

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

Pour l'obtention du Diplôme de Master en sciences biologiques

Option : **Microbiologie Appliquée**

Thème :

**Isolement, dénombrement des spores du groupe
Bacillus cereus à partir des épices et étude de leurs
paramètres de croissance.**

Présenté par :

BABAOUMOUSSA Khodir & CHEKHAR Amine

Devant le jury :

Président : MESSAOUDI O.	MCB
Examineur : BOUNOUALA F.	MAB
Encadreur : MADOURI R.	MAA

Année universitaire :2020/2021



Dédicaces

Je dédie ce travail qui n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limite de mes parents que j'aime beaucoup pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études

A mes chères frères et sœurs et leurs petits enfants pour leurs encouragements permanents et leur soutien moral ;

A toute la famille CHEKHAR et mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité ;

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès ;

A tous ceux que j'aime

Merci !

Amine.



Dédicaces

Je dédie ce travail qui n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limite de mes parents que j'aime beaucoup pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études

A mes chères frères et sœurs pour leurs encouragements permanents et leur soutien moral ;

A toute la famille et mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité ;

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès ;

A tous ceux que j'aime

Merci !

Khodir.



REMERCIEMENTS

Tout d'abord, nous remercions le Dieu, notre créateur de nos avoir donné les forces, la volonté et le courage afin d'accomplir ce modeste travail.

*Nous adressons le grand remerciement à notre encadreur Monsieur **MADOURI Redouane**, qui a proposé ce thème et a accepté de nous encadrer, également pour ses conseils et sa disponibilité.*

*Nous tenons également à remercier messieurs les membres de jury **Mr. MESSAOUDI Omar et Mme. BOUNOUALA Fatima zohra** pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner notre travail, également pour l'intérêt que vous avez porté à notre travail et pour vos précieux conseils et remarques.*

Finalement, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à nos familles qui nous ont toujours soutenues ainsi que pour l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation.

Résumé :

Les épices peuvent contenir des bactéries productrices de toxines, ce qui peut causer des problèmes de santé pour les consommateurs. Ce travail vise à rechercher et dénombrer les spores de *Bacillus cereus* isolées à partir des épices commercialisées dans les régions de Ghardaïa et Tlemcen ainsi d'étudier leur croissance dans une matrice alimentaire en utilisant le modèle mathématique. L'étude de la croissance a été faite par dénombrement sur gélose nutritive avec un ajustement par modèle primaire de Gompertz (1988) dont les deux paramètres de croissance la phase de latence 'Lag' et le taux de croissance ' μ_{max} ' ont été calculés. Les résultats obtenus avec les 5 meilleures souches utilisées (L, D, H, G et M) ont une phase de latence, avec un taux de croissance faible.

Mots clés : épices, spores de *B. cereus*, croissance bactérienne, modèle mathématique, phase de latence (Lag), taux (μ_{max}).

Summary:

Spices may contain toxin-producing bacteria, which can cause health problems for consumers. This work aims to research and count the *Bacillus cereus* spores isolated from the spices marketed in the regions of Ghardaïa and Tlemcen so as to study their growth in a food matrix using mathematical modeling. The growth study was performed by nutrient agar count with a Gompertz primary model fit (1988) whose two growth parameters the 'Lag' latency phase and ' μ_{max} ' growth rate were calculated. The results obtained with the five best strains used (L, D, H, G and M) have a latency phase, with a low growth rate.

Keywords: spices, *B. cereus* spores, bacterial growth, mathematical model, latent phase (Lag), rate (μ_{max}).

الملخص :

قد تحتوي التوابل على بكتيريا منتجة للسموم ، يمكن أن تسبب مشاكل صحية للمستهلكين. ويهدف هذا العمل إلى البحث والعد أبواع *B. cereus* المعزولة عن التوابل التي يتم تسويقها في ولايتي غرداية وتلمسان لدراسة نموها في الغذاء باستخدام النمذجة الرياضية. وقد أجريت دراسة النمو بواسطة على وسط غني بالمغذيات مع نموذج Gompertz الأول (1988) الذي تم حساب خصائص النمو. مرحلة "التأخر" (Lag) ومعدل النمو (μ_{max}). والنتائج التي تم الحصول عليها مع أفضل خمس سلالات مستخدمة (L, D, H, G, M) لديها مرحلة نمو، مع معدل نمو منخفض.

الكلمات المفتاحية: أبواع *B. cereus*، نمو البكتيريا ، التوابل ، النموذج الرياضي ، مرحلة نمو (Lag)، معدل (μ_{max}).

Sommaire

Dédicace	I
Remerciements	III
Résumé	IV
Liste des tableaux	VII
Liste des figures	VIII
Liste des abréviations	X
Introduction	1

Chapitre I : synthèse bibliographique

I-1 Microbiologie de <i>Bacillus cereus</i>	3
I-2 <i>Bacillus cereus</i> et ses endospores	3
I-3 Facteurs de virulence <i>Bacillus cereus</i>	5
I-4 La présence de <i>Bacillus cereus</i> dans les aliments	6
I-5 La présence de <i>Bacillus cereus</i> dans les épices	7
I-6 <i>Bacillus cereus</i> et les intoxications alimentaires	7
I-7 Modélisation de croissance bactérienne et les paramètres d'étude	8

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I- Isolement et dénombrement des spores de <i>B. cereus</i>	10
I-1- Prélèvement des spores de <i>Bacillus cereus</i>	10
I-2- Préparation des échantillons des épices et leurs dilutions	11
I-3- Dénombrement des spores de <i>B. cereus</i> sur milieu Mossel	12
II- Etude de croissance	13
II-1- Préparation de la matrice alimentaire	13
II-2- Souches et modèle utilise	13
II-2-1 Ensemencement des souches de <i>B. cereus</i>	14
II-2-2 suivi de croissance	14

II-2-3 dénombrement des boites	15
III- Analyse statistique	17
Chapitre III : Résultats et discussions	
I- Isolement et dénombrement des spores de <i>B. cereus</i>	18
I -1 Isolement de <i>Bacillus cereus</i>	18
I -2 Prévalence et dénombrements des spores de <i>B. cereus</i> dans les épices	18
I -3 Niveau de contamination d'épices par les spores de groupe <i>B. cereus</i>	19
II- Etude de croissance des spores de <i>B. cereus</i>	22
Conclusion	28
Références biobibliographiques	29
Annexes	35

Liste des tableaux:

Tableau 1	Caractéristiques des deux types de maladies causées par <i>Bacillus cereus</i> . (Per Einar Granum, 2002).	5
Tableau 2	Le plan d'échantillonnage.	10
Tableau 3	les intervalles de temps utilisés pour suivre la croissance.	14
Tableau 4	La phase de latence (Lag) et le taux de croissance (μ_{max}) des souches de <i>B. cereus</i> dans la matrice alimentaire.	24

Liste des figures

Figure 1	Microscopie à phase contraste des spores de <i>Bacillus</i> (x1000). (Carlin, 2016).	4
Figure 2	Image de microscopie électronique à transmission d'une spore de <i>Bacillus cereus</i> . (Carlin, 2016).	4
Figure 3	Réservoirs environnementaux, voies de transmission et manifestations cliniques associées à l'infection par <i>Bacillus cereus</i> . (Tuipulotu et al., 2020).	6
Figure 4	La courbe de croissance bactérienne.	9
Figure 5	Les échantillons des épices de différents endroits de Ghardaïa.	10
Figure 6	Etape de peser des échantillons.	11
Figure 7	Etape d'homogénéisation des échantillons au Shaker.	11
Figure 8	Ensemencement d'échantillon d'épice sur MOSSEL.	12
Figure 9	Les colonies de <i>B. cereus</i> sur milieu MOSSEL complet.	12
Figure 10	Préparation de la matrice alimentaire.	13
Figure 11	Préparation des dilutions décimales.	14
Figure 12	Le compteur électronique des colonies.	15
Figure 13	Schéma générale de manipulation : étude de croissance.	16
Figure 14	Dénombrement des colonies <i>B. cereus</i> sur milieu MOSSEL.	18

Figure 15	Pourcentages de contamination des échantillons.	19
Figure 16	Comparaison (log N) des régions d'échantillonnage.	20
Figure 17	Prévalences des régions d'échantillonnage.	20
Figure 18	Niveau de contamination des épices	21
Figure 19	Cinétique de croissance de souche M obtenu par ajustement des résultats de dénombrement avec le modèle de Gompertz.	22
Figure 20	Cinétique de croissance des souches H et D obtenus par ajustement des résultats de dénombrement avec le modèle de Gompertz.	23
Figure 21	Cinétique de croissance des souches G et L obtenus par ajustement des résultats de dénombrement avec le modèle de Gompertz.	24
Figure 22	Préparation et stérilisation du milieu de culture.	I
Figure 23	préparation d'eau physiologique.	II
Figure 24	préparation du milieu Mossel complet.	III
Figure 25	Cinétique de croissance des souches A et B obtenus par ajustement des résultats de dénombrement avec le modèle de Gompertz.	V
Figure 26	Cinétique de croissance des souches C et J obtenus par ajustement des résultats de dénombrement avec le modèle de Gompertz.	VI
Figure 27	Cinétique de croissance de souche K obtenu par ajustement des résultats de dénombrement avec le modèle de Gompertz.	VII

Liste des abréviations :

± :	Plus ou moins
μmax :	Taux de croissance
AFNOR :	Association française de normalisation
Aw :	Activité de l'eau
<i>B. cereus</i> :	<i>Bacillus cereus</i>
Cyt K :	La cytotoxine K
g :	Gramm
h :	Heurs
HACCP :	Système d'analyse des dangers et points critiques pour leur maîtrise
hbl:	Hémolysine BL
ISO :	L'Organisation internationale de normalisation
Lag :	Phase de latence
min :	Minutes
ml :	Milliliter
NaCl :	Chlorure de sodium
Nhe :	Entérotoxine non hémolytique
pH :	Le potentiel hydrogen
Psi :	Pound per square inch
T :	Temperature °C
TIA :	Toxi-infection alimentaire
TIAC :	Toxi-infection alimentaire collectif
UAE :	United Arab Emirates
UFC :	Unité formant colonie
UV :	Ultraviolet
μl :	Microlitre

Introduction générale

L'histoire des herbes et des épices est aussi longue que l'histoire de l'humanité. Les gens utilisent ces plantes depuis les temps plus anciens.

Ils ont une importance énorme dans la façon de notre vie, comme ingrédients dans les aliments, la médecine, la parfumerie, les cosmétiques, les colorants et aussi les plantes de jardin. Ils sont utilisés pour préparer des aliments. Ils ont également des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, pharmaceutiques et nutritionnelles. **(Peter et Babu, 2004)**.

L'Organisation internationale de normalisation (**ISO**) définit les épices et condiments comme : Produits végétaux ou leurs mélanges, dépourvus de matières étrangères, utilisés pour aromatiser, assaisonner et donner de l'arôme dans les aliments.

Dans le pays d'origine, les épices sont récoltées, séchées, nettoyées, classées et emballées. **(Pinkas et al., 2009)**. Ces étapes sont à l'origine de la flore microbienne qui contamine les épices.

La flore totale contaminante des épices contient une variété de microorganismes ; Les bactéries prédominantes dans les épices sont des mésophiles aérobies sporulés du genre *Bacillus*. **(Pinkas et al., 2009)**. Les autres types de bactéries présentes sont : *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* et *Salmonella sp.* **(Farakos et Frank, 2014)**. Les bactéries qui résistent haut température de cuisson peuvent germer durant la durée de stockage après préparation.

Ces bactéries thermorésistantes sont très incriminées dans les toxi-infection alimentaire (TIA), surtout dans les préparations culinaires collectives.

En Algérie, peu d'études sur La caractérisation des espèces du groupe *B. cereus* isolés à partir des épices ont été réalisées. Notre contribution est une étude de la croissance des spores de *Bacillus cereus* dans une matrice alimentaire à température ambiante.

1/ Microbiologie de *Bacillus cereus* :

Le terme « bacillus » signifie une « petite tige », tandis que le mot « cereus », traduit du latin, signifie « cire ». L'espèce *Bacillus cereus* appartient au groupe appelé *B. cereus*. (Marrollo, 2016). Souvent utilisé comme synonyme du appelé groupe *B. cereus*. (Frentzel *et al.*, 2016).

Les bactéries du genre *Bacillus spp.* Sont largement présentes dans les milieux naturels et sont des contaminants courants des aliments. Elles sont Gram positif, aérobies et de nombreuses espèces sont facultatives anaérobies. (Carlin, 2016). Mobile. (Soleimani *et al.*, 2017). La bactérie forme des spores sous un stress environnemental comme l'absence des nutriments. (Abbas *et al.*, 2014).

L'espèce dans le genre *Bacillus* (les deux vie libre et pathogène) comprennent *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringensis*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. alcalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. fastidious*, *B. infernos*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. popilliae*, *B. psychrophilus*, *B. pasteurii* et *B. stearothermophilus*. (Okanlawon *et al.*, 2010). *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* et *B. weihenstephanensis* sont considérées comme des causes de détérioration des aliments plutôt que comme des maladies d'origine alimentaire. (Frentzel *et al.*, 2016).

B. cereus est souvent trouvé contaminant des échantillons d'aliments tels que pâtes, riz, viande, poulet, légumes, fruits, céréales, épices, en poudre lait et autres aliments pulvérisés. (Sanchez-Chica *et al.*, 2020). Elle est généralement considérée comme un micro-organisme mésophile, avec une plage de température pour croissance entre 10 et 50 °C (avec un maximum entre 28°C et 37°C). De plus, seules quelques souches peuvent se multiplier à moins de 7°C et plus 45°C. L'agent pathogène peut croître à un pH de 4,3 à 9,3 (avec optimum entre 6,0 et 7,0) et au minimum de l'activité de l'eau (aw) de 0,92. (Osimani *et al.*, 2018).

2/ *Bacillus cereus* et ses endospores :

Les spores des espèces du groupe *Bacillus cereus* sont des contaminants fréquents des aliments, y compris les épices et plantes. (Frentzel *et al.*, 2016). Ils sont largement

distribués dans l'environnement et les produits alimentaires. Il peut former des spores qui sont capables de survivre à la cuisson températures. (Hwang et Huang, 2018).

Les spores de *B. cereus* sont très résistantes à la déshydratation, traitements thermiques et pendant la préparation des aliments. (Bursová *et al.*, 2017). Ils sont capables de résister aux contraintes chimiques et physiques telles que séchage à l'air, haute température, haute pression, lumière UV et acidité. (Abbas *et al.*, 2014).

Les spores de *B. cereus* sont allongées, caractérisées par un noyau entouré d'une membrane interne, d'un cortex peptidoglycane, d'une couche interne et d'une couche externe. Les spores bactériennes n'ont aucune activité métabolique. (Tuipulotu *et al.*, 2020).

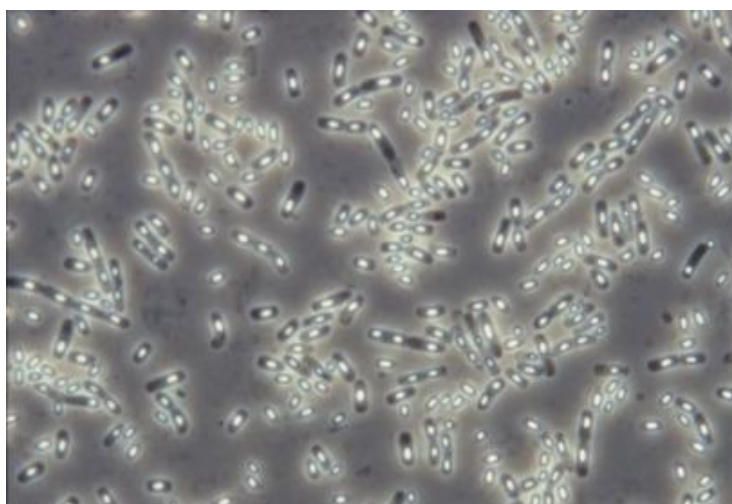


Figure 1 : Microscopie à phase contraste des spores de Bacillus (x1000). (Carlin, 2016).

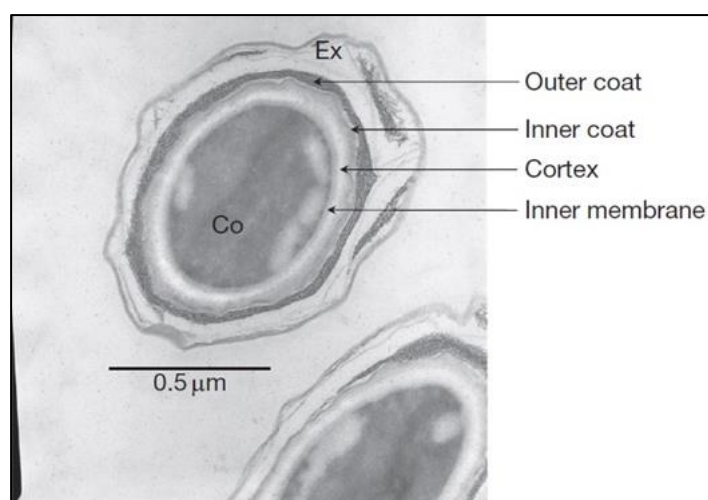


Figure 2 : Image de microscopie électronique d'une spore de *B. cereus*. (Carlin, 2016).

3/ Facteurs de virulence *Bacillus cereus* :

B. cereus peut produire des toxines causant deux types d'intoxication alimentaire, l'émétique et intoxication diarrhéique. (Hwang et Huang, 2018).

B. cereus cause deux types d'intoxication alimentaire à savoir les formes diarrhéiques et émétiques. Les toxines de *B. cereus* causant l'intoxication alimentaire avec des symptômes diarrhéiques sont principalement les trois entérotoxines formant des pores ; cytolysine K (CytK), entérotoxine non hémolytique (Nhe), et hémolysine BL (Hbl). La toxine émétique, le cérulide, à la structure du dodécadepsipeptide. (Cadirci *et al.*, 2018).

Tableau 1 : Caractéristiques des deux types de maladies causées par *Bacillus cereus*. Per Einar Granum, (2002).

	Syndrome diarrhéique	Syndrome émétique
Dose infectant	10^5-10^7 cellule/g	10^5-10^8 cellule/g
Toxine produite	Dans l'intestin grêle de l'hôte	Préformé dans l'aliment
Type de toxine	protéine(s)	peptide cyclique
Période d'incubation	8 à 16 h (parfois plus de 24 h)	0.5–5 h
Durée de la maladie	12 à 24 h (parfois plusieurs jours)	6–24 h
Symptômes	Douleurs abdominales, diarrhée aqueuse (parfois diarrhée sanglante) parfois avec nausées	Nausées, vomissements et malaises (parfois suivis de diarrhée, en raison de la production supplémentaire d'entérotoxines)
Aliments impliqués	Produits de viande, soupes, légumes, poudings/sauces et produits laitiers	Riz frit et cuit, pâtes, pâtisserie et nouilles

4/ La présence de *Bacillus cereus* dans les aliments :

Bacillus cereus est une bactérie ubiquitaire et souvent isolée du sol et des plantes. De cet environnement naturel, il se propage facilement aux aliments, en particulier ceux d'origine végétale. Il est fréquemment présent dans les matières premières et les ingrédients utilisés dans l'industrie alimentaire tels que les légumes, et les épices. (Granum et Lindback, 2013).

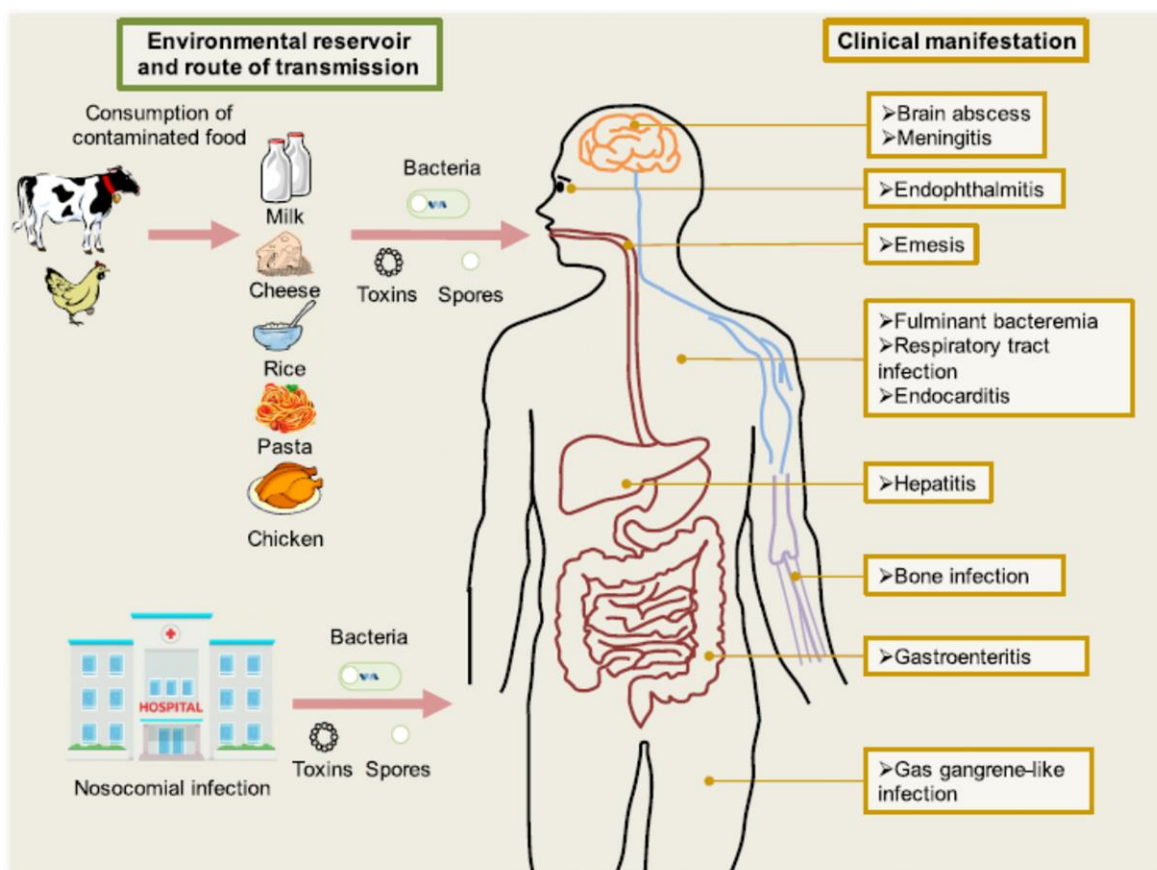


Figure 3 : Réservoirs environnementaux, voies de transmission et manifestations cliniques associées à l'infection par *Bacillus cereus*. (Tuipulotu et al., 2020).

Si l'on considère la distribution ubiquitaire de *B. cereus* dans l'environnement naturel et les spores résilientes qu'il produit, ainsi que la nature non fastidieuse de ce micro-organisme, il ressort clairement que chaque type d'aliment dont le pH est supérieur à 4,8 peut être un véhicule potentiel ou un aliment courant la détérioration, ce qui favorise l'infection d'origine alimentaire. Défaut des consommateurs d'effectuer les procédures correctes de préparation des aliments (par exemple, inadéquates ou refroidissement lent, stockage à température ambiante, ou assis à 60 °C pour un temps prolongé) peut être

responsable de la réplication de *B. cereus* et être en retard cas de maladie d'origine alimentaire par cet organisme. (Marrollo, 2016).

5/ La présence de *Bacillus cereus* dans les épices :

Les épices et les herbes peuvent présenter des niveaux microbiens élevés allant jusqu'à 10^8 (UFC)/g. Parmi les microorganismes détectables figurent également des espèces pathogènes qui peuvent causer des maladies d'origine alimentaire, parmi ces bactéries : *Bacillus cereus*. Des épices et des herbes sont ajoutées à divers aliments. Ainsi, des condiments contaminés peuvent servir de véhicule pour transférer des agents pathogènes aux aliments. (Thanh *et al.*, 2016)

Les cuisines qui incorporent des épices peuvent poser un risque pour la santé publique parce qu'elles sont souvent ajoutées à des aliments qui ne subissent aucune transformation ultérieure ou qui sont consommés crus. Les épices sont la principale source de bactéries sporadiques dans de grands volumes d'aliments, comme les soupes, les ragoûts et les gravies produits par les établissements de restauration. (Banerjee, M. et Sarka, P. K., 2003).

6/ *Bacillus cereus* et les intoxications alimentaires :

Bacillus cereus est largement reconnu comme un organisme d'intoxication alimentaire. (Granum, 2002). Ce sont des contaminants naturels des matières premières sous leur forme sporulée. Tout au long de la chaîne alimentaire, de la ferme à la fourchette, les spores contaminantes peuvent rencontrer des conditions environnementales qui permettent leur germination menant à une excroissance cellulaire. Après leur émergence, les cellules végétatives peuvent croître jusqu'à atteindre des concentrations élevées lorsqu'elles peuvent former des biofilms ou se différencier en spores résistantes. Les conditions de sporulation ont un fort impact sur la production de spores et leurs propriétés de résistance. Ces spores nouvellement formées seront des sources de recontamination des produits alimentaires, des produits finaux et des lignes d'équipement de transformation des aliments, et peuvent résister aux traitements. (Gauvry *et al.*, 2021).

La contamination d'un produit alimentaire par *Bacillus cereus* n'entraîne pas nécessairement une modification des propriétés organoleptiques, ce qui peut nuire au consommateur sans suspicion. (Chorin *et al.*, 1997).

7/ Modélisation de croissance bactérienne et les paramètres d'étude :

La modélisation prédictive est un domaine prometteur de la microbiologie alimentaire. Ces modèles sont des équations mathématiques utilisés pour décrire le comportement des microorganismes dans différentes conditions physiques ou chimiques telles que la température, le pH et l'activité de l'eau. (Zwietering, M. H. *et al.*, 1990). Ils peuvent être utilisés aussi pour estimer la croissance, la survie et l'inactivation des microbes. (Da-Young L. *et al.*, 2017).

Ces modèles permettent de prédire la sécurité microbienne ou la durée de conservation des produits, de détecter les parties critiques du processus de production et de distribution et d'optimiser les chaînes de production et de distribution. Pour construire ces modèles, la croissance doit être mesurée et modélisée.

Un certain nombre de modèles de croissance se trouvent dans la littérature, tels que les modèles de Gompertz, Richards, Schnute, et le modèle logistique et d'autres. Les modèles ne sont pas écrits en termes de taux de croissance, de temps de décalage et de valeur asymptotique, ce qui rend l'interprétation des valeurs des paramètres difficile. (Zwietering, M. H. *et al.*, 1990).

Les modèles primaires décrivent les changements de comportement microbien ou d'autres réponses microbiennes avec le temps. Ils sont largement utilisés pour adapter les données de croissance microbienne observées et prédire les taux de croissance microbienne.

Les modèles secondaires décrire les réponses des principaux modèles aux changements dans les conditions environnementales telles que la température, le pH ou l'activité de l'eau. Parmi ceux-ci, la température est le principal facteur influant sur la croissance bactérienne qui est susceptible de montrer des variations au cours de la transformation et de l'entreposage des aliments ; par conséquent, un certain nombre de

modèles prédictifs de la croissance bactérienne dans les aliments ont été élaborés pour modéliser l'effet des changements de température. (Da-Young L. et al., 2017).

Les bactéries croissent de façon exponentielle, il est souvent utile de tracer le logarithme de la taille relative de la population [$y = \ln(N/N_0)$] en fonction du temps (figure 4). L'étude de croissance peut être décrite par trois paramètres : le taux de croissance spécifique maximal (μ_{\max}) est défini comme la tangente dans le point d'inflexion ; le temps de latence (lag) est défini comme l'interception de cette tangente sur l'axe x ; et l'asymptote [$A = \ln(N_{\infty}/N_0)$] est la valeur maximale atteinte. (Zwietering, M. H. et al., 1990).

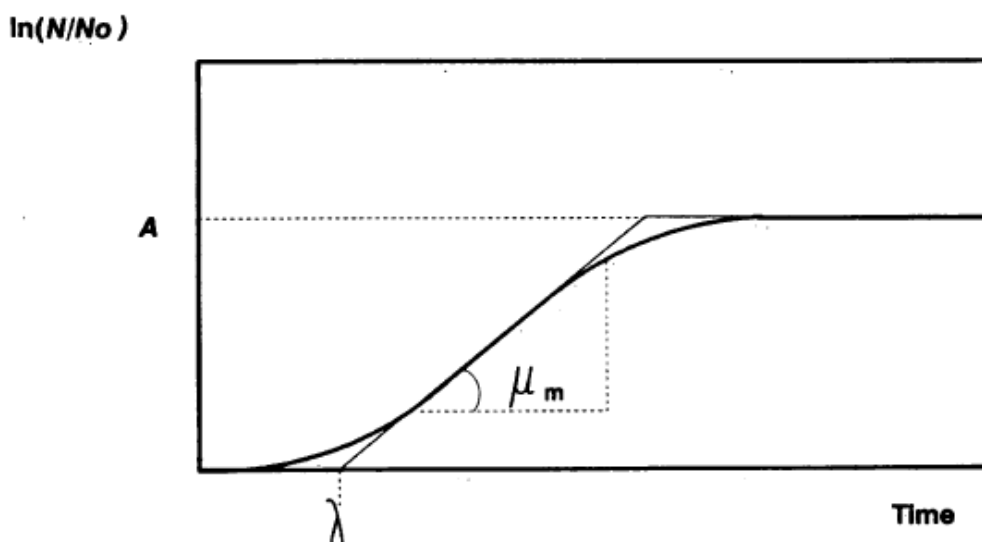


Figure 4 : La courbe de croissance bactérienne.

Da-Young L. et al., en 2017 ont étudiés la croissance de *Bacillus cereus* isolé du tofu en utilisant le modèle modifier de Gompertz. Les résultats ont été utilisées pour déterminer la température idéale pour le stockage sûr du tofu.

Juneja, V. K., et al., en 2019 ont étudiés la croissance de *Bacillus cereus* dans le riz cuit. Les modèles de croissance primaires, tel que Baranyi, Huang, Gompertz modifié, et le modèle logistique ont été adaptés aux données de croissance. Ce modèle soutenir l'industrie à élaborer des contrôles préventifs et des systèmes HACCP, notamment en aidant à élaborer des limites de contrôle critiques ainsi qu'à réduire les coûts d'exploitation, et à se protéger contre les dangers associés à la croissance excessive de *B. cereus* dans le riz cuit.

Matériel et Méthodes :

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie de département de Biologie à l'université de Amar Telidji -Laghouat.

I- Isolement et dénombrement des spores de *B. cereus* :

I-1- Prélèvement des spores de *Bacillus cereus* :

Les échantillons ont été prélevés directement auprès des épiceries de différents endroits dans les wilayas de Ghardaïa et Tlemcen. Au total, 30 échantillons ont été prélevés et acheminés au laboratoire.



Figure 5 : Les échantillons des épices de différents endroits de Ghardaïa.

Tableau 2 : Le plan d'échantillonnage.

Endroit	Nombre des échantillon	Date de prélèvement
Ghardaïa (centre-ville)	5	Mars / Avril 2021
El Meniaa	5	
Berriane	5	
El Guerrara	5	
Maghnia 1	5	Septembre 2020
Maghnia 2	5	Septembre 2020

I-2- Préparation des échantillons des épices et leurs dilutions :

À l'aide d'une cuillère stérile, une quantité de 10g d'épice a été pesé aseptiquement puis mise dans 90 ml d'eau peptonée tamponnée (Cette dilution constitue la dilution 10^{-1}). Les mélanges (épice + diluant) étaient ensuite portés au Shaker pour être homogénéiser pendant 15 min. par la suite ces préparations ont été mise au bain marie à 80°C pendant 10 min. Ensuite, ils ont été mise directement au bain glace pendant 30s. ce traitement thermique permet d'éliminer la flore végétative omniprésente dans les épices. Finalement, une série des dilutions décimales (10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4}) a été réalisée dans l'eau peptonée tamponnée.



Figure 6 : Etape de peser des échantillons.



Figure 7 : Etape d'homogénéisation des échantillons au Shaker.

I-3- Dénombrement des spores de *B. cereus* sur milieu Mossel :

Un volume de 0,1 ml des dilutions 10^{-3} et 10^{-4} ont été étalé à la surface de la gélose Mossel complet coulée dans des boîtes de Pétri. Les cultures ont été incubées à 30°C pendant 24h et 48h. Les colonies développées sur Mossel (résistance à la polymixine B) et donnant un aspect rose (absence de fermentation de mannitol) avec un halo opaque (production de lécithinase) ont été comptées.



Figure 8 : Ensemencement d'échantillon d'épice sur MOSSEL.

II- Etude de croissance :

II-1- Souches et modèle utilisés :

L'étude de la croissance d'une bactérie c'est le suivi de sa propagation en fonction de temps afin d'établir la courbe de croissance.

Le modèle utilisé pour décrire les résultats obtenus c'est le modèle de Gompertz 1988. Qui été appelé à l'époque la loi théorique de la mortalité de Gompertz. (Tjørve et Even Tjørve, 2017).

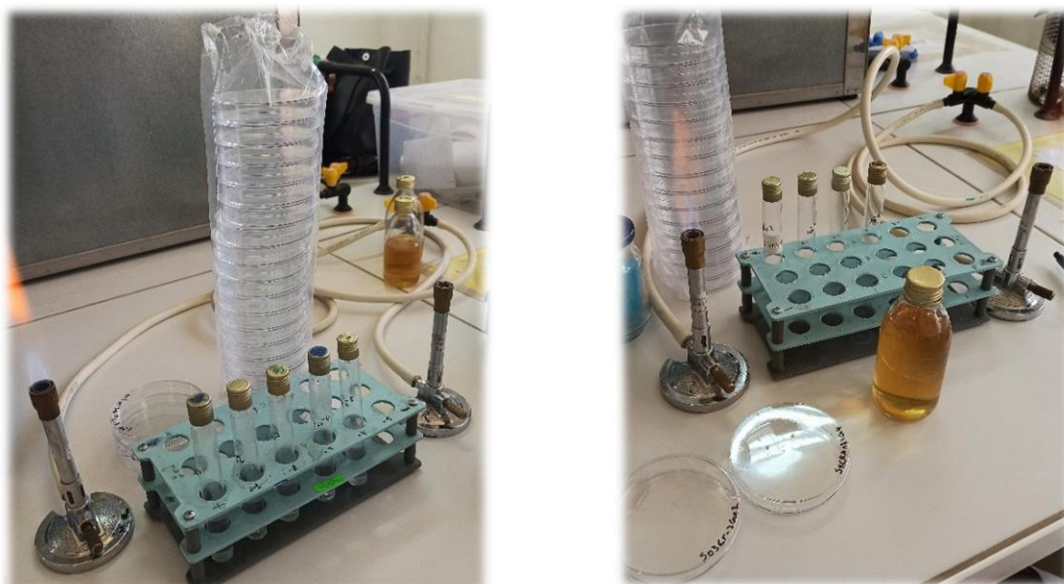
II-1-1 Ensemencement des souches de *B. cereus* :

A l'aide d'une micropipette, 100 µl de stocks de spores contenant environ 10^8 cellules a été inoculé dans un flacon de 90 ml contenant la soupe stérile. Après homogénéisation à l'aide d'un vortex, le contenu des flacons a été réparti dans 17 tubes à essai puis transféré à l'étuve de 25°C.

II-1-2 suivi de croissance :

Suivant un temps bien déterminé on prend un tube qui contient la matrice pour faire la dilution décimale jusqu'au $10^{-5}/10^{-6}$ ou 10^{-7} (selon la charge microbienne). Après, on ensemence 1ml des deux dernières dilutions dans des boîtes de pétri. Par la suite, les boîtes ont été coulées par le gélose nutritive (ensemencement en mass) et placées dans l'étuve à 30°C pendant 24h.

Figure 11 : Préparation des dilutions décimales.



II-2-3 dénombrement des boîtes :

Le dénombrement a été effectué à l'aide d'un compteur des colonies. Les résultats de dénombrement sont exprimés suivant la norme AFNOR, (1995) :

$$N(\text{ufc/mL}) = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0.1 n_2) d}$$

D'où :

ΣC : somme des colonies comptées sur une boîte retenue des dilutions effectuées ;

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

n_1 : nombre des boîtes retenues à la première dilution;

n_2 : nombre des boîtes retenues à la seconde dilution;

d : facteur de dilution correspondant à la première dilution retenue.

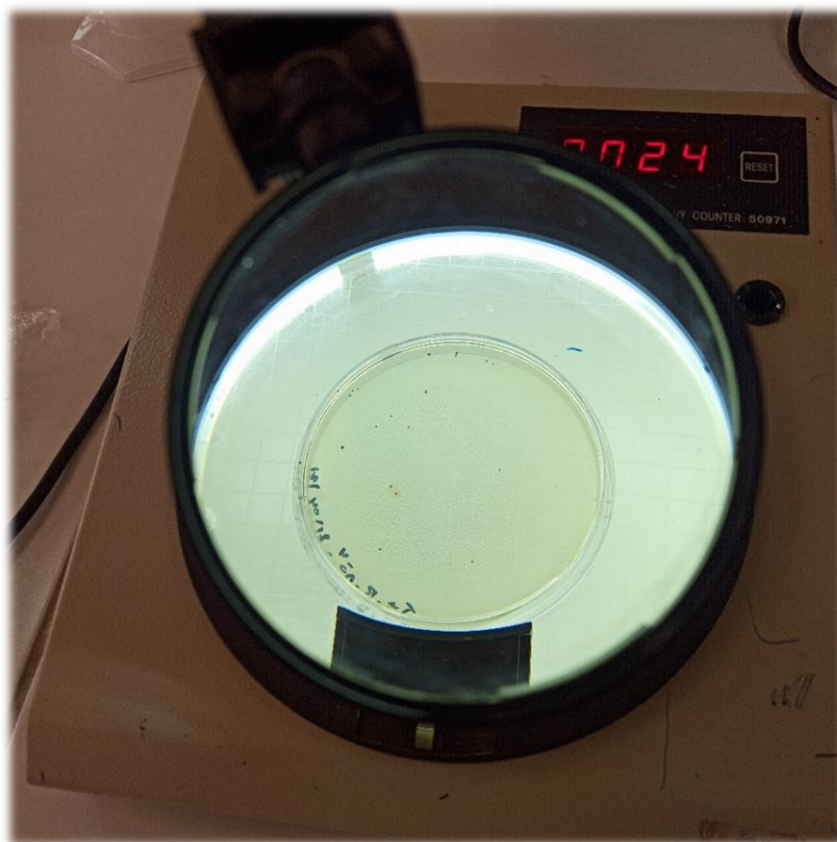


Figure 12 : Le compteur électronique des colonies.

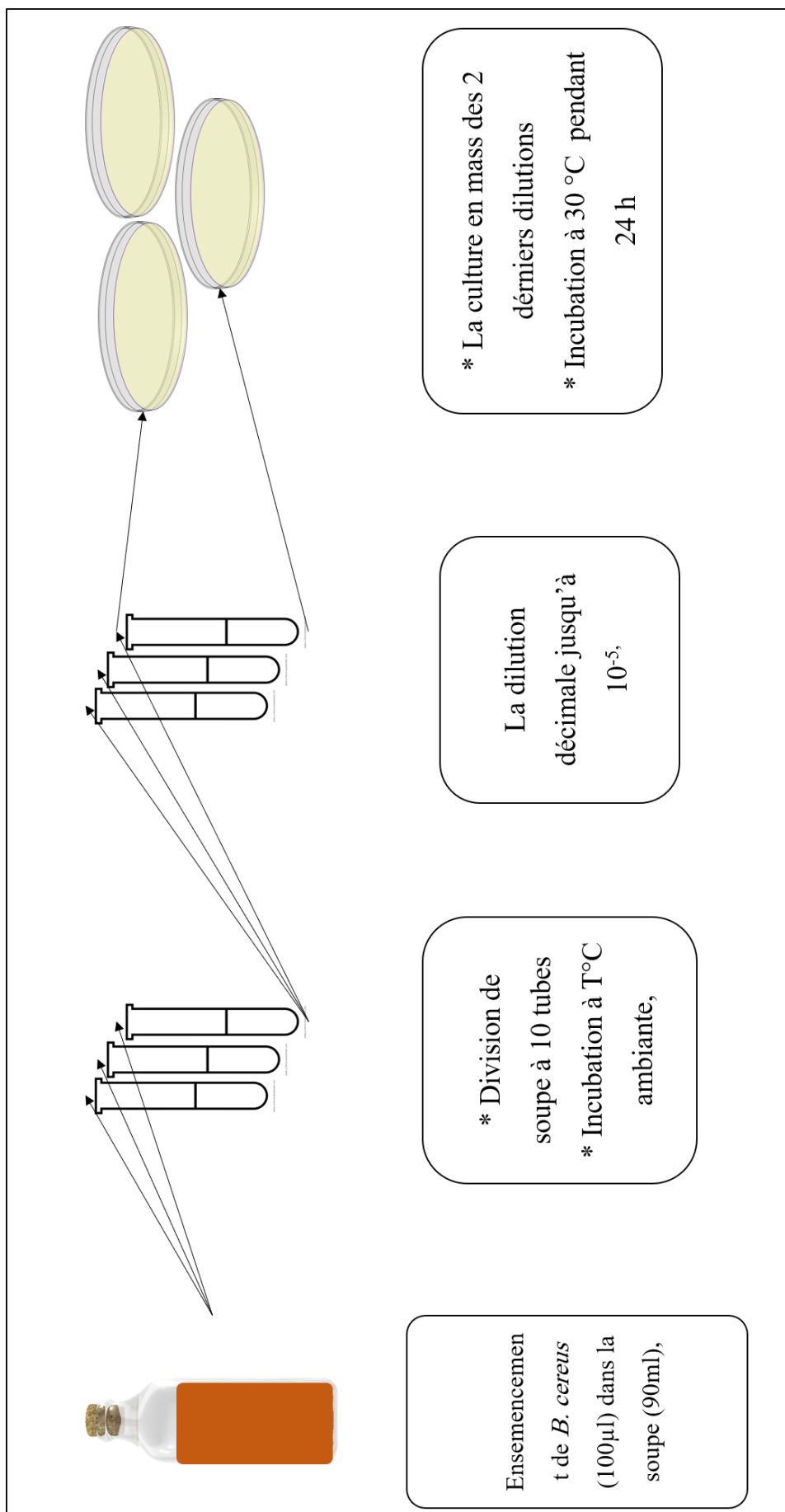


Figure 13 : Schéma générale de manipulation : étude de croissance.

III- Analyse statistique :

Afin d'obtenir des courbes de croissance fiable, tous les résultats ont été ajustés à la fonction du model Gompertz à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 9.2.1.

Microsoft Excel 360 a été utilisé pour calculer le taux de croissance et la phase de latence (lag).



Résultats et discussions

I- Isolement et dénombrement des spores de *B. cereus* :

I-1 Isolement de *Bacillus cereus* :

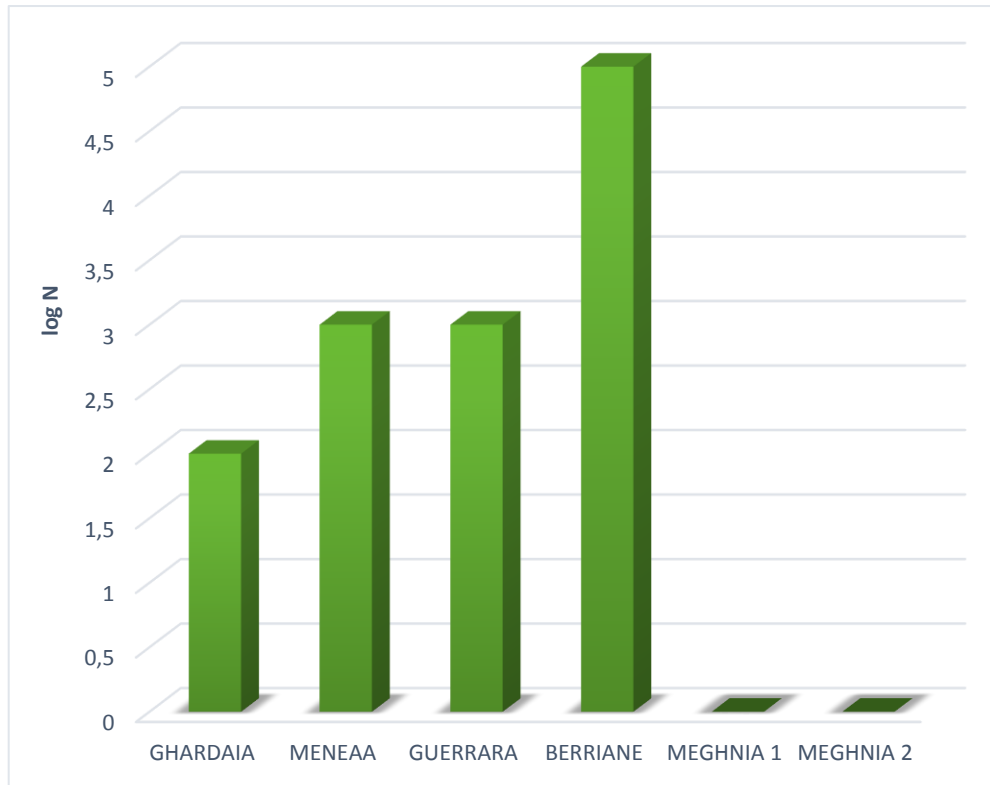
Les résultats obtenir à partir de cette expérience sont des isolats des spores de *B. cereus*, présentent essentiellement dans les épices isolées de différent endroits.

Après ensemencement sur milieu Mossel complet à émulsion de jaune d'œuf puis incubation à 30°C pendant 48h. Les colonies présumées de *B. cereus* sont de couleur rose et entourées par une zone opaque. Cette zone indique l'hydrolyse de la lécithine de jaune d'œuf suite à la production de la lécithinase par les cellules de *B. cereus*.

I-2 Prévalence et dénombrements des spores de *B. cereus* dans les épices :

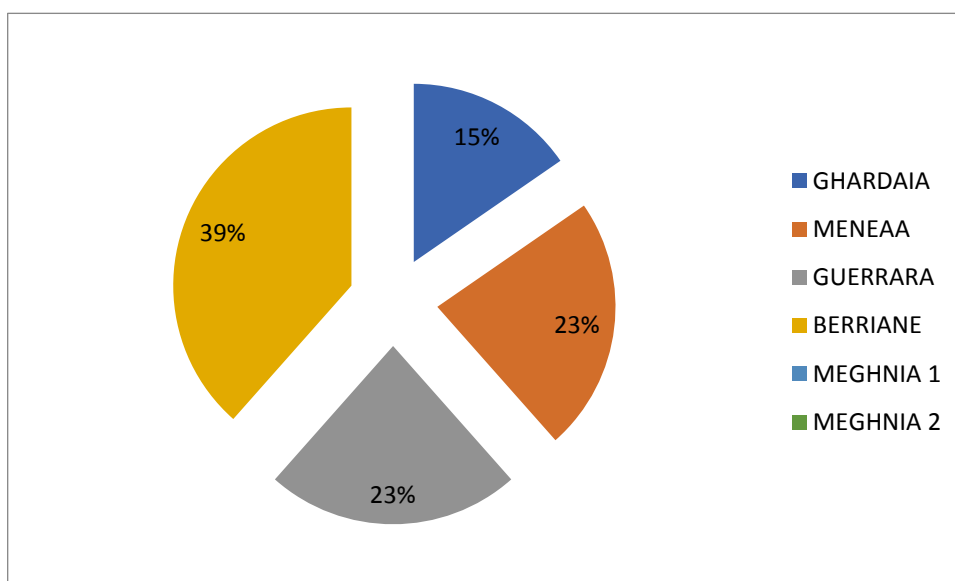
Après le dénombrement, on constate que les épices prélevées dans la wilaya de Ghardaïa semblent être les plus contaminées par rapport à celles de wilaya de Tlemcen.

Figure16 : Comparaison (log N) des régions d'échantillonnage.



Nos résultats ont montré une contamination plus élevée à Berriane avec une prévalence de 39%, puis Guerrara et El Meneaa avec une moyenne contamination de prévalence de 23% pour les deux régions, et finalement Ghardaïa avec une faible contamination avec une prévalence de 15%.

Figure 17 : prévalences des régions d'échantillonnage.



Ce résultat est comparable avec le travail de **Moore, E. R. et al. en 2019**, qui ont montré que dans 27 épices achetées sur les marchés de détail, entre juillet 2016 et juillet

2017, les niveaux de contamination des épices enregistrés était de l'ordre de (6,88 log₁₀ ufc/g) et le gingembre avait le niveau le plus bas de contamination (4,18 log₁₀ ufc/g). Aussi le travail de **Antai, (1987)**, Une étude basée au Nigeria sur un total de 230 échantillons de poivre alligator, poivre rouge, poivre noir, thyme et curcuma poudre, Les résultats des dénombrements totaux variaient de $1,8 \times 10^4$ jusque $1,1 \times 10^8$ bactéries/g. La plupart des épices testées ont été élevée de *Bacillus cereus*.

La proportion et la concentration de ces spores dans les épices est probablement liés aux étapes de fabrication : plantation et récolte, procédés de transformation des épices. Les spores persistent dans les épices et résistent aux conditions hostiles et s'attachent aux surfaces.

II- Etude de croissance des spores de *B. cereus* :

Les microbiologistes divisent traditionnellement les courbes de croissance bactérienne en phases décalées, latence, exponentielles et stationnaires. (Baranyi et Pin, 1999). La phase de latence c'est où le microorganisme va s'adapter au milieu pour exploiter les nutriments nécessaires pour multiplier et croître. Le taux de croissance (μ_{max}) qui exprime la vitesse de multiplication des bactéries étudiées.

Les résultats de dénombrement de dix souches ont été ajustés avec le modèle primaire de Gompertz (1988). Par ce modèle les deux paramètres de croissance : phase de latence 'Lag' et le taux de croissance ' μ_{max} ' ont été calculés. Les 5 meilleures souches avec une courbe de croissance non linéaire ont été choisies pour être discutées.

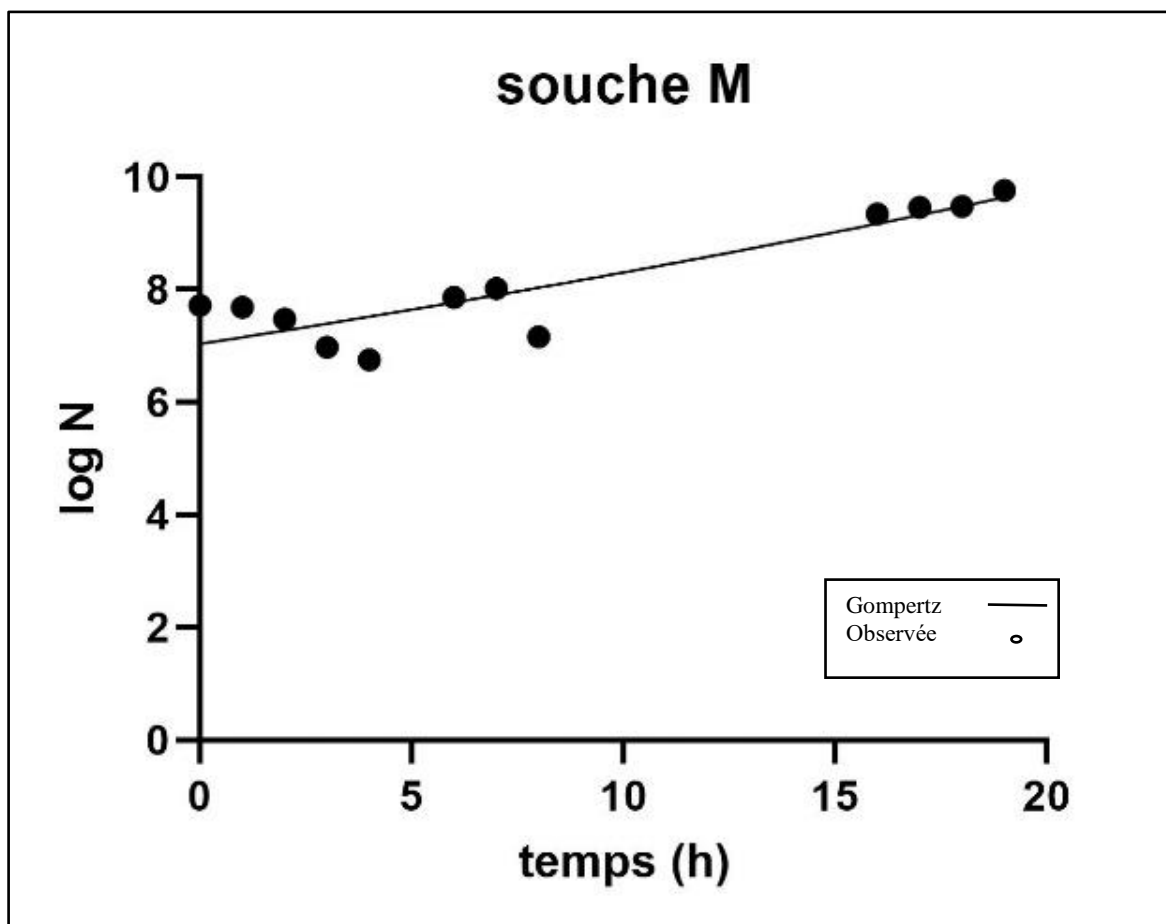


Figure 19 : Cinétique de croissance de souche M obtenue par ajustement des résultats de dénombrement avec le modèle de Gompertz.

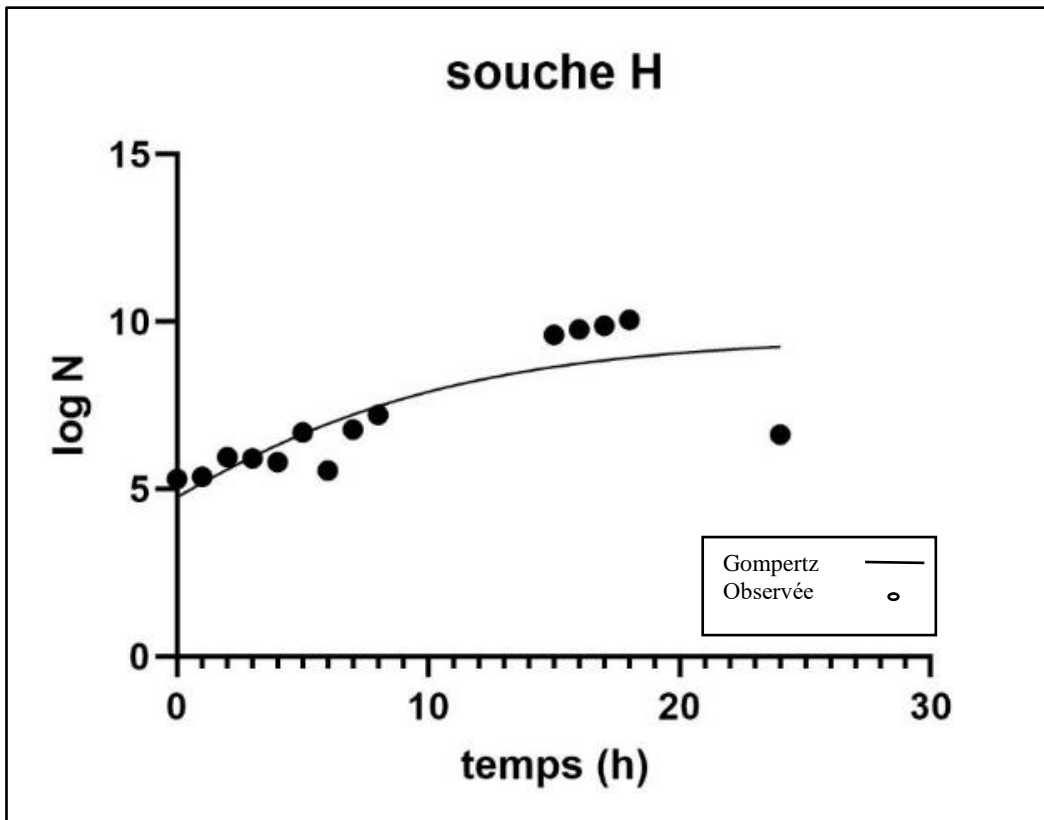
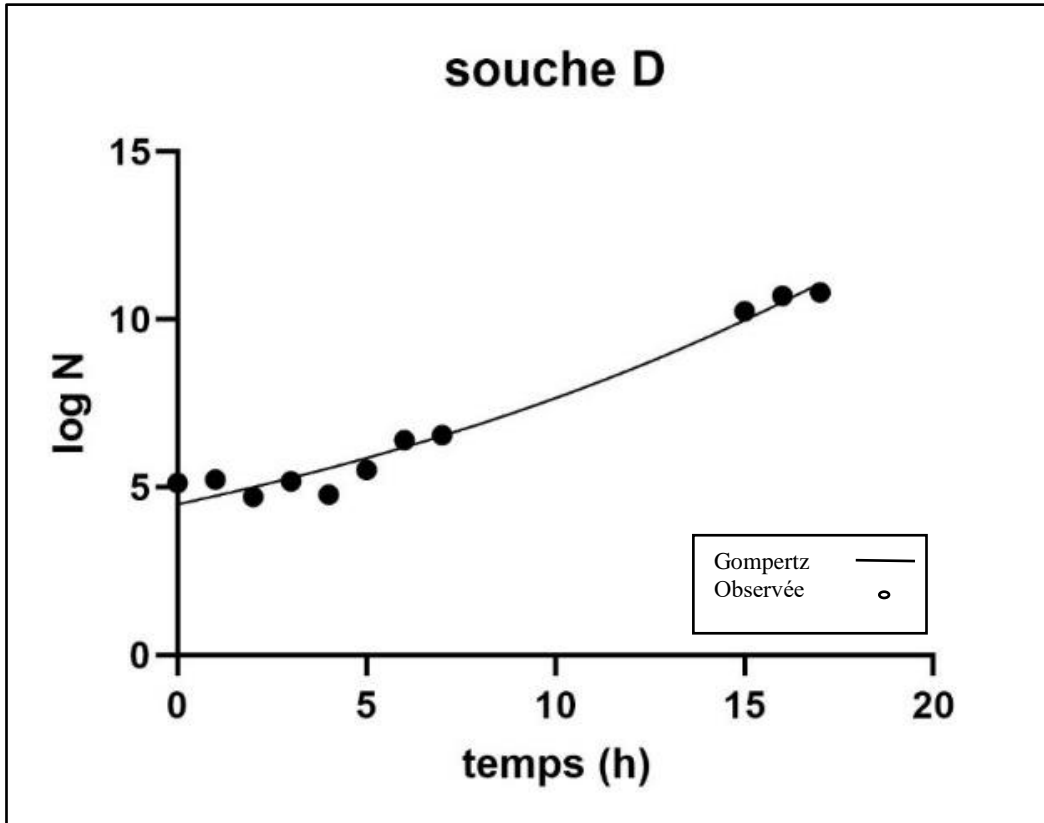


Figure 20 : Cinétique de croissance des souches D et H obtenus par ajustement des résultats de dénombrement avec le modèle de Gompertz.

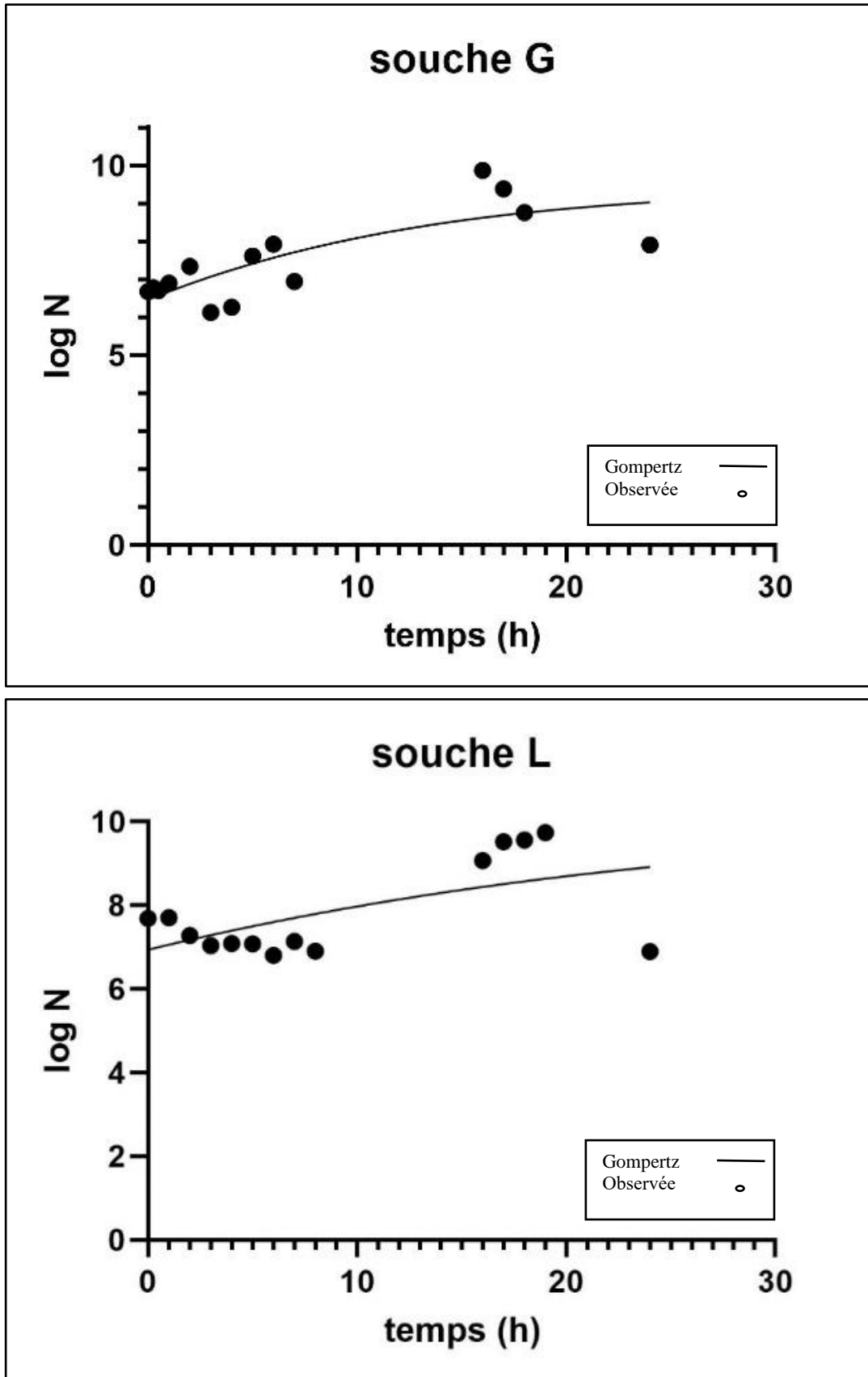


Figure 21 : Cinétique de croissance des souches G et L obtenus par ajustement des résultats de dénombrement avec le modèle de Gompertz.

Cette hétérogénéité peut être due à la différence entre les espèces puisque les souches n'ont pas été identifiées par biologie moléculaire.

Une phase de latence prolongée signifie que la souche ne possède pas le matériel enzymatique nécessaire pour la dégradation des composants de la matrice alimentaire.

Au cours de la germination des spores de *B. cereus*, une phase de latence prolongée minimise le risque alimentaire lié à la consommation de l'aliment contaminé tout en ralentissant la croissance des cellules pour atteindre un taux critique 10^5 ufc/g.

Valero, M., et al., (2000) qui ont trouvés un intervalle de [7.6-7.7h], tandis que **Young-Min Bae et al., en 2012** ont montrés que le lag de *B. cereus* égale à 8.6 h cette valeur est comparable avec les résultats obtenues.

Comme signalé dans la synthèse bibliographique, les bactéries du groupe *Bacillus* sont reconnues pour leur incrimination dans les TIAC à la suite de la consommation de quantité toxique en bactéries et/ou leurs toxines. Cette consommation est à l'origine des intoxications aiguës dont l'apparition est immédiate

Le développement des bactéries dépend de la température de stockage qu'elle-même dépend étroitement du climat de la région. Généralement, les plats cuisiniers à base d'épices sont gardés à une température ambiante avant la première consommation et/ou réfrigérateur pour plusieurs consommations.

Bacillus cereus groupe IV se développe bien à des températures ambiantes car leur température optimale est de 38°C. À cette température, le taux de sa croissance est maximal mais quand la température s'en éloigne, la croissance ralentit.

Ziane et al., (2016) ont mentionné que le taux de croissance de *Bacillus cereus* groupe IV, déterminé dans la semoule du couscous à 30 °C, était similaire à celui estimé de *Bacillus cereus* groupe IVensemencées dans le riz (**Gilbert et al., 1974**)

Par ailleurs, le temps de latence de *Bacillus cereus* testé est largement suffisant pour la germination des spores de *Bacillus cereus*. Ces résultats ont montré aussi que la souche de *Bacillus cereus* étudiée peut atteindre des concentrations toxiques.

Selon **Carlin et al. (2013)**, la croissance de *B. cereus* du groupe IV se développe à des températures comprises entre 8 °C et 48 °C, avec une température optimale proche de 38 °C. Les cellules de *Bacillus cereus* se multiplient à des vitesses variables qui atteignent son maximum à la température optimale. À partir de ces valeurs de températures cardinales T_{min} , T_{max} T_{opt} , les taux de croissance différents ont été calculés en utilisant des modèles de températures cardinales développés par **Rosso et al. (1996)**.

Valero, M., et al., (2000) qui ont montrés que le $\mu_{max} = [0.647-0.738]$. Et **Young-Min Bae et al., en 2012** qui ont enregistré de $\mu_{max} = 0.443$.

Les spores sont présentes dans les ingrédients des plats cuisiniers ont plusieurs origines dont la principale est les épices. Cette charge peut être amplifiée au cours du stockage et conservation avant consommation.

La connaissance de ces paramètres de croissance peut être un outil pour évaluer le risque lié à la consommation des spores de *B. cereus* dans les produits alimentaires à base des épices.

Références bibliographies :

[A]

Abbas, A. Planchon, S. Jobin, M. Schmitt, P. (2014). A new chemically defined medium for the growth and sporulation of *Bacillus cereus* strains in anaerobiosis. *Journal of Microbiological Methods*, page 54–58.

Antai, S. P. (1987). Study of the *Bacillus* fora of Nigerian spices. *International Journal of Food Microbiology*, 6, 259-261 (1988).

[B]

Bae, Y-M. Kim, B-R. Lee, S-Y. Cha, M. Park, K-H. Chung, M-S. Ryu, K. (2012). Growth and Predictive Model of *Bacillus cereus* on Blanched Spinach with or without Seasoning at Various Temperatures. *Food Sci. Biotechnol*, 21(2), page 503-508.

Banerjee, M. et Sarka, P. K. (2003). Microbiological quality of some retail spices in India. *Food Research International*, 36 (2003), pages 469–474.

Baranyi, J. Pin, C. (1999). Estimating Bacterial Growth Parameters by Means of Detection Times. *Applied and environmental microbiology*, volume 65, page 732–736.

Berthold-Pluta, A. Pluta, A. Garbowska, M. Stefanska, I. (2019). Prevalence and Toxicity Characterization of *Bacillus cereus* in Food Products from Poland. *Foods*, 8, 269.

[C]

Cadirci, O. Gucukoglu, A. Gulel, G.T. Uyanik, T. (2018). Enterotoxigenic structures of *Bacillus cereus* strains isolated from ice creams. *Food safety*, DOI: 10.1111/jfs.12537.

Carlin, F. (2016). *Bacillus cereus* and Other *Bacillus sp.* Causing Foodborne Poisonings, Detection of. Elsevier Ltd.

Chorin, E., Thuault, D., Cléret, J.-J., Bourgeois, C.-M. (1997). Modelling *Bacillus cereus* growth. *International Journal of Food Microbiology*, 38 (1997), pages 229–234.

[D]

Da-Young Lee, Ki-Hyun Kwon, Changhoon Chai, Se-Wook Oh. (2017). Microbial contamination of tofu in Korea and growth characteristics of *Bacillus cereus* isolates in Tofu. *LWT - Food Science and Technology*, 78 (May 2017), pages 63-69.

[F]

Farakos, S. M. S., et Frank, J. F. (2014). ‘Challenges in the Control of Foodborne Pathogens in Low-Water Activity Foods and Spices’. Dans: **Gurtler, J. B., Doyle, M. P., Kornacki, J. L.** *The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices*. New York, USA: Springer, pages 15-22.

Fogele, B. Granta, R. Valcina O, Berzins, A. (2017). Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. *Food Control*, page 1-6.

Frentzel, H. Kraushaar, B. Krause, G. Bodi, D. Wichmann-Schauer, H. Appel, B. Mader, A. (2016). Phylogenetic and toxinogenic characteristics of *Bacillus cereus* group members isolated from spices and herbs. *Food Control*.

[G]

Gauvry, E., Mathot, A.G., Couvert, O., Leguérinel, I., Coroller, L. (2021). Effects of temperature, pH and water activity on the growth and the sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1. *International Journal of Food Microbiology*, 337.

Granum, P. E. et Lindback, T. (2013). ‘*Bacillus cereus*’. Dans : **M. P. Doyle and R. L. Buchanan.** *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington, D.C, USA : ASM Press, pages 491-499.

[H]

Hwang, C. Huang, L. (2018). Growth and Survival of *Bacillus cereus* from Spores in Cooked Rice – One-Step Dynamic Analysis and Predictive Modeling. *Food Control*, S0956-7135(18)30497-3.

[J]

Juneja, V. K., Golden, C. E., Mishra, A., Harrison, M. A., Mohr, T., Silverman, M. (2019). Predictive model for growth of *Bacillus cereus* during cooling of cooked rice. *International Journal of Food Microbiology*, 290 (february 2019), Pages 49-58.

[M]

Marrollo, R. (2016). Microbiology of *Bacillus cereus* dans: vincenzo savini, The diverse faces of bacillus cereus. London: Academic Press (Elsevier). Page: 1-13.

Moore, R. E. Cherie Millar, B. Panickar, J. R. E. Moore, J. E. (2019).

Microbiological safety of spices and their interaction with antibiotics: implications for antimicrobial resistance and their role as potential antibiotic adjuncts. *Food Quality and Safety*, Volume 3, Issue 2, Pages 93–97.

[O]

Okanlawon¹, B.M. Ogunbanwo, S.T. Okunlola, A.O. (2010). Growth of *Bacillus cereus* isolated from some traditional condiments under different regimens. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (14), pp. 2129-2135.

Osimani, A. Aquilanti, L. Clementi, F. (2018). *Bacillus cereus* foodborne outbreaks in mass catering. *International Journal of Hospitality Management*, 72 (2018) 145–153.

[P]

Per Einar Granum. (2002). ‘*Bacillus cereus* and Food Poisoning’. Dans: **Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N., De Vos, P.** Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives. MA, USA: Blackwell Publishing, pages 37-44.

Peter, K. V. (2001). Handbook of herbs and spices. (Volume 1). Woodhead Publishing Cambridge England. 332 pages.

Peter, K. V. Babu, N. (2004). Handbook of herbs and spices. (Volume 2). Woodhead Publishing Cambridge England. 374 pages.

Pinkas, J. M., Battista, K., & Morille-Hinds, T. (2009). 'Microbiological Spoilage of Spices, Nuts, Cocoa, and Coffee'. Dans : **Sperber, W. H., Doyle, M. P.** Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. New York, USA : Springer, pages 325-342.

[R]

Roberta Marrollo. (2016). 'Bacillus Cereus Food-Borne Disease'. Dans : **Vincenzo Savini.** The Diverse Faces of *Bacillus Cereus*. London : Academic Press (Elsevier), Pages 61-68.

[S]

Sanchez-Chica, J. Correa, M. Aceves-Diez, A. Castaneda-Sandoval, L.M (2020). A novel method for direct detection of *Bacillus cereus* toxin genes in powdered dairy products. International Dairy Journal, 103 (2020) 104625.

Soleimani, M. Hosseini, H. Pilevar, Z. Mehdizadeh, M. Carlin, F. (2017). Prevalence, molecular identification and characterization of *Bacillus cereus* isolated from beef burgers. Food safety.

[T]

Thanh, M. D., Frentzel, H., Fetsch, A., Krause, G., Appel, B., Mader, A. (2016). Tenacity of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in dried spices and herbs. Food Control, 83 (January 2018), pages 1-10.

Tuipulotu, D.E. Mathur, A. Ngo, C. Man, S.M. (2020). *Bacillus cereus*: Epidemiology, Virulence Factors, and Host–Pathogen Interactions. Cell press, TIMI 1873 No. of Pages 14.

[Z]

Ziane, M. Leguerinel, I. Membré, J-M (2018). A quantitative microbiological exposure assessment of *Bacillus cereus* group IV in couscous semolina, Algeria. Microbial Risk Analysis, 11, April 2019, Pages 11-22.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., And Van'triet, K. (1990).
Modeling of The Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*,
56 (June 1990), P. 1875-1881.

I – Préparation de Gélose nutritive :

Ingrédients	g /L
Gélose	15,000
Peptone	5,000
Chlorure de sodium	5,000
Extrait de viande	1,500
Extrait de levure	1,500
PH	7,4 ± 0,2 à 25°C

Mode d'emploi :

Dissoudre 28,0 g dans 1000 ml d'eau distillée. Chauffer doucement pour dissoudre complètement le milieu. Stériliser par autoclavage à 15 psi (121 °C) pendant 15 minutes. Distribuer le milieu comme désiré.

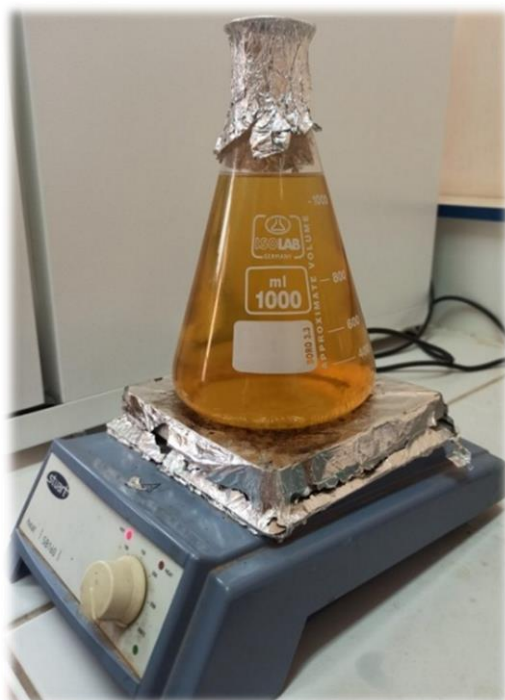


Figure 22 : Préparation et stérilisation du milieu de culture.

II – Préparation d'eau physiologique :

La solution est généralement composée d'eau distillée et de chlorure de sodium (NaCl) dilué à 9g pour 1000 ml.



Figure 23 : Préparation d'eau physiologique.

III – Préparation de milieu MOSSEL complet :

La gélose sélective pour *Bacillus cereus* est Mossel. Elle est utilisée pour la détection et dénombrement des spores et formes végétatives de *Bacillus cereus* dans les produits alimentaires. Leur composition c'est :

1- Mossel de base :

Extrait de viande	1 g/l
Peptone	10 g/l
Sodium chloride	10 g/l
D-mannitol	10 g/l
Rouge de phénol	0.025g
Agar-agar	9-1 g/l
ED	900ml



Figure 24 : Préparation du milieu Mossel complet.

2- Émulsion de jaune d'œuf :

- Rincer l'œuf à l'alcool, jeter l'excès d'alcool, flamber l'œuf entre deux becs bunsen.
- Récupérer le jaune d'œuf dans un bécher, le diluer avec l'eau distillée stérile pour obtenir une émulsion.
- Récupérer le surnage et ajouter stérilement 10ml dans chaque flacon contenant le milieu Mossel de base stérile en surfusion.

3- Mossel complet :

Milieu Mossel de base	90ml
Solution de polymixine B	01ml
Émulsion de jaune d'œuf	10ml

Les courbes de croissances de restes des souches de *B. cereus* étudiés :

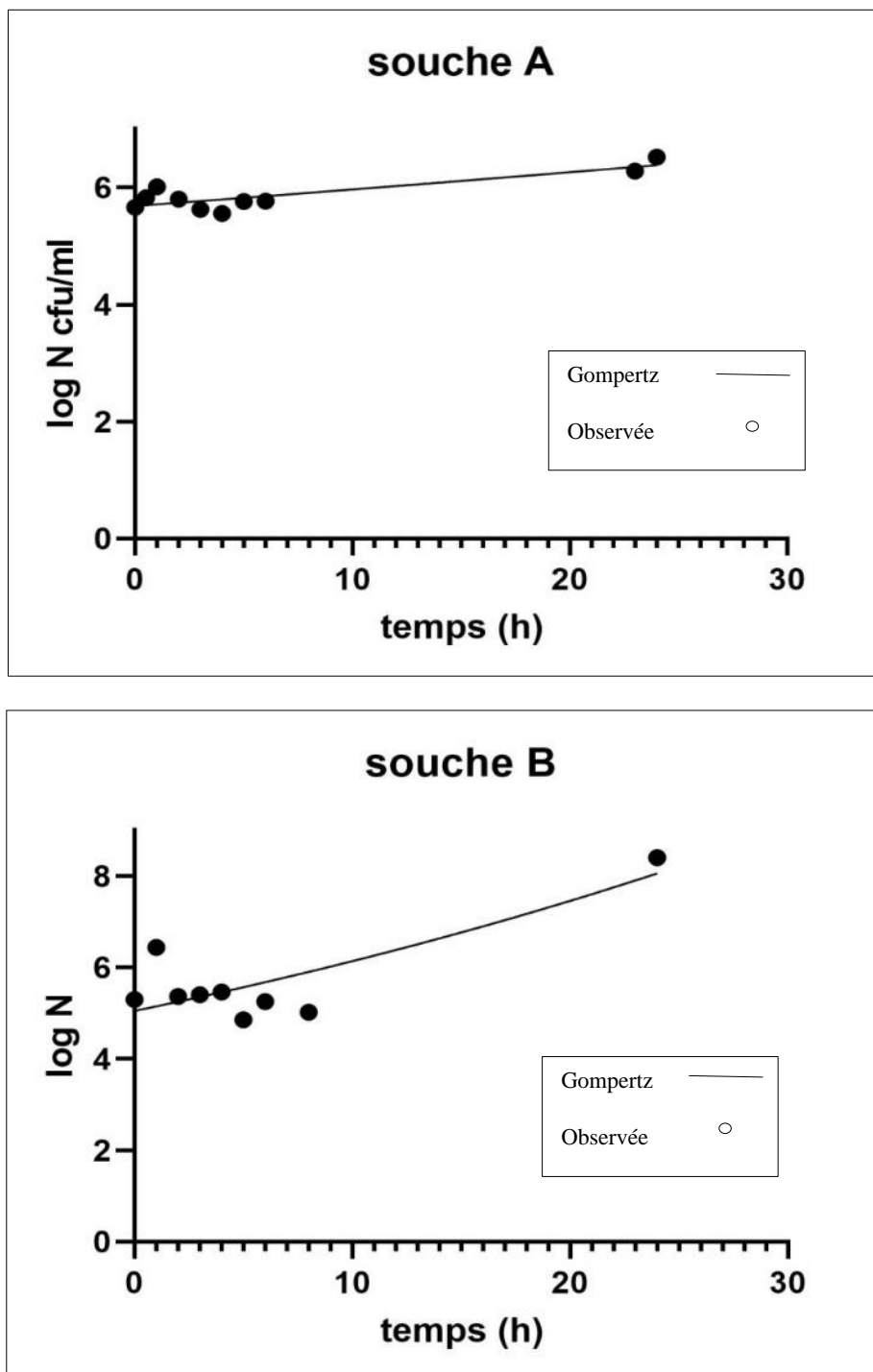


Figure 25 : Cinétique de croissance des souches A et B obtenus par ajustement des résultats de dénombrement avec le modèle de Gompertz.

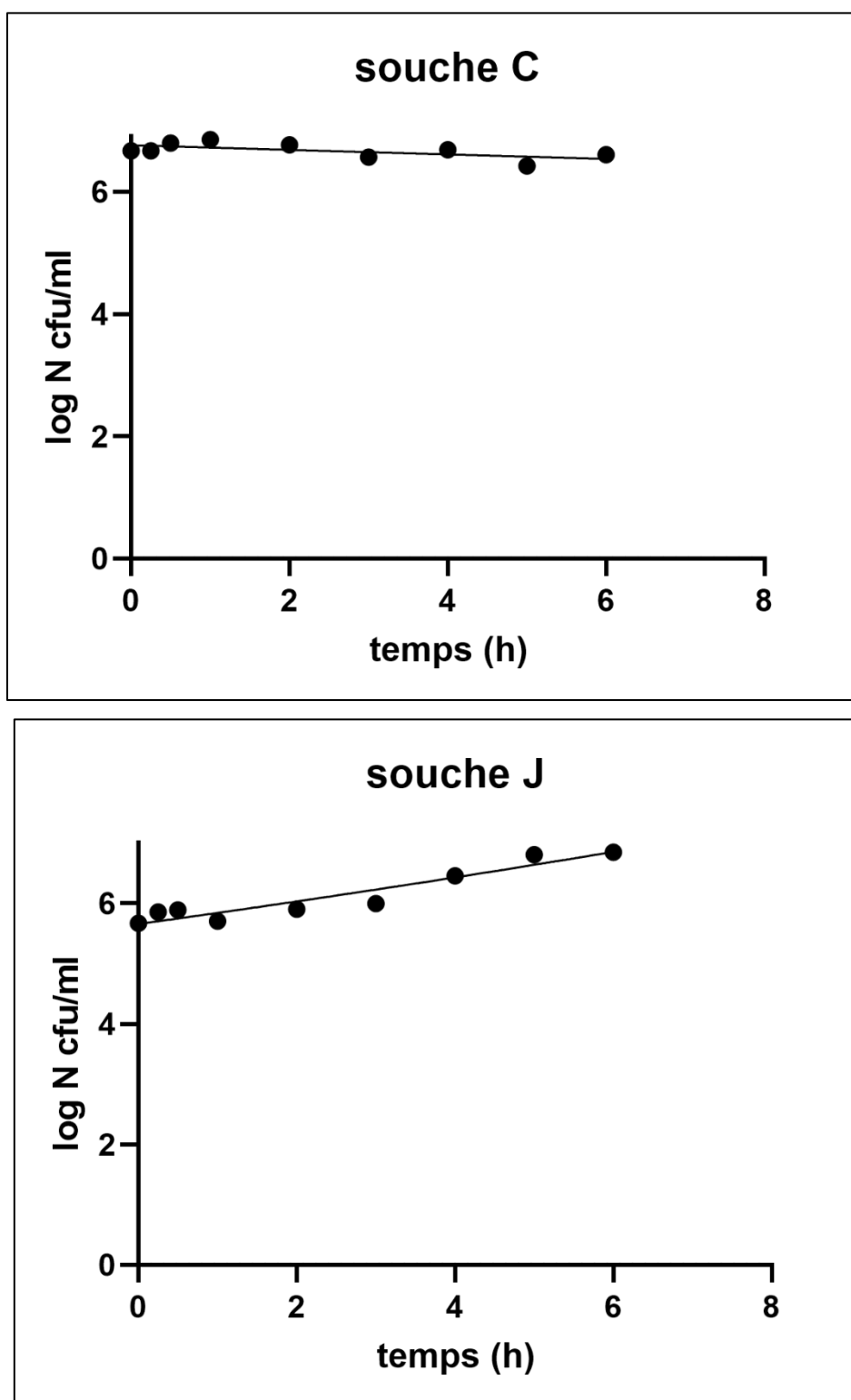


Figure 26 : Cinétique de croissance des souches C et J obtenus par ajustement des résultats de dénombrement avec le modèle de Gompertz

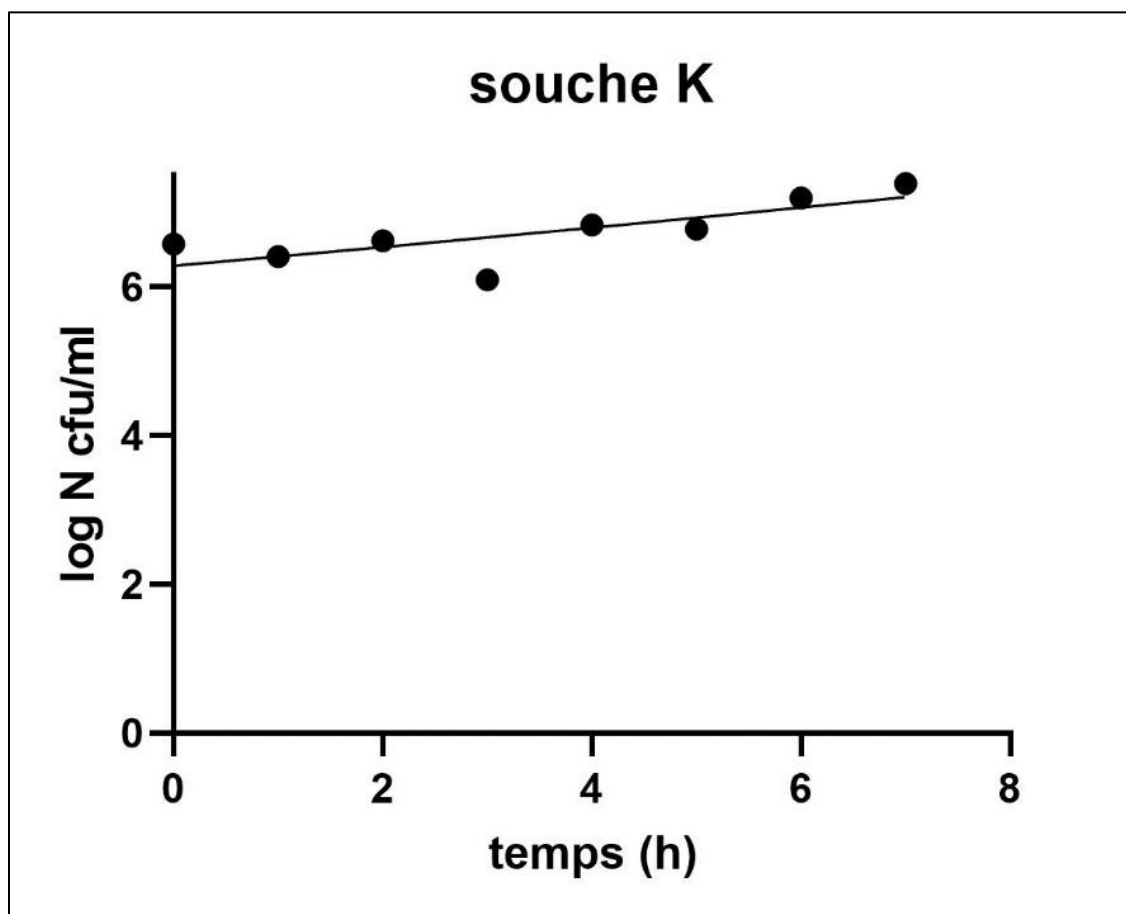


Figure 27: Cinétique de croissance de souche K obtenu par ajustement des résultats de dénombrement avec le modèle de Gompertz.