

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière : "Sciences Biologiques"

Spécialité : "Biotechnologie microbienne "

Présenté et soutenu publiquement par

- OUHAB Abdelhak

- BENATMANE Nour-eddine

Isolement, caractérisation et étude de certaines activités fonctionnelles des bactéries lactiques du blé dur fermenté du « matmor » de la région de Relizane

JURY

-Président/ Examineur : Mlle. AIT ABDERRAHIM L.

-Promoteur : Mlle. BOUBAKEUR B.

-Co-promoteur : M. DRABO, M.S.

Année universitaire : 2017–2018

Remerciements

Après avoir remercié DIEU le tout puissant lui qui nous guide dans toute notre vie et nous a donné le courage pour réaliser et achever ce travail.

Nous tenons à présenter nos sincères remerciements à nos encadrants madame BOUBAKEUR.B et monsieur DRABO.M. S pour tous leurs conseils et leurs orientations tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous tenons également à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Tiaret.

Nous tenons à présenter nos sincères remerciements à madame AIT ABDERAHIM L d'avoir accepté de présider et d'examiner notre travail.

Enfin nous tenons à remercier tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Merci à tous

DEDECACE

JE DEDIE CE TRAVAIL

**A MA chère maman*

*Tu es l'exemple de dévouement et de patience, maman
tu es toujours présente pour moi dans les moments
difficiles.*

**A mon cher papa*

*Rien au monde ne vaut les efforts fourmis jour et nuit
pour mon éducation et mon bien être ; ce travail est le
fruit des sacrifices que tu as consentis pour ma
formation.*

**A mes sœurs*

*A mon partenaire du Project : NOUR-EDDINE, mon
cher ami et collègue avec lequel j'ai passé des bons
moments surtout durant la réalisation de ce travail*

*A mes collègues ASMAA. KHAIRA ET ZOHRA qui ont
participé efficacement à la réalisation de ce travail.*

*A mes camarades de la Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie de l'Université de Tiaret.*

Abdelhak

DEDECACE

Ce travail est dédié

*À la femme qui m'a donné la force et m'a poussé et encouragé
Pour être une étoile dans le ciel quand j'étais une pierre sur Le sol...*

à ma mère Que dieu la soutiens

À mon père après tous les efforts qui a fait et qu'il fait encore et

Toujours pour le bien de notre famille,

Je lui souhaite une longue et joyeuse vie

À mon frère

À mes sœurs

À mes collègues :

Sissa ; Asmaa ; Kheira ; Chafia ; Zohra

À tous les amis de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

de l'Université de Tiaret

À mes camarades de Master biotechnologie microbienne

À tous mes enseignants de la Faculté des Sciences de la Nature et

de la Vie de l'Université de Tiaret.

Nour-eddine

Liste des abréviations

BFR : blé fermenté Relizane

BL / LAB : bactéries lactique / Lactic acid bacteria

C.R.AP.C : Le centre de recherche scientifique et technique en analyse physico-chimique-Expertise

CV : Cristal violet

DO : densité optiques

LDC: Lysine décarboxylase

MALDI-TOF MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry

MRS: gélose de Man, Rogosa, Sharpe

ODC : ornithine décarboxylase

ONPG: Ortho-Nitro-Phényl- β -D-Galactopyranoside

PCA : Plate Count Agar

TCP : Méthode de plaque de culture de tissus

TM : La méthode en tube

TSI : Triple Suger Iron

VF : viande foie

Liste des tableaux

Tableau N°01 : les besoins en matériel de laboratoire, consommables, verreries et en produits.....	05
Tableau N°02 : objectifs des tests biochimiques et moléculaire.....	14
Tableau N°03 : Caractères culturaux et microscopiques de la flore totale.....	21
Tableau N°04 : Caractères culturaux et microscopiques des isolats bactériens lactiques.....	24
Tableau N°05 : l'activité protéolytique des isolats lactiques.....	31

Liste des figures

Figure N°01 : Schéma explicatif de Protocole expérimental	06
Figure N°02 : Isolement des bactéries lactiques à partir du blé sur gélose (MRS,MRS _a ,M17) et repiquage sur bouillon(MRS,MRS _a ,M17).....	08
FigureN°03 :conservation à courte durée des bactéries lactiques purifiée.....	09
FigureN°04 :conservation à long durée des bactéries lactiques purifiée.....	10
Figure N°05 : Étapes de quantification de biofilm par cristal violet.....	16
Figure N°06 : Étape d'agrégage	17
FigureN°07 : Réduction d'un échantillon par la méthode du cône.....	17
Figure N°08 : consommation de hamoum (I)	18
Figure N°09 : Consommation de hamoum (II).....	19
Figure N°10 : Caractères microscopiques des levures et bactéries sporulantes.....	27
Figure N°11 . Capacité de production du biofilm + Intensité de l'anneau.....	29
Figure N°12 : Capacité d'agrégation.....	30

Sommaire

Remerciement

Dédicaces

Liste d'abréviation

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I.1. Objectif.....	04
I.2. Lieu de travail	04
I.3. Matériel.....	04
I.3.1. Échantillon de Hamoum.....	04
I.3.2. Appareillage, verreries et produits chimiques.....	05
I.4. Méthodes.....	06
I.4.1. Protocole expérimental.....	06
I.4.2. Questionnaire.....	07
I.4.3. Échantillonnage et spécification de l'échantillon	07
I.4.3.1. Préparation de la solution mère.....	07
I.4.3.2. Préparation de dilutions décimales.....	07
I.4.3.3. Analyse microbiologique.....	07
I.4.3.4. Isolement et purification des bactéries lactiques.....	07
I.4.3.5. Conservation des souches.....	09
I.4.3.6. Identification des isolats	11
I.4.3.6.1. Caractères morphologiques	11
I.4.3.6.2. Test de catalase.....	11
I.4.3.6.3. Test d'oxydase	11

I.4.3.6.4. Test sur milieu mannitol-mobilité	11
I.4.3.6.5. Citrate de Simmons.....	11
I.4.3.6.6 Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH), lysine décarboxylase (LDC) ornithine décarboxylase (ODC).....	12
I.4.3.6.7. Test Clark & Lubs	12
I.4.3.6.8. Test d'utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron (TSI)	12
I.4.3.6.9. Test ONPG.....	13
I.5. Etude de quelques propriétés technologiques des bactéries lactiques.....	15
I.5.1. Activité protéolytique	15
I.5.2. Pouvoir d'agrégation des isolats lactiques.....	15
I.5.3. Détection et quantification du Biofilm.....	15

Resultats et discussion

II.1. Préparation et prélèvement de l'échantillon.....	17
II.2. Niveaux et modalités de consommation du Hamoum.....	18
II.3. Composition microbienne dans le Hamoum.....	20
II.4. Caractéristiques technologiques des isolats : Capacité de production du biofilm et activité protéolytique.....	28
II.4.1. Capacité de production du biofilm.....	28
II.4.2. Activités enzymatique des souches isolées.....	30
II.4.2.1. Activité protéolytique.....	30

Conclusion

Références bibliographiques	33
Annexe	40
Annexe 02 : Composition des milieux de culture.....	40
Annexe 03 : Information sur l'échantillon.....	46
Annexe 04 : Tests d'identifications biochimiques.....	49

Résumé

La fermentation est un procédé ancestral et l'une des méthodes économiques les plus utilisées dans la conservation et la transformation des matières premières alimentaires ; elle prolonge leurs durées de vie en éliminant les facteurs toxiques et anti-nutritionnels. Leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles sont également améliorées (**Tamang, 2010**). Les aliments fermentés sont la base de l'alimentation de nombreuses populations, en particulier dans les pays en voie de développement et émergents où la fermentation est souvent la seule façon de préserver les aliments contre les microorganismes d'altération (**Humblot and Guyot, 2008**). Ils participent également à l'identité culturelle, car ils sont souvent liés à de très anciennes habitudes et pratiques alimentaires traditionnelles (**Guyot, 2012**).

Les aliments fermentés conventionnels, largement produits dans le monde occidental (produits laitiers, levain, viande et vin), ont reçu une attention scientifique significative liée à l'existence d'un puissant marché économique. Ce qui n'est pas le cas dans les pays en voie de développement, particulièrement en Afrique, où la préparation de nombreux aliments fermentés locaux reste encore un savoir-faire spécifique à chaque population. Ils sont souvent produits au sein des ménages dans les villages ou dans des industries de type artisanal (**Motarjemi, 2002 ; Guyot, 2012**).

Les céréales sont les premières sources d'aliments de l'homme (**Matz, 1971**), leur transformation est faite essentiellement par fermentation (**Akinrele, 1970 ; Akingbala et al., 1981 ; Fields et al., 1981 ; Adeyemi et Beckley, 1986**). La majorité des produits céréaliers en Afrique ont subi des fermentations et utilisées comme des aliments de sevrage pour les nourrissons et comme des aliments de base pour les adultes (**Osungbaro, 2009**).

En Algérie et dans certaines régions, le blé dur est fermenté dans des silos souterrains appelés « *MATMOR* ». Après la sédentarisation, les populations algériennes se sont intéressées à un autre procédé pour fermenter le blé dans un délai court ; la fermentation a lieu dans des « fûts ». Les conditions de la fermentation sont réalisées en présence d'eau uniquement ou supplémentées avec du vinaigre. Ce qui favorise un milieu privilégié pour une grande diversité de microorganismes responsables du déclenchement du processus fermentaire et des modifications des caractéristiques du blé en produisant des variétés de saveurs, de textures et d'arômes particuliers très convoités par le consommateur des régions spécifiques (**Boudreau et Ménard, 1992 ;**

Parveen and Hafiz, 2003 ; Jeantet et al., 2006).

Cependant, les céréales, dont le blé, sont naturellement contaminées par des organismes eucaryotes (moisissures et levures) et procaryotes (bactéries). Cette flore microbienne forme un équilibre très fragile et peut altérer la qualité, comme les aliments fermentés et les levains. Par ailleurs, l'équilibre de la population microbienne totale présente dans les grains de blé peut être affecté par de nombreux facteurs. Parmi les facteurs de ce déséquilibre, on cite les conditions climatiques, essentiellement la température et l'humidité et les conditions biotiques liées aux attaques par des insectes et des moisissures et l'application des pesticides. Parmi les microorganismes associés aux céréales, les bactéries lactiques jouent un rôle très important dans la préservation de l'équilibre de la flore microbienne et la stabilisation des produits finaux de la fermentation (**Caplice, 1999**).

Divers composés sont formés à partir de l'hydrolyse des composants des céréales (amidon, protéines et lipides), par des enzymes d'origine endogène et microbienne. En fonction de la structure chimique et la production des métabolites générés par ces activités enzymatiques, le goût, la texture, la consistance et les propriétés fonctionnels des produits sont affectés. La plupart des travaux sur les aliments à base de céréales fermentées sont consacrées à la caractérisation des communautés microbiennes impliquées et à leur interaction avec la matrice. Le but est d'acquérir les connaissances nécessaires pour améliorer leur qualité et attractivité, garantir leur sécurité, et permettre leur production à plus grande échelle.

En effet, outre les fermentations dont elles sont responsables, les bactéries lactiques empêchent la multiplication d'autres espèces bactériennes pathogènes ou susceptibles de dégrader les produits alimentaires (**Bekhouche et al., 2013**).

Les microorganismes ont besoins d'énergie pour assurer leur développement mais l'accès à ces macronutriments nécessitent le mécanisme des enzymes microbiennes (amylolytiques, lipolytiques et protéolytiques) pour les convertir en éléments assimilables.

Pour cela nous avons choisi un blé dur de type fermenté « Hamoum » de la région de Ouled Ayche de la wilaya de Relizane qui est considérée parmi les aliments qui sont le moins fréquemment employé dans notre pays à cause de l'ignorance des gens mais qui

Introduction

sont utilisées traditionnellement contre plusieurs maladies. Le blé fermenté de matmor, est un produit local qui abrite divers microorganismes dont les bactéries lactiques.

Ce produit reste sommairement caractérisé de point de vue microbiologique, biodiversité en bactéries lactiques et biofonctionnalité. Le but de ce travail est l'isolement de certaines bactéries lactiques impliquées dans la fermentation de notre échantillon et d'étudier certaines de leurs activités bio-fonctionnelles.

I.1. Objectif

Le travail a eu pour objectif d'étudier la flore bactérienne d'un échantillon de blé fermenté de type « Hamoum », d'isoler la flore lactique et d'évaluer ses activités biologiques : activité protéolytique et capacité d'agrégation et formation de biofilm.

I.2. Lieu de travail

Il a été conduite une enquête dans la ville de Relizane où il a été obtenu l'échantillon de l'étude. Les analyses de l'échantillon ont été réalisées dans deux établissements :

- Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Tiaret, au sein des Laboratoires de physiologie végétale et de microbiologie.
- Le centre de recherche scientifique et technique en analyse physico-chimique-Expertise C.R.AP.C, Bousmail. Tipaza.

I.3. Matériel

I.3.1. Échantillon de Hamoum

L'échantillon de blé fermenté Hamoum a été récolté le 13 /03/2018 à partir d'une matmor dans la région de Ouled Ayche de la wilaya de Relizane (**Annexe 03**).

Le blé a été maintenu dans un silo souterrain (argileux), à température non-contrôlée, en absence d'air, et pendant deux ans, en vue de sa fermentation.

I.3.2. Appareillage, verreries et produits chimiques

L'ensemble du matériel de laboratoire utilisé est récapitulé dans le **tableau 1** ci-dessous :

Tableau N°01 : les besoins en matériel de laboratoire, consommables, verreries et en produits.

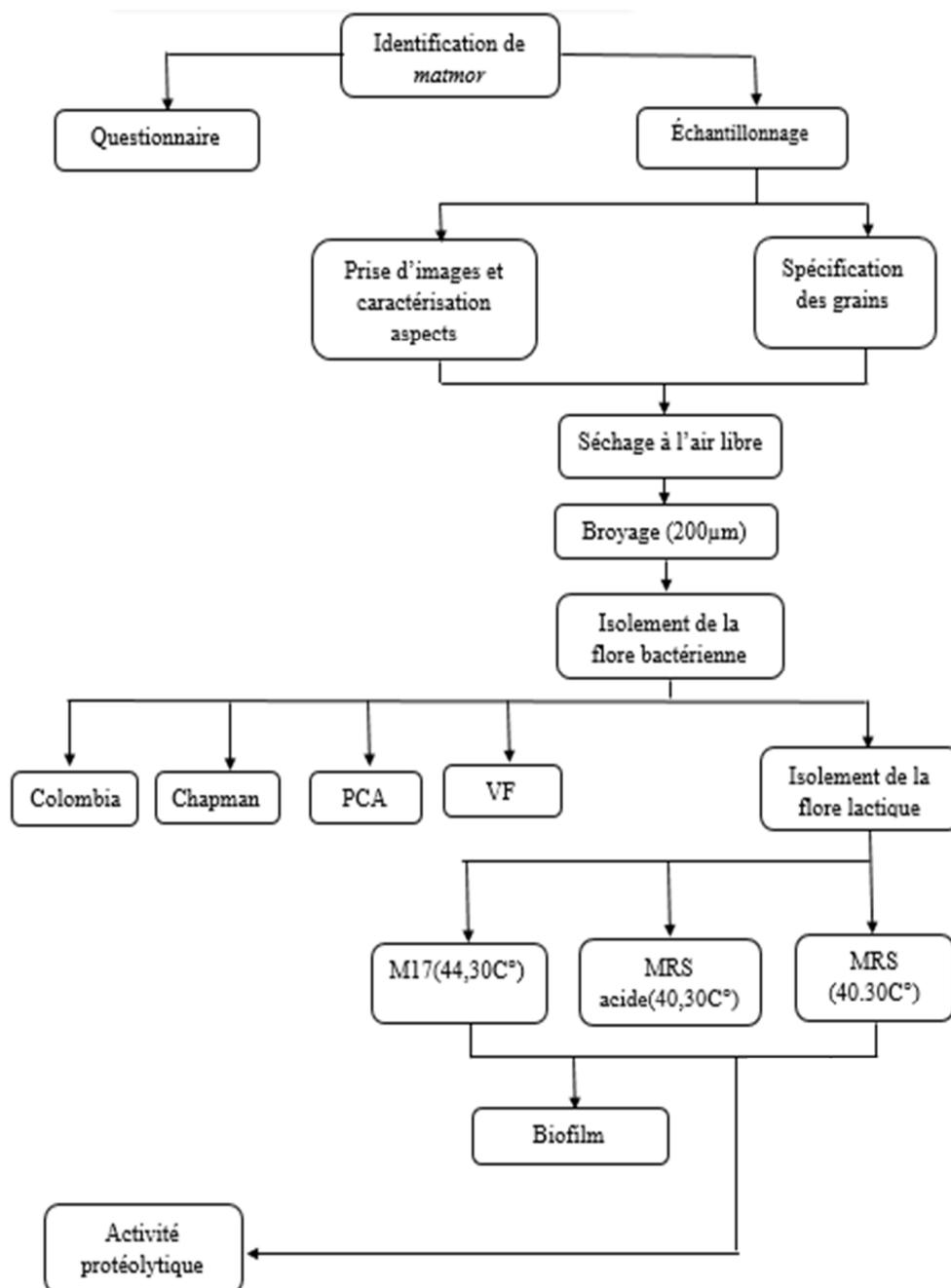
Produits	Appareils	Verreries et autres
Eau distillé	Agitateur magnétique	Béchers
Gélose Chapman	Chauffant	Boîtes de pétri
Gélose citrate de Simmons	Balance	Ecouvillons
Gélose Clark et Lubs	Bec Bunsen	Eprouvettes
Gélose Colombia	Bain-marie	Flacons
Gélose EMB	Broyeur	Lames et lamelles
Gélose et bouillon M17	Centrifugeuse	Lance de platine
Gélose Mac-Conkey	Dessiccateur	Pinces
Gélose et bouillon MRS	Incubateur	Pipettes Pasteur
Gélose PCA	Micropipettes	Seringues stériles
Gélose viande fois	Microscope	
	PH-mètre	
	Spectrophotomètre de masse	
	Tamis	
	Vortex	

I.4. Méthodes

I.4.1. Protocole expérimental

L'ensemble des étapes suivies lors de notre expérimentation est résumé dans la figure 1 ci-dessous :

Figure N°01 : schéma explicatif de protocole expérimental.



I.4.2. Questionnaire

Il a été conçu pour une enquête sur la connaissance de l'appréciation de blé fermenté auprès des personnes âgées de deux tranches d'âge (enfant et adulte).

I.4.3. Échantillonnage et spécification de l'échantillon

Le blé fermenté est prélevé, à partir de la surface et après homogénéisation, dans des plastiques hermétiques à ouverture ceinture. L'échantillon est transporté au laboratoire dans une glacière. Enfin, au laboratoire, l'échantillon est trié selon la méthode des cônes pour la spécification. Après la spécification, l'échantillon est conservé au réfrigérateur jusqu'à l'analyse microbiologique.

I.4.3.1. Préparation de la solution mère

1 g de poudre d'échantillon a été mélangé, par vortex vigoureux de 2 min, à un volume de 9 ml d'eau tryptonée 1% préalablement préparée.

I.4.3.2. Préparation de dilutions décimales

Une dilution successive d'ordre 6 a été réalisée. Brièvement, 1 ml de la solution mère (dilution d'ordre 1) est mélangé aseptiquement à 9 ml d'eau physiologique stérile. La dilution obtenue d'ordre 2 est prélevée 1 ml dans 9 ml d'eau physiologique pour constituer la dilution suivante d'ordre 3. L'opération est répétée ainsi de suite jusqu'à l'ordre 6 (Concentration 10^{-6} g/ml).

I.4.3.3. Analyse microbiologique

Afin d'avoir une idée sur la flore microbienne installée dans notre échantillon, 100 µl de la solution mère sont ensemencés, dans des conditions d'aspecie, sur des milieux de cultures sélectifs disponibles : Chapman, Mac-konky, Viande foie et des milieux ordinaires : PCA et Columbia.

I.4.3.4. Isolement et purification des bactéries lactiques

0,1 ml de la suspension microbienne est stérilement déposée à la surface des géloses : MRS, MRS acidifié (PH = 4.5) et M17. Les dilutions sont ainsi soigneusement réparties sur la surface puis incubées à 37 °C dans les conditions d'aérobiose et d'anaérobiose pendant 48–72 h.

L'anaérobiose est obtenue en utilisant une bougie et un dessiccateur. Les boîtes sont ensemencées en duplicata et retenues pour la suite de l'étude (Kacem et Karam, 2006).

A partir des colonies identiques, isolées, et caractéristiques des bactéries lactiques (couleur, taille et forme), trois sont aléatoirement repiquées dans les milieux correspondant pour s'assurer de la pureté. Les boîtes homogènes et pures sont retenues pour la suite de l'étude (Figure 2).

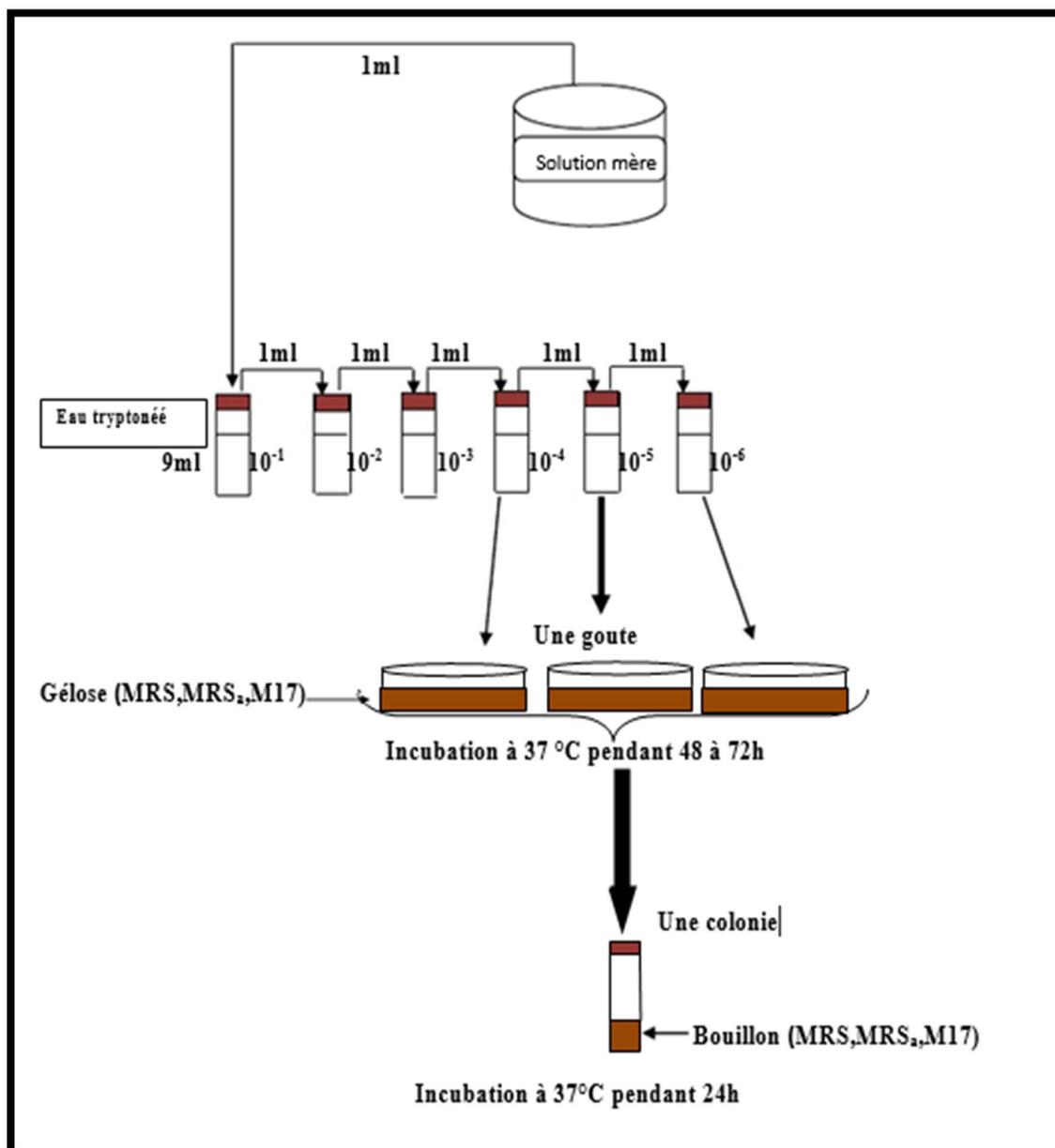
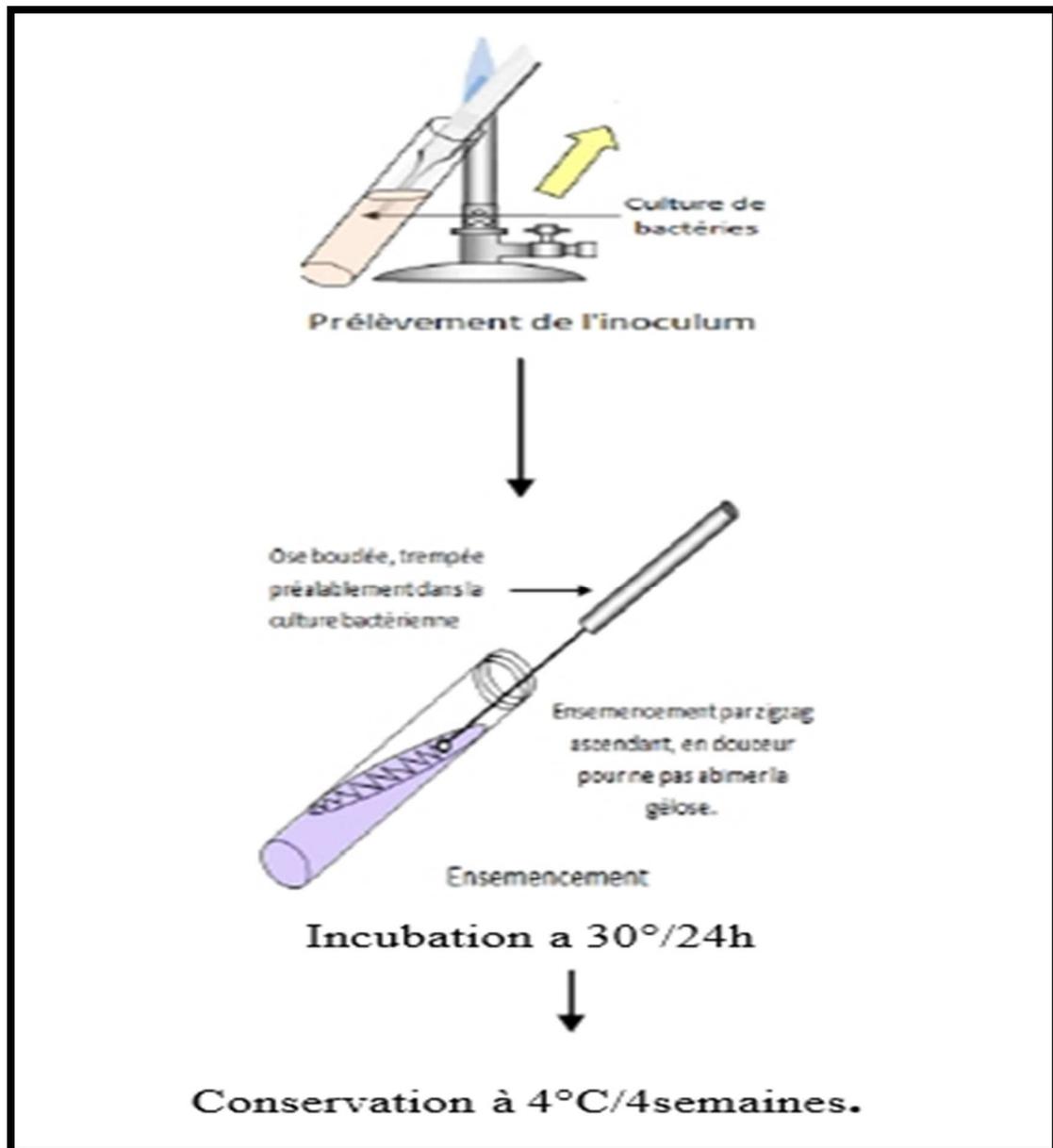


Figure N°02: Isolement des bactéries lactiques à partir du blé sur gélose (MRS, MRS_a, M17) et repiquage sur bouillon (MRS, MRS_a, M17).

I.4.3.5. Conservation des souches

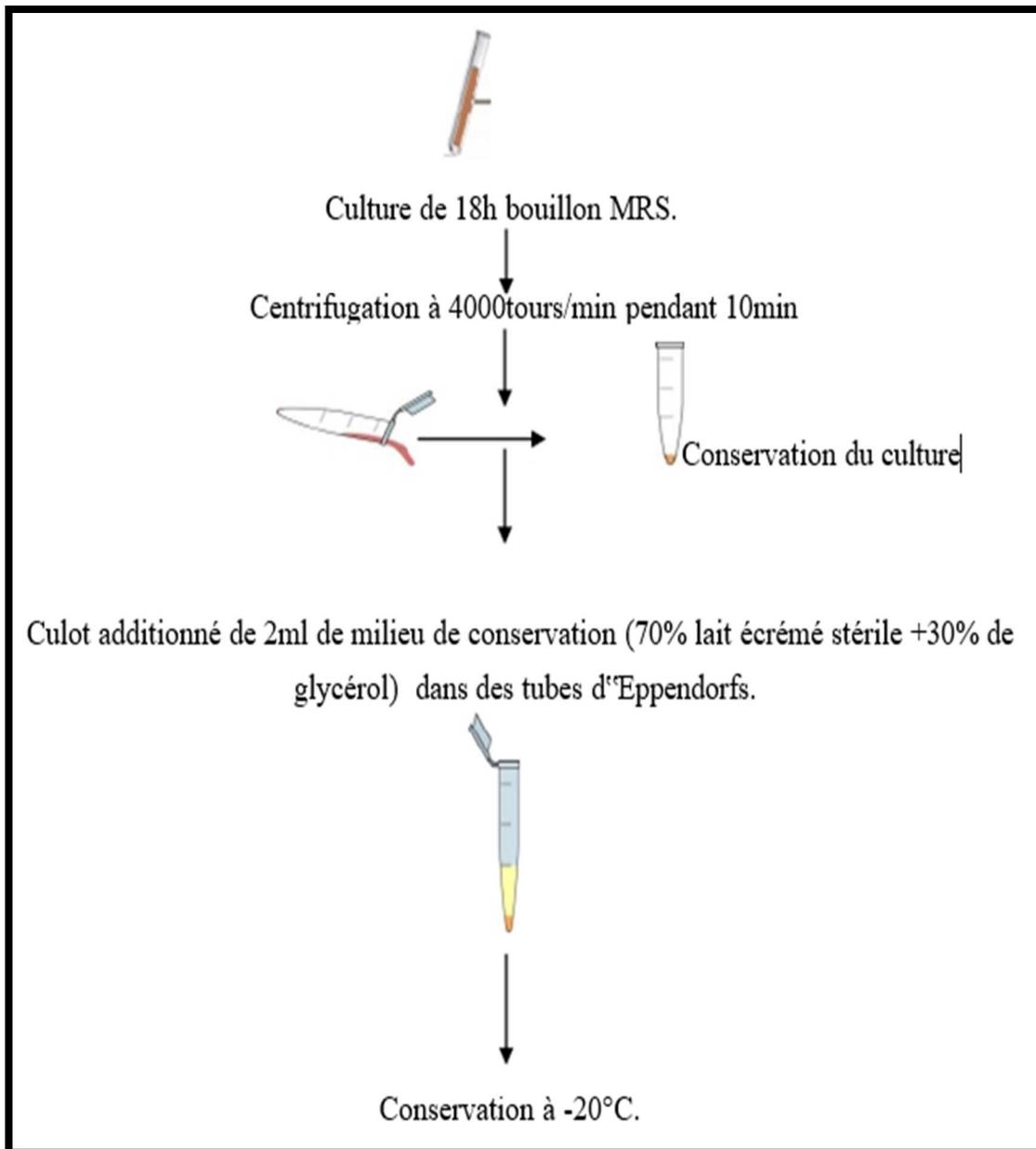
La conservation des souches pures a été faite selon deux méthodes : à court et à long terme.

- À court terme (**Figure 3**), des colonies ont été repiquées sur les géloses MRS et M17 inclinées en tube et conservées à 4°C. Le repiquage doit être répété chaque mois.



FigureN°03 : Schéma de conservation à courte durée des bactéries lactiques purifiées (Badis *et al.*, 2005)

- À long terme (**Figure 4**), les souches sont conservées dans une solution contenant 70% de lait écrémé (enrichie par 0.5g/l d'extrait de levure et 0.5g/l de gélose et 30% de glycérol à 40% à -20 °C) (**Sameilis et al., 1994**).



FigureN°04 :Schéma de conservation à long durée des bactéries lactiques purifiées (**Badis et al.,2005**)

I.4.3.6. Identification des isolats

Une identification spécifique présomptive a été réalisée en notant les caractères morphologiques et visuelles des différents isolats.

I.4.3.6.1. Caractères morphologiques

Les aspects taille, forme et couleur des colonies, la turbidité de liquide, et la coloration du Gram, forme cellulaire et mode d'association ont été observés (**Omar, 2013 ; Larpent et al., 1990**).

I.4.3.6.2. Test de catalase

Le test consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (10 volumes) dans laquelle sera dissocié un petit prélèvement de la colonie. La souche examinée est dite catalase positive si un dégagement gazeux est observé et le contraire indique l'absence de l'enzyme catalase (**Marchal et al, 1991**).

I.4.3.6.3. Test d'oxydase

Il consiste à prendre une partie d'une colonie pure du milieu MRS ou M17 gélosé et la mettre en contact avec un disque « Ox ». Le développement d'une couleur violette signifie que le test est positif et que l'isolat possède l'enzyme cytochrome oxydase (**Kovacs et al, 1995**).

I.4.3.6.4. Test sur milieu mannitol-mobilité

Ce test permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries. L'ensemencement des souches a été réalisé par piqûre centrale jusqu'au fond de la gélose à l'aide d'une pipette Pasteur. La fermentation du mannitol se traduit par virage de la couleur du milieu du rouge au jaune. Les bactéries mobiles se déplacent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble dans le milieu, alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement (**Gerhardt et al, 1994**).

I.4.3.6.5. Citrate de Simmons

L'utilisation du citrate est étudiée sur milieu Kempler et Mc-Kay (1980) (**Kihal et al,1996**). Ce milieu contient une solution de ferricyanide de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le potassium ferricyanide. Les colonies qui fermentent le citrate lancent la

réaction entre ces ions il en résulte la formation de colonies bleues ou ayant un centre bleu (après 18 h-72 h d'incubation). L'interprétation des résultats est comme suivie : **(Marchal et al., 1991)**.

- Citrate-positive : culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu).
- Citrate-négative : pas de culture (coloration verte de milieu inchangée).

I.4.3.6.6 Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH), lysine décarboxylase (LDC) ornithine décarboxylase (ODC)

Elles sont mises en évidence sur un milieu de **Moëller (Moëller, 1955 ; Harrigan et McCance, 1976)**.

Après 2 à 6 jours d'incubation à 37 °C virage du milieu au jaune due à l'acidification du milieu par la fermentation du glucose **(Larpen- Gourgaude , 1997 ; Carr, 2002)**. La dégradation de « l'arginine, lysine, ornithine » aboutissant à la formation d'ammoniaque est révélée par réalcalination du milieu qui revient à sa couleur initiale (violette) **(Belarbi, 2012)**.

I.4.3.6.7. Test Clark & Lubs

Le milieu de Clark & Lubs permet de différencier les Enterobacteriaceae avec les réactions au rouge de méthyle et de Voges-Proskauer. Le rouge de méthyle différencie le processus de fermentation, il est jaune au-dessus d'un PH de 6,3 et rouge en dessous d'un PH de 4,2. La production d'acétylméthylcarbinol se révèle par l'apparition d'une coloration rouge en surface du milieu **(Dellarras, 2007)**.

I.4.3.6.8. Test d'utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron (TSI)

La pente du milieu TSI estensemencée par stries et le culot par piqure centrale. Après, une incubation à 37C° pendant 24 h :

- Le virage du culot au jaune signifie la fermentation du glucose.
- La présence de bulles de gaz signifie la fermentation avec production du gaz.
- Le virage de la pente au jaune signifie l'utilisation du lactose ou saccharose ou les deux à la fois.

- Une coloration noire, signifie la production d'hydrogène sulfuré(H₂S) (**Khaladi et al 2015**).

I.4.3.6.9. Test ONPG

Pour dégrader le lactose ; les microorganismes doivent libèrent deux enzymes :la perméase et β -galactosidase, l'épreuve ONPG permet de mettre en évidence la β -galactosidase qui dégrade l'ONPG qui présente une structure analogue au lactose. L'hydrolyse de l'ONPG libère l'orthonitrophényl qui est responsable de la coloration jaunâtre de milieu (**Marchal et Boudron,1982**). Il est ajouté un disque ONPG dans une suspension (dans l'eau) dense d'isolat. Le virage de couleur au jaune indique activité B-galactosidase.

Tableau N°02: Tableau récapitulatif des objectifs des tests biochimiques et moléculaires.

Test	Objectif
Coloration de Gram	Permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association.
Recherche de la catalase	La capacité de la décomposition de peroxyde d'hydrogène par les souches isolées.
Recherche de l'oxydase	La cytochrome oxydase ou oxydase est une enzyme de la chaîne respiratoire bactérienne qui catalyse des réactions d'oxydation.
Mannitol-Mobilité	Permet de voir si les bactéries capable de fermenter le mannitol et en parallèle l'étude de la mobilité de celui-ci.
Test TSI	La fermentation des trois sucres (Saccharose, lactose et glucose).
La recherche de l'ADH, LDC et ODC	Permet de voir si la bactérie possède l'Arginine d'hydrolase lysine et ornithine décarboxylase.
L'utilisation du citrate	La capacité d'utilisé de citrate par les bactéries isolées
Test Clark & Lubs	Permet de différencier les Enterobacteriaceae avec les réactions au rouge de méthyle et de Voges-Proskauer.
Test ONPG	Permet de voir la capacité métabolique de lactose par le bactéries.

I.5. Etude de quelques propriétés technologiques des bactéries lactiques

I.5.1. Activité protéolytique

L'activité protéolytique des bactéries est mise en évidence et comparée sur un milieu plus riche (MRS) additionné de lait écrémé (YMA) (El-Kady et al., 1984). Les bactéries à tester, issues d'une culture jeune. L'inoculum a été ajusté sur l'échelle 0.5 Macfarland (Andrew, 2008).

Après incubation à 37/44 °C pendant 24-48h, L'activité protéolytique de ces isolats se manifeste par l'apparition des colonies sur gélose (Hassaine , 2013).

I.5.2. Pouvoir d'agrégation des isolats lactiques

Le pouvoir d'agrégation des isolats a été estimé selon le protocole de Kos et al. (2003), Une suspension bactérienne, ajusté sur l'échelle 0.5 Mcfarland à 10^8 , a été homogénéisée rigoureusement par vortex de 2 min et décanté pendant cinq heures à la température de laboratoire. Les DO ont été prises chaque heure à 623 nm. Le taux d'agrégation (Ag%) est estimé par l'équation ci-dessous :

I.5.3. Détection et quantification du Biofilm

La propension des isolats à s'organiser en biofilm a été évaluée par le test de coloration au cristal violet sur tube et sur micro-plaque 96 puits. La coloration a été réalisée suivant la méthode modifiée décrite par Boubakeur et al. (2016).

5 ml et 0.150 ml d'une suspension de densité de 0.08 sur 0.5 Mac.Farland (dans du bouillon MRS/M17) sont respectivement mis dans un tube à essai et un puits de la micro-plaque. L'ensemble est incubé 24h à 37°C.

Les tubes et les puits sont lavés trois fois avec du tampon phosphate salin (PBS) et séchés. Les biofilms ainsi formés par l'adhésion des bactéries sessiles sont colorés avec du Cristal Violet (CV) à 0,1%. La formation du biofilm est considérée comme positive lorsqu'un film visible recouvre le mur et le bas du tube ou du puits (**Figure 5**).

Le biofilm a été quantifié à partir des tubes en dissolvant le colorant adsorbé dans un volume d'acide acétique la DO a été prise à 570 nm.

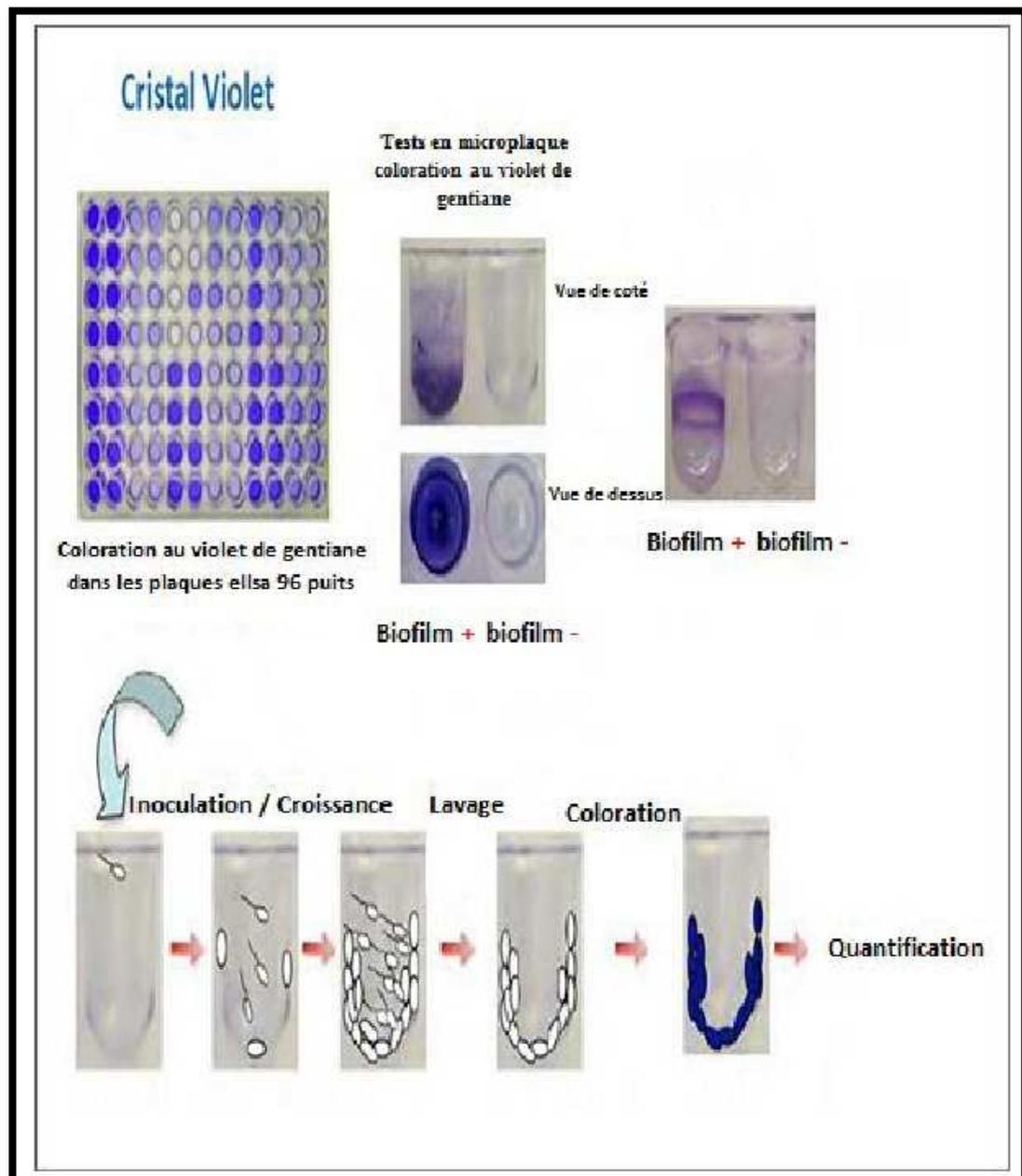


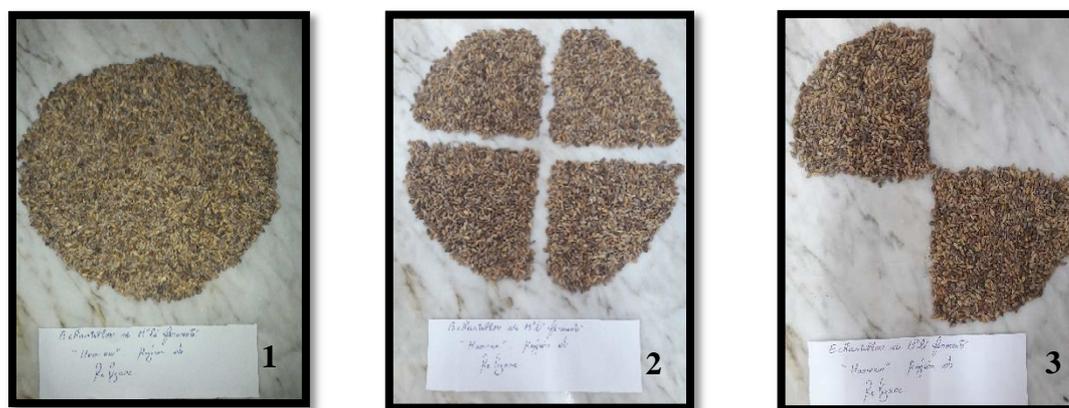
Figure N°05 : Étapes de quantification de biofilm par cristal violet
(Bellifa, 2014).

II.1. Préparation et prélèvement de l'échantillon



Figure N°06 : Étape d'agrégation.

La préparation de l'échantillon et le prélèvement de la portion servant à l'analyse sont les deux premières étapes. L'exactitude du résultat en dépend des techniques qui seront utilisées lors de ces étapes et elles devront permettre de respecter les principes suivants : L'aliquote prélevé pour l'analyse doit être le plus représentatif possible du lot et dépend de la nature de l'échantillon et les caractéristiques physiques (**Cruz,1989**).



Images réalisées par auteurs (26/02/2018)

Figure N°07 : Réduction d'un échantillon par la méthode du cône.

1. Échantillon global à réduire : grains brassés.
2. Le cône sépare en quatre parties égales.
3. Deux quart opposé sont réunis et mélangé pour former un sous échantillon représentatif.

II.2. Niveaux et modalités de consommation du Hamoum

Au total 37 répondants ont été obtenus. Il a été observé une fréquence très faible de la consommation du Hamoum parmi nos répondants. Plus de 87% consomment rarement ou très rarement le Hamoum, contre 13% assez fréquemment et 0% fréquemment (**Figure 8 A**). Cependant le Hamoum est rapporté comme un produit séculaire des pays arabes (**Merabti, 2015**). La fermentation est une technique de préservation du blé pour prévoir et résoudre les périodes de disette. Il serait en train de perdre de l'appréciation dans la nouvelle génération, face aux produits alimentaires industriels qui remplissent les marchés. 43% des interrogés l'ont connu et consommé à leur âge adulte, contre 57% à leur enfance (**Figure 8, B**). Ils le consomment principalement en famille (67%) dont 33% à une invitation (**Figure 8 C**).

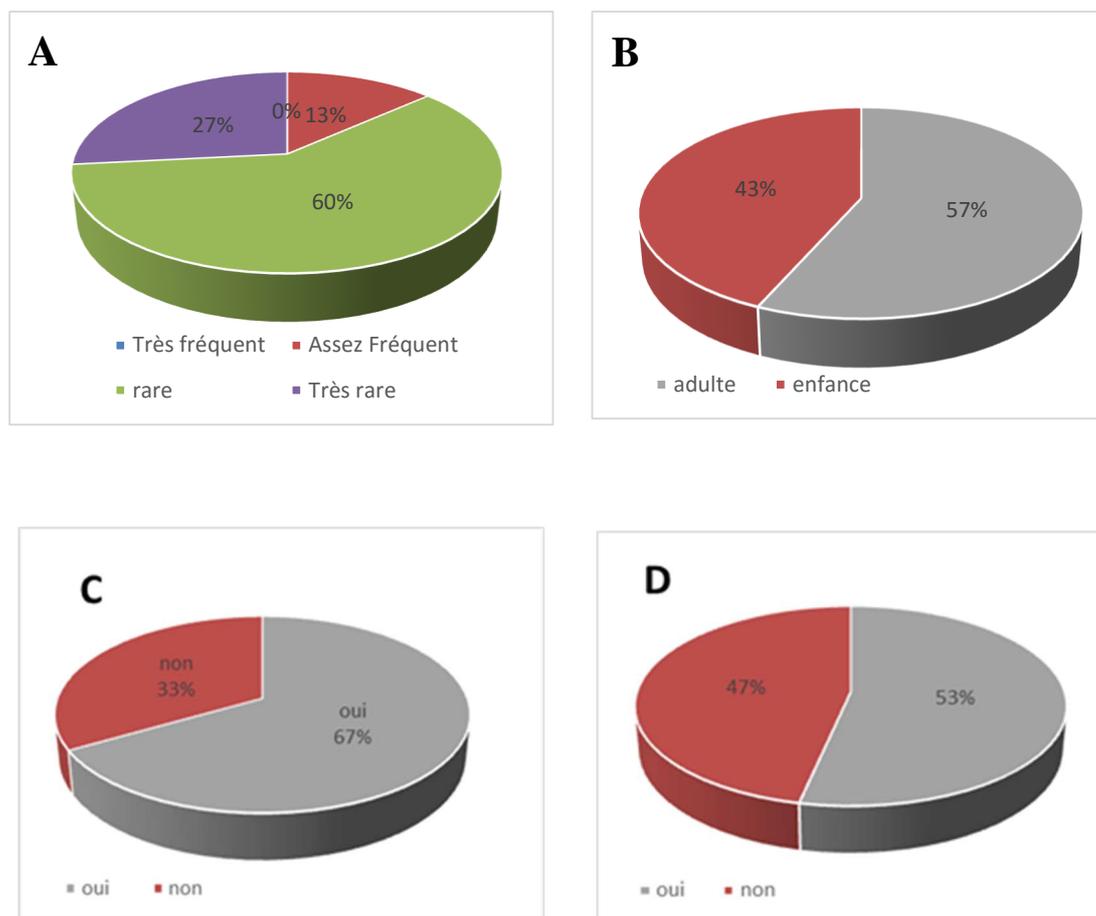


Figure N°08 : consommation de Hamoum (I). **A**. Fréquence de consommation, **B**. Distribution de l'âge de la première consommation/découverte, **C**. Cadre de consommation (en famille ou non), et **D**. Report d'indisposition digestive à la consommation du Hamoum (enquête dans la région de Relizane).

Le produit est en grande partie consommé directement par les détenteurs de Matmor (les producteurs) (73%) et seulement 27% l'achètent dans les marchés ou directement avec les producteurs (**Figure 9 A**). Les maladies nutritionnelles deviennent fréquentes dans les sociétés. Il serait important de promouvoir les produits locaux d'une grande valeur nutritionnelle. La fermentation offre au blé des nouvelles fonctionnalités organoleptiques (aspect, odeur, saveur) et nutritionnelles (composition biochimique et microbiologique bénéfique à la santé) (**Benakriche et al., 2017 ; Mokhtari, 2016 ; Merabti, 2015 ; Gourchala et al., 2014 ; Bekhouche et al., 2013**). Le blé fermenté pourrait être une importante ressource pour lutter contre les différentes maladies nutritionnelles, diabète, dyslipidémie/obésité et hypertension, qui prennent de l'ampleur dans la société algérienne. L'extrait de germe de blé fermenté est un adjuvant efficace dans le traitement du cancer gastro-intestinal (**Yeend et al., 2012**). Le profil protéique du Hamoum présenterait la même fonctionnalité (**Benkriche et al., 2017**), et le microbiote aurait un effet protecteur contre certains pathogènes gastriques (**Mokhtari, 2016**).

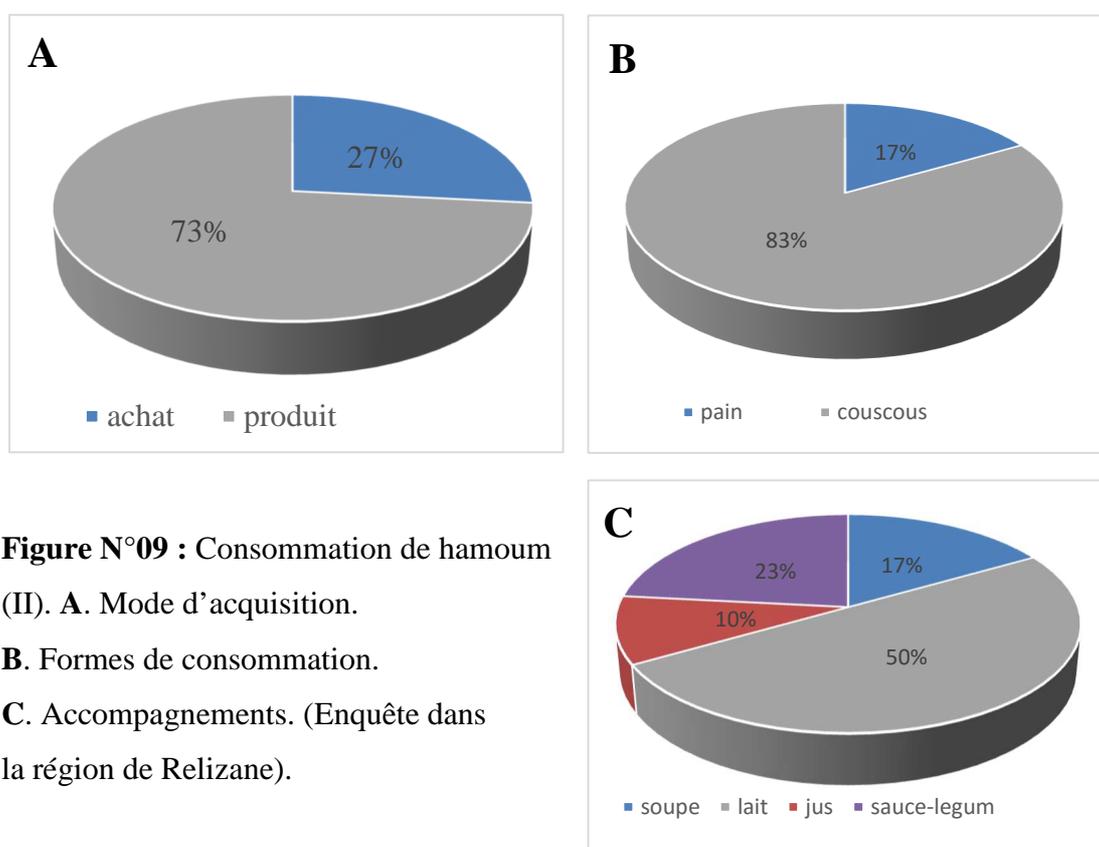


Figure N°09 : Consommation de hamoum (II). **A.** Mode d'acquisition. **B.** Formes de consommation. **C.** Accompagnements. (Enquête dans la région de Relizane).

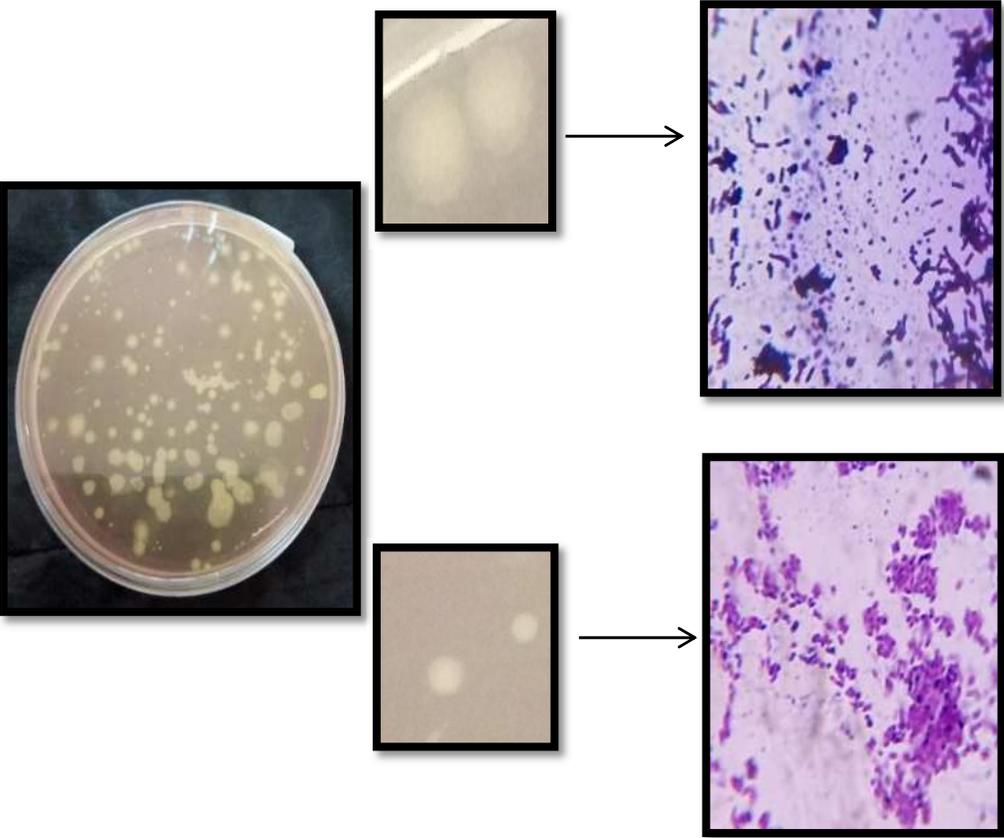
Le Hamoum est transformé et très largement consommé en couscous et pain ou galette emblématiques des pays arabes (Merabti, 2015). 83% le transforment en couscous et 17% en pain (Figure 9 A) - l'accompagne de lait (50%), soupe (17%), jus (10%), ou sans accompagnement (23%) (Figure 9 B). Les différents mets sont très appréciés des algériens. Mais un grand nombre d'interrogés (53%) (Figure 9 C) relatent des indispositions digestives, diarrhée, nausée, flatulence. En effet, le Hamoum est obtenu après plusieurs années de fermentation spontanée qui pourrait l'exposer à la contamination microbienne.

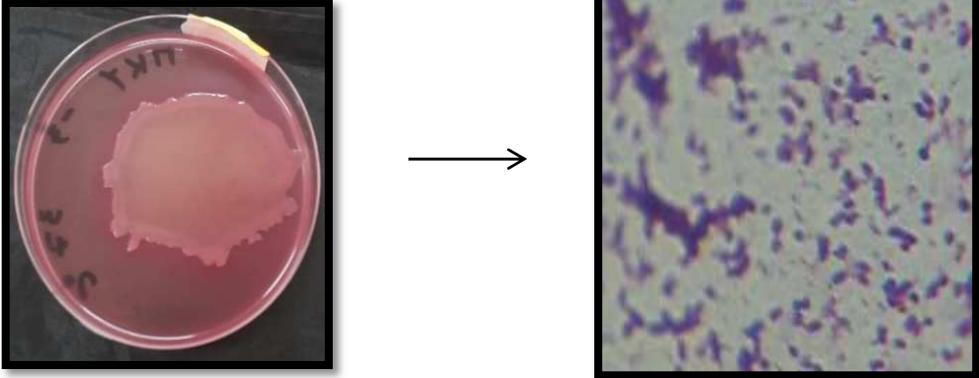
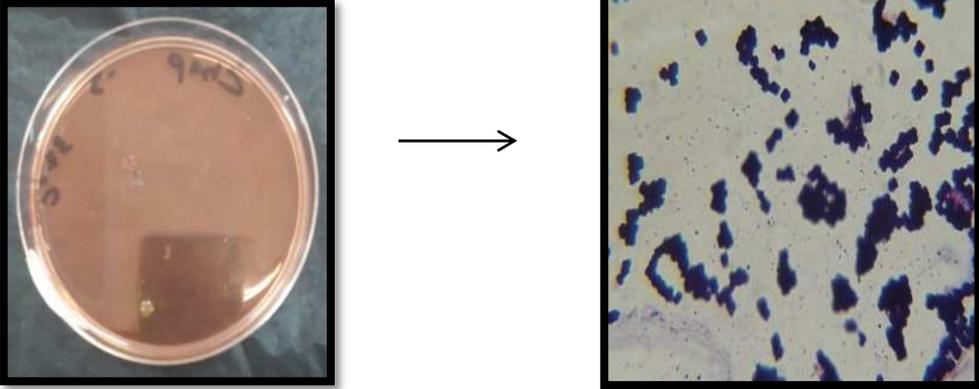
Il n'existe toujours pas, à notre connaissance, un guide de bonne pratique d'hygiène et de production. Une nouvelle méthode hors Matmor est développée pour réduire considérablement le temps de la fermentation (Merabti, 2015). Elle est également tributaire de la fermentation spontanée. Cependant, de nombreux travaux identifient une grande diversité de bactéries lactiques et leur caractéristiques technologiques (Kalbaza et al., 2018, Benakriche et al., 2016 ; Merabti, 2015 ; Bekhouche 2013) et pavent le développement de cultures starters. Les cultures starters et la fermentation hors Matmor pourront permettre une standardisation de la qualité et la maîtrise la sécurité et l'hygiène du Hamoum ; et cela en support d'un guide de bonne pratique d'hygiène et de transformation.

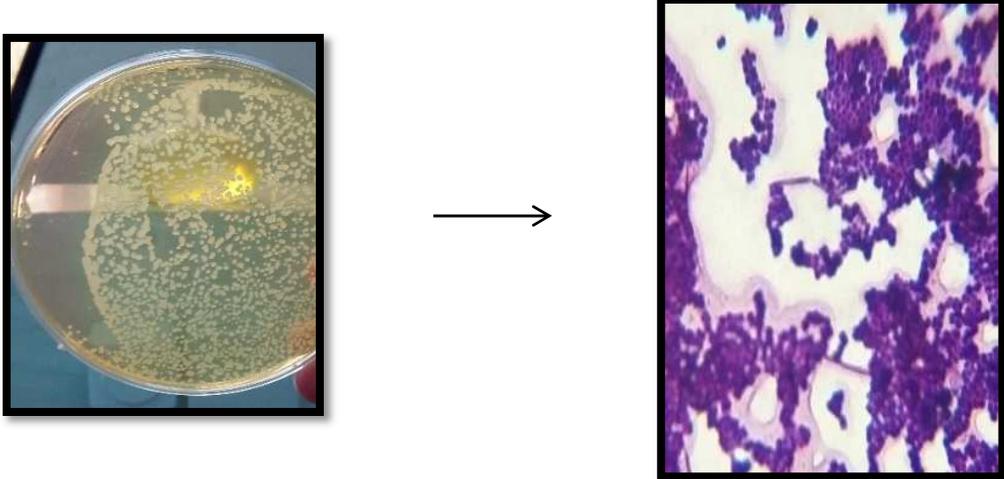
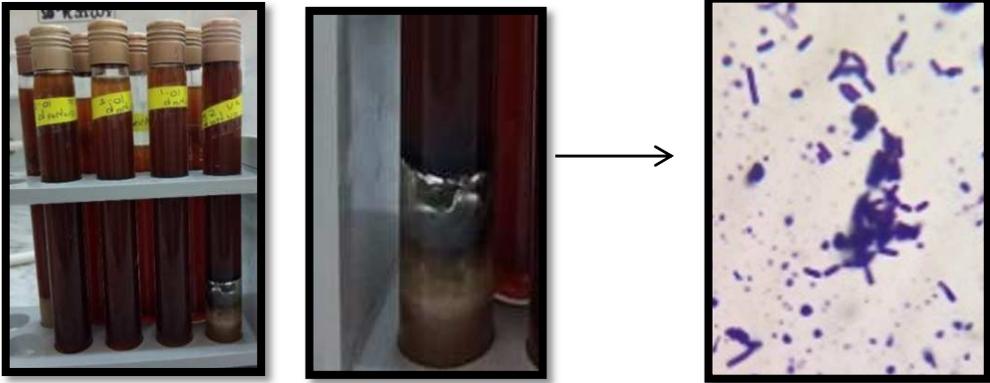
II.3. Composition microbienne dans le Hamoum

Le Hamoum a un riche microbiote, levures, bactéries lactique et bactéries sporulantes. La culture et la microscopie révèlent cette riche flore microbienne aux différents phénotypes morphologiques, culturels, et biochimiques (Tableaux 3,4). Les familles microbiennes, *Enterobactériaceae*, *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Staphylococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacillaceae* et *Saccharomycetaceae* ont été identifiées. *Enterococcus durans*, *Lysinibacillus fusiformis* et *Candida Krusei* (Figure 10).

Tableau N°03 : Caractères cultureux et microscopiques de la flore totale.

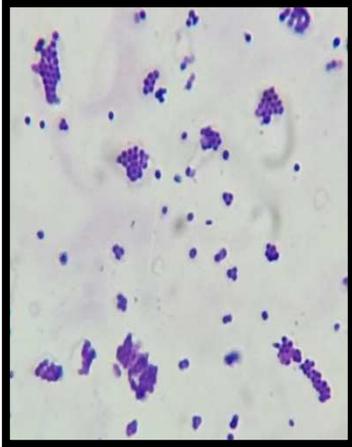
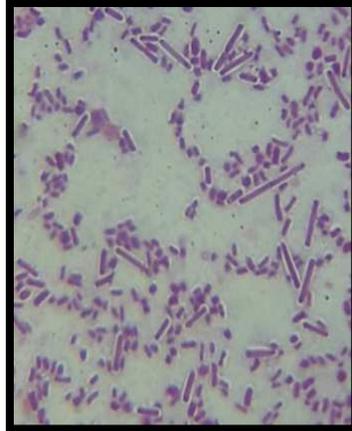
Milieu de cultures	Prises d'images (Culture et Coloration Gram)	Observations
<p>PCA Dilution 10⁻³</p>		<p>Flore totale abondante : Deux types de colonies distinctes de taille et de viscosité ; Coloration de Gram : mélange des coques, coccobacilles et bacilles à Gram positif et négatif.</p>

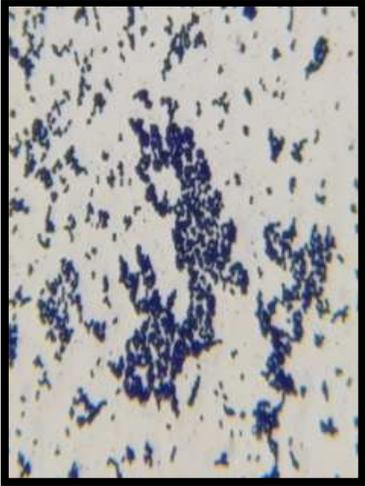
<p>Mac-Conkey Dilution 10^{-3}</p>		<p>Culture en nappe rouge (Lactose positif).</p> <p>Coloration de Gram : coccobacilles à Gram négatif.</p> <p>Orientation : <i>Enterobacteriaceae</i>.</p>
<p>Chapman Dilution 10^{-3}</p>		<p>Absence de virage de la couleur de la gélose.</p> <p>Coloration de Gram : coques à Gram positif.</p> <p>Regroupement caractéristique en amas.</p> <p>Orientation : <i>Staphylococcaceae/micrococcaceae</i>.</p>

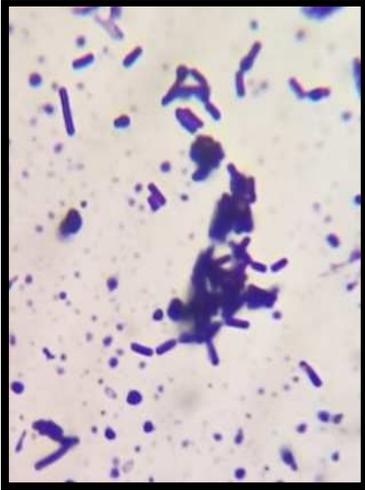
<p>Columbia Dilution 10^{-3**}</p>		<p>Flore abondante : Mélange de colonies distinctes de tailles et viscosités. Coloration de Gram : Mélange de coques et bacilles à Gram positif. Petites colonies caractéristiques - Orientation : <i>Streptococcaceae</i>/ <i>Enterococcaceae</i>.</p>
<p>Gélose Viande Foie (VF) 10⁻³ Culture profonde</p>		<p>Croissance en profondeur. Fragmentation de la gélose : production de gaz. Coloration noire caractéristique Orientation : <i>Clostridium spp.</i></p>

*Référence Cowan et Steel (2003).

Tableau N°04 : Caractères cultureux et microscopiques des isolats bactériens lactiques.

Code	Conditions de culture	Prises d'images (Culture et Coloration de Gram)		Observations
BFR ₁	M17 à 30°C en Aérobiose pendant 24 heures			<p>Colonies circulaires crémeuses. Coques isolés + diplocoques + petites Chaînettes à Gram positif</p>
BFR ₂				<p>Colonies bombées et crémeuses. Coccobacille paires et en chaînes Gram positif.</p>

<p>BFR₃</p>	<p>M17 à 30°C en Aérobiose pendant 24 heures</p>			<p>Colonies bombées blanchâtre. Coques Isolé + diplocoque + petites chaînettes à Gram positif.</p>
<p>BFR₄</p>				<p>Très petites colonies transparentes Bacilles paires et en chaînes à Gram positif</p>

<p>BFR₅</p>	<p>MRS à 44 °C en microaérobiose pendant 48 heures</p>	 	<p>Colonies crémeuses blanchâtre. Bacilles paires à Gram positif.</p>
-------------------------------	--	--	---

** Les colorations de Gram de colonies prises aléatoirement de la culture Columbia ont montré des levures, des bacilles à Gram négatif, et des coques et bacilles à Gram positif.

5 colonies d'aspects et tailles distincts et à Gram positif (BFR₁, BFR₂, BFR₃, BFR₄ et BFR₅), isolées sur M17 et MRS à différentes conditions (**Tableau 3**) ont été retenues pour l'identification biochimique (**Tableau 5**). L'isolat d'identification difficile, des lames soupçonnées bactéries sporulantes et de levures (**Figure 10**).

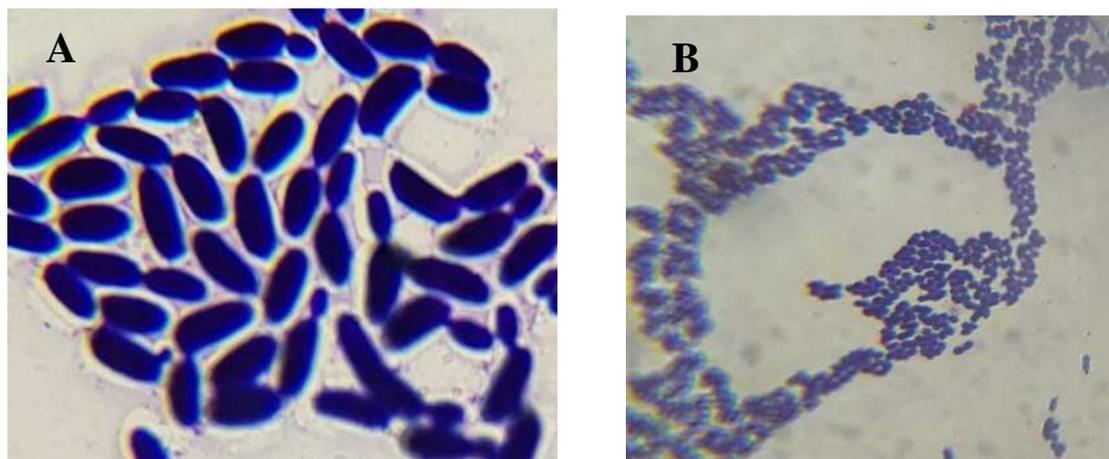


Figure N°10 : caractères microscopiques des levures et bactéries sporulantes.

A. Levures et **B.** Bactéries sporulantes présomptives.

Les bactéries sporulantes ne sont pas des microbiotes habituels dans la fermentation du Hamoum. Dans le Hamoum, les bactéries lactiques et rarement les levures sont les leaders de la fermentation (Merabti, 2015 ; Benakriche, 2016).

La composition microbienne prédominante en bactéries lactiques est en accord avec plusieurs travaux précédents (**Benakriche et al., 2016 ; Mokhtari, 2015 ; Merabti, 2015 ; Ennadir et al., 2014**), les genres ou espèces présumés des bactéries lactiques isolées, selon la description morphologique des colonies et les tests biochimiques réalisés (**Annexe 3**), sont récapitulés dans le tableau N°04 et le tableau N°05. Une confirmation de ces attributs est fortement recommandée par des tests d'identification biochimiques (galerie API) et moléculaires. Cependant, à notre connaissance, aucun des travaux ne soulève la question de la sécurité sanitaire/microbiologique du Hamoum. Nous avons révélé la présence d'une flore qui pourrait être toxigénique et pathogène, notamment *Candida Krusei*, *Staphylococcus* spp, *Enterococcus durans*, et *Clostridium* spp. La mise en évidence de ce risque sanitaire (et le report d'indisposition digestive) soulève la question d'une recherche approfondie, afin de connaître les points de contamination et mesurer les risques associés. La présence de bactéries sporulantes non pathogènes, *Lysinibacillus fusiformis*, laisse supposer que la fermentation du blé pourrait impliquer les *Bacillus*. Il n'a pas été possible de trouver une recherche sur le microbiote sporulant du Hamoum. Les conditions de transformation du Hamoum, sous-sol, contrainte hydrique et haute température suggèrent fortement une implication des bactéries sporulantes, qui sont telluriques et résistantes à ces conditions. Les *Bacillus* ont des caractéristiques technologiques, activité protéolytique et caractères probiotiques (résistance à l'environnement gastrique, production de substance antimicrobienne) (**Haldar, 2017**) qui peuvent servir dans la recherche d'une formule de culture starter, en association avec la flore lactique.

II.4. Caractéristiques technologiques des isolats : Capacité de production du biofilm et activité protéolytique

II.4.1. Capacité de production du biofilm

La fermentation du blé entraîne une modification physicochimique importante du blé (**Gourchalla et al, 2014 ; Bekouche, 2013**) et une protéolyse qui donnerait un profil protéique fonctionnelle, comme adjuvant dans le traitement de cancer digestive (**Benkriche, 2017 ; Yeend 2012**). Et pour des considérations technologiques, la capacité de production de biofilm et le profil de production d'enzymes sont des caractéristiques importantes dans la sélection et l'évaluation de potentielles cultures starters (**Berlanga et Guerrero, 2016 ; Latorre et al., 2016**). Les différents isolats

lactiques ont montré une importante capacité de production de biofilm et de protéase (**Figures 12**) (**Annexe 04**). La capacité de production du biofilm est révélée par une forte aptitude à s'adhérer au polystyrène (formation sessile, **Figure 12**). La capacité de production du biofilm est révélée par une forte aptitude à s'adhérer au polystyrène (formation sessile, **Figure 12**) et à s'agréger (Agrégation, **Figure 13**) (**O'Toole et Kolter, 1998**). **Boubakeur et al. (2016 ; 2018)** ont aussi noté une forte propension des souches lactiques à s'organiser en biofilm et une capacité d'agrégation significative. Les isolats ont montré différentes aptitudes à former le biofilm, avec une plus grande valeur pour BFR₄ (intensité de l'anneau et la DO (**Figure 12**)). La capacité d'agrégation était plus importante pour *Enterococcus durans* (BFR₃) (**Figure 13**).

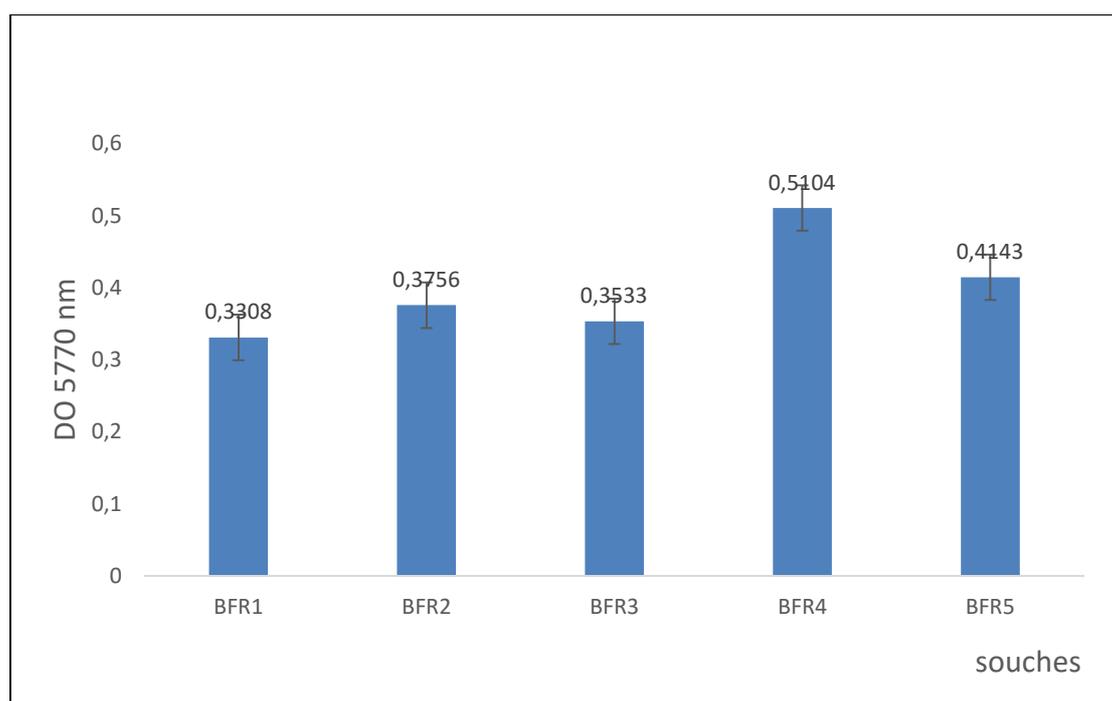


Figure N°11. Capacité de production du biofilm + Intensité de l'anneau.

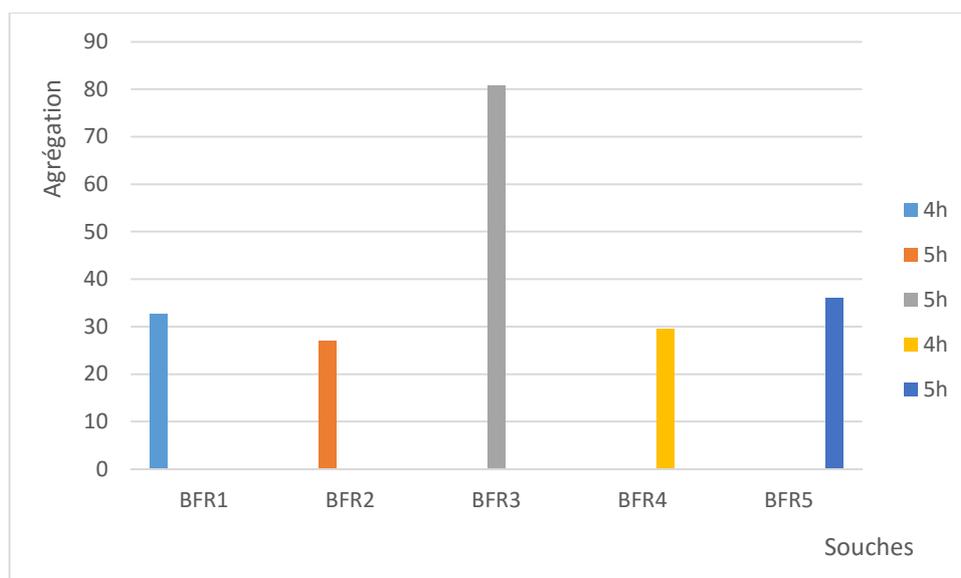


Figure N°12 : Capacité d'agrégation.

II.4.2. Activités enzymatique des souches isolées

II.4.2.1. Activité protéolytique

L'activité protéolytique des différents isolats sont regroupées dans le **Tableau 6**. La mise en évidence de l'activité protéolytique chez les isolats de bactéries lactiques indique l'apparition de zones claires autour des colonies bactériennes, cela est dû à la dégradation des protéines du milieu. On a pu distinguer cette activité chez tous les isolats.

Les diamètres des zones de lyse sont mesurés et presque la plupart des isolats ont des diamètres variables. D'après **Thapa et al. (2006)**, nos souches lactiques ont une activité protéolytique performante.

Notre résultat est totalement accord avec ce lui trouvé par **Kermiche (2013)** qu'elle noté une activité protéolytique chez les isolats de bactéries lactiques dû à la dégradation des protéines du milieu.

Tableau N°05 : l'activité protéolytique des isolats lactiques.

Souches	BFR ₁	BFR ₂	BFR ₃	BFR ₄	BFR ₅
Boîtes					

Le blé fermenté est transformé en des mets emblématiques de l'Algérie. Il possède de nombreuses vertus nutritionnelles et sanitaires et pourrait être promu plus largement dans l'alimentation de la population algérienne, face aux différentes pathologies nutritionnelles (diabète, surpoids) qui gagnent le terrain. Les travaux précédents se sont beaucoup intéressés à la valeur nutritionnelle et la composition microbienne avantageusement fonctionnelle. Cependant, nous avons soulevé dans ce présent projet le risque sanitaire ou microbiologique. Les germes potentiellement pathogènes, *Enterococcus durans*, *Staphylococcus spp.*, et *Clostridium spp.* ont été identifiés et l'enquête a rapporté des indispositions digestives rencontrées avec la consommation. Un second groupe microbien, bactéries sporulantes, *Lysinibacillus fusiformis*, avantageusement technologiques, pourrait être exploré parallèlement aux bactéries lactiques pour le développement de cultures starters. En perspective à ce présent travail, il serait intéressant :

- D'explorer la composition et le rôle des bactéries sporulantes dans la fermentation du Hamoum.
- De concevoir un guide de bonne pratique d'hygiène et de production, en appui des cultures starters et du procédé de fermentation contrôlée hors Matmor.

A

Adeyemi I.A., Beckley O. (1986). Effect of period of maize fermentation and souring on chemical properties and amylograph pasting viscosities of ogi. *Cereal Sci.* 4: 353-360.

Akinrele I.A. (1970). Fermented studies on maize during preparation of traditional African starch cake food. *J. Sci. Food Agric.* 21: 619-625.

Akingbala J.O., Rooney K.W., Faubion J.M. (1981). A Laboratory procedure for the preparation of ogi; a Nigerian fermented food. *Food Sci.* 45(5):1523-1526.

Andrew, J.M. (2008). BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 7). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62: 256-278.

B

Bekhouche, F., R. Merabti and J.D. Bailly. (2013). Traditional couscous manufacture from fermented wheat (Algeria): investigation of the process and estimation of the technological and nutritional quality. *Afr J Sci Technol*: 167–175.

Belarbi F. (2011). Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes. Mémoire de magister en Biologie, option microbiologie alimentaire et industrielle, Université Es-Sénia, Oran, 129p.

Bellifa S. (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université abou bekr belkaid, Tlemcen.

Berlanga M., Guerrero R. (2016). Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb Cell Fact*, 15:165. 1-11p.

Boubakeur, B., Drabo, M.S., Khadem, H., Mullier, C., Tirtouil, A. (2018). Influence of the exopolysaccharides of polyphenols-conditioned lactic acid bacteria on gut microecology and bacterial translocation (data accepted in Ukrainian journal of ecology-18-1).

Boubakeur, B., Tirtouil, A., Khadem, H., Meddah, B., Ahcen, S. (2016). An Assessment of the Effect of Aqueous Extract from *Thymus fontanesii* on Growth, Aggregation and Biofilm Formation of Pathogenic and Probiotic bacteria. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 6(7)1-1.

Boudreau Armand., Ménard Germain. (1992). Le blé : Eléments fondamentaux et transformation. Presses de l'Université LAVAL. Paris ; 439 P.

Badis, A., Laouabdia-SELLAMI, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R., (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales (Arabia et Kabile). In *Oscien.tech.* 23 : 30-37.

Benakriche BM, Benabdelmoumen D, Mortet A. (2016). Lactic acid bacteria diversity in the fermented wheat Hamoum in West Algeria. *Pakistan J Nutr.* 15(7): 639-648.

C

Caplice E. & Fitzgerald G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50 : 131–49.

Carr Frank J., Chill D. & Maida N. (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4): 281-370.

Cowan and Steel's. (2003). manual for identification of medical bacteria - 3rd ed / edited and rev. by G.I. Barrow and R.K.A. Feltham., Cambridge University Press 331p.

Cruz JF, Troude T, Griffon D, et Hebert JP. (1988). Conservation des grains dans les régions chaudes. 2eme Ed Paris France. Techniques rurales en Afrique. Ministère de la coopération et du développement, pp : 545.

D

Dellarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et documentation. France. Lavoisier. 462 p.

E

El-Kady Ismail A., Mazen Mohamed B., Saber Sabah M. (1984). Some enzymatic activities of fungi isolated from cotton seeds and cotton seed products. Qatar Univ. Sci. Bul. 85-93.

Ennadir J., Hassikou R., Al Askari G., Arahou F., Bouazza F., Amallah S., Amine SA., Khedid K. (2014). Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées des farines de blé d'origine marocaine (Phénotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat flour from Morocco). J.Mater. Environ. Sci. 5(4). 1125-1132.

F

Fields M.L., Hamad A.M., Smith D.R. (1981). Natural Lactic acid fermentation of corn meal. J. Food Sci. 46: 900-902.

G

Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. & Krieg, N. R. (1994). Method for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology. 518 P.

Gourchala F, Hobamahoro AF, Mihoub F, Henrchiri C. (2014). Effect of natural fermentation on the nutritional quality of 'el hammoum'' durum wheat (*Triticum durum*) fermented product of the Algerian country. Int J Biotechnol Res. 4 :9-18.

Guiraud J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Edition DUNOD. P.

Gutiérrez-Correa M, Ludeña Y., Ramage G., Villena G. K. (2012). Recent Advances on Filamentous Fungal Biofilms for Industrial Uses. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 22p.

Guyot, J.P. (2012). Cereal-based fermented foods in developing countries: ancient foods for modern research. International Journal of Food Science & Technology 47: 1109–1114.

H

Haldar L, Ghandi DN, Mazumdar D. (2017). Functional properties of spore-forming Bacillus strains: Pre-requisite for probiotic functions. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 6 (2): 162-169.

Harrigan W.F. & McCance M.E. (1976). *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology.* Second edition, Academic Press, London, 464p.

Holzapfel WH, Wood BJ (2014). *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy.* John Wiley & Sons, Chichester.

Humblot, C. and J.P. Guyot. (2009). Pyrosequencing of Tagged 16S rRNA Gene Amplicons for Rapid Deciphering of the Microbiomes of Fermented Foods Such as Pearl Millet Slurries. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 4354–4361.

J

Jeantet R., Croguennec T., Schuck P., Brule G. (2006). *Science des aliments. Biochimie Microbiologie Procédé produits, Volume 1 : Stabilisation biologique et physicochimique,* Tec. et Doc., Lavoisier, Paris ; 383 P.

K

Kacem, M. et Karam, N. (2006). Physicochemical and microbiological study of «Shmen», a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid.

Khaldi Z. (2015). Isolement, identification et étude de l'antibiorésistance des souches bactériennes isolées à partir de services de réanimation et d'hémodialyse de CHU Ouargla. Mémoire de master en Biologie, spécialité microbiologie appliquée,

Kihal, M. (1996). Etude de la production du dioxyde de carbone par leuconostoc mesentéroïdes, élément d'application en technologie fromagère type fromage bleu thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Oran.

Kempler. G.M, et Mc Kay. L.L. (1980). Improved medium for the detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 926-927.

Kalbaza K, Zadi-Karam H, Karam NE. (2008). Identification and major technological characteristics of *Lactococcus* and *Lactobacillus* strains isolated from "hamoum", an Algerian fermented wheat. *Afr J Biotechnol.* 17 (5): 108-117.

Kos, B. (2001). Probiotic Concept: In Vitro Investigations with Chosen Lactic Acid Bacteria, PhD Thesis, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Croatia. Université de Ouargla, 98p.

Kovacs, L. G., Ballati, P. A., Kroshman, H. B. & Pueppke, S.G. (1995).

Transcriptional organisation and expression of *nol* XWBTUV. A locus that regulate cultivar-specific nodulation soybean by *Rhizobium fredii* USDA275.

L

Larpent J.P. (1997). Technique de laboratoire : microbiologie alimentaire. Ed : Lavoisier. Paris (France). 1073p.

M

Marchal, N., Bourdon, J.L. ET Richard, CL. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed., Doin éditeurs, Paris

Matz S.A. (1971). *Cereal Science.* A VI Publishing Co. Westport Connecticut; P 241.

Merabti R. (2014). Blé dur fermenté lemzeit : étude du nouveau procédé de fermentation à l'extérieur du matmor et caractérisation de l'écosystème (interactions du microbiote avec la matrice). Université des Frères Mentouri-Constantine 1, thèse.

Moëller V. (1955). Simplified tests of some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 36: 158-172.

Mokhtari S, Kheroua O, Saidi D (2016). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Algerian durum wheat (*Triticum durum*) natural fermented in

underground silos Matmora “El-Hammoum” and their antimicrobial activity against pathogenic germs. *J Nutr Health Sci.* 3(4): 1-12.

Mokhtari S. (2012). Effet protecteur de certaines bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté type hamoum. Université El Sénia (Oran, Algérie), Magistère.

Motarjemi, Y. (2002). Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* 75: 213–229.

O

Omar Hassaine. (2013). Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien.

Osungbaro Taiwo O. (2009). Physical and nutritive properties of fermented cereal foods. *African Journal of food Science*; Vol 3(2): 023-027.

O'toole G A et Kolter R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30:295-304.

P

Parveen Sahana and Hafiz Fauzia. (2003). Fermented Cereal from Indigenous Raw Materials *Pakistan Journal of Nutrition* 2 (5): 289-291.

Pavlovic, M., et al. (2013). “Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria.” *Open.Microbiol.J.* 7: 135-41.

S

Samelis J., Maurogenakis F., Metaxopoulos J. (1994). Characterization of Lactic Acid Bacteria isolated from naturally fermented greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 179-196.

T

Tamang, J.P. (2010). Diversity of Fermented Foods. In Fermented foods and beverages of the world p. 448. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, USA.

Thapa N., Pal J., Tamang J.P. (2006). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *Int J Food Microbiol.* 1; 107(1): 33-8.

Y

Yeend T, Robinson K, Lockwood C, McArthur A. (2012). Effectiveness of the fermented wheat germ extract as an adjunct therapy in the treatment of cancer: A systematic review. *Libr Syst Rev.* 10 (42 Suppl.): 1-12.

Annexe 01 : Composition des milieux de culture.

Milieu MRS

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Glucose.....	20g
Tween 80.....	1ml
Phosphate bi potassique.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium.....	0,2g
Sulfate de manganèse	0,5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

Autoclavage 15 minutes à 120°C.

Gélose M17

Tryptone	2.5g
Peptone papainique de soja	5g
Extrait de viande.....	5g
Extrait de autolytique de levure.....	2,5g
Béta-glycérophosphate de sodium.....	19g
Sulfate de magnésium.....	0,25g
Lactose.....	5g
Acide ascorbique.....	0,5g

Agar-agar bactériologique.....15g

Le milieu CHAPMAN

Extrait de viande de bœuf..... 1 g/L

Peptones 10 g/L

Mannitol.....10 g/L

Chlorure de sodium.....75 g/L

Rouge de Phénol.....0 0.025 g/L

Agar..... 1 g/L

PH=7.4 Autoclavage 15 minutes à 120°C.

Le milieu colombia

Melange speciale de peptone.....20 g/L

D-glucose.....0.1 g/L

Amidone.....1 g/L

Chlorure de soduim.....5 g/L

Agar.....12.5 g/L

PH= 7.3 Autoclavage 15 minutes à 120°C.

ADH (milieu pour mise en évidence de l'arginine déshydrolyase)

L'argininene.....5g

Extrait de levure.....3g

Glucose.....1g

Chlorure de sodium.....5g

Pourpre de bromocrésol.....16g

PH=6,3 ; autoclavage 10 minutes à 120°C, avec l'ajout d'une solution stérile de sucre à 10%.

Citrate de Simmons

Citrate de sodiom.....	1g
Bleu de bromothymol.....	0.08g
Chlorure de seduim.....	5g
Sulfate de magnisuim.....	0.2g
Hydrogénophosphate de potasuim.....	1g
Dihydrog »nophosphate damonuim.....	1g
Agar-agar.....	15g

PH= 6.9

LDC

Extrait de levure.....	3g
L-ornithine , L-lysine (monochlorhydrate)	
L-arginine.....	5g
Glucose.....	1g
Bromocrésol pourpe.....	0,16g
Ethanol	1g
Chlorure de soduim.....	5g

Bouillon de Clark et Lubs

Peptone.....	10g
Phosphate bi potassique.....	2g
Glucose.....	5g

Mannitol-mobilité

Peptone.....	20g
Nitrate de potassium.....	1g
Mannitol.....	2g
Rouge de phénol.....	40g
Gélose.....	4g

PH=8,1 ; autoclavage 15 minutes à 120°C.

TSI (gélose triple sugar-iron agar)

Peptone.....	20g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3g
Chlorure de sodium.....	5g
Glucose.....	1g
Lactose.....	10g
Saccharoseose.....	10g
Citrate de fer.....	0,5g
Hyposulfite de sodium.....	0,5g
Rouge de phénol.....	0.25g
Gélose.....	12g

PH=7,4 ; autoclavage 15 minutes à 115°C en position semi-inclinée.

VF (milieu viande-foie gélosé)

Extrait de viande-foie.....	30g
Glucose.....	2g
Gélose.....	6g

PH=7,4 ; Répartir en tubes à essais.

Lait gélose

Lait écrémé.....1L
Gélose.....15g

Gélose de MAC-CONKEY

Pour 1 litre de milieu :

Peptone pancréatique de gélat 17,0 g
Tryptone 1,5 g
Peptone pepsique de viande 1,5 g
Lactose..... 10,0 g
Sels biliaires 1,5 g
Chlorure de sodium..... 5,0 g
Rouge neutre 30,0 mg
Cristal violet..... 1,0 mg
Agar agar bactériologique 13,5 g

Gélose pour démembrement (PCA)

Pour 1 litre de milieu :

Tryptone 5,0 g
Extrait autolytique de levure..... 2,5 g
Glucose 1,0 g
Agar agar bactériologique 12,0 g

PH= 7 ; autoclavage 15 minutes à 121°C.

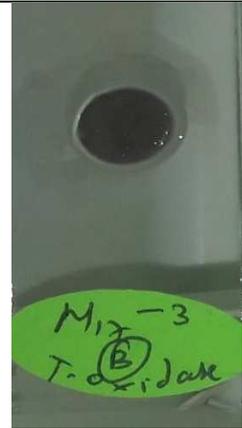
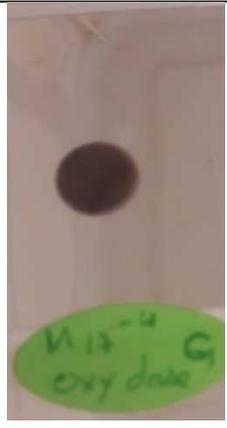
Cristal violet (1%)

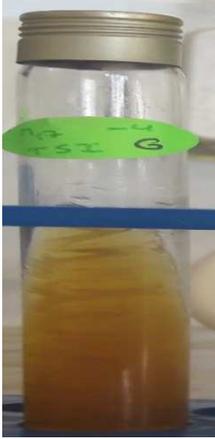
Cristal violet.....1 g
Eau distillée.....100 ml

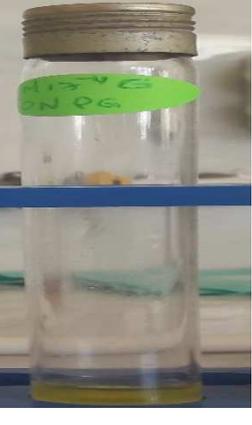
Annexe 02 : information sur l'échantillon

Variétés de blé	Références						
caractéristiques	région	Le prélèvement	Nature de produit prélevé	Date de Récolte	Quantité prélevée	Utilisation	Goût
	Ouled Ayché de la wilaya de Relizane	Été réalisé le 13/03/2018 est mis dans un sachet propre et amené à laboratoire pour être analysé	Blé dur de type Hamoum	Fin de Juin 2016	2 Kg	Sous forme de couscous	Acide

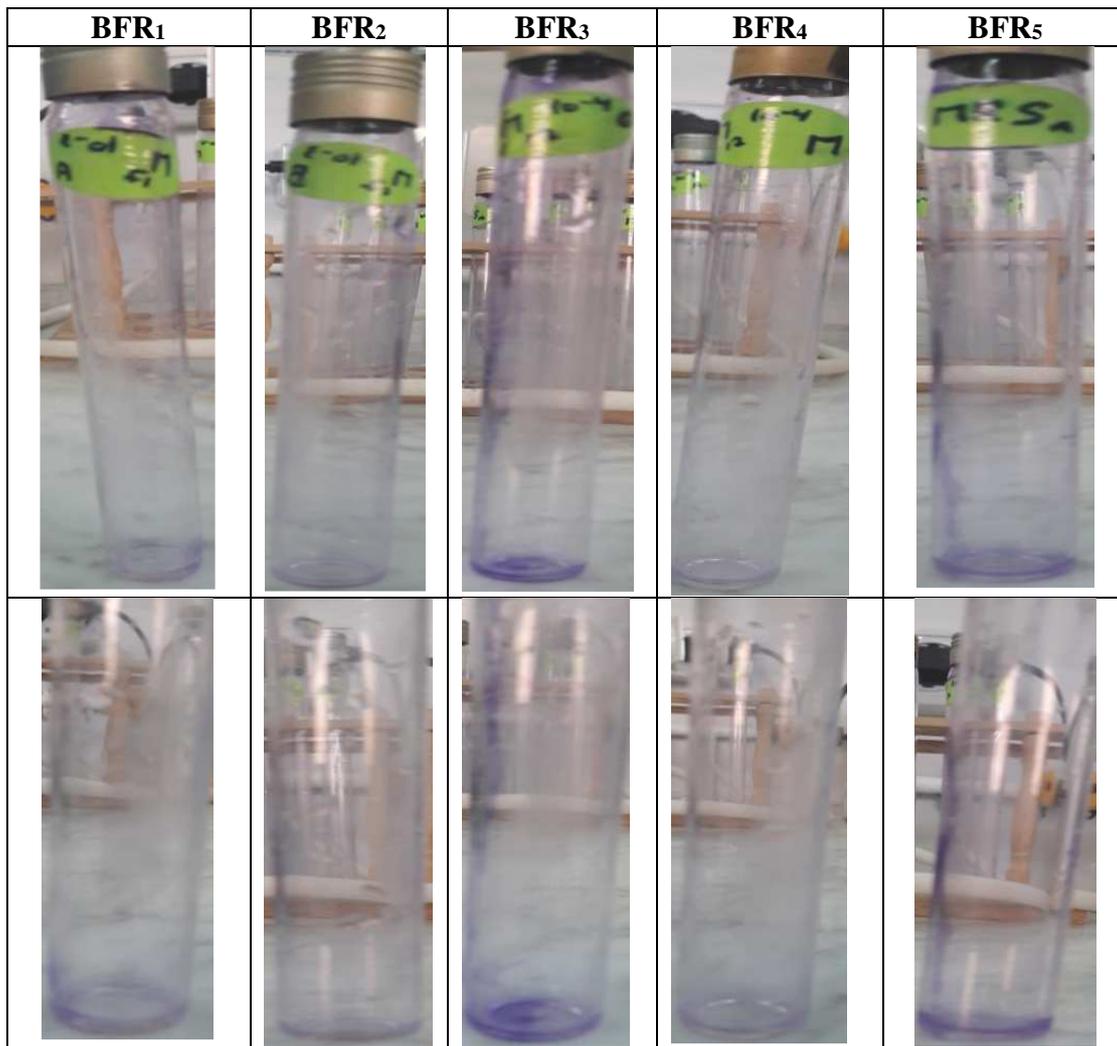
Annexe 03: Tests d'identifications biochimiques.

Souches	BFR ₁	BFR ₂	BFR ₃	BFR ₄
Catalase				
Oxydase				
M.mobilité				

<p>TSI</p>				
<p>C.simmons</p>				
<p>ADH ODC LDC</p>				

<p>CLARK & LUBS</p>				
<p>ONPG</p>				

Annexe 04 : Formation de biofilms après 24 heures d'incubation en bouillons nutritifs (tubes et micro-plaque).



Résumé

Le blé fermenté du *matmor* est une riche culture ancestrale en Algérie. Il est retrouvé sur le marché local et très largement consommé sous forme de couscous. Ce blé fermenté est le support d'importantes bactéries fonctionnelles. Cependant, le procédé reste toujours très traditionnel, soumis à la contamination spontanée des microorganismes ; et son microbiote fonctionnel reste sommairement caractérisé. Par ailleurs, la technique de la fermentation du blé en *matmor* et les caractéristiques physico-chimiques du blé devraient favoriser la prédominance de la croissance de bactéries productrices de biofilm fonctionnels (probiotique et culture starter). Les attributs du biofilm corréleraient avec de meilleures caractéristiques fonctionnelles du microbiote bactérien du blé fermenté. Cette étude a pour objectif l'évaluation de la capacité de production de biofilm des bactéries lactiques endogènes du blé fermenté du *matmor*.

Mots clés : Blé fermenté du *matmor*, biofilm, bactéries lactiques, et propriétés fonctionnelles.

Abstract

The fermented wheat of *matmor* is rich ancestral culture in Algeria. It is found on the local market and very widely consumed in the form of couscous, this fermented wheat is the support of important functional bacteria. However, the process is still very traditional, subject to spontaneous contamination of microorganisms; and its functional microbiota remains summarily characterized. In addition, the *matmor* wheat fermentation technique and the physico-chemical characteristics of wheat should promote the predominance of growth of functional biofilm-producing bacteria (probiotic and starter culture). The attributes of the correlate biofilm with better functional characteristics of the bacterial microbiota of fermented wheat. The objective of this study is to evaluate the biofilm production capacity of the endogenous lactic bacteria of fermented wheat of *matmor*.

Keywords:

Fermented wheat of *matmor*, biofilm, lactic acid bacteria, and functional properties.

الملخص

القمح المخمر في المظمورة هو ثقافة الأجداد الغنية في الجزائر. وهو موجود في السوق المحلية ويستهلك على نطاق واسع على شكل كسكس. يعتبر القمح المخمر مصدر مهم للبكتيريا ذات الوظائف الفيزيولوجية الجمة غير أن العملية لا تزال تقليدية جدا وتخضع للتلوث التلقائي بالكائنات المجهرية المختلفة النافعة منها والضارة أما الميكروبات الوظيفية فلا تزال دراستها تتسم بالإيجاز. بالإضافة الى ذلك فان تقنية التخمير في المظمورة والخصائص الفزيائية والكيميائية للقمح ينبغي ان تعزز نمو البكتيريا الوظيفية المنتجة للفلم الحيوي. الفلم البكتيري الحيوي مهم جدا من أجل خصائص وظيفية أفضل للبكتيريا في القمح المخمر. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم قدرة انتاج الفلم الحيوي للبكتيريا اللبنية الموجودة في القمح المخمر داخل المظمورة. النتائج الأولية المتحصل عليها اثبتت التنوع الميكروبي للقمح المخمر.

الكلمات المفتاحية: القمح المخمر داخل المظمورة، الفلم الحيوي، بكتيريا لبنية، الخصائص الوظيفية.