



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun -Tiaret-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

M^{lle} ABBAD Amira

M^{lle} NACEUR Hind

Thème

Isolement et identification des bactéries lactiques thermophiles à partir du lait de vache

Soutenu publiquement le

Jury :

Grade

Président : M^r ABBES M. A.

MCA Université Ibn Khaldoun-Tiaret-

Encadrant: M^{me} MOULAY M.

MCA Université Ibn Khaldoun-Tiaret-

Co-encadrant: M^r BENBEGUARA M.

MAA Université Ibn Khaldoun-Tiaret-

Examineur : M^{me} TAIBI A.

MCB Université Ibn Khaldoun-Tiaret-

Année universitaire 2023-2024

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Allah de nous avoir aidé et de nous avoir donné patience et courage pendant nos études.

Les plus sincères remerciements s'adressent à notre encadrant M^{me}

MOULAY M. pour avoir proposé et dirigé ce travail, pour sa disponibilité, ses fructueux conseils et ses judicieuses orientations tout au long de la réalisation de ce mémoire. Et à notre Co-encadrant

Mr. BENBEGUARA M. pour son soutien moral et ses consignes.

Nous remercions également les membres du jury, notre examinatrice M^{me} TAIBI A pour l'honneur qu'il nous a fait de juger notre travail, et

Mr ABBES M. A. d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance.

On tient à remercier spécialement Mr HOCINE L. le responsable de l'équipe de formation master microbiologie appliquée pour son soutien constant.

Nous souhaitons également à exprimer notre profonde gratitude à tout le personnel du laboratoire de microbiologie, en particulier à M^{me}Soualmi K et Djalouli Z, pour leurs aides, leurs conseils et leurs encouragements.

Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce travail, de près ou de loin.

Dédicace

À ma très chère mère

*Quoi que je fasse ou que j'adois je ne saurai point te remercier
comme il doit, ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta
présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter
les différents obstacles*

À mon très cher père

Tu as toujours été à mes côtés et m'encourager

À mes très chers frères m'hamed et ihab

À tout ma famille

Puisse dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite

Au défunt abbadboualem

Amira

Dédicace

Le parcours académique n'a pas été court et le chemin n'a pas été semé d'embûches, mais nous y sommes parvenus. Dieu soit loué, qui a facilité les débuts et nous avons atteint les fins.

*Je dédie cette réussite à mon ambition d'abord, à celui qui m'a accompagné pour mener à bien mon parcours universitaire, à celui dont je porte le nom avec dignité et fierté, à celui qui m'a ouvert la voie et à femme qui a fait de moi une fille ambitieuse et mon premier modèle Khaled et Aliya
À l'épaule qui ne penche pas et à l'ombre dans laquelle je me réfugie, aux cœurs qui battent sincèrement, aux piliers fermes de la vie, mes frères, Abdul Rahman, Kenza et
Montaseur*

A tout la famille Maceur Et La Famille Belhawari

C'est à vous tous que je dédie cet humble travail.

Hind

Sommaire

Liste des abréviations	I
Liste des tableaux	II
Liste figures	III
Liste des photos	IV
Introduction	1

Première partie : synthèse bibliographique

I. Lait	3
I.1. Définition	3
I.2. Microbiologie du lait	3
I.2.1. Flore de contamination	3
I. 2.2. Flore originelle	3
II. Bactéries Lactiques	4
II.1. Présentation Générale	4
II.1.1. Caractéristiques principales des bactéries lactiques	4
II.1.2 . Habitats	5
II.1.3 .Culture des bactéries lactiques	5
II.2 .Taxonomie des bactéries lactiques	5
II.3. Méthodes d'identification des bactéries lactiques	6
II.3 .1. Méthode classique	6
II.3 .2. Méthode moléculaire	7
II.4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques thermophiles	7
II.4.1. Genre <i>Lactobacillus</i>	7
II.4.2 Genre <i>Streptococcus</i>	8

Deuxième partie: partie expérimentale

Chapitre I: Matériel et méthodes

1. Objectif de travail	12
2. Lieu et période de travail	12
3. Matériel	12

3.1. Matériel biologique.....	12
3.2. Matériel de laboratoire.....	12
4. méthodes.....	14
4.1. Protocole expérimental	14
4.2. Echantillonnage	15
4.3. Isolement des bactéries	15
4.3.1. Préparation des dilutions	15
4.3.2. Isolement des bactéries lactiques thermophiles	15
4.3.2.1. Isolement Sur milieu solide	15
4.3.2.1.1. Lactobacillus	15
4.3.2.1.2. Streptococcus	15
4.3.2.2. Sur milieu liquide.....	16
4.4 Purification des isolats.....	16
4.5 Conservation des isolats	18
4.5.1 Conservation à court terme	18
4.5.2 Conservation à longue durée.....	18
4.6 Identification des isolats	18
4.6.1 Caractérisations morphologiques.....	18
4.6.1.1. Examens macroscopiques	18
4.6.1.2 Examens Microscopiques	19
4.6.1.2.1. Coloration de gram.....	19
4.6.2. Caractérisation biochimiques.....	20
4.6.2.1. Test de catalase	20
4.6.2.2 Type fermentaire	20
4.6.2.3Test TSI (triple sugar iron).....	20
4.6.2.4. Test de mannitol mobilité	21
4.6.2.5. Test de citrate de Simmons	21
4.6.2.6. Test ONPG (Orthonitro-Phenyle -B-Galactoside).....	21
4.6.2.7. Test d'ADH (arginine di hydrolase)	22
4.6.3Caractérisation physiologiques	22
4.6.3.1. Température de développement	22
4.6.3.2 Thermorésistance à 60°C pendant 30min	22
4.6.3.3Croissance en différente concentration de NaCl.....	23

Chapitre II Résultats et discussion

II.1 .Résultats.....	25
II..11. Isolement des bactéries lactiques	25
II..12. Identification	25
II ..12.1. Critères morphologiques	25
II ..12.1. 1. Aspect macroscopique.....	25
III.2.1.1.1 Sur milieu solide.....	25
II..12.1.1.2. Sur milieu liquide	26
II ..12.1.2.Aspect microscopique	27
II..12.2. Critères biochimiques et physiologiques.....	28
II..12.2.1. Test de catalase.....	29
II..12.2 .2.Type fermentaire	29
II..12.2 .3.Test de TSI	30
II..12.2 .5.Test citrate de Simmons	31
II..12.2. 6.Test d'ONPG.....	31
II..12.2.7.Test D'ADH	32
II..12.2.8.Test de thermorésistance	32
II..12.2.9.Test de croissance en présence de NaCl.....	33
II.2.Discussion.....	36
Conclusion.....	40
Références bibliographiques	39

Annexes

Résumé

الملخص

Liste des abréviations

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

GC% : Pourcentage de guanine et cytosine

MRS : Man, Rogosa, Sharpe

NaCl : Chlorure de sodium

Subsp. : Sous espèce

M17 : Tarazaghi et Sandine

NaOH : Hydroxyde de sodium

HCL : Chlorure d'hydrogène

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

ONPG : Orthonitro-Phenyle -B-Galactoside)

TSI : Triple Sugar Iron

S. : *Streptococcus*

Liste des tableaux

N°	Titre des tableaux	pages
01	Composition moyenne du lait de vache	03
02	Flore originelle du lait	04
03	Classification des bactéries lactiques thermophiles, selon Bergy's manuel	09
04	Milieu de culture, produits chimiques, réactifs.	12
05	Appareillage, verreries, et autre matériel.	13
06	Codes des isolats sur les deux milieux	25
07	Morphologie des souches lactiques isolées	28
08	Résultats des tests physiologiques et biochimiques des isolats sur milieu MRS	34
09	Résultats des tests physiologiques et biochimiques des isolats sur milieu M17.	34
10	Identification des souches de bactéries lactiques thermophiles	35

Liste des figures

N°	Titre des figures	pages
01	Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative de l'ADN ribosomique (ADNr) montrant les différents groupes phylogénétiques des bactéries lactiques à faible (GC%) et les genres Gram positif non reliés <i>Propionibacterium</i> et <i>Bifidobacterium</i> .	06
02	Morphologie en microscopie électronique de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .	08
03	Morphologie en microscopie électronique de <i>Streptococcus thermophilus</i>	09
04	Protocole expérimental	14
05	isolement et la purification des streptocoques et lactobacilles	17
06	conservation à longue durée	18
07	Aspect macroscopique des colonies sur milieu MRS après 24h d'incubation à 42°C	26
08	Aspect macroscopique des colonies sur milieu M17 après 24h d'incubation à 37°C.	26
09	Aspect de culture pure des bactéries lactiques, en milieu liquide	27
10	Aspect microscopique et arrangement des isolats après coloration de gram objectif (×100), souche NS4	27
11	Aspect microscopique et arrangement des isolats après coloration de gram objectif (×100) objectif (×100), souche AL2	28
12	Résultats de test de catalase	29
13	Type fermentaire sur milieu MRS liquide contenant la cloche de durham, incubé à 42°C/24h.	29
14	Test de TSI	30
15	Résultats de test mannitol-mobilité	31
16	Résultats de test de citrate de sommons	31
17	Résultats de test d'ONPG	32
18	Résultats de test d'ADH	32
19	Résultats de test de thermorésistance	33
20	Résultats de test de croissance en présence de différente concentration de Na Cl	33

Liste des annexes

Annexe n°	Liste des annexes	pages
01	Composition des milieux de cultures d'isolement (MRS et M 17)	46
02	Composition des milieux utilise pour l'identification	47
03	Composition des colorent	49
04	Milieu de conservation	50
05	repiquages	51
06	Coloration de gram	52
07	Régulation de pH	53

Introduction

Introduction

Introduction

Le lait est, de par sa composition, un aliment de choix : il contient des graisses, du lactose, des protéines, des sels minéraux, des vitamines et 87% d'eau et son pH est de 6,7. Il constitue un substrat favorable au développement de certains microorganismes (**Guiraud, 1998**), Certains d'entre eux des germes pathogènes ou agents d'altération, d'autres utiles responsables de la fermentation, les bactéries lactiques fait l'objet de plusieurs travaux de recherche (**Georges et François, 2008**).

Les bactéries lactiques représentent un groupe hétérogène des germes classées ensemble en raison de leur principal produit métabolique final commun, l'acide lactique lors de la transformation des hydrates de carbone (**Mofredjet *al.*, 2007**). Ces bactéries présentent un grand intérêt dans l'industrie laitière (**Bakhouch et Boulahrouf, 2005**), Les bactéries lactiques contribuent par leur métabolisme et leurs activités enzymatiques variées, à la production de composés volatils qui participent au développement de l'arôme, de la saveur et de la texture de plusieurs produits laitiers. Certaines bactéries lactiques produisent une des exopolysaccharides qui jouent un rôle important dans le développement de la texture de plusieurs produits laitiers (**Labaoui *et al.*, 2005**). Le plus largement utilisé dans la technologie laitière sont les bactéries lactiques thermophiles.

Les bactéries lactiques thermophiles homofermentaires jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales (**Stiles et Holzapfel, 1997**). Grâce à leur résistance à la température élevée, ces bactéries sont particulièrement adaptées à la fermentation des produits nécessitant des conditions thermiques plus élevées que le moyen, parmi les laits fermentés, le yaourt et le fromage.

Dans ce contexte et du fait de leur importance l'objectif de notre travail consiste à isoler, caractériser et identifier des souches lactiques thermophiles à partir du lai de vache.

Première partie
Synthèse bibliographique

I. Lait

I.1. Définition

Le lait de vache est un liquide opaque de couleur blanche, plus au moins jaunâtre selon la teneur en β - carotène de sa matière grasse. Sa saveur est douce et son odeur faible, mais identifiable (**FAO, 1995**). La composition nutritionnelle moyenne du lait est donnée dans le tableau 1.

Tableau 01: Composition moyenne du lait de vache (**Mathieu, 1998**).

Composition	Teneures (g/l)
Eau	902
Glucides (lactose)	49
Matières grasses	38
Protéines (caséines)	26
Protéines solubles	6
Sels	9
Autres substances	1.5

I.2. Microbiologie du lait

Du fait de sa composition physicochimique, le lait est un excellent substrat pour la croissance microbienne (**Bourgeois et al., 1996**). Les micro-organismes du lait sont divisés en deux grands groupes selon leur importance : la flore originelle et la flore contaminante (**Vignola, 2002**).

I.2.1. Flore de contamination

Le lait est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées lacténine mais leur action est courte environ 1heure, selon **Guiraud(1998)**, la contamination du lait par des germes exogènes provenant des fèces et téguments de l'animal (coliformes, entérocoque,*Clostridium*), air et eau (*Pseudomonas*), équipement de traite et de stockage du lait (microcoque, levures et flore lactique).

I. 2.2. Flore originelle

Le lait contient peu de micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10^3 germes /ml) (**Guiraud, 1998**). Le tableau 2 représenté la flore originelle du lait.

Tableau 02: Flore originelle du lait (Vignola, 2002).

Microorganisme	Pourcentage (%)
<i>Micrococussp.</i>	30-90
<i>Lactobacillus</i>	10-30
<i>Streptococcus</i> ou <i>Lactococcus</i>	<10
Gram négatif	<10

II. Bactéries Lactiques

II.1. Présentation Générale

II.1.1. Caractéristiques principales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes , procaryotes , gram positives hétérotrophes et chimioorganotrophe, elles sont le plus souvent immobiles, a sporulées ,catalase négative, oxydase négative, anaérobies facultatives ou microaérophiles(**Savodogaoet al., 2011**). Dont la principale caractéristique est de produire de l'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (**Badis et al., 2005**). Depuis 1960, **Orla Jensen** a montré que les bactéries lactiques peuvent se subdiviser en deux groupes biochimiques : les homofermentaires et les hétérofermentaires. La différence entre ces deux groupes est détectable par le dégagement de CO₂ (**Bourgeois et Lapent, 1996**).

Elles sont en général aérotolérantes, qui forment un groupe hétérogène composé de coque et bacilles (**Badis et al., 2005**).

Elles sont généralement mésophiles certaines sont psychotolérantes ou thermotolérantes, capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C (**Eck et Gillis, 2006**) avec un pH compris entre 4-4.5 et une tolérance variable à sel.

La teneur en GC de leur ADN varie de 33 à 54% qui permet à classer comme faible GC% et une taille de génome comprise ente 1.8 et 3.3 mpb (**Holzapflet al ., 1997**).

Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation généralement non pathogènes et considérées comme (gras) (generally recognized as safe / généralement reconnu comme sûr).

II.1.2 . Habitats

Les bactéries lactique sont trouvées dans diverses niches écologiques telque le lait, ainsi que certaines aliments, la bouche, les régions gastro-intestinales et urogénitales des humains et animaux (**Matharaet al., 2004**).

II.1.3 .Culture des bactéries lactiques

La culture des bactéries lactiques est difficile car leurs besoins nutritionnels sont riches et complexes, contenant des glucides, des acides aminés, des acides gras, des sels de vitamines et d'autres nutriments. Par conséquent, leur capacité de biosynthèse est très limitée et elles sont essentiellement cultivées dans le milieu MRS.

Le milieu MRS est un milieu riche qui offre aux bactérie à culture difficile différentes sources de carbone et d'azote telles que les peptones, glucose et le tween80 (**Deman et al., 1960, Kahina, 2012**).

II.2 .Taxonomie des bactéries lactiques

La première classification des bactéries lactiques basée sur les propriétés observables à savoirs propriété morphologiques, biochimiques et physiologiques à été établie en 1919 par **Oral-Jensen**. Ainsi les marqueurs chimiotaxomoniques tels que les compositions des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire sont utilisées pour la classification.

La taxonomie des bactéries lactiques a été révolutionne en introduisant la phylogénie moléculaire basée sur la séquence ARN ribosomique qui conduit à une reclassification importante de certaines espèces et sous espèces, figure 1 montre les différents groupes phylogénétiques des bactéries Lactiques à faible (GC%) basé sur l'analyse comparative de l'ADN ribosomique (ADNr).

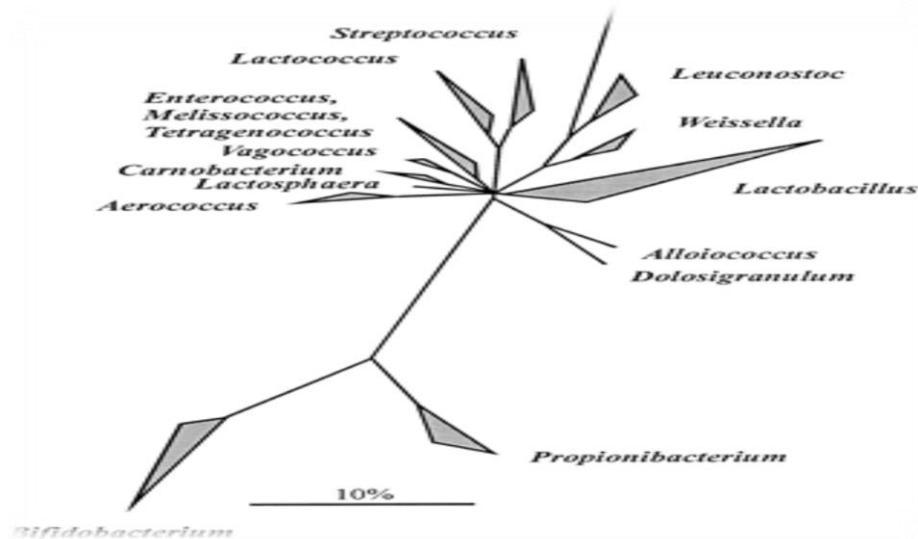


Figure 0 1 : arbre consensus, basé sur l'analyse comparative de l'ADN ribosomique (ADNr) montrant les différents groupes phylogénétiques des bactéries lactiques à faible (GC%) et les genres Gram Positif non reliés *Propionibacterium* et *Bifidobacterium*. (Holzapfelet *al.*, 2001).

II.3. Méthodes d'identification des bactéries lactiques

Les méthodes classiques de classification des bactéries lactiques ont toujours été basées sur des caractéristiques morphologiques, phénotypiques, biochimiques et physiologiques.

Les principales méthodes utilisées pour la classification et l'identification des bactéries lactiques selon Michel (2005).

II.3.1. Méthode classique

Sur les milieux MRS, ELIKER ou M17 les bactéries lactiques forment des petites colonies (2 à 3 mm de diamètre) blanches à crème bombées.

L'appartenance au groupe se fait sur la base de la coloration de gram positive, d'activité catalase et oxydase négatives et éventuellement l'absence de réduction des nitrates.

L'identification du genre est d'abord par la morphologie, puis par le type fermentaire (production de CO₂ à partir du glucose), et les conditions physiologiques de croissance.

L'identification des espèces se base, en plus de ces tests sur le profil de fermentation de différents glucides, la dégradation de l'arginine, la production de dextrane, et l'isomère de l'acide lactique.

Des tests plus spécifiques comme la recherche du pouvoir hémolytique peuvent être utilisés pour les *Streptococcus* et les *Enterococcus*.

II.3 .2. Méthode moléculaire

La technique de l'ADN chromosomique correspondant à L'ARN R16S permet l'identification précise de l'espèce et de variant permet de mettre au point une meilleure procédure de sélection des souches naturelles et traditionnelles pour un usage alimentaire (Badis *et al.*, 2004).

II.4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques thermophiles

II.4.1. Genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le principal genre de la famille des lactobacillaceae, contenant des bactéries en forme de bacille allongées et minces, d'autres plus courts et courbés en paires ou en chaînes, avec des propriétés homo et hétérofermentaires. Michael et Hozapfel(1997), site que la division classique des lactobacilles était basée sur leurs caractéristiques fermentaire.

D'après la classification D'oral –Jensen(1919) le genre *Lactobacillus* est subdivisé en trois groupes selon leur type fermentaire :

Groupe « Streptobacterium » : ce groupe comprend les espèces hétérofermentaires facultatives. Ces espèces métabolisent les sucres hexoses en acide lactique par la voie homofermentaires (EMP) et dégradent les sucres pentoses en acide lactique par la voie hétérofermentaire.

Groupe « Betabacterium » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires obligatoires. Qui englobe des espèces relativement hétérogènes par un pourcentage GC% qui varie entre 32 à 55%.

Groupe « Thermobacterium » : ce groupe rassemble des espèces homofermentaires obligatoires. Il constitué d'espèces thermophiles impliquées dans la fermentation des produits laitiers, qui fermentent le glucose exclusivement en acide lactique, ne fermentent pas le pentose ou le gluconate (Michael et Hozapfel, 1997).

Elles développent à 45°C mais pas à 15°C, les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont : *Lb. helveticus*, *Lb. jugurti*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. kefirifaciens*, *Lb. mali*). La figure2 représente l'observation microscopique de *Lactobacillus bulgaricus* sous microscope électronique.

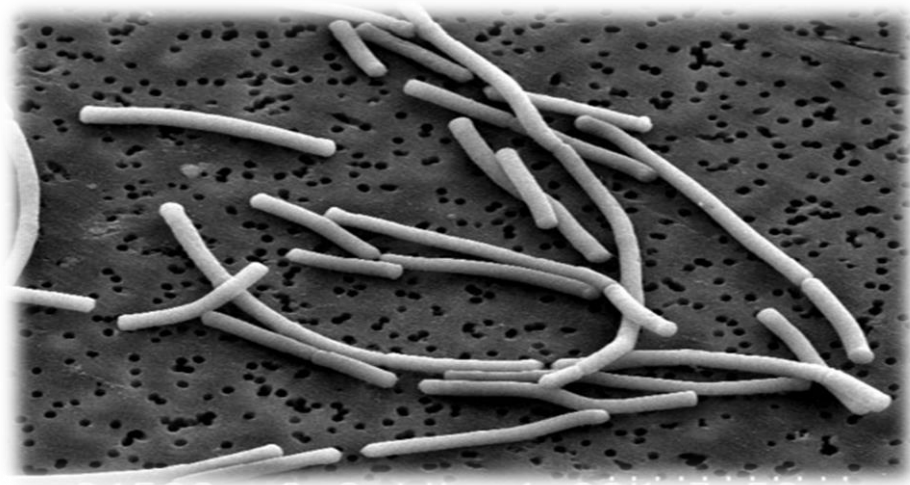


Figure 02 : Morphologie en microscopie électronique de *Lactobacillus bulgaricus* (Paul, 2016).

Les bactéries de ce groupe sont caractérisées par l'importante quantité d'acide lactique produite par ces genres, chaque espèce possède des aptitudes très limitées à fermenter divers sucres (Ghozlane, 2012).

Lb. acidophilus est utilisé dans la production de lait acidophile et est considéré comme une bactérie probiotique (Michael et Hozapfel, 1997).

II.4.2 Genre *Streptococcus*

Les streptocoques sont des bactéries lactiques homofermentaires qui se composent des espèces saprophytes, d'autres utilisées dans la fabrication de certains produits en laiterie : fromagerie, beurrerie et on retrouve également certaines espèces pathogènes.

La seule espèce de streptocoque qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* (Michael et Hozapfel, 1997).

Streptococcus thermophilus se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. Ils se développent bien à 37 °C, (Guiraud, 2012), l'absence de tout antigène de groupe D, sa thermorésistance à 60°C (parfois 65°C) pendant 30 min, une activité fermentaire le plus souvent réduite à quelques sucres et une forte sensibilité au NaCl (Novel, 1996), permettent de distinguer les *S.thermophile* de la plupart des autres streptocoques.

Figure 3, montre l'aspect des cellules de *Streptococcus thermophilus* sous la microscopie électronique.

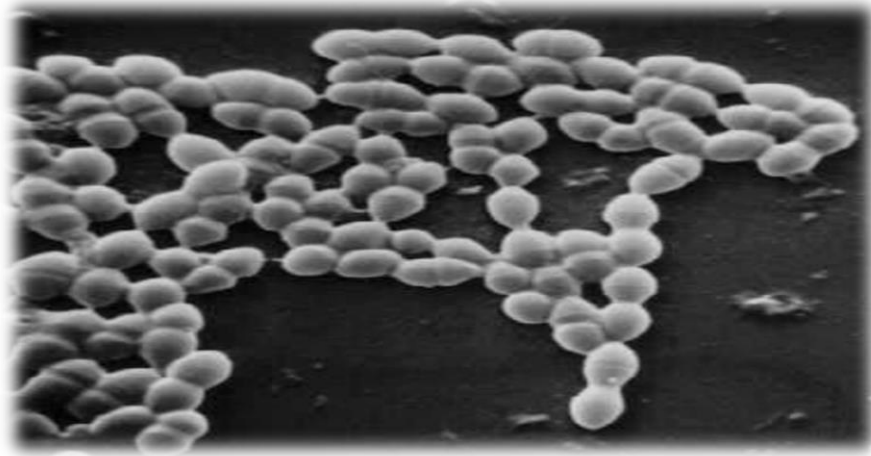


Figure 03: Morphologie en microscopie électronique de *Streptococcus thermophilus* (Liebefeld, 2002).

Elle est connue par une forte production d'arôme tel que l'acétaldéhyde, et par sa capacité de produire de l'acide folique et des exopolysaccharides (Bennama, 2012).

Elle peut être isolée du lait chauffé à 45°C-50°C, du lait pasteurisé, ou des levains artisanaux, elle est largement utilisée pour la fabrication du yaourt et du fromage en association avec d'autres bactéries lactiques tels que *Lactobacillus delbrucckii* subsp. *bulgaricus* et *Lactococcus lactis* (Holset *al.*, 2005).

Tableau 03 : Classification des bactéries lactiques thermophiles (*Lactobacillus* et *Streptococcus*), selon Bergey'smanuel (Vos *et al.*, 2011).

<i>Lactobacillus thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Règne : Bacteria	Règne : Bacteria
Division : Fimicutes	Division : Fimicutes
Classe : Bacilli	Classe : Bacilli
Ordre : Lactobacillales	Ordre : Lactobacillales
Famille : Lactobacillaceae	Famille : Streptococcaceae
Genre : <i>Lactobacillus</i>	Genre : <i>Streptococcus</i>

Deuxième partie
Partie expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthodes

1. Objectif de travail

Le but de cette étude est l'isolement et d'identification de quelques bactéries lactiques thermophiles (*Streptococcus* et *Lactobacillus*) à partir de lait cru de vache.

2. Lieu et période de travail

Notre étude a porté sur une durée de 45 jours du 1^{er} février au 15 mars 2024, réalisée au niveau de laboratoire de microbiologie 1 de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, de l'Université Ibn Khaldoun -Tiaret-.

3. Matériel

3.1. Matériel biologique

L'échantillon de lait cru de vache provient de la ferme d'élevage situé dans le village karman wilaya de Tiaret.

3.2. Matériel de laboratoire

Le matériel de laboratoire utilisé pour réaliser nos travaux est présenté dans les tableaux 4 et 5.

Tableu04 : Milieu de culture, produits chimiques et réactifs

Milieus de cultures (voir annexes 1 et 2).	Produits chimiques et réactifs
Milieu man-rososa et sharp (MRS) gélose et bouillon	Disque ONPG Sulfite de sodium
Milieu tarazaghi et sandine (M17) gélose et bouillon	Violet de gentiane, fuschine NAOH, HCL
Gélose citrate de Simmons	Ethanol, lugol, eau oxygénée
Gélose triple sugariron (TSI)	
Gélose mannitol mobilité	
ADH	
Eau peptonée, l'eau physiologique,	

Tableau 05 : Appareillage, verreries, et autres.

Appareillage	Verreries	Autres
Autoclave	Béchers	Anses de platine
Balance analytique(Sartorius)	Eprouvette graduée	Boites de pétri
Microscope (Leica Dm500)	Flacons	Pinces
Etuve à 37/42°C(Mammert)	Lames /lamelles	Bac de coloration
Vortex	Pipettes pasteur	Bec bunsen
Centrifugeuse (Hettich universal320)	Tubes à essai	Micropipette
Hôte	Burette	Spatules
pH-mètre (Hanna Hi 2210)		Papiers filme/aluminium
Bain marie à 60°C (Mammert)		

4. méthodes

4.1. Protocole expérimental

Le plan expérimental adopté dans notre étude est présenté dans la figure 4.

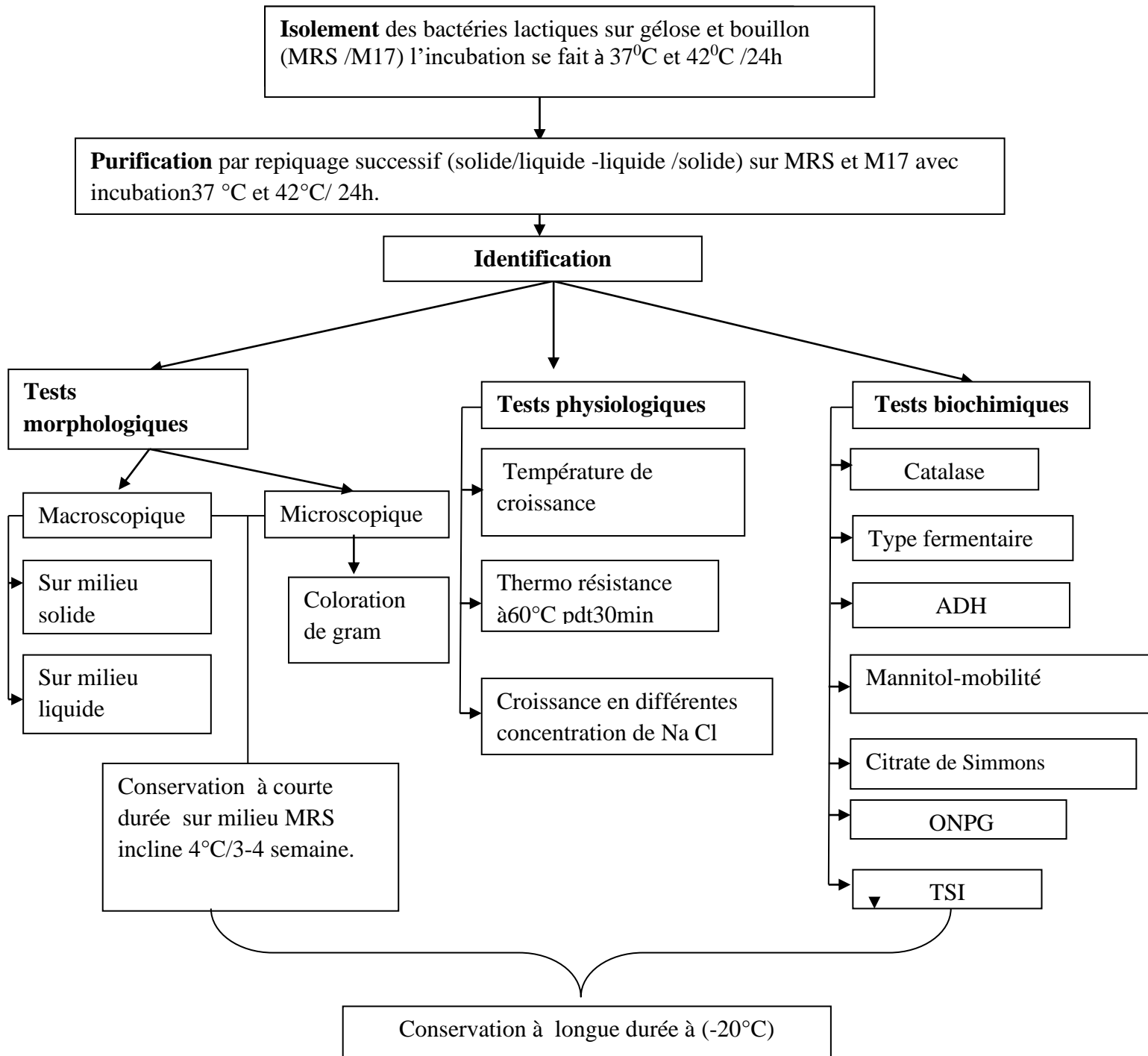


Figure 04: Protocole expérimental

4.2. Echantillonnage

La collecte du lait a été réalisée selon les règles d'hygiène et d'asepsies recommandées en microbiologie, c'est-à-dire le matin au moment de la traite manuelle après lavage à l'eau et séchage du pis.

Les deux premiers jets sont éliminés afin d'écartier la contamination qui se trouve probablement à l'entrée du pis. Le lait cru recueilli dans un flacon stérile (125ml) à 4°C est transporté au laboratoire de microbiologie¹ de l'université Ibn khaldoun -Tiaret-.

4.3. Isolement des bactéries

4.3.1. Préparation des dilutions

Après agitation pendant 10 secondes le flacon contenant le lait à diluer, à l'aide d'une pipette graduée on prélève 1ml de lait et on ajoute soigneusement au tube contenant 9ml de l'eau peptonée stérile, agiter le tube on obtient la dilution 10^{-1} , Au moyen d'une autre pipette stérile on prélève 1 ml de la dilution 10^{-1} et on l'introduit aseptiquement dans un tube contenant 9ml du diluant afin d'obtenir la dilution 10^{-2} , On répète la même procédure jusqu'à la dilution 10^{-6} (Guiraud,2003).

4.3.2. Isolement des bactéries lactiques thermophiles

4.3.2.1. Isolement Sur milieu solide

4.3.2.1.1. *Lactobacillus*

L'isolement a été réalisé sur gélose MRS modifiée par l'addition de CaCO_3 , ce milieu adapté à la recherche spécifique des lactobacilles.

L'ensemencement se fait en profondeur, 1ml de la dilution est introduit au fond des boîtes de pétri, ensuite un volume de 25ml de la gélose est ajouté, une homogénéisation par des mouvements en circuits (∞) a été réalisée, puis les incubées à 42°C pendant 24 à 72h.

4.3.2.1.2. *Streptococcus*

L'isolement a été réalisé sur gélose M17 milieu adapté à la recherche spécifique des streptocoques, préalablement coulé et solidifié dans des boîtes de pétri, ensemencés par 0.1 ml des dilutions, à la surface du milieu, suivi d'un étalement puis les incubées à 37 ° C pendant 24-72h.

4.3.2.2. Sur milieu liquide

Chaque dilution à été transfère dans une série contenant le bouillon MRS et autre série contant le bouillon M17, puis incube les tubes à la température 37°C /42°C pendant 24-72h.

4.4 Purification des isolats

La purification à été réalise par un repiquage successif (séries de 05 repiquages) sur MRS (gélose et bouillon) pour lactobacilles et M17 (gélose et bouillon) pour les streptocoques, avec une incubation de 42°C/37°C pendant 24h.

La purification des isolats sur milieux solides se fait par les méthodes des stries (**Badis et al., 2005**), jusqu'à l'obtention des colonies bien distincte de même taille, même forme, même couleur, renseignant la pureté des isolats (**karam et karam, 1994,2006**).

La figure 5 illustrée le schéma de l'isolement et la purification des streptocoques et lactobacilles.

NB:

A partir de chaque repiquages le test de catalase et la coloration de gram à été fait afin d'éliminer tous qu'il ni pas bactéries lactiques.

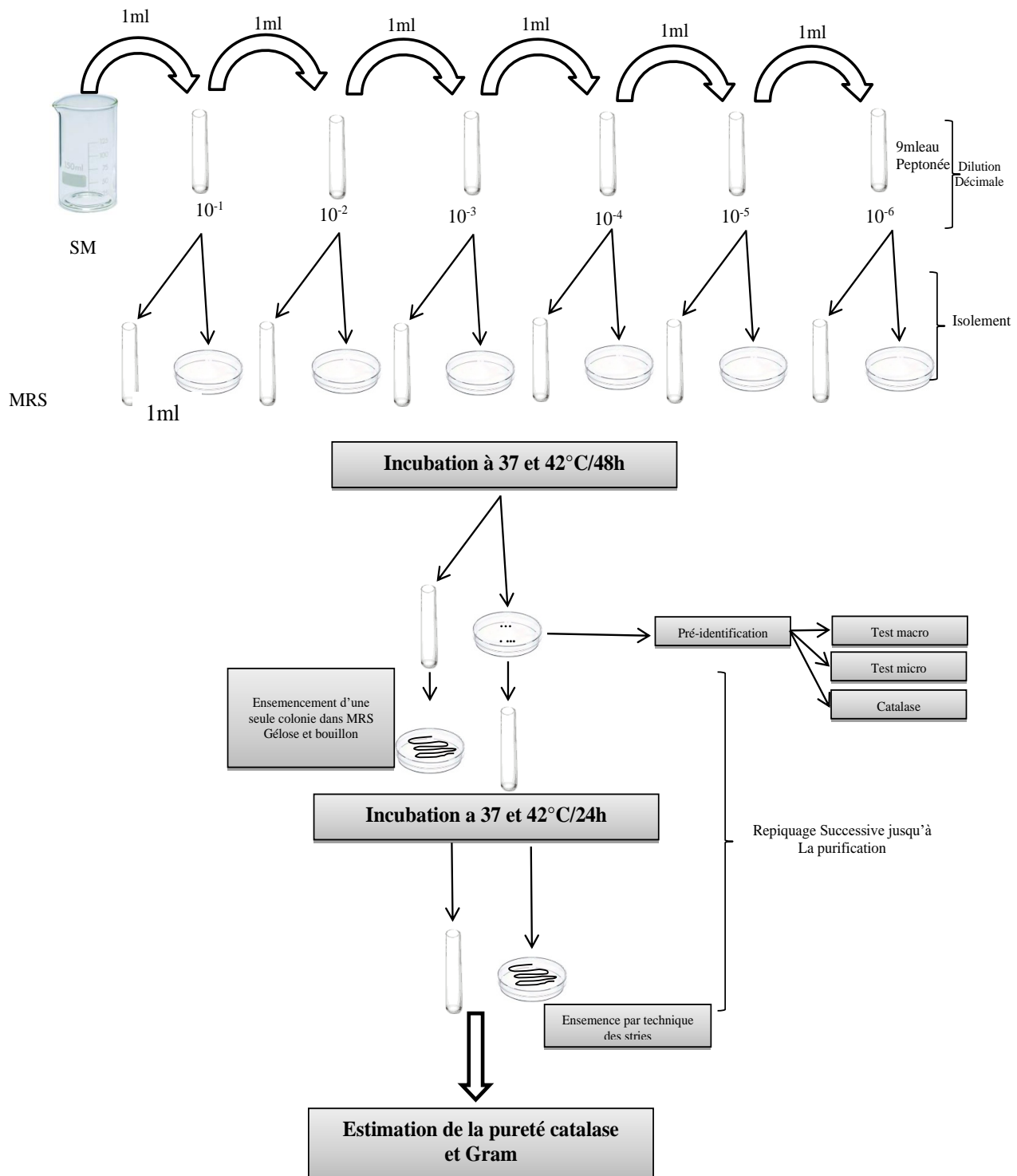


Figure05 : Isolement et la purification des streptocoques et lactobacilles

4.5 Conservation des isolats

Pour la conservation des isolats deux méthodes sont employés :

4.5.1 Conservation à court terme

La conservation à court terme des souches pure est effectuée sur milieu solide incliné, après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C pendant 3 à 4 semaines (Badis *et al.* , 2005).

4.5.2 Conservation à longue durée

On ensemence les souches dans un milieu de base liquide, après incubation en condition optimale, on centrifuge la culture jeune dans des tubes eppendorfs à 300 tours pendant 5 min, on ajoute au culot obtenu le mélange de 70% lait écrème et de 30% glycérol pure puis on conserve à (-20°C) au congélateur (Moulay *et al.* , 2006) (Figure 6).

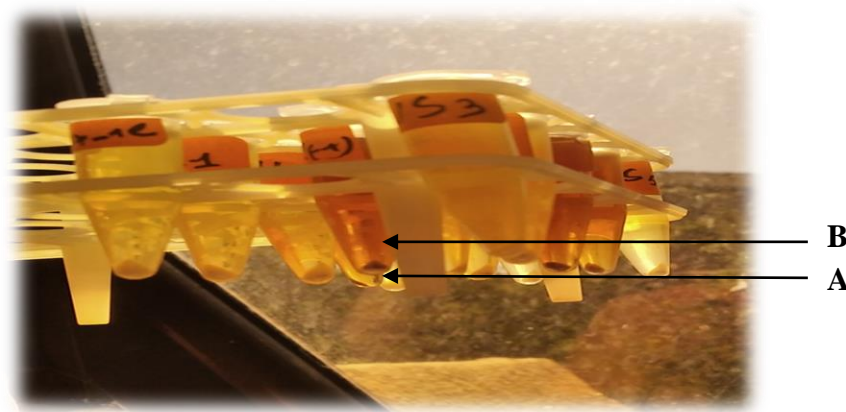


Figure06 : conservation à longue durée des bactéries

A : culot B : surnagent

4.6 Identification des isolats

L'identification des souches à été réalisé par l'application des techniques classiques basées sur les caractères biochimiques, physiologiques ainsi morphologiques.

4.6.1 Caractérisations morphologiques

4.6.1.1. Examens macroscopiques

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen réalisé à partir d'isolats cultivés, elle permet l'observation visuelle des cultures sur milieux MRS et M17 solides et

liquides pour caractériser la taille, la forme, l'aspect et la couleur des colonies sur milieux solides et turbidité en milieux liquides.

4.6.1.2 Examens Microscopiques

L'observation microscopique au grossissement ($G \times 100$) permet de classer les bactéries selon leur gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association (**Benmehid et Bennani ,2022**).

4.6.1.2.1. Coloration de gram

La coloration de gram mise au point en 1884 par **Christian Gram**, elle permet de mettre en évidence les caractères morphologiques (forme et taille) des bactéries et leur Gram.

Procédure de la coloration

Préparer un frottis d'une culture bactérienne pure ;

Coloration

- Recouvrir le frottis de violet de gentiane : laisser agir 1 minute ;
- Rincer à l'eau distillée ;

Mordantage au lugol

- Ajoute du lugol et laisser agir 1 minute ;
- Rincer à l'eau distillée ;

Décoloration

- Décolorer avec l'alcool pendant 10second ;

Recoloration

- Recolorer avec fuschine pendant 1 minute ;
- Rincer à l'eau distillée ;
- Sécher.

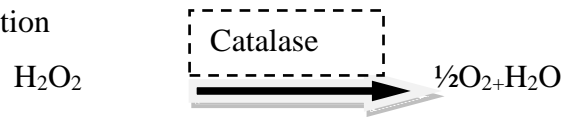
L'observation se fait au microscope optique, à l'objectif $\times 100$, après ajout de quelque goutte d'huile à immersion.

Selon **Guiraud (2012)**, celles qui retiennent de gentiane après lavage à l'alcool sont gram positif, celles sont décolore et prennent ensuite la couleur d'un second colorant sont dites gram négatif.

4.6.2. Caractérisation biochimiques

4.6.2.1. Test de catalase

La catalase est une enzyme qui décompose l'eau oxygénée en eau et on oxygène qui se dégage selon la réaction



Technique

Prélève une colonie sur l'extrémité d'une anse de platine que l'on plonge ensuite dans une goutte d'eau oxygéné qui été déposée sur une lame.

Lecture

Apparition du bulle d'air signifié la présence de catalase, les bactéries lactique sont catalase négative (**Hassanine ,2013**).

4.6.2.2 Type fermentaire

Ce test permet de discriminer les bactéries lactique homofermentaire de celles hétéro fermentaire (**Guiraud, 2003**).

Il consiste à mettre en évidence la production du gaz (CO_2) (**Hassaine ,2013**).

Technique

Les isolats sont ensemencés dans un bouillon M17 et MRS contenant des cloches de durham, puis incubés à 37°C/42°C pendant 24h.

Lecture

La présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (**Hariri et al., 2009**).

4.6.2.3 Test TSI (triple sugar iron).

Ce test réalisé sur milieu TSI, il permet de mettre en évidence d'un part la fermentation des 3 sucres (lactose, saccharose, glucose) avec ou sans production de gaz et d'autre part la production d'hydrogène sulfureuse (H_2S) (**Marchal et al., 1991**).

Technique

L'ensemencement du culot par une pique profonde et de la pente par des stries médianes, puis incube à 37°C/ 42°C pendant 24h (**Boutamdjet et Benmahmoud ,2013**).

Lecture

Un changement de couleur vers le jaune au niveau de la pente et le culot traduit la fermentation des 3 sucres, le noircissement indique la production d'H₂S, des fissures dans la gélose ainsi qu'un décollement du culot indiquent la production du gaz CO₂ (**Bouderse et Nekkaa, 2017**).

4.6.2.4. Test de mannitol mobilité

Ce test se réalise sur un milieu gélose semi solide mannitol -mobilité qui permet d'étudier la mobilité d'une souche bactérienne et la capacité à dégrader le mannitol (**Guiraud, 2003**).

Technique

L'ensemencement se fait par une pique centrale à l'aide d'une anse de platine, et incube à 37°C/42°C pendant 24h.

Lecture

Un jaunissement du milieu traduit une acidification suite à la fermentation de sucre, tandis que le trouble traduit la mobilité.

4.6.2.5. Test de citrate de Simmons

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie, seules les bactéries possédant une enzyme citrate perméase sont capables d'utiliser le citrate et cultiver sur ce milieu.

Technique

Le milieu agar citrate de Simmons est ensemencé sous forme strie longitudinal et incubé à 37°C/42°C pendant 24h (**Abid, 2015**).

Lecture

Le test positif se traduit par le virage de l'indicateur de pH du vert au bleu (**Delarras, 2007**).

4.6.2.6. Test ONPG (Orthonitro-Phényle -B-Galactoside)

L'utilisation du lactose fait souvent intervenir deux enzymes : une galactoside perméase (qui facilite l'absorption du lactose) et une β -galactosidase (qui scinde le lactose en glucose et galactose) sans cette enzyme la cellule bactérienne sera incapable d'utiliser le lactose (**Paul, 1999**), pour cela on utilise un substrat synthétique : l'ortho-nitro -phényl-galactoside incolore de structure proche du lactose.

Si la bactérie possède la β -galactosidase, on obtient du galactose et de l'orthonitrophénol (ONP) de couleur jaune, selon la réaction



Technique

Après la préparation d'une suspension dense d'une culture bactérienne dans un tube à essai stérile contenant 1ml d'eau physiologique, on ajoute un disque ONPG, puis l'incube à 37°C/42°C pendant 24h.

Lecture

Le test est considéré comme positif lorsque la suspension bactérienne se colore en jaune citron.

4.6.2.7. Test d'ADH (arginine dihydrolase)

L'arginine dihydrolase est une enzyme clé pour la caractérisation des bactéries lactiques (Boudersa et Nekkaa, 2017), elle permet la libération de l'ammoniac et de citruline à partir de l'arginine.

Technique

On ensemence chaque tube contenant le milieu Mueller avec l'arginine par la souche étudiée, puis incubée à 37°C/42 °C pendant 24h.

Lecture

Le milieu reste violet avec trouble indique que la souche ADH positif (Frenay *et al.*, 2007).

4.6.3 Caractérisation physiologiques

4.6.3.1. Température de développement

Deux tubes pour chaque milieu MRS et M17 sont incubés, l'un à 42°C et 37°C pendant une période de 24-48h et l'autre à 15°C pendant 1 à 2 semaines (Guiraud, 1996).

4.6.3.2 Thermorésistance à 60°C pendant 30min

Des tubes contenant 10ml de MRS et d'autre contenant M17 sont inoculés par les isolats, ensuite déposés au bain marie à 60°C pendant 30min et après refroidissement, elles sont incubées à la température optimale de croissance.

Lecture

L'apparition d'un trouble implique une thermorésistance de la souche (Guirad, 2003).

4.6.3.3 Croissance en différente concentration de NaCl

Ce test permet de savoir si les bactéries ont la capacité de croître dans un milieu hyper salé, ainsi il permet de séparer les entérocoques des coques lactique (*saidiet al*., 2002).

Technique

Pour chaque isolat on a préparé trois tubes de bouillon hyper salé de 2%, 4%, 6.5%, après l'ensemencement, l'incube à 37°C/42°C pendant 24h.

Chapitre II

Résultats et discussion

II. 1.Résultats

II.1.1. Isolement des bactéries lactiques

Un total de 12 souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir d'un échantillon de lait de vache sur les deux milieux sélectifs (MRS et M17).

Le tableau 6 montre les codes des isolats.

Tableau 06. Codes des isolats sur les deux milieux

Milieu d'isolement	Code des souches isolées
MRS	AL1 AL2 AL3
M17	NL1 NL2 NL3 NL4 NS1 NS2 NS3 NS4 NS5

II.1.2. Identification

II 1.2.1. Critères morphologiques

III. .2.1. 1. Aspect macroscopique

II.1.2.1.1.1 Sur milieu solide

L'observation macroscopique des colonies obtenues sur gélose MRS après incubation à 42°C pendant 24 h, ces souches ont donnés des colonies lenticulaires parfois circulaires à contour régulier et lisse, blanchâtre, avec un diamètre entre 0.1 et 1.5mm (figure 7).

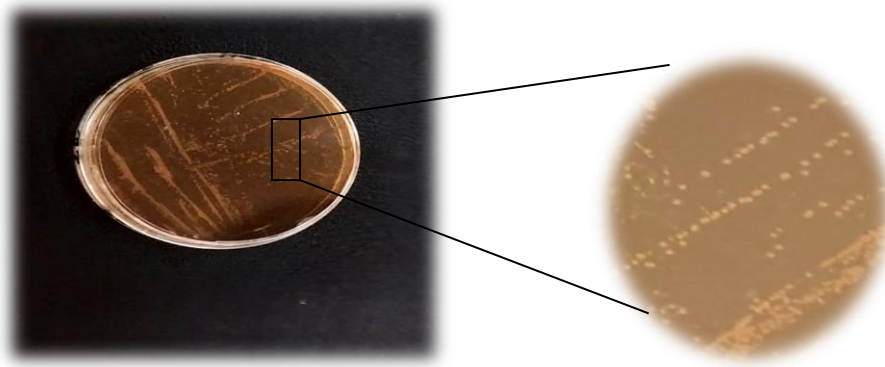


Figure 07. Aspect macroscopique des colonies sur milieu MRS après 24h d'incubation à 42°C.

Après une incubation à 37°C pendant 24 h sur milieu M17, les colonies apparues de couleur blanche crème à jaune, de forme rondes ou lenticulaires avec un contour régulier ou irrégulier, dont le diamètre est compris entre 0.5 et 2mm (figure8).

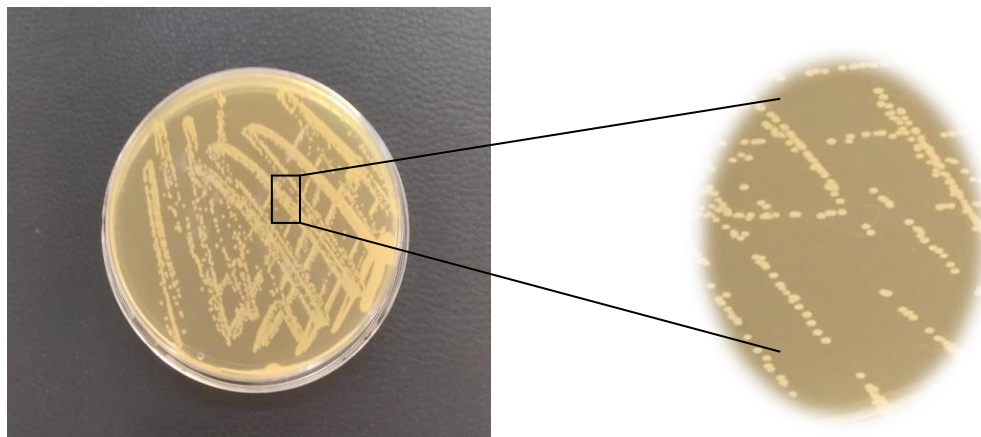


Figure08: Aspect macroscopique des colonies sur milieu M17 après 24h d'incubation à 37°C.

II.1.2.1.1.2. Sur milieu liquide

L'observation macroscopique des isolats sur milieux (MRS et M17) liquide, montre un trouble au fond du tube qui douée à une croissance bactérienne avec une zone claire à la surface du milieu (figure9).

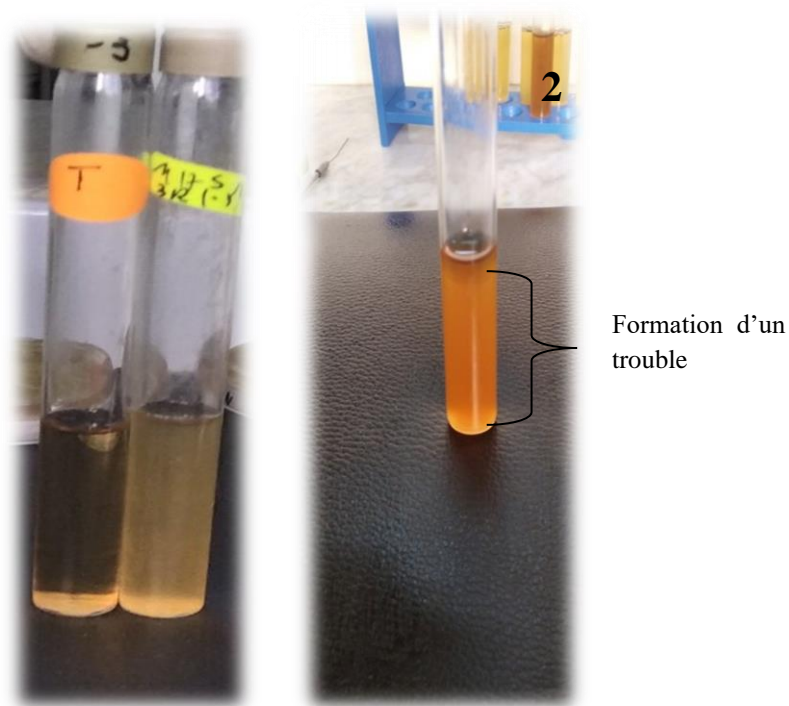


Figure 09. Aspect de culture pure des bactéries lactiques, en milieu liquide

T. Témoin 1. Milieu M17 2. Milieu MRS

II .1.2.1.2.Aspect microscopique

L'observation microscopique a montré que ces souches sont toutes Gram positive se présentent en deux formes de cellules, bacilles et coques disposés soit en paires ou en chainettes plus ou moins longue (figures10 et11).

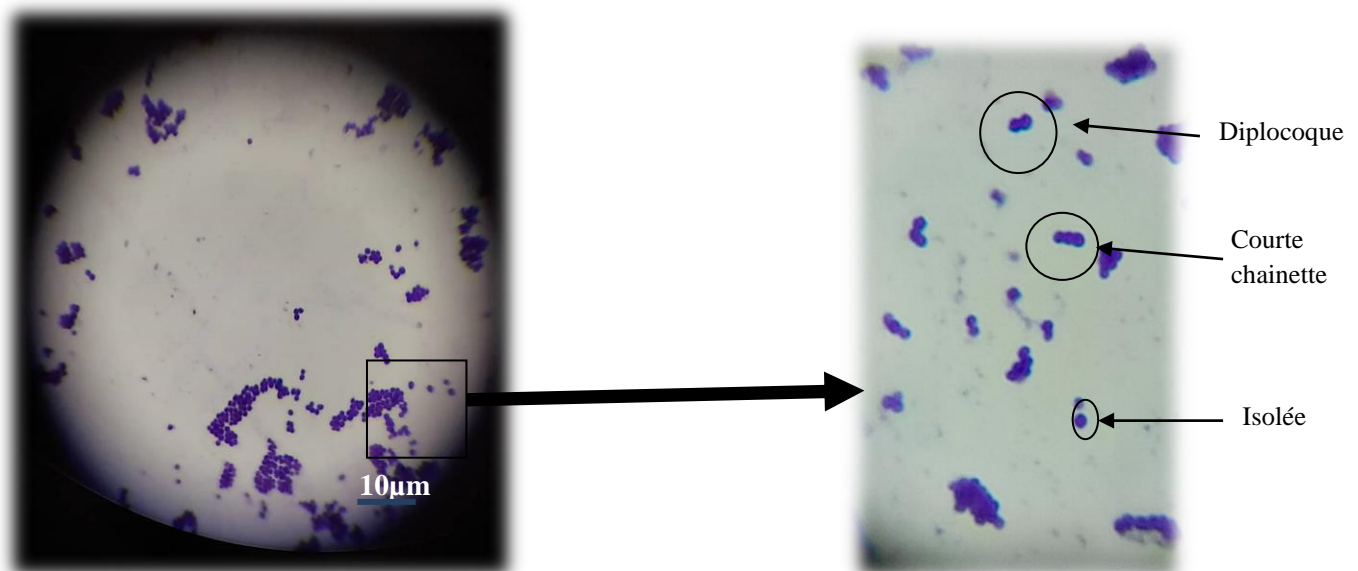


Figure10. Aspect microscopique et arrangement des isolats après coloration de gram objectif ($\times 100$), souche NS4, (Barre = $10\mu\text{m}$)

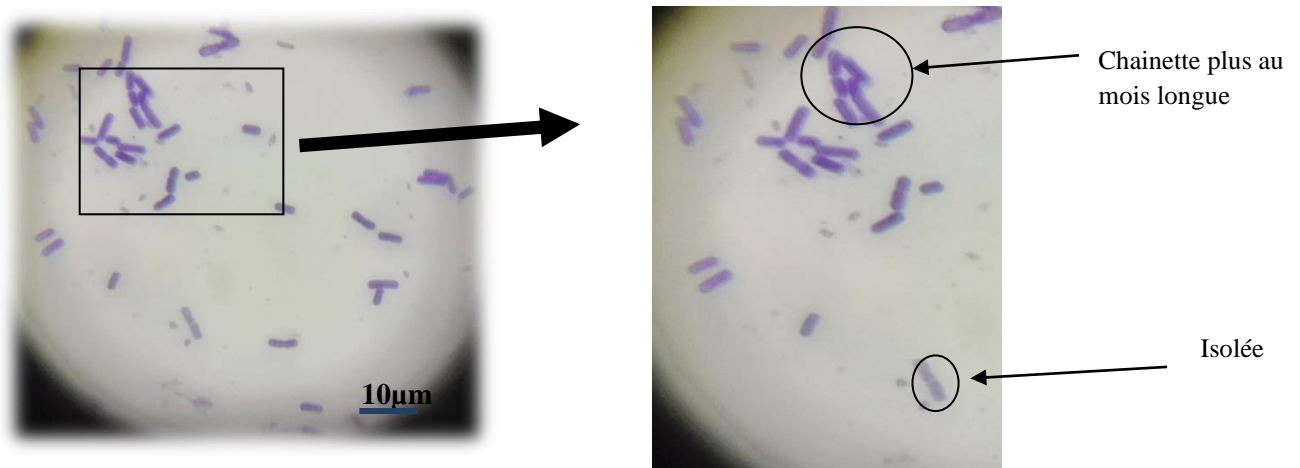


Figure 11. Aspect microscopique et arrangement des isolats après coloration de gram objectif ($\times 100$) objectif ($\times 100$), souche AL2, (Barre = $10\mu\text{m}$)

Les résultats de la morphologie et le mode de regroupement des isolats sur les deux milieux MRS et M17 sont consignés dans le tableau 7.

Tableau 07 : Morphologie des souches lactiques isolées

Isolats	Morphologie	Mode de regroupement
<ul style="list-style-type: none"> ○ AL1 ○ AL2 ○ AL3 	Bacilles	<ul style="list-style-type: none"> ○ Isolée et en amas ○ Isolée et en chaîne ○ Isolée et en chaîne
<ul style="list-style-type: none"> ○ NS1 ○ NS2 ○ NS3 ○ NS4 ○ NS5 ○ NL1 ○ NL2 ○ NL3 ○ NL4 	coques	<ul style="list-style-type: none"> ○ diplo et en chaîne ○ diplo et en chaîne ○ diplo et en amas ○ diplo et en chaîne ○ en amas ○ diplo et en amas ○ diplo et en chaîne ○ diplo et en chaîne ○ diplo et en chaîne

Les résultats obtenus d'après l'observation morphologique sont semblables aux travaux réalisés par **Badis et al., (2004)**.

II.1.2.2. Critères biochimiques et physiologiques

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques des isolats sont résumés dans les tableaux 8 et 9.

II.1.2.2.1. Test de catalase

Pour toutes les souches isolées sur les milieux MRS et M17 ne représentent pas d'effervescence lors de l'ajout d'une goutte de H_2O_2 , ce qui s'explique par le fait que ces bactéries ne possèdent pas l'activité d'enzyme catalase (figure 12).

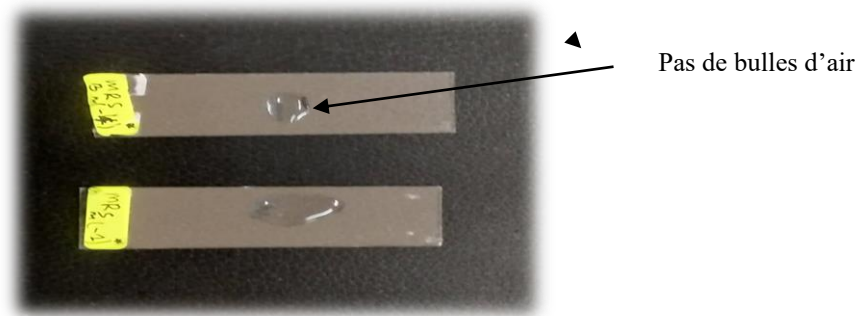


Figure12: Résultats de test catalase

II.1.2.2 .2.Type fermentaire

Ce test est effectué sur le milieu MRS liquide contenant une cloche de Durham, elle permet de différencier les isolats homofermentaire des hétérofermentaire, après une incubation à $42^{\circ}C$ pendant 24h, les résultats montrent que aucun gaz n'est produit dans la cloche, donc tous les isolats ont un métabolisme homofermentaire (figure13).L'absence des bulles au fond de la cloche confirme que les souches sont incapables de produire un gaz alors leurs métabolites de type homofermentaire.

Les résultats de l'étude biochimique de la souche sont comparables avec les travaux réalisés par **Hajd Said et al. (2019)**.

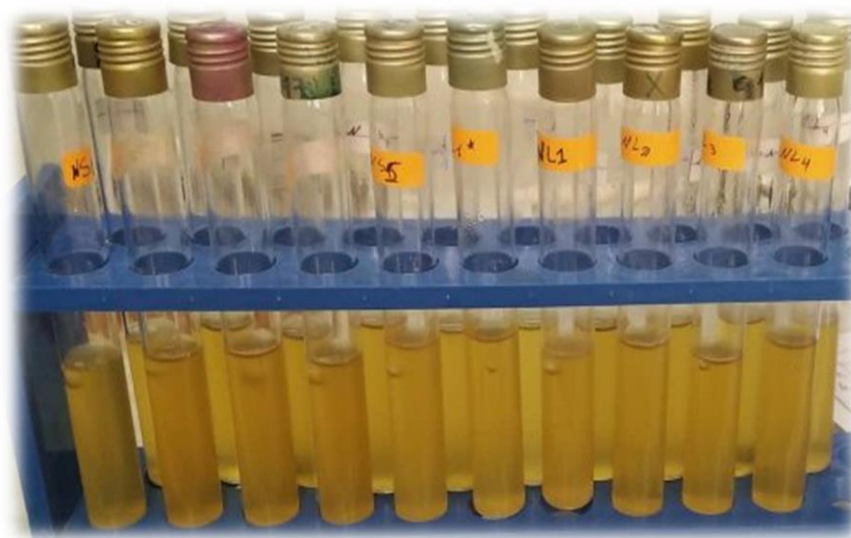


Figure 13: Type fermentaire sur milieu MRS liquide contenant la cloche de Durham, incubé à $42^{\circ}C/24h$ (Absence de gaz dans la cloche).

II.1.2.2 .3. Test de TSI

Ce test montre la fermentation de 3 sucres (lactose, saccharose, glucose) avec ou sans production de H₂S.

Le virage de la couleur au jaune au niveau de la coule signifie la fermentation de glucose et au niveau de la pente signifie la fermentation de lactose et/ou saccharose avec absence de H₂S pour l'ensemble des isolats (Figure 14).

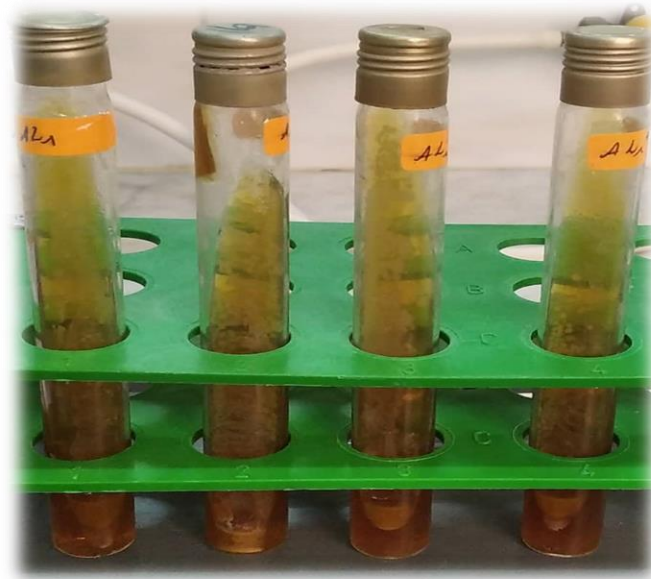


Figure14. Test de TSI

II.1.2.2 .4. Mannitol mobilité

La fermentation du mannitol se traduit par une acidification du milieu qui mise en évidence par le virage de l'indicateur colore du pH de rouge vers le jaune. Nous avons remarqué que 5 sur les 12 bactéries testées sont de couleur rouge (couleur inchangée) (NL1, NL2, NL4, AL2, AL3) et que 7 des souches testées sont de couleur jaune (NL3, NS1, NS2, NS3, NS4, NS5, AL1), ces dernières fermentent le mannitol c'est-à-dire qu'il ya une acidification du milieu révélée par un virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (**bactéries mannitol +**)(figure15).

Cependant il n'y a pas des diffusions des souches dans le milieu au niveau de la piqure centrale donc les souches sont immobiles.

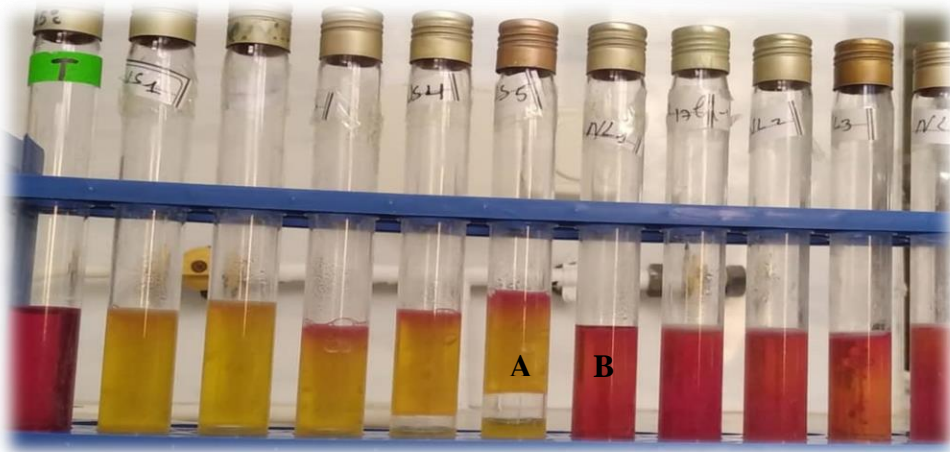


Figure 15. Résultats de test mannitol-mobilité

A : Test positive B : Test negative

II.1.2.2 .5. Test citrate de Simmons

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seul source de carbone.

Pour tous les isolats il n'y a pas de virage de l'indicateur de pH du vert au bleu, les souches n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone (figure 16).



Figure 16. Résultats de test de citrate de Simmons

II.1.2.2. 6. Test d'ONPG

Les souches de NL1, NL3, NL4, NS1, NS2, NS3, NS4, NS5, sont pourvues de la β -galactosidase, elles ont donné un résultat positif c'est-à-dire ONPG (+) où le milieu utilisé devient jaune. Alors que les souches de NL2, AL1, AL2, AL3 ont donné un résultat négatif c'est-à-dire le milieu restait incolore (figure 17).

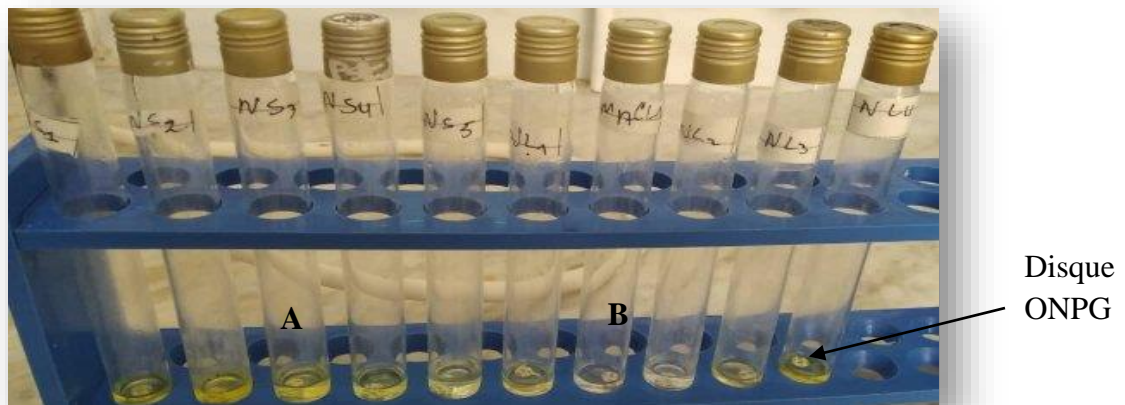


Figure17. Résultats de test d'ONPG

A : Aspect du test positif

B : Aspect du test négatif

II.1.2.2.7. Test D'ADH

Les souches NL4, AL1, AL2, AL3 ont un résultat négatif, n'ont pas la capacité à hydrolyser l'arginine, le virage du violet au jaune suite à une acidification du milieu, alors que les souches NL1, NL2, NL3, NS1, NS2, NS3, NS4, NS5 ont un résultat positif virage de jaune à la violette suite à une ré-alcanisation du milieu et la fermentation de l'ammoniaque (figure18).

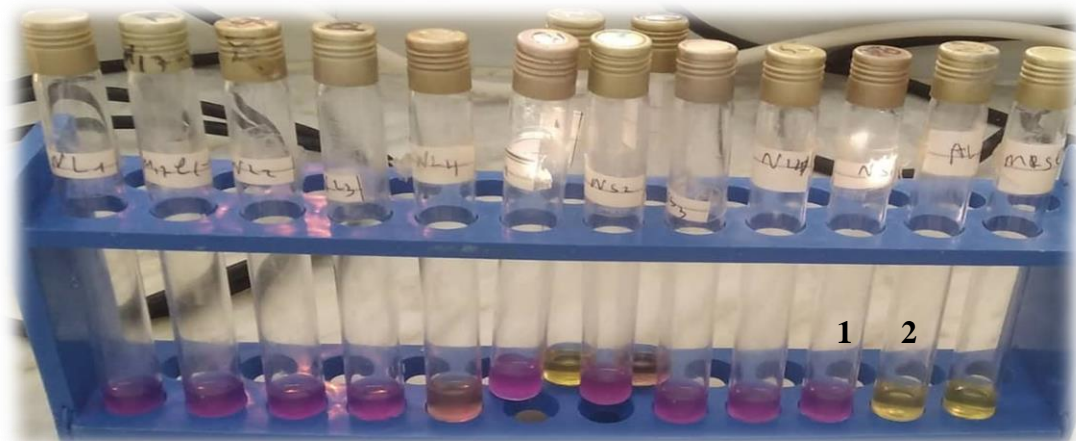


Figure 18. Résultats de test d'ADH

1: Test positif

2 : Test négatif

II.1.2.2.8. Test de thermorésistance

La thermorésistance est un caractère physiologique permettant de distinguer entre les isolats mésophiles et thermophiles.

Après exposition des isolats à une température de 60°C pendant 30min suivie d'une incubation de 24 h, toutes les souches ont révélés un résultat positif.

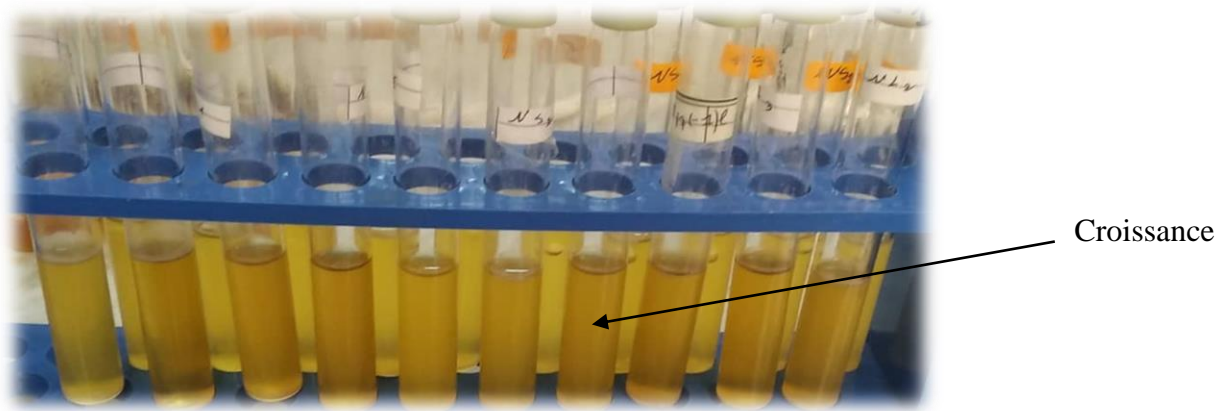


Figure 19: Résultats de test de Thermorésistance

II.1.2.2.9. Test de croissance en présence de NaCl

La mise en culture des souches en présence de 2%, 4%, 6.5% de NaCl permet d'évaluer leurs aptitudes à croître en présence de ces différentes concentrations.

Les résultats ont montrés que toutes les souches isolées sont capables de croître sur bouillon M17 avec une concentration de 2% et 4 %, par contre aucune croissance sur la concentration 6.5% qui permet de différencier les entérocoques qui on la capacité de croître à cette concentration.

En revanche aucune croissance n'a été détectée sur le bouillon MRS avec les trois concentrations qui signifie la grande sensibilité de lactobacilles thermophiles au sel.

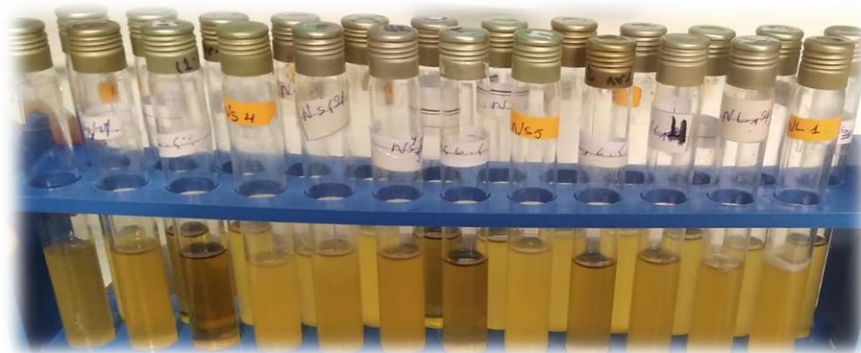


Figure 20.Résultats de test de croissance en présence de différente concentration de NaCl

Tableau 08. Résultats des tests physiologiques et biochimiques des isolats sur milieu MRS

Souches		AL1	AL2	AL3
Tests				
catalase		-	-	-
Type fermentaire		HFM	HFM	HFM
TSI	fermentation des sucres	+	+	+
	H ₂ S	-	-	-
ONPG		-	-	-
mannitol mobilité	mobilité	-	-	-
	mannitol	+	-	-
Citrate de Simmons		-	-	-
ADH		-	-	-
T °de croissance		42°C		
Thermorésistance à 60°C/30min		+	+	+
croissance à déficent concentration de Na Cl	2%	-	-	-
	4%	-	-	-
	6.5%	-	-	-

(+) test positif ;(-) test négatif ; HFM : Homofermentaire

Tableau 09. Résultats des tests physiologiques et biochimiques des isolats sur milieu M17.

Souches		NL1	NL2	NL3	NL4	NS1	NS2	NS3	NS4	NS5
Tests										
Catalase		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Type fermentaire		HFM	HFM	HFM	HFM	HFM	HFM	HFM	HFM	HFM
TSI	fermentation des sucres	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG		+	-	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol Mobilité	Mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	mannitol	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Citrate de Simmons		-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH		+	+	+	-	+	+	+	+	+
T °de croissance		37°C								
Thermorésistance à 60°C/30min		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à différente concentration de Na Cl	2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6.5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) test positif ;(-) test négatif ; HFM : Homofermentaire.

Suite à l'analyse des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques comparés à ce de (Guirade (1998), Bekhouche et Boulahroif (2005), Bennama (2012), Moulay *et al.* (2016), et par l'utilisation de site *abis online bacterial identification* (http://www.tgw1916.net/bacteria-logare-desk_top.html) nous avons pu identifier :

02 souches de *Lactobacillus acidophilus*

01 souche de *Lactobacillus salivarius*

09 souches de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

Le tableau 10 résume les 12 bactéries lactiques identifiées.

Tableau 10. Identification des souches de bactéries lactiques thermophiles.

Code de souche	identification
AL2, AL3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
AL1	<i>Lactobacillus salivarius</i>
NL1, NL3, NL4, NS1, NS2, NS3, NS4, NS5 NL2	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>

II. 2. Discussion

De par leur importance économique considérable, en particulier dans le secteur laitier, les bactéries lactiques étudiées afin de mieux les connaître pour mieux contrôler la fabrication (**Badis et al., 2004**), dans la présente étude nous sommes intéressés à l'isolement et l'identification des souches lactiques thermophiles, présentant un intérêt technologique : lactobacilles thermophiles et streptocoques thermophiles à partir d'un lait cru de vache.

Un ensemble de 12 souches lactiques ont été isolées, 9 isolat sur le milieu M17 et 3 à partir de milieu MRS.

Les mêmes méthodes, les mêmes milieux de culture sont utilisés pour la sélection des souches lactiques thermophiles (**Saidi et al. , 2002, Allouche et al., 2010, Bennama , 2012 ; Moulay et al., 2016**).

Deux paramètres sélectifs sont utilisés afin d'isoler la flore thermophiles : le milieu utilisé et la température d'incubation, Le milieu MRS pour les lactobacilles et M17 pour les streptocoques, **Martin et al. (2006)** ont signalé que les milieux utilisés pour l'isolement des lactobacilles doivent tenir compte la nature acidophile de ces organismes et leurs besoins nutritionnels complexes, ils doivent contenir de facteurs de croissance adéquats : l'extrait de levure comme source de vitamines, ainsi que le peptone, du manganèse, de l'acétate et du tween 80 stimulant.

Shankar et Davies (1977) cité par **Rabia et Negendra (2011)** ont montré que le milieu M17 contenant du b-glycérophosphate s'est avéré inhibiteur pour de nombreuses souches de *Lb delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mais il a permis une bonne croissance de *S. thermophilus*.

Deuxième paramètre est la température d'incubation, **de vuystet al. (1998)** ont montré que 42°C est la température optimale de lactobacilles thermophiles, d'autres auteurs ont utilisé des températures supérieures à 44°C comme **Badis et al. (2005)** pour l'isolement. Pour *S. thermophilus*, nous avons utilisé la température 37°C qui a été utilisée par d'autres comme **Moulay et al. (2016)**. **Guiraud en 2012** on signale que les *S. thermophiles* ils se développent bien à 37°C.

La croissance bactérienne dans le milieu M17 est beaucoup plus importante que dans le milieu MRS peut être interprétée soit par la richesse du milieu M17 en composant nutritif (**Mora et al. , 2005**) soit la dominance des *S. thermophilus* dans le lait (**Monnet et al. , 2004**), en 2012 **Bennama** a signalé que le nombre des *S. thermophilus* ne dépasse pas 1×10^3 ufc/ml dans le lait cru .

Badis et al . (2005) a signalé la dominance de lactobacilles thermophiles dans un échantillon de lait de chèvre contrairement aux nos résultats, une dominance des coques par rapport au bacille.

Saidi et al. (2002) a mentionné que la présence des espèces bactériennes dépendant essentiellement sur la nature du lait cru et les conditions d'analyse.

L'analyse des résultats biochimiques et physiologiques montre que tous les isolats sont gram positif, catalase négative, homofermentaire, immobiles, ce qu'est caractérisé les bactéries lactiques décrites par la littérature.

A travers la caractérisation physiologique, le comportement des isolats dans les différentes conditions de culture sur les deux milieux a révélé l'aptitude de croissance à température de 42°C et 37°C, Une thermorésistance à 60°C pendant 30min. La croissance en différente concentration de NaCl a relevé une croissance variable chez les *S. thermophilus* : une croissance observée à 2% et 4 % et aucune croissance à 6.5% qui permet de différencier les entérocoques, par contre aucune croissance n'a été détectée chez les lactobacilles thermophiles qui signifient la grande sensibilité au sel.

En ce qui concerne la caractérisation biochimique le résultat d'utilisation de citrate est un résultat normal grâce aux exigences nutritionnelles des bactéries lactiques. Pour l'utilisation de citrate il faut la présence d'un substrat fermentescible et d'une source d'azote (**Noval, 1996**).

Les souches des lactobacilles sont différenciées par le test d'ADH, l'incapacité à hydrolyser l'arginine de lactobacilles thermophile est un résultat normal, dû à leur appartenance aux groupes des homofermentaires obligatoires. **Noval (1996)** à mentionné que le catabolisme de l'arginine est fréquent dans le groupe des hétérofermentaires facultatives et absent dans les groupes des homo et les hétérofermentaires obligatoires.

La détermination de la capacité de la fermentation d'une gamme donnée des glucides sa défier d'une espèce a l'autre du genre *Lactobacillus* **Parada et al., 2007**.

Bennama (2012), site que l'espèce de *S. thermophilus* on une capacité limitée à utiliser les hydrates de carbone, seulement cinq différents sucres sont fermentés : le glucose, lactose, saccharose, galactose et fructose.

L'activité enzymatique sert souvent à différencier les bactéries lactiques. Il est généralement possible de distinguer des bactéries étroitement apparentées et de les regrouper en des espèces distinctes au moyen d'épreuves biochimiques.

À la vue des résultats obtenus, nous prouvons dire que l'identification par la caractérisation morphologique, physiologique et biochimique est très importante et c'est même l'étape clé de l'isolement et la pré-identification.

Conclusion

Conclusion

La présente étude a été conduite dans le but d'isoler et identifier des bactéries lactiques thermophiles ayant un intérêt technologique (Lactobacilles thermophiles et streptocoques thermophiles).

L'isolement des bactéries lactiques thermophiles sur les deux milieux MRS et M17 a permis d'étudier les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des souches isolées.

Les résultats obtenus confirment que les souches sont toutes gram positifs, sous forme des coques et des bacilles, catalase négative, homofermentaire, thermorésistante à 60°C avec une fermentation différentielle du sucre.

Au total de 12 souches ont été identifiées, les résultats obtenus faisaient l'objet d'une comparaison avec d'autres travaux similaires et par l'utilisation de site d'identification *Abis online bacterial identification* (<http://www.tgw1916.net/bacterialogare-desktop.html>) a permis d'identifier :

02 souches *Lactobacillus acidophilus*

01 souche *Lactobacillus salivarius*

09 souches *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

Pour compléter ce travail, des études plus approfondies doivent être menées notamment :

- ✓ Tests des souches à une gamme d'antibiotiques
- ✓ Evaluation des souches à des aptitudes technologiques telles que le pouvoir acidifiant et protéolytiques.
- ✓ Etude de l'activité antibactérienne des souches thermophiles vis-à-vis des germes pathogènes.
- ✓ Essai de fabrication d'un lait fermenté
- ✓ Identification par séquençage d'ARN 16s

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Abid Z. (2015).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées d'un produit laitier traditionnel algérien Jben. Université Abou bekr belkaid-Tlemcen.p30 .
- **Allouche F.N., Hellal A., LarabaA.(2010).** Etude l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. Revue nature et technologie. (3) : (13-201).

B

- **Badis A., Guetarni D., Delorme C ., Renaut P.(2004).**Identification par séquençage de l'ADN correspondant à L'ARN 16S des souches de *Streptocoques thermophiles* isolées à partir de lait cru des zones oasiennes de l'Algérie .revue des régions arides.ns.p :31-35.
- **Badis A., LaoubdiaSellami N., Guetarni D., Kihal M.et Ouzront K. (2005).** Caractérisation phénotypiques des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales Arabia et kabyles.SCI.Technol. p 23, 30,37.
- **Beklouche F., Boulahrouf A. (2005).** Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant a six stations d'élevage de Constantine. sciences et technologie (23) :38-45.
- **BenmehidiN.E ., Bennani B.(2022) .**Caractérisation biochimique et microbiologie de quelques souches lactobaciles isoles de prouduits terroir .mémoire de master .Université AbdElhamid Ibn Badis .Mostaganem. p20
- **Bennama R. (2012).***Streptococcus thermophilus* : Isolement et recherche systématique de souches indigènes productrices d'exopolysaccharides. Thèse de doctorat université Oran-Es-Sénia. Faculté des sciences. P12-55.
- **Bontandjet F., Benmahmoud A. (2013).**Caractérisation physico-chimique et microbiologique des laites crus de trois espèces laitières caprine, bovine et ovine .sélection des souches lactiques thermophiles ayant un profil probiotique et technologique .mémoire de master .Univ.Mohamed El Bachir El Brahimi Bordj.p59.
- **BoudersaW ., Nekka A. (2017).** Etude de l'activité antibactérienne de bactéries lactiques isolées a partir d'un produit laitier fermenté. Le yaourt brassé. Mémoire de master. Unv.Frévesmentouri Constantine. P : 35.

- **Bourgeois C.M., Larpent J.P. (1996).** Microbiologie Alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires, 2^{ème} éditions, tome 2. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. P6.
- **Ord B., Monnet V., Renault P. & Leblond Bourget N., Decaris B., Bolotin A., Delorme C., Ehrlich D., Guedon E., Monnet V., Renault P. & Kleerebezem M. (2005).** New insights in the molecular biology and physiology of streptococcus thermophilus revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, (29):435-463.
- **Holzapfel W.H., Haberer P., Geison R., Bourgeois C.M., Mexle J.F et Zucca J. (1996).** Microbiologie alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tec & Doc Lavoisier. Paris. p272.

D

- **Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec et doc. Lavoisier. p476.
- **De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. (1960).** A Medium for the cultivation of lactobacillus sp. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130-135.
- **De Vuyst L., Vanderveken F., Vans. Degeest B. (1998).** Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in milk medium and evidence for their growth associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology* (84):1059-1068.

E

- **Eck A., Grillis J.C. (2006).** Le fromage. Tec et doc, Lavoisier, Paris. p891.

F

- **FAO :** (collection FAO Alimentation et nutrition N°: 28/ 1995).
- **Freney J., Renaud F., Leclercq R., Recgel B. (2007).** Précis de bactériologie Clinique, 2^{ème} Ed éditions ESKA, Paris. p1764.

G

- **Georges C., Francois M.L. (2008).** Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Lavoisier doc. p592-593.
- **Ghozlane née Benazzou D. (2012).** Isolement et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arômes (diacétyle). Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie El-Harrach Alger p : 27.
- **Guirad J-P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. p : 136-137.
- **Guiraud J-P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Tec & Doc, Dunod. Paris, p90-292

- **Guiraud J.P.(2012).** Microbiologie alimentaire. Dunod. paris .p 91.

H

- **Hadj Said M., Moulay M., Benbeguara M., Hocine L. (2019).** Preparation of a biosorbent (clay particles/streptococcus thermophilus) to treat polluted water with methylene blue. *Advances in Environmental Biology*.13(08) : 30-38.
- **Hariri A., Ouis N., Sahnouni F., Bouhadi D.,(2009).**Mise en ouvre de la fermentation de certaines ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube. *Rev. Microbiol. Int San et environ.* P : 37-55.
- **Hassaine , (2013).** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de laits camelin du sud algérien. Thèse de doctorat en biotechnologie. Université d'Oran. P20-33.
- **HolsP.,Hancy F., Fontaine L., Grossi Bjorkroth., Schillinger U.(2001).**taxonomy and important facteures of probiotic microorganism in food and nutrition.americain journal of clinical nutrition.73:365-373.

K

- **Karam N.E., Karam H. (1994).**Isolement et caractérisation des bactéries lactiques de laits crus d'Algérie. In : alimentation, Génétique et santé de l'enfant. Ed. Touhami M., Desjeux, J. F et L'harmattan.p 257-264.
- **Karam H., Karam N.E. (2006).** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: Mise en évidence de souches de lactococcus résistantes au sel. *Tropicultura* 24(3) p153-156.
- **Kahina M. (2012).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *LeuconostocPseudemesenteroides* isolée du boza. *Bactériologie.* Université pierre et marie curie paris. p05.

L

- **Labioui H., Elmoualdi L., El yachioui M. et Ouhsine M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. (Bordeaux)* 144. 237-250.
- **Liebefild. (2002).**Microbiologie des cultures .unité de recherche« lait, fromage».

M

- **Marchal. N, Bourdon. J.L, Richard. C.I.,(1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin editor, Paris.pp: 67-122.

- **Martin D., Stanley F., Edugene R., Karl.H.Sc., Erko S.(2006).**the procaryotes, a handbook on the biologie of bacteria : bacteria firmicutes, cyanobacteria springer science ,business media . p321-346.
- **Mathara J.M., Schillinger M., Kutina P.M., Mbuguais .K., Holzapfelw H. (2004).** Isolation, Identification and characterisation of the dominatmicroorganismes of kenlenaroto: The massai traditional fermented milk in Kenya. Journal international microbiology. 94(3): 269-278.
- **Mathieu J. (1998).** Initiation à la physico-chimique du lait. Tec & Doc. Paris. p 22.
- **Michel F. (2005).** Bactériologie alimentaire, Compendium d'hygiène des aliments, 2^{ème} édition, paris, p292.
- **Mofredj A., Bahloul H., Chanut C. (2007).** Lactococcus lactis: UN pathogène opportuniste medecine et maladies infectieuse (37):200-207.
- **Monnet C., Pernaud S., Sepulchre A., Fremaux C., &Corrieu G. (2004).**Selection and properties of streptococcus thermophilus mutants deficient in urease. Jo. Dairy sci, 87,pp: 1634-1640.
- **Mora D., Monnet C., Parimi C., Guglielmetti S., Mariani A., Pintus P., Molinar F.,Daffonchio D. &Manachini P.L. (2005).**Urease biogenesis .in : streptococcus thermophilus. Researc. In microbiology, 156, pp: 897-903.
- **Moulay M., Aggad H., Benmechernene Z., Guessas B., Henni D-E., Kihal M. (2006).** Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. World journal of dairy & food sciences 1(1): 12-18.
- **Moulay M., Hadj Said A., Houcine L., Kihal M. (2016).** Immobilization Of Acid Lactic Bacteria On Bentonite Clay Particles of Maghnia Region West-Algérien. Advences In Envirenmental Biology, 10(10), Pp 33-3

N

- **Novel G. (1996).** Les bactéries lactiques .in microbiologi.e industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel .leveauj.y .,bouixm.ed tech &doc .lavoisier .paris p 170-374.

P

- **Paul S. (1999).** Bactériologie, 4édition, 2^{ème} cycle. Dunod. Paris, P368-415.
- **Paul G. (2016).**Biologie posts related to ed excel igcsespecificating.bacteria and yoghurt.
- **Parada J.L.,CaronC.R., Bianchi A. P Medeiros ., Soccol C.R.(2007).** Bacteriocins from lactic acid bacteria : purification, propreties and use as bio préservatives .brazilian archives of biology and technoogy .an international journal (3) :521-542

R

- **Rabia A., Nagendra P.S. (2011).** Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. In *Yoghurt*. *International Journal of Food Microbiology* 149:194-208.

S

- **Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henna D.E., Prevost H., Kihal M. (2002).** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides d'Algérie. *Journal Algérien Des Régions Arides*. p 1-10.
- **Savodogao A., Traore A.S. (2011).** La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles de yaourt et lait fermentés. *Int-j-Biol. ChimSci.* 5(5) : 2057-2075.
- **Sorescu I., Stoica C. (2021).** Online advanced bacterial identification software, an original tool for phenotypic bacterial identification. *Ron .biotechnollett*(6) :3047-3053.
- **Stiles Michael E., Holzappel W-H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Inter-J-Food microbiol*, 36: 1-29

T

- **Tabak S., Bensoltane A. (2011).** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis à vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastro-duodénales. *Nature et Technologie* (6):71-79.

V

- **Vignola C. (2002).** Science et technologie du lait : transformation du lait –Montréal : presse internationale polytechnique 600.
- **Vos P., Garrity G., Jones D., Kriej N., Ludwig W., Rainy F., Schleifer K., Whitman W. (2011).** *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Volume 3: the Firmicute, p1450.

Annexes

Annexe 01

Composition des milieux de cultures d'isolement (MRS et M17) selon Guiraud, (1998)

➤ Milieu MRS bouillon

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate triammonique	2g
Sulfate de magnésium	200mg
Sulfate de manganèse	50mg
Eau distillée	1000ml

PH : 6,5

Autoclavage 120° C Pendant 15 min.

➤ Géluse MRS

Composition de bouillon MRS +15g agar (en g/l d'eau distillée)

➤ Géluse MRS modifié :

Composition de bouillon MRS +15g Agar(en g/l eau distillée) +0,3g de CaCO₃

➤ Milieu M17 bouillon

Peptone de caséine	2,5g
Peptone de viande	2,5g
Peptone de soja	5g
Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium	0,25g

Lactose	5g
Acide Ascorbique	0,5g
Eau distillée	1000ml

PH : 7,2

Autoclavage 120 °C, 15 min

- **Gélose M17**
- Composition de bouillon M17 +15g agar (en g/l d'eau distillée)
- **Eau peptone tamponnée :**

Chlorure de sodium	5g
Phosphate de sodium phosphate dipotassique	9g
Phosphate monopotassique	1,5g
Eau distillée	1000ml

PH : 7,2

Autoclavage 115° C pendant 30 min.

Annexe 02

Composition des Milieux utilise pour l'identification

- **Eau physiologique :**

Chlorure de sodium	8.5g
Eau distillée	1l

Autoclave 20min à 120°C.

- **Mannitol- mobilité :**

Peptone tryptique de viande	20g
Agar	4g
Mannitol	2g
Rouge de phénol à1	4ml
KNO3	1g
Eau distillée	1000ml

PH : 7,6-7,8.

Autoclavage 120 °C pendant 15min

➤ **Milieu TSI (triple sugariron) :**

Peptone	20g
Agar	12g
Lactose	10g
Saccharose	10g
Na cl	5g
Extrait de viande	3g
Extrait de levure	3g
Glucose	1g
Citrate ferrique	0,3g
Na ₂ S ₂ O ₃	0,3g
Rouge de phénol	0,025g

Ph : 7,3

Autoclavage 120 c pendant 20min.

➤ **Citrate de Simmons**

Sulfate de magnésium	0,2g
Citrate de sodium	2g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate dipotassique	1g
Phosphate monoammonique	1g
Bleu de bronothynol	80g
Agar	12g
Eau distillée qsp	1000ml

PH : 7

Autoclave 20min 120°C.

➤ **Arginine d'hydrolase (ADH) :**

Arginine	5g
----------	----

Extrait de levure	3g
Chlorure de sodium	5g
pourpre de bronacrésol	16mg
Glucose	1g
Eau distillée qsp	1000ml

PH : 6,4

La répartition est faite en tube stériliser 15min à 120c.

➤ **ONPG**

Un disque ONPG peut être préparé en déposant 3 à 5 gouttes sur un disque de papier filtre.

Annexe 03

Composition des colorent

➤ **Fuchsine**

Fuchine basique	1g
Alcool éthylique à90	10ml
Phénol	5g
Eau distillée	100ml

➤ **Lugol**

Iode	1g
Iodure de potassium	2g
Eau distillée	300ml

➤ **Violet de gentiane :**

Violetdegentiane	1g
Ethanol à 90	10ml
Phénol	2g
Eau distillée	100ml

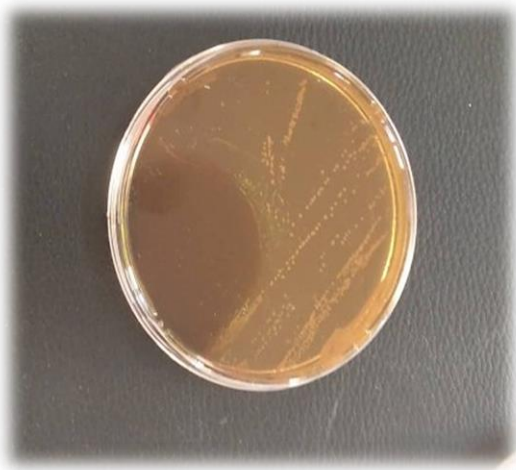
Annexe 04

Milieu de conservation

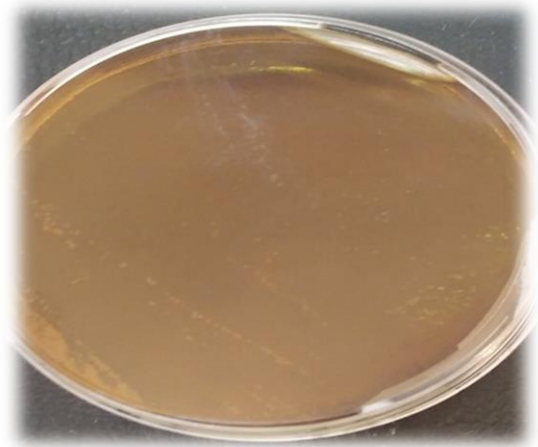
➤ **Lait écrémé :**

Lait écrémé	10g
Eau distillée	100ml
La stérilisation à 110°C pendant 10min	

Annexe 05 Repiquages

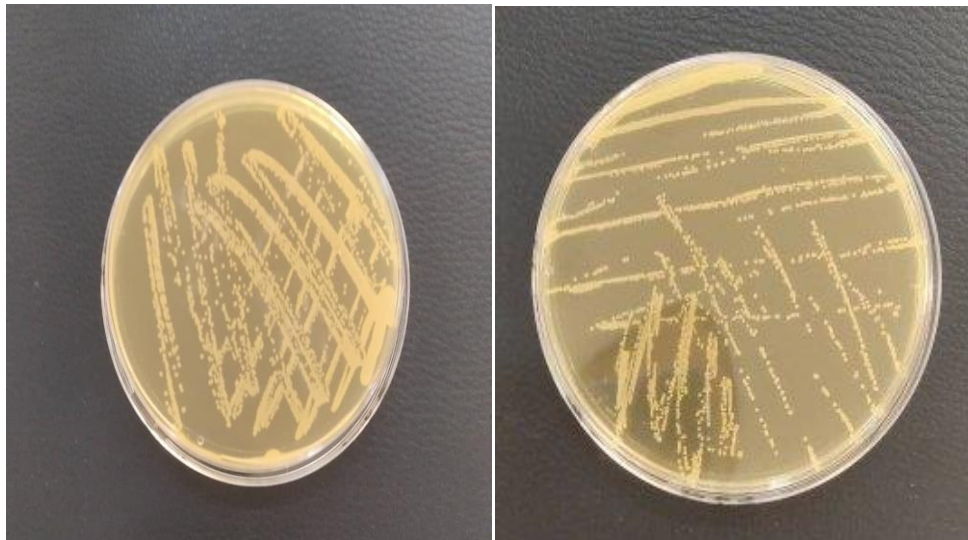


3^{ème} repiquage



4^{ème} repiquage

Figure21 : Aspects des colonies lactobacille thermophile après séries de la purification sur MRS.



3^{ème} repiquage

4^{ème} repiquage

Figure 22: Aspects des colonies streptocoque thermophile après séries de la purification sur M17.

Annexe 06

Coloration de gram



Figure 23 : Déroulement de la coloration de gram

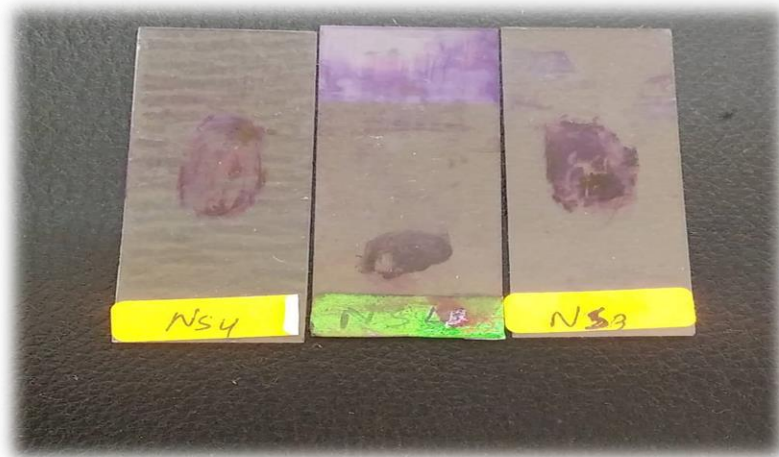


Figure 24 : Résultats de coloration de gram sur la lame.

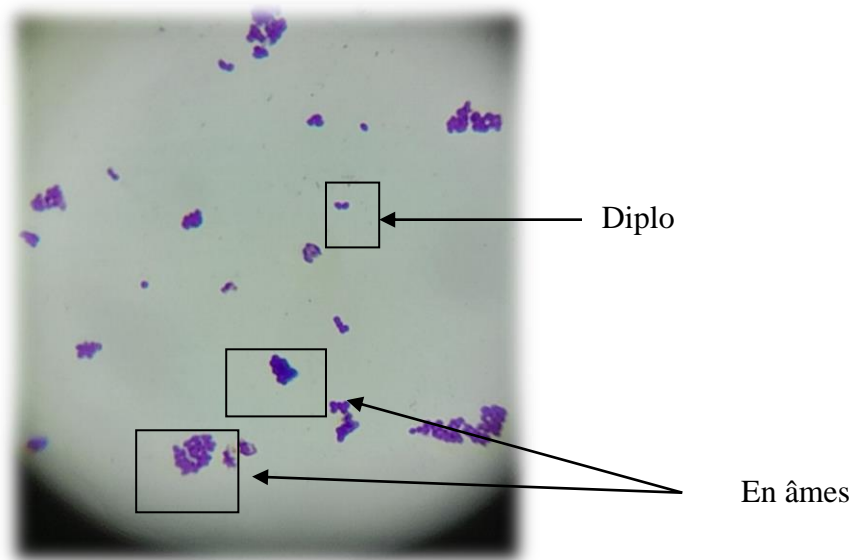


Figure 25 : Observation microscopique des souches sur milieu M17

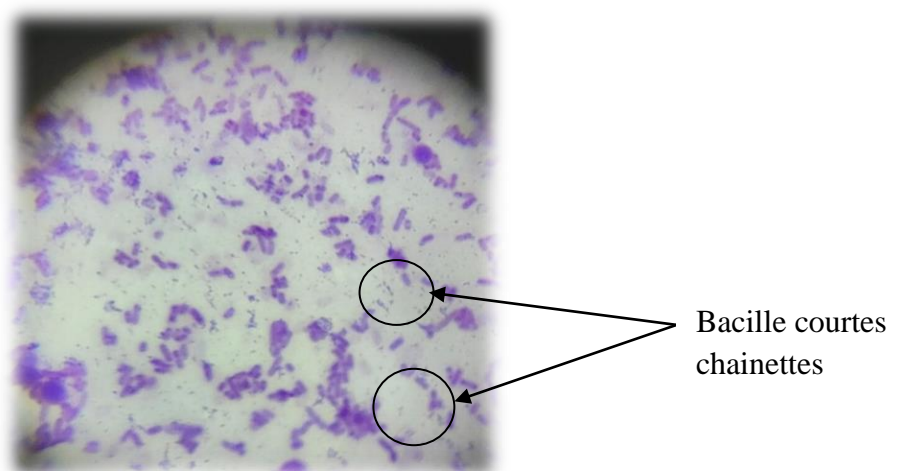


Figure 26 : Observation microscopique des souches sur milieu MRS

Annexe 07
Régulation de pH



Figure 27 : Régulation de pH de milieu

Résumé

Notre étude a porté sur l'isolement et l'identification des bactéries lactiques thermophiles, à partir du lait cru de vache.

Les différentes souches ont été identifiées sur la base des méthodes classiques afin de les attribuées aux différent genres voir espèces.

Au totale de 12 souches de bactéries lactiques ont été isolées suivant la coloration de gram et le test de la catalase, purifiées puis soumises à un ensemble des tests biochimiques et physiologiques (type fermentaire, test d'hydrolyse de l'arginine , utilisation de citrate, test d'ONPG tests des sucres, croissance en présence de NaCl et la thermorésistance), ce qui nous a permit d'identifié :

-2 souches de *Lactobacillus acidophilus* ;

-1 souche de *Lactobacillus salivarius* ;

-9 souches de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Mots clés : lait de vache, isolement, identification, thermophiles, bactéries lactiques

الملخص

ركزت دراستنا على عزل وتحديد بكتيريا حمض اللاكتيك المحبة للحرارة من حليب الأبقار الخام.

تم تحديد السلالات المختلفة باستخدام الطرق التقليدية من أجل تعيينها إلى أجناس أو أنواع مختلفة.

وقد تم عزل ما مجموعه 12 سلالة من بكتيريا حمض اللاكتيك باستخدام تلوين الجرام واختبار الكاتلاز، وتم تنقيتها ثم إخضاعها لسلسلة من الاختبارات الكيميائية الحيوية والفسيزيولوجية (نوع التخمر، واختبار التحلل المائي للأرجينين، واستخدام السترات، واختبار بيتا فلكتوزيداز ، واختبارات السكر، والنمو في وجود كلوريد الصوديوم ، والمقاومة الحرارية)، مما مكننا من تحديد

2 سلالات من *Lactobacillus acidophilus*

1 سلالة من *Lactobacillus salivarius*

9 سلالات من *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

الكلمات المفتاحية : حليب البقر، معزول، تحديد الهوية، البكتيريا المحبة للحرارة، البكتيريا اللبنية

Summary

Our study focused on the isolation and identification of thermophilic lactic acid bacteria from raw cow's milk.

The various strains were identified on the basis of classical methods in order to assign them to the various genera or species.

A total of 12 strains of lactic acid bacteria were isolated using gram staining and the catalase test, purified and then subjected to a series of biochemical and physiological tests (fermentation type, arginine hydrolysis test, citrate use, ONPG test, sugar tests, growth in the presence of Na Cl and thermoresistance) enabling us to identify :

2 strains of *lactobacillus acidophilus*

1 strain of *lactobacillus salivarius*

9 strains of *streptococcus salivarius subsp.thermophilus*

Keywords: Cow's milk, isolated, identification, thermophilic bacteria, lactic bacteria