

## Les bactéries sporulées dans les conserves de légumes (petits pois) : Recherche et caractérisation phénotypique

Faffani Guech-Lamari<sup>1</sup> et Djamila Kirane-Gacemi<sup>1-2</sup>

<sup>1</sup>Département de Biochimie, Faculté des Sciences

Université Badji Mokhtar Annaba, BP 12, 23000, Annaba, Algérie

<sup>2</sup>Laboratoire Amélioration Génétique des Plantes et Adaptation aux Stress Environnementaux (LAGP)

Université Badji Mokhtar Annaba, BP 12, 23000, Annaba, Algérie

Révisé le 07/06/2012

Accepté le 18/06/2012

### ملخص

بالنسبة للمستهلك الذي يتزايد اهتمامه بغياب الأخطار على صحته فيما يخص الأغذية التي يبتاعها، فإن الهدف من عملنا هذا هو التحقق من النوعية الصحية لعشرة مجموعات متكونة من خمس علب بازلاء عادية و متشابهة فيما بينها . جميع هذه العلب تعرضت في أول الأمر الي اختبار الاستقرار متبوع باختبار العقم. هذا الأخير أجري عن طريق تحليل ميكرو بيولوجي كلاسيكي لزراعة كل الأنواع المرفولوجية التي لوحظت اثناء اختبار الاستقرار . ظهور نباتات دقيقة وفيرة دون تغيرات واضحة للمنوع . ميز اختبار الاستقرار . نتاج هذا الفحص إضافة إلى تلك المتعلقة بالزرع وتأكيد تنوع السلالات العازلة، قد وجهتنا نحو شكل *Bacillus* من بين الأنواع التي تم التعرف عليها بالطريقة البيوكيميائية توجد خاصة

*Bacillus cereus* (42.50%); *B. megatherium* (30.40%); *B. mycoides* (10.73%); *B. sphaericus* (7.24%); *B. pumilus* (4.60%) و *Brevibacillus brevis* (4.53%).

الكلمات المفتاحية : خضار معلبة- بازلاء- بكتيريا تنوعية - تعرف بيوكيميائي

### Résumé

Pour un consommateur de plus en plus attentif à l'absence de risques pour sa santé, quant à l'aliment qu'il consomme, l'objectif de notre travail est de vérifier la qualité hygiénique de dix lots constitués, chacun, de cinq boîtes de conserves de petits pois, normales et identiques entre elles. Toutes ces boîtes ont subi, dans un premier temps, un test de stabilité suivi d'un contrôle de stérilité. Ce dernier a été réalisé par le biais d'une analyse microbiologique classique pour la mise en culture de tous les types morphologiques observés au cours du contrôle de stabilité. L'observation d'une microflore très abondante et variée sans modification apparente du produit a caractérisé le test de stabilité. Les résultats de ce contrôle, ajoutés à ceux de la mise en culture et de la confirmation de la sporulation de ces souches isolées, nous ont orientés vers le profil des *Bacillus*.

Parmi les espèces identifiées par méthode biochimique figurent principalement *B.cereus* (42.50%); *B. megatherium* (30.40%); *B. mycoides* (10.73%); *B. sphaericus* (7.24%); *B. pumilus* (4.60%) et *Brevibacillus brevis* (4.53%).

**Mots clés :** Conserves végétales - Petits pois- Bactéries sporulées - Identification biochimique.

### Abstract

For a consumer more and more aware about the risks for his health, regarding the food he buys, the aim of this study is to verify the hygienic quality of ten batches, each one contains five green peas cans, normal and identical. All these cans have been submitted, at first, to stability and sterility test. This last has been conducted with a classical microbiological study for the culture of all the morphological types observed during the stability control. The observation of a very abundant and varied microflora without apparent modifications of the product characterized the stability control. The results of this control, added to those of the culture and the confirmation of sporulation directed us towards the *Bacillus* profile.

Among the species identified by biochemical method, we can find mainly *B. cereus* (42. 50%); *B. megatherium* (30.40%); *B. mycoides* (10.73%); *B. sphaericus* (7. 24%); *B. pumilus* (4.60%) and *Brevibacillus brevis* (4.53%).

**Keywords:** Canned vegetables - Peas – Spore - Forming bacteria - Biochemical identification.

Auteur correspondant : univfany@yahoo.fr

## 1. INTRODUCTION

Les bactéries sporulées occupent une place de premier plan parmi les microorganismes préjudiciables particulièrement à la conserve alimentaire en raison de leur ubiquité et de leur capacité à produire des spores thermo-résistantes qui les rendent particulièrement adaptées aux aliments traités thermiquement. Le danger engendré par ce groupe de bactéries est leur capacité de produire des enzymes ainsi que des toxines susceptibles d'altérer la qualité des produits et d'engendrer des possibilités d'intoxications alimentaires [1].

Ces contaminations microbiologiques représentent les risques majeurs sur le plan sanitaire dans les industries agro-alimentaires. Ces industries ont, depuis longtemps, développé des stratégies pour détruire les contaminants sous leur forme végétative mais la maîtrise de la contamination due aux bactéries sporulées demeure un enjeu capital [2]. La présence des microorganismes sporulés dans les conserves alimentaires ayant subi une stérilisation est décrite de plus en plus fréquemment [3].

Les bactéries sporulées les plus rencontrées dans les conserves appartiennent aux genres *Clostridium* et *Bacillus*. Les espèces pathogènes et toxigènes pour l'Homme sont *Cl. perfringens* et *B. cereus* [4]. *B. cereus* est une bactérie responsable de toxi-infections alimentaires, avec 20 à 100 000 cas par année dans le monde [5]. Elle cause des intoxications alimentaires graves avec une mortalité élevée en l'absence d'une prise en charge précoce et adéquate. Les difficultés diagnostiques liées à la méconnaissance de cette bactérie sont responsables de l'évolution fatale de ces intoxications [6].

Les spores de *Clostridium* et *Bacillus* sont incapables de germer à un pH inférieur à 4.5, ce n'est que pour des produits moins acides que des précautions particulières doivent être prises [7]. Faisant partie de cette catégorie de produits à risque, les conserves de petits pois ont été choisies pour cette étude du fait de leur pH voisin de 6.2.

L'objectif de ce présent travail, est la recherche et l'identification d'une éventuelle flore sporulée pathogène et /ou d'altération dans les conserves de petits pois de l'importation. Ce contrôle hygiénique permettra de garantir la conformité de ces conserves aux normes microbiologiques en vigueur avant leur mise en vente sur le marché national.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1 Echantillonnage

Dix lots de cinq boîtes de conserves de petits pois importées, identiques entre elles et en apparence normales (ni bombées, ni fuitées) ont été prélevées au niveau du circuit de distribution de la ville de Annaba (Algérie) Aucune précaution n'a été prise au cours du transport de ces échantillons vers le laboratoire [8].

### 2.2 Contrôle de stabilité

Ce test permet de vérifier « la stérilité commerciale ». Celui-ci a été réalisé selon la norme AFNOR NF V 08-401 qui préconise des épreuves d'incubation à 30°C pendant 21 jours et à 55°C pendant 7 jours. L'analyse du contenu des boîtes a nécessité l'ouverture aseptique de la conserve (AFNOR NF V 08-403). Divers types d'analyse ont été effectués: examen de l'aspect extérieur, organoleptique (détection d'odeur suspecte, texture et couleur).

Le pH du produit a été mesuré au moyen d'un pH-mètre muni d'une électrode combinée de type classique. La différence entre boîtes de conserve incubées et témoins ne doit pas excéder 0.5 unité. Un examen microscopique (coloration de Gram) a été réalisé sur le contenu de toutes les boîtes de conserve. Le nombre moyen de germes par champ microscopique a été déterminé sur 20 champs [8].

### 2.3 Contrôle de stérilité et identification phénotypique

Ce contrôle a été effectué grâce à une analyse microbiologique classique ; une suspension a été préparée à partir d'un échantillon de 25g de produit prélevé selon la norme AFNOR NF V08 – 403 dans les deux phases et broyé en présence de 100 ml de tryptone-sel [9].

#### *Caractères morphologiques et physiologiques*

Une flore aérobie mésophile a été recherchée sur gélose nutritive et gélose caso-agar supplémentée de 0.2% d'amidon afin de lever la dormance des spores. 0.1 ml de la suspension ainsi préparée est ensemencée en surface. Après 24h d'incubation à 30°C, les colonies obtenues ont subi un examen microscopique après coloration de Gram, le test de la catalase et de l'oxydase.

- La mobilité et le type respiratoire ont été recherchés respectivement sur milieu mannitol mobilité par piqûre centrale et sur gélose profonde viande-foie en vrille à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée.

- La mise en évidence de la sporulation a été réalisée par un test de thermo résistance à 80°C pendant 10 minutes sur bouillon nutritif avec et sans sulfate de manganèse à 0.004% à 30°C pendant 24h, puis d'une observation microscopique après coloration de Gram.

### Caractères biochimiques

Les galeries API 20E ont été utilisées pour l'étude des caractères biochimiques. L'exploitation des résultats a été faite suivant une méthode probabiliste numérisée. La base de données est fournie sous la forme d'un tableau donnant, pour chaque taxon et pour chaque caractère, sa probabilité d'être positif [10].

Pour les calculs à effectuer, en vue, de l'identification probabiliste de chacune des souches obtenues, nous avons eu recours à la matrice d'identification des *Bacillus* selon la galerie API 20E établie par Michel Cavalla en 2003, en utilisant le tableur Excel [11]. D'autres tests complémentaires tels que la mise en évidence de la lécithinase, de l'amylase et de la caséinase ont été réalisés respectivement sur gélose au jaune d'œuf, gélose à l'amidon et gélose au lait [12].

## 3. RESULTATS ET DISCUSSION

### 3.1 Contrôle de stabilité

Pour toutes les boîtes de conserves analysées (témoins et incubées), la présence d'amidon révélée par un aspect farineux, prouve que les petits pois n'ont pas été mis en boîtes juste après la récolte [13]. L'exposition des boîtes de conserves de petits pois, à 30°C pendant 21 jours et à 55°C pendant 7 jours n'a entraîné aucune modification visible du contenant et du contenu.

L'emballage n'a subi aucune déformation, les caractéristiques organoleptiques et le pH ont été préservés. Les résultats obtenus pour le pH sont en moyenne de 6.50 pour les boîtes témoins, de 6.28 et de 6.20 respectivement pour les boîtes incubées à 30°C et à 55°C. Les différences moyennes de pH entre les boîtes de conserve incubées à 30°C et 55°C par rapport aux témoins sont respectivement égales à 0.22 et 0.30 donc inférieures à 0.5 unité.

Ces valeurs prouvent qu'il n'y a pas eu d'acidification c'est-à-dire pas de « flat-sour ». Ceci nous a permis d'écarter les microorganismes responsables de ce type d'altération qui est dû principalement aux bactéries anaérobies facultatives thermophiles dont *Geobacillus stearothermophilus* [14] et *B. coagulans*. Ce dernier est un thermophile facultatif qui ne se manifeste que dans les conserves à pH acide inférieur à 4.5.

Les bactéries sporulées thermophiles sont reconnues comme étant la cause principale des altérations des conserves alimentaires [15]. De même, aucun fuitage n'est apparu ; le papier buvard sur lequel ont été déposées ces boîtes de conserve au cours de l'incubation, est resté sans tache.

Aucun bombage n'a été détecté ; on observe également l'absence de couleur, d'odeurs putride, butyrique et de production d'H<sub>2</sub>S.

Dans les conserves des légumes à pH supérieur à 4.5, comme les petits pois, le bombage (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) avec production H<sub>2</sub>S et d'odeurs putrides ainsi que le bombage sans production d'H<sub>2</sub>S suivi d'odeurs butyriques sont l'œuvre de bactéries anaérobies sporulées comme les *Clostridium* mésophiles et thermophiles très gazogènes [9, 16, 17]. Ce résultat révèle ainsi l'inexistence de contamination de ces boîtes par ce type de bactéries.

Après coloration de Gram, nous avons observé une population bactérienne aussi abondante que variée, constituée de formes bacillaires plus ou moins longues, à l'état isolé ou regroupées en chaînettes Gram+ et de quelques spores. Seule, la présence de cette flore largement supérieure à 30 bactéries sur 20 champs microscopiques met en doute la stabilité donc « la stérilité commerciale » des conserves de petits pois étudiées [9, 18].

### 3.2 Contrôle de stérilité

Les résultats du contrôle de stabilité nous ont orientés vers la recherche d'une microflore aérobie mésophile.

Après incubation à 30°C pendant 72 heures avec une lecture toutes les 24h, certaines colonies obtenues sur gélose nutritive et caso-agar, sont généralement assez grosses, mates ou granuleuses, à contours le plus souvent irréguliers (Fig. 1) ou filamenteux.

D'autres sont rhizoïdes et adhérentes à la gélose.



Figure 1. Culture à contours irréguliers sur gélose caso-agar.

Une catalase positive pour toutes les souches isolées nous a permis de confirmer l'élimination des *Clostridium* qui sont catalase négative. Les souches isolées sont caractérisées par une oxydase variable.

Après sélection thermique (test de thermo-résistance), la présomption de la sporulation a été mise en évidence par la formation, de voile blanchâtre dans le bouillon nutritif après 24 h d'incubation (Fig. 2).

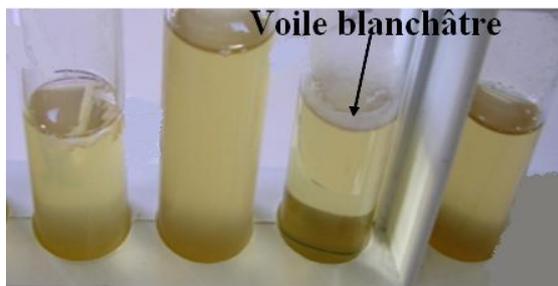


Figure 2. Résultat du test de présomption de la sporulation sur bouillon nutritif.

L'observation microscopique à partir de ces tubes, nous a révélé des bâtonnets Gram+ isolés ou en chaînettes et la présence de spores (Fig. 3). La présomption de l'aptitude à la sporulation a été confirmée par l'observation de bacilles Gram+ sporulés.

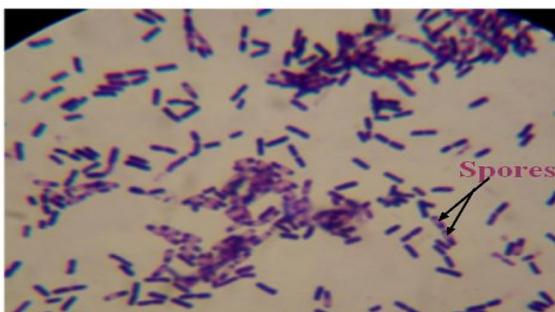


Figure 3. Observation microscopique montrant des bacilles sporulés après coloration de Gram

L'aspect des colonies à 30°C obtenues en culture aérobie, les bâtonnets à Gram + sporulés et une catalase positive nous permettent de déduire la présence de *Bacillus* mésophiles [18].

La mise en culture de cette flore sans précaution particulière, autrement dit sans étape de revivification, prouve qu'elle a repris une activité normale après un temps de réparation au cours du stockage ou de leur durée de vie commerciale.

La germination des spores a été induite par la nature des conserves à savoir le pH des petits pois qui se situe dans la zone optimale de croissance des *Bacillus* [7] et leur richesse en amidon reconnue comme un agent de germination et de détoxification .

La formation d'empois d'amidon aurait diminué la transmission de la chaleur par convection et provoqué une défaillance au niveau du traitement thermique [19], justifiant ainsi la présence des *Bacillus*.

### 3.3 Identification des souches isolées

Les résultats des caractères biochimiques que nous avons obtenus sur galeries API 20E rajoutés à ceux du type respiratoire, de la mobilité et de la lécithinase nous ont permis de différencier huit profils biochimiques reportés dans le tableau 1.

D'après le tableau 1, toutes les souches isolées ont donné un résultat négatif pour les tests lysine décarboxylase (LDC), ornithine décarboxylase (ODC), H<sub>2</sub>S, urée, tryptophane désaminase (TDA) et arabinose.

En utilisant la méthode probabiliste numérisée, les pourcentages relatifs d'identification obtenus pour chaque profil sont représentés par les figures 4 et 5.

Les résultats de l'identification des souches isolées, représentés par les taxons correspondants aux pourcentages relatifs maximaux nous ont permis de valider six espèces avec des taux d'identification généralement satisfaisants comme le montre le tableau 2.

Tableau 1. Profils biochimiques des souches isolées après 48h d'incubation à 30°C.

Souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
ANAEROBIOSE	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	+	+	-	+	+
ADH	+	+	-	-	+	+	+	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-
CITRATE	+	-	-	-	+	-	+	+
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-
INDOLE	-	-	-	-	-	-	+	-
VP	-	+	+	+	+	+	+	-
GELATINASE	+	+	+	-	+	-	+	+
GLUCOSE	+	+	+	+	+	-	-	+
MANNITOL	-	-	-	-	+	-	-	+
INOSITOL	+	+	+	-	-	-	-	-
SORBITOL	+	+	-	-	-	-	-	-
RHAMNOSE	+	-	-	-	-	-	-	+
SACCHAROSE	+	-	-	-	+	-	-	-
MELIBIOSE	-	-	-	-	-	-	-	+
AMYGDALINE	-	+	-	-	+	-	-	-
ARABINOSE	-	-	-	-	-	-	-	-
OXYDASE	+	+	+	-	-	-	+	+
NITRITES	-	+	-	-	+	-	+	+
MOBILITE	+	+	+	+	+	+	+	-
LECITHINASE	+	+	+	-	-	-	-	-

+ : la couleur du milieu a complètement changé  
 - : la couleur du milieu n'a pas changé

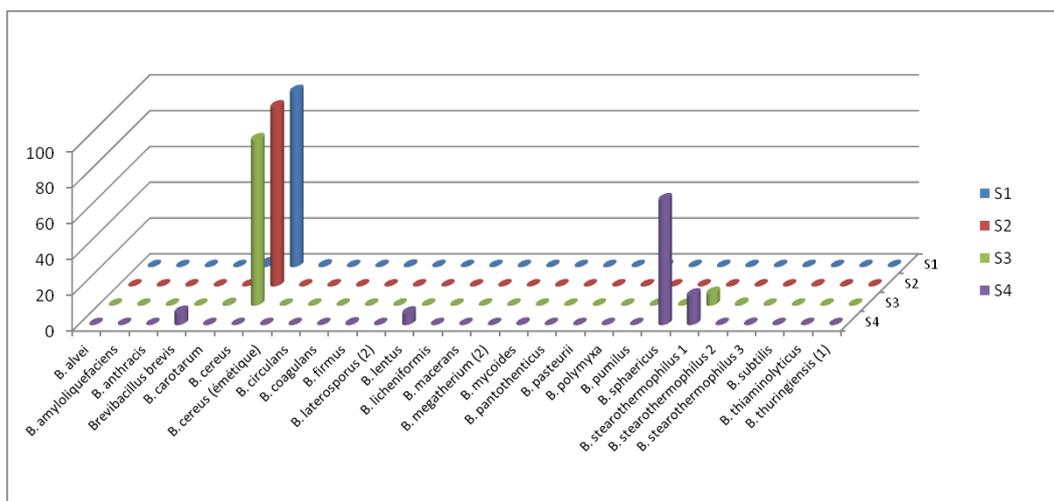


Figure 4. Pourcentages relatifs d'identification des souches S1, S2, S3, S4

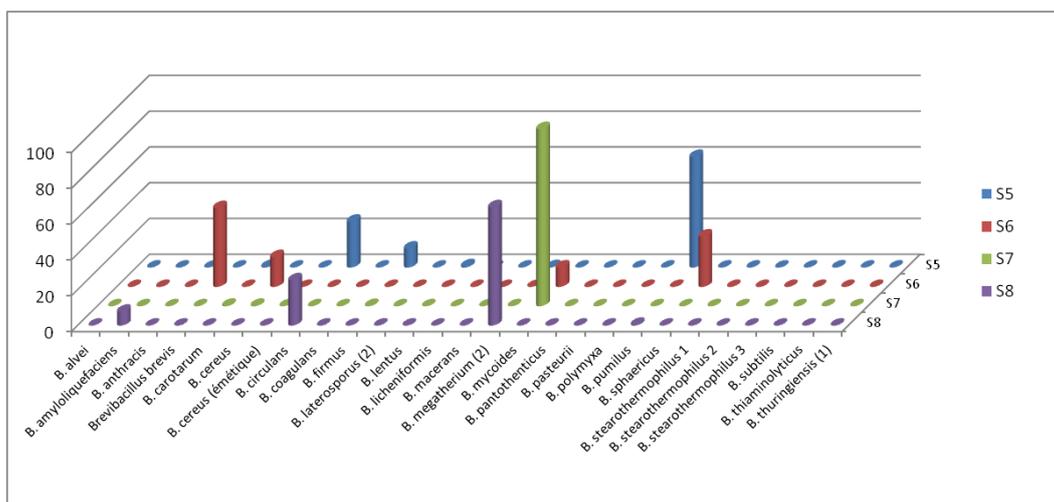


Figure 5. Pourcentages relatifs d'identification des souches S5, S6, S7, S8

Tableau 2. Résultats d'identification biochimique des souches isolées

Nom de la souche	Espèce identifiée	Pourcentage d'identification
S1	<i>B. cereus</i>	97.8
S2	<i>B. cereus</i>	100
S3	<i>B. cereus</i>	92.5
S4	<i>B. sphaericus</i>	69.7
S5	<i>B. pumilus</i>	61.9
S6	<i>Brevibacillus brevis</i>	44.1
S7	<i>B. mycooides</i>	91.1
S8	<i>B. megatherium</i> (2)	66.2

Notons que l'espèce *B. cereus* est apparue sous trois profils différents, ce qui reflète bien la diversité au sein d'une même espèce en ce qui concerne les bactéries sporulées.

Ceci est confirmé par Guinebretière *et al.* [20] ainsi que Van der Auwera *et al.* [21] qui indiquent que *B. cereus* fait partie d'un ensemble d'espèces apparentées regroupées sous le terme *Bacillus cereus sensu lato* présentant une grande diversité phénotypique.

Les résultats des tests biochimiques complémentaires tels que la caséinase et l'amylase n'ont fait qu'appuyer l'identification des espèces isolées [9]. Une lécithinase très active a caractérisé *B. cereus* (Fig. 6).



Figure 6. Résultat du test de la lécithinase.

La caséine a été hydrolysée par toutes les souches (Fig. 7), montrant ainsi une caséinase positive pour toutes les souches.

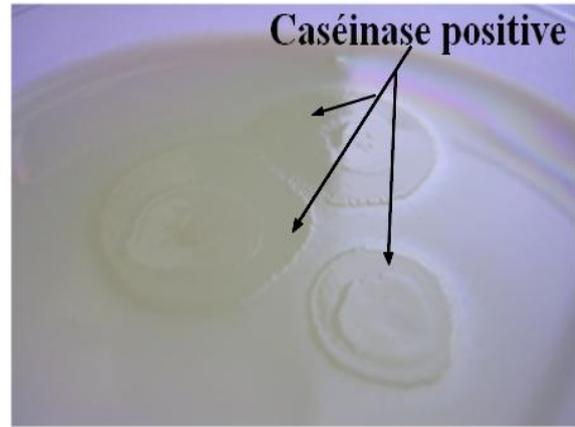


Figure 7. Résultat du test de la caséinase

L'amidon a été aussi dégradé par toutes les souches, à l'exception de *B. sphaericus*, *Brevibacillus brevis* et *B. pumilus* (Fig. 8).

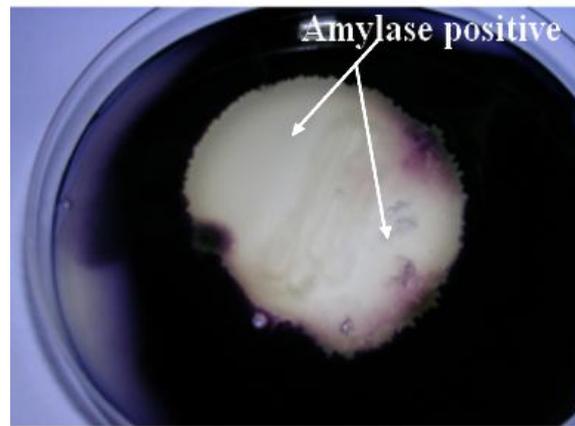


Figure 8. Résultat du test de l'amylase.

### 3.4 Fréquence d'apparition des souches identifiées

La fréquence d'apparition des différentes souches identifiées est représentée par la figure 9.

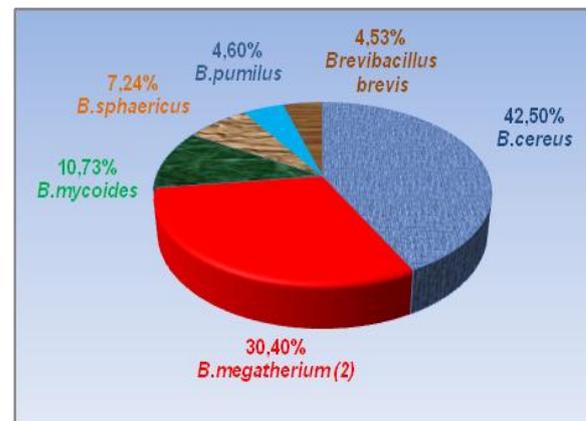


Figure 9. Fréquence d'apparition des différentes souches identifiées.

La fréquence d'apparition de *B. cereus*, reconnue comme bactérie à pouvoir pathogène indiscutable [22], est de loin la plus élevée (42.5 %) relativement à celle des autres espèces du même genre. Ceci est dû au fait que le sol est l'une des principales sources de contamination des produits à base de légumes par *B. cereus* [23]. C'est pour cela que cette bactérie peut être ensuite retrouvée à toutes les étapes de la chaîne de production des conserves et persister dans les conserves mal stérilisées.

Au phénomène de résistance à la chaleur, se sont ajoutés les problèmes posés par la capacité d'adhésion de *B. cereus* à différents matériaux dans les ateliers de fabrication et/ou à la formation de bio-films résistants aux procédures de nettoyage [22]. Les procédés de nettoyage classique ne permettent d'éliminer que 40% des spores [24].

Les souches de *B. cereus* susceptibles de provenir du sol et contaminant les légumes sont particulièrement à risque pour la santé. *B. cereus* est la quatrième cause de toxi-infections alimentaires collectives en France [25, 26]. Une grande partie des souches de *B. cereus* peuvent produire des toxines provoquant la diarrhée [27]. Le type émétique peut, dans certains cas, causer une issue fatale (entre autres par décompensation aigüe hépatique) [28]. Des souches de *B. cereus* impliquées dans des infections semblables à la maladie du charbon ont aussi été identifiées [29, 30].

De même, *B. cereus* n'est pas qu'un problème de santé publique potentiel, c'est aussi un modèle susceptible de caractériser les bactéries sporulées pouvant gêner l'innovation des procédés de fabrication industrielle [2].

La présence de *B. megatherium* avec une fréquence de 30.40% (voir Fig. 9) est inquiétante car cette bactérie est capable de produire des toxines thermostables à 30°C [31]. Les fréquences d'apparition de *B. sphaericus* (7.24%), de *B. pumilus* (4.60%) et de *Brevibacillus brevis* (4.53%) ne sont pas négligeables car ces espèces sont considérées par certains auteurs comme des bactéries à pouvoir pathogène opportuniste ; elles peuvent être responsables de toxi-infections alimentaires chez les personnes immuno- déficientes [22].

Ainsi, les boîtes de conserves de petits pois analysées non stables sur le plan microbiologique c'est-à-dire commercialement non stériles ont constitué un véritable bouillon de culture, principalement pour des bactéries pathogènes comme *B. cereus*. Cette flore sporulée contaminante a pour origine une matière première de mauvaise qualité bactériologique et une hygiène non respectée au

cours des traitements technologiques de conservation.

Ces bactéries sporulées ont probablement été sélectionnées par les process technologiques ou pourraient s'être adaptées à ces derniers; trouvant ainsi un terrain favorable à leur développement.

#### 4. CONCLUSION

Au terme de notre étude, il apparaît que les dangers microbiens les plus pertinents dans les conserves de légumes, en particulier les petits pois, sont les bactéries sporulées du genre *Bacillus* qui ont été isolées à partir de ces conserves. Ces dernières sont donc non conformes à la réglementation et constituent un danger certain pour les consommateurs. Les services compétents devraient s'y intéresser.

L'espèce identifiée, la plus dominante est *B. cereus* (fréquence d'apparition de 42.5%), présente dans la totalité des boîtes d'apparence normale analysées. De ce fait, ces résultats indiquent l'importance de mettre en place de nouvelles stratégies pour faire face à l'adaptation de ces bactéries sporulées thermorésistantes qui semblaient être contrôlées par le biais de la stérilisation.

Pour cela, une meilleure connaissance de l'écologie et de la physiologie de ces bactéries sporulées (extrêmement diverses au sein d'une même espèce), permettra de mieux adapter les traitements thermiques de conservation à chaque type de produit et éviter ainsi tout problème de santé publique.

#### REFERENCES

- [1] Granum P.E.A., Anderson A., Gayther C., Tegiffel M., Larsen H., Lund T. & O'Sullivan K., 1996. Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*, *FEMS. Microbiol. Lett.*, Vol. 141, 145-149.
- [2] Tétart T. & Torny D., 2009. Ça tue parfois mais ce n'est pas dangereux : Injonction Institutionnelle et mobilisation scientifique autour d'un pathogène émergent, *Bacillus cereus*, *Revue d'anthropologie des connaissances*. Vol. 3 (1), 73-102.
- [3] ADRIA développement, 2010. Les bactéries thermorésistantes, [www.bretagne-innovation.tm.fr/Agenda/Les bactéries Thermorésistantes](http://www.bretagne-innovation.tm.fr/Agenda/Les_bactéries_Thermorésistantes), Consulté en juin 2011.
- [4] INRA, 1998. Bactéries sporulées et sécurité des aliments. Dossier de l'INRA: Alimentation, sécurité et santé : Une priorité pour l'INRA, <http://www.inra.fr/internet/directions/dic/actualites/dossiers/doc/secualim>, Consulté en juin 2011

- [5] INVS, 2004. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France, Rapport de l'Institut de Veille Sanitaire. [http://www.invs.sante.fr/publications/2004/inf\\_origine\\_alimentaire](http://www.invs.sante.fr/publications/2004/inf_origine_alimentaire), Consulté en juin 2011.
- [6] Tossa P., Villeroy F., Schaefer J.L. & Manel J., 2009. Intoxication alimentaire par *Bacillus cereus*: à propos d'un cas d'hépatite fulminante suite à l'ingestion d'un plat de pâtes, 47<sup>ème</sup> congrès de Société de Toxicologie Clinique, STC, Toulouse, France.
- [7] Couvert O., 2002. Prise en compte de l'influence du pH dans l'optimisation des Traitements thermiques, Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, France. 180p.
- [8] Giraud J.P. & Rosec J.P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Ed. AFNOR. 298p.
- [9] Guiraud J.P., 2003. Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. 651p.
- [10] Joffin J.N. & Leyral G., 2006. Microbiologie technique, Tome 2: Documentation Technique, Collection Biologie Technique. Ed. Doin, CRDP Aquitaine. 363p.
- [11] Cavalla M., 2003. Identification biochimique des *Bacillus* par galeries API 20E. <http://mcavalla.free.fr>, Consulté en Juin 2008
- [12] Dellaras C., 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Ed. Lavoisier Tec & Doc. 276p.
- [13] Bédard R., 2006. Pois vert, L'encyclopédie canadienne, Fondation Historica du Canada, [www.passeportsanté.net/fr](http://www.passeportsanté.net/fr), Consulté en juin 2011.
- [14] De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. & Whitman W.B., 2009. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 3. The Firmicutes. 2nd edition, Springer, Dordrecht, 1450p.
- [15] Prevost S., Andre S. & Remize F., 2010. PCR Detection of thermophilic spore-forming bacteria involved in canned food spoilage, *Current Microbiology*, Vol. 61 (6), 525-533
- [16] Chen W.M., Tseng Z.J., Lee K.S. & Chang J.S., 2005. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge, *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 30, 1063-1070.
- [17] Liu G. & Shen J., 2004. Effects of culture medium and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria, *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 98, 251-256.
- [18] Mescle J.F., Zucca J. & Bourgeois C.M., 1996. Microbiologie Alimentaire, Tome 1. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed. Lavoisier Tec & Doc. 658p.
- [19] Cheftel J.C., Cheftel H. & Besançon P., 1999. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Ed. Lavoisier Tec. & Doc. 567p.
- [20] 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. *Environ. Microbiol.* Vol. 10 (4), 851-865.
- [21] Van der Auwera G., Immery A.T.S., Hoton F. & Mahillon J., 2007. Plasmid Exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 113 (2). 164-72.
- [22] Euzeby J.P., 2010, Systématique bactérienne, <http://www.bacterio.cict.fr.>, Consulté en Décembre 2010.
- [23] Guinebretière M.H. & Nguyen-The C., 2003. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing plant differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.*, Vol. 43, 207-215.
- [24] Rönner U., Husmark U. & Henriksson A., 1990. Adhesion of bacillus spores in relation to hydrophobicity. *J. Appl. Bacteriol.*, Vol. 69 (4), 550-556.
- [25] Delmas G., Gallay A., Espié E., Haeghebaert S., Pihier N., Weill F.X., De Valk H., Vaillant V. & Désenclos J.C., 2006. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 51-52, 418-422.
- [26] Delmas G., Jourdan da Silva N., Pihier N., Weill F.X., Vaillant V. & de Valk H., 2010. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 31-32, 344-348.
- [27] Ehling-Schulz M., Fricker M., Grallert H., Rieck P., Wagner M. & Scherer S., 2006. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiol.*, 6-20.
- [28] Dierick K., Van Coillie E., Swiecicka I., Meyfroidt G., Devlieger H., Meulemans A., Hoedemaekers G., Fourie L., Heyndrickx M. & Mahillon J., 2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J Clin Microbiol.*, Vol. 43(8), 4277-4279.
- [29] Hoffmaster A. R., Ravel J., Rasko, D.A., Chapman G.D., Chute M.D., Marston C.K., De B.K., Sacchi C.T., Fitzgerald C., Mayer L.W., Maiden M.C., Priest F.G., Barker M., Jiang L., Cer R.Z., Rilstone J., Peterson S.N., Weyant R.S., Galloway D.R., Read T.D., Popovic T. & Fraser C.M., 2004. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl Acad Sci U S A*, Vol. 101 (22), 8449-8454.

[30] Klee S.R., Ozel M., Appel B., Boesch C., Ellerbrok H., Jacob D., Holland G., Leendertz F.H., Pauli G., Grunow R. & Nattermann H., 2006. Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. *J Bacteriol.*, Vol. 188 (15), 5333-5344.

[31] Taylor J. M. W., Sutherland A. D., Aidoo K. E. & Logan, N. A., 2005. Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 242 (2), 313-317.