

# TABLES DES MATIERES

Remerciements	
Dédicace	
ملخص	I
Résumé	II
Abstract	III
Liste des tableaux	IV
Liste des figures	VI
Liste des abréviations	X
Introduction	XI

## Chapitre 1

### Rappel bibliographique

1.1 L'ensilage.....	1
1.2 Historique.....	2
1.3 Production fourragère en Algérie .....	3
1.4 Les élevages en Algérie.....	4
1.5 Les processus biochimiques et microbiologiques au cours de l'ensilage..	8
1.5.1 Phase aérobie .....	11
❖ Début d'acidification.....	11
➤ <i>Entérobactéries</i> : fermentation acétique.....	11
➤ Levures.....	12
➤ Moisissures.....	12
1.5.2 Phase anaérobie .....	12
➤ <i>Bactéries lactiques</i> : fermentation lactique.....	12

➤	<i>Bactéries butyriques</i> : fermentation butyrique.....	13
✚	Phase de stabilité anaérobie.....	14
1.5.3	Phase de l'alimentation.....	14
1.6	Le sorgho.....	15
1.6.1	Culture.....	15
1.6.2	Utilisation.....	16
1.7	Les caractéristiques des bactéries lactiques.....	17
✓	Les propriétés d'acide lactique .....	24
1.8	Facteurs influençant le processus d'ensilage.....	25
1.8.1	Facteurs liés à la plante.....	25
1.	Richesse en glucides fermentescibles.....	25
2.	Pouvoir tampon.....	25
3.	La température lors de la récolte .....	25
4.	pH.....	26
1.8.2	Facteurs techniques .....	26
1.8.2.1	Utilisation des additifs.....	26
1.8.2.2	Les stimulants de la fermentation.....	27
1.	<i>Les cultures bactériennes</i> .....	27
2.	<i>Les enzymes</i> .....	28
3.	<i>Substrats fermentescibles</i> .....	29
1.8.2.3	Les inhibiteurs de la fermentation.....	29
1.8.2.4	Les additives nutritionnelles.....	31
1.9	L'ensilage et la santé.....	31
1.10	Les céréales comme un substrat pour les bactéries lactiques.....	31
1.11	L'utilisation des bactéries lactiques amylolytique en biotechnologie .33	
1.11.1	La production de l'acide lactique par les BLA.....	35
1.11.2	Les enzymes amylolytiques produits par les Bactéries lactiques.....	36
1.12	L'importance de dégradation des macromolécules des aliments.....	38

<b>1.13 Les principaux usages des enzymes microbiens.....</b>	<b>39</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>44</b>

## **Chapitre 2**

### **Matériels et Méthodes**

<b>2.1 Choix d'échantillon.....</b>	<b>45</b>
<b>2.2 Site d'étude et d'échantillonnages.....</b>	<b>46</b>
<b>2.3 Préparation de l'ensilage.....</b>	<b>46</b>
<b>2.4 Test biochimique.....</b>	<b>47</b>
<b>2.5 Analyse microbiologique .....</b>	<b>47</b>
<b>2.5.1 Dénombrement de la flore total et la flore lactique.....</b>	<b>47</b>
<b>2.5.2 Isolement, purification et identification de la flore lactique .....</b>	<b>47</b>
<b>2.5.3 Identifications phénotypiques des isolats.....</b>	<b>48</b>
<b>2.5.4 Caractérisation morphologique (macroscopique et microscopique)48</b>	
<b>2.5.5 Test physiologiques .....</b>	<b>48</b>
<b>2.5.5.1 Influence de la température.....</b>	<b>48</b>
<b>2.5.5.2 Tolérance à la salinité.....</b>	<b>48</b>
<b>2.5.5.3 Tolérance au pH .....</b>	<b>48</b>
<b>2.5.5.4 Recherche de type fermentaire.....</b>	<b>48</b>
<b>2.5.6 Test biochimique.....</b>	<b>49</b>
<b>2.5.6.1 Test de la catalase.....</b>	<b>49</b>
<b>2.5.6.2 Profil fermentaire.....</b>	<b>49</b>
<b>2.5.6.3 Production de dextrane .....</b>	<b>51</b>
<b>2.5.6.4 Hydrolyse de l'arginine.....</b>	<b>51</b>
<b>2.5.6.5 Utilisation du citrate .....</b>	<b>51</b>
<b>2.5.6.6 Production de composés aromatiques.....</b>	<b>51</b>
<b>2.6 Etude des propriétés technologiques des isolats .....</b>	<b>52</b>
<b>2.6.1 L'activité protéolytique.....</b>	<b>52</b>

2.6.2	Protéolyse de la gélatine.....	52
2.6.3	L'activité amylasique .....	52
2.6.4	La production des polysaccharides .....	52
2.6.5	Confirmation de la production des Exo-polysaccharides .....	53
2.6.6	L'activité Cellulolytique.....	53
2.7	Etude des bactéries lactique amylolytique (BLA).....	53
2.7.1	Etude de la cinétique de croissance à différents paramètres...53	
2.7.1.1	Suivi de l'acidité au cours de la croissance .....	53
2.7.1.2	Le dosage du glucose et de l'amidon .....	54
a)	Dosage de glucose .....	54
b)	Dosage de l'amidon résiduel .....	54
2.7.2	Dosage de l'enzyme $\alpha$ amylase .....	57
2.7.3	Les caractéristiques physicochimiques de $\alpha$ amylase .....	57
➤	Effet de température.....	57
➤	Effet de pH .....	57
2.8	La mise en évidence de l'antagoniste des souches amylolytiques .....	58
2.8.1	Evaluation de l'activité bactérienne.....	58
➤	Méthode directe ( <i>Spot Agar Test</i> ) .....	58
➤	Méthode indirecte ( <i>Well Diffusion Assays</i> ) .....	58
2.8.2	Recherche de la nature de l'agent inhibiteur.....	59
2.8.2.1	Sensibilité au pH .....	59
2.8.2.2	Le peroxyde d'hydrogène.....	59
2.8.2.3	Sensibilité aux enzymes protéolytiques.....	59
2.8.2.4	Sensibilité à la température.....	59
2.9	Isolement des <i>Propionibacterium</i> à partir de l'ensilage de sorgho ....	60

## Chapitre 3

### Résultats et discussion

3.1	Préparation de l'ensilage au laboratoire.....	61
3.2	Dénombrement de la flore total et la flore lactique.....	61
3.3	Isolement et identification de la flore lactique .....	63
3.4	Caractérisation morphologique (macroscopique et microscopique).....	63
3.5	Test physiologiques et biochimique.....	63

<b>3.6</b>	<b>Identification de l'espèce.....</b>	<b>67</b>
<b>3.7</b>	<b>Etude des propriétés technologiques des souches.....</b>	<b>76</b>
<b>3.7.1</b>	<b>Production d'exo-polysaccharide .....</b>	<b>77</b>
<b>3.8</b>	<b>Etude de la cinétique de croissance à différents paramètres.....</b>	<b>78</b>
<b>3.9.</b>	<b>Dosage de l'activité amylasique.....</b>	<b>93</b>
<b>3.9.1</b>	<b>Les propriétés physiologiques de l'activité enzymatique de <math>\alpha</math> amylase .....</b>	<b>93</b>
<b>3.10</b>	<b>Activité antagoniste .....</b>	<b>98</b>
<b>3.10.1</b>	<b>Méthode directe.....</b>	<b>98</b>
<b>3.10.2</b>	<b>Méthode indirecte .....</b>	<b>99</b>
<b>3.11</b>	<b>Recherche de la nature de l'agent inhibiteur.....</b>	<b>100</b>
<b>3.12</b>	<b>Isolement des Propionibacterium à partir de l'ensilage de sorgho.....</b>	<b>103</b>
	<b>Conclusion et perspective .....</b>	<b>105</b>
	<b>Référence bibliographique .....</b>	<b>107</b>
	<b>Annexe.....</b>	<b>116</b>

## Liste des tableaux

Page

<b>Tableau 1.1</b>	Les animaux domestiques ruminants en Algérie et leur importance en effectifs.	04
<b>Tableau 1.2</b>	Evolution de production fourragère par espèce en Algérie.	05
<b>Tableau 1.3</b>	Le nombre approximatif des bactéries retrouvées dans la phyllosphère des plantes.	09
<b>Tableau 1.4</b>	Fermentation de l'acide lactique et du glucose par les Clostridies.	13
<b>Tableau 1.5</b>	Exemples des réactions de protéolyse causées par les Clostridies productrices des amines biogènes.	14
<b>Tableau 1.6</b>	Les bactéries lactiques les plus importantes dans les ensilages.	23
<b>Tableau 1.7</b>	Effet d'un conservateur à base d'acide propionique sur le nombre de levures et d'heures de stabilité à l'air de l'ensilage de maïs.	30
<b>Tableau 1.8</b>	Les bactéries lactiques amylolytiques.	34
<b>Tableau 1.9</b>	Utilisation des différents types d'enzymes dans l'industrie.	40
<b>Tableau 2.1</b>	Nombre des échantillons de l'ensilage de sorgho prélevé au niveau d'Es-senia, Oran, Algérie.	47
<b>Tableau 3.1</b>	Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats à partir de l'ensilage de sorgho	65
<b>Tableau 3.2</b>	Profil fermentaire des isolats	68
<b>Tableau 3.3.1</b>	L'utilisation des hydrates de carbone par les souches dans une API 50 CH.	73
<b>Tableau 3.3.2</b>	L'utilisation des hydrates de carbones par les souches dans une API Staph.	74
<b>Tableau 3.4</b>	Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats à partir de l'ensilage de sorgho.	75
<b>Tableau 3.5</b>	Tableau représentative des résultats des dégradations de Gélatine, caséine, cellulose $\beta$ , amidon.	76

<b>Tableau 3.6</b>	La quantité d'amidon résiduel, transformé et le pourcentage de taux d'hydrolyse par les souches à différent température °C.	95
<b>Tableau 3.7</b>	La quantité d'amidon transformé par les souches à différent pH.	97
<b>Tableau 3.8</b>	Diamètres des zones d'inhibition (cm) des souches.	99
<b>Tableau 3.9</b>	Effet de traitement de température, pH et les enzymes protéolytiques sur les surnageant des isolats.	102
<b>Tableau 3.10</b>	Effet de traitement de température, pH et les enzymes protéolytiques sur les surnageant des isolats. (suite)	102

<b>Liste des figures</b>		<b>Page</b>
<b>Figure 1.1</b>	Différentes étapes de préparation de l'ensilage de maïs en grands balles.	07
<b>Figure 1.2</b>	Différentes étapes d'évolution d'un ensilage	09
<b>Figure 1.3</b>	Schéma général du métabolisme anaérobie et aérobie des sucres et produits de la fermentation par les microorganismes du fourrage	10
<b>Figure 1.4</b>	Classification taxonomique de la plante de Sorgho ( <i>Sorghum bicolor</i> ).	16
<b>Figure 1.5</b>	Différentes formes d'acide lactique le D et le L.	17
<b>Figure 1.6</b>	Voie métabolique de l'utilisation des sucres par les bactéries lactique (A : voie homofermentaire, B : voie hétérofermentaire).	19-20
<b>Figure 1.7</b>	Voie métabolique des sucres par la voie bifide (Bifid-Shunt).	22
<b>Figure 1.8</b>	La conversion de l'amidon en acide lactique par la voie direct et indirecte de la fermentation.	32
<b>Figure 1.9</b>	Photo au microscope électronique à balayage (MEB) du son de blé fermenté par les bactéries (amidon-cellulose).	37
<b>Figure 1.10</b>	Photo au (MEB) du son de blé fermenté avec les bactéries (montrant l'hydrolyse de l'amidon dans les fibres).	37
<b>Figure 1.11</b>	Activité amylolytiques. a) structure d'amylose et amylopectine ; b) mode d'attaque des amylases sur l'amylose et amylopectine.	42
<b>Figure 1.12</b>	Structure de la pectine et mode de dégradation.	43
<b>Figure 1.13</b>	Activités cellulolytiques, a) structure de la cellulose ; b) représentation schématique des étapes séquentielles de la cellulolyse.	44
<b>Figure 2.1</b>	Site de prélèvement	45
<b>Figure 2.2</b>	Schéma représente l'utilisation de la plaque d'Elisa pour effectuer le profil fermentaire des souches	50



<b>Figure 2.3</b>	Schéma du protocole appliqué pour l'étude de la cinétique de croissance et acidification sur MRS.	55
<b>Figure 2.4</b>	Schéma du protocole appliqué pour l'étude de dosage de glucose et amidon.	56
<b>Figure 3.1</b>	Sorgho ensilé en micro silo préparée au laboratoire.	61
<b>Figure 3.2</b>	Dénombrement de la flore totale (b) et la flore lactique (a) au cours de l'ensilage de sorgho.	62
<b>Figure 3.3</b>	La croissance de la flore totale ( $\Delta$ ) et la flore lactique ( $\square$ ) aux cours de l'ensilage de sorgho.	62
<b>Figure 3.4</b>	Les variations de pH aux cours de l'ensilage de sorgho.	63
<b>Figure 3.5</b>	Caractère morphologique (cocci-bacille) des isolats isolés à partir de l'ensilage de sorgho observe à l'aide de microscope optique.	65
<b>Figure 3.6</b>	Test de l'hydrolyse de l'arginine. Colonie de couleur jaune : résultat négatif (pas de dégradation de l'arginine).	66
<b>Figure 3.7</b>	Test de citrate sur milieu KMK Colonie de couleur bleu : résultat positif.	66
<b>Figure 3.8</b>	Test d'acétoine sur milieu Clark Lubs. L'apparition d'un anneau rouge après l'ajout des réactive VP1 et VP2.	67
<b>Figure 3.9</b>	Fermentation des carbohydrates de nos isolats sur les plaques multi pore.	69
<b>Figure 3.9.1</b>	Résultats du test de fermentation des hydrates de carbone sur galerie API 50 CH (a) et API Staph (b).	70
<b>Figure 3.10</b>	Aspect de milieu l'esculine après croissance des isolats.	70
<b>Figure 3.11</b>	L'activité amylolytique des souches après l'ajout de la vapeur de Lugol (zone claire zone d'hydrolyse).	77
<b>Figure 3.12</b>	La formation d'un trouble confirme la formation de production des exo-polysaccharides.	78
<b>Figure 3.13</b>	Détermination des sucres réducteur par la liqueur de	

	Fehling (a) avant le chauffage, (b) après le chauffage.	79
<b>Figure 3.14</b>	Croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS (Amidon/Glucose).	80
<b>Figure 3.15</b>	Croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS Glucose.	80
<b>Figure 3.16</b>	Croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS Amidon.	81
<b>Figure 3.17</b>	Evolution de pH de la souche <i>Lb. plantarum</i> S <sub>22</sub> dans le milieu MRS Amidon.	81
<b>Figure 3.18</b>	Evolution de pH de la souche <i>Lb. plantarum</i> S <sub>7</sub> dans le milieu MRS Amidon.	82
<b>Figure 3.19</b>	Evolution du pH de la souche <i>Lb. manihotivorans</i> D <sub>1</sub> dans le milieu MRS Amidon.	82
<b>Figure 3.20</b>	Evolution de pH du milieu MRS (Glucose+Amidon) en présence de la souche <i>Lb. plantarum</i> S <sub>22</sub> .	83
<b>Figure 3.21</b>	Evolution de pH du milieu MRS (Glucose+Amidon) en présence de la souche <i>Lb. plantarum</i> S <sub>7</sub> .	83
<b>Figure 3.22</b>	Evolution de pH du milieu MRS (Glucose+Amidon) en présence de la souche <i>Lb. manihotivorans</i> D <sub>1</sub> .	84
<b>Figure 3.23</b>	Evolution de pH du milieu MRS (Glucose) en présence de la souche <i>Lb. plantarum</i> S <sub>22</sub> .	84
<b>Figure 3.24</b>	Evolution de pH du milieu MRS (Glucose) en présence de la souche <i>Lb. plantarum</i> S <sub>7</sub> .	85
<b>Figure 3.25</b>	Evolution de pH du milieu MRS (Glucose) en présence de la souche <i>Lb. manihotivorans</i> D <sub>1</sub> .	85
<b>Figure 3.26</b>	Assimilation des substrats carbonés par la souche <i>Lb. plantarum</i> S <sub>22</sub> dans le milieu MRS (Glucose+ Amidon).	86
<b>Figure 3.27</b>	Substrats carbonés résiduels présentés dans le milieu MRS (Glucose+ Amidon) assimilé par la souche <i>Lb. plantarum</i> S <sub>7</sub> .	86
<b>Figure 3.28</b>	Substrats carbonés résiduels présentés dans le milieu MRS (Glucose+ Amidon) assimilés par la souche <i>Lb. manihotivorans</i> D <sub>1</sub> .	87

<b>Figure 3.29</b>	Production de l'acide lactique exprimée en pH de la souche <i>Lb. plantarum</i> S22 dans le milieu MRS Amidon.	89
<b>Figure 3.30</b>	Production de l'acide lactique exprimée en pH de la souche <i>Lb. plantarum</i> S7 dans le milieu MRS Amidon.	89
<b>Figure 3.31</b>	Production de l'acide lactique exprimée en pH de la souche <i>Lb. manihotivorans</i> D1 dans le milieu MRS Amidon.	90
<b>Figure 3.32</b>	Production de l'acide lactique exprimée en pH de la souche <i>Lb. plantarum</i> S22 dans le milieu MRS glucose.	90
<b>Figure 3.33</b>	Production de l'acide lactique exprimée en pH de la souche <i>Lb. plantarum</i> S7 dans le milieu MRS glucose.	91
<b>Figure 3.34</b>	Production de l'acide lactique exprimée en pH de la souche <i>Lb. manihotivorans</i> D1 dans le milieu MRS glucose.	91
<b>Figure 3.35</b>	Effet de la température sur l'hydrolyse de l'amidon de l'extrait enzymatique.	94
<b>Figure 3.36</b>	Effet de pH sur l'hydrolyse de l'amidon de l'extrait enzymatique.	96
<b>Figure 3.37</b>	Résultats du test de l'activité antibactérienne de <i>Lb. plantarum</i> S22 et S7, <i>Lb. manihotivorans</i> D1 et <i>Weissella minor</i> S7'.	98
<b>Figure 3.38</b>	Effet du surnageant des souches sur les souches pathogènes.	101
<b>Figure 3.39</b>	Isolement de la flore propionique sur milieu LGA.	104

## Abréviations

**%** : pour cent.

**°C** : degré celsius.

**ADH** : arginine dihydrolase.

**A<sub>w</sub>** : activité de l'eau.

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone.

**cm** : centimètre.

**DO** : densité optique.

**FAO** : organisation mondiale pour  
l'alimentation et l'agriculture.

**g** : gramme.

**h** : heure.

**mg** : milligramme.

**min** : minute.

**ml** : millilitre.

**mM** : milli-molaire.

**MRS**: De Man, Rogosa and Sharpe.

**MRS<sub>G</sub>**: MRS Glucose

**MRS<sub>A</sub>**: MRS Amidon

**MRS<sub>GA</sub>**: MRS glucose/ amidon

**MRS-BCP** : milieu MRS additionné de  
Pourpre de Bromocrésol.

**MRSEV-BCP** : milieu MRS sans extrait  
de viande additionné de Pourpre de  
Bromocrésol.

**LGA** : lithium glycérol agar

**pH** : potentiel d'hydrogène.

**spp** : espèces.

**sp** : espèce.

**Subsp** : sous espèce.

**UFC** : unité formant colonie.

**µg** : microgramme.

**BL** : bactéries lactiques

# *Introduction*

---

## Introduction

Les cultures fourragères se situent à la croisée des productions agricoles et d'élevages, elles relèvent l'agronomie et servent aux productions animales. Le fourrage est la matière première de production animale dont l'importance économique est considérable (Roberge, 1999).

Les herbivores d'élevage pourraient être nourris au cours de l'année exclusivement avec de l'herbe, la couche herbeuse est exposée à de nombreuses sources de dégradation. Ainsi, une utilisation intensive, des coupes tardives, les destructions des semences par le froid, les dommages dus aux rongeurs, au piétinement ou encore les dégâts résultant des ornières, sont à l'origine de lacunes indésirables dans les tapis herbeux. Les rendements de matière sèche (MS) tout comme les concentrations énergétiques régressent au fil des ans (Hopkins et Ripley 1951).

Bien que dans le monde « moderne », la tendance générale, depuis le début de la rationalisation de l'élevage au 19<sup>ième</sup> siècle, a été l'incorporation croissante d'aliments concentrés dans les rations. Cette tendance est justifiée par le « progrès génétique » d'animaux dont l'accroissement de performances individuelles de production (lait, viande) nécessitait l'ingestion de rations à forte densité nutritionnelle (Assoumaya, 2007).

La valorisation des fourrages a fait l'objet de nombreux travaux, dans des zones différentes (Demarquilly 1981, Leng 1989, Minson 1990). Cependant, les connaissances accumulées sur ces modèles restent insuffisantes pour assurer une valorisation optimale des fourrages, d'autant plus que ces derniers demeurent dominants voire exclusifs dans les systèmes d'alimentation.

Le but des éleveurs est d'avoir un fourrage parfaitement conservé et riche en nutriment et facile à digérer et peut persister à une longue durée après l'ouverture des silos ; Dans cela le majeur problème de conservation dépend de plusieurs facteurs microbiologiques et biochimiques ; la présence des bactéries lactiques responsables de la fermentation qui assure

---

la stabilité anaérobique et aussi la teneur en glucides qui représente la source de développement de ces bactéries, et d'autre part le fourrage doit être enrichi par la dégradation partielle des composés complexes pour faciliter la digestion pour les ruminants.

L'objectif de ce présent travail était l'étude des caractéristiques de l'ensilage du sorgho au cours du temps puis isoler, purifier et identifier les différentes bactéries lactiques présentes dans l'ensilage et étudier les caractéristiques antagonistes et technologiques de ces souches ; Pour cela nous avons effectué une analyse bibliographique quantitative à partir d'une vaste base de données sur l'ensilage, les bactéries lactiques, les bactéries lactiques amylolytiques et les enzymes d'hydrolyses.... Au niveau expérimental, l'utilisation des micro-silos nous a permis de suivre les différentes étapes de l'ensilage du sorgho par l'analyse des paramètres physicochimiques et microbiologiques ; l'étude de propriété technologique.

Enfin, la dernière partie de ce document sera consacrée à la discussion générale des résultats, et aux principales conclusions et perspectives.

# *Rappel bibliographique*



# Chapitre 1

## Rappel bibliographique

### 1.1 L'ensilage

Les éleveurs assurent la présence des ressources de fourrage pour la saison sèche ou pour l'hiver afin de garantir une alimentation continue et régulière de bétails (FAO, 2004). La constitution des réserves repose sur deux techniques de conservation des fourrages.

1 **Le fanage.** La dessiccation ou conservation par voie sèche : le produit obtenu est le foin, il contient moins de 15% d'eau.

2 **L'ensilage.** L'ensilage est un aliment essentiel pour le bétail basé sur la préservation des cultures fourragères herbacées par acidification (Babayemi, 2009). On recherche à perdre le minimum de matière sèche, de valeur nutritive et à éviter de créer des produits toxiques pour les animaux (Merry et Davies, 1999).

Les principales récoltes employées pour l'ensilage sont le blé d'Inde ou maïs, le tournesol, le trèfle rouge, le trèfle d'odeur ou mélilot, l'avoine et les mélanges d'avoine et de pois, Le blé d'Inde, partout où il vient bien, est la plante la plus cultivée. Il donne un gros rendement et s'ensile aisément. Dans les districts où le blé d'Inde ne vient pas, et où il est nécessaire pour d'autres motifs d'employer d'autres récoltes, des précautions toutes spéciales sont nécessaires pour réussir l'ensilage.

Les deux produits issus de conservation des fourrages vont améliorer la production de viande (foin) le lait (ensilage) (Zheng et Stokes, 1997), hors saison au moment où les prix sont plus élevés, réduction des pertes de productivité (FAO, 2004).

## 1.2 Historique

L'ensilage est reconnu chez les Egyptiens comme méthodes de conservation en utilise toute culture céréale, affirmé par la peinture murale qui remonte à 1000-15000 ans avant J-C, Les silos ont été aussi trouvés à Carthage antique.

Au 19<sup>ème</sup> siècle, l'Europe conserve les cultures fourragères par l'ensilage, car cette technique était semblable à la production de choucroute (Weinberg, 2008).

En 1877, la publication d'Auguste Goffart, sur l'ensilage de maïs fourrager a un grand impact sur la diffusion de la technologie d'ensilage en Europe et en Amérique du Nord.

Le livre Sweet silage (Fry, 1885) préconise que l'ensilage atteindre 50 % des constituant nutritionnels a cause les microorganismes nuisible qui peuvent altérer l'ensilage avant la fermeture des silos, se qui a créé un reculement d'utilisation de cette technique.

En 1920, Virtanen Finlande a reçu le Prix Noble grâce au développement de l'acidification directe de l'ensilage pour l'herbe humide en utilisant un mélange d'acides chlorhydrique et sulfurique qui contribue à réduire les pertes de fermentation et la protéolyse.

Après la seconde guerre mondiale en Grande Bretagne les agricultures ont accepté cette nouvelle technique, celle-ci est appliqué qu'en 1968 seulement 12% à 15% de l'herbe a été conservé comme ensilage. En 1973 la quantité nettement augmentée jusqu'à 28% de fourrage (Thomans *et al.*, 1980). La France est considérée comme l'un des grands producteurs de l'ensilage en Europe. Bien que la majorité de l'ensilage soit constitué de maïs, 5 millions d'hectares de 12 millions de pâture sont récolté à des fins de conservation en l'an 2000 (Veen, 2005).

Les cultures fourragères fraîches, telles que le maïs, les graminées, les légumineuses, le blé et la luzerne, peut être conservée par ensilage (McDonald *et al.*, 1991), plusieurs type de silos ont été développés ainsi que des bâches en plastique pour sceller.

La tendance récente est d'utiliser de grandes balles en plastique et manchons pour stocker l'ensilage qui permettent la flexibilité de stockage et l'utilisation. Ainsi les machines qui comprennent les hacheurs et les déchargeurs d'ensilage ont été développées. Additifs, et des produits chimique et biologiques sont introduit, (les inoculant bactériens et des enzymes) qui améliorent la fermentation et la conservation d'ensilage et dans certains cas également améliorer les performances des animaux.

La production actuelle de l'ensilage en Europe et en Amérique du Nord est estimée à 200 millions de tonnes de matière sèche, par rapport à 300 millions de tonnes de foin. La superficies estimées des cultures récoltées pour l'ensilage total de 43 millions d'hectares (Wilkinson *et al.*, 2003).

### 1.3 Production fourragère en Algérie

L'alimentation constitue, incontestablement, l'une des contraintes majeures à l'essor de l'élevage en Algérie. Les espèces fourragères cultivées ne dépassent pas la dizaine, alors que la flore renferme un immense potentiel d'espèces pouvant faire l'objet de culture ou d'introduction au niveau des jachères et / ou dans la réhabilitation des terres de parcours ou des zones dégradées (FAO/INRA, 2006). Plusieurs genre peuvent être cités : *Médicago*, *Trifolium*, *Vicia*, *Astragalus*, *Scorpiurus*, *Trigonella*, *Lathyrus*, *Ménilotus*, *Hippocrepis*, *Coronilla*, *Lotus*, *Aegilops*, *Onobrychis*, *Anthyllis*, *Ononis*, *Hedysarum*, *Ornithopus*, *Pisum*, *Potereum*, *Tetragonolobus*, *Hordeum*, *Bromus*, *Phalaris*, *Dactylis*, *Artemisia*, *Salsola* et *Stipa*, *Ebinus*, l'espèce steppique *Peganum*, *Fétuques*, *Lupinus*, *Tétragonolobus*, *Sulla*, *Sorgho d'Alep*, *Ampelodesma*, *Hyperthenia* (FAO/INRA, 2006)

L'accent sera mis sur les espèces cultivées :

- Espèces principales : l'orge, l'avoine, le sorgho, la luzerne pérenne, le bersim et la vesce.
- Espèces secondaires : le maïs, le pois fourrager, le pois protéagineux, la féverole, le lupin, les luzernes annuelles, le sulla, la fétuque, le raygrass, l'agropyrum, le phalaris, le dactyle, le triticale, le mil, certaines espèces de trèfles et quelques espèces arbustives : l'atriplex, la luzerne arbustive, le cactus et d'arbres tels que le frêne et le caroubier (FAO/INRA, 2006).

Un examen détaillé de la structure du bilan fourrager en Algérie a permis de relever que le taux de couverture des besoins du cheptel algérien se situe à moins de 80 % pour une offre estimée à 8 milliards d'unités fourragères en 2001. Cette insuffisance fourrager à des répercussions négatives sur la productivité des animaux et se traduit par un recours massif aux importations de produits animaux comme des produits laitiers et carnés.

La faiblesse de la productivité fourragère qui due a divers causes selon (ITEBO ; 2002) sont:

Les superficies occupées par les fourrages ou utilisées pour l'alimentation du cheptel a près de 39 millions d'hectares (2001). Ces superficies sont représentées, essentiellement, par les steppes et les pâturages (82 %), les terres en jachère (7.8 %) et les soles pourvoyeuses de

chaumes et de pailles (9%) ; tableau (1.2) représente l'évolution de production fourragère par espèce en Algérie (ONS ; 2013).

Les coûts excessifs que nécessitent les différentes cultures dans ses régions, (besoins en irrigation, produits phytosanitaires, cultures sous serres, etc.) sans ignorer l'effet contreproductif de l'exploitation excessive et incontrôlée des eaux souterraines sur les sols à long terme.

## 1.4 Les élevages en Algérie

Le cheptel algérien des ruminants est estimé pour l'année 2001 à près de 3.5 millions d'unités gros bétail qui se localisent essentiellement au niveau des zones steppiques (32 %), des zones humides et subhumides (29 %) et les zones céréalières (23%). La structure des élevages varie selon les zones agro écologiques; celle-ci est dominée par l'élevage bovin (72 %) dans la zone tell littoral, par l'association ovins/bovins dans les zones céréalières et sublittoral, les ovins en zones steppiques (75 %) et les camelins en zones sahariennes (56%) (ITEBO ; 2002). Et le tableau (1.1) présente des animaux domestiques ruminants en Algérie et leur importance en effectifs (2003-2010) (FAO ,2012).

**Tableau 1.1** : Les animaux domestiques ruminants en Algérie et leur importance en effectifs.  
**Evolution des effectifs 2003-2010 (10<sup>3</sup> têtes) (FAO ,2012).**

Années	2003	2004	2005	2006	2007	2009	2010
<b>1- Bovins</b>	1 560	1 614	1 586	1607	1633	1682	1 747
<b>Vaches BLM*</b>	192	199	204	208	216	229	915
<b>Vaches BLA**</b>	640	645	624	639	643	652	
<b>Autres</b>	728	770	758	760	774	801	832
<b>2- Ovins</b>	17 502	18 293	18 909	19 615	20 154	21 404	22 868
<b>Brebis</b>	9860	10 184	10 396	10 696	10 899	11 852	13 086
<b>Autres</b>	7642	8109	8513	8919	9 252	9552	9781
<b>3- Caprins</b>	3 324	3 451	3590	3754	3 837	3962	4 287
<b>Chèvres</b>	1904	1940	2027	2151	2 200	2298	2492
<b>Autres</b>	1420	1511	1563	1603	1675	1664	1794
<b>4- Camelins</b>	253	273	269	286	291	301	314
<b>Total</b>	22 639	23 631	24 354	25 262	25 915	27 349	29 216
*BLM: Bovins laitiers modernes **BLA: Bovins laitiers améliorés							

**Tableau 1.2** : Evolution de production fourragère par espèce en Algérie (ONS ; 2013).

<b>Espèce</b>	<b>1999/00</b>	<b>2000/01</b>	<b>2001/02</b>	<b>2002/03</b>	<b>2003/04</b>	<b>2004/05</b>	<b>2005/06</b>	<b>2006/07</b>	<b>2007/08</b>	<b>2008/09</b>	<b>Moyenne</b>
<b>Vesce avoine</b>	906 600	1 634 310	1 351 390	1882780	1550800	1345740	1520130	2038800	1354790	1788619	1 537 196
<b>Luzerne</b>	36 180	39 860	100220	69520	117100	136060	211510	260090	168885	135364	127 479
<b>Divers</b>	1 859 350	3 870 290	2 476 820	5480290	5185600	4898040	4275600	7169110	4160025	9180680	4 855 581
<b>Fourrages artificiels(1)</b>	2 802 130	5 544 460	3 928 430	7 432 590	6 853 500	6 379 840	6 007 240	9 468 000	5 683 700	11 102 663	6 520 255
<b>Prairies naturelles</b>	481 950	655 890	296 000	566300	568850	601860	578885	605565	568570	674290	559 816
<b>Jachères fauchées</b>	1 287 220	1 879 650	1 137 260	4364580	2929900	2254120	2309895	4386765	2919295	5976760	2 944 545
<b>Fourrages naturels(2)</b>	1 769 170	2 535 540	1 433 260	4 930 880	3 498 750	2 855 980	2 888 780	4 992 330	3 487 865	6 651 050	3 504 361
<b>Total(1)+(2)</b>	4 571 300	8 080 000	5 361 690	12 363 470	10 352 250	9 235 820	8 896 020	14 460 330	9 171 565	17 753 713	10 024 616

Selon le Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (MADR) publier sur le site officiel le 19/11/2011 (<http://www.inraa.dz/squelettes/bdet.php?num=134>) ; qu'il nécessite une stratégie de développement de la production fourragère en Algérie et d'introduire des techniques modernes pour la préserver afin d'assurer la sécurité alimentaire, lors d'une journée d'étude l'intervenant Soukehal, Abdelhamid a estimé que la production de deux milliards de litres de lait comme seuil de sécurité alimentaire nécessite 335.000 vaches laitières produisant chacune 6.000 litres par an et 168.000 hectares de terres productives de fourrages tels que le maïs, la luzerne (pour un rendement d'environ 12.000 litres de lait par hectare), et il a souligné la mise en place d'un programme intense de formation et de vulgarisation des producteurs de fourrage.

Actuellement, le développement de l'alimentation animale et la production de semences est valorisée dans la région de Tamentit (Adrar), Oran et à Sidi Bel-Abbès pour la production de luzerne et du maïs.

L'Institut Technique des Elevages de Lamtar (Wilaya de Sidi-Bel-Abbès) applique la tendance récente d'utiliser de grandes balles en plastique et manchons pour stocker l'ensilage qui permettent la flexibilité de stockage et l'utilisation. Ainsi les machines qui comprennent les hacheurs et les déchargeurs d'ensilage ont été développées ; (Figure1.1) représente différentes étapes de préparation de l'ensilage de maïs en grands balles (l'Institut Technique des Elevages de Lamtar (Sidi-Bel-Abbès))





**Figure 1.1** : Différentes étapes de préparation de l'ensilage de maïs en grands balles (l'Institut Technique des Elevages de Lamtar (Sidi-Bel-Abbès)).

## 1.5 Les processus biochimiques et microbiologiques au cours de l'ensilage

Les bactéries jouent un rôle important dans le procédé de l'ensilage. Il y a beaucoup de bactéries qui ne peuvent vivre dans les conditions du silo; d'autres, au contraire, y trouvent un milieu idéal; la sève avec sa haute teneur en sucres, en protéines et en sels, fournit une nourriture excellente pour le développement des bactéries. Les bactéries provoquent de nombreux changements dans le fourrage ensilé, dont le principal est le développement d'acides organiques (Hopkins et Ripley ,1951). L'ensilage est le résultat d'une fermentation des plantes fourragères par les bactéries lactiques (LAB), constituant une partie du patrimoine naturel de la microflore associée avec du matériel végétal (Ma`kimattila *et al.*, 2011).

Les bactéries lactiques vont convertir les sucres solubles présents dans les cellules végétales en acides organiques. Cette production d'acides organiques entraîne une baisse de pH, ce qui permet la conservation des plantes fourragères tout en préservant leur valeur nutritive.

Pour obtenir un ensilage, il faut :

- Utiliser des silos hermétiques (anaérobiose totale) ; plusieurs types de silos sont utilisés:
  - Le silo-tunnel, le silo-fosse, le silo-couloir, le silo-tour, etc.,
  - Prendre le fourrage qui n'a pas été souillé par le sol, le hacher et le tasser,
  - Employer si nécessaire des techniques supplémentaires telles que le pré-fanage pour le fourrage à forte teneur en eau ou utiliser des conservateurs (produits sucrés, acide formique, antifongiques,...etc.) pour améliorer la conservation (FAO, 2004).

Lorsque l'on entasse un fourrage vert fraîchement coupé, on observe naturellement deux phénomènes plus ou moins marqués :

*Une élévation de la température, un écoulement de jus* (Hopkins et Ripley ,1951).

Ces modifications traduisent l'évolution biochimique et bactérienne du fourrage qui est issues à l'activité enzymatique des cellules végétales et celle des bactéries.

On retrouve différentes populations des microorganismes sur les plantes fourragères, dont le nombre et l'identité auront une influence directe sur la qualité de l'ensilage (Tableau 1.3).

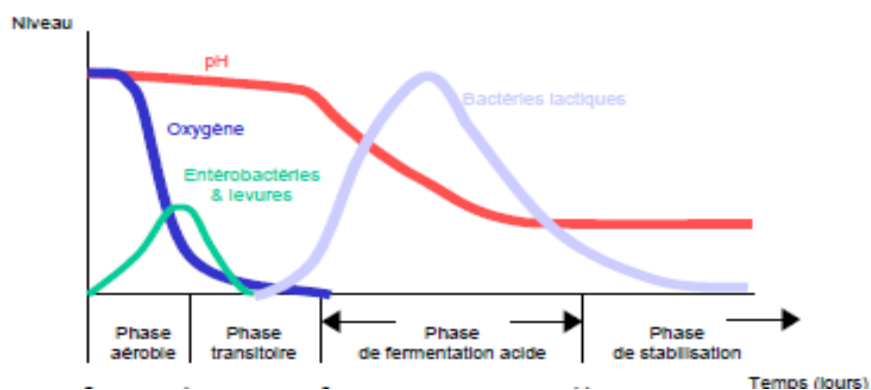


**Tableau 1.3 :** Le nombre approximatif des bactéries retrouvées dans la phyllosphère des plantes (Pahlow *et al.*, 2003).

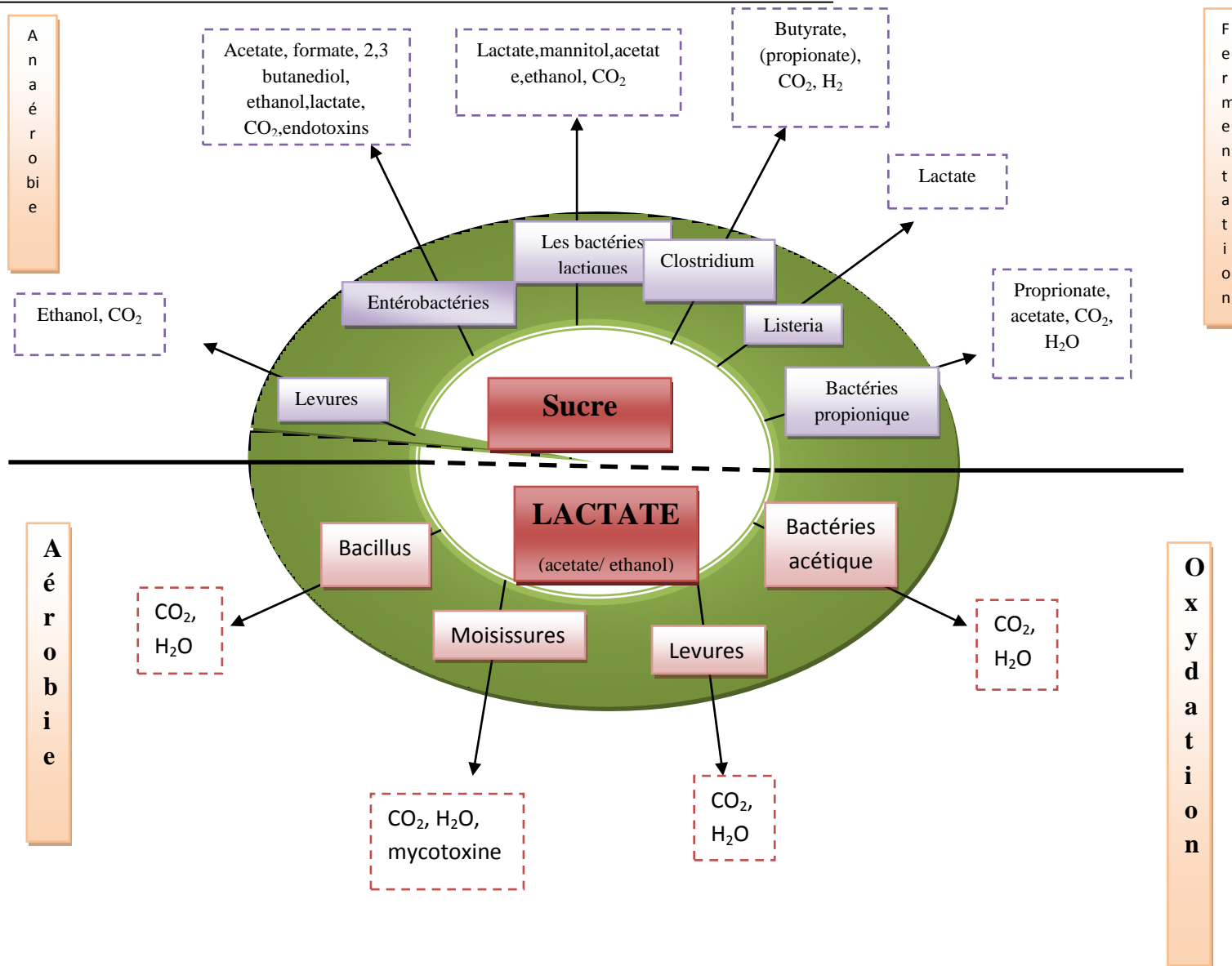
Groupe	Exemple de bactéries	Population (ufc.g <sup>-1</sup> FF) <sup>z</sup>
Bactéries aérobies	<i>Micrococcus</i>	>10 000 000
Bactéries lactiques	<i>Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, Enterococcus, Lactococcus et Streptococcus.</i>	10-1000 000
Entérobactéries	<i>Escherichia coli, Listeria</i>	1000-1000 000
Levures	<i>Candida, Saccharomyces</i>	1000-1000 000
Moisissures	<i>Aspergillus, Penicillium, Fusarium</i>	1000-1000 000
Spoires de clostridies	<i>Clostridium butyricum, C. tyrobutyricum, Clostridium sporogenes, Clostridium beijerinckii</i>	100-1000
Spoires de Bacilles	<i>Bacillus cereus, Bacillus lentus</i>	100-1000
Bactéries produisant de l'acétate	<i>Lactobacillus buchnuri</i>	100-1000
Bactéries produisant de l'acide propionique	<i>Propionibacterium</i>	10-100

(UFCg<sup>-1</sup>FF)<sup>z</sup> : Unité formant colonie par gramme de fourrage frais.

Les bactéries provoquent de nombreux changements dans le fourrage ensilé, dont le principal est le développement d'acides organiques. La fermentation des plantes fourragères peut être divisée en quatre étapes figure (1.2) (Pahlow *et al.*, 2003; Weinberg et Assbell, 2003).



**Figure 1.2 :** Différentes étapes d'évolution d'un ensilage (Paragon *et al.*, 2004)



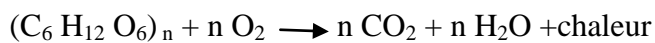
**Figure 1.3** : Schéma général du métabolisme anaérobie et aérobie des sucres et produits de la fermentation par les microorganismes du fourrage (Merry et Davies ,1999).

### 1.5.1 Phase aérobie

#### *Activité enzymatique*

Le tissu végétal vert que l'on met en silo ou dans un contenant fermé continue à vivre quelque temps. Elles continuent à développer leur activité métabolique et à respirer aussi longtemps qu'elles disposent de l'oxygène retenu dans la masse du fourrage et que la teneur en eau est suffisante.

Les réactions d'hydrolyse constituent l'étape première de l'évolution du fourrage. Elles concernent principalement les glucides de réserve, mais épargnent l'essentiel de l'amidon. Les glucides simples disponibles (glucose et fructose) vont constituer un combustible de choix pour les réactions de respiration selon le modèle classique :



Lorsque l'oxygène est épuisé dans le silo le taux de protéolyse est beaucoup plus rapide et la dégradation est importante. Cette réaction va transformer les protéines en peptides, puis en acides aminés eux-mêmes susceptibles de subir une désamination (libération d'ammoniac) sont plus actifs entre pH 6 et 7, mais l'activité ne se poursuit pas par la même vitesse à des valeurs inférieures à pH=4. (Hopkins et Ripley ,1951 ; Henderson, 1993).

Les exigences pour la réussite de ensilage comportent des mesures adéquates en matière sèche (MS) et le contenu glucide soluble doit être entre 300 et 400 g kg<sup>-1</sup> et au moins 30-50 g kg<sup>-1</sup> MS, respectivement (Weinberg, 2008).

En présence d'air et tant que l'acidification du fourrage n'est pas suffisante pour bloquer les processus fermentaires, la microflore aérobie présente sur le fourrage se développe. Ces réactions présentent peu d'intérêt pour la conservation car elles gaspillent de la matière sèche mais, elles s'arrêtent avec la raréfaction de l'oxygène. Cette phase aérobie peut intervenir également chaque fois que de l'air peut pénétrer dans le tas de fourrage, en cours de conservation et lors de la reprise de l'ensilage (Paragon *et al.*, 2004).

#### ❖ **Début d'acidification**

##### ➤ ***Entérobactéries : fermentation acétique***

Les entérobactéries sont les premières à prendre le relais car elles sont aérobies facultatives. Leur activité fermentaire, qui s'exerce au détriment des glucides solubles, génère avec une faible production de l'acide acétique (qui induit un début d'acidification), des alcools et du gaz carbonique (figure 1.3). Au bout de 24-48 heures, les streptocoques et les

leuconostocs prennent le relais, mais la disparition totale de l'oxygène et la baisse du pH, induite par l'accumulation d'acide acétique réduit leur activité. Les entérobactéries dégradent aussi la matière azotée en ammoniac.

#### ➤ **Levures**

Toutes les levures se développent bien en présence d'oxygène, et leur rôle important dans la dégradation anaérobie de fourrage est bien établi. Dans l'ensilage un sous-groupe se développe qui peut rivaliser avec succès pour les glucides fermentescibles en anaérobie. Ce sont remplacées par un sous-groupe en mesure d'utiliser acides organiques (Henderson, 1993).

Les genres de levures les plus importants associés à l'ensilage sont : *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* et *Saccharomyces* (Weinberg, 2008).

#### ➤ **Moisissures**

La plupart des moisissures sont dépendants de l'oxygène pour leur croissance et leur propagation mais même d'infimes quantités d'oxygène sont suffisantes pour maintenir le métabolisme de certains membres du groupe (Pahlow, 2003) cité par Henderson, 1993. Certaines moisissures peuvent produire des mycotoxines dans les ensilages qui sont dangereuses pour les animaux et les humains. Les genres de moisissure associé avec de l'ensilage sont : *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Geotrichum* et *Mucor* (Weinberge, 2008). Ces fermentations sont responsables d'une part de pertes d'éléments nutritifs, et d'autre part d'un ralentissement de l'acidification du fourrage, en diminuant la quantité des sucres utilisables par les bactéries lactiques. Tant que le pH de stabilité n'est pas atteint, les flores indésirables comme les germes butyriques ou les *Listeria* peuvent se développer.

### **1.5.2 Phase anaérobie**

#### ➤ **Bactéries lactiques : fermentation lactique**

L'ensilage consiste à une fermentation anaérobie naturelle par des bactéries productrices d'acide lactique pour convertir glucides solubles en acide lactique et par conséquent, diminuer le pH et inhiber l'activité enzymatique et microbienne.

Les bactéries lactiques sont présentes dans un nombre relativement faible (généralement  $10^3$ - $10^5$  ufc/g) de fourrage vert. Dans des conditions normale, elles se multiplient rapidement et en moins de 8 jours jusqu'à atteindre des niveaux à  $10^{10}$  ufc/g

(ICMSF. 2005 ; Weinberge, 2008).

➤ **Bactéries butyriques : fermentation butyrique**

Présente dans l'ensilage sous forme des spores, les bactéries butyriques (*Clostridium butyricum*, *Clostridium tyrobutyricum*) peuvent germer sous réserve d'une humidité suffisante (supérieure à 70 %) et lorsque le pH de l'ensilage ne descend pas en dessous de 4.2, leur développement se fait à partir des éléments nutritifs initiaux résiduels (sucres, acides aminés, protéines...) mais aussi au détriment des produits de fermentation (lactate essentiellement) ce qui induit un véritable renversement de tendance.

Certains espèces fermentent les glucides et ils sont appelés saccharolytiques (*Clostridium tyrobutyricum* and *Clostridium butyricum*), et autre dégrade les protéines (proteolytic, *Clostridium butulinum*) et beaucoup fermentent à la fois (*Clostridium sporogenes*) (Weinberg, 2008).

La dégradation de l'acide lactique rend le milieu moins acide, donc favorable au développement des levures et des moisissures. Les protéines sont décomposées en ammoniac et en amines toxiques (Elbadaoui , 2001.)

**Tableau 1.4** : Fermentation de l'acide lactique et du glucose par les *Clostridium* (MacDonald *et al.*, 1991)

Substrats	Produits
<b>2 Acide lactique + ADP</b>	acide butyrique + 2CO <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> + ATP
<b>Glucose + 3ADP</b>	acide butyrique + 2CO <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> + 3ATP

**Tableau 1.5** : Exemples des réactions de protéolyse causées par les Clostridium productrices des amines biogènes ( Elbadaoui , 2001.)

Substrats	Produits
<b>Déamination</b>	
Lysine	Acétate +Butyrate +2NH <sub>3</sub>
Sérine	Puryvate+NH <sub>3</sub>
Glutamate	Acétate +puryvate+NH <sub>3</sub>
<b>Décarboxylation</b>	
Arginine	Putriscine +CO <sub>2</sub>
Glutamate	γ-Aminobutyrate +CO <sub>2</sub>
Histidine	Histamine +CO <sub>2</sub>
Tyrosine	Tyramine +CO <sub>2</sub>
Tryptophane	Tryptamine +CO <sub>2</sub>
<b>Oxydation/ Réduction</b>	
Alanine	Acétate + NH <sub>3</sub> + CO <sub>2</sub>
Leucine	Acide iso -valérique + NH <sub>3</sub> + CO <sub>2</sub>
Valine	Acide iso-butyrique + NH <sub>3</sub> + CO <sub>2</sub>
Glycine	Acétate+ NH <sub>3</sub>
Proline	Acide σ- amino- valérique+ NH <sub>3</sub>

### Phase de stabilité anaérobie

À ce moment de la fermentation, l'activité des microorganismes est inhibée par l'acidité du milieu. La stabilité anaérobie de l'ensilage sera maintenue aussi longtemps que le silo restera fermé. Ces bactéries peuvent alors dégrader l'acide lactique pour former de l'acide butyrique et les acides aminés en une gamme d'acide organiques.

### 1.5.3 Phase de l'alimentation

Lorsque les animaux sont nourris l'ensilage est exposé à l'oxygène, les microorganismes aérobies recommencé à croître et l'ensilage serait détruit en raison d'une augmentation du pH et de la croissance des levures et moisissures. (Weinberg *et al.*, 2011).

## 1.6 Le sorgho

Les fourrages servent d'aliment bétail, y compris les bovins, les ovins et les chevaux. Les cultures fourragères comprennent à la fois des cultures annuelles et vivaces. Les éleveurs doivent assurer une ressource alimentaire constante à leurs troupeaux, malgré les pénuries fourragères de plus ou moins longue durée. Ceci implique :

- Une **adaptation stratégique** concerne les choix de systèmes d'élevage : niveau de production laitière, type de production animale (gras ou maigre ; broutards, bouvillons ou boeufs...), et de systèmes fourragers (niveau de chargement en fonction de la Surface Toujours en Herbe (STH) ou de la Surface Fourragère Principale (SFP), niveau d'utilisation des concentrés, part de l'herbe et du maïs ensilage, pâturage ou foin et ensilage d'herbe...)
- **L'adaptation tactique** concerne la gestion annuelle et saisonnière du système fourrager en fonction de l'évolution climatique subie ou prévue (date de mise à l'herbe, gestion des stocks, utilisation des cultures à double fin : maïs ensilé, *maïs en grain*, céréales immatures, utilisation des pailles) (Lemaire INRA, 2006).

Le sorgho, sorghum bicolor (L) Moench, est une graminée tropical à haute tige. En effet, son nom dérive du latin « surgo » c'est-à-dire « je m'élève ». La collection mondiale de sorgho comprend environ 17000 variétés ; ces variétés se croisent facilement et donnant une descendance fertile. La variabilité des sorghos cultivés et sauvage est maximale dans la région nord-est de l'Afrique (Miller, 1980).

### 1.6.1 Culture

Le sorgho [*Sorghum bicolor*(L) Moench] est une des principales cultures céréalières d'Afrique. L'ensemble des espèces du genre sorghum sont des plantes herbacées, comme la majorité des graminées. Elles se composent de tiges robustes et dressées, garnies de feuilles plates et se terminent par une grande inflorescence rameuse (Fig 1.4). Les plus grandes variétés s'élèvent jusqu'à 5 m de haut, avec une tige de 4 cm de diamètre, alors que les plus petites atteignent 50 cm à maturité. Elles possèdent un système racinaire puissant, capable de descendre rapidement à une grande profondeur du sol (jusqu'à 2 m) pour y extraire l'eau et les éléments minéraux (Dehaynin ; 2007). L'institut Technique des Elevages de LAMTAR ; Wilaya de Sidi-Bel-Abbès (2011) ( Legarto, 2000), considèrent le sorgho comme une bonne source d'aliment de bétail puisque il possède plusieurs caractéristique :

- Fourrage énergétique,
- Bonne conservation de l'ensilage,
- Bonne résistance aux maladies,
- Rendement : 70 tonnes de matière verte,
- Stade Du 1<sup>er</sup> ensilage 100 à 115 jours,
- Besoins en eau de 480mm, c'est 30% de moins que le maïs,
- Bonne tolérance au stress hydrique et à la salinité,

Classification	
<u>Règne</u>	<i>Plantae</i>
<u>Sous-règne</u>	<i>Tracheobionta</i>
<u>Division</u>	<i>Magnoliophyta</i>
<u>Classe</u>	<i>Liliopsida</i>
<u>Sous-classe</u>	<i>Commelinidae</i>
<u>Ordre</u>	<i>Cyperales</i>
<u>Famille</u>	<i>Poaceae</i>
<u>Sous-famille</u>	<i>Panicoideae</i>
<u>Tribu</u>	<i>Andropogoneae</i>
<u>Genre</u>	<i>Sorghum</i>
<u>Espèce</u> : <i>Sorghum bicolor</i>	



**Figure 1.4** : Classification taxonomique de la plante de Sorgho (*Sorghum bicolor*).

### 1.6.2 Utilisation

Le grain de sorgho est une source d'alimentation primordiale pour des centaines de millions d'humains dans les régions tropicales semi-arides d'Asie et d'Afrique (Elbadaoui,2001).C'est également une source importance de boissons alcooliques dans beaucoup de pays, le jus du sorgho sucré donne un sirop. Le sorgho joue un rôle très important, comme grain ou comme fourrage dans l'industrie animale (Teetes *et al.* , 1980 ).



## 1.7 Les caractéristiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) sont liées à un groupe des bactéries qui produisent de l'acide lactique à partir de glucides comme un produit métabolique majeur. Orla-Jensen (1919) a été le premier auteur à définir les bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique qui réuni plusieurs genres capables de fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique des isomères de forme L ou de forme D (Figure 1.4).

L'acide lactique est l'un des acides organiques les plus importants produit par les bactéries lactiques (LAB), découvert par le scientifique suédois Scheele en 1780 à partir de lait fermenté.

Elles ont été utilisées pour la fermentation ou la culture des aliments pendant au moins 4000 ans. Ce sont des bactéries hétérotrophes et ont généralement besoins nutritionnels complexes car elles sont chimioorganotrophe. Bien que les bactéries lactiques soient très hétérogènes, elles sont classées dans le même groupe en raison de leur principal produit métabolique final : l'acide lactique.

Selon la classification qui se base sur les méthodes de taxonomie moléculaire, les bactéries lactiques se subdivisent en 12 genres différents partagés entre les coques et les bâtonnets (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Holzapfel *et al.*, 2001; Jay, 2000; Axelsson, 2004) :

1 Les coques : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* et *Apotobium*.

2 Les bâtonnets : *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Bifidobacterium*. *Lactobacillus* le plus grand de ces genres, comprenant environ 80 espèces reconnues (Axelsson, 2004).

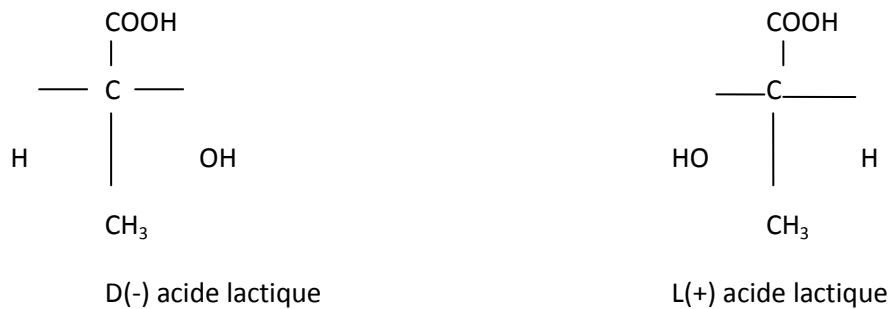
Cependant les genres les plus utilisés en industrie alimentaire en raison de leurs effets bénéfiques et surtout de leur innocuité sont : *Lactobacillus* – *Lactococcus* – *Leuconostoc* – *Pediococcus* – *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (représenté par l'espèce *Streptococcus thermophilus*).

Le genre est divisé en trois des groupes basés sur des types de fermentation:

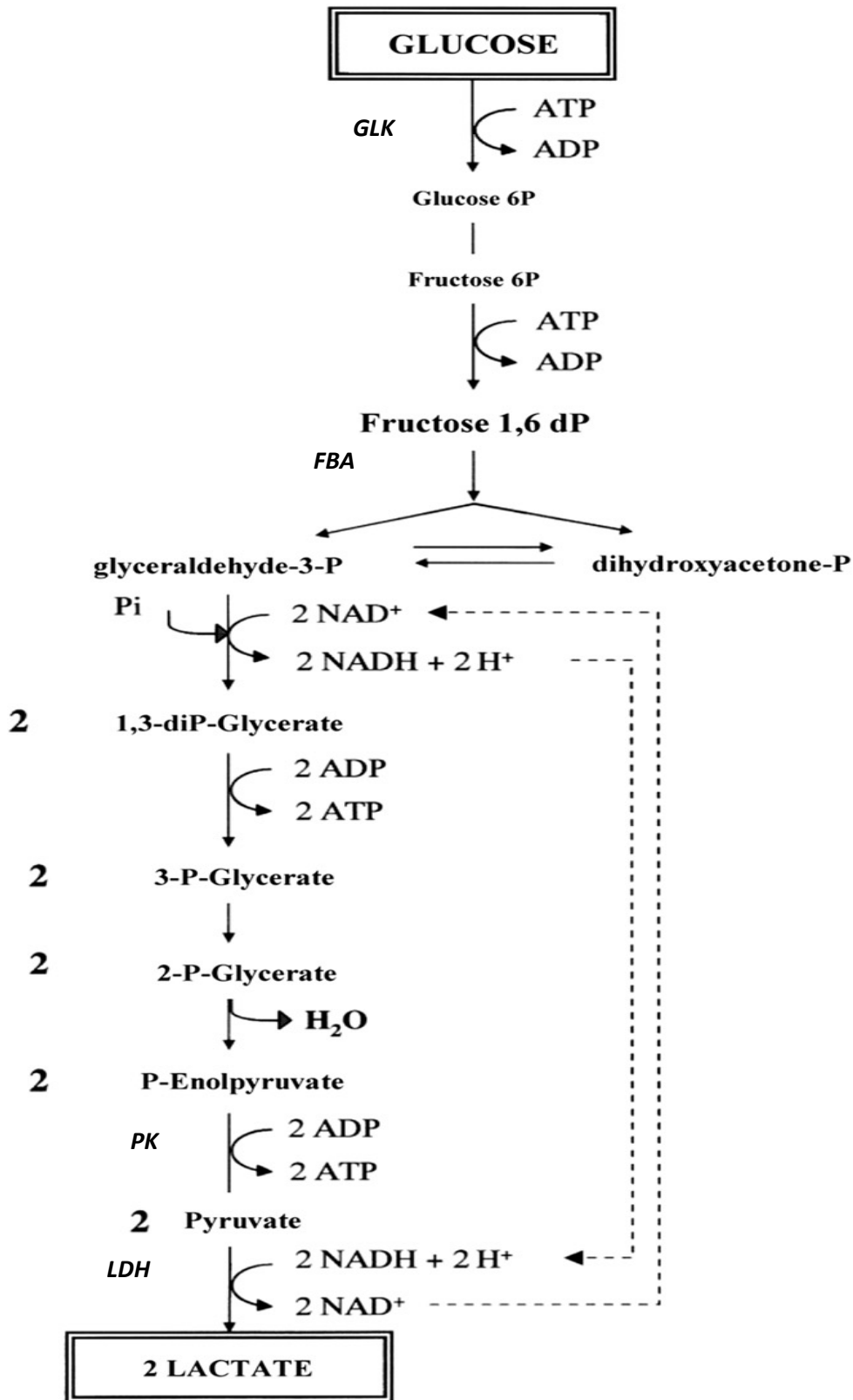
- 1 Les homofermentaires strictes,
- 2 Les hétérofermentaires facultatives,
- 3 Les hétérofermentaires strictes.

En utilisant les voies cataboliques suivantes :

- 1 Voie d'Embden Meyerhof Parnas, homofermentation dans laquelle l'acide lactique est le seul produit du métabolisme excrété à partir du sucre (figure 1.5) ;
- 2 Voie de Dickens-Horecker et Entner Doudoroff, hétérofermentation, conduisant à l'acide en mélange avec d'autres produits d'excrétion comme le CO<sub>2</sub>, l'acide acétique, l'éthanol, selon les bactéries considérées. La quantité de cet acide est liée à la quantité du substrat dégradé (hydrates de carbone) et de la voie métabolique empruntée pour cette excrétion (Orla –Jensen, 1919 cité dans Gournier Château et Larpent, 1994) (figure 1.5) ;
- 3 Voie bifide (Bifid-Shunt) (Scardovi, 1986) ; Le métabolisme des glucides chez les bifidobactéries diffère de ceux des bactéries homo et hétérofermentaire. Les espèces de bifidobactéries d'origine humaine ne possèdent pas des aldolases et des glucose-6-phosphate déshydrogénase, donc le glucose est métabolisé en fructose-6-Phosphate par l'intermédiaire d'une hexokinase et d'une glucose-6-phosphate isomérase comme illustre la figure (1.6).



**Figure 1. 5 :** Différentes formes d'acide lactique le D et le L.



**Figure 1.6 (a :** Voie métabolique homofermentaire des bactéries lactique (Cariou et Luquet, 2008).

Les principales enzymes : **GLK** : glucokinase ; **FBA** : fructose 1.6 bis phosphate aldolase ; **PK** : pyruvate kinase ; **LDH** : lactate déshydrogénase

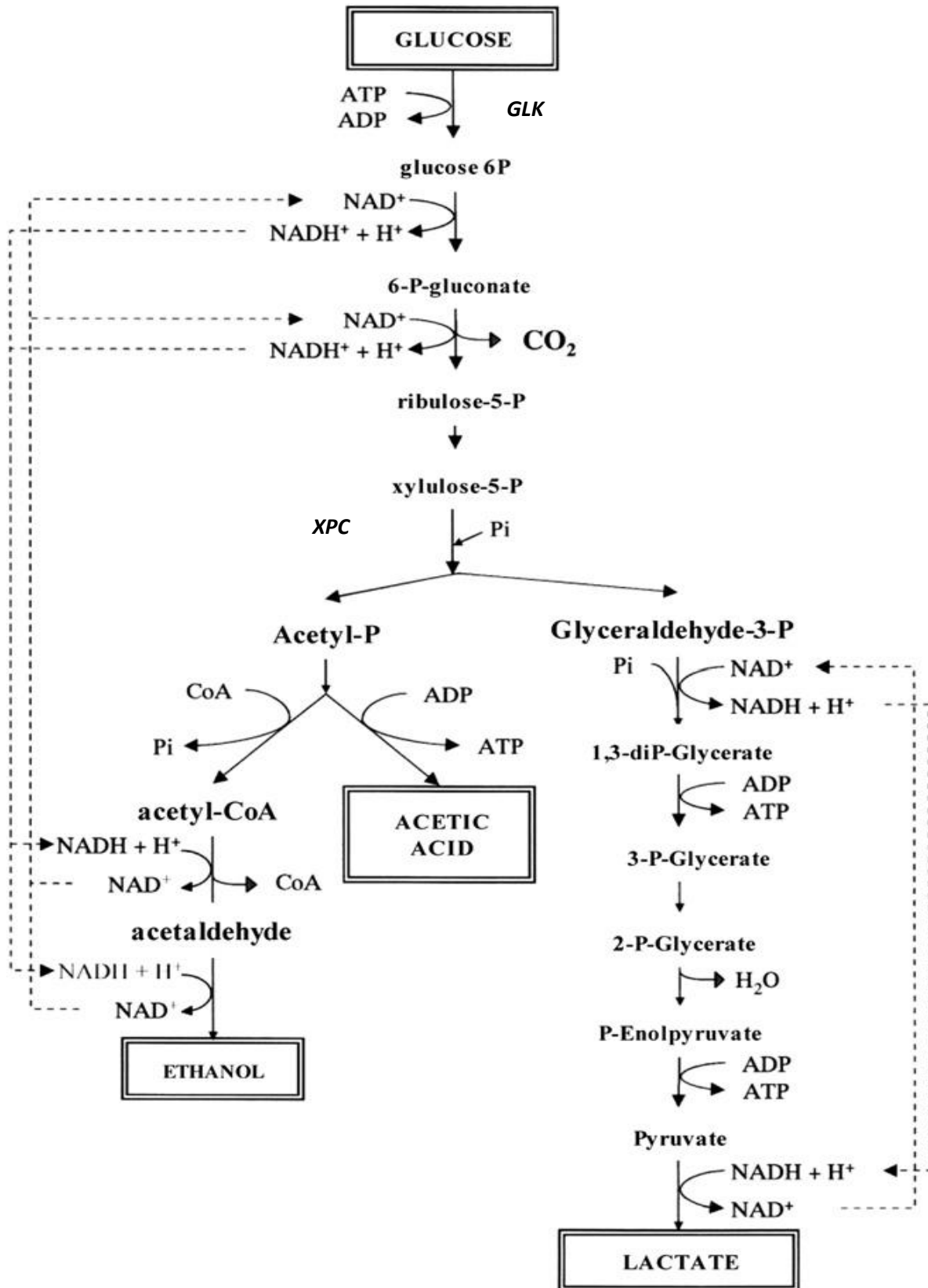


Figure 1.6 (b) : Voie métabolique hétérofermentaire des bactéries lactique (Cariou et Luquet, 2008).

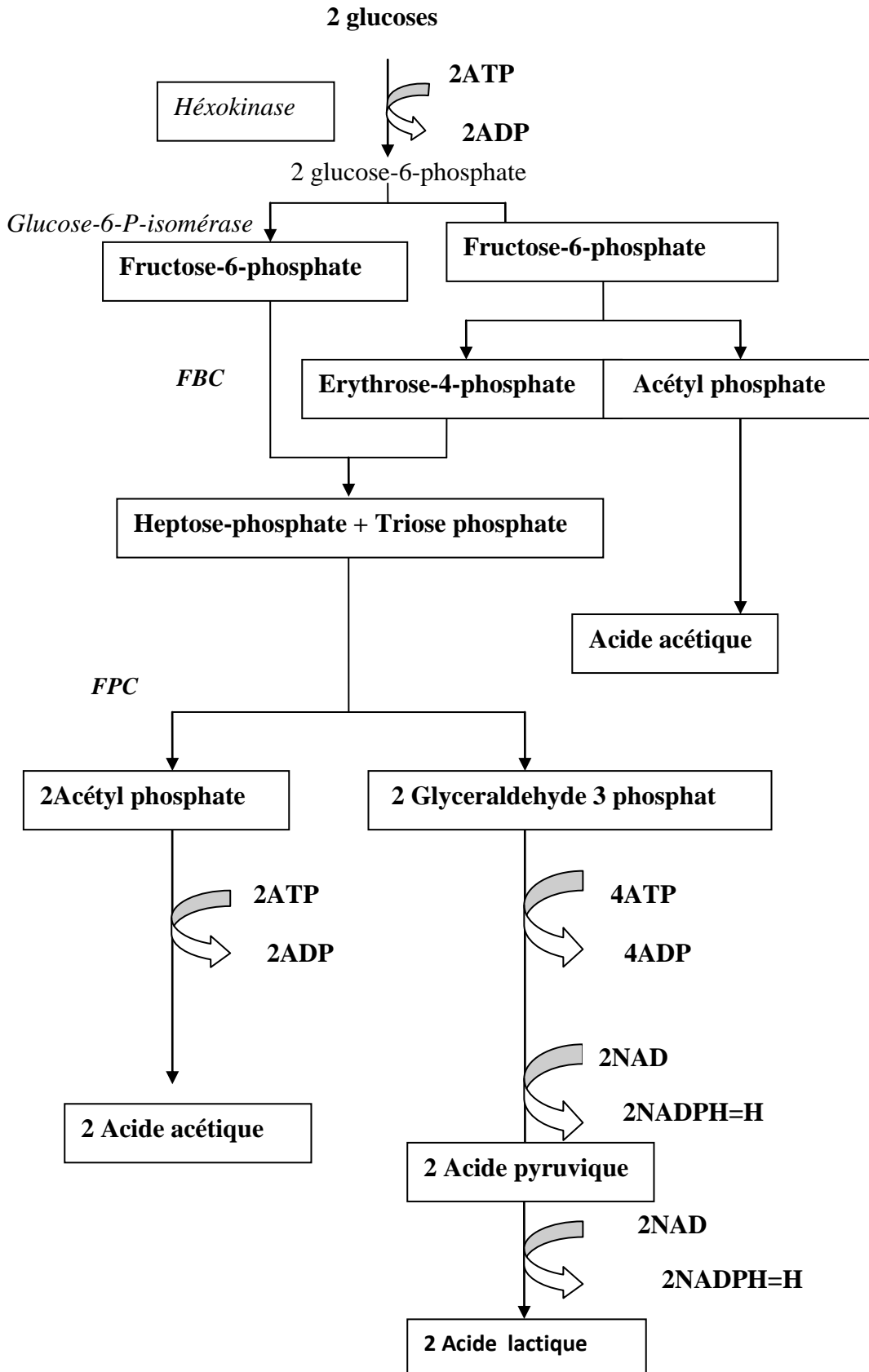
.Les principales enzymes : **GLK** :glucokinase ; **XPC** :xylulose 5 phosphate phosphocétolase.

Toutefois, les bactéries lactiques BL sont Gram positive, immobiles, asporulées et incapable de synthétiser les groupes de porphyrine. Elles se caractérisent par l'incapacité de synthétiser porphyrine (par exemple, l'hème) Cogan et Hill, (1993); Jay, (1996). Elles sont généralement faiblement protéolytiques et lipolytiques et elles exigent des acides aminés, des purines, des pyrimidines et des vitamines pour leur croissance (Stamer, 1976; Jay, 1996).

Elles sont aussi dépourvu de la catalase et des cytochromes par conséquent, les BL ne possèdent pas une chaîne de transport d'électrons donc elles utilisent la fermentation pour produire de l'énergie (Axelsson, 2004). Comme elles n'utilisent pas d'oxygène dans leur production d'énergie, les bactéries lactiques se développer dans des conditions anaérobies, mais elles peuvent aussi se développer en présence d'oxygène. Ces microorganismes sont aérotolérantes anaérobies. En raison des rendements énergétiques faibles, les bactéries lactiques se développent souvent plus lentement que les microorganismes capables de la respiration, et de produire des petites colonies de 2-3 mm. Elles peuvent croître à des températures de 5 à 45 ° C Les bactéries mésophiles 20°C et 30°C et les thermophiles se développe entre 30°C et 45°C (Bissonnette *et al.*, 2000). Elles sont caractérisées par la tolérance à l'acidité, avec la plupart des souches capables de croître à pH 4,4. Certaines sont active à pH 9,6 et d'autres à pH 3,2 (Jozala *et al.*, 2005). La croissance est optimale à pH 5.5 à 6.5.

Elles se caractérisent aussi par la nécessité des besoins nutritionnels complexes des acides aminés, des peptides, des bases nucléotidiques, des vitamines, des minéraux, des acides gras et les hydrates de carbone. (Hammes et Hertel, 2003).

Les BL se trouve dans différents niches écologiques, tel que le lait, et d'autre nourritures, la bouche, les régions gastro-intestinales et urogénitales des humains et des animaux (Lopez-Diaz *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2000; El Shafei *et al.*, 2000; Mathara *et al.*, 2004). Elles constituent aussi la flore microbienne dominante responsable de la fermentation des céréales et des plantes fourragères ensilées (tableau 1.6) (Carr *et al.*, 2002).



**Figure 1.7:** Voie métabolique des sucres par la voie bifide (Bifid-Shunt) (Scardovi, 1986).

Les principales enzymes: **FPC:** Fructose-6-P-cétolase ; **FBC :**fructose 1.6 bisphosphate aldolase.

**Tableau 1.6 :** Les bactéries lactiques les plus importantes dans les ensilages (Pang *et al.*, 2011 ; Yang *et al.*, 2010 ; Mc Donald *et al.*, (1991);

Genre	Type de fermentation	Espèces
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentaire	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> <i>L. coryniformis</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. paraplantarum</i> <i>L. citreum</i> <i>L. salivarius</i>
	Hétérofermentaire	<i>L. brevis</i> <i>L. buchnuri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. viridescens</i>
<i>Pediococcus</i>	Homofermentaire	<i>P. acidilacti</i> <i>P. damnosus</i> ( <i>cerevisiae</i> ) <i>P. pentosaceus</i>
<i>Enterococcus</i>	Homofermentaire	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
<i>Lactococcus</i>	Homofermentaire	<i>L. lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Streptococcus</i>	Homofermentaire	<i>S. bovis</i>
<i>Leuconostoc</i>	Hétérofermentaire	<i>L. mesenteroides</i> <i>L. pseudomesenteroides</i> <i>L. lactis</i>
<i>Weissela</i>	Hétérofermentaire	<i>Weissela .cibaria</i> <i>W.confusa</i>

### ✓ Les propriétés d'acide lactique

L'acide lactique ( $C_3H_6O_2$ ) est présent dans presque toutes les formes de la vie organisée, sa fonction la plus importante chez les animaux et les humains est liée à la fourniture d'énergie aux tissus des muscles. Il est soluble dans l'eau et très hygroscopique. Il est le premier produit multifonctionnel ayant une large gamme d'applications. Il s'agit d'un :

1. Le marché de la consommation d'acide lactique est dominé par la nourriture et le secteur des boissons depuis 1982. Même aujourd'hui, le marché de l'acide lactique existe encore pour les industries alimentaires et des boissons.
2. Plus de 50% de l'acide lactique produit est utilisé comme agent émulsifiant dans les produits de boulangerie (Datta *et al.*, 1995; Litchfield, 1996). Il est utilisé comme acidifiant / aromatisant / tampon pH ou d'un inhibiteur de détérioration bactérienne dans une grande variété d'aliments transformés, comme les bonbons, pains et des produits de boulangerie, boissons gazeuses, les soupes, les sorbets, les produits laitiers produits, la bière, les confitures et les gelées, la mayonnaise, et les pro-transformés des œufs, souvent en conjonction avec d'autres acidulants.
3. L'acide lactique ou ses sels sont utilisés pour la désinfection et l'emballage des carcasses, en particulier ceux de la volaille et poissons, où l'addition de solutions aqueuses au cours de traitement pour augmenter la durée de conservation par la réduction de l'altération microbienne (Datta *et al.*, 1995; Naveena, 2004).
4. La capacité de rétention d'eau, il est approprié pour une utilisation comme hydratant dans les formulations cosmétiques. Le lactate d'éthyle est l'ingrédient actif dans plusieurs préparations anti-acné.
5. La présence naturelle d'acide lactique dans le corps humain le rend très utile en tant qu'ingrédient actif en cosmétique (Wee *et al.*, 2006). L'acide lactique est utilisé depuis longtemps dans les formulations pharmaceutiques, principalement dans les topiques conjointement, lotions, et des solutions parentérales.
6. L'acide lactique est largement utilisé dans les industries de tannage du cuir comme un acidulant pour déchausage des peaux et dans le tannage végétal.



7. L'acide lactique est utilisé comme agent de détartrage, de solvant, agent de nettoyage, agent de libération et des humectants dans une variété de processus techniques.
8. Les organisations internationales telles que l'American Society for Testing and Materials (ASTM), l'Institut de Recherche sur les normes (ISR), Européenne Comité de Normalisation (CEN), l'International Organisation de Normalisation (ISO), l'Institut Allemand de Normalisation (DIN), l'Italien Normalisation Agency (UNI). Le compostage Association (ORCA), sont tous activement impliqués dans les tests de biodégradabilité en développement dans différents environnements et la compostabilité. La demande pour l'acide lactique a augmenté considérablement, en raison à des applications prometteuses de son polymère (Senthuran *et al.*, 1997).

## **1.8 Facteurs influençant le processus d'ensilage**

### **1.8.1 Facteurs liés à la plante**

Ces facteurs sont essentiellement liés aux caractéristiques de la plante, qui conditionnent son aptitude à l'ensilage :

#### **1. Richesse en glucides fermentescibles**

La teneur en sucres est très importante pour le développement des bactéries lactiques (Vervaern, 2010). Les substrats les plus communs sont le glucose, le fructose et le saccharose les fructosanes. Cette teneur varie en fonction de l'espèce fourragère, du stade végétatif et des facteurs du milieu.

#### **2. Pouvoir tampon**

Le pouvoir tampon peut être définie par la capacité de la plante à s'opposer aux fluctuations de pH et notamment l'acidification progressive par la production d'acide lactique. Il est exprimé par la quantité d'acide lactique nécessaire pour réduire le pH de l'ensilage à 4. Ce paramètre est très utilisé pour caractériser la capacité de la plante à l'ensilage (Fournier, 1998). Il dépend essentiellement de la teneur de la plante en protéines, acides organiques et sels minéraux (Paragon *et al.*, 2004) .Ces derniers auteurs indiquent que les légumineuses ont un pouvoir tampon élevé à celui des graminées et que les cultures fourragères peuvent être classées par ordre croissant de leur pouvoir tampon comme suit : maïs, sorgho, orge, avoine, feuilles et collets de betterave, bersim et luzerne.

#### **3. La température lors de la récolte**

L'ensilage récolté à une température fraîche (Octobre) subit une fermentation plus lente et présente une teneur plus élevée en azote ammoniacal que celui récolté par température

chaude (août). Cela serait dû à une moindre croissance des bactéries productrices d'acide lactique à une température fraîche (Fournier, 1998).

#### 4. pH

Le pH donne une indication de la qualité de conservation de l'ensilage, puisqu'un pH suffisamment bas arrête l'activité microbienne. Cependant le pH qui assure la stabilité anaérobie de l'ensilage c'est-à-dire qui arrête l'activité des Clostridium, augmente avec la teneur en matière sèche.

La variation de pH est proportionnelle à la teneur en matière sèche de l'ensilage. De plus le modèle développé par Leibensperger et Pitt (1987) cité par Elbadaoui, 2001 ; semble indiquer que le pH de stabilité anaérobie des légumineuses serait un peu plus élevé que celui des graminées. Un ensilage dont le pH est supérieur au pH de stabilité anaérobie peut présenter un taux d'azote ammoniacal élevé, ce qui en réduit la qualité de l'ensilage.

#### 1.8.2 Facteurs techniques

Ils englobent plusieurs volets :

- 1 *La finesse du hachage* qui réduit la taille des brins et disperse le jus, doit être faite selon le degré d'humidité du fourrage. donc, un fourrage humide ne doit pas être beaucoup haché sinon de grandes pertes seront occasionnées par écoulement du jus. La taille de fourrage influence la digestibilité de la matière sèche pour les vaches (Fang *et al.*, 2011 ; et Wang *et al.*, 2011)
- 2 *Le tassement* qui réduit les quantités d'air emprisonnées dans le silo, est très lié à la finesse de hachage et conditionne la densité de l'ensilage,
- 3 *La propreté de l'opération d'ensilage* qui affecte la fermentation et surtout le développement des clostridies amenées via les boues,
- 4 *Le type de silo* qui influence la réussite de l'ensilage par son degré d'étanchéité, et *La rapidité d'exécution et de fermeture du silo* pour minimiser le mieux possible les pertes dues à l'oxydation des nutriments.

#### 1.8.3 Utilisation des additifs

Les additifs utilisés ont plusieurs rôles pour la réussite de la technique d'ensilage. Ces additifs peuvent être classés en trois catégories : les stimulants de la fermentation (bactéries, enzymes et substrats fermentescibles), les inhibiteurs de la fermentation (acides et autres conservateurs) et les additifs nutritionnels (ammoniac, urée,...) (Kung, 1999).

### 1.8.3.1 Les stimulants de la fermentation

#### 1. *Les cultures bactériennes*

La fermentation de l'ensilage est hautement dépendante du type des microorganismes dominants. La conservation par l'acide lactique n'est pas toujours réussie car les bactéries lactiques homofermentatives sont généralement plus faibles en nombre sur les fourrages, et les hétérofermentatives produisent autres produits en plus de l'acide lactique. L'addition de bactéries lactiques homofermentatives a pour objectif de forcer la fermentation à une production accrue d'acide lactique.

Des inoculant microbiens doivent être présents en nombre suffisant pour dominer efficacement la fermentation. Les espèces les plus utilisées, seules ou mélangées, sont : *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*, *L. acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, et *P. pentosaceus*. D'autres types des bactéries sont utilisés spécialement pour augmenter la stabilité de l'ensilage vis-à-vis de l'air telque *Propionibacterium shermanii*, *P. freudenreichii* Subsp .*shermanii* et *P. jensenii* (Merry et Davies, 1999) et *Propionibacterium acidopropionici* (Filya *et al.*, 2004) et *Lactobacillus buchneri* (Mari *et al.*, 2009 ).

#### ❖ **Caractéristiques des inoculant bactériens lactiques et leurs effets:**

***Lactobacillus plantarum*** : domine dans les ensilages de sorgho, luzerne et le riz avec un pH4-4.5 (Pang et Qin, 2011, Zheng et Yu, 2011). Selon Prabhat ,2009 on peut ajouter *L. plantarum* comme additif pour renforcé la fermentation puisqu' ils sont homofermentaires et peuvent abaisser le pH jusqu'à environ 4.0-4.45 (Compagne, 2007). Selon les résultats de Saarisalo et Skytta, 2007 qui remarquent un faible pourcentage d'ammoniac et Azote soluble ; cet effet est du à une faible activité protéolytique (Winters *et al.*, 2000),et qui a aussi une activité antifongique envers : *Aspergillus parasitissus*, *Rhizopus stolonifer* indiquer Schnurer et Magnusson, 2005. D'autre souche de *L. plantarium* a été isolé à partir de manioc fermenté du Congo qui a une activité amylolytique (Giraus, 1995, Rojan *et al.*, 2009).

***Lactobacillus buchneri*** : est une bactérie lactique hétérofermentaire produit l'acide acétique en plus de l'acide lactique et permettait la stabilisation de l'ensilage lors l'ouverture des silos (Ray *et al.*, 2002, champagne, 2007) confirmé par : Hu *et al.*,2009 ;Keles et Demirci, 2011 ). Cette production peut inhiber la croissance des levures dans le blé et maïs et les ensilages de céréale à faible teneur en humidité cette inhibition est efficace avec un pH

inferieur (Brisson *et al.*, 2008).

La dominance d'acide acétique dans l'ensilage par rapport à acide lactique peut être défavorable puisque il porte peu d'énergie pour la croissance microbienne dans le rumen (Keles et Demirci, 2011).

Nnishinol et Touno, 2005 remarquent que *Lactobacillus buchneri* augmente les pertes de matière sèche par l'accumulation de ammoniac par rapport au fourrage fané .ces pertes peuvent influx positivement sur la valeur alimentaire des ensilages ( Keles et Dermirci,2011), Prabhat, 2009 montre que l'inoculation de *Lactobacillus buchneri* avec les bactéries lactique homofermentaire permet diminuer la dégradation des protéines et matière sèche; et selon Zang *et al.*,2010 il existe une Co fermentation entre *Lactobacillus buchneri* et *Lactobacillus diolivorans* permet l'accumulation de propionate et acétate au cours l'ensilage qui permet la stabilité aérobie de l'ensilage.

## 2. Les enzymes

Il ya deux principales raisons pour lesquelles l'ajout de fibrolytiques de digestion à l'ensilage (tableau1.7). Ces enzymes peuvent digérer partiellement les parois des cellules végétales (cellulose et hémicellulose) (voir tableau suivant) qui donne les sucres solubles qui pourraient être fermenté par LAB pour abaisser le pH de l'ensilage. (Kung, 1999) et d'augmenter la digestibilité des fibres de fourrage ce qui pourrait conduire a une grande production efficace de lait pour les vaches laitières en début de lactation selon les travaux de Holtshausen *et al.*, 2011.

**Tableau 1.7:** Les principaux enzymes hydrolytiques responsable de la digestion des fibres (Kung, 1999).

Enzyme	Cible	Produit finale
Cellulose	Cellulose	Dextrines,cellubiose,glucose
Hemicellulase (xylanase)	Hémicellulose	Xylans, xylose, arbinose
Amylase	Amidon	Maltose, glucose

En effet, l'efficacité des enzymes est affectée par plusieurs facteurs parmi lesquels :

- 1 Le pH et la température de l'ensilage : les cellulases ont une activité optimale dans des pH de 4.5 et une température de 50°C,

- 2 La teneur en eau,
- 3 L'action des protéines de la plante,
- 4 La composition efficace d'un mélange d'enzymes : par exemple la dégradation de la cellulase demande l'action synergique d'un complexe enzymatique composé d'endo- et d'exo- $\beta$ -glucanases, de cellobiohydrolases et de cellobiases.

Leduc et Fournier (1997) rapportent que les enzymes sont efficaces à 90% dans les graminées, sont peu efficaces dans la luzerne et ont un effet variable dans les ensilages de maïs et de céréales.

### 3. Substrats fermentescibles

En supposant une bonne récolte de fourrage mais la fermentation de l'ensilage (2<sup>ème</sup> phase) peuvent encore être sous-optimale, par manque d'un nombre de bactérie lactique (homofermentaire) ou une quantité faible de glucide ou les deux ensembles. La quantité de glucides solubles dépend de la teneur en matière sèche et le pouvoir tampon du fourrage. Weissbach et Honig 1996 ; cite par (Stefanie *et al.*, 2000 )

La relation entre ces facteurs détailler par l'équation :

$$FC = MS (\%) + 8 SS/PT$$

FC = coefficient de fermentation

MS = la teneur en matière sèche

SS = sucres solubles

PT = pouvoir tampon.

La mélasse était utilisée comme un stimulant de la fermentation. La mélasse est un sous-produit de l'industrie sucrière qui contient 79% de glucides solubles dont 45 à 50% est du saccharose. Elle fournit une source relativement moins chère de glucides fermentescibles pour les bactéries lactiques. Elle est surtout préconisée dans le cas de fourrages à faible teneur en glucides solubles. Le taux d'incorporation est de 18 à 36 kg par tonne de fourrage frais (Kung, 1999).

Dans nombreuses études, la mélasse s'est avérée un additif effectif dans la promotion de la fermentation lactique pour les fourrages à faible teneur en glucides, et inhibe la fermentation des clostridium, la réduction des pertes en matière organique et la déclenche pas l'acidose ruminale selon Oelker *et al.*, 2009.

### 1.8.3.2 Les inhibiteurs de la fermentation

Cette catégorie englobe les conservateurs acides, qui agissent sur l'acidification du milieu. Plusieurs acides sont utilisés dont l'acide formique, l'acide sulfurique (seuls ou mélangés avec 15 à 30% de formol) ou l'acide propionique (El badaoui, 2001).

Ces produits sont généralement utilisés seule ou en mélange telle que benzoate de sodium, sorbate de potassium et nitrite de sodium qui réduit la croissance des germes indésirables et régule l'ensilage par peu des pertes (kinkly et spurndly, 2011) à raison d'augmenter la stabilité aérobie.

L'ajout de propionibacterium après la fermentation (27 % d'humidité) peut réduire le nombre des levures et moisissures (voire les tableaux si dessus) et augmente le taux d'acide propionique par conséquent réduits les pertes grasse a l'activité antifongique des *Propionibacterium. shermanii*; *Propionibacterium. freudenreichii. subsp. shermarii et Propionibacterium .jensenii* (Merry et Davies, 1999).

#### Propionibacterium :

Propionibacterium sont des bactéries intolérantes à l'acidité et se développent lentement, ce qui explique la quantité minime dans l'ensilage (Ranjit *et al.*, 2002).l'application comme additif à pour but améliorer la stabilité aérobie (tableau (1.7)) par la réduction de nombre de levures ;elles sont capables de produire l'acide propionique et l'acide acétique à partir de glucose et l'acide lactique(Arriota *et al.*, 2011). l'inoculation de  $10^6$ UFC/g en plante de maïs entraine la diminution de pH de l'ensilage après 30jours de fermentation (Rowghawi *et al.*,2008). *Propionibacterium acidipropionique* a la capacité de convertir le glycérol en acide propionique (Ranjit *et al.*, 2002).

**Tableau 1.8:** Effet d'un conservateur à base d'acide propionique sur le nombre de levures et d'heures de stabilité à l'air de l'ensilage de maïs.

Traitement, taux d'application	Levures (nombre par gramme)	Stabilité à l'air * (heure)
Témoin	257.000	65
Conservateur, 0,9 kg/tonne	27.000	120
Conservateur, 1,8 kg/tonne	28.000	>160

\*heures avant que la température dépasse 2°C (Kung, 1999)

### 1.8.3.3 Les additives nutritionnelles

L'ammoniac et l'urée constituent les sources d'azote non protéique les plus ajoutées aux ensilages. L'urée est utilisée soit seule soit en mélange avec la mélasse. L'utilisation de ces sources d'azote résulte en (Kung, 1999):

- 1 une addition d'une source économique d'azote,
- 2 une augmentation de la stabilité à l'air de l'ensilage,
- 3 une réduction du développement des moisissures et de la température pendant le processus d'ensilage,
- 4 une baisse de la dégradation des protéines du fourrage.

Le traitement des fourrages à l'ammoniac est utilisé avec une réussite variable, mais un excès peut agir sur la qualité d'ensilage (Fournier ,1998 et Paragon ,2004).

## 1.9 L'ensilage et la santé

Les fourrages et leurs préservation présentent la première étape de la chaîne alimentaire de l'homme, leur qualité affecte la santé des animaux et par conséquent l'homme plusieurs germes pathogènes peuvent présenter dans l'ensilage due à la présence des facteurs qui sont favorable pour eux comme :

- 1 Les germes butyriques qui peuvent produit des toxines et leurs spores peuvent présenter en lait, selon les résultats de Giffel *et al.*, 2002.
- 2 La présence de *E. coli O157:H7* peut être dangereux pour animale et l'homme (Fenlon et Wilson.2000),
- 3 *Listeria monocytogenes* qui peut se développer à pH=5(Weinberg, 2008),
- 4 Les champignons qui produisent des mycotoxine (Bhat *et al.*, 2010) et aussi présence des substrats chimiques tels que Nitrite par l'utilisation des pesticides.

## 1.10 Les céréales comme un substrat pour les bactéries lactiques

Les céréales présentent un bon milieu pour la croissance des microorganismes. Elles incluent une flore microbienne indigène tels que les moisissures, les entérobactéries, les bactéries sporulées, les bactéries lactiques...etc ; tous en concurrence pour les éléments nutritifs, sources de carbones et d'énergie qui est présenté par les polysaccharides.

Le majeur polysaccharide dans les céréales est l'amidon, qui devient disponible pour les microorganismes après l'hydrolyse, le taux de sucres libres dans les grains plein et mature peut être seulement 1-3%, mais même cela permet de lancer un processus de fermentation qui

peut être utilisé comme source de carbone et d'énergie pour les microorganismes dans la fermentation. Dans le cas de seigle la production des sucres libres et d'enzymes amylolytiques sont plus élevés que dans autres céréales, Les enzymes endogènes des céréales, peuvent être utilisées pour décomposer l'amidon en simples sucres fermentescibles, (maltose et du glucose) (Hannus, 2004).

Les céréales contiennent aussi les minéraux, des vitamines, des stérols et autres facteurs de croissance, qui soutiennent la croissance des microorganismes y compris exigeante tel que les bactéries lactiques.

Plusieurs bactéries lactiques amylolytiques (BLA) (Tab1.10) ont été signalées dans les différentes amylocées tropicales, préparées principalement à partir du manioc et des céréales (par exemple, le maïs et le sorgho). Les souches de *Lactobacillus plantarum* ont été isolés à partir du cassava un produit africain fermenté à base de manioc (Nwankwo *et al.*, 1989), et le nouveau ALAB *Lactobacillus manihotivorans* (Morlon-Guyot *et al.*, 1998) a été isolé à partir de la fermentation de l'amidon de manioc fermenté en Colombie. Olympia *et al.*, (1995) caractérisé la souche amylolytique *L. plantarum* isolée à partir burong ISDA, un aliment fermenté à base de poisson et de riz aux Philippines. Les souches amylolytique *Lactobacillus fermentum* ont été isolées pour la première fois au Bénin au levain de maïs Agati *et al.*, (1998). Récemment, Sanni *et al.*, (2002) décrit des souches amylolytique de *L. plantarum* et *L. fermentum* dans diverses produits amylocée fermentée traditionnelle au Nigéria.

Les bactéries lactiques amylolytiques peut fermenter différents types des matières premières d'amylocée, comme le maïs (Nakamura, 1981), la pomme de terre (Chatterjee *et al.*, 1997), ou de manioc (Giraud *et al.*, 1994) et de différents substrats amylocés (Vishnu *et al.*, 2000 et 2002; Naveena *et al.*, 2003 et 2005a,b, c).

BL Amylolytique sont également impliqué dans les aliments fermentés à base de céréales tels que du pain Européenne aigre de seigle, le pain salé d'Asie, aigre bouillies, et la production de boisson non alcoolisée. Peu de bactéries lactiques sont utilisées pour la production d'acide lactique dans la fermentation de l'amidon.

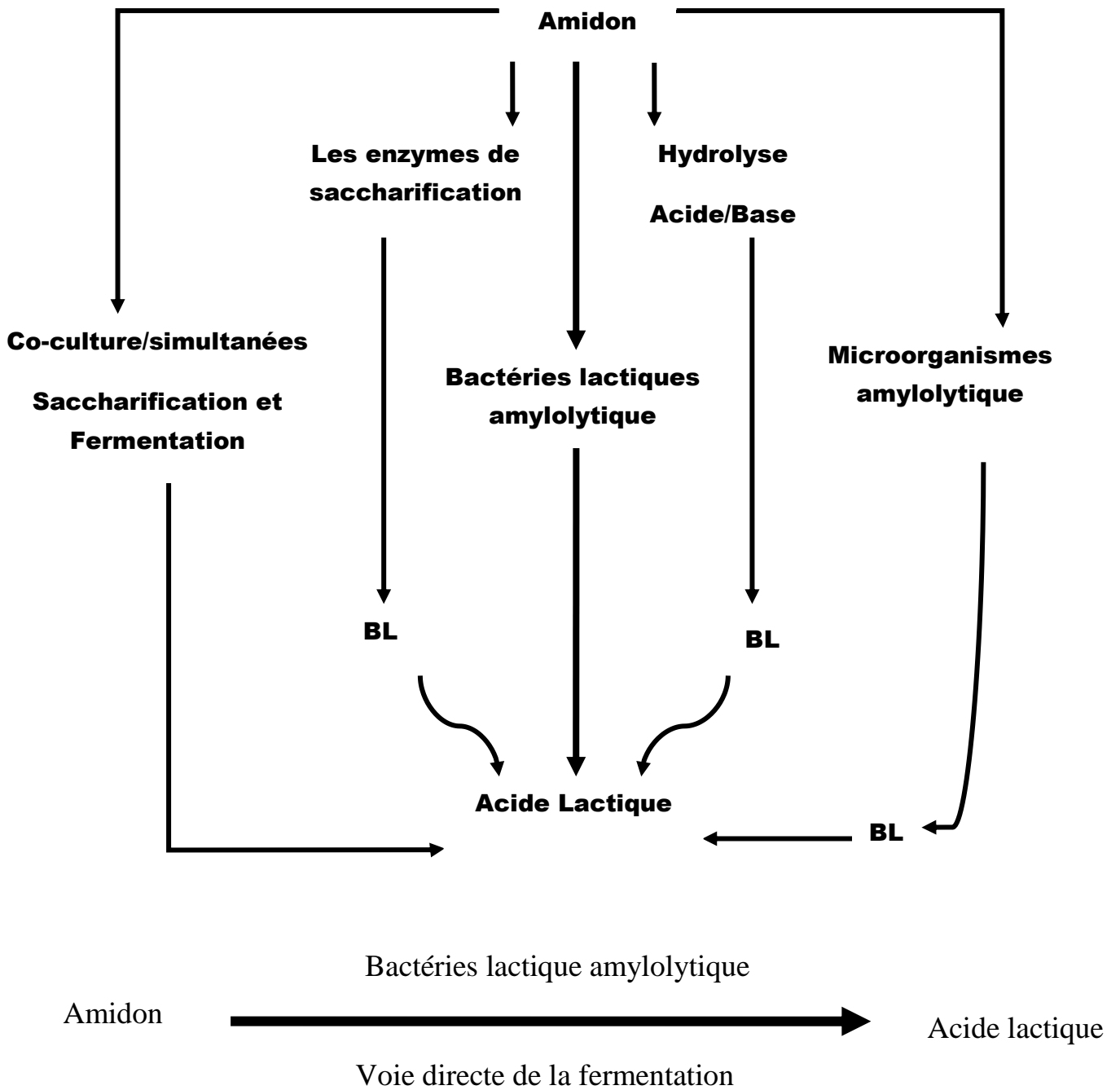


### 1.11 L'utilisation des bactéries lactiques amylolytique en biotechnologie

Environ 3,5 milliards de tonnes des résidus agricoles sont produites par ans dans le monde qui représente une source d'énergie renouvelables potentiellement intéressante basées sur le coût et la disponibilité. Malgré que ces débris sont riches en carbohydrates leur utilisation est limitée (Pandey *et al.*, 2001).

Dans l'échelle commerciale l'utilisation d'une source de carbone moins cher, tels que l'amidon qui est un substrat brut le plus abondent et disponible dans la nature à côté de la cellulose et d'autre part le glucose est un alternatif coûteux.

Généralement la production biotechnologique de l'acide lactique à partir de matières amylacées, nécessite un prétraitement pour la gélatinisation et la liquéfaction, qui est effectuée à des températures élevées de 90-130 ° C pendant 15 min, puis par saccharification enzymatique dans le résultat est le glucose qui va être convertir en l'acide lactique par la fermentation (Anuradha *et al.*, 1999). L'utilisation de l'amidon brut ou polysaccharide renouvelables en combinaison avec les bactéries lactiques amylolytique en deux étapes saccharification et fermentation, peuvent aider à diminuer le coût de l'ensemble de procédé de fermentation, comme illustre la figure (1.7).



**Figure 1.8 :** La conversion de l'amidon en acide lactique par la voie direct et indirecte de la fermentation (Reddy *et al.*, 2009).

Nombreux bactéries inclus *Lactobacillus* et *Lactococcus* ont été employée avec succès pour la production de l'acide lactique à partir de matières premières qui contient de l'amidon (Cheng *et al.*, 1991;. Naveena *et al.*, 2005).

**Tableau 1. 8:** Les bactéries lactiques amylolytiques. (Reddy *et al.*, 2009)

Espèces bactérienne	Code	Espèces bactérienne	Code
<i>L. manihotivorans</i> <i>L. manihotivorans</i>	<b>OND32T</b> <b>LMG18010T</b> <b>LMG1801I</b>	<i>L. acidophilus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. plantarum</i>	<b>L9</b> <b>A6</b> <b>LMG18053</b> <b>NCIM 2084</b>
<i>L. fermentum</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. fermentum</i>	<b>OgiEI</b> <b>MW2</b> <b>K9</b>	<i>S. bovis</i> <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Leuconostoc</i> <i>L. cellobiosus</i> <i>Lactobacillus</i> strains <i>Leuconostoc</i> strains <i>S. macedonicus</i> <i>L. amylolyticus</i>	<b>148</b> <b>TH 165</b> <b>St3-28</b> <b>LEM 220,207,202</b>
<i>L. amylovorus</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. amylovorus</i>	<b>ATCC33622</b> <b>B-4542</b>		
<i>L. amylophilus</i> <i>L. amylophilus</i> <i>L. amylophilus</i>	<b>JCIM 1125</b> <b>B 4437</b> <b>GV6</b>		

L'utilisation efficace des bactéries lactiques amylolytiques permettra d'éliminer la saccharification, ce qui conduit à la réduction des coûts de substrat et le rendement élevée (Vickroy, 1985; Yumoto et Ikeda, 1995; Litchfield, 1996). En ce sens, une seule fermentation acide lactique par une étape amylolytique bactérie *L. amylophilus* GV6 à haute efficacité de la production (Vishnu *et al.*, 1998; Naveena *et al.*, 2005 ; Altaf *et al.*, 2007).

### 1.11.1 La production de l'acide lactique par les BLA

*L. amylophilus* GV6 est la bactérie lactique amylolytique la plus largement étudiée en raison de sa haute capacité de production d'acide lactique. Elle fermente efficacement les différents substrats amyloacés avec différents concentrations, et le rendement d'acide lactique approche toujours à 90% (Vishnu *et al.*, 2000, 2002; Altaf *et al.*, 2005et 2007).

Junya Narita *et al.*, (2004) ont montré que *S. bovis* 148 produit directement de l'acide lactique à partir l'amidon et la concentration maximale de l'acide lactique est 14,2 g / l .

*L. manihotivorans* LMG18011 étudiée pour sa capacité de saccharification simultanée et la fermentation de l'amidon soluble, a partir de 200 g des déchets alimentaires la souche produit 19,5 g de L (+)-acide lactique (Ohkouchi et Inoue, 2006).

*L. plantarum* produit juste 0,81 g / g de lactate (Giraud *et al.*, 1994). *Lactobacillus cellobiosus* produit l'acide lactique par fermentation directe des déchets de pomme de terre (Chatterjee *et al.*, 1997).

### 1.11.2 Les enzymes amylolytiques produits par les Bactéries lactiques

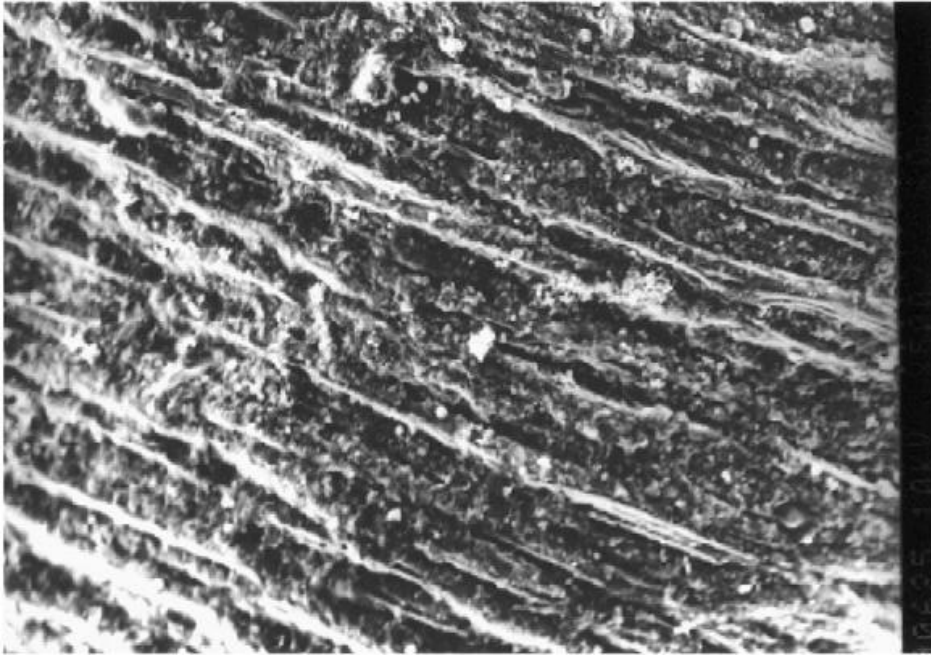
Les sucres raffinés ou gélatinisés sont généralement utilisés pour la production de l'acide lactique par la fermentation microbienne qui est une caractéristique de l'activité amylolytique de ces microorganismes.

La présence à la fois l'amylase et de la pullulanase caractéristiques la fermentation de *L. amylophilus* GV6 qui est efficace pour la conversion directe de substrats amylicés en l'acide lactique. Cette activité amylolytique a été évaluée par l'estimation de la production de la quantité des enzymes extracellulaires amylolytiques (amylase et pullulanase) (Naveena, 2004; Vishnu *et al.*, 2006). Ces enzymes amylolytiques de *L. amylophilus* GV6 ayant à la fois une activité d'amylase et de pullulanase qui est une protéine de 90 kDa caractérisée par Vishnu *et al.*, (2006). L'activité d'amylase et l'activité spécifique de pullulanase étaient de 0.439 U / g / min et 0,18 U / g / min respectivement dans le son de blé (Naveena, 2004).

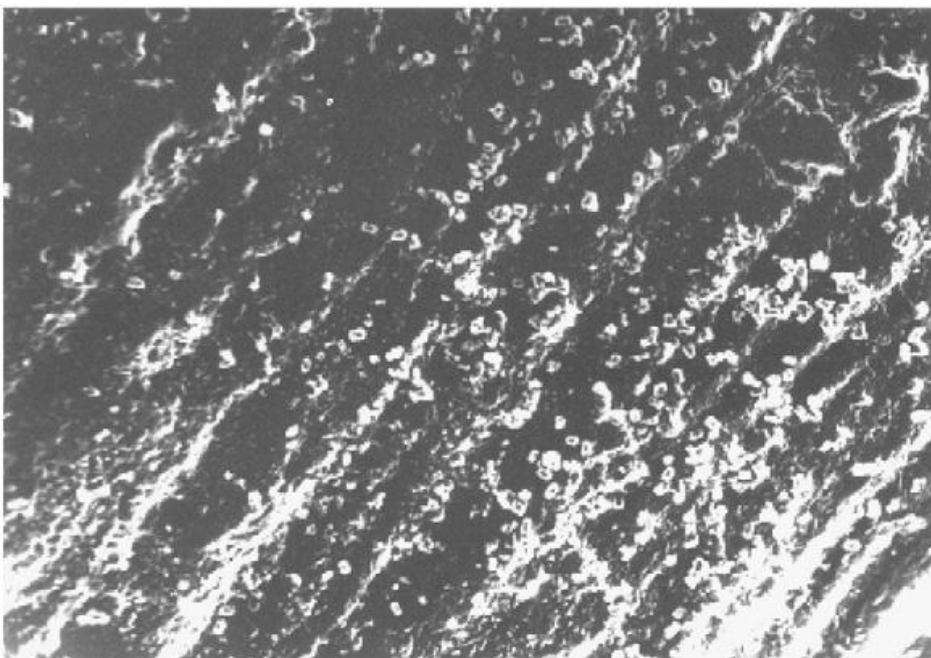
A partir de la photographies au MEB (figures (1.8) et (1.9)) montrant que *L. amylophilus* GV6 hydrolyse de l'amidon des fibres dans le son de blé à sucres en L (+) acide lactique (Vishnu *et al.*, 2000; Naveena *et al.*, 2005c). La souche GV6 montrée à la fois une activités l'amylase et pullulanase de 0,59 et 0,34 U / ml / min en fermentation submergée D'où le maximum d'activité amylolytique a été observée avec le suivie l'amylopectine par l'amidon soluble (Vishnu *et al.*, 2006).

L'activité d'alpha-amylase de *Streptococcus bovis* est plus élevée en présence de l'amidon brut (1,41 U / ml) que celle de glucose (0,06 U / ml) (Junya Narita *et al.*, 2004).

La souche de *L. fermentum* OGi E1 peu croître et produire des amylases à partir : amidon, le maltose, le glucose, le saccharose, le fructose, mais aussi à partir du composé de céréales et légumes qui sont riche en sucres. Peu de bactéries lactiques amylolytiques sont étudiées pour leur enzyme amylolytique.



**Figure 1.9 :** Photo au microscope électronique à balayage(MEB) du son de blé fermenté par *Lactobacillus amylophilus* GV6 (amidon-cellulose) (Naveena *et al.*, 2005a,b,c).



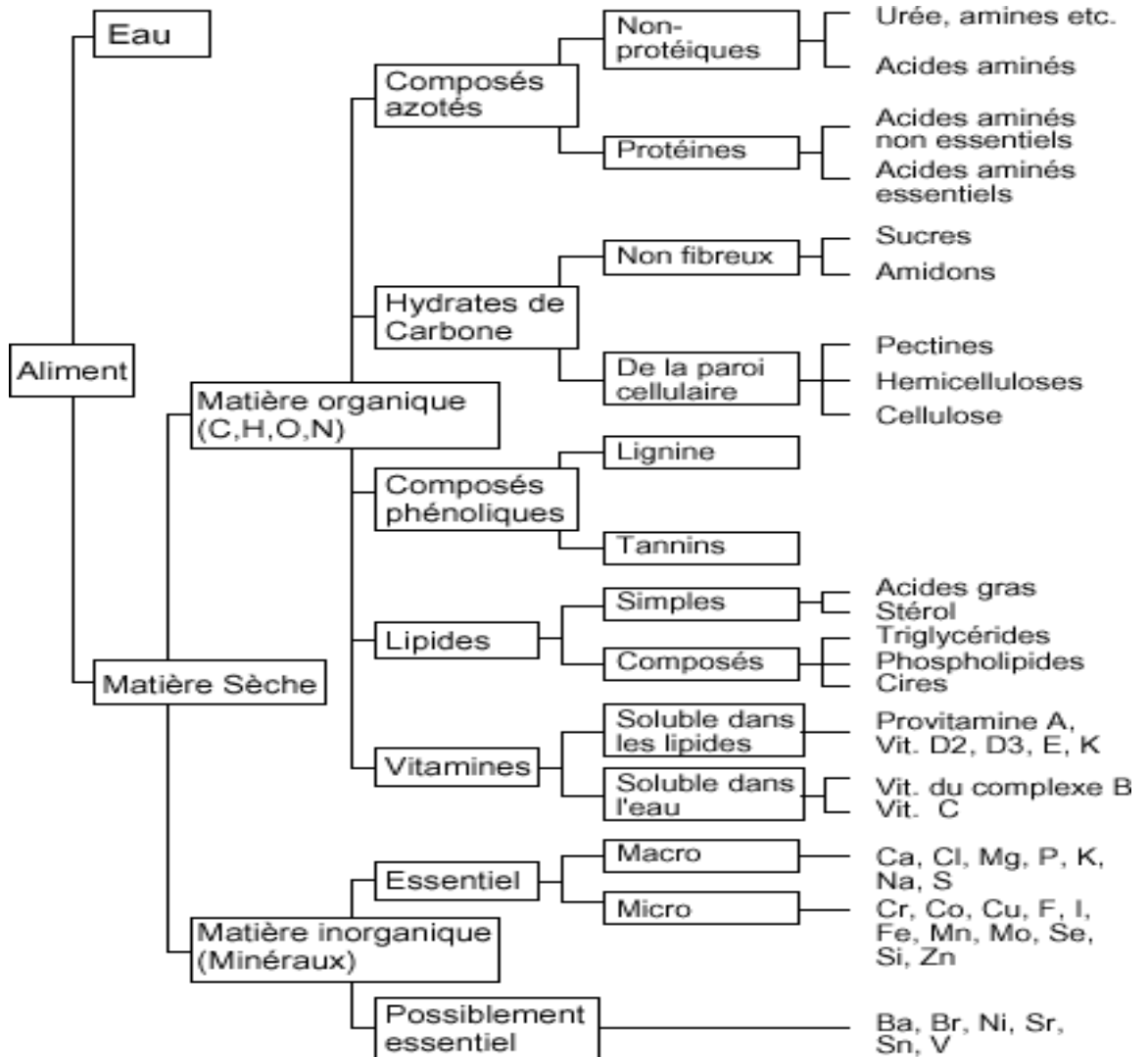
**Figure 1.10 :** Photo au (MEB) du son de blé fermenté avec *Lactobacillus amylophilus* GV6 (montrant l'hydrolyse de l'amidon dans les fibres) (Naveena *et al.*, 2005a)

## **1.12 L'importance de dégradation des macromolécules des aliments**

Bien que l'économie d'élevage occupe une place prépondérante dans la pratique agricole et absorbe un financement important sous forme de subventions, les viandes et le lait constituent une partie importante dans le système alimentaire dans le monde (Lourme, 2004).

La richesse d'un aliment en substance nutritives sert pour le maintien de la croissance, la production, la reproduction et la santé de l'animal. Il y a cinq catégories de substances nutritives: Eau ; Energie (hydrates de carbone, protéines, lipides) ; provenant des fibres (celluloses) ; provenant des sucres de réserves (amidons) ; Protéines (composés azotés) ; Minéraux ; Vitamines.

En outre., les fourrages sont, des aliments riches en fibres qui sont essentielles pour la santé de l'animal. Par contre, les concentrés sont en général riches en énergie provenant des sucres de réserves mais pauvres en fibres (Lourme, 2004). Certaines de ces substances ont des structures complexes qui sont indigestibles (par exemple, la lignine, les tannins) et elles peuvent interférer avec la digestion de certaines substances nutritives (Figure1.10).



**Figure 1.11:** Composition chimique d'un aliment d'origine végétal et l'analyse de ces constituants.

### 1.13 Les principaux usages des enzymes microbiens

Les enzymes microbiens ont une action spécifique sur certains composés tel que : amidon ; cellulose pectine hémicellulose... Elles permettent la transformation rapide et efficace de ceux-ci aux éléments simple à des températures convenable (Tableau 1.11)

**Tableau 1.9** : Utilisation des différents types d'enzymes dans les différentes denrées de l'industrie agroalimentaire (Louarme, 2004).

<i>Enzymes industrielles</i>	
Amylases	<p><i>Action</i> : (hydrolyse de l'amidon en sucres solubles)</p> <p><i>Sources</i> : <i>Aspergillus oryzae</i> (moisissure), <i>Bacillus subtilis</i> (bactérie)</p> <p><i>Usages</i> : Améliorer la fermentation (pain, bière) Clarifier les jus de fruits et de légumes...</p>
Invertase	<p><i>Action</i> : hydrolyse le saccharose en glucose et fructose</p> <p><i>Sources</i> : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levure), <i>Candida utilis</i></p> <p><i>Usages</i> : Réduire la cristallisation dans les sirops. Produire du sucre inverti</p>
Lactase ( $\beta$ -Galactosidase) ( $\alpha$ -galactosidase)	<p><i>Action</i> : hydrolyse le lactose en glucose et galactose</p> <p><i>Sources</i> : <i>Aspergillus niger</i> (moisissure), <i>Kluyveromyces fragilis</i> (levure) <i>Candida</i></p> <p><i>Usages</i> : Faire disparaître le lactose dans les produits laitiers</p>
Glucose isomérase	<p><i>Action</i> : conversion du glucose en fructose</p> <p><i>Sources</i> : <i>Streptomyces</i>, <i>Bacillus coagulans</i>, <i>Arthrobacter</i></p> <p><i>Usages</i> : Produire du sirop de maïs à teneur élevée en fructose</p>
Glucose oxydase	<p><i>Action</i> : transformation du glucose en acide gluconique</p> <p><i>Sources</i> : <i>Aspergillus niger</i>, <i>Penicillium</i></p> <p><i>Usages</i> : Éliminer le glucose dans les œufs déshydratés</p>
Pectinases	<p><i>Action</i> : hydrolyse de la pectine</p> <p><i>Sources</i> : <i>Aspergillus niger</i> (moisissure) <i>Rhizopus oryzae</i>, <i>Penicillium</i></p> <p><i>Usages</i> : Clarifier le vin ou le jus de fruits et de légumes Empêcher la gélification</p>
Cellulase	<p><i>Action</i> : hydrolyse de la cellulose en sucres</p> <p><i>Sources</i> : <i>Trichoderma viride</i> (moisissure), <i>Aspergillus niger</i> (moisissure)</p> <p><i>Usages</i> : Clarifier les jus de fruits, Produire davantage de sucres fermentescibles</p>
Lipases	<p><i>Action</i> : hydrolyse les lipides en acides gras et glycérides</p> <p><i>Sources</i> : <i>Saccharomycopsis lipolytica</i> (levure), <i>Aspergillus niger</i> (moisissure), <i>Penicillium roqueforti</i>, <i>Rhizopus</i>, <i>Candida lipolytica</i></p> <p><i>Usages</i> : Produire davantage de composés d'arômes dans les fromages et autres produits laitiers</p>
Enzymes protéolytiques (Proteases)	<p><i>Action</i> : hydrolyse des protéines en acides aminés</p> <p><i>Sources</i> : <i>Aspergillus oryzae</i> (moisissure), <i>Bacillus subtilis</i> (bactérie)</p> <p><i>Usages</i> : Améliorer la texture de la pâte à pain. Stabiliser la bière</p>



Au cours des fermentations alimentaires, ce sont les multiples enzymes des cellules microbiennes qui provoquent les modifications pour les macromolécules complexes. Il est également possible de faire intervenir des enzymes seules, en l'absence de toute cellule vivante. Ces enzymes jouent plusieurs rôles dans les productions alimentaires industrielles tel que :

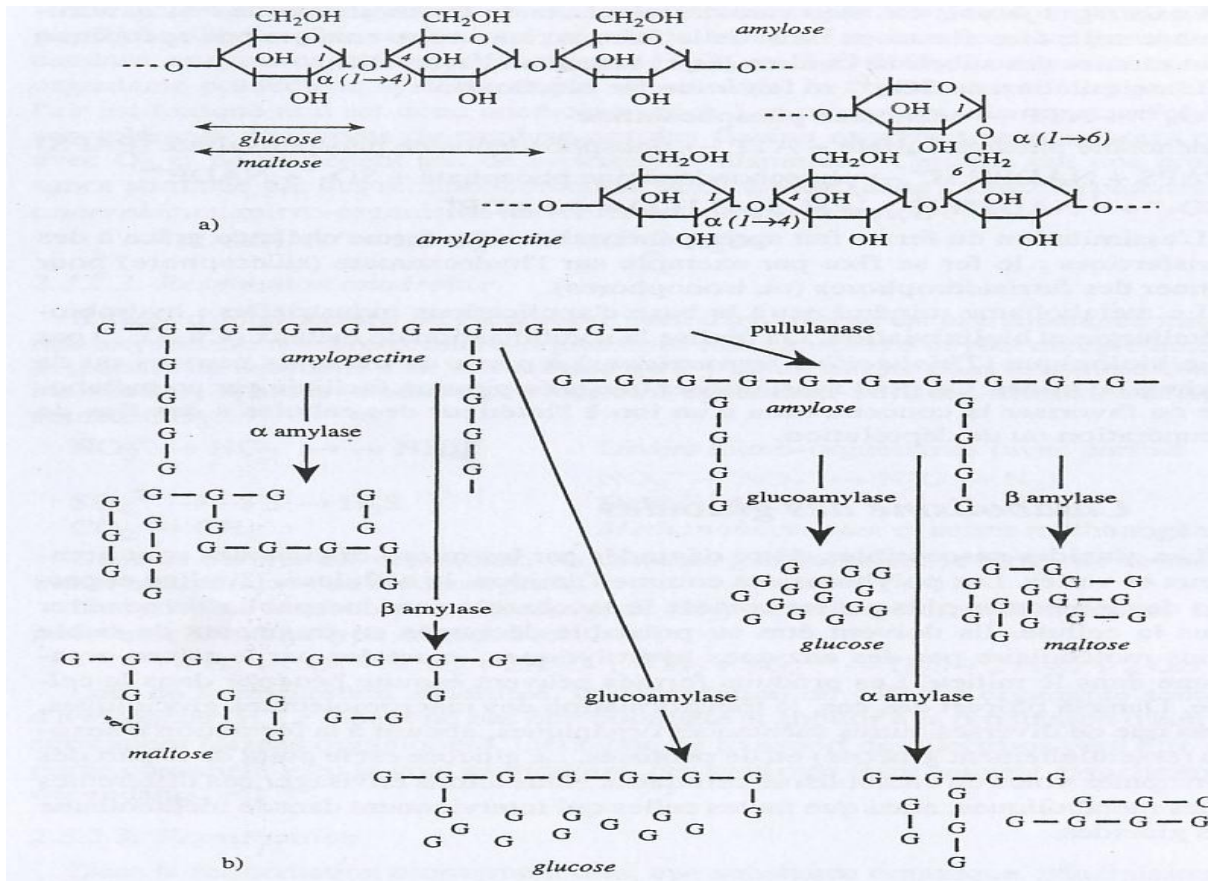
**Les amylases** (a-amylase, 6-amylase, amyloglucosidase et a-glucosidase ou maltase) hydrolysent l'amidon en sucres solubles. Elles peuvent être produites en quantité importante par des moisissures (comme *Aspergillus niger*) et des bactéries (comme *Bacillus subtilis*). Les amylases bactériennes, à l'inverse des amylases fongiques, sont thermorésistantes mais rapidement inactivées en pH acide.

Les principaux usages des amylases sont :

- Élimination de l'amidon dans les jus et les extraits de fruits, ce qui les clarifie et facilite leur filtration
- Conversion de l'amidon de céréales en sirops de sucres (tel le sirop de maïs) figure 1.11.
- Accélération de la levée de la pâte à pain.
- Saccharification de l'amidon de céréales (en complément ou en remplacement des amylases du malt d'orge) avant la fermentation alcoolique durant la fabrication de la bière.

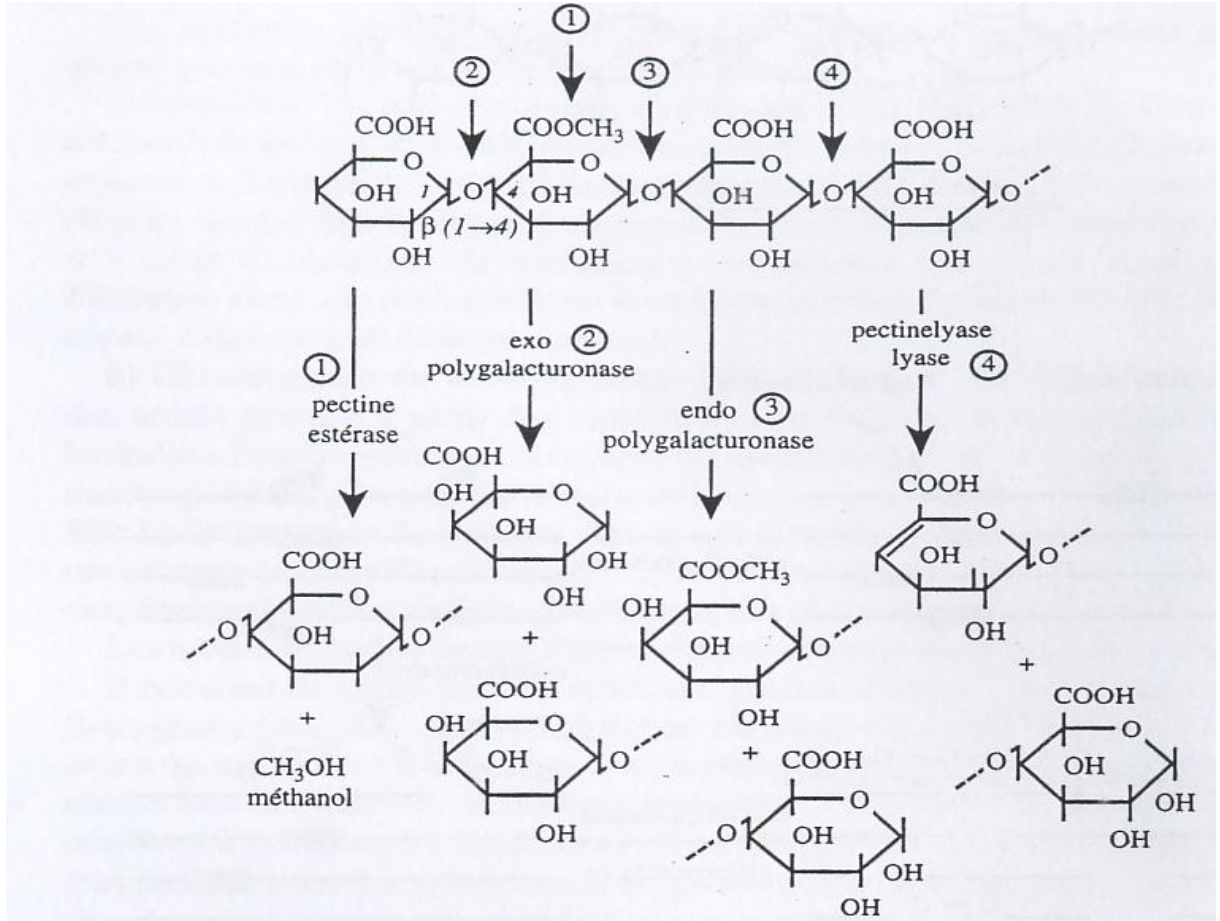
**La bêta-galactosidase** hydrolyse le lactose en glucose et galactose. Elle est produite par certaines levures et moisissures, comme *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus oryzae*. L'enzyme peut être utilisée pour enlever le lactose du lait, ce qui le rend plus digestible pour les personnes souffrant d'intolérance au lactose.

**L'alpha-galactosidase** est une enzyme qui hydrolyse les glucides complexes ou oligosaccharides (raffinose, stachyose et verbascose) contenus dans plusieurs légumes (fèves, haricots, pois, soja, choux...) en sucres simples facilement assimilables. Ces oligosaccharides, qui ne sont pas digérés par nos sucs digestifs mais fermentés par la flore intestinale, sont à l'origine de problèmes de flatulence.



**Figure 1.11:** Activité amylytiques. a) structure d'amylose et amylopectine ; b) mode d'attaque des amylases sur l'amylose et amylopectine (Kihal, 1986).

Les **pectinases** produites par des moisissures (principalement *Aspergillus niger* et *Rhizopus oryzae*) permettent l'hydrolyser la pectine des fruits qui aide à l'extraction du jus.



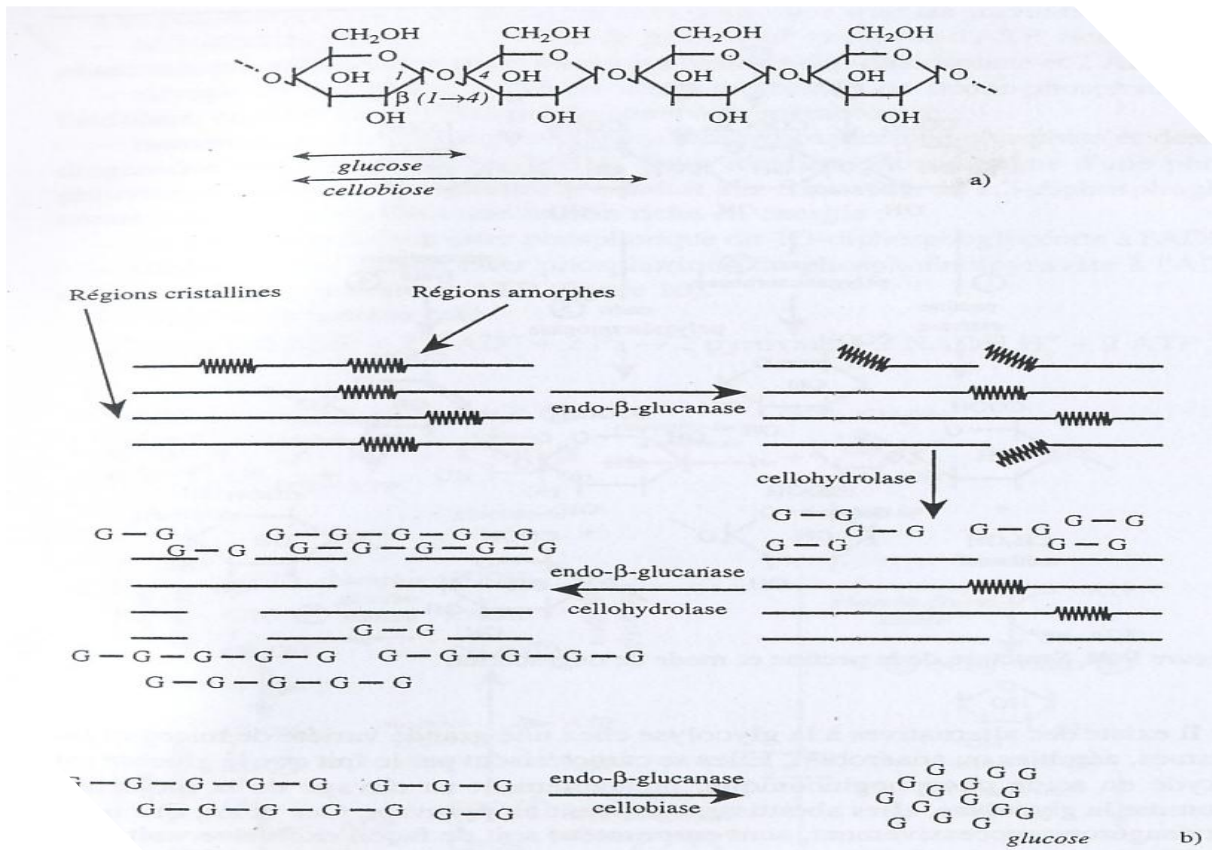
**Figure1. 12:** Structure de la pectine et mode de dégradation (Kihal, 1986).

La **cellulase** permet de dégrader la cellulose en sucres solubles. Elle est produite par différentes espèces de mycètes comme *Myrothecium verrucaria*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Stachybothrys atra*, etc.

Cette enzyme permet de produire davantage de sucres fermentes-cibles dans le moût de brasserie. Elle aide également à clarifier les jus de fruits.

La carboxyméthylcellulose (CMC) qu'on peut considérer comme un acide faible est très largement utilisée dans le secteur de la boulangerie pâtisserie pour améliorer le moelleux des préparations et diminuer le phénomène de rassissement. Dans le secteur de la

confiserie et des crèmes glacées la CMC est utilisée pour le contrôle de la cristallisation des saccharides. Dans le secteur des produits laitiers la CMC permet d'obtenir une structure visqueuse et évite les phénomènes de synérèse des produits gélifiés. Enfin la CMC est utilisée pour stabiliser les émulsions.



**Figure 1.13 :** Activités cellulolytiques, a) structure de la cellulose ; b) représentation schématique des étapes séquentielles de la cellulolyse (Kihal,1986).

## Conclusion:

On conclusion, cette revue bibliographique montre l'intérêt de l'ensilage dans l'alimentation des bétails et l'importance des bactéries lactiques naturellement présentes dans le fourrage pour l'amélioration de la qualité nutritionnelle de l'ensilage et aussi la bio-préservation des fourrages par la stabilité anaérobie et aérobie ; cette stabilité est due par l'hydrolyse des macromolécules en élément simple qui représente une source d'énergie pour les bactéries lactiques.

Il est indispensable d'étudier et identifier les différentes bactéries lactiques actives qui peuvent être présentes dans l'ensilage.

# *Matériels & Méthodes*



## Chapitre 2

### Matériels et Méthodes

#### 2.1 Choix d'échantillon

L'étude de notre travail a été réalisée sur l'ensilage de sorgho ; puisqu'il est caractérisé par plusieurs critères qui représente une bonne source d'alimentation de point de vue qualité et quantité Selon Institut Technique des Elevages de LAMTAR ; Wilaya de Sidi-Bel-Abbès (2011):

- Fourrage énergétique,
- Bonne conservation de l'ensilage,
- Bonne résistance aux maladies,
- Rendement : 70 tonnes de matière verte,
- Besoins en eau de 480mm, c'est 30% de moins que le maïs,
- Bonne tolérance au stress hydrique et à la salinité.



**Figure 2.1** : Site de prélèvement des échantillons de sorgho.

## 2.2 Site d'étude et échantillonnage

Dans ce travail, huit échantillons de fourrage de sorgho (*Sorghum bicolor*) ont été récoltés au niveau des fermes situées à la région d'Es-senia, Oran, Algérie. La récolte a été faite le mois de Septembre et le mois de Juin, 2011.

**Tableau 2.1** : Nombre des échantillons de l'ensilage de sorgho prélevé au niveau d'Es-senia, Oran, Algérie.

Fourrage	Durée d'ensilage	Région de la récolte
Sorgho <i>(Sorghum bicolor)</i>	2 jours	Es-senia, Oran, Algérie.
	5 jours	
	8 jours	
	10 jours	
	18 jours	
	28 jours	
	90 jours	
	6 mois	

## 2.3 Préparation de l'ensilage

L'ensilage a été préparée au laboratoire selon la méthode décrite par Filya *et al.*, (2004) ; Herman *et al.*, (2011). L'ensilage de sorgho a été récolté à la main et haché avec un couteau environ 1-5cm, et ensilé dans des micro-silos (bouteilles de sérum) de 500 ml. Chaque une est rempli environ 170g et laisser à la température de laboratoire et d'autre à l'incubateur à 30° C jusqu'à le jour d'analyse.

## 2.4 Test biochimique

10 g d'ensilage a été homogénéisé pendant 5 minutes avec 90 ml d'eau distillée, puis on mesure le pH de l'eau filtrée par un pH-mètre (Xing *et al.*, 2009). La matière sèche a été déterminée par séchage au four pendant 48 h à 60 ° C (Weinberg *et al.*, 1995).

## 2.5 Analyse microbiologique

### 2.5.1 Dénombrement de la flore total et la flore lactique

Afin de dénombrer la flore totale et la flore lactique à partir de différents stades de l'ensilage, un gramme de l'ensilage été homogénéisé avec 9ml de l'eau physiologique stérile à l'aide d'un mixeur pendant 60 sec afin d'obtenir une bonne homogénéisation. Des dilutions décimales allant de  $10^{-2}$  à  $10^{-8}$  ont été effectuées, un ml de chaque dilution a été prélevé et coulé sur boites de Pétri contenant le milieu PCA pour le dénombrement de la flore totale, et sur milieu MRS (De Man *et al.*, 1960) pour la flore lactique, Les boites sont incubées à 30 °C pendant 24 à 48 h Les boites ayant un nombre de colonies compris entre 25 et 250 ont retenues.

### 2.5.2 Isolement, purification et identification de la flore lactique

Huit à dix colonies de chaque boite de milieu MRS ont été sélectionnées et purifiées par stries et par repiquages successifs sur milieu MRS, confirmé par l'observation macroscopique (l'aspect, la forme et la couleur des colonies) et microscopique par la coloration de Gram (Gram positive- négative, la forme des cellules, mode d'association)

Pour la présélection tous les isolats qui sont Gram positive et catalase négative ont été présumées d'être des bactéries lactiques est conservées par deux méthodes ;

- ❖ pour une courte durée les souches sont ensemencées sur MRS incliné en tube. Ces cultures sont conservées à 4 °C. Les repiquages se font toutes les quatre semaines (Saidi *et al.*, 2002).
- ❖ Et pour la conservation à longue durée, des cultures jeunes de 18 h ont été centrifugées à 4000 t/min pendant 10min, une fois centrifugée le surnageant éliminé ,le culot contenant les cellules bactériennes est mélangé avec le lait glycérolé enrichie avec l'extrait de levure (30% de glycérol est ajoutée + 0,3 extrait de levure) le mélange a été déposée au congélateur à -20°C (Badis *et al.*, 2005).



Les souches conservées seront davantage examinées pour les identifier.

### **2.5.3 Identifications phénotypiques des isolats**

Pour la détermination des propriétés phénotypiques des isolats ; plusieurs test ont été réalisée baser sur :

### **2.5.4 Caractérisation morphologique (macroscopique et microscopique)**

Après purification, les isolats ont été examinées suivant l'aspect macroscopique des colonies (Colonies blanches, rondes, lenticulaires, lisses arrondies, grisâtres ou blanchâtres ou petites colonies blanches à centre marron et bombées) ; à partir des boites contenant entre 25 et 250 colonies de milieu MRS, les isolats étaient examinés pour leur morphologie (bacille, cocci), et coloration de Gram (positive, négative).

### **2.5.5 Test physiologiques**

#### **2.5.5.1 Influence de la température**

Ce test est évalué sur milieu MRS liquide à des différentes températures de 15 ° C pendant 14 jours et 37 et 45 ° C pendant 2 jours est évaluée par un trouble en milieu (Pang *et al.*, 2011).

#### **2.5.5.2 Tolérance à la salinité**

Ce test a pour but de voir la capacité de croître dans différentes concentrations de NaCl: 3, 4 et 6,5% pendant 2 jours sur bouillon MRS, la croissance bactérienne été évaluée par un trouble en milieu (Badis *et al.*, 2004 ; Kihal *et al.*, 2006 ; Bendimerad *et al.*, 2012).

#### **2.5.5.3 Tolérance au pH**

Le test été faite pour la tolérance des isolats à différents pH 4 et 9,6 pendant 7 jours sur bouillon MRS.

#### **2.5.5.4 Recherche de type fermentaire**

Pour savoir le type fermentaire de nos isolats (hétérofermentaire ou homofermentaires), l'utilisation du milieu MRS glucose qui contient une cloche de Durham (pour mettre en évidence la production du CO<sub>2</sub>) ; l'accumulation de gaz dans la cloche affirme que notre isolat été hétérofermentaire.

## **2.5.6 Test biochimique**

### **2.5.6.1 Test de la catalase**

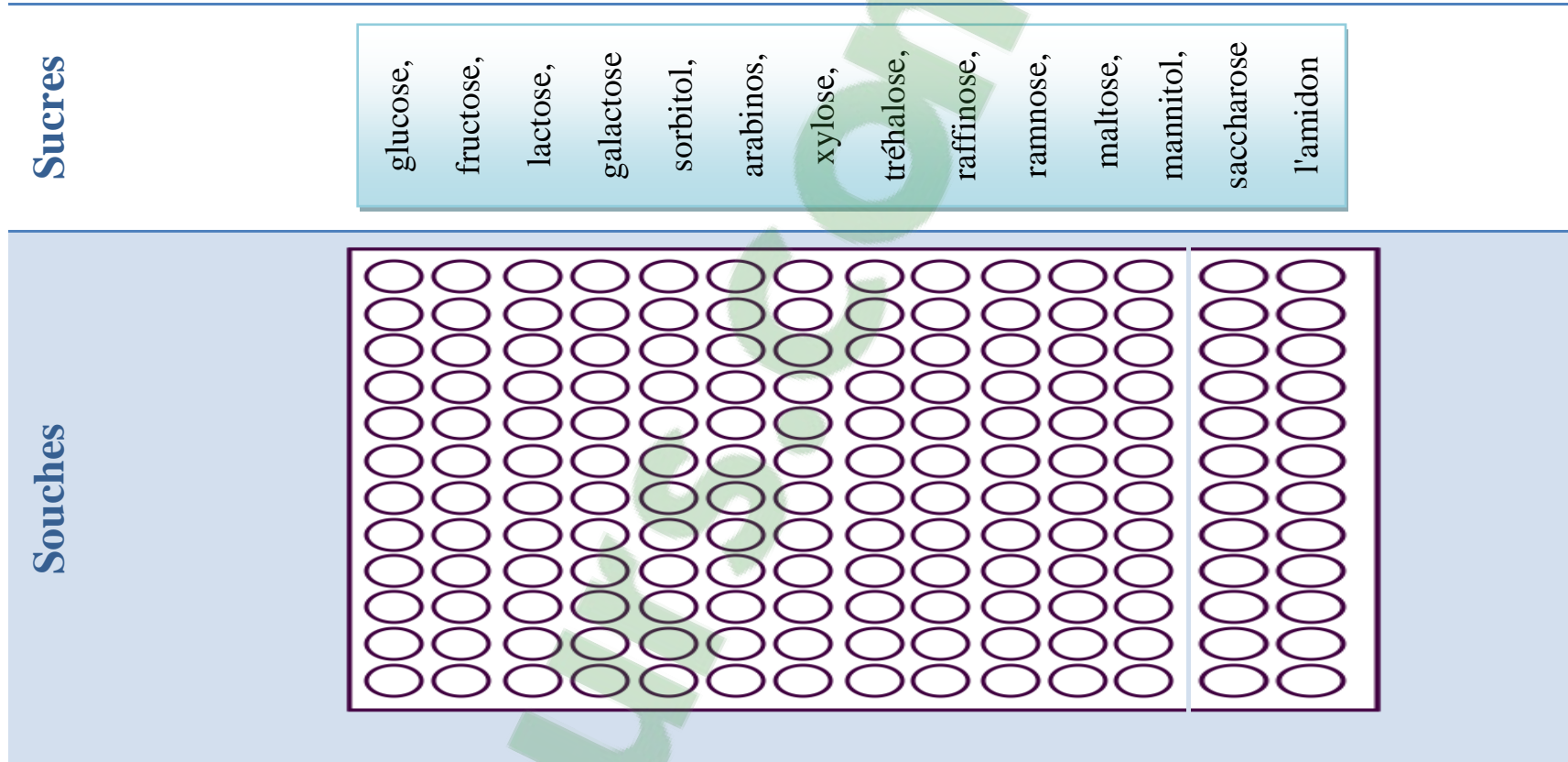
La recherche de la catalase été faite par un contacte directe d'une colonie bien isolée avec une goutte d'eau oxygéné sur une lame propre. Un dégagement gazeux sous forme des bulles d'air signifié la décomposition de l'eau oxygéné sous l'action de la catalase (Guiraud, 1998).

### **2.5.6.2 Profil fermentaire**

L'identification des espèces a été réalisées par la fermentation des hydrates de carbone ajoutée au milieu MRS liquide (sans extrait de viande) contenant du pourpre de bromocrésol (0,04 g / l) comme indicateur de pH. Les sources de carbone sont ajoutés au milieu à 1% (p / v) en tant que concentration finale.

Les hydrates de carbones utilisés étaient les suivants: glucose, fructose, lactose, le galactose, le sorbitol, l'arabinose, le xylose, le tréhalose, le raffinose, le rhamnose, le maltose, le mannitol, le saccharose, l'amidon et l'esculine. Une plaque d'Elisa été utilisée pour ses puits ; les puits de chaque ligne contiendront une source de carbone qui sera utilisée par différentes souches (figure 2). Chaque puits a été complété avec une goutte de l'huile de paraffine stérile avant l'inoculation pour assurer les conditions anaérobies.

L'utilisation de galerie Staph 20I et Api 50ch été utilisés pour quelque isolats pour la confirmation d'identification au niveau de l'espèce.



**Figure 2.2 :** Schéma représente l'utilisation de la plaque d'Elisa pour effectuer le profil fermentaire des souches

### **2.5.6.3 Production de dextrane**

Ce test été considéré comme clé d'identification permettant ainsi de différencier entre les *Leuconostoc* productrices et non productrice de dextrane. La production de dextrane à partir du saccharose a été mis en évidence sur milieu solide MSE (Mayeux et al., 1962). Les souches productrices de dextrane ont été caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes.

### **2.5.6.4 Hydrolyse de l'arginine**

La recherche de l'arginine di-hydrolase (ADH) a été recherchée sur milieu M16 BCP. L'hydrolyse de l'arginine par les isolats peuvent acidifie le milieu, les colonies donnant ainsi une coloration jaunâtre du milieu grâce à la présence d'indicateur de pH (BCP). D'autres bactéries lactiques sont capables d'utiliser l'arginine et ré-alcalinisent le milieu, leurs colonies apparaissent blanchâtres sur fond violet (Thomas, 1973).

### **2.5.6.5 Utilisation du citrate**

L'utilisation du citrate a été étudiée sur milieu Kempler et Mc Kay (1980). Après incubations pendant 24 jusqu' à 48h les isolats qui ont été fermentées le citrate forme des colonies bleues ou ayant un centre bleu, les colonies incapables de fermentées le citrate restent blanches. Ce milieu contient une solution de ferrocyanure 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 ferrocyanide.

### **2.5.6.6 Production de composés aromatiques**

Les isolats ont été cultivés sur Clark et Lubs (Fil, 1996) à 24 h, la production de l'acétoïne a été testée sur milieu, par la réaction de Vogues-Proskauer. Dans un tube à hémolyse, 2 ml de la culture ont été transvasés, 0,5 ml d'une solution de réactif (VP<sub>1</sub>) et 0,5 ml de (VP<sub>2</sub>). On agitant soigneusement les tubes et on laisse au repos 5 à 10 min à température ambiante. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu.

## 2.6 Etude des propriétés technologiques des isolats

Cette étude a été basée sur la dégradation des isolats des macromolécules (protéines, la cellulose et l'amidon) dans l'ensilage de sorgho:

### 2.6.1 L'activité protéolytique

A partir d'une pré culture bactérienne en milieu MRS (18h), les souches ont été ensemencées en touche sur milieu agar-lait est composé de gélose additionnée stérilement de 0.5% de lait reconstitué .Après incubation à 37°C pendant 48h, les boîtes sont placées à 4°C pendant 3 jours pour révéler l'activité protéolytique par la présence d'une zone d'hydrolyse autour des colonies (Fransen *et al.*, 1997).

### 2.6.2 Protéolyse de la gélatine

Les souches ont été ensemencées par piqûre centrale dans des tubes de milieu gélatine, puis laissés à la température ambiante du laboratoire (25°C). L'absence de tout changement permet de conclure que les souches sont gélatinase négative (Huggins et Sandine, 1984).

### 2.6.3 L'activité amylasique

A partir d'une pré-culture de 18h, les isolats ont été ensemencés par touche sur le milieu MRSA (en remplaçant 10g de Lactose par 20g d'amidon soluble) (Brabet *et al.*, 1996). Après l'incubation à 30°C pendant 48h les colonies ont été exposées à une vapeur iodée. L'activité amylasique a été révélée par la présence d'une zone claire autour des colonies (Thapa *et al.*, 2006).

### 2.6.4 La production des polysaccharides

La production des exo-polysaccharides a été évaluée tel que rapporté par Mora *et al.*,(2002); les pré-cultures ont été étalées sur la surface des boîtes contenant le milieu lait ruthénium, après incubation à 30°C pendant 24h-48h, les colonies qui apparaissent rouges, considérées comme souche non visqueuse et les colonies qui apparaissent blanches considérées comme souche visqueuse productrice d'exo-polysaccharides.

### **2.6.5 Confirmation de la production des Exo-polysaccharides**

Une pré-culture de 18h a été cultivé sur milieu MRS saccharose à 5% à pH5 pendant 24h à 30°C, après centrifugation à 4600 rpm durant 30min (4°C) ; 1 ml de l'éthanol brute de 96° a été mélangé avec 1ml de surnageant, la présence des polysaccharides a été révélée par la présence d'un anneau blanc (Lingani *et al.*, 2010).

### **2.6.6 L'activité Cellulolytique**

Ce test a été vérifié par l'ensemencement d'une pré-culture de 18h par touche sur le milieu de Dubois qui est un milieu minéral additionné avec 10% d'extrait de levure et 5% de cellulose. Les boites ont été incubées à 37°C pendant 72h, l'activité cellulolytique a été constatée par la présence d'une zone clair autour des colonies (Dubois, 1924).

## **2.7 Etude des bactéries lactique amylolytique (BLA)**

Les isolats (**S<sub>7</sub>**, **S<sub>7</sub>**, **S<sub>22</sub>**, **D<sub>1</sub>**) qui ont présentées une activité amylasique seront étudiées profondément :

### **2.7.1 Etude de la cinétique de croissance à différents paramètres**

La cinétique de croissance des trois souches a été réalisée sur MRS glucose 5%, MRS Amidon soluble 5%, MRS (glucose 2%+ amidon 3%) de pH=6.2. A partir d'une culture jeune sur milieu MRS pH 6,2, charge microbienne de est prélevé et mise dans des flacons qui contenant les milieux cité précédemment. L'incubation se fait à 30°C et à chaque point d'observation choisis (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 24, 48h), la croissance bactérienne est suivie par la densité optique mesurée à 595 nm et la variation de pH est suivi par un pH mètre.

#### **2.7.1.1 Suivi de l'acidité au cours de la croissance**

L'acidité développée dans le lait est suivi aussi par le mesure de pH à l'aide d'un pH mètre.

### 2.7.1.2 Le dosage du glucose et de l'amidon

A chaque point d'observation ; 5ml de culture est centrifugée à 4600rpm pendant 20min ; le surnageant récupérer suber le dosage nécessaire (glucose et amidon).

#### a) Dosage de glucose

Le dosage de glucose a été révélé par la méthode de la liqueur de Fehling ; dans un premier temps; la liqueur de Fehling a été étalonnée à l'aide d'une solution de glucose de concentration connue  $C_0$  (mol.L<sup>-1</sup>). Pour que la coloration bleue de la liqueur de Fehling disparaisse, il faut verser un volume de solution de glucose  $V_0$  (ml).

En deuxième temps qui est le dosage test : La liqueur de Fehling a été titrée par une solution de glucose de concentration inconnue  $C_1$  (mol.L<sup>-1</sup>). Jusqu'à la coloration bleue de la liqueur de Fehling disparaisse, donc un volume de solution de glucose  $V_1$  (ml) a été versé.

Soit D le facteur de dilution :

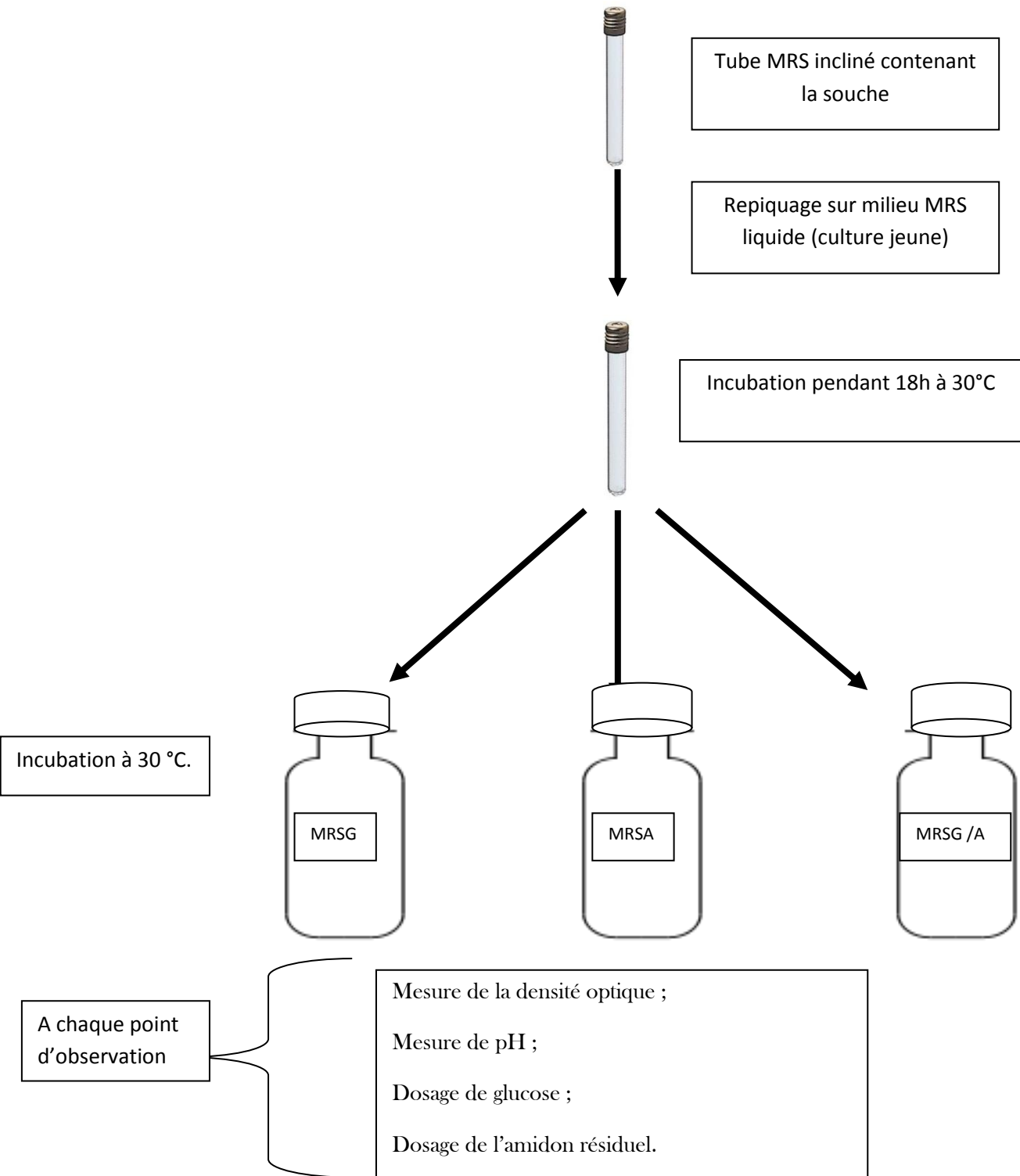
$$C_1 \text{ (moles/L)} = \frac{10 \times V_0}{V_1 \times D}$$

$$C_1 \text{ (g/L)} = \frac{10 \times V_0}{V_1 \times D \times 180}$$

#### b) Dosage de l'amidon résiduel

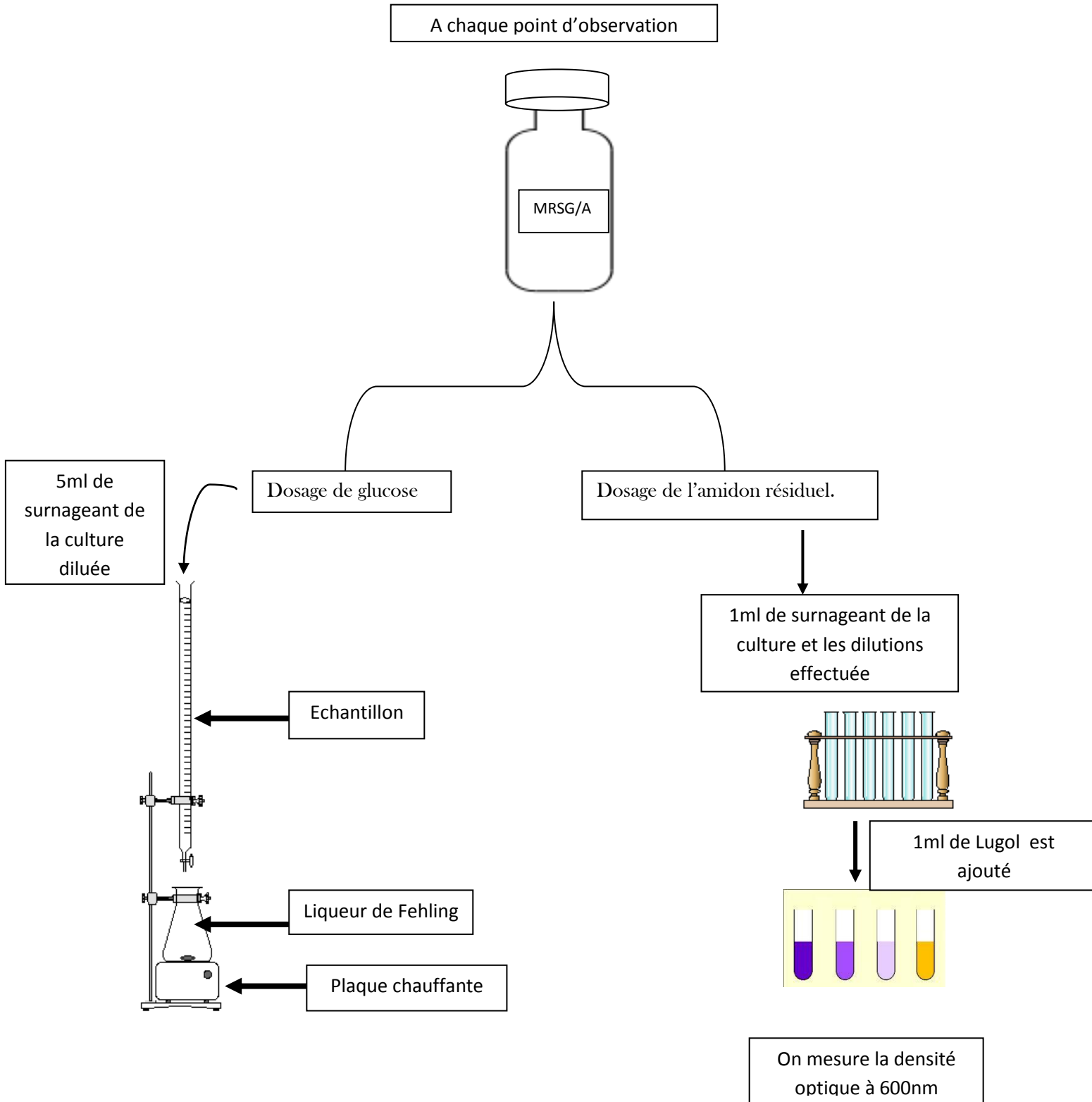
Avant le dosage de l'amidon une gamme étalonne est effectuer ; on utilisant une solution d'amidon et une solution de Lugol diluer de 1/9.

Pour la détermination de l'amidon résiduel, 1 ml de surnageant de la culture a été ajouté à 2,4 ml d'une solution d'iode et sa densité optique a été lue à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Fossi et Tavea , 2013).



**Figure 2. 3 :** Schéma du protocole appliqué pour l'étude de la cinétique de croissance et acidification sur MRS.





**Figure 2.4 :** Schéma du protocole appliqué pour l'étude de dosage de glucose et amidon.

### 2.7.2 Dosage de l'enzyme $\alpha$ amylase

La présence de l'enzyme  $\alpha$  amylase a été prouvée par le dosage de l'amidon résiduel resté à partir de l'hydrolyse de l'amidon ; Les souches ont été ensemencées dans un milieu contenant 1% amidon soluble, 0.5% extrait de levure, avec pH=6.5, à 30°C pendant 70h, la culture a été centrifugée à 4600rpm / 35min ; le surnageant récupéré considéré comme extrait brut.

1 ml de solution amidon de 1% ajoutée à 2 ml de tampon phosphate 0,1 M de pH=6, ce mélange a été laissé à la température ambiante pendant 10min, 1 ml de ce mélange a été ajouté à 0.5 ml de l'extrait brut ; après 30min de réaction, 1ml de (HCl) a été ajouté pour stopper la réaction.

La détermination de l'amidon résiduel a été réalisée (la méthode déjà décrite).

### 2.7.3 Les caractéristiques physicochimiques de $\alpha$ amylase

#### ➤ Effet de température

L'effet de température sur l'extrait enzymatique a été déterminé par l'incubation de mélange réactionnel à des températures allant 25°C, 30°C, 40°C et 60°C. Dans un intervalle de temps de 30min.

#### ➤ Effet de pH

L'effet de pH sur l'extrait enzymatique a été déterminé par incubation de mélange réactionnel à 30°C dans un intervalle du pH 3.4, 4, 4.4, 5, 5.4, 6, 6.4, 7,7.4, 8, 9 ; les tampons utilisées été : Tampon phosphate-citrate (pH 3, 4 -8,0), Tampon phosphate pH=9 ; puis le dosage enzymatique été effectuée (méthode déjà décrite).

## 2.8 La mise en évidence de l'antagoniste des souches amylolytiques

### 2.8.1 Evaluation de l'activité bactérienne

Les inhibitions entre bactéries peuvent avoir diverses causes (présence de phages lysogènes, carence nutritive, production d'agent inhibiteur, ...) (Guessas *et al.*, 2005), les souches pathogènes utilisés dans sont: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Listeria innocua* ATCC 33090.

Les bactéries lactiques qui ont activité amylasique ont été testées pour leur activité antagoniste envers les souches pathogènes selon deux méthodes.

#### ➤ Méthode directe (*Spot Agar Test*)

L'activité antimicrobienne des souches a été évaluée sur milieu solide selon la méthode de Fleming *et al.*, (1975). Le milieu MRS est ensemencé en touche (Spot) par les isolats pendant 24 heures d'incubation, une couche de gélose moelle (0,7 %) de BHI a été ensemencée par 100 µl de souches pathogènes dont la charge microbienne a été ajustée au préalable à 600 nm se trouvant dans l'intervalle 0.08-0.1 correspondant à une concentration cellulaire de 1 à  $2 \times 10^8$  UFC (Domínguez, 2001) cette dernière a été coulée à la surface puis a été ré-incubée pour 24 à 48 heures. Les souches présentant une zone claire tout au tour ont été considérées comme productrices de substances antimicrobiennes.

#### ➤ Méthode indirecte (*Well Diffusion Assays*)

Méthode de Tagg et Mc Given (1971) (Méthode de diffusion en puits). Cette méthode a été utilisée pour confirmer le résultat obtenu par la méthode de Fleming *et al.* (1975) mais aussi pour éliminer d'autres facteurs dans l'inhibition tel que la compétition nutritionnelle entre la souche indicatrice et la souche inhibitrice ; Les souches ont été cultivées dans du MRS liquide ont été incubées pendant 18 heures, après incubation, le milieu a été centrifugé (4600 rpm pendant 30 min) puis le surnageant a été conservé à 4 °C.

Les surnageants ont été filtrés par les filtres 0,22 µm. Une boîte de Pétri contenant du BHI solide a été ensemencée par nos souches pathogènes ensuite a été laissée reposer pendant 30 min à température ambiante ; des puits de 5 mm de diamètre ont été réalisés avec une cloche de Durham. Ces puits recevront 40 µl du surnageant de nos souches puis les boîtes ont

été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Ensuite, ont été examinées pour la formation de zones d'inhibition au tour des puits qui représente résultat positive.

## **2.8.2 Recherche de la nature de l'agent inhibiteur**

### **2.8.2.1 Sensibilité au pH**

L'effet du pH sur l'activité antimicrobienne des surnageant a été observé par l'ajustement du pH à 2, 7 et tester à nouveaux leur activité antimicrobienne envers les pathogènes par la méthode des puits.

Pour le pH=7 ; on a utilisé le milieu de MRS tamponné (tampon de phosphate) pour évaluer l'effet de l'acide lactique sur les souches pathogènes.

### **2.8.2.2 Le peroxyde d'hydrogène**

Les surnageant ont été traités par 1 mg/ml de catalase puis ont été filtrés et incubée à 37°C pendant une heure ; puis ils ont été testés par la méthode des puits sur les pathogènes, ce test a pour but d'éliminer l'effet du peroxyde d'hydrogène (Guessas *et al.*, 2005).

### **2.8.2.3 Sensibilité aux enzymes protéolytiques**

Pour identifier la nature de l'agent inhibiteur des souches, Les surnageant ont été traités aux enzymes protéolytiques ( $\alpha$ -chymotrypsine, pepsine séparément) (Lacroix *et al.*, 2011), 1  $\mu$ l de chaque enzyme a été additionné à 1 ml de surnageant et laissé pendant pendant une heure à 37 °C, après le bain-marie a été utilisation à 80°C pendant 10 min pour désactiver l'effet des enzymes (Ruiz-Barba *et al.*, 1994 ; Schillinger *et al.*, 1996) ; la sensibilité des substances antimicrobiennes aux enzymes protéolytiques a été testé par l'utilisation d'un surnageant neutralisé.

### **2.8.2.4 Sensibilité à la température**

La thermo-stabilité de l'activité antimicrobienne des surnageant a été déterminée par l'incubation de ces derniers à une température de 121°C pendant 15min.

## 2.9 Isolement des *Propionibacterium* à partir de l'ensilage de sorgho

Afin d'isoler les bactéries propioniques à partir de différents stades de l'ensilage, des dilutions décimales allant de  $10^{-2}$  jusqu'à  $10^{-12}$  ont été effectuées, un ml de chaque dilution a été prélevé et coulé sur boîtes de Pétri contenant le milieu sélectif lithium glycérol agar (LGA) (Madec *et al.* , 1993), l'incubation a été effectuée à 30°C pendant 5 à 6 jours en anaérobiose par l'utilisation d'une jar d'anaérobiose.

## *Résultats & Discussion*

## Chapitre 3

### Résultats et discussion

#### 3.1 Préparation de l'ensilage au laboratoire

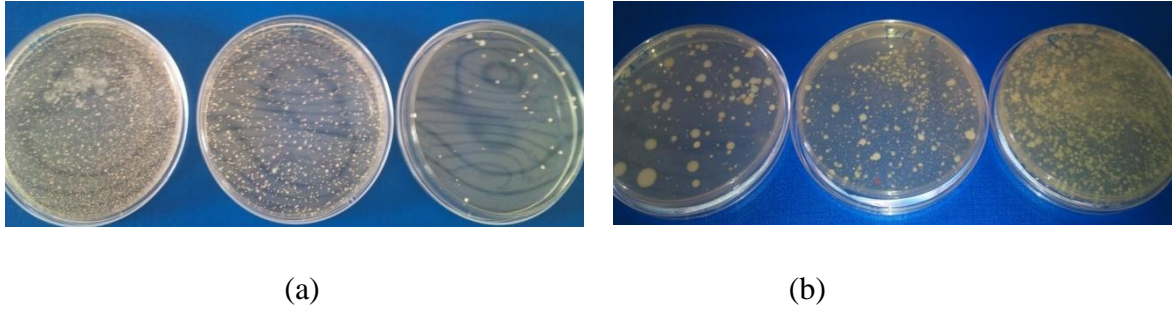
Comme premier volée, l'étude a été commencée par la récolte de sorgho aux niveaux de la région d'Oran-Es-senia, la préparation de l'ensilage a été effectuée aux niveaux de laboratoire, les bouteilles de sérum 500ml ont été utilisées figure 3.1.



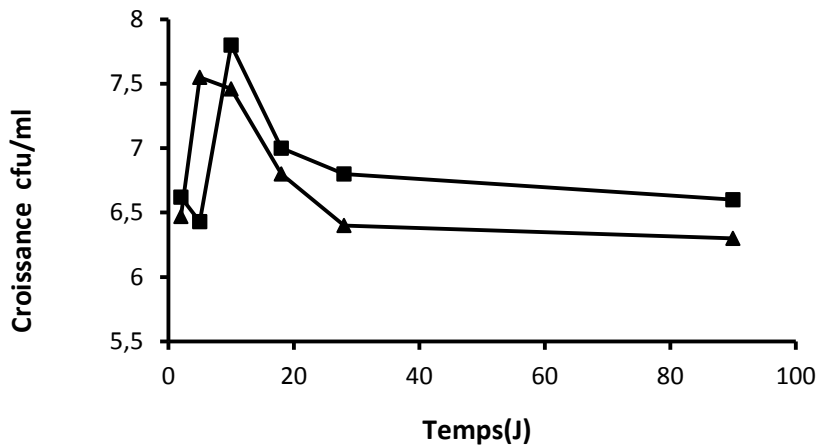
**Figure 3.1** : Sorgho ensilé en micro silo préparée au laboratoire.

#### 3.2 Dénombrement de la flore totale et la flore lactique

L'étude de l'évolution de la flore totale et la flore lactique a été réalisée sur milieux PCA et MRS figure(3.2). La figure (3.3) présente un graphe de l'étude de l'évolution de la microflore totale et lactique ; au début de l'ensilage le nombre de la flore totale montre qu'elle est supérieure que la flore lactique 7,5 et 6,5 log respectivement, mais aux 8<sup>ème</sup> jours de l'ensilage le nombre de la flore lactique augmente jusqu'à 7,8 log. Et une stabilité pour la flore totale à 7.8log après le nombre de la flore totale et lactique commence à diminuer graduellement au cours du temps de l'ensilage. En 90 jours, le nombre de la flore lactique est plus supérieur à la flore totale (6.7 et 6.3log).



**Figure 3.2 :** Dénombrement de la flore totale (b) et la flore lactique (a) au cours de l'ensilage de sorgho.



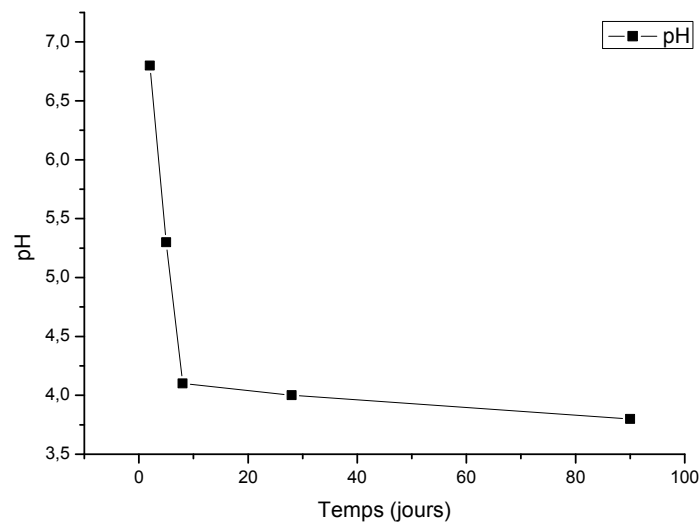
**Figure 3.3:** La croissance de la flore totale (Δ) et la flore lactique (□) aux cours de l'ensilage de sorgho.

La croissance de la flore lactique qui représente une partie de la flore totale naturelle des végétaux (Makimattila *et al.*, 2011) se comporte différemment dans l'ensilage d'après la figure 3.3, cette croissance est minimale au 2<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jours mais au 8<sup>ème</sup> jours elle est maximale (ICMSF, 2005 ; Weinberg *et al.*, 2010).

Au cours de cette période de l'ensilage plusieurs facteurs favorablement ou in favorablement peuvent exister, qui affecte sur la croissance des microorganismes.

La figure 3.4 illustre le changement du pH au cours de l'ensilage en fonction du temps ces variations débute par un pH supérieur = 7 jusqu'à 5.6 aux 28<sup>ème</sup> jours puis on observe aucun changement de pH.





**Figure 3.4:** Les variations de pH aux cours de l'ensilage de sorgho.

Dans ce cas la flore totale peut être inhiber par l'absence de  $O_2$ , comme les levures et les moisissures, et les bactéries aérobic (Pahlawet *al.*, 2003), la sensibilité au pH par la présence des acides organiques spécialement acide lactique qui est produit au cours de la croissance de la flores lactique (Paragon ,2004) ou par l'acide acétique qui a un effet antifongique (Lindsey et king,2010, Klesset Demirci,2011).

La dominance de la flore lactique de la dernière étape de l'ensilage est proportionnelle aux conditions environnementales spécialement l'absence graduelle de  $O_2$ , la diminution de pH 3.8 et la présence de source d'énergie.

### 3.3 Isolement et identification de la flore lactique

La fermentation est l'un des premières méthodes de conservation utilisée par l'homme, les bactéries lactique responsables de la fermentation jouent un rôle important par la production des acides organiques, l'enrichissement par les éléments nutritionnelle, améliore l'aspect organoleptiques, élimine les microorganismes.

L'ensilage est le résultat d'une fermentation des plantes fourragères par les bactéries lactiques (LAB), constituant une partie du patrimoine naturel de la microflore associée avec du matériel végétal (Ma`kimattilaet *al.*, 2011). Quelles sont les bactéries lactiques les plus abondantes et fonctionnelle dans l'ensilage de sorgho ?

Pour caractériser les différentes espèces qu'elles appartiennent les isolats, nous faisons appel aux caractères physiologiques et biochimiques.

Pour déterminer l'appartenance des isolats bactériens aux différents genres nous avons fait appel aux critères suivants : Coloration de Gram, test catalase, production de (CO<sub>2</sub>, acétoïne, dextrane), hydrolyse (arginine, citrate), croissance à différentes T°, croissance en présence de NaCl, croissance à différentes pH et le test de thermo-résistance. Les résultats sont présents dans le tableau 3.1.

### 3.4 Caractérisation morphologique (macroscopique et microscopique)

Toutes les colonies isolées qui ont un aspect macroscopique des souches lactiques sur milieu MRS solide qui semblent des colonies petites, rondes, blanches, et lenticulaires, ces isolats subissent une purification des souches par des repiquages successifs sur milieux MRS, les isolats qui représentent un aspect homogène dans les biotes et les tubes considérés comme des isolats purs mais restent à confirmer par la coloration de Gram, et le mode d'association des cellules (figure 3.5).

### 3.5 Test physiologiques et biochimique

Les isolats purs seront étudiés profondément par étude de la tolérance à l'acidité et la salinité et à l'influence de la température, type fermentaire, test de catalase.

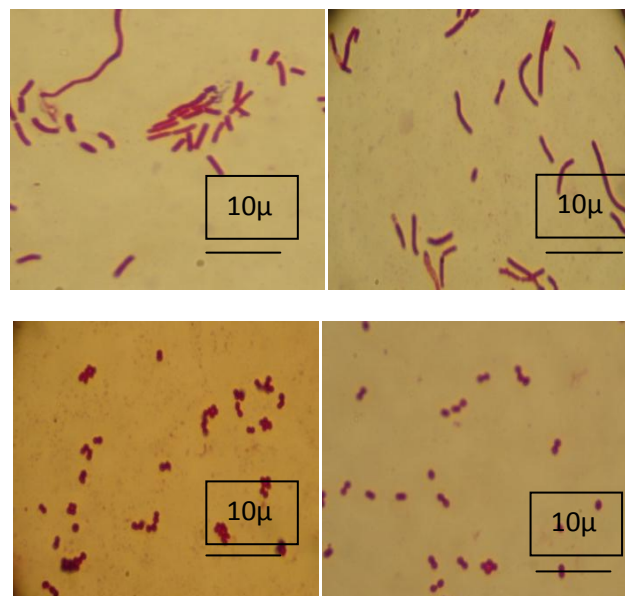
Parmi 63 nous avons permis de caractériser 27 isolats par : catalase négatif, hétérofermentaires et homofermentaires, capable de croître à 15°C, 30°C, 37°C et 45°C, capable de croître à un pH 6.8, 4, 9.6, elles peuvent croître en présence de 3% de NaCl, elles résistent à 63°C pendant 15 min, ces caractères phénotypiques nous orientent vers l'appartenance probable des isolats aux groupes de bactéries lactiques.

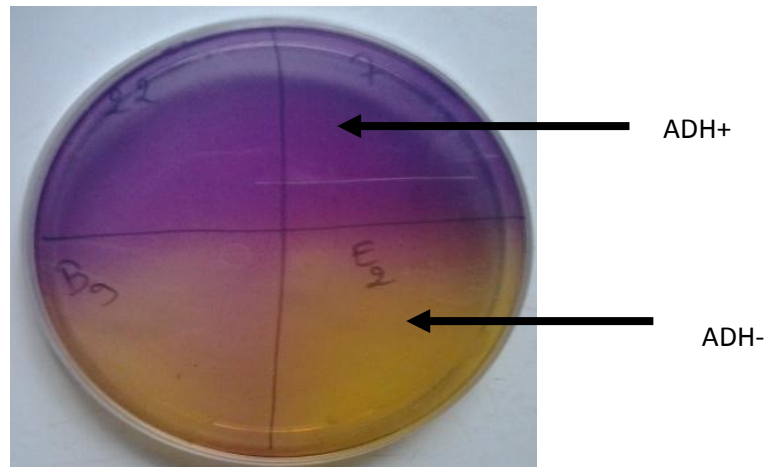
Plus ces caractéristiques, les tests de l'hydrolyse de Citrate, test de l'arginine, et la forme des cellules nous ont permis d'identifier les genres suivants : *Lactobacillus* (44%), *Lactococcus* (14.81%), *Weissella* (29.62%) and *Leuconostoc* (11.11%).

Généralement nos isolats ont été homofermentaire et hétérofermentaire et ont la capacité de pousser à pH=4 et 45°C.

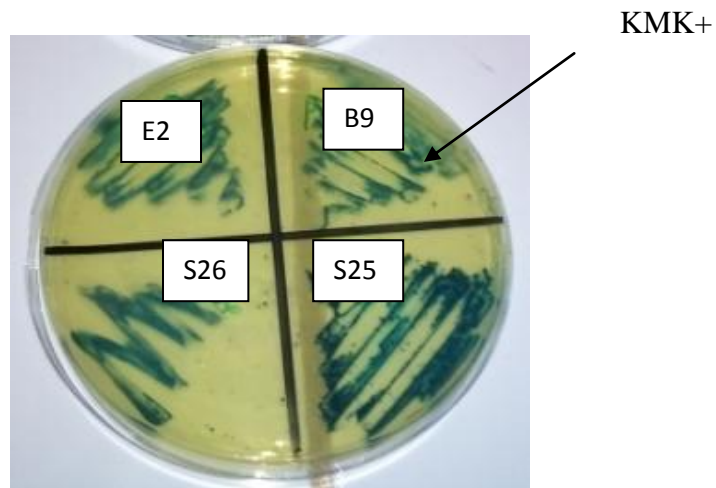
**Tableau3. 1** :Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats à partir de l'ensilage de sorgho

Caractéristiques	Groupes									
	Groupe des bacilles				Groupe des cocci					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	14-13- A <sub>5</sub> -12- D <sub>11</sub> -19- A <sub>9</sub>	50	S <sub>7</sub> -S <sub>22</sub> - D <sub>1</sub>	D <sub>10</sub>	11-A <sub>8</sub> - A <sub>6</sub> -20	4-32	S <sub>7</sub> -43- A <sub>4</sub>	25	A <sub>1</sub> -42	E <sub>1</sub> -E <sub>2</sub> - E <sub>3</sub>
<b>Nombre des isolats(27)</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Forme</b>	rods	rods	rods	rods	cocci	cocci	cocci	Cocci	cocci	cocci
<b>Gram</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Catalase</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CO<sub>2</sub>a partir de glucose</b>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
<b>NH<sub>3</sub>partir arginine</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>Croissance à température (°C)</b>	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45	v	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Croissance</b>	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>NaCl (%)</b>	6.5	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<b>Croissance à pH</b>	4	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	9.6	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<b>Dégradation de Citrate</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Thermo-résistance63.5°C for 30 min</b>	v	+	+	-	+	+	+	+	v	+

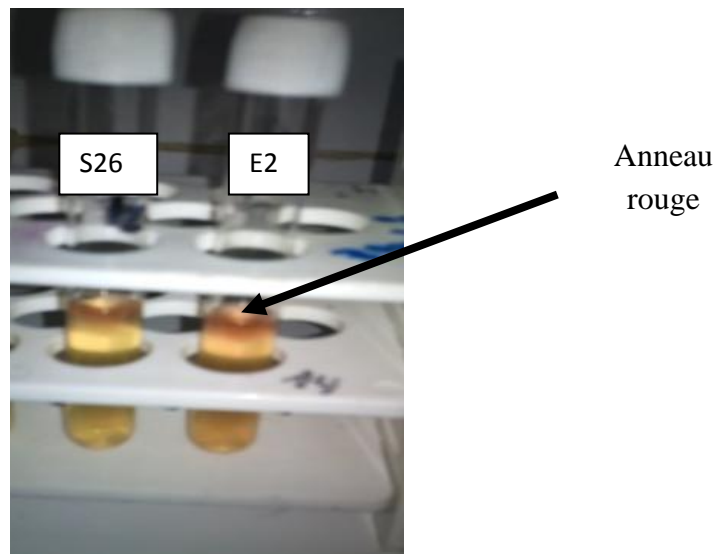
**Figure 3.5** : Caractère morphologique (cocci-bacille) des isolats isolée a partir de l'ensilage de sorgho observe à l'aide de microscope optique(Gr\*1000).



**Figure 3.6 :** Test de l'hydrolyse de l'arginine. Colonie de couleur jaune : résultat négatif (pas de dégradation de l'arginine)(E2,B9 : ADH-)(S7 et S22 : ADH+).



**Figure 3.7 :** Test de citrate sur milieu KMK Colonie de couleur bleu : résultat positif



**Figure 3.8 :** Test d'acétoïne sur milieu Clark Lubs. L'apparition d'un anneau rouge après l'ajout des réactifs VP1 et VP2 (S22-, E2+).

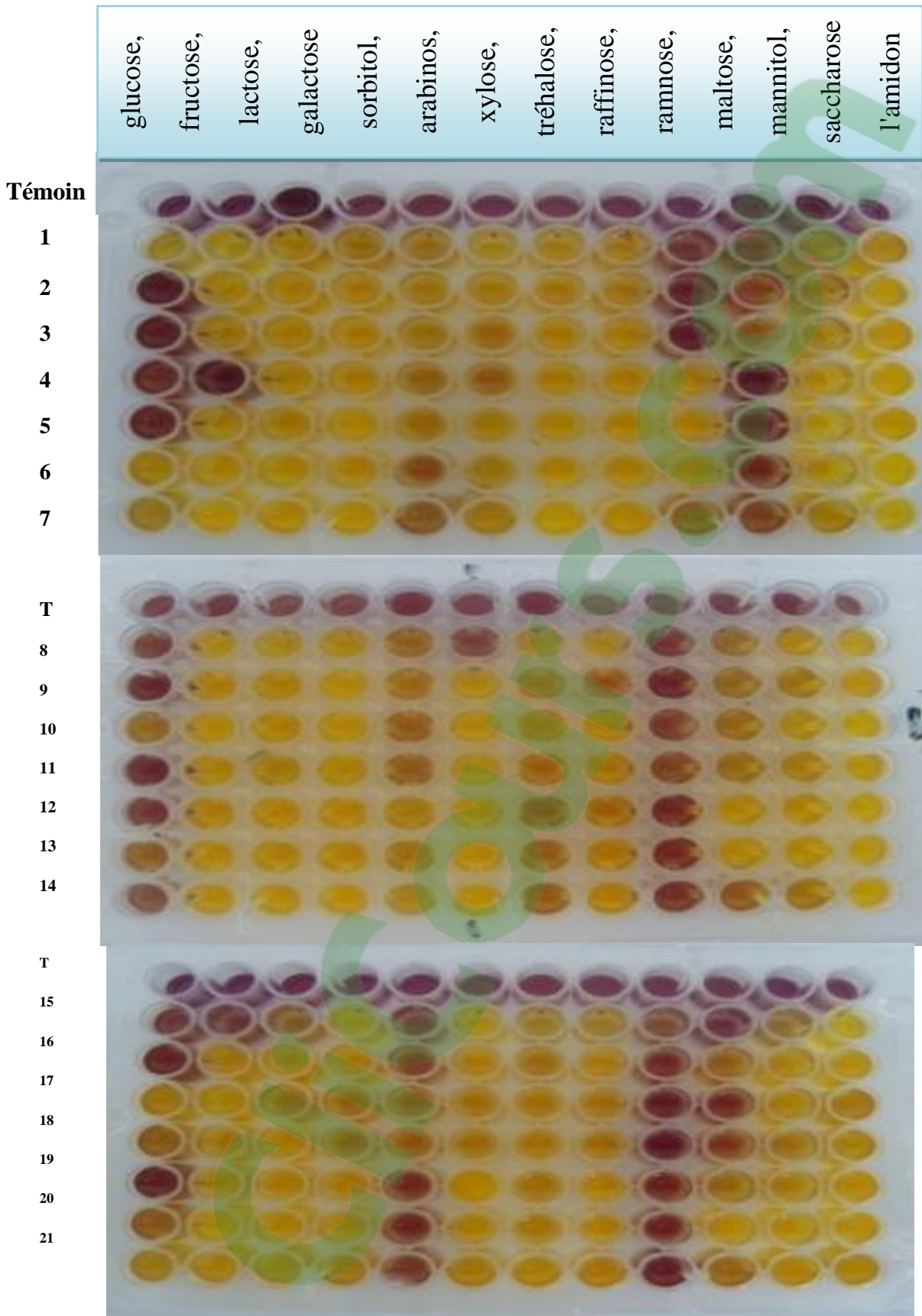
### 3.6 Identification de l'espèce

Pour identifier des isolats au niveau de l'espèce, on fait appel à la fermentation de quatorze sucres sur milieu MRS sans source de carbone et sans extrait de viande et en présence de pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH figure 3.9, tableau 3.2.

Les 27 isolats ont la capacité d'utiliser le trehalose, xylose, maltose, galactose, fructose et le sucrose. Le rhamnose et amidon sont les moins utilisés chez nos isolats l'esculine, sorbitole, arabiose, mannitole, leur utilisation est variable, cette variété peut être l'un des clés d'identification de l'espèce.

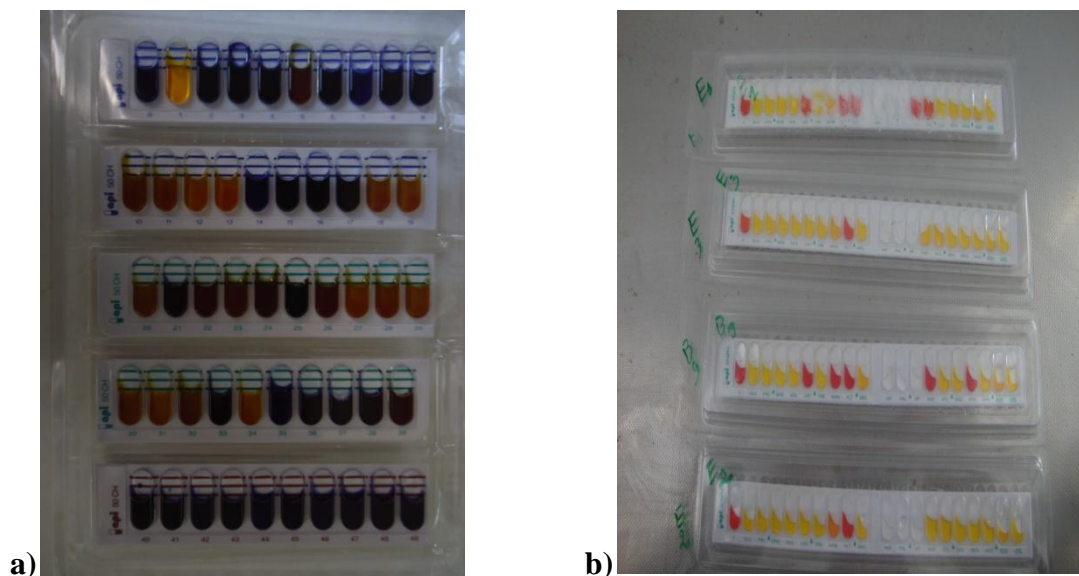
Tableau3.2 : Profile fermentaire des isolats.

Caractéristiques	Groupes									
	Groupe des bacilles				Groupe des cocci					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	14-13- A <sub>5</sub> -12- D <sub>11</sub> -19- A <sub>9</sub>	50	S <sub>7</sub> -S <sub>22</sub> - D <sub>1</sub>	D <sub>10</sub>	11-A <sub>8</sub> - A <sub>6</sub> -20	4-32	S <sub>7</sub> -43- A <sub>4</sub>	25	A <sub>1</sub> -42	E <sub>1</sub> -E <sub>2</sub> - E <sub>3</sub>
Nombre des isolats(27)	7	1	3	1	4	2	3	1	2	3
Forme	rods	rods	Rods	rods	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci
<b>Production de l'acide à partir</b>										
Trehalose	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
Xylose	+	+	+	-	/	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Arabinose	v	v	+	+	+	+	-	+	-	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Ramnose	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	/	/	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pre-identification	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subs p. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	<i>Weissellaciobaria</i>	<i>Weissellaminor</i>	<i>Weissella soli</i>	<i>Weissellaviridescense</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>

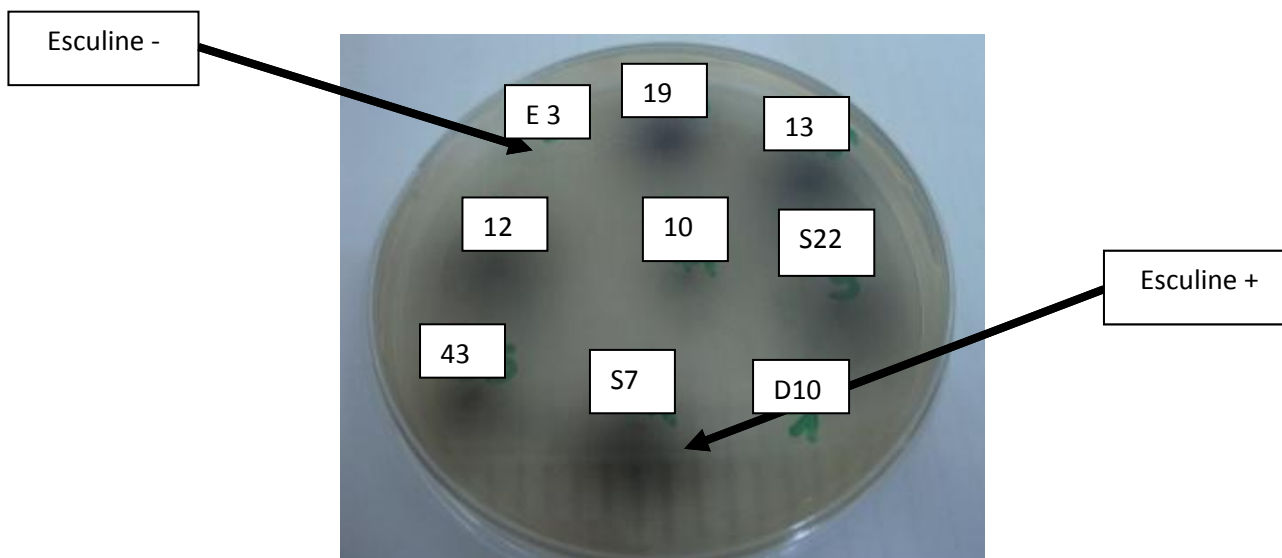


**Figure 3.9 :** Fermentation des carbohydrates de nos isolats sur les plaques multi pore.





**Figure 3.9.1 :** Résultats du test de fermentation des hydrates de carbone sur galerie API 50 CH (a) et API Staph (b).



**Figure 3.10 :** Aspect de milieu l'esculine après croissance des isolats.

A partir de 63 isolats, 27 isolats sont considéré comme bactérie lactique appartient a différents genre des bactéries lactiques.

La coloration de Gram nous a permet de grouper nos isolats en deux groupes ; groupe A, groupe B. en fonction de la forme cellulaire (bacille, cocci) Tableau3.3 illustre tous les teste réalisée pour identifier nos isolats.

Les isolats font partie a quatre différents genres : *Lactobacillus* (44%),



*Lactococcus*(14.81%), *Weissella*(29.62%) and *Leuconostoc*(11.11%).

Généralement ils ont été homofermentaire et hétérofermentaire et ont la capacité de pousser à pH=4 et 45°C.

Le groupe A (bacille) qui regroupe le genre des *Lactobacillus*, douze isolats qui appartient a quatre espèces (homofermentaire comme *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus manihotivorans* Et hétérofermentaire comme *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*)

Les lactobacilles homofermentaire regroupent l'espèce de *Lactobacillus manihotivorans*, caractérisée par la fermentation de la plupart des substances carbohydate sauf mannitol, et raffinose, et croit a des pH =4 et température élevée. *Lactobacillus pentosus* a presque les même caractéristiques *L. manihotivorans*, *L. pentosus* produit le CO<sub>2</sub> a partir de gluconate.

L'espèce *L. brevis* (7isolats) hétérofermentaire *L. fermentum* (1isolats), les différences entre ces espèces c'été aux niveaux de xylose et l'esculine (Dworknetet al ., 2004).

La présence de ces espèces dans notre l'ensilage ont été semblable a celle des résultats de Abrouillet al. , 2008.

Le groupe B, (cocci), trois isolats ont été positivement identifié comme *Leuconostocmesenteroidessubsp. mesenteroides* qui sont caractérisée par la production de CO<sub>2</sub> a partir de glucose, dextraina partir de saccharose, puis l'incapacité de l'hydrolysée l'arginine et pour spécifier l'espèce l'arabinose est le sucre clé pour l'identification (Carr et al.,2002 , Bendimerrattet al., 2012). Les résultats de la fermentation des hydrates de carbone sur la galerie Staph 20 permet la confirmation et l'identification des espèces, la figure 3.9.1. (b.

Généralement *Leuconostoc*se trouve on association avec le matériel végétale et les produits alimentaires fermentés, d'autres études portées que peu de *Leuconostoc*dominent la microflore de fourrage et l'ensilage (Cai et al., 1994).

La charge minimale de *Leuconostoc* est peut être du a la compétition nutritionnelle entre les déférentes espèces de bactérie lactique (Terber et guis 1981, Togo et al., 2002).

Huit espèce de se groupe confédérée comme *Weissella* différencier de *Leuconostoc* par le test de l'arginine et le profile fermenteur des sucres. Les espèces de *Weissella* incluent *Weissellacibaria*(7.20%),*Weissellaminor*(11.11%),*Weissella* *sol* (3.7%), *Weissellaviridescense* (7.20%).

L'étude de Panget *al.*, 2011 indiquent que peut être que les espèces de *Weissella* améliorent l'ensilage.

Quatre souches homofermentaires qui peut hydrolyser l'arginine et le citrate et ne peut pas se développer à pH 9, à 45 ° C et à 6,5% de NaCl. Cependant, les trois dernier caractères physiologiques pH, température et la salinité ne peuvent pas être utilisés comme référence pour l'identification des bactéries lactiques, car il ya des variations dans ces caractères en particulier dans ce groupe de bactéries (Driciet *al.*, 2010). Les auteurs postérieurs ont isolé à partir de lait de chamelle l'espèce de *Lactococcuslactissubsp.lactisbiovar. diacetylactis* qui ont montré une croissance à 50°C. La comparaison des profils a révélé que les coccihomofermetaives isolé dans la présente étude peuvent être considérées comme *Lactococcuslactissubsp. lactisbiovar. diacetylactis* (14,81%). En outre, le travail de recherche de Sawadogo-Linganiet *al.* (2010) ont observé la présence de *Lactococcus lactis* en sorgho grains fermenté.

Les résultats de la fermentation des hydrates de carbone sur la galerie API 50CH, ont permet l'identification des espèces, la figure 3.9.1.(a et le tableau 3.3.1, montre les résultats du profile de fermentation des hydrates de carbones. D'après ces résultats, et suivant les recommandations de Carr et *al* (2002), Axelsson (2004) et Hammes et Hertel (2006). On peu conclure que :Les souches S7 et S22 appartiennent à l'espèce *Lactobacillus plantarum*,

Les résultats de la fermentation des hydrates de carbone sur la galerie API Staph, ont permet la confirmation de l'identification des espèces des souches de *Leuconostocmesenteroidessubsp. mesenteroides* la figure 3.9.1.(b et le tableau 3.3.2.

**Tableau 3.3.1** :L'utilisation des hydrates de carbone par les souches dans une API 50 CH.

Hydrates de carbones	S <sub>7</sub>	S <sub>22</sub>	Hydrates de carbones	S <sub>7</sub>	S <sub>22</sub>
<b>Témoin</b>	-	-	<b>ESC</b>	+	+
<b>Glycérol</b>	+	+	<b>Salicine</b>	+	+
<b>Erythritol</b>	-	-	<b>D- Celiobiose</b>	+	+
<b>D- Arabinose</b>	-	-	<b>D- Maltose</b>	+	+
<b>L- Arabinose</b>	-	-	<b>D- Lactose 1</b>	+	+
<b>D- Ribose</b>	+	+	<b>D- Melibiose</b>	+	+
<b>D- Xylose</b>	-	-	<b>D-Saccharose</b>	+	+
<b>L- Xylose</b>	-	-	<b>D- Trehalose</b>	+	+
<b>D- Adonitol</b>	-	-	<b>Inuline</b>	-	+
<b>MDX</b>	-	-	<b>D- Mélézitose</b>	+	+
<b>D- Galactose</b>	+	+	<b>D- Raffinose</b>	-	-
<b>D- Glucose</b>	+	+	<b>Amidon</b>	+	+
<b>D- Fructose</b>	+	+	<b>Glycogène</b>	-	-
<b>D- Mannose</b>	+	+	<b>Xylitol</b>	-	+
<b>L- Sorbose</b>	-	-	<b>Gentiobiose</b>	-	+
<b>L- Rhamnose</b>	-	-	<b>D-Turanose</b>	-	+
<b>Dulcitol</b>	-	-	<b>D- Lyxose</b>	-	+
<b>Inositol</b>	-	-	<b>D- Tagatose</b>	-	-
<b>D- Mannitol</b>	+	+	<b>D- Fucose</b>	-	-
<b>D- Sorbitol</b>	+	+	<b>L-Fucose</b>	-	-
<b>MDM</b>	+	+	<b>D- Arabitol</b>	-	-
<b>MDG</b>	-	+	<b>L-Arabitol</b>	-	-
<b>NAG</b>	+	+	<b>GNT</b>	-	-
<b>Amydaline</b>	+	+	<b>2KG</b>	-	-
<b>Arbutine</b>	+	+	<b>5KG</b>	-	-

**Tableau 3.3.2** :L'utilisation des hydrates de carbones par les souches dans une API Staph.

Composant actif	E1	E2	E3
<b>Témoin</b>	-	-	-
<b>D-glucose</b>	+	+	+
<b>D-fructose</b>	+	+	+
<b>D-mannose</b>	+	+	+
<b>D-maltose</b>	+	+	+
<b>D-lactose</b>	-	+	+
<b>D-tréhalose</b>	+	+	+
<b>D-mannitol</b>	+	V	+
<b>xylitol</b>	-	-	-
<b>D-mélibiose</b>	-	+	+
<b>nitrate de potassium</b>	/	/	/
<b>β-naphtyl phosphate</b>	/	/	/
<b>sodium pyruvate</b>	/	/	/
<b>D-raffinose</b>	-	+	+
<b>D-xylose</b>	-	+	+
<b>D-saccharose</b>	+	+	+
<b>méthyl-αDglucopyranoside</b>	+	+	+
<b>N-acétyl-glucosamine</b>	+	+	+
<b>L-arginine</b>	+	+	+
<b>urée</b>	+	+	+

+ : Positif ; - : Négatif ; / Absence des réactifs ; V : variable

**Tableau 3.4:** Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats à partir de l'ensilage de sorgho:

Caractéristiques	Groupes									
	Groupe des bacillus				Groupe des cocci					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	14-13- A <sub>5</sub> -12- D <sub>11</sub> -19- A <sub>9</sub>	50	S <sub>7</sub> - SS <sub>22</sub> - D <sub>1</sub>	D <sub>10</sub>	11-A <sub>8</sub> - A <sub>6</sub> -20	4-32	S <sub>7</sub> -43- A <sub>4</sub>	25	A <sub>1</sub> -42	E <sub>1</sub> -E <sub>2</sub> - E <sub>3</sub>
<b>Nombre des isolats(27)</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Forme</b>	rods	rods	rods	rods	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci
<b>Gram</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Catalase</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CO<sub>2</sub> à partir de glucose</b>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
<b>NH<sub>3</sub> à partir arginine</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>Croissance à température (°C)</b>	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45	v	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Croissance</b>	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>NaCl (%)</b>	6.5	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<b>Croissance à pH</b>	4	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	9.6	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<b>Dégradation de Citrate</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Thermo-résistance 63.5°C for 30 min</b>	v	+	+	-	+	+	+	+	v	+
<b>Production de l'acide à partir</b>										
<b>Trehalose</b>	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+
<b>Raffinose</b>	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
<b>Xylose</b>	+	+	+	-	/	+	+	+	+	+
<b>Maltose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Galactose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Sorbitol</b>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
<b>Arabinose</b>	v	v	+	+	+	+	-	+	-	+
<b>Mannitol</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<b>Ramnose</b>	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-
<b>Sucrose</b>	+	/	/	+	+	+	+	+	+	+
<b>Fructose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Glucose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Esculin</b>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<b>Starch</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Pre-identification</b>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus manihotivorus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subs p. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	<i>Weissella cibaria</i>	<i>Weissella minor</i>	<i>Weissella soli</i>	<i>Weissella viridescens</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>

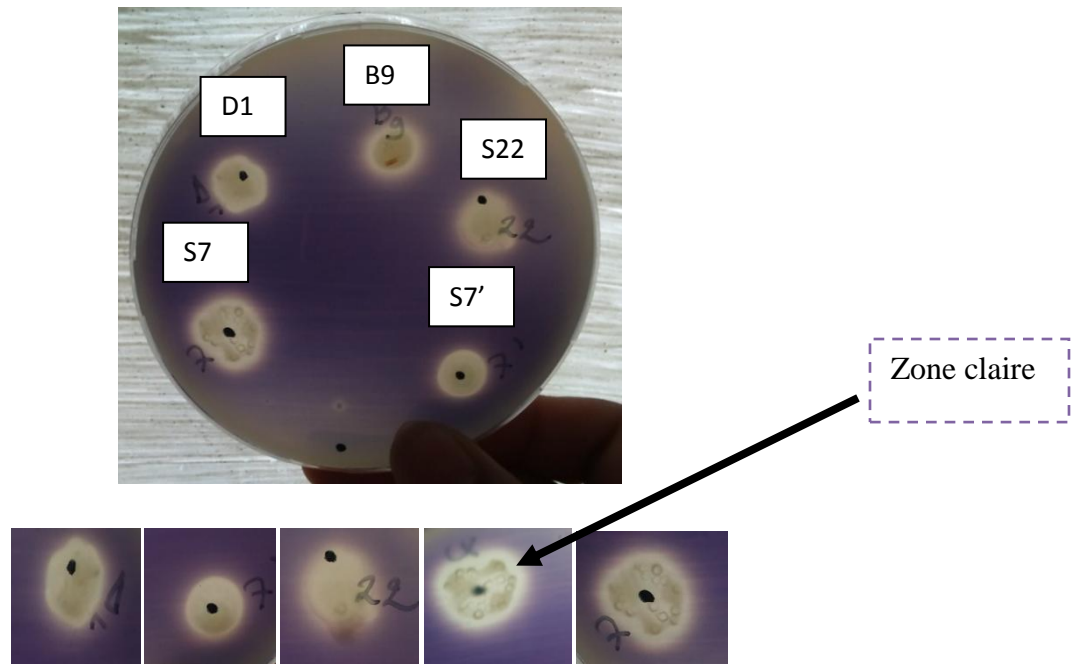
### 3.7 Etude des propriétés technologiques des souches

L'étude des propriétés technologiques des souches est basée sur la révélation de la capacité de la souche de synthétiser et de produire des enzymes qui hydrolyse les macromolécules, quelle peut se trouver chez les végétaux tels que protéines, cellulose amidon.

**Tableau 3.5 :** Tableau représentative des résultats de dégradation de Gélatine, caséine, cellulose  $\beta$ , amidon.

Souches	Gélatine	Caséine	Amidon	cellulose $\beta$
14	-	-	-	-
13	-	-	-	-
A <sub>5</sub>	-	-	-	-
12	-	-	-	-
D <sub>11</sub>	-	-	-	-
19	-	-	-	-
A <sub>9</sub>	-	-	-	-
50	-	-	-	-
S <sub>7</sub>	-	-	+	-
SS <sub>22</sub>	-	-	+	-
D <sub>1</sub>	-	-	+	-
S <sub>7</sub>	-	-	+	-
D <sub>10</sub>	-	-	-	-
11	-	-	-	-
A <sub>8</sub>	-	-	-	-
A <sub>6</sub>	-	-	-	-
20	-	-	-	-
4	-	-	-	-
32	-	-	-	-
43	-	-	-	-
A <sub>4</sub>	-	-	-	-
25	-	-	-	-
A <sub>1</sub>	-	-	-	-
42	-	-	-	-
E <sub>1</sub>	-	-	-	-
E <sub>2</sub>	-	-	-	-
E <sub>3</sub>	-	-	-	-

Aucune activité protéolytique cellulolytique été observée chez nos souches ; par contre il existe quatre souche amylolytique productrice de enzyme  $\alpha$  amylase, figure 3.11 la zone claire représente l'absence de l'amidon après l'ajout de la vapeur de Lugol. Les souches SS<sub>22</sub>-S<sub>7</sub> sont *Lactobacillus plantarum* et la D<sub>1</sub>*Lb.manihotivorans*, ces résultats correspondent aux travaux Morlonet *al.*,(1998,2001), et S<sub>7</sub> identifier comme *Weissellaminor* ; ces quatre souches considérer comme bactérie lactique amylolytique.



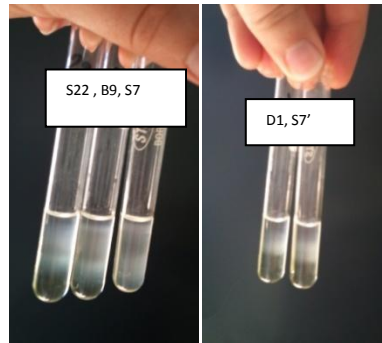
**Figure 3.11** : L'activité amylolytique des souches après l'ajout de la vapeur de Lugol (zone claire, zone d'hydrolyse) (D<sub>1</sub>, S<sub>7</sub>, S<sub>22</sub>, B<sub>9</sub>, S<sub>7</sub>').

### 3.7.1 Production d'exo-polysaccharide

Cette technique est effectuée sur les souches productrices d'amylase, pour confirmer la production des polysaccharides.

La production d'exo-polysaccharide par les souches été réveillée par la formation des colonies visqueuse transparentes chez les souches *Lb.plantarum*S<sub>22</sub>-*Lb.plantarum*S<sub>7</sub>, *Lb.manihotivorans*D<sub>1</sub> et *Weissellaminor* S<sub>7</sub>' (difficile à photographie). Cette production a été confirmée par la méthode décrite au matériel et méthodes (Linganiet *al.*, 2010). La figure 3.12 illustre l'apparition d'un anneau opaque après l'ajout de éthanol de 95% au surnageant de la

culture bactérienne (après 24h incubation à 30 °C en milieu MRS saccharose 5%) qui réveillait la présence des exo-polysaccharides.



**Figure 3.12 :** La formation d'un trouble confirme la formation de production des exopolysaccharides (D1, S7, S22, B9, S7').

Les résultats de la production des polysaccharides pour les souches de *Lb.plantarum*S22, *Lb.plantarum*S7, et *Weissellaminor*S7', *Lb.manihotivorans*D1 permettent la confirmation de la dégradation de l'amidon en polysaccharides par la production d'un enzyme catalyseur de l'amidon qui est l'amylase.

### 3.8 Etude de la cinétique de croissance à différents paramètres

Plusieurs flore peuvent présenter au cours de l'ensilage est entraînée une compétition nutritionnelle entre les flores ou entre elle-même et par conséquent épuise les éléments nutritionnelles et énergétiques. Ces carences peuvent agir sur la croissance des bactéries lactiques qui ont un grand intérêt dans la fermentation de fourrage, et d'autre part la consommation des sucres fermentescibles a un grand effet sur la diminution des flores indésirables sensibles à l'acidité, ou par des substances antimicrobiennes produites par les BL comme connu. Dans cela la présence des sucres fermentescibles est très nécessaire, pour leur croissance et pour le développement de l'ensilage.

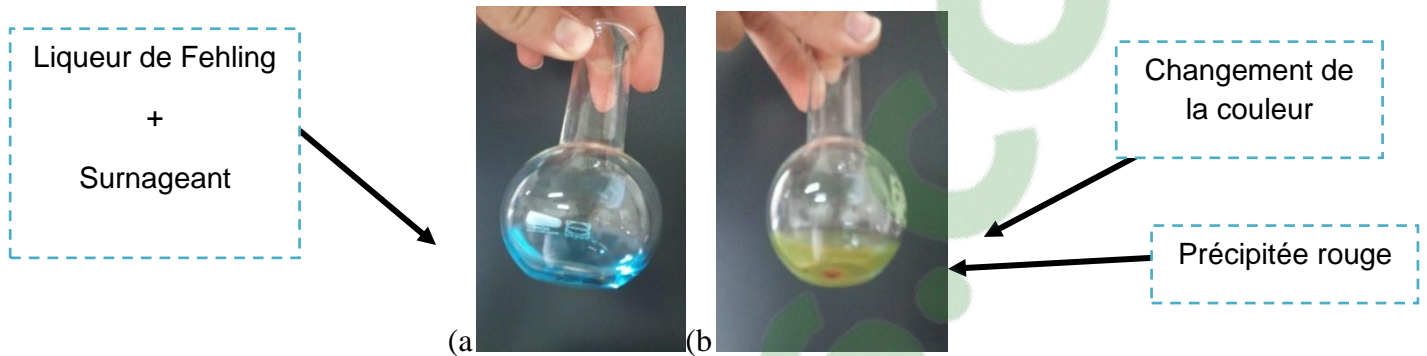
Cette partie de l'étude a été basée sur le suivi cinétique des souches amylolytiques dans un milieu qui contient le glucose comme seule source de carbone, amidon comme seule source de carbone et glucose et amidon comme deux sources présentes dans un milieu de culture MRS.

Ce test est appliqué sur les deux souches de *Lb.plantarum* S22, S7, *Lb.manihotivorans*D1 ; à chaque point d'observation choisis (0, 2, 3, 4, 6, 8, ... 48h) ; la croissance bactérienne a été suivie par la mesure de la densité optique à 595nm à l'aide d'un



spectrophotomètre et l'acidification du milieu par le pH mètre et le dosage de l'amidon résiduelle et glucose résiduelle.

Le surnageant de culture bactérienne des quatre souches étudiées (*Lb. plantarum*S22, *Lb. plantarum*S7, et *Weissellaminor* S7', *Lb. manihotivorans* D1) cultivées sur milieux MRS amidon, MRS glucose et MRS amidon/ glucose ont subi un dosage de l'amidon résiduel, puis la détection de la présence de glucose (figure 3.13).



**Figure 3.13 :** Détermination des sucres réducteurs par la liqueur de Fehling (a) avant le chauffage, (b) après le chauffage pour *Lb. plantarum*S22.

Cette méthode est basée sur la réduction des ions de cuivre de la liqueur de Fehling par les sucres réducteurs contenus dans l'échantillon en donnant un précipité rouge brique. Les ions de cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  contenus dans la liqueur de Fehling sont responsables de la couleur bleue. Ils sont transformés en ions  $\text{Cu}^+$  avec les sucres réducteurs, ces ions s'associent avec l'oxygène pour former de l'oxyde de cuivre ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) qui donne un précipité rouge brique. La liqueur de Fehling se décolore progressivement ; le dosage est terminé lorsque la couleur bleue est disparue. La réaction se fait en ébullition et agitation continue (Nigam et Ayyagari, 2008).

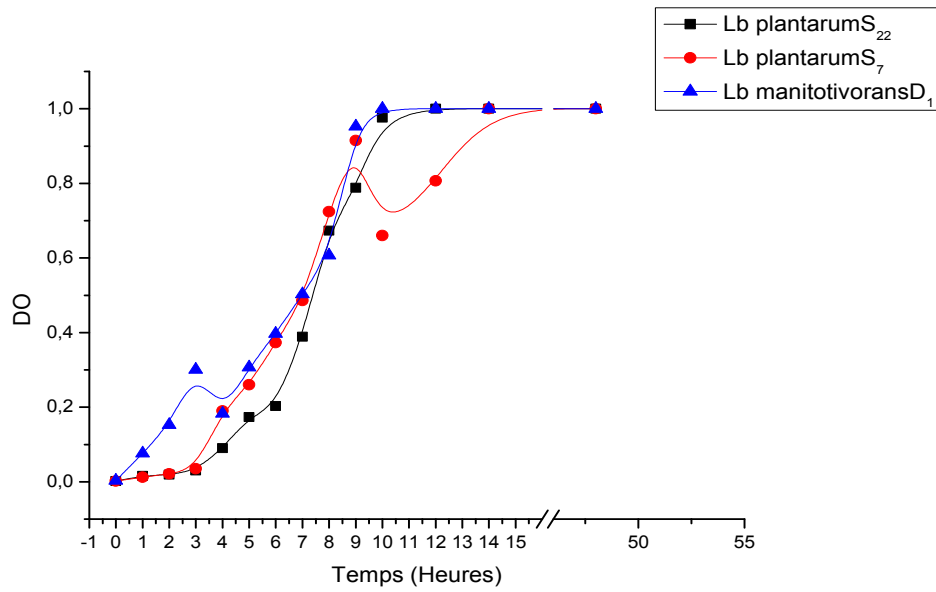
Les résultats de ces tests sont présentés dans les graphes suivants.

La vitesse de croissance est estimée par le calcul de  $\mu$  :

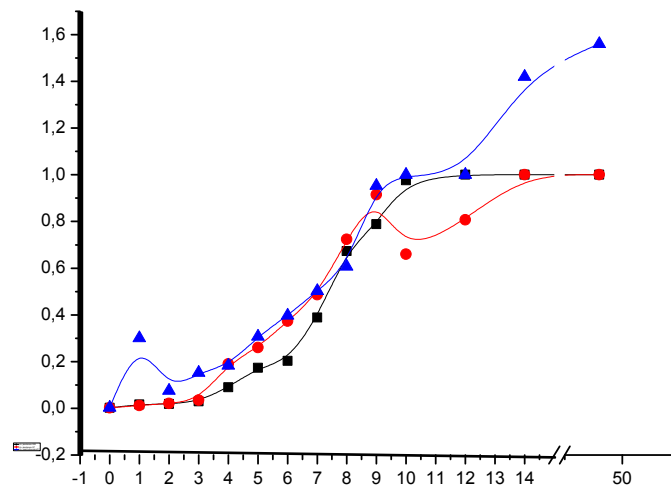
$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$$

Puis le calcul du temps de génération G est estimé par :

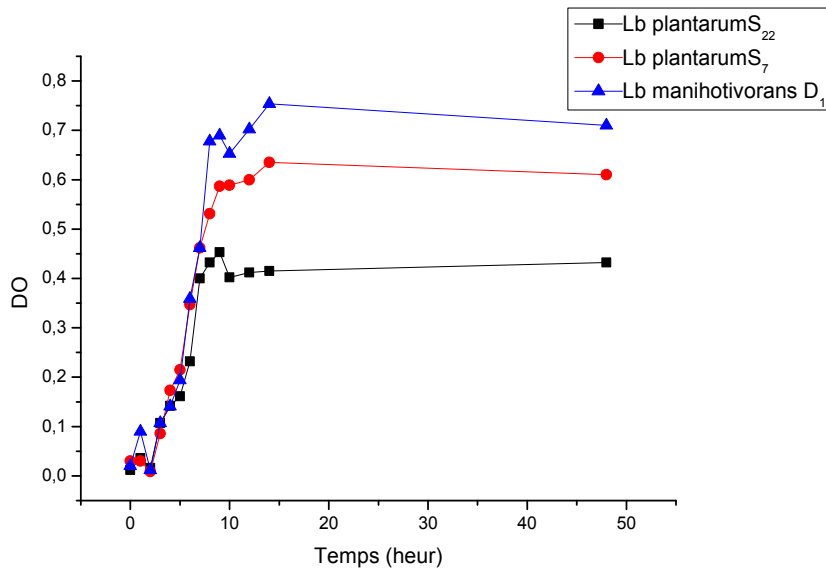
$$\mu = \frac{\ln 2}{G} \Rightarrow \frac{\ln 2}{\mu}$$



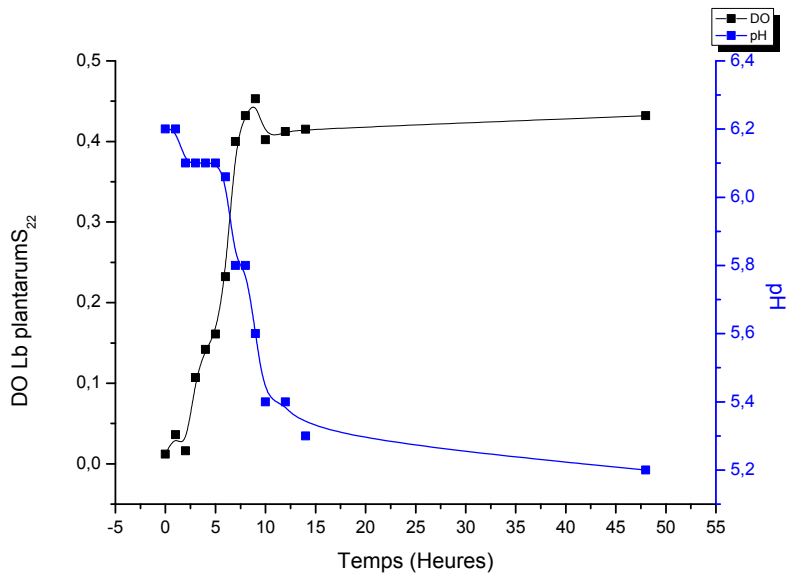
**Figure3.14 :** Croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS (Amidon/Glucose)



**Figure 3.15:** Croissance bactérienne exprimée en Do dans le milieu MRS Glucose.



**Figure 3.16:** Croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS Amidon.



**Figure 3.17:** Evolution de pH de la souche *Lb. plantarumS<sub>22</sub>* dans le milieu MRS Amidon.

Clicours.COM

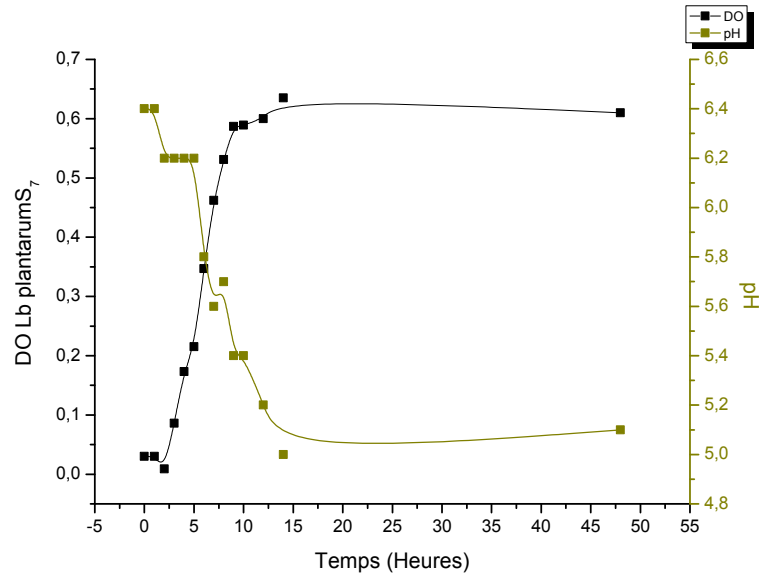


Figure 3.18 : Evolution de pH de la souche *Lb. plantarum* S<sub>7</sub> dans le milieu MRS Amidon.

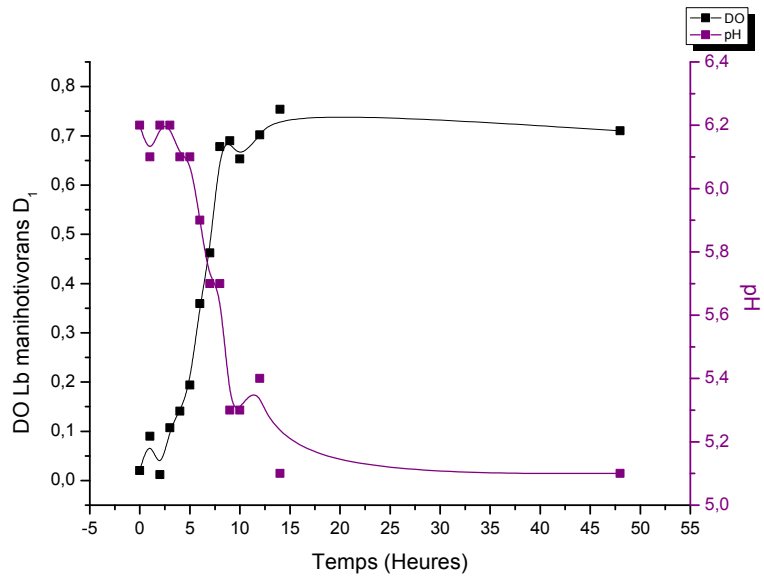
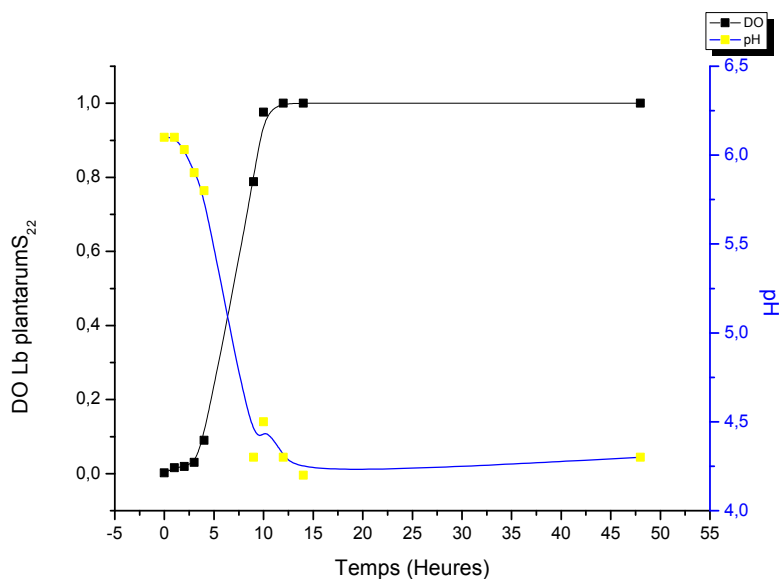
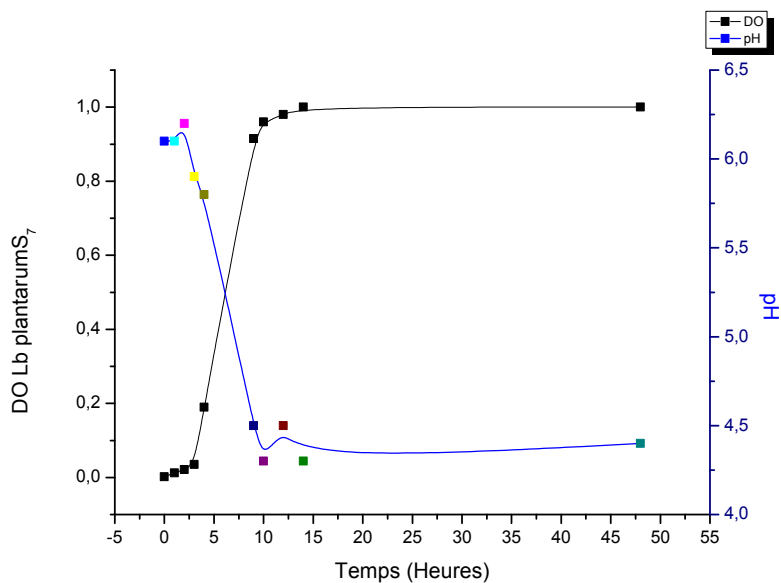


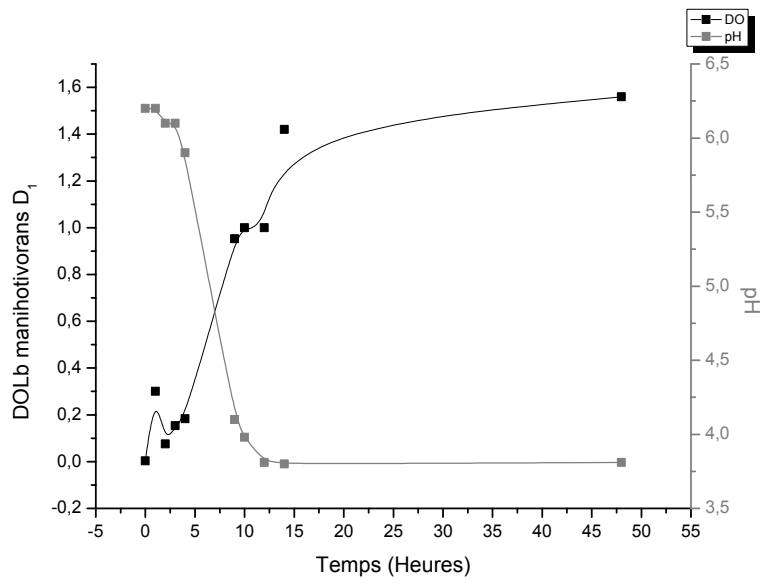
Figure 3.19: Evolution du pH de la souche *Lb. manihottivorans* D<sub>1</sub> dans le milieu MRS Amidon.



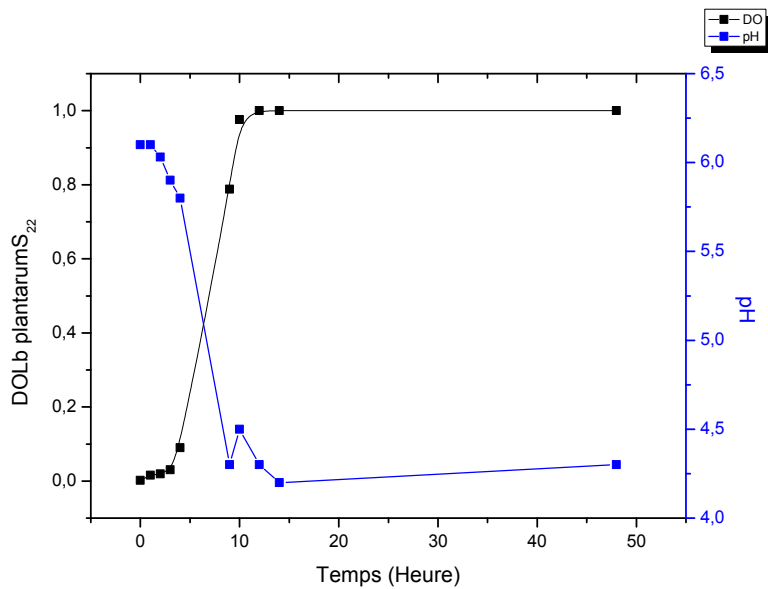
**Figure 3. 20 :** Evolution de pH du milieu MRS (Glucose+Amidon) en présence de la souche *Lb.plantarumS<sub>22</sub>*.



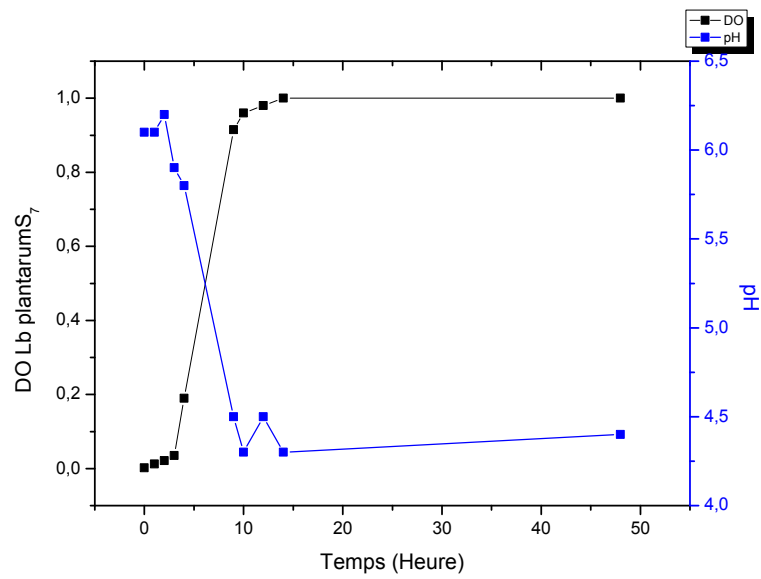
**Figure3.21 :** Evolution de pH du milieu MRS (Glucose+Amidon) en présence de la souche *Lb. plantarumS<sub>7</sub>*.



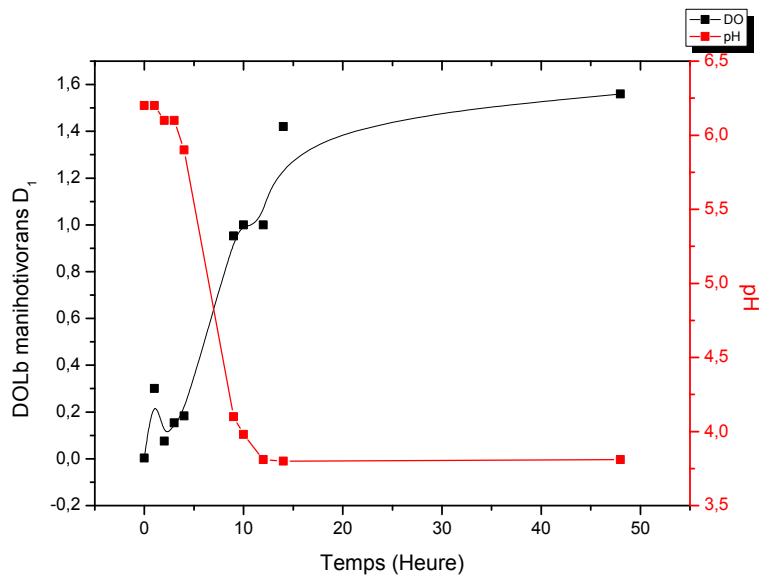
**Figure 3.22:** Evolution de pH du milieu MRS (Glucose+Amidon) en présence de la souche *Lb.manihotivorans* D<sub>1</sub>.



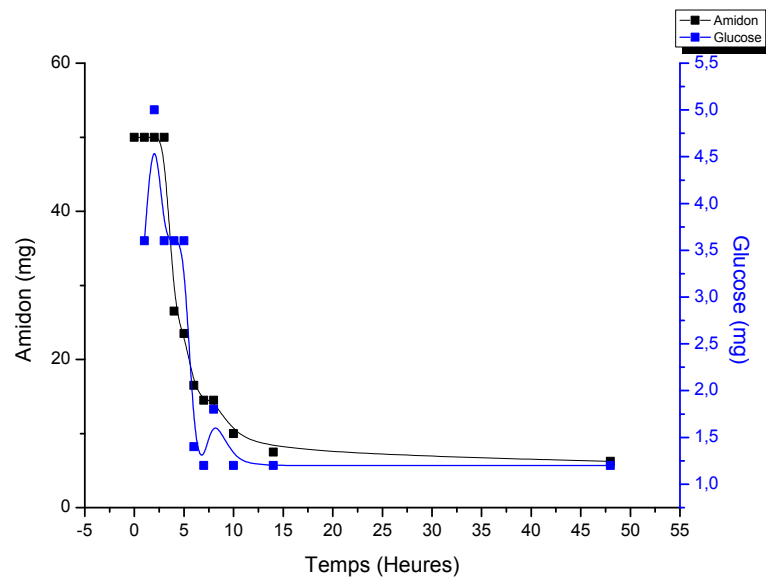
**Figure 3. 23 :** Evolution de pH du milieu MRS (Glucose) en présence de la souche *Lb. plantarumS<sub>22</sub>*.



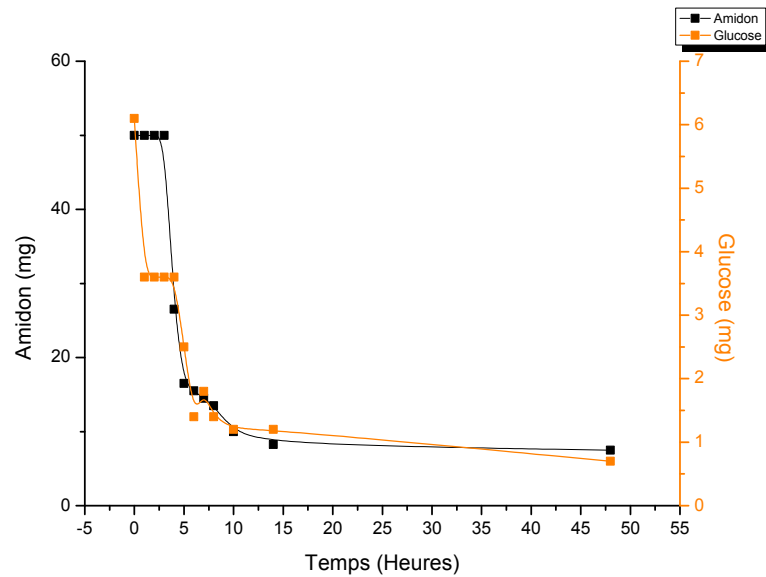
**Figure 3. 24 :** Evolution de pH du milieu MRS (Glucose) en présence de la souche *Lb. plantarum*S<sub>7</sub>.



**Figure 3. 25 :** Evolution de pH du milieu MRS (Glucose) en présence de la souche *Lb.manihotivorans* D<sub>1</sub>.

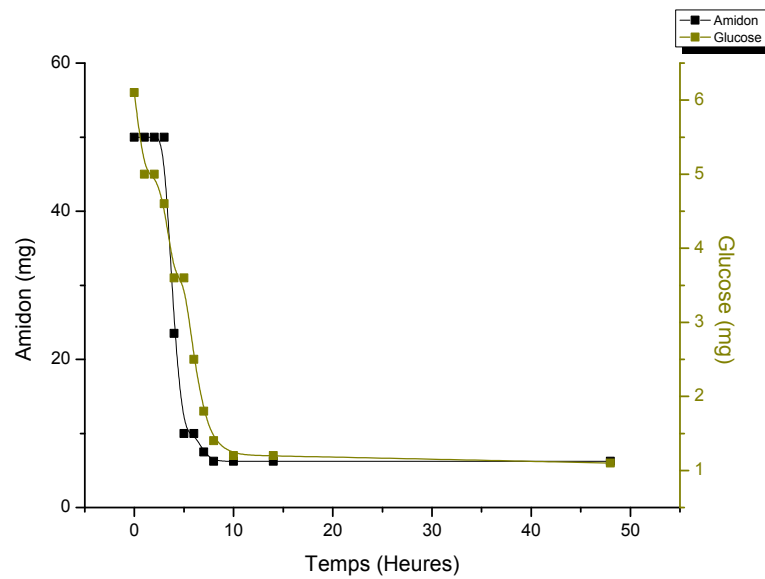


**Figure 3. 26 :** Assimilation des substrats carbonés par la souche *Lb. plantarum*S<sub>22</sub> dans le milieu MRS (Glucose+ Amidon).



**Figure 3.27:** Substrats carbonés résiduels présentés dans le milieu MRS (Glucose+ Amidon) assimilé par la souche *Lb. plantarum*S<sub>7</sub>.





**Figure 3.28:** Substrats carbonés résiduels présentés dans le milieu MRS (Glucose+ Amidon) assimilés par la souche *Lb. manihotorans* D<sub>1</sub>.

**Tableau :**

Milieux	Souches	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	G (min)
<b>MRS Glucose</b>	<i>Lb. plantarum</i> S22	0.78	52.8
	<i>Lb. plantarum</i> S22	1.1	37.2
	<i>Lb. manihotorans</i> D1	0.43	96.6
<b>MRS Amidon</b>	<i>Lb. plantarum</i> S22	0.183	226.8
	<i>Lb. plantarum</i> S22	0.413	100.68
	<i>Lb. manihotorans</i> D1	0.242	171.36
<b>MRS</b>	<i>Lb. plantarum</i> S22	0.170	244.2
<b>Glucose/ Amidon</b>	<i>Lb. plantarum</i> S22	0.234	177.66
	<i>Lb. manihotorans</i> D1	0.154	270

La croissance de nos souches de *Lb.manihotivorans*D1, *Lb.plantarum*S22 et *Lb.plantarum*S7 à différentes sources de carbone révèle une similarité de comportement avec une phase de latence chez les trois souches dure de 3 à 4h dans les deux milieux.

○ **Cinétique de croissance sur lieu MRSG :**

La concentration initiale des souches étaient de  $22,5 * 10^8$  UFC /ml.

L'analyse de régression des courbes fournit des valeurs de taux de croissance variable entre les 3 souches ; *Lb.plantarum* S7 présente une valeur maxde  $1.1 \text{ h}^{-1}$  avec un temps de génération de 37.2 min, *Lb.plantarum* S22 présente une valeur de  $\mu=0.78\text{h}^{-1}$  avec  $G=52.8\text{min}$  et *Lb.manihotivorans*D1qui présente une valeur minime par apport àS7 avec  $\mu=0.43\text{h}^{-1}$  et  $G=96.6\text{min}$  (figure 3.14).

○ **Cinétique de croissance sur lieu MRS A :**

L'analyse de régression des courbes fournit des valeurs de taux de croissance variable entre les 3 souches ; la souche*Lb. plantarum* S7 présente une valeur maxde  $0.413 \text{ h}^{-1}$  avec un temps de génération de 100.68 min, la souche*Lb.plantarum* S22 présente une valeur de  $\mu=0.183\text{h}^{-1}$  avec  $G=226.8 \text{ min}$  et la souche*Lb. manihotivorans* D1qui présente une valeur minime par apport à*Lb. plantarum*S7 avec  $\mu=0.2426\text{h}^{-1}$  et  $G=171.36\text{min}$  (figure 3.15).

○ **Cinétique de croissance sur lieu MRS A-G :**

L'analyse de régression des courbes fournit des valeurs de taux de croissance variable entre les 3 souches ; *Lb.plantarum* S7 présente une valeur maxde  $0.234 \text{ h}^{-1}$  avec un temps de génération de 177.66 min, *Lb.plantarum* S22 présente une valeur de  $\mu=0.170 \text{ h}^{-1}$  avec  $G=244.2 \text{ min}$  et *Lb.manihotivorans* D1qui présente une valeur minime par apport à*Lb.plantarum*S7 avec  $\mu=0.154 \text{ h}^{-1}$  et  $G=270\text{min}$  (figure 3.16).

○ **Cinétique d'assimilation de glucose et amidon:**

➤ *Sur milieuMRS G et MRS A :*

D'après les figures 3.17, 3.18,...jusqu'à 3.25 qui présentent l'évolution de pH par les *Lb.plantarum*S22, *Lb.plantarum*S7,*Lb.manihotivorans*D1 dans le milieu MRS A et MRS G ;La croissance des souches correspond à la diminution de pH (les figures suivantes) donc

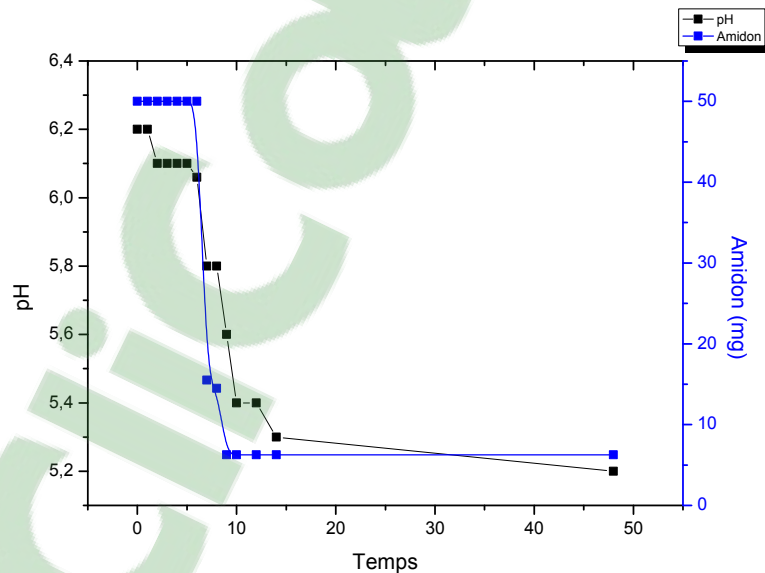
les bactéries lactiques utilisent le glucose ainsi l'amidon pour la production de l'acide lactique.

➤ *Sur milieu MRS AG :*

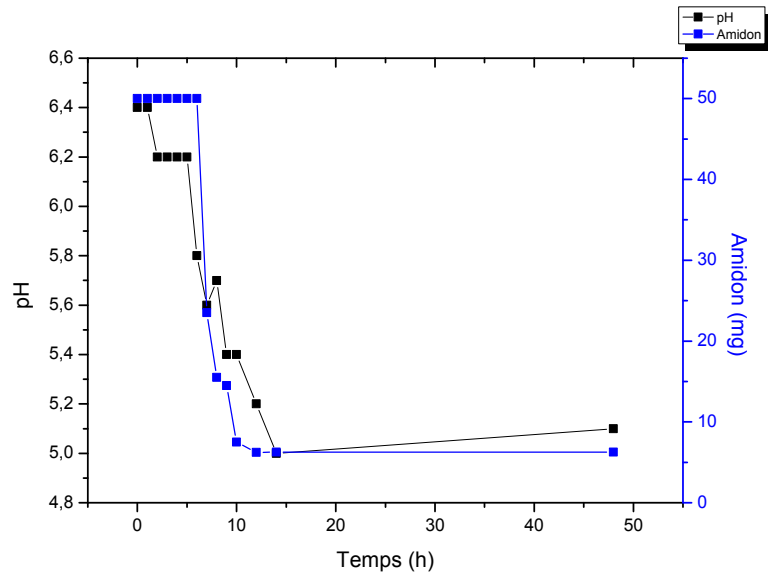
La croissance des souches présentent un temps de génération plus élevée par rapport aux autres milieux et selon les courbes présentent dans les figures 3.26, 3.27, 3.28 ; une phase stationnaire d'assimilation d'amidon est observée dans les trois graphes par rapport à une consommation directe de glucose chez les trois souches. donc les souches ont pris un temps pour s'adapter à la présence et l'utilisation des deux sources de carbone au même temps.

L'analyse progressive de DO correspond à la diminution des courbes de pH, glucose et amidon ; donc la croissance se traduit par la transformation ou l'assimilation de glucose et amidon pour produire l'acide lactique.

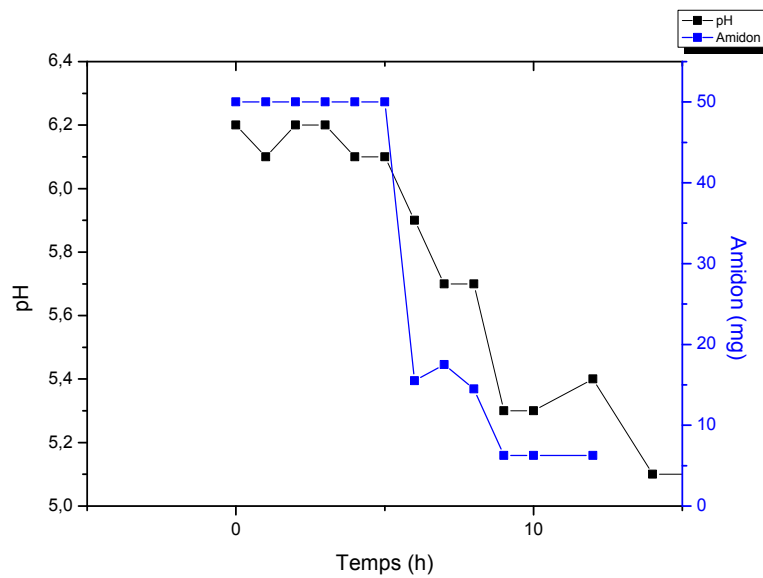
La présence de deux sources de carbone dans un milieu de culture qui contient une bactérie lactique permet de la croissance par la transformation de glucose en acide lactique, et pour les souches *Lb.plantarum*S22, *Lb.plantarum*S7 et *Lb.manihotivorans*D1 ont un pouvoir amylolytique peuvent utiliser les deux sources de carbone, et selon les résultats ces souches favorisent le glucose puis l'amidon.



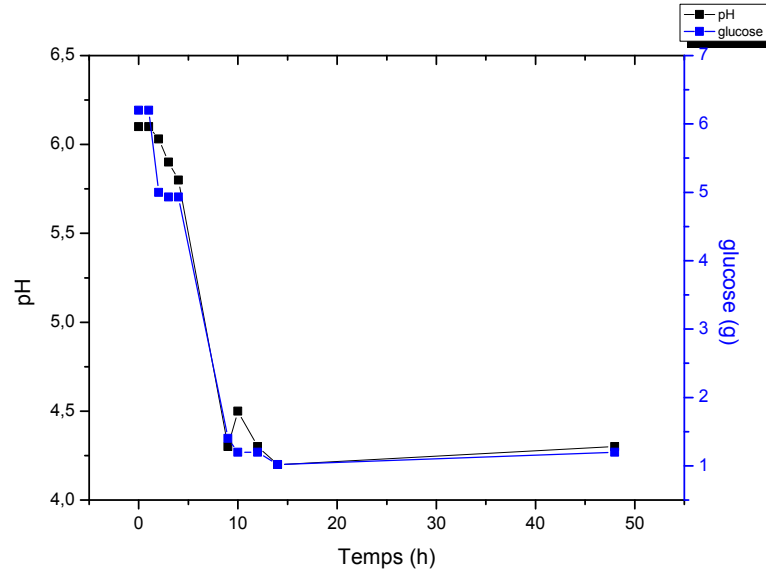
**Figure 3.29:** Production de l'acide lactique exprimée en pH de la souche *Lb.plantarum*S22 dans le milieu MRS Amidon.



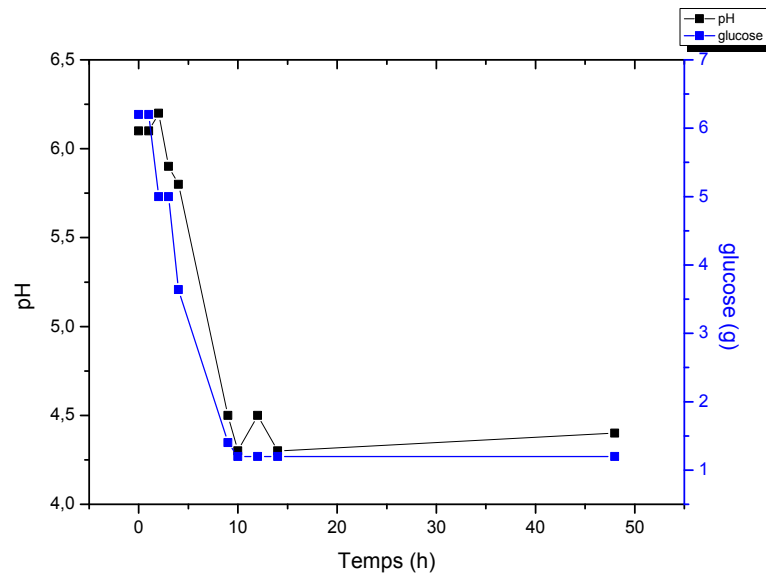
**Figure 3.30:** Production de l'acide lactique exprimée en pH de la souche *Lb.plantarumS7* dans le milieu MRS Amidon.



**Figure 3.31:** Production de l'acide lactique exprimée en pH de la souche *Lb.manihotivoransD1* dans le milieu MRS Amidon.

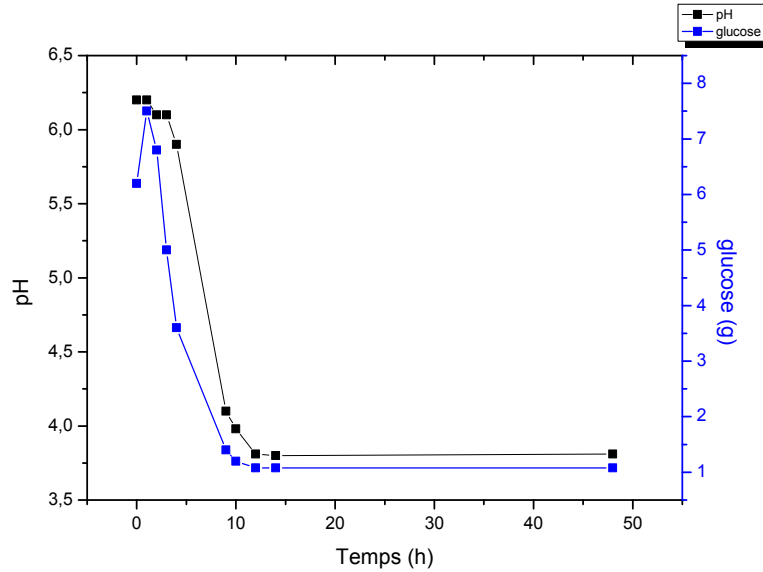


**Figure 3.32:** Production de l'acide lactique exprimée en pH de la souche *Lb. plantarum* S22 dans le milieu MRS glucose.



**Figure 3.33:** Production de l'acide lactique exprimée en pH de la souche *Lb. plantarum* S7 dans le milieu MRS glucose.

Clicours.COM



**Figure 3.34:** Production de l'acide lactique exprimée en pH de la souche *Lb.manihotivorans*D1 dans le milieu MRS glucose.

La présente étude a montré que l'hydrolyse de l'amidon ne limite pas la production d'acide lactique ; au cours de la fermentation de l'amidon, la production de l'acide lactique était inférieure à celui obtenu à partir de la fermentation du glucose, après 48h de fermentation sur milieu MRS A le pH atteint 5.1 pour la souche *Lb.manihotivorans* D1 ; et sur MRS G pH atteint 3.8 (figure 3.29 jusqu'à 3.34).

Cela peut être expliquée par la production des produits intermédiaires plus le glucose par la synthèse de l'enzyme amylase ce qui est suggéré par Guyot *et al.*, (2000) que l'amidon n'a pas été directement converti en sucres réducteurs ; les produits intermédiaires comme dextrine doivent d'abord être transformés avant d'entrer dans le métabolisme cellulaire, ce qui limite la production de l'acide lactique par rapport à la fermentation du glucose.

La fermentation de glucose présente des taux de croissance élevés par rapport à la fermentation d'amidon (*Lb.plantarum*S7 présente un taux de croissance de  $1.1h^{-1}$  sur MRS G, et  $0.41h^{-1}$  sur MRS A) qui est expliquée par l'utilisation de l'énergie issue de glucose pour la croissance.

Ce qui est pas le cas sur le milieu qui contient deux sources de carbones MRS G-A ; le taux de croissance était plus inférieurs (pour *Lb.plantarum* S7= 0.23h<sup>-1</sup>) ce qui peut expliquer par le flux d'énergie pour d'autre fonction de la cellule ou les propriété fonctionnelles liées à la structure de l'amidon été modifier par le pH du milieu (Guyot *et al.*,2000)

Diaz-Ruiz *et al.*, (2003) indiquent que *Lb.manihotivorans* et *Lb.fermentum*Ogi G1 ont une faible activité d'amylase, par contre il ya des souches telque *Lb.amylophilus* Gv6 peut convertir l'amidon en acide lactique en une seul étape de fermentation avec un rendement important de l'acide lactiques (Vishnu *et al.*,2002).

### 3.9. Dosage de l'activité amylosique

L'activité des -amylases est mesurée selon la méthode de Fossi et Tavea (2013), une unité de l'activité d'amylase est définie comme quantité de l'enzyme capable d'hydrolyser 1g d'amidon soluble pendant 60min dans les conditions expérimentales.

L'activité de l'enzyme de  $\alpha$  amylase été mesurée par l'équation suivante :

$$\text{Activité enzymatique UI /ml} = \frac{\text{Quantité de produit } (\mu\text{mol})}{\text{Volume enzymatique (ml)} \times \text{Temps d'incubation(min)}}$$

À partir de cette équation, les souches de *Lb. plantarum*S22 et S7, *Lb. manihotivorans*D1 et *Weissellaminor*S7'présentent une activité correspond à 6.79UI/ml ,7.59UI/ml, 6.42UI/ml et 5,67UI/ml respectivement ; ces résultats sont comparables à celles illustrés par Cherry *et al.*,2004 et Saxena*et al.*,2007 lors de leurs étude sur le dosage de l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase quelle peut atteindre le maximal lors de l'utilisation unique de l'amidon 107U//ml et 67,1 U/ml respectivement ; montrant une faible concentration de l'activité enzymatique qui peut être due aux conditions de culture qui affect sur la croissance des souches et par la suite sur la production de l'enzyme( Fossi et Tavea, 2013).

#### 3.9.1Les propriétés physiologiques de l'activité enzymatique de $\alpha$ amylase

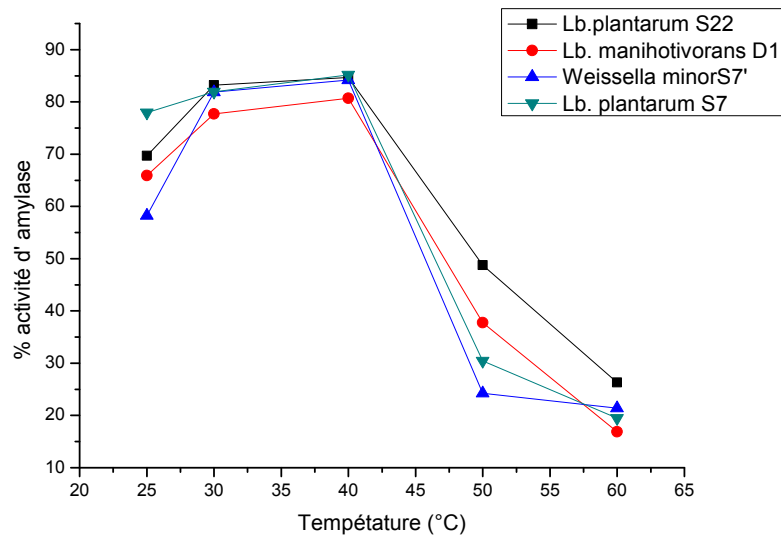
L'amidon est le composé organique d'origine végétale la plus abondante après la cellulose. Les principales sources sont les céréales, racines et les tubercules ; l'enzyme $\alpha$  amylase ( $\alpha$ -1,4-glucane-4-glucanohydrolases; EC 3.2.1.1) est un enzyme qui catalyse l'amidon, une étape importante vers la transformation de l'amidon en unités simples qui

peuvent être assimilés par le organisme. Cette enzyme est répandue chez les bactéries aérobies et anaérobies (Vihinen et Mantsala, 1989).

Généralement les bactéries lactiques ne produisent pas les amylases ; cependant cette propriété a été observée chez certains genres en particulier *Lactobacillus plantarum*(Giroud et Cunny, 1997) ; *Lactobacillus amylovorus* (Giroud et Cunny, 1997), *Lactobacillus manihotivorans*(Aguilaret *et al.*, 2000 ; Guyot *et al.*,2000).

L'étude de propriété physiologique de l'activité enzymatique de  $\alpha$  amylase été après une culture dans des conditions qui ont pour but de favoriser la production de l'enzyme.

La mesure de l'activité enzymatique est effectuée par le dosage d'amidon résiduel dans différents température et différents pH.



**Figure3.35** :Effet de la température sur l'hydrolyse de l'amidon de l'extrait enzymatique.

Après l'incubation de mélange réactionnel à des températures varient de 25, 30, 40, 50, 60°C ; la figure3.35 Montre l'effet de température sur l'activité enzymatique de  $\alpha$  amylase exprimé par le pourcentage de transformation d'amidon. Les tests d'activité montre que toute les souches ont présenté presque le même profile de l'activité d' $\alpha$  amylase à différent température.

Plus que la quantité de l'amidon résiduel est minime plus que l'activité enzymatique est supérieure ; En générale l'analyse régressive des courbes montre que l'activité est minime



à 60°C pour toute les souches (figure 3.35 et tableau 3 .7) ; et supérieure à 40°C avec un taux d'hydrolyse d'amidon correspond à 85.19% pour *Lb.plantarum*S7 par rapport à la *Lb.manihotivorans*D1 qui représente un taux minime d'hydrolyse (80.72%).

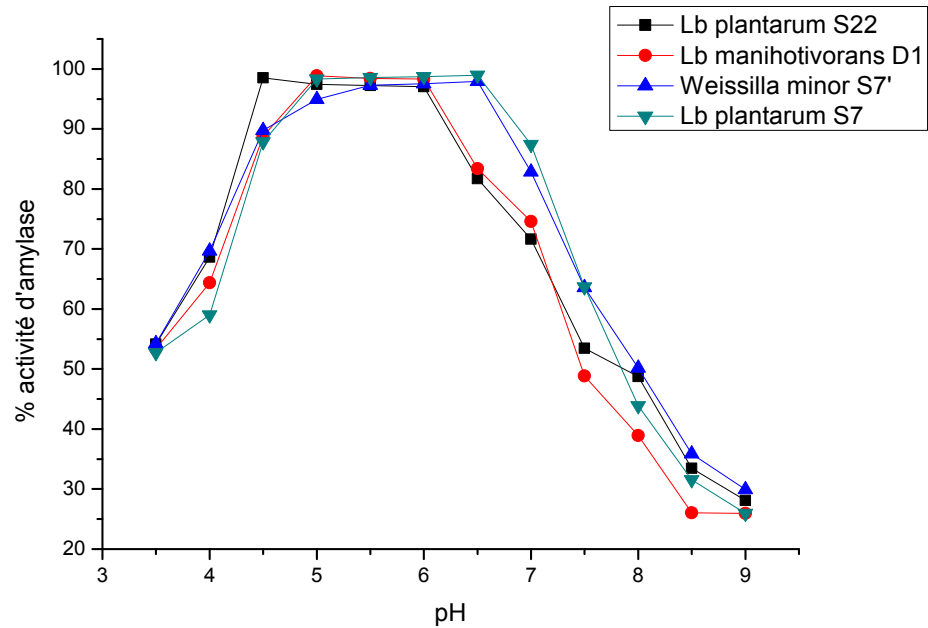
D'après les données de tableau suivant, plus que la température augmente plus que la quantité de l'amidon résiduel augmente ; cela est traduit par l'effet de température élevé sur la diminution de l'activité de  $\alpha$  amylase.

**Tableau 3 .6 :**La quantité d'amidon résiduel, transformé et le pourcentage de taux d'hydrolyse par les souches à différent température °C.

	<i>Lb.plantarum</i> S22			<i>Lb. plantarum</i> S7			<i>Lb.manihotivorans</i> D1			<i>Weissellaminor</i> S7'		
	AR	AT	%	AR	AT	%	AR	AT	%	AR	AT	%
<b>25°C</b>	15.15	34.85	69.7	11.01	38.98	77.97	17.03	32.96	65.93	20.89	29.11	58.23
<b>30°C</b>	8.40	41.6	83.2	9.04	40.95	81.91	11.15	38.84	77.69	9.06	40.93	81.87
<b>40°C</b>	7.64	42.35	84.70	7.4	42.59	85.19	9.63	40.36	80.72	7.9	42.09	84.18
<b>50°C</b>	25.62	24.38	48.76	34.78	15.22	30.44	31.12	18.87	37.75	37.88	12.12	24.24
<b>60°C</b>	36.83	13.16	26.33	40.26	9.73	19.47	41.55	8.45	16.90	39.3	10.7	21.4

**AR :** amidon résiduel(mg), **AT :** amidon transformé(mg), **%** de transformation d'amidon.

Après l'incubation de mélange réactionnel à températures 30°C dans un intervalle de pH 3.4, 4, 4.4, 5, 5.4, 6, 6.4, 7, 7.4, 8, 9 ; la figure 3.36 Montre l'effet de pH sur l'activité enzymatique de  $\alpha$  amylase exprimé par le pourcentage de transformation d'amidon.



**Figure 3. 36 :** Effet de pH sur l'hydrolyse de l'amidon de l'extrait enzymatique.

La figure 3.36 illustre l'effet de pH sur l'activité enzymatique de  $\alpha$  amylase exprimé par le pourcentage d'hydrolyse d'amidon ; la variation de pH de 3-9 révèle que l'extrait enzymatique est actif au pH de 4 à 5.5 comme montre le tableau 3.6 qui représente la quantité d'amidon transformée.

**Tableau 3.7** : La quantité d'amidon transformé par les souches à différent pH.

pH	Amidon transformée (mg)			
	S22	D1	S7'	S7
3.5	27.06	26.67	27.13	26.36
4	34.31	32.17	34.82	29.51
4.5	49.25	44.39	44.88	43.92
5	48.72	49.42	47.45	49.17
5.5	48.61	49.20	48.65	49.27
6	48.52	49.16	48.77	49.34
6.5	40.86	41.69	48.97	49.47
7	35.82	37.30	41.42	43.70
7.5	26.73	24.41	31.79	31.83
8	24.36	19.47	25.09	21.93
9	14.05	12.98	14.96	12.97

L'investigation des propriétés d'activité de l'extrait brut à différents températures et différents pH permettre de constaté que l'activité de  $\alpha$  amylase est active à température 40°C pour les souches *Lb. plantarum*S7, *Weissellaminor*S7', *Lb. manihotivorans*D1 et la souche *Lb. plantarum*S22 et à pH entre 4 et 5.5 pour toute les souches ces résultats sont similaire au travaux de Fossiet *al.*, (2011), Fossiet Tavea, (2013).

Généralement les amylases thermophile se trouvent chez les genres de *Bacillus* et *Thermococcus* que *Bacillus cohnii* US 147 (Gorbelet *al.*, 2009) *Thermococcus aggregans* (Canganella *et al.*, 1994) et pour les bactéries lactiques *Lactobacillus fermentum* 04BBA19 produit amylase thermophile (Fossiet *al.*, 2011).

### 3.10 Activité antagoniste

Les bactéries lactiques (BL) ont été utilisées traditionnellement pour améliorer l'arôme, la texture, éviter une détérioration rapide des produits laitiers et de la viande, les actes ainsi que les légumes et l'ensilage (Frazier et Westhoff, 1978 ; Beck, 1978) pour ce volé d'étude l'investigation des propriétés technologique a été réaliser sur les souches qui ont un pouvoir amylolytique *Lb.plantarum*S22etS7, *Lb.manihotivorans*D1et*Weissellaminor*S7'.

#### 3.10.1 Méthode directe

La Méthode directe vise à mettre en évidence le potentiel antibactérien des quatre souches et à déterminer le spectre d'activité de ces isolats envers les souches pathogènes ; *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli*ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Listeria innocua* ATCC 33090 .



**Figure 3.37** : Résultats du test de l'activité antibactérienne de *Lb.plantarum* S22 et S7, *Lb.manihotivorans* D1 et *Weissellaminor* S7'.

Les quatre souches testées ont présenté une activité inhibitrice vis-à-vis des souches indicatrice avec des diamètres de halos d'inhibition qui varient entre 0,2 et 1,9 cm comme il est montré au Tableau 3.5.

Les souches S<sub>7</sub>, S<sub>22</sub> de *Lb.plantarum* et D<sub>1</sub> de *Lactobacillus manihotivorans* ont un effet inhibiteur envers toutes les souches pathogènes, cette inhibition diffère entre les souches puisque la souche *Lb.manihotivorans* D1 a aucun effet sur *Staphylococcus aureus* et *Listeria ivanovii* ; la souche S7' *Weissellaminor* présente aucun effet inhibiteur envers *Listeria ivanovii* .

#### 3.10.2 Méthode indirecte

L'observation des zones d'inhibitions due au surnageant des souches tableau(3.7) a confirmée les résultats obtenue par la méthode direct envers les souches pathogènes ; celle-ci conduit à la rechercher l'agent inhibiteur responsable. Le poursuivi d'étude été par la mise en évidence de l'agent inhibiteur des surnageant des souches.

**Tableau 3.8:** Diamètres des zones d'inhibition (cm) des souches.

Souches indicatrices / Souches inhibitrices	<i>Lb.plantarum</i> S22	<i>Lb.plantarum</i> S <sub>7</sub>	<i>Weissellaminor</i> S <sub>7</sub>	<i>Lb.manihotivorans</i> D <sub>1</sub>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	1.2	0.8	0.6	0.9
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	1.4	0.8	1.1	0.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	/	/	0.5	0.9
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	0.8	0.8	/	1.1
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	0.8	/	/	0.9

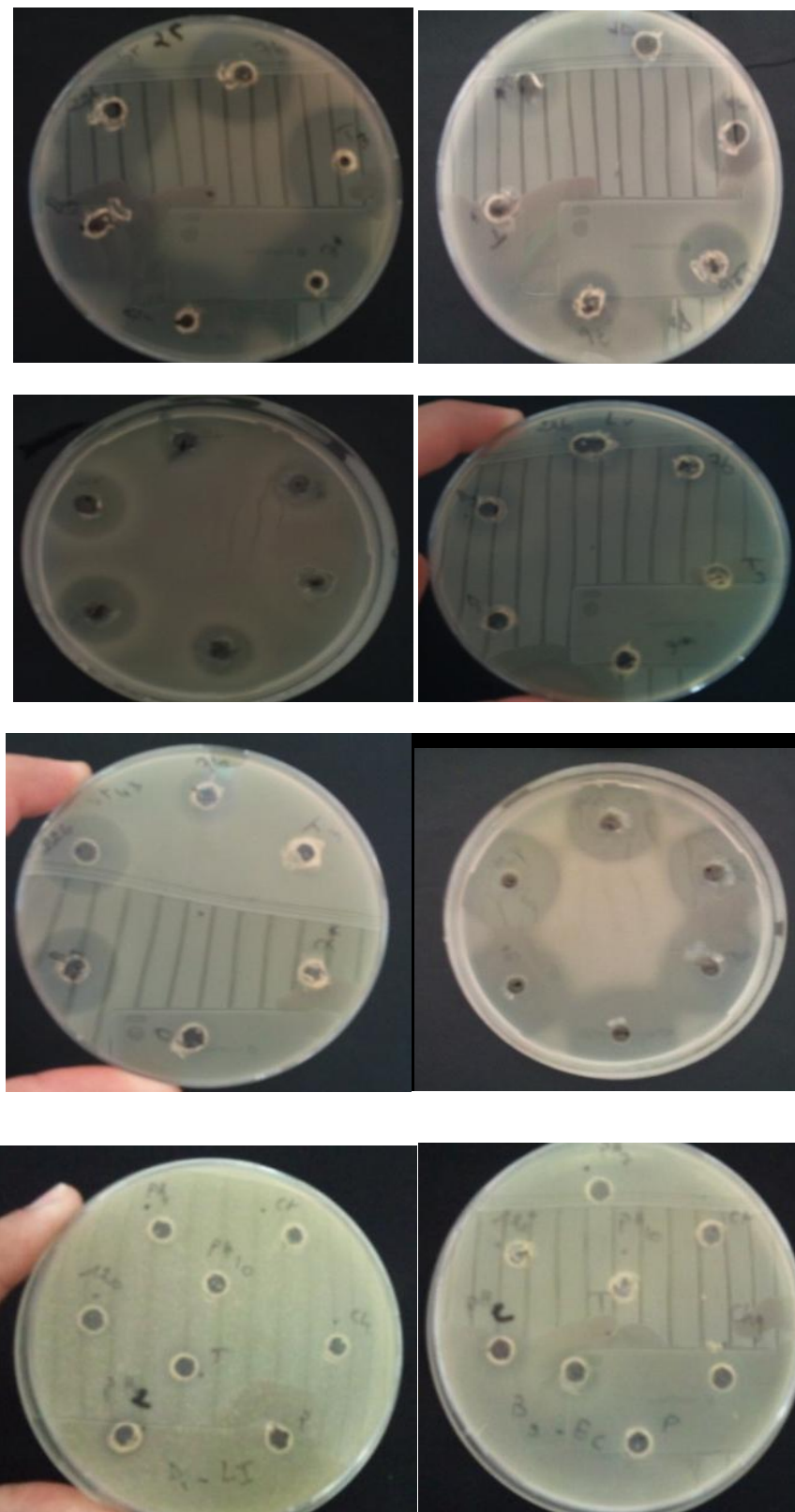
### 3.11 Recherche de la nature de l'agent inhibiteur

A ce stade de l'étude, l'effet inhibiteur observé peut être attribué à n'importe quel facteur antibactérien produit par les souches étudiées tel que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, une bactériocine ou une synergie entre certains d'entre eux (Ennahar, 1995 ; Zheng *et al.*, 1994).

Le traitement des surnageant par la température, et les enzymes protéolytiques voire (matériel et méthodes) a pour but de savoir la nature de substance inhibitrice :

Les résultats des surnageant traitée par la température et les enzymes protéolytiques déjà neutralisée pour éliminée l'effet de l'acidité, a montée une absence des zone inhibitrice vers toute les souches pathogènes.

D'autre part les surnageant des souches a été ajustée a pH=2 et pH=7, présente une inhibition ; les souches de *Lactobacillus manihotivorans* S7, S22, S7' ; inhibent *Staphylococcus aureus* et la souche *Lactobacillus manihotivorans*D1 inhibe *Escherichia coli* tan disques *L.manihotivorans* S22 inhibe *Listeria innocua* et il ya que *Weissellaminor* S7' inhibe *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 3.38** : Effet du surnageant des souches sur les souches pathogènes.

**Tableau 3.9** : Effet de traitement de température, pH et les enzymes protéolytiques sur les surnageant des souches.

Traitements	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853				<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119				<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090			
	S22	S7	S7'	D1	S22	S7	S7'	D1	S22	S7	S7'	D1
Température												
<b>12à°C / 10 min</b>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
pH												
<b>2</b>	/	/	0.6	0.7	0.8	0.8	/	1.2	0.9	/	/	0.7
<b>7</b>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Enzymes protéolytiques												
<b><math>\alpha</math>-chymotrypsine</b>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Pepsine</b>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Catalase</b>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

**Tableau 3.10 suite** : Effet de traitement de température, pH et les enzymes protéolytiques sur les surnageant des souches.

Traitements	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300				<i>Escherichia coli</i> ATCC25922			
	S22	S7	S7'	D1	S22	S7	S7'	D1
Température								
<b>12à°C / 10 min</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
pH								
<b>2</b>	1.2	0.8	0.8	0.9	1.2	1	1.1	0.9
<b>7</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
Enzymes protéolytiques								
<b><math>\alpha</math>-chymotrypsine</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Pepsine</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Catalase</b>	/	/	/	/	/	/	/	/



Ces résultats permettent de savoir quelle est l'agent inhibiteur envers ces pathogènes, puisque on observe aucune zone inhibitrice à pH=7 (tamponnée) et on compare ces résultats avec celle qui est présentée dans le tableau (3.5). Ces inhibitions dues à la production d'acide lactique par les souches S22, S7, D1 et l'acide acétique secrété par *Weissella minor* qui sont l'un des principaux facteurs inhibiteurs dans les végétaux fermentés et l'ensilage.

McDonald *et al.*, (1991) a signalé que l'inhibiteur majeur de la flore indésirable au cours de la fermentation de l'ensilage est la diminution rapide du pH et des conditions d'anaérobioses ; L'effet antimicrobien des acides organiques lactique ou acétique affecte les propriétés membranaires de la cellule telle que le potentiel de la membrane et l'intégrité de la cellule (Hemmes *et al.*, 2002).

Ammor *et al.*, (2007) ont noté que l'effet antimicrobien de l'acide réside dans la réduction du pH, et dans l'action de molécules d'acide non dissociées. Une baisse rapide du pH au cours de l'ensilage a un effet inhibiteur initial sur le nombre des entérobactéries (Lindgren *et al.*, 1988).

Ces résultats permettent de savoir que les souches *Lb. plantarum* S22 et S7, *Lb. manihottivorans* D1 et *Weissella minor* S7' peuvent minimiser le nombre des entérobactéries et d'autres germes pathogènes dans l'ensilage par la production des acides organiques au cours de leurs croissances qui permet une longue protection et conservation de l'ensilage.

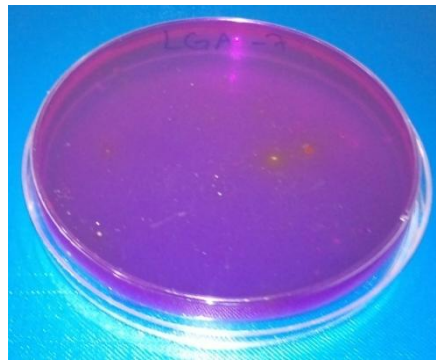
### 3.12 Isolement des *Propionibacterium* à partir de l'ensilage de sorgho

Freudenreich et Orskov-Jensen isolés la première bactérie propionique acide de fromage Emmental en 1906 (Jan *et al.*, 2007).

Dans les premières études, les bactéries de l'acide propionique ont été exclusivement isolées du fromage, du lait et des produits laitiers. L'habitat naturel peut aussi être le tube digestif des ruminants (Rinta-Koski *et al.*, 2001). Des techniques d'identification par PCR ont permis d'isoler des propionibactéries à partir des produits laitiers du sol et aussi du fourrage (Rossi *et al.*, 1999). Les propionibactéries sont Gram positif, irrégulière, non sporulée, immobiles, catalase positive (Vorobjeva, 1999). Caractérisées par un arrangement des caractères chinois.

Après incubation de 6 jours en anaérobiose par l'utilisation de jar; les bactéries propioniques se présentent sous forme de colonies lenticulaires ou de bords de diamètre égal ou

supérieur à 0.5mm entourées d'une zone d'acidification de 1.5mm de coloration jaune due à la diminution de pH par la fermentation de glycérol par les bactéries propioniques sur un fond violet (Thierry et Madec .1995) ; aucun de ces caractères était présenté sur toute les boites de dénombrement de suivie de l'évolution de l'ensilage, Ces résultats peuvent s'expliquer par les conditions environnementale (l'adaptation physiologique) dont le pH optimale pour la croissance des bactéries propioniques de 5.8 jusqu'à 8.5 (Jan *et al.*, 2007), à l'inverse ce qui présent dans l'ensilage avec une acidité remarquable (pH=3.8).



**Figure3.39** : Isolement de la flore propionique sur milieu LGA.

## *Conclusion & perspectives*

## Conclusion générale

Dans ce présent travail, nous avons essayé d'étudier le comportement des bactéries lactiques au cours de l'ensilage de sorgho et la sélection des souches actives qui sont utiles pour la stabilité anaérobie de la fermentation des fourrages.

La première étape de cet étude consiste à l'isolement et identification de 27 isolats lactiques à différentes étapes de l'ensilage de sorgho, comme étant phénotypiquement appartenant au genre : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella* et *Leuconostoc* ; les tests physiologique et biochimique ont révélés l'appartenance probable à plusieurs espèces : *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus manihotivorans*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Weissella cibaria*, *Weissella minor*, *Weissella soli*, *Weissella viridescense* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Les propriétés technologiques de ces souches ont été déterminées par la capacité à hydrolyser les majeures macromolécules qui peuvent exister dans les végétaux tels que la cellulose, l'amidon et les protéines ; aucune activité protéolytique ou cellulolytique a été observée, les souches de *Lactobacillus plantarum* S22 et S7, *Lactobacillus manihotivorans* D1 et *Weissella minor* S7' avec une capacité à hydrolyser l'amidon soluble et la production des polysaccharides ; la croissance sur milieu MRS à différent source de carbone permettre de savoir que le glucose est la source la plus utilisée directement ; d'autre part l'amidon présente une autre source de carbone utilisable par les bactéries lactiques qui ont un pouvoir de synthétisé et produire  $\alpha$  amylase ; cette utilisation peut conduire à des faible rendements de croissance qui ont été causés par un flux d'énergie dirigé vers d'autre fonctions cellulaires; l' $\alpha$  amylase produites par ces souches caractérisée par une bonne activité à température plus au moins supérieur et à pH acide.

Les bactéries lactiques avec leur activité amyliques omniprésentes dans l'ensilage du Sorgho utiles pour une bio-préservation du fourrage, et qui résistent aux conditions défavorables tels que la compétition nutritionnelle et la carence en source de sucres fermentescibles, qui montrent une acidité remarquable suite a la production de l'acide lactique qui est le caractère majeur de la stabilité anaérobie de l'ensilage.

Cette étude mériterait d'être poursuivie, afin d'accomplir les objectifs pour une meilleure application. La sommation de toutes ces considérations constitue une exhortation à l'usage de tels auxiliaires en bio-préservation des fourrages par les bactéries lactiques amylolytiques omniprésentes dans l'ensilage du Sorgho en Algérie. Par la suite, et pour une meilleure caractérisation de ces souches lactiques, il serait souhaitable d'utiliser des outils moléculaires, censés d'être plus fiables en terme d'identification concise, une étude approfondi sur la synthèse et l'activité de l'enzyme  $\alpha$  amylase, l'application des souches amylolytiques dans la préparation des ensilages mixte donnant naissance à une nouvelle forme d'aliments de bétail bénéfiques surtout pour les vaches laitières en Algérie.

# *Références bibliographique*

## Références bibliographique

Abriouel H., Ben Omar N., Pérez Pulido R., López RL., Ortega E., Cañamero MM et Gálvez A. 2008. Vegetable Fermentations, Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods. Chapter 5. Food Microbiol. Food Saf. pp. 145-161, DOI: 10.1007/978-0-387-74520-6\_5.

Agati VJP., Guyot J., Morlon-Guyot P et Talamond, Hounhouigan DJ. 1998. Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe and ogi) from Benin. J Appl Microbiol. 85:512–20.

Altaf M., Naveena BJ et Reddy G. 2007a. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. Biores Technol. 98:498–503.

Altaf M., Naveena BJ et Reddy G. 2005. Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L(+) lactic acid from starch by amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation. Food Technol Biotechnol. 43:235–9.

Altaf M., Naveena BJ., Venkateshwar M., Kumar EV et Reddy G. 2006. Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract—optimization by RSM. Process Biochem. 41:465–72.

Altaf M., Venkateshwar M., Srijana M et Reddy G. 2007b. An economic approach for L(+) lactic acid fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using inexpensive carbon and nitrogen sources. J Appl Microbiol. 103:372–80.

Anuradha R., Suresh AK et Venkatesh KV. 1999. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. Process Biochem. 35:367–75.

Assoumaya C. 2007. Etude des facteurs limitant l'ingestibilité chez les petits ruminants valorisant des fourrages tropicaux. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).

Axelsson L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A, editors. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd rev. and exp. ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 1-66.

Babayemi. O.J. 2009. Silage quality, dry matter intake and digestibility by West African dwarf sheep of Guinea grass (*Panicum maximum* cv Ntchisi) harvested at 4 and 12 week regrowths. African Journal of Biotechnology; 3:983-8.

Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M et 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 0 scien.tech. 23 : 30-37.

Badis A., Guetarni D., Moussa Boudjema B., Henni DE et Kihal M. 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goats milk of four Algerian races. Food Microbiol. 21(5):579-588.

Bendimerad N., Kihal M., Berthier F. 2012. Isolation, identification and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional raib type milk fermentation. Dairy Sci. Technol. 92 :249-264.

Bissonnette F., Labrie S., Deveau H., Lamoureux M., Moineau S. 2000 Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged cheddar cheese. J. Dairy Sci. 83 : 620-627.

Brabet C., Chuzer G., Oufour D., Raimbault M et Giraudt J. 1996. Improving cassava sour starch quality in Colombia, Progress in Research and Development, CIRAD chapter 27. ISBN 958-9439-88-8 pp 242-246

Brisson J., Bertiaume R., Michaud R et Savoie P.2008. Les traitements des fourrages de la récolte à la vache. Symposium sur les bovins laitiers. Centre de conférence en agriculture et agroalimentaire du Québec.

Calderon M., Loiseau G., Guyot JP. 2001.Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. J Appl Microbiol. 90:508–16.

Carr FJ., Chill D et Maida NR .2002. The lactic acid bacteria: With literature Survey. Curr. Rev. Microbiol. 28(4):281-370.

Carreiu G et Luquet F-M. 2008. Bactéries lactiques de la génétique aux ferments .Lavoisier.

Champagne.A .2007 . Potentiel antagoniste des bactéries lactiques épiphytes de plantes fourragères contre le développement des clostridies dans l'ensilage.

Chatterjee M., Chakrabarty SL., Chattopadhyay BD et Mandal RK. 1997.Production of lactic acid by direct fermentation of starchy wastes by an amylase-producing *Lactobacillus*. Biotechnol Lett.19:873–4.

Chatterjee M., Chakrabarty SL., Chattopadhyay BD et Mandal RK. 1997. Production of lactic acid by direct fermentation of starchy wastes by an amylase producing *Lactobacillus*. Biotechnol Lett;19:873–4.

Cheng P., Muller RE., Jaeger S., Bajpai R et Jannotti EL. 1991.Lactic acid production from enzyme thinned cornstarch using *Lactobacillus amylovorus*. J Ind Microbiol.7:27–34.

Cherry HM, Hussain T et Anwar MN. 2004. Extracellular glucoamylase from isolate of *Aspergillus fumigates*. Pak. J. Biol. Sci. 1988- 1992.

Datta R., Tsai SP., Bonsignor P., Moon S et Frank J. 1995 Technological and economical potential of polylactic acid and lactic acid derivatives. FEMS Microbiol Rev.16: 221–31.



Datta R., Tsai SP., Bonsignor P., Moon S et Frank J. 1995. Technological and economical potential of polylactic acid and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol Rev.*16:221–31.

Datta RS., Sai PT., Patric B., Moon SH et Frank JR.1993. Technological and economic potential of polylactic acid and lactic acid derivatives. International congress on chemicals from biotechnology, Hann- over, Germany. p. 1–8.

Dehaynin N.2007. Utilisation Du Sorgho en alimentation animale, Ecole Nationale Veterinaire De Lyon, L'universite CLAUDE-BERNARD - LYON I.

Demarquilly C. 1981. Nutritive value of grass under grazing conditions. 85: 59-72,121.

Dí'az-Ruiz G., Guyot J. P., Ruiz-Teran F., Morlon-Guyot J., et Wachter1 C. 2003. Microbial and Physiological Characterization of Weakly Amylolytic but Fast-Growing Lactic Acid Bacteria: a Functional Role in Supporting Microbial Diversity in Pozol, a Mexican Fermented Maize Beverage. *Applied and environmental microbiology.* 4367–4374

Drici H., Gilbert C., Kihal M et Atlan D.2010. Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. *J. Appl. Microbiol.* 108:647-657.

Dubos R.1928. The decomposition of cellulose by aerobic bacteria .*J. Bacteriol.* 15:223-234.

Elbadaoui M. S.2001.Utilisation de l'ensilage de sorgho dans l'alimentation des vaches laiteries et des génisses de remplacement. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. B.P. 6202-Instituts, 10101 Rabat.

Fang J., Matsuzaki M., Suzuki H., Xu .C, Cai Y., Horiguchi K.et Takahashi T.2011.Fermentation quality, digestibility and unhulled rice excretion of forage paddy rice silage prepared by different harvester types.

FAO .2004.Conservation du foin et de la paille. Pour les petits paysans et les pasteurs.

FAO/INRA. 2006, Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques ;

Filya I., Sucu E et Karabulut A.2004.The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. *J. Appl. Microbiol.* 97:818–826.

Filya I., Sucu E., Karabulut A. 2004. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. *J. Appl. Microbiol.* 97:818–826.

Fleming H.P, Mixed cultures in vegetable fermentations. In *Mixed Cultures in Biotechnology*; Zeikus, J.G., Johnson, E.A., Eds.; McGraw-Hill: New York, 1991; 69–103

Fournier .A, 1998, L'ensilage dans l'alimentation des Ruminants. Centre de recherche et expérimentation de Deschambault Ministère De l'Agriculture, Des Pêcheries Et De l'Alimentation Du Québec.

Fransen N.G., O'Connell M.B et Arendt E.K.1997. A modified agar medium for

Fransen NG., O'Connell MB et Arendt EK.1997.screening of proteolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. Int.J.Food Microbiol. 36: 235-239.

Giffell M.C., Wagendorp1 A., Herrewegh1 A. et Driehuis F. 2002. Bacterial spores in silage and raw milk .*Antonie van Leeuwenhoek* .625–630.

Giraud E., Champailier A et Raimbault M.1994. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. Appl Environ Microbiol.60:4319–23.

Giraud.E. 1995. Contribution à l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolée de manioc fermenté, laboratoire de Biotechnologie du Centre ORSTOM de Montpellier, France.

Guiraud J.P.1998. Microbiologie alimentaire. Ed. dunod, Paris.1998.

Guyot J.P., Calderon M.et Morlon-Guyot J. 2000. Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T Journal of Applied Microbiology, 88, 176–182.

Hammes W.P et Hertel C. 2003.The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In the Prokaryotes. An evolving resource for the microbiological community. Edited by M. Dworkin, New York.

Hammes WP., Vogel RF., Wood BJB et Holzappel WH .1992. The genus *Lactobacillus*. The genera of lactic acid bacteria. The lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, Scotland, Glasgow. 2:19-54.

Hang YD. 1990. Direct fermentation of cornstarch to L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. US Patent .4:963,486.

Hang YD., Hamemei H et Woodams EE. 1989b. Production of L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae* immobilized in calcium alginate gels. Biotechnol Lett.11:119–20.

Hang YD.1989a. Direct fermentation of corn starch to L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. Biotechnol Lett;11:299–300.

Henderson N. 1993. Silage additives. Animal Feed Science and Technology. 45: 35-56.

Holtshausen L., Chung Y.-H., Gerardo-Cuervo H., Oba M., et Beauchemin K. A. 2011, Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. J. Dairy Sci. 94:899–907.

Holzappel WH., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U.2001.Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. Am J Clin Nutr.73:365S–73S

Hopkins E. S et Ripley P. O.1951.l'ensilage, Le maïs vient au premier rang des plantes fourragères cultivées pour l'ensilage au Canada. Ministère De L'agriculture, Ottawa, Canada.

Hu .W., Schmidt R. J., McDonell E. E., Klingerman C. M., et Kung L.Jr.2009. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. J. Dairy Sci. 92:3907–3914.

I.C.M.S.F, International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2005, Microbial ecology of food commodities, feeds pet and foods, NY.

ITEBO .institut technique d'élevage bovin et ovin.2002.

ITEL. Institut Technique des Elevages de LAMTAR (Wilaya de Sidi-Bel-Abbès). Journée nationale *du Lait à la Wilaya d'Oran*,

ITELV . Institut Technique des Elevages de LAMTAR 2011 . Conduite de la culture du Maïs et du Sorgho pour Ensilage ; Sidi-Bel-Abbès, Algérie.

Jan G., Lan A. et Leverrier P.2007. Dairy propionibacteria as probiotics. In: Saarela, M. (Ed.) *unctional dairy products*. Woodhead Publishing. 165-194.

Jay JM. 1996. Modern food microbiology. 5th ed. New York: Chapman and Hall.p 635.

Jay JM. 2000. Fermentation and fermented dairy products. Modern food microbiology. 6<sup>th</sup> edition. Gaithersburg, USA: An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. p. 113–30.

Jozala A.F., Delencastre-Novaes, L.C., Cholewa, O., Moraes, D et Penna, T.C.V. 2005. Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. African Journal of Biotechnology. 4: 262-265.

Junya Narita., Nakahara S., Fukuda H et Kondo A. 2004.Efficient production of L-(+)-lactic acid from raw starch by *Streptococcus bovis* 148. J Biosci Bioeng.97:423–5.

Keles G et Demirci U .2011. The effect of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria on conservation characteristics of baled triticale–Hungarian vetch silage and lamb performance. Anim. Feed Sci. Technol.164:21-28.

Kihal M., Henni J.H., Prevost et Diviés.C.2006.A new manometric methode for measuring carbon dioxide production by dairy starter culture : a cause of *leuconostoc mesenteroides*. Int. African J. Biotechnol.5: 378-383.

Kung, L. 1999. A review on silage additives and enzymes. Ruminant Nutrition and Microbiology Laboratory. Department of Animal and Food Science. University of Delaware Newark, DE 19717-1303 .

Larpent J.P.1991.Les ferments microbiens dans les industries agro-alimentaires: produits laitiers et viandes. APRIA. Paris.

Leduc, R., et Fournier, A. 1997. Le maïs ensilage, un atout. Cahier de conférences du Symposium sur les bovins laitiers. Conseil des Productions Animales du Québec inc., pp. 1-47.

Legarto J.2000. L'utilisation en ensilage plante entière des sorghos grains et fourrages : intérêts et limites pour les régions sèches. Fourrage .163 :323-338

Lemaire J.2006. Sécheresse et agriculture Réduire la vulnérabilité de l'agriculture à un risque accru de manque d'eau. INRA.

Leng, R.A. 1989. Recent advances in applied aspects of ruminant physiology and nutrition. Ruminant physiology and nutrition in Asia. 1-26.

Lind H. 2010. Antifungal Properties of Dairy Propionibacteria . thèse de doctorat Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.

Lindsey JR., Limin Kung J .2010. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. Anim. Feed Sci. Technol. 159:105-109.

Litchfield JH.1996. Microbiological production of lactic acid. Adv Appl Microbiol. 42:45-95.

Lopez-Diaz T.M., Alonso C., Roman C., Garcia-Lopez M.L et Morino B. 2000. Lactic acid bacteria isolated from hand mode blue cheese. Food Microbiol. 17 : 23-32.

Louarme. L. 2004.Les nouvelles enzymes en panification, rôles et mécanismes d'action, Industries des Céréales.

Ma`kimattila E., Kahala M., Joutsjoki V., 2011, Characterization and electrotransformation of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paraplantarum* isolated from fermented vegetables .World J Microbiol Biotechnol. 27:371-379.

Madec MN., Rouault A., Maubois JL.1993. Milieu sélectif et procédé pour le dénombrement des bactéries propioniques. Brevet Fr n°dépot 9300823.

Mari, L. J., Schmidt, R. J., Nussio, L. G., Hallada, C. M., Kung, L.2009 Jr., An evaluation of the effectiveness of *Lactobacillus buchneri* 40788 to alter fermentation and improve the aerobic stability of corn silage in farm silos. Journal of Dairy Science. 92:3.

Mathara J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K et Holzappel, W.H.2004. Isolation , identification, characterization of the dominant microorganisms of kule nato; the maasai traditional milk in Kenya. Int. J. Food Microbiol. 94: 269-278.

McDonald P., Henderson N., Heron S. 1991. The Biochemistry of Silage. Second Edition. Chalcombe Publications. England.

Merry, R.J. et Davies, D.R.1999. Propionibacteria and their role in the biological control of aerobic spoilage in silage. *Lait* 79, 149–164.

Minson, D.J. (Eds) 1990. Forage in ruminant nutrition. San Diego, California 92101: Academic Press, Inc.

Morlon GJ., Guyot JP., Pot B., Jacobe de Haut I., Raimbault M .1998. *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov, a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:1101–1109.

Morlon GJ., Mucciolo RF., Rodriguez SR et Guyot JP .2001. Characterization of the *Lactobacillus manihotivorans* a-amylase gene. *DNA-sequence* 12:27-37.

Nakamura LK. 1981. *Lactobacillus amylovorus* a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int J Syst Bacteriol.*31:56–63.

Navarro L., Zarazaga M., Saenz J., Ruiz-Larea F et Torres C.2000. Bacteriocin production by lactic acid bacteria solated from rioja red wenes. *J. Appl. Microbiol.* 88 : 44-51.

Naveena BJ, Altaf Md, Bhadriah K, Reddy G. Production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in semi-solid state fermentation using wheat bran. *Food Technol Biotechnol* 2004;42: 147–52.

Naveena BJ., Altaf M., Bhadriah K et Reddy G. 2005c .Screening and interaction effects of physical parameters total N content and buffer on L(+) Lactic acid production in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using Taguchi designs. *Ind J Biotechnol.*4(3): 301–28.

Naveena BJ., Altaf Md., Bhadrappa K., Madhavendra SS et Reddy G. 2005b .Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid in SSF by *Lacto- bacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate—medium optimization using RSM. *Process Biochem.*40:681–90.

Naveena BJ., Altaf Md., Bhadriah K et Reddy G. 2004.Production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in semi-solid state fermentation using wheat bran. *Food Technol Biotechnol.*42: 147–52.

Naveena BJ., Altaf Md., Bhadriah K., Reddy G.2005a. Selection of medium components by Plackett–Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. *Biores Technol.*96:485–90.

Naveena BJ., Vishnu C., Altaf Md et Reddy G. 2003.Wheat bran an inexpensive substrate for production of lactic acid in solid state fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6-optimization of fermentation conditions. *J Sci Ind Res.*62:453–6.

Nedjraoui D.2012.Profil fourragère Algérie, FAO.

Nishino N et Touno E.2005. Ensiling characteristics and aerobic stability of direct-cut and wilted grass silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. J Sci Food Agric. 85:1882–1888.

Nwankwo D., Anadu E et Usoro R. 1989.Cassava fermenting organisms. MIRCEN J.5:169–79.

Nwankwo D., Anadu E et Usoro R. 1989.Cassava fermenting organisms. MIRCEN J. 5:169–79.

Oelker, E.R., Reveneau C.et Firkins J.L. 2009. Interaction of molasses and monensin in alfalfa hay- or corn silage-based diets on rumen fermentation, total tract digestibility and milk production by Holstein cows. J. Dairy Sci., 92: 270- 285.

Ohkouchi Y et Inoue Y. 2006. Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011. Bioresour Technol.97:1554–62.

Olympia M., Fukuda H., Ono H., Kaneko YetTakano M. 1995.Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, “Burong Isda,” and its amylolytic enzyme. J Ferment Bioeng.80:124–30.

ONS .Office National de Statistique. 2013. <http://www.ons.dz>

Pahlow G., Muck RE., Driehuis F., Oude Elferink S.J.W.H. 2003. Microbiology of ensiling. In: Silage Science and Technology. Agronomy Monograph 42 (Eds Buxton DR, Muck RE, Harrison JH), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI.

Pandey A., Soccol CR., Rodriguez-Leon JA et Nigam P. 2001.Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. New Delhi: Asiatech Publishers.

Pang H, Qin G, Tan Z, Li Z, Wang Y et Cai Y .2011. Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and recA gene analysis. Syst. Appl. Microbiol. 34:235-241.

Pang H., Qin G., Tan Z., Li Z., Wang Yet Cai Y .2011. Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and recA gene analysis. Syst. Appl. Microbiol. 34:235-241

Paragon BM. 2004. Bonnes pratiques de fabrication de l’ensilage pour une meilleure maitrise des risques sanitaires. Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Editions afssa, pp. 1-118.

Ranjit N. K.,Taylor C. C et L. Kung L. 2002. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage, Blackwell Science Ltd. Grass and Forage Science. 57 :73–81.

Reddy G., Altaf Md., Naveena B.J., Venkateshwar M et Vijay Kumar E. 2008.Amylolytic bacterial lactic acid fermentation— A review. Biotechnology Advances 26:22–34.

Rinta-Koski M., Beasley S., Montonen L et Mantere-Alhonen S. 2001. Propionibacteria isolated from rumen used as possible probiotics together with bifidobacteria. *Milchwissenschaft* 56(1), 11-13.

Roberge G et Toutain B. 1999. Plantes fourragères tropicales cultivées. Cirad, Montpellier.

Rojan P. J., Anisha G.S., Nampoothiri M.K et Pandey A.2009. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production, *Biotechnology Advances* .27:145–152.

Rossi F., Torriani S et Dellaglio F. 1999. Genus- and Species-Specific PCR-Based Detection of Dairy Propionibacteria in Environmental Samples by Using Primers Targeted to the Genes Encoding 16SrRNA. *Applied and Environmental Microbiology* .65(9), 4241-4244.

Rowghani E., Zamiri M. J., Khorvash M., et Abdollahipanah A.2008. The effects of *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium acidipropionici* on corn silage fermentation, ruminal degradability and nutrient digestibility in sheep. *Iranian Journal of Veterinary Research*, Shiraz University. 9: 25-30 8.

Saarisalo E., Skytta E., Haikara A., Jalava T et Jaakkola S. 2007. Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *J. Appl. Microbiol.*102:327-336.

Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni JE., Prévost H et Kihal M. 2002. Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du Lait Cru de Chèvre des

Sanni A., Morlon-Guyot J et Guyot JP. 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *International Journal of Food Microbiol.*72:53–62.

Saxena RK., Dutt K., Argawal L et Nayyar P .2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp PN5. *Bioresour and Technology*. 98: 260-265.

Scardovi V.1986. Genus *Bifidobacterium* .Orla Jensen, 1924, 472.In: Bergey's Manual of systematic Bacteriology, IXe Edition. *Williams and Wilkins. Baltimore*.

Schnurer J., et Magnusson J.2005. Antifungal lactic acid bacteria as bio-preservatives.*Trends in Food Science & Technology* .16: 70–78.

Senthuran A., Senthuran V., Mattiasson B et Kaul R. 1997. Lactic acid fermentation in a recycle batch reactor using immobilized Lacto- bacillus casei. *Biotechnol Bioeng.* 55:843–53.

Stamer J. R. 1979.The lactic acid bacteria: microbes of diversity. *Food Technol.* 33:60-5.

Stiles ME., Holzapfel WH. 1997. lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiol.*36:1-29.

Tagg J. R., et Mc Given A. R. 1971. Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology* 21(5): 943-945.

Teuber M et Geis A .1981. The Family Streptococaceae (Non-Medical Aspect). In: *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, Starr, M.P, Stolp H, Trueper H.G, Balows A.and Schlegel HG. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 1614-1630.

Thapa N., Pal J et 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.* 107:33 – 38.

Thierry A et Madec MN.1995. Enumeration of propionibacteria in raw milk using a new selective medium. *Elsevier/INRA.* 75, 315-323.

Thomans. P. C., Kelly C. et Chanberlain D. G. 1980.Silage ,*Proc. Nutr. SOC.* 39, 257.

Thomas. T.D.1973. Agar medium for differentiation of *streptococcus cremoris* from the other bacteria.N.Z.J. Dairy of Science and Technology.8:70-71.

Togo MA, Feresu SB, Mutukumira AN (2002). Identification of lactic acid bacteria isolated from Opaque beer (Chibuku) for potential use as a starter culture. *J. Food Technol. Afr.* 7(3):93-97.

Veen.A.V. 2005. Silage Market development manager, une étude des pratiques actuelles, des tendances et des opportunités ;étude du marché de l'enrubannage France .

Vickroy TB. 1985. Lactic acid. In: Moo-Young A, editor. *Comprehensive biotechnology*, vol. 3. Toronto: Pub: Dic Pergamon Press. p. 761–76.

Vihinen M., et Mantsala P. 1989. Microbial amyolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 24:329–418.

Vishnu C. 2000. Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by amyolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6. Ph.D. Thesis in Microbiology, Osmania University, Hyderabad, India.

Vishnu C., Naveena BJ., Altaf M.d, Venkateshwar M et Reddy G.2006. Amylopullulanase: a novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L(+) lactic acid. *Enzyme Microb Technol.*38:545–50.

Vishnu C., Seenayya G et Reddy G. 2000.Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid by amylase producing *Lactobacillus amylophilus* GV6. *Bioprocess Eng.*23:155–8.

Vishnu C., Seenayya G et Reddy G.2002. Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. *World J Microbiol Biotechnol.*18:429–33.

Vishnu C., Sudha Rani K., Reddy G et Seenayya G. 1998.Amyolytic bacteria producing lactic acid. *J Sci Ind Res.*57:600–3.



- Vorobjeva, L.I. (1999). *Propionibacteria*. Kluwer Academic Publishers.
- Wang M., Zhao X., Liao H. Y., Tan Z. L., Tang S. X., Sun Z.H., Zhou C.S et Han X. F.2011. Effects of rice straw particle size on digesta particle size distribution, nitrogen metabolism, blood biochemical parameters, microbial amino acid composition and intestinal amino acid digestibility in goats. *Animal Science Journal*. 82 : 78–85
- Wee YJ., Kim JN et Ryu HW. 2006. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol Biotechnol*.44: 163–72.
- Weinberg Z.G. et Ashbell G. 2003. Engineering aspects of ensiling. *Biochem. Eng. J*. 13:181-188.
- Weinberg Z.G., Ashbell G., Hen Y. et Azrieli, A. 1993. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. *J. Appl. Bacteriol*. **75**, 512-518.
- Weinberg Z.G., Khanal P., Yildiz C., Chen Y. et Arieli A.2011. Ensiling fermentation products and aerobic stability of corn and sorghum silages, *Japanese Society of Grassland Science* .1744-6961.
- Weinberg ZG., Khanal P., Yildiz C., Chen Y et Arieli A. 2010. Effects of stage of maturity at harvest, wilting and LAB inoculant on aerobic stability of wheat silages. *Anim. Feed Sci. Technol*. 158:29-35.
- Weinberg, 2008, *Preservation of forage crops by solid-state lactic acid fermentation-ensiling*, Springer New York, pp 443-467.
- Wilkinson J.M., Wadephul F. et Hill J. 1996. *Silage in Europe: a survey of 33 countries*. Chalcombe publications, Welton, UK.
- Winters A. L., Fychan R. et Jones R..2000. Effect of formic acid and a bacterial inoculants on the amino acid composition of grass silage and on animal performance. *Grass and Forage Science*, 56, 181–192.
- Yang TH., Kim TW., Kang HY., Lee SH., Lee EJ., Lim SC., Oh SO., Song AJ, Park SJ, Lee SY. 2010. Biosynthesis of polylactic acid and its copolymers using evolved propionate CoA 2277 transferase and PHA synthase. *Biotechnol Bioeng*.105:150–60.
- Yumoto I et Ikeda K.1995. Direct fermentation of starch to L(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*. *Biotechnol Lett*.17:543–6.
- Zhang C., Markus J., Brandt B., Clarissa Schwab , Michael G et Gänzle .2010. Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. *Food Microbiology* 27: 390-395.
- Zhang DX et Cheryan M.1994. Starch to lactic acid in a continuous membrane reactor. *Process Biochem*.29:145–50.
- Zheng Set Stokes M.R. 1997. Effects of fibrolytic enzymes on feed stability and performance of lactating cows. *Journal of Dairy Science* 80: 278.

Zheng Yi., Yu C., Cheng Y-S., Zhang R., Jenkins B et VanderGheynst J. S.2011. Effects of ensilage on storage and enzymatic degradability of sugar beet pulp. *Bioresource Technology* .102: 1489–1495.

# *Annexe*

Clicours.COM

## Annexe

### Milieu MRS (De Man, Rogosa and Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
Lactose	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
MnSO <sub>4</sub>	0,05 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 6,2

Autoclavage : 121°C pendant 15 minutes.

### Milieu MRS Glucose

Extrait de levure	5 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
Glucose	20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
MnSO <sub>4</sub>	0,05 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 6,2

Autoclavage : 121°C pendant 15 minutes.

### Milieu MRS Amidon

Extrait de levure	5 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
Amidon	15g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
MnSO <sub>4</sub>	0,05 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 6,2

Autoclavage : 121°C pendant 15 minutes.

### **Milieu MRS glucose amidon**

Extrait de levure 5 g  
Peptone 10 g  
Acétate de sodium 5 g  
Citrate de sodium 2 g  
Glucose 2%  
Amidon 3%  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g  
MgSO<sub>4</sub> 0,25 g  
MnSO<sub>4</sub> 0,05 g  
Eau distillée 1000 ml  
pH = 6,2

Autoclavage : 121°C pendant 15 minutes.

### **Milieu MRS-BCP sans extrait de viande**

MRS sans extrait de viande (milieu liquide) 1000 ml  
Pourpre de Bromocrésol 0,025 mg  
pH = 7.0

### **Milieu KMK (Kempner et Mc Kay, 1980)**

Extrait de levure 3 g  
Biopolytone 2,5 g  
Glucose 5 g  
Eau distillée 1000 ml  
pH=6.6

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé (121°C, 15min). Au moment de l'emploi, 1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v) et 1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p) sont ajoutés. Ces solutions sont stérilisées par filtration (millipores 0.22 µm) et sont conservées à l'obscurité à +4°C.

### **Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)**

Extrait de levure 2,5 g  
Extrait de viande 5 g  
Lactose 2 g  
Biopolytone 5 g  
Peptone papainique de soja 5 g  
Acide ascorbique 0,5 g  
Acétate de sodium 1,8 g  
L-Arginine 4 g  
Pourpre de bromocrésol 0,05 g  
Agar 10 g  
Eau distillée 1000 ml  
pH 6,5  
Autoclavage : 121°C pendant 15 minutes.

### **Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)**

Tryptone 10 g  
Extrait de levure 5 g  
Saccharose 100 g  
Citrate de sodium 1 g  
Glucose 5 g  
Gélatine 2,5 g  
Azohydrate de sodium 0,075 g  
Eau distillée 1000 ml  
pH 6,5  
Autoclavage 121°C, 15 minutes.

### **Bouillon nutritif**

Extrait de viande 5 g  
Peptone 10 g  
Chlorure de sodium 5 g  
pH = 7.4  
Autoclavage 121°C, 15 minutes.

### **Gélose nutritive**

Extrait de viande 5 g  
Peptone 10 g  
Chlorure de sodium 5 g  
Agar 15 g  
pH = 7.4  
Autoclavage 121°C, 15 minutes.

## **Eau physiologique**

Chlorure de sodium 8,5 g  
Peptone 0,5 g  
Eau distillée 1000 ml  
pH=7  
Autoclavage 121°C, 15 minutes.

## **Lait écrémé**

Lait écrémé 100 g  
Extrait de levure 3 g  
Eau distillée 1000 ml  
pH=7  
Autoclavage 110°C, 10 minutes.

## **Milieu de LGA Lithium Glycérol Agar**

Tryptone 10g  
Extrait de levure 10g  
Lactate de lithium 10g  
Po<sub>4</sub>Hk<sub>2</sub> 0.25g  
SO<sub>4</sub>Mn 0.05  
Glycérol 6g  
Agar 15g  
Pourpre de Bromocrésolé 0.05g

Eau distillée 1000 ml  
pH=7  
Autoclavage 121°C, 15 minutes.

## **Préparation des enzymes protéolytiques**

Chaque enzyme est dissoute dans du tampon phosphate (10mM, pH 7) à une concentration de 10mg/ml, puis filtrée par un filtre millipore (diamètre 0,45µm).

### **Tampon phosphate 0,1 M pH 7**

Mélanger un volume de phosphate monopotassique 0,1M (13,617 g/l) avec deux volume de phosphate disodique 0,1 M (17,814 g/l).

## Tampon phosphate-citrate (pH 2,2-8,0)

Préparer une solution d'acide citrique 0,50 M (soit 105,06 g de C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>8</sub>, H<sub>2</sub>O sec par litre) et une solution de phosphate de sodium disodique 0,50 M (soit 71,01 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> sec par litre).

Mélanger suivant les indications du tableau et diluer à 200 ml.

pH	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> à 0,50M	Acide citrique à 0,50M	pH	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> à 0,50M	Acide citrique à 0,50M
2,2	1,60 ml	39,20 ml	5,2	42,88 ml	18,56 ml
2,4	4,96 ml	37,52 ml	5,4	44,60 ml	17,70 ml
2,6	8,72 ml	35,64 ml	5,6	46,40 ml	16,80 ml
2,8	12,68 ml	33,66 ml	5,8	48,36 ml	15,82 ml
3,0	16,44 ml	31,78 ml	6,0	50,52 ml	14,74 ml
3,2	19,76 ml	30,12 ml	6,2	52,88 ml	13,56 ml
3,4	22,80 ml	28,60 ml	6,4	55,40 ml	12,30 ml
3,6	25,96 ml	27,12 ml	6,6	58,20 ml	10,90 ml
3,8	28,40 ml	25,80 ml	6,8	61,80 ml	9,10 ml
4,0	30,84 ml	24,58 ml	7,0	65,88 ml	7,06 ml
4,2	33,12 ml	23,44 ml	7,2	69,56 ml	5,22 ml
4,4	35,28 ml	22,36 ml	7,4	72,68 ml	3,66 ml
4,6	37,40 ml	21,30 ml	7,6	74,92 ml	2,54 ml
4,8	39,44 ml	20,28 ml	7,8	76,60 ml	1,70 ml
5,0	41,20 ml	19,40 ml	8,0	77,80 ml	1,10 ml



## Solution de tampon de Phosphate pH 7 - 11

Preparer les solution

(1) 0.1M disodium hydrogen phosphate (14.2g / l)

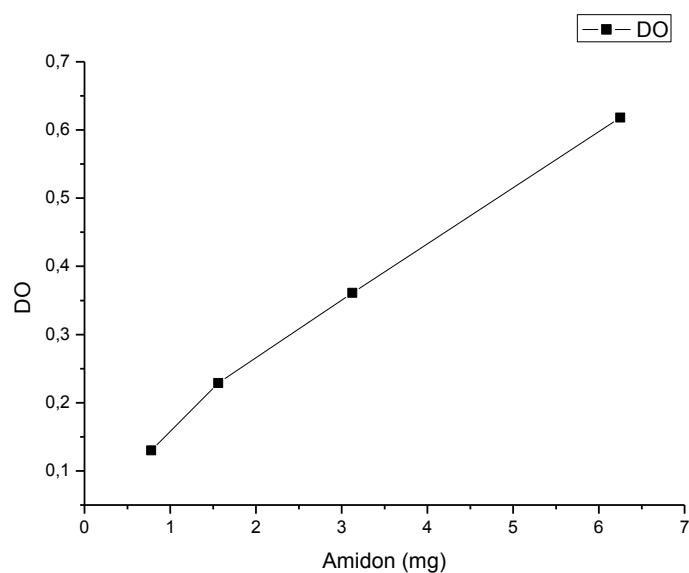
(2) (2) 0.1M HCl

(3) (3) 0.1M NaOH

Mélanger suivant les indications du tableau.

pH	vol. de phosphate	vol. de 0.1M HCl	vol. de 0.1M NaOH
7	756.0 mls	244 mls	
8	955.1 mls	44.9 mls	
9	955.0 mls	45.0 mls	
10	966.4 mls		33.6
11	965.3 mls		34.7

### Courbe d'étalon de l'amidon



*Full Length Research Paper*

# Screening and identification of lactic acid bacteria isolated from sorghum silage processes in west Algeria

Chahrour W., Merzouk Y., Henni J. E., Haddaji M. and Kihal M.\*

Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Oran University,  
BP 16, Es-Senia, 31100, Oran, Algeria.

Accepted 15 February, 2013

The lactic acid bacteria (LAB) isolated from sorghum (*Sorghum bicolor*. L.) silage were identified during different periods of evolution of sorghum silage in west Algeria. Morphological, physiological, biochemical and technological techniques were used to characterize lactic acid bacteria isolates. A total number of 27 representatives of lactic acid bacterial strains were retained and among them four dominant genus were identified as *Lactobacillus* (44%), *Lactococcus* (14.81%), *Weissella* (29.62%) and *Leuconostoc* (11.11%). The representative species identified were *Lactobacillus brevis* (25%), *Lactobacillus pentosus* (3.7%), *Lactobacillus manihotivorans* (11.11%), and *Lactobacillus fermentum* (3.7%). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (14.81%), *Weissella cibaria* (7.2%), *Weissella minor* (11.11%), *Weissella soli* (3.7%), *Weissella viridescense* (7.2%) and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (11.11%). Only two strains of lactic acid bacteria were amylolytic. These results will enable future research on the relationship between LAB species and silage fermentation quality.

**Key words:** Lactic acid bacteria, identification, silage, sorghum, evolution, amylolytic, technology, species.

## INTRODUCTION

Lactic acid fermentation, an ancient preservation method, is nowadays specially preferred as a "natural" process to increase the shelf life of various products (vegetable, dairy and meat). Natural populations of LAB on plant material are responsible for conservation of a crop as silage by converting water-soluble carbohydrates (WSC) into organic acids, mainly lactic acid. As a result, the pH decreases and the forage is preserved (Chen and Weinberg, 2009). The biochemical and microbiological events that occur during ensiling process can be divided into four distinct stages (Ashbell et al., 1997). The bacterial spectrum includes homofermentative species that exclusively produce lactic acid and heterofermentative species, which produce a mixture of lactic and acetic acids and/or other by-products like ethanol and carbon dioxide (Vlková et al., 2012). Habitually, heterofermentative LAB are low in number. Thus, the concept of using microbial inoculants for silage

involves adding fast-growing homofermentative LAB in order to dominate the fermentation, but is less effective if insufficient fermentable substrate is available. Some of the commonly used homofermentative LAB in silage inoculants include *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici* and *Enterococcus faecium*. Commercially available microbial inoculant contains one or more of these bacteria that have been selected for their ability to realize fermentation. The quality of silage could be improved by the addition of inoculants, consequently lactic acid production occurs more quickly and loss of nutrients during ensilage can be reduced (Widyastuti, 2008). The presence of LAB such as *L. plantarum* and *Pediococcus* spp. were able to maintain the silage quality through increasing lactic acid production (Filya et al., 2006). Recently, in order to prevent the aerobic deterioration of silage, heterofermentative LAB species, such as *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus reuteri*, were developed as silage additives for antifungal effect. Moreover, homofermentative LAB inoculum can provide substantial benefit by reducing the risk of the

\*Corresponding author. E-mail: Kihalm@gmail.com.

growth of other harmful spoilage organisms such as butyric acid bacteria including clostridia by reducing the pH (Saarisalo et al., 2007). Several factors influence the fermentation processes that transform green forage into silage.

From a microbiological point of view, to our knowledge, no information is available on the microbial ecology of sorghum, especially with regard to the indigenous LAB and their effects during the fermentation process. Especially, the sorghum plant is drought adaptive supporting the arid climate and rich food. The aim of this study was to identify and characterize naturally present microbial populations from the sorghum silage, especially dominants lactic acid bacteria on the basis of their important technological properties in order to select potential autochthonous as grass silage inoculants.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of silage

Silage sorghum (*Sorghum bicolor*) was obtained from different experimental sites in the north west of Algeria and it was prepared using the method described by Filya et al. (2004). Whereas, the forage of *S. bicolor* was collected in Oran region. This study was done at different periods of silage incubation. Sorghum was harvested and chopped by a precision forage harvester to 3 to 5 cm theoretical length. A serum bottle of 500 ml was used as microsilage and was incubated at two different temperatures, 30°C and ambient temperature. In all the experiments, the serum bottles were sampled on 2, 5, 8, 10, 18 and 90 days in triplicate (Ashbell et al., 1991; Filya et al., 2004).

### Analytical methods

#### Biochemical test

An amount of 10 g of silage was homogenized for 5 min with 90 ml of distilled water and then the pH of the filtered water was measured by pH meter (Xing et al., 2009). Dry matter was determined by oven drying for 48 h at 60°C for fresh material and silages (Weinberg et al., 1995).

#### Microbiological examination

For microbiological analysis, the samples of silage were prepared as follows: 1 g of sample was homogenized with 9 ml of 0.85% (w/v) sterile physiological saline in a Stomacher lab-blender for 1 min and serially diluted ( $10^{-1}$  to  $10^{-7}$ ) in the same diluents. One milliliter of these dilutions was pour-plated in the respective media for LAB. LAB were isolated on MRS agar, after incubation under anaerobic conditions at 30°C for 48 to 72 h. Representative strains of LAB were obtained from MRS plates of the highest sample dilutions. Aerobic mesophilic counts were determined using plate count agar incubated at 30°C for 48 to 72 h.

#### Isolation and identification of dominant lactic acid bacteria

The selection of colonies was randomly isolated from the plate containing between 25 and 250 colonies. Purity of the isolates was checked by streaking in MRS agar plates, followed by microscopic observation.

For the investigation of the fermentation properties of these isolates, inoculation was done in 10% skimmed milk and to which 0.3% yeast extract, 1% glucose, 1%  $\text{CaCO}_3$  were added and incubated for 48 h at 30 and 42°C. Subsequently, the coagulation of milk was checked which indicates the presence of LAB (Sengun et al., 2009).

Preliminary identification and grouping was done based on cell morphology, gram staining, catalase activity and other phenotypic properties by using  $\text{CO}_2$  production from glucose, hydrolysis of arginine in M16BCP plates, growth at different temperatures of 15°C for 14 days and 37 and 45°C for 2 days, and at different pH: 4 and 9.6 for 7 days as well as the ability to grow in different concentrations of NaCl: 3, 4 and 6.5% for 2 days of incubation in MRS broth (Badis et al., 2004; Bendimerad et al., 2012).

The identification at species level was carried out by the fermentation of carbohydrates determined on MRS broth containing bromocresol purple (0.04 g/l) as a pH indicator. The carbon sources were added to the medium at 1% (w/v) as final concentration. The carbohydrates tested were: glucose, fructose, lactose, galactose, sorbitol, arabinose, xylose, trehalose, raffinose, rhamnose, maltose, mannitol, sucrose, starch and esculin to ensure anaerobic conditions. Each tube was supplemented with two drops of sterile liquid paraffin before inoculation.

All strains of lactic acid bacteria were stored without appreciable loss of properties in skimmed milk containing 30% (wt/vol) glycerol at -20°C. Working cultures were also kept in MRS agar slant at 4°C and streaked for every 4 weeks (Badis et al., 2004; Guessas and Kihal, 2004).

### Technological properties of the isolates

The physiological group of lactic acid bacteria involved in the degradation of macromolecules (protein, cellulose and starch) in the vegetative parts of the silage sorghum (*S. bicolor*) was investigated by the method of Dubos (1928).

#### Proteolytic activity

For screening of the proteolytic bacteria, strains were grown on Yeast Milk Agar (YMA) and gelatin medium. The plate counts were evaluated by the presence of the hydrolysis zone around the colonies, and by the change in the appearance of gelatin in liquid medium (Huggins and Sandine, 1984).

#### Amylolytic activity

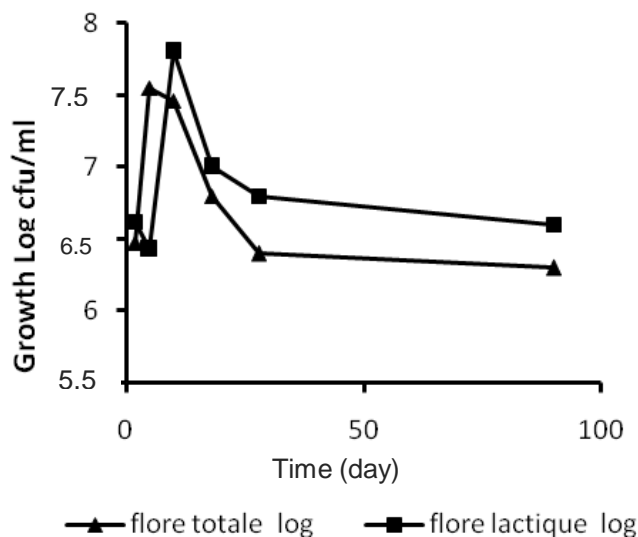
The amylolytic activity of isolates of sorghum silage was observed in MRS starch medium where glucose in the medium was replaced by 20 g soluble starch (Brabet et al., 1996). The enumeration of amylolytic bacteria was evaluated by the presence of the clear zone around the colonies after using iodine solution (Iugol) (Thapa et al., 2006).

#### Cellulolytic activity

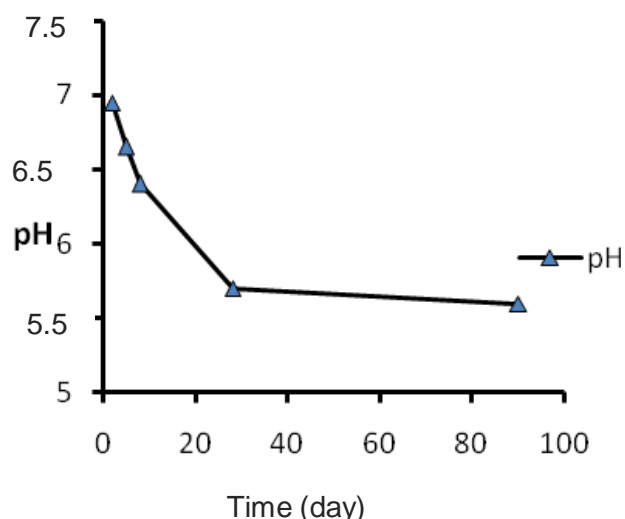
From retained isolates of lactic acid bacteria strain, the pre-cultures were inoculated by spot in Dubois agar supplemented with 5% of cellulose. The plates were then incubated at 37°C for 72 h. The plates were checked for clear zones surrounding the colonies.

## RESULTS AND DISCUSSION

The study of the diversity and the dynamics of microbial



**Figure 1.** Growth of total flora and lactic flora during the fermentation process of sorghum silage.



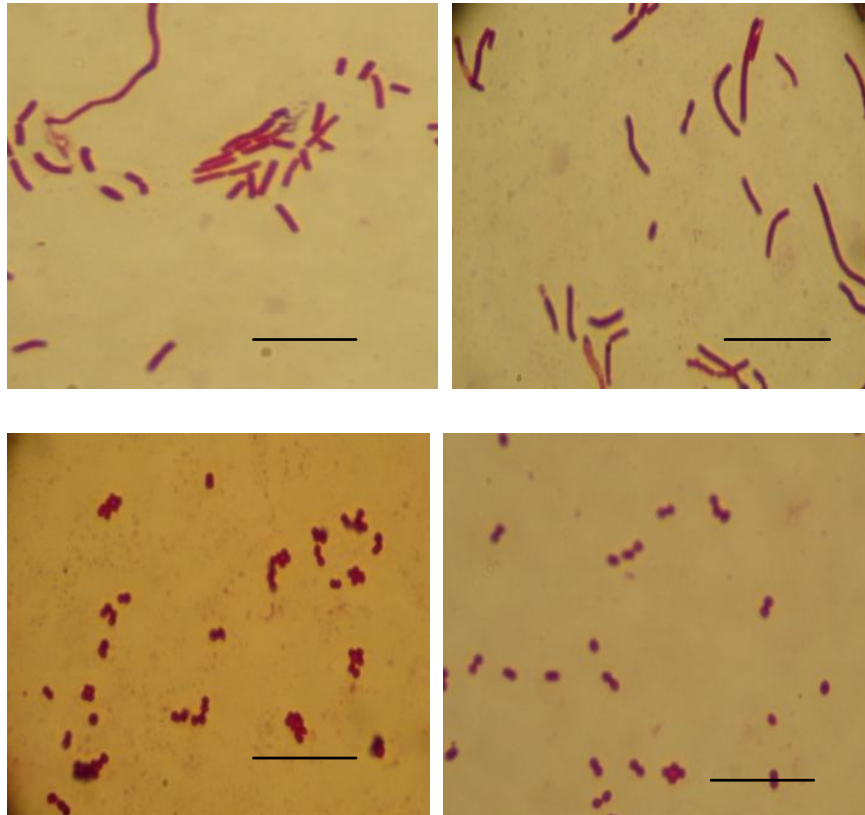
**Figure 2.** pH variations during the fermentation process of sorghum silage.

populations associated with sorghum silage were investigated for evaluation of the quality of silage which represent a major effect on the feed intake, nutrient utilization and milk production of dairy cows (Saarisalo et al., 2007).

#### Enumeration of total flora and lactic acid flora

The microbial composition of the sorghum silages is depicted in Figure 1. During the initial time of incubation, the number of total microflora is higher than lactic flora (7.5 and 6.5 log, respectively). But at day 8 of silage

incubation, the number of lactic acid bacteria increased to 7.8 log, whereas, the total microflora remained stable at 7.5 log. The number of total microflora and lactic acid flora decreased gradually during the time of incubation. At 90 days, the number of total microflora is less than lactic acid microflora (6.3 and 6.7 log, respectively). The growth of the total flora during 90 days of silage incubation was found to be maximum on 2nd and 5th day, whereas it was least on the 8th day. The variation in the evolution of pH during sorghum silage was noted and shown in Figure 2. The initial pH was 7 which dropped gradually to 5.6 on the 28th day and after which no change in the pH was observed.



**Figure 3.** Morphological characters of lactic acid bacteria of silage sorghum observed with microscope (rod form and cocci form).

On the other hand, the growth of lactic flora which is a part of the natural heritage of flora associated with the plant material (Makimattila et al., 2011), acts differently in silage because as shown in Figure 1, the growth is minimal at 2nd and 5th day but in the 8th day it was maximum (ICMSF, 2005; Weinberg et al., 2010). During this period of silage incubation, many factors can present favorable or unfavorable effect on microorganism's growth. The total flora can be inhibited by the absence of O<sub>2</sub> such as yeast, molds and aerobic bacteria (Pahlow et al., 2003), pH sensibility by presence of the organic acid especially lactic acid produced during the growth of the lactic acid bacteria (Paragon, 2004) or acetic acid which has an antifungal effect (Lindsey and Kung, 2010; Keles and Demirci, 2011). The dominance of lactic acid bacteria at the end phase of silage is enhanced by environmental conditions especially gradual absence of oxygen and pH decrease.

#### Isolation and identification of dominant lactic acid bacteria

From 63 isolates screened, 27 were considered to be LAB by the properties like Gram staining, catalase activity, motility and production of spores or not, as per

the method described by Sengun et al. (2009). This led to the delineation of two principal groups of isolates, each one displaying a distinct carbohydrate fermentation pattern (Table 1 and Figure 3). The various groups presumably represented four different LAB and various percentages of the total genera were found to be *Lactobacillus* (44%), *Lactococcus* (14.81%), *Weissella* (29.62%) and *Leuconostoc* (11.11%).

The LAB isolates were mostly homofermentative and heterofermentative. Most of them showed growth in the pH 4 and at temperature of 45°C.

In the lactobacilli isolates, especially for homofermentative *Lactobacillus* group, the species of *Lactobacillus manihotivorans* was detected and identified in our silage sample. The *Lactobacillus pentosus* is facultative heterofermentative species which can produce CO<sub>2</sub> from gluconate and have the same characters of *Lactobacillus manihotivorans*. The later species was also isolated from sour cassava starch fermentation in Colombia (Morlon et al., 1998, 2001).

The eight species of heterofermentative *Lactobacillus* group were found to belong to two species of *L. brevis* (7 isolates) and *L. fermentum* (1 isolate). To differentiate between these two species, xylose and esculin were used. Our results for *Lactobacillus* identification were in agreement with those obtained by Abriouel et al. (2008).

**Table 1.** Physiological and biochemical characteristics of isolated strains from silage.

Characteristics	Rod group				Cocci group					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	14-13-A <sub>5</sub> -12-D <sub>11</sub> -19-A <sub>9</sub>	50	7*-22-D <sub>1</sub>	D <sub>10</sub>	11-A <sub>8</sub> -A <sub>6</sub> -20	4-32	7-43-A <sub>4</sub>	25	A <sub>1</sub> -42	E <sub>1</sub> -E <sub>2</sub> -E <sub>3</sub>
Number of isolates (27)	7	1	3	1	4	2	3	1	2	3
Form	rods	rods	rods	rods	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO <sub>2</sub> from glucose	+	v	-	+	-	+	+	+	+	+
NH <sub>3</sub> from arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Growth at 15 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 45 °C	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in a medium with NaCl (%)	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Growth at pH 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9.6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Citrate hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Heat resistance 63.5°C for 30 min	v	+	+	-	+	+	+	+	v	+
<b>Acid production from</b>										
Trehalose	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
Xylose	+	+	+	-	/	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Arabinose	v	v	+	+	+	+	-	+	-	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Ramnose	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	/	/	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pre-identification	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	<i>Weissella cibaria</i>	<i>Weissella minor</i>	<i>Weissella soli</i>	<i>Weissella viridescens</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>

+, Positive; -,negative; v, variable.

Seseña et al. (2005) always considered the predominant LAB, with increased growth of *L. brevis* at the end of fermentation in natural

fermentation of green olives. The utilization of ribose, galactose, glucose, fructose, maltose, saccharose, raffinose and esculin was used for

the identification of *L. fermentum* by Hammes et al. (1992 and Sawadogo-Lingani et al. (2010).

In cocci groups, three isolates were positively

identified as *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* characterized by: Production of CO<sub>2</sub> from glucose, production of dextran from sucrose, inability to use arginine, but the use of arabinose is specific for this species. The properties of *Leuconostoc* species were reported in several works (Carr et al., 2002; Bendimerad et al., 2012). Generally, leuconostocs are found living in association with plant material and dairy products. Other studies have reported leuconostocs as the dominant microbial population on forage crops and silage (Cai et al., 1994). The lower numbers of *Leuconostoc* is probably due to their inability to compete with other LAB in mixed cultures (Teuber and Geis, 1981; Togo et al., 2002).

Eight strains in this group were identified as *Weissella* differing from the *Leuconostoc* by the arginine test and the sugar fermentation profile. The represented species include *Weissella cibaria* (7.2%), *Weissella minor* (11.11%), *Weissella soli* (3.7%) and *Weissella viridescense* (7.2%). The studies of Pang et al. (2011) indicate that perhaps several *Weissella* species could improve silage quality. Some species of *Weissella* have been isolated from a wide range of sources such as soil, fresh vegetables, meat, fish, fermented silage and foods (Björkroth et al., 2002; Sirirat et al., 2008; Valerio et al., 2009).

Four homofermentative strains can hydrolyze arginine and citrate and cannot grow at pH 9, 45°C and 6.5% NaCl. However, the three later physiological characters: pH, temperature and salinity cannot be used as reference for the identification of lactic acid bacteria because there are variations in these characters particularly in this group of bacteria Drici et al. (2010). They later had isolated from camel milk the species of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* which show growth at 50°C. The profile comparison revealed that homofermentative isolates observed in the present study can be considered as *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (14.81%). Further, the research work of Sawadogo-Lingani et al. (2010) has observed the presence of *L. lactis* in sorghum grains fermentation.

### Technological properties of the isolated lactic acid bacteria

Fermentation is one of the oldest methods of food preservation technology in the world. The process relies on the biological activity of microorganisms for production of a range of metabolites which can suppress the growth and survival of undesirable microflora in foodstuffs. As a result, fermented products generally have a longer shelf life than their original substrate and present very good safety records. In this study, the absence of proteolytic and cellulolytic activity in isolated lactic acid bacteria was noticed. In contrast, three species of *Lactobacillus* produced an enzyme amylase in culture medium, which was confirmed by the observation of a clear zone of starch hydrolysis when treated with iodine. Three

amylolytic strains identified belonged to the species of *L. manihotivorans* which are considered as amylolytic lactic acid bacteria.

### Conclusion

On the basis of phenotypic properties, the lactic acid bacterial population in silage sorghum prepared in laboratory consisted of: *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus manihotivorans*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* *Weissella cibaria*, *Weissella minor*, *Weissella soli*, *Weissella viridescense* and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* which play an important role in fermentation to increase the shelf life and enrichment by degradation of macromolecules. The present investigation revealed the presence of different genus of lactic acid bacteria in sorghum silage. The study of their technological characters might help in the near future for the establishment of a local starter for silage process. To our knowledge, in Algeria, this is the first report on the isolation of amylolytic species of *Lactobacillus manihotivorans* in sorghum silage which can be exploited in the manufacture of fermented foods.

### REFERENCES

- Abriouel H, Ben Omar N, Pérez Pulido R, López RL, Ortega E, Cañamero MM, Gálvez A (2008). Vegetable Fermentations, Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods. Chapter 5. Food Microbiol. Food Saf. pp. 145-161, DOI: 10.1007/978-0-387-74520-6\_5
- Ashbell G, Weinberg ZG, Azrieli A, Hen Y, Horev B (1991). A simple system to study aerobic deterioration of silages. Can. Agric. Eng. 33:391-395.
- Ashbell G, Weinberg ZG, Brukental I, Tabori K, Sharet N (1997). Wheat silage: effect of cultivar and stage of maturity on yield and degradability *in situ*. J. Agric. Food Chem. 45(3):709-912.
- Badis A, Guetarni D, Moussa Boudjema B, Henni DE, Kihal M (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goats milk of four Algerian races. Food Microbiol. 21(5):579-588.
- Bendimerad N, Kihal M, Berthier F (2012). Isolation, identification and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional raib type milk fermentation. Dairy Sci. Technol. 92(3):249-264.
- Björkroth KJ, Schillinger U, Geisen R, Weiss N, Hoste B, Holzapfel WH, Korkeala HJ, Vandamme P (2002). Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov, detected in food and clinical samples. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:141-148.
- Brabet C, Chuzer G, Oufour D, Raimbault M, Giraudt J (1996). Improving cassava sour starch quality in Colombia, Progress in Research and Development, CIRAD chapter 27. ISBN 958-9439-88-8 pp. 242-246.
- Cai Y, Ohmomo S, Kumai S (1994). Distribution and lactate fermentation characteristics of lactic acid bacteria on forage crops and grasses. J. Jpn. Soc. Grassl. Sci. 39:420-428.
- Carr FJ, Chill D, Maida NR (2002). The lactic acid bacteria: With literature Survey. Curr. Rev. Microbiol. 28(4):281-370.
- Chen Y, Weinberg ZG (2009). Changes during aerobic exposure of wheat silages. Anim. Feed Sci. Technol. 154:76-82.
- Drici H, Gilbert C, Kihal M, Atlan D (2010). Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. J. Appl. Microbiol. 108:647-657.



- Dubos R (1928). The decomposition of cellulose by aerobic bacteria. *J. Bacteriol.* 15:223-234.
- Filya I, Sucu E, Karabulut A (2004). The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. *J. Appl. Microbiol.* 97:818-826.
- Filya I, Sucu E, Karabulut A (2006). The effects of *Propionibacterium acidipropionici* and *Lactobacillus plantarum*, applied at ensiling, on the fermentation and aerobic stability of low dry matter corn and sorghum silages. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33:353-358.
- Guessas B, Kihal M (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *Afr. J. Biotechnol.* 3:339-342.
- Hammes WP, Vogel RF, Wood BJB, Holzapfel WH (1992). The genus *Lactobacillus*. The genera of lactic acid bacteria. The lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, Scotland, Glasgow. 2:19-54.
- Huggins AR, Sandine WE (1984). Differentiation of fast and slow milk-coagulating isolates in strains of *Lactic streptococci*. *J. Dairy Sci.* 67:1674-1679.
- ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (2005). Microbial ecology of food commodities, feeds pet and foods, NY.
- Keles G, Demirci U (2011). The effect of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria on conservation characteristics of baled triticale–Hungarian vetch silage and lamb performance. *Anim. Feed Sci. Technol.* 164:21-28.
- Lindsey JR, Limin Kung J (2010). Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159:105-109.
- Makimattila E, Kahala M, Joutsjoki V (2011). Characterization and electrotransformation of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paraplantarum* isolated from fermented vegetables. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27:371-379.
- Morlon GJ, Guyot JP, Pot B, Jacobe de Haut I, Raimbault M (1998). *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov, a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:1101-1109.
- Morlon GJ, Mucciolo RF, Rodriguez SR, Guyot JP (2001). Characterization of the *Lactobacillus manihotivorans*  $\alpha$ -amylase gene. DNA-sequence 12:27-37.
- Pahlow G, Muck RE, Driehuis F, Oude Elferink SJWH (2003). Microbiology of ensiling. In: Silage Science and Technology. Agronomy Monograph 42 (Eds Buxton DR, Muck RE, Harrison JH), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI.
- Pang H, Qin G, Tan Z, Li Z, Wang Y, Cai Y (2011). Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and recA gene analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 34:235-241.
- Paragon BM (2004). Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleure maîtrise des risques sanitaires. Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Editions afssa, pp. 1-118.
- Saarisalo E, Skytta E, Haikara A, Jalava T, Jaakkola S (2007). Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *J. Appl. Microbiol.* 102:327-336.
- Sawadogo-Lingani H, Diawara B, Glover RK, Debrah KT, Traoré AS, Jakobsen M (2010). Predominant lactic acid bacteria associated with the traditional malting of sorghum grains. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4:169-179.
- Sengun IY, Nielsen DS, Karapinar M, Jakobsen M (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* 135:105-111.
- Seseña S, Sánchez I, Palop L (2005). Characterization of *Lactobacillus* strains and monitoring by RAPD-PCR in controlled fermentations of "Almagro" eggplants. *Int. J. Food Microbiol.* 104:325-335.
- Sirirat R, Thosaporn R, Somkiat P (2008). Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. *Aquac. Res.* 39:134-143.
- Teuber M, Geis A (1981). The Family Streptococaceae (Non-Medical Aspect). In: The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria, Starr, M.P, Stolp H, Trueper H.G, Balows A. and Schlegel HG. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 1614-1630.
- Thapa N, Pal J, Tamang JP (2006). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *Int. J. Food Microbiol.* 107:33-38.
- Togo MA, Feresu SB, Mutukumira AN (2002). Identification of lactic acid bacteria isolated from Opaque beer (Chibuku) for potential use as a starter culture. *J. Food Technol. Afr.* 7(3):93-97.
- Valerio F, Favilla M, De Bellis P, Sisto A, de Candia S, Lavermicocca P (2009). Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. *Syst. Appl. Microbiol.* 32:438-448.
- Vlková E, Rada V, Bunešová V, Ročková Š (2012). Growth and survival of lactic acid bacteria in lucerne silage. *Folia Microbiol.* 57:359-362.
- Weinberg ZG, Ashbell G, Hen Y, Azrieli A (1995). The effect of a propionic acid bacterial inoculant applied at ensiling on the aerobic stability of wheat and sorghum silages. *J. Ind. Microbiol.* 15:493-497.
- Weinberg ZG, Khanal P, Yildiz C, Chen Y, Arieli A (2010). Effects of stage of maturity at harvest, wilting and LAB inoculant on aerobic stability of wheat silages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158:29-35.
- Widyastuti Y (2008). Fermentasi silase dan manfaat probiotik silase bagi ruminansia. *Med. Pet.* 31:225-232.
- Xing L, Chen LJ, Han LJ (2009). The effect of an inoculants and enzyme on fermentation and nutritive value of sorghum straw silages. *Bioresour. Technol.* 100:488-491.



\*Kindly provide the references in red

Full Length Research Paper

# Biodiversity and dynamic evolution of lactic acid bacteria in different phase of sorghum silage development in the West Region of Algeria

Chahrour Wassila, Merzouk Yamina, Henni Jamal Eddine, Guessas Bettache and Kihal Mebrouk\*

Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Oran University, BP 16, Es-Senia, 31100, Oran, Algeria.

Accepted 10 May, 2013

Diversity and density of lactic acid bacteria isolated from sorghum (*Sorghum bicolor* L.) silage for the isolation and taxonomic determination of large number of bacteria from sorghum silage in west Algeria was investigated. The microbiological techniques were used to identify lactic acid bacteria isolates using morphological, cultural, physiological, biochemical and technological tests. A number of 27 representatives' lactic acid bacteria strains were retained and four dominants genus were obtained, *Lactobacillus* (44%), *Lactococcus* (14.81%), *Weissella* (29.62%) and *Leuconostoc* (11.11%). The representatives species identified were *Lactobacillus brevis* (25%), *Lactobacillus pentosus* (3.7%), *Lactobacillus manihotivorans* (11.11%), *Lactobacillus fermentum* (3.70%), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (14.81%), *Weissella cibaria* (7.20%), *Weissella minor* (11.11%), *Weissella soli* (3.7%), *Weissella viridescense* (7.20%) and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (11.11%). Only the strains of *L. manihotivorans* were amylolytic. These results will enable future research on the relationship between LAB species and silage fermentation quality.

**Key words:** Lactic acid bacteria, *Sorghum*, silage, amylolytic, technology.

## INTRODUCTION

Lactic acid fermentation, an ancient preservation method, is nowadays especially favored as a "natural" process to increase the shelf life of various products (vegetable, dairy and meat). Natural populations of LAB on plant material are responsible for conservation of a crop as silage by Converting Water-Soluble Carbohydrates (WSC) into organic acids, mainly lactic acid. As a result, the pH decreases and the forage are preserved (Chen and Weinberg, 2009). The biochemical and microbiological events that occur during ensiling process can be divided into four distinct stages (Ashbell et al., 1997): Initial-aerobic, during filling of the silo and immediately after sealing, while air is still present

between the plant particles and the pH is similar to that in the fresh crop (6.0 to 6.5). During this stage, plant respiration and proteolysis continue, as well as activity of aerobic microorganisms. Fermentation, lasting several days to several weeks after oxygen is depleted, during which various LAB develop and convert (WSC) to organic acids, mainly lactic acid. As a result the pH decreases to 3.8 to 5.0. Stable, when relatively few changes occur in the sealed silage, given no air penetration into the silage.

Unloading for feeding, the silage is re-exposed to air and aerobic microorganisms are re-activated and spoilage processes begin. Inoculants bacteria are usually selected from epiphytic microflora or other environments.

The bacterial spectrum includes homofermentative species that exclusively produce lactic acid and heterofermentative species, which produce a mixture of lactic and acetic acids and/or other by-products like ethanol and carbon dioxide (Vlková et al., 2012). Habitually, heterofermentative LAB are low in number. Thus, the concept of using a microbial inoculants to silage involves adding fast-growing homofermentative LAB in order to dominate the fermentation, but is less effective if insufficient fermentable substrate is available. Some of the commonly used homofermentative LAB in silage inoculants include *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici* and *Enterococcus faecium*. The role of commercially available microbial inoculants contains one or more of these bacteria that have been selected for their ability to realize fermentation. The quality of silage could be improved by the addition of inoculants, consequently lactic acid production process more quickly and loss of nutrients during ensilage can be reduced (Widyastuti, 2008). The presence of LAB such as *L. plantarum* and *Pediococcus* spp. were able to maintain the silage quality through increasing lactic acid production (Filya et al., 2006).

Recently, in order to prevent the aerobic deterioration of silage, heterofermentative LAB species such as *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus reuteri* were developed as silage additives for antifungal effect. Moreover, homofermentative LAB inoculum can provide substantial benefit by reducing the risk of the growth of other harmful spoilage organisms such as butyric acid bacteria including clostridia by reducing the pH (Saarisalo et al., 2007). From a microbiological point of view, to our knowledge, no information is available on the microbial ecology of sorghum, especially with regard to the indigenous LAB and their effects during the fermentation process. Especially, the sorghum plant is drought adaptive supports for the arid climate and rich food. The objective of this study was to identify and characterize naturally present microbial populations from the sorghum silage, especially dominant lactic acid bacteria on the basis of their important technological properties in order to select potential autochthonous as grass silage inoculants.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of silage in laboratory

Fresh forage of *Sorghum bicolor* was collected in the Oran region (North western Algeria). Sorghum was harvested and chopped by a precision forage harvester to 3 to 5 cm theoretical chop length. A serum bottles 500 ml were used as microsilos which were incubated at two differences temperatures, 30°C and ambient temperature (22 to 30°C); each bottle contained (500 g) of forage. There were a total of 18 serum bottles which were sampled in triplicate on days 2, 5, 8, 10, 18 and 90 (Ashbell et al., 1991; Filya et al., 2004).

## Analytical methods

### Biochemical test

An amount of 10 g of silage was homogenized for 5 min with 90 ml of distilled water and then the pH of the filtered extracts water was measured by pH meter (Xing et al., 2009). Dry matter was determined by oven drying for 48 h at 60°C for fresh material and silages (Weinberg et al., 1995).

### Microbiological examination

For microbiological analysis, the silage samples were prepared as follows: Ten gram of sample was homogenized with 90 ml of 0.85% (w / v) sterile physiological saline in a Stomacher lab-blender for 5 min and serially diluted ( $10^{-1}$  to  $10^{-7}$ ) in the same diluents. One milliliter of these dilutions was pour-plated in the respective media for LAB. LAB were isolated on MRS agar, after incubation under anaerobic conditions at 30°C for 48 to 72 h. Representative strains of LAB were obtained from MRS plates of the highest sample dilutions. Aerobic mesophilic counts were determined using plate count agar incubated at 30°C for 48 to 72 h.

### Isolation and identification of dominant lactic acid bacteria

Colonies were randomly selected and isolated from plates which contained between 25 and 250 colonies. Purity of the isolates was checked by streaking in MRS agar plates, followed by microscopic observation. In order to investigate the fermentation properties of these isolates, we inoculated them in 10% skim milk and added 0.3% yeast extract, 1% glucose, 1% CaCO<sub>3</sub> and incubated for 48 h at 30 and 42°C. The isolates, which coagulated milk were considered LAB (Sengun et al., 2009). Preliminary, identification and grouping was based on cell morphology, gram stain and catalase activity. Additional phenotypic properties was used such as CO<sub>2</sub> production from glucose, hydrolysis of arginine in M16BCP plates, growth at different temperatures at 15°C for 14 days and at 37 and 45°C for 2 days, and at different pH 4 and 9.6 for 7 days as well as the ability to grow in different concentrations of NaCl, 3, 4 and 6.5% for 2 days of incubation in MRS broth (Badis et al., 2004; Bendimerad et al., 2012).

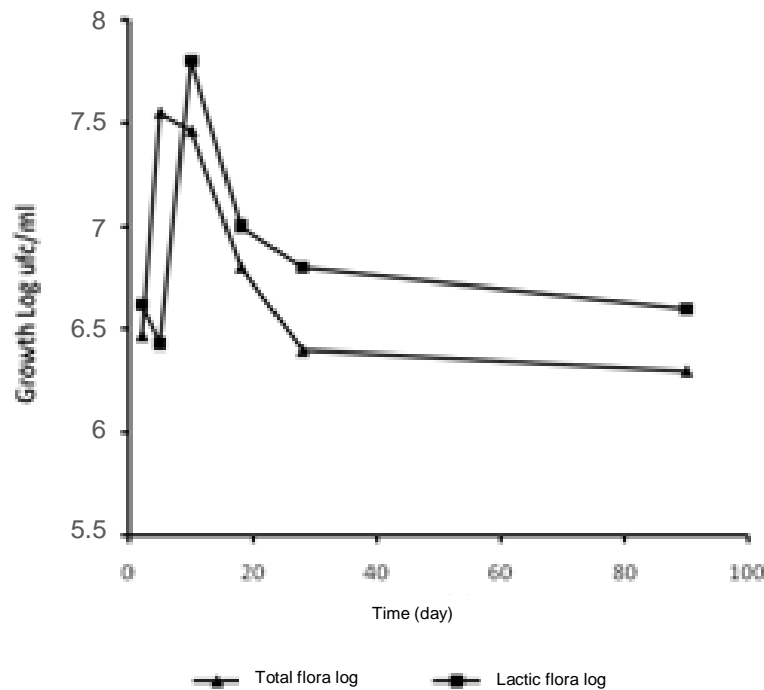
The identification of species level, the fermentation of carbohydrates was determined on MRS broth containing bromocresol purple (0.04 g/l) as a pH indicator. The carbon sources were added to the medium at 1% (w/v) as final concentration. The carbohydrates tested were: glucose, fructose, lactose, galactose, sorbitol, arabinose, xylose, trehalose, raffinose, rambnose, maltose, mannitol, sucrose, starch, and esculin to ensure anaerobic conditions; each tube was supplemented with two drops of sterile liquid paraffin before inoculation. All strains of lactic acid bacteria were stored without appreciable loss of properties in skim milk containing 30% (wt/vol) glycerol at -20°C. Working cultures were also kept in MRS agar slant at 4°C and streaked every 4 weeks (Badis et al., 2004; Guessas and Kihal, 2004).

### Technological properties of the isolates

The lactic acid bacteria involved in the degradation of macromolecules (protein, cellulose and starch) in the sorghum silage were investigated as follows:

### Proteolytic activity

For screening, the proteolytic bacteria strains were grown on yeast



**Figure 1.** Growth of total flora and lactic flora during the fermentation process of sorghum silage.

milk agar (YMA) and gelatin medium. The plate's counts were evaluated by the presence of the hydrolysis zone around the colonies, and by the change in the appearance of gelatin in liquid medium (Huggins and Sandine, 1984).

#### **Amylolytic activity**

The amylolytic activities of isolates of sorghum silage were observed in MRS starch medium (the glucose in the medium was replaced by 20 g soluble starch) (Brabet et al., 2006?). The enumeration of amylolytic bacteria was evaluated by the presence of the clear zone around the colonies after using iodine solution (lugol) (Thapa et al., 2006).

#### **Cellulolytic activity**

Isolates of lactic acid bacteria were inoculated by spot in Dubos agar supplemented with 5% of cellulose (Dubos, 1928). The plates were then incubated at 37°C for 72 h. The plates were checked for clear zones surrounding the colonies.

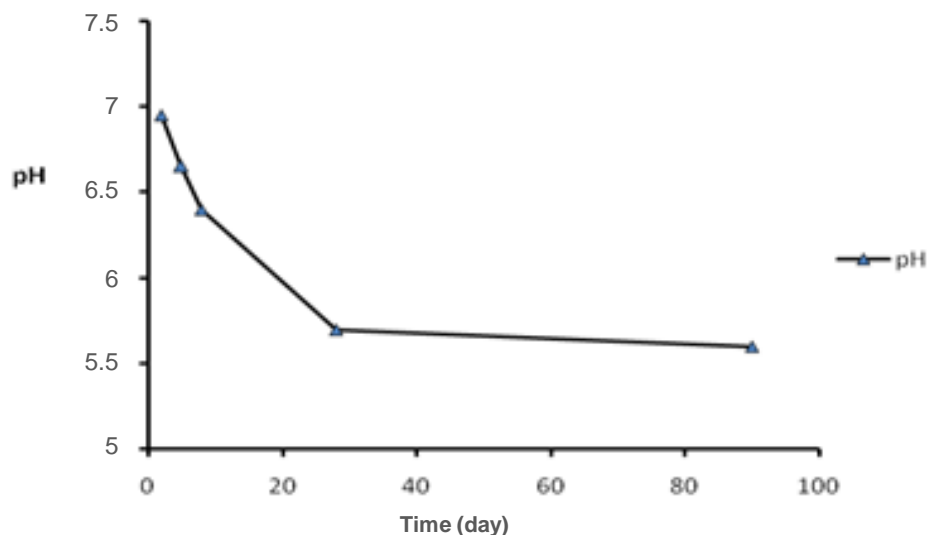
## **RESULTS AND DISCUSSION**

The study of the diversity and the dynamics of microbial populations associated with sorghum silage were investigated for evaluation of the silage quality which has a major effect on the feed intake, nutrient utilization and milk production of dairy cows (Saarisalo et al., 2007).

#### **Enumeration of total flora and lactic acid flora**

Changes of the microbial composition of the sorghum silages during ensiling are given in Figure 1. In the initial time of incubation, the number of total microflora is higher than lactic flora (log CFU/g = 7.5 and 6.5, respectively). At 8 days of silage incubation, the log number of lactic acid bacteria increased to 7.8, whereas, that of the total microflora remained 7.5. Afterwards, the number of total microflora and lactic acid flora decreased gradually during the time of incubation. At 90 days, the numbers of total microflora and of lactic acid bacteria were of the same order of magnitude (log CFU/g = 6.3 and 6.7, respectively). The peak numbers of the total flora were on the 2<sup>nd</sup> and 5<sup>th</sup> day, then there was a decrease from the 8<sup>th</sup> day and onward. Changes in pH during ensiling of sorghum are shown in Figure 2. The initial pH was 7 and then it decreased gradually to 4.6 until the 28<sup>th</sup> day. No change of pH value of sorghum silage was observed after 28<sup>th</sup> day. On the other hand, the growth of lactic flora which is a part of the natural flora associated with the plant material (Makimattila et al., 2011) behaves differently in silage because Figure 1 showed that the growth is minimal at 2<sup>nd</sup> and 5<sup>th</sup> day but in the 8<sup>th</sup> day is maximum (ICMSF, 2005; Weinberg et al., 2010).

During this period of silage, many factors can present favorable or unfavorable effect on microorganism's growth. The total flora can be inhibited by the absence of O<sub>2</sub> such as yeast, molds and aerobic bacteria (Pahlow et



**Figure 2.** pH mean variations during the fermentation process of sorghum silage.

al., 2003), pH sensibility by presence of the organic acid especially lactic acid produce during the growth of the lactic acid bacteria (Paragon, 2004) or acetic acid which has an antifungal effect mentioned by Lindsey and Kung (2010) and Keles and Demirci (2011). The dominance of lactic acid bacteria at the end phase of silage is enhanced by environmental conditions especially absence of oxygen and pH decrease (Demirci, 2011).

### Isolation and identification of dominant lactic acid bacteria

From 63 isolates screened, 27 isolates were considered to be LAB by the following properties: Gram-positive, catalase negative no spore producers, no mobile, confirmed by method cited by Sengun et al. (2009), this lead to the delineation of two principal groups of isolates, each one displaying a distinct carbohydrate fermentation pattern (Table 1 and Figure 3). The various groups presumably represented four different LAB for various percentages of the total genera: *Lactobacillus* (44%), *Lactococcus* (14.81%), *Weissella* (29.62%) and *Leuconostoc* (11.11%). The LAB isolates were mostly homofermentative, and heterofermentative and were able to grow in the pH 4 and at temperature 45°C. In the lactobacilli isolates, especially for homofermentative *Lactobacillus* group, the specie of *Lactobacillus manihotivorans* was detected in our silage sample and identified. The *Lactobacillus pentosus* is facultative heterofermentaire species which can produce CO<sub>2</sub> from gluconate and have the same characters with the hydrolysis of starch, with *L. manihotivorans*. The later species was also isolated from cassava sour starch fermentation in Colombia (Morlon et al., 1998, 2001).

The eight species of heterofermentative *Lactobacillus* group found belonging to two species: *Lactobacillus brevis* (7 isolates) and *Lactobacillus fermentum* (1 isolate). To differentiate between these two species, xylose and esculin were used. Our results for *Lactobacillus* identification were in agreement with those obtained by Abriouel et al. (2008). Seseña et al. (2005) always considered the predominant LAB, with increased growth of *L. brevis* at the end of fermentation in natural fermentation of green olives. The utilization of ribose, galactose, glucose, fructose, maltose, saccharose, raffinose and esculin was used for the identification of *L. fermentum* by Hammes et al. (1992) and Sawadogo-Lingani et al. (2010). In cocci groups, three isolates were positively identified as *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* characterized by: production of CO<sub>2</sub> from glucose, production of dextran from sucrose, cannot use arginine, but the use of arabinose is specific for this species. The properties of *Leuconostoc* species were reported in several works (Carr et al., 2002; Bendimerad et al., 2012). Generally, leuconostocs are found living in association with plant material and dairy products; other studies have reported leuconostocs as the dominant microbial population on forage crops and silage (Cai et al., 1994). The lower numbers of *Leuconostoc* is probably due of their inability to compete with other LAB in mixed cultures (Teuber and Geis, 1981; Togo et al., 2002).

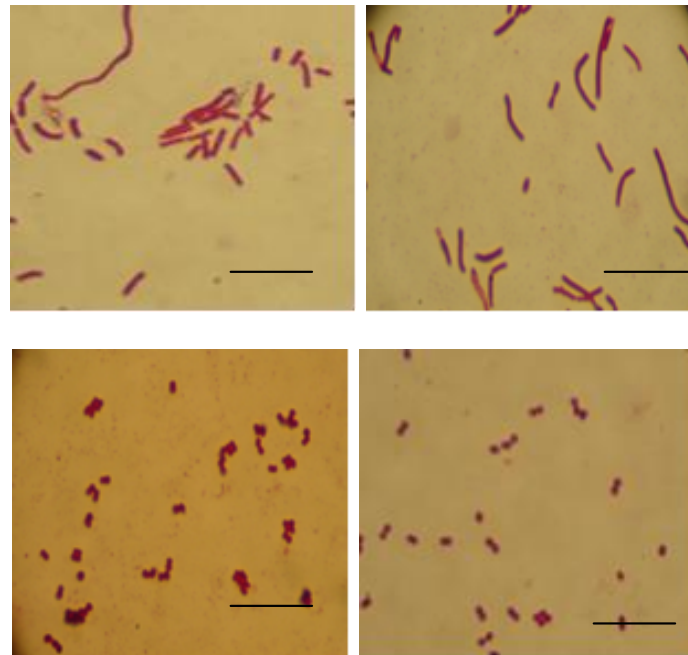
Eight strains in this group are identified as *Weissella* differed from the *Leuconostoc* by the arginine test and the sugar fermentation profile. The represented species are *Weissella cibaria* (7.20%), *Weissella minor* (11.11%), *Weissella soli* (3.7%) and *Weissella viridescense* (7.20%). The studies of Pang et al. (2011) indicate that perhaps several *Weissella* species could improve silage



**Table 1.** Contd

Cellulolytic activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pre-identification	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	<i>Weissella cibaria</i>	<i>Weissella minor</i>	<i>Weissella soli</i>	<i>Weissella viridescense</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>

+: positive,-: negative, v: variable.



**Figure 3.** Morphological characters of lactic acid bacteria of silage sorghum observed with microscope (rod and cocci forms).

quality. Some species of *Weissella* have been isolated from a wide range of sources such as soil, fresh vegetables, meat, fish, fermented silage and foods (Björkroth et al., 2002; Sirirat et al.,

2008; Valerio et al., 2009). Four strains are homofermentative, hydrolyze arginine and citrate, cannot grow at pH 9.6, growth at 45°C and at 6.5% NaCl. The three later physiological

characters pH, temperature and salinity cannot be used as reference for the identification of lactic acid bacteria because this character can be changed in this bacteria group. Drici et al. (2010)



isolated from camel milk the species of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* which can grow easily at 50°C. The profile comparison reveals that our homofermentative isolates are considered as *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* (14.81%). Whereas, the research work of Sawadogo-Lingani et al. (2010) have observed the presence of *L. lactis* in sorghum grains fermentation.

### Technological properties isolated lactic acid bacteria

Fermentation is one of the oldest methods of food preservation technology in the world. The process relies on the biological activity of microorganisms for production of a range of metabolites which can suppress the growth and survival of undesirable microflora in foodstuffs. As a result, fermented products generally have a longer shelf life than their original substrate and present very good safety records. In this work, the absence of proteolytic and cellulolytic activity in isolated lactic acid bacteria was studied. In contrast, three species of *L. manihotivorans* produce amylase enzyme in culture medium; after using iodine solution, the clear zone of starch hydrolysis was obtained. Three amylolytic strains belonged to the species of *L. manihotivorans* which are considered amylolytic lactic acid bacteria. *L. manihotivorans* is also observed in cassava sour starch fermentation by Morlon et al. (1998).

### Conclusion

On the basis of phenotypic properties, the lactic acid bacterial population in sorghum silage prepared in laboratory consisted of: *Lactobacillus* sp. *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. manihotivorans*, *L. fermentum*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *Diacetyllactis*, *W. cibaria*, *W. minor*, *W. soli*, *W. viridescense* and *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* which play an important role in fermentation like natural process to increase the shelf life and enrichment by degradation of macromolecule. This experimental research work has to reveal the presence of different genus of lactic acid bacteria in sorghum silage. The study of their technological characters must be specified in the near future for the establishment of a local starter for silage process. In our knowledge, in Algeria, this is the first time of research which isolates amylolytic species of *L. manihotivorans* in sorghum silage. *L. manihotivorans* isolates were able to grow and acidify milk thus indicating good technological properties for the manufacture of feed foods fermented.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge Dr Benlahcene K, Dr Saidi N, Pr. Heddadji M and Dr Benmechernene Z for

their technical's collaboration.

### REFERENCES

- Abriouel H, Ben Omar N, Pérez Pulido R, López RL, Ortega E, Cañamero MM, Gálvez A (2008). Vegetable Fermentations, Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods. Chapter 5. Food Microbiology and Food Safety.145-161, DOI: 10.1007/978-0-387-74520-6\_5
- Ashbell G, Weinberg ZG, Azrieli A, Hen Y, Horev B (1991). A simple system to study aerobic deterioration of silages. Can. Agric. Eng. 33: 391-395.
- Ashbell G, Weinberg ZG, Brukental I, Tabori K, Sharet N (1997). Wheat silage: effect of cultivar and stage of maturity on yield and degradability in situ. J. Agric. Food Chem. 45: 3: 709-912.
- Badis A, Guetarni D, Moussa Boudjema B, Henni DE, Kihal M (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goats milk of four Algerian races. Food. Microbiol. 21(5): 579-588.
- Bendimerad N, Kihal M, Berthier F. 2012. Isolation, identification and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional raib type milk fermentation. Dairy Sci. Technol. 92(3): 249-264.
- Björkroth KJ, Schillinger U, Geisen R, Weiss N, Hoste B, Holzapfel WH, Korkeala HJ, Vandamme P (2002). Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov, detected in food and clinical samples. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 141-148.
- Brabet C, Chuzer G, Outfour D, Raimbault M, Giraudt J. 2002. Improving cassava sour starch quality in Colombia, Progress in Research and Development, CIRAD chapter 27. ISBN 958-9439-88-8 pp 242-246
- Cai Y, Ohmomo S, Kumai S (1994). Distribution and lactate fermentation characteristics of lactic acid bacteria on forage crops and grasses. J. Jpn. Soc. Grassl. Sci. 39: 420-428.
- Carr FJ, Chill D, Maida NR (2002). The lactic acid bacteria: With literature Survey. Curr. Rev. Microbiol. 28(4): 281-370
- Chen Y, Weinberg ZG (2009). Changes during aerobic exposure of wheat silages. Anim. Feed Sci. Technol. 154: 76-82.
- Drici H, Gilbert C, Kihal M, Atlan D (2010). Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. J. Appl. Microbiol. 108: 647-657.
- Dubos R (1928).The decomposition of cellulose by aerobic bacteria. J. Bacteriol.15:223-234.
- Filya I, Sucu E, Karabulut A (2004). The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. J. Appl. Microbiol. 97:818-826.
- Filya I, Sucu E, Karabulut A (2006). The effects of *Propionibacterium acidipropionici* and *Lactobacillus plantarum*, applied at ensiling, on the fermentation and aerobic stability of low dry matter corn and sorghum silages. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 33: 353-358.
- Guessas B, Kihal M (2004).Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. Afr. J. Biotechnol. 3: 339-342.
- Hammes WP, Vogel RF, Wood BJB, Holzapfel WH (1992). The genus *Lactobacillus*. The genera of lactic acid bacteria. The lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, Scotland, Glasgow. 2: 19-54.
- Huggins AR, Sandine WE (1984). Differentiation of fast and slow milk-coagulating isolates in strains of Lactic streptococci. J. Dairy Sci. 67: 1674-1679.
- ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods (2005). Microbial ecology of food commodities, feeds pet and foods, NY.
- Keles G, Demirci U (2011). The effect of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria on conservation characteristics of baled triticale-Hungarian vetch silage and lamb performance. Anim. Feed Sci. Technol. 164: 21-28
- Lindsey JR, Limin Kung Jr. (2010). Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation

- and aerobic stability of corn silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159:105-109.
- Makimattila E, Kahala M, Joutsjoki V (2011). Characterization and electrotransformation of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paraplantarum* isolated from fermented vegetables. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27:371–379.
- Morlon GJ, Mucciolo-R F, Rodriguez SR, Guyot JP (2001). Characterization of the *Lactobacillus manihotivorans* a-amylase gene. *DNA-Sequence* 12: 27–37.
- Morlon GJ, Guyot JP, Pot B, Jacobe de Haut I, Raimbault M (1998). *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov, a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:1101–1109.
- Pahlow G, Muck RE, Driehuis F, Oude Elferink SJWH (2003). Microbiology of ensiling. In: *Silage Science and Technology. Agronomy Monograph 42* (Eds Buxton DR, Muck RE, Harrison JH), Amer Soc Agronomy, Crop Sci Soc America, Soil Sci Soc Amer, Madison, WI, . **Page numbers needed**
- Pang H, Qin G, Tan Z, Li Z, Wang Y, Cai Y (2011). Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and recA gene analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 34: 235–241
- Paragon BM (2004). Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleure maitrise des risques sanitaires. Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Editions afssa, 1-118.
- Saarisalo E, Skytta E, Haikara A, Jalava T, Jaakkola S (2007). Screening and selection of lactic acid bacteria strainssuitable for ensiling grass. *J. Appl. Microbiol.* 102: 327–336.
- Sawadogo-Lingani H, Diawara B, Glover RK, Debrah KT, Traoré AS, Jakobsen M (2010). Predominant lactic acid bacteria associated with the traditional malting of sorghum grains. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4: 169-179.
- Sengun IY, Nielsen DS, Karapinar M, Jakobsen M (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* 135: 105–111.
- Seseña S, Sánchez I, Palop L (2005). Characterization of *Lactobacillus* strains and monitoring by RAPD-PCR in controlled fermentations of "Almagro" eggplants. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 325–335.
- Sirirat R, Thosaporn R, Somkiat P (2008). Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. *Acquacul. Res.* 39: 134–143.
- Teuber M, Geis A (1981). The Family Streptococaceae (Non-Medical Aspect). In: *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, Starr, M.P, Stolp H, Trueper H.G, Balows A.and Schlegel H.G. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp: 1614-1630.
- 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.* 107:33 – 38.
- Togo MA, Feresu SB, Mutukumira AN (2002). Identification of lactic acid bacteria isolated from Opaque beer (Chibuku) for potential use as a starter culture. *J. Food Technol. Afr.* 7. 3: 93-97.
- Valerio F, Favilla M, De Bellis P, Sisto A, de Candia S, Lavermicocca, P (2009). Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. *Syst. Appl. Microbiol.* 32: 438–448.
- Vlková E, Rada V, Bunešová V, Ročková Š (2012). Growth and survival of lactic acid bacteria in lucerne silage. *Folia Microbiol.* 57:359–362.
- Weinberg Z.G, Khanal P, Yildiz C, Chen Y, Arieli A (2010). Effects of stage of maturity at harvest, wilting and LAB inoculant on aerobic stability of wheat silages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158 29–35
- Weinberg ZG, Ashbell G, Hen Y, Azrieli A (1995).The effect of a propionic acid bacterial inoculant applied at ensiling on the aerobic stability of wheat and sorghum silages. *J. Ind. Microbiol.* 15:493-497.
- Widyastuti Y (2008). Fermentasi silase dan manfaat probiotik silase bagi ruminansia. *Med. Pet.* 31: 225-232.
- Xing L, Chen LJ, Han LJ (2009).the effect of an inoculants and enzyme on fermentation and nutritive value of sorghum straw silages. *Bioresour. Technol.*100: 488–491.

**\*Kindly provide the references in red**



# Physico-chemical and Microbiological Analysis of Algerian Raw Camel's Milk and Identification of Predominating Thermophilic Lactic Acid Bacteria

Merzouk Yamina, Chahrour Wassila, Zarour Kenza, Zergui Amina, Saidi Noureddine, Henni Jamal Eddine and Kihal Mebrouk

Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Oran University, Oran 31100, Algeria

Received: November 26, 2012 / Published: February 20, 2013.

**Abstract:** The dromedary camel (*Camelus dromedarius*) is a significant socioeconomic importance in several arid and semi-arid regions of North Africa and Middle East, and its milk constitutes an important component of human diets in these regions. The camel milk plays a vital role in the food of the Algerian nomads in the Sahara. During February and September, 20 samples of the raw camel's milk were taken starting from different livestock of camels from three different Sahariennes regions (Bechar, El-Bayadh and Naama). These 20 collected samples were analyzed by physico-chemical and microbiological methods. The results of physicochemical analyze obtained from two hot and cold seasons are respectively the following: T °C (35.83 and 33.95), pH (6.36 and 6.49), density (1.031 and 1.032), dornic acidity (18.6 and 18.3 °D), dry matter (93.4 and 144.8 g/L), fat contents (30 and 52.1 g/L), total protein (26.3 and 33.1 g/L) and ashes (7.46 and 8.66 g/L). The protein profile obtained by electrophoretic analysis (SDS-PAGE) showed that camel milk contains several types of proteins and some have a molecular weight identical to major proteins of the cow's milk. The final results showed that camel milk has generally a comparable composition to that of bovine milk. The microbiological analysis, of these samples, detected a significant number of the total microflora, *Staphylococcus aureus* and total coliforms. The absence of *Clostridium* and fecal coliforms was observed. Several species of lactic acid bacteria were detected such as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Weissella cibaria* and *Enterococcus faecalis*.

**Key words:** Raw camel's milk, physicochemical analysis, microflora, electrophoretic analysis, proteins of milk.

## 1. Introduction

According to Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) statistics, there are about 19 million camels in the world, of which 15 million are found in Africa and 4 million in Asia. Of this estimated population, 17 million are considered to be a single hump camels (*Camelus dromedarius*) and 2 million with two-humped (*Camelus bactrianus*). Approximately 15 million dromedaries, representing two-thirds of the world camel population, are living in the arid areas of Africa, particularly in Northeast Africa (Somalia, Sudan, Ethiopia, and Kenya) [1-3]. In

Algeria, according to the statistics of FAO [4], the population of camels is of 295,000 head. The production of the camel milk per day and annual in Algeria is respectively 3 kg and 1,460 kg [3]. Camel is a unique animal having the ability to survive with low cost of feeding under difficult climatic conditions compared to other animals. It is a good source of meat in areas where the climate adversely affects efficiency of other animal's production [5].

The camel (*Camelus dromedarius*) is of significant socio-economic importance in many arid and semi-arid parts of the world and its milk constitutes an important component of human diets in these regions. The milk is the main source of nutrition for the neonates, and provides all the essential nutrients for growth and

---

**Corresponding author:** Kihal Mebrouk, professor, research fields: food and applied microbiology. E-mail: kihalm@gmail.com.

development [6]. Camel milk has been consumed for centuries by nomadic peoples for its nutritional value and medicinal properties. Currently, pasteurized camel milk is produced and sold only in a few countries including Saudi Arabia, United Arab Emirates, Kazakhstan, Mauritania and Algeria [7, 8].

The nomad's populations have long believed that raw camel's milk is safe and even has therapeutic virtues. Such empirical observation was scientifically substantiated by demonstrating the stronger antimicrobial activity of camel milk as compared to that of other animal species and its ability to inhibit Gram-positive and Gram-negative pathogens of concern to food safety. Nonetheless, camel milk is produced in a traditional way, and is usually collected, handled and transported in poor sanitary conditions. Moreover, camel herds rarely benefit from veterinary care and, hence, mastitis diseases are common among lactating females. Therefore, the milk produced is likely to cause food-borne diseases and the natural antimicrobial factors can only provide a limited protection against specific pathogens and for a short period. Such risk is higher when the milk is consumed in its raw state as is commonly practiced by the local producers [9].

The objective of this work is to evaluate the chemical composition of the Algeria raw camel's milk and determine the dominant milk microflora.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Sampling

To obtain variability, 20 samples of camel milk were collected in three different areas from the South Algeria: Bechar (Abadla), EL Bayadh (Elkheitar) and Naama (Table 1).

Four samples were collected on September 23, 2011 from Abadla (the race Ouled Sidi Cheikh, dark peeling), six samples were collected on September 26, 2011 from El Bayadh (race Rguibi, clear peeling) and 10 samples were collected from Naama on February 9, 2012. The different samples were taking in sterile bottles which

**Table 1 Samples provenance of raw camel's milk.**

Regions	Race	Number of samples	Date
Bechar (Abadla)	Ouled sidi Cheikh	4	September 23, 2011
Al-Bayadh (Elkheitar)	Rguibi	6	September 26, 2011
Naama (Bouktab)	Rguibi	10	February 9, 2012

were subjected to temperature and pH analysis. All samples were transported to the Laboratory of Applied Microbiology (Faculty of Science, University of Oran, Es-senia) in an isothermal container for the physical, chemical and microbiological analysis.

The food camels of these three areas are based primarily on the plants of the Sahara such as *Acacia raddiana Savi* (Talha), *Artemisia herba alba Asso* (Chih), *Euphorbia guyoniana Boiss. Rent.* (Moulbina), *Trananurn nudatum Del* (Damrane), *Retama retam Webb* (Rtam) [10].

### 2.2 Physicochemical Analysis of the Camel Milk

The physicochemical analysis consisted in measuring: the temperature (with an electronic thermometer), the pH (with pH meter, Hanna instruments) and the density (with a thermo-lactodensimeter regulated at a temperature of 20 °C). The Dornic acidity was measured by titration using a graduated pipette, a mixture of 10 mL of milk and 2 to 3 drops of phenolphthalein indicator 1% (w/v), following by the titration by NaOH solution (N/9). The dry matter was measured, after desiccation by evaporation of 5 g milk deposited in a dried capsule in 103 °C during 4 h. Total ashes were measured, after incineration of 5 g milk deposited in a dry and tarred capsule, with the Moufle furnace in 500 °C during 3 h. The fat contents rate (by the method to Gerber) was measured by the introduction, into a butyrometer, 10 mL of concentrated sulphuric acid, 11 mL of milk and 1 mL of amyl alcohol. The butyrometer was stopped then turned over 3 to 4 times for mixing the three products well; the direct reading of the fat content rates is made on the graduated branch of the butyrometer turned over after centrifugation during 3 to 5 min to

1,000 rpm [11, 12]. The protein was measured by the method of Bradford [13, 14].

### 2.3 Total Proteins Profile of Raw Camel Milk (SDS-PAGE)

#### 2.3.1 Preparation of the Samples

The creaming of the samples was done by centrifugation with 4,000 rpm during 15 min at 4 °C. The acidification of raw camel milk was made by the addition of HCl 0.1 N to obtain pH 4.4 (iso-electric pH of caseins) and for the goat and cow's milk until obtaining pH 4.6 (iso-electric pH of caseins). After centrifugation, the precipitate obtained represents caseins and the supernatant the lactoserum [15].

#### 2.3.2 The Electrophoresis (SDS-PAGE)

Electrophoresis on polyacrylamide gel SDS-PAGE was performed on freezing of concentration to 5% and freezing of separation to 12.5% by using the technique described by Laemmli [16]. A mixture of marker of size was prepared with serum albumin (68 kDa), casein (24 kDa),  $\alpha$ -lactalbumin (14 kDa), ovalbumin (45 kDa), lactoferrin (72 kDa) and  $\beta$ -lactoglobulin (18 kDa) [17].

### 2.4 Microbiological Analysis of the Camel Milk

The total aerobic mesophilic flora (TAMF) considered as a good indicator of contamination were counted on plate count agar (PCA) and were incubated for 24 h at 30 °C. The coliforms were grown on the desoxycolate citrate lactose agar (DCL) and were incubated 24 h, at 37 °C for total coliforms and 44 °C for fecal coliforms. *Staphylococci* were determined on Chapman medium (Mannitol Salt Agar) and were incubated for 48 h at 37 °C. The sulphite-reducing clostridia were counted on the culture medium beef liver agar distributed into tubes to promote anaerobic conditions, with heat treatment for 10 min at 80 °C to activate the germination of spores and destroy vegetative cells; the tubes were incubated for 48 h at 37 °C. Only black colonies were counted. Fungal flora was counted on malt extract agar (M.E) [18, 19].

### 2.5 Isolation and Identification of Thermophilic Lactic Acid Bacteria

Thermophilic lactic acid bacteria were isolated on MRS agar (pH 6.8) [20] and were incubated at 45 °C for 48 h. The colonies were randomly picked from plates with 30-300 colonies and several representative strains displaying general characteristics of lactic acid.

Bacteria (LAB) were chosen from each plate for further studies. The pure cultures were characterized using Gram stain, cell morphology and catalase reaction. The strains of LAB were stored without appreciable loss of properties in skimmed milk with 30% (v/v) glycerol at -20 °C. Working cultures were also kept on MRS agar slant at 4 °C and streaked every 4 weeks [21]. Colonies and cell morphology characteristics on MRS agar were examined. Only strains Gram-positive, catalase and cytochrome-oxidase negative have been taken to complete identification and the following tests were applied: growth at 15 °C, 37 °C and 45 °C (MRS broth) for 5 days; growth at pH 6.5 and pH 9.6; gas production from glucose (Durham tubes); hydrolysis of arginine (M16BPC medium) [22]. The production of acetoin from glucose was determined by using the Voges-Proskauer test [23]. The fermentation of carbohydrates (arabinose, ribose, xylose, galactose, fructose, mannitol, sorbitol, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, succrose, trehalose, raffinose, esculin) was determined also in mini preparation with ELISA microtiter plate [24-26].

#### 2.5.1 Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria

Citrate utilization, in the presence of glucose, was studied on KMK medium [27] allows to distinguish between citrate-fermenting colonies (blue colour) and non citrate fermenting colonies (white colour). Production of dextran was recorded on MSE medium [28] strains producing dextran are characterized by the formation of large and viscous colonies. Proteolytic activity was tested using Plat Count Agar PCA with 1%

(w/v) of skim milk [26, 29], the presence of clear zones around the colonies was recorder as positive activity.

### 3. Results and Discussion

The pH of fresh camel milk is 6.36 in September and 6.49 in February (Table 2), which is almost similar to that obtained by Omer et al. and Bornaz et al. [30, 31]. The Dornic acidity ranges from 6.5 to 6.7 in September and February, respectively, was lower than observed by Omer et al. [30] and higher to that obtained by Bornaz et al. and Meiloud et al. [31, 32]. This variation of pH and acidity for the same source of milk could be due to differences in hygiene of the actual milking and the total microbial count of the milk [2]. The average pH, acidity and density presented in Table 2 of camel milk samples collected from different areas seasonal (September and February) is significantly similar to that observed by several authors [33, 34].

The fat content of Algerian dromedary camel milk is between 30 g/L and 52.1 g/L in September and February, respectively [34-36]. Dry matter is very important quantity in February (144.88 g/L) and it is lower in September (93.4 g/L) [30, 36]. The average fat content, total dry matter and ash (Table 2) in Algerian camel milk collected in September is greater than that collected in February, which is probably due to seasonal variation, lactation periods, the state of dehydration animals and feeds [37, 38].

Native-PAGE electrophoretic patterns of camel, cow and goat's milk caseins (Fig. 1) showed that each type of casein has a unique electrophoretic pattern. Camel, cow and goat's milk caseins showed the appearance of three fractions differ in their migration positions. One

of these fractions was the major casein fraction and other two were minor fractions, as indicated by small arrows. Different casein fractions were identified on the gel as described previous by El-Agamy et al. [39].

Electrophoresis analysis of Algerian camel milk reveals several bands that are identical to those of cow's milk and goat's milk (Fig. 1) presence of  $\alpha$ -lactalbumin 14 kDa, [34]. Lactoferrin 72 kDa is present in some samples of camel milk (C1 and C2) and in cow's and goat milk. Our results show the presence of SBA and Ovalbumin in all samples. The casein fraction is present in all samples of camel milk, goat milk and cow milk but the  $\beta$ -lactoglobulin 18 kDa is present only in cow and goats milk [1].

The hygienic quality of camel milk samples collected from different regions indicates the presence of total aerobic mesophilic germs with an average rate (Table 3)  $2.2 \times 10^5$  cfu/mL in September and  $3 \times 10^4$  cfu/mL in February. The presence of total coliforms has an average  $4.2 \times 10^1$  and  $2.4 \times 10^2$  cfu/mL, the presence of coliforms indicates a strong fecal contamination of animal or human origin [9]. Presence of *Staphylococcus aureus* in several samples has an average 13 cfu/mL in the month of September and  $3.4 \times 10^1$  cfu/mL in the month of February. The presence of toxigenic pathogen could cause poisoning to the consumer and mastitis disease in the camels herd [40]. The absence of pathogenic germs, coliforms and spores of sulphite-reducing *Clostridium* which indicates the absence of old fecal contamination.

Species identification of LAB: out of 30 strains obtained from Algerian raw camel's milk were Gram-positive, catalase negative and non-spore-forming.

**Table 2 Physico-chemical analysis of samples collected from camel milk in different seasons and comparison with the parameters of other countries.**

Countries	pH	Dornic acidity (°D)	Density	Dry matter (g/L)	Fatty matter (g/L)	Ash (g/L)	Protein (g/L)	T (°C)
Average $\pm$ SE <sup>a</sup> (September)	6.369 $\pm$ 0.049	18.6 $\pm$ 0.069	1.031 $\pm$ 0.001	93.4 $\pm$ 5.42	30 $\pm$ 3.36	7.46 $\pm$ 0.28	26.3 $\pm$ 2.23	35.83 $\pm$ 0.58
Average $\pm$ SE <sup>a</sup> (Februray)	6.493 $\pm$ 0.052	18.3 $\pm$ 0.082	1.032 $\pm$ 0.001	144.88 $\pm$ 17.058	52.1 $\pm$ 4.121	8.667 $\pm$ 0.557	33.1 $\pm$ 2.13	33.95 $\pm$ 0.770

<sup>a</sup>strandard errors.

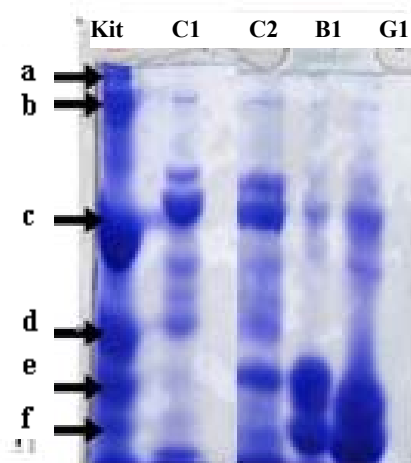


Fig. 1 Electrophoretic patterns of SDS-PAGE of dromedary's milk. Kit = molecular weight (MW) standards containing: a. Lactoferrin (MW 72,000 Da); b. Bovine serum albumin (MW 68,000 Da); c. Ovalbumin (MW 45,000 Da); d. casein (MW 24,000 Da); e.  $\beta$ -lactoglobulin ( $\alpha$ -Lg, MW 18,000 Da) and f.  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La, MW 14,000 Da). C1 and C2, camel milk; B1, cow milk and G1, goats milk.

Table 3 Enumeration of microbial groups of hygienic significance in Algerian camel's milk collected (February/September).

Microorganisms	Max (February) (cfu/mL)	Max (September) (cfu/mL)
TAMF	$30 \pm 3 \cdot 10^4$	$40 \pm 2.2 \cdot 10^5$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$35 \pm 3.4 \cdot 10$	$290 \pm 13$
Total coliforms	$20 \pm 2.4 \cdot 10^2$	$140 \pm 4.2 \cdot 10$
Fecal coliforms	00	00
<i>Clostridium</i>	00	00
Fungal flora	00	$37 \pm 3.3 \cdot 10^4$

The morphological, physiological and biochemical analysis revealed a diversity of LAB that were subdivided into four groups: *Lc. lactis* subsp. *lactis* (36.66%), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (30%), *Weissella cibaria* sp. *Nov* (13.13%) and *Enterococcus faecalis* (20%) (Table 4).

The identification of strains was performed following the recommendations of Carr et al., Bjorkroth et al., Khedid et al. and Dicks et al. [41-44].

Group 1: 11 homofermentative isolates, ADH positive, acetoin negative, they do not grow at 6.5% NaCl but grow at 4%;

Group 2: nine homofermentative isolates, ADH positive, acetoin positive, grow at 4% of NaCl;

Group 3: four heterofermentative isolates, ADH positive, grow at 15 °C, 37 °C, 45 °C and 4% of NaCl;

Group 4: six homofermentative isolates, ADH positive, grow at 45 °C, 15 °C, pH 9.6, ADH positive, does not ferment arabinose.

LAB predominated the total microflora; Lactococci dominates the totality of this flora. In our research, the absence of lactobacillus can be explained by their low concentration in raw camel milk, similar results were observed by Saidi et al. [45]. However, these strains grow at 45 °C. The classic literature indicates that the *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* species did not grow at this temperature. In 2009, Drici et al. [23] identified one *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* strains which grow at 50 °C from Algerian raw camel's milk, they use the molecular identification test. This thermo tolerance probably reflects an adaptation to the high temperatures of the Algerian desert.

There are three groups of isolates according to their proteolytic activities (Table 5): the first group contains 10 strains (1, 2, 11, 13, 19, 20, 22-25) that have a high proteolytic activity area which is more 20 mm in diameter. The second group contains 11 strains (3-6, 8, 10, 12, 16-18 and 21) which have a medium proteolytic activity whose diameter is between 10 and 15, while the third group contains four strains (7, 9, 14 and 15) that have a low proteolytic activity area whose diameter is less than 10 mm.

Camel milk composition was found to be less stable than other species such as bovine milk. However, variations observed in camel milk composition could be attributed to several factors such as analytical measurement procedures, geographical locations, feeding conditions and samples being taken from different breeds, in addition to other factors including stage of lactation, age and calving number [46]. Geographical origin and seasonal variations were found to be also the most effective factors in camel milk composition. Konuspayeva et al. [47] studied the effect of geographical origin on camel milk

**Table 4 Morphological, physiological, biochemical and technological characteristics of thermophilic LAB isolated from Algerian raw camel's milk.**

Group	Cocci			
	1	2	3	4
No. of isolates	11	9	4	6
Gram stain reaction	G+	G+	G+	G+
Spores formation	-	-	-	-
Catalase activity	-	-	-	-
CO <sub>2</sub> from glucose	-	-	+	-
NH <sub>3</sub> from arginine	+	+	+	+
Growth at temperature (°C)	15	+	+	-
	37	+	+	+
	45	+	+	+
Growth at pH	6.5	+	+	+
	9.6	-	-	+
Growth in a medium with NaCl (%)	4	+	+	+
	6.5	-	-	+
Production of dextrane from sucrose	-	-	-	-
Acetoin from glucose	-	+	-	+
Citrate utilization	-	+	+	+
Sugar fermentation				
Arabinose	+	-	+	-
Ribose	+	+	+	-
Xylose	+	+	+	-
Galactose	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+
Cellobiose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+
Melibiose	-	+	+	-
Saccharose	+	+	+	+
Trehalose	+	-	+	+
Raffinose	+	-	+	-
Esculine	+	+	+	+
Species	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	<i>Weissella cibaria</i> sp. nov.	<i>Enterococcus faecalis</i>

(+) = positive reaction, (-) = negative reaction.

composition and showed that the milk composition from camels living in East Africa have higher fat content than the milk from camels living in Africa and Western Asia. Variation in camel milk composition was also observed for camels from the same species (dromedary) but domesticated in different parts of the world [48].

An inverse relationship was found between total solids in camel milk and water intake by camels. In the first study, all components except lactose reached their maxima in mid-winter and were lowest in summer. For example, total solids were 13.9% in December and

January, and 10.2% in August due to availability of drinking water [36]. In another study, the fat content of camel milk was reported to decrease from 4.3% to 1.1% due to the increase in water content of milk produced by thirsty camels [49]. The increase observed in water content could be attributed to the decrease in total solids produced by the thirsty camels.

As far as we know, this is the first report that describes the distribution of LAB population in raw camel milk from Algeria. LAB distribution showed a high diversity of species that are dominant and frequently described in various dairy products. The

**Table 5** Proteolytic activity of isolated lactic acid bacteria.

Isolates	PCA + Lait 1%	Diameter of proteolysis zone (mm)
1	+	20
2	+	20
3	+	10
4	+	10
5	+	10
6	+	15
7	+	9
8	+	10
9	+	8
10	+	15
11	+	16
12	+	13
13	+	18
14	+	5
15	+	7
16	+	15
17	+	12
18	+	11
19	+	17
20	+	20
21	+	10
22	+	16
23	+	18
24	+	20
25	+	18

abundance of some species such as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* and *Weissella cibaria* suggests their possible use as starter culture in the manufacture of camel fermented milk products. Indeed, a process for the production of a camel milk cheese is under investigation in several laboratories. Khedid et al. [43] described several species of LAB isolated from raw dromedary milk in Morocco but all predominant species are thermophilic.

#### 4. Conclusions

The most relevant finding in this investigation is that thermophilic species are highly represented in Algerian camel milk compared with cow milk and goat milk. All isolates can grow at 45 °C. These findings are very important since the one humped camel from Algeria grow in regions where the ambient temperatures are

around 30 °C. Furthermore, during the lactating season which may be extended between May and July, the temperature can reach 40 °C. This is seemingly a very interesting approach for the curdling of camel milk, which can be handled under thermophilic conditions. However, more studies are needed to complete the isolation and the characterization of new LAB strains that could be present in Algerian camel milk and to compare the results with reports from other countries.

#### References

- [1] E.I. El-Agamy, I. Elsayed, N. Mohsen, M. Sherif, A. Shamsiab, A. Sameh, Are camel milk proteins convenient to the nutrition of cow milk allergic children?, *Small Ruminant Res.* 82 (2009) 1-6.
- [2] O.A.H. Al-Haj, A. Al-Kanhal, Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk, *Inter. Dairy J.* 20 (2010) 811-821.
- [3] Z. Farah, Camel Milk, in *Encyclopedia of Dairy Sciences*, (2nd ed.) Editor-in-Chief., 2011, pp. 512-517.
- [4] *Agro-statistics Database*, Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008.
- [5] O.M.A. Abdelhadi, S.A. Babiker, B. Picard, C. Juriec, R. Jailler, J.F. Hocquette, et al., Effect of season on contractile and metabolic properties of desert camel muscle (*Camelus dromedarius*), *Meat Sci.* 90 (2012) 139-144.
- [6] H. El-Hatmi, J.M. Girardet, J.L. Gaillard, M. Habib Yahyaoui, H. Attia, Characterisation of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrums, *Small Ruminant Research* 70 (2007) 267-271.
- [7] V. Dell'Orto, D. Cattaneo, E. Beretta, A. Baldi, G. Savoini, Effects of trace element supplementation on milk yield and composition in camels, *Inter. Dairy J.* 10 (2001) 873-879.
- [8] P.C. Lorenzena, R. Wernery, B. Johnson, S. Joseb, U. Wernery, Evaluation of indigenous enzyme activities in raw and pasteurized camel milk, *Small Rumt Res.* 97 (2011) 79-82.
- [9] N. Benkerroum, A. Boughdadi, N. Bennani, K. Hidane, Microbiological quality assessment of Moroccan camel's milk and identification of predominating lactic acid bacteria, *World J. of Microbiol. Biotech.* 19 (2003) 645-648.
- [10] K. Maiza, P. Brac, R.A. Hammiche, Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara septentrional. Médicaments et Aliments: l'approche Ethnopharmacologique, Actes du 2e Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11 e Conférence

- internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, 1993, pp. 169-171.
- [11] M.O. Koussou, P. Guiraud, L.Y. Mopaté, Evaluation de la qualité physico-chimique et hygiénique du lait de brousse et des produits laitiers locaux commercialisés dans les bars laitiers de N'Djamena au Tchad, *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop* 60 (2007) (1-4) 45-49.
- [12] S.B. Javaid, J.A.I. Gadah, M. Khaskeli, M.B. Bhutto, S. Kumbher, A.H. Panhwar, Physical and chemical quality of market milk sold at tandojam, Pakistan, *Pakistan Vet. J.* 29 (1) (2009) 27-31.
- [13] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248.
- [14] N. Nasri, S. Triki, Les protéines de réserve du pin pignon (*Pinus pinea* L.), *C.R. Biologies.* 330 (2007) 402-409.
- [15] N. Youcef, D. Saidi, F. Mezemaze, K.E. El-Mecherfi, H. Kaddouri, H. Negaoui, et al., Cross reactivity between dromedary whey proteins and IgG anti bovine  $\alpha$ -lactalbumin and anti bovine  $\beta$ -lactoglobulin, *Amer. J. Appl. Sci.* 6 (8) (2009) 1448-1452.
- [16] U.K. Laemelli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [17] J.N. Buffoni, I. Bonizzi, A. Pauciuolo, L. Ramunno, M. Feligini, Characterization of the major whey proteins from milk of Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*), *Food Chem.* 127 (2011) 1515-1520.
- [18] H. Aggad, F. Mahouz, Y. Ammar, M. Kihal, Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien, *Revue Méd. Vét.* 160, 12 (2009) 590-595
- [19] H. Labioui, L. Elmoualdi, A. Benzakour, M.E.L. Yachioui, E. Berny, M. Ouhsine, Etude physicochimique et microbiologique de laits crus, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 148 (2009) 7-16.
- [20] J.C. De Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe, A medium for the cultivation of lactobacilli, *J. Appl. Bacteriol.* 23 (1960) 130-135.
- [21] A. Badis, D. Guetarni, B. Moussa-Boudjema, J.E. Henni, M. Kihal, Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat's milk of four Algerian races, *Food Microbiol.* 21 (2004) 579-588.
- [22] B. Guessas, M. Kihal, Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats milk, *Afr. J. Biotechnol.* 3 (2004) 339-342.
- [23] H. Drici, C. Gilbert, M. Kihal, D. Atlan, Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk, *J. Appl. Microbiol.* 108 (2009) 647-657.
- [24] A.Z. Boumehira, A. Mami, A.R. Hamedi, J.E. Henni, M. Kihal, Identification and characterization of functional and technological *Lactobacillus plantarum* strains isolated from raw goat and camel milk collected in Algeria, *J. Pure Appl. Microbiol.* 5 (2) (2011) 553-566.
- [25] A. Mami, J.E. Henni, M. Kihal, Screening of autochthonous lactobacillus species from Algerian raw goat's milk for the production of bacteriocin-like compounds against *Staphylococcus aureus*, *Afr. J. Microbiol. Res.* 6 (12) (2012) 2888-2898.
- [26] B. Guessas, F. Adjoudj, M. Hadadji, M. Kihal, Isolation and identification of lactic acid bacteria from Dhan, a traditional butter and their major technological traits, *World Appl. Sci. J.* 17 (4) (2012) 480-488.
- [27] G.M. Kempler, L.L. McKay, Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *J. Appl. Environ. Microbiol.* 39 (1980) 956-927.
- [28] J.V. Mayeux, W.W.E. Sandine, P.R. Elliker, A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures, *J. Dairy Sci.* 45 (1962) 655-656.
- [29] M. Moulay, H. Aggad, Z. Benmechernene, B. Guessas, D.E. Henni, M. Kihal, Proteolytic activity of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk, *World J. of Dairy Food Sci.* 1 (1) (2006) 12-18.
- [30] R.H. Omer, A.H. Eltinay, Changes in chemical composition of camel's raw milk during storage, *Pak. J. Nutr.* 8 (5) (2009) 607-610.
- [31] S. Bornaz, A. Sahli, A. Attalah, H. Attia, Physicochemical characteristics and renneting properties of camels milk: A comparison with goats, ewes and cows milks, *Inter. J. Dairy Technol.* 62 (4) (2009) 505-513.
- [32] G.M. Meiloud, I.N. Ould bouraya, A. Samb, A. Houmeida, Composition of mauritanian camel milk: Results of first study, *Inter. J. Agri. Biol.* 13 (1) (2011) 145-147.
- [33] M. Kamoun, Le lait de dromadaire: Production, aspects qualitatifs et aptitude à la transformation, *Options méditerranéennes, série B.*, 1996, pp. 81-103.
- [34] O. Alloui-lombarkia, E.H. Ghennam, A. Bacha, M. Abededdaim, Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du lait de chamelle et séparation de ses protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, *Renc. Rech. Rum.* 14 (2007) 108.
- [35] H. El-Hatmi, T. Khorchani, H. Attia, Characterization and composition of camel's (*Camelus dromedarius*) colostrums and milk, *Microbiol. Hyg. Aliment.* 18 (2006) 13-17.
- [36] A.M. Kamal, O.A. Salama, K.M. El-Saied, Changes in amino acid profile of camel milk protein during the early lactation, *Inter. Dairy J.* 2 (2007) 226-234.
- [37] M.S.Y. Haddadin, S. Gammoh, R.K. Robinson, Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan, *J. Dairy Res.* 75 (2008) 8-12.
- [38] E.S. Shuiep, I.E.M. El Zubeir, O.A.O. El Owni, H.H. Musa, Influence of season and management on



composition of raw camel (*Camelus dromedarius*) milk in khartoum state, sudan, Tropic and Subtrop Agroecosystems 8 (2008) 101-106.

- [39] E.I. El-Agamy, Z.I. Abou-Shloue, Y.I. Abdel-Kader, A comparative study of milk proteins from different species, II. Electrophoretic patterns, molecular characterization, amino acid composition and immunological relationships, in: Third Alexandria Conference on Food Science and Technology, Alexandria, Egypt, Mar., 1997, pp. 1-3
- [40] E.S. Shuiep, T. Kanbar, N. Eissa, J. Alber, C. Lämmner, M. Zschöck, et al., Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from raw camel milk samples, Res. Veter. Sci. 86 (2009) 211-215.
- [41] F.J. Carr, D. Chill, N. Maida, The lactic acid bacteria: A literature survey, Critical Rev. Microbiol. 28 (4) (2002) 281-370.
- [42] J.K. Bjorkroth, U. Schillinger, R. Geisen, N. Weiss, B. Hoste, W.H. Holzapfel, et al., Taxonomic study of *Weissella confuse* and description of *Weissella cibaria* sp. nov. detected in food and clinical samples, Inter. J. Syst. Evol. Microbiol. 52 (2002) 141-148.
- [43] K. Khedid, M. Faid, A. Mokhtari, A. Soulaymani, A. Zinedine, Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco, Microbiol Res. 164 (2009) 81-91.
- [44] L.M.T. Dicks, A. Endo, Taxonomic status of lactic acid bacteria in wine and key characteristics to differentiate species, S. Afr. J. Enol. Vitic. 30 (1) (2009) 72-90.
- [45] D. Saidi, M. Kihal, A. Hamama, A. Chekroune, J.E. Henni, O. Kheroua, Characterization of Algerian raw camels' milk: Identification of dominant lactic acid bacteria and proteins analysis, J. Alg. Reg. Arides. 4 (2005) 1-9.
- [46] M. Khaskheli, M.A. Arain, S. Chaudhry, A.H. Soomro, T.A. Qureshi, Physico-chemical quality of camel milk, J. Agri. Soc. Sci. 2 (2005) 164-166.
- [47] G. Konuspayeva, B. Faye, G. Loiseau, The composition of camel milk: A meta-analysis of the literature data, J. Food Comp. Anal. 22 (2009) 95-101.
- [48] M.A. Mehaia, M.A. Hablas, K.M. Abdel-Rahman, S.A. El-Mougy, Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia, Food Chem. 52 (1995) 115-122.
- [49] R. Yagil, Z. Etzion, Effect of drought condition on the quality of camel milk, J. Dairy Res. 47 (1980) 159-166.