

ETUDES QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DES BACTERIES LACTIQUES DE LAIT CRU PRODUITS PAR DES VACHES LOCALES APPARTENANT A SIX STATIONS D'ELEVAGE DE CONSTANTINE.

Reçu le 08/03/2004 – Accepté le 06/06/2005

Résumé

Les dénombrements et l'identification des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de vaches appartenant à six stations d'élevage de la région de Constantine ont été effectués. Le nombre moyen de bactéries lactiques varie de $0,579 \times 10^7$ à $11,40 \times 10^7$. Sur 1645 souches isolées 1000 souches ont pu être purifiées et identifiées aux genres *Streptococcus* (147 souches), *Lactococcus* (121), *Enterococcus* (95), *Leuconostoc* (272), *Lactobacillus* (197) et *Pediococcus* (168). L'étude des caractéristiques biochimiques et physiologiques a permis d'identifier soixante six souches aux espèces suivantes : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (2), *Lac. lactis* subsp. *cremoris* (1), *Enterococcus faecium* (5), *Ec. faecalis* (2), *Ec. durans* (1), *Streptococcus thermophilus* (8), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (9), *Ln. lactis* (7), *Pediococcus acidilactici* (4), *Pc. urinae equi* (7), *Pc. pentosaceus* (1), *Pc. parvulus* (4) et *Pc. dextrinicus* (1). Dans le genre *Lactobacillus*, 14 souches sont classées parmi le groupe *Betabacterium* et appartiennent aux espèces *Lactobacillus cellobiosus* (10), *Lb. brevis* ou *buchneri* (4). Les quatre dernières souches appartenant au groupe *Thermobacterium* se rapprochent des espèces suivantes : *Lactobacillus delbrueckii/delbrueckii* (1) et *Lb. acidophilus* (2) et au groupe *Streptobacterium* avec comme espèce *Lb. plantarum* (1).

Mots Clés : Lait Cru de Vache - Bactéries Lactiques - Isolement - Identification- *Lactococcus*, *Streptococcus* - *Enterococcus* - *Leuconostoc* - *Pediococcus* - *Lactobacillus*.

Abstract

This study was conducted to investigate an isolation and identification of lactic acid bacteria from raw milk of cow in six breeding stations at Constantine (Algeria). The average number of bacteria was varied from $0.579 \cdot 10^7$ to $11.40 \cdot 10^7$. Firstly we have isolated 1654 strains and 1000 were purified. The results showed that: 147 were *Streptococcus*, 121 *Lactococcus*, 95 *Enterococcus*, 272 *Leuconostoc*, 197 *Lactobacillus* and 168 *Pediococcus* genus. We selected 66 species from each sample of milk and they were identified by biochemistry and physiological study their species: 8 strains of *Enterococcus* (*Ec. faecium*, *Ec. faecalis* and *Ec. durans*), 3 strains of *Lactococcus* (*Lc. lactis* subsp. *cremoris* and *Lc. lactis* subsp. *lactis*), 8 strains of *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus*), 16 strains of *Leuconostoc* (*Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and *Ln. lactis*), 17 strains of *Pediococcus* (*Pc. acidilactici*, *Pc. urinae equi*, *Pc. pentosaceus*, *Pc. dextrinicus* and *Pc. parvulus*), 18 strains of *Lactobacillus* to *Lb. cellobiosus*, *Lb. brevis* or *buchneri* of *Betabacterium* groups, *Lb. delbrueckii/delbrueckii* and *Lb. acidophilus* of *thermobacterium* groups and *Lb. plantarum* of *Streptobacterium* groups.

Key Words: Lactic Acid Bacteria - Raw Milk - Cow - Isolation - Identification - *Lactococcus*, *Streptococcus* - *Enterococcus* - *Leuconostoc* - *Pediococcus* - *Lactobacillus*

F. BEKHOUCHE¹
A. BOULAHROUF²

¹ Département de Nutrition et des Technologies Agro-Alimentaires (D.N.A.T.A.A) Faculté des Sciences Université Mentouri Constantine Algérie.

² Département des Sciences de la Nature et de la Vie Faculté des Sciences Université Mentouri Constantine. Algérie

ملخص

في هذا العمل قمنا بحساب وتعريف بكتيريا لبنية معزولة من حليب غير طازج للأبقار تنتمي إلى 6محطات لتربيتهم وتوجد في نواحي قسنطينة. إن العدد المتوسط الذي تحصلنا عليه للبكتيريا اللبينة يتراوح من $0,579 \times 10^7$ إلى $11,40 \times 10^7$. من بين 1645 سلالة معزولة تم تنقية وتعريف 1000 سلالة

تنتمي إلى الأجناس التالية : *Streptococcus* (147), *Lactococcus* (121), *Enterococcus* (95), *Leuconostoc* (272), *Lactococcus* (197), *Pediococcus* (168). سمحت لنا دراسة الخصائص البيوكيميائية و الفيزيولوجية بتعريف 66 سلالة تنتمي إلى الأنواع التالية: *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (2), *L. lactis* subsp *cremoris* (1), *Enterococcus faecium* (5), *E. faecalis* (2), *E. durans* (1), *Streptococcus thermophilus* (8), *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* (9), *L. lactis* (7), *Pediococcus acidilactici* (4), *P. urinae equi* (7), *P. pentosaceus* (1), *P. dextrinicus* (1) و *Pc. parvulus* (4). في الجنس *Lactobacillus* رتبنا 14 سلالة بين المجموعة *Betabacterium* و تنتمي إلى الأنواع: *Lactobacillus brevis* و *Lactobacillus cellobiosus* (10) و *Lb. brevis* أو *buchneri* (4). السلالات الأربع الأخيرة التي تنتمي إلى مجموعة *Thermobacterium* تقترب إلى الأنواع التالية: *Lactobacillus delbrueckii/delbrueckii* (1) و *L. acidophilus* (2) و *Lactobacillus plantarum* نوع واحد و *Streptobacterium*

الكلمات الأساسية: حليب غير طازج للبقرة، بكتيريا لبنية، تعزير، تمييز

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles sont largement utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires par des procédés de fermentations lactiques. Les bactéries lactiques assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sécurité alimentaire. Cette sécurité est favorisée grâce à la production acides organiques (acides lactiques et acétiques) qui font baisser le pH dans le milieu et par la synthèse de bactériocines qui renforce cette conservation (1, 2,3). La flore originelle lactique des laits crus a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche (4, 5,6). Les techniques de biologie moléculaires ont permis de mettre en évidence une forte diversité génomique qui a conduit à la classification récente de onze genres : *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (7).

A travers cette étude, nous contribuons à la réalisation d'une première collection de souches de bactéries lactiques ayant une application dans l'industrie alimentaire. Pour cela, des bactéries lactiques sont isolées des laits crus provenant des vaches importées et élevées dans un environnement locale et d'alimentation comprise. Dans cette étude notre intérêt est porté sur six genres de bactéries lactiques suivants : *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*.

MATERIEL ET METHODES

1°/ Origine des échantillons de laits analysés

Dans le tableau 1 figure les nombres des différents échantillons de lait analysés. Les vaches laitières de races croisées proviennent de six stations d'élevages situés à la périphérie de la ville de Constantine (Algérie). Les cinq premières stations, à l'exception de la station VI, sont de petites exploitations. Dans l'ensemble des stations, l'alimentation des vaches laitières est saisonnière. Elle s'effectue en hiver dans les étables (fourrages et complément nutritif à base de protéines) et durant les saisons chaudes dans les pâturages. Seules les vaches de la station III séjournent toute l'année à l'étable.

Tableau 1 : Présentation des stations d'élevage et origine des échantillons de lait cru utilisés.

Stations d'élevage *	I	II	III	IV	V	VI
Superficie des stations (ha)	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4	600
Nombres de vaches	10	14	12	22	22	40
Nombres d'échantillons	3	3	3	3	3	3

* Toutes les stations d'élevage se situent à la périphérie de la ville de Constantine.

Dix huit échantillons de lait ont été prélevés aseptiquement au moment de la traite. Tous les 7 jours, trois prélèvements de lait de 250 ml chacun sont été effectués par station.

Les prélèvements ont lieu pendant la traite manuelle à partir de bidon de 10 litres dans les cinq premières stations et après la traite mécanique dans les cuves de stockage de la station VI.

Les échantillons de lait sont maintenus à 4 °C durant les cinq heures qui précèdent les analyses au laboratoire et sont notés comme suit : E1, E2, E3 (station I), E4, E5, E6 (station II), E7, E8, E9 (station III), E10, E11, E12 (station IV), E13, E14, E15, (station V), E16, E17, E18 (station VI).

2°/ Dénombrement et isolement de bactéries lactiques

Des séries de dilutions décimales des échantillons de lait (10^0 à 10^{-6}) ont été effectuées sur du bouillon Tryptone sel et les milieux de culture de dénombrement et d'isolement ont été ensemencés à partir des dilutions : 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} .

Les genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* sont mis en évidence sur milieu M17 gélosé (gélose de Tarzaghi de chez Difco), les *Leuconostocs* sur gélose hypersaccharosée (Difco) et les *Lactobacillus* et les *Pediococcus* sur milieu M.R.S. gélosé (Man Rogosa et Sharpe) (Difco). Trois boîtes de Pétri par dilution sont ensemencées en surface sur milieu M17 et sur gélose hypersaccharosée et en profondeur sur milieu M.R.S. Le dénombrement des souches est évalué, après incubation à 30 °C durant 48 heures, en nombre de colonies par millilitre d'échantillon de lait analysé (8).

3°/ Identification des bactéries lactiques

Les colonies obtenues sont observées à la loupe binoculaire afin de déterminer leurs caractères culturels (couleur, disposition, forme et aspect).

Les cellules sont examinées au microscope optique pour différencier la morphologie et la disposition. La coloration de Gram est effectuée selon la méthode classique (8 et 9).

Les tests biochimiques et physiologiques effectués sur les souches isolées sont :

- l'activité catalytique mise en évidence en émulsionnant la culture dans l'eau oxygénée à 20 volumes pour observer la production de gaz par effervescence.

- La citratase déterminée par la transformation du citrate contenu dans la gélose au lait en acide citrique et en gaz (1).

- Différentes températures de croissance ont été testées :

Sur le milieu de Naylor et Sharpe

- * à 10 et 45° (*Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*)

Sur le milieu MRS

- *à 37 et 45 °C (*Lactobacillus*)

- *à 37 °C *Pediococcus*

- * à 37 °C (*Leuconostoc*) sur la gélose hypersaccharosée (10).

- La croissance des souches dans des conditions hostiles est étudiée :

Sur le milieu de Naylor et Sharpe :

- *à pH 9,6 pour les genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*

Sur le milieu MRS

- *à pH 5 pour le genre *Pediococcus*

- *Avec des concentrations en NaCl de 6,5 % (*Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*), 10 % et 15 % (*Pediococcus*) dans leurs milieux respectifs cités auparavant.

- à 55 °C durant 15 min (*Leuconostoc*) et à 60 °C durant 30 min (*Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*).

- en présence de tellurite de potassium (*Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*) additionné à la concentration de 0,4 %.

- Le développement des bactéries sur le lait "bleu de Sherman" à 0,1 % de bleu de Méthylène est déterminé à 30 °C durant 48 heures.

- La production d'acétoïne est détectée par la réaction de Voges Proskauer sur milieu Clark et Lubs (11).

- Le métabolisme protéique est déterminé par l'hydrolyse de la gélatine.

- L'hydrolyse de l'amidon est caractérisée au lugol après trois jours d'incubation de l'espèce dans la gélose ordinaire additionnée de 0,3 % d'amidon soluble (8).

- La réduction du chlorure de triphenyl 2-3-5 tétrazolium (T.T.C.) en triphenyl formazan est étudié selon la technique décrite par Barnes (9).

- les caractères homofermentaires et hétérofermentaires sont testés selon la technique de Gibson et Abdel-Malek (8, 9).

L'étude de la fermentation des sucres est réalisée sur le milieu spécifique à chaque genre, additionné d'un indicateur de pH (solution à 0,5% de rouge de Clorophénol). Les sucres testés sont : le lactose, le saccharose, le glucose, le fructose, le maltose, le melibiose, le mannitol, le raffinose et la dextrine.

RESULTATS

1°/ Dénombrements et isoléments

Les résultats du dénombrement observé par station varie entre $0,579 \cdot 10^7$ (station II) et $11,40 \cdot 10^7$ (station III). Ils sont reportés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Nombre moyen des colonies observées (UFC/ml de lait) pour chaque station d'élevage.

	Milieu de culture utilisés	M17	Mayeu	M.R.S	Total
Stations	I	$2,050 \cdot 10^7$	$0,252 \cdot 10^7$	$2,367 \cdot 10^7$	$4,669 \cdot 10^7$
	II	$0,073 \cdot 10^7$	$0,005 \cdot 10^7$	$0,501 \cdot 10^7$	$0,579 \cdot 10^7$
	III	$4 \cdot 10^7$	$0,4 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^7$	$11,40 \cdot 10^7$
	VI	$0,4 \cdot 10^7$	$0,030 \cdot 10^7$	$2,40 \cdot 10^7$	$2,830 \cdot 10^7$
	V	$2,50 \cdot 10^7$	$1,50 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^7$
	VI	$0,206 \cdot 10^7$	$0,3 \cdot 10^7$	$0,35 \cdot 10^7$	$0,856 \cdot 10^7$

1645 colonies ont été isolées dont 1000 ont pu être purifiées et appartiennent aux genres *Streptococcus* (Sc.) (147), *Enterococcus* (Ec.) (95), *Lactococcus* (Lc.) (121), *Leuconostoc* (Ln.) (272), *Lactobacillus* (Lb.) (197) et *Pediococcus* (Pc) (168). Tous les genres sont présents à des nombres équivalents et ceci quelle que soit la station considérée à l'exception de la population du genre *Leuconostoc* dont la taille est de 10 à 100 fois moins importante. Les colonies issues des isolements sont : de taille variable, de forme circulaire avec un pourtour régulier, irrégulier, érodé ; de couleurs blanches, jaune et blanc-crème.

2°/ Caractérisation et identification des souches obtenues

L'observation microscopique a révélée deux formes de cellules (Coques et Batonnets). Les coques (diplocoques pour l'ensemble et en chaînette) constituent 80,3 % de

l'effectif total et sont représentées par les genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*.

Les formes bâtonnets sont représentées par le genre *Lactobacillus* avec 19,7 % de l'effectif total.

Les résultats obtenus sur les 66 souches sélectionnées ont montrés que la plupart des espèces sont Gram positif, immobiles, catalase négative, peroxydase négative et nitrate-reductase négatif. Ces résultats confirment les données de la référence 12 ; sauf pour quelques souches qui sont catalase positives (S2, S4, S6, Lb5, Ln3), peroxydase positive (S2, Lb2, Lb5, Ln4) et parfois mobiles (S4, S5, S6, Lb3, P2, Ln3, Ln4). Ce qui confirment les études de la référence 13 qui ont montré que des exceptions ont été observées chez quelques *Lactobacillus* pour la mobilité et chez les *Pediococcus* et les *Lactobacillus* sur la production de catalase.

Les résultats du classement des espèces que nous avons isolées sont basés sur les travaux des références 9, 14, 15 et 16.

Parmi les souches sélectionnées pour les tests d'identification ; huit souches appartiennent au groupe *Enterococcus* et présentent un développement positif à 10 °C (Sauf S17, S18 et S19) et à 45 °C (Sauf S6), à pH 9,6 (Sauf S17, S18, S19), en présence de 6,5 % de NaCl (Sauf S12) et une thermorésistance égale à 60 °C durant 30 min. Les espèces S8, S9, S12, S18 et S19 sont citrate négatif ; ceux qui les rapprochent à l'espèce *Enterococcus faecium*. Les souches S6 et S17 présentent les mêmes caractéristiques que l'espèce *Enterococcus faecalis* par la production de citrate et un développement positif en présence de Tellurite de potassium. La souche S1 qui est manitol négatif et citrate négatif s'identifie à l'espèce *Enterococcus durans* (Tableau 3).

Parmi le genre *Lactococcus* trois espèces ont été déterminées ; S7, S13 et S15 ne résistent pas à la température de 45 °C. La souche S7 présente un développement positif à 6,5 % de NaCl et produit de l'acétoïne ; nous l'avons situé parmi l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et les souches S13 et S15, qui diffèrent de l'espèce précédente par la non-croissance au pH 9,6, se rapprochent de l'espèce *Lactococcus subsp. lactis* (Tableau 3).

Parmi le genre *Streptococcus*, les résultats des tests réalisés sont très variables ; de ce fait nous nous sommes seulement basés sur la thermoresistance positif et la production des cellules à 45 °C pour classer les souches S2, S3, S4, S5, S10, S11, S14 et S16 parmi l'espèce *Streptococcus thermophilus* (Tableau 3).

Dans le genre *Leuconostoc* ; toutes les souches présentent un développement positif à 37 °C et la plupart résistent au traitement thermique de 55 °C pendant 15 min. Les souches Ln1, Ln8, Ln10, Ln11, Ln12, Ln13, Ln14, Ln15 et Ln16 produisent du dextrane ; nous les avons classées parmi l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Les souches Ln2, Ln3, Ln4, Ln5, Ln6, Ln7 et Ln9 sont dextrane négatif et se rapprochent de *Leuconostoc lactis* (Tableau 4).

	Station I				Station II		Station III			Station IV			Station V			Station VI			
Caractéristiques des souches	E1	E2			E3	E1	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19
Croissance à 10 °C	+	+	-	V	V	V	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Croissance à 45 °C	-	+	+	+	+	V	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Croissance à pH 9,6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à 6,5 % NaCl	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Résistance 30 min 60 °C	V	+	V	V	+	V	V	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Croissance sur lait "bleu de Sherman"	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
Résistance au tellurite K	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Réduction du T.T.C.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lait tourmesolé	RC	CA	CA	CA	R	A	R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acétoïne	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
CO2 sur citrate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Gélatinase	+	+	+	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hydrolyse de l'amidon	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tableau 3: Caractéristiques physiologiques et biochimiques des espèces des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*.

(+): Positif ; (-): Négatif ; (V): variable ; (R) : Réduction du colorant positif ; (C) : Coagulation de la caséine positif ; (A): Acidification positif (Production d'acide lactique) ; (ND) : Non déterminé.

Tableau 4 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des espèces du genre *Leuconostoc*.

Stations			Caractéristiques des souches							
			Croissance à 37°C	Résistance 15 min 55°C	Acétone	Saccharose	Fructose	Dextrane	Esculine	Lait tournaisé
I	E1	Ln1	+	+	+	+	+	+	+	A
	E2	Ln2	+	+	+	+	+	+	+	A
	E3	Ln3	+	+	+	+	+	+	+	A
II	E1	Ln4	+	V	+	+	+	V	-	AC
III	E1	Ln5	+	+	+	+	+	-	ND	-
	E2	Ln6	+	+	+	+	+	-	ND	C
	E3	Ln7	+	+	+	+	+	-	ND	C
IV	E1	Ln8	+	-	+	+	+	+	ND	A
	E2	Ln9	+	+	+	+	+	-	ND	A
	E3	Ln10	+	+	+	+	+	+	ND	AC
V	E1	Ln11	+	+	+	+	+	+	ND	AC
	E2	Ln12	+	+	+	+	+	+	ND	AC
	E3	Ln13	+	-	+	+	+	+	ND	AC
VI	E1	Ln14	+	+	+	+	+	+	ND	C
	E2	Ln15	+	+	-	+	+	+	ND	C
	E3	Ln16	+	-	+	+	+	+	ND	AC

(V) : Variable ; (ND) : non Déterminé ; (+) : Positif ; (-) : Négatif ; (A) : Acidification positif ; (C) : Coagulation positif

Parmi le genre *Pediococcus* nous avons procédé au classement selon la technique de la référence 9. Les souches P5, P12 P13 et P14 sont acidophiles (croissance positive à pH 5), présentent un développement positif à 37 °C et 45 °C et ne fermentent pas le maltose. Elles sont classées parmi l'espèce *Pediococcus acidilactici*. La souche P8 présente les mêmes caractères que les autres souches du même genre, excepté qu'elle utilise le maltose et ne se développe pas à 45 °C. Elle est classée parmi l'espèce *Pediococcus pentosaceus*. La croissance des souches à pH 5 est non déterminé pour les souches P1 et P2, de ce fait nous nous sommes basés uniquement sur les autres résultats pour pouvoir les identifier. La souche P1 présente une

croissance négative sur le milieu à 15 % de NaCl, se développe à 37 °C mais pas à 45 °C. Elle fermente aussi le maltose nous l'avons situé parmi l'espèce *Pediococcus parvulus*. La souche P2 se développe bien à 37 °C et à 45 °C et fermente le maltose et le dextrane. Elle se rapproche de l'espèce *Pediococcus cerevisiae* selon la référence (8 et 9). La souche P2 se rapproche plus de *Pediococcus dextrinicus* par l'ensemble des tests réalisés selon la référence 9. Les souches P3, P4, P6, P7, P9, P10 et P11 sont non acidophiles et ne tolèrent pas des concentrations en NaCl égales à 15 % ; Elles sont classées parmi l'espèce *Pediococcus urinae equi* (Tableau 5).

Tableau 5 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des espèces du genre *Pediococcus*.

Stations			Caractéristiques des souches								
			Croissance à 37°C	Croissance à 45°C	Croissance à pH5	Croissance à 10% NaCl	Croissance à 15% NaCl	Acétone	Saccharose	Dextrane	Maltose
I	E1	P1	+	-	ND	+	-	-	+	+	+
		P2	+	+	ND	+	V	+	+	+	+
III	E1	P3	+	+	-	+	-	-	+	+	+
	E2	P4	+	+	-	+	-	-	+	+	-
	E3	P5	+	+	+	+	-	-	+	+	-
IV	E1	P6	+	-	-	+	-	V	+	+	-
	E2	P7	+	-	-	+	-	-	+	+	-
	E3	P8	+	-	+	+	-	-	+	+	+
V	E1	P9	+	-	-	+	-	+	+	+	-
	E2	P10	+	+	-	+	-	-	+	+	+
	E3	P11	+	-	-	+	-	-	+	+	-
VI	E1	P12	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	E2	P13	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	E3	P14	+	+	+	-	-	-	+	+	-

(V) : Variable ; (ND) : non Déterminé ; (+) : Positif ; (-) : Négatif

Dans le genre *Lactobacillus*, les souches, Lb1, Lb2, Lb3, Lb4, Lb5, Lb8, Lb9, Lb10, Lb11, Lb12,

Lb13, Lb14 et Lb17 sont classées dans les groupes *Bétabacterium* par la production de CO₂ dans un milieu glucosé. Alors que les souches Lb1, Lb2, Lb3, Lb4, Lb5, Lb8, Lb9, Lb10 et Lb14 qui fermentent l'ensemble des sucres testés se rapprochent de l'espèce *Lactobacillus cellobiosus*. Les souches Lb11, Lb12, Lb13 et Lb1 se développent à 10 °C mais pas à 45 °C et fermentent la plupart des sucres testés; nous les avons classées parmi les espèces *Lactobacillus brevis* ou *Lb. bruchneri*. La souche Lb6 utilise les sucres sans la production de gaz, nous

l'avons classée parmi l'espèce *Lactobacillus plantarum* du groupe *Streptobacterium*.

Les souches du groupe *Thermobacterium* ne produisent pas le CO₂ lorsqu'elles utilisent le glucose et ne se développe pas à 10 °C. Nous avons obtenu trois souches, Lb7, Lb15 et Lb16, qui répondent à ces critères. La souche Lb7, qui ne fermente ni le lactose ni le raffinose, est classée parmi l'espèce *Lactobacillus delbrueckii/delbrueckii*. Tandis que Lb15, et Lb16 qui fermentent seulement le lactose et le saccharose, sont rapprochées à l'espèce *Lactobacillus acidophilus* (Tableau 6).

Tableau 6 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des espèces du genre *Lactobacillus*

Stations			Caractéristiques des souches							
			CO ₂ sur glucose	Croissance à 10°C	Croissance à 45°C	Faëuline	Lactose	Méltiose	Raffinose	Saccharose
I	E1	Lb1	+	V	+	+	+	+	+	+
	E2	Lb2	+	V	+	+	+	+	+	+
	E3	Lb3	+	V	+	+	+	V	+	+
II	E1	Lb4	+	+	V	+	+	+	+	+
	E3	Lb5	+	+	V	+	+	+	+	+
III	E1	Lb6	+	+	+	ND	+	+	+	+
	E2	Lb7	+	+	+	ND	+	+	+	+
	E3	Lb8	+	+	+	ND	+	+	+	+
IV	E1	Lb9	+	V	+	ND	+	V	+	+
	E2	Lb10	+	+	+	ND	+	+	+	+
	E3	Lb11	+	+	+	ND	+	+	+	+
V	E1	Lb12	+	+	+	ND	+	+	+	+
	E2	Lb13	+	V	+	ND	+	+	+	+
	E3	Lb14	+	+	+	ND	+	+	+	+
VI	E1	Lb15	+	+	+	ND	+	+	+	+
	E2	Lb16	+	+	+	ND	+	+	+	+
	E3	Lb17	+	+	+	ND	+	+	+	+

(V) : Variable ; (ND) : non Déterminé ; (+) : Positif ; (-) : Négatif

DISCUSSION

L'étude des caractères culturels, biochimiques et physiologiques des 66 souches Sélectionnées et isolées à partir de laits crus produits par des vaches locales nous ont permis de mettre en évidence 18 espèces différentes (Tableau 7). Leur nombre par station varie de 5 (Station II) à 9 (Station IV). Les plus fréquemment rencontrés sont surtout les coques (80,3%). Le même type de résultat est apporté par les auteurs de la référence 6.

Les formes coques constituent 13 espèces localisées dans l'ensemble des échantillons de laits des six stations. Parmi elles, deux espèces de *Lactococcus* sont identifiées avec une fréquence très faible dans les échantillons étudiés. En effet ; l'espèce *Lc. lactis subsp. cremoris* n'est représentée que par une seule souche (S7) et *Lc. lactis subsp. lactis* par deux souches (S13 et S15) isolées de deux échantillons appartenant à deux stations différentes. Le même type de résultat est observé sur les laits crus de vaches produites en Algérie (5).

Dans le genre *Lactobacillus*, 5 espèces sont identifiées : l'espèce *Lb. cellobiosus* est largement dominante et représentée par 10 souches appartenant aux échantillons de lait de 4 stations. Selon la référence (17), les souches du

genre *Lactobacillus* isolés appartiennent essentiellement à l'espèce *Lb. plantarum*. Cette dernière est représentée par une seule souche isolée des échantillons de la station III. En ce qui concerne les autres espèces du genre *Lactobacillus*, nos résultats concordent avec ceux de la référence 4.

Les résultats observés par les auteurs de la référence (18) sur des échantillons de fromage produit traditionnellement en Algérie à partir de lait cru de vache ont démontré une forte prédominance de l'espèce *Ec. faecalis*. Tandis que dans nos résultats cette espèce n'est représentée que par deux souches : S6 et S17 isolées respectivement des laits des Stations II et VI. Nous pouvons déduire que les conditions hygiéniques de traite et de stockage des laits aux seins des stations d'élevages sont défavorables à ce type de bactéries qui est d'origine fécale.

CONCLUSION

66 souches ont été identifiées à partir de 18 échantillons de lait de vache appartenant à six stations d'élevage. Elles appartiennent à six genres de bactéries lactiques :

-le genre *Enterococcus* : *Ec. faecium*, *Ec. faecalis* et *Ec. durans*

-le genre *Lactococcus* : *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris*

-le genre *Streptococcus* : *Sc. thermophilus*

-le genre *Leuconostoc* : *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et *Ln. lactis*

-le genre *Pediococcus* : *Pc. pentosaceus*, *Pc. parvulus*, *Pc. urinae equi* et *Pc. acidilactici*

-le genre *Lactobacillus* : *Lb. cellobiosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii/delbrueckii*, *Lb. brevis* et *Lb. acidophilus*

Les résultats de l'identification des 66 souches nous ont permis d'observer une répartition très variée des espèces obtenues à partir des laits crus. *Ec. faecium* *Sc.*

thermophilus sont les espèces les plus fréquemment rencontrés alors que d'autres espèces sont isolées à partir d'un échantillon par station d'élevage tel que : *Ec. durans* (E1 : Station I), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (E3 : Station II), *Pc. pentosaceus* (E3 : Station IV), *Pc. parvulus* (E1 : Station I) et *Pc. dextrinicus* (E2 : Station I)

L'identification, des souches isolées, était basée sur les techniques qui caractérisent la morphologie et les différents métabolismes biochimiques et physiologiques de la souche. En perspective, il serait intéressant de confirmer l'identité des souches par l'utilisation des techniques mettant en évidence le caryotype de l'espèce identifiée.

Tableau 7 : Bilan des espèces des six genres de bactéries lactiques pré-identifiées.

Station I	Station II
<i>Ec. durans</i> (1)	<i>Ec. faecalis</i> (1)
<i>Sc. thermophilus</i> (4)	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (1)
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (1)	<i>Sc. thermophilus</i> (1)
<i>Ln. lactis</i> (2)	<i>Ln. lactis</i> (1)
<i>Pc. parvulus</i> (1)	<i>Lb. cellobiosus</i> (2)
<i>Pc. dextrinicus</i> (1)	
<i>Lb. cellobiosus</i> (3)	
Station III	Station IV
<i>Ec. faecium</i> (2)	<i>Ec. faecium</i> (1)
<i>Sc. thermophilus</i> (1)	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (1)
<i>Ln. lactis</i> (3)	<i>Sc. thermophilus</i> (1)
<i>Pc. acidilactici</i> (1)	<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (1)
<i>Pc. urinae equi</i> (2)	<i>Ln. Lactis</i> (1)
<i>Lb. cellobiosus</i> (1)	<i>Pc. urinae equi</i> (3)
<i>Lb. plantarum</i> (1)	<i>Pc. Pentosaceus</i> (1)
<i>Lb. delbrueckii/delbrueckii</i> (1)	<i>Lb. cellobiosus</i> (2)
<i>Lb. cellobiosus</i> (1)	
Station V	Station VI
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (1)	<i>Ec. faecium</i> (2)
<i>Sc. thermophilus</i> (1)	<i>Ec. faecalis</i> (1)
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (3)	<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (3)
<i>Pc. urinae equi</i> (3)	<i>Pc. Acidilactici</i> (3)
<i>Lb. cellobiosus</i> (2)	<i>Lb. brevis</i> (1)
<i>Lb. brevis</i> (2)	<i>Lb. acidophilus</i> (2)

Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre de souches pré-identifiées.

REFERENCES

- [1]- Bourel G., Henini S., Krantar K., Oraby M., Divies C. & Garmin D. "Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*". INRA EDP Sciences, (2001), pp75-82.
- [2]- de Roissard H.B. & Luquet F.M. "Bactéries lactiques, I, II", Loriga Chemin saint Georges, F-38410 France(1994).
- [3]- Novel G. "Les bactéries lactiques" dans "Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel". Leveau J.Y, Bouix M., A p r i a. Paris (1993), pp 170-3310.
- [4]- Larpent J.P. "Les ferments bactériens (Les ferments microbiens)" dans "les industries agro-alimentaires". Actualités scientifiques et techniques en industrie agro-alimentaire, Vol 46(1991), pp3- 117.
- [5]- Saïdi N. "Bactéries lactiques des laits d'Algérie : isolement, identification, caractéristiques technologiques. Mise en évidence de bactériocines et d'ADN plasmique". Thèse de Magister Université d'Oran (1998).
- [6]- Zadi-Karam H. "Bactéries lactiques isolées de lait de *Camelus dromedarius* : Etude microbiologique et biochimique, Caractérisation technologique, élaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromage". Thèse de Doctorat d'Etat, département de nutrition d'alimentation et des technologies agro-alimentaire. Faculté des sciences, Université de Constantine Algérie (1998).
- [7]- Atlan D., Aubel D. & Gilbert C. "La biodiversité des bactéries lactiques et les conséquences sur leurs protéinases". *Revue Science des aliments*. Vol 20 (01) (2000), pp 5-1.
- [8]- Guiraud J.P. "Microbiologie alimentaire". Technique et ingénierie, série Agro- alimentaire, Paris, (1998), pp 652.
- [9]- Guiraud J.P. & Galzy P. "L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Editions de l'usine nouvelle Paris, (1980), pp 239.
- [10]- Petransxiène P. & Lapiéd. L. "Qualité bactériologique du lait et des produits laitiers : Analyse et tests". 2^{ème} édition technique et documentation Lavoisier Paris, (1981), pp 44 -8.
- [11]- Leveau J.Y. & Bouix M. "La flore lactique" dans "technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires". Bourgeois C M, Leveau J Y, A p r i a. Paris (1980), pp 3-106.
- [12]- Gunter K., Pack. A., Bonaparte C. & Reute G. "Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria". *J. food. microbial.*, Vol 41(1998), pp103-125.
- [13]- de Roissard H. "Les bactéries lactiques". Dans "le lait et les produits laitiers", Luquet. F. M, 1986. Edition technique et documentation Lavoisier. Paris. Tome 3 (1986), pp 343-407.
- [14]- Garvie E.I. "Genus *Leuconostoc* van tiegen 1978, 198^{al} emended mut. Char Hucker and Pederson 1930, 66^{al}." in "Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore", Vol 2, (1986 a), pp 1071-1075.
- [15]- Garvie E.I. "44Genus *Pediococcus* Claussen 1903, 68^{al}." in: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Williams and Wilkins, Baltimore Vol 2, (1986 b), pp 1075-1079.
- [16]- Leveau J.Y. & Bouix M. "Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel". Technique et documentation. Lavoisier Paris (1993), pp 170-331.
- [17]- Karam N.E. "Constitution d'un souchier de bactéries lactiques à intérêt biotechnologique: Etude biochimique et moléculaire". Thèse d'Etat, Université d'Oran (1995).
- [18]- Boubekri K. & Yoshiyuki O. "Identification of lactic acid bacteria from Algerian traditional cheese, El-Klila". *J. Sci. Food. Agr.*, Vol70 (1996), pp 501-505.