



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :

Nour El Houda MHAMDI/Kaleb Eddine Ali HENANOU

Le : mercredi 10 juillet 2019

Evaluation de la qualité microbiologique des pâtisseries commercialisées au centre de la wilaya de Biskra

Jury :

Mme. Manel DJOUAMA	MAA	Université de Biskra	Président
Mme. Kenza MOHAMMEDI	MAB	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. Randa GAOUAOUI	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018/2019

Remerciement

Nous tenons à remercier en premier lieu ALLAH, le tout puissant de nous avoir donné courage, santé et patience pour achever ce travail (EL HAMDOUN LILLAH).

*Nous remercions chaleureusement madame **Mohammedi Kenza** pour son encadrement, sa confiance, ses efforts et sa patience lors de la correction de manuscrit.*

*Nous exprimons nos vifs remerciements à madame **Ben Ameer Nassima** pour son soutien, ses conseils et ses encouragements.*

Nos remerciements sont adressés aux membres de jury qui ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail.

*Nos remerciements vont également aux ingénieurs travaillant au laboratoire de biologie pour leurs orientations, leurs conseils, leurs aides : **Sara, Alima, Oussama, Walid.....etc.***

Enfin, nous tenons également à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont collaboré à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A

Celui qui a toujours garni mes chemins avec force et lumière, celui qui a combattu toute sa vie pour me procurer tout ce dont j'avais besoin.....

*Mon très cher père **Mebarek***

A

Celle qui a n'a jamais cessée de me soutenir, pour son amour, ses sacrifices.....

*Ma chère mère **Salima***

A

Ceux qui m'a donné tout sans rien en retour, les symboles de tendresse, que ce travail soit le fruit de Vos aide précieuse pendant toute ces années.....

*Ma chère Tante **Nadjette**, Ma chère sœur **Naama***

A

*Mes charmantes sœurs...**Randa, Amel.***

A

Ma sœur qui ma mère n'a pas donné naissance...Merci de me soutenir, et pour votre patience, et vos conseils précieuses....

*Ma chère **Djamila***

A

*Mon oncle **Säid**...pour ses conseils et ses encouragements.*

A

Mes très chères amies **El-Kahina, Aicha, Ikhlass, Zineb, Dalal, Farida, Saliha, Mériem**.....que dieu vos protège tous.

Houda

Je dédie cet humble travail à toute ma famille

*Mon très cher père **Lakhedari***

*Ma chère mère **Ouahiba***

*Mes cher seures **Rabiha, Roukia, Nada et Asala***

*Ma cher frère **Nouh et Bilal***

*, en particulier à ma tante **Souad**, que Dieu ait pitié de-elle.*

*À tous mes amis **Samir, Mohamed, Abed Rahman, Daddi, Fathi, walid et Youssef***

Ainsi qu'à tous ceux qui m'ont aidée à le réaliser.

Et tous qui m'ont encouragé à atteindre cet endroit

*Aux ingénieurs de laboratoire **Ossama, Walid, Abdelkader** et d'autres qui ont facilité notre travail et nous ont aidés en cas de besoin.*

Merci beaucoup

Ali

Sommaire

Remerciement	
Didicace	
Listedestableaux	I
Listedesfigures	II
Listedesabréviations	IV
Introduction	1

Partie I synthèse bibliographique

Chapitre 1 généralités sur la pâtisserie

1.1. Définition de la pâtisserie	2
1.2. Composition de la pâtisserie	2
1.3. Les types de produits pâtisseries	2
1.3.1. Pâtisserie artisanale	2
1.3.2. Pâtisserie industrielle	2
4-La détérioration des produits pâtisseries	3
1. 5. Risques sanitaires en pâtisserie	3
1.6. Hygiène et assainissement	4

Chapitre 2 microbiologie de la pâtisserie

2.1. Origine des micro-organismes indésirables dans les aliments	5
2.2. Facteurs influençant la croissance microbienne	5
2.2.1. Environnement intrinsèque	5
2.2.1.1. pH	5
2.2.1.2. Activité de l'eau (aw)	6
2.2.1.3. Composition de l'aliment	6
2.2.1.4. Potentiel redox	6
2.2.2. Environnement extrinsèque	6
2.2.2.1. Température de conservation	6

2.2.2.2. Humidité relative.....	6
2.3. Les germes responsables d'altération des produits pâtisseries.....	7
2.3.1. Flore aérobie mésophile total (FTAM).....	7
2.3.2. Coliformes totaux et thermotolérants.....	7
2.3.2.1. Coliformes totaux.....	7
2.3.2.2. Coliformes thermotolérants.....	7
2.3.3. <i>Clostridium</i> sulfito-réducteur.....	7
2.3.4. <i>Staphylococcus aureus</i> à coagulase positif.....	7
2.3.5. <i>Salmonella</i>	8
2.3.6. Levures et moisissures.....	8
2.4. Les maladies transmises par les pâtisseries.....	8
2.4.1. Infection.....	8
2.4.2. Intoxication.....	8
2.4.3. Toxi-infection alimentaire.....	8

Partie II : Etude expérimental

Chapitre 3 matériel et méthodes

3.1. Echantillonnage (choix des échantillons).....	10
3.2. Préparation de l'échantillon pour essai.....	10
3.3. Germes recherchés.....	10
3.4. Protocole d'analyse.....	11
3.4.1. Préparation de la solution mère (NF V08-010).....	11
3.4.2. Préparation des dilutions décimales.....	11
3.5. Recherche et dénombrement des germes.....	12
3.5.1. Recherche et dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (ISO 4833/2003)	12
3.5.2. Recherche et dénombrement de coliformes totaux (NM ISO 4832, 2003) et fécaux (NM 08.0.124, 2004).....	12

3.5.3. Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> à coagulase positif	12
3.5.3.1. Dénombrement des staphylocoques à coagulase Positive.....	12
3.5.3.2. Confirmation (recherche de la coagulase).....	13
3.5.4. Recherche des spores des anaérobies sulfito-réductrices (ASR)	15
3.5.5. Recherche et dénombrement de salmonella.....	16
3.5.6. Recherche des levures et moisissures	20
3.6. Méthode d'interprétation	20

Chapitre 4 résultats et discussions

4.1. Résultats des analyses bactériologiques.....	22
4.1.1. Flore Mésophile Aérobie totale	22
4.1.1.1. Caractéristiques macroscopiques	22
4.2.1. Coliformes totaux et fécaux	22
4.1.2.1. Coliformes totaux	22
4.1.2.2. Coliformes fécaux	23
4.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
4.1.3.1. Caractéristiques Macroscopiques	24
4.1.3.2. Caractéristiques microscopiques	24
4.1.3.3. Tests biochimiques (confirmation).....	25
4.1.4. <i>Clostridium</i> sulfito-réductrice	26
4.1.5. Salmonella.....	27
4.1.5.1. Caractéristiques macroscopiques	27
4.1.5.2. Caractéristiques microscopiques	28
4.1.5.3. Test oxydase	28
4.1.5.4. Identification biochimique (tests de confirmation)	28
4.2. Résultats des analyses de la flore fongique	31
4.2.1. Caractéristiques macroscopiques	31
4.2.2. Caractéristiques microscopiques.....	34

4.3. Présentation et discussion de résultats de dénombrement	37
4.3.1. Variation globale de niveau de contamination.....	38
4.3.2. Variation de niveau de contamination en fonction de germes	38
4.3.2.1. Flore Mésophile Aérobie Total à 30°C	38
4.3.2.2. Coliformes totaux.....	39
4.3.2.3. Coliformes fécaux	40
4.3.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	40
4.3.2.5. Anaérobies Sulfito-Réductrices.....	41
4.3.2.6. <i>Salmonella</i>	41
4.3.2.7. Flore fongique (levures et moisissures)	41
4.3.3. Appréciation globale de contamination	42
4.4. Discussion générale	43
Conclusion.....	44
Les références bibliographiques.....	46
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 1: Les plages de croissance de microorganismes au pH (Tewari et Juneja, 2008). ...	5
Tableau 2. Les types de produits pâtisseries analysés	10
Tableau 3. Résultats des tests biochimiques	29
Tableau 4. Résultats de dénombrement et interprétation de présence de germes.	34
Tableau 5. Résultats de dénombrement et interprétation de présence de germes.	37

Liste des figures

Figure 1. Exemple de pâtisserie (Bellec et al, 2009).....	3
Figure 2. Principales interactions entre aliments, microorganismes et consommateur.....	9
Figure 3. Schéma de préparation de série de dilutions.....	11
Figure 4. isolement de staphylococcus sur gélose Baird Parker.	13
Figure 5. Confirmation biochimique de <i>staphylococcus</i> (Test catalase).....	14
Figure 6. Confirmation biochimique de <i>Staphylococcus</i> (Test coagulase).....	14
Figure 7. Schéma des étapes de recherche des spores de <i>Clostridium</i>	16
Figure 8. Les étapes d'isolement de <i>Salmonella</i>	17
Figure 9. Résultats de recherche de la flore aérobie mésophile sur milieu PCA	22
Figure 10. Résultats de recherche des coliformes sur DLC (Photo originale, 2019).	23
Figure 11. Résultats d'ensemencement de coliformes fécaux sur Mac Concky (Photo originale, 2019).	23
Figure 12. Résultats de recherche de Staphylococcus aureus sur BP (Photo originale, 2019)	24
Figure 13. Observation microscopique de Staphylococcus aureus avec un grossissement 10×100(Photo originale, 2019).	24
Figure 14. Résultat de test de catalase (photo originale, 2019).....	25
Figure 15. Résultat d'incubation des souches de Staphylococcus aureus en BCC (Photo A et B) et le test de coagulase (Photo A' et B') (Photos originales, 2019).	25
Figure 16. Galerie API Staph (Photo originale, 2019).	26
Figure 17. Résultats de recherche des spores de Clostridium sulfite réducteur (Photo originale, 2019).	26
Figure 18. Résultat de recherche des salmonelles sur la gélose SS (Photo originale, 2019). .	27
Figure 19. Isolement sur milieu SS (après 24 h d'incubation) des colonies suspectes de salmonelle (Photo originale, 2019).	27
Figure 20. Observation microscopique d'une souche isolée de gélose SS avec un grossissement × 100 (photo originale, 2019).	28
Figure 21. Résultat du test oxydase (Photo originale, 2019).....	28
Figure 22. Galerie API E 20 « souche 9 » (Photo originale, 2019).....	31
Figure 23. Le Genre <i>Aspergillus sp</i> (Photo originale, 2019).....	31
Figure 24. Le genre <i>Alternaria sp</i> (Photo originale, 2019).	32
Figure 25. Le genre <i>Penicillium sp</i> (Photo originale, 2019).	32
Figure 26. Levure Saccharomyces sur la gélose Sabouraud (Photo originale, 2019).	33

Figure 27. Distribution de la qualité microbiologique des pâtisseries.	38
Figure 28. Répartition des niveaux de contamination des pâtisseries par FTAM.....	38
Figure 29. Répartition des niveaux de contamination des pâtisseries par CT.....	39
Figure 30. Répartition des niveaux de contamination des pâtisseries par CF.	40
Figure 31. Répartition des niveaux de contamination des pâtisseries par <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Figure 32. Répartition des niveaux de contamination des pâtisseries par la flore fongique. ...	41
Figure 33. Pourcentages d'incidence des germes dans les échantillons de pâtisserie.	42

Liste des abréviations

ADH : Arginine déshydrogénase.

AFNOR : Association Française de normalisation.

AFSCA : Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire.

ASR : Anaérobies sulfite-réducteurs.

BP : Baird-Parker.

CF : coliformes fécaux.

CT : coliformes totaux.

DCL : Désoxycholate lactose.

EPT : Eau peptonée tamponnée.

Ech: Echantillon.

ISO: International organization for standardization.

ONPG: Orthonitrophenyl β -D galactopyranoside.

PCA : Plate Count Agar.

RM : rouge de méthyle.

RV : Rappaport vasiladis.

SM : Solution mère.

TSI : Triple-Sugar-Iron.

UFC : Unité Formant Colonies.

VF : Viande foie.

VP : Voges-Proskauer.

Introduction

La diversité alimentaire est essentielle dans la vie des gens, et parmi les types importants de la liste des aliments sont les confiseries.

En plus de leur taux de consommation élevé lors des occasions heureuses, les pâtisseries font désormais partie intégrante de l'alimentation humaine, car elles peuvent être utilisées comme source d'énergie alimentaire à haute densité, leur marché mondial croit actuellement d'environ 1,5% par an (Issiri, 2014).

Cependant, les produits pâtisseries (en particulier à la crème) en tant qu'aliments nutritifs riches en glucides, lipides, et protéines sont sensibles à la croissance de différents micro-organismes et à la transmission d'agents microbiens, qui sont soit des bactéries ou bien des levures et moisissures (Smith *et al*, 2004).

Ces microorganismes sont partout. L'eau, l'air, l'homme, et les surfaces. Ils ont des facteurs favorisant la croissance : extrinsèques liés à l'environnement, et intrinsèques liées à l'aliment. Si ces micro-organismes trouvent la possibilité de se développer et de se multiplier, ils provoquent des modifications chimiques indésirables et une intoxication alimentaire (Pajohi-Alamoti, 2016).

Les intoxications alimentaires touchent des personnes en bonne santé dans le monde entier, dont les symptômes les plus courants sont les nausées, les vomissements, douleurs abdominales, crampes et diarrhée (Sharifzadeh *et al*, 2016).

Ce travail a pour objectif d'évaluer la qualité microbiologique de quelques échantillons de pâtisseries vendus sur la voie publique à Biskra, par dénombrement de flore aérobie mésophile total, coliformes totaux et fécaux, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sulfite-réducteurs, *Salmonella*, flore fongique.

Ce travail est divisé en deux parties

- Partie bibliographique : contient deux chapitres dont le chapitre 1 c'est généralités sur les pâtisseries et le chapitre 2 concerne la microbiologie des pâtisseries.
- Partie expérimental : contient deux chapitres dont le chapitre 3 : matériels et méthodes et le chapitre 4 : résultats et discussion.

Partie
bibliographique

Chapitre 1

Généralités sur la pâtisserie

1.1. Définition de la pâtisserie

La pâtisserie c'est une discipline majeure de l'art culinaire, qui repose sur la préparation, l'élaboration, la fabrication, le service à la consommation. C'est un aliment plaisir qui vient après le nécessaire (Bellec *et al.*, 2009).

1.2. Composition de la pâtisserie

Les pâtisseries sont essentiellement à base de, farine, sucre, œufs, graisse ou huile (Wilderjans *et al.*, 2013). Sont des sortes de confiseries qui ont généralement des constructions molles et spongieuses, de la crème, du coca et ses produits, du café, de la gelée, des fruits frais et d'autres poudres de noix de coco et grains utilisés dans leur fabrication (Asadi *et al.*, 2015).



Figure 1. Exemple de pâtisseries (Bellec *et al.*, 2009).

1.3. Les types de produits pâtissiers

1.3.1. Pâtisserie artisanale

Le produit pâtissier artisanal est non industrialisé, il est le fait d'un artisan qui transforme des matières premières, qu'elles soient végétales, animales ou minérales. La production artisanale est de petit volume (Kiger et Kiger, 1968).

1.3.2. Pâtisserie industrielle

La pâtisserie industrielle est définie comme un produit non nécessairement parfait, mais pratique et facile à manipuler.

Il est presque impossible de classer toutes les variétés de pâtisseries commerciales.

On peut cependant selon la consistance de la pâte, retrouver les produits moussés (le gâteau des anges et le gâteau éponge), les produits à pâte liquide (les pâtisseries individuelles), les produits à pâte semi-ferme (les tartes et tartelettes, les gâteaux aux fruits) et les produits à pâte ferme comme les feuilletés (Bourdeau et Ménard, 1992).

1.4. La détérioration des produits pâtisseries

La durée de vie d'un produit peut être définie par la période pendant laquelle il ne présente aucun signe de détérioration sensorielle et demeure sain dans des conditions de stockage normales (El-gerssifi, 1998).

Les détériorations peuvent être de plusieurs ordres :

- Chimique : se caractérise par une dégradation des lipides conduisant à des odeurs désagréables, qui rendent les produits inacceptables et réduisent la durée de vie.
- Microbiologiques : est souvent le principal facteur limitant la durée de conservation des produits à humidité élevée et intermédiaire.
- Physique : la perte et le gain d'humidité peuvent entraîner des modifications de la texture, et même favoriser la détérioration physique et chimique (Smith *et al.*, 2004).

La durée de vie des produits céréaliers va dépendre de plusieurs facteurs :

Formulation, pétrissage/battage, cuisson, emballage, conditions de stockage. Ces facteurs ont tous une influence significative et il convient donc de n'en négliger aucun (El-gerssifi, 1998).

L'altération est souvent due à la multiplication de microorganismes contaminants. Il existe une grande variabilité dans la capacité des aliments à assurer la croissance des microorganismes, en fonction de leur valeur nutritive et de leur humidité.

Les pâtisseries étant des denrées périssables (produits frais), ils ont des durées de vie limitées (Madigan et Marktino, 2007).

1.5. Risques sanitaires en pâtisserie

Les risques microbiens existent pour Les pâtisseries à base de crème chantilly, crème pâtissière, crème au beurre et crème ganache, ainsi que pour les glaces.

Ces produits présentent en effet un milieu favorable pour le développement de diverses bactéries qui peuvent être dangereuses pour la santé humaine (*E. coli*, *Salmonella*, *et*

Staphylococcus aureus). Les tartes et mousses aux fruits quant à elles, peuvent être contaminées par les levures et moisissures.

Si ces micro-organismes altèrent les aliments au niveau visuel et gustatif, ils ne sont généralement pas responsables de maladies graves (Millet et Cabut, 1997).

1.6. Hygiène et assainissement

La qualité d'une pâtisserie ou d'un dessert dépend de la présentation, de l'odeur et du goût. Certains de ces éléments comprennent les qualités nutritives d'un plat ainsi que les soins à apporter en matière d'hygiène et de salubrité lors de sa préparation.

Un chef a l'obligation morale d'observer ces derniers sans exception et d'Avoir une éthique de travail qui implique de prêter une attention particulière aux considérations d'hygiène.

L'uniforme du chef sert à plusieurs fins, la veste blanche garantit aux clients que la cuisine est propre, la double couche offre une protection contre les éléments chauds et les éclaboussures. (Bleu, 2011).

Chapitre 2

Microbiologie de la pâtisserie

2.1. Origine des micro-organismes indésirables dans les aliments

Ces micro-organismes ont deux origines possibles :

Ils préexistent dans la matière brute ou l'aliment avant toute manipulation ou transformation. Leur nombre dépendra des conditions de conservation.

Ils sont apportés accidentellement lors de manipulations ultérieures de l'aliment. Cet apport peut venir soit de matériel ainsi que des eaux de lavage non stériles, soit de manipulateur par l'intermédiaire de la peau, de la bouche, des vêtements, soit de l'air par l'intermédiaire de poussières par exemple, soit des insectes comme les mouches qui sont des vecteurs très dangereux de microorganismes (Ait abdelouahab, 2007).

2.2. Facteurs influençant la croissance microbienne

La capacité des micro-organismes à se développer ou à se multiplier dans un aliment est essentiellement déterminée par l'environnement alimentaire ainsi que par l'environnement dans lequel l'aliment est stocké, désignés respectivement comme l'environnement intrinsèque et extrinsèque de l'aliment (Ray, 2004).

2.2.1. Environnement intrinsèque

2.2.1.1. pH

Les aliments dont le pH est inférieur à 4,6 sont appelés des aliments très acides. Cette limite a été fixée car, dans ces aliments, les spores de *Clostridium botulinum* ne peuvent pas sporuler et produire de la toxine. Le pH optimal pour la croissance des micro-organismes est presque neutre (pH 7) et la plupart des bactéries ne se développent pas en dessous de pH 4,6.

Tableau. 1: Les plages de croissance de microorganismes au pH (Tewari et Juneja, 2008).

Microorganisme	Les plages de croissance	pH optimal
Bactéries à gram positif	4,0 à 8,5	6,0 - 8,0
Bactéries à gram négatif	4,5 à 9,0	
Levures	2,0 à 8,5	4,5-6,0
Moisissures	1,5 à 9,0	3,5-4,0

2.2.1.2. Activité de l'eau (aw)

L'activité de l'eau (A_w) est une mesure de la disponibilité de l'eau pour des fonctions biologiques. Le A_w d'un aliment peut être exprimé par le rapport entre la pression de vapeur d'eau de l'aliment ($P < 1$) et celle de l'eau pure ($P_0 = 1$), c'est-à-dire P_0 / P . Il varie entre 0 et 1 (Ray, 2004).

Le seuil minimal nécessaire aux bactéries est généralement compris entre 0,75 et 0,95. Ceci correspond à l' A_w des aliments, qui se situent entre 0,60 et 1, pour les aliments non secs (Delarras, 2007).

2.2.1.3. Composition de l'aliment

Les microbes se développeront sur des milieux qui comportent, des sources d'énergie : des glucides surtout, des lipides éventuellement, des sources d'azote assimilable, nécessaire à la fabrication des protéines et des facteurs génétiques : acides aminés, peptides simples, des facteurs de croissance : vitamines- certains minéraux (Oudot, 1999).

2.2.1.4. Potentiel redox

Le potentiel redox (E_h) est défini comme le rapport entre le pouvoir oxydant total (acceptation des électrons) et le pouvoir réducteur total (donneur d'électrons) d'un aliment.

Généralement, les bactéries aérobies tolèrent mieux les valeurs d' E_h supérieures que les bactéries anaérobies nécessitant des valeurs d' E_h négatives pour la croissance (Tewari et Juneja, 2008).

2.2.2. Environnement extrinsèque

2.2.2.1. Température de conservation

Les produits tels que les cakes farcis aux fruits, crème fraîche, ... sont conservés, réfrigérés, ou surgelés afin d'obtenir un temps de conservation plus élevé (AFSCA, 2013). La température la plus basse à laquelle un microorganisme a été signalé est de -34 °C , la plus élevée dépasse quelque part les 100 °C (Jayet *al.*, 2008).

2.2.2.2. Humidité relative

Une atmosphère ambiante très humide entraîne une prolifération des microorganismes à la surface des aliments. La température et l'humidité sont liées : plus la température s'élève, plus l'humidité diminue (Ait abdelouahab, 2007).

2.3. Les germes responsables d'altération des produits pâtisiers

2.3.1. Flore aérobie mésophile total (FTAM)

Il s'agit des germes aérobies pouvant se multiplier dans des conditions ambiantes à 30 °C (Salifou *et al.*, 2013), mais d'autres températures sont parfois utilisées (35°C, 37°C).

Ils ne constituant pas une famille bactérienne particulière (Ghafir et Daube, 2007) et leur présence au-delà des limites définies peut signifier un défaut d'hygiène des procédés de fabrication (Salifou *et al.*, 2013).

2.3.2. Coliformes totaux et thermotolérants

2.3.2.1. Coliformes totaux

Ce groupe correspond à certaines espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*. La plupart d'entre eux peuvent être présents dans l'environnement et cela n'est pas forcément signe d'une contamination fécale. L'analyse des « coliformes totaux » est un indicateur permettant d'apprécier l'état d'hygiène général (Carip *et al.*, 2015).

2.3.2.2. Coliformes thermotolérants

Correspondent au genre *Escherichia*, sont désignés par l'appellation « coliformes thermotolérants » en raison de leur capacité de croître à 44,5°. *E. coli* est un Hôte normal, étant l'espèce bactérienne prédominante dans l'intestin et les fèces, sa présence dans les aliments est considérée comme une indication de contamination fécale (Ghafir et Daube, 2007).

2.3.3. *Clostridium* sulfito-réducteur

Ce sont des bactéries anaérobies sporulées, Gram positif, Ils sont ainsi dénommés car ils sont capables de réduire les sulfites présents dans le milieu de culture en sulfures ; ceux-ci se combinent avec un sel de fer pour donner du sulfure de fer noir (Delarass, 2007). Ils sont témoins d'une contamination fécale ou tellurique. Ils sont résistants du fait de leur capacité à produire des spores et présentent une certaine thermotolérance (46°C) (Carip *et al.*, 2015).

2.3.4. *Staphylococcus aureus* à coagulase positif

Cette bactérie se trouve dans les narines, la peau et les poils d'animaux à sang chaud, de ce fait elle peut contaminer une grande variété d'aliments au cours de la préparation et de la transformation, notamment des pâtisseries à la crème qui ont été impliqués dans des intoxications alimentaires. Elle est positive en catalase et coagulase (Le loir, 2003).

2.3.5. *Salmonella*

Salmonella est une bactérie mésophile : son optimum de croissance est proche de la température corporelle des animaux à sang chaud (35-43°C). La limite de croissance inférieure se situe aux environs de 5 °C, ce qui implique un contrôle efficace de la chaîne de froid. L'optimum de croissance pour pH est 7,2 et pour aw est de 0,99 (Korsak *et al.*, 2004).

2.3.6. Levures et moisissures

La détérioration des denrées périssables par ces micro-organismes indique souvent que les denrées ont simplement été « stockées » trop long." (Sperber et Doyle, 2009).

2.4. Les maladies transmises par les pâtisseries

2.4.1. Infection

La maladie résulte de la consommation d'aliments contaminés par des bactéries entéropathogènes. Il est nécessaire que les cellules restent en vie dans les aliments pendant la consommation. Les cellules viables, même si elles sont présentes en petit nombre, ont le potentiel de s'établir et de se multiplier dans le tube digestif pour provoquer la maladie. La salmonellose est un exemple (Ray, 2008).

2.4.2. Intoxication

La maladie résulte de l'ingestion d'aliments contenant une toxine microbienne préformée. Les micro-organismes toxigènes n'infectent pas l'hôte et sont souvent morts lorsque l'aliment contaminé est consommé. La maladie est due à l'ingestion et à l'action d'une toxine bioactive (Madingo et Martinko, 2007). L'empoisonnement alimentaire au staphylocoque en est un exemple (Ray, 2008).

2.4.3. Toxi-infection alimentaire

Individuelles ou collectives, les toxi-infections alimentaires (TIA) résultent de la transmission d'infections à l'homme par les aliments. L'attaque microbienne peut être liée aux propriétés invasives du micro-organisme et/ou aux produits toxiques qu'il est capable d'élaborer au cours de sa croissance.

Un foyer de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est défini par l'apparition d'au moins 2 cas d'une symptomatologie, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (Esbelin, 2009).

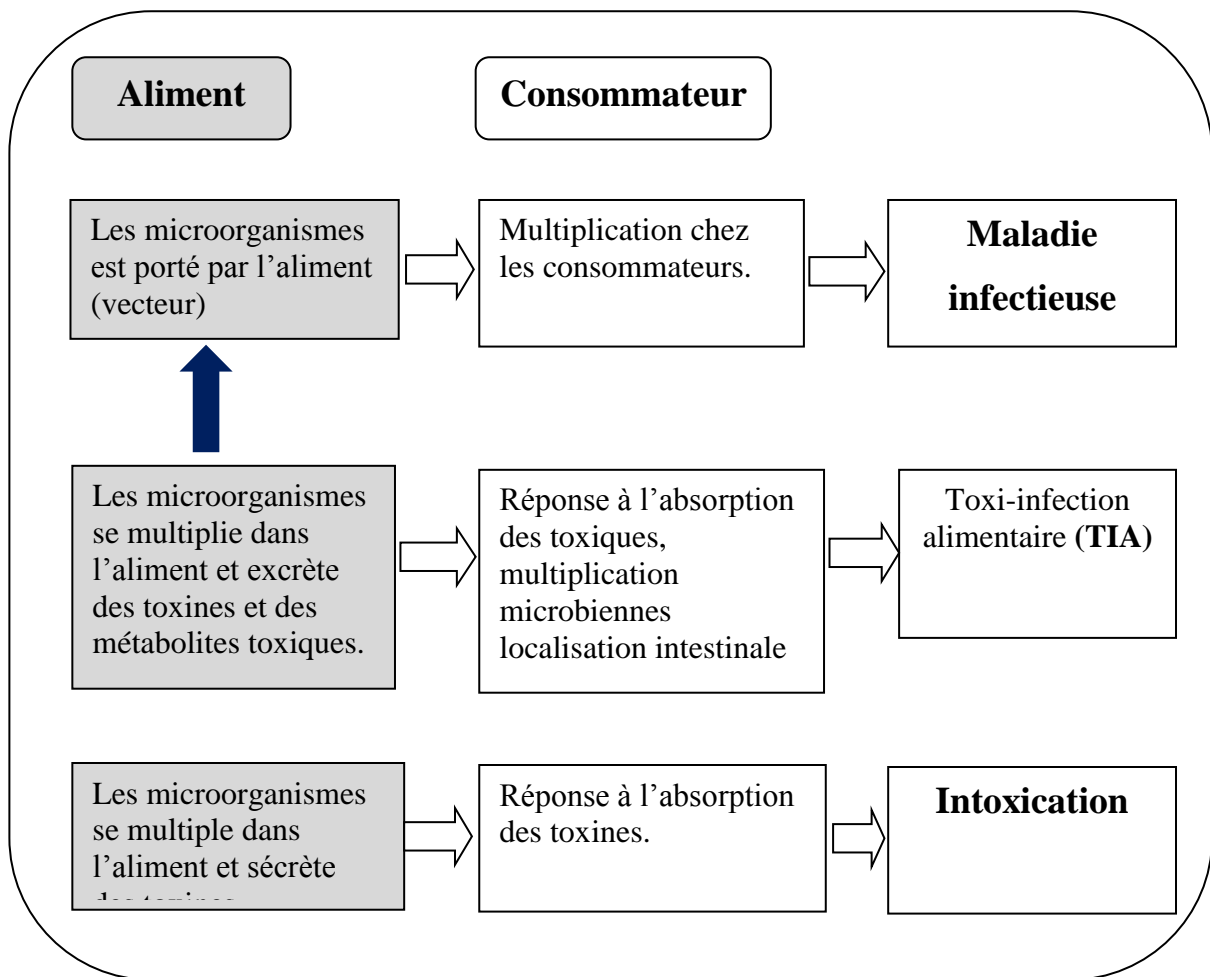


Figure 1. Principales interactions entre aliments, microorganismes et consommateur.

Partie expérimental

Chapitre 3

Matériel et méthodes

Méthodologie

3.1. Echantillonnage (choix des échantillons)

L'étude a été faite sur 10 échantillons de pâtisseries représentés dans le tableau 2 prélevés dans la période de 24 février à 28 Avril à partir des pâtisseries différentes de centre de wilaya de Biskra. Les prélèvements ont été effectués de manière aseptique à l'aide des sacs stériles, Conservés au frais dans une glacière avec carboglace, et directement acheminés au laboratoire pour l'analyse.

Tableau 2. Les types de produits pâtisseries analysés

N°écha.	Type de pâtisserie
1	Roulet à la vanille
2	Génoise à la vanille
3	Génoise biscuit simple
4	Royal
5	Génoise au caramel
6	Tartelette
7	Génoise au chocolat
8	Roulet au chocolat
9	Milles feuilles
10	Les éclaires

3.2. Préparation de l'échantillon pour essai

Les parties aliquotes de chaque composant de l'échantillon ont été prélevées à proximité de bec bunsen allumé. Cette prise d'essai est utilisée pour la préparation de solution mère (JORA, 2016). Les pâtisseries étant des produits solides, elles feront donc l'objet de dilutions décimales.

3.3. Germes recherchés

Lors de l'analyse on recherche six germes :

- La flore mésophile aérobie total (FMAT).
- Les coliformes totaux et fécaux.
- Les staphylocoques.

- Les anaérobies sulfito-réducteurs (ASR).
- Les salmonelles.
- La flore fongique (levures et moisissures).

3.4. Protocole d'analyse

3.4.1. Préparation de la solution mère (NF V08-010)

Un fragment de 25 g de chaque échantillon de pâtisserie a été prélevé de façon aseptique et placé dans un bécher contenant 225 ml d'EPT, ensuite mélangé et laissé au repos 30mn à 1h à la température du laboratoire pour assurer la revivification des germes. La solution mère de dilution (10-1) est ainsi constituée.

3.4.2. Préparation des dilutions décimales

A partir de la solution mère, des dilutions plus grandes sont réalisées pour faciliter les dénombrements. Les dilutions successives sont obtenues en introduisant 1ml de la solution mère à l'aide d'une pipette stérile dans un tube à essai contenant 9ml d'EPT. On a mis :

1ml de la solution 10-1 dans 9 ml d'EPT pour obtenir la solution 10-2.

1ml de la solution 10-2 dans 9ml d'EPT pour obtenir la dilution 10-3.

1ml de la solution 10-3 dans 9ml pour obtenir la dilution 10-4.

L'opération a été poursuivie jusqu'à ce qu'on ait obtenu de dilution 10-5.

Chaque solution a été homogénéisée à l'aide d'un vortex pour être prêt à l'emploi.

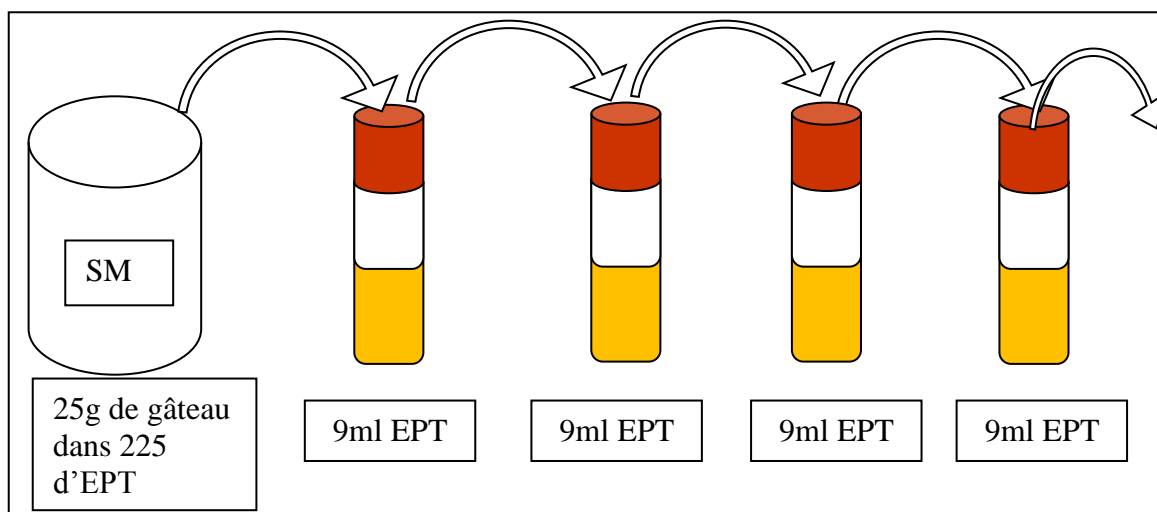


Figure 2. Schéma de préparation de série de dilutions (NF V08-010).

3.5. Recherche et dénombrement des germes

3.5.1. Recherche et dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (ISO4833/2003)

Pour chaque dilution 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 1 ml a été déposé dans des boîtes de pétri stériles à l'aide de pipettes stériles auquel on a ajouté environ 12 à 15 ml de gélose PCA maintenue à l'avance à une température de 47 °C et refroidie à 37°C. Chaque boîte a été ensuite soigneusement homogénéisée avec le prélèvement par des mouvements circulaires et de « va-et-vient » ou en forme de « 8 ». Les boîtes ainsi préparées ont été incubées retournées dans une étuve réglée à 30°C. La lecture a lieu après 72 ± 3 heures par dénombrement des colonies blanchâtres qui poussent en profondeur.

3.5.2. Recherche et dénombrement de coliformes totaux (NM ISO 4832, 2003) et fécaux (NM 08.0.124, 2004)

Nous avons déposé 1 ml de chaque dilution décimale (10⁻² jusqu' à 10⁻⁵) dans une boîte de pétri stérile, ensuite 15 ml de Désoxycholate lactose (DCL) ont été coulés et mélangés avec l'inoculum par la suite, nous avons incubé les boîtes de pétri pendant 24h à 37°C (pour les coliformes totaux) et à 44°C (pour les coliformes fécaux). Les colonies caractéristiques sont rouge brique d'un diamètre de 0,5mm.

3.5.3. Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus* à coagulase positif

Bactéries formant des colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques à la surface d'un milieu de culture sélectif et donnant une réaction positive à la coagulase.

3.5.3.1. Dénombrement des staphylocoques à coagulase Positive

Le milieu de culture de choix employé pour cette recherche est celui de Baird-Parker (BP), additionné d'un mélange de jaune d'œuf et de tellurite de potassium. A l'aide d'une pipette stérile, 0,1 ml de chaque dilution a été transféré à la surface des boîtes de milieu gélosé.

L'inoculum déposé a été étalé soigneusement et le plus rapidement possible à la surface du milieu gélosé tout en évitant de toucher les bords de la boîte avec l'étaleur. Les boîtes ont été laissées séchées avec leur couvercle en place, pendant, environ, 15 min à la température ambiante, Ensuite retournées et incubées pendant 24h ± 2h, puis ré-incubées pendant 24h ± 2h supplémentaires dans les étuves à 37°C.

Après 24h et 48h d'incubation, les colonies noires ou grises, brillantes, convexes et entourées d'une auréole d'éclaircissement sont caractéristiques. Après au moins 24h d'incubation, peut apparaître dans cette zone claire un anneau opalescent au contact des colonies.

3.5.3.2. Confirmation (recherche de la coagulase)

Une partie de chaque colonie sélectionnée a été ensemencée dans 5ml de bouillon cœur cervelle (BCC) à l'aide d'un fil stérile et incubée à 37°C pendant 24h ± 2 h.

0,1 ml de chaque culture a été ajouté aseptiquement à 0,3ml de plasma de lapin dans des tubes stériles à hémolyse. L'examinations de la coagulation de plasma a été effectuée après 4h à 6h d'incubation à 37°C en inclinant le tube. La réaction à la coagulase est considérée comme positive quand le coagulum occupe plus de la moitié du volume initialement occupé par le liquide. Une réexaminations après 24h d'incubation est nécessaire en cas d'un test négatif. A titre de contrôle négatif, 0,1 ml de BCC est ajouté à la quantité recommandée de plasma de lapin, et incubé sans ensemencement. Pour que la réaction soit valable, le plasma du tube témoin ne devra pas montrer de signes de coagulation (JORA, 2014).

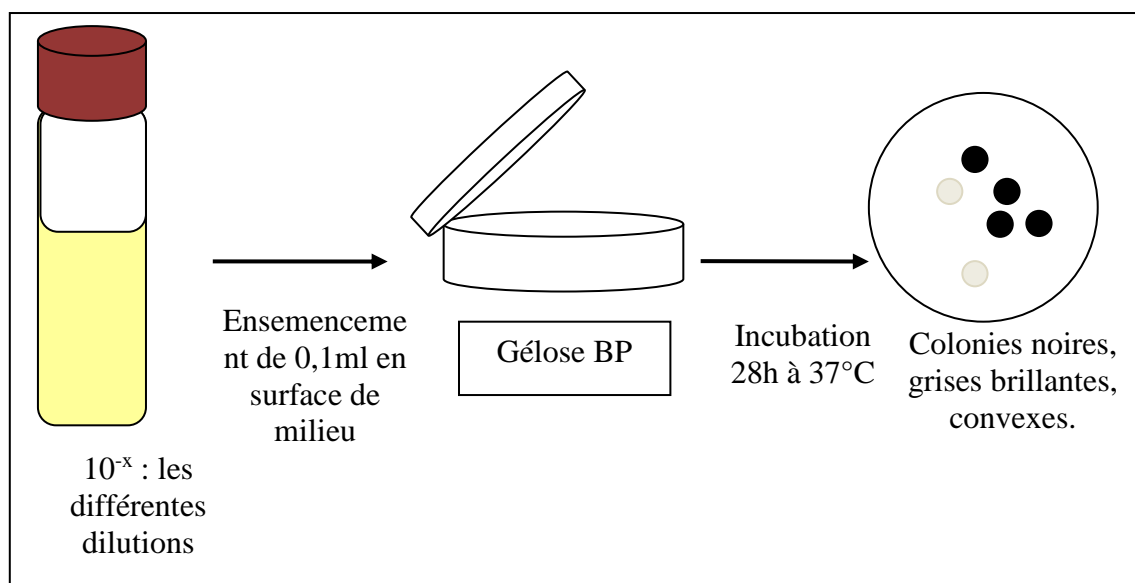


Figure 3. Isolement de *Staphylococcus* sur gélose Baird Parker (JORA, 2014).

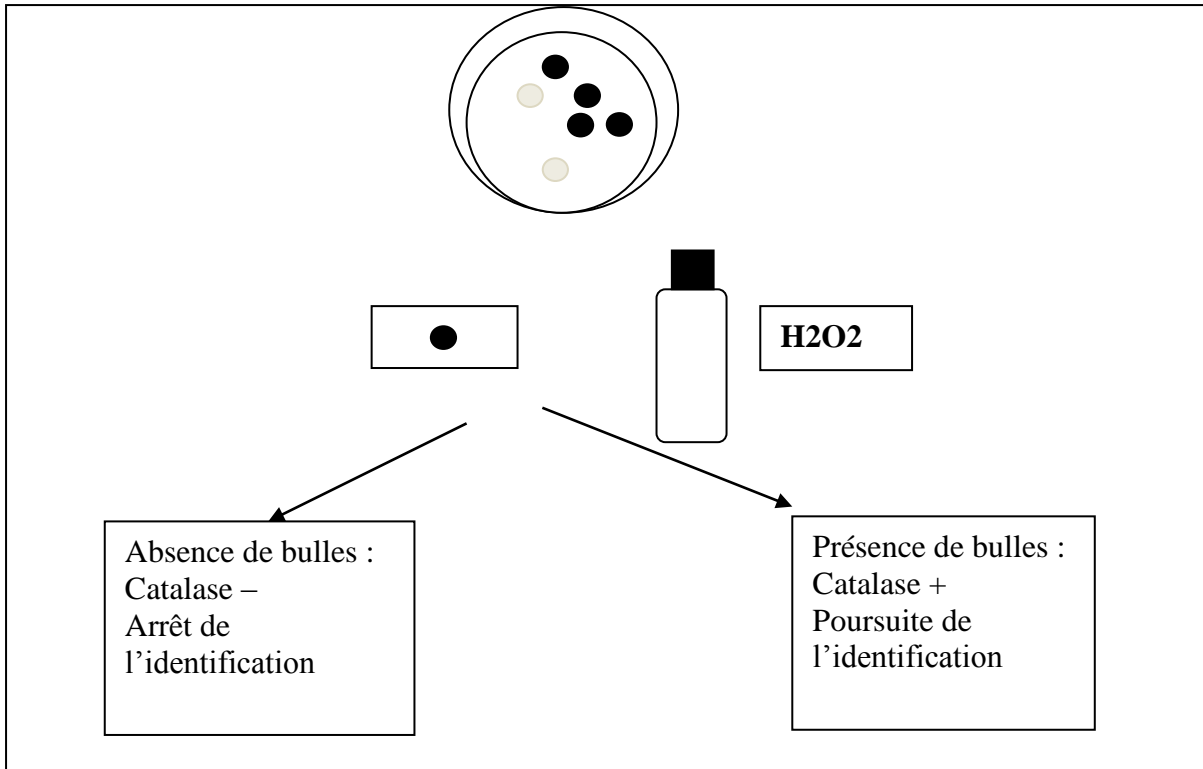


Figure 4.Confirmation biochimique de *Staphylococcus* (Test catalase) (JORA, 2014).

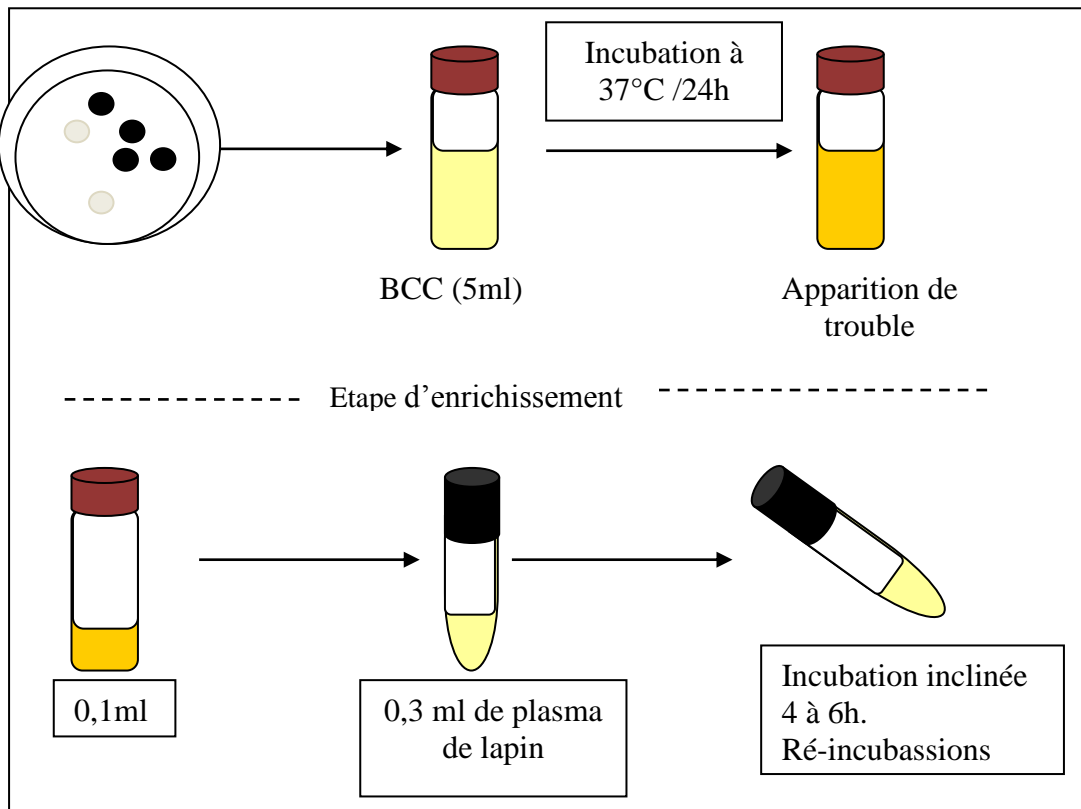


Figure 5.Confirmation biochimique de *Staphylococcus* (Test coagulase) (JORA, 2014).

Nous avons dénombré toutes les colonies ayant poussé à l'aide d'un compteur de colonies muni d'une loupe. La lecture se fait sur 2 boîtes ensemencées avec des dilutions successives. Le nombre de germes par gramme (N) de produit est obtenu selon la formule suivante (JORA, 2014) :

$$N = \frac{\Sigma C}{V (n_1 + 0,1 n_2) \times d}$$

N= nombre de germes par gramme de produit.

ΣC = somme des colonies caractéristiques sur les deux boîtes retenues.

V= volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte (en ml).

d= taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

n_1 = nombre de boîte lu à la 1^e dilution.

n_2 = nombre de boîte lu à la 2^e dilution.

3.5.4. Recherche des spores des anaérobies sulfito-réductrices (ASR)

Quatre tubes stériles contenant 1ml des dilutions $10^{-2}/10^{-3}$ (deux tubes par dilution), ont été placés dans un bain marie à 80°C, pendant 10min, puis ils ont été refroidis sous l'eau de robinet (destruction des formes végétatives). Ensuite chaque tube a reçu 15 ml, de gélose viande foie (VF), qui après refroidissement, additionnés par 0,2 ml de l'alun de fer et 0,5 ml de sulfite de sodium puis agités doucement.

Après solidification, quelques gouttes d'huile de paraffine ont été ajoutées pour assurer les conditions d'anaérobiose, puis incubés à 46°C pendant 24h (Institut Pasteur, 1999). Les grosses colonies noires, produisant des sulfures à partir desulfites qui ont précipité avec les ions de fer, sont considérées comme étant des clostridies sulfito-réductrices (HAMMOUDI *et al*, 2013).

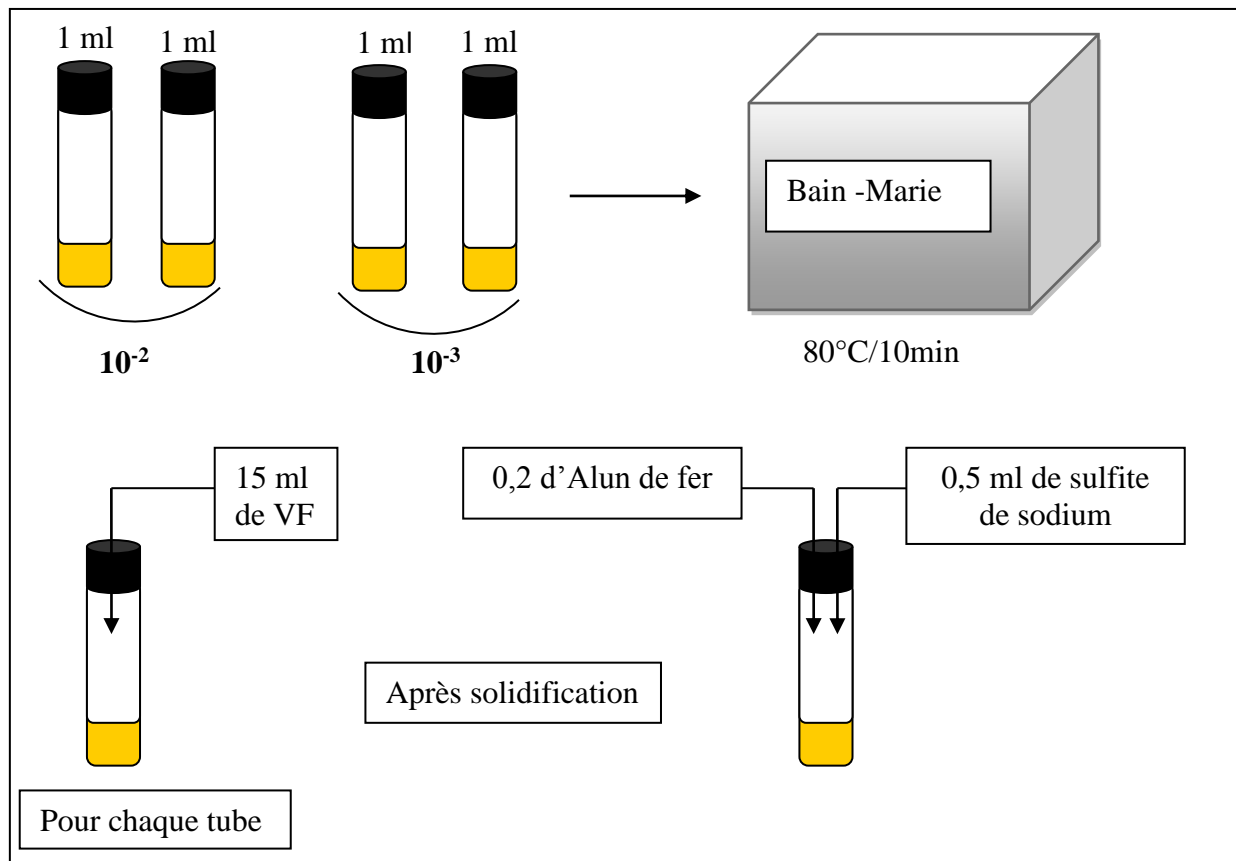


Figure 6. Schéma des étapes de recherche des spores de *Clostridium* (Institut Pasteur, 1999).

3.5.5. Recherche et dénombrement de salmonella

La méthodologie employée est subdivisée en quatre étapes : le pré-enrichissement, l'enrichissement, l'isolement et l'identification (NM 08.0.116, 2004).

➤ Pré-enrichissement en milieu non-sélectif

La solution mère qui a été préparée à partir de 25g de l'échantillon et 225ml de L'EPT a été incubée à 37°C , pendant 24h. Cette étape consiste en la revivification.

➤ Enrichissement en milieu sélectif

Les cultures de pré-enrichissement sontensemencées dans un milieu nutritif contenant des agents inhibiteurs actifs sur les germes qui font concurrence avec *Salmonella*. Pour cela ; à l'aide d'une pipette stérile ; 0,1 ml de la culture de pré-enrichissement a été transféré dans 10 ml de bouillon Rappaport (RV) puis incubé à 44°C pendant 24h.

➤ Isolement

Des stries ont été appliquées sur de la gélose SS, puis incubé à $37\text{ °C} \pm 0,5$ pendant 18 à 24 h (AL-JAFAERI et al, 2013). Cela permet de visualiser les colonies caractéristiques, dont le nombre aura été considérablement augmenté durant les phases précédentes. L'étape de confirmation, qui suit l'isolement, consiste en la sélection d'une ou plusieurs colonies caractéristiques en vue de leur purification. L'identité des colonies doit être confirmée en fonction de caractéristiques biochimiques (KORSAK *et al.*, 2004).

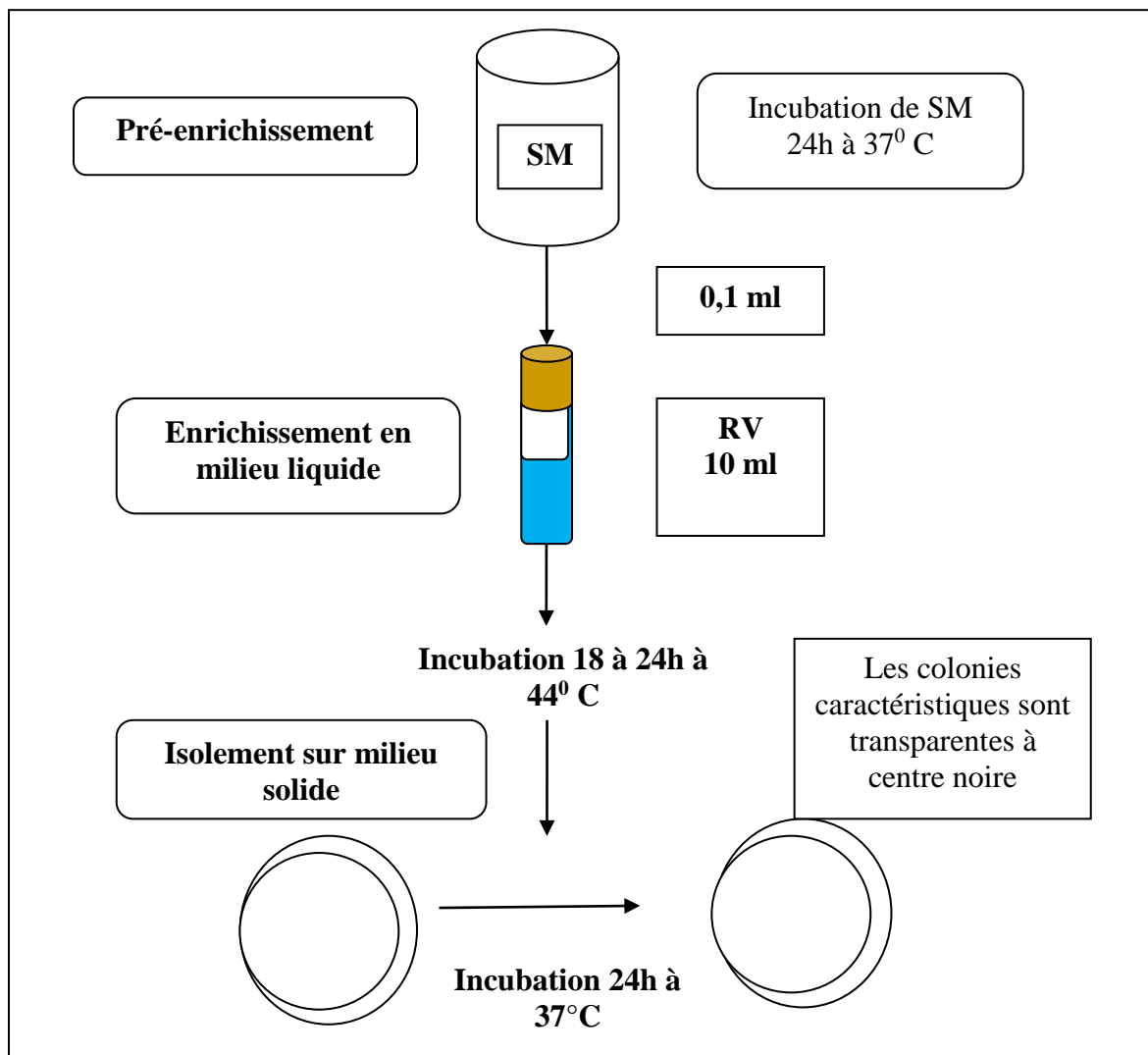


Figure 7. Les étapes d'isolement de *Salmonella* (Korsak *et al.*, 2004).

Identification biochimique

A-Milieu T.S.I (Triple Sugar Iron.)

Le milieu a été ensemencé par stries à l'aide d'une anse de platine à la surface de la pente et par piqure centrale dans le culot, puis incubé à 37 °C pendant 24h. Elle permet

d'étudier plusieurs caractères (production de gaze, réduction de H₂S, fermentation de glucose et de lactose).

B-Utilisation de citrate

La pente du milieu a été ensemencée avec une strie sur toute la surface et incubé à 37°C pendant 24h. Ce milieu permet de tester la capacité d'une bactérie à utiliser le citrate comme une seule source de carbone.

C-Mannitol-mobilité

Le milieu a été ensemencé par piqure centrale jusqu'au fond du tube avec la souche à tester à l'aide d'une anse de platine puis incubé à 37°C durant 24h pour découvrir la capacité d'utiliser le mannitol et la mobilité des souches.

D-Milieu urée-indole

Le milieu a été inoculé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne après l'avoir préparée dans l'eau physiologique. Ensuite incubé à 37°C pendant 24h. L'indole a été recherché en ajoutant quelques gouttes de réactif de Kovac, dont la présence se traduit par un anneau rouge en surface de milieu.

E-Test RM-VP : (Rouge de méthyle et voges-proskauer)

Pour réaliser ce test, nous avons utilisé le milieu Clark et lubs et nous l'avons ensemencé à l'aide d'une anse de platine avec la souche bactérienne à analyser. Après avoir incubé à 37°C pendant 18h, nous avons partagé le milieu en deux tubes pour pratiquer les deux tests :

- Réaction de voges-proskauer en ajoutant quelques gouttes du réactif VP1 et le même volume de réactif VP2. La lecture s'effectue après quelques minutes.
- Test du rouge de méthyle en additionnant 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle. La lecture est immédiate.

F-Test catalase

Une goutte d'eau oxygénée a été déposée sur une lame porte objet dans laquelle un peu de colonie suspecte a été émulsionnée. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase.

J-Test oxydase

Sur une lame porte-objet propre, un disque « OX » a été déposé et imbibé avec une goutte d'eau distillée. Ensuite, une partie de la colonie à étudier a été prélevée et étalée sur le disque à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée stérile.

En cas d'un résultat positif, une coloration violette foncée apparaît immédiatement sur le disque puis vire au noir.

H-Test ONPG-hydrolase

Il est particulièrement important pour les entérobactéries. La β gal peut être mise en évidence facilement car elle est capable d'hydrolyser toute molécule analogue du lactose. En laboratoire, on utilise l'ONPG ou Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside.

Le test se pratique uniquement chez les bactéries lactose - en 24 h sur milieu solide.

- Dans un tube sec stérile, 0.25ml d'eau physiologique a été met.
- Des gouttes de toluène ont été ajoutées.
- A l'aide d'une anse stérile, des colonies suspectées ont été ensemencées.
- Le disque d'ONPG a été ajouté.
- Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 30 min.

L'apparition de coloration jaune indique un résultat positif (l'hydrolyse d'ONPG par β -galactosidase libère le galactose et de l'orthonitrophénol (ONP = couleur jaune)).

I-Test ADH

Ce test a été réalisé sur tube de bouillon ADH (contient de l'arginine) appelé milieu de Moeller falkow. Nous avons préparé une suspension bactérienne en eau physiologique de la souche à étudier, ensuite nous avons ensemencé le milieu avec 2 à 3 gouttes de cette suspension et nous avons ajouté l'huile de paraffine pour assurer l'anaérobiose. Incubation à 37°C pendant 24h.

G-Galerie API 20E

Après purification, une colonie caractéristique est transférée dans 5 ml d'eau physiologique. Cette suspension a été introduite dans chaque micro-tube à l'aide d'une pipette pasteur stérile, avec la pointe appuyée à l'intérieur et sur les côtés pour éviter la formation de bulles d'air. Les tubes et cupules des tests CIT, VP et GEL ont été remplis. Pour les autres

tests, seuls les tubes ont été remplis. Pour les tests ADH, LCD, ODC, URE, H2S ; l'anaérobiose est créée en remplissant leurs cupules d'huile de paraffine.

Après 24h d'incubation à 37°C, des additifs sont ajoutés à quelques micro-tubes afin de compléter la lecture (voir annexe 3) Pour la galerie **Staph API 20**, seuls les tubes ont été remplis par la souche bactérienne, avec l'ajout d'huile de paraffine pour ADH, et URE.

3.5.6. Recherche des levures et moisissures

Des aliquotes de 0,1 ml de et de chaque dilution ont été ensemencées en surface sur la gélose Sabouraud au Gentamycine initialement préparée et coulée dans les boîtes de pétrie. Des colonies blanches ou colorées, lisses et crémeuses de levures et des moisissures sous forme poudreuse ont été apparus après 5 jours d'incubation à 25 °C (DEGNON *et al.*, 2013).

➤ Observation microscopique de levures

Une seule colonie de levure a été mélangée dans une gouttelette d'eau distillée stérile sur une lame de verre et étalée jusqu'à ce que le frottis s'élève. Le frottis a ensuite été coloré à l'aide d'un colorant bleu de méthylène dilué, séché à l'air et observé au microscope optique à un grossissement de 100 (Karki *et al.*, 2017). L'observation microscopique des moisissures a été réalisée à l'aide de scotch-test.

3.6. Méthode d'interprétation

Les résultats des analyses microbiologiques sont interprétés à partir des critères microbiologiques fixés par des normes algériennes. Ces critères d'appréciation sont définis par l'arrêté ministériel du 27 Mai 1998 et publié sur le Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire n°35.

Germes	FMAT/g	CT/g	CF/g	Staph/g	ASR/g	Salmonelle/25g
M	3.10^5	10^2	10	10^2	10	Absence

L'interprétation des résultats se fait selon un plan à 3 classes, suivant les critères de références de m :

- Si les résultats sont inférieurs ou égaux à 3m, le produit est « satisfaisant ».
- Si les résultats sont supérieurs à 3m et inférieurs ou égaux à 10m, le produit est « acceptable » (M=10m).

- m : seuil au-dessous duquel le produit est considéré comme étant de qualité satisfaisante. Tous les résultats égaux ou inférieurs à ce critère sont considérés comme satisfaisants.
- M : seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants.
- Si les résultats sont supérieurs à 10m, le produit est « non satisfaisant ».

Pour les salmonelles :

Les résultats sont interprétés à partir du plan à 2 classes :

- Absence= qualité satisfaisante.
- Présence=qualité non satisfaisante (Voir annexe 3).

Concernant les résultats de dénombrement de levures et de moisissures, ils sont interprétés en se basant sur les normes AFNOR (NF V 08-059) (Voir annexe 3).

Chapitre 4

Résultats et discussions

4.1. Résultats des analyses bactériologiques

4.1.1. Flore Mésophile Aérobie totale

Correspond à un bon nombre de microbes permet d'évaluer la charge bactérienne globale présente dans un aliment.

4.1.1.1. Caractéristiques macroscopiques

L'aspect des colonies de la FTAM obtenue sur les boîtes de pétri est montré dans la figure 9. La forme est ronde et lenticulaire en masse ; la taille est moyenne et petite et la couleur est blanchâtre crémeuse.

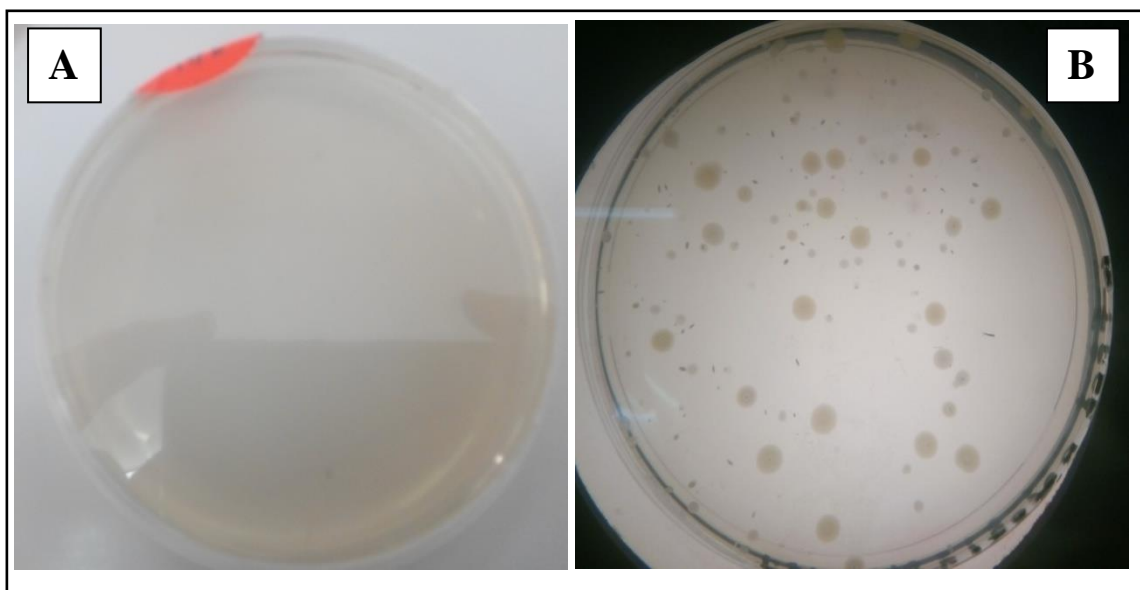


Figure 8. Résultats de recherche de la flore aérobie mésophile sur milieu PCA.

A : avant l'incubation ; **B** : après l'incubation (présence de colonies).

4.2.1. Coliformes totaux et fécaux

4.1.2.1. Coliformes totaux

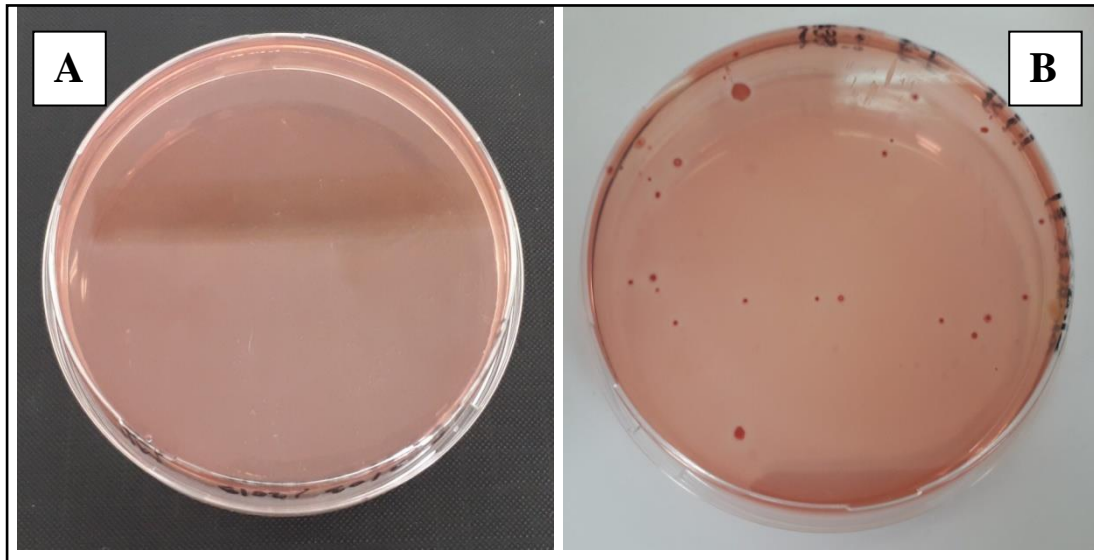


Figure 9. Résultats de recherche des coliformes sur DLC (Photo originale, 2019).

A : avant l'incubation ; **B** : après l'incubation (présence de colonies)

La présence de coliformes totaux a été indiquée par l'apparition de colonies rouge brique comme montre la figure 10.

4.1.2.2. Coliformes fécaux

Les coliformes fécaux obtenues ont étéensemencés sur de la gélose Mac Concky.

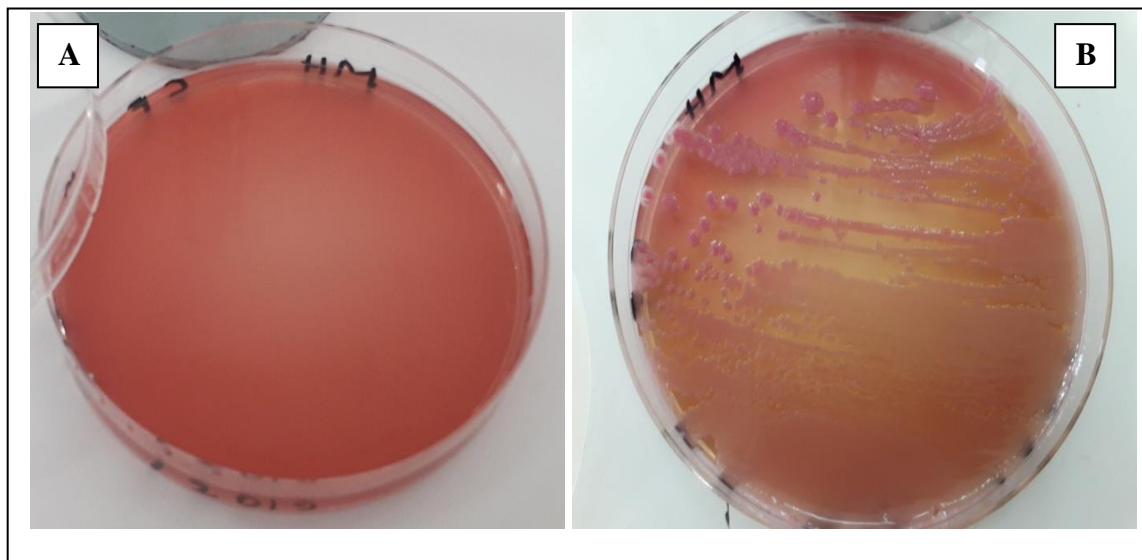


Figure10. Résultats d'ensemencement de coliformes fécaux sur Mac Concky (Photo originale, 2019).

A : avant l'incubation ; **B** : après l'incubation.

Une Observation microscopique et une galerie API 20 E ont été appliquées pour les colonies. L'espèce correspond aux résultats lus à partir de galerie est : *Klebsiella pneumoniae* (voir annexe N°1).

4.1.3. *Staphylococcus aureus*

4.1.3.1. Caractéristiques Macroscopiques

Les colonies noires ou grises, brillantes, convexes comme montre la figure 12.

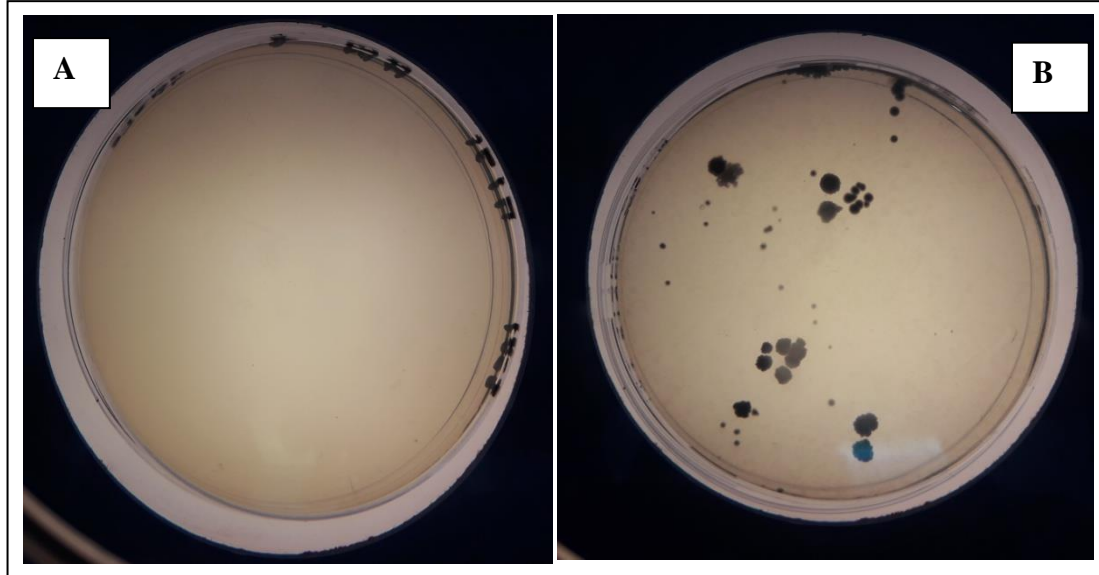


Figure 11. Résultats de recherche de *Staphylococcus aureus* sur BP (Photo originale, 2019).

A : Avant l'incubation ; **B :** Après l'incubation (présence de colonies).

4.1.3.2. Caractéristiques microscopiques

L'observation microscopique a montré la présence des coques en amas (grappe de raisin) en couleur violet (gram positif). Ils sont immobiles comme montre la figure 13.

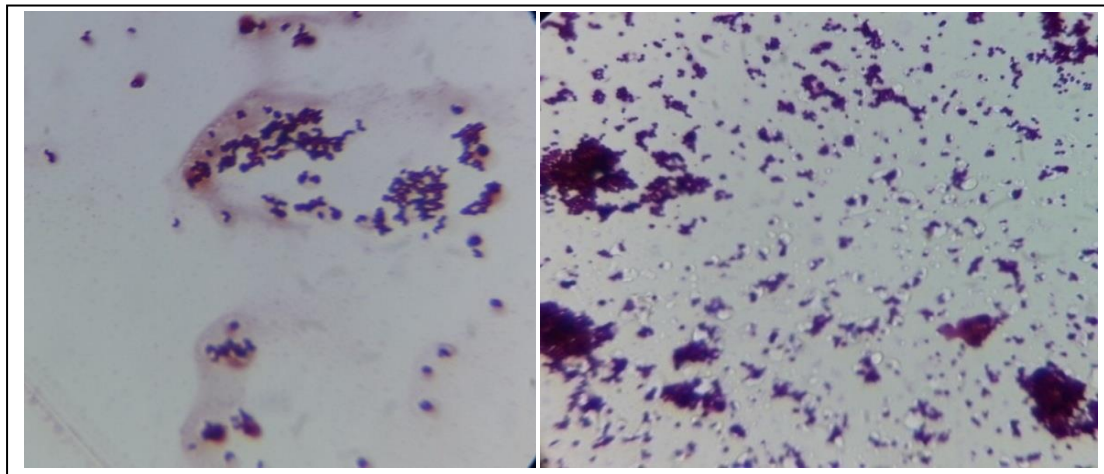


Figure 12. Observation microscopique de *Staphylococcus aureus* avec un grossissement 10×100 (Photo originale, 2019).

4.1.3.3. Tests biochimiques (confirmation)

A- Test catalase

Les staphylocoques sont capables de décomposer l'eau oxygénée grâce à la présence de catalase (Guiraud, 2012).

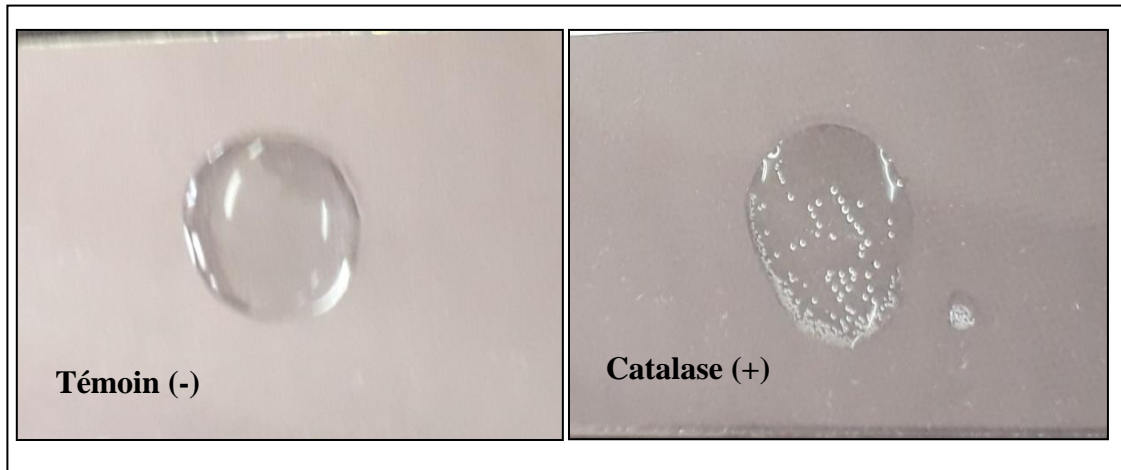


Figure 13. Résultat de test de catalase (photo originale, 2019).

B- Test coagulase

L'ensemencement des souches en BCC a donné un trouble après 24 h d'incubation comme montre la figure 15.

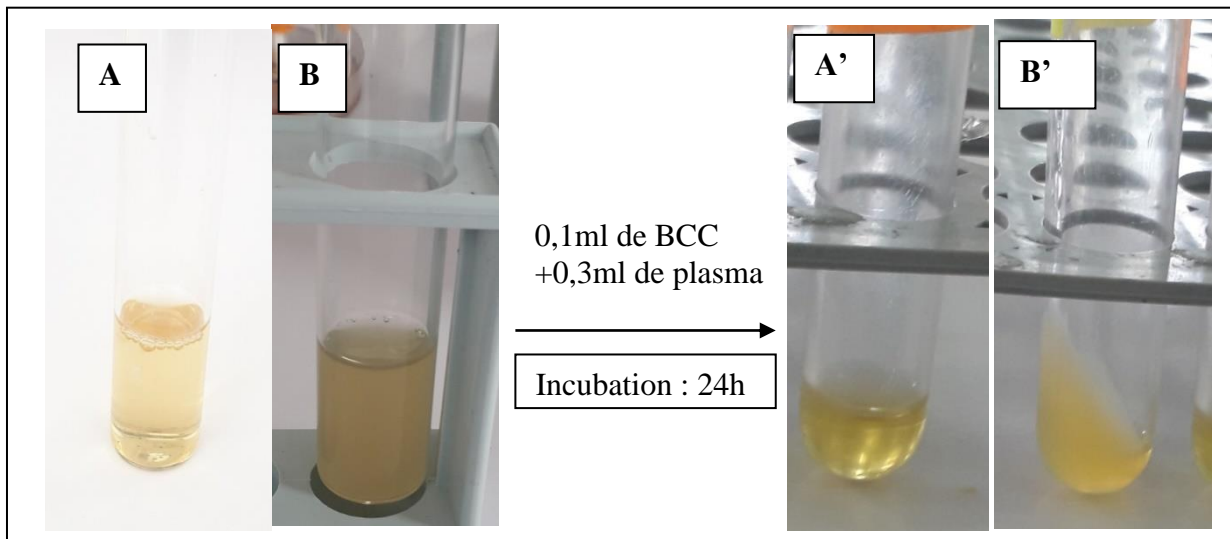


Figure 14. Résultat d'incubation des souches de *Staphylococcus aureus* en BCC (Photo A et B et le test de coagulase (Photo A' et B')) (Photos originales, 2019).

A : avant l'incubation ; **B :** après l'incubation (présence de trouble). **A' :** témoin (négatif) ; **B' :** après l'incubation (coagulase+).

C- Galerie API 20 staph

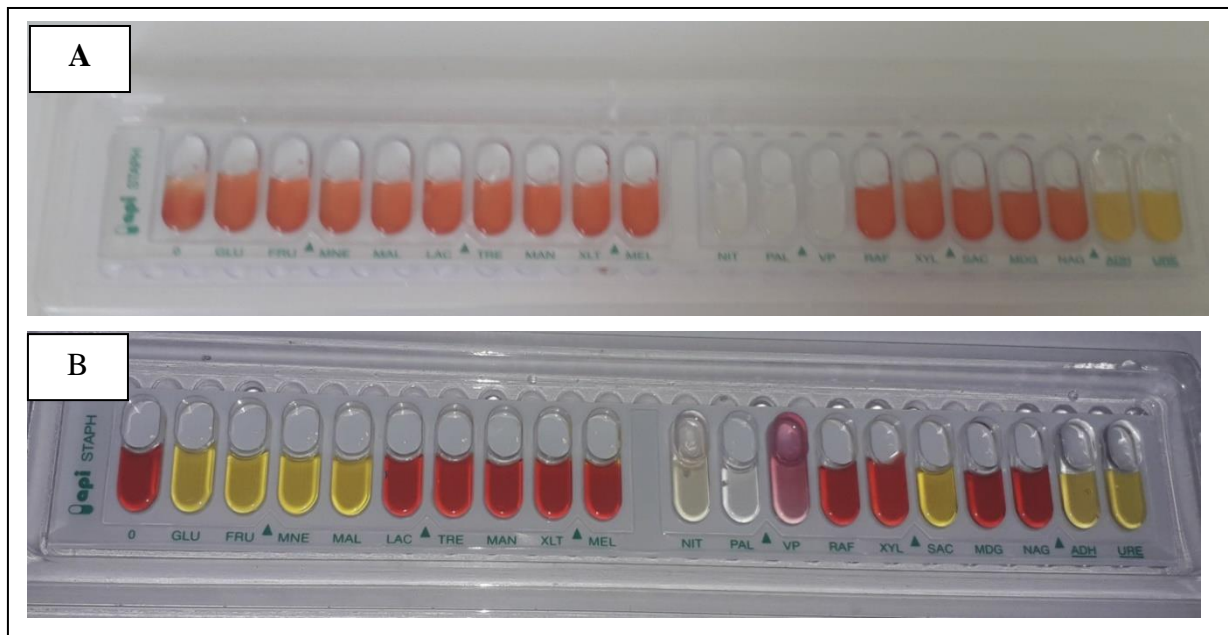


Figure 15. Galerie API Staph (Photo originale, 2019).

A : avant l'incubation ; **B** : après l'incubation et l'addition de réactifs.

On observe dans la figure 16 les caractères biochimiques d'une souche de *Staphylococcus* ou le résultat positif virée au jaune (les sucres), au rose (ADH, urée et VP) ou au rouge (NIT). Le code trouvé par lecture de résultats est de 6300110, celui correspond à l'espèce *Kocuria kristinae*.

4.1.4. *Clostridium sulfito-réductrice*

Les spores de *Clostridium sulfito réducteur* ont été absentes dans tous les échantillons, cela est montré dans la figure 17.



Figure 16. Résultats de recherche des spores de *Clostridium sulfito réducteur* (Photo originale, 2019). **A** : Témoin (négatif) ; **B** : Après l'incubation (absence de colonies).

4.1.5. Salmonella

4.1.5.1. Caractéristiques macroscopiques

Les colonies caractéristiques sont transparentes à centre noire comme montre la figure18.

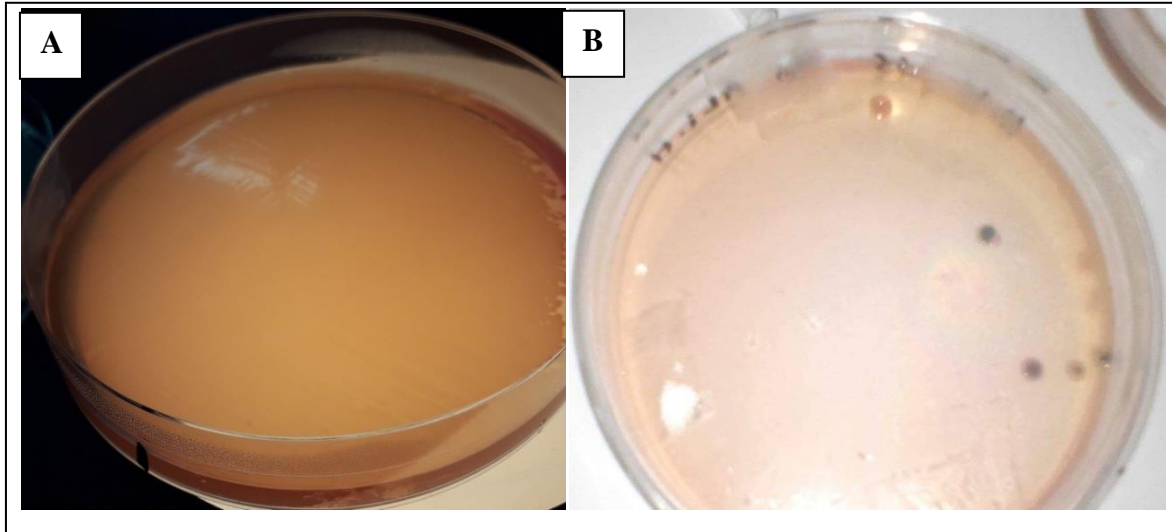


Figure 17.Résultat de recherche des salmonelles sur la gélose SS (Photo originale, 2019).

A :avant l'incubation ; **B** :après l'incubation (colonies transparentes à centre noire).

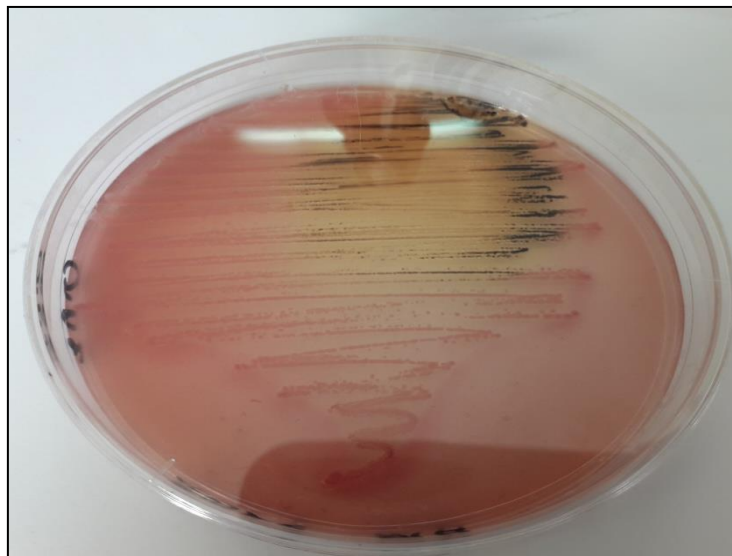


Figure 18. Isolement sur milieu SS (après 24 h d'incubation) des colonies suspectes de salmonelle (Photo originale, 2019).

4.1.5.2. Caractéristiques microscopiques

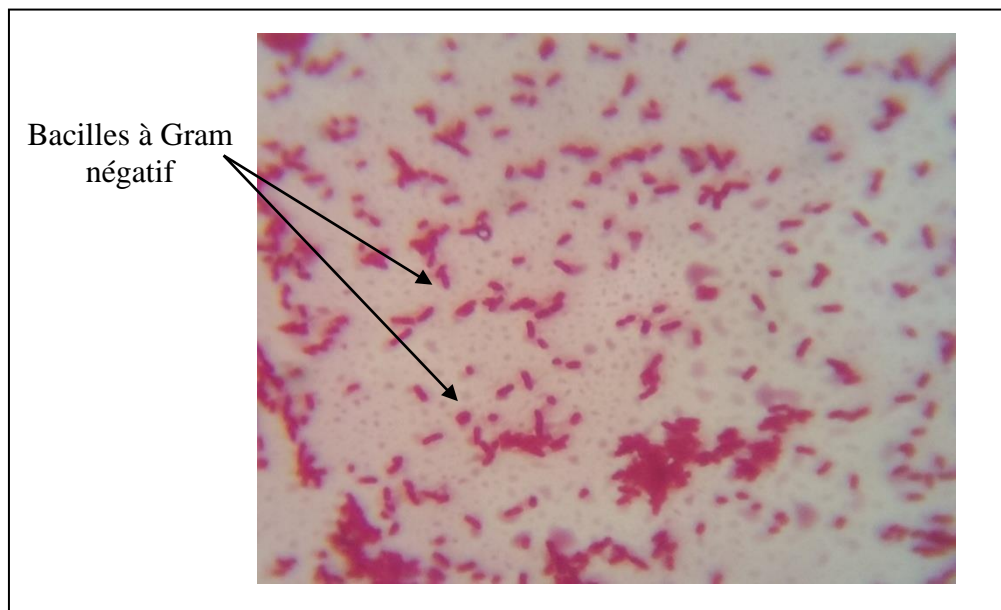


Figure 19. Observation microscopique d'une souche isolée de gélose SS avec un grossissement $\times 100$ (photo originale, 2019).

4.1.5.3. Test oxydase

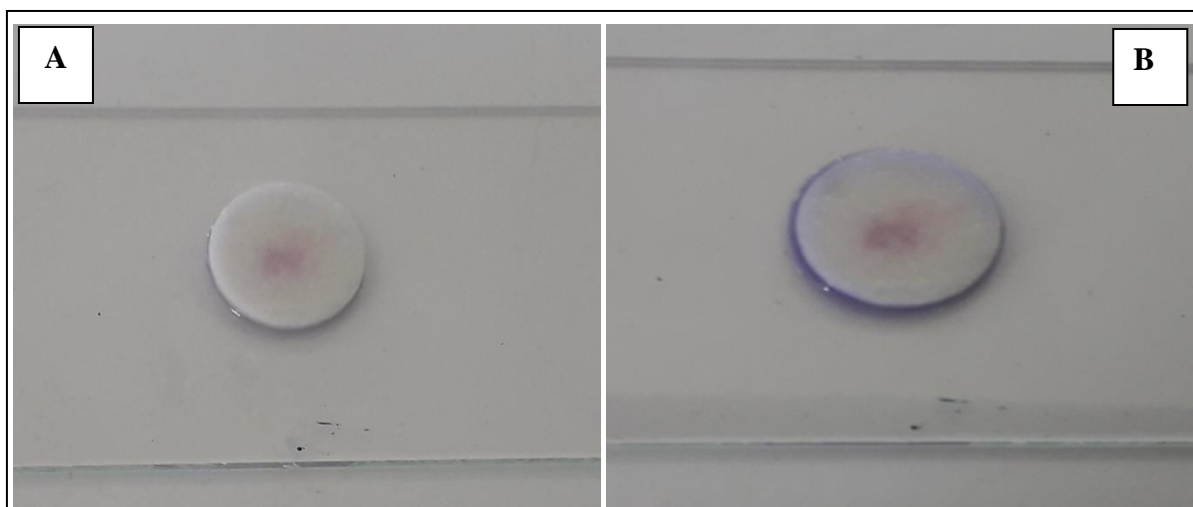






Figure 20. Résultat du test oxydase (Photo originale, 2019).




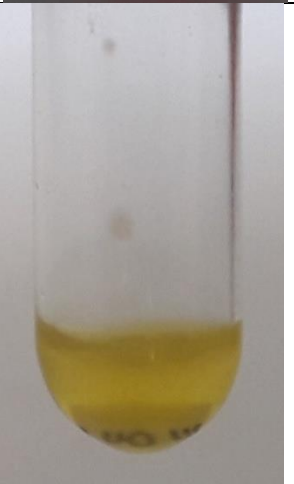


A : témoin (-) ; **B :** après l'ajout de la souche (pas de coloration violette(-))

4.1.5.4. Identification biochimique (tests de confirmation)

A-Galerie classique

Tableau 3.Résultats des tests biochimiques

Tests	Témoin	Photo de résultat	Lecture	Interprétation
TSI			Virage de culot et de pente vers le jaune Noircissement (pente) Bulles+soulèvement de gélose	Glu+ Sach+ Lac+ H ₂ S+ Gaz+
VP Voges- proskauer Croissance 24h Ajout de Vp1+Vp2			Un trouble apparaît après 24h d'incubation Pas de virage vers le violet	Croissance de souche bactérienne VP-

<p>RM Rouge de Méthyle</p>			<p>Apparition d'une coloration rouge</p>	<p>Coloration rouge fermentation du glucose par la voie des acides mixtes (production d'acides forts) : souche RM +</p>
<p>ONPG</p>			<p>Virage de transparent vers le jaune</p>	<p>ONPG+ La souche a l'enzyme de β- galactosidase</p>
<p>ADH</p>			<p>Pas de virage vers le jaune</p>	<p>ADH- La souche est dépourvue de dihydrolase</p>

B- Galerie API E 20



Figure 21. Galerie API E 20 « souche 9 » (Photo originale, 2019).

Le code trouvé à partir de catalogue des bactéries est de 1604373, celui correspond à l'espèce : *Citrobacter freundii*. Le code trouvé pour la souche 7 est de 0704573 celui correspond à l'espèce : *Citrobacter brakii* (Voir annexe 1).

4.2. Résultats des analyses de la flore fongique

4.2.1. Caractéristiques macroscopiques

A).Genre *Aspergillus sp*

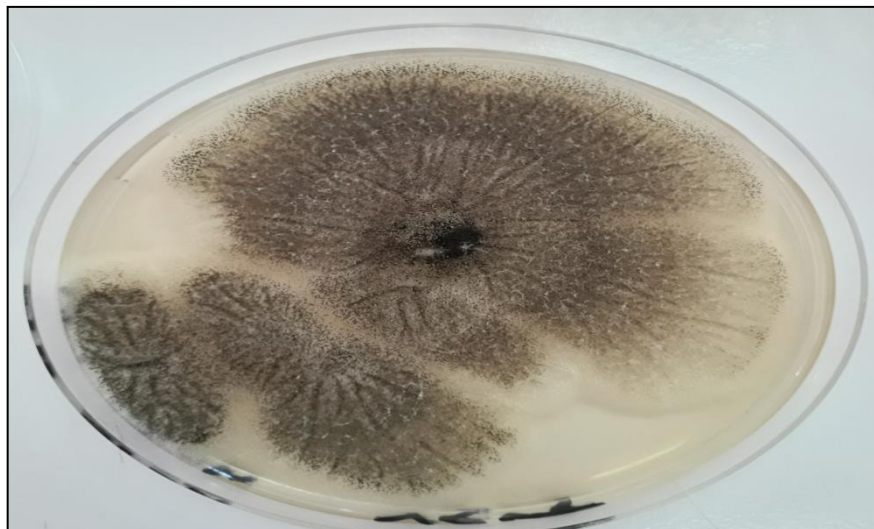


Figure 22.Le Genre *Aspergillus sp* (Photo originale, 2019).

Après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique : Recto : colonie d'abord blanche, puis jaune et en fin granuleuse noire. La croissance est rapide (2-3 jours). Notre résultat est similaire au résultat de (Chabasse et al., 2002) ou elle a isolé des souches d'*Aspergillus* sur gélose Sabouraud avec les mêmes caractères qu'on a trouvé. En 2007 Tabuc a décrit les caractères culturels de genre d'*Aspergillus* comme suite

après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces.

B). Genre *Alternaria sp*



Figure 23. Le genre *Alternaria sp* (Photo originale, 2019).

Les colonies sont de croissance rapide sur le milieu Sabouraud à 30°C, elle apparait blanc-gris au départ mais elle devient vert foncé à noirs rapidement avec une texture duveteuse à laineuse. Les résultats obtenus par Chabasse en (2002) sont similaire au résultat de notre étude. Il a présenté les caractères macroscopiques d'*Alternaria sp* qu'il est caractérisé par une croissance rapide et donnant des colonies blanc-gris et vert foncé à noir avec un recto comme le verso.

C). Genre *Penicillium sp*

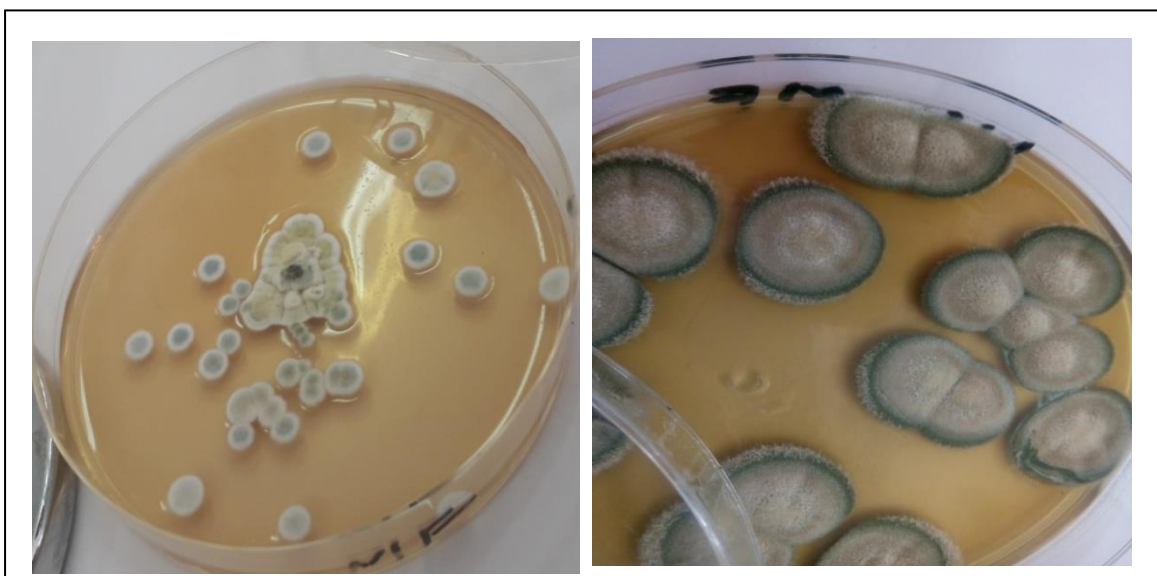


Figure 24. Le genre *Penicillium sp* (Photo originale, 2019).

Les colonies de *Penicillium* sont duveteuses, poudreuse, de colore variable le plus souvent vert et parfois gris. Chabasse en (2002) dite que *Penicillium sp* se développent rapidement sur gélose Sabouraud donnant des colonies duveteuses de colore variable généralement vert et parfois gris avec un revers incolore ou foncé. Tabuc en (2007) a présenté le genre *Penicillium* comme suit : Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs. Après 3-4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi, pour certaines espèces, jaune, orange, chamois. Nos résultats sont proches à ceux de Tabuc.

D). *Saccharomyces sp*

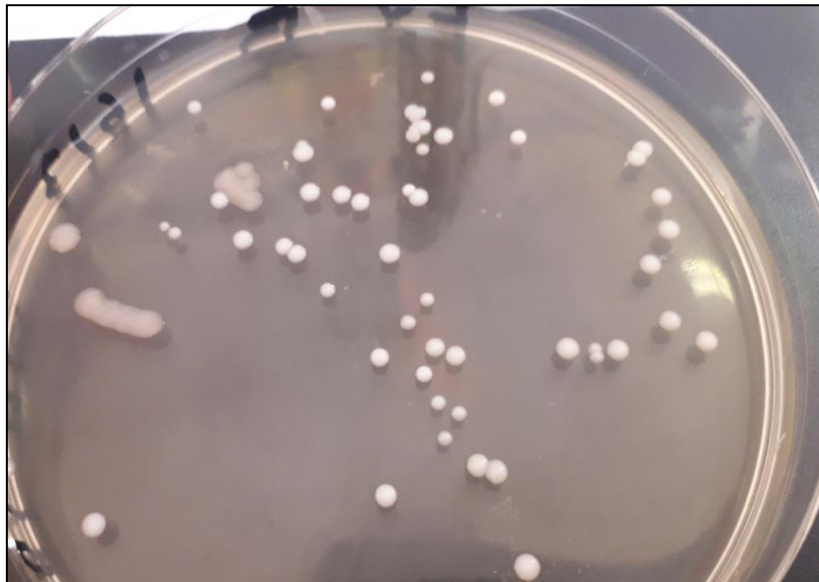
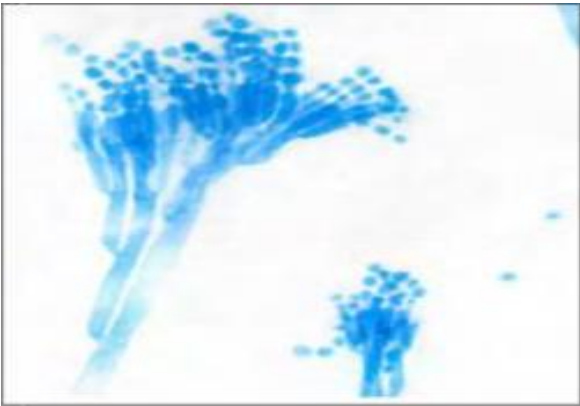
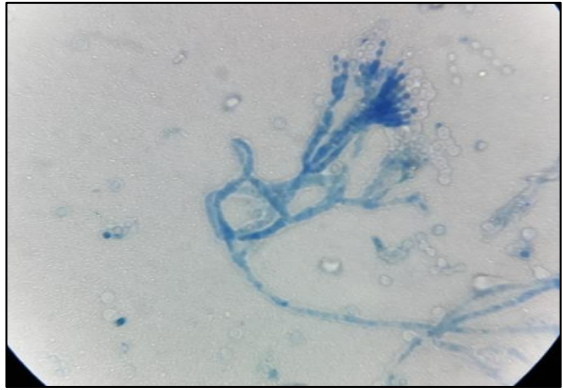



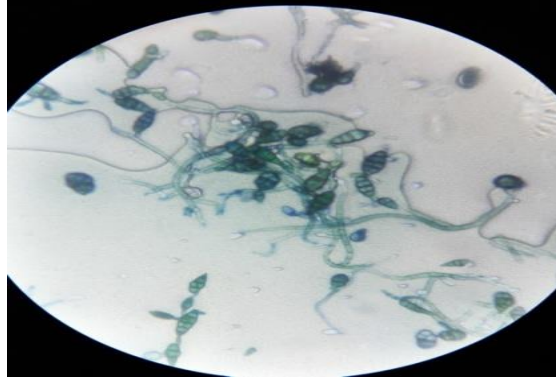
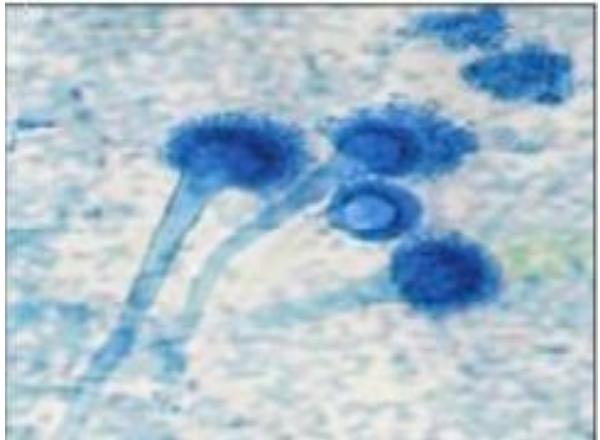
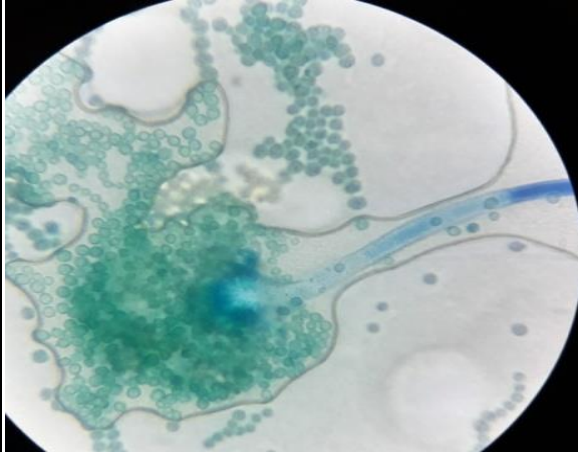
Figure 25. Levure *Saccharomyces* sur la gélose Sabouraud (Photo originale, 2019).

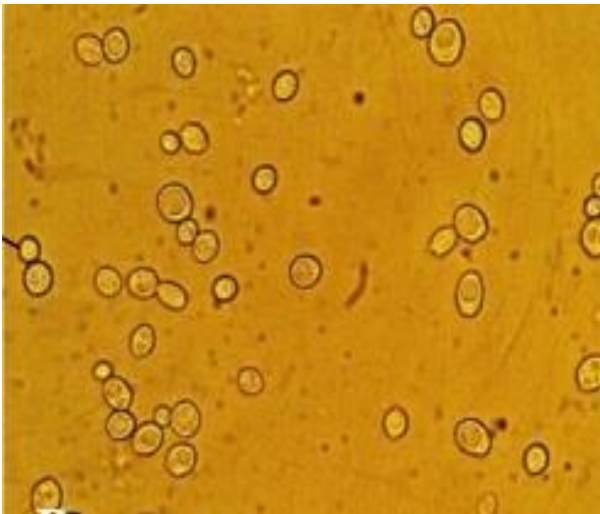
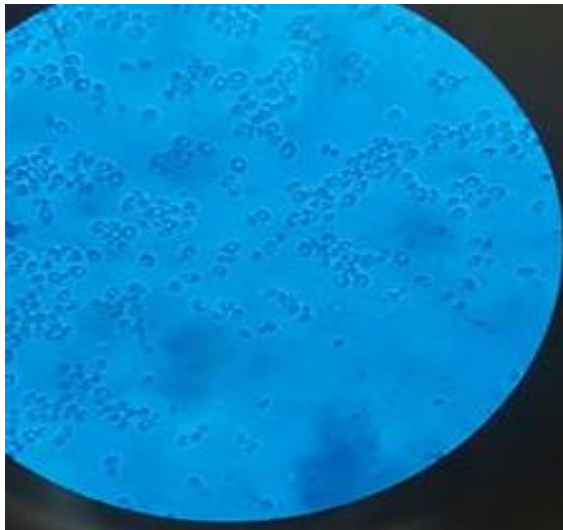
L'observation macroscopique a permis de mettre en évidence l'aspect des colonies, la taille, la forme, le relief et la couleur. Les colonies apparues sont ; de forme circulaire, de taille moyenne et de couleur blanche.

4.2.2. Caractéristiques microscopiques

Tableau 4. Résultats de dénombrement et interprétation de présence de germes.

Genres	Aspects microscopiques	Photos de référence	Résultats obtenus
<i>Penicillium sp</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiospore isolée, simple ou ramifié terminé par un pénicille. - les phialides des pénicilles branchés directe à l'extrémité des conidiospores. - les conidies se dépose en longes chaînes globuleuse, cylindrique ou fusiforme, lisse ou rugueuses. (Kawo & Abdulmumin, 2009). 		

<p><i>Alternaria sp</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> -Conidiophore a croissance sympodiale. - conidie noirs en chaines acropétales cloisonné longitudinalement et transversalement. 		
<p><i>Aspergillus sp</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> -Tête unisériée en colonne. - Conidiophore lisse court, évasement progressif au sommet en vésicule hémisphérique. - Conidie rondes, vertes, échaulées ou lisses. 		

<p><i>Saccharomyces</i> <i>sp</i></p>	<p>-Le résultat obtenu montre que les cellules sont, plus ou moins sphériques, pourvues d'un noyau, se reproduisant par bourgeonnement.</p> <p>-Les résultats obtenus confirment que la souche observée répond à la morphologie de <i>S.cerevisiae</i>.</p>	 A light micrograph showing several spherical yeast cells. Each cell has a distinct nucleus and a smaller, darker spot indicating a bud. The cells are scattered across a light brown background.	 A fluorescence micrograph of the same yeast cells. The cells appear as numerous small, bright blue spots against a dark background, indicating the presence of a fluorescent marker.
---	---	---	--

4.3. Présentation et discussion de résultats de dénombrement

Tableau 5. Résultats de dénombrement et interprétation de présence de germes.

Germes recherchés	FTAM (germes/g) [9.10 ⁵ -3.10 ⁶]		CT (germes/g) [3.10 ² -10 ³]		CF (germes/g) [30-100]		S. aureus(germes/g) [3.10 ² -10 ³]		ASR (germes/g) [30-100]		Salmonella (Germes/25g)		Lev & mois [1000]		Conformité
	Ech.	N	Intr	N	Intr	N	Intr	N	Intr	N	Intr	N	Intr	N	
1	3,8.10 ⁴	S	00	S	00	S	00	S	00	S	00	S	4,25.10 ²	S	C
2	2,5.10 ⁴	S	00	S	00	S	91	S	00	S	00	S	00	S	C
3	2,5.10 ⁴	S	31	S	00	S	9,8.10 ⁴	IN	00	S	00	S	00	S	NC
4	2.10 ⁴	S	00	S	00	S	00	S	00	S	00	S	00	S	C
5	2,7.10 ⁶	A	00	S	00	S	36,6.10 ³	IN	00	S	00	S	1,33.10 ²	S	NC
6	6,8.10 ³	S	00	S	00	S	00	S	00	S	00	S	00	S	C
7	7.10 ³	S	00	S	00	S	00	S	00	S	00	S	00	S	C
8	2,1.10 ⁶	A	00	S	00	S	00	S	00	S	00	S	75	S	C
9	10 ⁴	S	9,6.10 ³	IN	14	S	00	S	00	S	00	S	38,96.10 ³	IN	NC
10	4,6.10 ³	S	00	S	00	S	00	S	00	S	00	S	00	S	C

N : charge microbienne, **intr** : interprétation, **Lev** : levures, **Moisi** : moisissures.

S : satisfaisant, **A** : acceptable, **IN** : insatisfaisant, **C** : conforme, **NC** : non conforme.

4.3.1. Variation globale de niveau de contamination

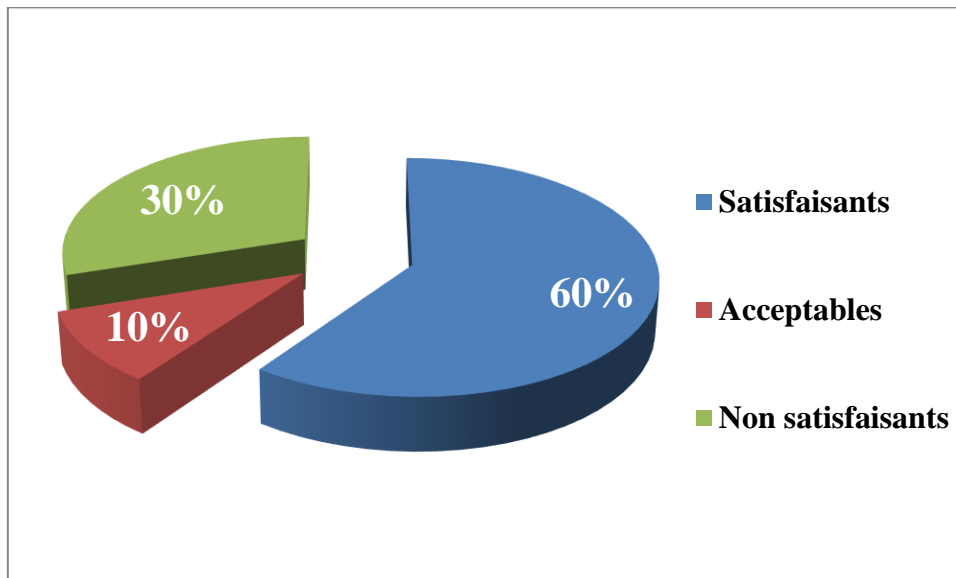


Figure 26. Distribution de la qualité microbiologique des pâtisseries.

Ces résultats montrent un pourcentage élevé des pâtisseries satisfaisants par rapport aux celles acceptables et non satisfaisants.

4.3.2. Variation de niveau de contamination en fonction de germes

4.3.2.1. Flore Mésophile Aérobie Total à 30°C

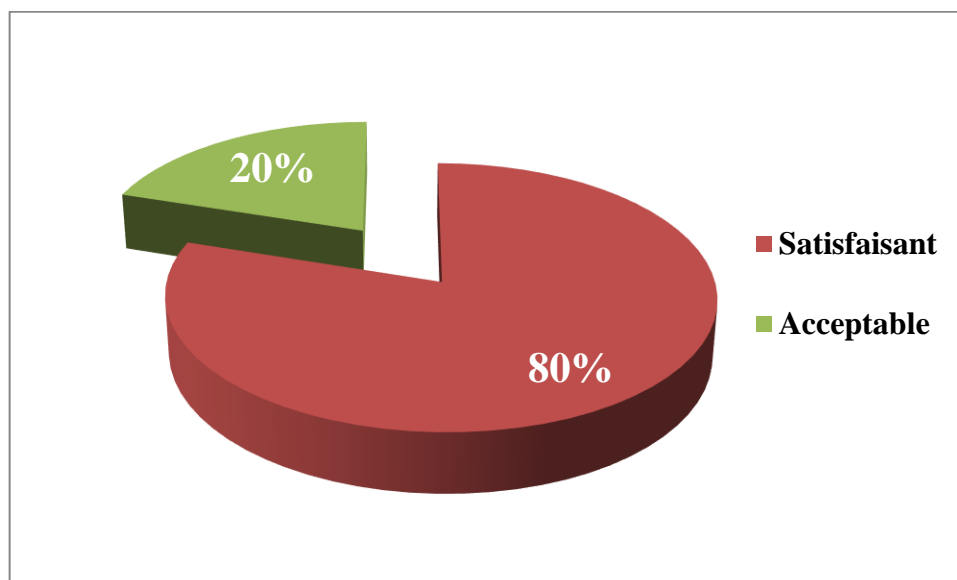


Figure 27. Répartition des niveaux de contamination des pâtisseries par FTAM.

La figure 28 montre un taux de satisfaction de 80% vis à- vis des mésophiles aérobies pour l'ensemble des échantillons. Ce résultat est très différent de celui obtenu par El-kadi et *al*

en 2012, qui lors d'une étude sur des pâtisseries au chocolat et à la crème, tous les échantillons étaient non satisfaisants concernant ce germe.

La flore aérobie mésophile total, dans un produit alimentaire reflète la qualité microbiologique générale du produit. Ce germe peut donner une indication sur l'état de décomposition du produit et constitue de ce fait un indice de la qualité sanitaire (Anihouvi *et al.*, 2006). La présence constante de ce germe est liée sans doute à l'environnement, dont la chaleur et l'exposition à l'air libre sont deux facteurs favorables pour la multiplication de ce germe sur des pâtisseries. L'absence des échantillons non satisfaisants indique le respect des conditions de conservation au froid.

4.3.2.2. Coliformes totaux

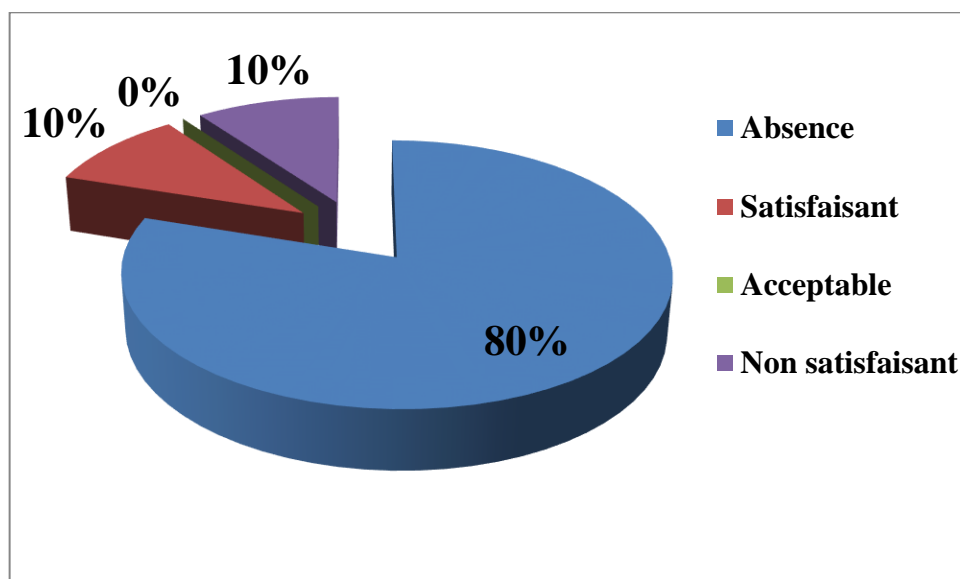


Figure 28. Répartition des niveaux de contamination des pâtisseries par CT.

La figure 29 montre que le taux de non satisfaction de 10%, celui est liée au fait de ne pas respecter les règles d'hygiène personnelles lors de la production et de distribution.

4.3.2.3. Coliformes fécaux

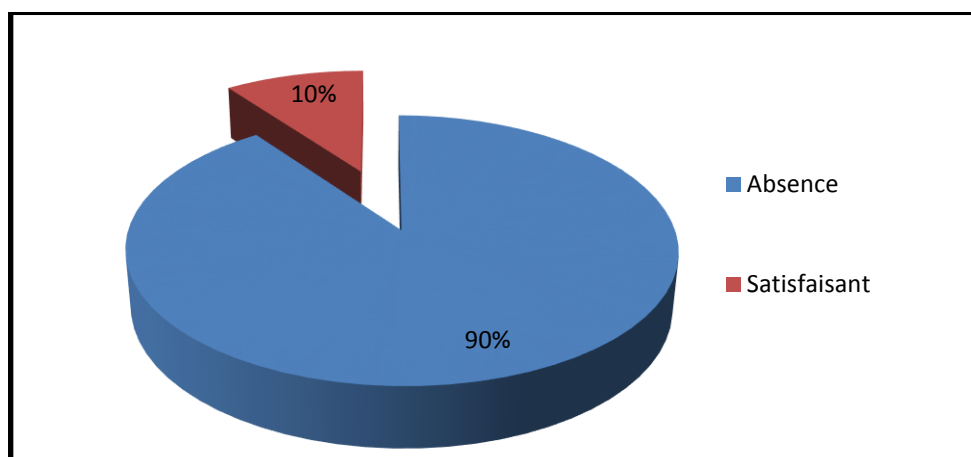


Figure 29. Répartition des niveaux de contamination des pâtisseries par CF.

Tous les échantillons étaient satisfaisants, ce résultat est comparable à celui trouvé par Diallo en 2010, mais différent au résultat de Kindji (2008) qui a trouvé un taux de non satisfaction de 5,48%. Une satisfaction totale vis-à-vis des coliformes fécaux, indique l'absence d'une contamination fécale récente, et donc le respect des bonnes pratiques des règles d'hygiène notamment : Une bonne hygiène corporelle du personnel, une bonne utilisation des sanitaires.

4.3.2.4. *Staphylococcus aureus*

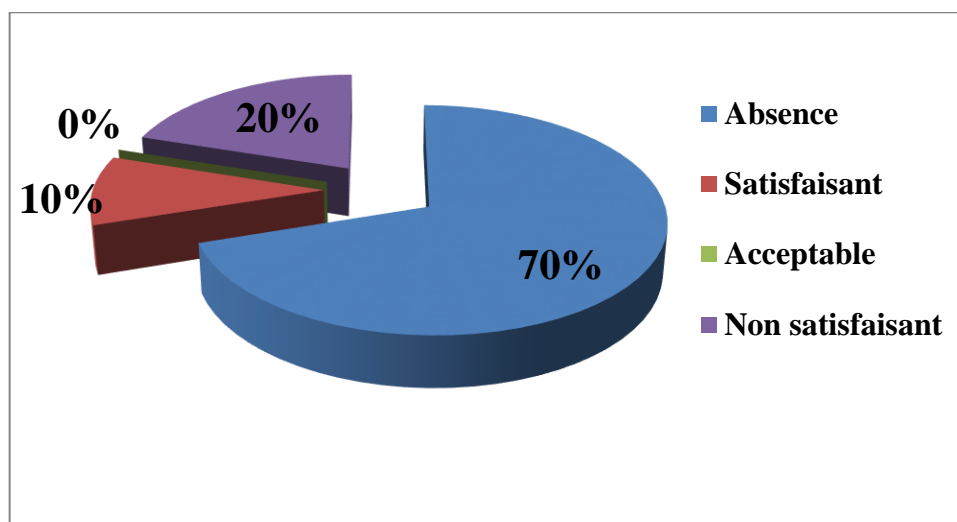


Figure 30. Répartition des niveaux de contamination des pâtisseries par *Staphylococcus aureus*.

D'après la figure 31 le taux de non satisfaction est de 20%, ce résultat est comparable à celui obtenu par Sami *et al* en 2013, mais il est largement supérieur au résultat de Meldrum *et al* qui dans le cadre de leurs analyses en 2005, 0,1% de pâtisseries à la crème sont non

satisfaisants vis-à-vis *Staphylococcus aureus*. Dans notre étude, 10% des échantillons était positif pour le test de coagulase de *S. aureus*, ce résultat est faible par rapport à ceux trouvés par Shadan *et al* en 2004 et par Uzeh *et al* en 2006, où il a été démontré que 60,5% et 20% des pâtisseries crémeuses étaient contaminés respectivement.

Les principales sources de cette contamination peuvent être les boutons purulents des mains ou du visage des travailleurs et mauvaise manipulation des produits de pâtisserie par le personnel des confiseries, la manipulation de produits contaminés originalement.

4.3.2.5. Anaérobies Sulfito-Réductrices

Absence totale de tous les échantillons, ce résultat est similaire à celui trouvé par Kindji en 2008. L'absence des ASR dans tous les échantillons pourraient s'expliquer par l'efficacité du nettoyage-désinfection, une cuisson suffisante des denrées.

4.3.2.6. Salmonella

Aucune salmonelle n'a été trouvée dans l'ensemble des échantillons analysés, celui est en concordance avec les résultats obtenus par Sultan Dalal *et al.* (2010) et Pajohi-Alamoti *et al.*(2016) qui ont signalé des taux de contamination de 0% dans les pâtisseries fourrées à la crème dans les villes d'Ispahan, de Téhéran et de Hamedan (Iran). Cependant ce résultat est inférieur à celui trouvé par Hassanzadazar *et al* (2018), où 6,45% des échantillons de pâtisseries étaient non satisfaisants concernant ce type de germe. Absence totale de *salmonella* dans l'ensemble des échantillons analysés, indique le respect des règles hygiénique lors de la manipulation, et l'absence de ce germe dans les matières premières (lait-œuf-crème...) qui sont la clé de transmission.

4.3.2.7. Flore fongique (levures et moisissures)

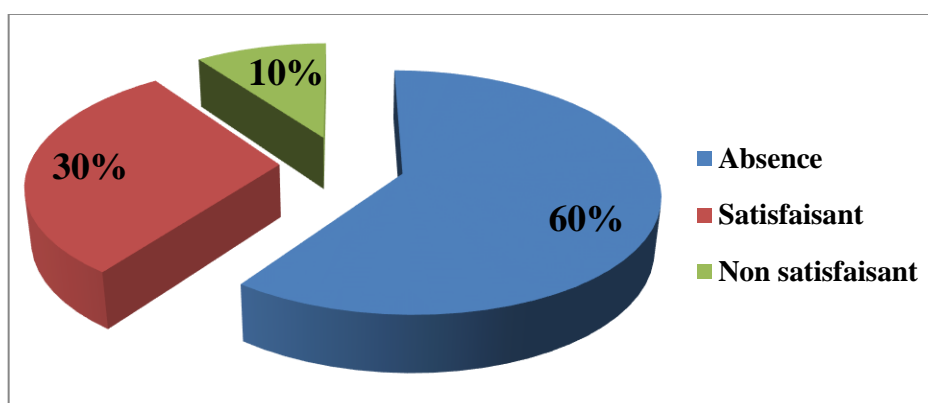


Figure 31. Répartition des niveaux de contamination des pâtisseries par la flore fongique.

La figure 32 indique un taux de non satisfaction de 10%, ce résultat est totalement différent de celui trouvé par Kumar *et al* en 2011, qui lors d'une étude portant sur 40 échantillons de pâtisseries ont trouvé des taux de non satisfaction variant entre 75% et 100% vis-à-vis les levures et moisissures. Dans notre étude, quatre genres ont été trouvés : *Aspergillus*, *Penicillium* sp, *Alternaria* sp, *Saccharomyces* sp. Cependant, seulement deux moisissures *Aspergillus* et *Penicillium* ont été isolées par Albellana *et al* (2001) des échantillons de génoise.

Le non satisfaction a été trouvé dans un seul échantillon, elle est causée par le genre *Penicillium*. La contamination est due par l'air, les surfaces, le matériel, les manipulateurs, ou les ingrédients crus après la cuisson. La contamination de l'environnement et les contenants appliqués pour la transformation, le stockage à long terme et la distribution des produits, la contamination croisée, sont considérés comme les principales causes de contamination des produits de confiserie par les moisissures et les levures (Smith et al, 2004).

4.3.3. Appréciation globale de contamination

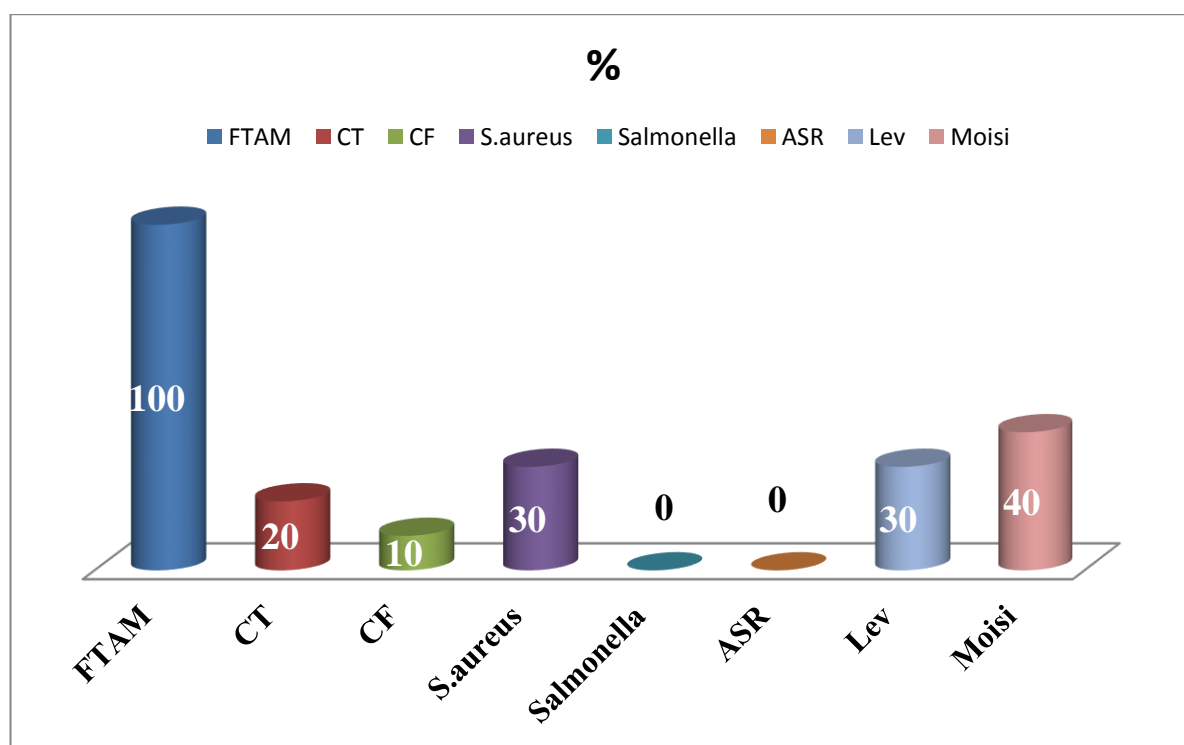


Figure 32. Pourcentages d'incidence des germes dans les échantillons de pâtisserie.

La figure 33 montre que la flore aérobie est présente dans tous les échantillons (100%), le taux de contamination par les coliformes totaux (20%), les coliformes fécaux (10%), la *S. aureus* (30%), *Salmonella* (0%), les anaérobies sulfito-réductrices (0%), les levures (30%) et les moisissures (40%).

Une étude similaire effectuée à Tabriz en Iran par Nikniaz *et al* en 2011, a montré une contamination par différents agents microbiens, dont la concordance avec nos résultats c'était en pourcentage d'incidence de *S. aureus* (31,5%), alors qu'une différence claire a été trouvée dans les pourcentages des autres germes : 70% par la levure, 48,8% par l'*E. coli*, 38,8% par les coliformes et 27,5% par les moisissures. La différence entre nos résultats et les résultats précédents peut exister en raison de la diversité des périodes d'échantillonnage, des conditions météorologiques et de la température, et du processus de fabrication.

4.4. Discussion générale

Les résultats de l'étude ont montré que les pâtisseries fourrées à la crème sont l'une des sources les plus importantes de croissance microbienne et peuvent transmettre des agents pathogènes aux humains. Les types de germes présents sont : la flore aérobie mésophile totale, les coliformes totaux et thermotolérants, *Staphylococcus aureus*, levures et moisissures.

Aucune salmonelle n'a été mise en évidence, mais deux espèces ont été identifiées : *Citrobacter freundii* et *Citrobacter brakii*. Ce sont les habitants intestinaux normaux des animaux et des humaines, elles existent couramment dans les eaux usées, eau et sol (Chen *et al*, 2018), donc sa présence dans les aliments est liée le plus souvent à une contamination fécale.

Lors de nos analyses, nous avons trouvé un taux de non-conformité de 30%, ce résultat est supérieur à ceux trouvés dans les années 2003, 2004, 2005, 2006 par El-marinissi *et al* dont les taux de non satisfaction étaient 17,2%, 21,4%, 9,8%, 17,5% respectivement.

En s'intéressant aux germes responsables de l'insalubrité des échantillons de pâtisseries, on a remarqué que trois échantillons ont été non satisfaisants, dont deux (génoise biscuit simple et génoise au caramel) dus aux *Staphylococcus aureus* et un (milles feuilles) du aux coliformes totaux et de moisissure dont le genre c'était *Penicillium*.

En générale, les sources de contamination de la pâtisserie, en particulier la crème pâtissière, sont les suivantes : la contamination des équipements tels que les couteaux et des outils de coupe ; mauvaise hygiène personnelle des travailleurs et transmission de bactéries par les mains ; L'ajout de crèmes non pasteurisées aux pâtisseries, une conservation insuffisante du froid (Rezaei *et al*, 2019).

Conclusion

Conclusion

Ce travail réalisé sur différents types de produits pâtisseries à la crème (roulet à la vanille, génoise à la vanille, roulet au chocolat, génoise au chocolat, génoise biscuit simple, génoise au caramel, royal, tartelettes, mille-feuilles, éclaires) s'est fixé comme objectif : l'appréciation de leur qualité microbiologique par dénombrement des germes suivants : FTAM, coliformes totaux, coliformes fécaux, *Staphylococcus aureus*, anaérobies sulfite-réducteurs, *Salmonella*, flore fongique.

Les résultats des analyses microbiologiques ont révélé :

Sur les 10 échantillons :

- 3 non satisfaisants soit un pourcentage de 30%.
- 1 acceptable soit un pourcentage de 10%.
- 6 satisfaisants soit un pourcentage de 60%.

L'appréciation globale du niveau de contamination a donné les résultats suivants :

- 100% pour la FTAM à 30°C.
- 20% pour les coliformes totaux.
- 10% pour les coliformes fécaux.
- 30% pour *Staphylococcus aureus*.
- 30% pour les levures.
- 40% pour les moisissures.
- 00% pour *Salmonella*, ASR.

60% de satisfaction, reste le fait que notre étude n'est pas effectuée sur toute la wilaya de Biskra.

Recommandations

Nous suggérons pour s'assurer la qualité des pâtisseries un renforcement des mesures prises pour éduquer et former le personnel en matière d'hygiène et de sécurité alimentaire.

- Une bonne hygiène personnelle.
- Le respect de couple temps/ température.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

1. Abellana M. V., Sanchis A. J., Ramos. 2001. Effect of water activity and Temperature on growth of three *Penicillium* species and *Aspergillus flavus* on a sponge cake analogue. *International Journal of Food Microbiology* 71: 151-157.
2. Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire (AFSCA). 2013. Guide d'autocontrôle pour les boulangeries et pâtisseries. Food safety center, Bruxelles, p.141.
3. Ait abdelouahab N. 2007. *Microbiologie Alimentaire*. 3rd Edition. Office des publications universitaires, Alger, pp. 12-24.
4. Al-Jafaeri S. M., Madi N. S., Nahaisi M. H. 2013. Incidence of pathogenic bacteria in cakes and tarts displayed for sale in Tripoli, Libya. *Int J Nutr Food Eng* 7(3):210-214.
5. Anihouvi V. B., Ayernor G. S., Hounhouigan J. d. Sakyi-dawson E. 2006. *Quality*.
6. Asadi S., Maram Z. R., Kooshk. F. 2015. Evaluation of microbial contamination of pastry cream in Arak city of Iran. *Journal of Food Safety and Hygiene* 1(1) :26-29.
7. *African Journal of food agriculture, nutrition and development* 6: Salifou C. F. A., Boko K.
8. Bellec J. F., Chaing V., Drzewiecki E., Dugast A., Marcelino. V. 2009. La qualité dans la filière de la pâtisserie, [Web log post]. Retrieved January 10, 2014.
9. Bleu. 2011. *pâtisserie and baking foundations, the chef of le cordon bleu*. 1st edition. Delmar Cenage Learning, USA, p. 34.
10. Boudreau A. & Ménard G. 1992. *Le blé : éléments fondamentaux et transformation*. Presses Université Laval, Québec. 443p.
11. Carip C., Salavert M. H., Tandau A. 2015. *Microbiologie, hygiène et droit alimentaire*. 2^{ème} édition. Lavoisier TEC & DOC, Paris. 475p.
12. C., Ahounou G. S., Tougan P. U., Kassa S. K., Houaga I., Youssao A. K. I. 2013. Diversité de la microflore initiale de la viande et sécurité sanitaire des consommateurs. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 7(3) :1351-1369.
13. Chabasse D., Bouchara J. P., Degentile L., Brun S., Cimon B., Penn P. 2002. Les moisissures d'intérêt médicale. *Cahier de formation biologie médicale* 25: 46-123.

14. Characteristics of lanolin: a traditionally processed fermented fish product? Chen H., Wang Y., Zhang J. 2018. Isolation and identification of *Citrobacter* spp. from the intestine of *Procambarus clarkii*. *J Fish Res* 2 (1) : 1-6.
15. Degnon R. G., Agossou, V. E., Adjou, E. S., Dahouenon-Ahoussi E., Soumanou M. M., Sohounhloue D. C. 2013. Évaluation de la qualité microbiologique du chinchard (*Trachurus*) au cours du processus de fumage traditionnel. *Journal of Applied Biosciences* 67 : 5210-5218.
16. Delarras C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou le contrôle sanitaire. Rue lavoisier : Tec & Doc. 475p.
17. Denis F., Poly M. C., Martin C., Bingen E., Quentin R. 2011. Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. 2nd Edition. Elsevier Masson, Paris. 615p.
18. El Marnissi B., Bennani L., El oulali lalami A., Aabouch M., Belkhou R. 2012. Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des denrées alimentaires commercialisées à Fès-Boulemane. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* 6(1) : 98-117.
19. El-Gerssifi M. 1998. Les Défauts des Produits de Pâtisserie et Biscuiterie au Cours du Stockage. La Prévention par la Formulation. *Industries alimentaires et agricoles* 78 : 82-88.
20. Esbelin J. 2009. La protéine Fnr et le système à deux composants ResDE, des régulateurs majeurs de la synthèse des entérotoxines de *Bacillus cereus*. Thèse de doctorat d'état, Université Montpellier II sciences des procédés-sciences des aliments, France, 198p.
21. Ghafir Y. & Daube G. 2007. Le point sur les méthodes de surveillance de la contamination microbienne des denrées alimentaires d'origine animale. In *Annales de Médecine Vétérinaire* 151 :79-100.
22. Guiraud J.P. 2012. Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD, Paris, pp.79-98.
23. Hammoudi A., Bousmaha F., Aggad H., Saegerman C. 2013. Évaluation de la contamination bactérienne superficielle des carcasses bovines dans un abattoir algérien. *Journal of Animal & Plant Sciences* 19(2): 2901-2907.

24. Hassanzadazar H., Taami B., Abbasi Z., Aminzare M. 2018. Microbial Contamination of Cream filled Pastries supplied in Confectioneries of Zanjan, Iran. *Journal of Nutrition, Fasting and Health* 6: 30-34.
25. Institut de Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI). 2014. Microbiological of pastry and confectionary products-Spécifications and test method. No. 2395.
26. Institut pasteur. 1999. Guide pratique d'analyse microbiologique des denrées alimentaires.
27. Jay J. M., Loessner M. J., Golden D. A. 2008. *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media, USA, p.54.
28. JORA. 1998. Arrêté interministériel N°35 du 27 mai 1998 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires : techniques de prise d'essai et interprétation des résultats d'analyses microbiologiques, p. 24.
29. JORA. 2014. Arrêté ministériel N°68 du 21 Mai 2014 : rendant obligatoire la méthode de dénombrement de staphylocoques à coagulase positif (*Staphylococcus aureus* et autres espèces), p.17.
30. JORA. 2016. Arrêté ministériel N° 63 du 25 Aout 2016 : rendant obligatoire la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique des produits autres que les produits laitiers, les produits carnés et les produits de la pêche, p.21.
31. Karki T. B., Timilsina P. M., Yadav A., Pandey G. R., Joshi Y., Bhujel S., Neupane K. 2017. Selection and Characterization of Potential Baker's Yeast from Indigenous Resources of Nepal. *Biotechnology research international*.
32. Khezri M., Safamanesh S., Gorgani M. 2007. Microbial qualification of wet and dry confections, *Food and drug administration*.
33. Kiger J. L. & Kiger J. G. 1968. *Techniques modernes de la biscuiterie, pâtisserie-boulangerie industrielles et artisanales et des produits de régime : par JL Kiger, JG Kiger, Dunod*.
34. Kindji S. L. 2008. Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des pâtisseries et repas froids servis par Dakar Catering en 2006 et 2007. Mémoire de DEA de production animale, Université Cheikh Anta de Dakar.

35. Korsak N., Clinquart A., Daube G. 2004. Salmonella spp. Dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique. Ann. Méd. Vét 148 :174-193.
36. Kumar H., Palaha R., Sharma D., Sharma V., Singh D., Kaur A. 2011. Microbiological quality analysis of the pastry sold in the Jalandhar city and public perception about the pastry. Internet Journal of Food Safety 13(5): 361-366.
37. Le Loir Y., Baron F., Gautier M. 2003. Staphylococcus aureus and food poisoning. Genet Mol Res 2(1) : 63-76.
38. Madigan T. M. & Martinko J. M. 2007. Biologie des microorganismes. 11th Edition, Université carbondale de l'illinois du sud. Pearson, Paris. 1047p.
39. Meldrum R. J., Ribeiro C. D., Smith R. M. M., Walker A. M., Simmons M., Worthington D., Edwards C. 2005. Microbiological quality of ready-to-eat foods: results from a long-term surveillance program (1995 through 2003). Journal of food protection 68(8) : 1654-1658.
40. Millet J. & Cabut J. 1997. Guide de Bonnes Pratiques d'Hygiène en Pâtisserie - Réalisé par la Confédération Nationale de la Boulangerie et Boulangerie-Pâtisserie Française et par la Confédération Nationale de la Pâtisserie-Confiserie-Chocolaterie-Glacierie de France, p. 7.
41. Nguyen M. T. 2007. Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du vietnam : Etude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines, l'institut national polytechnique de Toulouse, France, 147p.
42. Nikniaz Z., Mahdavi R., Jalilzadeh H., Vahed Jabbari M. 2011. Evaluation of microbial contamination in cream filled pastries distributed in Tabriz confectioneries. J Food Technol Nutr 8 : 66-72.
43. Norme française NM 08.0.115, ISO 4832. 2003. Dénombrement des coliformes totaux par comptage des colonies à 30°C.
44. Norme française NM 08.0.116. 2004. Recherche de Salmonella.
45. Norme française NM 08.0.121, ISO 4833. 2004. Dénombrement des microorganismes par comptage des colonies à 30°C.
46. Norme française NM 08.0.124. 2004. Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage de colonies obtenues à 44°C.

47. Oudot C. 1999. La transformation des aliments. Casteilla, Paris. 79p.
48. Pajohi-Alamotia M., Rezaei A., Mahmoudi R. 2016. Microbial contamination of pastry cream: evidence from Hamedan, Iran. Archives of hygiene sciences 5(3): 207-213.
49. Raton, London, NewYork, Washington. 625p.
50. Ray B. 2004. Fundamentals of Food microbiology.3rd Edition, CRCPress, Boca republic of Benin. African Journal of food agriculture, nutrition and development 6: republic of Benin.
51. Rezaei N., Rezaei A., Shahmoradi S., Bashtin A. 2019. Evaluation of Antibiotic resistance in *Esherichia coli* Starains isolated frpm pastry cream in Hamdan, Iran, Int J Health Life Sci 5(1): 87-103.
52. Sami M., Nasri A., Bagheri M., Sharifi H. 2013. Microbiological and chemical qualities of cream-filled pastries sold in Kerman city confectioneries, southeast of Iran. Eurasian J Vet Sci 29(3):138-42.
53. Shadan M., Khoshabi F., Shahraki M., Safari F. 2004. The evaluation of microbial quality of Cream Filled Pastries in Zahedan confectioneries [in persian]. J Ahvaz Public Health School 1: 84-87.
54. Sharifzadeh A., Hajsharifi-Shahreza M., Ghasemi-Dehkordi P. 2016. Evaluation of microbial contamination and chemical qualities of cream-filled pastries in confectioneries of Chaharmahal Va Bakhtiari Province (Southwestern Iran). Osong public health and research perspectives 7(6): 346-350.
55. Smith J. P., Daifas D. P., El-khoury W., Koukoutsis J., El-khoury A. 2004. Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products—A Review, Critical Reviews in Food Science and Nutrition 44(1): 19-55.
56. Soltan Dalal M., Fazelifard P., Tabatabai Befroee A., Rashidi S., Zarrin M. 2010. Determination of microbial contamination of fresh pastries supplies units in southern Tehran. Scientific journal of microbial biotechnology 2: 7-11.
57. Sperber W. H. & Doyle M. P. 2009. Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages, food microbiology and food safety. Springer Science & Bisness Media, New York. 380p.
58. Tabuc C. 2007. Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat d'état, l'institut national polytechnique de Toulouse et de l'université de Bucarest, France, 109p.

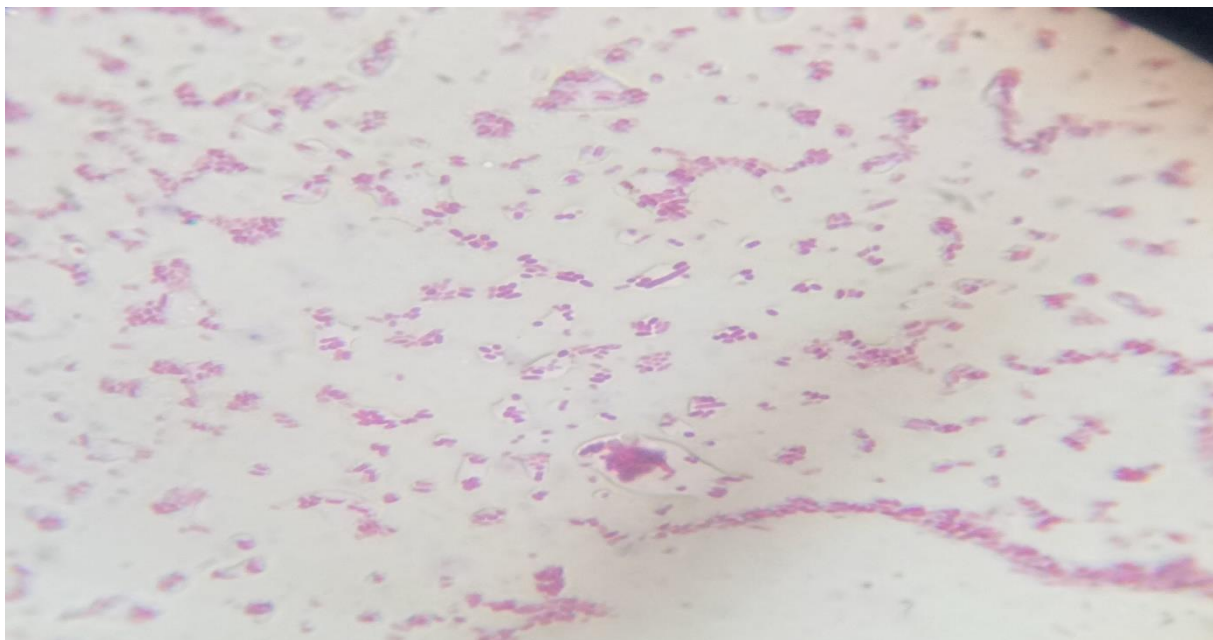
59. Tewari G. & Juneja V. 2008. *Advances in thermal and non-thermal food preservation*. Blackwell, Australia, Victoria. 281p.
60. Uzeh R. E., Uhenhen R. E., Rojuginbokan A. K. 2006. Microbiological and nutritional qualities of dairy products: Nono and Wara. *Nat Sci* 4: 37-43.
61. Wilderjans E., Luyts A., Brijs K., Delcour, J. A. 2013. Ingredient functionality in batter type cake making. *Trends in food science & technology* 30(1): 6-15.

Annexes

Annexe 1



Galerie API de coliformes fécaux



La coloration de gram des souches du coliforme fécal



Galerie API de souche 9

Annexe 2

Les plans appliqués dans l'Interprétation des résultats d'analyses microbiologiques :

1. Interprétation selon un plan à trois classes :**2.1 — Plan à trois classes :**

Ce plan est ainsi désigné parce que les résultats des examens interprétés sur cette base, permettent de fixer trois classes de contamination, à savoir :

- * celle inférieure ou égale au critère "m";
- * celle comprise entre le critère "m" et le seuil "M";
- * celle supérieure au seuil "M".

Les critères qualificatifs "m" et "M" expriment le nombre de germes présents dans un gramme (g) ou un millilitre (ml) d'aliment et dans 25 grammes d'aliment pour les salmonella.

m : le seuil au-dessous duquel le produit est considéré comme étant de qualité satisfaisante. Tous les résultats égaux ou inférieurs à ce critère sont considérés comme satisfaisants;

M : seuil limite d'acceptabilité, au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants, sans pour autant que le produit soit considéré comme toxique;

n : nombre d'unités composant l'échantillon;

c : nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs situées entre "m" et "M";

2.2. — Plan à deux classes :

Ce plan est ainsi désigné car les résultats des examens interprétés sur cette base permettent de déterminer deux classes de contamination.

Ce type de plan qui n'accepte aucune tolérance, même de caractère analytique, correspondant souvent aux expressions :

- "absence dans" : le résultat est considéré comme satisfaisant;
- "présence dans" : le résultat est considéré comme non satisfaisant; dans ce cas, le produit est déclaré impropre à la consommation.

Le plan à deux classes répartit les unités d'échantillon en deux catégories :

- catégorie satisfaisante si le résultat d'analyse est inférieur à "m"; le produit est propre à la consommation;
- catégorie non satisfaisante lorsque le résultat d'analyse est supérieur à "m"; le produit est déclaré impropre à la consommation.

Remarque :

Ce plan est applicable aux contaminations par les salmonella en particulier.

Annexe 3

- Cas d'un échantillonnage avec n=1 :

- résultat satisfaisant lorsque la valeur observée est inférieure ou égale à m,
- qualité insatisfaisante lorsque la valeur observée est supérieure à m.

Les commentaires types suivants sont recommandés en cas de résultat insatisfaisant :

- dans le cas d'un critère microbiologique dit de sécurité du Règlement (CE) n° 2073/2005 (en rouge dans les tableaux ci-dessous) : « *Qualité insatisfaisante selon critère sécurité du Règlement (CE) N° 2073/2005* »
- dans le cas d'un critère microbiologique indicateur d'hygiène du procédé du Règlement (CE) n°2073/2005 (en bleu dans les tableaux ci-dessous) : « *Qualité insatisfaisante selon critère procédé du Règlement (CE) n° 2073/2005* »,
- dans le cas d'un critère microbiologique indicateur d'hygiène du procédé déterminé par les membres de la FCD (en noir dans les tableaux ci-dessous) : « *Qualité insatisfaisante selon critère procédé de la profession* ».
- En cas de dépassement d'un critère mentionné dans le Guide d'aide à la gestion des alertes d'origine alimentaire, la mention suivante est ajoutée « *dépassement du seuil du Guide d'aide à la gestion des alertes* ».
- En cas de dépassement du critère flore aérobie mais d'un ratio flore aérobie/flore lactique inférieur ou égal à la valeur indiquée (10, 100, 1000), le commentaire suivant est recommandé : « *Résultat satisfaisant, compte tenu de la flore lactique* ». Attention pour l'Histamine, les critères présentés dans le présent document sont valables dans le cas d'un échantillonnage n=1. Dans ce cas la valeur m égale M. En cas d'échantillonnage n=9 se référer à l'interprétation du Règlement (CE) n° 2073/2005.

Denrée	Germe	Critère REG EU 2073	Critère MP/MDD LS Réception Distribution (R)	Critère MP/MDD LS à DLC/DLUO Distribution (D)	Actions correctives	Commentaires
2. Pâtisseries cuites	Flore aérobie 30°C		100 000	100 000	1	
	Bacillus cereus		100	100	2	
Tartes aux pommes	Levures Moisissures		1 000	10 000	2	
Gâteaux chocolat	Escherichia coli		10	10	2	
	Staphylocoques coag +		100	100	1	
Flan	Salmonella*		Absence/25g	absence/25g	5	* Critère à privilégier pour les produits contenant des ingrédients à risque
Crêpes fraîches	Listeria monocytogenes	Absence/25g*	Absence/25g*	100**	3	* Ou dérogations prévues par le règlement (CE) n°2073/2005 ** Critère valable pour les produits de moins de 5j de durée de conservation résiduelle sinon absence dans 25g ou dérogations prévues par le règlement (CE) n°2073/2005

Méthode d'ensemencement de la galerie API E 20

Préparation de la galerie :

Mettre de l'eau distillée sur le fond de la boîte (partie alvéolée), toutes les alvéoles doivent être remplies, éliminer l'excès d'eau en renversant la boîte au-dessus de l'évier.

- Placer la galerie sur le fond de la boîte **elle doit être manipulée avec la pince.**
- Recouvrir la boîte avec son couvercle.
- Inscrire nom, référence souche, date et température d'incubation sur la languette latérale de la boîte.

Préparation de l'inoculum :

- Réalisez une suspension de la souche à étudier. La suspension doit avoir une densité suffisante (0.08 à 0.13 mcferlond).

Inoculation de la galerie

Remplir les cupules de suspension en évitant les bulles d'air. Les Cupules encadrées ex : [CIT] ; [VP] Remplir la cupule en entier. Cupules soulignées ex : H₂S Remplir la partie inférieure puis compléter avec de l'huile de paraffine.

ملخص

تعتبر المعجنات منتجات غذائية ذات قيمة عالية و مع ذلك فهي سبب شائع للتسمم الغذائي أجريت هذه الدراسة على 10 عينات لأنواع مختلفة من المعجنات (كعكة الإسفنج، الروليت، الفاتح، فطائر الملكي، ميل فوي) تم جمعها بشكل عشوائي في وسط ولاية بسكرة وذلك بهدف تقييم الجودة الميكروبيولوجية عن طريق حساب جراثيم التلوث المختلفة كشفت التحليلات أن 60 % من المعجنات كانت مرضية، و10% كانت مقبولة لمجموع القولونيات و30% كانت غير مرضية بسبب المكورات العنقودية الذهبية، القولونيات الكلية، الفطريات. جميع العينات كانت موجبة بالنسبة لمجموع القولونيات 100%، يليها الفطريات 40%، المكورات العنقودية والخمائر 30%، القولونيات الكلية 20%، القولونيات البرازية 10%، مع غياب كلي للسالمونيلا و الكلوستريديوم. في هذه الدراسة تم عزل أربعة أنواع من الفطريات: *sp, Alternaria sp Aspergillus sp, Penicillium*، حيث كان *Penicillium sp* هو الغالب منها. الكلمات المفتاحية: المعجنات، التحليلات الميكروبيولوجية، الجودة، النظافة.

Résumé

Les pâtisseries sont considérées comme des produits alimentaires à haute valeur nutritionnelle. Cependant, ils sont une cause fréquente d'intoxications alimentaires. Cette étude a été réalisée sur 10 échantillons pour différents types de pâtisseries (génoise, roulet, éclaires, tartelette, royal, mille-feuilles) ont été prélevés au hasard dans le centre de la wilaya de Biskra dont l'objectif c'est d'évaluer la qualité microbiologique par dénombrement de différents germes de contamination. Les analyses ont révélé que 60% de pâtisserie étaient satisfaisants, 10% étaient acceptables pour FTAM, 30% étaient non satisfaisants du au *Staphylococcus aureus*, coliformes totaux, flore fongique. Tous les échantillons étaient positifs pour FTAM (100%), suivi par les moisissures (40%), *Staphylococcus aureus* et levures (30%), coliformes totaux (20%), coliformes fécaux (10%), Absence total de *salmonella* et ASR. Dans cette étude 4 genres de flore fongiques ont été isolés : *Aspergillus sp, Penicillium sp, Alternaria sp, Saccharomyces sp* dont *Penicillium sp* était prédominant.

Mots clés : Pâtisseries, analyses microbiologique, qualité, hygiène.

Abstract

Pastries are considered high nutritional value food products. However, they are a common cause of food poisoning. This study was conducted on 10 samples for different types of pastries (Sponge cake, roulette, light, tart, royal, mille-feuilles) were randomly collected in the center of the wilaya of Biskra whose objective is to evaluate the microbiological quality by counting different germs contamination. The analyzes revealed that 60% of pastries were satisfactory, 10% were acceptable for FTAM, 30% were unsatisfactory due to *Staphylococcus aureus*, total coliforms, fungal flura. All samples were positive for FTAM (100%), followed by molds (40%), *Staphylococcus aureus* and yeasts (30%), total coliforms (20%), faecal coliforms (10%), total absence of *Salmonella* and ASR. In this study 4 fungal flora genera were isolated *Aspergillus sp, Penicillium sp, Alternaria sp, Saccharomyces sp*, of which *Penicillium sp* was predominant.

Key words: Pastries, microbiological analyzes, quality, hygiene.