



HAL
open science

BtID -Outils pour identifier, tracer et contrôler les contaminants de *Bacillus thuringiensis* de la fourche à la fourchette

Florence Postollec, Sabine Herbin, Alexandra Séverac Cauquil, Sébastien Louarn, Marie-Hélène Guinebretière, Rodolphe Vidal, Benoît Thuillier, Louis Coroller

► To cite this version:

Florence Postollec, Sabine Herbin, Alexandra Séverac Cauquil, Sébastien Louarn, Marie-Hélène Guinebretière, et al.. BtID -Outils pour identifier, tracer et contrôler les contaminants de *Bacillus thuringiensis* de la fourche à la fourchette. *Innovations Agronomiques*, 2021, 82, pp.53-65. 10.15454/5kqe-4413 . hal-03159089

HAL Id: hal-03159089

<https://hal.inrae.fr/hal-03159089>

Submitted on 4 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives | 4.0 International License

BtID - Outils pour identifier, tracer et contrôler les contaminants de *Bacillus thuringiensis* de la fourche à la fourchette

**Postollec F.¹, Herbin S.², Cauquil A.², Louarn S.³, Guinebretiere M.H.⁴, Vidal R.⁵, Thuillier B.⁶
Coroller L.⁷**

¹ ADRIA UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX – Département Qualité & Sécurité des aliments, F-29196 Quimper

² ANSES – Unité SBCL (Staphylocoques, Bacillus, Clostridies et Lait) – Département des contaminants microbiologiques des aliments – Laboratoire de sécurité des aliments, F-94701 Maisons Alfort Cedex

³ IBB-PAIS – Initiative Bio Bretagne, F-35016 Rennes Cedex

⁴ INRA UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84914 Avignon Cedex

⁵ ITAB – Institut Technique de l'Agriculture Biologique, F-75595 Paris Cedex 12

⁶ LABOCEA – Site de Quimper, F-29334 Quimper

⁷ LUBEM UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX – Université de Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne EA3882, IBSAM, F-29334 Quimper

Correspondance : florence.postollec@adria.tm.fr ; rodolphe.vidal@itab.asso.fr

Résumé

Bacillus thuringiensis ou Bt est une bactérie ubiquiste utilisée dans le domaine agricole en protection des cultures pour ses propriétés insecticides depuis les années 1950. Au niveau taxonomique, Bt appartient au groupe *Bacillus cereus* (*sensu lato*), qui contient également des souches pouvant être impliquées dans la qualité et sécurité des aliments. Même si l'utilisation de produits phytosanitaires à base de souches commerciales de Bt est un moyen efficace, facile d'utilisation et avantageux pour la protection des cultures, la persistance de spores sur les végétaux traités n'est pas toujours compatible avec les critères microbiologiques fixés pour leur utilisation dans les denrées alimentaires. Le projet BtID a permis (1) d'évaluer la diversité de *B. thuringiensis* et le positionnement de souches commerciales au sein du groupe *B. cereus* ; (2) de passer en revue les pratiques agricoles pour la protection des plantes à base de Bt ainsi que (3) de développer des méthodologies et outils d'aide à la décision permettant d'identifier, distinguer et tracer les souches de Bt autorisées au niveau européen, du champ à l'assiette. La collecte de ces souches commerciales a permis le séquençage du génome de trois représentants distincts majoritaires utilisés en biocontrôle, une caractérisation fine du comportement de ces souches hautement spécialisées, ainsi que d'étudier leur prévalence au niveau des matières premières (légumes) et produits finis (alimentaires transformés).

Mots-clés : *Bacillus thuringiensis*, biocontrôle, sécurité sanitaire, critère microbiologique d'hygiène, agriculture biologique.

Abstract: Tools to identify, trace and mitigate *Bacillus thuringiensis* contaminations from field to fork

Bacillus thuringiensis or Bt is an ubiquitous bacteria used in agriculture for crop protection exploiting its insecticidal properties since the 1950s. At a taxonomic level, Bt belongs to the *Bacillus cereus* group (*sensu lato*) which also contains strains that may be involved in food quality and safety. While the use of commercial phytosanitary products based on Bt strains is an effective, easy-to-use and low cost treatment for crop protection, the persistence of spores on treated vegetables is not always compatible with food microbiological criteria. The BtID project carried out (1) experimental characterizations on the diversity of *B. thuringiensis* and the positioning of commercial strains within the *B. cereus* Group; (2) a review of

agricultural practices for the protection of Bt-based plants as well as (3) the development of methodologies and decision-making tools to identify, distinguish and trace the Bt strains authorized at the European level, from field to fork. This collection of commercial strains made it possible to sequence the genome of three distinct strains, which represent the majority of strains used in Bt biopesticides, and to achieve a detailed characterization of the behavior of these highly specialized strains, as well as their occurrence on raw materials (vegetables) and processed food.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, organic plant protection, food safety, hygiene microbiological criteria, organic agriculture.

Introduction

Bacillus thuringiensis (Bt) est actuellement le microorganisme le plus utilisé en lutte biologique contre les insectes ravageurs et piqueurs en agriculture, en forêt, et en milieu urbain. Aucun incident n'a été rapporté lié aux formulations commerciales utilisées depuis plus de 40 ans, notamment pour les cultures maraîchères en conventionnel ou en agriculture biologique. De par son efficacité, son coût abordable et son utilisation simple par pulvérisation, ces agents de biocontrôle représentent actuellement la seule alternative aux traitements phytosanitaires chimiques pour la protection des cultures contre certains ravageurs. Dans la suite de l'article, le terme de bioinsecticide pourra être utilisé pour désigner cette substance active vivante utilisable en agriculture biologique relevant de la catégorie biocontrôle.

Cependant, en février 2013, l'ANSES publie un avis relatif aux risques sanitaires liés à l'utilisation de souches de *Bacillus thuringiensis* en tant que substances actives insecticides suite à une alerte de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) sur des lots de persil frisé ayant des dénombrements en *Bacillus cereus* présumés supérieurs à 10^5 UFC/g. *B. cereus* ne fait pas l'objet de critères de sécurité des aliments selon la réglementation européenne, toutefois un critère d'hygiène des procédés applicables aux isolats de *B. cereus* présumés a été défini pour les préparations en poudre et aliments diététiques destinés aux nourrissons. Pour ces derniers, le seuil limite doit être compris entre 50 UFC/g et 500 UFC/g et un seuil d'alerte à 3 log UFC/g a été fixé, alors que pour les autres denrées alimentaires, le seuil d'alerte est fixé à 5 log UFC/g (note de service DGAL, 2009). De même, la publication au tout début du projet BtID de l'avis de l'EFSA (EFSA, 2016) ainsi que la réponse de Raymond et Federici (2017) soulignent la controverse que peut représenter cette problématique, liée à la persistance de spores de Bt utilisé pour la protection des cultures sur les matières premières entrant dans la fabrication de denrées alimentaires. D'un point de vue global, cela souligne la nécessité de dialoguer et d'avancer conjointement, plutôt que d'opposer des traitements phytosanitaires efficaces et abordables utilisés depuis les années 50 au niveau agricole pour la protection des cultures maraîchères, à des doutes concernant l'implication de ces souches commerciales dans la sécurité des aliments transformés issus de végétaux traités.

En effet, avant le projet BtID, les Bt autorisés en phytosanitaire ne pouvaient pas être différenciés des autres *B. cereus* présumés (ISO7932). Pour répondre à cette attente, le partenariat du projet BtID incluait des acteurs de l'amont et de l'aval des filières agricoles et alimentaires, pour en faire un projet intégratif de la fourche à la fourchette. Ainsi, les équipes de l'ITAB et IBB ont réalisé le recensement des pratiques agricoles, la mise en place d'essais aux champs, le transfert vers les réseaux identifiés ainsi que le suivi des discussions autour de l'utilisation de ces phytosanitaires aux niveaux national et européen. Les équipes d'INRAE et de l'ANSES, expertes dans la thématique *B. cereus sensu lato* aux niveaux national et international, ont contribué à l'acquisition de connaissances sur le comportement de *B. thuringiensis* et sa diversité, ainsi qu'au développement d'un outil moléculaire d'identification et d'affiliation phylogénétique. Sur Quimper, la collaboration entre l'ADRIA et LABOCEA, laboratoire vétérinaire maîtrisant la technologie de spectrométrie de masse MALDI-TOF, a permis la réalisation d'une base de données interne permettant l'identification des espèces, groupes phylogénétiques et souches de bioinsecticides commerciaux. Le LUBEM et l'ADRIA, collaborant depuis plus de 10 ans sur les risques

associés à la présence de contaminants sporulés thermorésistants (UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX), ont permis la caractérisation de la biodiversité étudiée par l'acquisition de données phénotypiques et la réalisation d'empreintes PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) permettant de tracer les souches du champ à l'assiette.

Cet article de synthèse reprend les points clés de ce projet CASDAR, qui était structuré en 5 actions distinctes mais connectées entre elles, alliant les compétences des différents partenaires.

1. Collecte des souches bactériennes et recensement des pratiques agricoles

Avant le projet BtID, les collections de référence ou bases de données recensant les génomes bactériens ne comportaient que peu ou pas d'isolats issus des produits phytosanitaires commerciaux. Au cours de ce projet, une collection de souches bactériennes représentatives de la diversité rencontrée au sein du groupe *B. cereus* a été constituée. La collecte d'isolats issus d'une quarantaine de formulations commerciales à base de Bt a permis également d'établir 9 souches représentatives des produits phytosanitaires à base de Bt autorisés en Europe. De plus, le recensement des pratiques agricoles auprès des agriculteurs sollicités met en évidence une utilisation importante, tant en préventif qu'en curatif, de ces agents de biocontrôle qui représentent la seule alternative aux phytosanitaires chimiques au niveau de la production maraîchère en agriculture biologique.

A noter que lors du projet BtID, nos collaborateurs d'IBB-PAIS ont observé la mise en impasse technique du non-renouvellement du Novodor® dont la substance active est *Bt tenebrionis* utilisé dans la lutte contre les doryphores sur pommes de terre (1ère utilisation en juin 1999, retrait en janvier 2020 ; ANSES). Lors de la table ronde réalisée à l'issue du projet en janvier 2020, le fabricant Sumitomo indiquait que ce non-renouvellement était lié à la taille du marché et aux controverses récentes (EFSA, 2016 ; Raymond et Federici, 2017).

1.1 Inventaire des souches commerciales collectées et produits associés

Au niveau européen, l'EFSA recense également les même 9 souches de Bt utilisées et autorisées en tant qu'agent de biocontrôle pour la protection des cultures, à savoir :

- 2 souches de *Bt aizawai* (ABTS 1857, GC-91) utilisées contre la tordeuse de la grappe et les chenilles phytophages pour les usages suivants : artichaut, choux, olivier, tomate. Ces souches sont commercialisées sous forme de différentes spécialités phytosanitaires telles que Xentari GD, Bioflower, Neudorff, Agree 50WP, ...
- 5 souches de *Bt kurstaki* (ABTS-351, PB 54, SA 11, SA12, EG 2348) utilisées contre les pucerons (arbres et arbustes, choux, pommier, rosier), chenilles phytophages (arbres et arbustes, artichaut, cassissier, cerisier, choux, framboisier, fruits à coque, forêt, haricots, oignon, olivier, pêcher, poireau, pommier, prunier, riz, rosier, tomate, cultures florales et plantes vertes, traitements généraux), tordeuse de la grappe, chenilles foreuses des fruits (pommier, amandier, pêcher, prunier), ravageurs divers, acariens et phytophages, insectes xylophages, zeuzère. Ces souches sont commercialisées sous forme de différentes spécialités phytosanitaires telles que Bacivers DF, Bactospeine Jardin, Bactura, Biobit, Dipel, Foray 48B, KB insecticide BV, Scutello, Delfin, Delfin Jardin, Wasco Jardin, Wasco WG, Foray 48B ...
- 1 souche de *Bt tenebrionis* (NB-176) utilisée contre les coléoptères phytophages de la pomme de terre et de la tomate. Cette souche est commercialisée sous le nom de Novodor FC.
- 1 souche de *Bt israelensis* (AM65-52) utilisée contre les moustiques et commercialisée sous forme de différentes spécialités phytosanitaires telles que Aquabac XT, Aquabac 200G, Vectomax G, VectoMax WSP, Aquabac DF3000, Vectobac 12AS, Vectobac WG, Vectobac G...

Tableau 1 : Produits commerciaux à base de Bt UAB – Utilisables en en agriculture biologique, listés en 2020 lors de la journée de restitution du projet BtID et représentant un total de 327 usages (Source : e-phy ANSES)

Nom du produit	Substance active	Usages
AGREE 50 WG	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> , souche GC-91	1
COSTAR JARDIN	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kustaki</i> , souche SA-12	37
COSTAR WG	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kustaki</i> , souche SA-12	42
DELBACILETI	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kustaki</i> , souche SA-11	44
DELFIN	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kustaki</i> , souche SA-11	44
DELFIN JARDIN	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kustaki</i> , souche SA-11	43
DIPEL DF	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kustaki</i> , souche ABTS 351	32
DIPEL DF JARDIN	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kustaki</i> , souche ABTS 351	23
FORAY 48 B	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kustaki</i> , souche ABTS 351	2
LEPINOX PLUS	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kustaki</i> , souche EG2348	24
NOVODOR FC	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> , souche NB176	2
XENTARI	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> , souche ABTS 1857	33

A noter qu'en dehors de l'Europe, plusieurs autres souches et formulations commerciales peuvent être utilisées, dont 12 en agriculture biologique (Tableau 1), et sont recensées au niveau de diverses bases de données américaines avec un code US EPA (Environmental Protection Agency) ou numéro CAS (chemical abstract service). Ces agents de biocontrôle hors EU n'ont pas fait l'objet de la collecte réalisée dans le projet BtID.

1.2 Constitution de la souchothèque de l'étude

La collection du projet comportait 90 souches représentatives de la diversité phylogénétique rencontrée au sein du groupe *B. cereus*. Un gros travail de collecte a été mené pour récupérer des souches ayant une faible prévalence, comme les souches de *B. thuringiensis* des groupes II et VI, ou les souches de bioinsecticides commerciaux qui sont moins répandues que les souches classiques Bti AM6552, Btk ABTS-351, Bta ABTS-1857. Parmi les 90 souches sélectionnées, 4 sont issues de bioinsecticides (Bactospeine = ABTS-351, Ad2118 = ABTS-1857, Ad2234 = ABTS-351, Ad2584 = AM6552) et représentent les souches classiquement retrouvées dans la plupart des formulations utilisées. La sélection de souches étudiées au sein du projet comportait donc 43 souches de *B. thuringiensis* et 47 souches du groupe *B. cereus* autres que *B. thuringiensis*. Les groupes I et VII étaient réputés ne pas contenir de *B. thuringiensis* mais présentaient un intérêt pour constituer la diversité la plus exhaustive possible parmi les souches autres que *B. thuringiensis*. La répartition des souches de Bt au sein des groupes phylogénétiques de la sélection variait de 27 à 67 %. Le séquençage du génome de 16 souches parmi elles, a permis, en plus d'intégrer trois souches de Bt commerciales aux bases de données des génomes, d'avoir accès aux données de génomes de Bt très sous-représentés en début de projet BtID pour les groupes phylogénétiques II, V, VI.

1.3 Recensement des pratiques agricoles

Une enquête permettant de recenser les pratiques agricoles a été menée début 2017 auprès de 180 agriculteurs bretons. Sur l'ensemble des agriculteurs contactés, 37 % ont répondu au questionnaire. Leurs réponses sont illustrées en partie dans la Figure 1.

Cette enquête a été menée par démarchage téléphonique (< 10min) auprès des agriculteurs recensés par l'ITAB et IBB-PAIS. Ces agriculteurs opèrent en agricultures bio et conventionnelle, la moitié utilise le Bt principalement en traitement curatif. Les récoltes sont destinées à la vente directe ou en coopérative des produits frais et non transformés. Le retour de cette enquête souligne un manque d'informations concernant l'utilisation de Bt, notamment en ce qui concerne les modes d'utilisation (curatif ou préventif)

ainsi que l'application de délais avant récolte (DAR). Il est à noter que la plupart des fiches d'usage des produits ne comportaient pas de DAR lors de l'enquête en 2016/2017.

L'autre résultat clé à souligner concerne la motivation de l'utilisation du Bt, qui porte principalement sur le fait que ce traitement est efficace et qu'il n'y a pas de solution alternative en agriculture biologique, notamment pour le traitement des crucifères qui représentent une grande partie de la production en Bretagne (Figure 1).

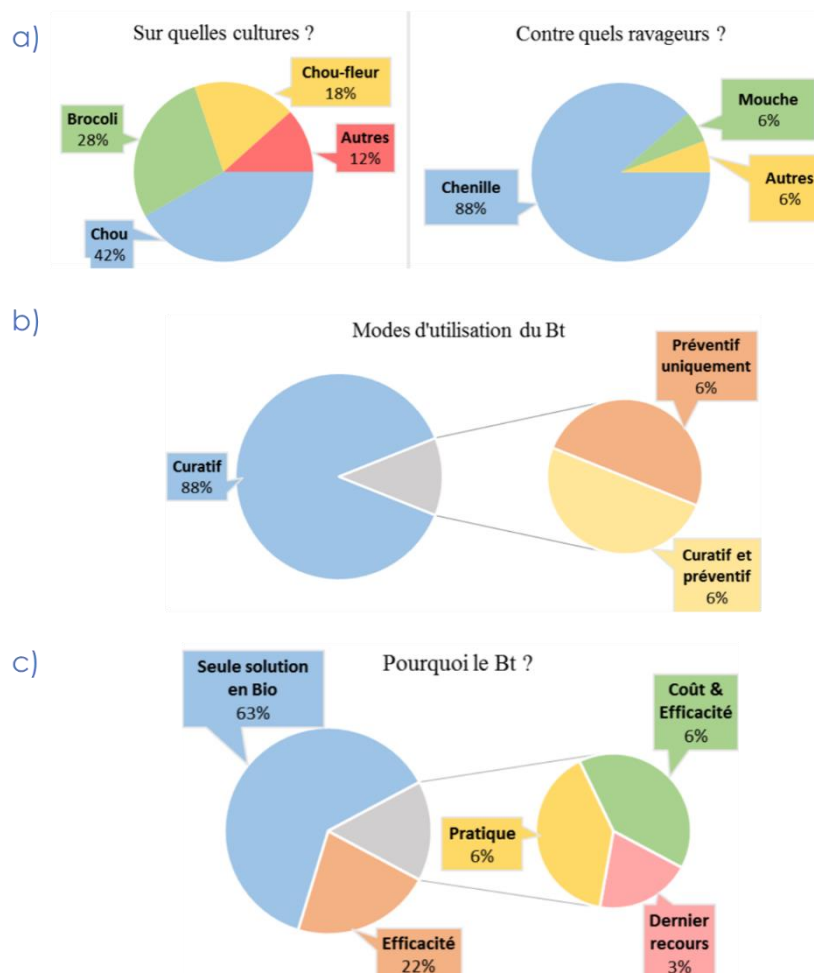


Figure 1 : Résultats de l'enquête menée auprès d'agriculteurs concernant les questions suivantes : a) Sur quelles cultures et contre quels ravageurs appliquez-vous un traitement au Bt ? ; b) Quels modes d'utilisation ? ; c) Quelles motivations ?

1.4 Etude de cas du champ à l'assiette

La production au champ de laitue (2017), brocoli (2018) et persil (2019) avec et sans traitement au Scutello® a été réalisée par IBB avec enregistrement des conditions météorologiques, et analyses physico-chimiques et microbiologiques de l'eau de forage utilisée (Figure 2).

Les plans d'échantillonnage et prélèvements ont été réalisés selon les pratiques de la plateforme dans le but d'évaluer l'application des méthodes d'identification et traçabilité des souches de bioinsecticides du champ à l'assiette, et non pour une analyse statistique de survie.

La solution de Scutello® appliquée était concentrée de l'ordre de 7 log UFC/g et les dénombrements de *B. cereus* présumptifs, réalisés selon la norme ISO7932, mettaient en évidence des taux de contamination sur le végétal traité de l'ordre de 4-5 log UFC/g contre 2-3 log UFC/g pour le végétal non traité. Les taux de contamination naturelle observés étaient cohérents avec les études précédentes (Guinebretière *et al.*,

2003). Ces dénombrements ont été réalisés en triplicat avec en parallèle le dénombrement de flore totale et spores, permettant de distinguer la proportion de *Bacillus* sous forme de cellules végétatives ou sous forme de spores. Dans les conditions de notre étude, le traitement au Scutello® doublait donc la contamination en spores de *B. cereus* présumés et ce niveau de contamination se maintenait sous forme de spores tout au long du process et du stockage de la purée de brocoli. Les taux de contamination dans les prélèvements de terre avant ou après traitement au Scutello® étaient quant à eux de l'ordre de 5 log UFC/g.



Figure 2 : Parcelle utilisée pour la production de laitue avec et sans traitement au Scutello® réalisé afin de distinguer et tracer la souche de bioinsecticide du champ à l'assiette (crédit photo IBB, S. Louarn)

Les empreintes PFGE déterminées permettaient de tracer la souche de Bt contenue au départ dans le traitement (Scutello®) et de suivre dans le temps son devenir. Elles indiquaient la persistance de la souche de bioinsecticide au niveau de la terre et des végétaux quelques soient les délais appliqués avant récolte (DAR de 1 jour à 1 mois). Pour chacune des conditions testées, les productions végétales étaient récoltées au champ puis analysées au laboratoire. La comparaison entre les dénombrements de spores et de *B. cereus* présumés permettent d'indiquer que ces contaminations étaient principalement sous forme de spores bactériennes. Les contaminations en *B. cereus* présumés sur végétal après récolte variaient de 3,7 à 6,1 log UFC/g lorsqu'un traitement au Scutello était appliqué pendant la culture. En l'absence de traitement bioinsecticide, ces mêmes végétaux présentaient des contaminations en *B. cereus* présumés sur végétal après récolte de l'ordre de 2,3 +/- 0,2 log UFC/g. Ces résultats sont confortés par l'utilisation de la PFGE qui indique une forte diversité de profils obtenus sur les isolats de *B. cereus* présumés avec la présence d'un regroupement d'empreintes similaire à celle de la souche utilisée dans le Scutello.

Seule la production de brocolis a été utilisée pour la fabrication de denrées alimentaires au laboratoire, afin de suivre la contamination en *B. cereus* présumés tout au long du procédé de transformation et lors du stockage au froid de purée de brocoli. La comparaison entre les dénombrements de spores et de *B. cereus* présumés permet d'indiquer que ces contaminations étaient principalement sous forme de spores bactériennes avec aucune réduction de contamination lors de la cuisson, du broyage ou du stockage en conditions réfrigérées. De plus, un échantillonnage et une caractérisation des isolats de *B. cereus* présumés avant et après chacune des étapes de transformation ont été réalisés. Cela a fait l'objet de la caractérisation de plus de 200 isolats. Cette caractérisation s'est faite en deux étapes, à savoir la recherche de cristal parasporal au microscope optique afin de distinguer les *Bacillus thuringiensis* des *Bacillus cereus* selon les annexes informatives de la norme ISO7932, et l'acquisition d'empreintes PFGE permettant de tracer les souches du champ à l'assiette. Ces résultats soulignaient la biodiversité observée parmi les souches de *B. cereus* présumés retrouvées sur la terre et les légumes non traités, avec la présence d'une flore dominante psychrotrophe lors du stockage à température réfrigérée (7 jours à 4°C et 14 jours à 8°C) de la purée de brocoli, en plus de la présence de la souche de bioinsecticide utilisée qui persistait sous forme de spore tout au long de la durée de vie du produit.

2. Positionnement des souches de Bt au sein de la diversité du groupe

Pour l'ensemble des 90 souches sélectionnées dans le projet, les caractérisations ont porté sur des aspects moléculaires (détection de gènes spécifiques ciblés en PCR), ainsi que des aspects phénotypiques (capacités de croissance, survie et de production de toxines diarrhéiques et émétiques). Ainsi, les marqueurs moléculaires ciblés portaient notamment sur (1) les gènes *cspA* et *panC*, marqueurs respectifs de psychrotrophie de souches et d'affiliation aux groupes phylogénétiques, (2) les gènes codant pour les toxines et facteurs liés à la virulence, à savoir les entérotoxines diarrhéique (*Hbl*, *Nhe*), la cytotoxine K (formes *CytK-1* et *CytK-2*), la présence des gènes codant pour la toxine émétique (gène *ces*) et l'hémolysine II (gène *hlyII*). La caractérisation phénotypique a porté sur (1) l'observation de cristal parasporal spécifique de *B. thuringiensis* après observation au microscope optique, (2) la cytotoxicité des surnageants de culture qualifiée par le dosage immuno-enzymatique avec des kits commerciaux (kit oxoid BCET RPLA, kit Merck Singlepath® Emetic tox et Kit 3M Tecra Duopath® cereus diarrheal enterotoxin) à 30 et 37°C, ainsi que la toxicité de ces surnageants sur cellules Caco2 (lignées clonales intestinales), (3) la détermination des températures limites de croissance pour la température, ainsi que (4) la thermorésistance des spores à 90°C pendant 5 temps de traitement (1-80 min).

Seulement neuf souches n'ont pas produit de spores dans ces conditions de culture, malgré les différentes tentatives testées. Une analyse en composantes principales (ACP) a permis de mettre en évidence certaines corrélations sur l'ensemble des variables. Cette analyse montre que la variable la plus discriminante était le thermotype, c'est-à-dire les températures minimales, optimales et maximales de croissance. Dans les conditions expérimentales appliquées, cette étude indiquait que l'espèce *B. thuringiensis* ne se démarquait pas globalement des autres espèces pour les variables étudiées, y compris les souches de bioinsecticides étudiées (*Bacillus thuringiensis kurskstaki* ABTS-351 issu de Bactospeine et Dipel PM Jardin, *Bacillus thuringiensis aizawai* ABTS-1857 issue de Xentari, et *Bacillus thuringiensis israelensis* AM65-52 issue de Vectobac).

Concernant la détection des gènes associés aux toxines, les résultats étaient cohérents avec l'état des connaissances actuelles. Les marqueurs de pathogénicité *CytK-1* et *ces* n'étaient pas retrouvés sur les souches de Bt étudiées, tandis que les gènes codant pour les toxines diarrhéiques étaient retrouvés chez *B. thuringiensis*, selon la même distribution que *B. cereus* au sein des groupes phylogénétiques. Les souches de bioinsecticides étudiées présentaient un profil commun, elles appartenaient toutes au groupe IV, au sein de deux sous-groupes phylogénétiques distincts (*panC*). Elles portaient les gènes *nhe*, *hbl* et *cytK-2*. Il est à noter que la souche *Bt tenebrionis* NB-176 isolée de Novodor® se distinguait par l'absence des gènes *hbl* et *cytK-2*.

En parallèle, une étude phylogénomique itérative de plus de 900 génomes issus des bases de données internationales et du projet BtID (16 génomes de *B. thuringiensis* – groupes II, V, IV, VI – séquencés au cours du projet dont trois Bt issus de bioinsecticides) confirmait une diversité importante chez *B. thuringiensis*, comparable à celle de *B. cereus*, diversité autant phylogénétique qu'en contenu de gènes de toxines. Ces résultats soulignaient notamment le fait que *B. thuringiensis* pouvait comporter des souches inoffensives tout comme des souches pathogènes, et que le risque lié à l'épandage de bioinsecticides Bt devait être appréhendé selon les caractéristiques propres à la souche active et non selon les caractéristiques propres à l'espèce. Cette étude permettait également de positionner de manière précise les souches de Bt commerciales au sein de lignées spécifiques dont on pouvait entrevoir une identification aisée via plusieurs méthodes.

3. Développement et validation des outils analytiques pour l'identification et la traçabilité des souches commerciales de Bt

L'ensemble de la collection du projet a été utilisé pour optimiser différentes méthodologies permettant l'acquisition d'empreintes pour les souches de Bt commerciaux. L'analyse bioinformatique de ces empreintes permettait d'identifier et tracer les souches de Bt épandues lors des traitements

phytosanitaires. Les optimisations analytiques ont été réalisées au sein des laboratoires responsables de ce développement. La validation de ces outils a par la suite été réalisée en laboratoire avec des souches extérieures à la souchothèque et utilisées en aveugle pour valider la méthode. Ces outils étaient basés sur la détermination du profil protéomique par MALDI-TOF ou sur la production d'empreintes moléculaires génomiques spécifiques à chaque souche.

3.1 Typage protéomique des isolats par MALDI-TOF

Après optimisation des conditions de culture (3 milieux, 4 temps d'incubation) et de dépôt (dépôt direct, extraction rapide, extraction totale), la constitution de la base de données s'est faite sur des cultures jeunes après extraction et réalisation de 20-24 spectres par souche pour la réalisation des spectres de référence (MSP). Conformément aux recommandations du fournisseur, plusieurs dépôts sur la plaque du standard contenant 8 protéines (BTS) sont nécessaires pour garantir la qualité des résultats. De même, la génération des spectres de référence est réalisée après avoir validé la qualité d'un minimum de 20 spectres bruts par souche sur l'observation de 6 pics dans la gamme d'étude allant de 2 à 20 kDa. La base de données relative au projet comporte donc un minimum de $20 \times 90 = 1800$ spectres bruts. Un total de 3 bases de données a été réalisé par 3 opérateurs indépendants pour les 90 souches sélectionnées dans le projet.

Ces résultats sont en accord avec les travaux précédents sur la biodiversité du groupe *B. cereus* (Guinebrière *et al.*, 2008). Conformément aux recommandations du fournisseur, l'identification de pics discriminants et spécifiques permettant l'identification de souches extérieures à la base de données a été faite sur spectres bruts. Cette analyse est très délicate compte tenu des variations observées entre les 3 réplicats réalisés systématiquement et entre les 3 opérateurs. La sélection des pics spécifiques a donc été faite à partir de la première base de données et validée sur les 2 autres et des souches additionnelles. Au démarrage du projet, la base de données disponible sur le MALDI-TOF Biotyper comportait 6 souches de *B. cereus sensu lato* dont les souches ATCC14579T, ATCC10792, qui sont communes avec la sélection de souches du projet. L'utilisation de 90 souches représentatives de la biodiversité rencontrée au sein du groupe *B. cereus* a permis d'améliorer grandement l'identification des souches, malgré la complexité et variabilité observée au sein de ce groupe. Le développement de cette base de données améliore grandement le score et l'identification des souches de *B. cereus sensu lato* avec une distinction nette des profils attribués aux *B. cytotoxicus* (groupe VII), *B. weihenstephanensis* (groupe VI), *B. pseudomycooides* (groupe I). Une amélioration demeure possible pour les autres groupes en sélectionnant les pics spécifiques propres à chaque groupe.

3.2 Typage moléculaire des isolats

Le typage moléculaire des souches a été réalisé par rep-PCR (BOX-A1R-PCR, GTG5-PCR) ou AP-PCR (M13-PCR) ou après restriction enzymatique et migration en champ pulsé (PFGE). L'analyse bioinformatique des empreintes a permis le regroupement des empreintes indifférenciables.

3.2.1 Méthode de typage rapide

Les différentes méthodes ainsi que des tests combinant différentes amorces de différentes méthodes ont été réalisés sur une sélection restreinte de souches. Puis les trois techniques les plus prometteuses ont été validées sur les 90 souches du projet. Ces trois méthodes ont ensuite été appliquées sur 30 isolats issus d'une trentaine de produits phytosanitaires commerciaux à base de Bt. Les techniques les plus prometteuses étaient la combinaison de la BOX/GTG5, la BOX-PCR seule et la M13-PCR seule. En effet ces trois techniques permettaient une typabilité et présentaient un pouvoir discriminant satisfaisant. Si la M13-PCR est très reproductible, la BOX est plus sensible aux concentrations d'ADN qui doivent être bien maîtrisées. Ces méthodes permettent de reconnaître rapidement les souches de Bt issues de

bioinsecticides, en trois profils principaux, distincts et appartenant à deux sous-groupes phylogénétiques au sein du groupe IV.

3.2.2 Méthode de typage en champ pulsé ou empreinte PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

En parallèle, le protocole de typage par Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) a été adapté de Liu *et al.* (1997) et Zhong *et al.* (2006) avec les optimisations conséquentes sur (1) la standardisation des cultures, (2) la fabrication et lavage des plugs, (3) les conditions de restriction et (4) les conditions de migration. Trois enzymes de restriction ont été testées (SmaI, NotI, ApaI). L'analyse bioinformatique a été faite par la plateforme BioNumerics® et les dendrogrammes ont été générés en utilisant le coefficient de Dice/UPGMA selon les recommandations et procédures du centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) du gouvernement américain. L'utilisation de l'enzyme NotI permet d'obtenir des profils plus simples à interpréter (5-10 bandes) alors que SmaI et ApaI génèrent des profils plus complexes. Ces trois enzymes permettent de générer des profils ou empreintes spécifiques des souches de bioinsecticides.

Parmi les souches testées, les empreintes des souches de *Bt israelensis* présentaient des profils indifférenciables. Les souches *Bt kurstaki* et *Bt aizawai* étaient composées au sein de chaque sérotype de profils très proches. Ces résultats soulignent le fait que les mêmes souches ou des souches extrêmement proches sont utilisées dans des formulations de bioinsecticides commercialisées sous des noms différents. Ces résultats sont en accord avec les regroupements obtenus par les méthodes de M13-PCR, Box-PCR et la combinaison d'amorces BOX-A1R/GTG5.

Les résultats obtenus par MALDI-TOF, typage rapide par PCR et PFGE sont cohérents et permettent de distinguer les souches commerciales utilisées pour la protection des cultures des autres souches de *B. cereus* présomptifs. Ces résultats soulignent la faible diversité des souches utilisées en tant qu'agent de biocontrôle parmi un nombre très important de formulations commercialisées. Ces outils permettent la distinction, l'identification et la traçabilité des souches et peuvent être appliqués pour le suivi de souches du champ à l'assiette.

4. Transfert et valorisation des résultats vers un large public, qu'il soit agro-industriel, laboratoire expert, académique ou institutionnel

L'acquisition des connaissances et le développement analytique ont été menés au sein du consortium afin d'en valoriser les résultats en les diffusant auprès d'un public (1) spécialisé, sous forme de publications scientifiques, enquêtes recensant les pratiques agricoles, création d'une interface web pour la qualification des risques sanitaires et d'altération des *B. cereus* présomptifs, et (2) plus large, sous forme de création de page web décrivant le projet, journée de restitution, interventions lors des [colloques internationaux](#) ou webinaires pour la sensibilisation des industriels de l'agroalimentaire à la diversité du groupe *B. cereus*. Le transfert de ces livrables au niveau des réseaux déjà identifiés permettra de poursuivre la valorisation des résultats et du consortium du projet BtID.

4.1 Outil de qualification des risques sanitaires et d'altération des *B. cereus* présomptifs

L'affiliation des souches du groupe *B. cereus* en 7 groupes phylogénétiques majeurs en fonction de la séquence du gène *panC* a permis le développement de [l'outil](#) de comparaison de séquences en 2010. Cette affiliation aux groupes phylogénétiques plutôt qu'aux espèces est plus que jamais d'actualité suite à la description récente de nombreuses nouvelles espèces (Jimenez *et al.*, 2013 ; Miller *et al.*, 2016 ; Jung *et al.*, 2010-2011 ; Liu *et al.*, 2017) amenant à 22 le nombre d'espèces associées au groupe *B. cereus* et par là même une complexité difficile à gérer par les acteurs de la filière.

L'outil CereusID est l'un des livrables majeurs du projet BtID (Figure 3). Il permet de positionner les souches de *B. cereus* présomptifs au sein des 7 groupes phylogénétiques majeurs. De plus, il autorise l'identification des sous-groupes IV-4 et IV-7 contenant les souches commerciales de bioinsecticides, le sous-groupe III-8 contenant *B. anthracis* et anthracis-like, ainsi que le sous-groupe III-5 contenant les souches émétiques. Cela permet ainsi de qualifier les risques sanitaires (*B. anthracis*, *B. cytotoxicus*, souche émétique), risques d'altération (*B. weihenstephanensis*, *B. wiedmannii*) ou agents de biocontrôle autorisés pour la protection des cultures au niveau européen. Cette application en ligne, simple, accessible et ciblée sur les dangers microbiologiques permettra la sensibilisation envers un public plus ou moins spécialisé, tel que les professionnels de la filière (industriels de l'agro-alimentaire) et les laboratoires d'analyses microbiologiques.

Cereus_ID : Identification aux groupes phylogénétiques de *Bacillus cereus* (*sensu lato*)

Identification du groupe phylogénétique par séquençage du gène *panC*
 La séquence du gène *panC* est utilisée pour l'identification des groupes phylogénétiques au sein de *B. cereus sensu lato*, selon la classification proposée par [Guinebretière et al. \(2008\)](#).

Les caractéristiques phénotypiques attribuées aux groupes phylogénétiques de *B. cereus* peuvent être consultées [en cliquant ici](#).

Pré-requis indispensables :
 Vous devez avoir préalablement vérifié l'appartenance de cette souche au Groupe *B. cereus* (exemple : isolement et colonies caractéristiques sur milieu Mossel ou sur un milieu validé ISO 16140).
 Les 2 courtes séquences AACAAAC ou AACAGAC sont requises pour initier l'alignement.
 Pour accéder au protocole de préparation de la séquence *panC*, veuillez cliquer [ici](#).

La séquence du gène est comparée à celles présentes dans la base de données du centre INRA d'Avignon - UMR408.
 L'algorithme d'alignement de séquence est présenté [ici](#).
 Contact : [M.-H. Guinebretière](#)

Comment saisir les séquences?

```
ATAATCTACACCGTTTCTTTGTCACATTTTCATCTCTATCAATATCAGGAGATTCGATCTAAATCTTCATTTGGGCCAAATGTAGTGGGTTTACA
AATACACTTAAACTACAGTTTCATTTCTCTCTGCTTACGTAATAAAGTAGCATGGCCCTCATGTAATAACCCATCGT
>NVH-0597-99
TTCTGCATTACGTTCTCTGCTCAATTCCTTTTGGCATAACAGACTGCAGTATAAATGAGGAGCCTCTTACGCTCTCTGTGATAAATACAG
TTACGGAACCTTTCGCTAATCCATCTCTGCTTACAAATCCACCGGTACGATTTGAACCGGAATATAAATCAGCAACAATCTTCAATGACAG
CAACTTGTGTGATCTTTATACCAAAAATACGCGCGTGTGGCAATGTAATATAAATAGTTTCATGAGTACAGTCGCAACACGCGAAATGACCTGG
CCTTTGTTACCGGATACATCGGTACGCTTCACAACTCTACCGTTGTCGTTGTCTACTGGATACATTTCTTACGCTCGGATAAATAAATAA
TCTACACCGTTTCTTTTGGTCACATCTCATCTCTATCAATATCAGGAGGATTCGATCTAAATCTTCATTTGGCCCAAACCTGTAGCGGATTTACAACA
CGCTTAAACTACAATCCATTTCTCTCTGCTTACGTAATAAAGTCGATGGCCCTCATGTAATAAACCCTCGT
```

IDENTIFIER !

Résultats :

Query seq	Phylogenetic group (into <i>B. cereus sensu lato</i>)	%Identity	Close related Species	Specific Charactics	Troubleshooting
AH187_B_CEREUS	III sub-group_5 see more on this group	100% see detailed results	<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i> III genomovar paranthracis see more on close related Species	emetic-like strain with possibly high virulence capabilities see more ...	
BACTOSPEINE	IV sub-group_4 see more on this group	100% see detailed results	<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i> IV-4 see more on close related Species	may have originated from Bt Bioinsecticide see more ...	
NVH-0597-99	III sub-group_3 see more on this group	100% see detailed results	<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i> III-8 see more on close related Species	anthracis-like strain see more ...	

Figure 3 : Visuel de l'outil CereusID obtenu pour l'affiliation des 7 groupes phylogénétiques majeurs du groupe *B. cereus*, l'identification des espèces affiliées et sous-groupes, notamment celui comportant les agents de biocontrôle *Bt aizawai* et *Bt kurstaki*

4.2 Dissémination à destination d'un large public

La description du projet BtID sur le site web d'INRAE ainsi qu'une [page web](#) hébergée par l'ITAB ont été créées dès le démarrage du projet afin de communiquer sur le consortium, les objectifs et les livrables du projet BtID (Figure 4).

Btid

Accueil Le Projet ▾ Biopesticides et Pratiques Agricoles Diversité de *Bacillus thuringiensis*

Etude de la diversité par spectre de masse Validation et études inter-laboratoires Accompagnement ▾

Bienvenue sur la plateforme Bt ID

Outils pour identifier, tracer et contrôler les contaminations de *Bacillus thuringiensis* de la fourche à la fourchette

Bacillus thuringiensis est une bactérie ubiquiste utilisée dans le domaine agricole en protection des cultures pour ses propriétés insecticides depuis les années 1950. C'est l'insecticide le plus utilisé au monde en Agriculture Biologique.

Au niveau taxonomique, Bt appartient au groupe de *Bacillus cereus sensu lato* et n'est aujourd'hui différenciable de l'espèce *B. cereus sensu stricto* que par la production d'une toxine insecticide (cristal parasporal). Ce groupe au sens large contient également des bactéries qui peuvent poser des problèmes sanitaires et entraîner des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). De ce fait le seuil d'alerte pour le dénombrement des *B. cereus* présumptifs dans les aliments peut être atteint, voire dépassé, lors de ces traitements phytosanitaires bio-insecticides.

Le projet Bt ID s'inscrit dans une démarche transversale pour proposer des méthodes simples permettant de distinguer et tracer les contaminations dues aux quelques souches autorisées (Bt) de autres contaminants *B. cereus* présumptifs. Ce projet a donc pour objectif de proposer une méthode innovante d'identification des souches de Bt, de qualification du risque associé et de leur suivi de la fourche à la fourchette.

Projet CASDAR 2016-2019 financé par le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt

Figure 4 : Visuel de la page web hébergée par la plateforme ITAB-ID présentant le projet BtID ainsi que le consortium et les différentes actions menées dans le projet BtID (2016-2019)

Une journée de restitution du projet BtID a été organisée le 29 janvier 2020 à Paris avec la présentation des résultats clés du projet vegexpoBt, coordonné par ACTALIA avec le syndicat des Végétaux Frais Prêts à l'Emploi sur l'impact des procédés industriels sur la persistance des souches de bioinsecticides dans les aliments (Figure 5). En effet, cela a permis de mutualiser et valoriser les résultats clés de ces 2 projets nationaux se finissant en 2019. Des études de cas avec démonstration de l'utilisation de l'outil [Sym'Previus](#) a permis la visualisation des points de contrôle critiques et l'optimisation des procédés pour la maîtrise de ces contaminations. En effet, cet outil de microbiologie prévisionnelle permet de prévoir la croissance et la destruction des isolats de *B. cereus* présumptifs en fonction des différents groupes phylogénétiques. De plus, une table ronde organisée avec les experts nationaux a permis d'appréhender la problématique de manière transversale en soulignant le besoin de statuer sur :

- L'innocuité des souches commerciales de Bt autorisées au niveau européen, qui ont pu être associées, mais non impliquées, à des cas d'intoxications ;
- Le manque d'alternatives aux pesticides chimiques si l'utilisation de bioinsecticides à base de Bt était arrêtée. Il est bon de rappeler que les traitements à base de Bt sont une solution biologique efficace, avantageuse et durable pour la protection des cultures.

Bacillus thuringiensis est-il un Bacillus cereus comme les autres ?

Colloque de restitution du projet Casdar Bt ID
avec la participation du projet FranceAgriMer VEGEXPOBT

État des connaissances sur le Bt, de ses applications phytosanitaires à ses impacts agro-alimentaires

+ d'infos sur www.itab.asso.fr et www.adria.tm.fr

PROGRAMME

Colloque à destination des Instituts de recherche, administrations, laboratoires d'analyses, industries agri-agro, instituts techniques, producteurs et transformateurs

9h30 Café d'accueil

10h00 Contexte : les projets BtID et VegExpoBT
Présentation des projets BtID (Outils pour identifier, tracer et contrôler les contaminations de *Bacillus thuringiensis* de la fourche à la fourchette) et VegExpoBT (Impact de la contamination des végétaux par Bt lors des procédés de transformation et de la conservation)
Florence POSTOLLEC - ADRIA, Rodolphe VIDAL - ITAB, Catherine DENIS - ACTALIA

10h20 Positionner les souches commerciales de Bt dans la diversité du groupe *Bacillus cereus*
Actualisation des connaissances sur le groupe *Bacillus cereus* (Capacité de croissance, résistance, virulence)
Marie-Hélène GUINEBRETIERE - INRA, Louis COROLLER - LUBEM

11h00 Revue des pratiques agricoles sur l'utilisation de Bt
Types de cultures / applications / temps d'attente avant récolte... Quelles préconisations ?
Rodolphe VIDAL - ITAB, Sébastien LOUARN - IBB

11h20 Quels outils pour identifier *Bacillus thuringiensis* ?
Panorama des techniques de laboratoire développées lors des projets : pour distinguer *Bacillus cereus*/*Bacillus thuringiensis*, identifier les souches commerciales de bioinsecticides (Bt) et tracer les souches du champ à l'assiette.
Florence POSTOLLEC - ADRIA, Aurélie HANIN - ACTALIA

11h50 Comportement de *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus* lors des procédés de transformation et de la conservation des végétaux frais prêts à l'emploi
Devenir des spores de Bt phytosanitaires au cours de la transformation et de la conservation de la laitue, de la mâche et du persil
Catherine DENIS - ACTALIA

12h20 Repas bio

14h00 Synthèse & démonstration en ligne : messages clés et outils accessibles pour les opérateurs industriels

- Identifier les Bt commerciaux grâce à Cereus ID
- Prévoir la destruction des Bt et leur croissance dans l'aliment grâce à Sym'Previous

Florence POSTOLLEC - ADRIA, Rodolphe VIDAL - ITAB, Catherine DENIS - ACTALIA

14h30 Table ronde : Perspectives / Débat / Discussion sur les problématiques industrielles (agri et agro)

15h30 Conclusion
Quelles avancées par rapport au bilan EFSA publié en 2016 sur les risques de santé publique liés à l'utilisation de Bt ?

16h00 Fin de la journée

Figure 5 : Visuel de l'emailing transmis conjointement par l'ITAB et l'ADRIA concernant la journée de restitution des résultats du projet BtID du 29 janvier 2020

Conclusions et perspectives

Les outils et connaissances générés dans le projet BtID pourraient au fil d'analyses futures contribuer à combler le manque de connaissances sur la prévalence de souches spécifiques de bioinsecticides dans les matières premières, aliments et prélèvements cliniques. Leur impact éventuel dans la production d'une hausse des dénombrements de *B. cereus* présomptifs sur aliment transformé pourra notamment être mieux évalué dans les années à venir.

L'utilisation à grande échelle de ces produits phytosanitaires depuis les années 1950 n'a jusqu'alors été corrélée qu'à quelques cas d'intoxications ponctuels plus ou moins controversés, tandis que beaucoup de souches de *B. cereus* qui n'ont pas été intentionnellement répandues dans l'environnement ont été responsables de nombreuses TIAC (Toxi-Infections Alimentaires Collectives). Il semble donc qu'il y ait une différence de comportement peut-être liée à la « spécialisation » de *B. thuringiensis* vis-à-vis de son insecte hôte. Par ailleurs, les souches de Bt utilisées en tant qu'agents de biocontrôle comportent un nombre de plasmides important susceptible d'influer sur leur comportement, notamment sur leur capacité à croître et à induire des toxi-infections alimentaires chez l'Homme. Pour vérifier cette hypothèse, le comportement des souches de produits phytosanitaires dans des conditions proches de celles du tube digestif humain serait donc intéressant à comparer à celui de *B. cereus* issus de TIAs.

L'utilisation de Bt en agriculture reste une solution efficace et pour laquelle il n'y a toujours pas d'alternatives saines pour l'Homme et l'environnement à l'heure actuelle. De ce projet il ressort l'importance de ne tirer aucune conclusion hâtive concernant l'innocuité des souches de Bt commerciales ou leur dangerosité. L'étude au cas par cas et le suivi des souches utilisées en traitement phytosanitaire semblent plus appropriés, en attendant plus de données sur les capacités réelles de *B. thuringiensis* et les conditions nécessaires pour induire des intoxications alimentaires collectives.

Références bibliographiques

ANSES, E-Phy catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages, des matières fertilisantes et des supports de culture autorisés en France <https://ephy.anses.fr>

DGAL, 2009. Note de service DGAL/MUS/N2009-8188, CE n°2073/2005

EFSA, 2016. Scientific opinion on risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.*, including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. doi :10.2903/J.efsa.2016.4524

Guinebretiere M.H., Nguyen-The C., 2003. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiology Ecology* 43(2), 207-215.

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.

Guinebretière M.H., Velge P., Couvert O., Carlin F., Debuysse M.L., Nguyen-The C., 2010. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *Journal of Clinical Microbiology* 48(9), 3388-3391.

ISO7932 microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – colony-count technique at 30 degrees C – Amendment 1 : inclusion of optional tests (ISO7932 :2004/Amd 1 :2020, corrected version 2020-08).

Jiménez G., Urdiain M., Cifuentes A., López-López A., Blanch A.R., Tamames J., Kämpfer P., Kolstø A.B., Ramón D., Martínez J.F., Codoñer F.M., Rosselló-Móra R., 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic Applied Microbiology* 36(6), 383-391.

Jung M.Y., Paek W.K., Park I.S., Han J.R., Sin Y., Paek J., Rhee M.S., Kim H., Song H.S., Chang Y.H., 2010. *Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. *Journal of Microbiology* 48(6), 867-871.

Jung M.Y., Kim J.S., Paek W.K., Lim J., Lee H., Kim P.I., 2011. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. *Journal of Microbiology* 49, 1027-1032.

Liu P.Y., Ke S.C., Chen S.L., 1997. Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate a pseudo-outbreak of *Bacillus cereus* in a pediatric unit. *Journal of Clinical Microbiology* 35(6), 1533-1535.

Liu Y., Du J., Lai Q., Zeng R., Ye D., Xu J., Shao Z., 2017. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*. 67(8), 2499-2508.

Miller R.A., Beno S.M., Kent D.J., Carroll L.M., Martin N.H., Boor K.J., Kovac J., 2016. *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology* 66(11), 4744-4753.

Raymond B. et Federici B.A., 2017. In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity - a response to EFSA. *FEMS Microbiology Ecology*. 93(7):fix084.

Zhong W., Shou Y., Yoshida T.M., Marrone B.L., 2006. Differentiation of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* by using Pulsed-Field- gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 73(10), 3446-3449.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « *Innovations Agronomiques* », la date de sa publication, et son URL ou DOI).