

# République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI Laghouat

Faculté des Sciences

Département de Biologie

جامعة عمار ثليجي - الأغواط -

كلية العلوم

قسم البيولوجيا



## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

*En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Biologie*

*Option : Génie biologique*

### Thème

*Isolement et identification biochimique des bactéries aérobies sporulées à partir du lait de chamelle de différentes régions du sud algérien*

Encadré par :

M. Ziane Mohammed

Présenté par :

M. Cheknane Oussama

M. Dahou Mohammed

Juin 2012

# République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI Laghouat

Faculté des Sciences

Département de Biologie

جامعة عمار ثلجي - الأغواط -

كلية العلوم

قسم البيولوجيا



## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

*En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Biologie*

*Option : Génie biologique*

### Thème

*Isolement et identification biochimique des bactéries aérobies sporulées à partir du lait de chamelle de différentes régions du sud algérien*

Encadré par :

M. Ziane Mohammed

Présenté par :

M. Cheknane Oussama

M. Dahou Mohammed

Juin 2012

## ***Dédicaces***

*Je dédie ce modeste travail à :*

*A mes parents Seghir et Fatma, pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.*

*A Maima pour sa douceur et sa gentillesse, qu'Allah lui fasse resplendir d'une pure piété.*

*A mes chers frères Mohammed et Hadj Aïssa et mes tendres sœurs Asma, Zohra et Amina pour leur complicité et leurs soutiens qu'ils n'ont cessés d'apporter au cours de ma formation, j'espère que la vie leur réserve le meilleur.*

*A la mémoire de ma grand-mère qu'Allah lui accorde sa paix et sa miséricorde.*

*A toute ma famille ainsi qu'à mes amis*

*Oussama....*

***Dédicaces***

*Ce travail est spécialement dédié à :*

*Mes chers parents A Abdelkader et Akila , pour leur dévouement, et la disponibilité qu'ils ont affiché, chaque fois que je leur fait appel.*

*Mes frères, mes sœurs, et toute ma famille sans aucune exception.*

*Mes collègues, surtout le groupe de révision : 'Farouk, Oussama, Tidjani, Ahmed, Fatima et Aicha', et à tous mes amis.*

*Et finalement à : DOUKANI Med AMINE.*

*Mohammed.....*

## **Remerciements**

*Le présent travail a été réalisé au sein du Laboratoire de microbiologie à l'université Amar-Thledji .Laghouat*

*On tient à exprimer toute notre reconnaissance à Monsieur Ziane Mohammed, enseignant au département de biologie à l'université de Laghouat, pour avoir accepté d'encadrer ce travail, pour son soutien, encouragement et compréhension dans les moments difficiles du mémoire. On le remercie chaleureusement pour tous ses efforts ainsi que leur dévouement dans le suivi de ce travail. Sa grande disponibilité nous a été très Bénéfique, aussi son esprit de synthèse et son érudition restent pour nous un exemple à suivre. On tient à témoigner de son professionnalisme ainsi que de son grande générosité scientifique et humaine.*

*Nous remercions nos profs qu'ils nous ont fait partager leurs expériences, leurs temps, leurs conseils et informations durant notre cursus universitaire.*

*Un grand merci pour les ingénieurs de laboratoire pour avoir mis à notre disposition le matériel nécessaire pour ce travail ainsi que pour leur compréhension et soutien.*

*Une pensée particulière pour Oumelkheir pour son aide, sa bonne humeur et son sourire permanent, soyer assuré de notre reconnaissance.*

*On adresse, enfin, nos plus profondes gratitudees à nos familles pour leur soutien indéfectible et leur confiance en toutes circonstances au cours de ces cinq dernières années.*

# Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES PHOTO	
LISTE DES FIGURES	
INTRODUCTION.....	1

## CHAPITRE I

### *Synthèse bibliographique*

1. COMPOSITIONS DU LAIT DE CHAMELLE.....	2
2. TAXONOMIE DE <i>BACILLUS</i> .....	3
3. CARACTERISTIQUES DU GENRE <i>BACILLUS</i> .....	3
4. PATHOGENICITE D'ESPECES DE <i>BACILLUS</i> .....	5
4.1. <i>Bacillus cereus</i> .....	6
4.1.1. Infection gastro-intestinal.....	6
A. Toxine diarrhéique.....	6
B. Toxines émétiques.....	7
4.1.2. Infections Non-gastro-intestinales.....	7
4. 2.Autres espèces de <i>Bacillus</i> .....	8
5. IMPACT DE <i>B. CEREUS</i> EN PRODUITS LAITIERS.....	9
5.1 Incidence de <i>B.cereus</i> en produits laitiers .....	9
5.2. Adhérence de spores <i>B. cereus</i> .....	9
5.3. Caractéristique psychrotrophique de <i>B.cereus</i> .....	10

## CHAPITRE II

### *Matériels et Méthodes*

1. ECHANTILLONNAGE DU LAIT DE CHAMELLE.....	11
---	----



## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**kD:** kilo Dalton

**UFC :** unité formant colonie

**AFNOR:** L'Association Française de normalisation

**API 50CHB :** Application Programming Interface 50Carbohydrat Hydrolyse *Bacillus*

## **LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1-**Composition du lait de chamelle (**page**)

**Tableau2** –principales espèces de *Bacillus* et leur type respiratoire selon leurs groupes d'après (**Smith et al., 1952**) (**page**)

**Tableau 3-** Différentes échantillons et leurs origines et natures (**page**)

**Tableau4-**Représente les différents substrats existents dans les cupules de la galerie API50CHB (**page**)

## **LISTE DES PHOTOS**

**Photo1 :** Morphologie de *B.anthraxis* (**page**)

**Photo2 :** Aspect des colonies de *Bacillus* purifiée sur gélose nutritive (**page**)

**Photo3 :** Observation des cellules de *Bacillus* sous microscope optique après coloration de Gram(×100) à immersion. (**page**)

**Photo4 :** Représente la galerie API50CH après 48heures d'incubation (**page**)

## **LISTE DES FIGURES**

**Figure 1-** Schéma représentatif de l'isolement par technique des cadrans (**page**)

**Figure2** –Représente la fiche de résultats de la galerie d'identification API50CHB (**page**)

# **INTRODUCTION**

# Introduction

Dans les conditions de sécheresse extrême et en manque de pâturages, contrairement aux autres animaux, les femelles des dromadaires (*Camelus dromedarius*), désignées ci-dessous par "chamelles", sont capables de produire un lait de très bonne qualité (Yagil, 1982.). Knoess *et al.* (1986) ont rapporté que la production journalière de lait varie entre 3,5 et 35 litres par animal, selon les saisons et l'alimentation.

Les études entreprises sur ce lait ont porté sur la composition et les caractéristiques physico-chimiques, en comparaison avec le lait de vache ainsi que sur les potentialités de transformation en produits dérivés (Farah, 1993). La préoccupation majeure des laitiers et technologues est de pouvoir transformer le lait de chamelle en produits laitiers dérivés présentant une conservabilité satisfaisante. A ce jour, le lait de chamelle est consommé souvent cru pour des raisons thérapeutiques.

La transformation de ce lait nécessite, entre autres, une bonne connaissance de sa microflore microbienne comme les bactéries du genre *Bacillus* thermorésistantes sporulées qui restent peu décrites dans la littérature, ce genre de bactérie présente des intérêts dans la production laitière et parfois chez les consommateurs.

Dans la présente étude nous avons tenté à caractériser et identifier les différentes souches de *Bacillus* sporulés présents dans le lait de chamelle recueilli de différentes régions du sud Algérien à l'aide des galeries d'identification API50CHB.

Pour atteindre notre objectif, nous avons partagé notre travail en trois parties. La première partie représente quelques notions et des généralités sur le genre *Bacillus*. La deuxième partie décrit les différentes techniques et méthodes utilisées pour isoler et identifier phénotypiquement ces bactéries. Dans une troisième partie, nous exposerons les résultats de cette recherche.

# **CHAPITRE I**

## ***Synthèse bibliographique***

## 1- COMPOSITIONS DU LAIT DE CHAMELLE

Les publications faisant mention de manière complète de la composition du lait de chamelle sont relativement rares: beaucoup d'informations apportées par l'étude bibliographique sont souvent imprécises et fragmentaires. Aussi nous n'avons regroupé dans le tableau 1 que les données qui nous sont apparues comme les plus significatives, certaines d'entre elles figurent déjà dans les synthèses faites sur le sujet par différents auteurs (**Yagil, 1982**), nous les avons complétées par les apports récents de la littérature.

L'analyse des résultats (tableau 1) montre une dispersion assez large dans les valeurs des principaux composants du lait de chamelle. Cette diversité est vraisemblablement liée à des facteurs génétiques relatifs à l'aptitude laitière propre à chaque race de chamelle, elle est également consécutive à l'hétérogénéité des observations qui ont été faites sur des animaux se trouvant dans des situations très diversifiées au plan physiologique et alimentaire. Il a été en particulier clairement démontré que la privation d'eau, établie de manière expérimentale (**Yagil et Etzion, 1980; Yagil et al., 1986**) ou consécutive aux variations climatiques saisonnières (**Knoess et al., 1986**), contribue à faire chuter très sensiblement les teneurs de tous les composants de la matière sèche. Leur valeur moyenne calculée par compilation des résultats analytiques publiés (tableau 1) montre que le lait de chamelle est légèrement plus pauvre que le lait de vache.

**Tableau 1-**Composition du lait de chamelle

	eau	matière sèche	lactose	matière grasse	matière protéique	cendres
lait dromadaire	87,37	12,63	4,62	3,70	3,45	0,74
lait vache	87,20	12,80	4,80	3,70	3,50	0,80

## 2. TAXONOMIE DE *BACILLUS*

Le genre de *Bacillus* établi en 1872 par Ferdinand Cohn, appartient à la famille *Bacillaceae*, l'ordre des Bacillales (*Bacillales*), la classe des bacilles (*Bacilli*) (**Claus et Berkeley, 1986**).

## 3. CARACTERISTIQUES DU GENRE DE *BACILLUS*

Les caractéristiques de ce genre sont très variables et elles montrent un éventail de propriétés de croissance, de psychrophile à thermophile et d'acidophile à alkalophile. La température optimale de la croissance est comprise entre 30° à 37°C pour la plupart des *Bacillus* y compris les mésophiles, et de 45°C à 75°C pour les thermophiles et de -5°C à 2°C pour quelques *Bacillus* psychrophiles (**Gordon, 1989**).

Les espèces du genre *Bacillus* appartient au groupe des bactéries Gram positif, elles peuvent survivre à des pH s'étalent de 2 à 11, et se développent en conditions aérobies ou anaérobies facultatives selon les espèces (**Claus et Berkeley, 1986**). Leurs capacités de former des spores est l'une des caractéristiques les plus importantes des membres du genre *Bacillus* (**Gordon et al., 1973**).

Les espèce *Bacillus* peuvent être divisée en trois larges groupes basés sur la morphologie de spore et le gonflement de sporange (tableau2) (**Smith et al., 1952 ; Gordon et al., 1973**).

### Le groupe 1 :

Ce groupe produit un ellipsoïde central ou terminal ou spores cylindriques qui ne dilatent pas les sporanges. La cellule végétative est < 1  $\mu m$  du long (**Kramer et Gilbert, 1989 ; Tumbull et al., 1990**).

### Le groupe 2

Les Membres de ce groupe sont à Gram-variable et ont des sporanges gonflés avec des spores d'ellipsoïde centrales et parfois terminales.

### Le groupe 3

Ce groupe est le plus fastidieux et il est plus facile à distinguer leur morphologie que d'autres espèces de *Bacillus*. Leurs spores sont localisées dans les sporanges gonflés (Gordon, et al., 1973 ; Smith, et al., 1952 ; Tumbull et Kramer, 1991 ; Tumbull et al., 1990).

**Tableau 2** –principales espèces de *Bacillus* et leurs type respiratoire selon leurs groupes d'après (Smith et al., 1952)

Espèces	Groupe	Type respiratoire
<i>B.subtilis</i>	1	AS
<i>B.licheniformis</i>	1	AA
<i>B.pulimus</i>	1	AS
<i>B.cereus</i>	1	AA
<i>B.megaterium</i>	1	AS
<i>B.coagulans</i>	1	AA
<i>B.firmus</i>	1	AS
<i>B.lentus</i>	1	AS
<i>B.anthraxis</i>	1	AA
<i>B.polymyxa</i>	2	AA
<i>B.macerans</i>	2	AA
<i>B.circulans</i>	2	AA
<i>B.brevis</i>	2	AS
<i>B.alvei</i>	2	AA
<i>B.sphaericus</i>	3	AS
<i>B.pasteuri</i>	3	AS

AA : Aéro-Anaérobie facultatives

AS : Aérobie stricte

L'espèce *B. cereus* est la plus connue dans ce genre. Elle peut se développer au-dessus de température de 5°C au 55°C. Elle se caractérise par une température optimale de croissance au tour de 28°C à 35°C et une gamme de pH optimum compris entre 5-9 (**Van Netten et Krarner, 1992**). Selon **Vaisinen et al. (1991)**, il est très difficile de différencier entre les espèces de *Bacillus* par les caractères morphologiques et biochimiques. Les espèces *B. mycoides*, *B. thuringiensis* et *B. anthracis* sont considérées comme variantes plus proche au *B. cereus* et il est difficile de les différencier par les propriétés physiologiques (**Sommerville et Jones, 1972; Tumbull et Krarner, 1991; Drobniewski, 1994**). Cependant, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* et *B. thuringiensis* sont classé en tant qu'espèce distincte parce que leur pathogénicité aux êtres humains et aux animaux sont différentes de l'un à l'autre.

*B. cereus* est activement motile, fortement hémolytique et ne produit pas des colonies rhizoïdale ou cristaux d'endotoxine. *B. cereus* et *B. anthracis* sont presque identiques sur le plan génétique (**Ash et al., 1991**). *B. cereus* peut être différencié des autres espèces du genre *Bacillus* par sa sensibilité à la pénicilline et à sa lyse par un bactériophage de type gamma.

De plus, le *B. anthracis* peut également être différenciée de *B. cereus* et *B. thuringiensis* par analyses d'acide gras (**Kaneda, 1967 ; Kaneda, 1968; Lawrence et al., 1991**). Les endotoxines produites exclusivement par le *B. thuringiensis* sont employé pour le différencier des autres espèces du genre *Bacillus*.

#### **4. PATHOGENICITE D'ESPECES DE BACILLUS**

Les espèces *B. cereus* et *B. anthracis* ont été longtemps considérés comme les plus pathogènes (**Tumbull et Kramer, 1991 ; Drobniewski, 1994 ; Jackson et al., 1995**). Les autres espèces, y compris *B. thuringiensis*, *B. licheniformis* et *B. subtilis* ont été également identifiés comme agents de toxi-infections alimentaires (**Tumbull et Kramer, 1991 ; Drobniewski, 1994 ; Jackson et al., 1995**).

##### **4.1. *Bacillus cereus***

Plusieurs cas de toxi-infections alimentaires sont recensées suite à l'ingestion des cellules de *Bacillus cereus* ( $>10^5$  UFC/ml) ou leurs toxines. Elle provoque deux types d'infections.

#### 4.1.1. Infection gastro-intestinal

Ce type d'infection est du à l'ingestion de l'un des deux toxines produites par *B.cereus*: toxine de diarrhée et toxine émétique (**Melling et al., 1976**).

##### A. Toxine diarrhéique

L'entérotoxine de diarrhée est une protéine thermolabile de poids moléculaire de 50 kD et un point isoélectrique de 4.9. La toxine est produite à la phase exponentielle de croissance des cellules à une température optimale entre 32°C à 37°C (**Gilbert, 1979 ; Adams et mousse, 1995**).

**Thompson et al. (1984)** constate que la toxine est composée de trois protéines de poids moléculaires de 43 kD, 39kD et 38 kD. Les plus grandes et plus petites protéines n'ont aucune activité toxique. Selon le même auteur, ces trois protéines ne sont pas toujours produites et l'estimation de leur poids moléculaires est sensible aux différentes méthodes utilisées. En effet, **Granum et al. (1993)** ont montré aussi que la toxine diarrhéique se compose de trois protéines mais de poids moléculaire différents 48kD ,40kD et 34 kD. Ils ont montré aussi que la protéine de poids moléculaire moyen c'est-à-dire de 40KD est douée d'une activité toxigène.

L'entérotoxine diarrhéique est détruite par une simple cuisson à température de 56°C pendant 5 minutes. Elle peut s'inactiver à un pH plus acide (<4) ou Basique (>11) (**Kramer et Gilbert, 1989**). La toxine peut également être dégradée par la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine (**Granum et al., 1993**).

La durée de période d'incubation est environ 8 à 16 heures suite à la consommation de la nourriture contaminée par *B.cereus*. Elle se caractérise par des symptômes principalement de diarrhée et douleur abdominale et de temps en temps vomissement. Ces symptômes disparaissent après 12 à 24heures.

##### B. Toxine émétique

La manifestation émétique le plus tôt documentée dans l'organisme était dans la grande

Bretagne en 1971. Cependant, la toxine émétique n'est pas bien caractérisée. La toxine est produite à la fin de la phase exponentielle ou à la phase stationnaire de croissance des cellules à la température optimale de 25°C à 30°C (Adams et Moss, 1995). La toxine émétique est un peptide nommé le "cereulide" (Agata, et al., 1994). Le poids moléculaire de cette toxine est moins de 10 KD. Il résiste aux conditions de tube digestif (Shinagawa et al., 1994, 1996 ; Mikami et al., 1995).

La toxine est fortement thermostable, elle résiste à une température de 126°C pendant 90 minutes, à des pH compris entre 2 à 11 et à l'action des enzymes protéolytiques notamment la trypsine et la pepsine (Hughes et al., 1988 ; Tumbull et al., 1990).

Le syndrome émétique à une période d'incubation beaucoup plus courte de (1-5 h) que celle de toxine diarrhéique (8-16 h) (Tumbull, et al., 1990 ; Drobniewski, 1993).

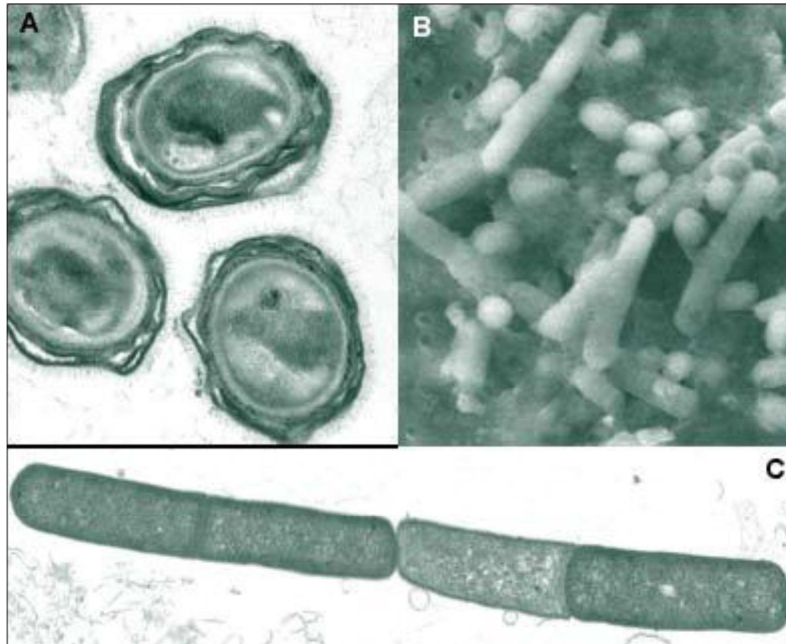
Les symptômes plus prédominants sont la nausée, vomissement, douleur abdominal, crampes et diarrhée, qui sont similaires à ceux de l'intoxication due au *Staphylococcus aureus* (Tumbull et al., 1990 ; Adams et mousse, 1995).

#### 4.1.2. Infections Non-gastro-intestinales

Les infections de *B. cereus* ont été documentées depuis le début du siècle précédent (Doyle et al., 1985 ; Drobniewski, 1993 ; Kramer et Gilbert, 1992) à savoir les infections locales, infections respiratoires, infections du système nerveux central (Johnson, 1984 ; Tumbull et Kramer, 1991 ; Drobniewski, 1993). Ces infections causées par *B. cereus* sont associées à l'interaction des enzymes membranaires extracellulaires (la phospholipase C, cereolysin et un cytolysin thermostable) avec les toxines (Sliman et al., 1987 ; Beecher et Macmillan, 1991 ; Granum, et al., 1993). Par exemple, le complexe d'enzymes (cereolysin AB) présent un pouvoir cytolytique (Gilmore et al, 1989 ; Beecher et Macmillan, 1991 ; Granum, 1994)

#### 4. 2. Autres espèces de *Bacillus*

La *B. anthracis* (photo1) est un microbe pathogène qui infecte les animaux et les êtres humains (Tumbull et Kramer, 1991 ; Ezzell et Wilhelmsen, 1993).



**Photo1** - Morphologie de *B.anthraxis*

Les espèces *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus* et *B. brevis* ont été isolées à partir de lait et produits laitiers et identifiées comme agents causals de certaines maladies humaines (**Tumbull et Kramer, 1991**). Le Cas de *B. licheniformis* présent des syndromes d'intoxication alimentaire semblables aux syndromes de diarrhée provoqué par *B. cereus*. La *B. subtilis* produit un syndrome émétique aigu (**Kramer et Gilbert, 1989; Drobniewski, 1993**).

Les espèces *B. thuringiensis*, *B. popuiliae*, *B. sphaericus*, *B. larves*, et *B. lentimorbus* sont considérées comme microbes pathogènes d'insecte (**Tumbull et Kramer, 1991**). *B. thuringiensis* est le plus extensivement employé et intensivement étudiée en microbiologie d'insecticide. Beaucoup d'essais *in vivo* et *in vitro* ont été effectués pour assurer la sûreté des champs de récolte par pulvérisation de ces organismes, mais des récents observations indiquer que les deux *B. thuringiensis* et le *B. sphaericus* peuvent causer la maladie humaine (**Ray, 1991; Drobniewski, 1994**).

Certaines espèces de *B. thuringiensis* peuvent produire des entérotoxines diarrhéique similaire à celles produites par *B.cereus* (**Ray, 1991 ; Jackson et al., 1995 ;Mikami, et al., 1995**)

## 5. IMPACT DE *B. CEREBUS* EN PRODUITS LAITIERS

La présence de *B. cereus* dans le lait pasteurisé et d'autres produits laitiers est un commandant souci de l'industrie laitière puisque la contamination du lait par cet organisme peut mener à la détérioration et des problèmes de sûreté alimentaire. Les propriétés génératrices et psychrotrophiques de spores permettent à *B. cereus* d'accroître et de produire des toxines dans le lait pasteurisé à la température de réfrigérateur (**Wong et al., 1988a; Christiansson et al., 1989**).

### 5.1 Incidence de *B.cereus* en produits laitiers

L'incidence de *B. cereus* en produits laitiers est assez haute. En effet, Un pourcentage de 35% de lait pasteurisé, 63% de lait en poudre, 50% de nourriture pour bébés (basée sur le lait) et 14% de glace simple se sont avérés souillés avec *B. cereus* avec un nombre compris entre 0.3 à 800 UFC/g ou ml (**Ahmed et al., 1983 ; Wong, et al., 1988b ; Becker, et al., 1994**).

En plus des maladies causées par *B.cereus*, elle est également responsable du l'écaillage de lait pasteurisé (**Stone et Rowlands, 1952 ; Billing et Cuthbert, 1958 ;Overcast et Atmaram, 1974**).

### 5.2. Adhérence de spores de *B. cereus*

Les spores de *B. cereus* sont très adhésives sur des surfaces d'équipement de laiterie. Ceci peut être une autre raison de leur présence dans le lait pasteurisé et contribuent difficilement en contrôlant cette organisme. La capacité adhésive forte de spores est principalement en raison de trois caractéristiques (**Ronner et Husmark, 1992**) :

- a) leur hydrophobicité relativement haute.
- b) basse charge extérieure à la spore.
- c) morphologie unique.

### 5.3. Caractéristique psychrotrophique de *B.cereus*

Les souches psychrotrophiques de *B. cereus* ont été isolées pour la première fois dans le lait en 1969 (**Grosskopf et Harper, 1969**). Les souches Psychrotrophiques de *B.cereus* peuvent se développer à les températures de la réfrigération commerciale (<7°C). 50% des espèces entérotoxigènes peuvent se développer à 5°C, et 86.6% à 7°C dans 7 jours (**RusuI et Yaacob, 1995**). Les études sur des souches psychrotrophiques de *B.cereus* ont indiqués que la période de génération moyenne de ces organismes dans le lait est 17 h à 6°C (**Griffiths et Phillips, 1990**). La plupart des espèces en lait peuvent produire les lipases et des protéases qui sont associés à une variété de mauvais goûts aussi bien que des défauts physiques dans le lait (**Coghill et Juffs, 1979 ; Ahmed et al., 1983 ; Gilliland et al., 1984**). Elles peuvent produire des toxines pendant la croissance à basse température (6-10°C) (**Wong, et al., 1988 b ; Griffiths ,1990**). La production de Toxine augmente avec l'augmentation de la température de 6 à 21°C (**Griffiths, 1990**). La plupart des psychrotrophes sont détruits par pasteurisation et normalement ne sont pas un problème sérieux (**Gilliland et al., 1984**).

Cependant, leurs enzymes extracellulaires (des lipases et des protéases) sont, dans la plupart des cas, anti-caloriques et ne sont pas inactivées par le procédé de pasteurisation (**Champagne et al., 1994**). La présence des souches psychrotrophiques de *B.cereus* dans le lait pasteurisé peu impliquer de post-traitement de contamination, ou germination des spores (**Gilliland et al., 1984**).

## **CHAPITRE II**

### *Matériels et Méthodes*

La totalité de ce travail a été accompli dans le laboratoire pédagogique de l'université de Laghouat.

## 1. ECHANTILLONNAGE DU LAIT DE CHAMELLE

Les échantillons du lait de chamelle utilisés durant cette étude ont été récoltés de différentes régions du sud de l'Algérie. Le tableau 3 représente leurs origines et leurs natures. Les échantillons du lait prélevés sont vendus dans des bouteilles cachetées.

**Tableau 3-** Différentes échantillons et leurs origines et natures

	Origine	Nature
Echantillon 0	Laghouat	cru
Echantillon 1	Laghouat	cru
Echantillon 2	Ghardaïa	pasteurisé
Echantillon 3	Ain-Amenas	cru

Les échantillons ont été amenés au laboratoire dans une glacière à 4°C dans leur conditionnement d'origine.

## 2. ISOLEMENT DE SOUCHES DE *BACILLUS* AEROBIES SPORULEES

L'isolement des *Bacillus* aérobies sporulés est basé sur la sélection thermique des cellules thermorésistantes en conditions d'aérobioses.

### 2.1. Préparation des échantillons et traitement thermique

Un volume de 10ml de chaque échantillon a été introduit dans des tubes stériles puis apporté au bain marie à 80°C pendant 10min.

Après traitement thermique, un volume de 1 ml du lait de chamelle traité a été prélevé stérilement puis dilué dans 9 ml d'eau physiologique stérile. Ensuite, des dilutions décimales ont été réalisées à partir de la première dilution jusqu'à la troisième dilution. Les tubes doivent être agités avant chaque prélèvement.

## 2.2. Dénombrement et isolement des *Bacillus*

Un volume de 500 µl de chaque dilution a été étalé en surface de la gélose Müller Hinton coulée dans des boîtes de Pétri de 90mm. Les boîtes de Pétriensemencées ont été laissées sécher pendant 10 min puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

Après incubation, le nombre de colonies exprimé en UFC/ml a été estimé suivant la norme **AFNOR, (1996)**.

$$N = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0,1n_2) d}$$

D'où :

$\sum$  : C est la somme des colonies comptées sur une boîte retenue des dilutions effectuées ;

V : est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres;

$n_1$  : est le nombre des boîtes retenues à la première dilution;

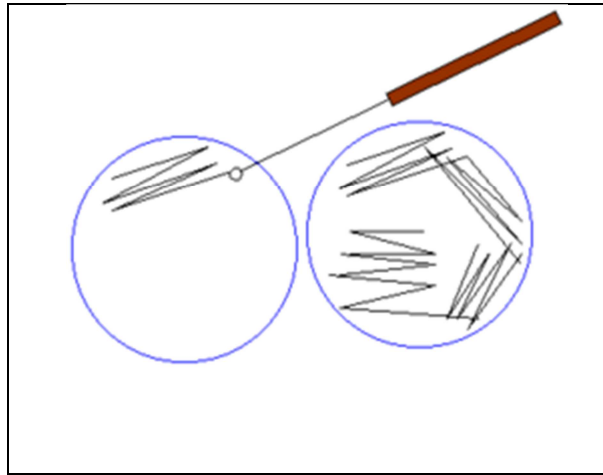
$n_2$  : est le nombre des boîtes retenues à la seconde dilution;

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

## 2.3. Isolement et purification

A partir des boîtes dénombrées, les colonies repérer pour l'isolement sont les colonies dont l'aspect colonial est différent pour le même échantillon.

La purification des souches consiste à prélever un *öse puisensemencé en strie suivant la technique de cadrant comme le montre la figure1. La purification a été répétée deux fois sur le même milieu d'isolement.*



**Figure 1-** Schéma représentatif de l'isolement par technique des cadrans

#### **2.4. Test de confirmation de la pureté**

Pour confirmer la pureté de souches de *Bacillus* isolées, nous nous sommes basés sur l'observation macroscopique des colonies, l'observation microscopique après coloration de Gram. La recherche de catalase consiste à confirmer l'authenticité de groupe de *Bacillus* sporulé.

### **3. CONSERVATION DES SOUCHES DE *BACILLUS***

La conservation de souche de *Bacillus* a été effectuée en double sur gélose nutritive inclinée à 4°C.

### **4. IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE PAR GALERIE API 50CHB**

La procédure utilisée pour l'identification de souches de *Bacillus* est celle décrite par le fabricant Biomerieux. Le test consiste à étudier la fermentation des 49 sucres présents dans les cupules de la galerie API 50 CHB. API 50 CHB est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes. La galerie API 50 CH est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques). Les cupules de fermentation sont inoculés avec API 50 CHB Medium qui réhydrate les substrats. Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans les cupules, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.

#### 4.1. Préparation des pré-cultures et l'inoculum

Les pré-cultures de *Bacillus* ont été préparées à partir de milieu de BHI puis incubées à 37°C pendant 24heures. Les pré-cultures récupérées ont subi une centrifugation à 4000g pendant 20min. Ensuite, les culots ont été récupérés puis lavés trois fois (après chaque centrifugation) à l'eau physiologique.

Enfin, le culot lavé est suspendu dans le milieu API 50 CHB commercialisé par Biomerieux.

#### 4.2. Inoculation des plaques API 50CHB

Après la préparation des galeries API 50CHB, un volume de 100µl a été introduit dans les cupules. La préparation des plaques consiste à répartir 10ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.

Ensuite, les plaques ont été incubées à 37°C.

#### 4.3. Lecture des résultats

La lecture des galeries a été réalisée à des temps d'incubation définis (24 et 48). Les résultats ont été notés sur la fiche de résultats (figure2). Les tests à considérer positif sont les tests présentant un virage de couleur traduit par l'acidification du milieu de rouge au jaune à l'exception de test esculine traduit par le virage du rouge au noir. Le profile biochimique de *Bacillus* est interprété par API web TM.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	
24	-	+	-	-	+	+	+	-	-	V	+	+	+	+	-	V	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
48	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	V	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

**Figure2** –Représente la fiche de résultats de la galerie d'identification API50CH

**Tableau 4**-Représente les différents substrats existents dans les cupules de la galerie  
API50CHB

cupule	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)	cupule	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
0		TEMOIN	-	25	ESC	ESCuline	1.16
1	GLY	GLYcérol	1.64	26	SAL	SALicine	1.04
2	ERY	ERYthritol	1.44	27	CEL	D-CELLobiose	1.32
3	DARA	D-ARAbinose	1.4	28	MAL	D-MALtose	1.4
4	LARA	L-ARAbinose	1.4	29	LAC	D-LACtose (origine bovine)	1.4
5	RIB	D-RIBose	1.4	30	MEL	D-MELibiose	1.32
6	DXYL	D-XYLose	1.4	31	SAC	D-SACcharose	1.32
7	LXYL	L-XYLose	1.4	32	TRE	D-TREhalose	1.32
8	ADO	D-ADOnitol	1.36	33	INU	INuline	1.28
9	MDX	Méthyl-βD-Xylopyranoside	1.28	34	MLZ	D-MéLéZitose	1.32
10	GAL	D-GALactose	1.4	35	RAF	D-RAFFinose	1.56
11	GLU	D-GLUcose	1.56	36	AMD	AmiDon	1.28
12	FRU	D-FRUctose	1.4	37	GLYG	GLYcoGène	1.28
13	MNE	D-MaNNosE	1.4	38	XLT	XyLiTol	1.4
14	SBE	L-SorBosE	1.4	39	GEN	GENtiobiose	0.5
15	RHA	L-RHAmnose	1.36	40	TUR	D-TURanose	1.32
16	DUL	DULcitol	1.36	41	LYX	D-LYXose	1.4
17	INO	INOsitol	1.4	42	TAG	D-TAGatose	1.4
18	MAN	D-MANnitol	1.36	43	DFUC	D-FUCose	1.28
19	SOR	D-SORbitol	1.36	44	LFUC	L-FUCose	1.28
20	MDM	Méthyl-αD-Mannopyranoside	1.28	45	DARL	D-ARabito	1.4
21	MDG	Méthyl-αD-Glucopyranoside	1.28	46	LARL	L-ARabitoL	1.4
22	NAG	N-AcétylGlucosamine	1.28	47	GNT	potassium GlucoNaTe	1.84
23	AMY	AMYgdaline	1.08	48	2KG	potassium 2-CétoGluconate	2.12
24	ARB	ARButin	1.08	49	5KG	potassium 5-CétoGluconate	1.8

## **CHAPITRE III**

*Résultats et discussion*

### 3. RESULTATS ET DISCUSSION

Le lait de chamelle est un lait de très bonne qualité organoleptique et nutritionnelle (Yagil et al., 1980 ; Yagil, 1982 ; Yagil et al., 1984). Les propriétés physicochimiques du lait de chamelle et sa salinité permettent la sélection des souches plus intéressante sur le plan technologique. Il est aussi servi comme alicament par le consommateur contre plusieurs pathologies.

L'analyse de la qualité microbiologique en termes de bactéries sporulées aérobies mésophiles (SAM) montre que le nombre de bactéries ne dépasse pas 20UFC/ml et 90UFC/ml pour le lait pasteurisé et le lait cru respectivement.

Le seuil de contamination en termes de bactéries aérobie mésophile régi par le règlement Algérien ne dépasse pas  $10^5$  et  $3 \times 10^4$  UFC/ml pour le lait cru et pasteurisé respectivement (JOA, 1998).

Malgré que le nombre de bactéries SAM en UFC est en dessous du seuil de contamination régi par la norme Algérienne. Le nombre peut s'accroître pour atteindre un seuil de contamination présentant un potentiel danger pour le consommateur parfois sensible (nouveau née, immunodéprimée....etc).

Ce risque peut influencer par les modalités d'utilisation et de transport (parfois dure une journée à des températures optimale de la croissance bactérienne).

Les huit souches retenues sont sélectionnées selon la fréquence de leurs présences dans le milieu d'isolement.

La présence de divers genres de bactéries *Bacillus* (SAM) dans le lait de chamelle était prévisible car des bactéries sporulées ont été trouvées dans la microflore de tous les laits étudiés à savoir les travaux de Kalogridou (1992); Betsie et al. (1997) ; Magnusson et al. (2007).

En effet, plusieurs travaux sur le lait de chamelle ont été réalisés sur la microflore. Hadush et al. (2008) ; Alman et Molla (2000) ; Gadir et al. (2005) ; Abera et al. (2010) ont isolé différentes souches responsable de mastite chez la chamelle à savoir les streptocoques, les staphylocoques, *E. coli*...

Les travaux de Gadir et al. (2005) et Hadush et al. (2008) montrent la présence de *Bacillus* ssp et notamment *Bacillus cereus*.

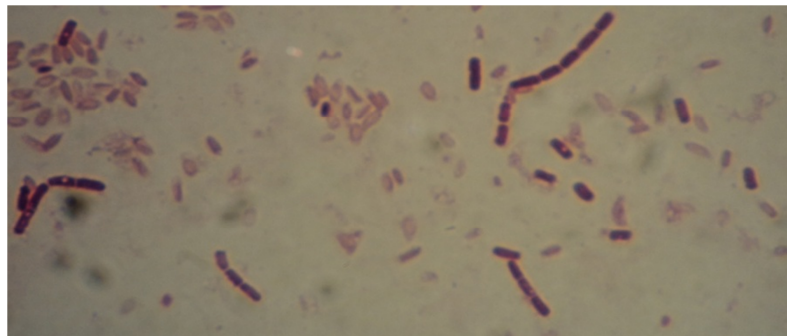
Dans les échantillons du lait de chamelle, les colonies des souches sont de couleur blanche avec une surface lisse et brillante, de forme circulaire, plate (photo2)(Lc1, Lc2, Lc4 et Lt1) et bombée (Lc3). Alors que les colonies des souches présentent une couleur blanc-crème, une forme circulaire et plate (Lc5, Lc6 et Lt2).



**Photo2** -Aspect des colonies de *Bacillus* purifiées sur gélose nutritive

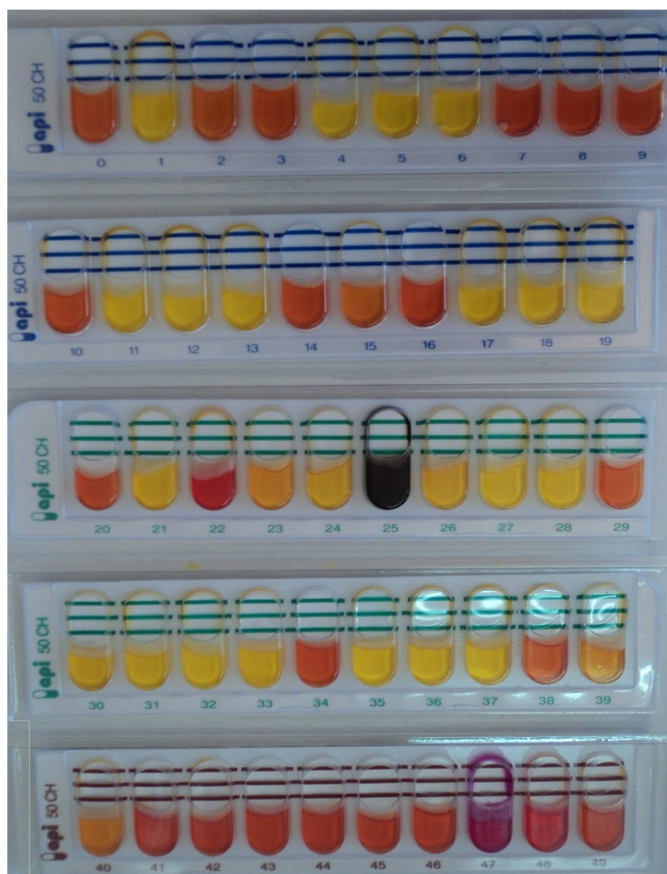
L'observation microscopique, montre que toutes les souches ont la même forme de cellules bacillaires isolées et en chaînettes. Le mode d'arrangement dépend de la nature du milieu de culture et la technique d'étalement.

Comme le montre la photo 3, les cellules de la souche Lc1 isolées s'arrangent en chaînette présentant une endospore non déformante non colorée par le colorant de Gram. Par contre, certaines souches présentent une endospore centrale (Lc2, Lc1, Lc4 et Lt1), d'autre subterminale (Lc3, Lc5, Lc6 et Lt2).



**Photo3** : Observation des cellules de *Bacillus* Lc2 en microscope optique après coloration de Gram( $\times 100$ ) à immersion

Huit souches de *Bacillus* ont été isolées puis identifiées à l'aide de système de galerie API 50CHB (photo4). Toutes les souches identifiées sont Gram positif et catalase positif.



**Photo4** - Représente la galerie API50CH après 48heures d'incubation.

Dans cette étude, la raison pour l'usage de la méthode API 50CH est la fiabilité de cette dernière pour l'identification des bactéries. Par contre, les méthodes d'identification classiques sont moins fiables. **Selon Berkeley et al. (1984)**, ils étaient faciles d'identifier des souches typiques des espèces communes par la clef dichotome mais la difficulté était rencontrée avec des souches atypiques ou intermédiaires. Pour ces raisons, **Collins et al. (1991)** ont noté que les kits d'identification d'API étaient plus fiables dans ces circonstances.

Si, lors de la lecture de test, un test initialement positif devient négatif, seul le résultat positif sera pris en compte (il s'agit d'une alcalinisation due à la production d'ammoniaque à partir de peptone).

L'identification de ces souches par galerie API50CH conduit à la sélection d'une souche *B.megaterium* (12,5%), quatre souches de *B.licheniformis* (50%), une souche de *B.cereus* (12,5%), une souche de *Paenibacillus mecerans* (12,5%) et une souche de *B.lentus* (12,5%). Une forte contamination du lait par *Bacillus licheniformis* avec une

prévalence de 50%. Cette espèce est peut être responsable de plusieurs toxi-infections alimentaires (**Tumbull et Kramer, 1991 ; Drobniewski, 1994 ; Jackson et al. 1995**).

La présence de ces contaminants peut être expliquée par leurs pouvoirs de résistance à des températures très élevée comme celles de la région du sud, de matériels de récolte, de conditions de vente. D'autres facteurs liés aux bactéries et leurs enzymes sécrétées à savoir les lipases, protéase qui leurs permettent de survivre (**Coghill et Juffs, 1979 ; Ahmed et al., 1983 ; Gilliland et al., 1984**).

Par ces tests, il est très difficile de distinguer les espèces de *Bacillus* spp parce qu'elles appartiennent au même groupe de *Bacillus subtilis* et d'autres appartiennent au groupe *Bacillus cereus* (**Ash et al., 1991**). En effet, entre *B.megaterium* et *B.licheniformis*, des tests de distinction supplémentaires sont nécessaire à savoir le caractère d'anaérobiose (**Erem et al., 2009**). La plupart des espèces de *Bacillus* diffèrent seulement par une propriété biochimique donc l'identification biochimique classique de ces espèce est très difficile. Par exemple la *B. subtilis* et le *B.pumilus* sont seulement distingués par hydrolyse d'amidon. *B. subtilis* hydrolyser l'amidon alors que le *B. pumilus* ne peut pas, ce qui provoque une erreur dans l'interprétation de cet essai peut donc changer l'identification d'un isolat (**Collins et al., 1991 ; Thompson et al., 1993**).

**Sorokulova et al. (2003)** ont montré que ces deux bactéries sont responsables des cas de détérioration des produits alimentaire et certains cas d'intoxication.

L'espèce *Bacillus cereus* est connue aussi par leurs pouvoir pathogène (**Becker et al., 1994**). Plus récemment, 71% du lait pasteurisés commerciaux ont été rapportés pour contenir *B. cereus* après la pré-incubation à 30°C pendant 6 heures (**Te Giffel et al., 1996**).

L'espèce de *Paenibacillus mecerans* est une bactérie ubiquitaire rencontrée en abondance dans les sols (**Timmusk, 2003**). Cela peut expliquer la présence de ces espèces dans le lait. Elle présente un effet microbienne très remarquable (**Singh et al., 2009**). Elle secrète des enzymes altérantes le lait (**Singh et al., 2009**). *B.lentus* est une bactérie connu par sa thermorésistance très élevée isolée des milieux de désert. Elle est responsable aussi de plusieurs toxi-infections alimentaires (**Arshnee, 2006**). Elle présente un intérêt technologique très important notamment sa capacité de produit des enzymes d'amylase (**El-Aassar et al., 1992**), dans l'agriculture (**Abbasdokht et Gholami, 2010**).

## **CONCLUSION**

## Conclusion

Au long de la chaîne de la mise en consommation, les produits laitiers restent des produits très sensibles aux facteurs environnementaux notamment la température. Ils sont considérés comme un milieu idéal pour toute croissance microbienne. Le lait de chamelle est l'un des aliments moins étudiés sur le plan microbiologique. Compte tenu des modalités de transport et d'utilisation de ce produit, elles poussent les scientifiques à étudier la composition en flores d'altération et pathogènes du lait de chamelle. Plusieurs travaux ont été entrepris par des chercheurs Algériens sur les bactéries lactiques isolées du lait de chamelle à savoir Pr. KARAM d'université d'Oran et son équipe (**Karam et al., 2006**), mais pas sur les bactéries sporulées.

Dans ce travail, nous avons étudié et recensé les flores sporulées aérobies mésophiles majoritaires du lait de chamelle. Les différentes flores dénombrées ont été isolées puis identifiées phénotypiquement à l'aide de galeries API50CH.

Au total huit souches ont été isolées. L'identification de ces souches par galerie API50CH conduit à la sélection d'une souche *B. megaterium* (12.5%), quatre souches de *B. licheniformis* (50%), une souche de *B. cereus* (12.5%), une souche de *Paenibacillus mecerans* (12.5%) et une souche de *B. lentus* (12.5%) avec un pourcentage de similitude de 98% obtenus par le logiciel API web Biomerieux. L'ensemble de ces bactéries présente un risque pour les consommateurs que pour les utilisateurs industriels.

Dans l'optique de ces résultats, le lait de chamelle peut véhiculer des bactéries sporulées causant des dégâts pour les acteurs de la filière.

Comme perspective de ce travail, l'élargissement de l'éventail des souches identifiées et surtout les souches thermophiles envisagées. A ce stade du travail, l'identification biochimique est insuffisante, elle nécessite une éventuelle identification génotypique à savoir le séquençage de gène 16S.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Adams, M. R. et M. O. Moss. 1995.** *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Food microbiology, pp. 160- 164. The Royal Society of Chemistry.

**Abera, M. Abdi, O .Abunna,f.Megersa, B.2010.** tropical animal health and production Volume: 42 Issue: 3 Pages: 341-347 DOI: 10.1007/s11250-009-9424-6 Published: MAR 2010

**Alman, G . Molla, B .2000.**Prevalence and etiology of mastitis in camels (*Camelus dromedarius*) in eastern Ethiopia Author. Journal of camel practice and research. 7(1), 97-100.

**Agata, N., M. Mori, M. Ohta, S. Suwan, and I . Ohtanil. 1994.** A novel dodecadepsipeptide ,cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEP-2 cells. FEMS Microbiol. Lett. 121:3 1-34.

**Ahmed, A. A.-H., M. K. Moustafa, and E. H. Marth.1983.** incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. J. Food Protect. 46: 126- 128

**Ash, C., J. A. E. Farrow, S. Wallbanks, and M. D. Collins. 199 1.** Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA. Lett. Appl. Microbiol. 13:202-206.

**Arshnee ,M, 2006.** The molecular basis of glycopeptide Resistance in two Clinical Isolates: *Bacillus Lentus* RSA1208 and *Paenibacillus Thiaminolyticus* RSA 1221. Thesis. 9902930F Masters Dissertations Faculty of Health Sciences.

**El-Aassar, S. A. , S. H. Omar, M. K. Gouda, A. M. Ismail et A. F. Abdel-Fattah.2009** .Applied Microbiology and Biotechnology Volume 38, Number 3,312-314

**Abbasdokht, H et Gholami ,A, 2010.**The Effect of Seed Inoculation (*Pseudomonas putida+Bacillus lentus*) and Different Levels of Fertilizers on Yield and Yield Components of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars .World Academy of Science, Engineering and Technology 68 .

**Becker H., G. Schaller, W. von Wiese, et G. Terplan. 1994.** *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. Int. J. Food Microbiol. 23: 1- 15.

**Beecher, D. J. et J. D. MacMillan. 1991.** Characterization of the components of haemolysin BL from *Bacillus cereus*. *infect. Immun.* 59: 1778-1784.

**Berkeley, R. C. W., Logan, N. A., Shute, L. A. et Capey, A. G. 1984.** In: Berkeley, R. C. W. (Ed.), *Methods in Microbiology*, vol 16, chap. 12, Academic Press, London, pp 292-323.

**Betsie .A, Slaghuis, M, Te Giffel. C, Rijkelt .R, Beumer. G. 1997.** *International DairyJournal*, Volume7, Pages201-205

**Billing, E. et W. A. Cuthbert. 1958.** 'Bitty" cream: The occurrence and significance of *Bacillus cereus* spores in raw milk. *J. Appl. Bact.* 21:65-78.

**Champagne, C. P., R. R. Laing, D. Roy, A. A. Mafu, et M. W. Griffiths. 1994.** Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* 34( 1): 1-30.

**Christiansson, A., A. S. Naidu, I. Nilsson, T. Wadstram, H. E. Pettersson. 1989.** Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in mik at low temperature. *Appt. Environ. Microbiol.* 55:2595-2600.

**Claus, D. et R. C. W. Berkeley. 1986.** Genus *Bacillus* Cohn 1872,174. In: P. H. A. Sneath, N. S-Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Hot (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1105-1 139. The William & Wilkins Co., Baltimore.

**Collins, N. E., Kirschner, L. A. M. et von Holy, A. 1991.** Characterization of *Bacillus* isolates from ropey bread, bakery equipment and raw materials. *South African Journal of Science* 87, 62-66.

**Coghill, D., et H. S. Juffs. 1979.** Incidence of psychrotrophic spore-forming bacteria in pasteurized mik and cream products and effect of temperature on their growth. *Aust. J. Dairy Technol.* 34: 150-153.

**Doyle, R. J., K. F. Keller, et J. W. Ezzell. 1985.** *Bacillus*. In: E. H. Lennette, A, Baiows, W. J. Hausler Jr., and W. J. Shadomy (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 4th, pp.2 1 1-2 15. American Society for Microbiology

**Drobniewski, F. A. 1994.** The safety of *Bacillus* species as insect vector control agents. J. Appl. Bacteriol. 76: 101-109.

**Drobniewski, F. 1993.** *Bacillus cereus* and related species. Clin. Microbiol. Rev. 6 (4):324-38.

**Erem, f. Certel,m . Karakaş, b. 2009.** Identification of *bacillus* species isolated from ropey breads both with classical methods and api identification kits. *Akdeniz üniversitesi ziraat fakültesi dergisi*22(2), 201–210

**Ezzell, I, W. et C, L. Wilhelmssen. 1993.** *Bacillus anthracis*. In: C. L. Gyles and C. O. Thoen (eds.), Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 2nd, pp.36-43. Iowa state University Press, Iowa

**Farah Z., 1993,** Composition and characteristics of camel milk. A review. Journal of Dairy Research, 60, 603-626.

**Gadir, AEA. Hildebrandt, G. Kleer, J. Molla, B. Kyule, M. Baumann, M.2005.** Journal of camel practice and research volume:10 issue: 1 pages: 43-46.

**Gilbert, R. J. 1979.** *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: H. Riemann and F. L. Bryan (eds.), Food-borne infections and Intoxications, 2nd, pp. 495-518. Academic Press, NewYork

**Gilliland, S. E., Michener, H. D., et Kraft, A. A. 1984.** Psychrotrophic Microorganisms. In: M. Speck (ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods (2ed.). pp. 135-138.

**Gilmore, M. S., A. L. Cruz-Rodz, M. Leimeister-Waechter, J. Kreft and W-Goebel. 1989.** A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. J. Bacteriol, 17 1 :744-753.

**Gordon, R. E., W. C. Haynes, et C. H. Pang. 1973.** The genus *Bacillus*. In: A. 1. Laskin and H. A. Lechevalier (eds.). Handbook of Microbiology, vol. 1, pp:7 1-88. CRC Press Cleveland, Ohio.

**Gordon, R, E. 1989.** The *genus Bacillus*. In W. M. O'Leary (ed.), Practical Handbook of Microbiology, pp. 109-126. CRC Press, Boca Raton, Florida

**Granum, P. E. 1994.** *Bacillus cereus* and its toxins. J. Appl. Bact. Symp. Supp. 76:6IS-66s.

**Granum, P. E., S. Brynstad, K. O'Sullivan, et H. Nissen. 1993.** Enterotoxin from *Bacillus cereus*: production and biochemical characterization, Neth. Milk Daicy 1.47:63-70

**Griffiths, M. W. et J. D. Phillips. 1990.** Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus* found in raw and pasteurized milk. J. Soc. Dairy Technol. 4352

**Griffiths, M. W. 1990.** A research note: Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. I. Food Protect. 53:790-792.

**Grosskopf, J. C. et W. J. Harper. 1969.** Isolation and identification of psychrotrophic sporeformers in milk. Milchwissenschaft. 29:467.

**Hadush .B, Etsay .K et Hailay. K.2008.** Journal of camel practice and research volume: 12 issue: 1 pages: 33-36.

**Hughes, S., B. Bartholomew, J. C. Hordy et I. M. Kramer. 1988.** Potential application of a HEP-2 assaying in the investigation of *Bacillus cereus* emetic syndrome food poisoning. FEMS Microbiol. Lett. 52:7-12.

**Jackson, S. G., R. B. Goodbrand, R. Ahmed, S. Kasatiya 1995.** *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. Lett. Appl. Microbiol. 21:103-105.

**Johnson, K. M. 1984.** *Bacillus cereus* foodborne illness: an update. J. Food Protect. 47: 145-153.

**Kaneda, T. 1967.** Fatty acids in the genus *Bacillus*. 1. Iso- and anteiso-fatty acids as characteristic constituents of lipids of 10 species. J. Bacteriol. 93:894-903.

**Kaneda, T. 1968.** Fatty acids in the genus *Bacillus*. II. Similarity in the fatty acid composition of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. 95:22 10-22 16.

**Karam H, Z, et Karam, N, E 2006.** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie, Université d'Oran-Sénia, 31000, Oran, Algérie. Reçu le 07.02.05 et accepté pour publication le 31.08.05.

**Kalogridou D .V. 1992,**Journal of Dairy Science, Volume 75, Pages 2681-2686

**Knoess K.H., Makhudum A.J., Rafiq M. et Hafeez M., 1986,** Potentiel laitier de la chamelle. Revue mondiale de zootechnie, 57, 11-21.

**Kramer, I. M. et R. J. Gilbert. 1992.** *Bacillus cereus* gastroenteritis. In A. T. Tu (ed.). Handbook of Natural Toxins, Food Poisoning, vol.7, . Marcel Dekker Inc., New York.

**Kramer, J. M. et R. J. Gilbert. 1989.** *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: M. P. Doyles (ed.), Foodborne Bacterial Pathogens, pp.2 1-70. Marcel Dekker, New York.

**Lawrence, D., S. Heitefuss, et H. S. H. Seifert. 1991.** Differentiation of *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* by gas chromatographic whole-cell fatty acid analysis. J. Clin. Microbiol. 29(7): 1508- 15 12.

**Magnusson.M, Christiansson .A, Svensson. B. 2007.** Journal of Dairy Science, Volume90,Pages2745-2754

**Melling, J., B. J. Capel, P. C. B. Turnbull, et R. J. Gilbert. 1976.** Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*. J. Clin. Pathol. 29:938-940.

**Mikami, T., T. Horikawa, T. Murakami, N. Sato, Y. Ono, T. Matsumoto, A. Yarnakawa, S. Murayama, S. Katagiri, et M. Suzuki. 1995.** Examination of toxin production from environmental *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. J. Pharmaceutical Society of Japan. 1 15(9):742-748

**Overcast, W.W. et K. Atmaram. 1974.** The role of *Bacillus cereus* in sweet curdling of fluid milk. J. Milk Food Technol. 37:233-236.

**Raeuori, M., T. Kiutamo, et A. Niskanen. 1977.** Comparative studies of *Bacillus cereus* strains isolated from various foods and food poisoning outbreaks. Acta Vet. Scand. 18:397-407

**Ray, D. E. 1991.** Pesticides derived from plants and other organisms. in: W. J. Hayes and E. R. Laws (eds), Handbook of pesticide toxicology, vol. 2, pp. 585-627. San Diego: Academic Press.

**Ronner, U. et U. Husmark. 1992.** Adhesion of *Bacillus cereus* spores - a hazard to the dairy industry. In: L. F. Me10 et al. (ed.), Biofilms, pp.403-406. Science and Technology, Kluwer Academic publishers, The Netherlands

**Rusul, G. et N. H. Yaacob. 1995.** Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. Int. J. Food Microbiol. 25: 131-139.

**Shinagawa, K. et M. Suzuki. 1994.** An improved method for detecting cytostatic toxin (emetic toxin) of *Bacillus cereus* and its application to food samples. EMS Microbiol. Lett. 119:53-58.

**Shinagawa, K., Y. Ueno, D. L. Hu, S. Ueda, et S. Suggi. 1996.** Mouse lethal activity of a Hep-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. I. Vet. Med. Sci. 58(10): 1027-1029

**Sliman, R., Rehm, S., Shlaes, D. M. 1987.** Serious infection caused by *Bacillus cereus*. Medicine. 66: 218-223.

**Smith, N. R., Gordon R. E., et F. E. Clark. 1952.** Aerobic spore-forming bacteria US Dept. Agric. Monograph No. 16. The United States Dept of Agriculture, Washington, D. C.

**Somerville, H. J. et M. L. Jones. 1972.** DNA competition studies within the *Bacillus cereus* group of *Bacilli*. J. General. Microbiol. 73:257-265.

**Singh, A.K. G. Mehta et H.S. Chhatpar, 2009.** Optimization of medium constituents for improved chitinase production by *Paenibacillus* sp. D1 using statistical approach Letters in Applied Microbiology 49:708-714

**Sorokulova, I. B., Reva, O. N., Smirnov, V. V., Lapa, S. V. et Urdaci, M. C. 2003.** Genetic diversity and involvement in bread spoilage of *Bacillus* strains isolated from flour and rony bread. Letters in Applied Microbiology 37, 169-173.

**Stone, M. J. et A. Rowlands. 1952.** "Broken" or "bitty" cream in raw and pasteurized milk. *J. Dairy Res.* 195 1-62.

**Te Giffel, M. C., R. R. Beurrier, M. H. Bonestroo, et F. M. Rombouts. 1996.** incidence and characterization of *Bacillus cereus* in two dairy processing plants. *Neth. Milk Dairy J.* 50:479-492.

**Thompson, N. E., M. I. Ketterhagen, M. S. Bergdoll, E. J. Schantz. 1984.** Isolation and some of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *infect. immun.* 43:887-894.

**Thompson, J. M., Dodd, C. E. R. et Waites, W. M. 1993.** Spoilage of bread by *Bacillus*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 32, 55-66.

**Tumbull, P. C. B., J. Kramer, et J. Melling. 1990.** *Bacillus*. In: M. T. Parker and B. I. Duerden (eds.), *Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity*, 8th. ed., vol. 2, pp.188-210. Edward Arnold, London.

**Tumbull, P. C. B., et J. M. Kramer. 1991.** *Bacillus*. In: A. Balows, W- J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 5th., pp.296-303. American Society for microbiology. Washington, D.C

**Timmusk, S. 2003.** Mechanism of action of the plant growth promoting bacterium *Paenibacillus polymyxa*. In *Comprehensive summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology*, pp. 908. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis.

**Vaisiinen, O. M., N. J. Mwaishumo, et M. S. Salkionja-Saonen. 1991.** Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature, and fatty acid analysis. *J. Appl. Bacteriol.* 70:3 15-324.

**Van Netten, P., et J. M. Krarner. 1992.** Media for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 17:85-99.

**Wong, H. C., Chen, Y. L. et Chen, C. L. F. 1988a.** Growth, germination and toxigenic activity of *Bacillus cereus* in milk produces. *J. Food Protect.* 51(9):707-710.

**Wong, H. C., M. H. Chang, et J. Y. Fan. 1988b.** Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolated contaminating dairy products. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(3):699-702.

**Yagil R., 1982.** Camels and camel milk. F.A.O. Animal Production and Health Papers, 26, F.A.O., Roma, Italy.

**Yagil R. et Etzion Z., 1980.** The effect of draught conditions on the quality of camel milk. Journal of Dairy. Research, 47, 147-166.

**Yagil R., Saran A. et Etzion Z., 1984.** Camels milk: for drinking only? Comparative Biochemistry and Physiology, 78, 2, 263-266.

# ANNEXES

### **Compositions du milieu Muller Hinton**

- Beef infusion solides 2g/l
- Starch 1.5g/l
- Casein hydrosate 17.5g/l
- Agar 17g/l
- pH 7,3 à 25°C

### **Compositions du milieu gélose nutritive**

- extrait de viande 1,0g /l
- extrait de levure 2.5g /l
- peptone 5,0g /l
- chlorure de sodium 5,0g /l
- Agar 15,0g/l
- pH 7,0
- 

### **Compositions de milieu de BHI**

- Peptone de caséine 5g/l
- Peptone de viande 6g/l
- Infusion cervelle cœur 6g/l
- Extrait de levure 5g/l
- Dextrose 2g/l
- Chlorure de Sodium 5.5g/l
- Phosphate dipotassique 2.5g/l
- pH 7,4 +/- 0,2 à 25° C
- 

### **Compositions de milieu API50CHB (10ml)**

- Sulfate d'ammonium 2 g
- Extrait de levure 0,5 g
- Tryptone (origine bovine/porcine) 1 g
- Phosphate disodique 3,22 g
- Phosphate monopotassique 0,12 g
- Solution d'oligo-éléments 10 ml
- Rouge de phénol 0,17 g
- Eau déminéralisée 1000 ml
- pH 7,4-7,8 à 20-25°C

## Résumé :

Le lait de chamelle est l'un des alicaments moins étudiés sur le plan microbiologique surtout la flore sporulée qui peuvent persister après les traitements technologiques et causée des soucis pour les utilisateurs industriels et les consommateurs. La connaissance de la flore thermorésistante prédominante aide les acteurs de la filière dans la prise de décision pour éventuels scénarios. Dans ce contexte, ce travail vise à recenser et identifier la flore sporulée existante dans le lait de chamelle. Quatre échantillons différents de lait de chamelle ont été analysés au laboratoire. Le seuil de contamination est faible montré par un niveau de 20UFC/ml et 90UFC/ml pour le lait pasteurisé et cru respectivement. Les souches de *Bacillus* représentatives étaient isolées, purifiées puis identifiées à l'aide de galeries d'identification API50CH. Les résultats montrent la prédominance de *B.licheniformis* avec 50% de prévalence, *B.megaterium* (12.5%), *B.cereus* (12.5%), *Paenibacillus mecerans* (12.5%) et *B.lentus* (12.5%) avec un pourcentage de similitude de 98%.

**Mots-clés :** lait de chamelle, bacilles, isolement, identification, galerie API50CH.

## Abstract:

The camel milk is one of the alicaments less studied on the microbiological level especially the sporulated flora which can persist after the technological treatments and caused troubles for the industrial users and the consumers. The knowledge of the prevalent heat-resisting flora helps the actors of the sectors in the making of decision for possible scenarios. In this context, this work is to count and identify the existing flora sporulated in the milk of camel. 4 samples different of camel milk were analyzed at the laboratory. The threshold of contamination weak is shown by a level of 20UFC/ml and 90UFC/ml for pasteurized milk and raw respectively. The representative strains of *Bacillus* were isolated, purified then identified using API50CH identification kits. The results show the prevalence of *B.licheniformis* with 50% of prévalence, *B.megaterium* (12.5%), *B.cereus* (12.5%), *Paenibacillus mecerans* (12.5%) and *B.lentus* (12.5%) with a percentage of similarity of 98%.

**Key words:** camel milk, bacilli, insulation, identification, gallery API50CH.

## ملخص :

حليب النوق هو أحد الأغذية المعالجة الأقل دراسة على المستوى الميكروبيولوجي. خاصة أبواغ البكتيريا التي قد تستمر بعد المعالجة التكنولوجية وتسبب قلقا للمستخدمين الصناعيين والمستهلكين. دراسة هذه البكتيريا المقاومة للحرارة تساعد المستخدمين في مجال الصناعة في صنع القرار بالنسبة للسيئاريوهات المحتملة في هذا السياق، وهذا العمل يهدف إلى عزل والتعرف على أبواغ البكتيريا الموجودة في حليب النوق. وقد تم تحليل اربع عينات مختلفة من حليب النوق في المختبر. وجدنا نسبة التلوث على مستوى منخفض وتقدر بـ 20UFC/ml و 90UFC/ml عن الحليب الطازج و الميبستر على التوالي. تم عزل سلالات من البكتيريا العصوية، وحددت هويتها باستخدام صفائح API50CH و أظهرت النتائج أن غالبيتها (*B.licheniformis*(50%) و (*B.megaterium*(12.5%) (*Paenibacillus*(12.5%) (*B.cereus* (12.5%) و (*mecerans* (12,5) و (*B.lentus* مع نسبة التشابه من 98%.

**الكلمات الدالة:** حليب الناقة، العصوية، أبواغ، العزل، تحديد الصنف، صفيحة API50CH