

Les *shigelles* sont des bactéries strictement humaines. Elles ne font pas partie de la flore intestinale normale. On ne les retrouve que chez les malades, les convalescents et les rares porteurs sains. (**Carbonnelle et al., 1987**).

II. 5.3. Salmonella

Les *Salmonella* sont des entérobactéries dont les caractères essentiels sont de ne pas fermenter le lactose et de ne pas produire d'uréase (**Leyral et Vierling, 2001**). Les *Salmonella* sont des parasites de l'homme, des mammifères (rongeurs), des oiseaux (volailles) et des animaux à sang froid (reptiles). Elles sont responsables, après pénétration par voie orale, de nombreuses infections (salmonelloses), notamment des fièvres typhoïde et paratyphoïdes, des gastro-entérites et des toxi-infections alimentaires collectives (maladies à déclaration obligatoire n° 12). Le principal mode de contamination chez l'homme est l'ingestion à partir de l'eau (*S.typhi*), des aliments (ex: produits laitiers, œufs, viande) ou d'animaux familiers porteurs (**Paul, 2005**).

II.5.3.1. Habitat

Le réservoir naturel est constitué par le tube digestif des espèces contaminées mammifères (y compris l'homme), volailles, reptiles, escargots, grenouilles, animaux de compagnie (chiens et chats)... Les déjections de ces espèces peuvent contaminer le sol et/ou l'eau. Si elles ne peuvent s'y multiplier de manière significative, elles peuvent y survivre, en particulier dans le sol, pendant plusieurs semaines ou même plusieurs mois si les conditions de température, de pH et d'humidité sont favorables. (**Cristian, 2008**).

II.5.4. Klebsiella

Au sein des entérobactéries, les bactéries du genre *Klebsiella* se distinguent par leur immobilité constante, leur groupement en diplobacilles généralement encapsulés. On distingue cependant plusieurs espèces mais *Klebsiella pneumoniae* est la plus fréquemment retrouvée en clinique humaine. (**Bagley et al, 1978 Avrilet et al., 2000**).

II. 5.5 *Yersinia*

Yersinia est une entérobactérie immobiles, cultivant lentement, produisant une uréase très active (base de l'identification) mais pas de tryptophane désaminase, à la différence des *Proteus* qui sont aussi uréase positif (Nauciel, 2000).

III. Les *Pseudomonas*

III. 1. Généralités

Ce sont généralement des bactéries psychrotrophes, capables de se développer à 7°C ou moins, indépendamment de leur optimum de croissance. En fait, la température minimum d'activité métabolique des psychrotrophes est proche de -10°C.

Le genre *Pseudomonas* renferme des bacilles Gram négatif, droits ou légèrement incurvés, de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm (ou plus) de longueur, non sporulés, très généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires, aérobies, à métabolisme strictement respiratoire, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose), chimioorganotrophes, présentant une activité catalase, et généralement une activité oxydase, non producteurs d'indol et d'acétoïne et ne se cultivant pas à un pH inférieur à 4,5. (Eezby, 2013).

D'après (Guiraud, 2003), il n'existe pas de milieu spécifique utilisable pour l'ensemble des *Pseudomonas*. Ils se multiplient sur les milieux ordinaires. L'isolement s'effectue sur milieu gélose contenant un inhibiteur des Gram+. Il existe quelques milieux spécifiques : gélose CFC, C.F.C. (base) - Gélose (Céphalosparine / Fucidine / Cetrimide), gélose *pseudomonas* CN (qui contient de l'acide nalidixique), gélose pyocyanosel et la gélose d'isolement pour *Pseudomonas*.

III. 2. Habitat

Les *Pseudomonas* sont largement répandus dans le sol, l'eau douces et marines et l'environnement. On les retrouve souvent sur la peau des mamelles de vache (Chatelin et Richard, 1981 ; Desmaures et al, 1997) et dans les installations de traite (Laithieret al., 2004). Ils sont retrouvés très fréquemment dans les laits crus réfrigérés (Giannino et al., 2009).

III.3. Taxonomie

La classification actuelle des *Pseudomonas* et des divers bacilles à Gram négatif non fermentants (Perriere, 1992). Cette classification est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 06 :les principaux groupes des *Pseudomonas* (Perriere, 1992) .

Groupe	Genre	Espèces
Groupe I d'ARN	Genre <i>Pseudomonas</i> stricto sensu	<ul style="list-style-type: none"> - <i>P. aerogunisa</i> - <i>P. fluorescens</i> - <i>P. putidia</i> - <i>P. veroniispnov</i> - <i>P. alcaligenes</i> - <i>P. pseudoalcaligenes</i> - <i>P. mendocina</i> - <i>P. stutzeri</i> - <i>P. balearicasipnov</i> - <i>P. monteiliispnov</i>
Groupe II d'ARN	Genre <i>Bulkhorderia</i> (1992)	<ul style="list-style-type: none"> -<i>B. mallei</i> -<i>B. pseudomallei</i> -<i>B. cepacia</i> -<i>B. vietnamiensis</i>
	Genre <i>Ralstonia</i> (1995)	<ul style="list-style-type: none"> -<i>R. pickettii</i> -<i>R. solanacarrum</i>
Groupe III d'ARN	Genre <i>comamonas</i> (1991)	<ul style="list-style-type: none"> -<i>C. testosteroni</i> -<i>C. acidovorans</i> -<i>C. terrigena</i>
	Genre <i>acidovorax</i> (1991)	<ul style="list-style-type: none"> -<i>A. delafieldii</i> -<i>A. temperans</i>
	Les genres <i>Hydrogenophaga</i> , <i>Xylophilus</i> , <i>Variovorax</i>	<ul style="list-style-type: none"> -<i>A. facilis</i>

Groupe IV d'ARN	Genre Brevundimonas (1994)	- <i>B. diminuta</i> - <i>B. visicularis</i>
Groupe V d'ARN	Genre stenotrophomonas (1993)	- <i>S. malotophilia</i> - <i>S. africanaspnov</i>

IV. Les Staphylocoques

IV.1.Généralités sur le genre

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des coques (cocci) à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative. Parmi les 27 espèces du genre actuellement répertoriées, les principales sont *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis* et *S.saprophyticus*. L'espèce *S.aureus* sera prise comme type de description. *Les Staphylocoques* sont les bactéries responsables de la plupart des infections mammaires. Ils sont présents dans le lait lors de la traite et se retrouvent dans les fromages au lait cru. Les entérotoxines produites par certaines souches de *Staphylocoques* dorés peuvent provoquer des intoxications alimentaires. Le nombre de *Staphylocoques* dorés dans les fromages au lait cru est réglementé (**Sutra,1998**).

IV.2.Habitat

Les staphylocoques sont des bactéries naturellement présentes sur la peau des animaux, la main du trayeur ou du fromager, sur la peau de la mamelle et des trayons. Ils sont présents de manière transitoire sur le matériel de traite ou de fromagerie. Ils sont éliminés par de bonnes pratiques de nettoyage et de désinfection. *Les Staphylocoques* peuvent pénétrer dans la mamelle lors de la traite et s'y multiplier (**Avril et al.,1992**) .

IV.3. Les staphylocoques, une grande famille

On distingue deux grandes catégories de staphylocoques:

IV.3.1. Les staphylocoques coagulase-positifs (SC +) :

Ils possèdent une enzyme (une coagulase) qui permet de les identifier. Ce groupe se compose essentiellement des Staphylocoques dorés (*Staphylococcus aureus*), bactéries parfois capables de synthétiser des entérotoxines nocives pour la santé humaine.

IV.3.2 Les staphylocoques coagulase-négatifs (SC-) :

Ne possèdent pas de coagulase. Ils sont généralement inoffensifs pour la santé humaine. Plus d'une trentaine d'espèces font partie de ce groupe. Les plus fréquents chez la chèvre sont les *Staphylococcus epidermidis* et *caprae*.

Ces deux catégories de staphylocoques n'ont pas les mêmes conséquences sur la santé mammaire des chèvres et ne sont pas soumises aux mêmes exigences réglementaires (Sutra,1998). .

IV.4. Taxonomie et classification

a- Classification de Bergey (1994)

Selon la deuxième édition de Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology, la classification phylogénétique du genre *Staphylococcus* est

- Domaine : *Bacteria*-Phylum XIII: *Firmicutes*

- Classe: *Bacilli*

- Ordre: *Bacillales*

- Famille: *Staphylococcaceae*

- Genre: *Staphylococcus* avec 38 espèces et des sous-espèces (Delarras , 2007) .

b- Classification de Garrity

Selon la classification phylogénétique du genre *Staphylococcus* de Garrity:

- Domaine : *Bacteria* ou *Eubacteria*;

- Phylum XIII: *Firmicutes*;

- Classe : *Bacilli*;

- Ordre : *Bacillales*;

- Famille : *Staphylococcaceae*;

- Genre: *Staphylococcus* avec trente-huit espèces et des sous-espèces.

V. Les levures

V.1.Généralité sur les levures

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes (noyau délimité), non photosynthétiques, chimio-hétérotrophes (puisent leur énergie dans la dégradation de substances organiques variées), champignons à thalle unicellulaire immobiles. Le thalle de la levure est l'appareil végétatif le plus simple, sans racine ni tige, sans rameau feuillu et non chlorophyllien .(Leveau et Bouix ,1993.Bourgeois ,1996) ,C'est la plus simple, il s'agit de cellules uniques, libres ou associées deux à deux ayant une morphologie caractéristique: sphérique, ovoïde, globuleuse ou cylindrique. Des formes spécifiques sont parfois distinguées comme la forme apiculée (*Hanseniaspora et Kloeckera*), en bouteille (*Pityrosporum*), triangulaire (*Trigonopsis*) ainsi que la forme pyramidale et ogivale (*Dekkera*) (Walker et White, 2005).Ceci en plus des *arthrospores*, des *ballistospores* et des *chlamydospores*(Barnett et al, 1983).Sous cette forme unicellulaire, les dimensions sont de 2,5 à 10,5 µm de large et de 4,5 à 21 µm de long. Cette longueur peut dépasser, chez certaines espèces, les 30 µm. Ces dimensions, ainsi que leurs aspects dépendent fréquemment de l'âge des cellules et des conditions de culture (Scherr et Weaver, 1953).Figure 03

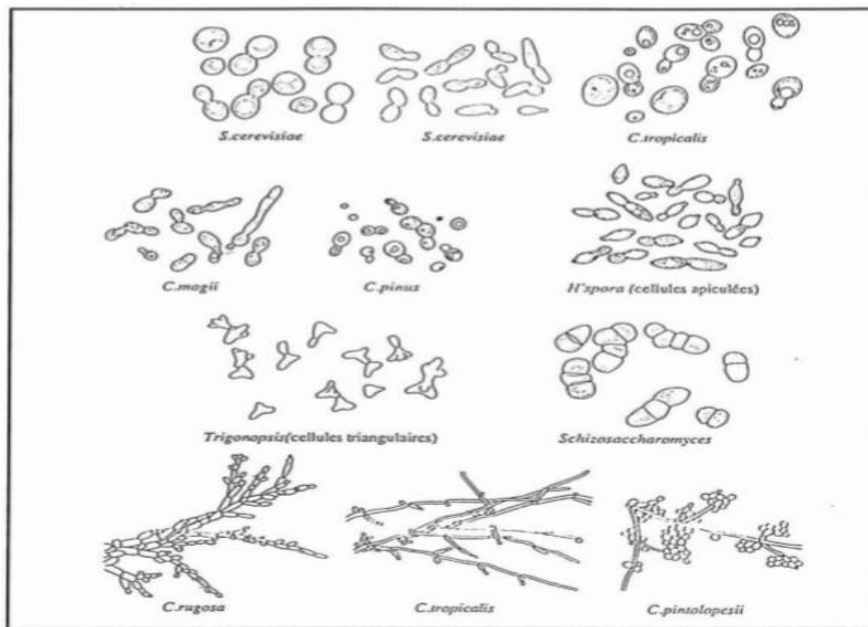


Figure 03 : Morphologie des cellules de levure et des mycelium(Leveau et Bouix ,1993).

V.2. Caractères cultureux

Conditions de culture

- Température optimale de croissance : 20 à 28°C.
- pH optimal: 4,5 à 6,5
- Obtention de colonies: 24 à 48 heures.

V.3. Modes de reproduction

V.3.1. Reproduction asexuée ou multiplication végétative:

Le mode de reproduction le plus courant chez la levure est le bourgeonnement (*Saccharomyces*, *Candida*). Le détachement de la cellule fille laisse une cicatrice à la surface de la paroi. Chez *S. cerevisiae*, dans les conditions les plus favorables, la durée du cycle cellulaire est de 90 minutes. Elle est capable de bourgeonner une trentaine de fois avant de mourir et la paroi conserve toutes les cicatrices laissées par les cellules filles. On rencontre également des levures qui se multiplient par fission binaire ou scissiparité (*Schizosaccharomyces pombe*).

V. 3.2. Reproduction sexuée:

Dans des conditions de culture défavorables, les levures diploïdes ne se multiplient pas par bourgeonnement mais elles sporulent.

Les levures, cellules diploïdes, forment des spores, cellules haploïdes, par méiose. À partir d'une cellule diploïde, on obtient 4 spores (ou ascospores) contenues dans un sac ou asque. Après éclatement de l'asque, les ascospores peuvent se multiplier pour donner d'autres cellules haploïdes. Elles peuvent également se transformer en gamètes de forme caractéristique, sous l'effet de phéromones sexuelles. La fécondation entre 2 cellules de signes sexuels opposés donne un zygote, à l'origine de la phase diploïde. (Figure 04)

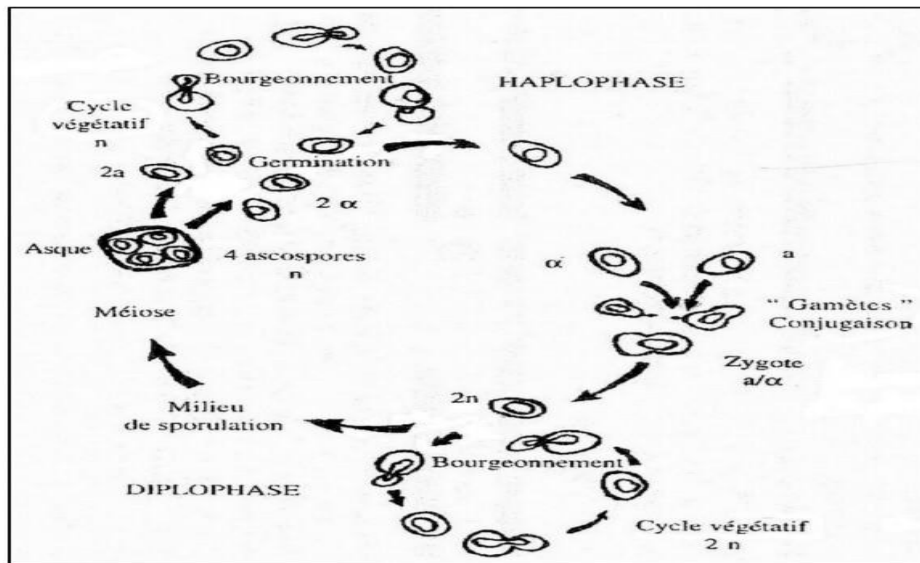


Figure 04: Cycles de reproduction de la levure(*Saccharomyces cerevisiae*) (<http://fdanieau.free.fr/bts/Mycetes-Levures>)

V.4. Classification des principaux genres de levure

-Les *Ascomycotina* ou «levures vraies » ou « levures ascosporigènes » : il y a formation d'endospores ou «ascospores » contenues dans un asque, par reproduction sexuée, après transformation d'une cellule par méiose (Larpent,1991) .

-Les *Basidiomycotina* ou « levures fausses »:Sont parfois classées parmi les Deuteromycota (Larpent,1991). A l'issue d'une reproduction sexuée, sont formées des exospores ou «basidiospores » portées par une baside .

-Les *Deuteromycota* ou «levures imparfaites »ou « levures asporogènes »Sont des espèces ayant des affinités avec les Ascomycotina ou les Basidiomycotina, mais chez lesquelles le stade sexué (stade parfait) n'est pas connu avant leur mise en culture sur un milieu adéquat permettant de les classer (Leblonc, 1988;Bourgeois et al ,1996).

VI. Les moisissures

VI.1. Généralité sur Les moisissures

Les moisissures sont des organismes filamenteux hétérotrophes (Nicklinetal, 2000). Certains vivent en symbiose avec les végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres sont des saprophytes, se développant sur des déchets organiques.

Les moisissures sont aérobies, en général, acidophiles (pH compris entre 3 et 7) ((Nicklinetal, 2000) et mésophiles (température optimale 20-30°C)(Botton et al,

1990). Cependant, certaines espèces sont psychrophiles, se développant à basse température ($T^{\circ} < 15^{\circ}\text{C}$ ou même parfois $< 0^{\circ}\text{C}$, comme *Cladosporium herbarium*, *Thamnidium elegans*). Elles ont, en générale, un faible besoin en eau par rapport à d'autres microorganismes ($A_w = 0.65$) (Boiron, 1996). Elles sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytique, pectinolytique, amylolytique, protéolytique, lipolytique, etc...) qui en font des agents de dégradation dangereux mais aussi parfois des alliés utiles (affinage des fromages, production d'enzymes).

La sporulation *des moisissures* est sous la dépendance des facteurs nutritifs (Barker et Worgan, 1981 ; Botton *et al.*, 1990) ainsi que des facteurs environnementaux, essentiellement la lumière qui influence fortement la croissance de certaines moisissures, soit par destruction photochimique de constituants du milieu, soit en agissant directement sur le métabolisme fongique. Ainsi, l'induction de la synthèse des pigments caroténoïdes sous l'influence de la lumière, colore en orange le mycélium de certaines espèces.

D'autres pigments voient également leur production stimulée par la lumière et colore diversement les moisissures (Boiron, 1996). Cependant, beaucoup de moisissures n'exigent pas de lumière pour sporuler (Botton *et al.*, 1990).

VI.2. Besoins nutritifs et activités biologiques

Les champignons sont des hétérotrophes, ils utilisent des composés organiques comme source de carbone. La digestion des grosses molécules doit commencer dans le milieu extérieur car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme. La panoplie enzymatique des champignons est extrêmement riche et leur permet d'utiliser les substrats les plus complexes plus efficacement que les bactéries, tel que : la cellulose, la lignine, la kératine, les acides humiques etc... (Davet, 1997). Le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le maltose, le saccharose, l'amidon et la cellulose représentent les sucres les plus utilisés par *les moisissures* comme source de carbone et d'énergie. Ces hydrates de carbone sont dégradés grâce à la glycolyse et le métabolisme aérobie (Boiron, 1996 ; Nicklin *et al.*, 2000). D'autres composés organiques tels que les pesticides, les hydrocarbures, la lignine, la pectine et les lipides sont également dégradés par *les moisissures* à côté d'autres substrats organiques bon marché comme les déchets issus de l'industrie agroalimentaire (lactosérum, mélasses de canne ou de betterave, amidon de maïs, déchets d'agrumes etc...)(Nishio et Nagai, 1981 ; Joyeau, 1982 ; Hart *et al.*, 1991).

VI.3. Cycle de vie

Le cycle de vie des moisissures est illustré par 4 principales étapes (**Figure 05**) : germination, développement, reproduction et la dormance/latence.

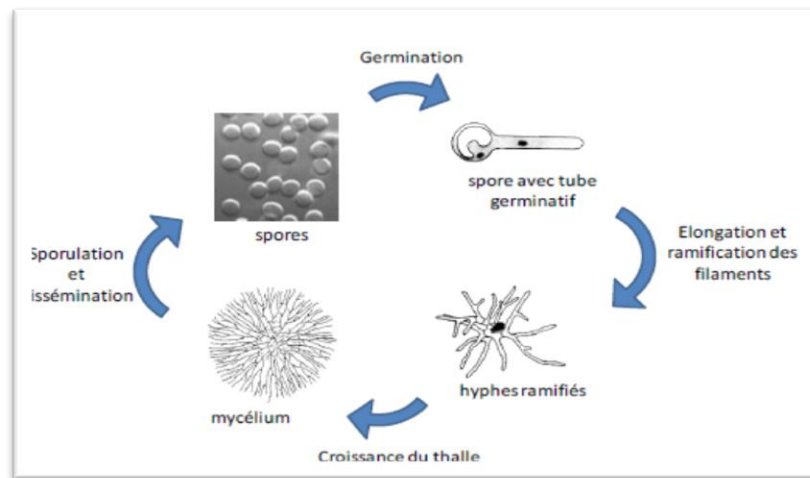


Figure 05: Cycle de vie des moisissures (www.aspergillus.man.ac.uk)

VI.4. Classification

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (**Davet, 1996**). *Les Eumycètes* (les vrais champignons) forment un groupe très vaste incluant les classes principales *des moisissures* (**Bourgeois, 1989**), à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes.

VI.4.1 .Les Zygomycètes

Ces *moisissures* possèdent un thalle mycélien non cloisonné et des organes de reproduction sexuée (**Guiraud, 1998**). La famille la plus importante dans cette classe est celle de Mucorales qui comprennent un grand nombre de moisissures saprophytes mais aussi quelques espèces parasites des champignons, des animaux et des hommes (*mucormycoses*) et surtout des contaminants de nombreux produits alimentaires (**Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996**). Certaines Mucorales sont parfois utilisées industriellement en raison de leurs activités enzymatiques (amylase, protéase,...) comme *Rhizopus* et *Mucor* (**Guiraud, 1998**).

VI.4.2. Les Ascomycètes

Les Ascomycètes sont définis comme des champignons à thalle mycélien cloisonné, dont le mode de reproduction est sexué avec des spores endogènes (ascospores). Cette classe regroupe de nombreux parasites des végétaux mais aussi de nombreuses moisissures (Guiraud, 1998). Elles sont cependant plus particulièrement nombreuses dans l'ordre des Eurotiales, des *Microscales* et des *Sphaeriales*. Dans cette classe, le genre le plus connu est *Endothia* et *Neurospora* (Bourgeois, 1998).

VI.4.3. Les Basidiomycètes

Elles regroupent seulement certaines moisissures parasites. Elles sont caractérisées par un thalle à mycélium septé et une reproduction sexuée avec la formation de spores exogènes (basidiospores), c'est le cas de *Agaricus* et *Coprinus* (Botton et al., 1999).

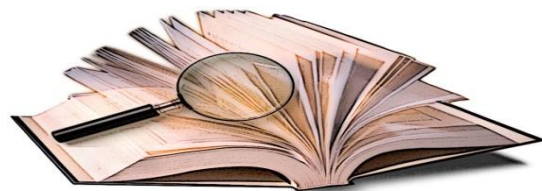
VI.4.4 .Les Deutéromycètes

Egalement appelés champignons imparfaits, les Deutéromycètes sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium (Boiron, 1996). Ces moisissures constituent la majeure partie des Hyphales ; elles sont classées en fonction des caractéristiques des organes conidiens et du mode de groupement des hyphes. Le groupe des Deutéromycètes contient un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires : *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, cette classe regroupe aussi les *Penicillium* et les *Aspergillus* (Frazier, 1967; Punt et al ,2002).

VI.5. Les principaux genres fongiques

Les genres les plus importants de point de vue économique et médical sont les *Aspergillus*, les *Penicillium* et les *Fusarium* qui représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux et d'origine animale .

Chapitre III :



Matériels et méthodes

I.1. Cadre et objectif de l'étude

Ce travail a porté sur l'étude de la microflore de quatre échantillons d'un fromage frais traditionnel el' Klila (séchée et fraîche) fabriqué au niveau des laiteries traditionnelles de la ville de Tébessa. Pour but d'étudier la microflore de ce produit traditionnel.

Cette étude a été effectuée au niveau de laboratoire de microbiologie de l'Université de Tébessa durant la période Février à Mai de l'année 2019, dans lequel nous avons réalisé un isolement et une caractérisation des différentes souches microbiennes (comme les bactéries lactique, des entérobactéries, les staphylocoques, les levures et moisissures) isolées à partir el'klila (séchée et fraîche) fabriqué au niveau des laiteries traditionnelles de la ville de Tébessa. Pour but d'étudier la microflore d'el'klila.

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériels biologique :

L'échantillon étudié : l'klila séchée (2 échantillon), l'Klila fraîche (2 échantillons) .

II.2. Matériels non biologique

La composition des différents milieux de culture est représentée dans l'annexe 2.

Le matériel utilisé dans le cadre de cette étude est cité dans l'annexe 3.

III. Echantillonnage

III.1. Provenances des échantillons :

Quatre échantillons de préparations laitières traditionnelles ont été prélevés dans des régions différentes de la wilaya de Tébessa. Ces échantillons ont été récupérés dans des sachets ou des boîtes de prélèvement stériles, et transportés au laboratoire pour être analysés. **Tableau 07**

Tableau 07: Caractéristiques des échantillons prélevés.

Numéro d'échantillon	Application traditionnelle	Date de prélèvement	Matière de production	Origine d'échantillon
E1 (KS1)	l'klila séchée (2 échantillon)	03/02/2019	Lait de vache	Tébessa
E2 (KS2)		19/02/2019		
E3 (KF1)	l'Klila fraîche (2 échantillons)	06/03/2019		
E4 (KF2)		9/04/2019		

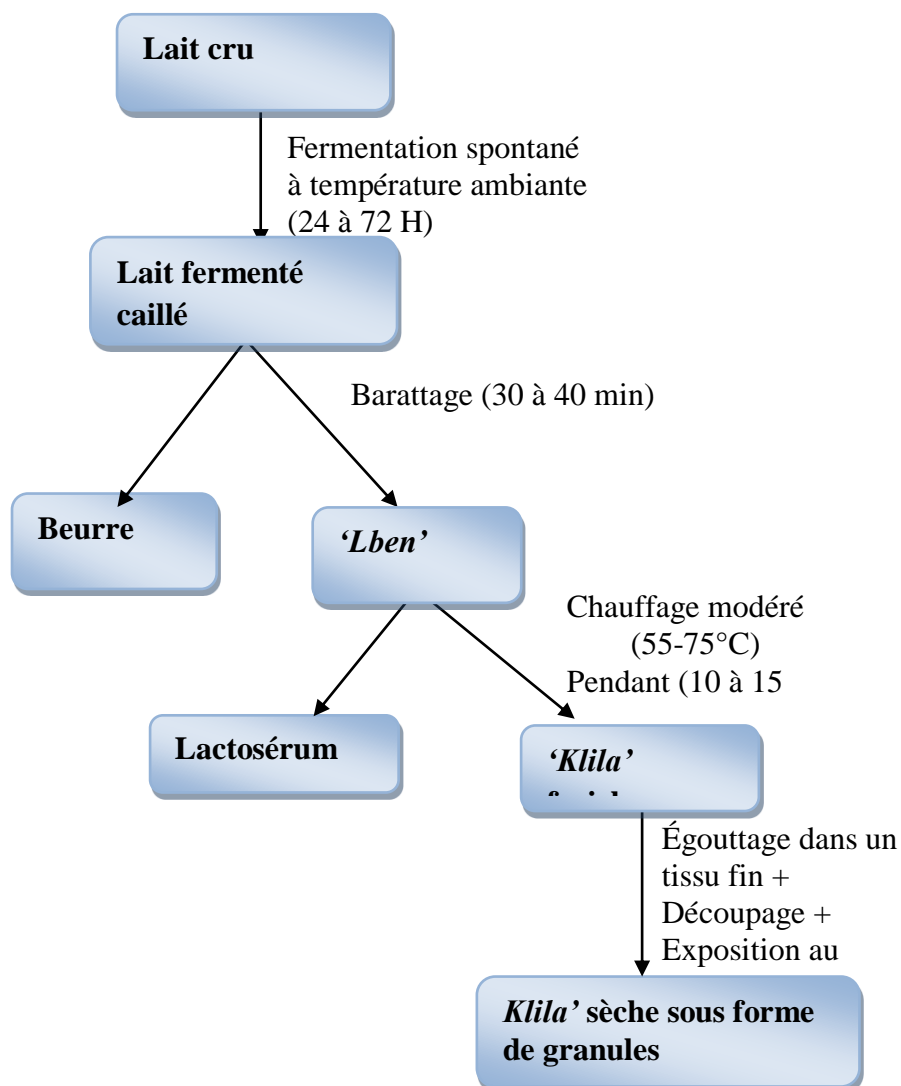


Figure06:Diagramme de fabrication du fromage traditionnel ' el Klila'



a)El'klila séchée(KS1)



b)El'klila séchée(KS2)



d)El'Klila fraîche(KF1)



c)El'Klila fraîche(KF2)

Planche 01:Aspects et couleurs des différents échantillons étudiés de 'Klila'.

IV. Isolement des bactéries

IV.1. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales

Dix grammes de chaque échantillon (Klila) ont été homogénéisés avec 90 ml de l'eau péptonée salée (annexe 2). A partir de la solution mère considérée 10^0 préalablement homogénéisée à l'aide d'un vortex, 1 ml de la solution mère est prélevé aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile et introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau péptonée salée on obtient ainsi la dilution 10^{-1} et ainsi de suite jusqu'à 10^{-4} (Guiraud, 2003). Pour assurer la répartition des bactéries, une agitation pendant 3 à 5 minutes par un vortex a été réalisée. Pour chaque dilution un volume de 0,1 ml a été étalé en surface sur les milieux d'isolement (Kacem et Karam, 2006; Cheriguene et al., 2007). **Planche 02**



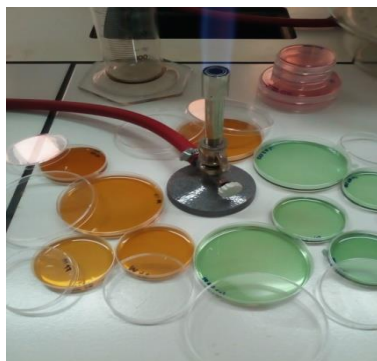
A) Peser 10g klila



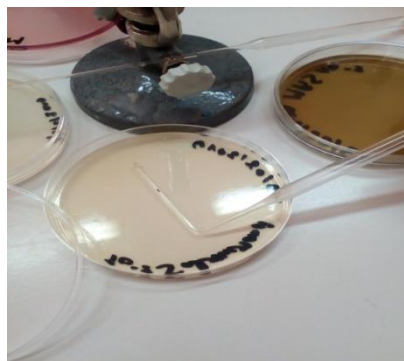
B) préparation de solution mère



C) préparation des dilutions décimale



D) Couler les géloses



E) ensemencement



F) Incubation dans la jarre d'anaérobie et dans l'étuve.

Planche 02: Méthode d'isolement des bactéries lactiques à partir de klila.

IV.2.1. Recherche et isolement des souches lactiques

L'isolement des bactéries lactiques a été réalisé sur le milieu de Man Rogosa et Sharpe (MRS) contenant le vert de bromocrésol (25mg/L) et M17 solide. L'ensemencement se fait en surface. Les boîtes sont incubées pendant 48 heures à 30 °C (Eric, 2011).

IV.2.1.1. Ensemencement

0.1ml des dilutions décimales (10^{-1} jusqu'à 10^{-4}) sont étales à la surface du milieu par la technique d'étalement en râteau en utilisant une pipette Pasteur. Chaque dilution a été ensemencé sur deux milieux gélosés MRS et M17, préalablement coulés dans des boîtes de Pétri stériles. Ensuite, elles ont été incubées dans une jarre d'anaérobiose à 30°C pendant 48h à 72 h.

IV.2.1.2. Etude macroscopique

En se basant sur les aspects morphologiques (taille, couleur, surface, profondeur...) (Kacem et Karam, 2006 ; Cheriguene et al., 2007).

❖ **Milieu MRS:** Présence des colonies vertes, colonies vertes lumineuses, colonies transparentes à centre vert. L'acidification du milieu qui est due à la production d'acides par les bactéries lactique ce traduit par le virage du milieu au jaune.

❖ **Milieu M17 :** Présence des colonies blanches et colonies écrémeuses et jaunes blanchâtres.

IV.2.1.3. Etude microscopique

Après l'examen macroscopique et à l'aide d'une anse de platine, On prélève de chaque boîte des colonies suspectées bien isolée sur les quelles sera effectuée une coloration de Gram (technique voir l'annexe 4) pour le bute de différencier les bactéries soit Gram positif ou négatif et d'apprécier leur morphologie.

Alors, dans notre étude les bactéries examinés se sont des bactéries Gram positif, leur forme soit des bacilles , des coques , des coccobacille isolé ou en paire ,en chaînette, en amas.

IV.2.1.4. Purification et conservation des isolats

a) Purification des souches

La purification des souches isolées est réalisée par repiquages successifs alternant sur milieux sélectifs MRS liquide et solide, et l'incubation à 30°C.

(Kacem et Karam, 2006 ; Cheriguene et al.,2007).

La pureté des souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur (couleur, taille et forme) (Guiraud, 2004). Ces colonies pures sont retenues pour

la suite de l'étude.

b) Conservation des souches :

- ❖ **A courte durée :** Les souches sont conservées à 4°C dans des géloses en tubes inclinées avec un repiquage toutes les 4 semaines.
- ❖ **A longue durée:** Les cultures sont conservées en suspension dense et en tube éppendorfs à -20°C. (Badis et al.,2005).

IV.2.2. Recherche et isolement des entérobactéries

IV.2.2.1.Ensemencement

0.1ml des dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-6}) sont étales à la surface du milieu par la technique d'étalement en râteau en utilisant une pipette Pasteur. Chaque dilution a été ensemencée sur milieu gélosé Mac Conkey, préalablement coulés dans des boites de Pétri stériles. Ensuite, elles ont été incubées à 37°C pendant 24h à 48h .

IV.2.2.2. Etude macroscopique

Dans chaque boite on prend des colonies de forme caractéristique sur lesquelles sera effectuée une coloration de Gram, alors sur :

- ❖ Milieu Mac Conkey : des colonies rouge (Lac ⁺), ou bien des colonies incolore ou jaune (Lac ⁻) de forme rond (régulier ou irrégulier), de taille grand et moyen , petite , crémeuse et laiteuse.

IV.2. 2.3.Etude microscopique

Est un examen direct après coloration de Gram. Alors, dans notre étude les bactéries examinés se sont des bactéries Gram négatif, leur forme soit des bacilles de taille moyen ou de taille grande, diplobacille, isolé ou en amas.

IV.2.2.4. Purification et conservation des isolats

Nous avons effectué une série d'ensemencement par la méthode des stries sur boites des cultures déjà coulé de milieu Mac Conkey pour bute d'avoir des cultures pures. L'opération est renouvelée en prenant chaque fois au hasard une colonie isolée. Jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches (Idouiet al.,2009), estimée par observation microscopique après coloration de Gram. La conservation à court terme des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après 24h d'incubation les tubes sont placé à +4°C, où ils peuvent être conservés pour plusieurs semaines.

IV.2.3. Recherche et isolement des Staphylocoques

IV.2.3.1. Isolement

0.1ml des dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-4}) sont étales à la surface du milieu par la technique d'étalement en râteau en utilisant une pipette Pasteur. Chaque dilution a été ensemencé sur le milieu sélectif (Chapman), préalablement coulés dans des boîtes de Pétri stériles. Ensuite, elles ont été incubées à 37°C pendant 24h à 48h .

IV.2.3.2. Etude macroscopique

Sur le milieu de Chapman, les colonies jaunes entourées d'une zone jaune, mannitol(+) sont des *S. Aureus* ,*S. saprophyticus*... (Delarras , 2007).

Les colonies entourées d'une zone rouge ou pourpre, mannitol(-) sont des *S.epidermidis*, *S. hominis*... (Delarras, 2007).

IV.2.3.3. Examens microscopiques

La coloration de Gram: est effectuée à partir des colonies cultivées sur gélose Chapman présentant l'aspect caractéristique du staphylocoque, pour confirmer la présence de cocci en diplocoques et en grappes de raisin (Chaala, 2013).

Les frottis sont observés au microscope optique avec l'objectif à immersion (objectifx100).

IV.2.3.4. Purification et conservation des souches

a.Purification des souches

La purification des souches isolées est réalisée par repiquages successifs alternant sur milieu liquide (bouillon nutritives) et milieu gélosé sélectif Chapman (par la méthode des stries), et l'incubation à 37°C .

b.Conservation des souches:

Les souches sont conservées dans des tubes de gélose sélectif (Chapman) inclinés à une température de 4°C .

IV.2.4. Recherche et isolement des *Pseudomonas*

IV.2.4.1. Isolement

0.1ml des dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-4}) sont étales à la surface du milieu par la technique d'étalement en râteau en utilisant une pipette Pasteur. Chaque dilution a été ensemencé sur le milieu sélectif (cétrimide ou King A), préalablement coulés dans des boîtes de Pétri stériles. Ensuite, elles ont été incubées à 30°C pendant 24h à 48h .

IV.2.4.2. Etude macroscopique :

Possibilité de dissociation des cultures sous trois formes :

colonies (Large) : grandes colonies isolées, bombées à contour irrégulier.

colonies (Small) : petites, mûtes, bombées à contour régulier.

colonies (Muqueuse) : bombées, opaques, visqueuses.

L'obtention de colonies présentant une pigmentation caractéristique (Production de deux pigments) : Pyocyanine (Bleu vert) ou Pyoverdine (jaune vert).

IV.2.4.3. Examens microscopiques

C'est un examen direct après coloration de Gram : Alors, dans notre étude les bactéries examinés (*Pseudomonas*) se sont des bacilles Gram négatif, droits ou légèrement incurvés. Les frottis sont observés au microscope optique avec l'objectif à immersion (objectifx100).

IV.2.4.4. Purification et conservation des souches

a.Purification des souches

La purification des souches isolées est réalisée par repiquages successifs alternant sur milieu gélosé sélectif Cétrimide (par la méthode des stries), et l'incubation à 30°C.

b.Conservation des souches

Les souches sont conservées dans des tubes de gélose sélectif (Cétrimide) inclinés à une température de 4°C .

IV.2.5. Recherche et isolement des Levures et Moisissures

IV.2.5.1. Isolement

0.1ml des dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-4}) sont étales à la surface du milieu par la technique d'étalement en râteau en utilisant une pipette Pasteur. Chaque dilution a été ensemencé sur le milieu Sabouraud, préalablement coulés dans des boîtes de Pétri stériles. Ensuite, elles ont été incubées à 30°C pendant 3 jours.

IV.2.5.2. Etude macroscopique

Sur le milieu de **Sabouraud** (non sélectifs) : les aspects morphologiques des :

- ❖ **levures** : Colonies de 2 mm de diamètre souvent blanches, crémeuses, lisses et brillantes, certaines levures produisent des pigments.
- ❖ **Moisissure** : large colonies, aux contours diffus, couleur variable (moisissure pouvant produire propre pigmentation), le centre de la colonie présente normalement une coloration intense.

IV.2.5.3. Examens microscopiques

Le matériel biologique (levure ou moisissure) collecté est déposé entre lame et lamelle dans une goutte de l'eau physiologie ou par coloration au bleu de méthylène. L'observation microscopique est effectuée à l'objectif 10 puis à l'objectif 40. Un examen direct positif permet d'observer des fragments de filaments ou des spores, s'il s'agit d'une moisissure. Dans le cas des levures l'examen direct permet d'observer des cellules ovoïdes de $10\text{-}12\mu\text{m}$ de long; formes filamenteuses ou non.

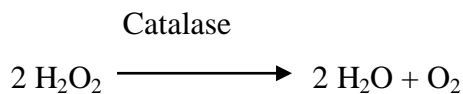
V. Identification biochimique et physiologique des bactéries

V.1. Identification biochimique et physiologique des bactéries lactiques

En plus des caractères morphologiques, l'identification est aussi effectuée sur la base de quelques caractères biochimiques et physiologique :

V.1.1. Catalase

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase, celle-ci décompose l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) des autres bactéries (catalase +). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame propre. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O₂). Les bactéries Gram positives et catalase négatives sont présumées des bactéries lactiques (Marchal et al., 1991).

V.1.2. Type fermentaire

Ce test permet de différencier les isolats homolactiques des hétérolactiques après une incubation à 30°C pendant 24 heures jusqu'à 72 heures (Hassaine, 2013).

a) Technique

- prendre des tubes stériles renfermant des cloches de Durham.
- y ajouter 10 ml de bouillon MRS, puisensemencer avec la souche a étudiées.
- homogénéiser en prendre soin de remplir la cloche de bouillon en évitant l'introduction des bulles d'air.
- incuber à 37°C pendant trois jours.

b) Lecture

La présence du gaz dans la cloche indique un métabolisme, heterofermentaire (Hariri et al., 2009). Alors que leur absence indique les bactéries homofermentaires.

V.1.3. Culture en différentes températures (4, 15, 30, 37 et 45°C)

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles, ce test est réalisé en bouillon MRS. La croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24 heures à 4, 15, 30, 37 et 45°C en comparaison avec un tube témoin nonensemencé (Hassaine, 2013).

V.1.4. Culture différents concentration de NaCl 3%, 7% et 10%

La culture des isolats est réalisée dans des tubes de bouillon MRS à 3% ,7% et 10% de NaCl, l'incubation se fait à 30°C pendant 72 heures (**Hassaine, 2013**). La croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin non ensemencé.

V.1. 5.Culture à pH 3,9

La croissance au pH 3.9 a été testée dans du bouillon MRS ajusté à pH 3.9 (**Lucke et Schillinger, 1987**). La croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24 heures à 30C ° (**Hassaine ,2013**).

V.1.6. Recherche de l'arginine déshydrolyase (ADH)

Cette enzyme libère l'ammoniac à partir de l'arginine. Pour réaliser ce test, chaque souche est ensemencée dans un microtube de bouillon Möeller avec arginine. Les tubes sont recouverts avec de l'huile de vaseline stérile. L'incubation est faite à 30°C pendant 24h. Les souches possédant l'ADH vont acidifier le milieu en fermentant le glucose (virage au jaune). Cette acidification favorise l'activité de l'arginine dihydrolyase qui va dégrader l'arginine et libérer l'ammoniac d'où virage de la couleur au Rouge/orangé(**Gelman et al., 2000**).

V.1.7. Test de l'attaque des sucres

Les bactéries lactiques dégradent différemment les sources de carbone. L'étude de la fermentation des sucres est réalisée sur le milieu spécifique bouillon MRS (MRS sans sucre), additionné de vert de bromocrésol comme indicateur de pH (**Mannu et al., 2000 ; Bekhouche et Boulahrouf, 2005 modifi**).

Le test de l'attaque des sucres constitue une étape clé pour l'identification des bactéries lactiques et vu le manque d'API 50 CHL qui permet l'identification par 49 sucres nous avons essayé de rassembler le maximum des sucres selon leur disponibilité.

Les sucres que nous avons testés sont: Glucose, mannitol, Sorbitol, Inositol ,rhamnose,saccharose,melibiose,arabinose,Amygdaline .

Ce test a été réalisé afin de déterminer la capacité des souches à fermenter quelques sucres, Pour cela, les micro tubes des sucres a été s inoculés avec une suspension bactérienne des souches à étudier et incubé à 30°C pendant 24h .L'apparition de trouble, et le virage de la couleur du milieu du vert au jaune indique la fermentation du sucre donc la souche a dégradé le sucre testé (résultat positif), si non le résultat est négatif.

V.1.8 Mise en évidence de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques

V.1.8.1 Activité antagoniste

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que se soit dans la bio conservation des aliments ou dans la biothérapie grâce à leur pouvoir d'inhiber les bactéries pathogènes et altérantes (Dortu et Thonart, 2009 ; El-Ghaish et al., 2011).

Cette inhibition est conférée soit par la diminution du pH suite à la production d'acides organiques, ou par la production de différents autres métabolites tels le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, le dioxyde de carbone, la reutéline et les bactériocines (Albano et al, 2007).

L'activité antibactérienne est déterminée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition. Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance ont été mesurés après 16 h de culture (Duquesne, 2007; Makhloufi, 2011).

Pour la détermination de cette activité inhibitrice, on a réalisé des interactions entre les souches isolées de produits laitiers et quatre souches de bactéries indicatrices pathogènes : *Staphylococcus aureus*, *Staphylocoque* (manitol -), *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*.

V.1.8.2 La technique

La méthode utilisée est celle de la diffusion du surnageant de culture à partir des disques. Cette méthode consiste à :

- Les souches productrices de substances inhibitrices sont cultivées dans du milieu MRS liquide, Après incubation, le milieu est centrifugé (13000 tr/min, 5 min) à 4°C
- La souche indicatrice estensemencée par écouvillonnage à la surface du milieu de Muller Hinton on boîte de Pétri.
- Après appliquer les disques de papiers Wattman sur la gélose Muller-Hinton en appuyant légèrement à l'aide d'une pince stérile, chaque disque est rempli par 20 µl du surnageant brut de la culture lactique à tester.
- les boites sont incubées pendant 24 h à 37°C.
- Les disque entourés d'une zone Claire d'inhibition de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 8 mm sont considérées comme positive.les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

V.2. Identification biochimique et physiologique des *entérobactéries*

V.2.1. API 20 E

La galerie API 20E (Appareillage et Procédé D'Identification), comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les réactions produites pendant la période d'incubation (24h) se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture. L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification.

a) Technique

Les micro tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne selon les étapes suivantes :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Sortir la galerie de son emballage.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.
- A l'aide d'une pipette prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser Préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.
- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une pipette pasteur (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule.
- Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule.
- Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules) .
- Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures.

b) Lecture de la galerie

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture Si 03 tests ou plus sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- Test **TDA** : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- Test **IND** : ajouter 1 goutte de réactif Kovacs. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- Test **VP** : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative. **Tableau 08**

Tableau 08 :Tableau de lecture de la galerie miniaturisée **API 20E**.

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-Galactosidase	Beta- galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	L-lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	L-ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
H₂S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré

URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	L-tryptophane	Production d'indole	James/ 2 mn	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2/ 10mn	
			Incolore	Rosé-rouge

GEL	Gélatine	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	D-mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
Nitrate réductase Tube GLU	Potassium nitrate	Production de NO ₂ Réduction au stade N ₂	NIT1 + NIT2 / 2-3 mn	
			Jaune	Rouge
			Zinc / 5mn	
			Rouge/orangé	Jaune

V. 3. Identification biochimique et physiologique des Staphylocoques

V.3.1.Catalase

Le catalase est une oxydoréductase intervenant dans le mécanisme de résistance à la Bactéricide (Chaala, 2013). Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques. A partir d'un isolement, une petite quantité de culture bactérienne est prélevée; puis placée sur une lame, on fait réagir la colonie dans 1 goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).pour les staphylocoques cette test une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz (oxygène) .

Les bactéries Gram positives et catalase positives sont présumées des staphylocoques. (Aouati, 2009 ; Chaala, 2013).

V.3.2.Staphylocoagulase (libre)

La coagulase libre est présente chez *S. aureus*, mais aussi peut être produite par *S. intermedius* ou *S. hyicus*. Ce test consiste à mettre en évidence la coagulase libérée dans le milieu extérieur.

La détection de cette coagulase s'effectue en ajoutant dans un tube à hémolyse 0.5 ml de plasma humain et 0.5 ml d'une culture de staphylocoques de 24 h en bouillon. Le mélange est placé à l'étuve à 37°C et est incubé pendant 24 heures. Les souches de *S. Aureus* provoquant la coagulation du plasma le plus souvent les trois premières heures, Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum.(Chaala, 2013).

V.4. Identification biochimique et physiologique des *Pseudomonas*

V.4.1.Catalase

Tous catalase positive ,Les *Pseudomonas* vivent dans les conditions aérobies (métabolisme oxydatif avec l'oxygène comme accepteur final d'électrons) .(Leriche et Fayolle,2004) .

V.4.2.Teste de pigmentation

Les *Pseudomonas* sont responsables, en transformation laitière, de la détérioration de produit à long conservation de lait (fromages),du fait leur métabolisme :production d'enzymes et de pigments .Les pigment produit sont la pyoverdine dans le cas des *Pseudomonas Fluorescens*(couleur jaune fluorescent),la pyocianine (bleu-vert) dans le cas des *Pseudomonas aeruginosa*.(Leriche et Fayolle ,2004).

a) production de pyocyanine

Pour réaliser ce test, chaque souche estensemencée dans un tube de gélose sélectif (King A) inclinés à une température de 30 °C pendant 48h .Si la présence de pigmentation bleu foncé ou vert à bleu dans le tube ,la mise en évidence de la pyocyanine par addition de 1ml de chloroforme sur le pente du tube .

La coloration en bleu du chloroforme signifie la présence de pyocyanine caractéristique de *Pseudomonas aeruginosa*.

b) production de pyoverdine

Pour cette test, chaque souche estensemencée dans un tube de gélose sélectif (King B) inclinés à une température de 30 °C pendant 48h. Si la présence de pigmentation jaune vert fluorescent dans le tube il est indiqué la présence de *Pseudomonas Fluorescens* .

VI. Antibiogramme des souches isolées

L'antibiogramme est un examen dont le but est de tester la sensibilité des germes retrouvés aux antibiotiques habituels.

VI.1. Technique de l'antibiogramme

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide a été appliquée, dont la gélose de Muller -Hinton et le milieu utilisé ; un milieu non sélectif. L'épaisseur de la gélose doit être 3à4 mm.

➤ Préparation de l'inoculum bactérien

➤ Un inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement. Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine, déchargée dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0,9% (Aouati, 2009). La suspension bactérienne est bien homogénéisée et ajustée jusqu'à atteindre une opacité équivalente à 0.5 McF. Elle est ajustée en ajoutant, soit de la culture à la suspension bactérienne, soit de l'eau physiologique stérile (CASFM, 2018).

➤ L'ensemencement s'effectué par écouvillonnage :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube pour le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche de haut en bas, en stries serrées. (Bocquier, 2013).
- Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois ; sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Recharger l'écouvillon pour chaque boîte de pétri.

- Laisser la boîte sécher pendant 10 minutes. (Chaala, 2013).
- **Application des disques d'antibiotiques :**
 - Appliquer les disques d'antibiotiques sur la gélose Muller-Hinton en appuyant légèrement à l'aide d'une pince stérile.(Bocquier, 2011).
 - Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte.
 - Chaque disque doit être éloigné au minimum de 30 mm des autres.(Chaala, 2013).
 - Après incubation à 37°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.
- **Lecture et interprétation**
 - Les résultats sont exprimés en mm après lecture des diamètres des zones d'inhibition et sont interprétés en trois catégories :sensible(S), intermédiaire(I) ou résistante(R) , en se référant aux normes de la CA-SFM.
 - L'interprétation est faite selon les recommandations de (CA-SFM-2018).

VI.2.Antibiotique utilisés

Les antibiotiques testés sont choisis selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie CA-SFM (2018).**Tableau 09.**

Tableau 09 : Liste des antibiotiques utilisés vis-à-vis Les bactéries lactiques. **CA-SFM (2018)**

Famille		Antibiotique	Sigle	Charge	Diamètres critiques (mm)	
					S ≥	R <
β-Lactamines	Pénicilline	Ampicilline	AMP	10 µg	18	18
	Aminosides	Kanamycine	K	30 µg	15	17
Quinolones		Acide pipémidique	PI	20 µg	14	19
Phénicolés		Chloramphénicol	C	30 µg	18	18
Tétracyclines		Tétracyclines	TE	30 µg	22	19
Fosfomycine		Fosfomycine	FO	50 µg	19	19

Tableau10: Liste des antibiotiques utilisés vis-à-vis *les entérobactéries*. CA-SFM (2018).

Famille		Antibiotique	Sigle	Charge	Diamètres critiques (mm) S ≥ R <	
β-Lactamines	Pénicilline	Ampicilline	AMP	10 µg	14	14
		Amoxicilline-acide clavulanique	AUG	30 µg	19	19
	Cephalosporines	Ceftazidime	CAZ	30 µg	22	19
Aminosides		Amikacine	AK	30 µg	16	13
Quinolones	Quinolones 1 ^{ère} G	Acide nalidixique	NA	30 µg	19	14
		Acidepipémidique	PI	20 µg	ND	ND
	Quinolones 2 ^{ème} G	Ofloxacine	OFX	5 µg	24	22
Phénicolés		Chloramphénicol	C	30 µg	17	17
Sulfamides-trimethoprime		Trimethoprime-Sulfanéthoxazol	SXT	25 µg	14	11

ND :non déterminer

Tableau11 : Liste des antibiotiques utilisés vis-à-vis *Les Staphylocoque*. CA-SFM (2018).

Famille		Antibiotique	Sigle	Charge	Diamètres critiques (mm) S ≥ R <	
β-Lactamines	Pénicilline	Ampicilline	AMP	10 µg	18	18
	Aminosides		K	30 µg	18	18
		Kanamycine (<i>S. aureus</i>)			22	22
Fluoroquinolones	Quinolones 1 ^{ère} G	Acide nalidixique	NA	30 µg	19	14
		Acidepipémidique	PI	20 µg	14	19
	Quinolones 2 ^{ème} G	Ofloxacin (<i>S. aureus</i>)	OFX	5 µg	20	20
		Ofloxacin (<i>S. non-aureus</i>)			24	24
Macrolides		Erythromycine	E	15 µg	21	18
Phénicolés		Chloramphénicol	C	30 µg	18	18

Tableau12 : Liste des antibiotiques utilisés vis-à-vis *Les Pseudomonases*. CA-SFM (2018).

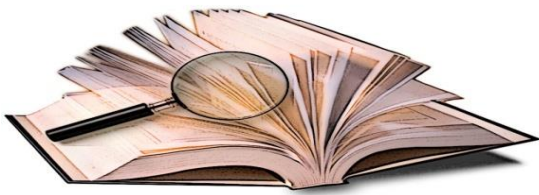
Famille		Antibiotique	Sigle	Charge	Diamètres critiques (mm) S ≥ R <	
β-Lactamine	Pénicilline	Ampicilline	AMP	10 µg	14	14
		Amoxicilline-acide clavulanique	AUG	30 µg	19	19
Aminosides		Kanamycine	K	30 µg	18	15
Fluoroquinolones		Acide pipémidique	PI	20 µg	ND	ND
		Ofloxacin	OFX	5 µg	24	22
Phénicolés		Chloramphénicol	C	30 µg	17	17
Tétracyclines		Tétracyclines	TE	30 µg	22	19

ND :non déterminer

Résultat et discussions

Résultats

.



Résultat et discussions

I.1. Isolement des bactéries lactiques

Parmi un totale de 30 souches à Gram + isolées, 19 souches de bactéries lactiques ont été identifiées à partir el'klila (séchée, fraîche). 5souches ont été isolées a partir el' klila séchée 1 (KS₁), 5souches ont été isolées a partir de klila séchée 2 (KS₂) , 3 souches ont été isolées a partir el' klila fraîche 1 (KF₁) , 6 souches ont été isolées a partir el' klila fraîche 2 (KF₂) .

I.1.1. Etude macroscopique

Les bactéries lactiques ont été isolées sur deux milieux sélectifs : le milieu MRS additionné de vert de bromocresole et le milieu M17. L'examen macroscopique des cultures sur milieux MRS au vert bromocrésol montre la présence de colonies vert foncé, vert clair, colonies transparente et transparente centre vert .L'examen macroscopique des cultures sur milieu M17montre des colonies de formes, circulaires, lisses, bombées régulières et irrégulières, de couleur blanchâtre, crémeuses, transparente, leur taille environ est de 0,1 à 3 mm de diamètres.**Planche 03**

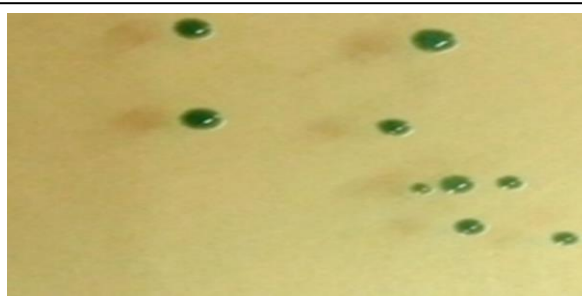
Après incubation, il a été remarqué un virage de l'indicateur coloré dans le milieu de culture du vert au jaune. Ce virage est attribué à la production d'une quantité plus ou moins forte d'acide lactique par les souches en utilisant les sucres fermentescibles. **Figure 06 et 07** .



KF2bl18 Colonie blanche centre vert (MRS)



KS1BL2Colonie vert clair (MRS)



KF2BL14Colonie vert foncé(MRS)



K F1 BL12Colonie blanchâtre (M17)



KF1BL13Colonie transparent (M17) .



KS2bl10Colonie blanchâtre(M17) .

Planche 03 : Aspect des colonies des bactéries lactiques après une mise en culture sur milieux solides MRS au vert de bromocrésol et M17.

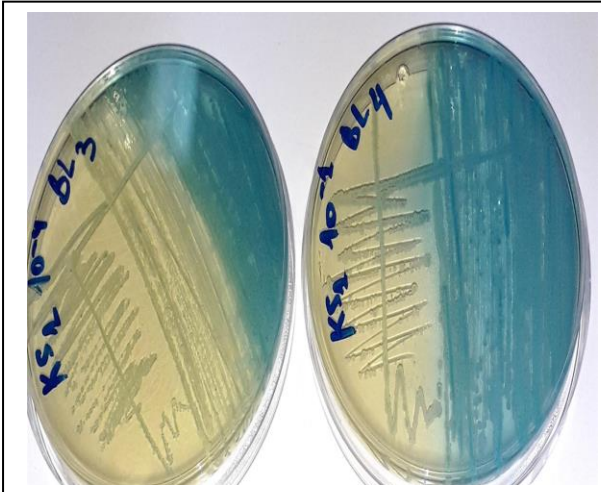


Figure07 : fermentation partielles de l'acide lactique(KS1)

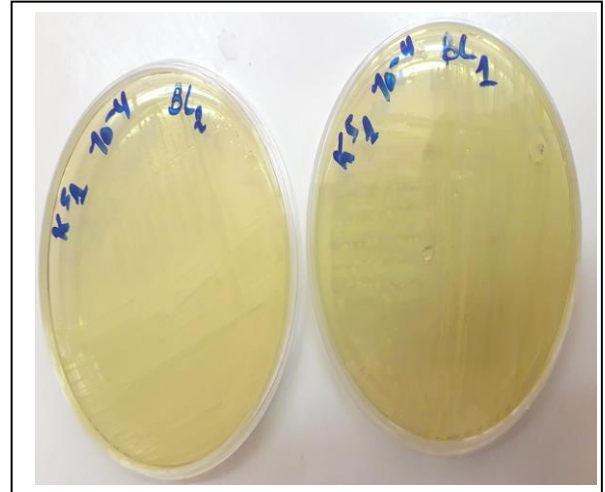


Figure08 : KS1 fermentation totale de l'acide lactique(KS1)

I.1.2. Etude microscopique

La caractérisation microscopique est basée sur la coloration de Gram. Les bactéries lactiques peuvent être sphériques (coque ou cocci), en forme de bâtonnet (bacille), ou intermédiaire (coccobacille), (Carr *et al.*, 2002).

Après la coloration de Gram, on a passé à l'observation microscopique au ($G \times 100$) avec l'huile à immersion, où on a observé que les bactéries étaient Gram positives apparaissant généralement sous formes de coques, bacilles et coccobacille et leur modes d'associations généralement en chaînette, en amas, en double, ou bien isolée. **Le tableau 13** présente les résultats de l'examen microscopique des isolats. **Planche 04**

I.1.3. Test de Catalase

Toutes les souches lactiques isolées sont à catalase négative car l'absence de dégagement gazeux (O_2) (**Figure 09**), ce qui nous oriente à déduire que les souches isolées sont des bactéries lactiques les résultats sont résumés dans le **tableau13**.

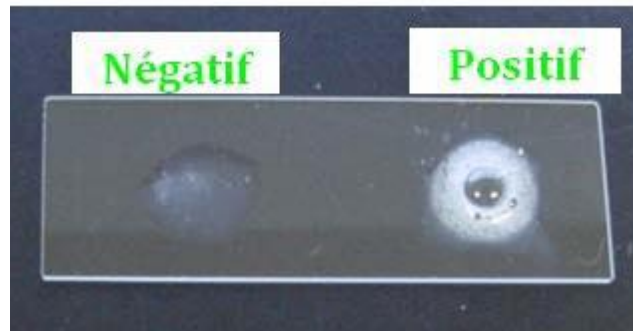


Figure09:Test de catalase

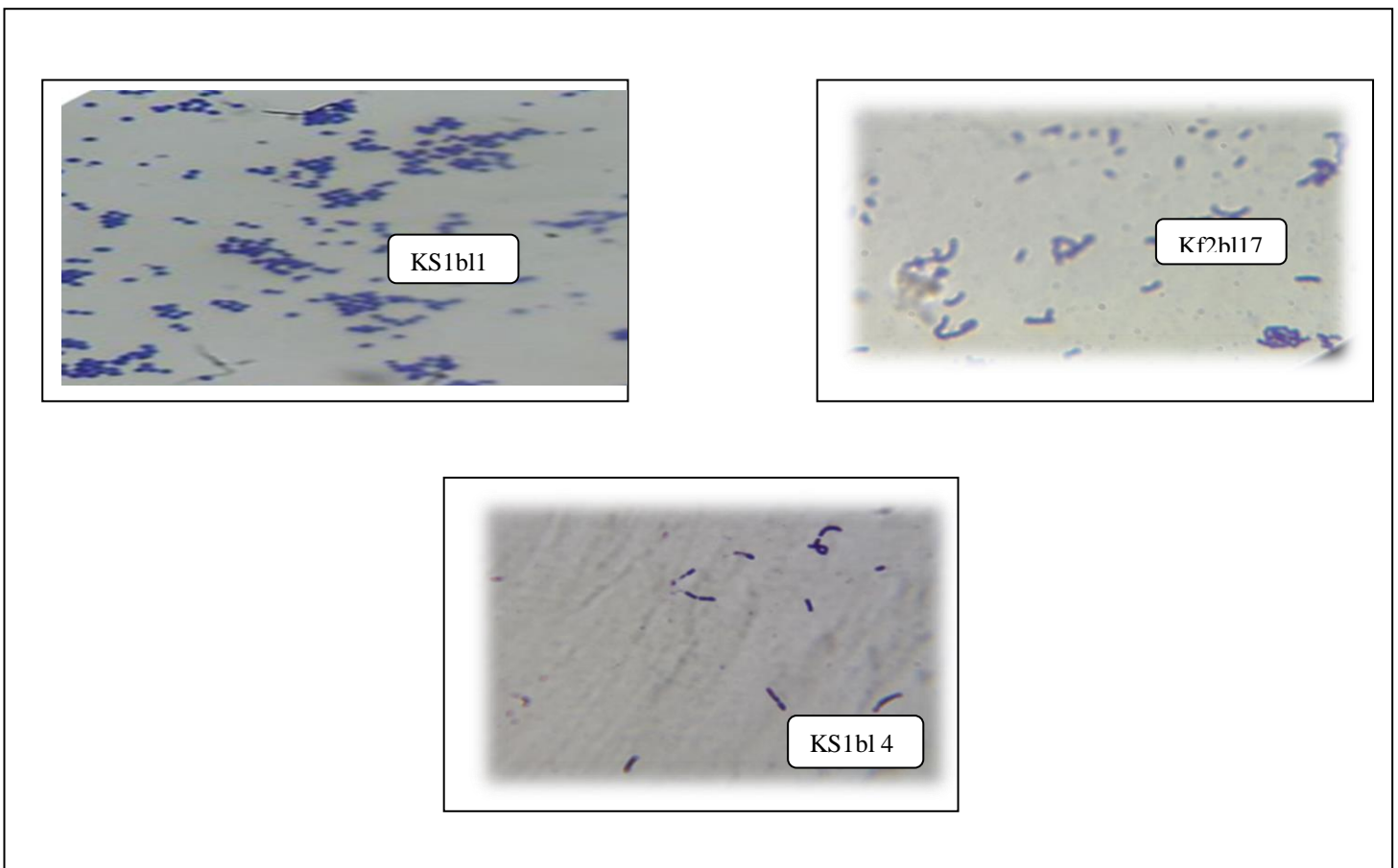


Planche 04 : les différentes observation microscopique (x100) après coloration de Gram

Tableau13: résultats de test catalase et l'aspect microscopique et macroscopique des isolats lactiques.

Souche	Origine	Aspect macroscopique	Observation microscopique: forme/regroupement	Coloration de Gram	Teste de catalase
BL1	KS1 10 ⁻⁴ MRS	Petite Colonie blanche, virage de milieu au jaune	<i>Cocci</i> , Isolée, en double et en chaînette	+	Négative
BL2	KS1 10 ⁻⁴ MRS	petites colonies, vert claire régulière, de 1mm de diamètre avec virage de milieu au jaune	Cocci, isolée, en amas, en chaînette	+	Négative
BL3	KS1 10 ⁻⁴ MRS	Petite colonies, vert claire régulière, de 1mm de diamètre avec virage de milieu au jaune	Cocci, isolée, en amas, en chaînette	+	Négative
BL4	KS1 10 ⁻¹ MRS	Petite Colonie vert clair, virage de milieu au jaune	<i>Cocobacille</i> , Isolée, en double et en chaînette	+	Négative
BL5	KS1 10 ⁻² MRS	Petite Colonie blanche centre vert, virage de milieu au jaune	<i>bacille</i> , Isolée, en double et en chaînette	+	Négative
BL6	KS2 10 ⁻¹	Petite Colonie blanche, virage de milieu au jaune	<i>Cocci</i> , Isolée, en double et en chaînette	+	Négative
BL7	KS2 10 ⁻¹ MRS	Grande Colonie blanche, virage de milieu au jaune	<i>Cocobacille</i> , Isolée, en double et en chaînette	+	Négative
BL8	KS2 10 ⁻² MRS	petites colonies, vert claire régulière, de 1mm de diamètre avec virage de milieu au jaune	Cocci, isolée, en amas, en chaînette	+	Négative

Résultat et discussions

BL9	KS2 10 ⁻⁴ MRS	petites colonies, vert claire régulière, de 1mm de diamètre avec virage de milieu au jaune	Cocci, isolée, en amas, en chênette	+	Négative
BL10	KS2 10 ⁻⁴ M17	Petite Colonie blanche, virage de milieu au jaune	Cocci, isolée, en amas	+	Négative
BL11	K F1 10 ⁻¹ M17	Petite Colonie transparent 0,5mm, virage de milieu au jaune	Cocci Isolée, en double et en amas	+	Négative
BL12	K F1 10 ⁻² M17	Grande Colonie blanchâtre, 3-4mm virage de milieu au jaune	<i>Cocobacille</i> , Isolée, en double et en chainette	+	Négative
BL13	K F1 10 ⁻⁴ M17	Petite Colonie transparent 0,5mm virage de milieu au jaune	<i>bacille</i> , Isolée, en double et en chainette	+	Négative
BL14	KF210 ⁻¹ MRS	Petite colonie, vert foncé 1 mm, avec virage de milieu au jaune	bacille, isolée, en amas, en chênette	+	Négative
BL15	KF210 ⁻¹ MRS	petite colonie, vert foncé, avec virage de milieu au jaune	cocobacille, isolée, en amas, en chênette	+	Négative
BL16	KF210 ⁻² MRS	petite colonie, vert foncé, avec virage de milieu au jaune	Cocobacille, isolée, en amas, en chênette	+	Négative
BL17	KF210 ⁻² MRS	petite colonie, vert foncé, avec virage de milieu au jaune	bacille, isolée, en amas, en chênette	+	Négative
BL18	KF210 ⁻² MRS	Colonie blanche centre verfoncé, virage de milieu au jaune	bacille, isolée, en amas, en chênette	+	Négative
BL19	KF210 ⁻⁴ MRS	petite colonie, vert foncé, avec virage de milieu au jaune	Cocobacille, isolée, en amas, en chênette	+	Négative

Une première collection de 19 isolats lactiques a été constituée à partir des échantillons, des tests préliminaires d'identification sont effectués. Il s'agit d'une détermination de l'aspect macroscopique, microscopique et de la recherche de la catalase. Sur la base des résultats obtenus (bacilles ou cocci ou coccobacilles à Gram positif et catalase négative). Ils sont désignés par un code composé de lettre et de numéro.

L'observation microscopique des 19 souches après coloration de Gram a identifié 37% isolats de forme coccobacille, 42% de forme cocci et 21% de forme bacille. **Figure 10**.

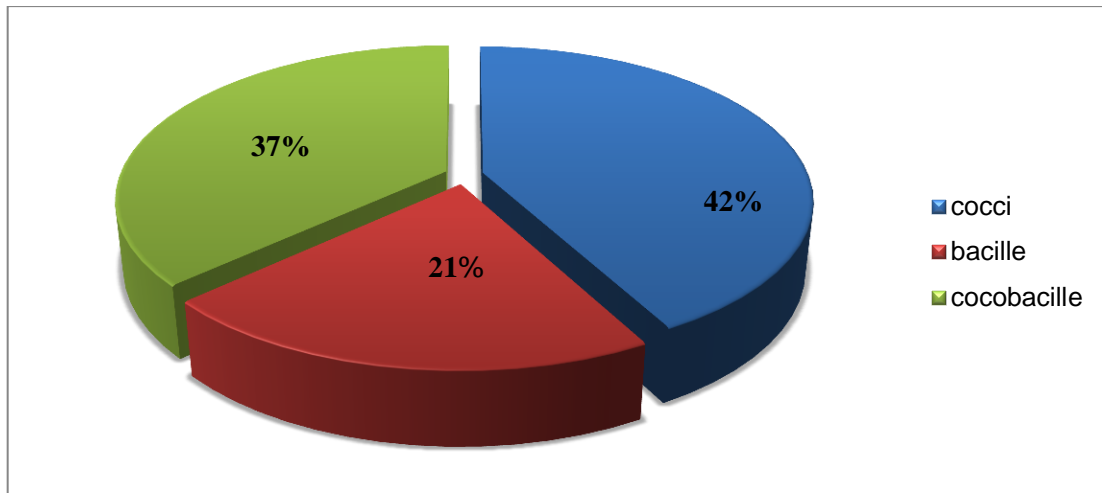


Figure 10 Représentation graphique de la forme des bactéries lactiques isolées.

I.2. Identification biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques

Les isolats Gram positif, catalases négatifs sont étudiées pour déterminer leur genre et leurs espèces. Les résultats de l'identification phénotypiques, biochimiques et physiologiques sont résumés dans le **tableau 14**.

I.2.1. Type fermentaire

Ce test permet de différencier entre les bactéries lactiques homofermentaires et hétérofermentaires (production du gaz CO_2) (**Copolla et al., 1997**).

. La plus parts des souches (68%) sont hétérofermentaires, où il y a un dégagement de gaz qui va poussée la cloche de Durham vers le haut et les autres souches (32%) sont homofermentaires, qui fermentent le sucre en lactate sans produire du gaz (**planche 05** **Tableau 13**). **Figure 11**.

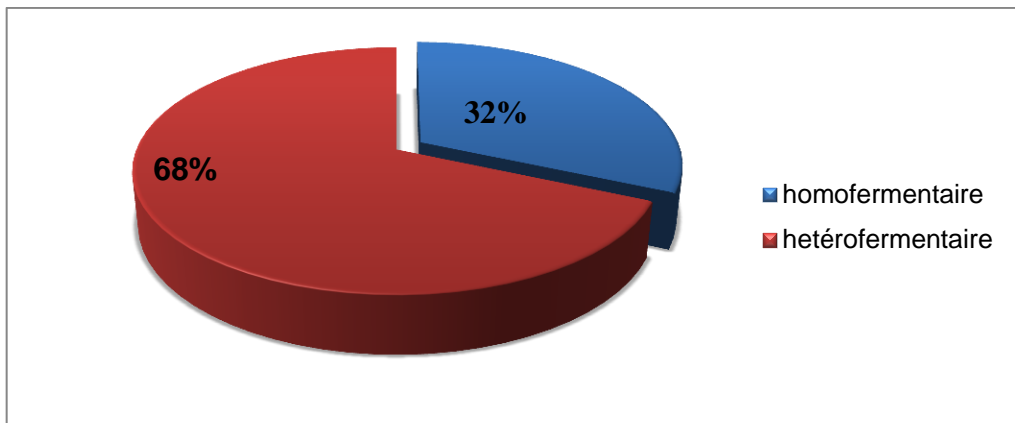


Figure 11 : Représentation graphique de type fermentaire des bactéries lactiques isolées.

I.2.2. Croissance à différentes températures 4°C, 15°C et 45°C

L'emploi de ce teste permet de diviser les souche en trois groupes :groupe des souche mésophile et le groupe des souche thermophile et psychrophile, la croissance des isolats à été teste à 4°C, 15°C et 45°C .La croissance est appréciée par un trouble du milieu après l'incubation en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (**planche 05 et tableau13**).Parmi les 19 souches isolées, on à 13 souches qui se multiplient à 4°C, ce qui assure que ces souches sont psychrophiles ceci prouve que ces bactéries s'adaptent bien au froid dans les conditions utilisées pour la conservation des produits laitiers comme(klila) ,14 des souches qui se multiplient à 15°C. Dans cette étude13 des souches testé sont signalée thermophile, elles poussent bien à 45°C après 24h d'incubation, et on remarque dans cette étude la majorité des souches lactique poussent à température 30°C et 37°C. Cependant, 72% des souches poussent à 15 °C, 96% poussent à 37°C et 72% poussent à 45°C.Néanmoins, 42% des souches ont une large gamme de température de croissance, elles Poussent à 15 °C, 30°C, 37 °C, 45°C .

Nos résultats se concordent avec ceux rapportés dans une étude **Battah et Bouhamdani ,2017** (le fromage artisanal (Alatig)) .

I.2.3 Croissance en présence de différentes concentrations de Na Cl

Pour des concentrations différentes de Na Cl la pluparts des isolas poussent à 3% et 10% peuvent croitre à 7%(**Planche 05, Tableau14**).par contre dans le fromage artisanal (Alatig)70% des souches poussent à10% de NaCl,64% des souches poussent à 4% (**Battah et Bouhamdani ,2017**).

I.2.4 Croissance à pH 3,9

Nous avons remarqué que la majorité des souches testées capable de croître sur milieu MRS liquide à pH 3,9(planche05 et Tableau13) .

I.2.5 Recherche de l'arginine déshydrogénase (ADH)

Parmi les 19 souches isolées, on à 13 souches qui ne possèdent pas l'ADH (ADH^-) et 6des souches qui possèdent l'ADH (ADH^+),donc on observe que la majorité des isolats n'ont pas lacapacité à hydrolyser l'arginine, car ne possèdent pas l'ADH (arginine déshydrogénase), ceci signifié que les bactéries lactiques utilisent le glucose en acidifiant le milieu, et la couleur de ce dernier va virer vers le jaune, et les autres isolats sont capables d'utiliser l'arginine et ré-alcalinisent le milieu et sa couleur reviendra mauve. Les résultats sont résumés dans la **figure 12,tableau 13**.



Figur 12: Résultat du test d'hydrolyse de l'arginine

I.2.6 Test de l'attaque des sucres:

Ce test est utilisé pour but d'identifié les isolats au niveau de l'espèce, en établissant leur profil fermentaire, L'apparition de trouble, et le virage de la couleur du milieu du vert au jaune indique la fermentation du sucre donc la souche a dégradée le sucre testé (résultat positif), si non le résultat est négatif. Les résultats obtenus sont résumés dans la **Figure 13, tableau 15**.

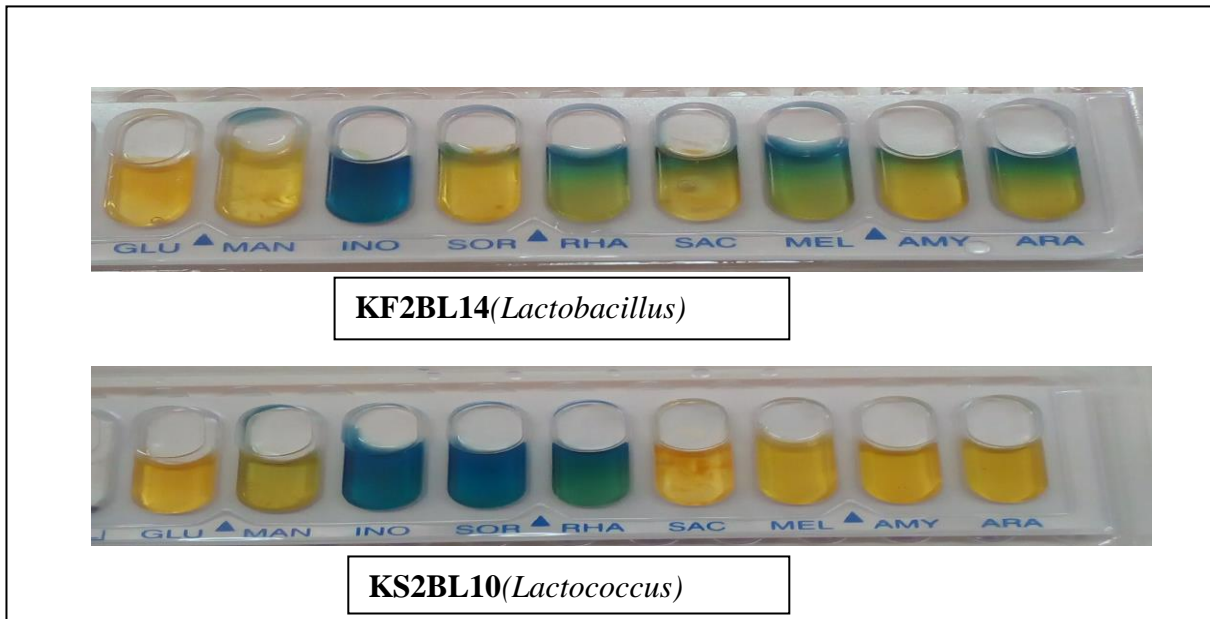
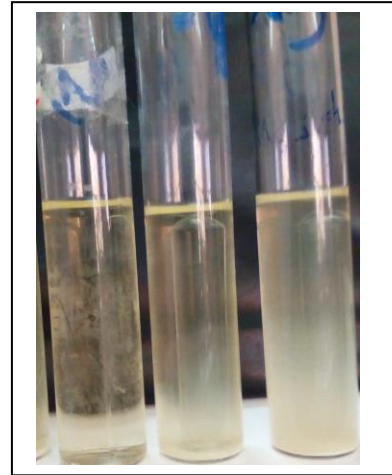


Figure 13 :Résultat de l'attaque des sucres.



Hétérofermentaire

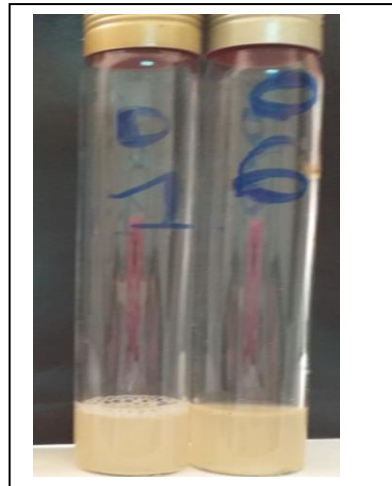


homofermentaires

A.Type fermentaire sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de



Absence de trouble(test-)



Présence de trouble(test⁺)

B.Résultats du test de croissance à 10% de Na Cl pour les souches isolées KSBL1,6,12,13



C.Résultats du test de croissance à pH 3,9 pour les isolats

Planche 05 : les différents testent des bactéries lactiques.

Tableau 14: Résultats des tests biochimiques et physiologique des souches lactiques

Les testes Souches	Type fermentaire	Croissance à pH = 3,9	Croissance à différentes températures				Croissance à différentes concentration de NaCl			ADH	Genre
			4°	15°	30°	45°	3	7	10		
BL1	homofermentaires	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lactococcus</i>
BL2	Hétérofermentaire	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Leuconostoc</i>
BL3	Hétérofermentaire	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Leuconostoc</i>
BL4	Hétérofermentaire	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL5	Hétérofermentaire	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL6	Hétérofermentaire	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>
BL7	Hétérofermentaire	-	-	+	+	+	+	-	-	+	<i>Lactobacillus</i>
BL8	Hétérofermentaire	-	+	+	+	+	+	-	+	-	<i>Streptococcus</i>
BL9	Hétérofermentaire	-	+	+	+	+	+	-	+	-	<i>Leuconostoc</i>
BL10	Hétérofermentaire	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Lactococcus</i>
BL11	homofermentaires	+	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>Enterococcus</i>
BL12	homofermentaires	-	-	-	+	-	-	+	-	+	<i>Lactobacillus</i>
BL13	homofermentaires	-	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL14	Hétérofermentaire	+	-	-	+	-	+	-	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL15	Hétérofermentaire	+	+	+	+	-	+	-	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL16	Hétérofermentaire	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>
BL17	Hétérofermentaire	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>
BL18	Hétérofermentaire	+	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL19	homofermentaires	+	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus</i>

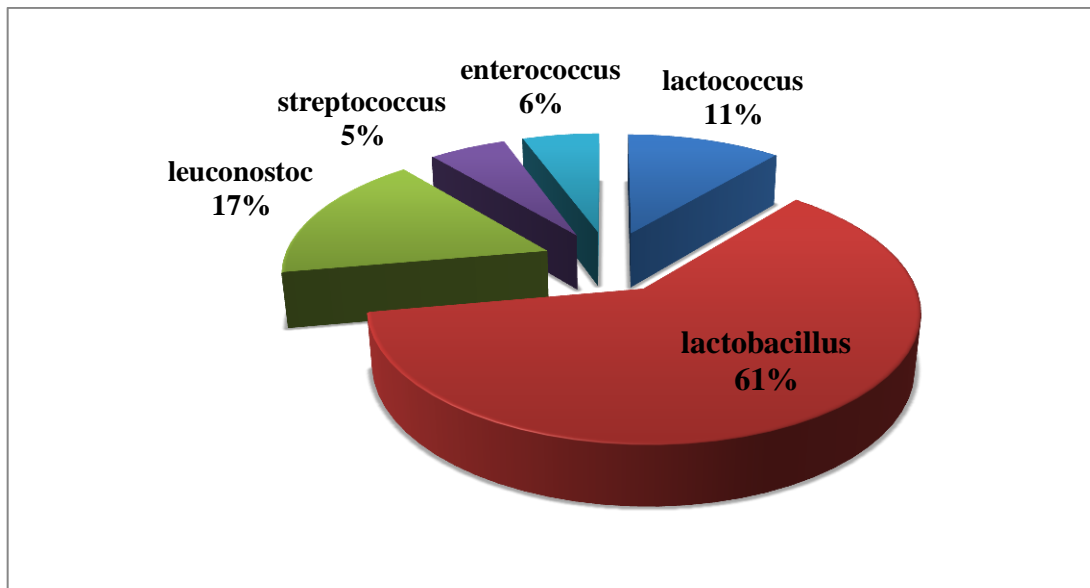


Figure14: Distribution du pourcentage des souches lactiques.

A partir de 4 échantillon el' klila de wilaya de Tébessa: 61% des souche sont des caractéristique rapproche du genre *lactobacilles* ,17% des souche sont des des caractéristique rapproche du genre *Leuconostoc*, 11% des souche sont des des caractéristique rapproche du genre *lactoccus* et 5% des souche sont des des caractéristique rapproche du genre *Streptococcus* et 6%des souche sont rapproche du genre *Enterococcus*. par contre nos résultats différente a d'autre échantillon. de lait cru de vache et chèvre , le lait de vache single la présence des 8.33% *lactoccus*, 45.83% *Enterococcus* et 45.83% *Leuconostoc*, mais le lait de chèvre 13.79% *lactoccus*, 62.06 % *Enterococcus* et 20.68% *Leuconostoc* et 3.44% *lactobacilles* (Belarbi,2011).

Tableau 15 : Résultats de tests de l'attaque des sucres

Souche	Fermentation des sucres									Souche identifié
	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	
BL1	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Lactococcus</i>
BL2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Leuconostoc</i>
BL3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Leuconostoc</i>
BL4	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL5	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>
BL6	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>
BL7	+	-	-	-	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>
BL8	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Streptococcus</i>
BL9	+	-	-	-	+	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
BL10	+	+	-	-	-	+	+	+	+	<i>Lactococcus</i>
BL11	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Enterococcus</i>
BL12	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL13	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL14	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>
BL15	+	-	-	-	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>
BL16	+	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>
BL17	+	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>
BL18	+	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>
BL19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus</i>

I.3. Détermination de la sensibilité des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques

Les résultats de ce test sont présentés dans la **planche 06** et résumés dans. La **Figure 15**

Tableau16 : Détermination de la sensibilité des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques.

ATB \ SOUCHE	PI	TE	K	C	AMP	FO
KBL1	R	S	R	S	R	R
KBL2	R	S	S	S	R	R
KBL3	R	S	S	S	R	R
KBL4	R	S	S	S	R	R
KBL5	R	S	S	S	R	R
KBL6	R	R	R	R	R	R
KBL7	R	R	R	R	R	R
KBL8	R	R	R	S	R	R
KBL9	R	R	R	R	R	R
KBL10	R	S	S	S	R	R
KBL11	R	S	S	S	R	S
KBL12	R	S	R	S	R	R
KBL13	S	S	S	S	R	S
KBL14	S	S	S	S	R	R
KBL15	S	R	S	R	R	R
KBL16	R	S	R	R	S	R
KBL17	R	S	S	R	R	R
KBL18	R	R	R	R	R	R
KBL19	R	R	R	R	R	R

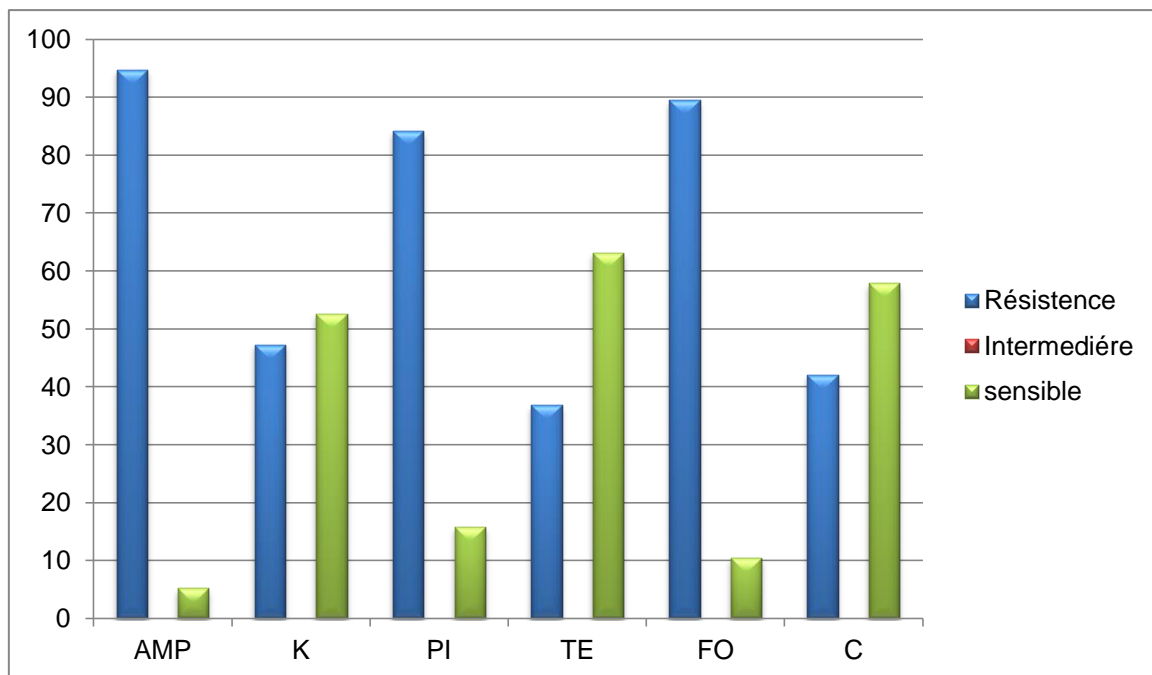


Figure 15: Représentation graphique de la forme des profils des souche des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques utilisés.

On note 94,73% des souche sont résistantes à l'Ampicilline et 47,36% à la Kanamycine , 36,84 % des souche résistantes Tétracycline ,84,21 %des souche sont résistantes a l' Acide pipémidique,89,47 %des souche sont résistantes à la Fosfomycine et 42,1%des souche sont résistantes à Chloramphénicol .

par contre à l'étude qui faite par (**Wandee et al., .2017**) dans le lait , résulte tous les isolats résistance à la Kanamycine ,94,1% sensible à la l'Ampicilline , 79.4% des souche sensible à la Chloramphénicol et 58.9% sont sensible à la Tétracycline.

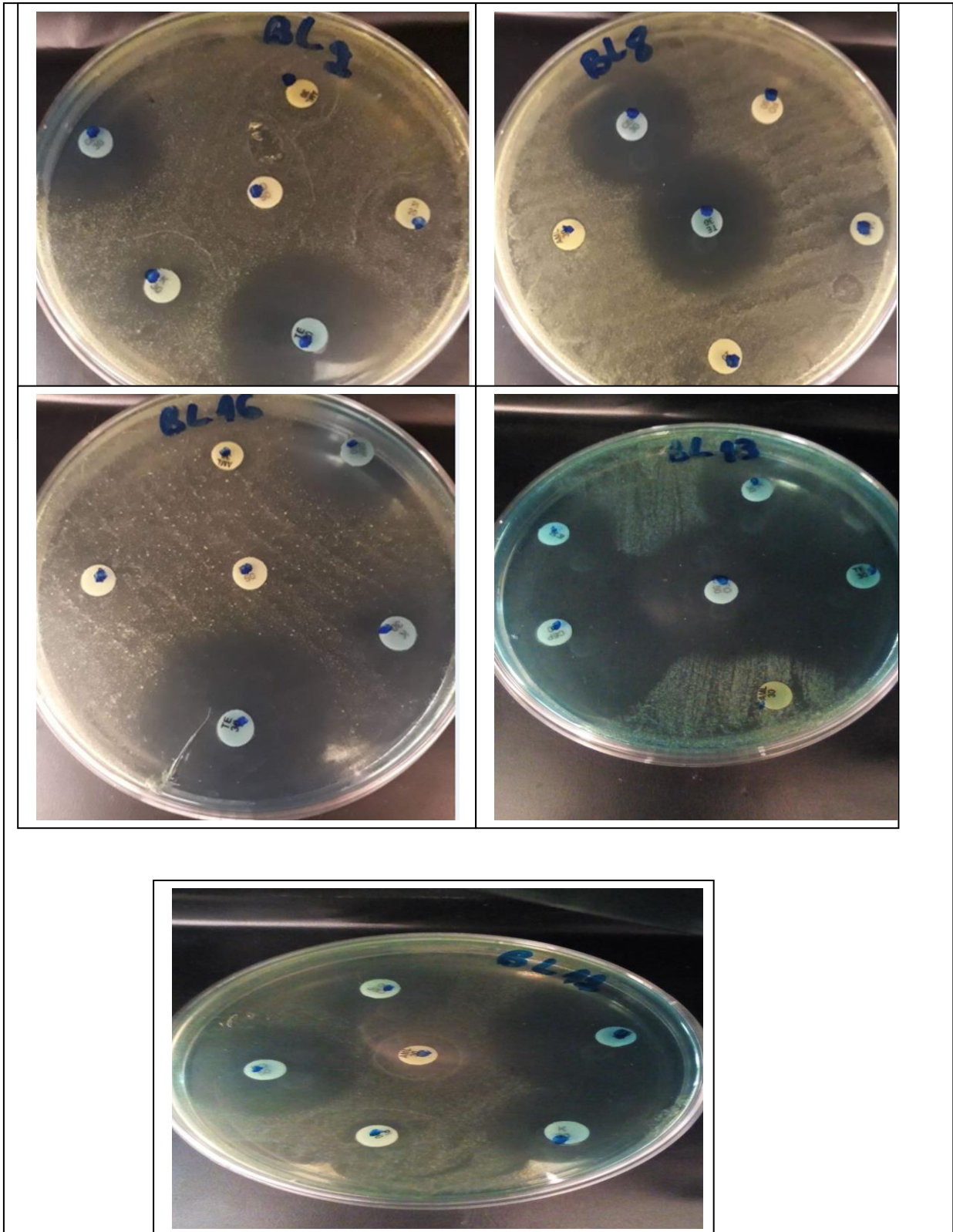


Planche 6: photos représentant des profils de quelques souches des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques utilisés antibiotiques.

I.3 l'activité antagoniste des bactéries lactiques

Pour les teste d'inhibition nous avons utilisé toutes les souche de bactéries lactique contre quater souche indicatrices qui sont des bactéries soit pathogène soit d'altération el'klila .

Tableau17 : Résultats du test d'antagonisme par la méthode de la diffusion sur gélose

Souche Indicatrices / Bactéries lactique	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus mannitole (-)</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>E. coli</i>
1	++	+++	++++	-
2	+	-	++++	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	+	-	-
6	-	+	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	+++	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	+++	-
13	++	-	-	+
14	++	-	-	-
15	++	-	-	-
16	-	+	+	+
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	+	-	-	-

+ :7mm-8mm
 ++ :9mm
 +++ :10mm
 ++++:14mm-16mm

I.3. 1. Activité antagoniste de souches vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

Parmi les 19 souches sélectionnées pour la recherche des propriétés antagoniste, 6 souche a savoir BL1, BL2, BL13, KBL14 , BL15, BL19 ,présentent un spectre d'activité vis-à-vis du germe cible testé *Staphylococcus aureus* . le diamètre de zone d'inhibition varie entre 8 à 9. Et aussi on observée aucune zone inhibition pour les autres souches **Planche7, figure16.**

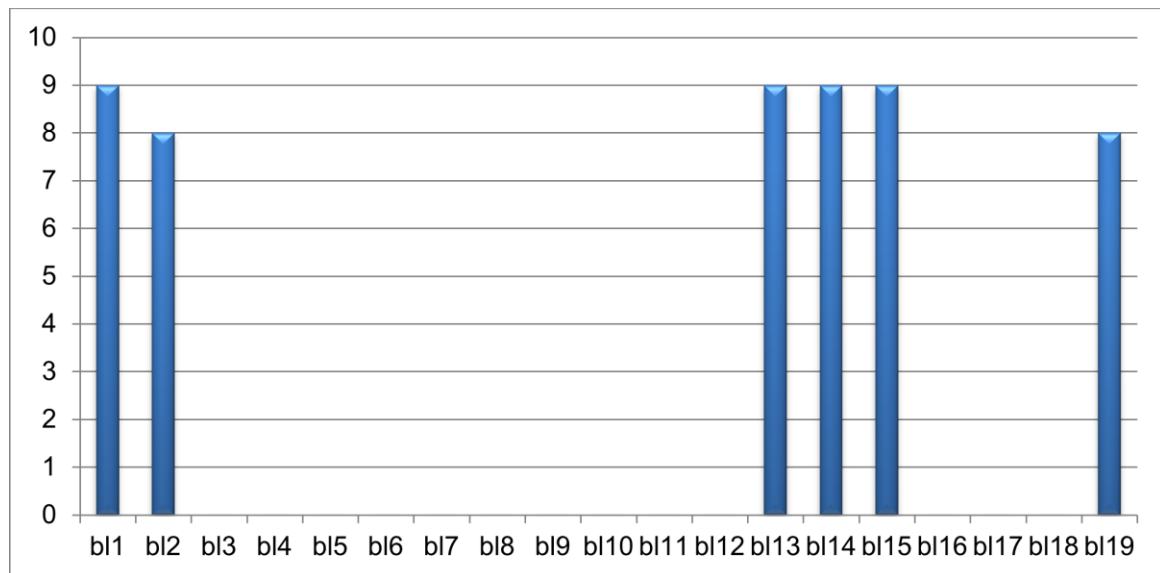


Figure 16: Diamètre d'inhibition en (mm)des souches lactique vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

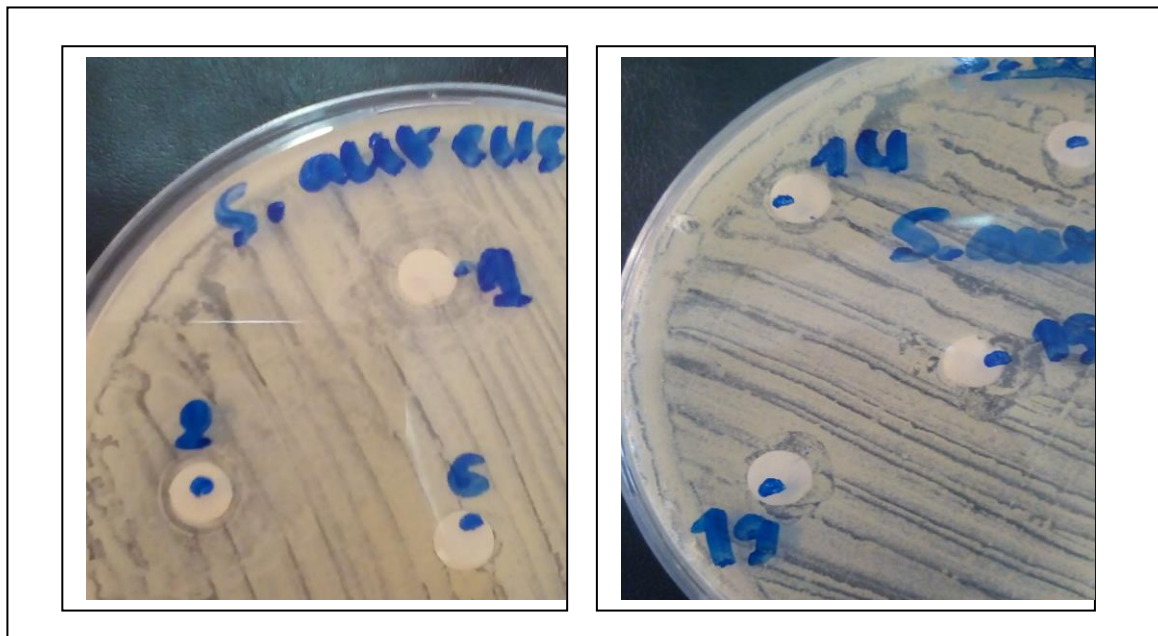


Planche7 : Inhibition obtenue par les souches lactiques vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

I.3. 2. Activité antagoniste de souches vis-à-vis de *Staphylococcus manitol* (-)

Parmi les 19 souches sélectionnées pour la recherche des propriétés antagonistes, 5 souches à savoir BL1, BL4, BL5, BL6, BL16, présentent un spectre d'activité vis-à-vis du germe cible testé *Staphylococcus manitol* (-). Le diamètre de zone d'inhibition varie entre 8 à 11 mm.

Et aussi on observe aucune zone d'inhibition pour les autres souches **Figure 17, Planche 8.**

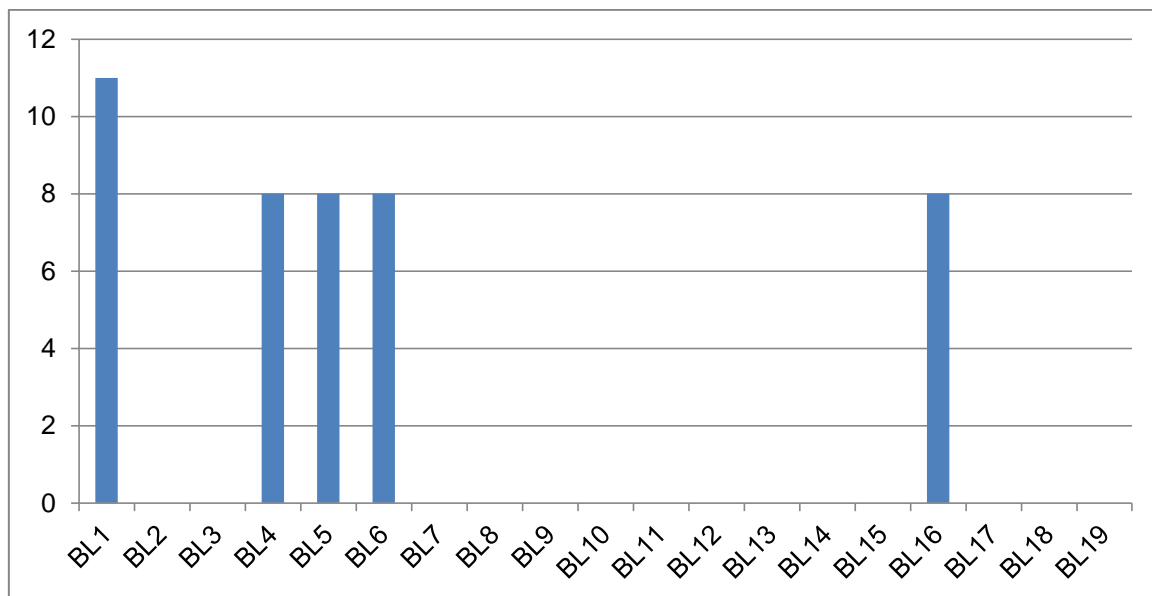


Figure 17 : Diamètre d'inhibition en mm des souches lactiques vis-à-vis *Staphylococcus manitol* -

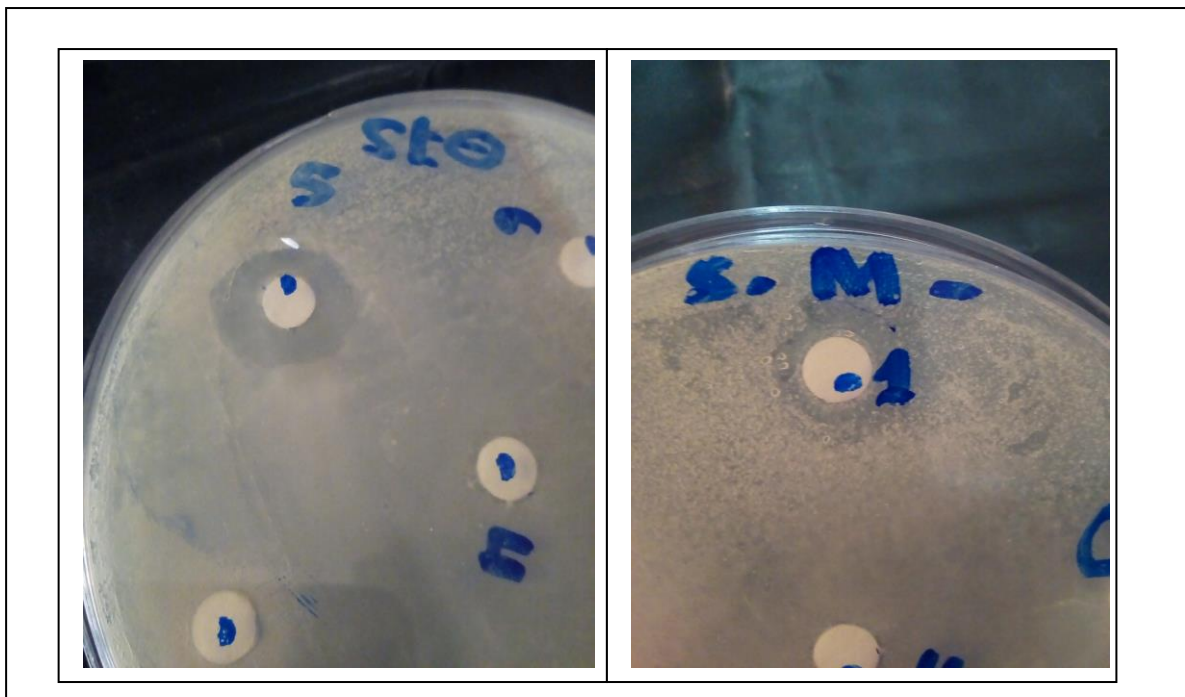


Planche 8 : Inhibition obtenue par les souches lactiques vis-à-vis *Staphylococcus manitol*(-)

I.3.2. Activité antagoniste de souches vis-à-vis de *Pseudomonas*

Concernant *Pseudomonas* les diamètres des zones d'inhibition sont importants pour les souches : BL1, BL2, BL8, BL12, BL16. le diamètre de zone d'inhibition varie entre 8 à 16mm. Pour les autres souches aucune inhibition n'a été observée **Figure 18, Planche 9**.

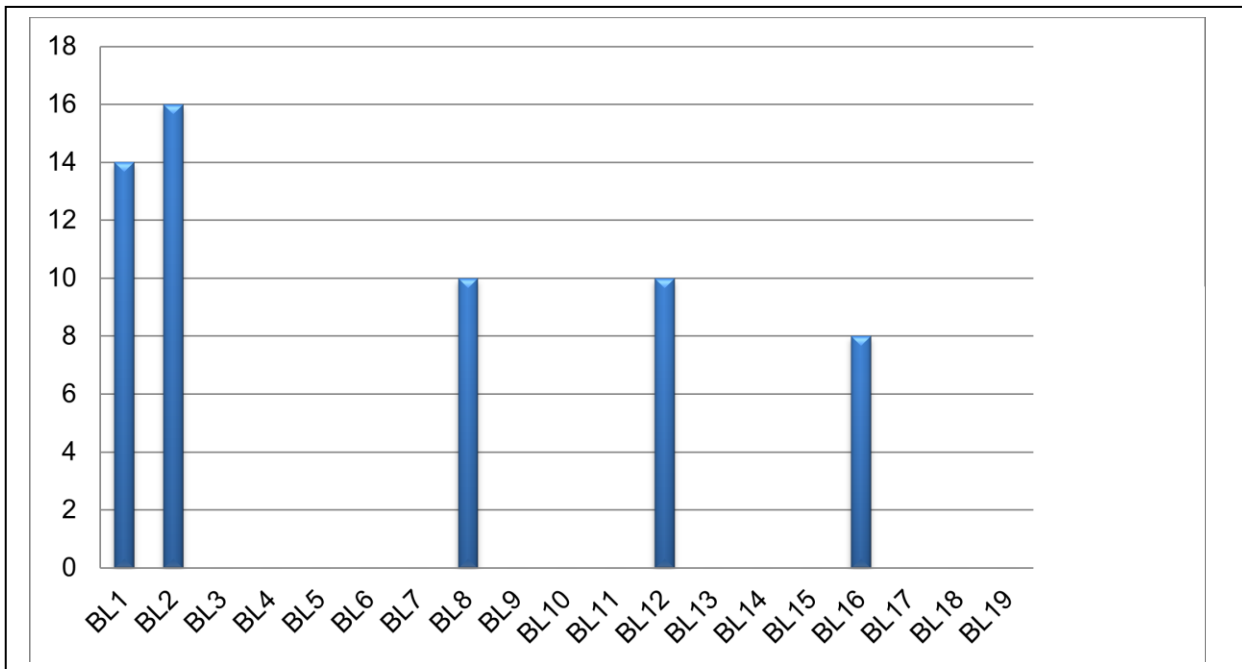


Figure 18: Diamètre d'inhibition en mm des souches lactique vis-à-vis *Pseudomonas*

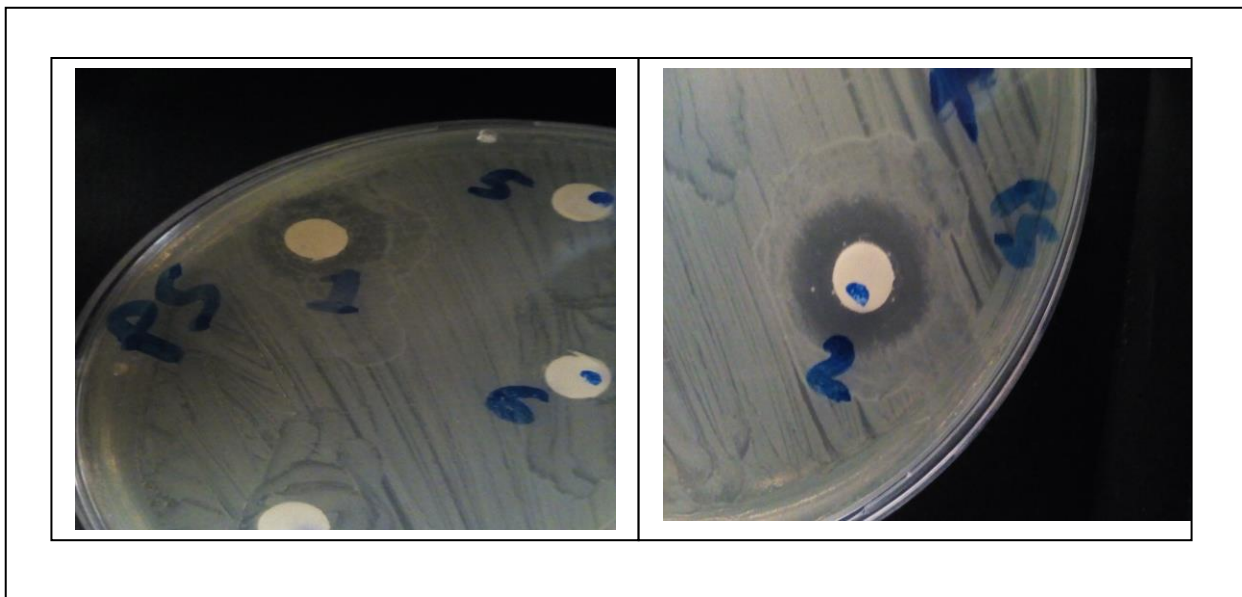


Planche 9: Inhibition obtenue par les souches lactiques vis-à-vis *Pseudomonas*

I.3.3. Activité antagoniste de souches vis-à-vis de *E. coli*

On observe une deux souche BL13, BL16 présente un spectre d'activité vis-à-vis du germe cible testé *Escherichia coli*. Le diamètre de zone d'inhibition varie entre 7 à 8 mm. .Aucune inhibition n'a été observée pour les autres **Figure 19, Planche 10** .

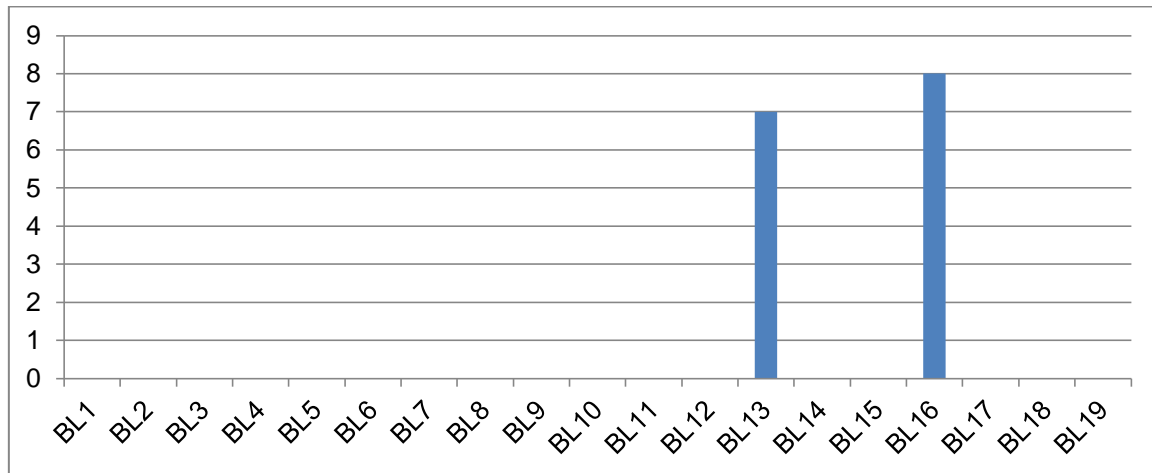


Figure 19 :Diamètre d'inhibition en mm des souches lactique vis-à-vis *E.coli*

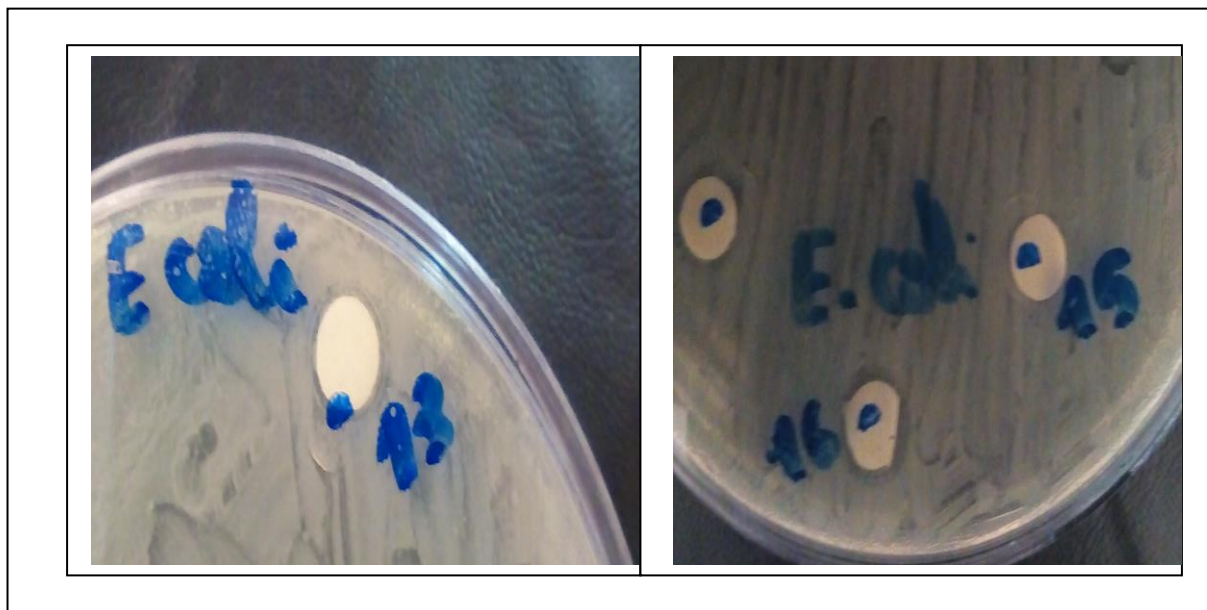


Planche 10: Inhibition obtenue par les souches lactiques vis-à-vis *E.coli*

En général les bactéries lactiques propres el'klila possèdent un effet inhibiteur sur les bactéries indicatrice. Ces résultats indiquent que nos bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne, car il est montré que l'activité antagoniste de bactéries lactiques est due à la production des substances antibactériennes (acide lactique, peroxyde et bactériocine), (Stiles, 1996).donc il ya une production importante des molécule bioactive conter *Pseudomonas*, *Staphylocoques aureus*, *Staphylocoques* mannitol (-), et moins important pour *E. coli*. a l'inverse dans le lait cru de vache et chèvre les résultats de l'interaction des bactérie lactique contre souche pathogène *Staphylocoques aureus*, *E. coli* montre que les 53 souche utilisée avait d'activité inhibitrice .les différentes souche de *leuconostoc*, *lactobacillus*, *lactocoques* possèdent un spectre d'activité vis-à-vis des germe cibles testés.

II.1. Isolement et identification des *entérobactéries*

Parmi un totale de 20 bacilles à Gram négatif, on a identifié 10 souches d'entérobactéries qui ont été isolé à partir d'elklila (séchée, fraîche) 3 souches ont été isolées a partir de klila séchée 1 (KS₁), 3 souches ont été isolées a partir de klila séchée 2 (KS₂), 2 souches ont été isolées a partir de klila fraîche 1 (KF₁), 2 souches ont été isolées à partir de klila fraîche 2 (KF₂).

II.1.1. Observation macroscopique des colonies

L'observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide Mac Konkey après 48h d'incubation à 37°C, pour les isolats testés, on a observé sur le milieu de cultures Mac Konkey des petites et des grandes colonies (Tableau 17) de diamètres de 0,5, 2 et 3 mm arrondie réguliers et irrégulières incolore se traduit l'absence de fermentation du lactose « lac⁻ » (Figure 20), et rose bombé ce qui traduit la fermentation du lactose lac⁺ (Figure 21).

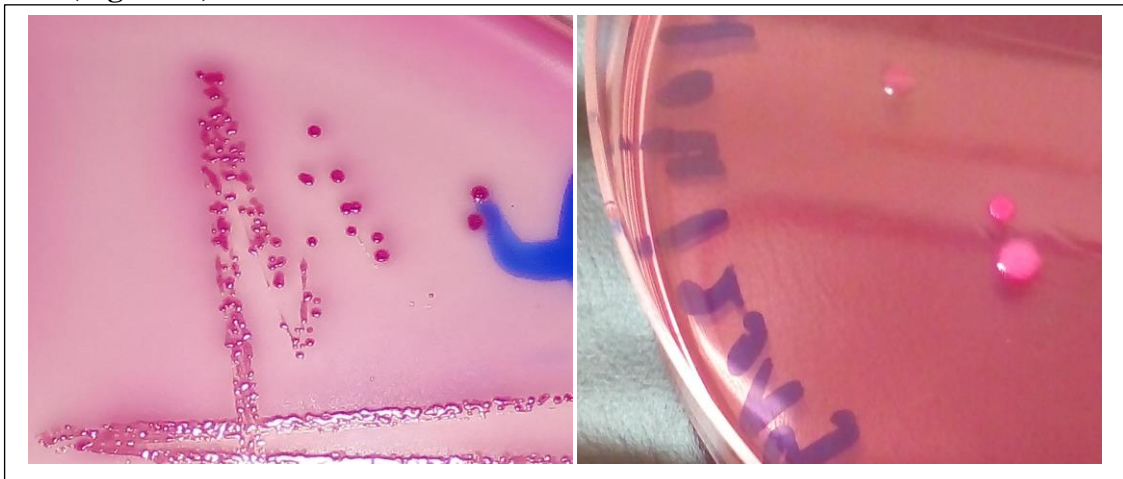


Figure 20: grande colonie rose bombé (KS₁EN₂, KS₂EN₃)

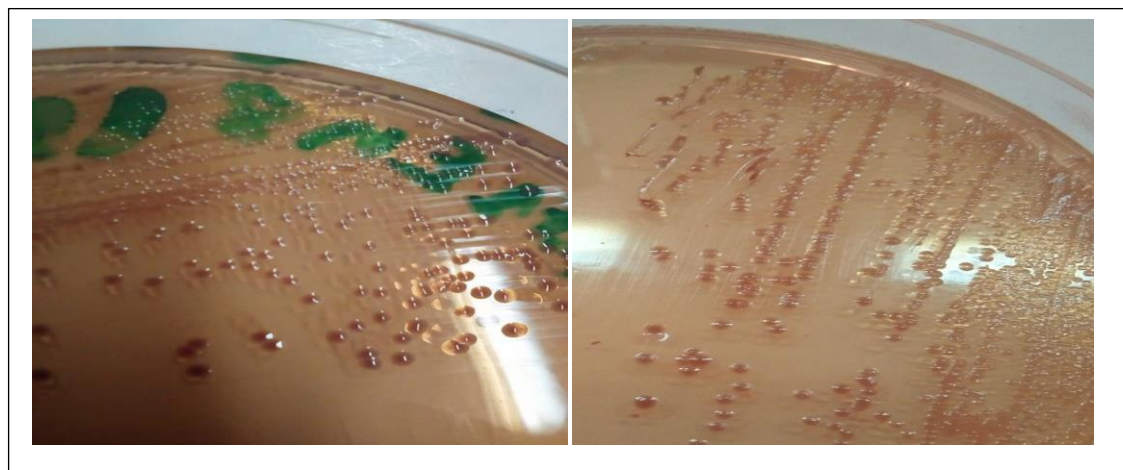


Figure 21 Petite colonie incolore (KF₁EN₆, KF₂EN₁₀)

II.1.2.Observation microscopique des colonies

La coloration différentielle pour les 10 souches isolées montre la présence des bacilles isolé, en chênette ,diplobacille(**Tableau 18**),et en amas colorés en rose (**planche 11**).

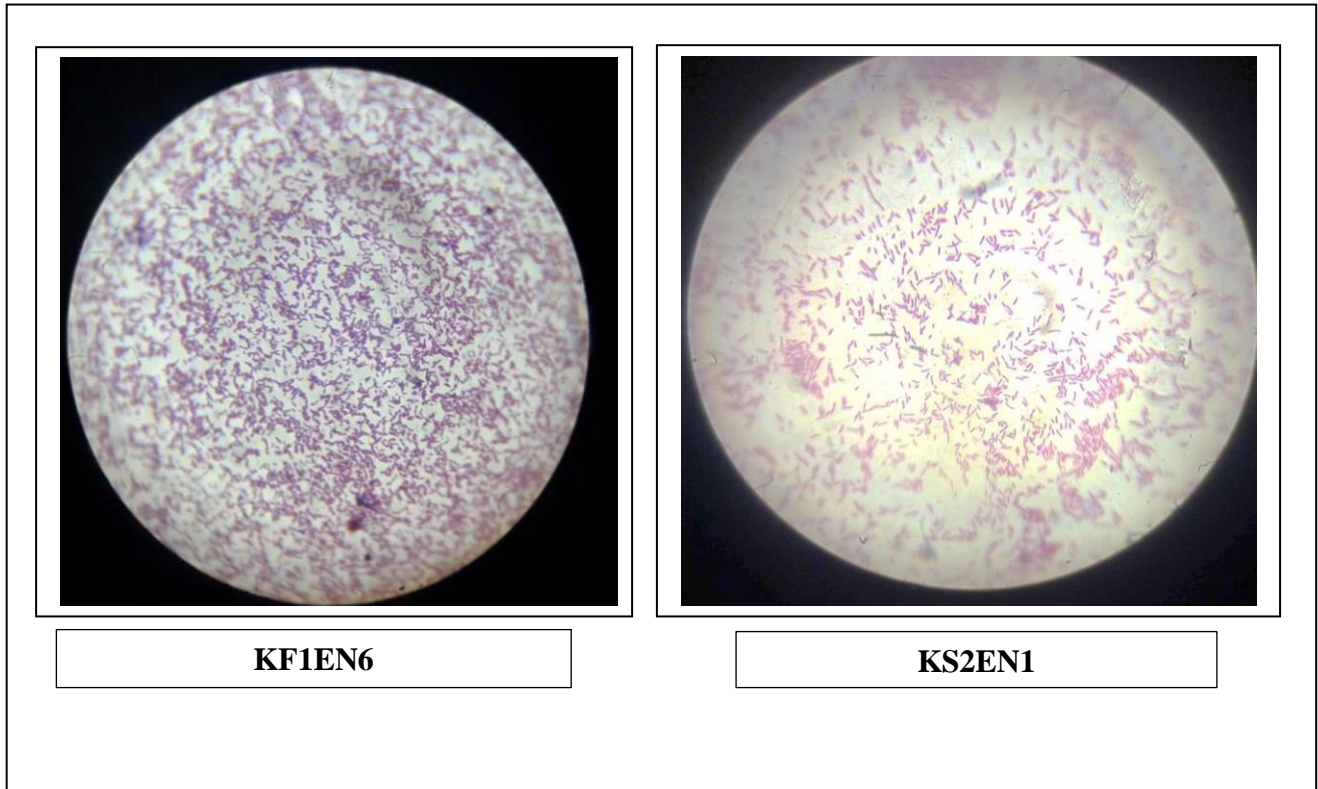


planche 11 :Examen microscopique des souches d'entérobactéries.

Les résultats de la caractérisation phénotypiques sont représentés dans le **Tableau18**

Tableau 18: résultats de test catalase et l'aspect micro et macroscopique des isolats des entérobactéries.

Souche	Origine	Aspect macroscopique	Observation Microscopique forme/regroupement	Coloration de Gram	Teste de catalase
EN1	KS ₁ 10 ⁻¹ Mac konkey	petites colonies forme rond, rose , et crémusede 0,5 à 1 mm de diamètre	Bacille, Isolée, en amas	-	+
EN2	KS ₂ 10 ⁻¹ Mac konkey	grand colonies, rose, crémeuse, de 1 à 3 mm de diamètre	Bacille, Isolée, diplobacille, en amas	-	+
EN3	KS ₂ 10 ⁻² Mac konkey	grand colonies, rose, crémeuse, de 1 à 3 mm de diamètre	Bacille, Isolée, diplobacille, en amas	-	+
EN4	KS ₂ 10 ⁻⁴ Mac konky	petites colonies, incolore, de 1 mm de diamètre	Bacille, Isolée, diplobacille, en amas	-	+
EN5	KF ₁ 10 ⁻¹ Mac konky	Grande colonies, incolore , de 2 mm de diamètre	Bacille,, diplobacille, en amas	-	+
EN6	KF ₁ 10 ⁻⁴ Mac konky	Grande colonies, incolore isolée de 2 mm de diamètre	Bacille, Isolée	-	+
EN7	KF ₁ 10 ⁻⁶ Mac konky	petites colonies, incolore , de 0.5mm de diamètre	Bacille, Isolée, diplobacille, en amas	-	+
EN8	KF ₂ 10 ⁻¹ Mac konky	Grande colonies, incolore isolée de 2 mm de diamètre avec virage de milieu	Bacille, Isolée, diplobacille, en amas	-	+
EN9	K F ₂ 10 ⁻⁴ Mac konky	petites colonies, incolore , de 0.5 mm de diamètre	Bacille, Isolée, diplobacille, en amas	-	+
EN10	KF ₂ 10 ⁻⁴ Mac konky	petites colonies , incolore , de 1mm de diamètre diamètre	Bacille, Isolée, diplobacille, en amas	-	+
EN11	KF ₂ 10 ⁻⁶ Mac konky	petites colonies, incolore, de 1 mm de diamètre	Bacille, Isolée, diplobacille, en amas	-	+

II.2. Identification spécifique des entérobactéries

II.2.1.1 Résultats des tests d'identification par la galerie API 20 E :

Dans notre étude, l'analyse microbiologique qui a porté sur 4 échantillons de Klila séchée et frais nous a permis d'isolé et purifié des isolats suspects, par la suite nous avons réalisé une identification en utilisant le système miniaturisé pour chacun isolats . Les résultats d'identification par le système Api 20 E sont représentées dans **le tableau 18** et **figure 20 planche 12** sont suivant :

Tableau 19 : Résultats de la manipulation avec l'APIE 20

Testes Souche	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	IND	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	L'espèce
EN01	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacteriaceae</i>
EN02	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacteriaceae</i>
EN03	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacteriaceae</i>
EN04	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacteriaceae</i>
EN05	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Flavimonashoryzibians</i>
EN06	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacteriaceae</i>
EN07	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Enterobacteriaceae</i>
EN08	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacteriaceae</i>
EN09	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacteriaceae</i>
EN10	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>Hafniaalvei</i>
EN11	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	<i>Vibriofluvialis</i>



Entérobactér cloacae (EN2)



Hafinia alvei (EN10)



Entérobactér cloacae (EN8)

Planche 12 : Illustration de l'identification par galerie API 20 E des espèces d'entérobactéries isolées .

Les résultats d'identification montre que 09 souches d'entérobactéries ont été identifiées, parmi un total de 11 bacilles à Gram négatif, avec une fréquence d'isolement de 82% (9/10).L'analyse des espèces identifiées par rapport à l'ensemble des souches d'entérobactéries isolées, a montré une prédominance *d'Enterobacter cloacae* avec 8souches soit73%, suivie de *Hafiniaalvei1* souches soit (9 %), nous avons trouvé une souche de *flavimonas oryzihabitans* (9%)et aussi trouvé une souche de *Vibrio fluvialis*(9%) .

La figure présente la répartition de l'ensemble des entérobactéries isolé. Toutefois nous avons constaté que l'espece bactériennes les fréquemment isolées étaient :

Enterobacter cloacae(73%), *Hafinia alvei* 1 (9 % (Tableau 20 Figure 22).

Tableau20 : Fréquence de souches isolées .

Souches	Effectif	Fréquence %
<i>Enterobactercloacae</i>	8	73%
<i>Hafiniaalvei1</i>	1	9%
<i>Flavimonasoryzihabitans</i>	1	9%
<i>Vibriofluvialis</i>	1	9%
Total	11	100%

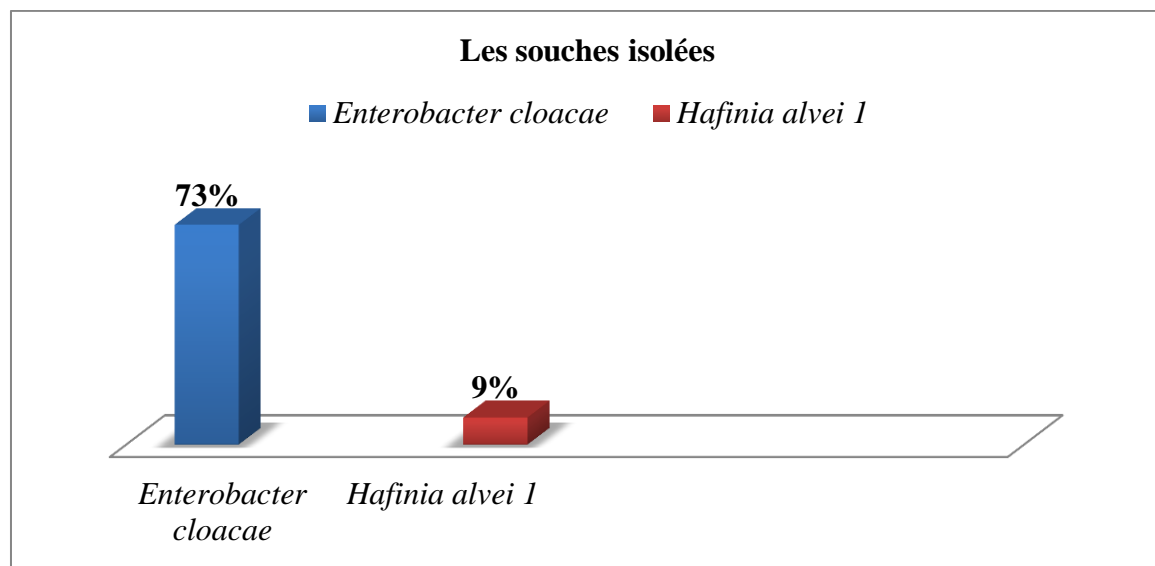


Figure 22: Répartition de l'ensemble des souches des entérobactéries isolées.

Nos résultats montrent qu'il y a une prédominance d'*Enterobacter cloacae* 73% et *Hafinia alvei* 9% à l'inverse d'autres produits alimentaires (la viande) qui ceux rapportés dans un mémoire (Benhadj, 2009) les résultats montrent que l'*Enterobactercloacae* 5,26% et *Hafinia alvei* 26,31% .

II.3.II'antibiogramme

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion des disques sur gélose Muller Hinton et interprété après la mesure des diamètres d'inhibition selon les Recommandations du Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie CA-SFM (2018) .

L'interprétation de test de l'antibiogramme a été faite par la méthode de détermination de la sensibilité d'une souche de bactérie vis-à-vis de divers antibiotiques ,L'interprétation des résultats est simple ce qui explique son intérêt :

- Une souche est dite sensible à un antibiotique si sa croissance peut être réduite par un traitement à base de cet antibiotique
- Une souche est dite intermédiaire à un antibiotique si elle n'est pas atteinte par un traitement standard ; mais si une augmentation de la dose d'antibiotique permet de détruire ce germe.
- Une souche est dite résistante à un antibiotique si elle ne peut être atteinte par ce traitement même en augmentant les doses d'antibiotique.
- Les résultats de l'antibiogramme, sont reportés dans **le tableau21, figure 23,planche 13.**

Tableau 21: Détermination de la sensibilité des entérobactéries vis-à-vis des antibiotique .

<i>ATB</i> / <i>Souche</i>	AK	NA	OFX	SXT	CAZ	C	AM	PI	AUG
EN1	R	S	S	S	R	S	R	ND	R
EN2	R	S	S	S	R	S	R	ND	R
EN3	R	S	I	S	R	S	R	ND	R
EN4	R	S	R	S	R	S	R	ND	R
EN6	S	S	I	S	R	R	R	ND	R
EN7	S	S	S	S	R	R	R	ND	R
EN8	S	S	S	S	R	R	R	ND	R
EN9	R	I	S	S	R	S	R	ND	R
EN10	S	S	R	S	R	S	R	ND	R

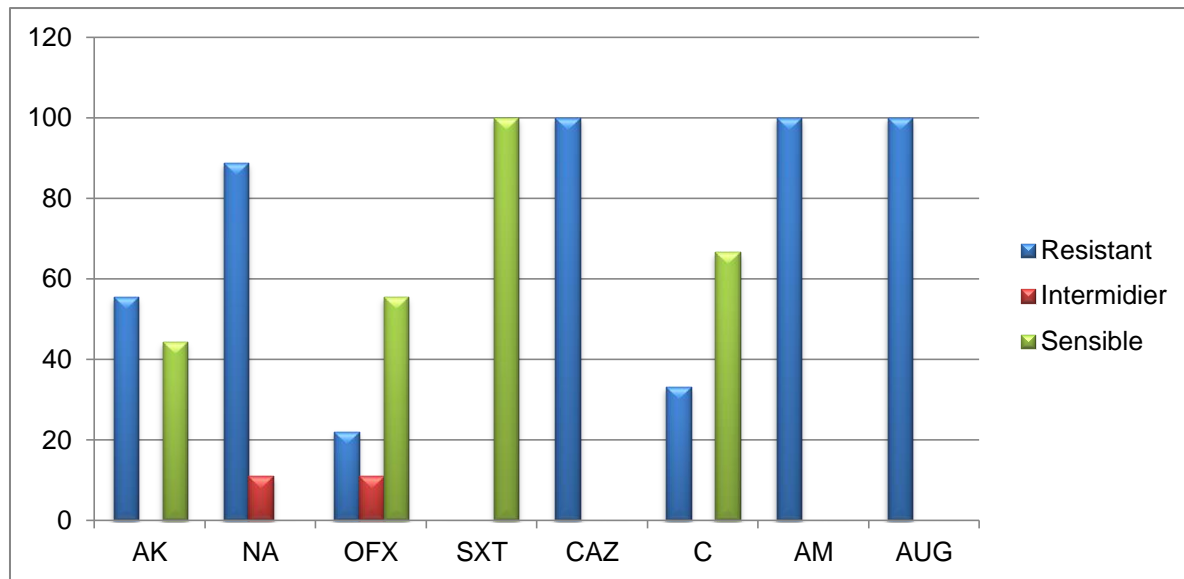


Figure 23: Profil de sensibilité des souches testé des entérobactéries aux antibiotiques

Selon les résultats présentés dans le profil de sensibilité des souches testées des entérobactéries aux antibiotiques, on peut dire que la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées est comme suit :

- Triméthoprime- Sulfaméthoxazole, Chloramphénicol et Ofloxacine et Amikacine sont les antibiotiques pour lesquels les bactéries testées sont sensibles avec un pourcentage de 100% - 62% - 55% - 42%

- Et Cefotaxime, Amoxicilline-acide clavulanique et Ampicilline et Acide nalidixique, Chloramphénicol, Amikacine, Ofloxacine, sont les antibiotiques pour lesquels les bactéries testées sont résistantes avec un pourcentage de 100% - 83% - 56% - 20%

Les antibiotiques les plus actifs sur nos souches étaient :

- Triméthoprime- Sulfaméthoxazole, et Ofloxacine.

Les antibiotiques les moins actifs sur nos souches étaient :

- Cefotaxime, et Ampicilline. Amoxicilline-acide clavulanique, Acide nalidixique

Nos résultats se concordent avec ceux rapportés dans une étude iranienne **Jalalpoor, (2011)** où les taux de sensibilité ont été élevés aux Chloramphénicol, Ofloxacine Amikacine et surtout le Triméthoprime- Sulfaméthoxazole qui était actif à 100 %.

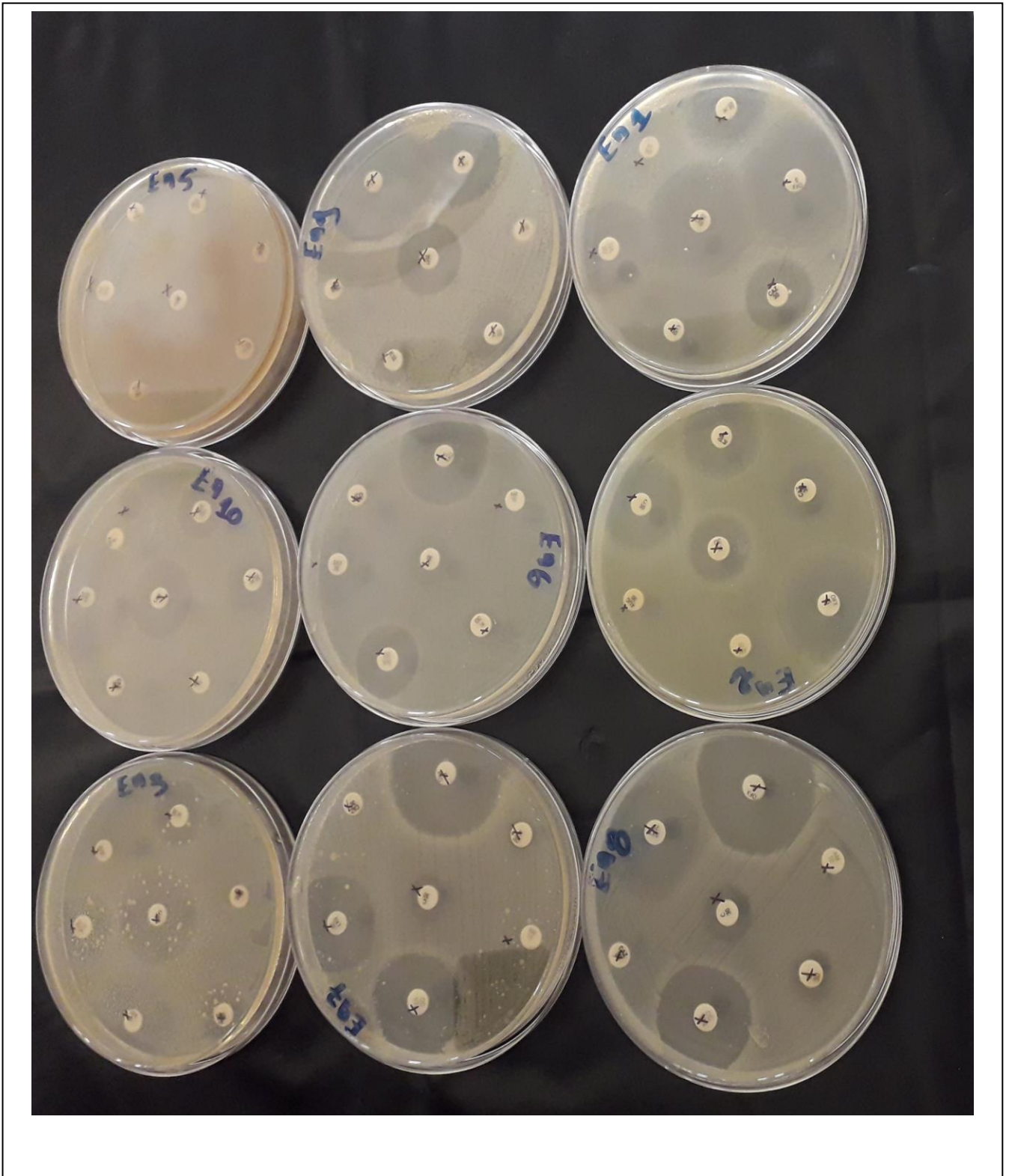


Planche 13 : Photos représentant des profils de quelque souches d'entérobactéries vis-à-vis des antibiotiques différents .

III.1. Isolement et identification des *Staphylocoque*

Parmi un totale de 20 cocci à Gram positif on a identifié ,11 souches de *Staphylococcus* sont été isolé à partir l'klila (séchée, fraîche).3 souches ont été isolées a partir de klila séchée1 (KS₁) ,3 souches ont été isolées a partir de klila séchée 2 (KS₂) , 2 souches ont été isolées a partir de klila fraîche 1 (KF₁) ,3 souches ont été isolées a partir de klila fraîche 2 (KF₂) .

III.1.1 Observation macroscopique des colonies

Observation macroscopique , permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide chapman après 48h d'incubation à 37C° ,pour les isolats testés, on a observé sur le milieu de cultures (Chapman) la présence de colonies jaunes entourées d'une zone jaunâtre dans le cas où le mannitol est fermenté (mannitol⁺)(Figure 24), et la présence de colonies de couleur blanchâtre ,entourées d'une zone rouge ou pourpre dans le cas où le mannitol n'est pas fermenté,(mannitol⁻)(Figure 25). Ces colonies sont arrondies à bords réguliers de 1 à 3 mm de diamètre (Tableau 26) .

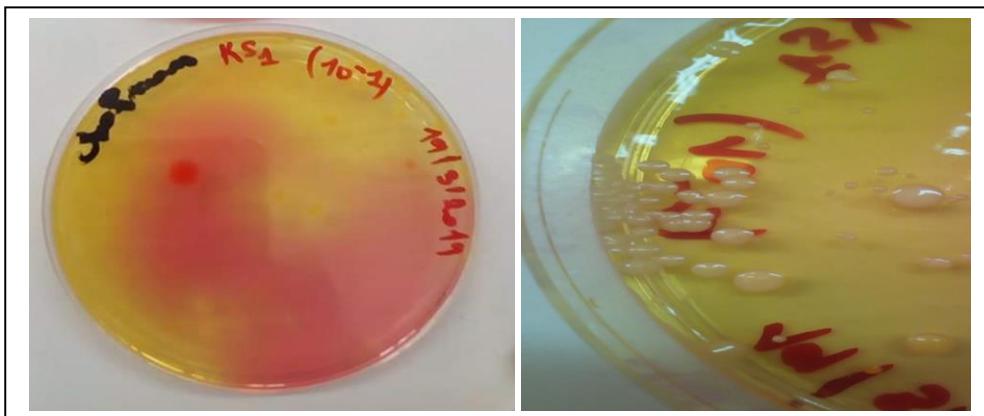


Figure 24: Colonie de *S. aureus* sur milieu Chapman (KS₁ST₁).



Figure 25: Colonie de *S. epidermidis* sur milieu Chapman (K F₁ST₈).

III.1.2.Observation microscopique des colonies

La coloration différentielle pour les 11 souches isolées met en évidence des cocci sphériques, en grappe de raisin, en amas, en chênette colorés en violet .**Planche 14**

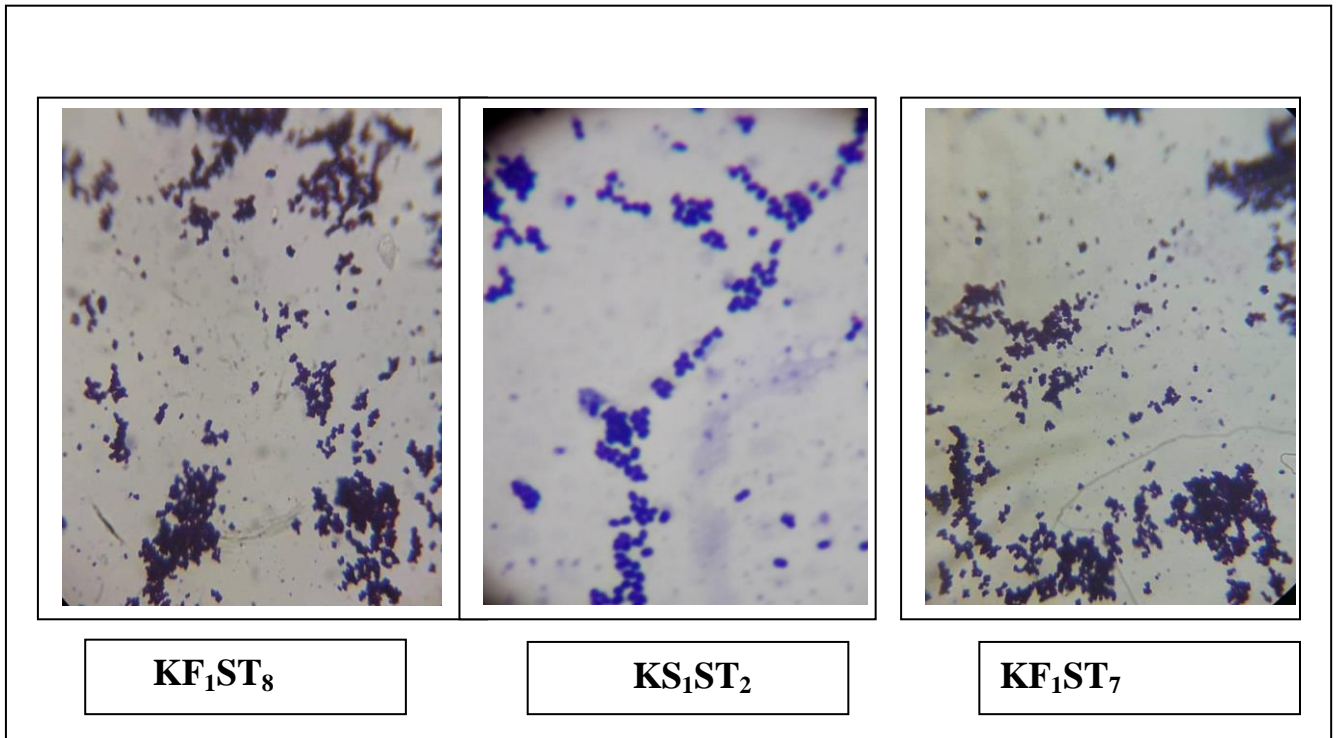


Planche14 :Examen microscopique des souches de staphylocoque.

III.1.3.Test catalase

pour les staphylocoques cette test une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz (oxygène). **Figure 26,Tableau 22.**



Figure 26: Production de catalase par les cocci à Gram positif isolés.

Tableau 22 : résultats de test catalase et l'aspect microscopique et macroscopique des isolats des *staphylocoques*.

Souche	Origine	Aspect macroscopique	Observation Microscopique forme/regroupement	Coloration de Gram	Teste de catalase
ST1	KS ₁ 10 ⁻¹ Chapman	Grande colonie,écumuse régulière, de 3mm de diamètre avec virage de milieu	Cocci, isolée, en chênette	+	+
ST2	KS ₁ 10 ⁻² Chapman	Petite colonie, ,blanchâtre régulière, de 1mm de diamètre	Cocci , isolée ,en amas	+	+
ST3	KS ₁ 10 ⁻⁴ Chapman	Petite colonie, ,blanchâtre irrégulière, de 1mm de diamètre	Cocci, isolée, en amas, en chênette	+	+
ST4	KS ₂ 10 ⁻¹ Chapman	Petite colonie, ,blanchâtres régulière, de 1mm de diamètre	Cocci, isolée, en amas, diplocoque	+	+
ST5	KS ₂ 10 ⁻² Chapman	Grand colonie, doré , régulière, de 4mm de diamètre	Cocci, isolée, en amas, en chênette	+	+
ST6	KS ₂ 10 ⁻⁴ Chapman	Grand colonie, blanchâtre , régulière, de 3mm de diamètre	Cocci, isolée, en amas, en chênette	+	+

ST7	KF110 ⁻¹ Chapman	Grande et petite colonie, blanchâtre de 3à0.5 mm de diamètre	Cocci, endiplocoque ,en amas	+	+
ST8	KF ₁ 10 ⁻⁴ Chapman	Grande et petite colonie, blanchâtre de 3à0.5 mm de diamètre	Cocci, isolée, en chênette,diplocoque	+	+
ST9	KF ₂ 10 ⁻¹ Chapman	Grand colonie, blanchâtre ,régulière, de 3mm de diamètre	Cocci, isolée, en amas, en chênette	+	+
ST10	KF ₂ 10 ⁻² Chapman	Petite colonie, ,blanchâtres régulière, de 1mm de diamètre, avec virage de colure	Cocci, isolée, en amas, en chênette	+	+
ST11	KF ₂ 10 ⁻⁴ Chapman	Grand colonie, blanchâtre ,régulière, de 3mm de diamètre avec virage de colure	Cocci, isolée, en amas, en chênette	+	+

III.2.1. Test de coagulase libre

Les cocci à Gram positif, catalase positive, testés pour la production d'une coagulase, présentent un phénotype variable (**Figure 27**).

- 7 souches à coagulase positive et mannitol positive: *S. Aureus*.
- 4 souches à coagulase négative : autres espèces de staphylocoques.

Les résultats de la pré-identification sont illustrés dans le **tableau23**.

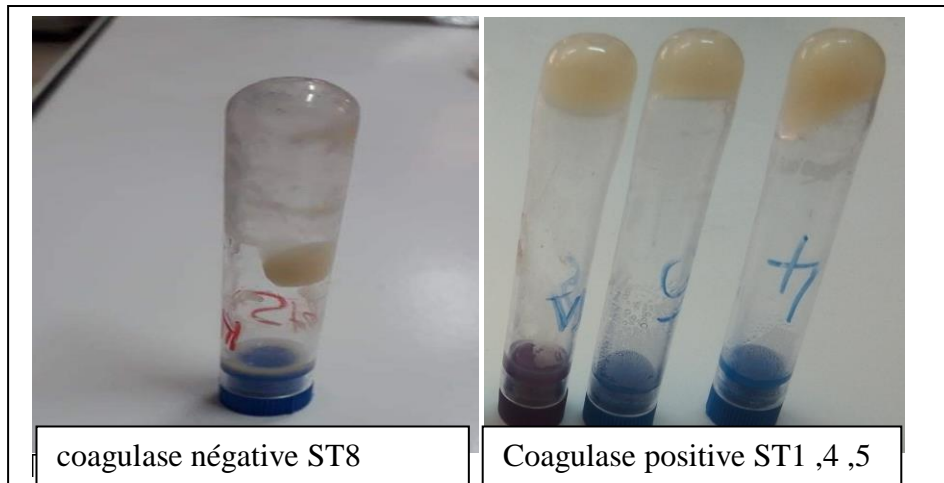


Figure 27 : Résultat du test de coagulase libre

Tableau 23: Résultats de pré-identification par les techniques microbiologiques standards

Souche	ST ₁	ST ₂	ST ₃	ST ₄	ST ₅	ST ₆	ST ₇	ST ₈	ST ₉	ST ₁₀	ST ₁₁
Dégradation le mannitol	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
production d'une coagulase	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Les résultats de la pré-identification	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus intermedius</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. schleiferi</i>

Le teste de la coagulase de souches ST₈,ST₉est négatif (-) qui indique l'absence de l'enzyme coagulase libre, c'est une enzyme capable de faire coaguler le plasma sanguin. La

mise en évidence d'une activité coagulase libre chez une souche de *Staphylococcus* est un des critères d'identification de *Staphylococcus aureus* en médecine humaine (Camille,2014).

III.2.2.Répartition des espèces selon leur nature

L'identification des 11 souches de Staphylocoques à donné :

7 *Staphylococcus aureus* (SCP) 4 Staphylocoques à coagulase négative (SCN), **Figure 28**

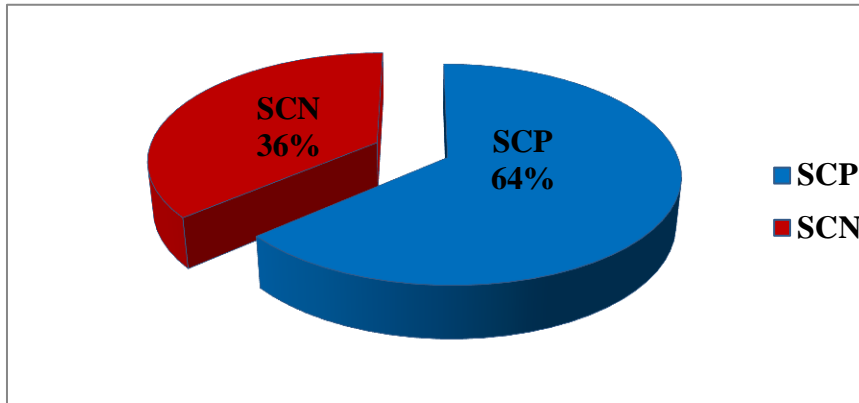


Figure 28: Répartition des espèces isolées étudiées selon leur nature .

On remarque la présence des germes des staphylocoques dans tous les échantillons du klila (séchée, fraîche) analysés. On note 64% des souches *Staphylococcus aureus* (SCP) et 36% des souches staphylocoques à coagulase négative (SCN). Par contre, a été enregistrée une absence totale des staphylocoques durant toute la période du contrôle des trois fromages par **Hadef (2012)** dans la fabrication d'un fromage frais et même résultat pour l'klila au Maroc par **Rhiat et al,(2013)** ; **Mennane et al, (2007)**.

La présence des staphylocoques dans le produit alimentaire est très dangereuse de point de vue sanitaire car en bactériologie alimentaire, cette espèce capable de produire des entérotoxines. En effet l'ingestion d'entérotoxine présentes dans les aliments provoque un syndrome gastro-intestinal ou toxi-infection alimentaire à staphylocoque (**Bezzalla et Gouttaya, 2013**).

La norme concernant *Staphylococcus aureus* est l'absence totale du germe dans le lait cru destiné à la fabrication du fromage frais. (**Bezzalla et Gouttaya, 2013**).

III.3. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

L'antibiogramme)

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité ou la résistance des souches à étudiée à certains antibiotiques en utilisant la méthode de diffusion en milieu solide.

Les résultats de l'antibiogramme des 11 isolats des staphylocoques sont reportés sur le **tableau 24, Figure 29.**

Tableau 24 : Résultat de l'antibiogramme des souches des staphylocoques.

ATB souche	AM	K	AN	OFX	PI	E	C
ST1	R	S	R	S	R	S	S
ST2	R	S	R	S	R	R	S
ST3	R	S	R	S	R	S	S
ST4	R	S	R	S	R	I	S
ST5	R	S	R	S	R	I	S
ST6	R	S	R	S	S	S	S
ST7	R	S	R	S	S	S	S
ST8	R	R	R	S	S	S	S
ST9	R	S	R	S	S	S	S
ST10	R	S	R	S	R	R	R
ST11	R	R	R	S	R	S	S

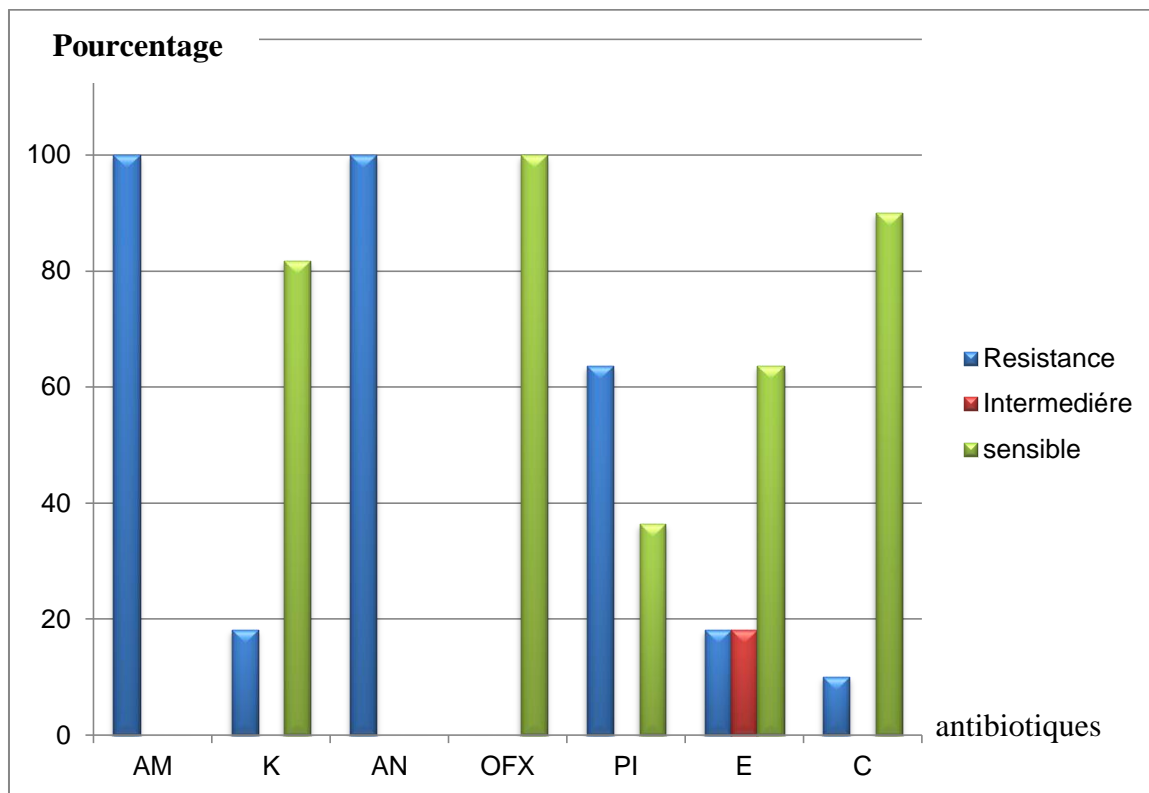


Figure (29) : Représentation graphique des profils des souches staphylocoques vis-à-vis des antibiotiques utilisés.

On note 100% des souches sont résistantes à l' Ampicilline et l'acide nalidixique ,aussi 63,63% sont résistantes à la Acide pipémidique ,et 18,18 %des souches sont résistantes à la Kanamycine et Erythromycine, 10% sont résistantes à la Chloramphénicole .

Encore 18 ,18% es souches présentent un profil intermédiaire pour l'erythromycine.

Par ailleurs 100% des souches sont sensibles pour Ofloxacine , alors que 90% des souches sont sensibles pour Chloramphénicole ,et 81,81%des souches sont sensibles à la Kanamycine ,aussi 63,63%des souches sont sensibles à la rythromycine, et 36,36% des souches sont sensibles à la Acide pipémidique.

IV. Isolement et identification des *Pseudomonas*

Parmi un total de 17 bacilles à Gram négatif , les 10 souches de *Pseudomona* sont été identifiées et isolé à partir l'klila (séchée,fraiche).3 souches ont été isolées a partir de klila séchée1(KS₁) ,3 souches ont été isolées a partir de klila séchée 2 (KS₂) , 3 souches ont été isolées a partir de klila fraiche 1 (KF₁) ,1 souches ont été isolées a partir de klila fraiche 2 (KF₂) .

IV.1.Observation macroscopique des colonies

Observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu sélectifs (King A et cétrimide), après 48h d'incubation à 30 C° ,pour les isolats testés, on a observè sur le milieu de cultures des colonies de quelques millimètres de diamètre (0,5 à 3mm),plates ou opaques, bombées à contour régulier.

En 2 à 4 jours, on assiste souvent à un bleuissement ou verdissement des milieux de culture dû aux pigments diffusibles élaborés par la bactérie **Planche15, Tableau 25.**

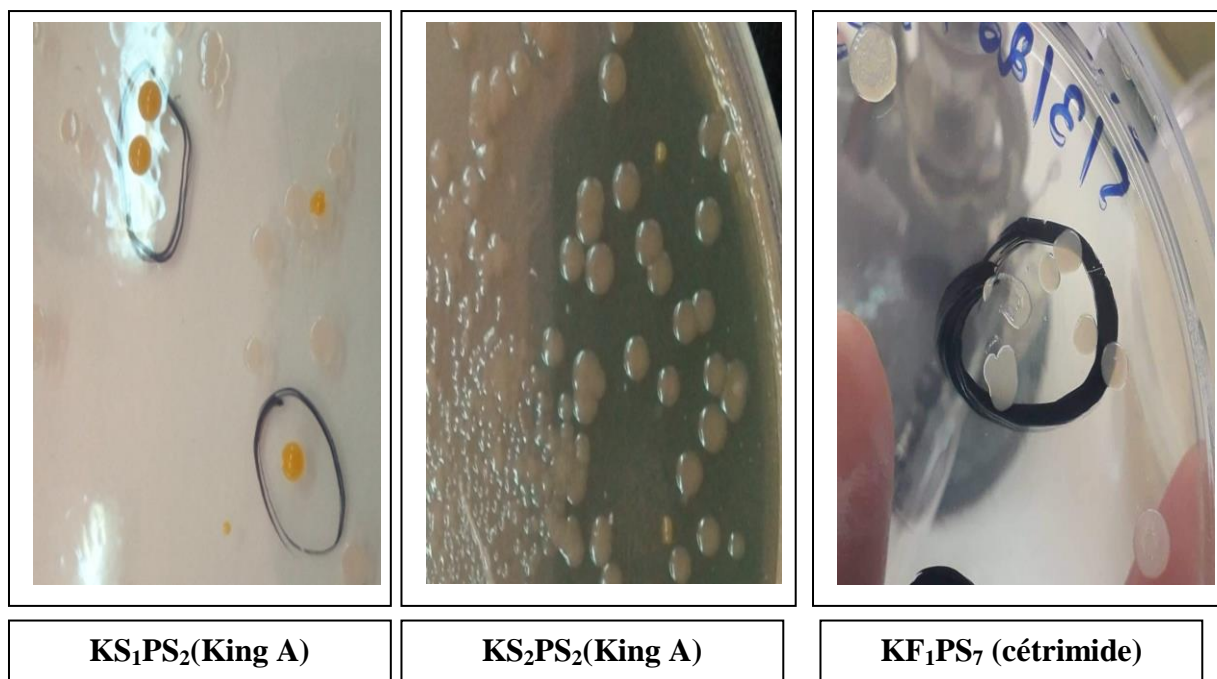


Planche 15 :Observation macroscopique des souches de *Pseudomonas* sur milieu sélectifs (King A et cétrimide)

IV.2.Observation microscopique des colonies

La coloration différentielle pour les 11 souches isolées mettre en évidence des bacilles

Isolé, en chênettes , diplobacilles, en amas colorés en rose **planche16,Tableau25** .

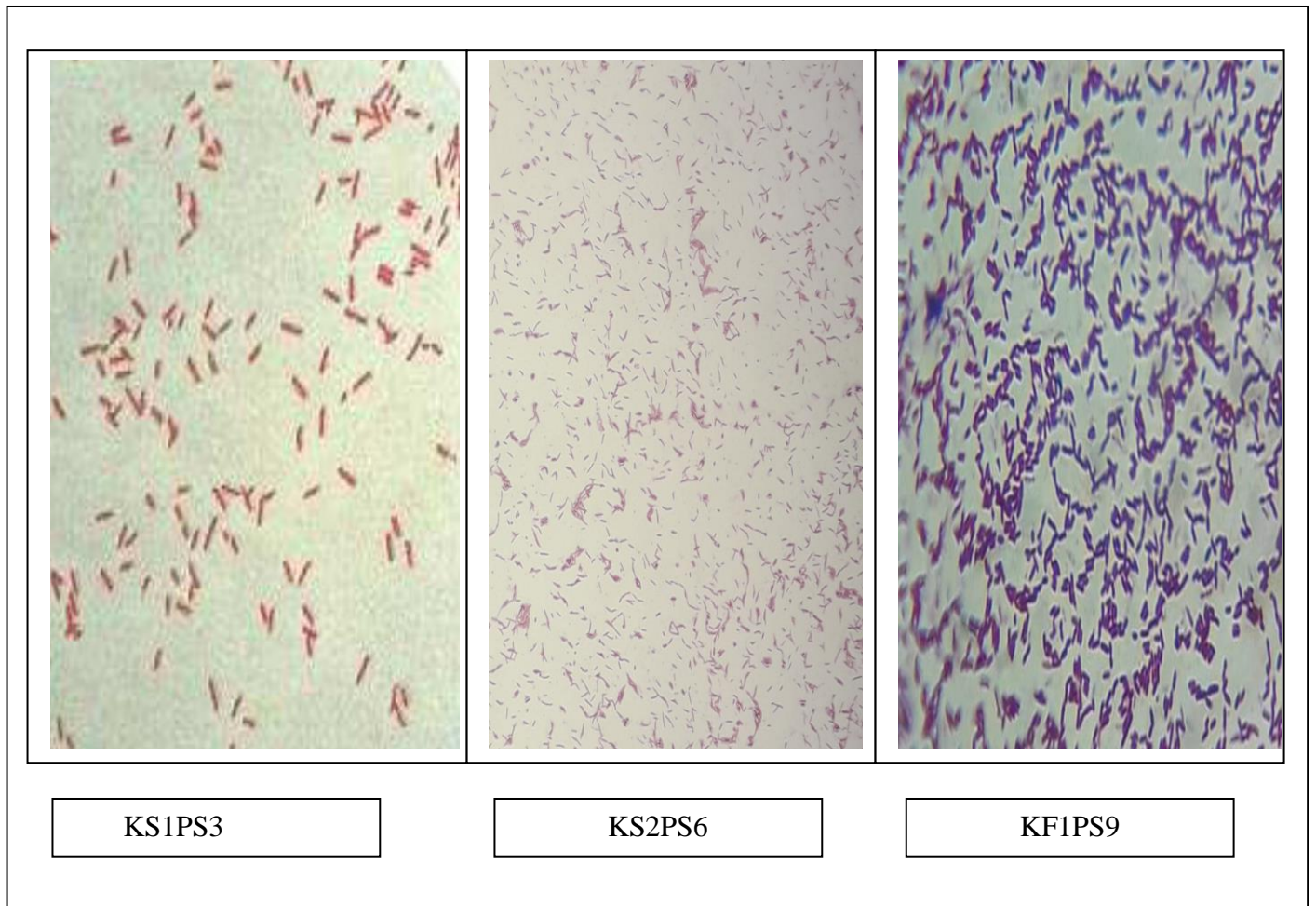


planche 16 :Examen microscopique des souches de *Pseudomonas*.

Tableau 25 : résultats de test catalase et l'aspect microscopique et macroscopique des isolats des Pseudomonas.

Souche	Origine	Aspect macroscopique	Observation microscopique: forme/regroupement	Coloration de Gram	Teste de catalase
PS1	KS ₁ 10 ⁻¹ King A	petites colonies, incolore de 0.5mm de diamètre	Bacille, Isolée, diplobacille et en chaine	-	+
PS2	KS ₁ 10 ⁻² King A	petites colonies, incolore de 1 mm de diamètre	Bacille, Isolée, en amas,	-	+
PS3	KS ₁ 10 ⁻⁴ King A	petites colonies, incolore de 1 mm de diamètre	Bacille, Isolée, en amas,	-	+
PS4	KS ₂ 10 ⁻¹ Gélose cétrimide	petites colonies, jaunâtre de 0.5mm de diamètre	Bacille, Isolée, en amas,	-	+
PS5	KS ₂ 10 ⁻² Gélose cétrimide	petites colonies, jaunâtre de 0.5mm de diamètre	Bacille, Isolée, en amas,	-	+
PS6	KS ₂ 10 ⁻⁴ King A	petites colonies, incolore de 0.5mm de diamètre	Bacille, Isolée, en amas,	-	+
PS7	KF ₁ 10 ⁻¹ Gélose cétrimide	petites colonies, jaunâtre de 0.5mm de diamètre	Bacille, Isolée, diplobacille et en chaine	-	+
PS8	KF ₁ 10 ⁻² Gélose cétrimide	petites colonies, de 0.5mm de diamètre jaunâtre	Bacille, Isolée, en amas et en chaine	-	+
PS9	KF ₁ 10 ⁻⁴ King A	Grande colonies, jaunâtre de 2mm de diamètre	Bacille, Isolée, en amas et en chaine	-	+
PS10	KF ₂ 10 ⁻¹ King A	Grande colonies, jaunâtre 3mm de diamètre	Bacille, Isolée, en amas et en chaine	-	+

IV.3. Teste de pigmentation

IV.3.1. production de pyocyanine

On observe des colonies blanches apparaît sur milieu King A, et l'absence de Pigmentation bleu foncé ou vert à bleu dans le tube il traduire l'absence de production de pyocyanine. Et aussi indique l'absence de *Pseudomonas aeruginosa*. (Figure 30) .

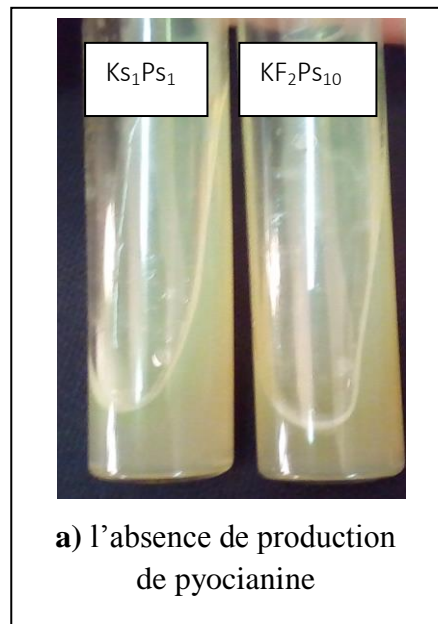


Figure 30 : Résultat de production de pyocyanine sur milieu King A

IV.3.2. Production de pyoverdine

On observe la présence de pigmentation jaune vert fluorescent sur le milieu King B dans les tubes PS7 , PS8 ,PS9 .la présence de cette pigmentation est indique la production de pyoverdine et la présence de *Pseudomonas fluorescents* dans les tubes présentant les codes des souches suivantes ; PS7 , PS8 et PS9.

Aussi, on observe l'apparition des colonies blanches, et l'absence de pigmentation jaune vert sur le milieu King B dans les tubes des souches présetant les codes suivant ; PS1,PS2,PS3,PS4,PS5,PS6et PS10 , l'absence de pigmentation se traduit par la non production de pyocyanine.(Figure 31)



Figure 31: Résultat de production de pyoverdine sur milieu King B

IV.4. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme des 10 isolats des *Pseudomonas* sont reportés sur le **tableau 26**, **Figure 32**, **planche 17**.

Tableau 26 : Résultat de l'antibiogramme des souches des *Pseudomonas* .

ATB souche	AMP	AUG	K	OFX	PI	C	TE
PS1	R	S	S	S	ND	S	I
PS2	R	R	S	R	ND	R	R
PS3	R	R	S	S	ND	S	I
PS4	R	R	S	S	ND	S	I
PS5	R	R	S	R	ND	S	I
PS6	R	R	S	S	ND	S	S
PS7	R	R	S	S	ND	S	S
PS8	R	S	S	S	ND	S	S
PS9	R	R	S	S	ND	S	S
PS10	R	R	S	S	ND	S	S
PS11	R	S	S	S	ND	S	I

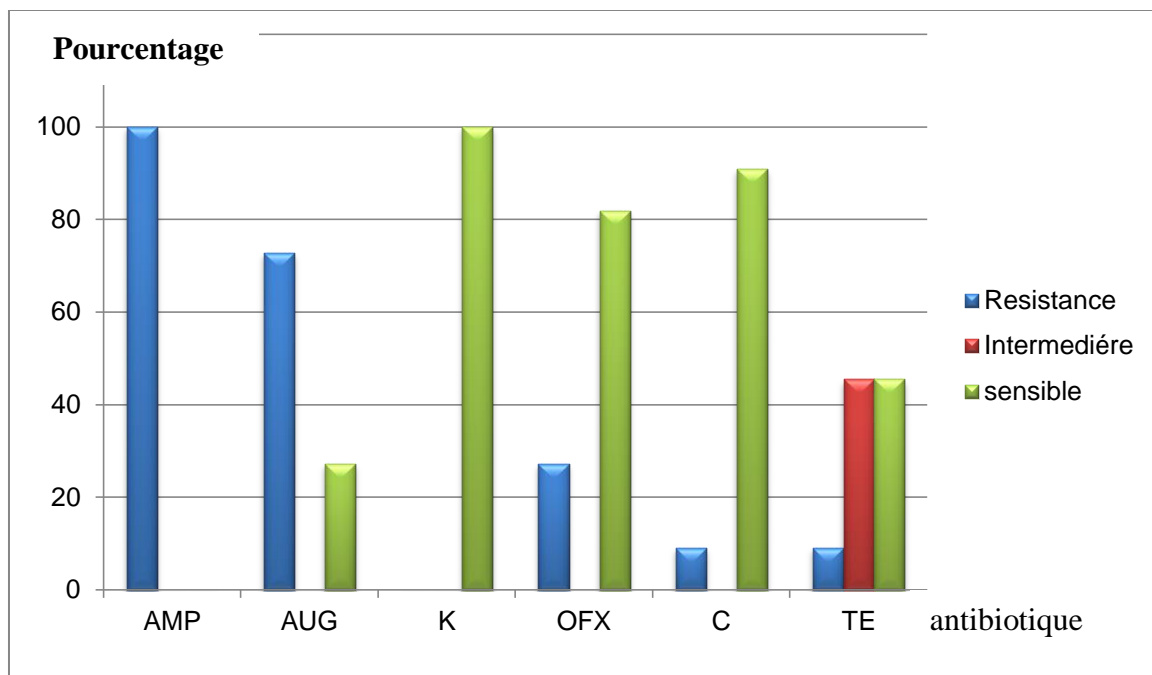


Figure 32 : Représentation graphique des profils des souches des *Pseudomonas* vis-à-vis des antibiotiques utilisés.

On note 100% des souches sont résistantes à l' Ampicilline, 72,72% sont résistantes à la Amoxicilline-acide clavulanique, et 27,27% des souches sont résistantes à l' Ofloxacin et 9,09% sont résistantes à le Chloramphénicol et la Tétracyclines.

Encore 45 ,45% es souches présentent un profil intermédiaire pour la Tétracyclines.

Par ailleurs 100% des souches sont sensibles pour Ofloxacin ,alors que 90% des souches sont sensibles pour Chloramphénicol ,et 81,81% des souches sont sensibles à la Kanamycine ,aussi 63,63% des souches sont sensibles à la Erythromycine, et 36,36% des souches sont sensibles à la Acide pipémidique.

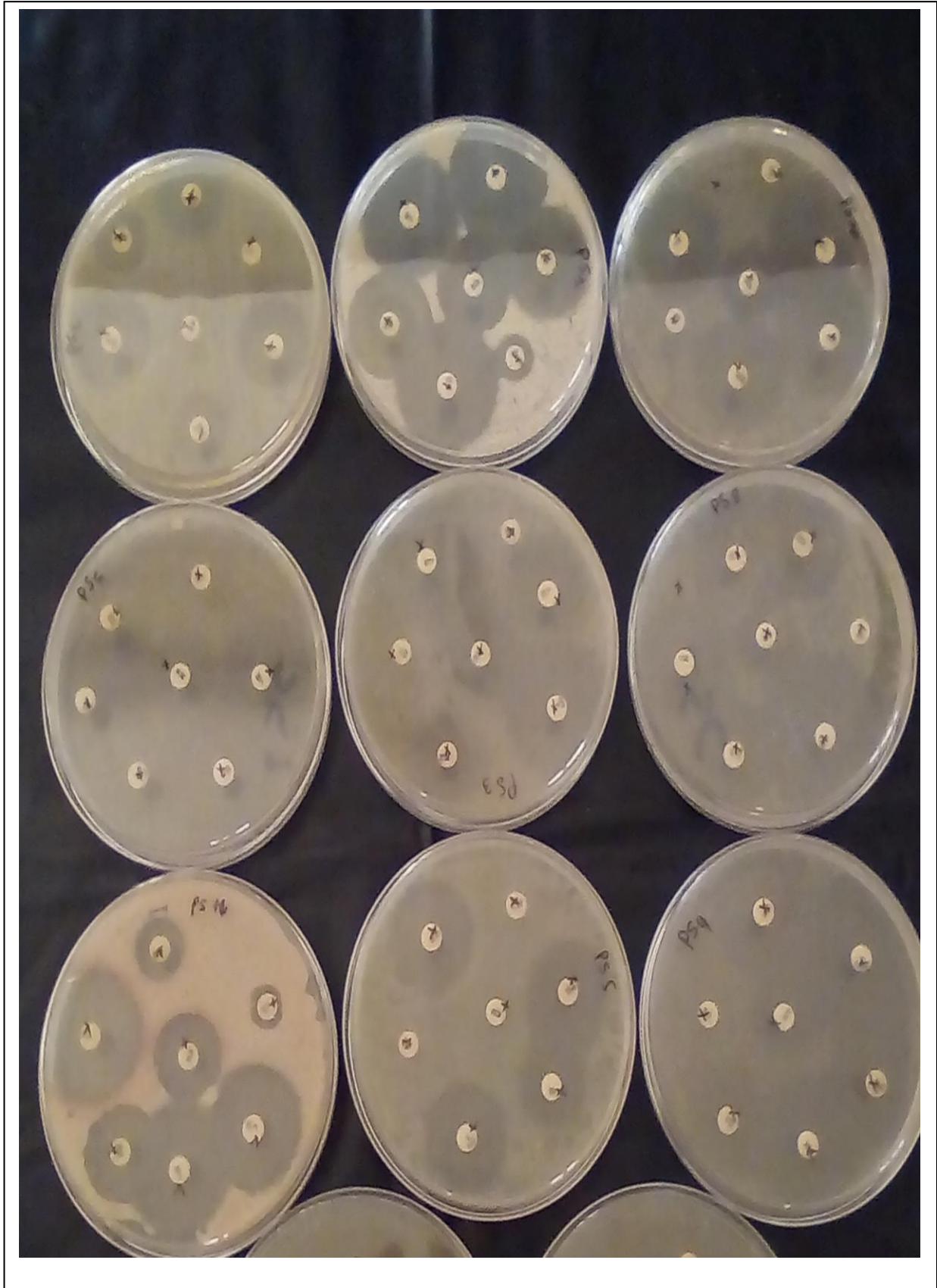


Planche 17: Photos représente des profils d'antibiogramme différents (Résistance et Sensibilité) .

V. Isolement et identification des levures et moisissures

L'isolement de la flore fongique (levures et moisissures) à été effectué sur le milieu gélosé (milieu Sabouraud) après incubation de 03 à 05 jours à 30°C. On remarque la présence totale de levure dans tous les échantillons qui à été analysée par contre on note la présence des moisissures seulement dans la première échantillon KS1. **(Planche18)** Les levures sont des micro-organismes largement utilisés aux procédés de production de produits laitiers notamment les fromages et pour la production de certains laits fermentés (*Candida kéfir*, *Torulopsis kéfir*) **(Leksir, 2012)**.

Les moisissures sont utilisées également pour la production d'une large gamme de fromages (fromages à pâtes molles à croûte fleurie, fromages à pâtes molles à croûte lavée, à pâtes persillées, fromages à pâtes pressées). Les espèces les plus couramment utilisés sont *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti* **(Leksir, 2012)**.

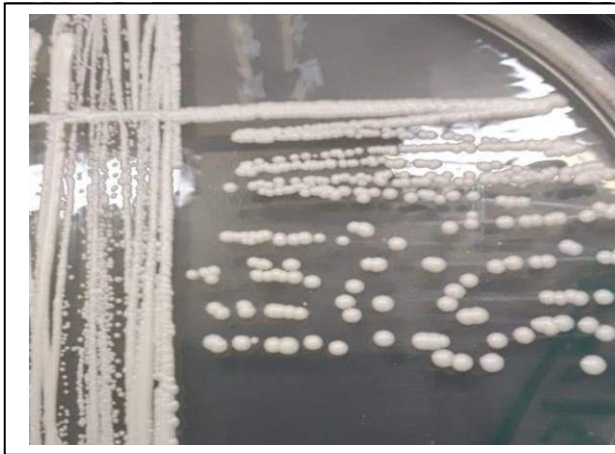
Elles se développent en surface, ou dans les parties internes aérées. Elles sont productrices de lipases et de protéases, dont on rencontre le *Penicillium* et le *Geotrichum*

Les levures ne posent aucun problème d'aspect sanitaire dans l'alimentation, à l'exception de *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*; mais peuvent produire, par leurs développement dans les produits finis des altérations marchande par formation de trouble, d'odeurs ou de goût annexes anormaux et par la formation du CO₂. Par contre pour les moisissures en retrouve des agents pathogènes qui sont pour la plupart toxigènes; c'est à dire qu'elles produisent une toxine dans le produit alimentaire, c'est pour cette raison qu'il faut jeter tout aliment moisisse car la toxine diffusée dans l'aliment sera source de danger pour la santé **(Saoudi, 2012)**.

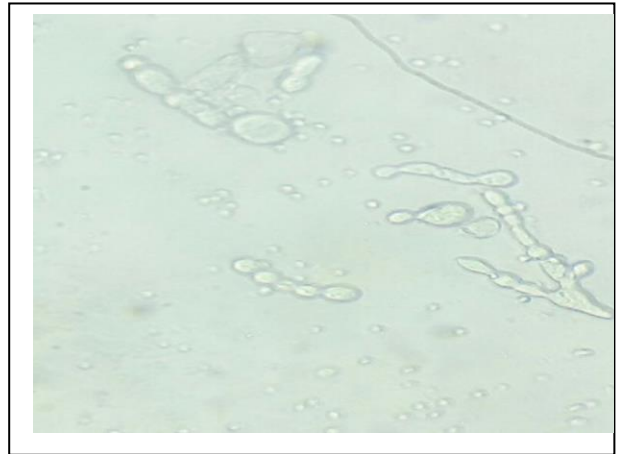
Observation macroscopique des colonies

Observation microscopique des colonies

Objectif 40



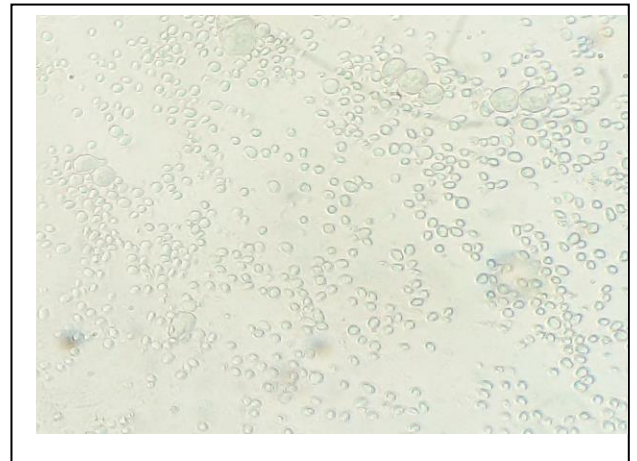
a) Colonie forme rond, couleur blanc, le contour régulier.



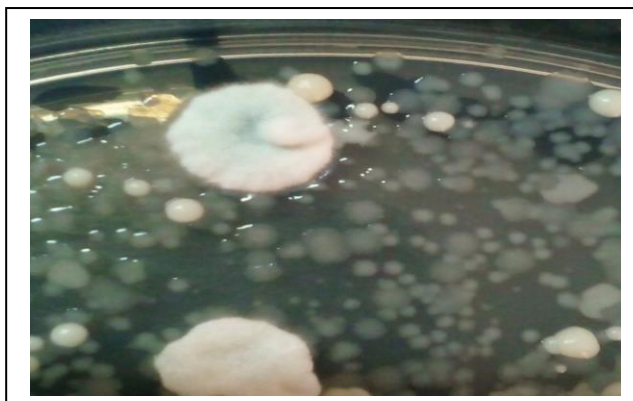
a) Présence de forme pseudomycélium (chaîne ramifiées), forme ovoïde



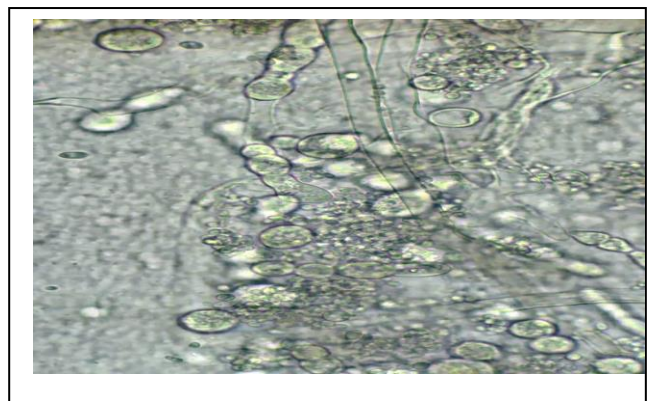
b) Colonie pigmentée, forme rond, couleur orangé, le contour régulier.



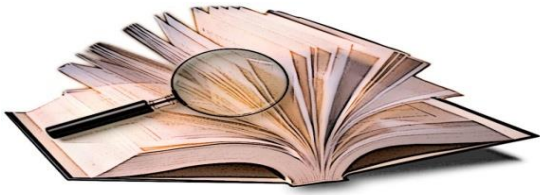
b) Présence de forme ovoïde, isolé.



C) d'observation des colonies aériennes, La couleur est blanche à centre vert



C) d'observation des fragments de filaments non septés.



Conclusion

Conclusion générale et perspectives

Pour prolonger la durée de conservation du lait il est transformé à un autres produits fermentées comme le produit laitier traditionnelle el klila

Notre travail est réalisé dans la période de Février – mai de l'année 2019 avait pour objectif d'étudier la recherche de la microflore d'el klila, fabriqué au niveau des laiteries traditionnelles de différents régions de la willaya de Tébessa. Dans cette étude plusieurs souches d'entérobactéries, des staphylocoques, des *Pseudomonas* et des bactéries lactiques ont été identifiées au laboratoire de microbiologie sur la base des tests d'identifications morphologiques, physiologiques et biochimiques. Les résultats révèlent une certaines diversités.

Pour les espèces d'entérobactéries identifiées. Les espèces les plus prédominantes *Enterobacter cloacae* suivie de *Hafinia alvei* plus la présence des souches des *Pseudomonas* pour les Staphylocoques les espèces plus prédominantes *Staphylococcus aureus*, et *Staphylococcus* à coagulase négative, Pour les bactéries lactiques les espèces prédominantes ce sont les *Lactobacilles* et les *Leuconostoc* et la présence aussi des levures et moisissures.

Dans notre étude nous avons essayée aussi de déterminer le profil de la sensibilité et la résistance de nos souches collectées et identifiées vis-à-vis des différents antibiotiques par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé, selon les normes du CA-SFM. Les résultats obtenus nous ont permit de constater que :

- pour certains antibiotiques, la majorité des souches bactériennes testées est soit entièrement résistante, soit entièrement sensible
- il a été également observé que des souches appartenant à des genres et des espèces différentes, présentent des profils semblables ou distincts dans le même échantillon ou dans des échantillons différents.

Notre étude s'est ensuite développée autour de ces souches isolées, en examinant certains caractéristiques d'intérêt technologique afin d'évaluer leurs potentiels pour un éventuel usage industriel. La méthode utilisée est celle de la diffusion du surnageant de culture à partir des disques, on a réalisé des interactions entre les souches isolées et d'autres

souches indicatrices pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus mannitol*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*).

Les travaux réalisés sur l'antagonisme bactérien, sur les isolats sélectionnés, ont montré des inhibitions à différents niveaux vis-à-vis des souches indicatrices testées. La caractérisation de l'agent inhibiteur a permis de déterminer que l'activité antibactérienne des souches est due à la présence des substances antibactériennes (peroxyde d'hydrogène, acides organiques ou d'autres substances protéiques comme la bactériocine).

Enfin, que ce soit "el klila" et d'autres produits, leur contamination peut être engendrée par les microorganismes nuisibles à différents stades de fabrication. Mais, malgré les mauvaises conditions d'hygiène du fromage artisanal "el Klila" traduit par un niveau élevé de contamination par les flores contaminantes et les germes de détérioration, ce produit reste exempt de germes à potentiel pathogène redoutable, el Klila peut se classer parmi les produits à risque moyen pour la consommation. Pourtant, il reste néanmoins inévitable de donner l'importance à l'établissement des normes et la réalisation d'un guide de bonnes pratiques d'hygiène pour la fabrication de tels produits, comme les beurres, les ferments et les fromages.

En perspective nous envisageons de poursuivre ce travail sur

- Mener une étude prospective sur une large gamme d'échantillons.
- Etude de cinétique de nos souches pour qu'elles puissent être utilisées en industrie-alimentaire.
- Identification génétique pour compléter l'identification biochimique et physiologique.

Référence bibliographiques

- 1) **ABDELAZIZ, S. & AIT KACI, F.(1992).** Contribution à l'étude physico-chimique et microbiologique d'un fromage traditionnel algérien fabriqué à partir du lait de chèvre le "*Djben*". Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie. Institut national agronomique d'El Harrach,Alger. P. 67.
- 2) **AISSAOUI ZITOUN, O. (2004).** « Fabrication et caractéristiques d'un fromage traditionnel algérien *bouhezza* ». Thèse en de Doctorat INATAA, Constantine, Algérie. P.138.
- 3) **AISSAOUI ZITOUN O., ZIDOUNE M.N. (2006) .** Le fromage traditionnel algérien"*bouhezza*". Séminaire d'Animation Régional. ' Technologies douces et procédés de séparation au service de la qualité et de l'innocuité des aliments ',INSAT – Tunis (communication orale), Tunisie / 27 – 28 – 29 novembre Actes des sommaires. Pp. 118 - 124.
- 3) **Alais, C., Linden, G.&Miclo, L. (2008).** Biochimie alimentaire, Dunod 6ème édition. Paris. Pp.86-88.
- 4) **Ibano, H., Oliveira, M., Aroso, R., Cubero, N., Hogg, T., &Teixeira, P. (2007).**Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from 'Alheiras' (traditional portuguese fermented sausages) In situ assays. Meat. Sci. **76**: 796-800.
- 5) **Aouati, H. (2009).** Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* resistances à la méthécillines: Mémoire de Master : Etude de leur sensibilite aux autres familles d'antibiotiques. Département De Biochimie et De Microbiologie, Algerie. P. 69.
- 6) **Avril, J.L & al. (2000).** Bactériologie clinique. 2ed .Ellipses, Paris. Pp. 171-177.
- 7) **Badis, A., N. Laouabdia- Sellami, D. Guetarni, M. Kihal&Ouzrout, R. (2005).** Caractérisation phenotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de Deux populations caprineslocalesArrabia et Kabyle. SciTechnol**23**: 30 -37.
- 8) **Bagley, S.T., Seidler, R.J., Talbot, H.W.J., &Morrow, J.E., (1978).** Isolation of *Klebsiella*from within living wood. Appl Environ Microbiol. **36**: 178-185.
- 9) **Barker, T.W., Worgan, J.T.(1981).** The application of air. Lift fermenters to the cultivation of filament oufungi. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol**13** :77 -148.
- 10) **BATTAH, A & BOUHAMDANI, K. 2017.** Isolement et essais d'identification de quelques bactérieslactiques à partir d'un fromage artisanal. Mémoire de

master : Microbiologie Alimentaire et Santé. Bejaia, Université A. MIRA – Bejaia. P. 20.

11) Battah, A. & Bouhamdani, K. (2017) .Isolement et essais d'identification de quelques bactéries lactiques à partir d'un fromage artisanal. Mémoire de Magistère : Microbiologie alimentaire et santé Bejaia Bejaia. Université A MIRA Bejaia. P . 20.

12) Bekhouche, F. & Boulahrouf, A. (2005). Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d'élevage de Constantine. Sciences & Technologie **23** : 38-45.

13) Bekhouche, F. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : Isolement et Identification biochimique : Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de Doctorat .Université de Mentouri. Constantine. P.119.

14) Belarbi, F.(2011).Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériens, Mémoire de Magistère :Microbiologie alimentaire et industrielle, Oran, université d'Oran, P .69.

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

16) Bendimerad, N.,(2013). Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type «Jben».Thèse de Doctorat, Université de Tlemcen. Algérie. P. 05.

17) Benhadj , M. (2009) . Intérêt des bactéries lactiques dans la conservation de la viande. Mémoire du Magister. Université Badji Mokhtar Annaba. Pp. 134-135.

18) Benkerroum, N. & Tamime, A.Y. (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (*Lben, Jben* and *Smen*) to small industrial scale. *Food Microbiol.* 21(4), 399-413.

19) Benkheniche, A. et Kaya, A. (2013). Fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnel algérien « Mechouna » et un autre fromage au Lben. *Mémoire d'Ingénieur d'état en Nutrition, Alimentation et Technologies Agro-alimentaires*. Aissaoui Zitoun, O., Université de Constantine1. Algérie. P 48.

- 20) Bjorkroth, J., Holzapfel, W.H. (2006).** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissellain* : The Prokaryotes. Vol 4. Springer, Pp. 267-319.
- 21) Bocquier, S. (2011).** *Documentation technique: etude de la sensibilite aux antimicrobiens*. Grenoble: lycee des metiers du tertiaire, de la sante et du social, louise michel.
- 22) Boiron, P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. p:13-19-69-79.
- 23) Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P.H., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier J.J., Vayssier, Y., Veau, P. (1990) .** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. P.34-428.
- 24) Bourgeois, C.M., Mescle, J.F., Zucca, J. (1989) .** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P. 216-244.
- 25) Bourgeois, C. M., Mescle, J.F. & Zucca, J. (1996).** Microbiologie alimentaire ; Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments , Edition. Tec & Doc. P. 672.
- 26) Bourgeois, C.M ., Larpent, I.P. (1996).** Microbiologie alimentaire Tome 2 : Aliments fermentés et fermentations alimentaires - 2ème Edition. Tec & Doc, P. 523.
- 27) Bousnane, M. & Djadi, O. (2009).** Caractérisation d'un fromage traditionnel algérien « *Takammarite* » de la région de Ghardaïa. Mémoire d'Ingénieur. Aissaoui Zitoun O. Université Mentouri-Constantine. Algérie. P. 48.
- 28) Carbonnelle B. ; Denis F. ; Marmonier A. ; Pinon G. et Vargues R. (1987).**
- CA-SFM. (2010) .** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. P.144.
- 29) CA-SFM. (2018).** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
- 30) Chaala, W. (2013).** Occurrence et profil d'antibioresistance des *Staphylococcus aureus* isolée de produits alimentaires. Université d'Es-senia Oran, Algerie. P. 115.

- 31) **Chatelin, Y.M., Richard, J. (1981).** Sources of bacterial contaminations of raw-milk in the farm. *Lait* **61** : 80-94.
- 32) **Cheftel et Cheftel. (1996).** Introduction à la biochimie, à la technologie des aliments. Vol 1. Edition : Lavoisier, Paris. Pp . 43.
- 33) **Cheriguene, A., Chougrani, F., Bekada, A.M.A., El Soda, M. & Bensoltane, A. (2007).** Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goat's milk. In *African Journal of Biotechnology* Vol. **6** (15), Pp. 1854-1861.
- 34) **Claps, S., Morone, G. . 2011.** Produits laitiers et fromagers traditionnels de l'Algérie. In *Développement de la Filière laitière et Fromagère en Algérie, CorFilac*: 57-77.
- 35) **Cniel . (2006).** Produit laitier. Maison de lait.
- 36) **Cristian, C. (2008).** Microbiologie Hygiène Base microbiologiques de la diététique. Edition. TEC & DOC Lavoisier, Paris. P.76 -86, 257.
- 37) **Davet, P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P. 52-57.
- 38) **Davet, R. (1997).** La Communauté Fongique : Son organisation et rôle dans l'écosystème. Marcel Dekker, Inc., New York.
- 39) **Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales .
- 40) **Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Paris: Lavoisier.
- 41) **Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C. & Janssens, D. (1994)** .Caractéristiques générale des bactéries lactiques in « Bactérielactique », de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris. Pp. 85-87.
- 42) **Derby. (2001).** Lait, nutrition et santé, Edition : Tec et Doc, Lavoisier, Paris. p 556.
- 43) **Desmaures, N. Radiguet, S. Lejeune, J. Gueguen, M. (1995).** Effect of ripening on the microbiological profile of high-quality raw-milk for cheese-making. *Milchwissenschaft- MilkScience International* **50** : 193-195.

- 44) Dharam, P., Narender, R. P. (2007)** . Indian traditional dairy products: an overview. International Conference on Traditional Dairy Foods. November 14-17. NDRI, KARNAL (INDIA).
- 45) Dillon, J.C. (2008).** Place du lait dans l'alimentation humaine en région chaude. Edition A. P.G (Agro Paris Tech).
- 46) Dortu, C. &Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **13** :143-154.
- 47)Drame, B. (2001).** Micro méthode d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : Intérêts thérapeutiques. Thèse Pharm. Dakar. N° 86.
- 48) El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El-Mecherfi, K.E., Bazukyan, I., Choiset, I., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y. G., Kuliev, A. A., Mozzi, F., Chobert, J. M. &Haertlé, T. (2011).** Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. Trends in Food Sci. Technol. **22**: 509-516.
- 49) Eric, D. (2011)** : Les critères microbiologiques des denrées alimentaires. Edition Tec et doc. Lavoisier, p. 266.
- 50) Eeby , J.P. (2013),** abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'école nationale vétérinaire detoulouse .
- 51) Frazier, W.C. (1967).** Food microbiology. Academic presse. London. P. 3-429.
- 52) Gelman, A. Drabkin, V. &Glatman L. 2000.** Evaluation of lactic acid bacteria, isolated from lightly preserved fish products starter cultures for new fish based food products. Emerg. Technolgy, vol. **1**, p. 219-622.
- 53) Giraud, J.(1998).** Microbiologie alimentaire . Edition Donod, Paris. P. 330 .
- 54) Gueye, O. (2007).**Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif. Thèse de pharm. N ° 36.
- 55) Guiraud, J.P. 2003.** Microbiologie alimentaire. Technique et ingénierie, Paris : Dunod, série Agro-alimentaire, p. 387-433.
- 56) Guiraud , J.P. &Rosec, J.P .(2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. P. 237-251

- 57) Guiraud, J.P., Rosec, J.P. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. Saint-Denis la plaine, Paris, P. 300.
- 58) Guiraud, R. (1998) .** Microbiologie alimentaire . Edition. Dunod. P.652.
- 59) Hadeif S. 2012.** Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locale. Mémoire de magister. Université KasdiMerbah Ouargla. Pp 87.
- 60) Hariri, A. Ouis, N. Sahnouni, F. &Bouhadi, D. (2009).** Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieu a base des extraits de caroube. Rev.Microbiol. Ind. San et Environn, P. 37-55.
- 61) Hassaine O. 2013.** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien. Thèse de doctorat en biotechnologie : l'université d'Oran-Essenia, P. 57-102.
- 62) Joyeaux, A. (1982).** Les préparations industrielles d'enzymes. In : Durant G., Monsan. (ed.), Les enzymes production et utilisations industrielles. Edition Gautier-Villars.Paris. P. 22-46.
- 63) Joseph-Pierre Guiraud (2003).**Microbiologiealimentaire :1 édition. Paris .Dunod .p136,137, ISBN 2100072595.
- 64) Kacem, M. et Karam, N. (2006) .**Physicochemical and microbiological study of«Shmen», alactiques isolées de lait camelin du sud algérien. Thèse de doctorat en biotechnologie : l'université d'Oran-Essenia, Pp.57-102.
- 65) Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A &Zinedine, A.(2006).**Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco.Microbiol.Res. **10** : 10-16. bacteria and yeast.
- 66) Koussou, M., Duteurtre,G., &Mopota, L.(2007).** Consommation de l'ans les bars laitiers de la ville de N'Djamena au Tchad. Elev Med. Vet. Pays Trop. 60: 39-4ait d4.
- 67) LeMinor L. et Veron M. (1989).** Bactériologie médicale. 2e édition. Edition Flammarion Médecine-Sciences. Paris. P .312.
- 68) Lahsaoui, S. (2009).** Etude de procédé de fabrication d'un fromage traditionnel (klila). Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention de diplôme d'Ingénieur Université El Hadj Lakhdar Batna, Département d'Agronomie.

- 69) Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S. & Wright, A.V. (2012).** Lactic Acid Bacteria .
- 70) Lampel, K. A &Maurelli, A.T. (2003).** *Shigella* species. Ch 11 In: Miliotis MD, Bier JW(eds) International handbook of foodborne pathogens. Marcel Dekker, New York, P. 167–180.
- 71) Larpent, J.P. (1997)** .Mémento technique de microbiologie .3eme Edition . Technique et Documentation Lavoisier. Paris. P. 910.
- 72) Larpent, L . P. (1991)** Les ferments microbiens dans les industries agro-alimentaires (produits laitiers et carnés) Ed. APRIA, P. 242.
- 73) Leblonc.** Thèse: Pharmacie: Nancy 1 : (1988) . Etude des levures de vinification et des facteurs agissant sur la fermentation alcoolique .P.235.
- 73) Leksir, Ch. 2012.** Caractérisation et contrôle de la qualité de ferments lactiques utilisés dans l'industrie laitière Algérienne. Mémoire de magistère. Université Mentouri de Constantine.
- 74) Lemouchi, L. (2007).** Le fromage traditionnel *Bouhezza*: enquête dans la wilaya de Tébessa et suivi de l'évolution des caractéristiques physicochimiques de deux fabrications. Mémoire d'ingénieur en Nutrition et Technologies Agro-Alimentaires. Aissaoui Zitoun, O. Université de Constantine 1. Algérie. P11.
- 75) Leriche, F & Fayolle, K . 2004.** Maitrise du risque d'altération des fromages de saint-nectaire par les *peudomonas* .Pôle fromages AOC Massif Central,Aurillac, P. 80 .
- 76) Leroy. (1965).** Le producteur du lait «guide du contrôle laitier et beurrier agrude»
- 77) Leveau, I., Bouix, M (1993)** . Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel Ed. Tec & Doc Lavoisier, P. 612.
- 78) Leveau, S. B. &Bouix, M. (1993).** Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P. 216-244.
- 79) Levine, M.M., Kotloff, K.L., Barry, E.M., Pasetti, M.F. &Sztein, M.B., (2007).** Clinical trials of *Shigella* vaccines: Two steps forward and one step back on a long, hard road. Nature Reviews Microbiology. 5:540–553.

- 80) Leyral, G et Vierling, E. (2001).** Microbiologie et toxicologie des aliments. 3^{ème} édition. Collection biosciences et techniques .Paris, Pp. 77-134.
- 81) Lucke, F.K. & Schillinger, U., 1987.** Identification of lactobacilli from meat and meat products. The British Library, P. 200.
- 82) Luquet, F. M. (1985).** Laits et produits laitiers - Vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits De la De la mamelle à la laiterie. Tec et Doc., Coll. STAA, Lavoisier, Paris. P. 334.
- 83) Luquet, F.M. & Corrieu, G.(2005)** .Bactéries lactique et probiotique .Edition Lavoisier, Paris . P.307.
- 84) Madigan, M. & Martinko, J. (2007).** Biologie des micro-organismes. 11^{ème} Edition. PEARSON Education, France. P.354-355.
- 85) Mahamedi, A. E. (2015).** Etude des qualités: hygiénique, physicochimique et microbiologique des ferments et des beurres traditionnels destinés à la consommation dans différentes régions d'Algérie. Mémoire de Magister en Biologie. Benlahcen K. Université d'Oran. Algérie. P. 111.
- 86) Marchal, N., Bourdon, J.L. & Richard, C.L. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3^{ème} Edition. , Doin éditeurs, Paris. P. 482.
- 87) Marchal, N., Bourdon, J.L. & Richard, CL. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3^{ème} Edition. , Doin éditeurs, Paris. P. 226.
- 88) Mathieu, J. (1998).** Ecole nationale des industries du lait et des viandes de la Roche-Sur-Foron. Initiation à la physico-chimie du lait. Edition. Tec et Doc. Lavoisier, Paris. Pp . 12-210.
- 89) MEKENTICHI,(2003).** Qualité physicochimique et bactériologique d'un fromage traditionnel(*Bouhezza*).Thèse. Université de Batna, Algérie.
- 90) Mennane, Z. K., Khedid, A. Zinedine, M. Lagzouli, M. Ouhssine & Elyachioui, M. (2000).** Microbial Characteristics of Klila and Jben Traditionnal.

- 91) Mennane Z., Khedid K., Zinedine A., Lagzouli M., Ouhssine M., Elyachioui M. (2007).** Microbial Characteristics of *Klila* and *Jben* Traditionnal Moroccan Cheese from Raw Cow's Milk. World Journal of Dairy & Food Sciences. Pp 23-27.
- 92) Meziani, M. (2012).** Mémoire de Magistère, Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et Pseudomonas, Université Mentouri Constantine. P.3.
- 93) Monfred, Moll, N., (2002).** précis des risques alimentaire, 3eme ed. Tec et Doc, Lavoisier.Paris P. 131.
- .
- 94) Nauciel, C. (2000).** Bactériologie médicale: connaissance et pratique. Edition Masson. Paris. Pp. 125-146.against challenge with *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*. Vaccine. **27**(39):5363-5370.
- 95) Nicklin, J., Graeme-Cook, K., Paget T. & Killington, R . (2000)** .L'essentiel en microbiologie. Edition Berti.P :210-216.
- 96) Nishio, N., Nagai, S. (1981)** .Single cellprotein production from mandarin orange peel. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol 1. P. 156-160.
- 97) Ouadghiri ,M .(2009),**biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « l'ben » et « j'ben » dorigine marocaine ,thèse de doctorat en Microbiologie et biologie moléculaire . universitemohammed v agdalfaculte des sciences rabat ,maroc .Pp .132.
- 98) Ouadghiri, M. (2009)** .Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « lben » et « jben » d'origine marocaine. thèse de doctorat. université mohammed v – agdal faculté des sciences rabat.
- 99) Paul, S. (2005).** Bactériologie.6 Edition. Dunod .Paris. P. 515.
- 100) Perriere, G. (1992)** .Application d'une présentation par objet des connaissances de modélisation certains aspects de l'expression des gènes chez *E. coli* UCBL. Thèse Université deLyon I. France. **14P.** 77.
- 101) Pilet, M.F., Magras, C. &Federigh, M. (2005).** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Edition., Economica. Paris. P. 219-240.

- 102) Punt, P. J., Van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J. & Van den Hondel, C. & RAMIREZ, C. (1982).** Manual and atlas of the *Penicillium*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- 103) Saoudi, Z. 2012.** Caractérisation microbiologique et de la protéolyse du fromage traditionnel algérien « *Bouhezza* » de ferme. Mémoire de magister. Université Mentouri. Constantine. Pp 49-52.
- 104) Scherr G.H. & Weaver R.H. (1953).** The dimorphism phenomenon in yeasts. *Bact Rev*, **17**: 51- 92.
- 105) SHAN-NA. L. HAN. Y. & ZHI-JIANG. Z. (2011).** Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, **44** :643–651.
- 106) Sirichokchatchawan, W., Tanasupawat, S., Niyomtham, W., Prapasarakul, N.(2017).** Identification and antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria from fecal samples of indigenous and commercial pigs . *Thai J Vet Med*. 47(3): 329-338.
- 107) Stils, M.E. &Holzapfl, W.H. (1997),** *Int.J.foodMicrobiol***36**: 1-29. Th. Méd. Vét., Dakar, 1997, n09, III p.
- 108) Sutra,L;FDERIGHI,M&JOUVE, J-L(1998)** MAnnuel de bacteriologies alimentaire
Edition polytechnica p.53,56,57,82,114,115,235,236,253 .
- 110) TAKAHIRO, M. NOBUHIKO. K. & TOSHINAO .G. (2007).** Milk consumption does not affect body mass index but may have an unfavorable effect on serum total cholesterol in Japanese adults. *Nutr. Res*, **27**: 395–399.
- 111) Touati, (1990) .** chimique d'un fromage artisanal algérien "la klila". Mémoire d'ingénieur, INATAA, Constantine, Algérie, P. 83.
- 112) Vimahieu .(2005) .** Composition du lait .Edition Université libre de Bruxelles.traditional butter made fromcamelmilk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lacticacidbacteria and yeast. *57 2P* . 198-204.
- 113) Walker, G. M. & White, N. A. (2005).** Introduction to Fungal Physiology. In «Kavanagh K., *Fungi: Biology and applications*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester» .P. 267.

114) Zarour, K. 2010. Contribution à l'étude microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées de différents écosystèmes. Mémoire de Magister. Université D'Oran Es-Senia.

Les sites webe :

www.aspergillus.man.ac.uk

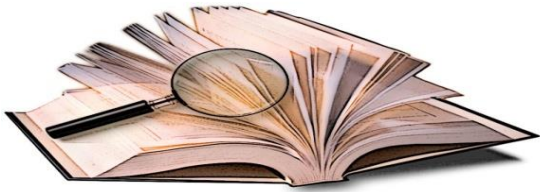
www.aspergillus.man.ac.uk.

www.sfm-microbiologie.org.

www.sfm-microbiologie.org

([http//fdanieau.free.fr /bts /Mycetes-Levures](http://fdanieau.free.fr/bts/Mycetes-Levures))

(www.aspergillus.man.ac.uk)



Annexe

Annexe01

Tableau 01: Caractéristiques physico-chimiques du lait de vache (Bouraoui, 2014).

Caractéristiques chimiques	Valeurs
PH	6,6-6,8
Densité	1,028-1,030
Acidité (°D)	14- 18
Température de congélation C	-0,53
Caractéristiques physiques (g / 100g)	
Teneur en eau	87,3
Extrait sec total	12,7
Taux de matière grasse	3,9
Extrait sec dégraissé	4,2
Teneur en matière azote	3,4
Teneur en caséine	2,8
Teneur en albumine	0,5
Teneur en lactose	4,9
Teneur en cendre	0,90

Tableau 02 : les principaux genres des bactéries lactiques (Matamoros, 2008).

Genre	Forme de la cellule	Type de fermentation	Espèce type
<i>Aerococcus</i>	Coques	Homofermentaire	<i>Ac. Viridans</i>
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaire	<i>Cb. Divergens</i>
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaire	<i>Ec. Faecalis</i>
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homo ou hétérofermentaire	<i>Lb. delbrueckii</i>
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaire	<i>Lc. Lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaire	<i>Ln. Mesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaire	<i>Oe. Oeni</i>
<i>Pediococcus</i>	Coques	Homofermentaire	<i>Pc. Damnosus</i>
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaire	<i>Sc. Salivarius</i>
<i>Tetragenococcus</i>	Coques	Homofermentaire	<i>Tc. Halophilus</i>
<i>Vagococcus</i>	Coques ovoïdes	Homofermentaire	<i>Vc. Fluvialis</i>
<i>Weissella</i>	Petits bacilles	Homofermentaire	<i>We. Viridescens</i>

Tableau 03: Classification d'entérobactéries courantes et rares.

	Genres	Espèces
Entérobactéries Courantes	<i>Escherichia</i> <i>Salmonella</i>	Six espèces: <i>Escherichia</i> <i>Salmonella bongori</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. subterranean...coli...</i>
	<i>Shigella</i>	Quatre espèces : <i>Shigelladysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. boydii</i> .
	<i>Citrobacter</i>	Douze espèces : <i>Citrobacterfreundii</i> , <i>C. youngae</i> , <i>C. braakii</i> , <i>C. koseri...</i>
	<i>Klebsiella</i>	Quatre espèces : <i>Klebsiellapneumoniae</i> , <i>K. pneumoniaesubsp. ozaenae</i>
	<i>Enterobacter</i>	Quatorze espèces : <i>Enterobacteraerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. sakazakii</i>
	<i>Hafnia</i> <i>Serratia</i>	Espèce unique <i>Hafniaalvei</i> Onze espèces : <i>Serratiamarcescenssubsp. marcescens</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>S. rubidaea...</i>
	<i>Proteus</i>	Six espèces : <i>Proteusvulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i>
	<i>Morganella</i>	Une espèce : <i>Morganellamorganiisubsp. Morganii</i>
	<i>Providencia</i>	... Cinq espèces : <i>Providenciaalcalifaciens</i> , <i>P. stuartii</i> <i>P. rettgeri...</i>
	<i>Yersinia</i>	Onze espèces : <i>Yersinia pestis</i> , <i>Y. enterocoliticasubsp. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i>
Entérobactéries rare ou récemment décrites	<i>Erwinia</i>	Onze espèces
	<i>Cedecea</i>	
	<i>Ewingella</i>	
	<i>Pantoea</i>	
	<i>Rahnella</i>	
	<i>Budvicia</i>	
	<i>Buttiauxella</i>	
	<i>Kluyvera</i>	
	<i>Leclercia</i>	
	<i>Moellerella</i>	
	<i>Trabulsiella</i>	
	<i>Yokenella</i>	
	<i>Edwardsiella</i>	
	<i>Leminorella</i>	
	<i>Obesumbacterium</i>	
<i>Pragia</i>		
<i>Photorhabdus</i>		
<i>Tatumella</i>		

Annexe 2

Composition des milieux de culture utilisés.(Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée) .

1. Eau péptonée salée

Peptone	1g
NaCl	8,5g
Eau distillée	1000 ml

2. Eau physiologique

Chlorure de sodium	8,5 g
Peptone	0,5 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7	
Autoclavage : 120° C pendant 20 minute	

3. Bouillon nutritif

Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillé q.s.p	1000ml
pH=7.4	
Autoclavage : 120°C pendant 20 min.	

4.M-17

Extrait de levure	2, 5g
Extrait de viande	05g
Peptone de caséine	2,5g
Peptone de viande	2,5g
Peptone de soja	05g
Acide ascorbique	0,5g
glycérophosphate de sodium	19g
Agar	12,75g
Sulfate de magnésium	0.25g
Eau distillée.....	1000 ml
pH=7.1 à 0.2 à 37°C	
Autoclavage : 121°C pendant 15min.	

5.Milieu MRS au vert bromocrésol : pH = 6.4 ± 0.2 à 25°C.

Peptone spécial	10.00
Extrait de levure	5.00
Glucose.....	20.00
Citrate Tri ammonium	2.00
Acétate de Sodium	5.00
Sulfate de Magnésium	0.2
Sulfate de Manganèse	0.05
Phosphate Di-Potassique	2.00
Tween 80	1.00
Vert Bromocrésol	0.025
Agar	20.00

6. Milieu MRS (Man, Rogosa, Shrpe) liquide

Peptone spécial	10.00
Extrait de viande	10.00
Extrait de levure	5.00
Citrate Tri ammonium	2.00
Acétate de Sodium	5.00
Sulfate de Magnésium	0.2
Sulfate de Manganèse	0.05
Phosphate Di-Potassique	2.00
Tween 80	1.00
pH = 6.4 ± 0.2 à 25°C	

7. Milieu de Chapman

La formule théorique de ce milieu de culture en g/L d'eau purifiée est

Extrait de viande (bovin ou porcin).....	1g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g

pH=7,6

111g par litre d'eau distillée.

stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C.

8. Milieu Sabouraud

Peptone.....	10,0 g
Glucose massé	20,0 g
Eau distillée.....	01,0 L
Agar.....	15,0 g
Vitamine et facteur de croissance	
pH=6,0	

9. Milieux King A

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée

Péptone.....	20,00 g
Sulfate de potassium.....	10,00 g
Chlorure de magnésium.....	1,40 g
Agar	15,00 g
pH final à 25°C : 7,2 ± 0,2	

10. Milieux King B

Peptone	20,0 g
Glycérol.....	10,0 mL
Phosphate dipotassique	1,5 g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	1,5 g
Agar agar bactériologique.....	15,0 g
pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2.	

11. Gélose Citrimide

péptones.....	20 g
Sulfate de potassium.....	10 g
Chlorure de magnésium.....	3 g
Phosphate dipotassique.....	0,3g
Cétrimide.....	0,2g
Acide nalidixique.....	0,015 g
Glycérol.....	10mL
Agar.....	13 g
pH = 7,1	

12. Milieu Mac Conkey

Peptone	20g
Lactose	10 g
Sels biliaires	1.5 g
Cristal violet	0.01g
Rouge neutre	0.05
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
Ph = 7.1, Autoclavage 120°C, 20 min	

13. Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton)

Infusion de viande de bœuf	3000 cm ³
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs.....	1,5 g
Agar-agar	17 g
pH=7.4	
Autoclavage 120°C, 20 min	

Glycérol**Pour 100 ml**

Glycérol	80 ml
Eau distillé.....	20ml
Autoclavage 120° C, 20min	

Annexe 03

Colorants de Gram

- **Violet de gentiane au cristal**

Violet de gentiane	10g (ou 5g)
Phénol	20g
Ethanol à 0.95	100 cm ³
Eau distillée	01 dm ³
.	

- **Lugol**

Iode	05g
Iodure de potassium	10g
Eau distillée	01g
Flacon brun	

- **Alcool (éthanol)**

- **Fuchsine de Ziehl**

Fuchsine basique	10g
Phénol	50g
Ethanol à 0.5.....	10cm ³
Eau distillée	1dm ³

Coloration de Gram

C'est un critère important dans la classification qui permet de distinguer entre les bactéries Gram⁺ et les bactéries Gram⁻.

Les étapes de coloration de Gram

- 1- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
- 3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 9- Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Les cellules Gram⁺ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram⁻ qui apparaissent distinctement rosâtres.

L'état frais

C'est l'observation directe entre lame et lamelle d'une suspension bactériennes à l'objectif ($\times 40$). Elle permet de donner une idée sur la mobilité et la forme du micro-organisme.

Annexes 04

Matérielles utilisée

1.Appareillage

- Microscope optique
- Réfrigérateur
- Etuve
- Autoclave
- Bec benzène
- pH mètre
- Balance de précision
- Plaque chauffante
- Etuve bactériologique
- Vortex
- Loupe binoculaire)
- Plaque chauffante agitante

2.Petit matériel

Boites pétri en plastique, tube à essais, pipettes pasteur, éprouvettes, bécher, pipettes graduées, lames et lamelles, flacon en verre de 250 ml, les disques antibiotiques entonnoir.

3.Produits chimiques et réactifs :

Bleu de méthylène , violet de gentiane, liquide de lugol, alcool, solution de Fuchsine de Ziehl, l'eau distillée stérile, l'eau oxygénée 10 volume, HCl, huile d'immersion,

Autres :

Papier parafilm, Coton , Cloches de Durham



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : ARARE CHIRAZ

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : Biologie Appliquée

N° de carte d'étudiant : 2012401492411

Année universitaire : 2019-2018

Domaine : Science de la nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé du mémoire : Contribution à l'étude de la microflore d'ekhila

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

2019 جوان 19

Fait à Tébessa, le : 19/06/2019

Signature de l'étudiant(e) :

Signature de l'étudiant(e) :





REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : Khelifa Latifa

Régulièrement inscrit(e) en **Master** au département : Biologie Appliquée

N° de carte d'étudiant : 13/34014651/2018

Année universitaire : 2018 / 2019

Domaine : Science de la nature et de la vie

Filière : Science biologique

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé du mémoire : contribution à l'étude de la microflore d'el Khla

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

2019 جوان 19

Fait à Tébessa, le : 19/06/2019

Signature de l'étudiant(e) :



Université Larbi Tébessi - Tébessa

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)



Je soussigné(e),

Nom, Prénom : Maâche Sabrina

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : Biologie Appliquée

N° de carte d'étudiant : 34017805/2013

Année universitaire : 2018/2019

Domaine : Science de la nature et la vie

Filière : Science biologique

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé du mémoire : Contribution à l'étude de la microflore d'el Kkita

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le 19/06/2019

Signature de l'étudiant(e) :

19 جوان 2019

عن / رئيس المجلس البلدي
 رجب بن عبد الحميد
 السيد بن عرفان
 نائب رئيس المجلس البلدي