
Soumis le : 16 Mai 2011
 Forme révisée acceptée le : 16 Février 2012
 Email de l'auteur correspondant :
 kihalm@gmail.com

Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie

Kanza ZAROOUR*, Zineb BENMECHERNENE*, Miloud HADADJI*, Boumediene MOUSSA-BOUDJEMAA*, Jamal Eddine HENNI* et Mebrouk KIHAL*

*Laboratoire de microbiologie appliquée, département de biologie, faculté des sciences, université d'Oran, Bp 16. Es-Senia, 31100, Oran Algérie.

Résumé

La caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre, de chamelle et du fromage Roquefort a permis d'identifier neuf souches de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et neuf souches de *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Les résultats des tests technologiques ont montré que les isolats produisent du dextrane sur milieu MSE, et du dioxyde de carbone, utilisent le citrate et résistent à 55°C pendant 15 minutes, ce qui favorise leur utilisation industrielle. La souche de *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* a une cinétique de croissance, d'acidification et de production de dioxyde de carbone dans le lait écrémé à 30°C, plus élevée que *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. L'addition de l'extrait de levure au lait écrémé stimule le développement de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* en augmentant sa croissance, son activité acidifiante et gazogène. La sensibilité des souches aux antibiotiques a été évaluée sur 33 antibiotiques et les souches ont montré une résistance à 42,4% des antibiotiques utilisés.

Mots clés : Technologique ; *Leuconostoc* ; lait ; cinétique de croissance ; dioxyde de carbone ; extrait de levure ; antibiotiques .

Abstract

The microbiological and technological characterization of *Leuconostoc mesenteroides* species isolated from raw goat milk, camel milk and Roquefort cheese identified nine strains of *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and nine strains of *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*. The results of technological tests of the strains showed that strains produced dextran, carbon dioxide, and resist to 55° C for 15 minutes, which promote their industrial use. The growth kinetic, acidification and carbon dioxide production of *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* strain in skim milk at 30°C were slightly higher than *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Yeast extract addition to skimmed milk stimulates the development of *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* by increasing its growth, acidification activity and evolved CO₂. Susceptibility to antibiotics was evaluated on 33 antibiotics and strains of *Leuconostoc mesenteroides* showed resistance to 42,4% of antibiotics used.

Keywords: Technological ; *Leuconostoc* ; milk ; growth kinetics ; carbon dioxide ; yeast extract ; antibiotics.

1. Introduction

Les bactéries lactiques représentent un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme [1]. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales, elles font partie de la flore intestinale et vaginale humaine et animale [2-3]. Ces bactéries sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et

d'augmenter la durée de conservation. En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes telles que les acides organiques, le dioxyde de carbone et le diacétyle. Elles jouent un important rôle hygiénique en abaissant le pH et en sécrétant une variété de composés inhibiteurs qui empêchent le développement de bactéries indésirables [4-5-2]. Les bactéries lactiques sont Gram positif, catalase négative, immobiles et asporulées, elles poussent dans des conditions d'anaérobiose mais peuvent être aérotolérantes [3].

Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*,

Bifidobacterium, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* [2].

Parmi les bactéries lactiques les plus utilisées en industrie laitière, les bactéries hétérofermentaires du genre *Leuconostoc*, qui produisent à partir du lactose de l'acide lactique, de l'acétate ou l'éthanol et du dioxyde de carbone. Ces bactéries sont considérées comme des ingrédients technologiques essentiels dans la formation des ouvertures dans le fromage bleu à pâte persillée comme le Roquefort, due à la production de dioxyde de carbone qui se forme à partir de deux substrats distincts : le lactose et l'acide citrique. La stabilité de ces ouvertures dépend de la cinétique de la production de CO₂ par les *Leuconostoc*. Ces ouvertures facilitent le développement, la croissance et l'installation correcte de *Penicillium roqueforti* [6-7-8-9]. Les espèces de *Leuconostoc* sp. participent dans la fermentation, à l'amélioration de l'aliment par la saveur par la production des composés aromatiques et par la texture, production de dextrane [10].

L'objectif de ce travail était l'étude des caractères microbiologiques et technologiques de l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* isolée de lait de chamelle et du lait de chèvre qui présentent deux écosystèmes particuliers par apport au fromage du Roquefort. La sélection des souches de *Leuconostoc* performantes peut être utilisés en industrie agro-alimentaire adaptée aux conditions des zones arides d'Algérie.

2. Matériels et méthodes

2.1. Provenance des échantillons

Les souches de *Leuconostoc* ont été isolées à partir de trois échantillons : le premier est le lait cru de chèvre provenant de la région d'Oran (Tafraoui), le second est le lait de chamelle qui est un mélange de plusieurs laits crus de chammelles de la région de Bechar (Abadla) prélevé en 2009, tandis que le troisième échantillon est le fromage de Roquefort danois « ROSENBERG » de 100g fabriqué en juin 2009, qui a été utilisé pour l'isolement de la souche de référence.

2.2. Les bactéries pathogènes utilisées

Les souches tests utilisées sont la bactérie pathogène à gram positif *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et la bactérie à gram négatif *Escherichia coli* (ATCC 25922), qui proviennent de la collection de laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran.

2.3. Isolement et purification

Afin de sélectionner les espèces de *Leuconostoc* sp. l'isolement a été effectué sur milieu MRS solide à pH 6,5 additionné de la vancomycine (30µg/ml) [11] et sur milieu MSE [12] pour détecter les souches de *Leuconostoc* sp. productrices de dextrane. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 48h. Les cultures sont ensuite purifiées sur milieux MRS solide et MRS liquide utilisés alternativement. Parmi les colonies isolées, seules celles qui sont Gram positifs et catalase négative ont été retenues [13].

La conservation des souches a été effectuée sur milieu MRS solide incliné à 4°C. La culture est renouvelée tous les 15 jours. Pour une conservation de long terme, les souches sont conservées à -20°C dans du lait écrémé (70%) additionné de glycérol (30%) (v/v) [14].

2.4. Identification des souches

L'identification des souches bactériennes a été réalisée selon le schéma de la démarche dichotomique des espèces de *Leuconostoc* sp. proposée par Carr *et al.* [1] et selon la classification proposée par Bjorkroth *et al.* [15].

En basant sur les critères morphologiques, dix huit souches représentatives ont été choisies dans cette étude. Les isolats ont été testés pour leurs aspects morphologiques et technologiques à savoir, l'activité protéolytique sur milieu PCA additionné de 2% de lait écrémé, la production de CO₂ à partir de glucose, l'hydrolyse de l'arginine, la capacité de croissance à différentes températures 4°C, 15°C, 37°C et 45°C. Par ailleurs, la thermorésistance à (63,5°C / 30 min et à 55°C/ 15 min) [16] et à la capacité de survie en présence du NaCl (3% et 6,5%) et à pH de 4 et 6,5 ont été aussi investiguées .

La production de dextrane a été détectée sur milieu MSE [12] dont les souches productrices de ce polysaccharide sont caractérisées par la formation de colonies gluantes. L'hydrolyse de l'esculine a été testée sur milieu gélose à 0,5% d'esculine réparti en tubes [17]. L'utilisation de citrate, en présence de glucose, a été étudiée sur milieu KMK [18]. La production d'acétoïne a été déterminée en utilisant le test Vosges-Proskauer sur milieu Clark et Lubs [16-19].

Le test de fermentation des sucres a été effectué sur le bouillon MRS-BCP (BCP 0,17 g / l) dépourvu d'extrait de viande. La source de carbone a été ajoutée au milieu stérile à une concentration finale de 3%. Les sucres testés étaient les suivants : glucose, lactose, galactose, fructose, arabinose, xylose, maltose, mannitol, esculine, saccharose, rhamnose, sorbitol [15]. L'utilisation des carbohydrates de carbone a été évaluée après 24 et 48h. Pour assurer les conditions d'anaérobioses, deux gouttes de l'huile de paraffine stérile ont été ajoutées dans chaque tube après l'inoculation [14-20].

2.5. Cinétique de croissance de *Leuconostoc mesenteroides* en milieu lait

Afin d'étudier la cinétique de croissance de *Leuconostoc mesenteroides*, les souches C1 LMA, C3 LMA et R2 LMA ont été choisies et inoculées dans le milieu lait écrémé qui a été préparé à partir de la poudre de lait écrémé et reconstitué à 10%, stérilisé à 110°C pendant 10 minutes, refroidi à 20°C [9]. Les cultures sont réparties en tubes et incubées à 30°C pendant 24h. Chaque deux heures, les échantillons ont été prélevés de façon aseptique pour déterminer le pH, l'acidité dornic, les taux de croissance et de CO₂ produit.

2.5.1. Mesure du pH et de l'acidité dornic produite

La mesure du pH a été réalisée par un pH-mètre. L'acidité totale a été déterminée en titrant 10 ml de la culture avec la solution basique NaOH N/9 en utilisant l'indicateur de pH la phénolphtaléine. L'acidité a été exprimée en mM d'acide lactique [9-14-21].

2.5.2. Taux de croissance

Les prélèvements ont été effectués à 0h et toutes les 2 heures pendant 24h dont 1ml de chaque tube a été dilué dans 9 ml d'eau physiologique. Les dilutions successives appropriées ont étéensemencées en profondeur en utilisant le milieu MRS gélosé. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 48h et seules les boîtes contenant entre 25 et 250 colonies ont été retenues. Le temps de génération et le taux de croissance ont été calculés dans la phase logarithmique [9].

2.5.3. Production de CO₂

La production de dioxyde de carbone a été mesurée par une technique de Kihal [7], simple et efficace, basée sur le déplacement du liquide dans une burette graduée à une pression constante qui résulte du dégagement gazeux. Cette technique permet la mesure de l'activité gazogène des cellules en croissance. Elle nécessite un tube contenant 10 ml de lait écrémé inoculé et fermé hermétiquement avec un bouchon percé mené d'un joint en caoutchouc. Ce joint sera percé par une aiguille reliée à la burette. Ensuite un ajustement du volume d'eau dans la burette sur zéro est réalisé par une seringue liée à la burette aussi. Une fois l'eau est ajustée sur le zéro, la réaction chimique sera déclenchée par l'injection de 1 ml de HCl 2N dans le tube. Le volume de CO₂ libéré crée une pression de gaz qui s'échappe à travers le tuyau jusqu'à la burette ou ce volume est mesuré [7-9-22].

Afin de contrôler le système de mesure, une réaction chimique a été réalisée en utilisant une solution de Na₂CO₃ dont le principe est le suivant :



Le volume de CO₂ régénéré à partir de 10 ml d'une solution de 50 mM Na₂CO₃ [23] était de 11,2 ml de CO₂ lorsqu'elle réagit avec 1 ml de HCl 2N [9].

Effet de l'extrait de levure sur la croissance de *Leuconostoc mesenteroides*.

L'effet d'extrait de levure sur le développement de *Leuconostoc mesenteroides* a été étudié sur milieu lait écrémé reconstitué à 10% en utilisant les concentrations suivantes 0,1%, 0,3%, 0,5% d'extrait de levure afin de déterminer son effet sur la croissance, la production d'acide lactique et de dioxyde de carbone par *Ln. mesenteroides* en culture pure. L'ensemencement au lait écrémé sans extrait de levure représente le témoin.

La même méthodologie a été suivie pour mesurer le pH, l'acidité dornic, la quantité de CO₂ produite et le taux de croissance qui a été calculé par le dénombrement sur milieu MRS.

2.6. AntibioGramme

L'antibiogramme des souches de *Leuconostoc* sp. est déterminé par la technique standardisée de diffusion, proposée par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, [24] sur milieu gélosé (MRS) [25-26-27]. Deux souches de référence résistantes aux antibiotiques connus, *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923 et *Escherichia coli* ATCC 25922, ont été incluses dans les essais [28]. Les diamètres de la zone d'inhibition observée autour des colonies classent les bactéries comme chimiquement sensibles (S), intermédiaires (I), ou résistantes (R) à un antibiotique donné et cela se fait en comparaison avec les diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques proposées par le CASFM [29].

Les antibiotiques testés sont les suivants : Amikacine, Amoxicilline + Acide clavulanique, Ampicilline, Bacitracine, Cefsulodine, Cefazoline, Cefotaxime, Cefoxitine, Ceftazidime, Cephalothine, Ciprofloxacine, Clindamycine, Colistine, Erythromycine, Acide Fusidique, Imipeneme, Lincomycine, Acide Nalidixique, Netilmicine, Nitrofurantoïne, Ofloxacine, Oxacilline, Pefloxacine, Penicilline, Piperacilline, Pristinamycine, Rifampine, Spiramycine, Tétracycline, Ticarcilline, Tobramycine, Trimethoprime-Sulfamethoxazole (co-trimoxazole), Vancomycine. Ces disques d'antibiotiques proviennent de Bio-rad (Marnes-la-Coquette, France), sauf VA de OXOID (Basingstoke, Hampshire, Angleterre).

3. Résultats et discussion

L'étude de l'aspect macroscopique des souches sur milieu MRS a révélé des colonies petites, rondes, blanches et lenticulaires tandis que sur milieu MSE, les colonies sont transparentes gluantes avec un aspect

gélatineux. L'aspect microscopique a révélé que les cellules sont Gram positif avec une forme ovoïde associées en paires ou en chaînes courtes incurvées. Toutes les souches sont catalase négatives, capables de produire le CO₂ à partir du glucose, incapables d'hydrolyser l'arginine, par conséquent, ces souches sont considérées comme des *Leuconostoc* sp [13-30-31-32]. Les souches isolées et purifiées ont pu croître à 15 et à 37°C mais non à 4 et 45°C, ce qui confirme qu'elles sont des bactéries mésophiles. Cinq souches ont pu résister à une concentration de 3% de NaCl, tandis qu'aucune souche n'a poussée à 6,5 %. Les isolats sont capables de croître à pH 6,5 et non pas à pH 4. Elles sont non protéolytiques. La thermorésistance a été testée à deux températures, la première est de 63,5°C/30 min à la quelle les souches n'ont pas pu résister, et la seconde à 55°C/15 min ou elles ont pu croître [16].

La production de dextrane sur milieu saccharosé MSE est un critère important pour différencier entre les espèces de *Leuconostoc* sp. Les dix huit isolats sont capables d'hydrolyser le saccharose et de produire le dextrane [1-31-33].

Tableau 1 :

Les tests physiologiques et biochimiques des isolats obtenues à partir du lait cru de chèvre ou de chamelle et du fromage Roquefort.

Echantillon	Lait de chèvres							Roquefort					Lait de chamelle					
	C1 L M A	C2 L M A	C3 L M A	C4 L M A	C5 L M A	C6 L M A	C7 L M A	R2 L M A	R3 L M A	R7 L M A	R8 L M A	R9 L M A	CH5 LMA	CH6 LMA	CH7 LMA	CH9 LMA	CH10 LMA	CH11 LMA
Hydrolyse d'arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production de gaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production de dextrane	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilisation de Citrate	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Hydrolyse de l'esculine	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Production d'acétoïne	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 3%	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 6,5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T° 4°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T° 15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T° 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T° 45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63,5°/30min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55°/15min	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 6,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Selon le profil fermentaire (Tableau 1), les isolats sont devisés en deux groupes, le premier contient neuf souches qui sont « Glu⁺, Lac⁺, Gal⁺, Sac⁺, Frc⁺, Mal⁺, Xyl⁺, Mnt⁻, Rha⁻, Ara⁺, Sorb⁺, Esc⁺ » et le deuxième contient les neuf souches restantes et qui sont « Glu⁺, Lac⁺, Gal⁺, Sac⁺, Frc⁺, Mal⁺, Xyl⁺, Mnt⁻, Rha⁻, Ara⁻, Sorb⁻, Esc⁻ » dont l'arabinose est le sucre clé de différenciation entre les sous-espèces de *Leuconostoc mesenteroides*.

L'identification microbiologique a révélé que cinq souches isolées du fromage de Roquefort et les quatre souches, isolées de lait de chèvre, appartiennent à la sous espèce *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* tandis que les six souches isolées de lait de chamelle et les trois souches isolées de lait de chèvre appartiennent à la sous espèce *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, et cela selon les travaux effectués par Carr *et al.* [1], Kihal [7]; Ghazi *et al.* [13] et Bjorkroth *et al.* [15].

Production d'acide à partir de : Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculine	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Symboles : + ; réaction positive, - ; réaction négative.

Les isolats présentent un caractère variable vis-à-vis de l'utilisation du citrate, dont cinq souches parmi dix huit sont incapables de former des colonies bleues sur milieu KMK, ce qui traduit leur incapacité d'utiliser ce précurseur de composés aromatiques qui est pris comme un critère important dans la sélection des espèces à intérêt technologique. Cette variabilité peut être du selon Bellengier *et al.* [34] ; Kihal *et al.* [7] à la perte des plasmides codant les gènes responsables de la dégradation de citrate. Toutes les souches sont incapables de produire l'acétoïne à partir de glucose ce qui correspond aux caractères des deux sous espèces *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum* [16-31]. L'hydrolyse de l'esculine étudiée sur milieu gélosé a révélé le même résultat trouvé sur milieu liquide MRS-BCP.

La cinétique de croissance de *Leuconostoc mesenteroides* a été étudiée sur milieu lait écrémé en utilisant la souche de référence et dont les proportions inoculées au début sont les suivantes : $25 \cdot 10^6$ ufc/ml, $21 \cdot 10^6$ ufc/ml, $12 \cdot 10^6$ ufc/ml des souches C3 LMA, C1 LMA, R2 LMA. Le suivi de pH, de l'acidité dornic, la quantité de CO₂ produite et la croissance de *Leuconostoc* ont été mesurés à un intervalle de temps régulier.

La figure 1 (A et B) a montré que *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* a une vitesse d'acidification plus élevée par rapport à celle de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* après 8 heures d'incubation et dont les vitesses de diminution de pH des souches C3LMA, C1LMA sont 0,05 et 0,036 upH/h, respectivement. Le taux de CO₂ produit par *Ln mesenteroides* subsp. *dextranicum* est plus élevé que celui produit par *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* dont les vitesses spécifiques et respectives des souches C3LMA, C1LMA, R2LMA sont 0,73, 0,63 et 0,66 mM/h. La cinétique de production de dioxyde de carbone par *Ln.*

mesenteroides subsp. *mesenteroides* est presque identique à celle enregistrée chez la souche de référence et dont le coefficient de corrélation entre le pH et le CO₂ produit par cette sous espèce est $r=0,95$.

Une relation étroite a été remarquée entre l'activité gazogène et l'acidité dornic des deux sous espèces. Le taux de croissance de *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* est supérieur à celui de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, une grande corrélation a été observé entre la développement bactérien et l'activité gazogène des deux sous espèces ce qui prouve que la méthode utilisée pour mesurer le dioxyde de carbone est un moyen indirect pour suivre la croissance des bactéries. Ces résultats montrent que la sous-espèce *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* présente un taux de production de CO₂, un taux de croissance, une vitesse d'acidification plus élevés que ceux enregistrés chez la sous-espèce *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Des observations similaires ont été obtenus par Kihal [7] ; Kihal *et al.*, [35] ; Kihal *et al.* [9].

L'effet de l'extrait de levure sur la croissance de *Leuconostoc mesenteroides* :

La vitesse de diminution de pH en présence de 0,1% était de 0,08 upH/h et le pH passe de 6,4 à 5 après 24h d'incubation, tandis que 0,3% et 0,5% d'extrait de levure étaient corrélés à des diminutions de l'ordre de 0,098 et 0,095 upH/h avec des valeurs finales de pH de l'ordre de 4,6 et 4,7. Le témoin qui est illustré dans la figure 2 (A), avait une vitesse de 0,042 upH/h avec une valeur finale de 5,4, ce qui montre que l'addition de l'extrait de levure augmente la vitesse de diminution de pH.

Le taux de production de dioxyde de carbone en présence de 0,3% d'extrait de levure était de 3,9 mM/h avec une valeur finale de 53 mM dont le témoin avait une vitesse de 0,79 mM/h avec une valeur finale de 25 mM. Le taux de croissance en présence de 0,3% d'extrait de levure était

de 1,10 h⁻¹ avec un temps de génération de 54 minutes, par contre il était de 0,69 h⁻¹ dans le témoin avec un temps de génération de 86 minutes.

L'acidité illustrée dans la figure 2 (B) a augmenté aussi lorsque l'extrait de levure a été additionné à 0,3%. Une corrélation étroite a été observée entre la production de CO₂ et l'acidité du milieu lait additionné de 0,3% d'extrait de levure et dont le coefficient de corrélation était de l'ordre de $r = 0,98$. D'après les résultats des cinétiques obtenus, il a été remarqué que la croissance en présence de 0,3% et 0,5% d'extrait de levure accélère mieux la croissance des leuconostocs et l'acidification du lait avec l'observation d'une meilleure assimilation de 0,3% de ce composant vu la quantité des acides et de dioxyde de carbone produites durant la phase exponentielle. La croissance de *Ln. mesenteroïdes* subsp. *mesenteroïdes* est influencée donc par l'addition de ce facteur car la principale propriété recherchée chez les bactéries lactiques, utilisées en tant que levains en industrie alimentaire, est leur capacité à acidifier et à se développer de façon régulière. Dans le lait, elles doivent trouver un certain nombre de nutriments nécessaires à leur croissance, et, en particulier, les acides aminés et les vitamines qui peuvent être fournis par l'extrait de levure. Ces résultats sont conformes avec les travaux rapportés par Accolas *et al.* [36]; Desmazaud [37]; Kihal [7]; Garault *et al.* [38]; Kihal *et al.* [35].

L'antibiogramme des deux sous-espèces *Leuconostoc mesenteroïdes* subsp. *mesenteroïdes* et *Leuconostoc mesenteroïdes* subsp. *dextranicum* a été effectué en utilisant trente trois antibiotiques commercialisés. Les quatre souches testées sont quasiment sensibles à la céphalothine, clindamycine, érythromycine, imipenème, lincomycine,

pénicilline, piperacilline, pristinamycine, rifampine, tétracycline, ticarcilline ce qui est semblable avec les travaux de Milliere *et al.* [39]; Kihal [7]. Tandis que quelques souches possèdent un profil intermédiaire. *Leuconostoc mesenteroïdes* subsp. *mesenteroïdes* (C7 LMA) est résistante à l'ampicilline et au nitrofurantone contrairement aux autres souches qui sont sensibles. Les résultats observés indiquent que les deux sous-espèces sont résistantes à la vancomycine. Selon Hemme *et al.* [10], cette résistance est généralement une caractéristique intrinsèque, elle est liée à la présence des pentapeptides avec D-lactate lié au C-terminal à la place de D-alanine dans la composition de peptidoglycane ce qui empêche la pénétration de l'antibiotique et par conséquent la lyse cellulaire. En plus de la vancomycine, les souches présentent des polyrésistances envers 13 antibiotiques : l'acide nalidixique, oxacilline, Triméthoprime/sulfaméthoxazole, bacitracine, céfazoline, céfsulodine, céftazidime, ciprofloxacine, colistine, tobramicine, pefloxacine, ofloxacin, Netilmicine.

Selon Dalache *et al.* [26], cette polyrésistance est fréquemment attribuée à des plasmides ou des transposons chez de nombreuses espèces bactériennes. Pour l'ensemble d'antibiotiques testés, on n'observe pas une grande différence entre les souches étudiées. Les résultats de l'antibiogramme sont semblables avec ceux trouvés par Milliere *et al.* [39]; Swenson *et al.* [40]; Kihal [7]; Philippon *et al.* [33].

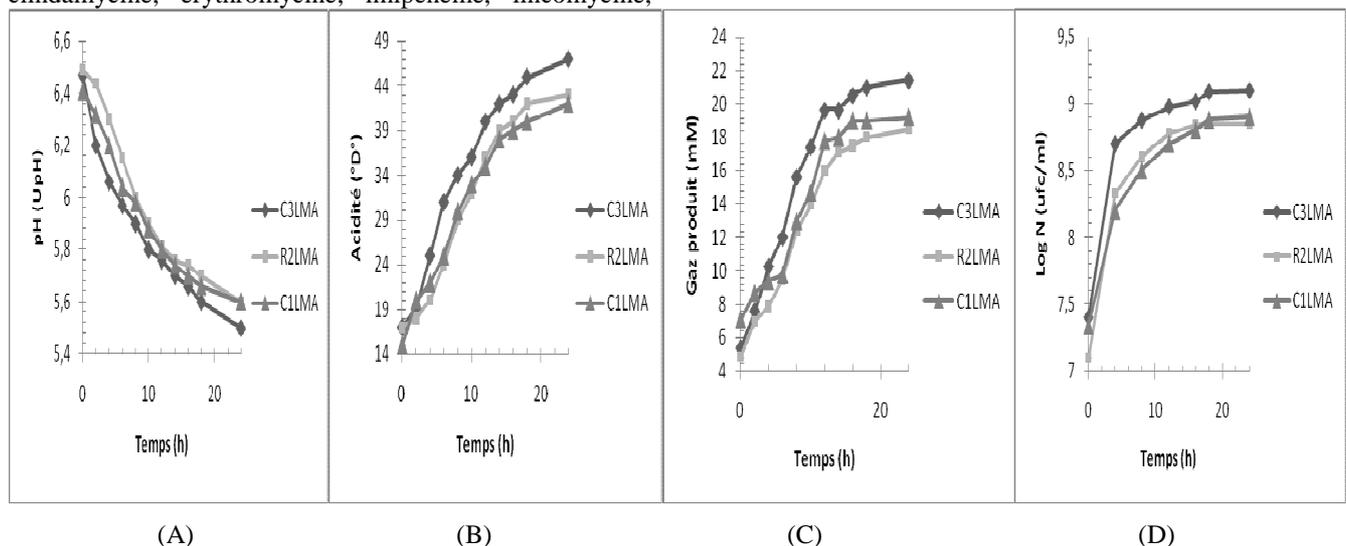


Figure 1 : Cinétique de croissance des souches de *Leuconostoc* (C3 LMA : *Leuconostoc mesenteroïdes* subsp *dextranicum*, C1 LMA : *Leuconostoc mesenteroïdes* subsp *mesenteroïdes*, R2 LMA : *Leuconostoc mesenteroïdes* subsp *mesenteroïdes*) en milieu lait sans extrait de levure, d'évolution de pH (A), de l'acidité dornic (B), de production de CO₂ (C) et croissance bactérienne (D).

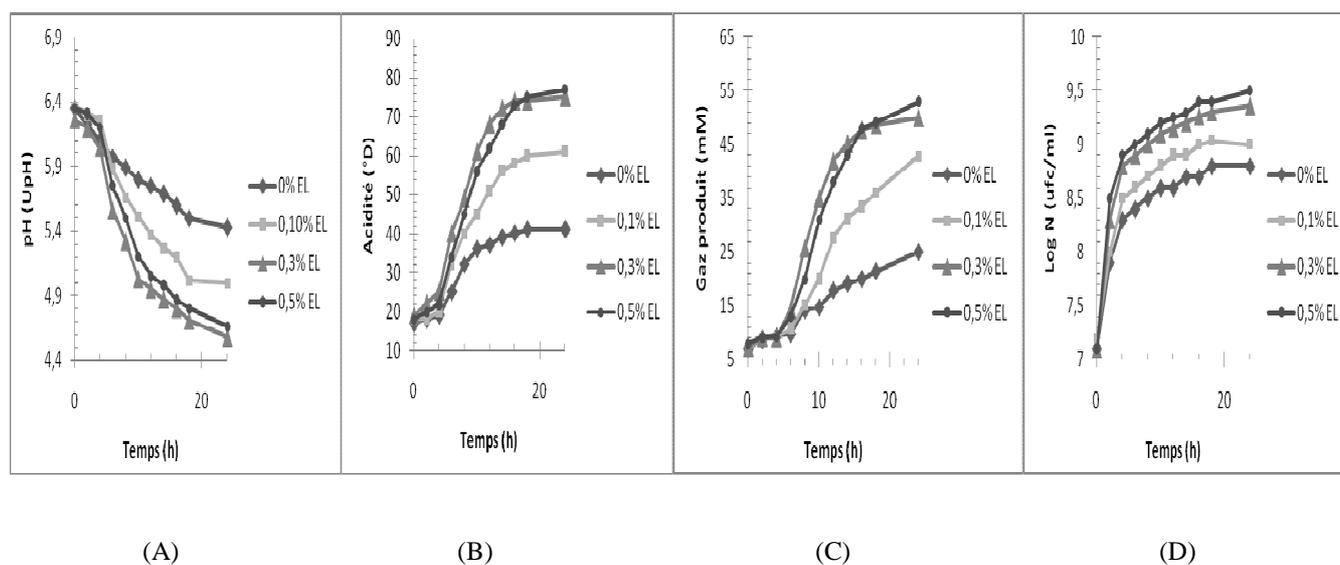


Figure 2 : Cinétique de croissance de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (souche C7 LMA) en milieu lait écrémé additionné de 0%, 0,1%, 0,3%, 0,5% d'extrait de levure, évolution de pH (A), de l'acidité domique (B), de production de CO₂ (C) et de croissance bactérienne (D)

Tableau 2 :

Le test de sensibilité aux antibiotiques des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait de chèvre et du lait de chamelle d'Algérie.

Antibiotiques	Charge du disque	symbole	C7 LMA		C3 LMA		R2 LMA		CH11 LMA	
Amikacine	30 µg	AN	16	R	14	R	20	I	18	I
Amoxicilline + Acide Clavulanique	20 µg + 10 µg	AMC	29	S	28	S	17	R	24	S
Ampicilline	10 µg	AM	0	R	28	S	27	S	24	S
Bacitracine	0,02 à 0,04 IU	BAC	14	R	14	R	14	R	14	R
Cefazoline	30 µg	CZ	18	R	15	R	18	R	13	R
Cefotaxime	30 µg	CTX	19	I	23	S	25	S	19	I
Cefoxitine	30 µg	FOX	22	S	23	S	16	I	18	I
Cefsulodine	30 µg	CFS	12	R	12	R	11	R	10	R
Ceftazidime	30 µg	CAZ	10	R	9	R	0	R	0	R
Cephalothine	30 µg	CF	24	S	27	S	32	S	28	S
Ciprofloxacine	5 µg	CIP	12	R	14	R	19	R	14	R
Clindamycine	2 µg	CM	25	S	22	S	34	S	26	S
Colistine	50 µg	CS 50	9	R	10	R	13	R	12	R
Erythromycine	15 µg	E	26	S	25	S	31	S	25	S
Acide Fusidique	10 µg	FA	17	I	16	I	18	I	18	I
Imipeneme	10 µg	IPM	27	S	24	S	24	S	23	S
Lincomycine	15 µg	L	29	S	27	S	36	S	27	S
Acide Nalidixique	30 µg	NA	0	R	0	R	0	R	0	R
Netilmicine	30 µg	NET	18	R	18	R	20	R	20	R
Nitrofurantoin	300µg	FT	0	R	28	S	27	S	25	S
Ofloxacine	5 µg	OFX	13	R	16	R	21	R	14	R
Oxacilline	1 µg	OX1	0	R	0	R	0	R	0	R
Pefloxacine	5 µg	PEF	0	R	0	R	14	R	10	R
Penicilline	6 µg / 10 IU	P	29	S	29	S	36	S	29	S
Piperacilline	75 µg	PIP 75	22	S	26	S	28	S	25	S
Pristinamycine	15 µg	PT	31	S	25	S	40	S	27	S
Rifampine	30 µg	RA 30	31	S	34	S	40	S	30	S
Spiramycine	100 µg	SP	20	I	20	I	26	S	18	I
Tetracycline	30 µg	TE	28	S	30	S	40	S	26	S
Ticarclilline	75 µg	TIC	30	S	30	S	40	S	33	S
Tobramycine	10 µg	TM	12	R	12	R	16	R	14	R
Trimethoprime-Sulfamethoxazole (co-trimoxazole)	1.25 µg + 23.75 µg	SXT	0	R	0	R	0	R	0	R
Vancomycine	30 µg	VA	0	R	0	R	0	R	0	R

4. Conclusion

Vu Leur caractère résistant à la vancomycine, les souches de *Leuconostoc* ont été isolées et sélectionnées à partir de lait de chèvre, lait de chamelle et le fromage de Roquefort en utilisant deux milieux MRSV et MSEV. Les tests microbiologiques, biochimiques et physiologiques des isolats ont permis d'identifier deux sous-espèces *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum*. Les souches présentent des caractères technologiques très importantes comme la production L'étude de la cinétique de croissance, de production de CO₂, d'évolution de pH et de l'acidité en milieu lait des deux sous-espèces a révélé que *Ln. mesenteroides* subsp *dextranicum* a une vitesse de croissance, une activité acidifiante et gazogène plus élevées que celles de *Ln. mesenteroides* subsp *mesenteroides*. Le suivi des mêmes paramètres pendant 24h en cultivant la sous-espèce *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* en milieu lait additionné de différentes concentrations d'extrait de levure a permis de déduire que ce composant stimule le développement bactérien, la production gazeuse et la production de l'acide lactique chez les leuconostocs. L'antibiogramme des souches a permis de conclure qu'en plus de la vancomycine, elles présentent des polyrésistances envers 13 antibiotiques parmi 33 antibiotiques testés.

Références

- [1] F.J.Carr, D. Hill, N.Maid, The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28 (2002).281-370.
- [2] C. Dortu, P. Thonart, Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13 (2009) 143-154.
- [3] B. Mayo, T. Aleksandrak - piekarczyk, M. Fernández, M. Kowalczyk, P. Alvarez-Martín, et J. Bardowski, Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* Blackwell Publishing (2010) 3- 34.
- [4] J. Hugenholtz, W. Sybesma, M.N. Groot, W. V. Wisselink, K. Ladero, J. C. Burgess, G. Piard, Eggink, E. J.Smid, G. Savoy, F. Sesma, T. Jansen, P. Hols, M. Kleerebezem, Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of neutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82 (2002) 217–235.
- [5] B. Guessas, M. Hadadji, N. Saidi M. Kihal. Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth in milk by lactic acid bacteria. *Dirassat.* 32 (2005) 53-60.
- [6] J. Pinchon,. Le fromage de Roquefort. *Options Méditerranéennes*, 6 (1989) 199-204.
- [7] M. Kihal. Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides* , éléments d'application en technologie fromagère type fromage bleu. Thèse de Doctorat d'Etat. *Université d'Oran Algérie* (1996).
- [8] M. Kihal , H. Prevost, M.E. Lhotte, D.Q Huang. et C. Divies. Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *J. Appl. Microbiol.* 22 (1996) 219–223.
- [9] M. Kihal, H. Prevost, D.E Henni, Z. Benmechernene et C. Divies. Carbon Dioxide Production by *Leuconostoc mesenteroides* Grown in Single and Mixed Culture with *Lactococcus lactis* in Skimmed Milk. *Scientific Research and Essay* Vol. 4 (11), (2009) 1348-1353.
- [10] D. Hemme, C. Foucaud-Scheunemann. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy* . (2004) 467–494.
- [11] A. G. Mathot, M. Kihal, H. Prevost et C. Divies.. Selective enumeration of *Leuconostoc* on Vancomycin agar medium. *International Dairy Journal*, 4, (1994) 459–469.
- [12] J.V. Mayeux, W.E. Sandine et P.R Elliker. A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Science*, 45 (1962) 655-656.
- [13] F. Ghazi, DE. Henni, Z. Benmchernene et M. Kihal. Phenotypic and Whole Cell Protein Analysis by SDS-PAGE for Identification of Dominants Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 4 (2009) 78-87.
- [14] A. Badis, D. Guetarni, B. Moussa Boudjema D.E Henni., E. Tornadijo et M. Kihal. Characteristics of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiol.* 21. 3 (2004) 343-349.
- [15] J. Bjorkroth et W.H. Holzapfel. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella* in : *The Prokaryotes. Vol 4*.Springer, (2006) pp 267-319.
- [16] J.P. Guiraud. Microbiologie alimentaire. *DUNOD, Paris* .(1998) 282-290.
- [17] R.A. Lelliott et D.E. Stead. Methods for diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications Volume 2. (1987) Oxford (GB).
- [18] G.M. Kempler et L.L. Mc Kay. Improved medium for detection of citratefermenting *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis*. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 39 (1980) 956-927.
- [19] J. Samelis, F. Maurogenakis et J. Metaxopoulos. Characterization of Lactic Acid Bacteria isolated from naturally fermented greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.* 23 (1994) 179-196.
- [20] B. Guessas et M. Kihal. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goat's milk. *African Journal of Biotechnology* Vol. 3(6), (2004) 339-342.
- [21] J. P. Accolas R. Bloquel et J. Regnier. Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yaourt ; *Le Lait.* 67 (1977) 1-23.
- [22] M. Kihal, H. Prevost, D.E. Henni Z., Benmechernene et C. Divies. Carbon Dioxide Production by *Leuconostoc mesenteroides* Grown in Single and Mixed Culture with *Lactococcus lactis* in Skimmed Milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 2 (2). (2007) 62-68.
- [23] S.A Mohr, W.E. Zottola et G.A. Reineccius. The use of gaschromatography to measure carbon dioxide production by starter cultures. *J. Dairy Sci.* 76 (1993) 3350-3353.
- [24] Comité de l'Antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie. Société Française de Microbiologie. CASFM. Recommandations, (2004).
- [25] A.N. Bauer, W.M.M Kirby, J.S. Sherris et M. Turk. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. *Ann. Clin. Pathol.* 45 (1966) 493-496.
- [26] F. Dalache, M. Kacem et N.E. Karam. Antibiorésistance de bactéries lactiques isolées de laits crus de vache, chèvre, brebis et chamelle d'Algérie. *Renc. Rech. Ruminants.* (2003) p 231.
- [27] S.Ruiz-Moyano, A. Martin, M.J. Benito, R. Casquete, M.J Serradilla et M. De Guia Cordoba. Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science* 83. (2009) 460–467
- [28] J.S Zhou., C. G Pillidge, P. K. Gopal.. et H. S. Gill. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic

- Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 98 (2005) 211 – 217.
- [29] Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Société Française de Microbiologie. CASFM. Recommandations, (2009).
- [30] E.I.Garvie. Gram positive cocci genus *Leuconostoc* in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol II. 9th edit. *The Williams and Wilkins Co Baltimore* : (1986) 1071 – 1075.
- [31] A. Badis, N. Laouabdia-Sellami, D. Guetarni, M. Kihal et R. Ouzrout. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabie et kabyle". *Sciences & Technologie* N°23, (2005) 30-37.
- [32] J.C. Ogier, E. Casalta, C. Farrokh et A. Saihi. Safety assessment of dairy microorganisms : The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126(2008) 286-290.
- [33] A. Philippon et C. Poyart. Autres coques à Gram positif catalase négative d'intérêt médical : *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. *EMC Elsevier Masson SAS. Biologie clinique*. 90-05-0120. (2008) 1-11.
- [34] P. Bellengier, D. Hemme et C. Foucaud. Citrate metabolism in sixteen *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and subsp. *dextranicum* strains. *Journal of Applied Bacteriology*, 77 (1994) 54–60.
- [35] M. Kihal, D.E. Henni, H. Prevost et C. Diviès. A new manometric method for measuring carbon dioxide production by dairy starter culture : a case of *Leuconostoc mesenteroides*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (4) (2006) 378-383.
- [36] J.P. Accolas, M. Veaux et J. Auclair. Etude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles, en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite. *Le lait*. 51 (1980) 249-272.
- [37] M.J. Desmazaud. L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait*. 63.(1983) 67-316.
- [38] P. Garault, C. Letort, V. Juillard et V. Monnet. La biosynthèse des acides aminés à chaîne branchée et des purines : deux voies essentielles pour une croissance optimale de *Streptococcus thermophilus* dans le lait. *Lait* 81(2001) 83–90.
- [39] J. B. Milliere, A. G. Mathot, P. Schmitt et C. Divies. Phenotypic Characterization of *Leuconostoc* species. *Journal of applied bacteriology*, 67 (1989) 529-542.
- [40] J.M. Swenson, R.R. Facklam. et C. Thornsberry. Antimicrobial Susceptibility of Vancomycin-Resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* Species. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Apr. (1990) 543-549.