

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun –Tiaret–

Faculté Sciences de la Nature et de la Vie

Département Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Toxicologie et Sécurité Alimentaire

Présenté par :

- Kaid Jasmine Khaldia

- Thamer Sara

- Yeddou Malika

Thème

Le suivi de cinétique de croissance des deux bactéries lactiques *Lactococcus* et *Leuconostoc* isolés de lait cru de vache

Soutenu le :

Jury :

Président : Mrs ACEM

Encadrant : Mme MOULAY

Co-encadrant : Mrs BENBEGARA

Examineur : Mrs YEZLI

Année universitaire 2020-2021

Remerciement

Tout d'abord, nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté de réaliser et de mener à terme ce travail.

Nous adressons le grand remerciement à notre encadreur Mme Moulay qui nous a proposé le thème de ce mémoire, pour ses conseils et ses dirigés, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie du début à la fin de ce travail.

Nous tenons à remercier notre co-promoteur Mr Benbegara qui nous a aidé pour réaliser ce travail et les membres de jury à leur tête le président Mr Acem et l'examineur Mr Yezli qui ont accepté d'examiner notre manuscrit. Nous vous remercions chaleureusement pour la qualité de votre enseignement pendant nos années d'apprentissage et le savoir que vous nous avez transmis.

Nos remerciements vont également au personnel de laboratoire de microbiologie particulièrement Mme Kheira.

Enfin nous tenons à ne pas oublier notre frère YEDDOU ZINEDDINE qui nous a soutenus avec ses conseils et ses orientations tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

La merveille de ma vie, mon point de départ, ma meilleure amie, ma grande mère ZOHRA qui m'a soutenu à chaque étape de ma vie, surtout durant mon parcours universitaire, tu es la personne qui prend la place de tous le monde mais personne ne peut te remplacer, que dieu te garde pour moi.

Mon héros, mon grand père ABDELKADER, un homme rapluie, généreux, un homme dont je suis fière, merci pour ton accueil remplie d'affection.

La femme qui est toujours prête à tous donné, à tous sacrifier, ma chère mère SABAH, merci à tous tes efforts que tu as fait pour mon éducation ainsi que ma formation, tu es la meilleure des mamans.

Mon cher père ZOHIR, qui a cru en moi, qui m'a protégé, qui m'a aimé sans condition, il n'y a pas de mots pour décrire combien mon père compte pour moi.

Ma douce sœur FARAH, ma moitié, merci pour ton soutien constant dans le bien et le mauvais.

Mon petit frère ABDELWAHBAB, rien n'est plus beau dans la vie que d'avoir un frère comme toi, tu es un garçon génial.

Ma tante AICHA, mon oncle ALI et sa femme WASSILA, mes cousins et mes cousines, merci pour votre amour et votre soutien moral.

Mes chères partenaires MALIKA et SARA, on a formé un trinôme formidable, je suis très contente de notre amitié, je vous adore.

Mes amis MOH, KAMAR, RANIA, LAMIA, LOUBNA, RADIA, SARA, je vous remercie de m'avoir accompagné ainsi que mes collègues qui on été avec moi durant mon parcours.

Jasmine

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père MOHAMED

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non a mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : ma chère mère FATIMA

A ma chère sœur NOUR EL HOUDA qui n'est pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout long de mes études.

A mes tendres frères et sœurs SID AHMED ET SOUFIANE. SOUMIA ET AMINA, pour tant de confiance, d'amour, de patience et d'abnégation.

Je tiens a remercier mes collègues de travail et qui sont aussi mes chères copines MALIKA et JASMINE, que j'adore.

Je remercie mes amis qui m'ont soutenu moralement : Lamia, RADIA, DJAMELEDDINE , CHAHREDDINE et OMAR.

SARA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à

La personne qui a été toujours à mes côtés, celle qui a sacrifié toute sa vie pour moi dès ma naissance jusqu'à mon adultère, la femme qui fait tous pour me voir heureuse, son soutien moral et financière m'ont toujours accompagnés, cette femme : une femme forte, une femme fière, une femme douce, c'est ma mère SORAYA ; la lumière de ma vie et mon meilleure amie ; celle qui peut remplacer tout le monde mais personne ne peut la remplacer . Le paradis est sous ses pieds je donnerai ma vie pour elle.

A mon père LAKHDAR ; un papa avec un esprit ouvert qui m'a toujours pousser d'aller vers l'avant ; un homme qui a cru en moi, cet homme qui a fait tant de sacrifices pour cette famille, pour qu'on restera soudé à jamais.

A mon frère ZINOÛ, la personne qui est la cause de ce que je suis devenue aujourd'hui, celui qui a raté tellement de chances pour y-aller mais il est resté à mes côtés pour faire de moi la femme que je suis, celui qui m'a toujours guidé et qui m'a poussé de choisir ce domaine ; l'homme qui m'a appris ce que veut dire une femme forte et réussie, aujourd'hui si je suis une femme de principes et qui veut toujours avancé en avant c'est grâce à lui ; ce merveilleux frère que n'importe qu'elle fille a besoin de l'avoir dans sa vie.

A mes grands frères, les piliers de ma vie ;

MOHAMMED, que je considère comme mon père, celui au- près lequel j'ai passé mes plus beaux souvenirs d'enfance ; sa confiance en moi me fait sentir trop fière ; à sa femme FATIMA et ma nièce AICHA.

KADI, mon frère qui veut toujours me voir à la hauteur avec son soutien moral et ses discours pleins de conseils, sa douceur avec moi m'a toujours permis de partager avec lui mes petits secrets.

LOTFI ; mon frère qui est malgré son absence présent ; celui qui a toujours ouvert ses bras pour moi ; son soutien pour moi malgré qu'il est loin me touche tellement ; à sa femme KRISTINA et leur fils mon petit charment AMINE ELIAS.

A mes grands-parents ; M'HAMMED, ADDA ; ma grand-mère KHEIRA *allahyerhamhom* et ma grand-mère DJAOUHAR que dieu la garde pour nous.

A mes tantes et mes oncles ; A mon oncle MOHAMMED et sa femme NACERA qui m'ont toujours encouragé.

A Mes chères cousines ; et cousins.

A mes meilleures copines et collègues de travail JASMINE et SARA ; j'ai l'honneur d'avoir réalisé ce mémoire avec eux ; ces filles que j'adore. A ma jolie et ma douce RADIA ASMA ; son soutien moral et sa présence tous les jours que je n'oublierai jamais nous a tellement aidé.

A mes chères amies : LAMIA ; SARA BEL, MAROUA.

MALIKA

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Tables des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

Partie bibliographique

1. Le lait..... 2

 1.1 Spécification du lait 2

1.2 Compositions 3

 1.3 Le lait cru..... 3

 1.3.1 La flore du lait cru 4

2. Les bactéries lactiques 5

 2.1 Etudes de deux exemples de bactéries lactiques 6

 2.1.1 *Leuconostoc* 6

 2.1.2 *Lactococcus*..... 7

Matériel et Méthodes

1. Objectif du travail	8
2. Lieu et période de travail	8
3. Matériels et milieux de cultures	8
3.1 Appareillages	8
3.2 Verreries	9
3.3 Autres matériel	9
3.4 Produit chimiques	9
3.5 Milieux de cultures.....	10
4. Protocole expérimental	11
5. Méthodes	12
5.1 Prévenances des souches.....	12
5.2 Repiquage et revivification des souches.....	12
5.3 Conservation des souches	12
5.3.1 Conservations à court terme	12
5.3.2 Conservations à long terme	13
5.4 Tests morphologiques	13
5.4.1 Caractères macroscopiques.....	13
5.4.2 Caractères microscopiques	13
5.4.2.1 Coloration de gram	13
5.5 Test biochimique.....	14
5.5.1 Test de catalase	14
5.5.2 Test de type fermentaire.....	14

5.6 Test de coagulation du lait	14
5.7 Cinétique d'acidification.....	14
5.7.1 Mesure de l'acidité Dornic	15
5.7.2 Mesure de Ph.....	15
5.8 Cinétique de croissance.....	16

Résultats et discussion

1. Caractérisation des souches de la collection.....	17
1.1 Caractères morphologiques.....	17
1.1.1 Caractères macroscopiques.....	17
1.1.2 Caractère microscopique.....	17
2. Tests biochimiques.....	19
2.1 Type fermentaire	19
2.2 Dosage de l'acidité et pH.....	19
2.3 Cinétique de croissance de souches étudiées.....	21
2.3.1 Comparaison entre une courbe de croissance bactérienne normale et celle de nos résultats.	21
2.3.2 Interprétation des résultats de la courbe de croissance des deux souches	22
Conclusion	24

Référence

Annexes

Résumé

Abstract

ملخص

Listes des figures

Figure 1 : Apparition du trouble qui montre la croissance bactéries lactiques 19D et Ma1 en milieu MRS liquide.....	18
Figure 2 : aspect des colonies de culture pure des bactéries <i>Leuconostoc</i> après incubation à 30°C pendant 24h sur milieu MRS.....	18
Figure 3 : aspect des colonies de culture pure des bactéries <i>Lactococcus</i> après incubation à 30°C pendant 24h sur milieu MRS.....	18
Figure 4 : Aspect microscopique et arrangement du Ma1 après coloration de Gram (objectif X100).....	18
Figure 5 : Aspect microscopique et arrangement du 19D après coloration de Gram (objectif X100).....	18
Figure 6 : Aspect microscopique des colonies de culture pure de 19D et Ma1 après incubation de 24 h.	21
Figure 7 : La courbe de croissance de Ma1 et 19D..	21

Liste des tableaux

Tableau 1 : flore du lait cru	4
Tableau 2 : différents genres des bactéries lactiques	5
Tableau 3 : aspects morphologiques des bactéries étudiés 19D et Ma1.	17
Tableau 4 : mesures du pH et de l'acidité Dornic du lait coagulé	19
Tableau 5 : Dénombrement des colonies après 24h d'incubation.....	20
Tableau 6 : Calculs de la moyenne du dénombrement des colonies et N et Log N..	20

Liste des abréviations

C° : Degrée Celsius

D° : Degré Dornic

LMA : Laboratoire microbiologique appliqué

MRS : Man Rogosa Sharpe

N : Normalité

NaOH : la soude

pH : Potentiel d'hydrogène

UFC : unité formant colonies

Introduction

Introduction

Le lait est un produit indispensable à l'équilibre de l'alimentation humaine. Il contient de nombreux nutriments qui fortifient notre organisme : protéines, glucides, lipides, sels minéraux, vitamines et oligo-éléments. Le lait fut de tous temps un symbole de fertilité, de richesse et d'abondance. Il représente un milieu biologique fortement altérable par voie microbienne en raison de sa forte teneur en eau, de son pH voisin de la neutralité et de sa richesse en composants biodégradables (lactose, protéines et lipides) (**Huyghebaert, 2006**).

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles 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 des acides organiques (acides lactiques et acétiques), qui font baisser le pH dans le milieu, et par la synthèse de bactériocine qui renforce cette conservation (**Bekhouche et Boulahrouf, 2005**).

Parmi les bactéries lactiques les plus utilisées en industrie alimentaire, sont celles étudiées dans notre travail, appartenant aux genres *Leuconostoc* et *Lactococcus*.

L'orientation de notre travail concrétisée par notre approche expérimentale comporte 02 volets principaux :

- Première partie repose d'une part sur la caractérisation morphologique et biochimique des bactéries lactiques *Leuconostoc* et *Lactococcus*.
- Deuxième partie qui consiste à établir un suivi de cinétique d'acidification et de croissance des souches étudiés.

Partie bibliographique

1. Le lait

Le lait est un liquide alimentaire opaque, blanc mat légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre, à odeur peu marquée et au goût douceâtre, secrété, après parturition par la glande mammaire des animaux mammifères femelles pour nourrir leur nouveau-né (Larousse agricole, 2002).

Selon la définition établie par le congrès international de la répression des fraudes alimentaires à Genève (1908), le lait est 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 du colostrum (Debry, 2007).

1.1 Spécification du lait

Selon l'article 6 de (J.O.R.A.No69, 1993), le lait ne doit pas :

- être coloré, malpropre ou malodorant.
- provenir d'une traite opérée moins de sept (07) jours après le part.
- provenir d'animaux atteints de maladies contagieuses ou de mammites.

Contenir notamment des résidus antiseptiques, antibiotiques et pesticides.

- coaguler à l'ébullition.
- provenir d'une traite incomplète.
- subir un écrémage même partiel.

En outre, le lait ne doit pas subir :

- de soustraction ou de substitution de ses composants nutritifs.
- de traitements, autres que le filtrage ou les procédés thermiques d'assainissement susceptibles de modifier la composition physique ou chimique, sauf lorsque ces traitements sont autorisés

1.2 Composition

Le lait contient plus de 88% d'eau, il est considéré comme une source de calcium et de phosphore, il contient aussi les vitamines B12, B2, B3, B5, A, C et D.

Les macronutriments du lait entier se répartissent comme suit :

- 43% de glucides, son principal glucide est le lactose.
- 29% de lipides, ses lipides comportent une majorité d'acides gras saturés et de cholestérol.
- 28% de protéines.

1.3Le lait cru

D'après les études de **Luquet et al. 1985**, le lait cru est un produit intéressant sur le plan nutritionnel puisque il n'a subi aucun traitement d'assainissement lui permettant d'assurer une meilleure conservation. Sa production et sa commercialisation doivent être sévèrement contrôlées en raison des risques qu'il peut présenter pour la santé. En effet, il doit :

- provenir d'animaux connus indemnes de brucellose et de tuberculose.
- provenir d'exploitation bien implantée.
- être préparé, traité, conditionné et stocké dans des conditions hygiéniques, satisfaire des critères microbiologiques déterminées.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1.3.1 La flore du lait cru

Le tableau ci-dessous représente la flore du lait cru.

Tableau 01 : Flore du lait cru (CDELPC, 2000).

Flore banale	Microcoques Staphylocoques coagulase Entérobactéries non toxigènes <i>Bacillus</i> spp...
Flore d'intérêt technologique	Bactéries lactiques et propioniques Corynébactéries (<i>Brevibacterium linens</i>) Levure et moisissure (charge + ou -) <i>Hafnia alnei</i>
Flore d'altération	Bactéries butyriques, coliformes... Psychrotrophes (<i>Pseudomonas</i> spp, <i>Clostridium</i> spp.) Virus
Flore pathogène	<i>E.coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogènes</i> , <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Brucella</i> spp <i>Compylobacter jejuni</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> et <i>bovis</i> .

2. Les bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactique ou bactéries de l'acide lactique a été défini par **Orla- Jensen (1919)** et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique la fermentation est dite homolactique. Si d'autres composés sont aussi présents : acide acétique, éthanol, CO₂... selon le mode de fermentation obligatoire ou préférentiel, on parle de bactéries hétérofermentaires

Elles sont Gram+, généralement immobiles, asporulés et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et glucides fermentescibles (**Luquet et Roissar, 1994**).Le tableau ci-dessous illustre les genres variables des bactéries lactiques.

Tableau 2 : Différents genres des bactéries lactiques. (**Leveau et Bouix, 1993**).

	Cellules		Fermentation	ADN :GC%
	Forme	Arrangement		
<i>Leuconostoc</i>	Coque	Chaines	Hétérolactique	36-43
<i>Lactococcus</i>	Coque	Diplo ou en chaine	Homolactique	23-53
<i>Pediococcus</i>	Coque	Tétrades	Homolactique	34-42
<i>Lactobacillus</i>	Bacille	Chaines	Homolactique Hétérolactique	32-53
<i>Bifidobacterium</i>	Varié	Variés	Acétique et lactique	55-67
<i>Streptococcus</i>	Coque	Chaines	Homolactique	34-46

2.1 Etudes de deux exemples de bactéries lactiques : (*Lactococcus* et *Leuconostoc*)

Lactococcus, *Leuconostoc*, ce sont des bactéries lactiques dont le rôle primaire fondamental est d'acidifier plus ou moins le lait selon le produit recherché d'obtenir l'égouttage et la synthèse voulu du caillé, dont le pH acide évite le développement des micro-organismes de contaminations ou entraîne une réduction de leur nombre (Martinet *et al.*, 1993).

Généralement ne sont pas pathogènes (Rescott *et al.*, 2007).

2.1.1 *Leuconostoc*

La famille des *leuconostocaceae* contient des coques, facultatifs pouvant être allongés ou elliptiques et dispersés par paires ou en chaînes. Les *leuconostocs* réalisent la fermentation hétérofermentaire en convertissant le glucose en acide lactique et éthanol ou en acide acétique, par la voie de la transacétolase.

Ils participent aussi donc à la constitution de l'arôme et de la saveur (Fredot, 2009). Ce genre a une classification bien détaillée :

Règne : Bacteria

Division : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Lactibacillales

Famille : Leuconostocaceae

Genre : *Leuconostoc*

Espèce : *Leuconostoc mesenteroid*

2.1.2 *Lactococcus*

La famille des *streptococcaceae*, ils se trouvent en chaînes ou en paires lorsqu'ils se développent en milieu liquide. Ce sont des chimiohétérotrophes qui fermentent les sucres en produit majeur de l'acide lactique mais pas de gaz ; ils réalisent donc une fermentation homolactique. Quelques espèces sont anaérobies plutôt que facultatives (**Prescott et al., 2007**). La classification de ce genre est bien déterminée comme suivant :

Règne : Bacteria

Division : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Lactibacillales

Famille : Streptococcaceae

Genre : *Lactococcus*

Espèce : *Lactococcus diacetylactis*

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

1. Objectif du travail

L'objectif de notre travail est d'étudier la cinétique de croissance des deux bactéries lactiques *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* .

2. Lieu et période de travail

Les travaux sont effectués au sein de laboratoire de Microbiologie et Technologie Alimentaire au niveau de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Ibn Khaldoun-TIARET- pendant une période allant du 14-04-2021 au 29-04-2021.

3. Matériel et milieux de cultures

Afin de réaliser ce travail on a utilisé le matériel ci-dessous :

3.1.1 Appareillages

- Balance analytique (SARTORIUS BASIC)
- Autoclave (SARTORIUS BASIC)
- Agitateur magnétique (STUART/SB162)
- Microscope optique (OPTIKA)
- pH mètre (HANNA)
- Incubateur à 30°C
- Spectre
- Centrifugeuse (HETTICH)
- Réfrigérateur (CONDOR)
- Pompe à vide

PARTIE EXPERIMENTAL

3.1.2 Verreries

- Becher de 50, 100, 300 et 1000 ml.
- Tubes à essai.
- Burette graduée.
- Pipette graduée.
- Flacons en verre.
- Boite de pétri.
- Lames.
- Cloches de Durham.

3.1.3 Autres matériel

- Bec bunsen.
- Anse de platine.
- Pince en bois.
- Bac de coloration.
- Portoir.
- Micropipette de 10 μ l
- Eppendorf

3.1.4 Produit chimiques

- Solution de NaOH (N/9).
- Phénolphtaléine.
- Alcool.
- Violet de Gentien
- Lugol.
- Fuchsine

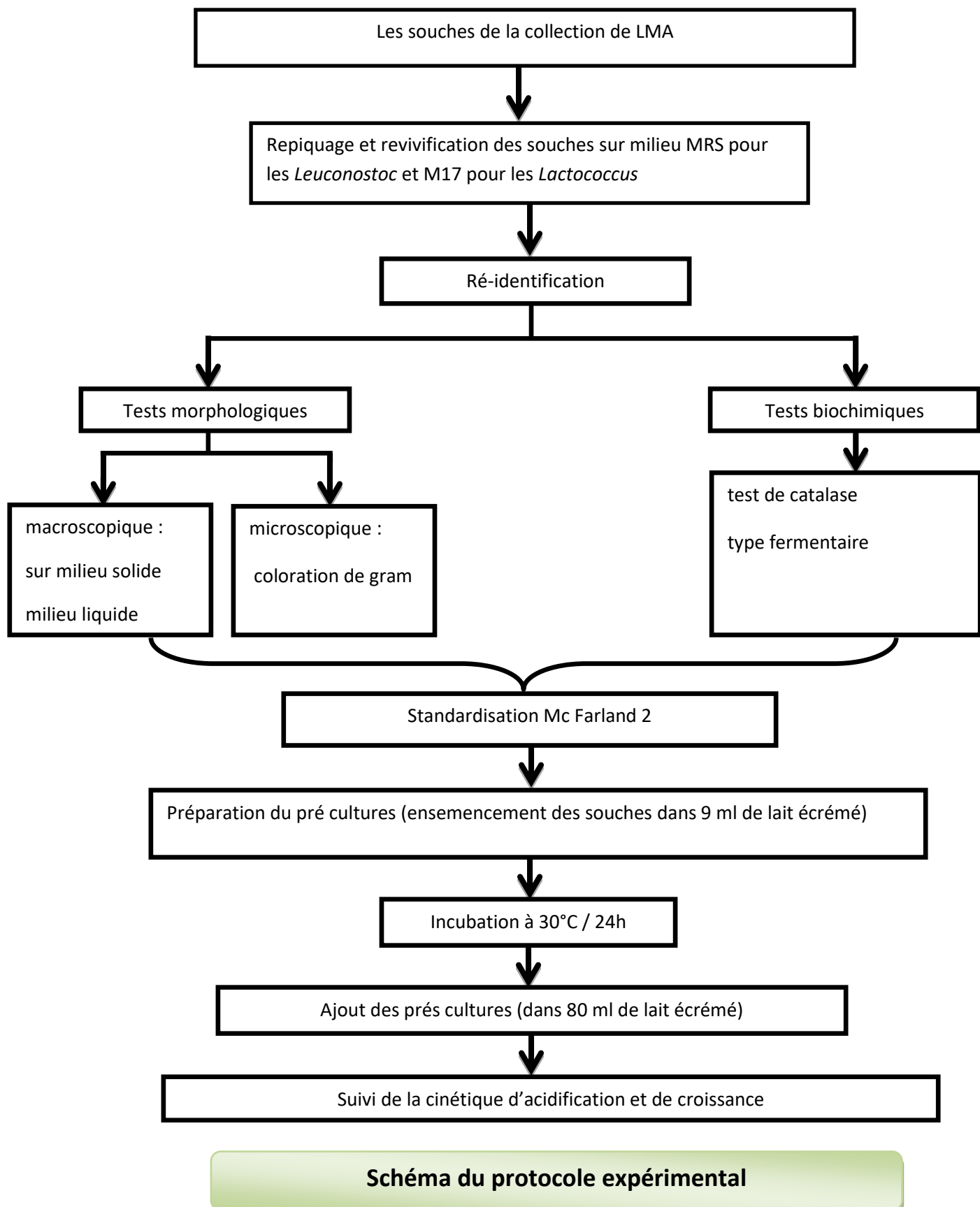
PARTIE EXPERIMENTAL

- Eau distillée.
- L'huile d'immersion
- L'eau oxygénée.
- Glycérol
- Extrait de levure

3.1.5 Milieux de cultures (voir annexe 1)

- Milieu MRS (solide et liquide)
- Lait écrémé.

4. Protocole expérimental



5. Méthodes

5.1 Prévenances des souches

Les 2 espèces bactériennes proviennent de la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'université d'Oran. Elles ont été isolées à partir du lait cru de vache provenant des fermes de la région ES-SENIA –Oran. Ont été conservées dans le Laboratoire de Microbiologie - faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Université Ibn Khaldoun-TIARET.

5.2 Repiquage et revivification des souches

Les souches utilisées sont sous forme congelées en cultures pures additionnées lait écrémé et glycérol. Elles sont activées et maintenues par repiquage selon **Guiraud, (1998)** de la façon suivante :

- prendre une goutte d'inoculum dans 5 ml de milieu de croissance, le plus souvent M17 bouillon pour les lactocoques et MRS pour les leuconostocs.
- Incubation à 30°C pendant 24h

Après croissance on procède à la purification sur milieu M17 et MRS solide (**Mathot et al., 1994**). Les cultures sont tous incubées à 30°C pendant 24 h à 48 h afin d'obtenir des colonies bien isolées.

La pureté des souches est confirmée par des observations microscopiques après coloration de Gram avec une recherche de la catalase après chaque repiquage.

5.3 Conservation des souches

5.3.1 Conservations à court terme

Les souches sont conservées dans le milieu MRS ou M17 solide incliné dans des tubes à essai stériles. Après ensemencement et incubation en conditions optimales de 30°C pendant 24 h, les cultures sont conservées au réfrigérateur à (+ 4°C) pendant trois à quatre semaines, ensuite elles sont repiquées pour renouveler la conservation (**Kihal, 1996**). (Annexe 3)

5.3.2 Conservations à long terme

On ensemence les souches dans un milieu à base liquide. Après incubation en conditions optimales, on centrifuge la culture jeune dans des tubes eppendorf à 30000 tours par minute pendant 10 minutes et on ajoute aux culots obtenues le mélange de (70%) lait écrémé et (30%) de glycérol pure puis congelées à (- 20°C) (**Badis et al. 2004**). (**Annexe 3**)

5.4 Tests morphologiques

5.4.1 Caractères macroscopiques

L'étude macroscopique permet de décrire les cultures bactériennes sur milieu solide et sur milieu liquide.

- **Sur milieu solide**

Cette étude consiste à décrire l'aspect, le contour, la surface, la couleur des colonies obtenues sur milieu MRS solide (**Delarras, 2004**).

- **Sur milieu liquide**

On révèle l'aspect de la culture et le type respiratoire

5.4.2 Caractères microscopiques

5.4.2.1 Coloration de gram

Selon la nature de la paroi, les bactéries sont distinguées en: Gram positif, dont les bactéries lactiques en font partie et en Gram négatif. La coloration de Gram a été réalisée selon le protocole décrit par (**Joffin et Leyral, 2006**).

- Réaliser un frottis bactérien et le fixer.
- Colorer au violet de gentiane durant environ 1 min.
- Laver à l'eau distillée.
- Faire agir la solution de lugol durant environ 30 secondes.
- Laver à l'eau distillée.
- Faire agir l'éthanol à 0.95 durant 10 secondes ou faire couler l'éthanol sur la lame jusqu'à la décoloration.

PARTIE EXPERIMENTAL

- Laver à l'eau distillée.
- Colorer à la fuchsine de quelques secondes à 1 min selon sa concentration.
- Laver à l'eau distillée.
- Observer après séchage à l'immersion (objectif x100) et à pleine lumière.

Les bactéries à Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement celles à Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

5.5 Test biochimique

5.5.1 Test de catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage. Sur une lame propre, déposer une goutte d'eau oxygénée puis ajouter une colonie bactérienne, une catalase positif est indiqué par le dégagement de bulles de gaz (**Delarras, 2014**)

5.5.2 Test de type fermentaire

Ce test permet de donner la nature de la fermentation des sucres: homolactiques ou hétérolactiques. On incube la souche dans le milieu MRS liquide contenant la cloche de Durham. Après incubation à 30°C pendant 24h, on observe un trouble et présence de gaz dans la cloche indique le métabolisme hétéro fermentaire (**Samelis et al., 1994**).

5.6 Test de coagulation du lait

Pour réaliser le teste de d'acidification et la croissance des souches données, on doit inoculer 9ml de lait écrémé (préparé et stérilisé) avec 1ml de l'inoculum de bactéries lactiques. L'incubation se fait à 30°C pendant 72 h (**Olasupo et al., 2001**)

5.7 Cinétique d'acidification

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH et d'autre part à doser simultanément l'acidité totale par la soude (**Larpent, 1997**). L'évaluation de l'acidité produite par les souche Ma1 et 19D standardisées à l'échelle de 2 Mac Farland (**annexe 2**), est réalisée selon (**Moulay et al. 2006**) comme suit :

- La souche estensemencée dans 5 ml de lait écrémé stérile

PARTIE EXPERIMENTAL

- Après incubation jusqu'à coagulation du lait à 37°C, le tout est transvasé stérilement dans 80ml de lait écrémé stérile et homogénéisé ;
- Le mélange est réparti dans des tubes stériles à raison de 10 ml/ tube et les cinétiques d'acidification sont réalisées aux intervalles réguliers 0h, 1h30, 3h, 4h30,...24h...

5.7.1 Mesure de l'acidité Dornic

L'acidité du lait est exprimée conventionnellement en degré Dornic.

Selon Moulay et al. (2006)

- Placer la solution de NaOH au 1/9ème mol.L-1 dans la burette ;
- Ajuster la burette à zéro ;
- Dans bécher contenant 9 ml de l'échantillon;

Ajouter :

- 3 gouttes de phénolphtaléine (à 5 %)
- Verser doucement la solution de NaOH jusqu'à apparition d'une coloration rose persistant plus de 30s

Relever le volume versé (noté V en ml)

Les résultats sont exprimés selon la relation : **Acidité en °D = V_{NaOH} X 10**

V_{NaOH}: volume de la soude coulée en ml.

L'acidité est exprimé en degré Dornic où 1°D = 0,1g/1 d'acide lactique.

5.7.2 Mesure de pH

Le pH est mesuré par un pH-mètre dont sa valeur est fonction de la concentration des ions hydronium présents dans la solution (**Larpen, 1997 ; Geoffrey, 2011**).

Etalonner l'appareil avec des solutions tampons (pH de 7 et 4), Dans un bécher contenant 9 ml de l'échantillon, Prolonger les électrodes du pH- mètre dans le bécher et faire la lecture lorsque l'afficheur est stable (**AOAC, 2002**)

5.8 Cinétique de croissance

La cinétique de croissance a été déterminée par la technique de micro-spot. Est une technique permettant de quantifier à l'œil nu le nombre d'unité formant colonies (UFC). On effectue des dilutions successives au dixième dans l'eau distillée et on dépose 10µl de chaque dilution bactérienne (spot) sur une surface de gélose MRS, chaque spot est reproduit quatre fois. Après séchage des micro-spots, la boîte est ensuite retournée puis incubée à l'étuve à 30°C pendant 24h. Les micro-spots contenant 3 à 60colonies sont dénombrés (**Bulard, 2012**).

Résultats et discussion

1. Caractérisation des souches de la collection

1.1 Caractères morphologiques

Cette étude permet la ré-identification du genre des souches étudiées *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (19D) et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (Ma1).

1.1.1 Caractères macroscopiques

L'observation macroscopique du développement des deux bactéries dans le milieu MRS et M17 liquide, apparaissent sous forme de trouble concentré au fond du tube, dû au caractère anaérobie et micro-aérophiles des bactéries lactiques (**Figure 1**).

Sur milieux M17 et MRS solide, les isolats ont données des colonies lenticulaires parfois circulaires, de petites tailles d'environ 1 mm de diamètre, légèrement jaunâtre, à pourtour régulier et lisse (**Figure2 et 3**).

1.1.2 Caractère microscopique

L'observation microscopique a montré que ces souches sont Gram + s'apparaissent sous forme de coques placées soit en paire soit en chainettes (**Figure 4**) et (**Figure5**), le **Tableau 3** montre les aspects morphologiques des souches étudiées.

Tableau N°3 : Aspects morphologiques des bactéries étudiés 19D et Ma1.

Souches	Gram	Catalase	Forme	Arrangement
19D	+	-	Coques	En chainette et en diplo
Ma1				

Ces résultats sont identiques à celles mentionnées par **Badis et al. 2004** qui montrent que les bactéries lactiques *Lactococcus* et *Leuconostoc* sont G+ sous forme des coques associés en diplocoques ou en courte chainette.

RESULTATS ET DISCUSSION



Figure 01: Apparition du trouble qui montre la croissance bactériennes lactiques 19D et Ma1 en milieu MRS liquide.

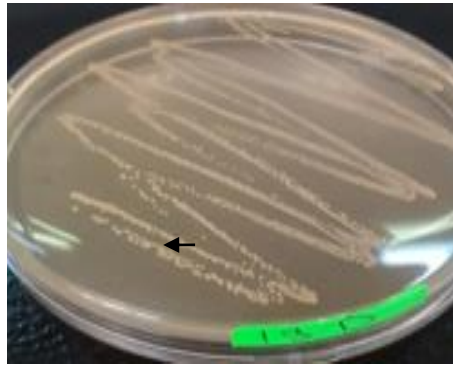


Figure 02 : aspect des colonies de culture pure des bactéries *Leuconostoc* après incubation à 30°C pendant 24h sur milieu MRS.

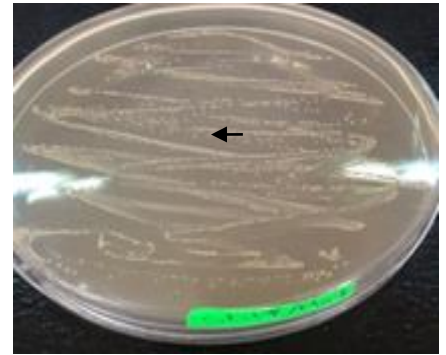


Figure 03: aspect des colonies de culture pure des bactéries *Lactococcus* après incubation à 30°C pendant 24h sur milieu MRS.

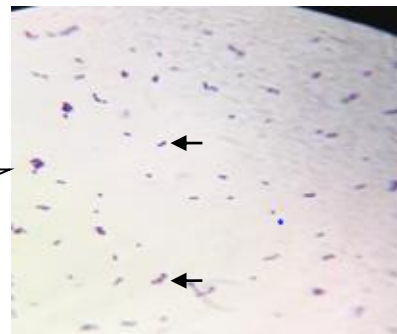
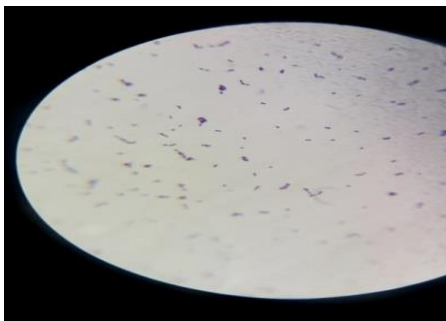


Figure 4 : Aspect microscopique et arrangement du Ma1 après coloration de Gram (objectif X100).



Figure 5 : Aspect microscopique et arrangement du 19D après coloration de Gram (objectif X100)

2. Tests biochimiques

2.1 Type fermentaire

Nos résultats ont montré que la souche de *Leuconostoc mesenteroides* 19D a produit du gaz en présence de glucose, en revanche, la souche de *Lactococcus lactis* est incapable de le produire.

Ces caractéristiques concordent à celles décrites par **Moulay, 2005** qui montrent que ce test est effectué pour déterminer les différents types fermentaire entre les souches hétérofermentaires (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) et homofermentaires (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*) et de les classées.

2.2 Dosage de l'acidité et pH

L'acidité titrable du lait correspond à la titration par l'hydroxyde de sodium en présence de phénol phtaléine comme indicateur colorée. La présence de ce dernier indiquera la limite de neutralisation par changement de couleur qui devient rose pale (**Fanni et Novak, 1987**).

Le pH du lait normal de vache est de l'ordre de 6.7, le milieu aqueux contient plus d'ions (H₃O⁺) que des ions de (OH⁻). Cette valeur est due en grande partie au groupement basique ionisable et acide dissociable des protéines (**Jaque, 1998**). Les résultats sont interprétés dans le tableau 4

On remarque d'après nos résultats que l'acidité augmente par contre le pH est inversement proportionnel à l'évolution du nombre des cellules bactériennes.

Tableau N°4 : Mesures du pH et de l'acidité dornic du lait coagulé

	pH	Acidité Dornic
T ₀	5.44	10
T ₁	5.39	21
T ₂	5.34	27
T ₃	5.31	31
T ₄	4.90	33
T ₅	4.91	36

RESULTATS ET DISCUSSION

Remarque importante

Ce résultat n'était pas fiable à cause de l'acidité de pH de l'eau distillée utilisée

pH (eau distillée)=5.71

Après l'incubation des boîtes à 30°C pendant 24h on a observé l'apparition des colonies de cultures pures des bactéries étudiées *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* et *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* (**Figure 6**)

On a dénombré les colonies selon (**le tableau 5**)

Tableau 5 : Dénombrement des colonies après 24h d'incubation

Dilutions	10 ⁻⁴		
T ₀	26	37	33
T ₁	83	86	78
T ₂	74	89	83
T ₃	69	88	65
T ₄	46	63	45
T ₅	52	61	36

Les résultats indiqués dans **le tableau 5** sont interprétés dans le graphe ci-dessous (**Figure 7**).

Avant la réalisation du graphe on doit passer par les calculs suivants (**Tableau 6**)

Tableau 6 : Calculs de la moyenne du dénombrement des colonies et N et Log N.

/	Moyenne	N	Log N
T ₀	34.6	34.6×10 ⁶	7.5
T ₁	82.3	82.3×10 ⁶	7.9
T ₂	82	82×10 ⁶	7.9
T ₃	74	74×10 ⁶	7.8
T ₄	51.3	51.3×10 ⁶	7.7
T ₅	49.6	49.6×10 ⁶	7.6

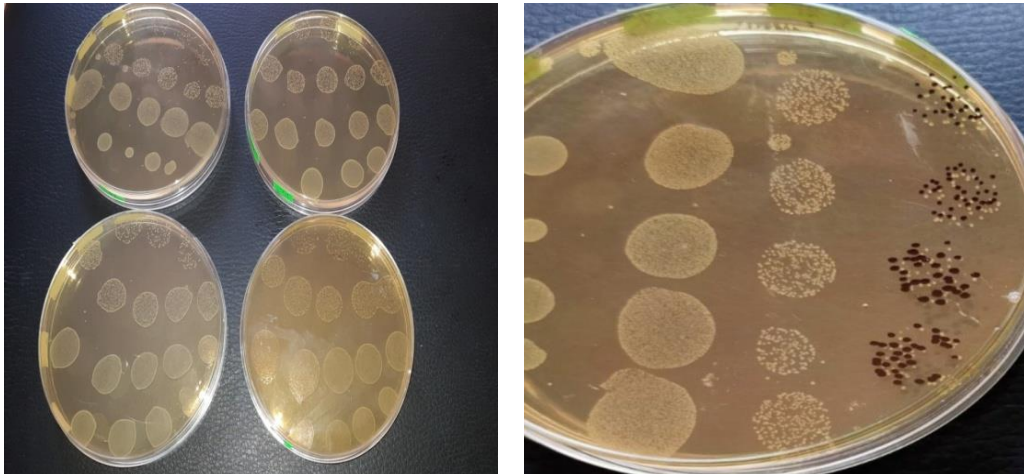


Figure 6 : Aspect microscopique des colonies de culture pure de 19D et Ma1 après incubation de 24 h.

2.3 Cinétique de croissance

2.3.1 Comparaison entre une courbe de croissance bactérienne normale et celle de nos résultats.

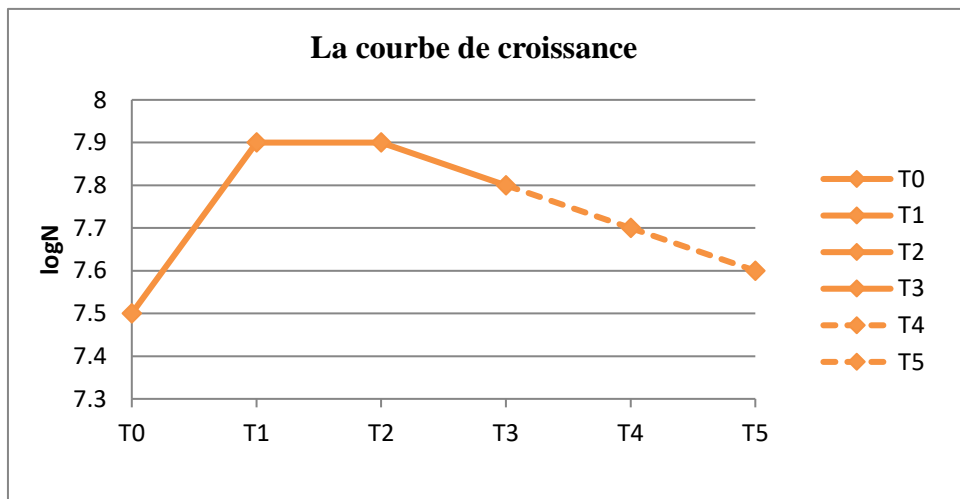


Figure 7: La courbe de croissance de Ma1 et 19D.

2.3.2 Interprétation des résultats de la courbe de croissance des deux souches

D'après les résultats obtenus, on remarque que la phase de latence n'est pas indiquée, ce qui résulte que cette phase a été faite durant l'incubation des levains préparés. Après la phase de croissance exponentielle $[T_0-T_1]$, elle s'est déclenchée à T_0 dont le nombre de bactéries augmente, cette augmentation est due à la croissance de ces dernières, durant cette phase le taux de croissance atteint un maximum ($\mu=\max$) (voir annexe 03).

$$\mu = \frac{\log N - \log N_0}{t \cdot \log 2} = \frac{7,7 - 7,5}{0,75 \cdot \log 2} = 0,89 \text{h}^{-1}$$

$$\mu (\max) = 0,89 \text{h}^{-1}$$

Après ça on aura une phase stationnaire $[T_1-T_2]$: durant cette phase on remarque une stabilité au niveau du nombre des bactéries, les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent, et en dernier lieu la phase de déclin $[T_2-T_3]$: on remarque durant cette phase la diminution de nombre des bactéries, ce qui indique la phase de mortalité de ces dernières.

D'après les études de **Moulay 2005** les résultats de la cinétique de croissance ont montré que les cultures pures de *Leuconostoc mesenteroides* (19D) et de *Lactococcus lactis* (Ma1) donnent un taux de croissance de 0,49 et 0,12 h⁻¹ respectivement et cela en milieu lait sans extrait de levure. En revanche la croissance des deux espèces en culture mixte sans distinction des espèces donne un taux de croissance légèrement élevé qui est de 0,53 h⁻¹. En milieu synthétique MRS ou M17, ce taux de croissance est pratiquement identique chez les espèces de *Leuconostoc mesenteroides* qui est due à la richesse du milieu synthétique par les éléments nutritifs et par les facteurs de croissances (**Courtin et al., 2002**).

L'ajout de l'extrait de levure peut être la cause de taux de croissance trouvé élevé.

Selon **Hadadji et al., (2005)** ont montré que les espèces de *Bifidobacterium* d'origine humain ont un taux de croissance similaire qui varie de 0,24 h⁻¹ à 0,4 h⁻¹ lorsqu'elles sont cultivées en milieu lait écrémé. **Chambellon et Yvon (2003)** ont

RESULTATS ET DISCUSSION

trouvé un taux de croissance identique chez les espèces lactocoques ($\mu = 0,32$ à $0,48 \text{ h}^{-1}$). Ces derniers chercheurs ont étudié la relation entre le taux de croissance et la nature de la source d'azote et l'acide aminé. Le taux de croissance maximum peut varier de $0,15 \text{ h}^{-1}$ à $0,58 \text{ h}^{-1}$. Ils ont démontré que le taux de croissance en milieu lait est fortement lié à la capacité des lactococques à produire des protéases en milieu lait.

Depuis la première description de **Buchanan (1918)**, il est classique de distinguer plusieurs phases dans la croissance des cultures bactériennes. Ces phases sont caractérisées par certaines valeurs ou variations de la vitesse de multiplication de la culture.

La croissance d'une bactérie s'étudie en milieu liquide ou bien en milieu solide. Il existe 5 phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance.

Cette croissance débute par la phase de latence durant laquelle le taux de croissance est nul ($\mu = 0$), la durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu. C'est la phase durant laquelle la bactérie s'adapte. Après l'adaptation de ces souches, la phase de croissance exponentielle commence dans cette période le taux de croissance atteint son maximum ($\mu = \text{max}$). Cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante. Ensuite, la phase de ralentissement apparaît, la vitesse de croissance régresse, il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets. Il existe un début d'autolyse des bactéries, cette dernière est poursuivie par la phase stationnaire là où le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent. Il se produit une modification de l'expression des gènes.

Finalement on aura la phase de déclin ; le taux de croissance est négatif

($\mu < 0$). Toutes les ressources nutritives sont consommées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes

Conclusion

CONCLUSION

Conclusion

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire afin d'exploiter leur pouvoir acidifiant et aromatisant (fabrication de fromages). Ces bactéries ont la capacité de synthétiser des substances à effet inhibiteur, ce qui a attiré l'attention des chercheurs dans les dernières années afin de les utiliser comme bio conservateurs et d'augmenter la durée de conservation des denrées alimentaires. Les lactocoques et leuconostocs sont très largement étudiés et considérés comme micro-organismes modèles des bactéries lactiques

Le travail a été réalisé en utilisant les deux souches Ma1 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*), et 19D (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) de la collection de LMA après avoir fait le repiquage et la revivification de ces dernières.

Les résultats obtenus lors de cet étude confirment que les ferments lactiques ré-identifiés sont tous G+ sous forme des coques associés en diplocoques ou en courte chaînette, catalase -, hétérofermentaire pour les leuconostocs et homofermentaire pour les lactocoques.


Tous ces tests ont été succédés par le suivi de la croissance bactérienne qui est l'objectif de ce travail, ce dernier a été réalisé par la méthode de « Microspots », elle est moins coûteuse et plus rapide que les autres méthodes.

L'étude de la cinétique d'acidification et de croissance montre que l'acidité augmente proportionnellement avec l'augmentation du nombre de cellules par contre le pH est inversement proportionnel à l'évolution du nombre des cellules bactériennes.


References bibliographiques


Références bibliographiques

A

 **AOAC. (2002):** Official Methods of Analysis 17th. Ed Gaitherbaury.USA

B


 **Badis A, D. Guetarni, M. Kihal et M.W. Naceur., 2004.** Etude physiologique des bactéries lactique isolées du lait cru de chèvre de la race Ouled Djellal. Journal algérien des zones arides. PP: 15-19.


 **Bekhouche et Boulahrouf. (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 C – N°23,38-45..


 **(Bulard, 2012).**xxxxxx

 **Buchanan (1918),**


C


 **C.D.E.L.P.C., 2000.** Centre d'enseignement laitier par correspondance. Lexique .Ecole nationale d'industrie laitière et des industries agro-alimentaires. p 61-105.


 **Chambellon E et Yon M., 2003.** Cod Y – Regulated Aminotransferases Ara T and β cat T play a major role in the growth of *Lactococcus lactis* in milk by regulating the internacellular pool of Amino Acides, *Appl. Environ. Microbiol.*, 3061- 3068.

 **Courtin P, Monnet V et Rul F., 2002.** cell-wall proteinases prt S and prt B have a different role in *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiol.* 148, 3413- 3421.


D

 **Delarras C., 2004.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. ED: Tec et Doc, Lavoisier, Paris. PP: 110-394.

 **Delarras, Camille. (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire ? recherche de bactéries et de levures-Moisissures. Editions Lavoisier, pp : 65-66-67-111-113-11


 **Fredote., 2009.** Lait et produits laitiers. In : Connaissance des aliments. *Ed* : Tech et Doc. Lavoisier. Paris. p 9-65.

G


 **Geoffrey C.P. (2011):** Food Science and Technology. Ed: John wiley& Sons .USA.P 520.


 **Guiraud J .P . (1998).** Microbiologie des principaux produits alimentaires, Microbiologie alimentaire. Ed Dunod, Paris

H


 **Hadadji M, Benaama R, Saidi N, Henni D et Kihal M., 2005.**Identification of cultivable *Bifidobacterium* species isolated from breast-fed infants faeces and their technological properties for potential use as a probiotic cultures. *Afr. J. Biotechnol.*4 (5), 422 – 430.

J

 **Joffin J. N., Leyral G. (2006):** Microbiologie techniques, Ed: Doc, Bordeaux. PP : 75-239.


 **Journal Officiel Algérien N° 69 Du 27 Octobre 1993.** Arrête interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 aout 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation. p. 16 (N° JORA : 069 du 27-10-1993)


K


 **Kihal M., 1996.** Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostocmésentéroides*, éléments d'application en technologie fromagère type fromage bleu. Thèse de Docteur D'état. Université d'Oran.


L

 **Larousse agricole, 2002 :** p 767


 **Larpent J.Pet M. Larpent-Gourgaud., 1997.** Mémento technique de microbiologie. 3^{eme} edition.ED: Tec et Doc, Lavoisier, Paris.PP: 76-492.


 **Leveau J.M., et Bouix M., 1993.** Microbiologie Industriel. Tome : 1. Ed : Tec et Doc Lavoisier. Paris. p 171-172


 **Luquet F.M., et Roissard H., 1994.** Les laits fermentés par les bactéries lactiques in « Bactéries lactiques ». Tome 2. Ed : Doc et Tec. Lavoisier. P 614.


 **Luquet F.M., 1985.** Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre) tome 1 : les laits de la mamelle a la laiterie. Ed : Tec et Doc. Lavoisier Paris, p 261

M


 **Martinet J et L.M. Houdebine., 1993.** Biologie de lactation. ED:Inserm. Paris PP: 546-549.

 **Method A.G, M. Kihal, H. Presvost, C. Diviese., 1994.** Selective enumeration of *Leuconostoc* on *Vancomycine* agar media. Inter. Doiry. J.P. PP: 459-469


 **Moulay.M,H. Aggad, Z. Benmechernene, B. Guessas, D.E. Henniet M. Kihal., 2006.** Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and their roteolytic activity, World journal of Dairy and Food. Sciences 1(1). PP: 12-18.

 **Moulay.M., 2005.** Etude de la flore lactique protéolytique du lait cru de chèvre de la collection du laboratoire de microbiologie appliqué. Thèse de magistère. Université d'Oran. P:65.


O

 **Olasupo, N. A., Schillinger, U., and Holzpafel, W. H. (2001).** Studies on some technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from Nigerian fermented foods. Food Biotechnol. 15, 157–167. doi: 10.1081/FBT 100107627

P

 **Prescott.M., Harley J.P., et Klein.A., 2007.**Les bactéries : les grams positifs pauvres en GC .In : Microbiologie. 3éme Ed française (Paris). p 529-530

S

 **Samelis J, F.Maurogenokis et J. Metaxoponolos., 1994.** Characterization of lacticacidbacteria isolated from naturally grec dry salami, International of food microbiology 23. PP176-196

Annexes

Annexe 01

Préparation des milieux de culture :

Pour préparer le milieu MRS solide on aura besoin de 62g de MRS AGAR dans 1000 ml de l'eau distillée.

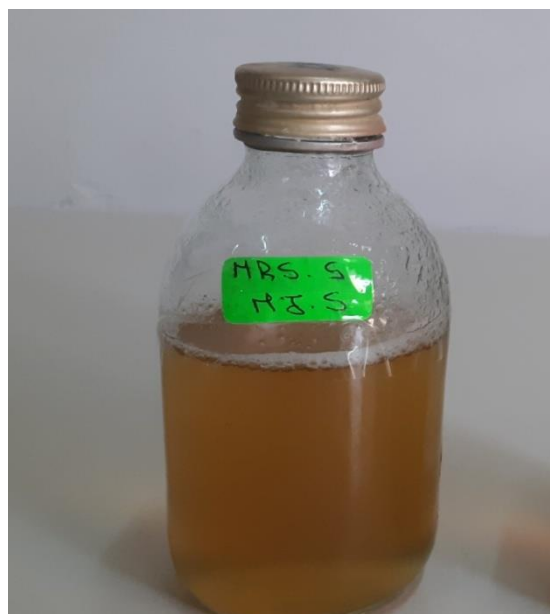
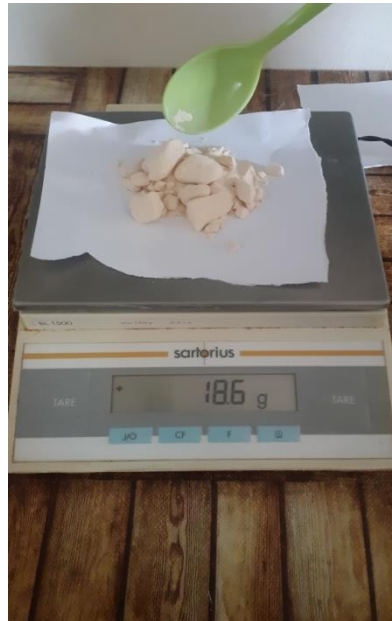
Nous avons réalisé la préparation selon le calcul suivant :

$$62\text{g} \longrightarrow 1000\text{ml}$$

$$X \longrightarrow 300\text{ml}$$

$$X = 18.6\text{g}$$

Après ça on met le mélange sur l'agitateur magnétique jusqu'à l'ébullition.



Pour préparer le milieu MRS liquide on aura besoin de 52g de MRS BROTH dans 1000 ml de l'eau distillée.

Nous avons réalisé la préparation selon le calcul suivant :

52g \longrightarrow 1000ml

X \longrightarrow 300ml

$$X = 15.6g$$

Après ça on met le mélange sur l'agitateur magnétique jusqu'au on aura un mélange homogénéisé.



Pour préparer le milieu M17 solide on aura besoin de 55g de M17 AGAR dans 1000 ml de l'eau distillée.

Nous avons réalisé la préparation selon le calcul suivant :

55g \longrightarrow 1000ml

X \longrightarrow 300ml

$$X = 16.5g$$

Après ça on met le mélange sur l'agitateur magnétique jusqu'à l'ébullition.

Annexe 02

Standardisation McFarland

En microbiologie, les normes McFarland sont utilisées comme référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes pour que le nombre de bactéries se situe dans une gamme de concentrations donnée afin de normaliser les tests microbiens.

Une solution standard est une solution dont la composition est connue avec exactitude. On la prépare en dissolvant une quantité précise de soluté de grande pureté dans un liquide afin d'obtenir un volume précis de solution.

On a pris 1ml de l'inoculum bactérien dans 9ml de l'eau distillée, puis à l'aide de spectrophotomètre on a réalisé les calculs.

Solution standard 2,0 Mc Farland

Chlorure de baryum solution de 0,048M2,0 ml

Acide sulfurique, solution de 0,18M98,0 ml

D.O. à 625 nm au spectrophotomètre.....0,32-0,4

2.3.2 Standardisation McFarland

Dans le but de trouver l'intervalle de la charge microbienne des souches étudiés, on doit réaliser la standardisation à l'aide du spectrophotomètre sachant que cet intervalle est [0.32_0.4] on a eu les résultats ci-dessous :

19D=0.38

Ma1=0.34

Annexe 03



Conservation à court terme



Conservation à long terme

μ (max)

On réalise le calcul de μ (max) comme suivant :

$$\mu = \frac{\log N - \log N_0}{t \cdot \log 2}$$

On a : $\log N = 7,7$

$\log N_0 = 7,5$

$t = 45 \text{ min} = 0,75 \text{ h}$

Donc : $\mu = \frac{7,7 - 7,5}{0,75 \cdot \log 2} = 0,89 \text{ h}^{-1}$

$$\mu \text{ (max)} = 0,89 \text{ h}^{-1}$$

Résumé

Cette étude a permis de connaître les étapes essentielles d'un bon suivi de la cinétique de croissance bactérienne, par l'addition des levains lactiques « *Leuconostoc* et *Lactococcus* » sur milieu lait écrémé.

Les tests morphologiques (macroscopiques et microscopiques) ont montré que les deux souches sont à Gram+ regroupées en chaînette et en diplocoque, catalase- ; la souche Ma1 est une bactérie homofermentaire et 19D hétérofermentaire.

Il existe une relation étroite entre le pH et le degré Dornic ; quand le pH diminue la quantité d'acide lactique produite augmente.

Ces tests ont été succédé par le suivi de la croissance qui, ce dernier a été réalisée par la méthode de « Micro-spots ».

Mots clés : Bactéries lactiques, *Leuconostoc*, *Lactococcus*), identification, cinétique d'acidification, cinétique de croissance, micro-spots.

Abstract

This study made it possible to know the essential steps of a good follow-up of the bacterial growth kinetics, by the addition of lactic starters "Leuconostoc and Lactococcus" on skimmed milk medium.

Morphological tests (macroscopic and microscopic) showed that the two strains are Gram + grouped together in chain and diplococcus, catalase-; the Ma1 strain is a homoferment and heterofermentative 19D bacterium.

There is a close relationship between pH and Dornic degree; when the pH decreases the amount of lactic acid produced increases.

These tests were followed by growth monitoring, which was carried out by the "Micro-spots" method.

Key words: Lactic acid bacteria, (*Leuconostoc*, *Lactococcus*), identification, acidification kinetics, growth kinetics, micro-spots.

ملخص

أتاحت هذه الدراسة معرفة الخطوات الأساسية للمتابعة الجيدة لحركية نمو البكتيريا ، من خلال إضافة مقبلات اللبن على وسط الحليب منزوع الدسم .

أظهرت الاختبارات المورفولوجية (العيانية والميكروسكوبية) أن السلالتين هما جرام + مجمعة معًا في سلسلة هي بكتيريا 19 د متجانسة التخمر وغير متجانسة Ma1 ومكورة ثنائية ، الكاتلاز- ؛ سلالة

هناك علاقة وثيقة بين درجة الحموضة ودرجة دورنيك. عندما ينخفض الرقم الهيدروجيني ، تزداد كمية حمض اللاكتيك المنتجة.

وقد أعقب هذه الاختبارات مراقبة النمو والتي أجريت بطريقة "البقع الدقيقة".

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك التحديد ، حركية التخمير ، حركية النمو ، البقع الدقيقة

