

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire de fin d'études

*En vue de l'obtention du diplôme de **Master II***

Filière : Sciences de la nature et de la vie

Option : Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Thème

**Etude de risque potentiel des bactéries de groupe *Bacillus cereus*
dans certains produits alimentaires traditionnels**

Présenté par :

- Melle. BEHAT Leila
- Melle. MAATIAT Fatima

Soutenue publiquement le 29/06/2024 devant les membres de jury :

Mr. DJEBLI Ahmed	MAA	Président
Mr. CHETATHA Mohamed	MAA	Examineur
Mr. MADOURI Redouane	MAA	Promoteur

Année universitaire 2023-2024

Dédicace

*Avant tous, je commence par exprimer ma gratitude envers
Dieu pour m'avoir guidé à travers ce chemin*

Je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers

À mon cher père et ma chère mère

*Je remercie du fond du cœur pour leur amour inconditionnel
et leur soutien constant, leur présence et leurs
encouragements ont été une source de force pour moi*

À mon frère Mohammed el-amine

*Son soutien indéfectible et son précieuse assistance tout au
long de mes études méritent une mention spéciale.*

À mes sœurs, Nouzha, Imene et Mouna

*Leur présence a illuminé ma vie de manière unique et
précieuse*

*À mon choix idéal, ma partenaire de travail **Maatiat fatima**,
c'était merveilleux de travailler avec toi.*

À mes amies Safa, Riham, Dounia, Imane

Pour leur soutien sans faille et leurs mots d'encouragement

Leila

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents, à mon père qui a fait de moi la meilleure version de moi-même et qui a toujours rêvé de me voir diplômée. Je suis fière d'être ta fille.

*À ma tante **Mahjoubah** qui a marché avec moi mes premiers pas vers le succès, tu es la bonté, tu es tout.*

*À mes sœurs **Soumia et Salima**, et à mes frères **Noureddine et Mohamed**.*

À ma famille qui m'a façonnée, a illuminé mes jours, et a été mon soutien.

*À la personne qui a été ma deuxième famille, à mon amie **Reggab Amel**, je n'oublierai jamais ta générosité tant que je vivrai.*

*À mon choix idéal, ma partenaire de travail **Behat Leila**, c'était merveilleux de travailler avec toi.*

*À mes amies qui ont été mon soutien, je vous souhaite un avenir radieux : **Riham, Fatna, Dounia zed, Soundous, Safa, Rima**.*

*À ceux avec qui la distance n'a pas été un obstacle entre nous, je vous remercie pour l'amour que vous m'avez donné : **Mihoubi Hiba, Arabaoui Kouthar, Kadri Imane**.*

À tous ceux que je porte dans mon cœur, un grand merci à vous.

Fatima

Remerciement

Comme un tel travail ne s'effectue jamais seul, nous aimerions au début remercier par ces quelques mots tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à le rendre possible et nous ont aidé à le réaliser.

*On exprime tout d'abord nos profonds remerciements à notre encadreur, **Mr. Madouri Redouane**, pour l'honneur qu'elle nous a fait en nous encadrant, pour son soutien, son attention, ses précieux conseils, ainsi que pour ses qualités humaines. Nous tenons à lui exprimer toute notre gratitude.*

*Nos sincères remerciements vont également au président du jury, **Mr. DJEBLI Ahmed**, ainsi qu'à l'examineur, **Mr. CHETATHA Mohamed** pour avoir pris le temps d'évaluer notre travail avec attention et pour leurs conseils précieux. Nous sommes reconnaissants qu'ils aient accepté cette tâche et partagé leur expertise avec nous.*

*Nous n'oublions pas non plus de témoigner notre profonde gratitude à tous les enseignants qui nous ont accompagnés au cours de ces cinq années d'études à **l'Université Amar Tleligi** pour leur générosité et la grande patience dont ils ont fait preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.*

Tables de Matière

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Chapitre I : synthèses bibliographiques.

1 Les toxi-infections alimentaires collectives 17

1.2 Les toxi-infections alimentaires collectives en Algérie 17

1.3 Les toxi-infections alimentaires collectives à Laghouat 17

1.4 Germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires collectives 18

2 *Bacillus cereus* 19

2.1 Historique de *Bacillus cereus* 19

2.2 Description et quelques caractéristiques du groupe *Bacillus cereus*..... 19

2.2.1 Morphologie de *Bacillus cereus* 20

2.2.2 Classification de *Bacillus cereus*..... 20

2.3 Caractéristiques de la spore de *Bacillus cereus* 21

2.3.1 La sporulation..... 21

2.3.2 Thermorésistante des spores de *Bacillus cereus* 22

2.4 Infections à *Bacillus cereus* 22

2.4.1 Le syndrome émétique 22

2.4.2 Le syndrome diarrhéique : 22

Chapitre II: Matériels et Méthodes

1.Etude de la prévalence de *Bacillus cereus* dans certains produits alimentaires

traditionnels 27

1.1.Description de la région d'échantillonnage 27

2. Prélèvement et transport des échantillons **Erreur ! Signet non défini.**

2.1. Isolement et dénombrement des *B. cereus* **Erreur ! Signet non défini.**

2.2. Milieu de culture 29

3 Confirmation de l'appartenance des souches au groupe *B. cereus* 31

3.1	Les examens microscopiques	31
3.2	Tests biochimiques supplémentaires	32
4	Etude de la température de croissance des isolats obtenus	32

Chapitre III: Résultats et Discussions

1	Résultats de l'étude de la prévalence de <i>Bacillus cereus</i> dans certains aliments traditionnels	34
1.1	Résultats de recherche et dénombrement de <i>Bacillus cereus</i> :.....	34
1.2	Caractérisation et confirmation de l'appartenance des isolats au groupe <i>B. cereus</i> .	39
1.2.1	Resultats de l'étude de la température de croissance des isolats obtenus:	42

Conclusion

Référence bibliographique

Annexe

Liste des tableaux

Tableau 1: Description des agents bactériens responsables de TIAC. (Anses, 2017), (Denayer et al., 2013), (Sciensano, 2023).	18
Tableau 2: Sept groupes phylogénétiques de <i>Bacillus cereus</i> (Guinebertière et al., 2008)	21
Tableau 3: Nombre et répartition des échantillons prélevés dans chaque commune.....	28
Tableau 4: Températures et périodes d’incubation des isolates obtenus.	32
Tableau 5: la prévalence de <i>Bacillus cereus</i> dans les aliments traditionnels testés.....	34
Tableau 6: Taux de contamination de <i>B. cereus</i> dans divers types d’aliments traditionnels (CS: Couscous/ MD: Mardoude/ HM: Hermas/ RN:Rouina).	38
Tableau 7: Resultats des tests de confirmations (Cs: couscous / MD: Mardoude /RN: Rouina/ HM: Hermas).	40
Tableau 8: Resultats de la température de croissance. (Cs: Couscous / MD: Mardoude /RN: Rouina/ HM: Hermas).	43

Liste des figures

Figure 1: Image de microscopie électronique à balayage des cellules de <i>B. cereus</i> . (Ramarao, 2020).....	20
Figure 2: Description des 2 principaux syndromes présents lors d'intoxication alimentaire liée au groupe <i>B. cereus</i> . (Hachfi., 2022).....	23
Figure 3: Carte de surface représente les points des prélèvements des échantillons (Google Earth).	27
Figure 4: les Echantillons prélevés. (A : Mardoude/B: Rouina/C: Hermas/ D : Couscous)..	29
Figure 5: Préparation des dilutions décimales et d'ensemencement du milieu Mossel complet.	30
Figure 6: Coloration du Gram des isolats obtenus.	31
Figure 7: Les échantillons des résultats positifs (A:CS,ASF /B:RN,HR/C:MD,SB).....	34
Figure 8: La Prévalence des cellules de <i>Bacillus cereus</i> dans les aliments testés (%).	37
Figure 9: observations microscopique (×100) d'isolat ASF, HM (A: à l'état frais, B: Au Bleu de méthylène, C:Coloration de Gram).	41
Figure 10: Résultats du test à hémolyse. (A: TJ, HM; B: SB, RN; C: SB, MD).	42

Liste des abréviations

AFNOR : Association française de normalisation.

A_w : Activity water.

BHIB : Bouillon cœur-cervelle. (Brain heart infusion broth).

CYTK: Cytotoxin K.

DSP : Direction de la santé et de la population.

EPS : Eau physiologique stérile.

EPT : Eau peptone tamponne.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

GN : Gélose nutritif.

HBL : Hemolysin BL.

INSP : Institut National de Santé Publique Algérien.

ISO : Organisation internationale de normalisation.

MDO : Les maladies à déclaration obligatoire.

MYP : Mannitol Jaune d'œuf polymyxine.

NHE : Non Hemolitique Enterotoxin.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

TIAC : Toxi-infection alimentaire collective.

ملخص

تعتبر بكتيريا *Bacillus cereus* واسعة الانتشار في الطبيعة والأطعمة، ومعروفة بتسببها في حالات التسمم الغذائي، وخاصة متلازمة القيء ومتلازمة الإسهال. في دراسة تهدف إلى تقييم تلوث الأطعمة التقليدية الأكثر استهلاكًا والمحضرة منزليًا في الأغواط والمناطق المحيطة بها، تم فحص عدة أطعمة تقليدية مثل الهرماس، الروينة، المردود والكسكس، وتم عزل بعض العينات للكشف عن وجود بكتيريا *Bacillus cereus*. أظهرت نتائج العزل والعد أن 63.33%، أي 38 عينة، كانت إيجابية بالفعل، مع معدل 86% في الهرماس، و66.6% في المردود، تليها الروينة بنسبة 60%، وأخيرًا 40% في الكسكس. بينما تجاوز معدل التلوث في العينات الحد الأقصى وهو 10^4 CFU/g بنسبة 33.66%، حيث تم تسجيل أعلى قيمة في الهرماس بمعدل 3×10^8 CFU/g، مع تسجيل معدلات عالية أيضًا في المردود، الهرماس والروينة.

أظهرت نتائج دراسة درجات حرارة النمو نتائج إيجابية في غالبية العينات، حيث شكلت نطاقًا واسعًا من النمو يتراوح بين 6 درجات مئوية و45 درجة مئوية. يُعتبر هذا جانبًا مثيرًا للقلق، خاصة بالنسبة للعزلات التي لديها القدرة على النمو عند 6 درجات مئوية، مما يهدد صحة المستهلك. وفقًا للاختبارات التي أُجريت، تم التأكيد على أن معظم العزلات تنتمي إلى مجموعة *B. cereus*. تؤكد النتائج التي تم الحصول عليها أن هناك خطرًا كبيرًا من التعرض لـ *B. cereus*، التي يمكن أن تسبب العديد من المشاكل الصحية للمستهلكين بمرور الوقت بسبب سمية هذه البكتيريا.

الكلمات المفتاحية: الأطعمة التقليدية، الأغواط، التسممات الغذائية الجماعية، *Bacillus cereus*.

Résumé

Bacillus cereus est une bactérie largement répandue dans la nature et les aliments, connue pour causer des toxi-infections alimentaires collectives, notamment le syndrome de vomissements et le syndrome de diarrhée. Dans une étude visant à évaluer la contamination des aliments traditionnels préparés à domicile les plus consommés à Laghouat et ses environs, plusieurs aliments traditionnels telles que le hermas, le rouina, le mardoude et le couscous ont été examinées et certains échantillons ont été isolés pour détecter la présence de *Bacillus cereus*.

Les résultats d'isolement et du dénombrement de *Bacillus Cereus* ont montré que 63,33 %, soit 38 échantillons, étaient effectivement positifs, avec un taux de 86 % dans le hermas, 66,6 % dans le mardoude, suivi du rouina à 60 % et enfin 40 % dans le couscous. Alors que le taux de contamination dans les échantillons dépassant la seuil de 10^4 ufc/g 33,66%, avec la valeur la plus élevée enregistrée à Hermas à un taux de 3×10^8 ufc/g, avec des taux élevés également enregistrée répartis sur le Mardoude Hermas et Rouina.

Les résultats de l'étude des températures de croissance ont montré des résultats positifs dans la majorité des échantillons, car ils formaient une large plage de croissance allant de 6°C à 45°C. Ceci est considéré comme un aspect préoccupant, en particulier pour les isolats ayant la capacité de se développer à 6°C, ce qui constitue un risque sur la santé du consommateur.

Selon les tests effectués, il a été confirmé que la plupart des isolats appartiennent au groupe *B. Cereus*. Les résultats obtenus confirment qu'il existe un risque élevé d'exposition aux germes de *B. Cereus*, qui peuvent causer de nombreux problèmes de santé au consommateur avec le temps en raison de la toxicité de ces bactéries.

Les mots clé : Les aliments traditionnels, Laghouat, TIAC, *Bacillus cereus*.

Abstract

Bacillus cereus is a widely distributed bacterium in nature and food, known for causing foodborne illness outbreaks, notably the vomiting syndrome and diarrhea syndrome. In a study aimed at evaluating the contamination of the most consumed traditional homemade foods in Laghouat and its surroundings, several traditional foods such as hermas, rouina, mardoude, and couscous were examined, and some samples were isolated to detect the presence of *Bacillus cereus*. The results of the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* showed that 63.33%, or 38 samples, were indeed positive, with a rate of 86% in hermas, 66.6% in mardoude, followed by rouina at 60%, and finally 40% in couscous. Meanwhile, the contamination rate in samples exceeding the threshold of 10^4 CFU/g was 33.66%, with the highest value recorded in hermas at a rate of 3×10^8 CFU/g, with high rates also recorded across mardoude, hermas, and rouina.

The results of the study on growth temperatures showed positive results in the majority of samples, as they exhibited a wide growth range from 6°C to 45°C. This is considered a concerning aspect, particularly for isolates capable of growing at 6°C, indicating that they can grow at low refrigerator temperatures, posing a threat to consumer health. According to the tests conducted, it was confirmed that most isolates belong to the *B. cereus* group. The results obtained confirm that there is a high risk of exposure to *B. cereus* germs, which can cause numerous health problems for consumers over time due to the toxicity of these bacteria.

Keywords: Traditional foods, Laghouat, TIAC, *Bacillus cereus*.

***INTRODUCTION
GENERALE***

La santé publique et le développement économique font face à un défi majeur en raison des maladies liées à l'alimentation (**Oliveira et al., 2020**). Parmi ces maladies, nous évoquons les TIAC.

Les cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont connu une augmentation significative au cours des dernières années. Selon l'institut national de la santé publique de l'Algérie, cette augmentation ne semble pas être due à la détérioration de la santé, mais plutôt à la performance et à l'amélioration continue des systèmes de surveillance et/ou des procédures de suivi. Ce progrès du système de surveillance a également été mentionné dans le rapport de la **FAO (2005)**. De plus, même si l'Algérie a fourni des efforts dans ce contexte, le taux réel des TIAC est plus élevé que celui annoncé par les autorités compétentes.

D'après l'Organisation mondiale de la Santé (**OMS**), les maladies gastro-intestinales provoquées par les bactéries, les virus et les parasites contenus dans les aliments entraînent plus de 420 000 décès en 2018 annuellement à l'échelle mondiale.

En France, on considère que *Bacillus cereus*, une bactérie ubiquitaire sporulé, est le troisième agent impliqué dans les TIAC (**Cadel, 2012**), 25% des cas signalés à *Bacillus cereus* étaient liés à la consommation de semoule et de couscous. Il s'agit peut-être d'un taux insignifiant dans un pays où la semoule de couscous n'est pas toujours consommée, contrairement à un pays où le couscous est largement consommé, comme l'Algérie, où le taux de TIAC dû à ce pathogène devrait être très élevé dans le pays (**Ziane, 2015**).

Le couscous vient en tête des aliments traditionnels les plus consommés par la famille algérienne (**Doukani, 2015**), ainsi que d'autres aliments traditionnels tels que la mardoude (un aliment similaire au couscous, mais ses grains sont généralement plus gros que les grains de couscous), la rouina (grains de blé torréfiés en poudre) et l'Herma (abricots secs). Ils ne sont pas seulement des aliments, mais sont considérés comme faisant partie de la vie quotidienne de la famille algérienne. Et la poursuite de l'utilisation de ces aliments traditionnels suscite des inquiétudes quant à leur qualité et à leur sécurité alimentaire, ce qui pourrait être à l'origine de la présence de certaines bactéries responsables de TIAC en Algérie.

La germination des spores de *Bacillus Cereus* se produit lorsque les conditions environnementales sont favorables (**Banwart, 1989**). Deux syndromes d'intoxication alimentaire différents sont causés par cette bactérie, avec respectivement la diarrhée et les vomissements (**Eley, 1992**).

Dans la problématique qui se pose :

Est-ce-que ces aliments traditionnels contiennent des bactéries pathogènes de groupe *Bacillus cereus* ayant des concentrations susceptibles de poser un risque d'être inappropriées pour la consommation humaine ?

L'objectif de cette étude vise à :

- Déterminer le niveau de contamination par le *Bacillus cereus* de certains aliments traditionnels préparée à la maison dans la wilaya de Laghouat et ses environs.
- caractériser les isolats obtenus.
- Etudier la température de croissance des isolats obtenus.

Pour la présentation de notre travail, nous avons opté pour le plan suivant : en commençant par une introduction générale, suivie par rappels bibliographiques comprenant les toxi-infections alimentaires collectives et leurs causes. Ensuite, nous avons présenté les matériels et les méthodes ainsi que la discussion des résultats obtenus et en fin nous clôturons ce manuscrit par une conclusion générale et perspective.

Chapitre I : Introduction
Bibliographique

1. Les toxi-infections alimentaires collectives

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) constituent un problème de santé publique, probablement sous-estimé en raison de la faible déclaration des cas. Ils peuvent survenir en repas collectifs ou en milieu familial (**Lezzar *et al.*, 2019**).

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont des accidents aigus d'intoxication consécutifs à l'ingestion d'aliments contaminés par des bactéries ou par leurs toxines. Un foyer de TIAC est défini par l'apparition d'au moins deux cas groupés d'une symptomatologie similaire, en générale digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (**Buisson &Teyssou, 2002**).

1.2 Les toxi-infections alimentaires collectives en Algérie

En Algérie, l'intoxication alimentaire est inscrite sur la liste des maladies à déclaration obligatoire (**MDO**) (arrêté ministériel du 17 novembre 1990) et fait l'objet d'une décision du ministère de la Santé, qui traduit la volonté de l'État de contrôler les données sur cette maladie afin de réduire davantage ses méfaits (**Ziane, 2015**).

Ces dernières années, notamment en 2021/2022, l'incidence des maladies d'origine alimentaire a considérablement augmenté, passant de 6,99 à 10,90 cas pour 100.000 habitants (**INSP, 2021**). Et de 10,90 à 12,73 cas pour 100.000 habitants (**INSP, 2022**).

1.3 Les toxi-infections alimentaires collectives à Laghouat

La situation épidémiologique des toxi-infections alimentaires collectives des années 2021, 2022,2023 dans la région de Laghouat selon la direction de la santé et de la Population de Laghouat, montre que les différentes communes de la région de Laghouat, Ont été touchées par les TIAC. Les nombres des cas élevés ont été enregistrés pendant cette durée, 150 cas et 47 cas à Laghouat 2021,2023 et 12 cas à Aflou en 2022. Les aliments incriminés sont : poulet/viande haché /lait de vache frais. le manque d'hygiène de l'aliment incriminé est la circonstance d'apparition majeure des TIAC dans les différentes communes de la région de Laghouat. (**DSP, 2021 ; 2022 ; 2023**).

1.3.1 Germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires collectives

Différentes bactéries et/ou leurs toxines jouent un rôle dans les toxi-infections alimentaires, en particulier les bactéries qui produisent des toxines, qu'elles soient végétatives ou sporulées. Les bactéries sporulées sont plus résistantes lorsqu'elles sont transformées dans des conditions hostiles. Elles peuvent donc être responsables des TIAC associés à des produits considérés comme sûrs par les consommateurs et présentant peu de risques pour la santé. (Ziane, 2015).

Tableau 1: Description des agents bactériens responsables de TIAC. (Anses, 2017), (Denayer *et al.*, 2013), (Sciensano, 2023).

Germe	Symptômes	Incubation	Sources (aliments à risque)	Production de toxines
<i>Campylobacter jejuni et coli</i>	Nausées, crampes abdominales, diarrhée, fièvre, douleurs musculaires.	De 1 à 10 jours	Volaille, viande de bœuf peu ou insuffisamment cuites, Lait cru.	+
<i>E. coli producteur de Shiga-toxines (STEC)</i>	Diarrhée sanguinolente accompagnée de crampes abdominales sévères. Fièvre.	De 1 à 10 jours	Haché de bœuf insuffisamment Cuit, Fruits et légumes crus.	+
Autres <i>E. coli</i> pathogènes	Crampes d'estomac, diarrhée, vomissements, fièvre < 38,5°.	De quelques heures à plusieurs jours.	Haché de bœuf insuffisamment cuit, Fruits et légumes crus, Lait cru.	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	Diarrhée, douleurs Abdominales, septicémie,	Forme légère : 6h à 10 jours Forme invasive : 2 à 70 jours.	Fromage + saumon fumé, charcuterie crèmes glacées.	+
<i>Salmonella</i>	Diarrhée, fièvre élevée, Crampe abdominale, vomissements, maux de tête	3 à 7 jours.	Œufs et préparations à base d'œufs.	+
<i>Shigella</i>	Diarrhée sanguinolente, fièvre, nausées, vomissements, douleurs abdominales	1 à 7 jours	Tout produit de consommation manipulée par l'homme.	+
<i>Vibrio cholerae</i>	Diarrhées légères à modérées, nausées, vomissements	1 à 5 jours	ingestion d'aliments insuffisamment cuits, fruits de mer.	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Diarrhée aqueuse ou mucopurulente parfois accompagnée de fièvre, vomissements,	3 à 7 jours.	Aliments peu ou mal cuits (mouton), Produits laitiers contaminés.	+

<i>Bacillus cereus</i>	Forme émétique : nausées et vomissements. Forme diarrhéique : Diarrhées, crampes abdominales parfois, Vomissement.	Emétique : de 1 à 5 h (toxine préformée dans l'aliment) ; Diarrhéique : de 8 à 16 h.	Emétique : Céréales, riz, pate alimentaires, Diarrhéique : produits laitiers, légumes, viandes.	+
<i>Clostridium botulinum</i>	Nausées, vomissement, Douleur abdominale, paralysie des muscles.	2 h à 8 jours.	Conserves familiales mal stérilisés.	+
<i>Clostridium perfringens</i>	Crampes abdominales. Sans vomissement ni fièvre. Nausée.	8 à 24 h	Aliments refroidis trop lentement, plats préparés principalement à base de viande.	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nausées, vomissement, douleurs abdominales, Crampes et diarrhée	30 minutes à 8 heures.	pâtisseries, plats préparés, salades composées.	+

2. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est un agent majeur de maladies d'origine alimentaire, plusieurs pays signalant des épidémies de maladies d'origine alimentaire associées à *B. cereus*. (**Gdoura et al., 2019**).

2.1 Historique de *Bacillus cereus*

En 1887, un couple anglais de la « Royal School of Mines », Grace et Percy Frankland, enregistraient les différentes bactéries présentes dans l'air d'une étable au Royaume-Uni sur des boîtes de Pétri. Une souche de *Bacillus cereus* a été isolée pour la première fois dans cette étude. On a donné le nom de cette souche à l'ATCC 14579 et elle demeure encore aujourd'hui une souche de référence (**Frankland & Frankland, 1887**).

2.2 Description et quelques caractéristiques du groupe *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est une bactérie ubiquitaire formant des endospores qui s'adapte à des environnements très différents. (**Guinebertière, 2008**). Elle est largement répandue dans la nature et souvent isolée du sol, (**Drobniewski, 1993**), des poussières ou des surfaces végétatives, ce qui favorise sa propagation dans les aliments (**Kotiranta et al., 2000**).

2.2.1. Morphologie de *Bacillus cereus*

C'est un bacille de grande taille ($>1.0\ \mu\text{m}$) à Gram-positif, aérobie-anaérobie facultative, mobile à la présence de flagelles péritriches (Drobniewski, 1993). Les spores de *B. cereus* se trouvent en position centrale ou subterminale, avec une seule spore par cellule (Kramer & Gilbert, 1989). La température de croissance varie de 5 à 50°C (Guinebertière *et al.*, 2008).

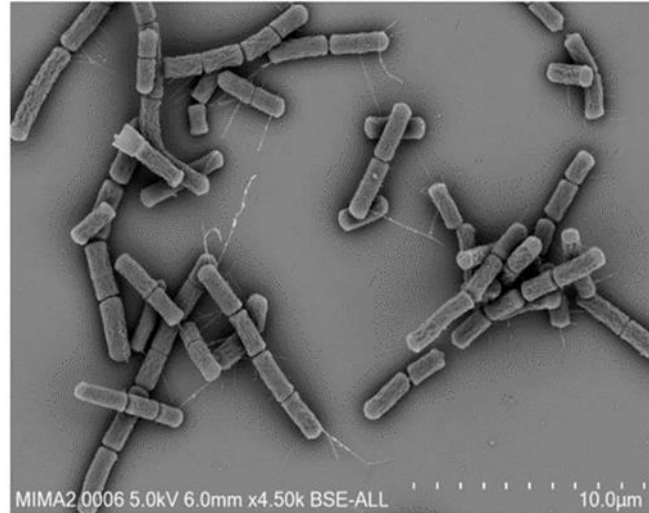


Figure 1: Image de microscopie électronique à balayage des cellules de *B. cereus*. (Ramarao, 2020).

2.2.2. Classification de *Bacillus cereus*

Le groupe *B. cereus*, ou *Bacillus cereus sensu lato*, est un terme informel mais couramment utilisé pour désigner une sous-section génétiquement très homogène du genre *Bacillus*, qui comprend sept espèces connues : *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* et *Bacillus weihenstephanensis* (Frankland & Frankland, 1887). Ainsi que la nouvelle espèce *Bacillus cytotoxicus* (Fagerlund *et al.*, 2007), (Auger *et al.*, 2008), (Lapidus *et al.*, 2008).

En 2008, il a été suggéré de diviser le groupe *B. cereus* en sept groupes phylogénétiques, qui se distinguent par des domaines de températures. (Guinebertière *et al.*, 2008).

Tableau 2: Sept groupes phylogénétiques de *Bacillus cereus* (Guinebertière *et al.*, 2008).

Groupes	Espèces	Température de croissance	Thermo résistance	Association avec des TIAC
I	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	10-40	Non déterminé	Non
II	<i>B. cereus II</i> <i>B.thuringiensis II</i>	7-40	++	Oui
III	Souche émétique <i>B. cereus III</i> <i>B.thuringiensis III</i> <i>B. anthracis</i>	15-45	+++	Oui
IV	<i>B. cereus IV</i> <i>B.thuringiensis IV</i>	10-45	++	Oui
V	<i>B. cereus V</i> <i>B.thuringiensis V</i>	8-40	++	Oui
VI	<i>B.weihenstephanensis</i> <i>B.mycoides</i> <i>B.thuringiensis VI</i>	5-37	+	Non
VII	<i>B.cytotoxicus</i>	20-50	+++	Oui

2.3.Caractéristiques de la spore de *Bacillus cereus*

2.3.1. La sporulation

La plupart des espèces de *B. cereus* ont un cycle de vie qui se divise en deux phases : d'une part la division des cellules bactériennes et d'autre part la formation de la spore. (La forme végétative / forme sporulé). (Hachfi, 2022).

La forme végétative et la reproduction ultérieure provoquent l'intoxication alimentaire. (Albaridi, 2022). Qui peut être éliminé principalement par un traitement thermique doux, (Jess berger *et al.*, 2020). Car les structures végétatives de *B. cereus* sont sensibles aux stress environnementaux tels que la chaleur, les produits chimiques ou les radiations (Gharibet *et*

al., 2020). Contrairement aux spores bactériennes, qui sont des formes cellulaires hautement spécialisées et différenciées qui ont leur propre structure qui diffère considérablement de celle de la cellule végétative qui les produit (**Ben Amara & Bou djemaa, 2017**). Les spores de *Bacillus cereus* manquent d'activité métabolique et résistent aux conditions environnementales extrêmes telles que températures, congélation, séchage et rayonnement (**Strom et al., 2023**).

2.3.2. Thermorésistante des spores de *Bacillus cereus*

La thermorésistance de la spore est l'une des principales propriétés de *Bacillus cereus*, elle varie selon les espèces et peut dans certains cas permettre la survie après 10 min à 120°C. Les spores sont également plus résistantes aux radiations, au pH, aux rayonnements et d'autres facteurs environnementaux. (**Sagripanti et al., 2006**), (**Henrique & Moran, 2007**).

2.4. Infections à *Bacillus cereus*

Trois catégories d'infections à *B. cereus* peuvent être distinguées, dont les plus importantes sont les infections gastro-intestinales.

Les infections gastro-intestinales surviennent dans le contexte d'une intoxication alimentaire grave, qui se manifeste par deux types de syndromes : le syndrome des vomissements (émétique) et le syndrome de la diarrhée (**Teyssou et al., 1998**).

2.4.1. Le syndrome émétique

Est causé par une ingestion d'une substance toxique appelée céréulide Préformée dans l'aliment avant ingestion. Ce syndrome se manifeste principalement pendant une période de 6 à 24 heures et se manifeste dès la première demi-heure et jusqu'aux 6 heures suivant l'ingestion de l'aliment contaminé. (**Dierick et al., 2005**), (**Mahler et al., 1997**), (**Teyssou et al., 1998**).

2.4.2. Le syndrome diarrhéique :

Dans l'intestin, des toxines sont synthétisées (Entérotoxines). Les premiers signes ne surviennent généralement qu'au-delà de 6 heures après l'ingestion, pour une durée de 12 à 24 heures. (**Ceuppens et al., 2011**), (**Stenfors et al., 2008**).

Les Entérotoxines qui sont reconnues comme responsables du syndrome diarrhéique sont l'hémolysine BL (**HBL**) l'Entérotoxine non hémolytique (**NHE**), la cytotoxine K (**CytK**) et l'Entérotoxine T (**BceT**) (**Agata et al., 1995**), (**Hwang & Park, 2010**), (**Zhang et al., 2015**).

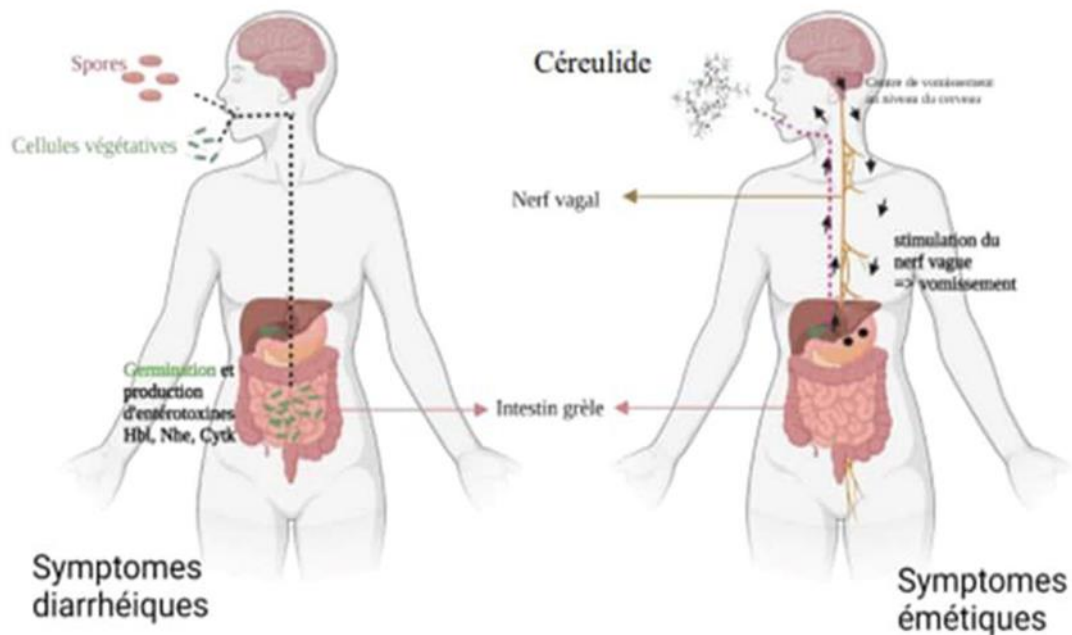


Figure 2: Description des 2 principaux syndromes présents lors d'intoxication alimentaire liée au groupe *B. cereus*. (Hachfi., 2022).

2.4.2.1. L'hémolysine BL (HBL)

L'Entérotoxines HBL est une toxine hémolytique, cytotoxique, dermonécrotique et elle entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire (Beecher & Wong, 1997). Il s'agit de trois sous-unités constituent un complexe protéique, dont deux composants lytiques, L2 et L1, codés respectivement par les gènes hblC et hblD, et la protéine de liaison B, codée par le gène hblA (Franziska *et al.*, 2021).

2.4.2.2. L'Entérotoxines non hémolytique (NHE)

NHE se compose de trois protéines distinctes : NheA, NheB et NheC. Ces trois composants travaillent ensemble pour induire son effet toxique. Le NHE est associé à des maladies d'origine alimentaire caractérisée par des symptômes de diarrhée. Contrairement à d'autres toxines, le NHE n'a aucune activité hémolytique (Lindbačck *et al.*, 2004).

2.4.2.3. Cytotoxine K (CytK)

La Cytotoxine-K est une toxine poreuse qui peut créer de petits trous dans les membranes cellulaires, entraînant la mort cellulaire. Elle a été démontrée comme étant capable de causer Des dommages aux cellules épithéliales intestinales, ce qui suggère son rôle

potentiel dans la pathogénèse des infections à *Bacillus cereus* chez l'homme. (**Gdoura et al., 2019**).

Etude Expérimentale

*Chapitre II : Matériels et
Méthodes*

Cette étude a été réalisée entre février, et mai 2024.dans Le laboratoire pédagogique de microbiologie du Département de Biologie de l'Université de Laghouat.

1 Etude de la prévalence de *Bacillus cereus* dans certains produits alimentaires traditionnels

1.1. Description de la région d'échantillonnage

La région de Laghouat est située au sud de l'Algérie, à 400 km d'Alger. Sa superficie est de 25 052 km².

Sa population est de 520 188 personnes. Son climat est continental au nord-ouest, la quantité de précipitations varie de 300 à 400 mm. Au centre et au sud de la région, le climat est désertique et sec (précipitations moyennes de 150 mm). L'hiver est caractérisé par du gel blanc et l'été par de la chaleur et des tempêtes de sable (Andi, 2013).

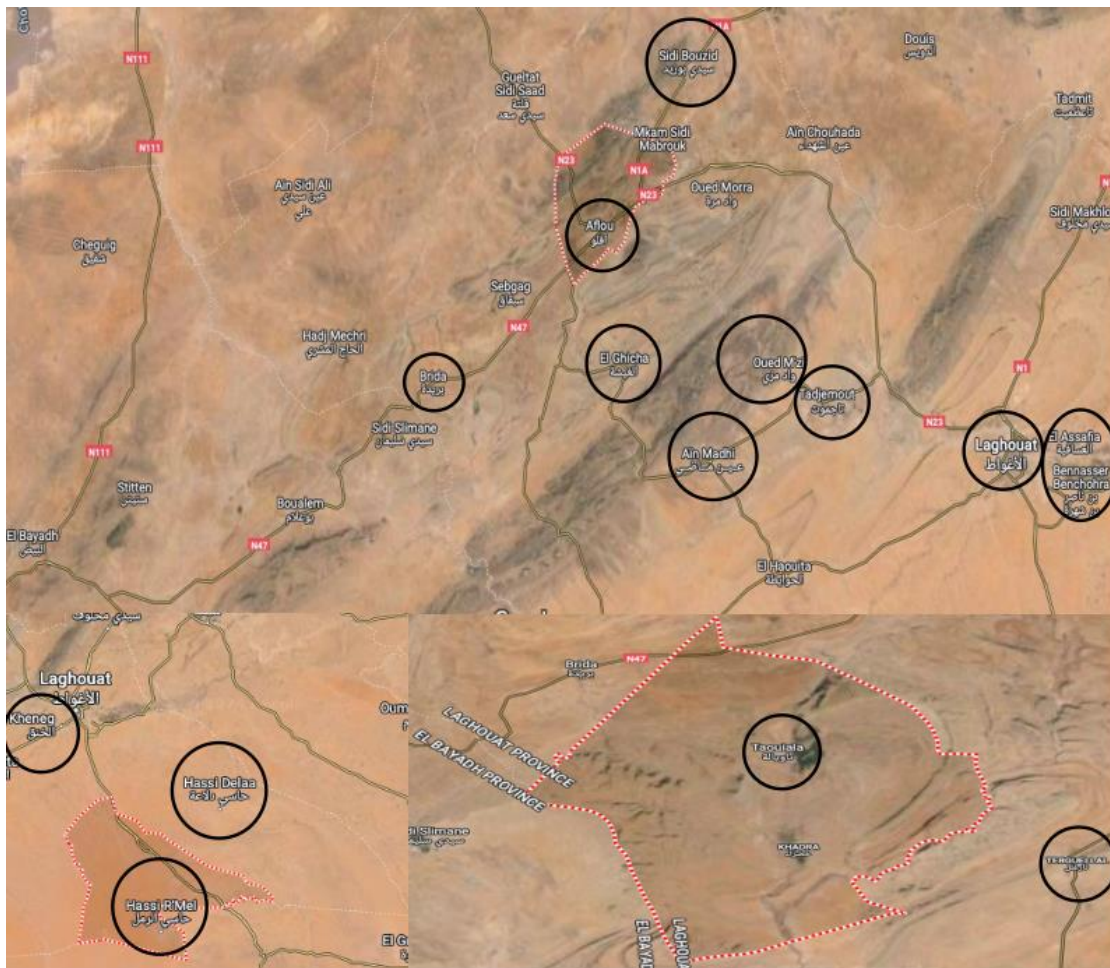


Figure 3: Carte de surface représente les points des prélèvements des échantillons (Google Earth).

2. Prélèvement et transport des échantillons :

La recherche de *Bacillus cereus* dans différents types d'aliments traditionnels de la région de Laghouat a été menée selon les étapes suivantes :

60 échantillons de Hermas, Mardoude, Couscous et Rouina ont été prélevés auprès d'habitants de différentes régions de la wilaya de Laghouat.

Ces derniers avaient la liberté de collecter les échantillons, la plupart ayant été apportés dans des sacs en plastique. Puis transférés directement au laboratoire pour l'analyse.

Tableau 3: Nombre et répartition des échantillons prélevés dans chaque commune.

Endroit / Type d'aliments	Couscous	Rouina	Hermas	Mardoude
Laghouat	1	1	1	1
Lkhneg	1	1	1	1
El Assafia	1	1	1	1
Ain madhi	1	1	1	1
Hassi R'mel	1	1	1	1
Hassi Delaa	1	1	1	1
Brida	1	1	1	1
Sidi Bouzid	1	1	1	1
Tedjmout	1	1	1	1
Aflou	1	1	1	1
Tarkalel	1	1	1	1
Taouiala	1	1	1	1
Oued m'Zi	1	1	1	1
El Ghaicha	1	1	1	1
B-B-Chohra	1	1	1	1
Total	60			



Figure 4: les Echantillons prélevés. (A : Mardoude/B: Rouina/C: Hermas/ D : Couscous).

2.1. Isolement et Dénombrement de *Bacillus cereus*

2.2. Milieu de culture

L'isolement a été réalisé sur le milieu Mossel complet, MYP (Mannitol egg-Yolk polymyxin) qui est un milieu d'isolement sélectif de groupe *Bacillus cereus*. Les bactéries de groupe *B. cereus* sont résistantes à la poly myxine, il est particulièrement utilisé pour le dénombrement de *Bacillus cereus* dans les produits alimentaires. (ISO 7932).

La recherche et l'isolement des souches de *Bacillus cereus* a été effectués selon les étapes suivantes :

a. La préparation des échantillons et leurs dilutions

Les échantillons ont été ouverts dans une zone stérile (bec bunsen). A l'aide d'une spatule stérile, une quantité de 10 g d'échantillon a été pesé et mélange avec 90 ml d'eau peptone tamponnée. Puis agiter pour homogénéiser la solution. De cette façon, les dilutions 10^{-1} ont

été obtenus (la solution mère). Une série de dilutions décimales allant jusqu'à 10^{-3} était alors réalisées dans l'eau peptone tamponnée à partir de la suspension mère.

La recherche de *Bacillus cereus* a été réalisée par étalement de chaque dilution sur le milieu Mossel complet. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 h.

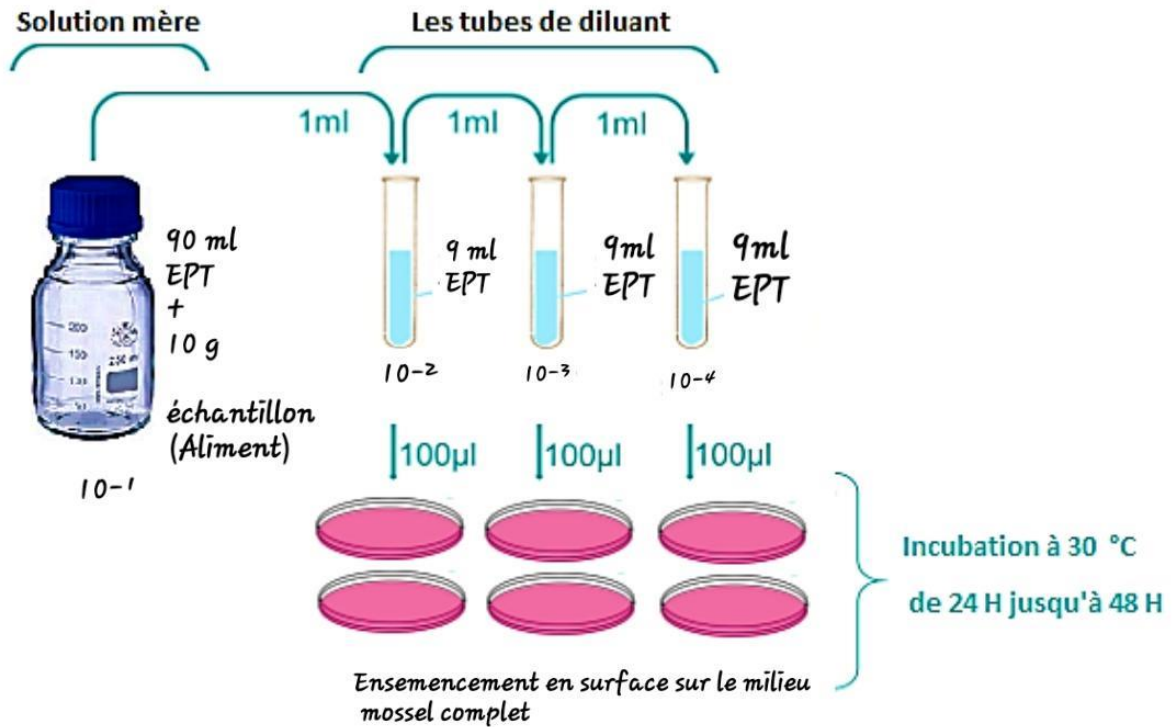


Figure 5: Préparation des dilutions décimales et d'ensemencement du milieu Mossel complet.

b. isolement et dénombrement des *B. cereus*

Les colonies présumées *B. cereus* sont celles qui répondent aux critères d'aspect macroscopique recommandés dans la norme **ISO 7932 (2005)**. Par conséquent, les colonies présumées de *B. cereus* présentent les caractéristiques suivantes :

- Aspect rose rougeâtre et l'absence de virage de couler de milieu dû à non-dégradation de mannitol.
- Un halo opaque entourant la cellule dû à l'hydrolyse de la lécithine du jaune d'œuf par la lécithinase produite par les cellules de *Bacillus cereus*.

3. Confirmation de l'appartenance des souches au groupe *B. cereus*

Pour confirmer l'appartenance de *Bacillus cereus*, il y a plusieurs méthodes qui peuvent être utilisées, allant des techniques de microbiologie aux techniques biochimique, La confirmation de l'appartenance consiste à réaliser :

3-1 Les examens microscopiques

a. L'examen à l'état frais

L'examen à l'état frais consiste à examiner des cellules bactériennes vivantes, ce qui permettra de déterminer avec précision si l'espèce étudiée est mobile, l'observation de la morphologie et facilite l'identification rapide des éléments présents dans l'échantillon biologique.

b. Coloration au Bleu de méthylène

Cette coloration est utile pour l'observation rapide des frottis mais elle ne permet que d'étudier la morphologie des bactéries. Souvent, elle doit être complétée par une coloration de Gram. (Les bactéries sont colorées en bleu sombre).

c. Coloration du Gram

La coloration de base en bactériologie appelée coloration différentielle, car elle est utilisée pour distinguer et classer la plupart des bactéries en deux grands groupes (GRAM + / GRAM -), en fonction de la composition de leur paroi cellulaire, et donc de leur capacité à fixer ou non un colorant.

Après coloration, les bactéries Gram (+) deviennent violettes alors que les bactéries Gram (-) apparaissent en rose.

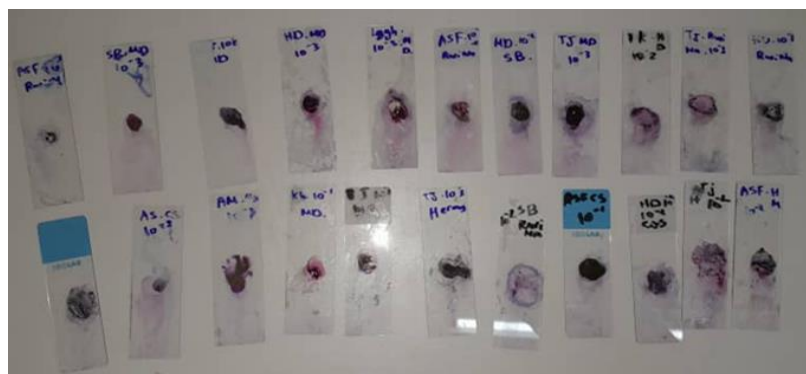


Figure 6: Coloration du Gram des isolats obtenus.

3.2. Tests biochimiques supplémentaires

a. Test catalase

Au contact d'une colonie isolée ou sur la pente d'une culture en gélose (Milieu Mossel) déposer une goutte d'eau oxygénée H₂O₂. Observer immédiatement.

- S'il y a une apparition de bulles d'air gazeux de dioxygène. = catalase +.
- Pas de bulles : catalase –

b. Test à hémolyse

En ce qui concerne la recherche de l'hémolysine, elle consiste à ensemercer par stries une gélose nutritive à 5% du sang de Mouton défibrine. Par la suite, les cultures étaient incubées à 30°C pendant 24h. Les colonies qui présentent une hémolyse positive se distinguent par une zone de lyse claire, ce qui indique l'hémolyse beta caractéristique des espèces de groupe *Bacillus cereus*. (Andersson *et al.*, 2004).

4. Etude de la température de croissance des isolats obtenus

Les isolats obtenus ont été ensemençés dans le milieu BHIB stérile à l'aide des pipettes pasteur stérile puis incubés à 4 températures différentes (6°C) pendant 7 jours et (/25°C/30°C/45°C) pendant 24 heures.

Les isolats ont été incubés à 6°C pendant une semaine complète.

Tableau 4: Températures et périodes d'incubation des isolates obtenus.

Les températures C°	Périodes d'incubation (heures)
6	168
25	24
30	24
45	24

*Chapitre III : Résultats et
Discussions*

1. Résultats de l'étude de la prévalence de *Bacillus cereus* dans certains aliments traditionnels

1.1 Résultats de recherche et dénombrement de *Bacillus cereus*

L'étude a porté sur une sélection de 60 échantillons en recherchant les cellules du groupe *B. cereus* dans les aliments testés provenant de la région de Laghouat et de ses environs.

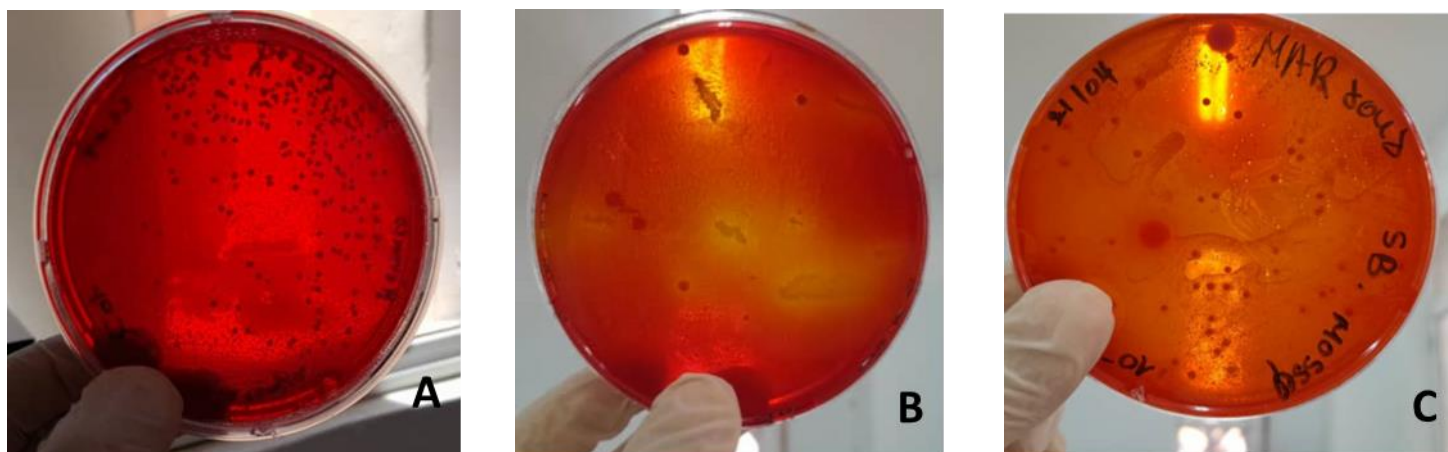


Fig7. Les échantillons des résultats positifs (A:CS,ASF /B:RN,HR/C:MD,SB).

La prévalence, le taux de contamination dans les aliments traditionnels testés sont présentés dans les tableaux 04 et 05.

Tableau 5: la prévalence de *Bacillus cereus* dans les aliments traditionnels testés.

Aliments	Le nombre d'échantillons	Le nombre d'échantillons positifs	La Prévalence (%)
Couscous	15	6	40
Rouina	15	9	60
Hermas	15	13	86.66
Mardoude	15	10	66.66
Total	60	38	63.33
Le nombre des échantillons >10⁴ufc/g	60	19	31.66

A) Prévalence de *Bacillus cereus* dans les aliments obtenus

Sur l'ensemble des 60 échantillons analysés, 63,3 % (38 échantillons) contiennent *B. cereus*.

Les prévalences obtenues montrent une variabilité significative entre les différents types d'aliments traditionnels testés. Le couscous présente une prévalence faible de 40% comparées aux autres, alors que le Mardoude et Rouina affichent des valeurs relativement faibles de 66,66% et 60% respectivement, tandis que Hermas affiche la prévalence la plus élevée de 86,88%. Ces résultats indiquent des différences possibles dans les pratiques de préparation, de stockage ou dans la nature intrinsèque des aliments pouvant influencer la prolifération de *B. cereus*.

La présence de *B. cereus* a été trouvée principalement à Hermas à raison de 86,6%, et c'est ce que nous avons voulu comparer avec les résultats d'étude examinant les spores de *Bacillus cereus* dans les graines de café, la prévalence de l'Hermas est très élevée avec une augmentation estimée à (22,6%) par rapport aux travaux rapportés par (**Turner et al., 2005**).

Cette diffusion est très proche de celle rapporté par (**Chandrakant et al., 2005**) dans lequel la prévalence atteignait 88,29 % dans le riz américain, Cela représente un grand danger en stimulant la production de toxines.

Cette contamination relativement élevée peut être attribuée à une contamination des matières premières, comme montré par une étude précédente réalisée par (**Thorsen et al., 2009**). Ils indiquent que la présence de *Bacillus cereus* dans les aliments est principalement due à la contamination initiale des matières premières. De plus, une autre source de contamination pourrait survenir lors du processus de séchage où les aliments sont souvent placés au sol et exposés à l'air libre et au soleil, augmentant ainsi le risque de contamination microbienne. La *Bacillus cereus* est présent partout dans l'environnement et peuvent être retrouvés dans le sol à des concentrations pouvant atteindre 10^6 UFC/g. (**Hendriksen et al., 2006**).

La présence de *Bacillus cereus* dans le Mardoude a été confirmé avec une prévalence de 66,66% C'est un résultat proche des résultats de l'étude de (**Quintanilha et al., 2011**) qui ont rapporté à un taux de 56,7% de *Bacillus cereus* dans Le café torréfié.

On pense que la principale cause de contamination du produit est liée à la matière première, à savoir la semoule, qui était à l'origine des grains de blé cultivés sur des terres

agricoles et exposés au sol et à toutes les conditions environnementales, ce qui contribue à l'acquisition de *Bacillus cereus*.

Le matériau de base pour la préparation du produit est la semoule, à partir de laquelle est également fabriqué le couscous, mais la méthode de préparation est un peu différente, ce qui a été confirmé par (Ziane, 2015) concernant la présence de spores bactériennes dans le couscous de semoule.

La deuxième hypothèse est due au processus de séchage. Le produit préparé est parfois exposé à la lumière du soleil et à l'air pour accélérer le processus de séchage, ce qui entraînera la possibilité d'acquérir un plus grand nombre de spores de *Bacillus cereus*.

En comparaison avec d'autres aliments séchés, (Tallent., 2012) a mentionné que :

Les aliments contaminés par *B. cereus* incluent les produits alimentaires secs et le riz cuit qui ont été conservés à une température constante, favorisant ainsi la croissance de *B. cereus*.

Alors que Rouina arrive en troisième position avec une prévalence allant jusqu'à 60%, ce qui est relativement supérieur à ce que Hariram & Labbé ont trouvé en 2015 dans les épices aux Etats-Unis, avec une estimation de 19% d'échantillons positifs représentant *Bacillus cereus*, tandis que (Deniz & Cufaoglu, 2021) sur 31,5% des échantillons positifs représentant *Bacillus cereus* dans les épices en Turquie.

La première hypothèse serait la contamination du blé, puisqu'il s'agit de la matière première pour fabriquer la poudre de Rouina, en plus du fait que la température à laquelle le Rouina sera torréfié pourrait être insuffisante pour éliminer la *Bacillus cereus* en raison de sa propriété de tolérance.

Les travaux de (Afchain *et al.*, 2008) montrent que les spores de *B. cereus* sont résistantes à la chaleur élevée et peuvent donc survivre même après des processus de décontamination de produits alimentaires tels que la pasteurisation.

En bas du classement se trouve le couscous, présentant une prévalence de 40 %, ce qui est significativement plus élevé que les résultats obtenus par (Ziane., 2015) dans son étude sur le couscous commercial, où seulement 10 % des échantillons positifs contenaient du *Bacillus cereus*.

Une étude ultérieure menée par (Ziane, 2019) a confirmé la présence de bactéries aérobies et la formation de spores dans la semoule de couscous. (Rogers, 1978) confirme également la présence de *Bacillus* dans les pâtes alimentaires.

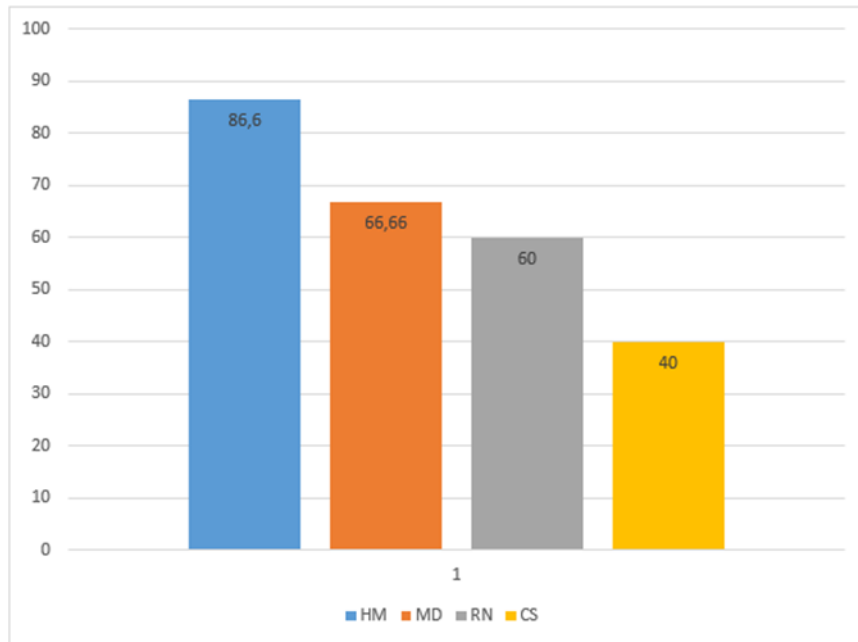


Figure 8: La Prévalence des cellules de *Bacillus cereus* dans les aliments testés (%).

Nous remarquons que le Hermas occupe la première place parmi les aliments contaminés par *Bacillus cereus*. En effet, cet aliment est le plus négligé en termes de soins de préparation et de conditions de séchage. Comme nous l'avons mentionné précédemment, toutes les étapes de sa préparation étaient susceptibles d'attirer les germes de *Bacillus cereus*.

Ensuite vient le Mardoude, dont la granulométrie légèrement plus importante que celle du couscous nécessite parfois une exposition au soleil et à l'air libre pour un séchage rapide. De plus, son temps de séchage est plus long que celui du couscous en raison de son activité de l'eau (A_w) élevée immédiatement après la préparation.

Ensuite vient le Rouina qui est le moins contaminé car il n'y a pas de stations de contamination par rapport aux autres aliments. Le premier point de contamination, comme est la contamination des grains de blé qui étaient en contact avec le sol. Quant à la deuxième station, seul le dispositif de broyage des grains de blé entraînera une augmentation du pourcentage de contamination par les spores de *Bacillus cereus*.

Quant au couscous qui présentait un taux de contamination plus faible que les autres aliments, du fait de la prise en compte de ses stations de fabrication.

B) - Taux de contamination des aliments obtenus:

Le tableau 5 expose les taux de contamination de différents aliments étudiés par le *Bacillus cereus*, avec des valeurs variant entre 1×10^1 UFC/g à 3×10^8 UFC/g dans ces aliments.

Tableau 6: Taux de contamination de *B. cereus* dans divers types d'aliments traditionnels (CS: Couscous/ MD: Mardoude/ HM: Hermas/ RN: Rouina).

Aliments	Région	taux de contamination (UFC/g)
CS	OM	1×10^1
	TY	1.2×10^2
	TJ	3.6×10^2
	HD	7×10^3
	SB	7×10^1
	ASF	3.2×10^3
MD	Lagh	1.6×10^7
	TR	2.4×10^2
	OM	1.4×10^7
	AM	4.4×10^2
	HR	2.3×10^2
	AF	8×10^3
	TJ	3×10^7
	HD	7×10^3
	SB	5.9×10^4
	ASF	3×10^5
HM	GH	8×10^1
	BR	8.2×10^4
	OM	3×10^3
	TY	5×10^6
	AM	1.1×10^4
	HR	6×10^1
	AF	3.1×10^7
	KH	5.6×10^7
	TJ	3×10^8
	HD	2.1×10^4
	SB	1.9×10^2
	ASF	3.07×10^3
	BN	4.4×10^7
RN	GH	4×10^6
	TR	7×10^1
	OM	1×10^3
	AM	4×10^6
	HR	3×10^6
	TJ	8×10^3
	HD	3.05×10^5
	SB	3.1×10^5
	ASF	1.7×10^7

(GH : El Ghaicha/Lagh: Laghouat/TR: Tarkalel/ BR: Brida/OM: Oued M'Zi /TY:taouiala.

AM:Aïn madhi/HR:Hassi R'mel/AF: Aflou/KH:LKhneg/ TJ:Tajmout/HD:Hassi Delaa.

SB: Sidi Bouzid/ASF: El Assafia/ BN: Bennaceur benchohra).

Le niveau de contamination dans le Hermas variait de 6×10^1 à 3×10^8 UFC/g Il s'agit d'un nombre important par rapport à ce que (**Chevas et al., 2011**), avec un taux de contamination allant de : 1×10^1 à 1×10^3 UFC/g dans le café torréfié et sont similaires à ceux trouvés par (**Feijoo et al., 1996**), à des niveaux atteignant 1×10^6 ufc/g dans le café.

Alors que la contamination par les cellules de *Bacillus cereus* varie dans le Mardoude entre : $2,4 \times 10^2$ à 3×10^7 ufc/g, Il s'agit d'un niveau plus élevé que ce que (**Chandrakant et al., 2005**), avec un taux compris entre : 3.6-460 UFC/g dans le riz américaine, et sont élevés par rapport à ceux trouvés par **Gaoji et al** en **2022** dans le riz brun, avec des taux variants entre 1.54 à 2.59 log UFC/g.

Le niveau de contamination de Rouina se situe entre 7×10^1 à $1,7 \times 10^7$ ufc/g Ce taux est jugé élevé par rapport à ce que (**Hariram & Labbé, 2015**), ils ont obtenu dans les épices aux États-Unis de 2×10^2 à 8.3×10^7 ufc/g, et sont élevés par rapport à ce qu' (**Aksu et al ., 2000**) dans des épices et des herbes emballées à Istanbul, et ils se situent entre 1×10^2 à $3,2 \times 10^3$ ufc/g.

Alors que le taux de contamination du couscous se situe entre 1×10^1 à 7×10^3 UFC/g Ce taux est un peu similaire à ce que **Ziane** retrouvait en **2015** dans le couscous commercial de $1,2 \times 10^1$ à 3×10^1 UFC/g, Ce niveau est considéré comme niveau faible par rapport à une autre étude de (**Ziane et al., en 2019**), puisqu'il ont enregistré un taux de pollution estimé à 10^5 ufc/g dans le couscous.

En résumé, les résultats montrent que le couscous est l'aliment le moins contaminé parmi ceux étudiés, tandis qu'Hermas présente le taux de contamination le plus élevé. La Rouina et le Mardoude ont des niveaux de contamination intermédiaires, avec des valeurs plus élevées enregistrées pour le Mardoude par rapport à la Rouina.

1.2 Caractérisation et confirmation de l'appartenance des isolats au groupe *B. cereus*

Le tableau 07 représente les résultats des tests confirmation Il est montré comme suite:

Tous les échantillons étaient positifs aux tests de catalase et d'hémolyse, et nos résultats sont cohérents avec ce que **Bouali et al** ont obtenus en **2016** dans une étude sur l'isolement de *Bacillus cereus* du sol en Algérie, à savoir qu'un total de 36 échantillons était Gram positifs.

Catalase positive. La présence de résultats positifs dans tous les échantillons augmente la probabilité que les germes appartiennent au groupe *Bacillus cereus*.

Tableau 7: Resultats des tests de confirmations (Cs: couscous / MD: Mardoude /RN: Rouina/ HM: Hermas).

L'échantillon/région	TEST catalase	TEST Hémolyse	Coloration de Gram
ASF, CS.	+	+	+
ASF, MD.	+	+	+
ASF, HM.	+	+	+
ASF, RN.	+	+	+
Lagh, MD.	+	+	+
KH, MD.	+	+	+
HD CS.	+	+	+
AM, MD.	+	+	+
TJ, HM.	+	+	+
HD ,RN,	+	+	+
SB, MD.	+	+	+
HR', RN.	+	+	+
SB, RN.	+	+	+
TR, MD.	+	+	+
HD, MD.	+	+	+
TJ, MD.	+	+	+
TJ ,RN	+	+	+
ASF,RN	+	+	+
ASF, RN.	+	+	+
TJ, HM.	+	+	+
ASF, CS.	+	+	+
SB, MD.	+	+	+

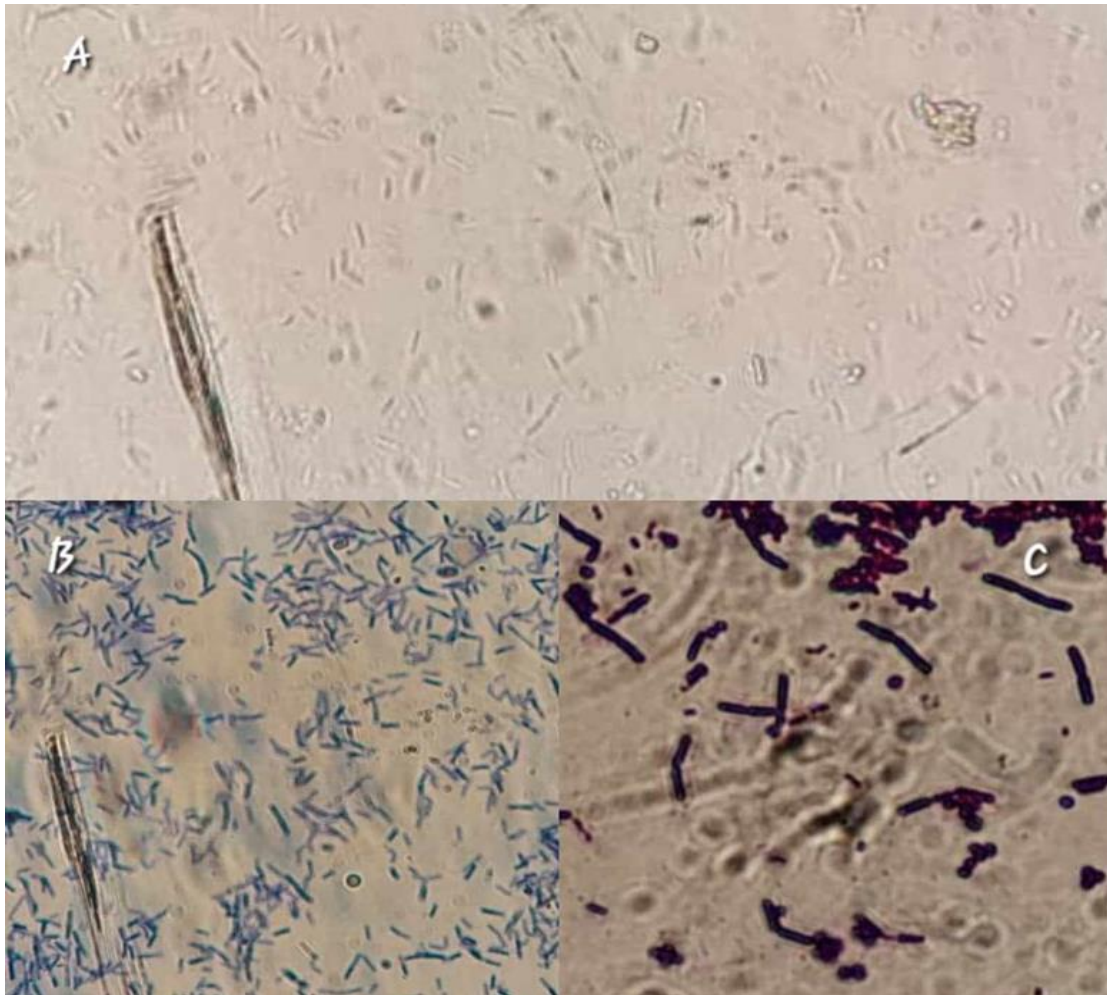


Figure 9: observations microscopique ($\times 100$) d'isolat ASF, HM (A: à l'état frais, B: Au Bleu de méthylène, C:Coloration de Gram).

Dans la plupart des isolats que nous avons trouvés, nous avons pu retrouver la forme des cellules en forme de bâtonnet, et le mouvement (La mobilité) était également très net dans la plupart des échantillons du test de l'état frais. C'est ce que (**Bouali et al., 2016**) ont également découvert dans leur étude Tous les isolats étaient Gram positif, en forme de bâtonnet.

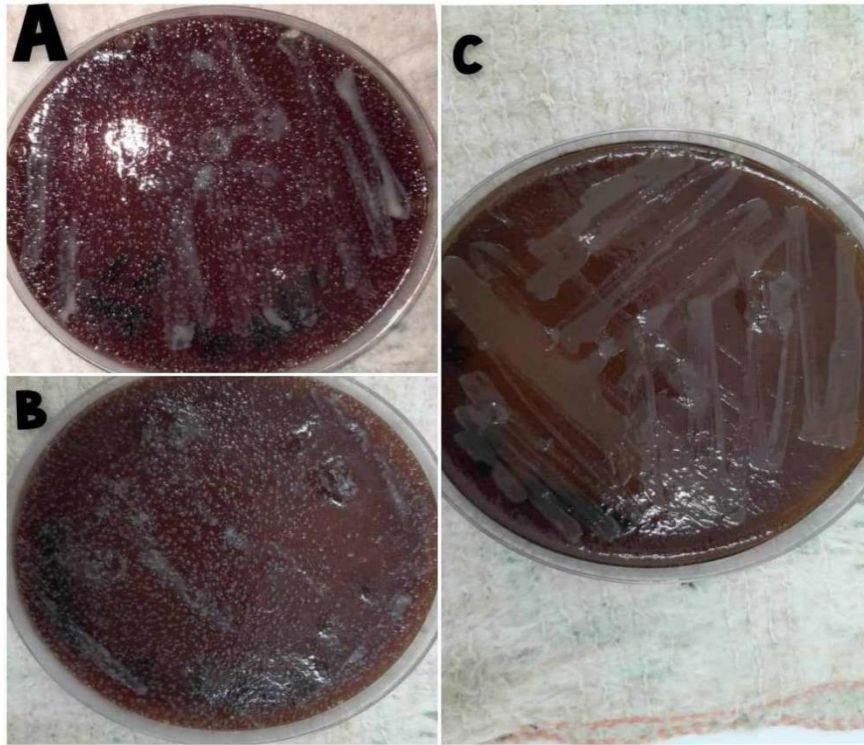


Figure 10: Résultats du test à hémolyse. (A: TJ, HM; B: SB, RN; C: SB, MD).

(TJ: Tajmout; SB: Sidi-Bouzyd); (HM: Hermas / RN: Rouina / MD: Mardoude).

Nos résultats concordent avec ceux trouvés par (Ehling-Schulz *et al.*,2005), indiquant que certaines de leurs souches appartenant à *Bacillus cereus* étaient capables d'induire une activité hémolytique, et ces mêmes souches étaient également les plus toxiques.

1.2.1 Résultats de l'étude de la température de croissance des isolats obtenus

Le tableau 07 représente les résultats d'une étude sur la croissance des échantillons isolés à quatre températures différentes qui se répartissent comme suit :

Tableau 8: Resultats de la température de croissance. (Cs: Couscous / MD: Mardoude /RN: Rouina/ HM: Hermas).

Échantillon	croissance à différente température			
	6C°	25C°	30C°	45C°
ASF, CS.	+	-	+	-
ASF, MD.	+	-	+	+
ASF, HM.	+	+	+	+
ASF, RN.	-	-	+	+
Lagh, MD.	-	-	+	-
KH, MD.	+	-	+	+
HD CS.	+	+	+	+
AM, MD.	-	-	+	-
TJ, HM.	-	-	+	+
HD ,RN,	+	+	+	-
SB, MD.	-	-	+	+
HR', RN.	-	-	+	-
SB, RN.	+	+	+	+
TR, MD.	+	-	+	+
HD, MD.	-	-	+	-
TJ, MD.	-	+	+	+
TJ ,RN	+	+	+	-
ASF,RN	-	+	+	+
ASF, RN.	-	-	+	+
TJ, HM.	-	-	+	-
ASF, CS.	-	-	+	-
SB, MD.	+	-	+	-

Les résultats indiquent que ce groupe d'isolats présente une capacité complète à croître et à s'adapter à toutes les températures testées (6 °C, 25 °C, 30 °C, 45 °C).

Les isolats de ce groupe montrent une capacité remarquable à s'adapter à des températures variées, ce qui signifie qu'ils peuvent survivre et se développer dans une large gamme d'environnements thermiques. Cette caractéristique est avantageuse pour leur survie dans différents environnements et cela est connu sous le nom de capacité d'adaptation thermique.

C'est inquiétant car la période de croissance était longue et les bactéries s'adaptaient à toutes les températures. Cela nous rapprochera de la possibilité que les germes appartiennent au groupe *Bacillus cereus* car la propriété de ce groupe peut s'adapter à toutes les conditions environnementales, même à la température élevée de 45 C° dans notre cas. Ce résultat est similaire à celui de (Nateza *et al.*, 2022) ont découvert que des souches isolées de poivre blanc de Bogor poussent à une température de 51 C°.

Les isolats découverts par (Bouali *et al.*, 2016) ont pu se développer dans une plage limitée comprise entre 15 et 45 C°.

Ces résultats correspondent étroitement à ceux obtenus par (Choma *et al.*, 2000) concernant leur isolat *Bacillus cereus* TZ415 dans une étude où elles ont réussi à se développer dans une plage de température allant de 5°C à 45°C.

➤ Groupe aux résultats positifs et négatifs mixtes

Le groupe avec des résultats mixtes positifs et négatifs représente des résultats répartis sur les quatre températures. Certains isolats ont réussi à se développer à des températures très basses (6°C) et à des températures appropriées (30°C), tandis que d'autres se sont développés à 25 et 45°C.

➤ Le différentiel de croissance observé à différentes températures reflète une diversité étendue au sein du groupe, indiquant une capacité d'adaptation à des environnements variés.

➤ Les isolats capables de croître à 6°C et à 30°C peuvent différer physiologiquement ou génétiquement de ceux croissant à 25°C et à 45°C, ce qui indique une variabilité génétique au sein du groupe.

Concernant la croissance à basse température 6 C°, nos résultats sont similaires à ce obtenus par (Berthold *et al.*, 2019), qui ont révélé que les souches isolées de divers aliments sont capables de se développer à des températures comprises entre 6 ° C à 7 ° C.

Ces résultats sont identiques à ceux trouvés par (**Foegeding & Berry, 1997**) dans des isolats de lait, où ils ont constaté qu'ils peuvent se développer à des températures basses comprises entre : 5 C° et 10 C°, bien qu'à basses températures, les isolats puissent se développer clairement. . Cela signifie que les cellules de *B. cereus* présentes dans les aliments peuvent se développer lorsqu'elles sont conservées au réfrigérateur à une température de 6 C°, ce qui présente un risque pour la santé du consommateur, surtout si les niveaux de contamination sont élevés.

C'est ce qui est préoccupant et considéré comme un modèle de danger car les souches qui se sont développées à ces températures sont capables de former des spores. C'est ce qu'ont démontré (**Carlin et al., 2008**), lorsqu'ils ont découvert que leurs isolats appartenaient au groupe *Bacillus cereus*. Réalisé le processus de sporulation de manière optimale à des températures comprises entre 15°C et 37°C.

Conclusion

Jusqu'à présent, la nutrition basée sur l'utilisation d'aliments traditionnels dans la wilaya de Laghouat et ses environs reçoit encore la plus grande part d'attention, et malgré le développement des modes de consommation et la présence de tels aliments prêts à l'emploi, cela n'a pas été une raison pour que les gens s'abstiennent de les fabriquer et de les consommer.

Nos résultats révèlent des taux de prévalence variables de *Bacillus cereus* dans les aliments traditionnels testés totalisant 63,33 %, avec le taux le plus élevé enregistré pour le hermas à 86,66 %, suivi par le mardoude avec un taux de dispersion de 66,66 %, puis le rouina à 60 %, et enfin le couscous avec un taux de 40 % ,

Nos résultats ont montré un taux de prévalence estimé à 63,33% par les germes du groupe *Bacillus cereus* dans tous les aliments traditionnels.

La majorité des échantillons des aliments traditionnels (19/38) montraient un taux de contamination qui dépasse le seuil de 10^4 ufc/g en représentant 33,66% des échantillons analysés ,avec un taux de contamination très élevée observer dans le Hermas de 3×10^8 ufc/g ,ce qui constitue un risque potentiel pour la santé du consommateur .

Les résultats de l'étude des températures de croissance ont montré des résultats positifs dans la majorité des échantillons, car ils formaient une large plage de croissance allant de 6°C à 45°C. Ceci est considéré comme un aspect préoccupant, en particulier pour les isolats ayant la capacité de se développer à 6°C, ce qui signifie qu'ils peuvent pousser à des températures basses au réfrigérateur, ce qui menace la santé du consommateur.

L'étude biochimique des souches isolées pour confirmer leur appartenance aux groupes et l'orientation en faveur de l'identification a été basée sur l'utilisation de lécithinase, ainsi sur leurs propriétés tinctoriales (coloration de gram, Blue de méthylène).

En fin de compte, ces résultats suffisent à nous faire repenser en réorientant ces recherches vers les aliments traditionnels, en particulier dans les zones qui consomment fortement ces aliments, dans l'espoir de réduire l'incidence de telles maladies qui peuvent entraîner des conséquences indésirables.

Références
Bibliographies

Références Bibliographiques

- Auger, S., Galleron, N., Bidnenko, E., Ehrlich, S. D., Lapidus, A., & Sorokin, A. (2008). The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains. *Applied and environmental microbiology*, 74(4), 1276-1280.
- Albaridi, N. (2022). Risk of *Bacillus cereus* contamination in cooked rice. *Food Science and Technology*, 42, e108221.
- Agata, N., Ohta, M., Mori, M., & Isobe, M. (1995). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters*, 129(1), 17-19.
- Ankolekar, C., Rahmati, T., & Labbé, R. G. (2009). Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in US rice. *International journal of food microbiology*, 128(3), 460-466.
- Afchain, A. L., Carlin, F., Nguyen-The, C., & Albert, I. (2008). Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *International journal of food microbiology*, 128(1), 165-173.
- Andersson, M. A., Jääskeläinen, E. L., Shaheen, R., Pirhonen, T., Wijnands, L. M., & Salkinoja-Salonen, M. S. (2004). Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. *International journal of food microbiology*, 94(2), 175-183.
- Aksu, H., Bostan, K., & Ergün, O. (2000). Presence of *Bacillus cereus* in packaged some spices and herbs sold in Istanbul. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 3(5), 710-712.
- Attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire novembre 2018 page 5-7/15.
- Auger, S., Galleron, N., Bidnenko, E., Ehrlich, S. D., Lapidus, A., & Sorokin, A. (2008). The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains. *Applied and environmental microbiology*, 74(4), 1276-1280.

Références Bibliographiques

- Bouali, W., Malek, F., Sahin, F., & Abdelouahid, D. E. (2016). Morphological, physiological and biochemical characterizations of some soil isolates of *Bacillus cereus* group from Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 10(29), 1094-1103.
- Berthold-Pluta, A., Pluta, A., Garbowska, M., & Stefańska, I. (2019). Prevalence and toxicity characterization of *Bacillus cereus* in food products from Poland. *Foods*, 8(7), 269.
- Beecher, D. J., & Wong, A. L. (1997). Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*: hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *Journal of Biological Chemistry*, 272(1), 233-239.
- Cadel S.S., De Buyser M.L., Vignaud M.L., Dao T.T., Messio S., Pairaud S., Hennekinne J.A., Pihier N. and Brisabois A. (2012). Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus* : bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010, Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation /Spécial Risques alimentaires Microbiologiques. 50, 57-61.
- Chaves, J. Q., Cavados, C. D. F. G., & Vivoni, A. M. (2012). Molecular and toxigenic characterization of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from commercial ground roasted coffee. *Journal of food protection*, 75(3), 518-522.
- Cufaoglu, G., & Ayaz, N. D. (2022). Potential risk of *Bacillus cereus* in spices in Turkey. *Food Control*, 132, 108570.
- Ceuppens, S., Rajkovic, A., Heyndrickx, M., Tsilia, V., Van De Wiele, T., Boon, N., & Uyttendaele, M. (2011). Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Critical reviews in microbiology*, 37(3), 188-213.
- Choma, C., Clavel, T., Dominguez, H., Razafindramboa, N., Soumille, H., Nguyen-the, C., & Schmitt, P. (2000). Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 73-77.
- Doukani, K. (2015). Etude comparative entre le couscous industriel et le couscous à base de glands. *Nature & Technology*, (13), 2.
- Drobniowski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical microbiology reviews*, 6(4), 324-338.

Références Bibliographiques

- Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., ... & Mahillon, J. (2005). Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of clinical microbiology*, 43(8), 4277-4279.
- Eley, A. R. (Ed.). (1996). *Microbial food poisoning*. Springer Science & Business Media.
- Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretiere, M. H., Lindback, T., Andersson, M., Schulz, A., ... & Scherer, S. (2005). Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, 151(1), 183-197.
- Foegeding, P. M., & Berry, E. D. (1997). Cold temperature growth of clinical and food isolates of *Bacillus cereus*. *Journal of food protection*, 60(10), 1256-1258.
- Gounina-Allouane, R., Broussolle, V., & Carlin, F. (2008).
- Feijoo, S. C., Cotton, L. N., Watson, C. E., & Martin, J. H. (1997). Effect of storage temperatures and ingredients on growth of *Bacillus cereus* in coffee creamers. *Journal of dairy science*, 80(8), 1546-1553.
- Frankland, G. C., & Frankland, P. F. (1887). XI. Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London (B)*, (178), 257-287.
- Gharib, A. A., El-Hamid, M. I. A., El-Aziz, N. K. A., Yonan, E. Y., & Allam, M. O. (2020). *Bacillus cereus*: Pathogenicity, viability and adaptation. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 8(s1), 34-40.
- Gaoji Y, G., Xu, J., Xu, Y., Li, R., & Wang, S. (2023). Analysis of dynamics and diversity of microbial community during production of germinated brown rice. *Foods*, 12(4), 755.
- Gdoura épouse Ben Amor, M. (2019). *Maitrise des risques de contamination des produits alimentaires tunisiens par le groupe Bacillus cereus* (Doctoral dissertation, Rennes, Agrocampus Ouest).
- Guinebretière, M. H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., & De Vos, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental microbiology*, 10(4), 851–865.
- Hachfi, S. (2022). *Destin et comportement des spores du groupe Bacillus cereus chez des organismes modèles* (Doctoral dissertation, Université Côte d'Azur).

Références Bibliographiques

- Henriques, A. O., & Moran, Jr, C. P. (2007). Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 555-588.
- Hance, P., Teyssou, R., Nicand, E., & Buisson, Y. (1998). Sources alimentaires des diarrhées bactériennes. *Toxi-infections alimentaires collectives. Médecine thérapeutique/Pédiatrie*, 1(1), 25-30.
- Hendriksen, N. B., & Hansen, B. M. (2011). Diagnostic properties of three conventional selective plating media for selection of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. weihenstephanensis*. *Folia Microbiologica*, 56, 535-539.
- Hariram, U., & Labbé, R. (2015). Spore prevalence and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates from US retail spices. *Journal of food protection*, 78(3), 590-596.
- H. Rogres., Westmacott, D., & Perkins, H. Rogres. (1979). Effects of lysozyme on *Bacillus cereus* 569: rupture of chains of bacteria and enhancement of sensitivity to autolysins. *Microbiology*, 115(1), 1-11.
- <https://www.industrie.gov.dz/fr/andi/> (L'Agence nationale du développement des investissements 2013.)
- <https://www.fao.org/home/fr> (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture) 2005.
- Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrients inosine and l-alanine on *Bacillus cereus* spore germination. *Food microbiology*, 25(1), 202-206.
- Jessberger, N., Dietrich, R., Granum, P. E., & Märklbauer, E. (2020). The *Bacillus cereus* food infection as multifactorial process. *Toxins*, 12(11), 701.
- Jeong, Y. H., Hwang, J. Y., Kim, I. S., Park, Y., Hwang, S. J., Lee, S. W., ... & Park, S. W. (2010). Adding cilostazol to dual antiplatelet therapy achieves greater platelet inhibition than high maintenance dose clopidogrel in patients with acute myocardial infarction: results of the adjunctive cilostazol versus high maintenance dose clopidogrel in patients with AMI (ACCEL-AMI) study. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 3(1), 17-26.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., & Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and infection*, 2(2), 189-198.

Références Bibliographiques

- Kramer, J. M., & Gilbert, R. J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Foodborne bacterial pathogens, 19, 21-70.
- Lapidus, A., Goltsman, E., Auger, S., Galleron, N., Ségurens, B., Dossat, C., ... & Sanchis, V. (2008). Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chemico-biological interactions*, 171(2), 236-249.
- Lindbäck, T., Fagerlund, A., Rødland, M. S., & Granum, P. E. (2004). Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 12), 3959–3967.
- Mahler, H., Pasi, A., Kramer, J. M., Schulte, P., Scoging, A. C., Bär, W., & Krähenbühl, S. (1997). Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New England Journal of Medicine*, 336(16), 1142-1148.81. Marxen, S., Stark, T. D., Frenzel, E., Rüttsch
- Nanteza, H., Dewanti-Hariyadi, R., & Nurjanah, S. (2022, October). The occurrence of *Bacillus cereus* in white pepper from Bogor, Indonesia. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1097, No. 1, p. 012030). IOP Publishing.
- Nicand, E., Teyssou, R., & Buisson, Y. (1998). Le risque fécal viral en 1998. *Virologie*, 2(2), 103-16.
- Oliveira, A. M., de Abreu Filho, B. A., de Jesus Bassetti, F., Bergamasco, R., & Gomes, R. G. (2020). Natural Extract of *Moringa oleifera* Leaves Promoting Control of *Staphylococcus aureus* strains biofilm on PVC surface. *Food and Bioprocess Technology*, 13(10), 1817-1832.
- Pandiani, F. (2010). Mécanismes d'adaptation aux basses températures de croissance de la bactérie pathogène *B. cereus*: rôle des hélicases à ARN (Doctoral dissertation, Université d'Avignon).
- Ramarao N.,Tran S.,Marin M.,Vidic J., 2020,Advanced Methods for Detection of *Bacillus cereus* and Its Pathogenic Factors,Advanced Biosensors for Bacterial Detection page 2.
- Ramm, F., Stech, M., Zemella, A., Frenzel, H., & Kubick, S. (2021). The pore-forming hemolysin bl enterotoxin from *Bacillus cereus*: Subunit interactions in cell-free systems. *Toxins*, 13(11), 807.

Références Bibliographiques

- Strom, K., Jarzynka, S., Minkiewicz-Zochniak, A., Wesolowska, A., & Oledzka, G. Effect of holder pasteurization and storage of donor human milk on survival. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 78(1), 13-21.
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology reviews*, 32(4), 579-606.
- Tallent, S. M., Kotewicz, K. M., Strain, E. A., & Bennett, R. W. (2012). Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group. *Journal of AOAC international*, 95(2), 446-451.
- Turner, N. J., Whyte, R., Hudson, J. A., & Kaltovei, S. L. (2006). Presence and growth of *Bacillus cereus* in dehydrated potato flakes and hot-held, ready-to-eat potato products purchased in New Zealand. *Journal of food protection*, 69(5), 1173-1177.
- Teyssou, R., Hance, P., Nicand, E., Nizou, J. Y., & Buisson, Y. (1998). Les infections à *Bacillus Cereus*: bactériologie, clinique et traitement. *Lett Infect*, 99-104.
- Ziane M., 2015, Caractérisation, identification et étude de la thermorésistance de souches de *Bacillus cereus* isolées de semoule de couscous, Thèse doctorat, page 2.
- Ziane, M. (2015). Caractérisation, identification et étude de la thermorésistance de souches de *Bacillus cereus* isolées de semoule de couscous. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen. Annexes.
- Ziane, M., Leguerinel, I., & Membré, J. M. (2019). A quantitative microbiological exposure assessment of *Bacillus cereus* group IV in couscous semolina, Algeria. *Microbial risk analysis*, 11, 11-22.

Annexes

Milieux de culture et diluants

1. Milieu Mossel

Mossel de base

Extrait de viande.....	1 g
Tryptone	10 g
Sodium chloride.....	10 g
D-mannitol	10 g
Rouge de phénole	0.025g
Agar-agar	15 g
ED	1L

Mossel complet

Milieu Mossel de base	180ml
Solution de polymyxine B	2ml
Émulsion de jaune d'œuf	20ml



Fig. Milieu Mossel de base après la répartition dans les flacons.

Emulsion de jaune d'œuf

- Prenez un œuf et nettoyer la coquille avec de l'eau stérile pour enlever toute saleté.
- Imbiber un coton avec de l'alcool et frotter-le sur la coquille pour la stériliser.
- Casser délicatement l'œuf et Séparer le jaune d'œuf du blanc, Placer le jaune d'œuf dans un bécher stérile.
- Mesurer le volume du jaune d'œuf récupéré.
- Ajoutez quatre fois ce volume en eau distillée stérile. Par exemple, si vous avez 10 ml de jaune d'œuf, ajoutez 40 ml d'eau distillée stérile.
- Utilisez une pipette ou une seringue stérile pour mesurer et ajouter l'eau physiologie stérile.

2. Gélose nutritive :

Extrait de viande.....	15g
Extrait de levure.....	2g
Peptone.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	1.5g
Eau distillé.....	1L

pH =6,8-7,4.

3. Gélose au sang :

Gélose nutritive..... Sang du mouton.

4. BHIB :

Extrait cœur-cervelle	17,5g
Peptone pancréatique de gélatine.....	10g
Chlorure de sodium.....	5 g
Phosphate disodique	2,5 g
Glucose.....	2g

pH du milieu : 7,4 ± 0,2 ∴

Annexe 2

Tests et Techniques :

1. Coloration au bleu de méthylène :

Le bleu de méthylène (BM) est un colorant souvent utilisé en biologie. Il peut servir à colorer des bactéries pour les visualiser au microscope. Il permet de renseigner sur :

- la forme des bactéries, la taille, le mode de regroupement.

❖ La Technique :

- ✓ Réaliser un frottis et le fixer.
- ✓ Recouvrir la lame de bleu de méthylène, pendant 1 à 2 minutes.
- ✓ Rincer à l'eau distillée.
- ✓ Sécher la lame.
- ✓ Observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile.

2. coloration du Gram :

La coloration de Gram est une méthode de coloration différentielle utilisée pour distinguer les bactéries en deux grands groupes : les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, en fonction de la structure de leur paroi cellulaire.

Matériel nécessaire :

Lames et lamelles de microscope

Solution de cristal violet

Solution de lugol

Alcool décolorant (éthanol ou acétone)

Fuchsine basique

Bec Bunsen

Pipette

EPS

Microscope

❖ La Technique

Préparation du frottis :

Prélevez une petite quantité de l'échantillon bactérien à l'aide d'une anse stérile.

Étalez l'échantillon en une fine couche sur une lame de microscope propre.

Fixez le frottis en passant la lame rapidement au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen pour tuer les bactéries et les faire adhérer à la lame. Laissez refroidir la lame.

1. Appliquez le cristal violet sur la lamelle et maintenez-la pendant 60 secondes. Lavez la lamelle avec de l'eau.
2. Appliquez lugol sur la lamelle et maintenez-la pendant 60 secondes. Lavez la lamelle avec de l'eau.
3. Appliquez de l'alcool éthylique 95 % sur la lamelle et maintenez-la pendant 5 à 10 secondes. Lavez la lamelle avec de l'eau.
4. Enfin, appliquez le fushine sur la lamelle et maintenez-la pendant 45 secondes. Lavez la lamelle avec de l'eau.

Il est possible de remarquer que les bactéries Gram positif sont violettes, car le cristal violet est bloqué dans leurs parois cellulaires épaisses, tandis que les bactéries Gram négatif sont roses, car le cristal violet a traversé leurs fines parois cellulaires et les a recolorées de rose.

3. Le test de Catalase :

La catalase est une enzyme qui permet de décomposer le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ selon la réaction suivante :



Observation :

Si des bulles d'oxygène se forment rapidement (immédiatement ou en quelques secondes), cela indique la présence de l'enzyme catalase, et le test est positif.

Si aucune bulle ne se forme, le test est négatif, indiquant l'absence de catalase.