

Research Article

EVALUATION DE L'EFFET DU MIEL SUR LE DEVELOPPEMENT DES ASPERGILLUS SP

* **BAKENG MATABARO Dieudonné, ATEHNKENG Joseph, MURHULA CIZUNGU Alexis, AGANZE BIGABWA Bigman and KYAKIMWA KIMINYA Florence**

Unité de Recherche en Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire, Département de Biologie, Institut Supérieur Pédagogique de Bukavu, ISP, Bukavu, RD Congo.

Received 06th February 2024; Accepted 07th March 2024; Published online 25th April 2024

RESUME

Le présent travail portait sur l'évaluation de l'effet du miel sur le développement des *Aspergillus* sp. Il avait pour objectif d'avoir une idée sur les effets du miel dans la réduction du taux d'aflatoxines dans les produits céréaliers. C'est pourquoi, un échantillon de farine de maïs analysé au départ au laboratoire de l'IITA Kalambo et ayant présentant un taux d'aflatoxines élevé (258,4 ppb) à l'aide du Raptor, a été isolé sur un milieu sélectif, spécifique à la croissance des champignons (Sabouraudchloramphécol-agar) mélangé au miel à différentes concentrations. Les résultats obtenus ont montré que le miel inhibe le développement des *Aspergillus* à partir de 75%. Après l'analyse microbiologique, nous avons voulu vérifier si le miel pouvait avoir un effet sur le taux d'aflatoxines dans cette farine. Les résultats obtenus montrent que le miel garde d'une manière stationnaire les toxines dans l'échantillon. Il serait donc utile d'utiliser du miel dans la conservation des produits céréaliers pour garder en dormance les *Aspergillus* et arrêter ainsi la prolifération des aflatoxines.

Mots clés: miel, Aflatoxines, *Aspergillus* sp.

INTRODUCTION

De nos jours, les produits agro-alimentaires sont menacés par un nombre important des toxines naturelles. Ces menaces sont dues à leur contamination par des microorganismes toxigènes préjudiciable au commerce, à la santé humaine et animale, aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement (Nadjet et al., 2016).

Dans les pays en voie de développement, en particulier en Afrique et en Amérique Latine, le maïs [*Zea mays* (L.)], est un produit agro-alimentaire beaucoup plus consommé sous plusieurs formes : boisson, fufufu, pop-corn, ... (Doré, 2006). C'est une céréale cultivée dans des conditions très variées : climat tropical et tempéré (Née Ky et al., 2017). Ces régions se situent en grande partie dans la zone intertropicale où le stockage de maïs après récolte pose de sérieux problèmes de par ses températures moyennes qui varient entre 20 et 25°C et des fortes humidités qui offrent des conditions favorables au développement des moisissures surtout du genre *Aspergillus* qui réduisent la qualité des grains à cause des aflatoxines qu'ils produisent (Boeckel et al., 2003).

De par sa situation géographique et ses climats variés, la RD Congo, dans toutes ses provinces, offre un champ de prédilection à la prolifération de ces moisissures et à la production d'aflatoxines (substances dangereuses pour la santé). On peut s'attendre à ce que celles-ci contaminent les denrées alimentaires en particulier le maïs (Joachim et al., 2020).

Les méthodes utilisées pour limiter les pertes dans les stocks des céréales sont généralement les insecticides chimiques qui peuvent induire une intoxication chronique des consommateurs et avoir un impact négatif sur la santé (Jacquet et Jouan, 2022).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 200 maladies allant de la diarrhée au cancer sont provoquées par la consommation des denrées alimentaires impropres ou contenant des substances chimiques nocives comme les aflatoxines (OMS, 2018). Ceux-ci entraînent à la longue le cancer de foie, un retard de croissance et la malnutrition chez les enfants de moins de 5 ans ainsi qu'une baisse du système immunitaire (Mahuku et al., 2023).

Au vu de ce qui précède ; nous sommes persuadée que le miel aurait un effet sur l'inhibition de la croissance des *Aspergillus* et ainsi empêcherait la prolifération des aflatoxines dans la farine de maïs. En effet, le miel est un aliment naturel consommé par l'homme depuis de nombreux siècles, en raison de ses riches valeurs nutritionnelles et thérapeutiques. Il possède des vertus curatives réputées de par ses propriétés antibactériennes, antifongiques, antioxydante et hépatoprotectrices (Pierre, 2022). C'est dans ce contexte que cette étude est menée pour contribuer au soin de la santé par la prise des aliments sains. Elle vise à évaluer les effets du miel dans l'inhibition du développement des *Aspergillus* sp.

MÉTHODOLOGIE

Milieu d'étude et échantillonnage

Le matériel végétal qui a fait l'objet de cette étude est la farine de maïs (*ZEA Mays*) sélectionnée parmi les échantillons les plus contaminés du Nord-Kivu, collectés au mois de Septembre 2022, dans les ménages, lors d'une enquête nutritionnelle précédente qui visait à évaluer la connaissance sur la contamination aux aflatoxines des aliments destinés des enfants des 0 à 59 mois dans la zone de santé de Goma et le lien entre cette contamination et la malnutrition.

La figure 1 ci-dessous indique la délimitation et la localisation des sites dans lesquelles nos enquêtes ont été effectuées.

*Corresponding Author: BAKENG MATABARO Dieudonné, Unité de Recherche en Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire, Département de Biologie, Institut Supérieur Pédagogique de Bukavu, ISP, Bukavu, RD Congo,



Figure 1. Carte de la zone de santé de Goma reçue du médecin chef de zone de santé de Goma lors des enquêtes en septembre 2022.

Dosage d'aflatoxines dans les échantillons d'aliments

Le dosage d'aflatoxine a été réalisé en deux phases dans le laboratoire de l'IITA Station de Kalambo à l'aide du Raptor de marque NEOGEN PS-11. La première phase d'analyse a concerné les échantillons d'aliments utilisés pour nourrir les enfants de moins de 5 ans en vue de déterminer leur qualité. La deuxième phase a concerné les échantillons d'aliments analysés préalablement et traités avec différentes concentrations de miel dans le but d'évaluer l'évolution du taux d'aflatoxines après deux semaines de conservation.

Dans les deux cas et lors des analyses, l'échantillon des aliments était broyé selon leur état pour les transformer en farine à l'aide d'une moulinette ou mixeur de marque Waring commercial Blender 8011ES. Par la suite, 10g du broyat obtenu étaient pesés à l'aide d'une balance de précision de marque DETECTO et mélangés avec 50 ml d'éthanol 65%. La solution qui en résulte est ensuite homogénéisée pendant 1 minute puis laissée reposer pendant 5 minutes avant d'être filtrée sur du papier filtre posé sur un entonnoir sur un Erlenmeyer. La solution recueillie est claire et prête à être analysée. Avant de passer à l'analyse proprement dite, nous définissons le code dans le Raptor, puis, à l'aide d'une pipette graduée, nous relevons 100 μ L de la solution filtrée et les déposons dans une fiole. Nous prélevons ensuite 500 microlitres de diluant ou réactif d'analyse des aflatoxines et les mélangions avec les 100 μ L de la première solution. La solution totale ainsi obtenue est ensuite homogénéisée par des mouvements de compression et de dépression par pipette. Enfin, nous prélevons 400 microlitres de cette solution homogène et la plaçons dans une cartouche contenant le test. Le résultat s'affiche sur l'écran après 6 min.

Analyses microbiologiques et test de l'activité inhibitrice du miel

Les échantillons d'aliments présentant de fortes valeurs d'aflatoxines ont fait l'objet d'analyses microbiologiques et de test de l'effet de diverses concentrations de miel sur le développement des moisissures du genre *Aspergillus*. Les analyses microbiologiques ont concerné la recherche du développement des moisissures du genre *Aspergillus* qui sont aflatoxinogènes dans les échantillons de farine.

A cet effet, la gélose Sabouraud chloramphénicol a été préparée en raison de 65 g litre d'eau distillée. Le mélange a été chauffé puis autoclavé à 121 $^{\circ}$ C pendant 20 minutes. Par la suite, l'inoculum à ensemercer était préparé en pesant et en dissolvant 1 g de farine à analyser dans 9 ml d'eau distillée puis dilué jusqu'à 10^{-3} . En fin 100

μ L de la solution 10^{-3} ont été prélevés au moyen d'une micropipette et étalés à la surface de la gélose autour d'un bec bunsen. La culture ainsi réalisée est incubée à la température ambiante durant 48 heures avant la lecture des résultats. L'évaluation de l'effet inhibiteur du miel s'est faite avec les mêmes échantillons d'aliment aux valeurs d'aflatoxines les plus élevées. Le but poursuivi était de vérifier la concentration du miel capable d'empêcher le développement des moisissures visées dans les aliments et de ce fait y limiter la production des aflatoxines.

Dans la procédure, les concentrations de miel 100%, 75%, 50%, 25%, 10% et 1% ont été préparées en mélangeant respectivement 15 g ; 11,25 g ; 7,5g ; 3,75g ; 1,5g et 0,15 g de miel avec 25 ml de gélose Sabouraud au chloramphénicol préalablement stérilisé dans des tubes à essai. Le mélange du miel et du milieu était réalisé après refroidissement de la gélose et avant sa solidification.

Le mélange gélose-miel était coulé dans des boîtes de pétri préalablement autoclavées. Après cette préparation des milieux contenant aux différentes concentrations de miel, 100 μ L de la solution d'inoculum étaient prélevés au moyen d'une micropipette et étalés à la surface du milieu en boîte. La culture ainsi préparée est incubée à la température ambiante durant 48h pour enfin lire les résultats.

Identification des colonies de moisissures

Dans les cultures des échantillons mélangés ou pas au miel, on pouvait observer le développement des colonies de levures et de diverses moisissures. L'identification des moisissures du genre *Aspergillus* qui retenait notre attention était basée sur l'observation macroscopique de leur couleur et de leur aspect. Ces moisissures sont verdâtres au centre avec des bords jaunâtres ou jaune-verdâtres. Les colonies d'autres couleurs sont celles des levures ou d'autres moisissures. Pour estimer la charge globale des moisissures (des spores) de la farine, sachant que chaque colonie est le fruit de développement d'une spore, le nombre de colonies de chaque type a été rapporté à un gramme de farine tenant compte de la dilution de l'inoculum.

Analyses statistiques des résultats

Pour les analyses des données, le programme Excel et le logiciel Epi-Info 2000, version 3.5.1 ont été utilisés. Pour les analyses descriptives, les variables discrètes qualitatives ont été présentées sous forme de proportions. Les variables quantitatives continues ont été présentées sous forme de moyennes \pm déviation standard ou écart type si la distribution a été normale ou symétrique et médiane (P25, P75) pour celles dont la distribution a été asymétrique. Pour les statistiques analytiques, la comparaison des proportions a obéi au test de χ^2 de Pearson, en cas de non applicabilité de celui-ci, le test de Fisher a été à notre service. L'association entre les variables dépendantes et indépendantes a été faite par le calcul d'Odds Ratio (Intervalle de Confiance à 95%).

RÉSULTATS

Résultats du dosage des aflatoxines dans les échantillons d'aliments

Evaluation de la qualité des aliments collectés

Nos analyses ont porté sur un total de 27 échantillons. Ces aliments collectés étaient constitués d'un mélange d'ingrédients issus de la

farine de maïs, de blé, du manioc, du lait en poudre, du riz, de fretins, de soja grillé ou non, de sorgho ; d'arachide, d'oléagineuse.

La figure 2 suivante donne une idée sur la qualité des aliments collectés.

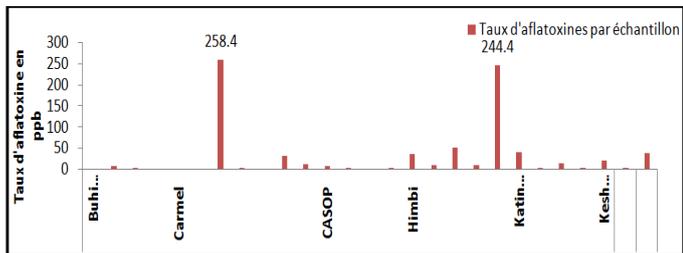


Figure 2. Evaluation de la qualité des aliments collectés dans les centres de santé

Il ressort de la figure 2 ci-dessus que 10 échantillons sur 27 étaient plus contaminés avec un taux d'Aflatoxine compris entre 11,1 et 258,4 ppb, 4 avaient un taux modéré compris entre 4,1 et 8,8 ppb et 13 étaient en bon état avec un taux d'Aflatoxine inférieur à 4 ppb

Relation entre le taux d'aflatoxines et l'origine des aliments

La contamination des aliments par les aflatoxines peut avoir diverses causes. Nous avons cherché à savoir si la contamination pourrait se faire à partir du champ ou à partir du marché. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau I suivant.

Tableau I : Origine et triage des grains pour la fabrication des aliments pour enfant

Origine des grains	Tri des graines			
	Oui		Non	
	Fréquences	%	Fréquences	%
Du champ	69	94,5	17	12,8
Du marché	4	5,5	116	87,2
Total	73	100,0	133	100,0

De ce tableau I, il ressort que de manière générale, les grains servant à la fabrication des aliments pour nourrir les enfants proviennent soit du marché, soit du champ et peuvent ne pas être triés lors du processus de production.

Nous avons cherché à vérifier s'il existait un lien entre le lieu de provenance et le souci de procéder au triage des grains. Le test statistique montre que le lien entre le tri et le lieu de provenance des denrées alimentaires est très fort: {OR=0,009 (IC 0,003 – 0,03) P. val. =0,00}. De même, les valeurs p du Chi² sont inférieures à 0,05. Il est clair que le fait de ne pas trier les graines lors de la fabrication des aliments pour enfants présente un risque élevé (99,1%) de contamination par les aflatoxines.

Résultats des analyses microbiologiques et du test d'activité du miel

Résultats de la culture microbienne

Les échantillons de farines ayant présenté les taux d'aflatoxines les plus élevés ont été soumis à une culture dans le but de vérifier si des moisissures aflatoxinogènes persistent dans ces aliments après fabrication, les rechercher et par la suite, les dénombrer. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II suivant.

Tableau II : Résultats de la culture microbienne et nombre de germe par gramme de farine

Echantillon	Genre de champignon	Moyenne de colonies	Nombre de germes par gr
Mélange de farine	Aspergillus sp	32	32. 10 ⁴ UFC/g
	Penicillium sp	56	56. 10 ⁴ UFC/g
	Levures	32	32. 10 ⁴ UFC/g
Autres moisissures		2	2. 10 ⁴ UFC/g

Les résultats des analyses microbiologiques tels qu'indiqués dans le tableau II ci-haut montrent que les échantillons de farine utilisés pour nourrir les enfants de notre étude ne sont pas stériles. Ils contiennent d'énormes quantités de spores pouvant se développer dans les aliments en question même durant la conservation, plus particulièrement nous notons la présence des espèces de moisissures aflatoxinogènes du genre *Aspergillus* pouvant atteindre en moyenne 32. 10⁴ spores de ce genre par gramme de farine.

Résultats du test de l'effet du miel sur le développement d'*Aspergillus*

L'échantillon de farine a été mélangé avec différentes concentrations de miel avant d'être mis en culture dans le but de vérifier non seulement l'effet mais aussi la concentration capable de bloquer le développement des moisissures aflatoxinogènes visées. Le témoin 1 est constitué de l'échantillon de farine sans miel. Le témoin 2 a été fait avec du milieu avec du miel seulement. Les résultats obtenus sont représentés par la figure 3 qui suit.

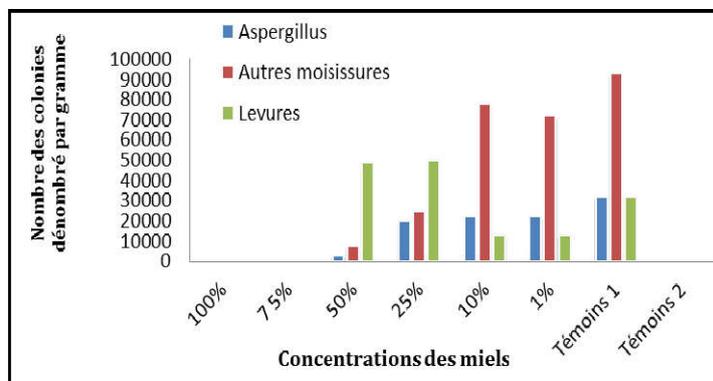


Figure 3. Evaluation de l'effet du miel sur le développement des champignons

Il ressort de cette figure 3 précédente que le miel inhibe le développement des moisissures jusqu'à la concentration 75% dans les échantillons de farine alors que sous les autres concentrations, il y a eu croissance des champignons dont le genre *Aspergillus* visé dans notre étude.

Effet du miel sur la présence des aflatoxines

Les échantillons de farines traités avec différentes concentrations de miels ont été conservés durant dix jours avant d'être analysés de nouveau au laboratoire. Le but était de vérifier si l'effet du miel pouvait limiter la production des aflatoxines dans ces farines. Pour l'échantillon considéré, la concentration de miel utilisée, la valeur initiale du taux d'aflatoxine et la valeur obtenue après la nouvelle analyse sont représentées dans la figure 4 suivante.

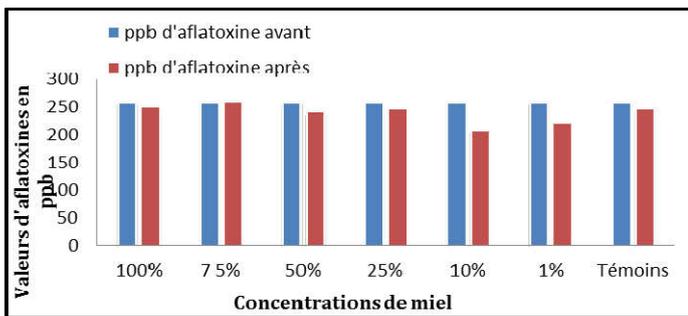


Figure 4 : Comparaison des taux d'aflatoxines dans les échantillons avant et après traitement au miel.

De cette figure 4, nous constatons que le taux d'aflatoxines est resté plus ou moins stable avant comme après traitement au miel.

DISCUSSION

Les résultats obtenus de nos deux analyses microbiologiques et chimiques montrent que le miel réduit le développement des *aspergillus* mais garde d'une manière stationnaire leurs toxines dans les denrées. Nos résultats sont conformes à ceux de Moussa Ahmed car ayant évalué in vitro l'effet synergique de l'amidon sur l'activité antifongique du miel, il a constaté que le miel avait montré un effet antifongique vis-à-vis du genre d'*Aspergillus* à 47,6% (Moussa Ahmed, 2007).

Pour prévenir la contamination, dans des conditions bien maîtrisées, on recommande d'utiliser des antifongiques dans la conservation des céréales. Plusieurs autres procédés de lutte biologique sont recommandés : ça peut-être des insectes transgéniques et mutants (Nanfack et Fogang, 2015) soit des substances végétales (Waongo et al., 2013). Il serait utile aussi d'user du miel dans la conservation des produits céréaliers surtout les maïs pour garder en dormance les *aspergillus* et arrêter ainsi la prolifération des aflatoxines.

Cependant, ces produits n'éliminent pas la mycotoxine déjà présente, mais empêchent le développement de nouvelles moisissures (Ndiaye, 2011). C'est pourquoi, pour nous assurer de la qualité sanitaire de ce que nous consommons, à part les techniques citées ci-haut, il sera bénéfique de respecter aussi les mesures préconisées en 2011 par Green Info: récolter des grains arrivés à maturité ; bien sécher une denrée récoltée pour réduire la teneur en eau, stocker dans un endroit frais et sec, à l'abri de l'humidité et des insectes et autres ravageurs, trier pour écarter les graines attaquées par les insectes et celles qui sont immatures, tachées, noircies, rances ou moisies.

CONCLUSION

Notre travail portait sur l'évaluation de l'effet du miel sur la réduction du taux d'aflatoxines dans la farine de maïs. L'objectif était de tester l'effet du miel sur le taux d'aflatoxines dans les produits céréaliers. C'est pourquoi, un échantillon de farine de maïs a été analysé à deux niveaux : in vitro puis chimiquement.

Pour ce faire, nous avons préparé différentes dilutions à partir de la solution mère que nous avons mises en culture (le milieu gélosé de Sabouraudchloramphécol Agar) mélangé aux différentes concentrations de miel (100%, 75%, 75%, 50%, 25%, 10% et 1%). Après incubation à la température ambiante pendant 48 heures, le miel a montré un effet inhibiteur sur le développement des *Aspergillus* à partir de 75%. Ces résultats nous ont poussé à vérifier si le miel aurait un également un effet sur la réduction du taux

d'aflatoxines dans l'échantillon. Nous avons donc mélangé l'échantillon de la farine de maïs au taux d'aflatoxine élevé à 258,4ppb avec différentes concentrations du miel. Dix jours après incubation, les résultats ont montré le taux d'aflatoxines dans l'échantillon est resté stationnaire et dangereux. Cela nous amène à conclure que le miel sera utile dans la conservation des produits céréaliers surtout les maïs pour garder en dormance les *Aspergillus* et arrêter ainsi la prolifération des aflatoxines.

Etant donné que cette étude n'est qu'une partie d'un travail plus consistant dans la conservation des produits céréaliers, nous encourageons quiconque voudrait se lancer dans cette recherche si noble et utile pour la santé infantile. D'autres travaux intéressants seraient d'étudier de voir à quel moment de la conservation les *aspergillus* commencent à proliférer ce toxine dans les farines et à quel moment il serait mieux d'user du miel dans la conservation. Il serait aussi possible de déterminer la quantité du miel qu'il faut pour tel ou tel autre produit. Ceci compléterait les moyens préventifs d'intoxication alimentaires.

BIBLIOGRAPHIE

- BOECKEL, Thomas P. van, HOUNHOUIGAN, Joseph D., et NOUT, Robert. Les aliments: transformation, conservation et qualité. Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation, 2003.
- DORÉ, Claire et VAROQUAUX, Fabrice. Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. Editions Quae, 2006.
- JACQUET, Florence et JOUAN, Julia. État des lieux de l'utilisation des pesticides. ZÉRO PESTICIDE, 2022, p. 21.
- JOACHIM, Umba di M.'balu, THADDÉE, Masimango N., et LELO, Mvumbi. Inhibition du développement de l'*Aspergillus flavus* par l'acide acétique: Analyse de trois expériences réalisées à Kinshasa-RD Congo. 2020.(JOACHIM et al. 2020).
- Mahuku, G., Mauro, A., Pallangyo, B., Nsami, E., Boni, S. B., Koyano, E., ... &Bandyopadhyay, R. (2023). Atoxicogenic-based technology for biocontrol of aflatoxin in maize and groundnuts for Tanzania. World Mycotoxin Journal, 16(1), 59-73.DEMNI, Fatima Zohra. PHARMACODYNAMIQUE DU MIEL. 2018. Thèse de doctorat. université ibn khaldoun TIARET.
- MOUSSA, AHMED. Evaluation in vitro de l'effet synergique de l'amidon sur l'activité antifongique du miel, en relation avec l'indice de diastase vis-à-vis de deux espèces pathogènes: *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. 2007. Thèse de doctorat. Université Ibn Khaldoun-Tiaret.
- NADJET, GUEZLANE-TEBIBEL, NOUREDDINE, BOURAS, et DIDI, OULD EL HADJ Mohamed. Les mycotoxines: un danger de santé public. Algerian Journal of AridEnvironment "AJAE", 2016, vol. 6, no 1.
- NANFACK, F. M., DONGMO, Y. Z., et FOGANG, M. A. R. Les insectes impliqués dans les pertes post-récolte des céréales au Cameroun: méthodes actuelles de lutte et perspectives offertes par la transgénèse. International Journal of Biological and Chemical Sciences, 2015, vol. 9, no 3, p. 1630-1643.
- Ndiaye. S. (2011). LA sécurité alimentaire au Sénégal, constats et perspectives ? contribution GREEN INFO Décembre 2011, Revue trimestrielle d'informations environnementales - Décembre 2011 - N° 02, p. 3 - 4. Université de Thiès
- NÉE KY, Juliette Mme Dedi, GBEHE, Stéphane, et YOUO, Dékpassi Clément. Caractérisation de neuf échantillons de farine de maïs Zeamays (L.) vendus sur les marchés d'Adjamé, Yopougon et Abobo en Côte d'Ivoire. Journal of Applied Biosciences, 2017, vol. 115, p. 11434-11440.
- OMS (Organisation mondiale de la Santé), Février 2018, Département Sécurité sanitaire des aliments et zoonoses.

12. Pierre, M. F., Bigman, A. B., & Dieudonné, B. M. (2022). Analyse phytochimique et activité antioxydante de quelques miels de Bukavu et de ses environs. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, vol. 37, no 4, p. 772-778.
13. WAONGO, Antoine, YAMKOULGA, Marcelin, DABIRE-BINSO, Clémentine L., et al. Conservation post-récolte des céréales en zone sud-soudanienne du Burkina Faso: Perception paysanne et évaluation des stocks. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2013, vol. 7, no 3, p. 1157-1167.
