II. Résultats et discussion

II.1. Isolement des bactéries lactiques :

Plusieurs souches ont été sélectionnées à partir des échantillons par les tests préliminaires décrits ci-dessous. A partir de ces 9 échantillons, différents bactéries lactiques ont été isolées:

Echantillons de klila séchée : 9 souches

Echantillons de klila fraiche : 3 souches

Le lait cru : 4 souches

Raibe : 10 souches

II.1.1. Etude macroscopique :

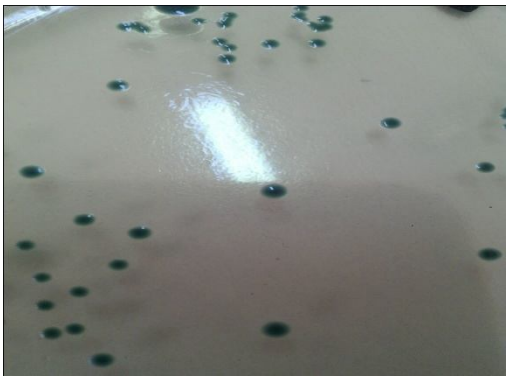
Les cultures obtenues sur les boites de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies **(Badis et *al*., 2006)**.

Les bactéries lactiques ont été isolées sur deux milieux sélectifs : le milieu MRS additionné de vert de bromocresol et le milieu M17. Les colonies sont de formes, circulaires, lisses, bombées régulières et irrégulières, de couleur blanchâtre, verts, crémeuses, leur taille environ 0,1 à 3 mm de diamètres **(Kihal, 1996 ; Carr et *al*., 2002).**

L'examen macroscopique des cultures sur milieux MRS au vert bromocrésol montre des : colonies vert foncé, vert clair, colonies transparente et transparente centre vert et colonie vert centre noir.

Après l'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.

L'examen macroscopique des cultures sur milieux M17 montre des colonies blanchâtre et crémeuse. (**Planche 2** , **Tableau 3**)



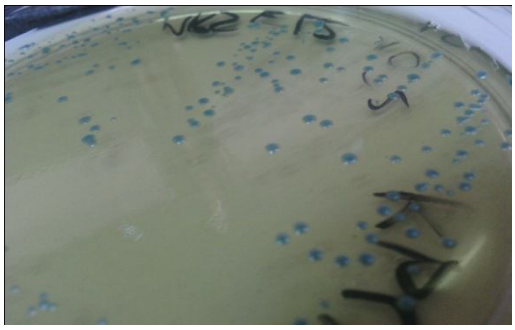
Colonie vert foncé (MRS)



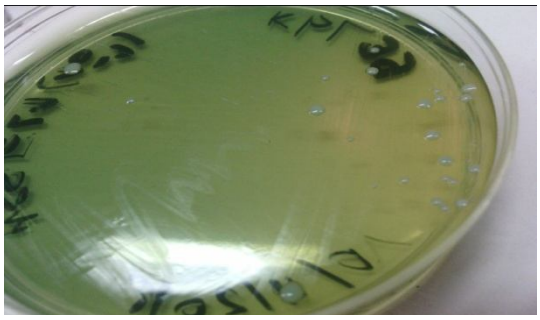
Colonie transparente (MRS)



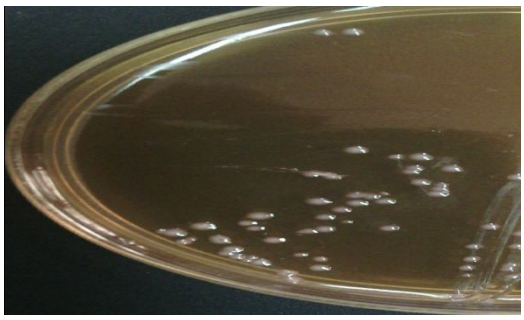
Colonie transparent centre vert (MRS)



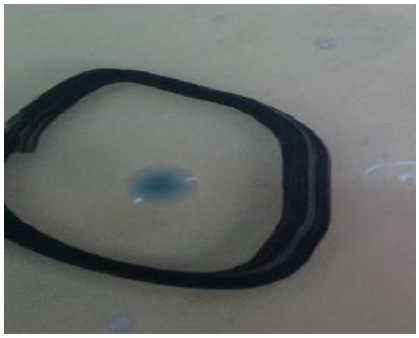
Colonie vert clair (MRS)



Colonie blanchâtre sur milieu MRS



Colonie blanchâtre sur milieu M17



Colonie vert centre noir (MRS)

Planche 2 : Aspect des colonies des bactéries lactiques après une mise en culture sur milieux solides MRS au vert de bromocresol et M17.

II.1.2. Etude microscopique :

La caractérisation microscopique est basée sur la coloration de Gram. La forme des bactéries et leur affinité pour les colorants constituent la base de leur classification. 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×100) avec l'huile à immersion, où on a pu observé que les bactéries étaient Gram positives apparaissant généralement sous formes de coques, bacilles et coccobacille,(**planche4**) et leur modes d'associations généralement en chaînette, en amas, en double, en triple, tétrade ou bien isolée. Le tableau 5 présente les résultats de l'examen microscopique des isolats.

II.1.3. Test de Catalase :

L'activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau, par la mise en contact des colonies avec quelques gouttes d'eau oxygénée **(Guiraud, 2003)**.

Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester **(Guiraud, 2003)**. La Planche03 represente le résultat de ce test.

Toutes les souches lactiques isolées sont à catalase négative car l'absence de dégagement gazeux (O2), ce qui nous oriente à déduire que les souches isolées sont des bactéries lactiques les résultats sont résumés dans le tableau 3.

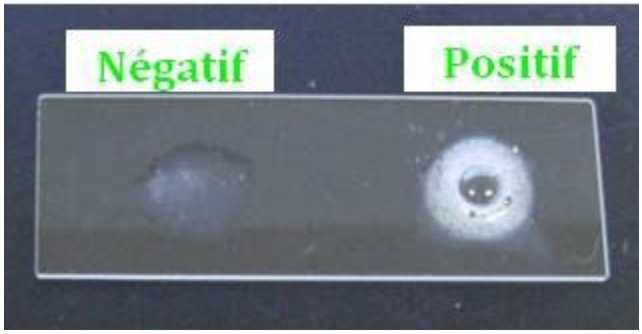


Planche 3: Test de catalase

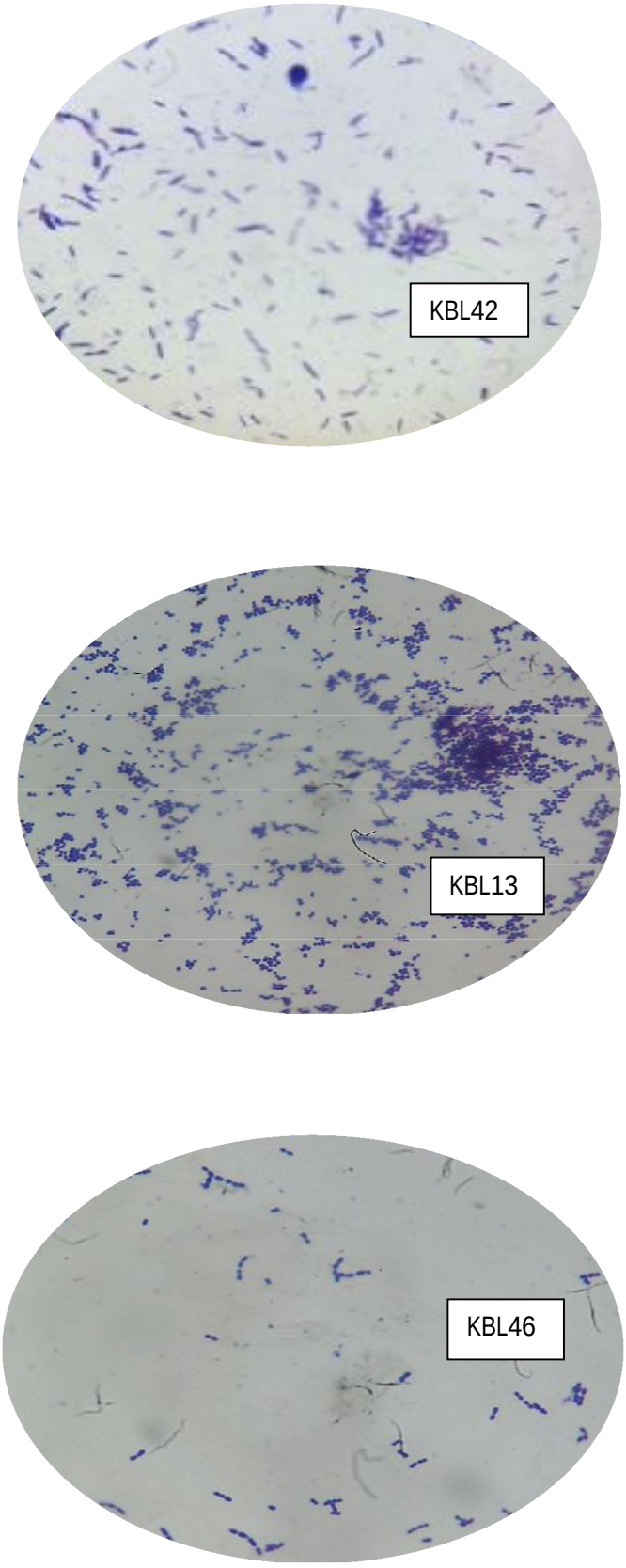


Planche 4: Représentation de l'observation au microscope optique (x100) des bactéries lactiques après coloration de Gram.

Tableau03: résultats de test catalase et l'aspect miroscopique et macroscopique des isolats lactiques.

Souche	Origine	Aspect macroscopique	Teste de catalase	Coloration de Gram	Observation microscopique:forme/ regroupement
KBL1	EK1 MRS 10^{-4}	petites colonies, vert claire régulière, de 1mm de diamètre avec virage de milieu au jaune	négative	+	Cocci, isolée, en amas, en chênette
KBL2	EK1 MRS 10^{-4}	petite colonie, vert foncé, régulière, de 2mm de diamètre avec virage de milieu au jaune	négative	+	Cocobacille, isolée, en amas, en chênette
KBL13	EK4 MRS 10^{-1}	Petite Colonie blanche, virage de milieu au jaune	négative	+	Cocci , isolée ,en amas
KBL15	EK4 MRS 10^{-3}	Petite Colonie blanche au centre vert, virage de milieu au jaune	négative	+	Cocobacille , isolée, en amas, en chênette
KBL17	EK4 M17 10^{-4}	Colonie blanche ronde, lisse et régulière	négative	+	Cocci, isolée, en amas, en chênette
KBL20	EK5 MRS 10^{-1}	Colonie blanche centre vert, virage de milieu au jaune	négative	+	Cocobacille , isolée, en amas, en chênette
KBL22	EK6 MRS 10^{0}	Colonie blanche centre vert, 1mm de diamètre, virage de milieu au jaune	négative	+	Bacille,Isolée, diplobacille, en amas, en long et courte chaine
KBL23	EK6 MRS 10^{0}	Colonie blanche centre vert, 1mm de diamètre, virage de milieu au jaune	négative	+	*Cocobacille,* Isolée, en double et en chainette
KBL29	EK6 M17 10^{0}	Petite Colonie blanche	négative	+	*Cocobacille,* Isolée, en double et en chainette
KBL31	EK7 MRS 10^{0}	Petite Colonie blanche, virage de milieu au jaune	négative	+	*Cocobacille,* Isolée, en double et en chainette

KBL37	EK8 MRS 10^{-3}	Colonie blanche centre vert, 3mm de diamètre, virage de milieu au jaune	négative	+	Cocci, isolée, en amas, en chênette
KBL38	EL MRS 10^{0}	Petite Colonie vert, virage de milieu au jaune	négative	+	*Cocobacille,*en amas ,isolée , en Chaînette .
KBL39	EL MRS 10^{-1}	Colonie blanche centre vert, virage de milieu au jaune,	négative	+	*Cocobacille,* Isolée, en double et en chainette, en amas
KBL41	EL MRS 10^{-4}	Petite Colonie blanche	négative	+	Cocci, isolée, en amas, en chênette
KBL42	ELR MRS 10^{0}	Colonie blanche centre vert, virage de milieu au jaune,	négative	+	Bacille,Isolée, diplobacille et en chaine
KBL44	ELR MRS 10^{-2}	Colonies vert de taille différente, virage de milieu au jaune,	négative	+	Bacille,Isolée, diplobacille et en chaine
KBL45	ELR MRS 10^{-3}	Colonies vert de grand taille, virage de milieu au jaune,	négative	+	Cocci, isolée, en amas, en chênette
KBL46	ELR MRS 10^{-4}	Colonie blanche centre vert , bombé, virage de milieu au jaune	négative	+	*Cocobacille* , en diplo ,en amas ,isolée , en Chaînette
KBL47	ELR MRS 10^{-4}	Colonie blanche centre vert , virage de milieu au jaune	négative	+	*Bacille,en diplo ,en amas ,isolée*, en Chaînette
KBL48	ELR M17 10^{-2}	Petites Colonies blanche	négative	+	Cocci, isolée, en amas, en chênette
KBL49	ELR M17 10^{-3}	Petites Colonies blanche	négative	+	*Cocobacille* , en diplo ,en amas ,isolée , en Chaînette
KBL50	ELR M17 10^{-4}	Colonie blanche de grand taille	négative	+	*Cocobacille* , en diplo ,en amas ,isolée , en Chaînette
KBL52	EK8 M17 10^{-2}	Colonie blanche , 3mm .	négative	+	*Cocobacille* , en diplo ,en amas ,isolée , en Chaînette ,

Un premier souchier de 52 isolats lactiques a été constitué 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 cocobacilles à Gram positif et catalase négative), 23 isolats considérés comme étant des bactéries lactiques sont retenus pour une identification. Ils sont désignés par un code composé de lettre et de numéro.

L'observation microscopique des 23 souches après coloration de Gram a identifié 52% isolats de forme cocobacille et 26% de forme cocci et 22% de forme bacille. (Figure 3)

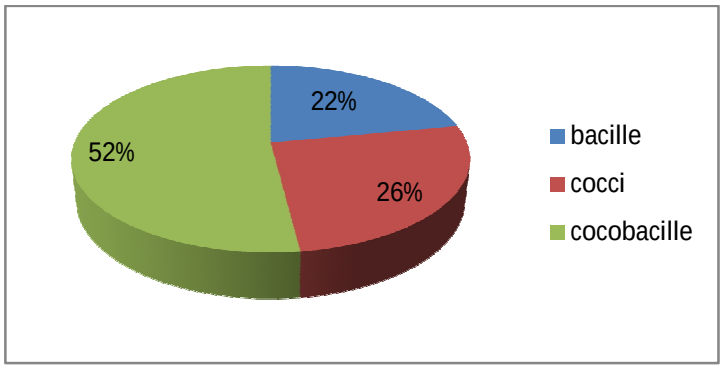


Figure 3: Représentation graphique de la forme des bactéries lactiques isolées.

II.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 4**.

II.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 (74%) sont homofermentaires qui fermentent le sucre en lactate sans produire du gaz, et les autres souches (26%) sont hétérofermentaires, où il y a un dégagement de gaz qui va poussée la cloche de Durham vers le haut (planche 5). La production de gaz se manifeste par le flottement de la cloche qui est vidé du milieu **(Kheddid et *al*., 2009)**.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le **tableau4**.

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de *lactocoques*, *pediocoques*, ainsi que certains *lactobacilles*. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. **(Thompson et *al*., 1994)**.

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO_2 sont dites hétérofermentaires. . Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc* et certains *lactobacilles*. **(Thompson et *al*., 1994).** *Leuconostoc* sont incapables de dégrader l'arginine ce qui leurs distinguent des *lactobacilles* hétérofermentaires **(Gonzalez et *al*.,2007)**.

II.2.2. Croissance à différentes températures 4°C, 15°C, 30 °C et 44°C :

La croissance est appréciée par un trouble du milieu après l'incubation en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (planche 5) :

Parmi les 23 souches isolées, on à 13 des 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 laitières comme (Jben).

La plus part des souches poussent à température 15, 30 et 30C°, ce qui assure que ces souches sont mésophiles en générales, conditions souvent utilisées dans la conservation de klila.

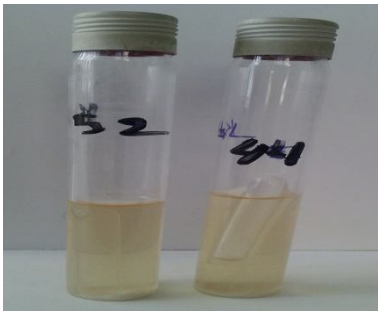
Les résultats obtenus montrent que 6 souches sont des thermophiles est peuvent pousser à 44 °C (Tableau 4).

II.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 peuvent croitre à 7% et 10% de Na Cl **(Planche 5, tableau 4**).

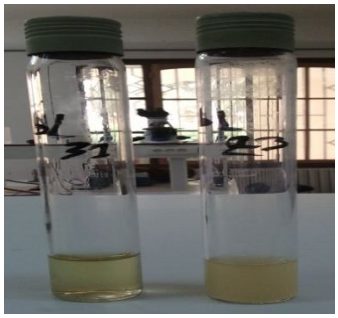
II.2.4. Croissance à pH 3,9 :

Nous avons remarqué que la majorité des souches testées incapable de croitre sur milieu MRS liquide à pH 3,9 (planche 5 et tableau 4).

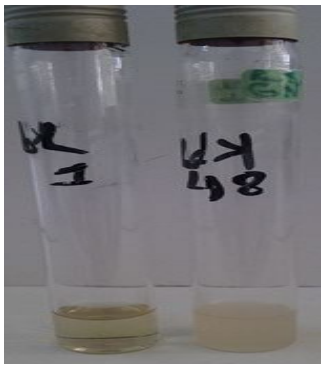




Type fermentaire sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de durham.



Aspect de cultures en Bouillon MRS à 15°C pour les isolats KBL31 et KBL23



Résultats du test de croissance à pH 3,9 pour les isolats KBL1 et KBL48



Résultats du test de croissance à 10% de Na Cl pour les souches isolées KBL2 et KBL23

Planche 5: quelques photos des résultats obtenus pour la caractérisation physiologique des isolats lactiques.

II.2.5. Recherche de l’arginine dihydrolase (ADH) :

Sur bouillon Möeller avec arginine on observe que la majorité des isolats n‘ont pas la capacité à hydrolyser l’arginine, car ne possèdent pas l’ADH (arginine déhydrolase)**,** 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 (planche 6). Les résultats sont résumés dans le tableau **tableau 4**.

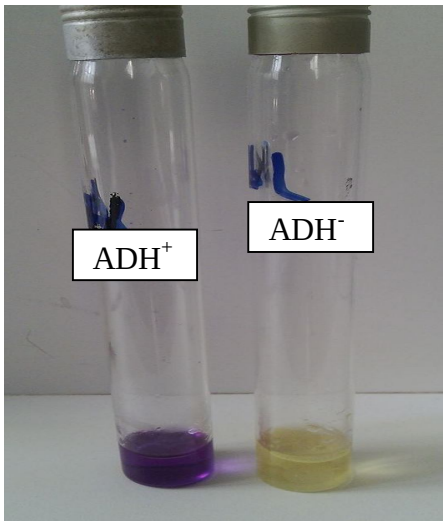


Planche 6 : Résultat du test d’hydrolyse de l’arginine

Tableau 4 : Résultats des tests biochimiques et physiologique des souches lactiques

Tests / **Souches**	**Type fermentaire**	**Croissance à pH = 3,9**	**Croissance à différentes températures**				**Croissance à différentes concentration de NaCl**			**ADH**	Genre
			4°	15°	30°	44°	3	7	10		
KBL1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*Lactococcus*
KBL2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*Lactococcus*
KBL13	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	*Leuconostoc*
KBL15	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	*Lactobacillus*
KBL17	-	-	+	+	+	+	+	-	-		*Streptococcus*
KBL20	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	*Lactobacillus*
KBL22	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	*Lactobacillus*
KBL23	+ +	+	+	+	+	-	+	+	+	-	*Leuconostoc*
KBL29	-	-	-	+	+	-	+	-	-		*Lactobacillus*
KBL31	-	-	+	-	+	-	-	-	-		*Enterococcus*
KBL37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*Lactococcus*
KBL38	-	-	-	-	-	-	-	-	-		*Lactobacillus*
KBL39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*Lactobacillus*
KBL41	-	-	-	-	-	-	-	-	-		*Enterococcus*
KBL42	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	*Lactobacillus*
KBL44	+ + +	-	+	+	+	+	+	-	-	-	*Lactobacillus*
KBL45	+ +	-	+	+	+	+	+	-	-	-	*Leuconostoc*
KBL46	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	*Lactobacillus*
KBL47	+ +	-	+	+	+	-	+	-	-	-	*Lactobacillus*
KBL48	+ +	-	+	+	+	+	+	+	-	-	*Leuconostoc*
KBL49	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	*Lactobacillus*
KBL50	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	*Lactobacillus*
KBL52	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	*Lactobacillus*

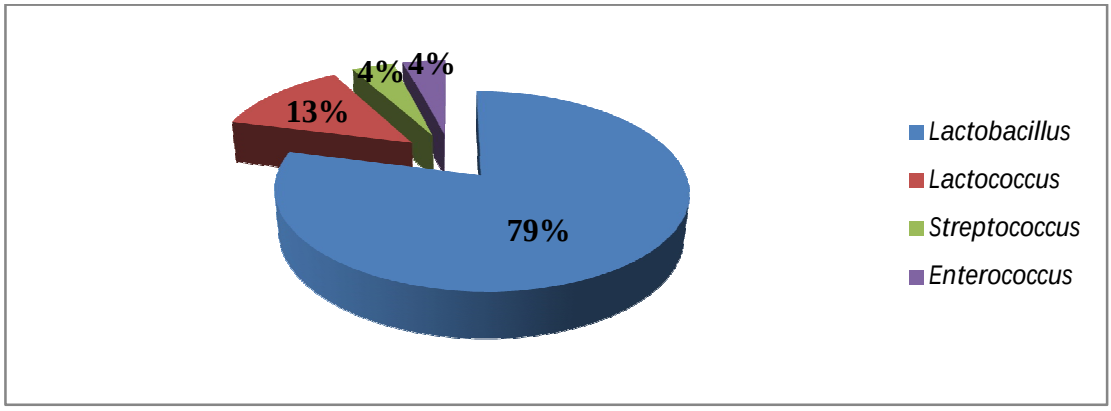


Figure 4: Distribution du pourcentage des isolats lactiques.

II.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 à l'aide de galerie classique, 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. (**Planche7)**. Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau 5**.

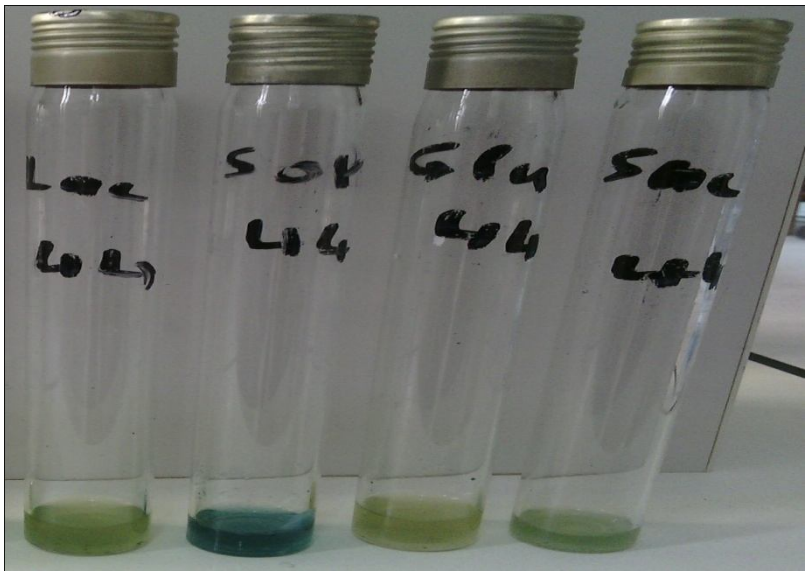


Planche 7 :Résultat de fermentation de sucre**.**

Tableau 5 : Résultats de teste de l'attaque des sucres.

souche	Fermentation des sucres								Souche identifié
	Glucose	Lactose	Sucrose	Tyrosine	Sorrbitol	Aspargine	Xylose	Fructose	
KBL1	-	-	-	-	-	-	-	+	*Lc lactis sub sp.crzmoris*
KBL2	-	-	+	-	-	-	-	+	*Lc lactis sub sp.crzmoris*
KBL13	+	+	-	-	-	-	-	+	*Ln. lactis*
KBL15	+	+	±	-	-	-	+	+	*Lb.casei*
KBL17	+	+	+	-	-	-	+	+	*Streptococcus sp*
KBL20	-	-	-	-	-	-	-	+	*Lb.casei*
KBL22	+	-	±	-	-	-	-	+	*Lactobacillus sp*
KBL23	+	-	+	-	-	-	-	+	*Ln. lactis*
KBL29	+	+	+	-	-	-	-	+	*Lb.casei*
KBL31	-	-	-	-	±	-	-	−	*E.faecium*
KBL37	-	-	−	-	-	-	-	+	*Lc lactis sub sp.crzmoris*
KBL38	+	-	−	-	-	-	-	−	*Lb.casei*
KBL39	-	-	−	-	-	-	-	−	*Lb.casei*
KBL41	+	+	+	-	-	-	-	+	*E. faecalis*
KBL42	-	-	−	-	-	-	-	+	*Lb.helveticus*
KBL44	+	+	+	-	-	-	±	±	*Lb.casei*
KBL45	+	+	+	-	-	-	+	/	*Ln. lactis*
KBL46	-	-	−	-	-	-	-	−	*Lb.sake*
KBL47	+	+	+	-	-	-	+	±	*Lb.casei*
KBL48	+	+	+	-	-	-	+	+	*Ln. lactis*
KBL49	+	+	+	-	-	-	-	+	*Lb.helveticus*
KBL50	-	-	-	-	-	-	-	+	*Lb.casei*
KBL52	+	+	+	-	-	-	-	+	*Lb.helveticus*

II.4.Détermination de la sensibilité des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques :

Les résultats de ce test sont présentés dans la planche 8 et résumés dans le tableau 6.

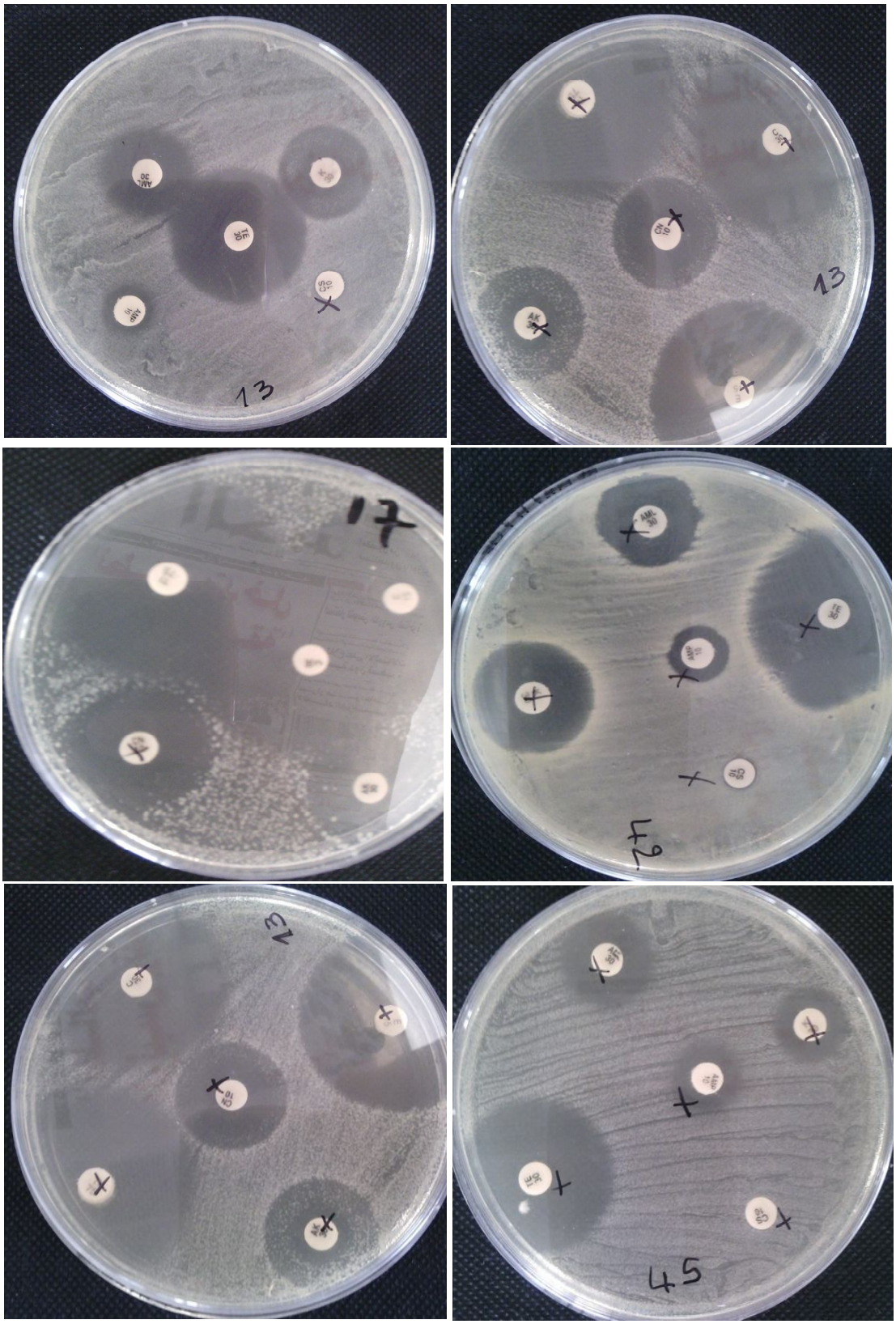


Planche 8: quelques résultats du test de l'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.

Tableau 6 : Détermination de la sensibilité des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques.

ATB / Souches	TE	C	AMP	K	E	CS	AML	TI	AK	CN
KBL1	S	S	I	S	S	R	ND	S	ND	ND
KBL2										
KBL13	S	S	R	S	S	R	ND	S	ND	ND
KBL15	S	S	R	S	S	R	ND	S	ND	ND
KBL17	S	S	I	S	E	R	ND	S	ND	ND
KBL20	S	S	S	S	S	S	ND	S	ND	ND
KBL22										
KBL23	S	S	R	R	ND	R	S	S	ND	ND
KBL29	S	S	S	R	S	ND	S	S	R	ND
KBL31	S	S	I	S	S	R	ND	S	ND	ND
KBL37										
KBL38	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND
KBL39	S	S	S	S	S	S	ND	S	S	ND
KBL41										
KBL42	S	S	R	S	S	R	ND	S	ND	ND
KBL44	S	S	R	R	S	R	ND	S	ND	ND
KBL45	S	S	I	ND	S	R	ND	S	ND	ND
KBL46	S	S	S	ND	S	ND	ND	S	ND	ND
KBL47	S	S	R	R	S	R	ND	S	ND	ND
KBL48	S	S	I	S	S	R	ND	S	ND	ND
KBL49	S	S	S	R	S	R	S	S	ND	ND
KBL50	S	S	S	I	ND	R	S	R	ND	ND
KBL52	S	S	S	R	S	ND	S	S	R	ND

ND : non déterminé

II.5. Mise en évidence de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques :

La capacité de compétition de bactéries lactiques résulte de leurs activités fermentaires associées à la production de divers composés antimicrobiens dans le but d'inhiber la prolifération de microorganismes **(Rodrigues et *al.*, 2002)**.

Il faut signaler que cette activité antibactérienne des souches lactiques peut être due à la production de plusieurs agents antibactériens. L'acide lactique et l'acidification du milieu inhibent plusieurs types de bactéries. Aussi, ces souches produisent le diacétyle qui possède aussi un pouvoir d'inhibition. L'H_2O_2 libéré par les souches lactiques inhibe les bactéries qui ne possèdent pas des défenses contre le stress oxydatif **(Ouwehand et Vesterlund, 2004)**.

II.5.1. Activité antagoniste de souches vis-à-vis d'*Escherichia coli* :

Une seule souche (KBL17) présente un spectre d'activité vis-à-vis du germe cible testé *Escherichia coli*. Le diamètre de zone d'inhibition est 12 mm. (planche 9). Aucune inhibition n'a été observée pour les autres.

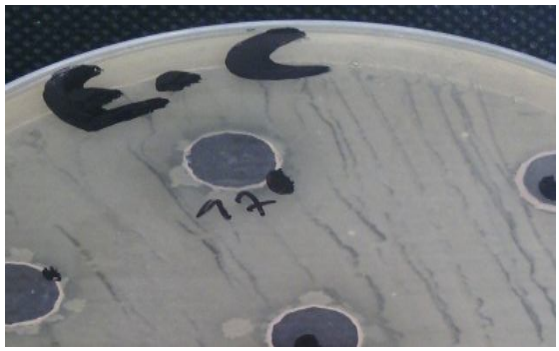


Planche 9: Inhibition obtenue par la souche KBL17 vis-à-vis *E.coli.*

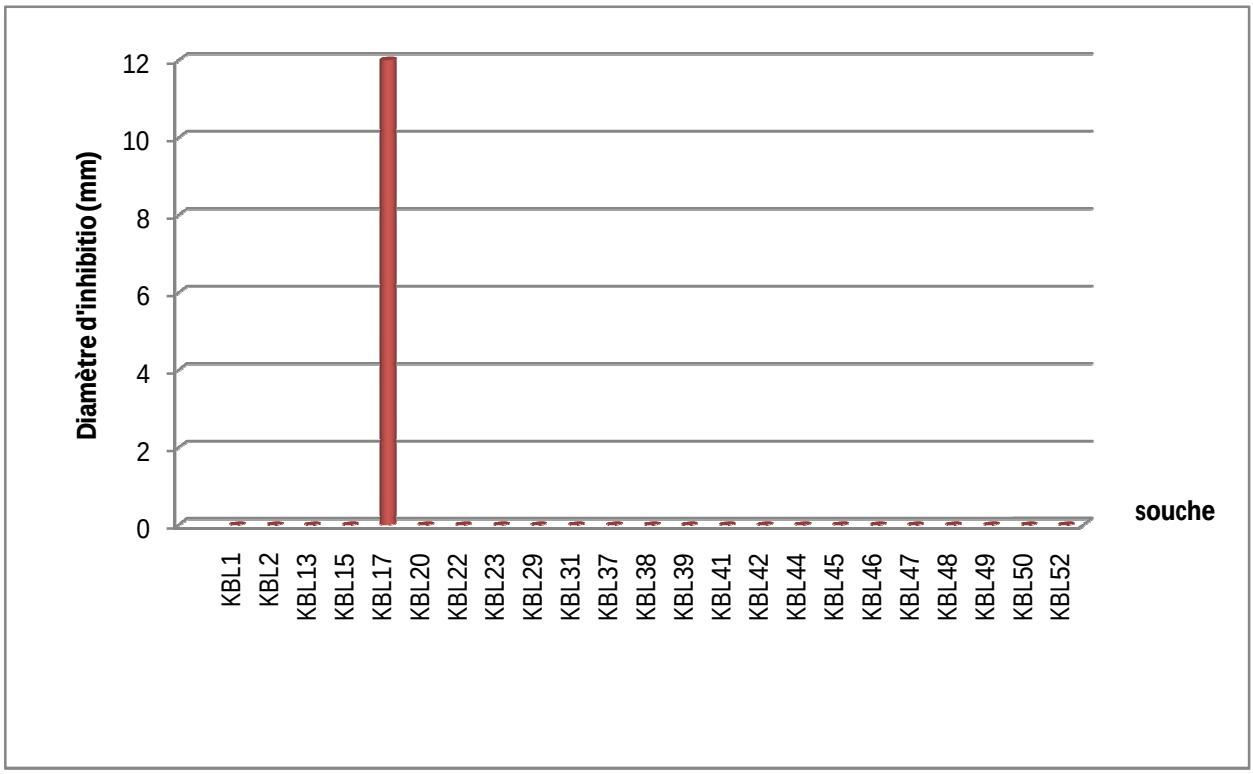


Figure 5 : Interactions entre les souches de bactéries lactiques et *E.coli.*

II.5.2. Activité antagoniste de souches vis-à-vis de *Staphylococcus aureus :*

Concernant *Staphylococcus aureus*, les diamètres des zones d'inhibition sont importants pour les souches KBL38, KBL47, KBL23, KBL44, KBL48, KBL3, KBL17, KBL52 et varie entre 10 à 15mm .Pour les autres souches aucune inhibition n'a été observées (**Planche10 et figure 6**).

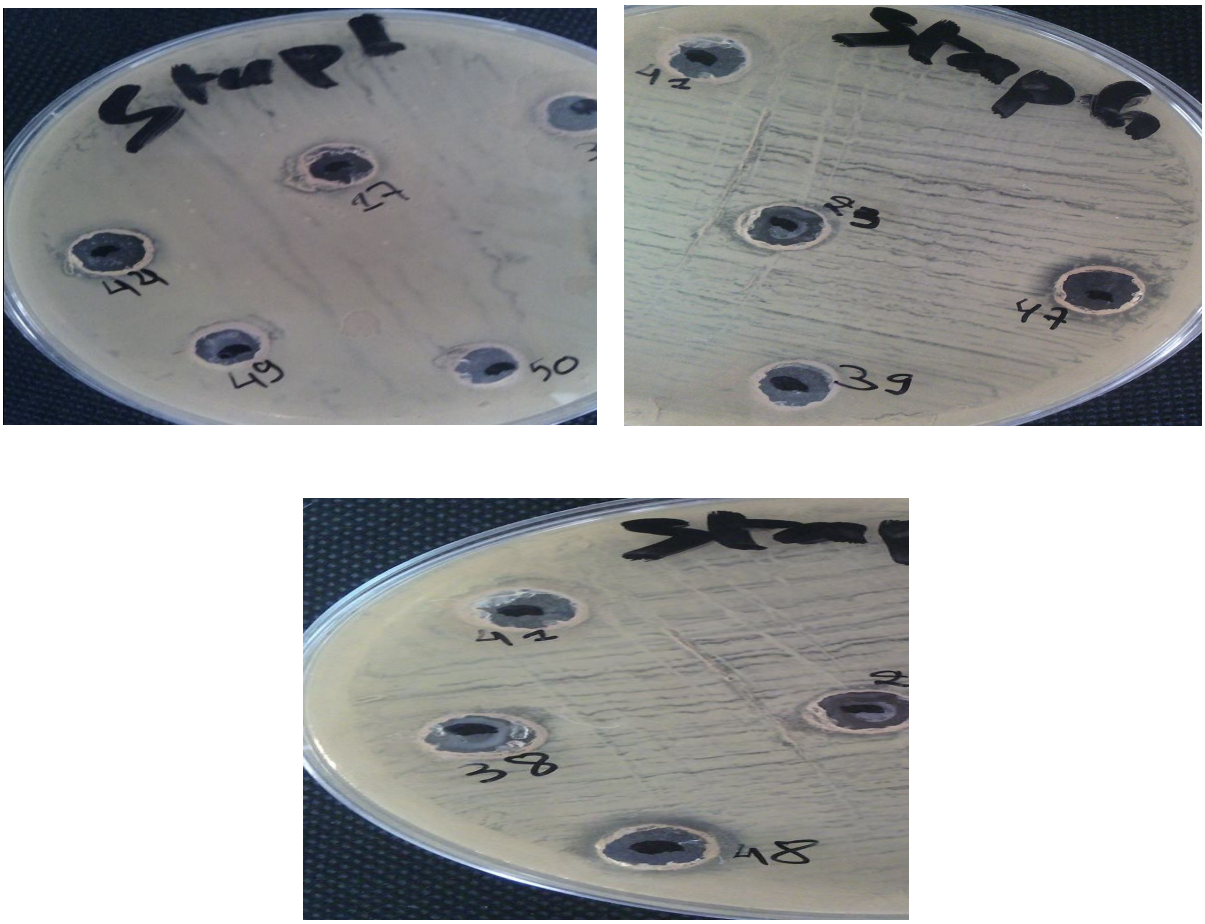


Planche 10 : Inhibition obtenue par les souches lactiques vis-à-vis *Staphylococcus*

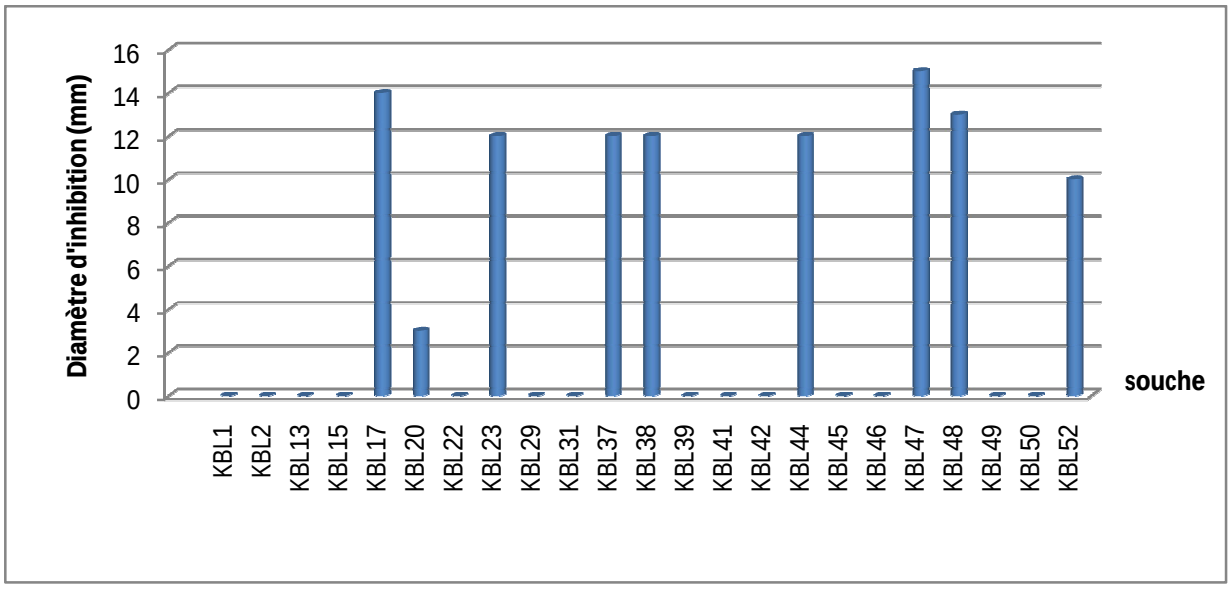


Figure 6 : Diamètre d'inhibition en mm des souches lactique vis-à-vis *Staphylococcus*

II.5.3. Activité antagoniste de souches vis-à-vis de *Micrococcus luteus :*

Parmi les 23 souches sélectionnées pour la recherche des propriétés antagoniste, 13 souche a savoir KBL13, KBL15, KBL44, KBL23 , KBL31, KBL38 , KBL37, KBL41, KBL46, KBL47 , KBL48, KBL49 et KBL50 présentent un spectre d'activité vis-à-vis du germe cible testé *Micrococcus luteus* . le diamètre de zone d'inhibition varie entre 12 à 17mm, (**planche 11 , figure 7**)

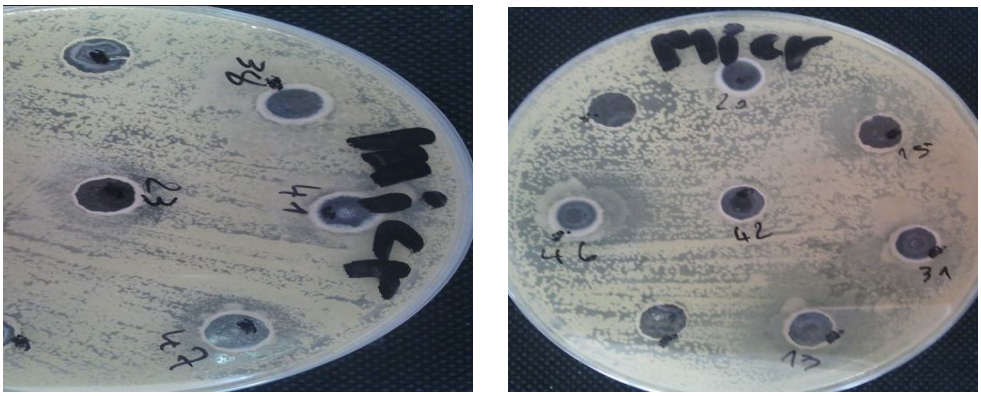


Planche 11: Inhibition des souches lactiques vis-à-vis de *Micrococcus luteus*

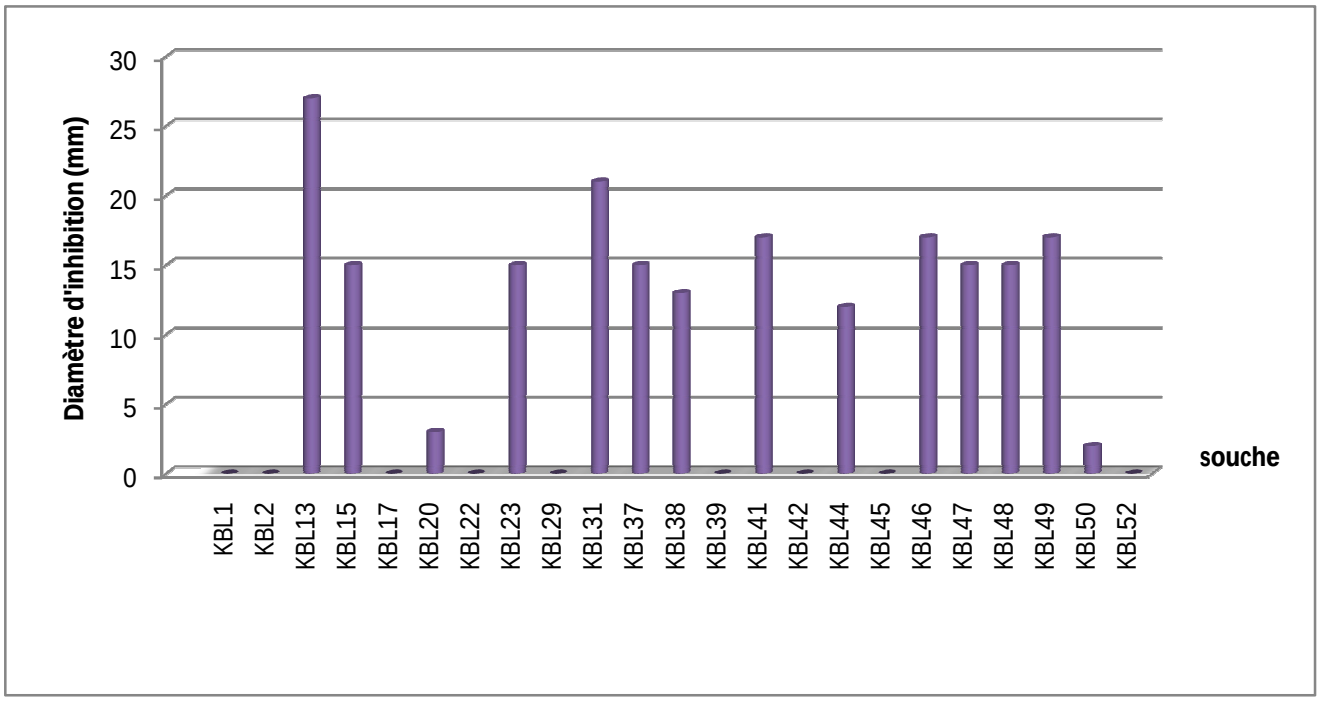


Figure 7 : Diamètre d'inhibition en mm des souches lactique vis-à-vis *Micrococcus luteus*