

ÉTUDE DE CAS

1

B.CEREUS, CONTAMINANT DU LAIT MATERNISÉ

Partie 1 : Consignes à lire avant de commencer

Préparation en amont de la séance :

En amont de la séance, vous devez réaliser le travail programmé en distanciel asynchrone :

- **le chapitre 1 de microbiologie prévisionnel** avec les QCM associés : Vous avez une version rédigée mais aussi la présentation vidéo à disposition.
- **Les exercices de préparation** très courts intercalés dans le chapitre 4
- **Les TD de microbiologie avant ou après la séance** : Afin de vous préparer à des exercices plus complexes.

A l'issue de ce travail en ligne, vous devriez être capable de décrire les modèles théoriques de croissance et de traiter des données expérimentales simples. Remplissez le questionnaire d'auto-évaluation afin de vous positionner.

Objectifs d'apprentissage :

A l'issue de cette séance, l'étudiant sera capable d'obtenir les constantes des modèles à partir de données théorique mais aussi de prévoir l'évolution d'une population microbienne en fonction des données environnementales.

Organisation de la séance :

Cette étude de cas est faite pour vous mettre en difficulté de prime abord. Vous allez travailler en équipe de 4 maximum afin de résoudre l'ensemble de données. Vous vous installez sur un îlot de travail. Vous avez à votre disposition des marqueurs, des feuilles véléda et de la patafix pour écrire au mur sur des « tableaux ». Vous pouvez utiliser des ordinateurs des tablettes MAIS vous ne pouvez pas utiliser l'IA. Elle ne vous permettra pas de réussir ce type de travail ni d'atteindre les objectifs d'apprentissage.

Vous **devez** échanger au sein d'une équipe mais entre membres de l'équipe pour réussir ce travail et vous équiper de :

- calculatrice
- papier millimétré, crayon gris et règle
- papier brouillon
- un support propre pour le rendu final

Accompagnement de la séance :

Au cours de la séance pour passer d'une sous partie à l'autre, vous devrez **aller voir l'enseignant pour valider votre travail**.

Vous devez également remplir un **questionnaire d'autoévaluation avant la séance (une fois que vous avez lu le cours) et après la séance** afin que je puisse adapter la séance de retour en classe entière.

A la fin de la semaine, vous déposerez le fruit de votre travail en équipe en indiquant bien sur les parties individuelles qui a fait quoi dans l'espace moodle dédié. Ce document doit contenir le

résultat correctement rédigé final de votre travail mais aussi vos difficultés et comment vous les avez résolues (voir la box Help).

HELP : QUE FAIRE ? _____

Vous ne pouvez pas m'interroger à chaque difficulté, vous allez suivre un parcours et remplir le document de type "Help" pour cela. Voici l'ordre du travail à réaliser quand vous ne voyez pas comment répondre à la question :

1. Reprendre la partie de cours correspondante et noter les informations
2. Aller voir dans l'énoncé de TD d'enzymologie correspondant afin de comprendre comment traiter les données et noter les informations
3. Échangez avec vos coéquipiers : notez les idées des autres
4. Échangez avec une autre équipe : notez les propositions de l'autre équipe

Vous serez autorisés à venir me demander quand vous aurez réalisé et noté toutes ces étapes.

Références :

(1) Biofilms in the Food Industry : Health Aspects and Control Methods Serena Galié 1,2,3 , Coral García-Gutiérrez 1,2,3 , Elisa M. Miguélez 1,2,3 , Claudio J. Villar 1,2,3 and Felipe Lombó 1,2,3 * Frontiers in Microbiology May 2018 — Volume 9 — Article 898

(2) Christophe Nguyen-The, Frédéric Carlin, Marie-Hélène Guinebretière Bacillus cereus et sécurité des aliments Bull.Soc.Fr.microbiol. 18(2)2003

(3) Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen Bacillus cereus A. Ultee, L.G.M. Gorris and E.J. Smid Agrotechnological Research Institute (ATO-DLO), Journal of Applied Microbiology 1998, 85, 211–218

(4) Toyoncin, a Novel Leaderless Bacteriocin That Is Produced by Bacillus toyonensis XIN-YC13 and Specifically Targets B. cereus and Listeria monocytogenes Juanjuan Wang, a Haitao Xu, a Shu Liu, a Baolong Song, a Hualin Liu, b Feng Li, a Shulin Deng, a Guangli Wang, a Huawei Zeng, a Xin Zeng, a Dayong Xu, a Biao Zhang, a Bingyue Xin a June 2021 Volume 87 Issue 12 e00185-21 Applied and Environmental Microbiology

(5) Yating Wang 1, Yangtai Liu 1, Shuo Yang 1, Yuhang Chen 2, Yang Liu 3, Dasheng Lu 2, Hongmei Niu 1, Fanchong Ren 1, Anning Xu 1, Qingli Dong 1 Effect of Temperature, pH, and aw on Cereulide Synthesis and Regulator Genes Transcription with Respect to Bacillus cereus Growth and Cereulide Production - Toxins (Basel) 2024 Jan 8;16(1) :32. doi : 10.3390/toxins16010032.

Partie 2 : Croissance de *B.cereus* dans le lait (1,2)

Bacillus cereus est une bactérie à l'origine d'intoxication alimentaire par l'intermédiaire d'une toxine produite en fin de phase stationnaire et de toxi-infections alimentaires à déclaration obligatoires en collectivités. *Bacillus cereus* est une bactérie difficile à éliminer de part sa capacité à sporuler mais aussi de part la forte adhésion des spores à la surface. La contamination des produits alimentaires peuvent avoir lieu à toutes les étapes de la chaîne alimentaire mais aussi des traitements hospitaliers (1,2).

L'amélioration des méthodes de stérilisation est nécessaire pour améliorer la toxicité alimentaire.

Nous verrons d'abord les capacités de croissance de *Bacillus cereus* dans le lait puis nous verrons deux méthodes chimiques pour éviter la contamination des surfaces mais aussi pour améliorer la conservation du lait pasteurisé.

Des souches de *B.cereus* non sporulées sont mises en culture dans du lait maternisé reconstitué à raison de 10 cellules végétatives par mL. Toutes les 30mn à 1h, un échantillon des cultures est prélevé, dilué et 100 μ L sont étalés sur une boîte de culture.

Question 1 Méthode

Quel type de cellules sont mesurées par cette méthode ?

Les résultats des mesures prises pendant 11h sont présentés dans le tableau ci dessous.

Question 2 Obtention de la courbe de croissance

TABLE 1.1 – Données obtenue de mesure de concentration en bactérie au cours de la croissance dans 3 cultures équivalentes indépendantes (C1, C2, C3)

temps (h)	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C1 diluton 10-2	10	10	18	62	211	715	2423	8206	27794	94144	120000	128000	130000
C1 diluton 10-3	1	1	2	6	21	72	242	821	2779	9414	12000	12800	13000
C1 diluton 10-4	0	0	0	1	2	7	24	82	278	941	1200	1280	1300
C1 diluton 10-5	0	0	0	0	0	1	2	8	28	94	120	128	130
C2 diluton 10-2	10	10	17	59	201	679	2301	7795	26405	89437	114000	121600	123500
C2 diluton 10-3	1	1	2	6	20	68	230	780	2640	8944	11400	12160	12350
C2 diluton 10-4	0	0	0	1	2	7	23	78	264	894	1140	1216	1235
C2 diluton 10-5	0	0	0	0	0	1	2	8	26	89	114	122	124
C3 diluton 10-2	10	10	19	65	222	751	2544	8616	29184	98852	126000	134400	136500
C3 diluton 10-3	1	1	2	7	22	75	254	862	2918	9885	12600	13440	13650
C3 diluton 10-4	0	0	0	1	2	8	25	86	292	989	1260	1344	1365
C3 diluton 10-5	0	0	0	0	0	1	3	9	29	99	126	134	137

A partir des données ci-dessus, calculez- la concentration en bactérie dans chaque prélèvement pour chaque culture.

Méthode 1 : Tracez la courbe de croissance ($X_t=f(t)$) puis la version en logarithme népérien ($\ln(X_t)=f(t)$) pour chaque culture.

Méthode 2 : Réalisez les moyennes et les écart-type pour chaque prélèvement et Tracez la courbe de croissance moyenne ($X_t=f(t)$) puis la version en logarithme népérien ($\ln(X_t)=f(t)$).

Question 3 Analyse de la courbe de croissance

Analysez les différentes étapes des deux courbes obtenues afin d'identifier la phase de latence, la phase de croissance exponentielle et la phase stationnaire.

Prouvez qu'une des phase suit bien un modèle exponentiel.

Question 4 Analyse de la phase exponentielle : obtention du modèle de croissance

Afin de caractériser la croissance, les paramètres de la phase exponentielle doivent être déterminés. Le modèle primaire de croissance ici est :

$$X_t = X_0 \times \exp(\mu \times (t - lag)) \quad (1.1)$$

A partir de ce modèle mathématique et de la courbe déterminez le taux de croissance et le temps de génération :

- graphique lecture sur les courbes de la méthode 1 et de la méthode 2 (cf plus haut)
- calcul à partir du modèle et des données
 - Méthode 1 : réaliser le calcul pour chaque culture puis faites la moyenne des temps de génération et taux de croissance obtenus
 - Méthode 2 : calculez les constantes à partir des courbes moyennes

Partie 3 : Traitement du lait maternisé et durée d'utilisation (1,2)

Question 1 Traitement Thermique du lait - calcul D_T 10mn

Le lait disponible en grande surface peut avoir été traité par trois méthodes thermiques décrites dans le tableau 1.2 (les valeurs de réduction de la population ne sont pas toutes documentées).

Type de traitement	Température	Durée	Facteur réduction population	D_T
Pasteurisation	72	15 s	10^5	
stérilisation	115	15 mn	10^6	
UHT	137	4 s	10^7	

TABLE 1.2 – Étude de la réduction de la population de bactéries et de levures non sporulantes par traitement thermique Les valeurs de réduction de la populations ne sont pas réelles.

Q. Calculez la valeur du temps de réduction décimal (D_T) pour chacune de ces conditions en explicitant une fois le calcul (remplissez le tableau). Le modèle de décroissance utilisé est le suivant :

$$N = N_0 \times 10^{-\frac{t}{D_T}}$$

Question 2 Croissance de la souche dans le lait maternisé - calcul de μ 10mn

Dans le lait maternisé, **100 spores/g** peuvent être détectés. Le lait maternisé doit être réhydraté à raison de 1g/mL (soit une contamination de 100 spores par mL). Seules 10 % des spores entrent en germination (cela signifie que pour 10 spores vous aurez 1 CFU) à 27 ° C. Avec un temps de latence de 30mn, au bout de **8h à 27 ° post reconstitution**, **10^5 CFU/mL** de *B.cereus* sont détectés dans le lait (1,2).

Q. Donnez le taux de croissance népérien de la souche dans le lait maternisé.

Le modèle primaire de croissance est :

$$X_t = X_0 \times \exp(\mu \times (t - lag)) \quad (1.2)$$

avec μ taux de croissance et lag de temps de la phase de latence.

Question 3 Temps de conservation - calcul - 10mn

Un bébé de 3 mois prend des biberons de 180mL. La dose infectieuse est de l'ordre de 10^5 CFU ingérées.

Q. Combien de temps le biberon peut être conservé après reconstitution ?

Partie 4 : Croissance de *B.cereus* et toxines - bonus

A. Production de toxine au cours de la croissance de *B.cereus* - bonus (5)

La céréulide peut être produite dans les aliments lorsque les spores des souches émétiques du Groupe *Bacillus cereus* germent et que les bactéries se multiplient. Les aliments riches en amidon ou en protéines sont particulièrement sensibles à la contamination par la céréulide en lien avec les matières premières et les conditions de process (température, temps d'attente, refroidissement non maîtrisé, etc.). Il s'agit notamment des produits laitiers, des préparations infantiles en poudre, du riz cuit, des pâtes, des produits à base de pommes de terre, des mélanges d'épices et des plats cuisinés.

La croissance de *B. cereus* ainsi que la production de sa toxine ont été testés dans différentes conditions dans les aliments.

Question 1 Analysez les résultats obtenus en respectant la méthode "fait-voit'interprête"

B. Traitement du lait par une bactériocine pour éliminer *B.cereus* (4)

Une culture de *Bacillus toyonensis* XIN-YC13 est réalisée en Batch et un prélèvement régulier permet de tracer la courbe de croissance. En parallèle, un étalement sur milieu solide de *B.cereus* est réalisé. Dans des puits, le surnageant de culture de *Bacillus toyonensis* XIN-YC13 traité (puits intérieurs) ou non (puits extérieurs) avec des peptidases est déposé à différents stade de la courbe de croissance.

Question 1

A partir des résultats présentés dans la figure 2a, indiquez :

- si le surnageant contient une bactériocine
- si oui, à quelle stade de croissance est-elle produite
- quelle est la nature biochimique de cette bactériocine

Question 2

Les cellules de *B.cereus* ont été observées à différentes concentrations en bacteriocines (Toyoncine). A partir des résultats de la figure 2b, donnez l'effet de la bacteriocin sur la sporulation.

Question 3

Du lait a été incubé en présence de *B.cereus* et de concentrations variables en bacteriocine (toyoncin). A partir de la figure 2c, analyser l'effet de la toyoncine sur la conservation du lait. Précisez la fonction des expériences réalisée avec la Nison et le ddH2O.

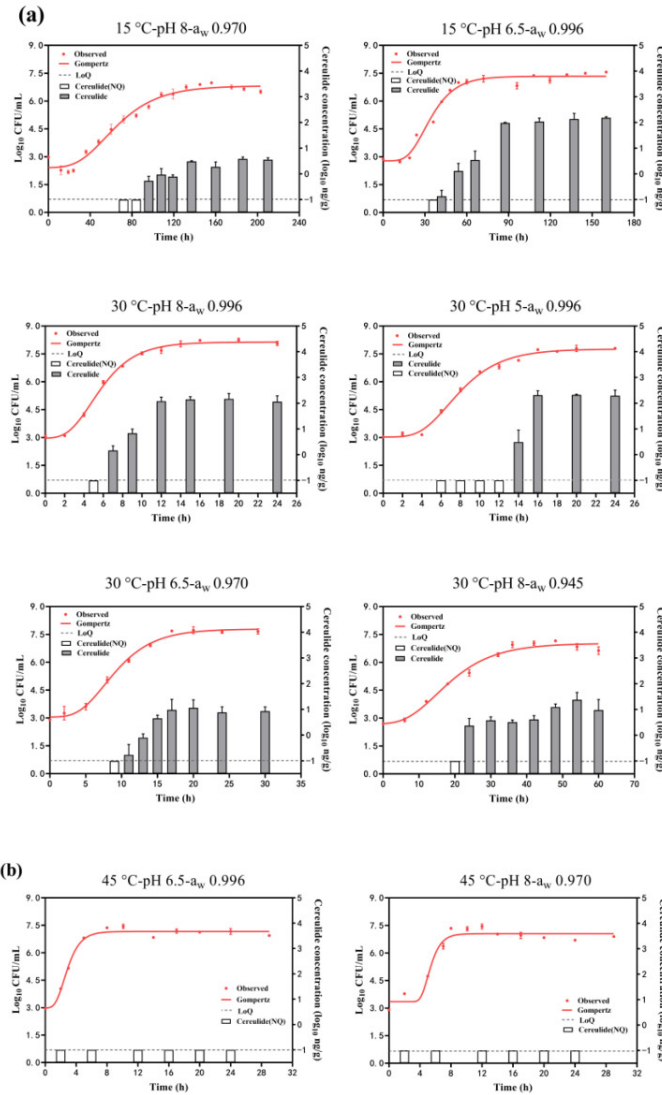
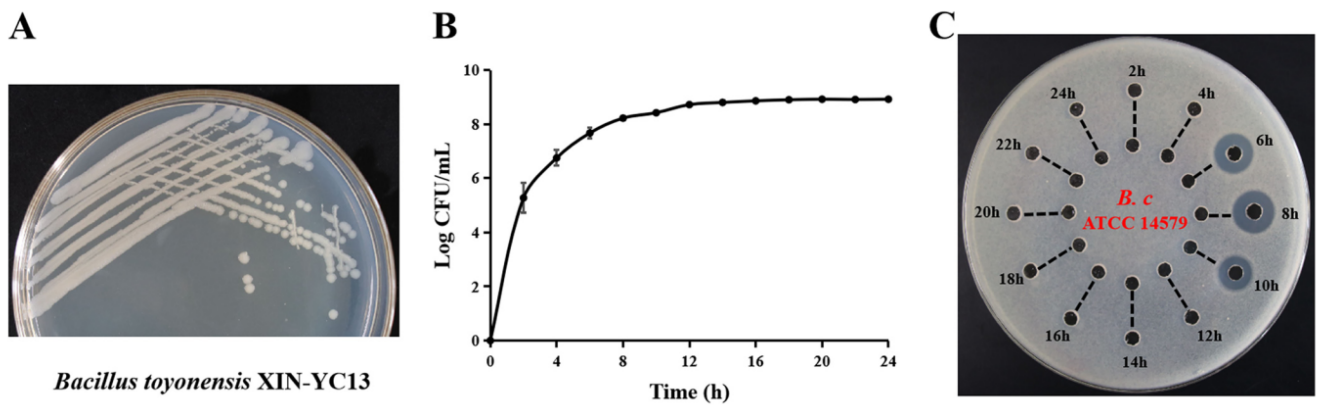


FIGURE 1.1 – *B. cereus* growth and cereulide production in combinations range of temperature (15 45 °C), pH (5 8), and a_w (0.945 0.996). (a) growth with cereulide production; (b) growth without cereulide production. White columns mean the cereulide concentration (log₁₀ ng/g) was lower than 1 log₁₀ ng/g (dash lines, LoQ ng/g) (not quantitation) and gray columns mean the quantified cereulide.



(a) Effet du surnageant sur la croissance de *B. Cereus*

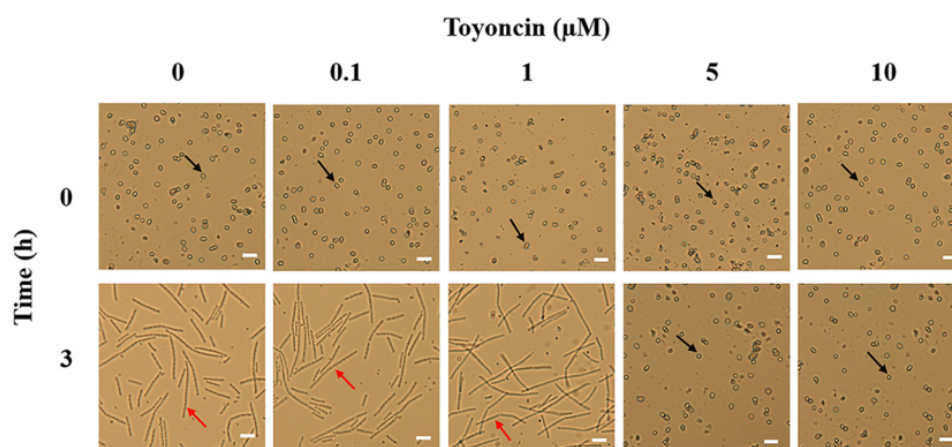
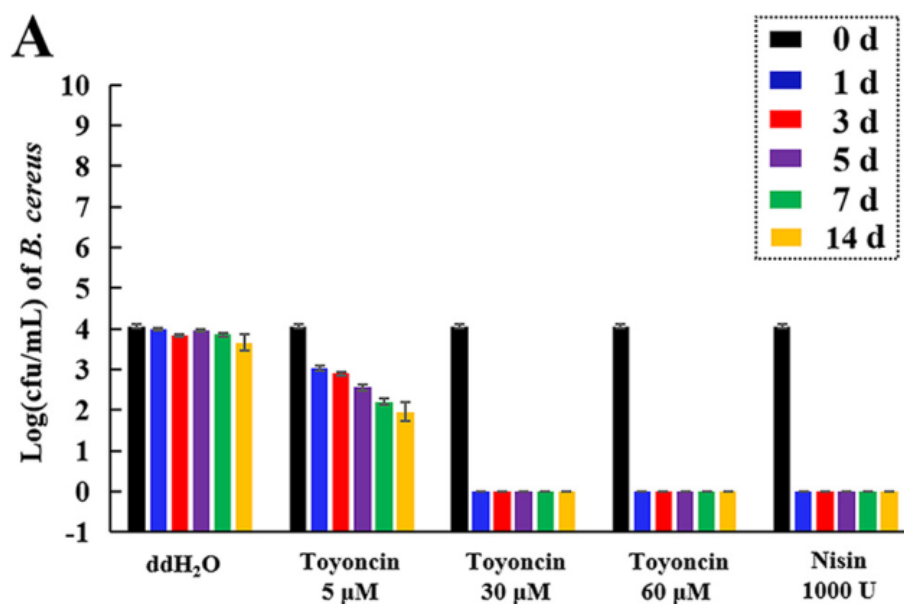


FIG 6 Toyoncin inhibits the outgrowth of *Bacillus cereus* spores. Black arrows indicate spores of *B. cereus* ATCC 14579. Red arrows indicate vegetative cells of *B. cereus* ATCC 14579. Scale bars represent 5.0 μm .

(b) Effet de la toyoncin sur la sporulation de *B. Cereus*



(c) Effet de la toyoncin sur la croissance de *B. Cereus* dans le lait

FIGURE 1.2 – Effet d'une bacteriocine, la toyoncin sur la croissance de *B. cereus*(4)