



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 :

Djihen ZEKAR / HIBET ALLAH HENNA

Le :samedi 10 octobre 2020

Evaluation de la qualité microbiologique des Mini donuts commercialisés au centre de la wilaya de Biskra

Jury :

M.	Fateh GUEMMAZ	MAA	Université de Biskra	Président
Mme.	Kenza MOHAMMEDI	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	Randa GAOUAOUI	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019 - 2020

Remerciements

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

*Nous remercions chaleureusement madame **Mohammedi Kenza** pour son encadrement, sa confiance, ses efforts et sa patience lors de la correction de manuscrit, sa disponibilité, ses conseils et ses critiques constructives. Sa gentillesse, son amabilité lui ont valu le respect et la sympathie de tous les étudiants.*

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

Nos plus vifs remerciements s'adressent au personnel du laboratoire de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie pour leur patience et leur précieuse aides, pendant la réalisation de ce travail.

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

Celle qui n'a jamais cessée de me soutenir, pour son amour, ses sacrifices, qui a toujours été une motivation psychologique incroyable pour moi d'insister pour atteindre le succès.

..... Ma chère mère

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

*Mon très cher oncle **BELKHIR SEGNI***

*Ma chère sœur **RAHMA***

Tu es la lumière qui illumine ma vie, et la source dont j'arrose avec amour et tendresse. L'impulsion lui coule, l'âme est poussée vers elle, dans son éloignement mes blessures abondent, et dans sa proximité elle exclut mes peines.

*Mes charmantes sœurs **IKRAM, ISRAA TASNEEM***

A tous mes tantes, oncles et mes cousines.

*Mes très chers frères **Younis Hachani, Moncef Soufi, Ahmed, Soufiane, Abdou.***

*Mes inspirants amis: **RM, Jin, Suga, J-Hope, Jimin, Taehyung, JK. BTS EXO (obsession) PARK Chan-yeol, Baek-hyun, Suho, Kai, chen, sehun.***

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

*Mes très chères amies **Fathi Cherif, Amira Mechka, Ali Henanou, Houda Mhamdi, Zahra Proff, Nezha Meziani, Chaima Djoudi**que dieu vos protège tous.*

*Ma chère binôme **Djihen***

À tous mes amis de promo 2019-2020.

Toutes les personnes merveilleuses de ma vie.

HIBET ALLAH

Dédicace

Je dédie ce travail

A ma chère mère

A mes chères pères Mohmmmed Saleh et Athmane.

Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard de me soutenir et m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

Qui je souhaite une bonne santé.

A mon cher fiancée, Wahab qui ma aider et supporte dans les moments difficile.

A mes frères, Abdellah Sami et Mehdi.

A mes chères sœurs et son maries, Naima, Nadjet , Wassilla, Sameh ,Rima et Selma

Ceux avec lesquels, j'ai partagé mes secrets, mon bonheur, mes larmes et mes éclats de rire et pour leur conseils précieux tout au long mes études.

A mes neveux : Djoumana, Zaki, Wasssim, Norlina, Serine et Ayoubé.

A tout ma famille

A ma chère binôme Hiba, pour sa entente et sa sympathie.

A mes amies : Houda, Nour, Mounia, Afafe, Nesrin, Nerdjrs .

A tous autre mes amies

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

DJIHEN

Sommaire

Remerciements	
Dédicace	
Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	IV
Introduction	1

Partie I Synthèse bibliographique

Chapitre 1 Généralités sur les Mini donuts

1.1. Définition	3
1.2. Histoire des Mini donuts	3
1.3. Composition des Mini donuts	3
1.4. Types des Mini donuts	4
1.5. Détérioration des Mini donuts	5
1.6. Risques sanitaires	5

Chapitre 2 Microbiologie des Mini donuts

2.1. Origine des micro-organismes indésirables dans les aliments	6
2.2. Facteurs influençant la croissance microbienne	6
2.2.1. Environnement intrinsèque	6
2.2.1.1. pH	6
2.2.1.2. Activité de l'eau (aw)	7
2.2.1.3. Composition de l'aliment	7
2.2.1.4. Potentiel redox	7
2.2.2. Environnement extrinsèque	7
2.2.2.1. Température de conservation	7
2.2.2.2. Humidité relative	7
2.3. Germes indicateurs d'hygiène	8

2.3.1. Flore aérobie mésophile total (FTAM)	8
2.3.2. Coliformes	8
2.3.3. <i>Staphylococcus aureus</i> à coagulase positif	8
2.3.4. <i>Salmonella</i>	8
2.3.5. <i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	8
2.3.6. Levures et moisissures	9
2.4. Les maladies transmises par les Mini donuts	9
2.4.1. Infection	9
2.4.2. Intoxication	9
2.4.3. Toxi-infection alimentaire	9

Partie Expérimental

Chapitre 3 Matériels et méthodes

3. Objectif du travail	10
4. Méthodologie	10
4.1. Echantillonnage et prélèvement	10
4.2. Analyses microbiologiques	10
4.3. Germes recherchés	11
4.4. Protocole d'analyse	11
4.4.1. Préparation de la Solution mère et des dilutions décimales	11
4.4.1.1. Solution mère (NF V08-010).....	11
4.4.1.2. Dilutions décimales	13
4.5. Recherche et dénombrement des germes	14
4.5.1. Recherche et dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (ISO 4833/2003)	14
4.5.2. Recherche d' <i>Escherichia Coli</i>	16
4.5.3. Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> à coagulase positif.....	18
4.5.4. Recherche des spores des <i>Clostridium sulfito-réducteur</i> (ASR)	20

4.5.5. Recherche et dénombrement de <i>salmonella</i>	22
4.6. Identification microbiologique et tests complémentaires	24
4.6.1. Caractères morphologiques	24
4.6.2. Caractères enzymatiques	25
4.6.3. Caractères biochimiques	29
4.5.6. Recherche des levures et moisissures	35
4.7. Méthode d'interprétation	37

Chapitre 4 Résultats et Discussions

5.1. Résultats des analyses bactériologiques	38
5.1.1. Flore Mésophile Aérobie totale	38
5.1.1.1. Caractéristiques Macroscopiques.....	38
5.2.1. <i>Escherichia coli</i>	39
5.1.2.1. Caractéristiques Macroscopiques	39
5.1.2.2. Caractéristiques microscopiques	39
5.1.2.3. Tests biochimiques (confirmation).....	40
5.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	41
5.1.3.1. Caractéristiques Macroscopiques	41
5.1.3.2. Caractéristiques microscopiques	42
5.1.3.3. Tests biochimiques (confirmation)	42
5.1.4. <i>Clostridium sulfito-réductrice</i>	44
5.1.5. <i>Salmonella</i>	45
5.1.5.1. Caractéristiques Macroscopiques	45
5.2. Résultats des analyses de la flore fongique	46
5.2.1. Caractéristiques Macroscopiques	46
5.2.2. Caractéristiques microscopiques	49
5.3. Présentation et discussion de résultats de dénombrement	52
5.3.1. Variation de niveau de contamination en fonction de germes	52

5.3.1.1. Flore Mésophile Aérobie Total à 30°C	52
5.3.1.2. <i>E. coli</i>	54
5.3.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	54
5.3.1.4. <i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	54
5.3.1.5. <i>Salmonella</i>	55
5.3.1.6. Flore fongique (levures et moisissures)	55
5.4. Discussion générale	56
Conclusion	57
Les références bibliographiques	58
Annexes	
Résumé	

Liste des tableaux

Tableau 1. Plages de croissance de microorganismes au pH (Tewari et Juneja, 2008).	6
Tableau 2. Caractères biochimiques de la Galerie Classique (Azaizia et Selaimia, 2013).	29
Tableau 3. Résultats des tests biochimiques des colonies obtenus sur le milieu Mac Conkey.	41
Tableau 4. Résultats de dénombrement et interprétation de présence de germes.	49
Tableau 5. Résultats de dénombrement et interprétation de présence de germes.	52

Liste des figures

Figure 1. Différents types de Mini donuts (Photo originale, 2020).	4
Figure 2. Les étapes de la préparation de la solution mère (Photos originales, 2020).	12
Figure 3. Schéma de préparation de série de dilutions	13
Figure 4. Schéma des étapes de recherche de la flore totale aérobie mésophile (FTAM).	15
Figure 5. Schéma des étapes de recherche d' <i>Escherichia Coli</i>	17
Figure 6. Schéma des étapes de recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> à coagulase positif.	19
Figure 7. Schéma représentant la recherche des <i>Clostridium sulfito réducteur</i>	21
Figure 8. Protocole de recherche de <i>Salmonella</i>	23
Figure 9. Le protocole utilisé pour la coloration de Gram.	25
Figure 10. Confirmation biochimique (Test catalase (teste d'identification)).	26
Figure 11. Confirmation biochimique de <i>Staphylococcus</i> (Test coagulase).	27
Figure 12. Test d'ONPG.	29
Figure 13. La galerie API 20 E.	31
Figure 14. Méthode d'ensemencement de la galerie API E 20 (Photo originale, 2020).	33
Figure 15. Lecture de la galerie et Identification de la fiche des résultats.	34
Figure 16. Schéma des étapes de recherche des champignons (des levures et moisissures).	36
Figure 17. Résultats de recherche de la flore aérobie mésophile totale sur milieu PCA (Photo originale, 2020).	38
Figure 18. Résultat d'ensemencement sur milieu Mac Conckey (Photo originale, 2020).	39
Figure 19. Résultat de l'observation microscopique des colonies obtenues sur milieu Mac Conckey après coloration de Gram (grossissement 10×100) (Photo originale, 2020).	40
Figure 20. Résultat de recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Baird Parker (Photo originale, 2020).	41
Figure 21. Observation microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> avec un grossissement 10×100 (Photo originale, 2020).	42
Figure 22. Résultat du test catalase (photo originale, 2020).	43

Figure 23. Résultat d'incubation des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> en BCC.	43
Figure 24. Résultat du test oxydase (Photo originale, 2020).	44
Figure 25. Résultats de recherche des spores de <i>Clostridium sulfito réducteur</i> (Photo originale, 2020).	44
Figure 26. Résultat de recherche des salmonelles sur la gélose SS (Photo originale, 2020).	45
Figure 27. Genre <i>Aspergillus sp</i> (Photo originale, 2020). ..	46
Figure 28. Genre <i>Aspergillus sp</i> (Photo originale, 2020). ..	47
Figure 29. Levure (<i>Saccharomyces</i>) sur la gélose Sabouraud (Photo originale, 2020).	48
Figure 30. Répartition des niveaux de contamination des Mini donuts par les FTAM.	53

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.

aw: (Activity of water) ; Activité de l'eau.

BP: Baird-Parker.

E.coli: *Escherichia coli*.

EPT : Eau peptonée tamponnée.

Ech: Echantillon.

FAMT : Flore Aérobie Mésophile Totale.

FeS : sulfure de fer.

H₂O₂ : Eau oxygénée.

IND: Indole.

ISO: International organization for standardization.

JORA : Journal officiel de la République algérienne.

NF : Norme Française.

ONPG: Orthonitrophenyl-β-D galactopyranoside.

PCA : Plate Count Agar.

pH: Potentiel d'hydrogène.

RM : rouge de méthyle.

RV : Rappaportvasiladis.

SM : Solution mère.

SS : milieu sélectif pour *Salmonella-Shigella*.

TDA : Tryptophane décarboxylase.

TIAC : Toxi-infection alimentaire collective.

TSI : Triple-Sugar-Iron.

UFC : Unité Formant Colonies.

URE : Urée.

VF : Viande foie.

VP : Voges-Proskauer.

Introduction

Une bonne santé débute par une bonne nutrition elle-même, synonyme d'une alimentation équilibrée. Cette alimentation ne doit pas seulement être une source d'énergie, mais doit couvrir un apport en éléments indispensables au bon fonctionnement de l'organisme (Rozier *et al.*, 1985).

En microbiologie alimentaire, il est plus important de rechercher l'absence ou la présence de germes et d'être à mesure de dire si le produit est conforme ou non aux normes de la consommation humaine (Lightfoot, 2002).

Les aliments prêts-à-manger vendus dans la rue jouent un rôle vital dans la satisfaction des besoins alimentaires de nombreux habitants des pays en développement, ils sont appréciés par les consommateurs pour leur caractère abordable, leur accessibilité, leur variété et leurs propriétés organoleptiques uniques (Shiningeniet *al.*, 2018).

Cependant, les produits pâtisseries 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 (Smith *et al.*, 2004), alors une menace potentielle pour la santé du consommateur (Al-Humam, 2019).

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 liés à l'aliment (Pajohi-Alamoti, 2016).

Si l'hygiène est insuffisamment appliquée ou n'est pas du tout appliquée, il y a un risque pathologique pour les convives. En effet, les microbes et d'autres agents non microbiens présents dans les denrées alimentaires peuvent être à l'origine des maladies telles que : les toxi-infections et intoxications alimentaires et les maladies infectieuses d'origine alimentaire. Toutes ces manifestations sont regroupées sous le terme générique officiel de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) (Mfoaponnjueya, 2006).

L'objectif de ce travail consiste à faire des analyses microbiologiques pour évaluer la qualité de quelques échantillons de Mini donuts vendus sur la voie publique au niveau de la ville de Biskra.

Ce travail est divisé en deux parties :

- une partie bibliographique répartie en deux chapitres dont le premier est un rappel sur les Mini donuts et le deuxième présente la microbiologie des Mini donuts.
- une partie expérimentale décrivant le matériel et la méthode, donnant les résultats suivis d'une discussion avant de se terminer par une conclusion générale.

Partie
bibliographique

Chapitre 1

Généralités sur les

Mini donuts

1.1. Définition

Un Mini donut est un petit gâteau de pâte sucrée ou, parfois, non sucrée frite dans une graisse profonde, généralement en forme d'anneau ou, lorsqu'elle est préparée avec une garniture, d'une boule. Tout ce qui a la forme d'un anneau épais; un objet annulaire; tyroïde (John, 2006).

1.2. Histoire des Mini donuts

L'histoire du gâteau remonte à des siècles, bien avant la découverte du Nouveau Monde. Dans la Rome antique et la Grèce, les cuisiniers préparent des tranches de pâte à tarte et les enveloppent de miel. Au Moyen Âge, les chefs arabes ont commencé à faire frire de petites portions de pâte de levure non sucrée, en trempant les marinades frites dans du sirop de sucre pour les sucrer (Pull, 2008).

Ces crêpes arabes se sont propagées dans le nord de l'Europe au XIVe siècle et sont devenues célèbres dans toute l'Angleterre, l'Allemagne et les Pays-Bas. Au XVe siècle en Allemagne, où le sucre était difficile à trouver, il est souvent cuit salé avec des garnitures telles que de la viande ou des champignons. Des pèlerins et des colons néerlandais ont apporté des gâteaux en Amérique (Pull, 2008).

Enfin, des trous ont été ajoutés au milieu de la tarte pour créer la forme de gâteau que nous connaissons aujourd'hui. Cette invention est née de la nécessité. À un moment donné, le jaune d'œuf a été ajouté à la pâte - on a découvert que cela produisait un produit final plus riche et plus stable. Le problème était que les crêpes finissaient souvent crues au centre après la friture la cuisson extérieure était cuite avant l'intérieur du gâteau. L'ajout d'un trou au centre a éliminé ce problème (Pull, 2008).

1.3. Composition des Mini donuts

Les gâteaux sont généralement frits avec de la pâte à farine, sous la forme d'une boucle, souvent remplis, mais peuvent également être sous la forme d'une boule "trous de beignets". De nombreux additifs et arômes sont utilisés pour différents types, tels que le sucre, le chocolat(voir figure 1).Les gâteaux peuvent également comprendre de l'eau, la levure, des œufs, du lait, du sucre, de l'huile, du ghee et des arômes naturels ou artificiels(John, 2006).

1.4. Types des Mini donuts



Figure 1. Différents types de Mini donuts (Photo originale, 2020).

a. M.donuts à l'ancienne. **b.** M.donuts simple glacé au chocolat liquide noir et blanc.

c. M.donuts à la noix de coco. **d.** M.donuts à fruits. **e.** M.donuts royale.

1.5. Détérioration des Mini donuts

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 et 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.

1.6. Risque sanitaire

Il existe 3 classes de risques sanitaires :

1- La contamination initiale des matières premières et produits livrés secondaire lors du Stockage, fabrication et manipulation (MILLET et CABUT, 1997).

2- La multiplication des micro-organismes déjà présents dans le produit, suite à une rupture de la chaîne du froid ou à un refroidissement mal conduit.

3- La survie des micro-organismes suite à une cuisson insuffisante, c'est-à-dire d'un non-respect des critères du couple temps/température nécessaire pour garantir l'assainissement d'un produit (MILLET et CABUT, 1997).

Chapitre 2
Microbiologie des Mini
donuts

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. 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 (aw) est une mesure de la disponibilité de l'eau pour des fonctions biologiques. L'aw d'un aliment peut être exprimé par le rapport entre la pression de vapeur d'eau de l'aliment (P) et celle de l'eau pure (P₀), c'est-à-dire P/P₀. Elle 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'aw 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 et des facteurs de croissance : vitamines et certains minéraux (Oudot, 1999).

2.2.1.4. Potentiel redox

Le potentiel redox (Eh) 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'Eh supérieures que les bactéries anaérobies nécessitant des valeurs d'Eh 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. Germes indicateurs d'hygiène

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 constituent 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

Sont des entérobactéries vivant principalement dans les intestins. Ces bactéries fermentant le lactose (avec gaz) à 30°C (les bactéries correspondantes appartiennent au genre *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsilla* et *Entérobacter*) ou à 44°C (coliformes thermotolérantes ou fécaux). Les coliformes fécaux et *E.coli* survivant difficilement hors de l'intestin traduiront donc une contamination fécale récente (Joffin et Joffin, 1999).

Ils sont des bactéries Gram et oxydase négatifs, non sporulant, aéro-anaérobies facultatives (Guirand, 1998).

2.3.3. *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).

2.3.4. *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 le pH est 7,2 et pour l'*aw* est de 0,99 (Korsak *et al.*, 2004).

2.3.5. *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).

2.3.6. 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. Maladies transmises par les mini donuts

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 toxinogènes 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 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 (Eselin, 2009).

Partie expérimental

Chapitre 3

Matériel et méthodes

3. Objectif du travail

Ce travail a pour objectif général l'étude de l'hygiène dans les boutiques populaire collective commerciale dans la région de Biskra ; D'une façon spécifique de dénombrer certains types de microorganismes et d'identifier des agents microbiens présentant dans les Mini donuts vendus dans les boutiques publiques.

4. Méthodologie

4.1. Echantillonnage et prélèvement

L'étude a été faite sur 3 échantillons de Mini donuts, prélevés dans la période entre fin février et début mars à partir de différentes boutiques populaires de Mini donuts situées au centre-ville de la wilaya de Biskra.

Les échantillons ont été choisis par le vendeur après conditionnement habituel.

Les prélèvements ont été effectués de manière aseptique à l'aide des sacs stériles, Conservés au frais dans une glacière contenant de carboglace pour le transport des échantillons, sous régime du froid, et directement acheminés au laboratoire pédagogique de département de science de la nature et de la vie de l'université de Biskra afin de réaliser les analyses microbiologiques.

4.2 .Analyses microbiologiques

L'élaboration des normes internationales est confiée en générale au comité technique de l'ISO qui est une organisation internationale de normalisation. La norme donne des directives pour le dénombrement des microorganismes dans les produits destinés à la consommation humaine et animale.

Les méthodes de dénombrement utilisées dans cette étude sont définies par cette organisation. Ainsi nous nous sommes inspirés des normes AFNOR (Association Française de Normalisation).

4.3. Germes recherchés

Les germes recherchés dans cette étude sont :

- Germes indicateurs de la qualité commerciale
 - ✓ Flores Aérobie Mésophile Totale (FMAT).
 - ✓ *Echerichia coli*.
- Germes indicateurs de la qualité hygiénique
 - ✓ Staphylocoques présumés pathogènes (SPP).
 - ✓ Anaérobies sulfite-réducteurs (ASR).
 - ✓ Salmonelles.
 - ✓ Flore fongique (levures et moisissures).

4.4. Protocole d'analyse

4.4.1. Préparation de la Solution mère et des dilutions décimales

4.4.1.1. Solution mère (NF V08-010)

La préparation de la solution mère consiste à peser aseptiquement 25 g de l'échantillon à l'aide d'une balance de précision, par la suite on ajoute 225 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT). L'homogénéisation du contenu dure 5 min, par la suite la solution est récupérée dans un flacon ou dans un bécher stérile. L'opération est effectuée tout en respectant les conditions d'asepsies strictes. Cette suspension est laissée au repos pendant 30 min pour assurer la revivification des micro-organismes s'ils existent, et obtenir un surnageant.

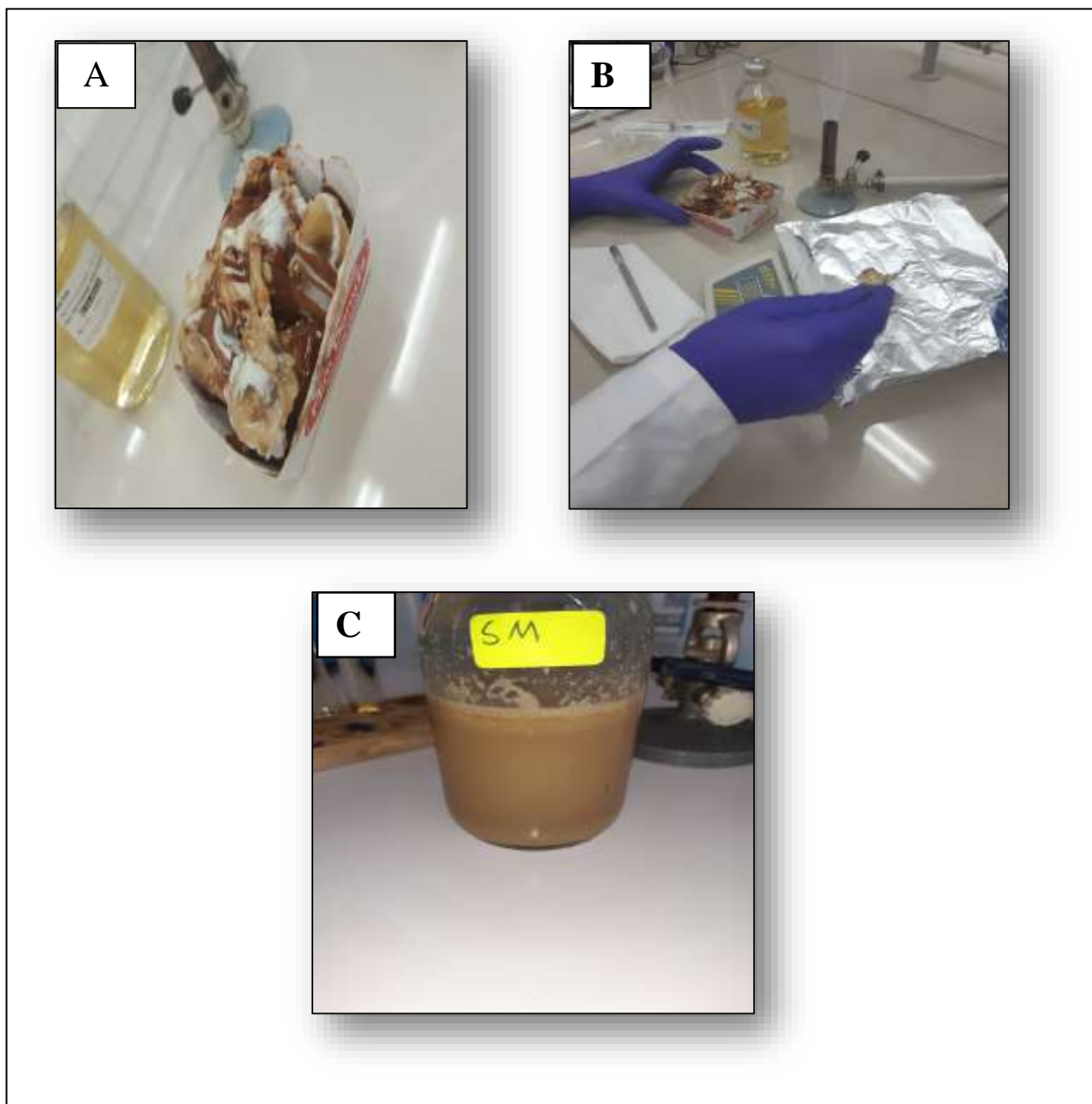


Figure 2. Etapes de la préparation de la solution mère (Photos originales, 2020).

A. Echantillon de Mini donuts. **B.** Etape de la pesée. **C.** Solution mère préparée.

4.4.1.2. 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.

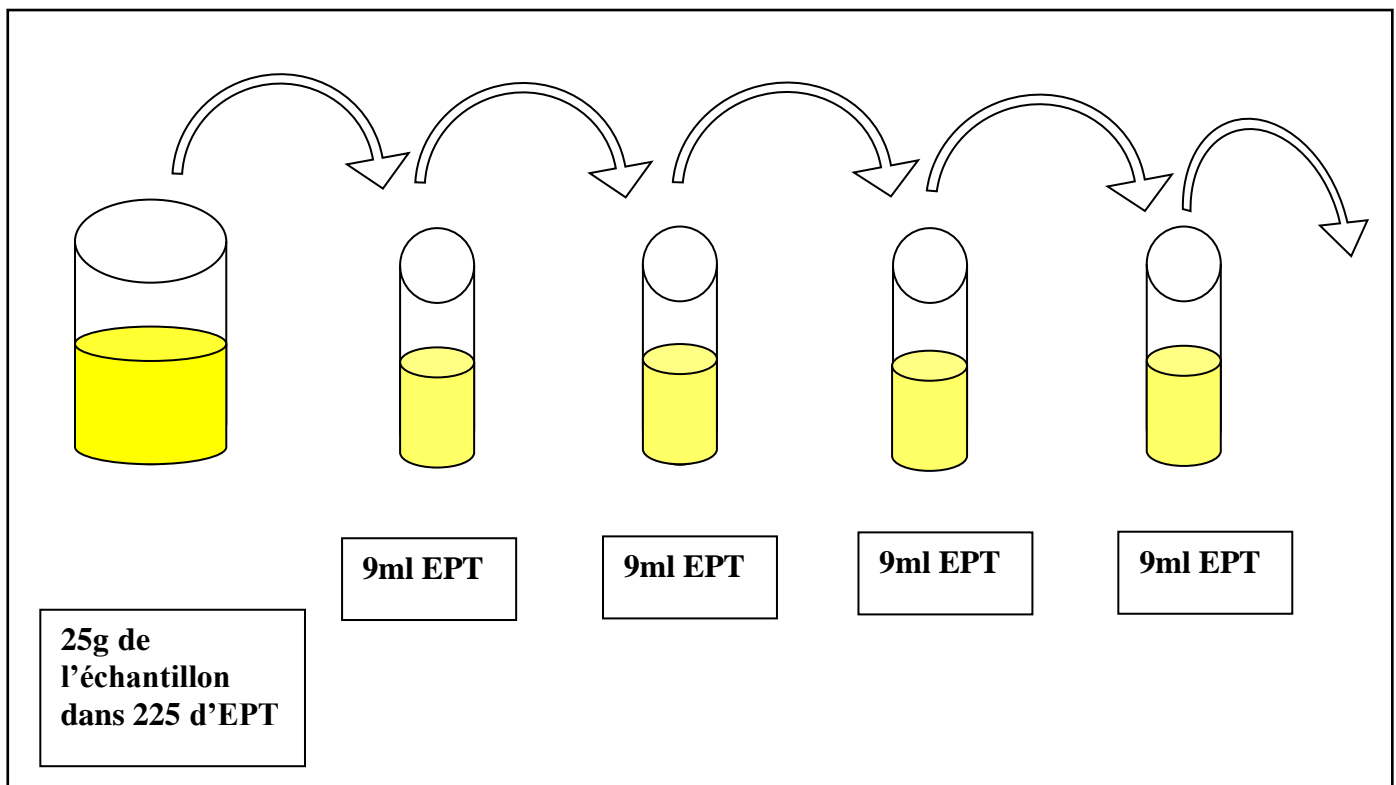


Figure 03. Schéma de préparation de série de dilutions (NF V08-010).

4.5. Recherche et dénombrement des germes

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

❖ Principe

Il s'agit d'une technique de comptage des micro-organismes après incorporation de volumes déterminés d'échantillons ou de ces dilutions dans un milieu gélosé (Delarras, 2007).

Le dénombrement de cette microflore est réalisé selon les normes française NF V 08-011 N et NF V 08-51 par la méthode d'ensemencement en profondeur sur gélose PCA (Plate Count Agar) pour numération.

❖ Mode Opératoire

1 ml de chaque dilution est déposé dans des boîtes de Pétri à l'aide d'une pipette graduée stérile de 1 ml, ensuite 15ml du milieu **PCA** liquéfié et refroidit à 45°C, sont additionné à chaque boîte de Pétri.

L'inoculum est soigneusement mélangé avec le milieu de culture par des mouvements circulaires de « va-et-vient » ou en forme de « 8 » sur une surface fraîche et horizontale.

Après solidification, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 72h. Les dénombrements sont exprimés en unité formant colonie par gramme d'échantillon (UFC/g). (Delarras, 2007).

❖ Lecture et interprétation

Les germes totaux se présentent sous forme de colonies lenticulaires poussant en masse, ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies (Lebres, 2002).

Le nombre de micro-organismes par gramme de produit est calculé à partir des boîtes retenues relatives aux dilutions successives selon la formule suivante (Guiraud et Galzy, 1980).

$$N = \frac{\Sigma C}{V (n1 + 0.1 n2) \times d}$$

N= nombre de germes par gramme de produit.

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

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

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

n1= nombre de boite lu à la 1ère dilution.

n2= nombre de boite lu à la 2ème dilution.

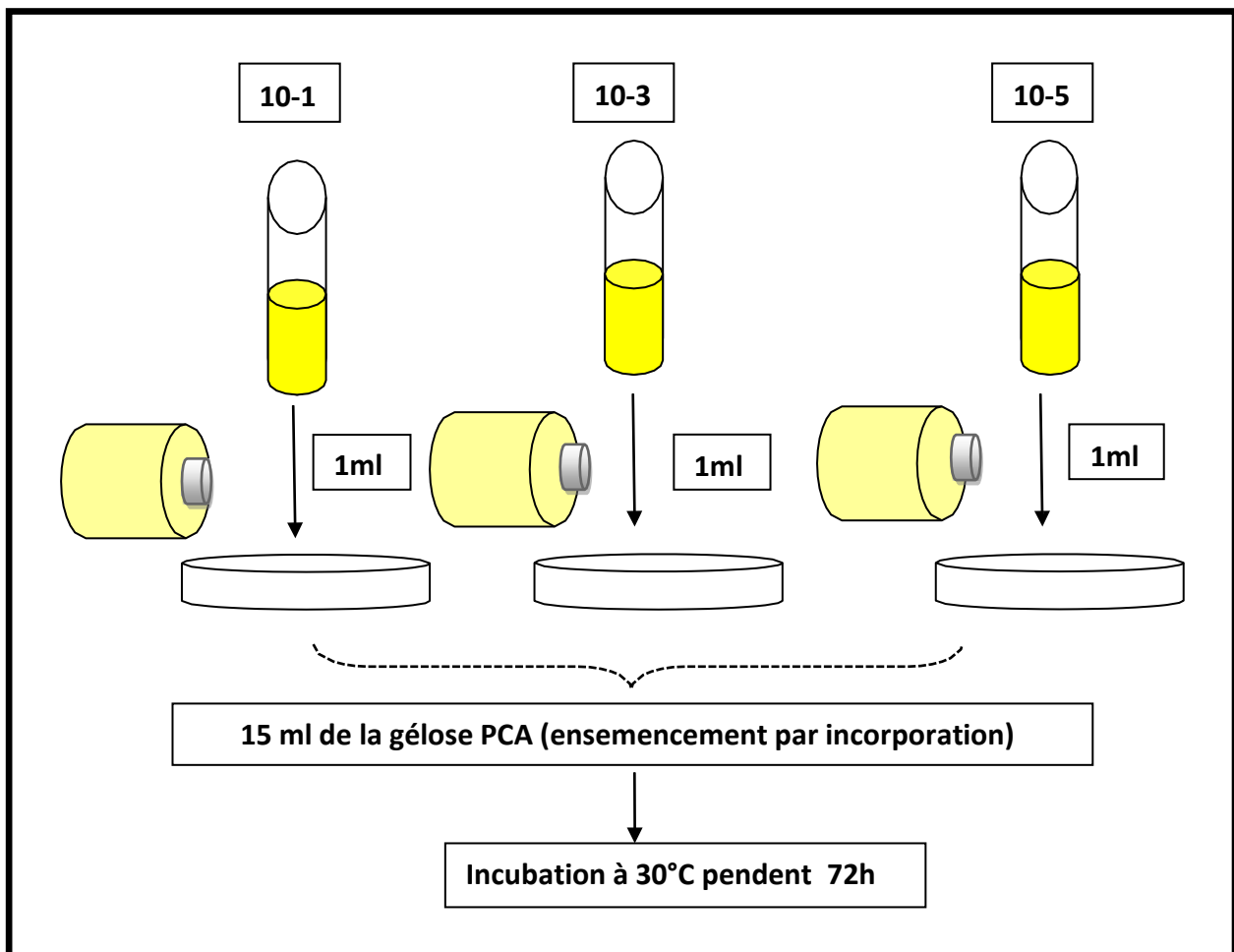


Figure 4. Schéma des étapes de recherche de la flore totale aérobie mésophile (FTAM).

4.5.2. Recherche d'*Escherichia Coli*

Escherichia coli est un hôte normal du tube digestif mais peut devenir pathogène, elle représente 80 % de la flore intestinale aérobies, sa présence dans un aliment prêt à manger est un signe d'une contamination fécale, et de ce fait rend ce dernier à risque pour la consommation humaine (Balde, 2002).

❖ Principe

L'inhibition des microorganismes à Gram positif est due à la présence de sels biliaires et de cristal violet. Ce colorant inhibe principalement le développement des entérocoques et des staphylocoques. La gélose Mac Conkey est un milieu sélectif pour l'isolement des entérobactéries (Delarras, 2007).

❖ Mode Opératoire

A partir de la solution mère et les dilutions décimales on prend aseptiquement 0.1 ml à l'aide d'une pipette Pasteur, et on ensemence par stries les boîtes de Pétri (contenant le milieu Mac Conkey coulé et gélifié). Ensuite on incube à 37°C pendant 24 à 48 heures (Delarras, 2007).

❖ Lecture et interprétation

Les colonies lactose-positif présentent une coloration rouge et sont entourées d'un halo de sels biliaires précipités. Les colonies lactose-négatif sont incolores.

Pour l'identification, quelques tests ont été réalisés : examen microscopique (coloration de gram), galerie classique et galeries API 20E.

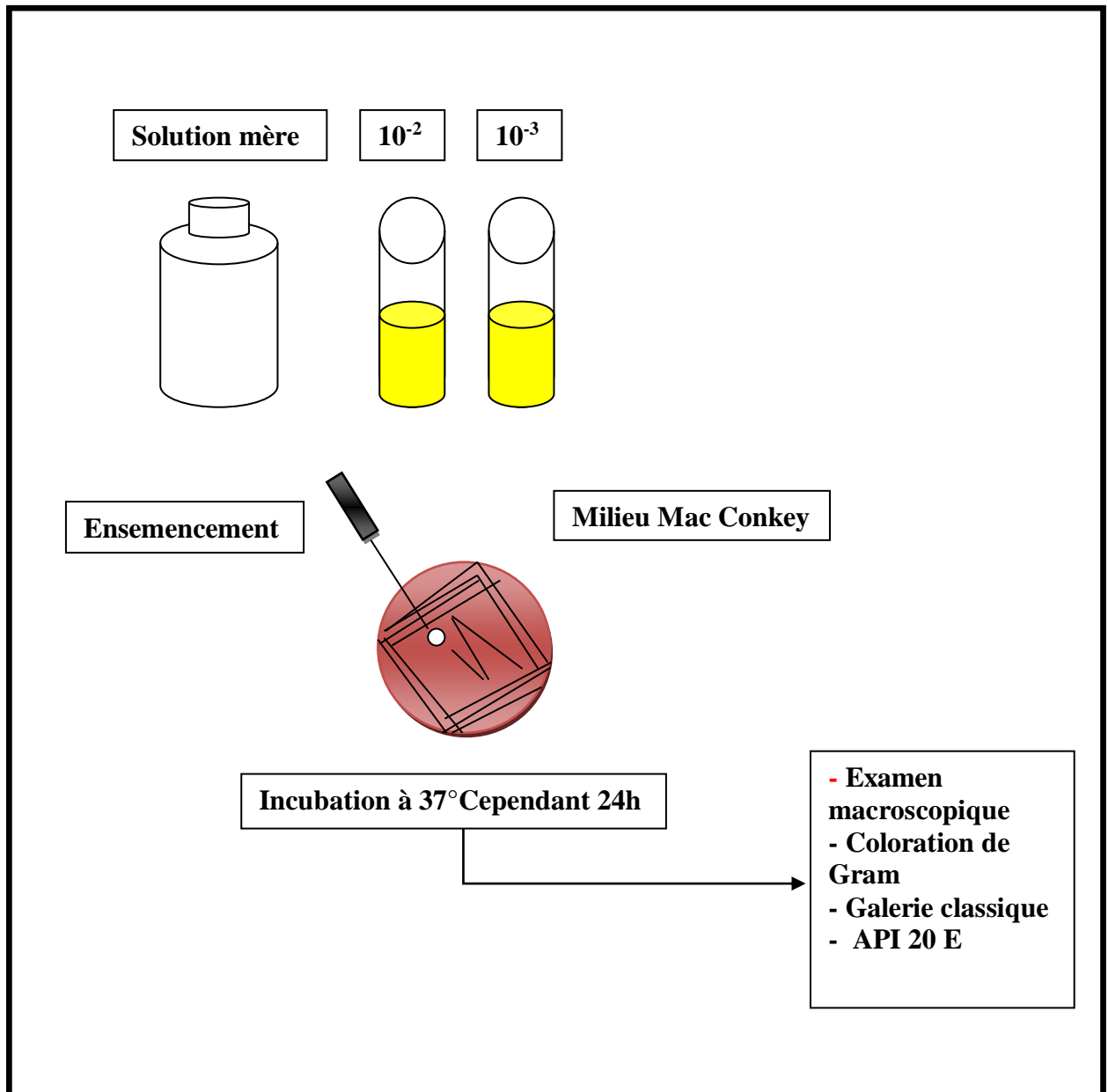


Figure 5. Schéma des étapes de recherche d'*Escherichia Coli*.

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

❖ Principe

Les staphylocoques sont recherchés par la méthode d'ensemencement sur boîte de Pétri et pratiqués le plus souvent dans un but d'isolement (Delarras, 2007).

❖ Mode opératoire

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 $24h \pm 2h$, puis ré-incubées pendant $24h \pm 2h$ supplémentaires dans les étuves à $37^{\circ}C$.

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.

❖ Lecture et interprétation

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 boites ensemencées avec des dilutions successives. Le nombre de germes par gramme (N) de produit est obtenu selon la formule suivante (JORA, 2014) :

$$N = \frac{\Sigma C}{V (n1 + 0.1 n2) \times d}$$

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.

n1= nombre de boîte lu à la 1ère dilution.

n2= nombre de boîte lu à la 2ème dilution.

Pour l'identification du genre *staphylococcus*, quelques tests ont été réalisés : coloration de Gram, test catalase et test oxydase, et pour confirmer l'espèce (aureus ou non) le test coagulase a été réalisé.

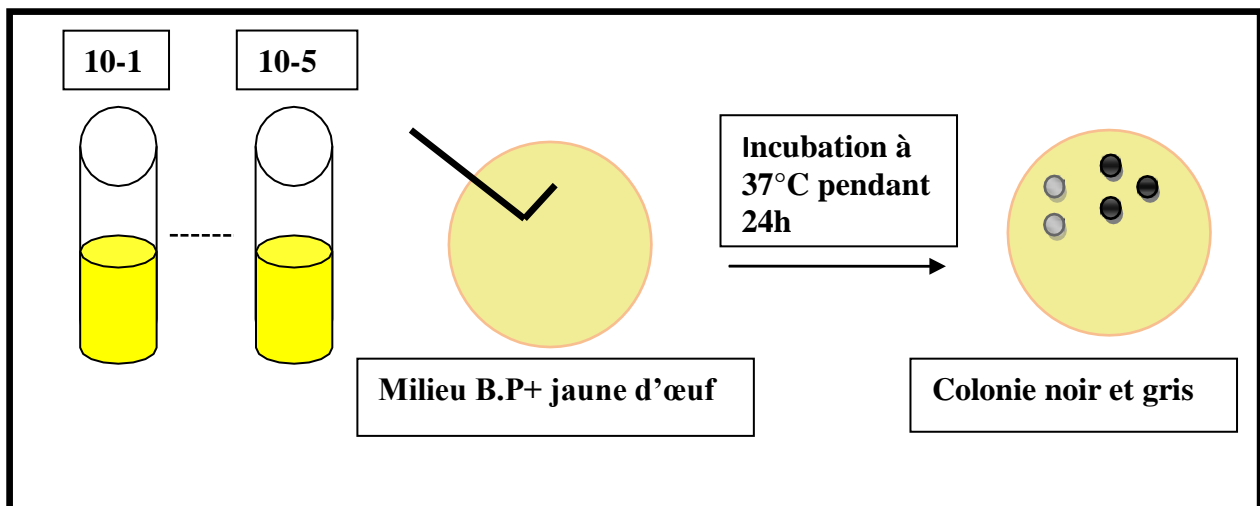


Figure 6. Schéma des étapes de recherche de *Staphylococcus aureus* à coagulase positif.

4.5.4. Recherche des spores des anaérobies sulfito-réducteurs (ASR)

❖ Principe

La recherche de ces micro-organismes indicateurs de contamination se fait par la méthode d'incorporation de gélose en tube, dans le but de rechercher et dénombrer les spores des Clostridium sulfito-réductrices dans les viandes qui se développent en 24 à 48 heures sur une gélose Viande Foie en donnant des colonies typiques réduisant le sulfite de sodium (Na_2SO_3) qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de Fe^{+2} donne FeS (sulfure de fer) de couleur noire.

Les spores des ASR constituent généralement des indices de contamination ancienne (Benaissa, 2011).

❖ Mode opératoire

Dans des tubes stériles, 1ml de la solution mère ou des dilutions décimales est introduit.

Ces tubes sont ensuite placés dans un bain marie pendant 10 mn à 80°C , afin de détruire toutes les formes végétatives des ASR éventuellement présentes et activer les formes sporulés. Immédiatement à la sortie du bain marie, ces tubes sont refroidis sous l'eau du robinet. Par la suite 18 à 20 ml de gélose Viande Foie (VF) fondue puis refroidie à $45^\circ\text{C} \pm 1$, additionnés de 0.2 ml d'Alun de fer et de 0.5ml de Sulfite de sodium à 5%, sont ajoutés à chaque tube à essai. Le mélange est doucement homogénéiser pour éviter la formation des bulles d'air. Après solidification sur paille, les tubes sont incubés à 37°C , pendant 24 à 48h (Benaissa, 2011).

❖ Lecture et interprétation des résultats

L'apparition de colonie de couleur noire indique la présence des ASR, toute colonie noire de 0.5 mm de diamètre pouvant aller jusqu'à 5 mm, poussant en masse est dénombrée par gramme de produit à analyser (Joffin, 2001).

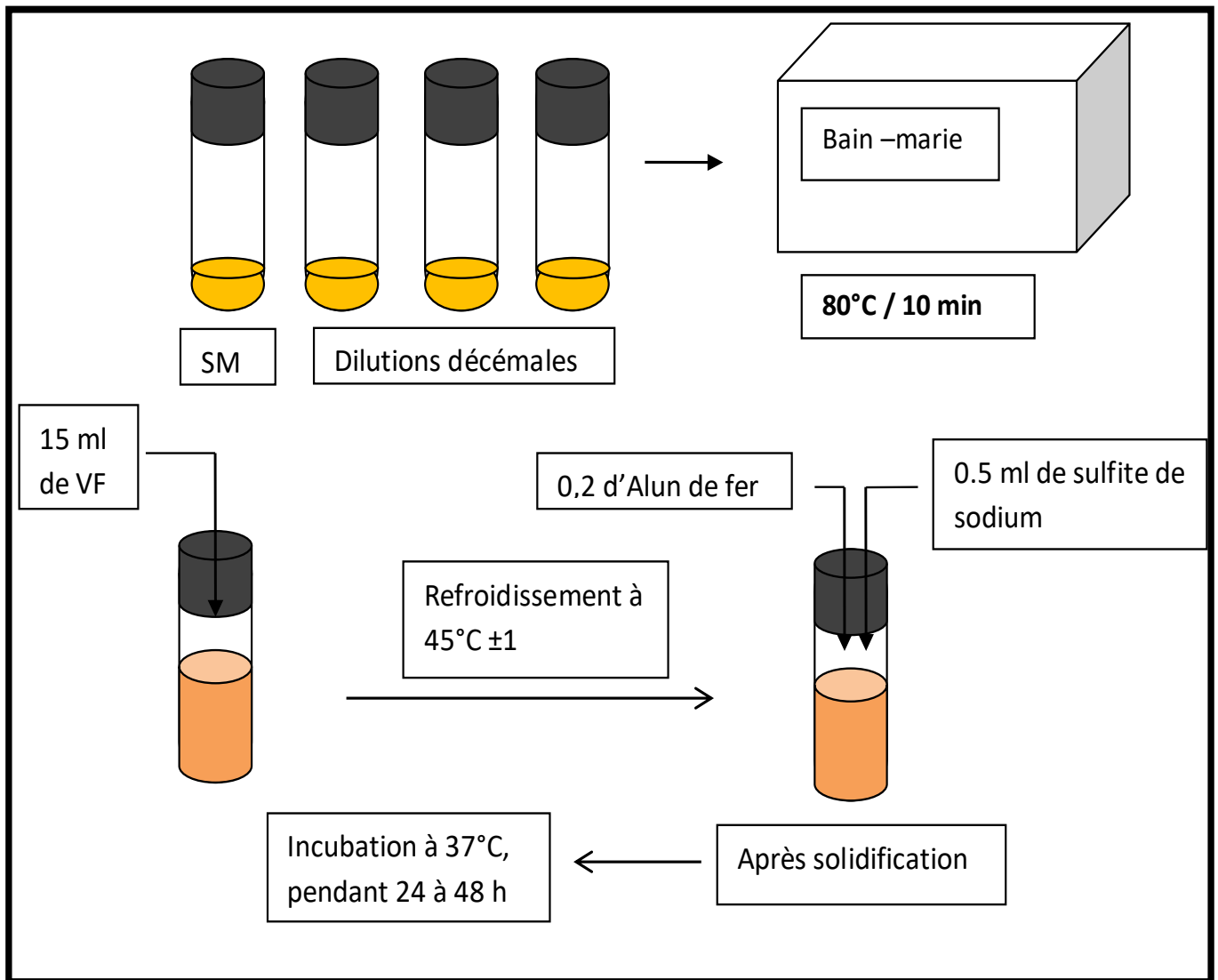


Figure 7. Schéma représentant la recherche des Anaérobies Sulfito-réducteurs.

4.5.5. Recherche et dénombrement de *salmonella*

❖ Principe

La recherche des Salmonelles est effectuée en trois étapes successives : Pré-enrichissement, enrichissement et isolement (Guiraud et Rosec, 2004).

❖ Mode opératoire

✓ Pré-enrichissement

Il est destiné à revivifier les cellules de façon à faciliter la culture dans les bouillons d'enrichissement. On incube la solution mère à 37°C pendant 24 heures (Dennai et *al.*, 2001).

✓ Enrichissement

Porter aseptiquement 0.1 ml de la solution de pré-enrichissement dans des tubes contenant 10ml de bouillon rapapport.

Après homogénéisation, les tubes sont incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures (Guiraud et Rosec, 2004).

✓ Isolement

L'isolement est réalisé par ensemencement en surface par la méthode de stries du milieu sélectif solide SS à partir du bouillon d'enrichissement. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 h et parfois même pendant 48 h, en absence de colonies caractéristiques (Guiraud et Galzy, 1980).

❖ Lecture et interprétation des résultats

La gélose SS est utilisée pour l'isolement des salmonelles et des shigelles présents dans les produits alimentaires, ainsi qu'elle permet la poussée des coliformes (Guiraud et Galzy, 1980).

- ✓ Les Salmonelles qui ne fermentent pas le lactose présentent des colonies incolores transparentes avec ou sans centre noir (production d'H₂S).
- ✓ Les Shigelles sont incolores.
- ✓ Les coliformes présentent des colonies rouges ou roses (Korsak et *al.*, 2004).

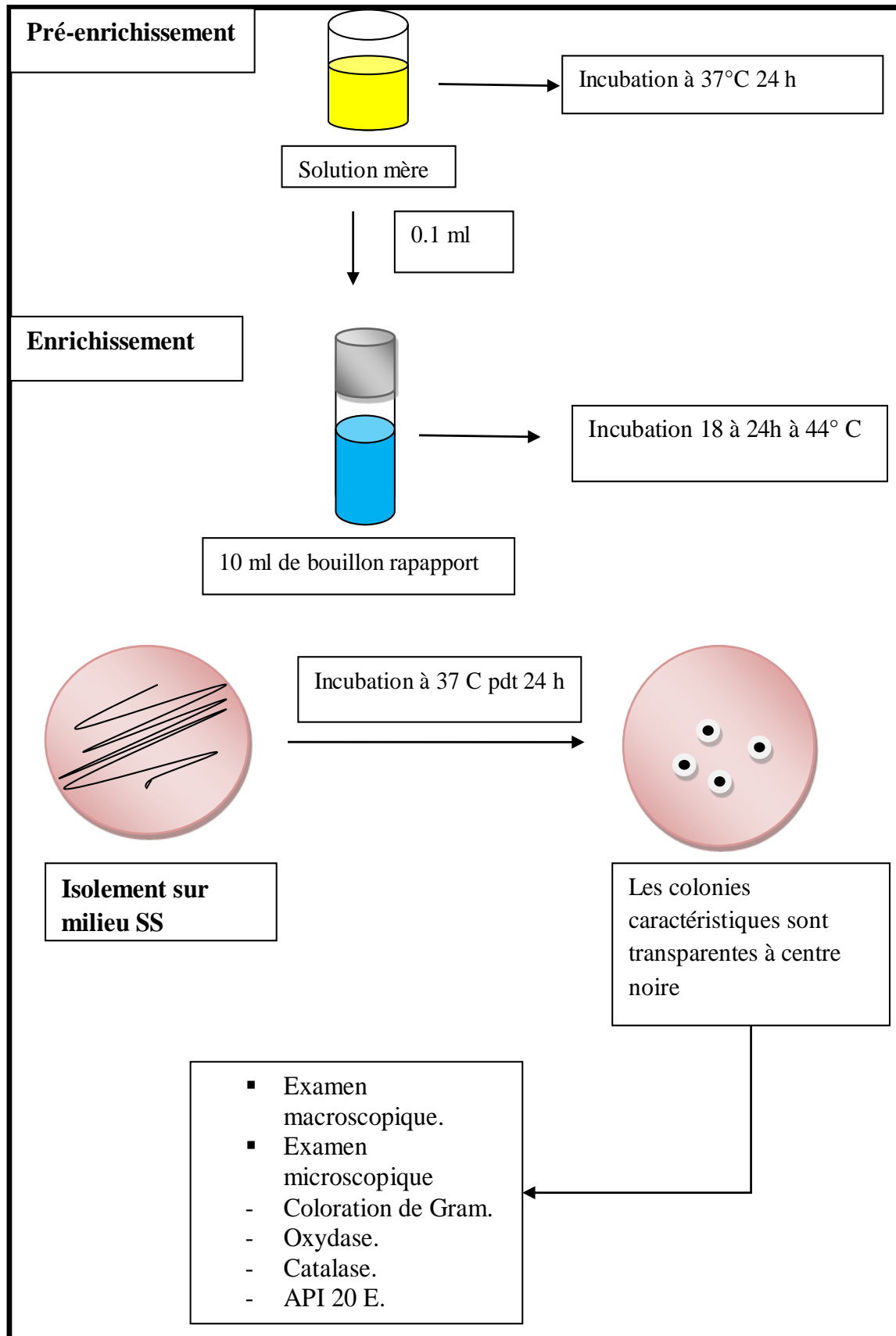


Figure 8. Protocole de recherche de *Salmonella* (Korsaket *al.*, 2004).

4.6. Identification microbiologique et tests complémentaires

4.6.1. Caractères morphologiques

- **Examen macroscopique des caractères culturaux**

L'aspect des colonies dépend du milieu, de la durée et la température d'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir des colonies bien isolées. La description des colonies doit mentionner plusieurs éléments (Joffin, 2001).

- La taille.
- La forme : bombée, plate, ombiliquée, à centre surélevé.
- L'aspect de la surface : lisse, rugueux.
- L'opacité : opaque, translucide ou transparente.
- La consistance : grasse, crémeuse, sèche ou muqueuse.
- Pigmentation.

- **Examen microscopique après coloration de Gram**

La coloration est reliée à la différence de structure chimique des parois cellulaire des bactéries.

Le protocole de coloration de Gram selon (Delarras, 2007)est le suivant :

- Préparer un frottis d'une culture bactérienne pure.
- Recouvrir le frottis de violet de Gentiane ; laisser agir 1 min, rincer à l'eau distillée.
- Verser du Lugol et le laisser agir pendant 1 min, rincer à l'eau distillée.
- Décolorer à l'alcool à 95%, entre 15 et 30s, rincer à l'eau distillée.
- Recolorer avec la Fushine pendant 10 à 30s, rincer à l'eau distillée.
- Sécher au-dessus de la flamme du bec Bunsen.
- Avec cette coloration double, les bactéries Gram positifs apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram négatif sont colorées en rose (fig. 9).

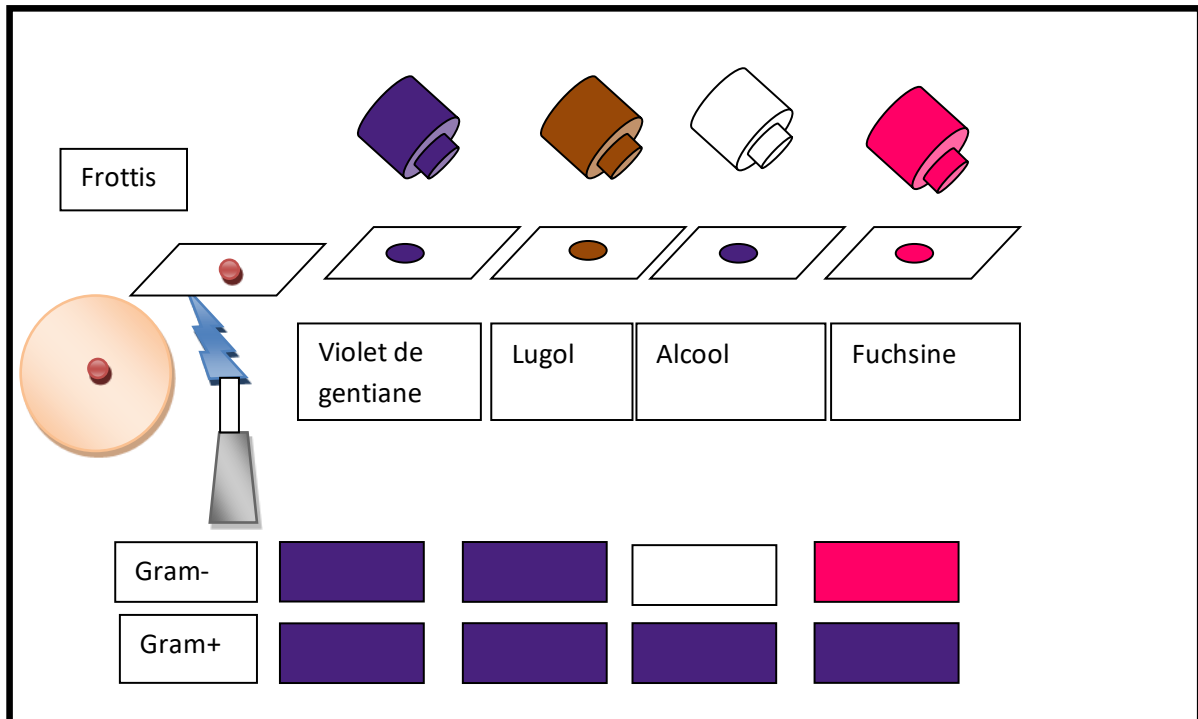


Figure 9. Protocole utilisé pour la coloration de Gram (Delarras, 2007).

4.6.2. Caractères enzymatiques

- **Test catalase**

Elle a pour but de classifier des bactéries aérobies et plus spécialement de les différencier. Il s'agit d'une enzyme qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase : test catalase +.

Sur une lame propre et sèche, une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes a été déposée à l'aide d'une pipette Pasteur et l'inoculum bactérien a été ajouté. L'observation a été immédiate (Dellaras, 2007).

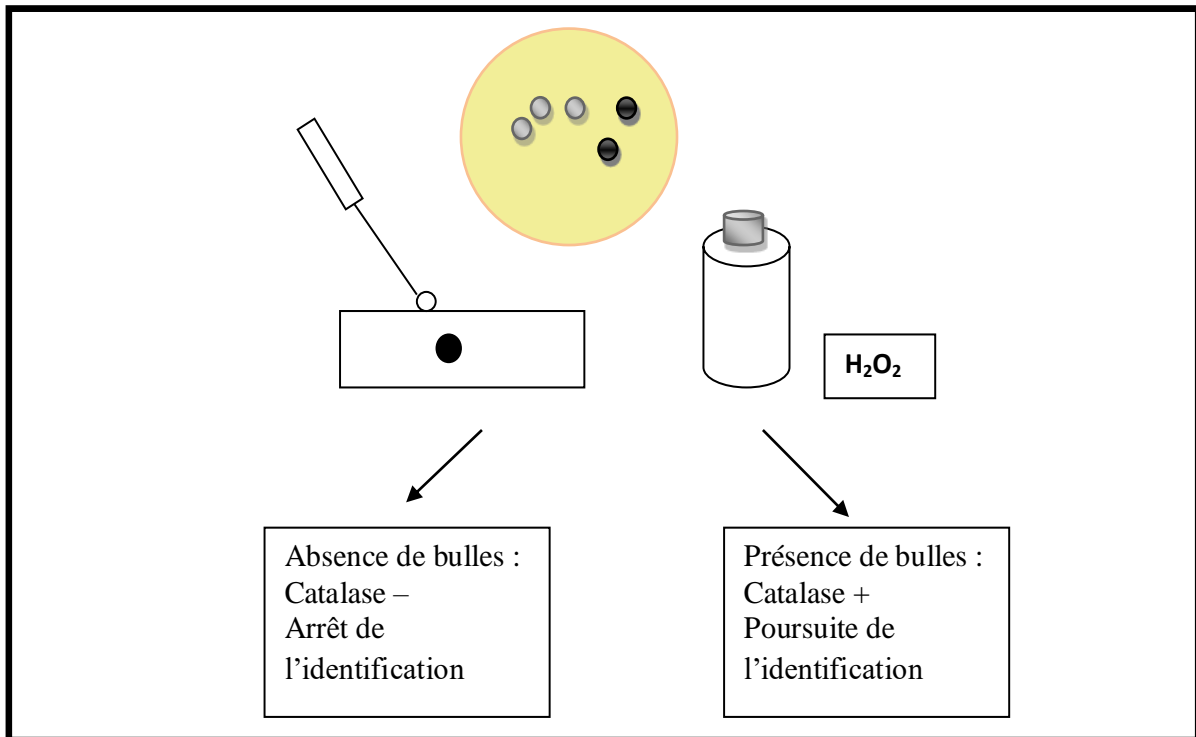


Figure 10. Confirmation biochimique (Test catalase (teste d'identification)) (JORA, 2014).

- **Test oxydase**

La présence de cette enzyme est réalisée par le disque oxydase constitué de l'oxalate diméthyle puruphénylène diamine et qui est incolore à l'état réduit et coloré en rouge à l'état oxydé. Ce test consiste à déposer un disque oxydase sur une lame propre, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile et écraser la colonie testée sur le disque.

Les bactéries oxydases positives donnent une coloration violette au disque en quelques minutes (Carbonnelle et *al.*, 1988).

- **Test coagulase**

Ce test est réalisé pour détecter les staphylocoques dorés. Une partie de chaque colonie sélectionnée a étéensemencée 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 0,3 ml 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).

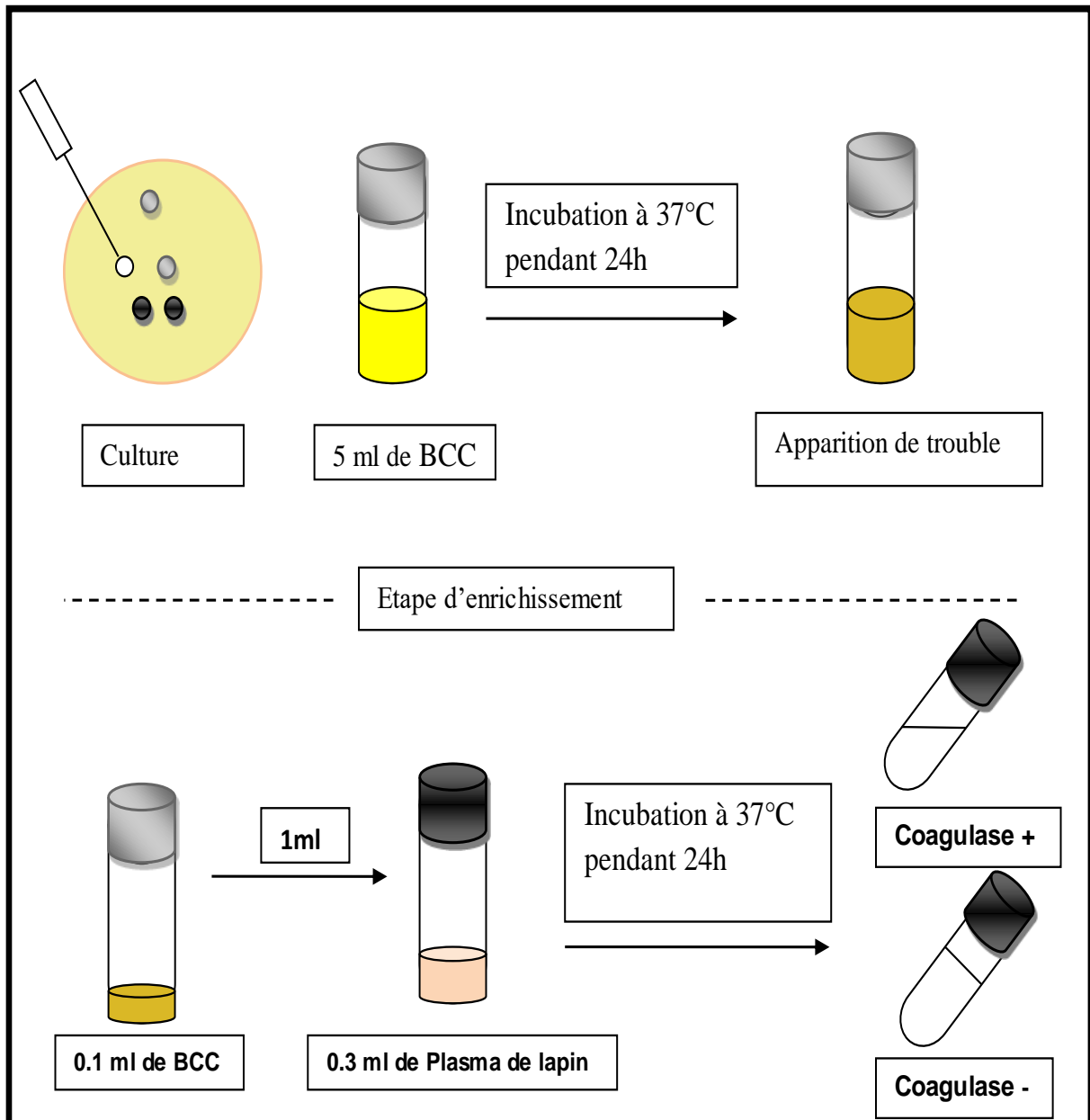


Figure 11. Confirmation biochimique de *Staphylococcus* (Test coagulase) (JORA, 2014).

- **Test d'ONPG (l'enzyme B –galactosidase)**

Cette enzyme permet de scinder la molécule du lactose après sa pénétration dans la cellule bactérienne en glucose et galactose.

Ce test consiste à préparer une suspension dense à partir de la culture bactérienne étudiée, y ajouter un disque ONPG. Incuber à 37°C pendant 24 h.

Si la couleur du milieu devienne jaune, le test est positif (Carbonnelle et *al.*, 1988).

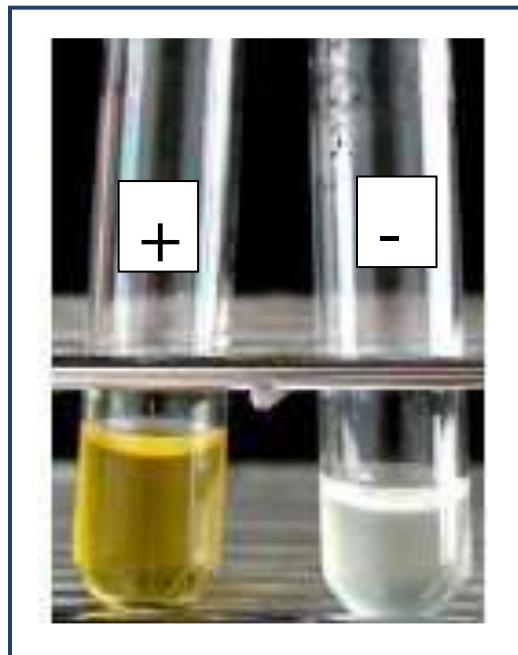


Figure 12. Test d'ONPG.

- **Test ADH**


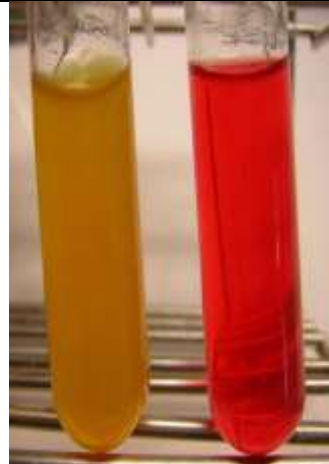
Ce test a été réalisé sur tube de bouillon ADH (contient de l'arginine) appelé milieu de Moellerfalkow. Nous avons préparé une suspension bactérienne en eau physiologique de la souche à étudier, ensuite nous avonsensemencé le milieu avec 2 à 3 gouttes de cette suspension et nous avons ajouté l'huile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

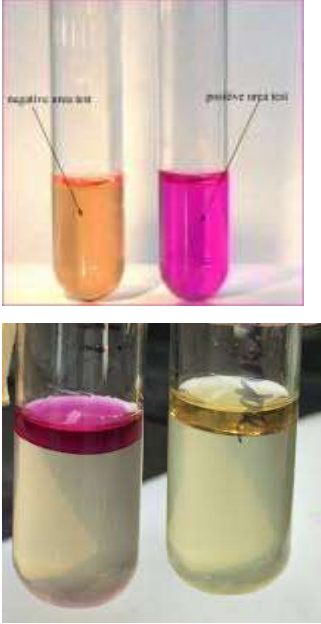
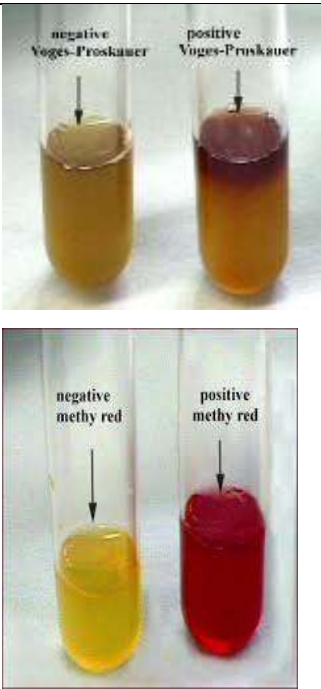
4.6.3. Caractères biochimiques

❖ La galerie Classique

L'identification et la classification des espèces, est basée sur l'étude des caractères biochimiques qui sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2. Caractères biochimiques de la Galerie Classique (Azaizia et Selaimia, 2013).

Milieu	Technique d'ensemencement	Caractères Recherchés	Lecture	Figure
TSI (Triple-Sugar-Iron)	<ul style="list-style-type: none"> - Ensemencer le milieu à l'aide d'une anse stérile par des stries longitudinales au niveau de la pente et par une piqûre centrale dans le culot. -Incuber les tubes ensemencés à 37°C pendant 24 h. 	Fermentation du Glucose, Lactose, Saccharose. -Production de : Gaz et H ₂ S.	<ul style="list-style-type: none"> -Virage de la couleur vers le jaune : Glucose, Lactose, Saccharose sont positifs (+). -Formation de tache noire : (H₂S₊). -Bulles de Gaz dans le culot : (Gaz₊). 	
Mannitol Mobilité	<ul style="list-style-type: none"> -Le milieu est ensemencé par piqûre centrale unique. -Incuber pendant 24 h à température optimale. 	<ul style="list-style-type: none"> -Mannitol. -Mobilité. 	<ul style="list-style-type: none"> - Apparition de couleur jaune : mannitol(+). - le milieu reste rouge: mannitol(-). -Formation d'une voile autour de la piqûre : les Bactéries sont mobiles. 	

<p>Uréeindole</p>	<p>Inoculer le milieu. -Incuber à l'étuve à 37°c pendant 24h. - Ajouter le réactif de kovacs (Test d'indole). - Ajouter 2 à 3 gouttes du réactif de TDA.</p>	<p>-L'uréase. -Formation d'indole. - La tryptophane désaminase (TDA).</p>	<p>-Virage de couleur au rouge violacé ou rose : Uréase positif(+). -Apparition d'un anneau rouge ou rose : Indole positif(+). -Obtention d'un précipité brun foncé : TDA positif(+).</p>	
<p>Clark et Lubs</p>	<p>-Ensemencer largement. -Incuber à 37° C pendant 24 h. - Ajouter 2 à 3 gouttes de VP1 et VP2 (Test VP). - Ajoute 2 à 3 gouttes de méthyle (Test RM).</p>	<p>-Formation d'acétone : réaction de vogesproskauer (VP). -Formation d'acide acétique et formique : réaction au rouge de méthyle (RM).</p>	<p>-Le milieu devient : Rouge (VP+)/Jaune (VP-). -Le milieu devient : Rouge (RM+)/Jaune (RM-).</p>	

<p>Citrate de Simmons</p>	<p>-Ensemencer le milieu par stries longitudinales de bas en haut. -Incuber à 37°C pendant 24 h.</p>	<p>-utilisation du citrate comme seule source de carbone par la bactérie qui possède l'enzyme citrate perméase en provoquant l'alcalinisation du milieu utilisé.</p>	<p>- Bactérie citrate positive: culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu). -Bactérie citrate négative: pas de virage.de couleur).</p>	
----------------------------------	--	--	--	---

❖ **Galerie API**

• **API 20 E**

✓ **Technique**

La galerie API 20 E est un système permettant l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif, comprenant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, avec une base de données (Delarras, 2007).

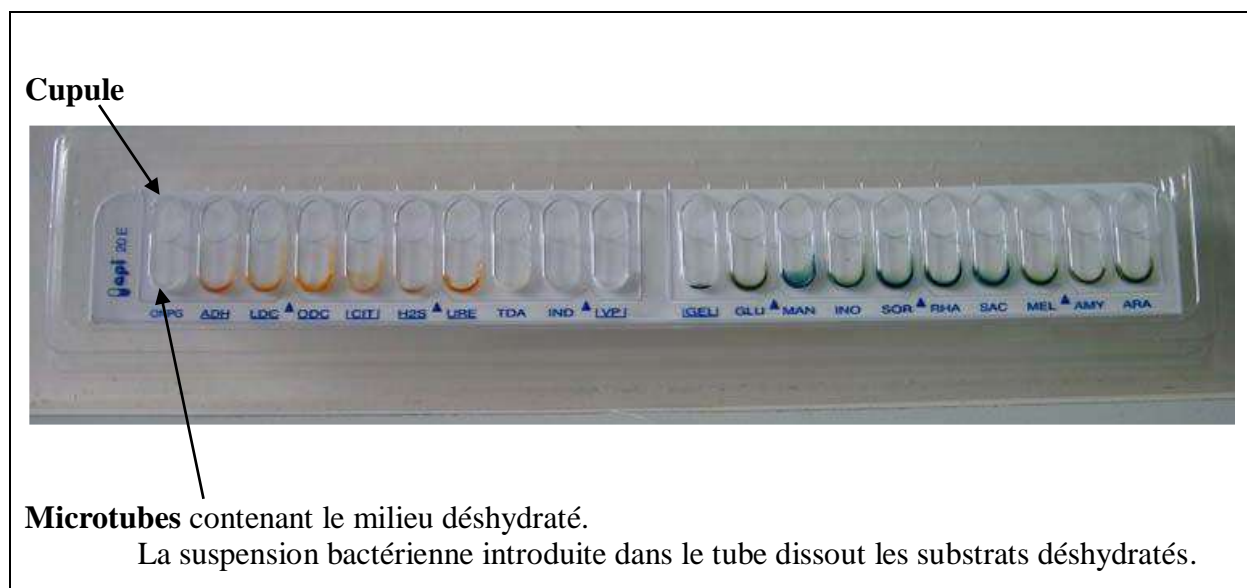


Figure 13. La galerie API 20 E.

✓ Mode Opérateur

A-Préparation de l'inoculum : prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé et la mettre dans un tube d'eau distillée stérile, on réalisant une suspension bactérienne faible (opacité 0,5 sur l'échelle de Mc Ferland) (Delarras, 2007).

B-Préparation de la galerie : L'opération s'effectuée selon les étapes suivantes :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Remplir tubes et cupules des tests : |CIT |, |VP |, |GEL|, avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation, coder et placer à 37°C pendant 18-24 heures (Leclerc, 1996).

Remarque : il est important de veiller à ne pas créer de bulles lors de l'inoculation qui pourraient fausser le résultat. De plus l'apparition de bulles après l'incubation apportera un caractère d'identification supplémentaire (GAZ +).

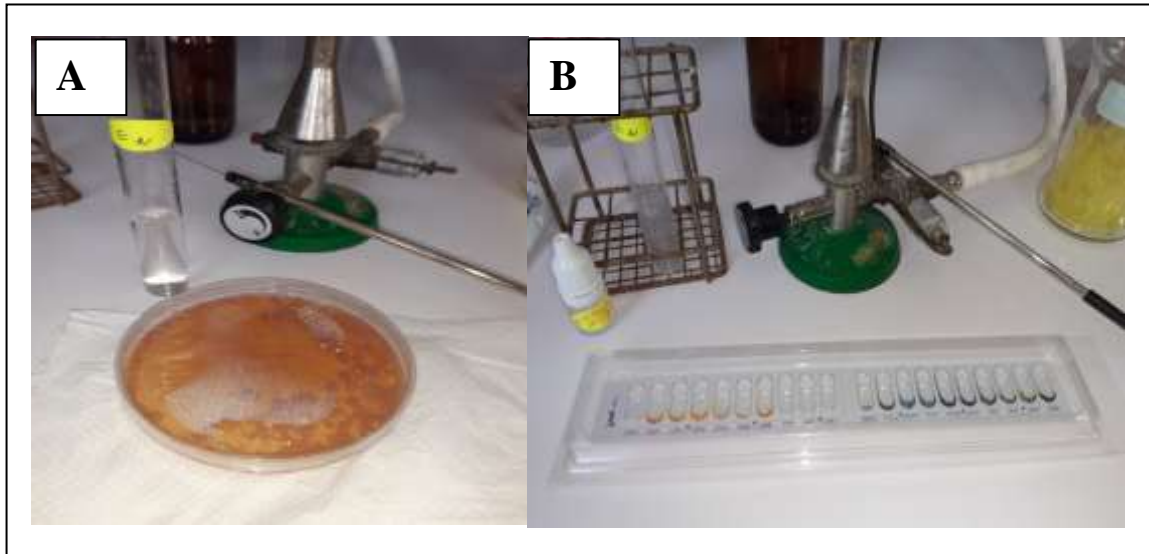


Figure 14. Méthode d'ensemencement de la galerie API E 20 (Photo originale, 2020).

A. Préparation de l'inoculum. **B.** Préparation de la galerie.

✓ **Lecture de la galerie**

Noter sur la fiche de résultat toutes réactions spontanées. Si le glucose est positif et/ou si 3 tests ou plus sont positifs : révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (Annexe 0).

-Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.

-Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncée indique une réaction positive.

-Test IND : ajouter une goutte de réactif de Kovacs. Un anneau rouge obtenu en 2 minutes indique une réaction positive.

La lecture de ces réactions se fait selon un profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20E (Delarras, 2007).

✓ **Identification**

Avec le tableau d'identification, comparer les résultats affichés sur la fiche avec ceux du tableau ; chaque cellule de ce tableau contient le pourcentage de positivité.

Avec le catalogue analytique : les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1 ou 2 ou 4) est positive suivant l'ordre de l'emplacement de la cupule dans le groupe, ensuite on obtient un nombre de 7 chiffres qui sert de code d'identification avec un logiciel d'identification (fig .15)(Delarras, 2007).

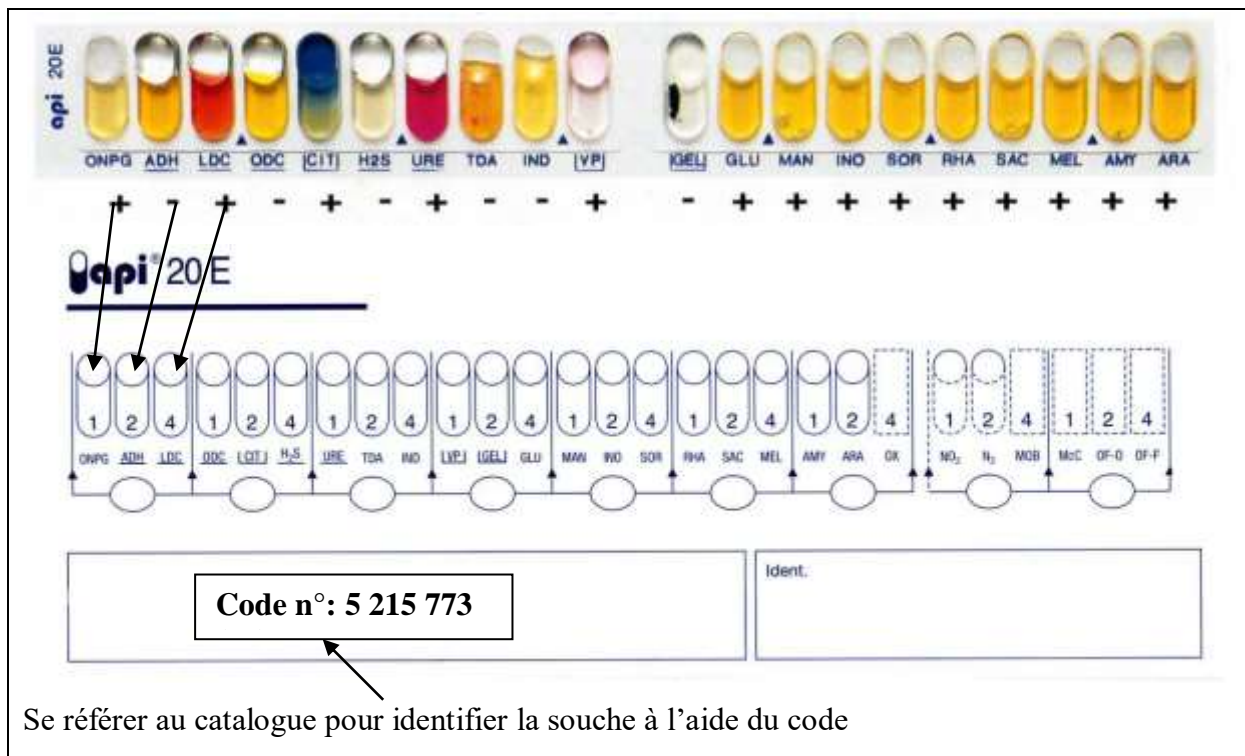


Figure 15. Lecture de la galerie et identification de la souche à l'aide du code.

4.5.6. Recherche des levures et moisissures

❖ Principe

Des boîtes de Pétri préparées en utilisant un milieu de culture sélectif défini sontensemencées dans un but d'isolement.

❖ Mode opératoire

Des aliquotes de 0,1 ml de et de chaque dilution ont étéensemencées 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

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 (Karkiet *al.*, 2017). L'observation microscopique des moisissures a été réalisée à l'aide de scotch-test.

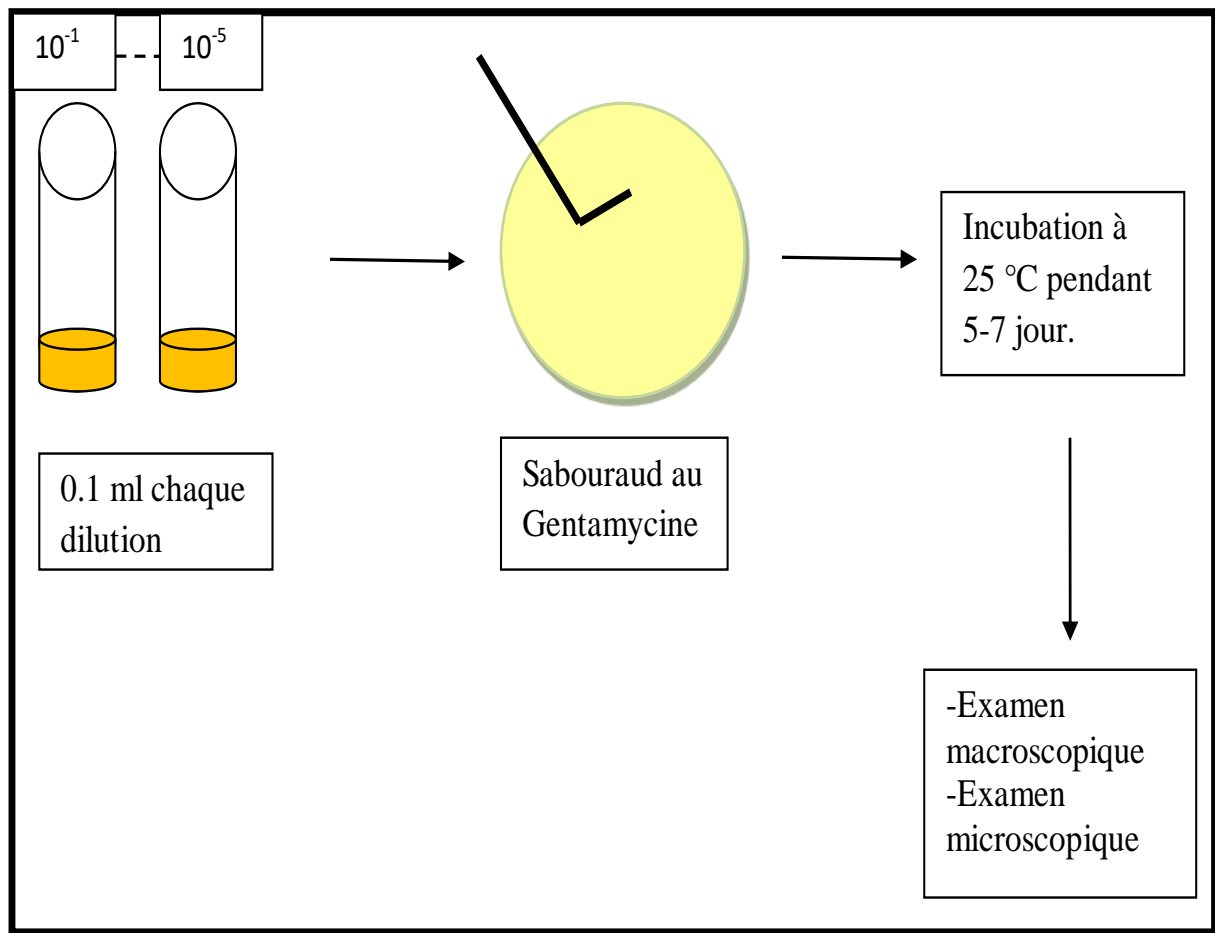


Figure 16. Schéma des étapes de Recherche des champignons (des levures et moisissures).

4.7. 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	Staph/g	ASR/g	Salmonelle/25g
M	3.10^5	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 7).

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 7).

Chapitre 4

Résultats et discussions

5.1. Résultats des analyses microbiologiques

5.1.1. Flore Mésophile Aérobie totale

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

5.1.1.1. Caractéristiques Macroscopiques

L'aspect des colonies de la FTAM obtenue sur les boîtes de pétri est montré dans la figure 17.

La forme est ronde et lenticulaire en masse ; la taille est moyenne et petite et la couleur est blanchâtre crémeuse.

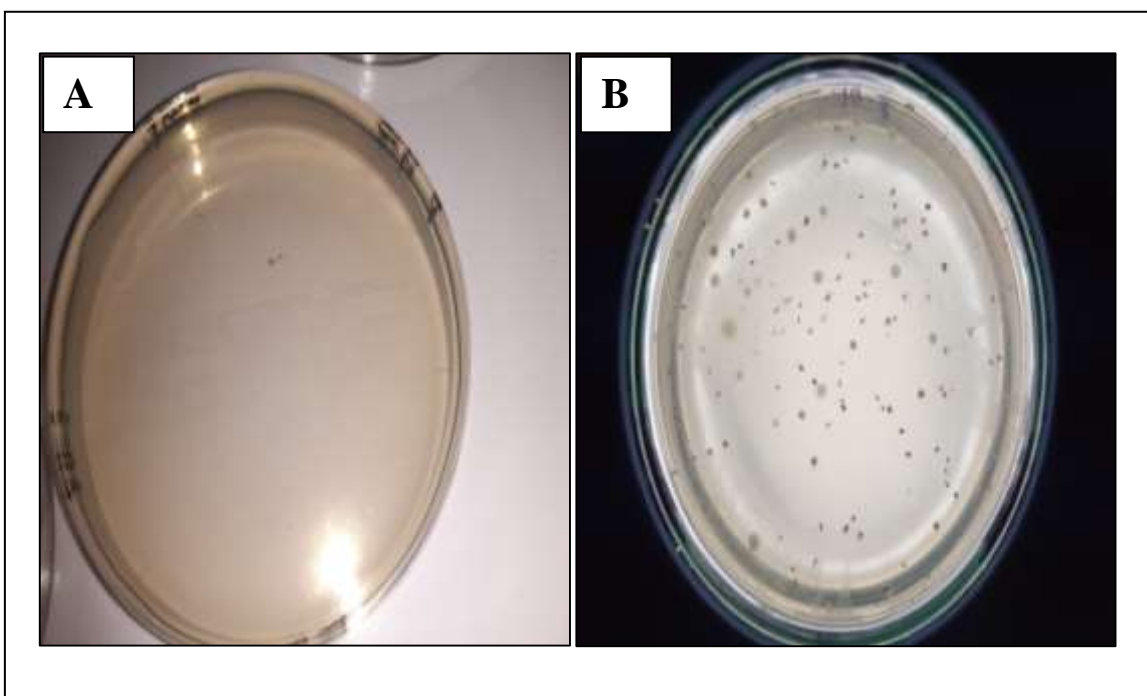


Figure 17. Résultats de recherche de la flore aérobie mésophile totale sur milieu PCA
(Photo originale, 2020).

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

5.1.2. *Escherichia coli*

5.1.2.1. Caractéristiques Macroscopique

Les boîtes présentent des colonies roses de taille moyenne, ronde, à surface lisse et bords réguliers, bombés, de consistance crémeuse et donnant des suspensions homogènes (Colonie S (*Smooth*- lisse)).

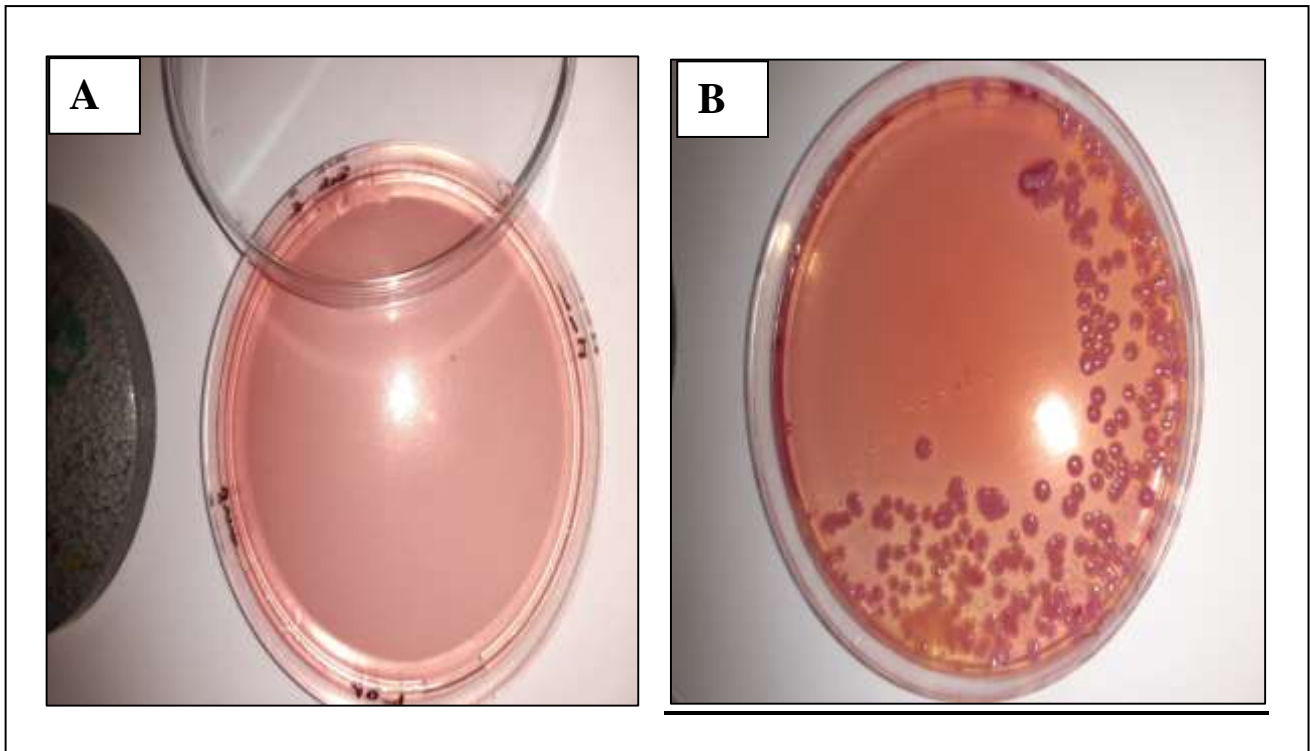


Figure 18. Résultat d'ensemencement sur milieu Mac Conckey (Photo originale, 2020).

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

5.1.2.2. Caractéristiques microscopique

La coloration de Gram et les tests biochimiques : galerie classique et API 20E sont réalisés pour deux échantillons (échantillon 02 et 03).

L'observation microscopique a montré la présence des bacilles en couleur rose (Gram négatif).

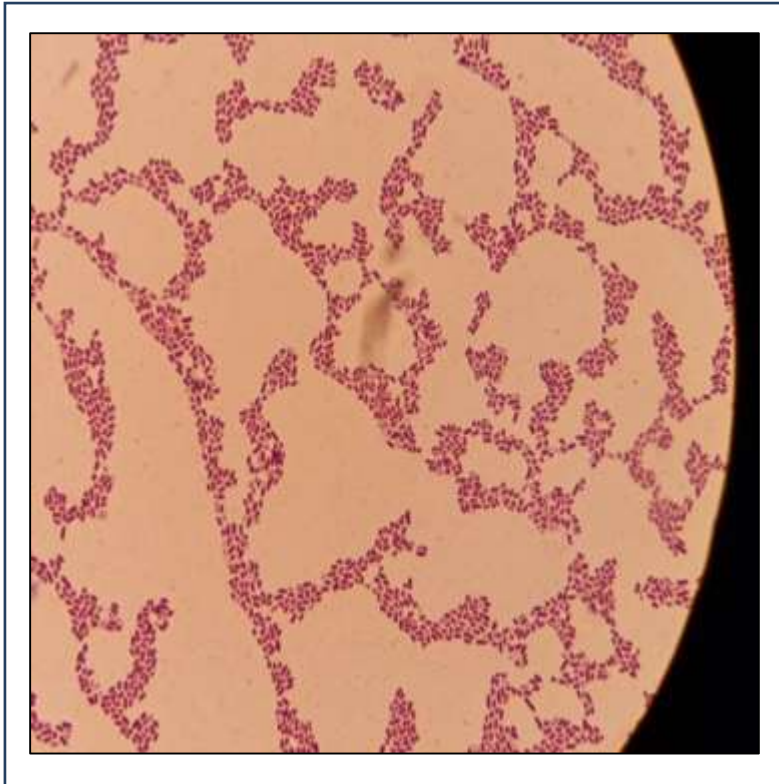


Figure 19. Résultat de l'observation microscopique des colonies obtenues sur milieu Mac Conckey après coloration de Gram (grossissement 10×100) (Photo originale, 2020).

A- Résultats des tests biochimiques

Tableau 3. Résultats des tests biochimiques des colonies obtenus.

Échantillons	Catalase	Oxydase	TSI					Mannitol-mobilité	
			Glu	Lac	Sac	Gaz	H ₂ S	Mannitol	mobilité
02	+	-	+	-	+	+	-	+	+
03	+	+	+	+	+	+	-	+	+

B- Galerie API 20 E**Pour l'échantillon 02**

L'espèce correspond aux résultats lus à partir de la galerie est :

Klebsiella pneumoniae (voir annexe 4).

Pour l'échantillon 03

L'espèce correspond aux résultats lus à partir de la galerie est :

Aeromonas hydrophila (voir annexe 5).

5.1.3. *Staphylococcus aureus***5.1.3.1. Caractéristiques Macroscopiques**

Les boîtes présentent des colonies noires de petite taille, ronde, à surface lisse et bords réguliers, plates, de consistance crémeuse et donnant des suspensions homogènes (Colonie S (Smooth- lisse)).

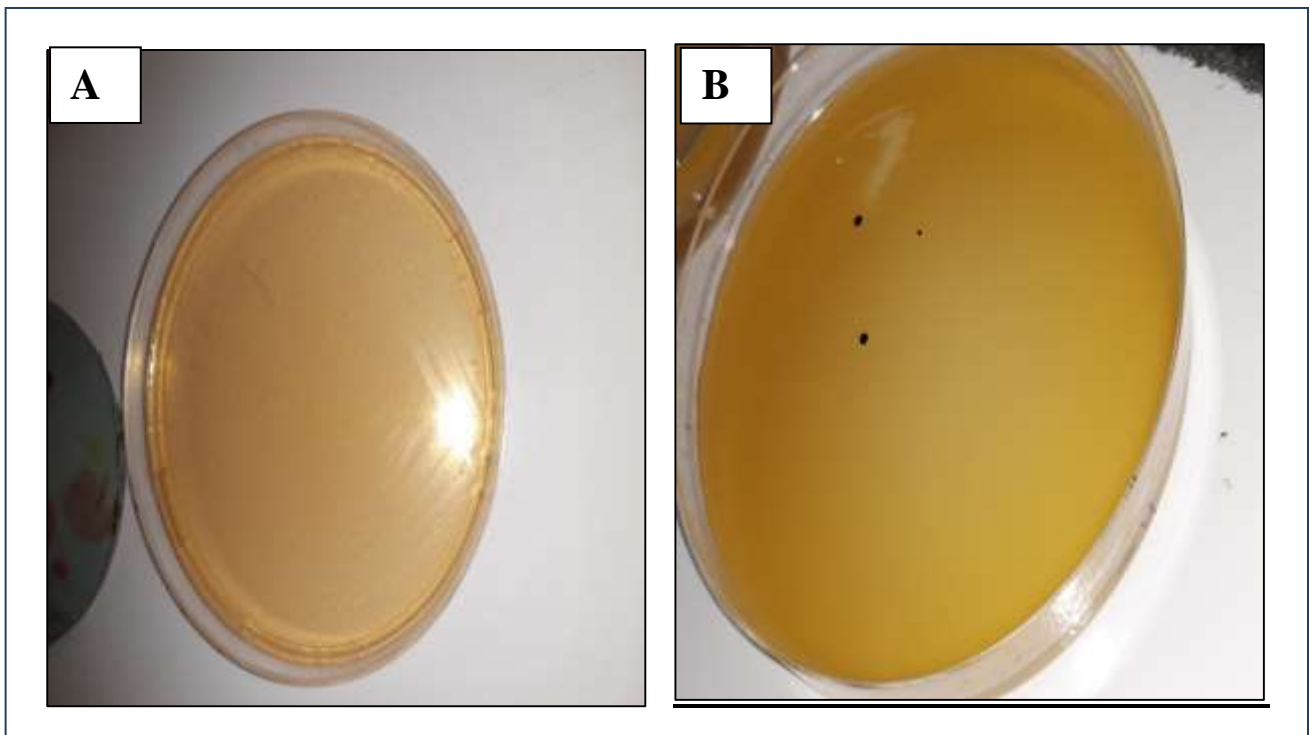


Figure 20. Résultat de recherche de *Staphylococcus aureus* sur milieu Baird Parker
(Photo originale, 2020).

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

5.1.3.2. 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 ci-dessous.

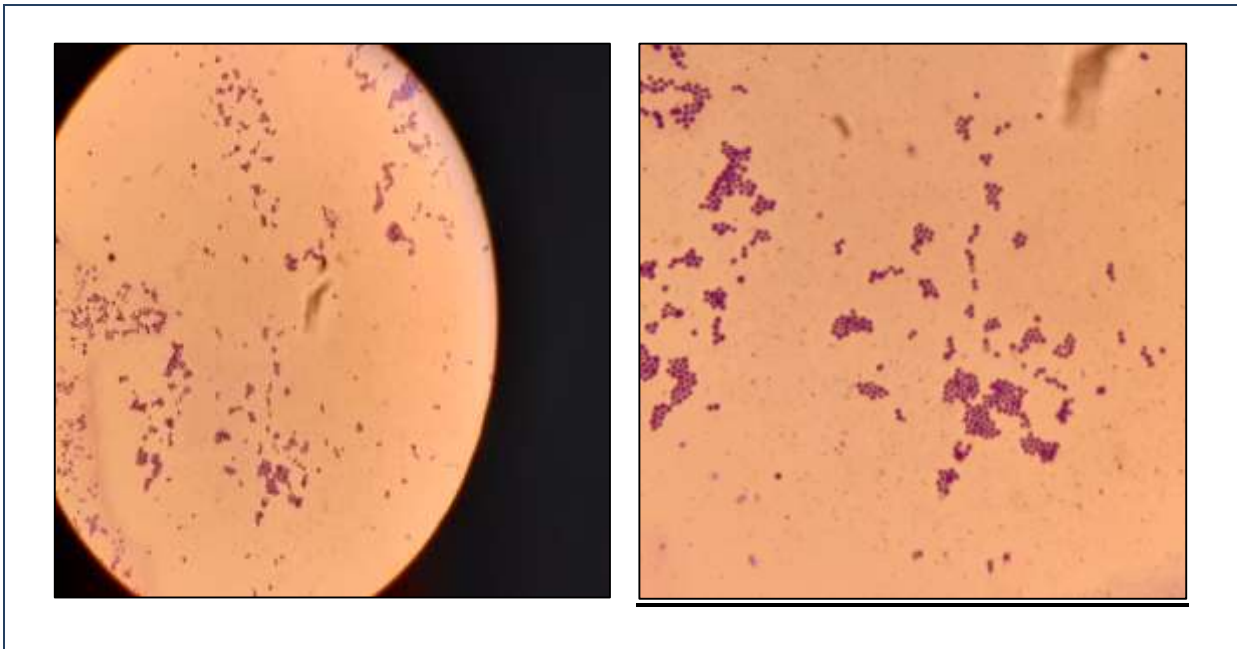


Figure 21. Observation microscopique de *Staphylococcus aureus* avec un grossissement 10×100 (Photo originale, 2020).

5.1.3.3. Tests biochimiques (confirmation)

A- Test catalase

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

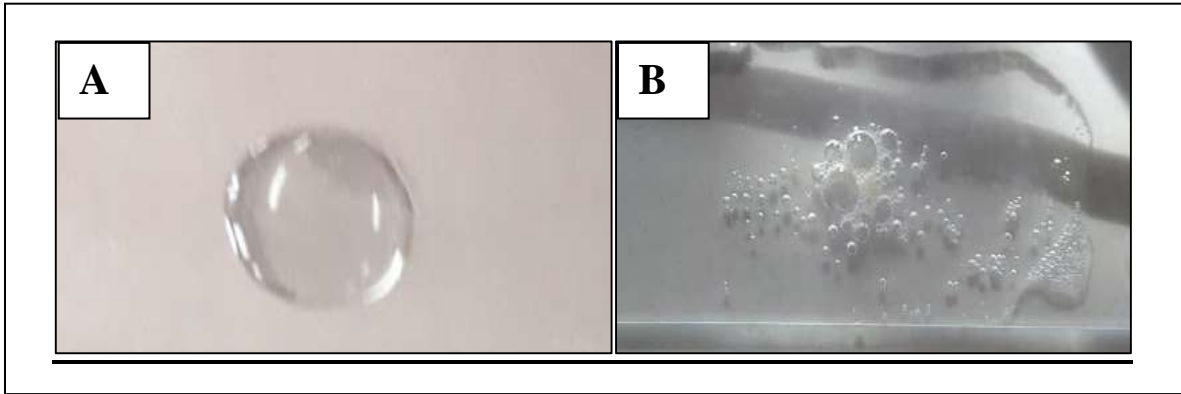


Figure 22. Résultat du test catalase (photo originale, 2020).

A. Témoin ; **B.** Présence de bulle de gaz.

B- Test coagulase

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

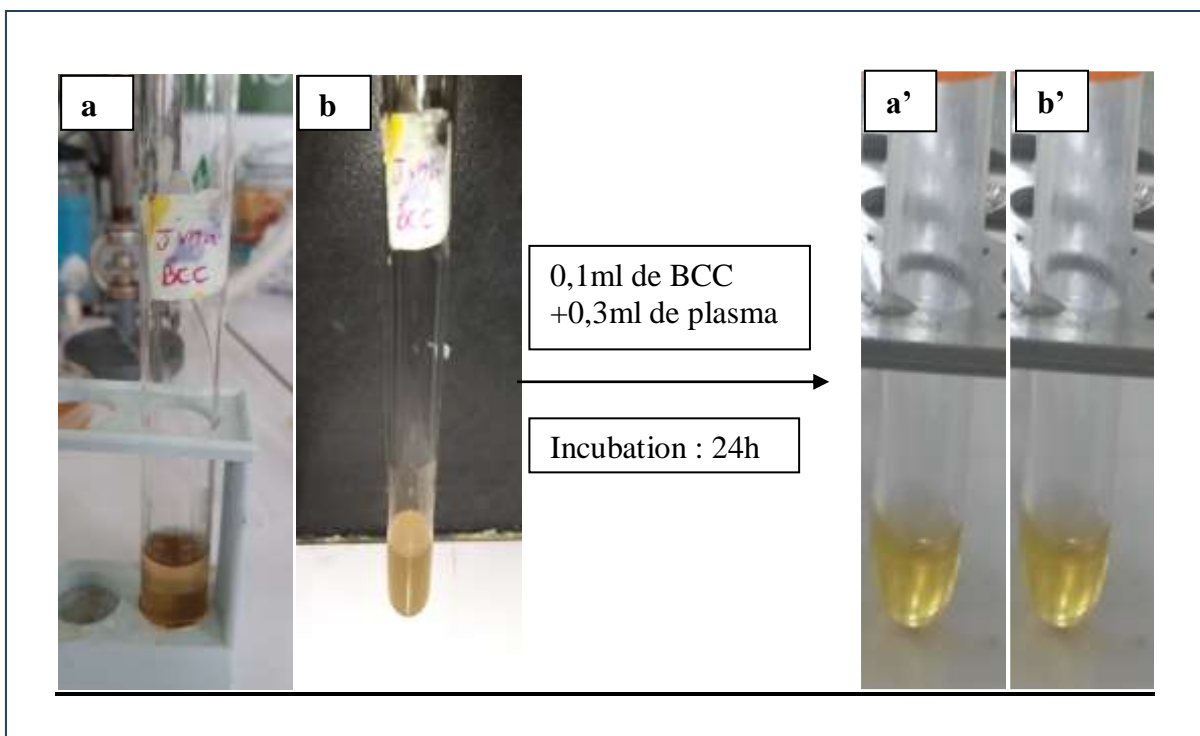


Figure 23. Résultat d'incubation des souches de *Staphylococcus aureus* en BCC.

(Photos **a** et **b**) et le test coagulase (photos **a'** et **b'**) (Photos originales, 2020).

a. Avant l'incubation sur milieu BCC; **b.** Après l'incubation (présence de trouble).

a'. Témoin (négatif) ; **b'.**Après l'incubation (coagulase-).

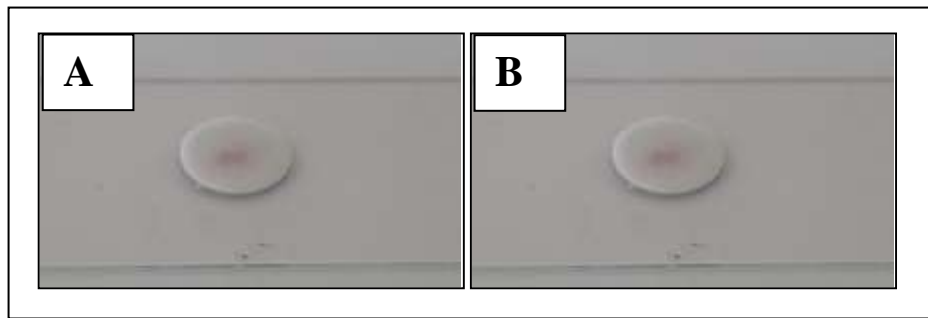
C-Teste oxydase

Figure 24. Résultat du test oxydase (Photo originale, 2020).

A. Témoin (-) ; **B.** Après l'ajout de la souche (pas de coloration violette(-)).

5.1.4. *Clostridium sulfito-réductrice*

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

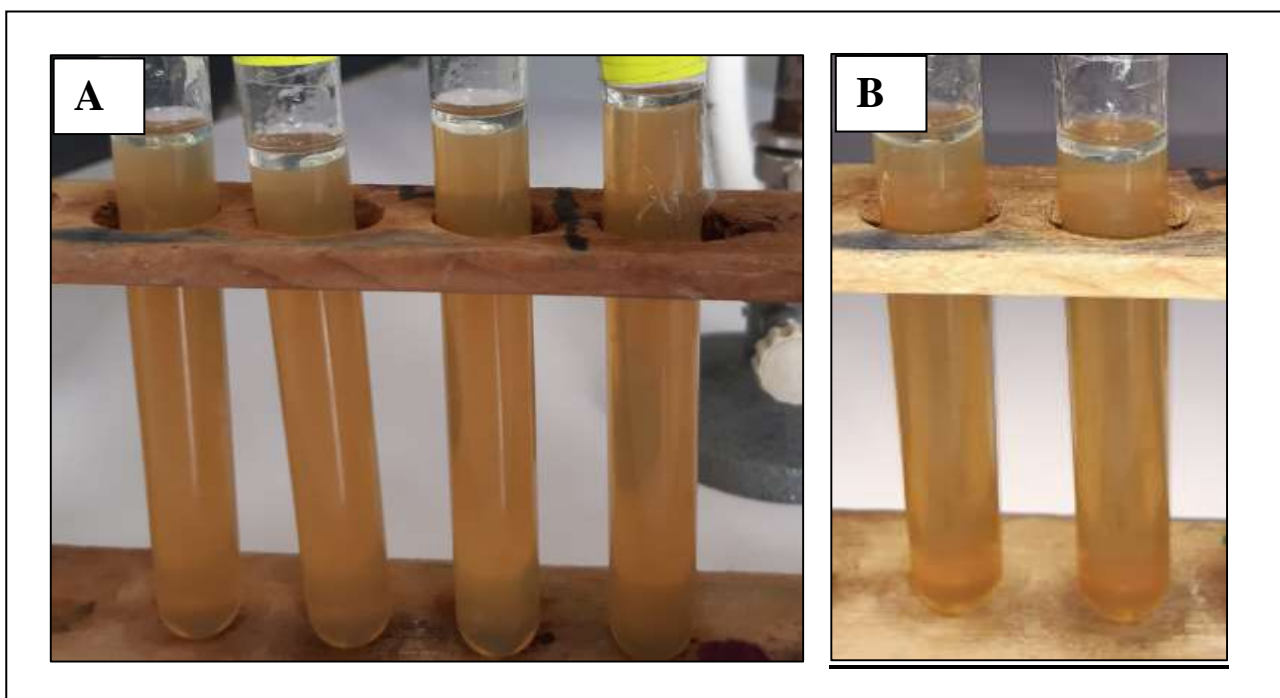


Figure 25. Résultats de recherche des spores de *Clostridium sulfito réducteur* (Photo originale, 2020).

A. Témoin (négatif) ; **B.** Après l'incubation (absence de colonies).

5.1.5. *Salmonella*

5.1.5.1. Caractéristiques Macroscopique

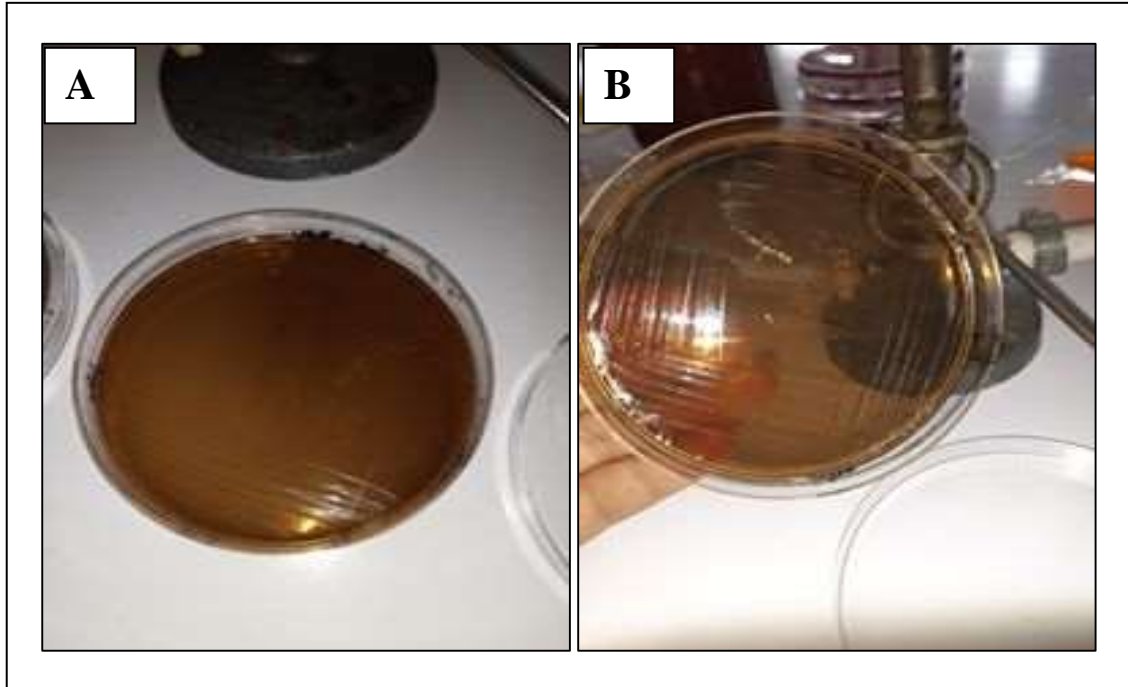


Figure 26. Résultat de recherche des *salmonella* sur la gélose SS
(Photo originale, 2020).

A. Avant l'incubation ; **B.** Après l'incubation (absence des colonies).

5.2. Résultats des analyses de la flore fongique

5.2.1. Caractéristiques Macroscopiques

A.1. Genre *Aspergillus sp*



Figure 27. Genre *Aspergillus sp*(Photo originale, 2020).

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 (Chabasseet *al.*, 2002) ou elle a isolé des souches d'*Aspergillus* sur gélose Sabouraud avec les même caractères qu'on a trouvé. En 2007 Tabuc a décrit les caractères culturaux 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. Donc les colonies sont blanches puis jaunes et en fin granuleuses noires.

A.2. *Aspergillus sp*

Figure 28. Genre *Aspergillus sp*(Photo originale, 2020).

Les colonies présentent les caractères suivants : la couleur blanche puis jaune à jaune-vert, une colonie duveteux à poudreux.

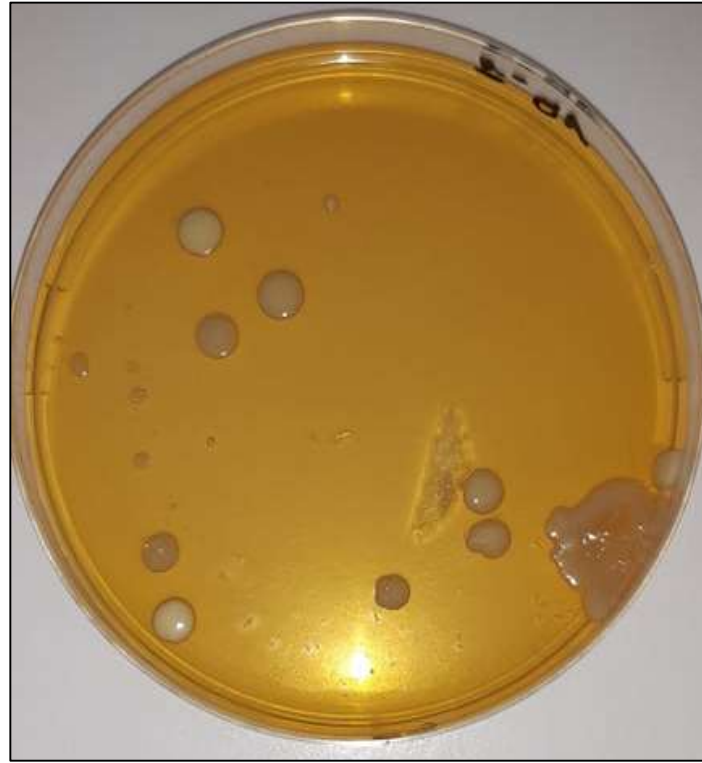
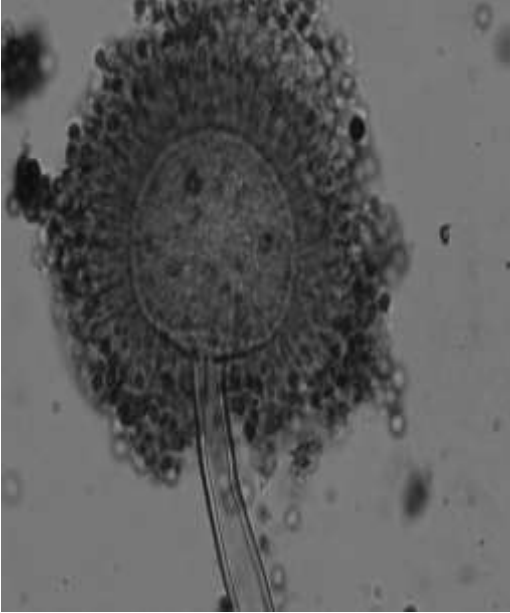
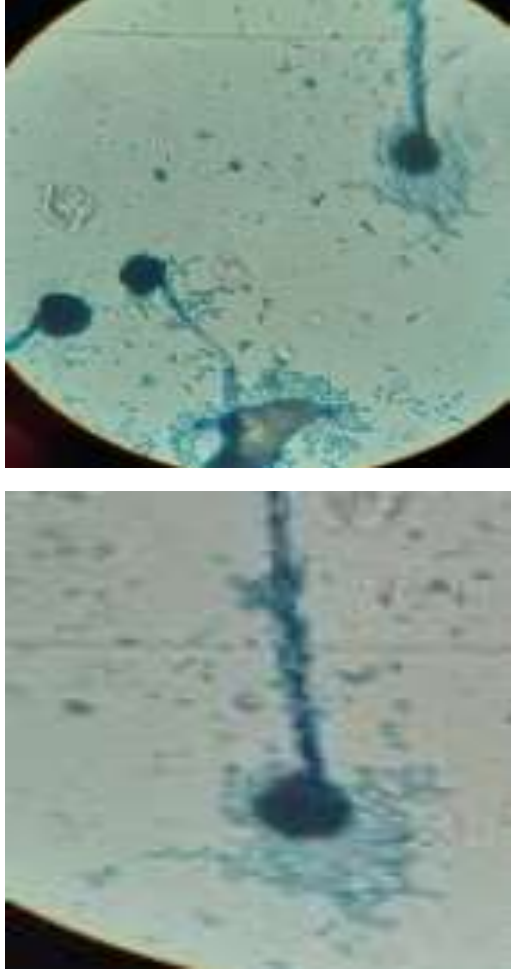
B. *Saccharomyces sp*

Figure 29. Levure (*Saccharomyces*) sur la gélose Sabouraud (Photo originale, 2020).

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.

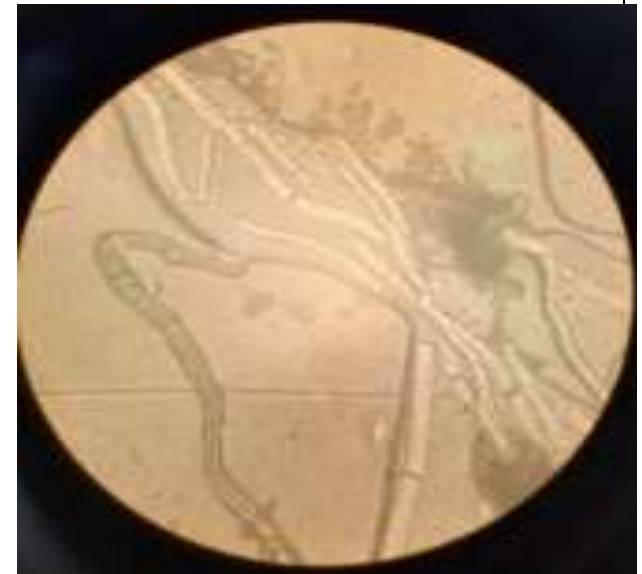
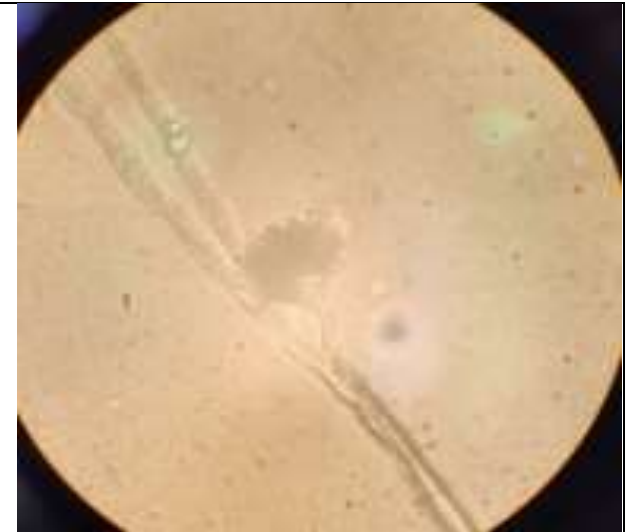
5.2.2. Caractéristiques microscopiques

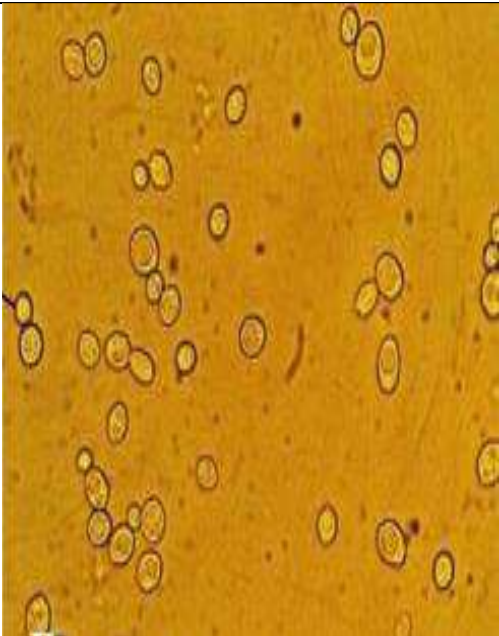
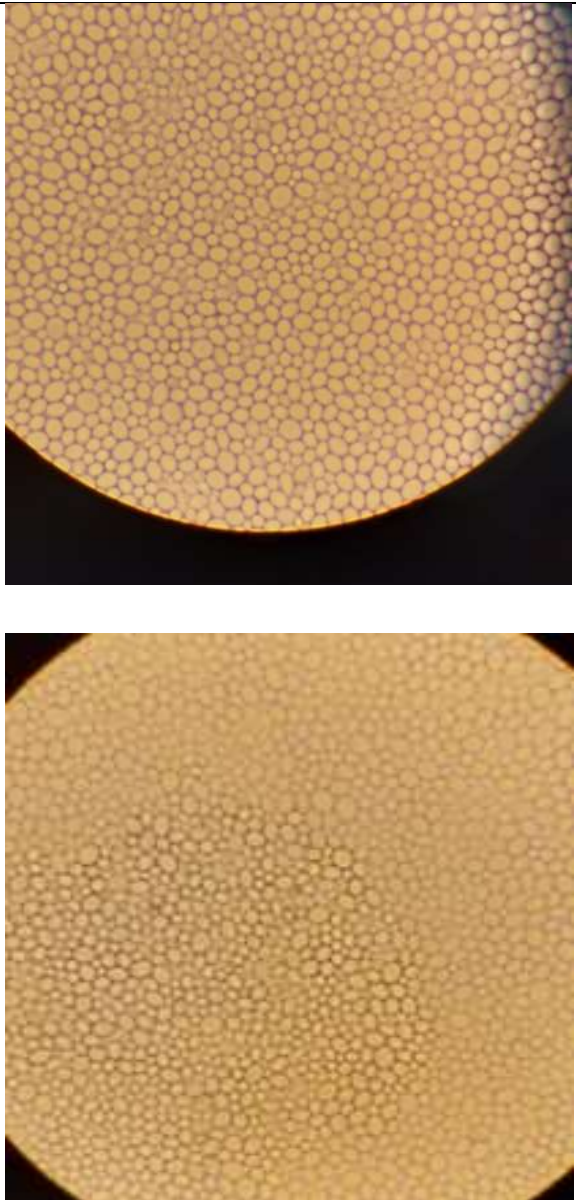
Tableau 4. Résultats de dénombrement et interprétation de présence de germes.

Genres	Aspects microscopiques	Photos de référence	Résultats obtenus
<i>Aspergillus sp</i>	<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. -Les résultats obtenus confirment que la souche observée répond à la morphologie d' <i>Aspergillus niger</i>. 		

Aspergillus sp

-Les filaments constituant le mycélium sont présentés en forme des siphons (filaments non septés), avec la formation des conidiospores à l'extrémité des siphons (forme de parasol).



<p><i>Saccharomyces sp</i></p>	<p>-Les résultats obtenus 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 individual yeast cells of Saccharomyces sp. The cells are roughly spherical and appear to be in various stages of budding. Some cells show a distinct nucleus and a smaller bud cell attached to the main cell. The background is a uniform light brown color.	 Two circular micrographs showing a dense population of yeast cells. The top image shows a large number of small, spherical cells packed closely together, with some larger cells visible. The bottom image shows a similar dense population of cells, but with a slightly different appearance, possibly indicating a different stage or condition of the culture. Both images have a dark background around the circular field of view.
--------------------------------	--	--	---

5.3. Présentation et discussion des résultats de dénombrement

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

Germe recherché	FTAM (germes/g) [9.10 ⁵ -3.10 ⁶]		<i>S. aureus</i> (germes/g) [3.10 ² -10 ³]		ASR (germes/g) [30-100]		<i>Salmonella</i> (Germe/25g)		Levures & moisissures [1000]		Conformité
	N	Intr	N	Intr	N	Intr	N	Intr	N	Intr	
1	1.2.10 ⁴	S	00	S	00	S	00	S	00	S	C
2	4.6.10 ⁵	S	00	S	00	S	00	S	00	S	C
3	2.4.10 ⁵	S	00	S	00	S	00	S	00	S	C

N: charge microbienne, **Intr:** interprétation, **S:** satisfaisant, **A:** acceptable,

IN : insatisfaisant, **C :** conforme, **NC :** non conforme.

5.3.1. Variation de niveau de contamination en fonction de germes

5.3.1.1. Flore Mésophile Aérobie Total à 30°C

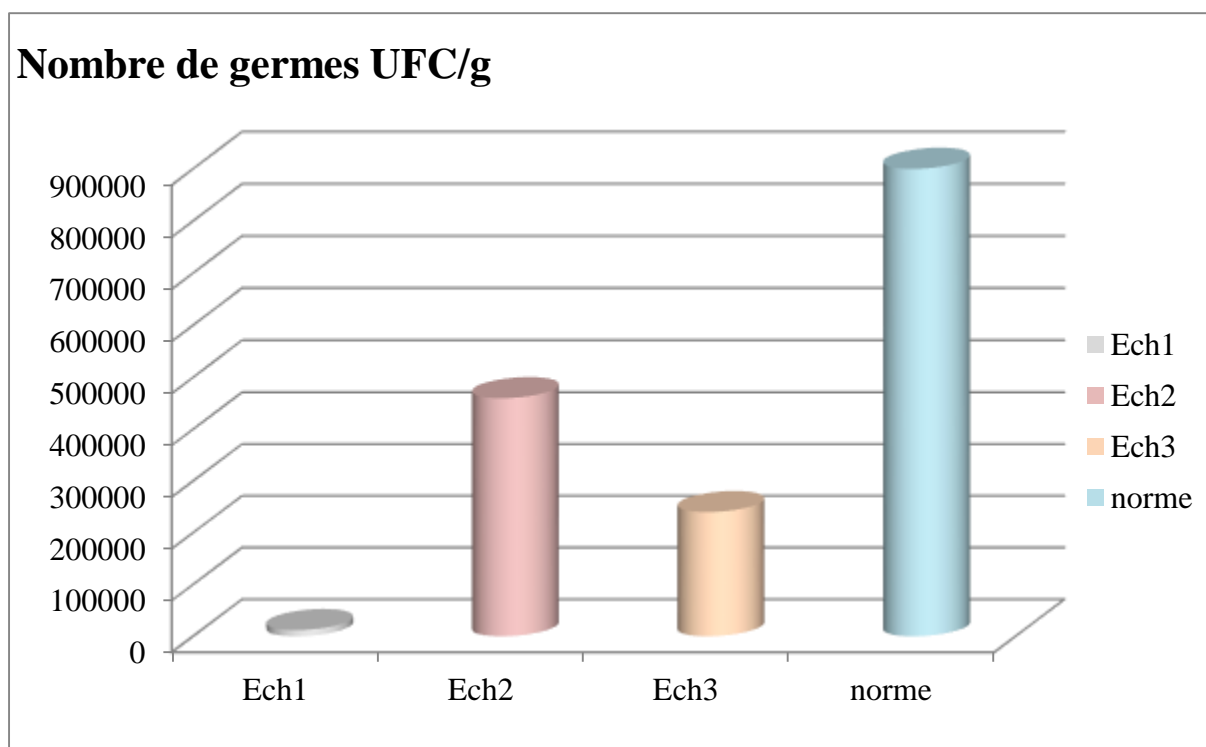


Figure 30. Répartition des niveaux de contamination des Mini donuts par les FTAM.

Les résultats obtenus après le dénombrement des flores mésophiles totaux sont mentionnés dans le graphe. Il ressort de ce graphe que la charge des FTAM dans tous les échantillons n'a pas dépassé les normes maximales suggérées par la réglementation Algérienne (les résultats sont satisfaisants à 100%).

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 les mini donuts. L'absence des échantillons non satisfaisants indique le respect des conditions de conservation.

5.3.1.2. *E. coli*

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 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.

Autres Entérobacteriaceae sont isolées :

- *Klebsiellapneumoniae*
- *Aeromonashydrophila*

5.3.1.3. *Staphylococcus aureus*

Les résultats obtenus après dénombrement des *Staphylococcus aureus* sont mentionnés dans le tableau 5.

Il ressort de ce tableau que la charge des *Staphylococcus aureus* dans tous les échantillons n'a pas dépassé les normes maximales suggérées par la réglementation Algérienne (les résultats sont satisfaisants à 100%).Ce résultat n'est pas comparable à celui obtenu par Sami *et al* en 2013.

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.

5.3.1.4. Anaérobies Sulfito-Réductrices

Les résultats obtenus après le dénombrement des *Clostridium Sulfito-Réducteur* sont mentionnés dans le tableau 5.

Absence totale des *Clostridium Sulfito-Réducteur* dans tous les échantillons, ce résultat est similaire à celui trouvé par Kindji en 2008. Ce résultat pourrait s'expliquer par l'efficacité du nettoyage-désinfection, une cuisson suffisante des denrées.

5.3.1.5. *Salmonella*

Les résultats obtenus après le dénombrement des salmonelles sont mentionnés dans le tableau 5.

Aucune salmonelle n'a été trouvée dans l'ensemble des échantillons analysés, celui est en concordance avec les résultats obtenus par SoltanDalalet *al.* (2010) et Pajohi-Alamotiet *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 Hassanzadazaret *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.

5.3.1.6. Flore fongique (levures et moisissures)

Les résultats obtenus après le dénombrement de la Flore fongique sont mentionnés dans le tableau 5.

Les résultats indiquent un taux de satisfaction de 100%, cela est totalement différent de celui trouvé par Kumaret *al.* en 2011, qui lors d'une étude portant sur 40 échantillons de pâtisseries ont trouvé des taux de non satisfaction varient entre 75% et 100% vis-à-vis les levures et moisissures.

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, les contenants appliqués pour la transformation, le stockage à long terme et la distribution des produits et 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).

Dans notre étude, trois genres ont été trouvés : *Aspergillus sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Aspergillus niger.*

5.4. Discussion générale

Les Mini donuts présentent une source plus ou moins importante d'infection liée aux compositions riches en lipides, glucides et protéines.

Les germes recherchés sont présent comme suit :

- La présence des FTAM dans les échantillons 1, 2 et 3 est liée à l'exposition à l'aire libre et à l'environnement (Anihouviet *et al.*,2006).Le résultat de dénombrement des FTAM montre que leur charge microbienne ne dépasse pas la norme.
- D'autre part on note l'absence totale des *salmonelles*, *Staphylococcus aureus* (couagulase+), *Clostridium sulfito réducteur*.
- Pour *E.coli*, tous les échantillons sont de qualité satisfaisante ce qui indique l'absence de contamination fécalerécente. Deux germes ont été isolés : *K.pnoumoniae* et *A.hydrophyla*.
- Pour la flore fongique, on amarqué un taux de satisfaction de 100%. On a isolé deux genres :*Aspergillus sp* et *saccharomyces sp*.

D'après les résultats obtenus durant notre étude, on peut dire que les Mini donuts consommés dans les sites étudiés sont de bonne qualité.

Conclusion

Conclusion

Ce travail réalisé sur différents types de Mini donuts (Mini donuts à l'ancienne, Mini donuts simple glacé au chocolat liquide noir et blanc, Mini donuts à la noix de coco, Mini donuts fruit, Mini donuts royal) a pour objectif : l'appréciation de leur qualité microbiologique par le dénombrement des germes suivants : FTAM, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, anaérobies sulfite-réducteurs, *Salmonella*, flore fongique.

Les résultats des analyses microbiologiques ont révélé que les 03 échantillons étudiés sont de qualité satisfaisante.

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

- 100% pour la FTAM à 30°C.
- 00% pour *E.coli*.
- 67% pour les Coliformes.
- 00% pour *Staphylococcus aureus*.
- 00% pour *Salmonella*, ASR.
- 33% pour les levures.
- 67% pour les moisissures.

100% 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 Mini dontus 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. AFNOR V 08-057-1. 2004. Microbiologie des aliments : Méthode de routine pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 37°C Technique avec confirmation des colonies, Paris, 15 p.
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-Humam N., 2019. Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* And *Staphylococcus aureus* in Ready-to-Eat Food in Al-Ahsa Province, Saudi Arabia. *Journal of Nutrition & Food Sciences* 9: 2.
5. Anihouvi V. B., Ayernor G. S., Hounhouigan J.d. Sakyi-dawson E. 2006. Quality.
6. Azaizia H., Selaimia R., 2013. Étude de la qualité physico-chimique et bactériologique des eaux de garaet chichaya : complexe de zones humides de guerbès-sanhadja (w.skikda). Université du 8 mai 1945 Guelma, Département de Biologie, mémoire de master, option : santé, eau et environnement : p 29.
7. Balde J. 2002. Étude de la qualité microbiologique des repas servis à l'hôpital principal de Dakar (HPD). Thèse docteur en médecine vétérinaire (diplôme d'état), Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD) , 126p.
8. Benaissa A., 2011. Étude de la qualité microbiologique des viandes cameline et ovine conservées selon différents modes. Université Kasdi Merbah Ouargla. Mémoire de magister : 141 p.
9. Bleu. 2011. pâtisserie and baking foundations, the chef of le cordon bleu. 1st edition. Delmar Cenage Learning, USA, p. 34.
10. Carbonnelle D., Kouyoumdjian S., Audurier A., 1988. Bactériologie médicale techniques usuelles. Édition Méd. Mal. Inf. France : p251.
11. Carip C., Salavert M. H., Tandeau A. 2015. Microbiologie, hygiène et droit alimentaire. 2ème édition. Lavoisier TEC & DOC, Paris. 475p.

12. Dalmas G., Gallay A., Espie A., Haeghebaert S., Pihier N., Weill F., De Valk H., Vaillants V., Desenclos J. 2006. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005, p. 51-52.
13. 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.
14. Delarras C., 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition. Lavoisier: Tec & Doc. Paris : 463 p.
15. Delarras C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou le contrôle sanitaire. Rue lavoisier : Tec & Doc. 475p.
16. Dennaï N., Kharrati B., El yachioui M., 2001. Appréciation de la qualité microbiologique des carcasses de bovins fraîchement abattus. Université Constantine, Département de Biologie : 145 p.
17. Diallo M. 2010. Contribution à l'étude de la qualité bactériologique des repas servis par Dakar Catering selon les critères du groupe SERVIAIR. Thèse de doctorant vétérinaire, université Cheikh Anta Diop de Dakar, p. 04, p. 75.
18. 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.
19. 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.
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., Galzy P., 1980. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaire. Edition. L'Usine Nouvelle : 239 p.

23. Guiraud J., Rosec J., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Edition. AFNOR : p 110.
24. Guiraud J.P. 2012. Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD, Paris, pp.79-98.
25. 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.
26. 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.
27. Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI). 2014. Microbiological of pastry and confectionary products-Spécifications and test method. No. 2395.
28. Institut pasteur. 1999. Guide pratique d'analyse microbiologique des denrées alimentaire.
29. ISO 6887-1. 1999. Microbiologie des aliments : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales. 5p.
30. ISO 483. 2003. Microbiologie des aliments : Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes – Technique par comptage des colonies à 30°C. 9p.
31. Jay J. M., Loessner M. J., Golden D. A. 2008. Modern food microbiology. Springer Science & Business Media, USA, p.54.
32. Joffin G., 2001. Microbiologie Technique 1. Dictionnaire des techniques. Editions. CRDP d'Aquitaine : 320 p.
33. John T. 2006. Donuts: an American passion. University of Pennsylvania . 176p.
34. 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.
35. JORA (Journal officiel de la République algérienne). 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.
36. 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.

37. 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*.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Lebres E., 2002. Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments « Microbiologie des eaux, des boissons et des produits de la mer ». Institut Pasteur d'Algérie : 34 p.
43. Leclerc., 1996. Microbiologie général. Edition. Doin, France : 368 p.
44. Le Loir Y., Baron F., Gautier M. 2003. Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genet Mol Res* 2(1) : 63-76.
45. Lightfoot N., 2002. Analyses microbiologiques des aliments et de l'eau. Directive pour l'assurance qualité. Edition. Lavoisier, France : 387 p.
46. Madigan T. M. & Martinko J. M. 2007. Biologie des microorganismes. 11th Edition, Université carbondale de l'illinois du sud. Pearson, Paris. 1047p.
47. 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.
48. Mfoapon njueya M. L. 2006. Etude de la contamination des surfaces dans la restauration collective universitaires de Dakar. Thèse de doctorat vétérinaire d'état. Université cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal, p.28.
49. 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.
50. 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
51. 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.
52. Norme française NM 08.0.116. 2004. Recherche de Salmonella.
53. Norme française NM 08.0.121, ISO 4833. 2004. Dénombrement des microorganismes par comptage des colonies à 30°C.
54. Oudot C. 1999. La transformation des aliments. Casteilla, Paris. 79p.
55. 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.
56. Pull R. 2008. *Glazed America: A History of the Doughnut*. University of Florida Press, Department of Geoscience: 224 p.
57. Ray B. 2004. Fundamentals of Food microbiology. 3rd Edition, CRC Press, Boca republic of Benin. *African Journal of food agriculture, nutrition and development* 6: republic of Benin.
58. Rozier J., Calier V., Bolnot F., 1985. Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments. Édition. Sapaic, paris : 230 p.
59. 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.
60. Shiningeni D., Chimwamurombe P., Shilangale R., Misihairabgwi J., 2018. Prevalence of pathogenic bacteria in street vended ready-to-eat meats in Windhoek, Namibia. *Meat Science*. 6 p.
61. 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.

62. 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.
63. Sperber W. H. & Doyle M. P. 2009. *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages, food microbiology and food safety*. Springer Science & Business Media, New York. 380p.
64. 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.

Annexes

Annexe 1

Milieux de culture et réactifs utilisés (Delarras, 2007).

<p><input type="checkbox"/> Eaupeptonée tamponnée pH = 7,2 Peptone (20g). Chlorure de sodium (5g). Phosphate di sodique (9g). Phosphate mono potassique (1, 5g). Eau distillée (1000ml).</p>	<p><input type="checkbox"/> Gélose PCA pH =7.2 Peptone (5g). Extrait de viande (2,5g). Glucose (facultatif : présent dans le milieu PCA) (1g). Gélose (15g).</p>
<p><input type="checkbox"/> Mac conkey pH = 7.1 Peptone bactériologique (20 g/l). Sels biliaires (1.5 g/l). Chlorure de sodium (5 g/l). Lactose (10 g/l). Rouge neuter (0.03 g/l). Cristal violet (0.001 g/l). Agar (15 g/l). Eau distillée (1000 ml).</p>	<p><input type="checkbox"/> Gélose viande foie (VF) pH = 7,6. Extrait viande –foie (30g). Glucose (2g). Amidon (2g). Gélose (12g). Eau distillée (1000ml).</p>
<p><input type="checkbox"/> Gélose Baird Parker pH = 7,2 Peptone (10,0g). Extrait de viande de bœuf (4,0g). Extrait de levure (2,0g). Pyruvate de sodium (10,0g). Glycocolle (12,0g). Chlorure de lithium 5,0g. Agar-agar (20,0g). Eau distillée (1000ml). A ajouter en conditions stériles juste avant l'ensemencement (sinon détruit par l'autoclavage) : Émulsion de jaune d'oeuf(<i>stérile</i>) : (50,0ml). Tellurite de potassium (<i>sterile</i>0,1g).</p>	<p><input type="checkbox"/> Sabouraud pH= 5.6 Peptone de gélatine (10g). Glucose (20g). Agar (17). Eau distillé (1000ml). Après l'autoclavage et avant l'écoulement ajouter (Gentamycine) : pour 1L de milieu 0.004 ml de Gentamycine</p>













<p><input type="checkbox"/> Clark et Lubs (Bouillon)</p> <p>pH = 7.5</p> <p>Peptone (5.0 g/l).</p> <p>Glucose (5.0 g/l).</p> <p>Hydrogénophosphate de potassium (5.0 g/l).</p> <p>Eau distillée (1000 ml).</p>	<p><input type="checkbox"/> Mannitol Mobilité</p> <p>pH= 8,1</p> <p>Peptone trypsique de viande (20g).</p> <p>Mannitol (2g).</p> <p>Nitrate de sodium (1g).</p> <p>Rouge de phénol à 1% (4ml).</p> <p>Agar (4g).</p> <p>Eau distillée (1000ml).</p>
<p><input type="checkbox"/> TSI : (Triple SugarIron)</p> <p>pH = 7,4 ± 0,2 à 25°C</p> <p>Tryptone (14,0 g).</p> <p>Extrait autolytique de levure (3,0 g).</p> <p>Extrait de viande (3,0 g).</p> <p>Glucose (1,0 g).</p> <p>Lactose (10,0 g).</p> <p>Saccharose (10,0 g).</p> <p>Chlorure de sodium (5,0 g).</p> <p>Thiosulfate de sodium (0,3 g).</p> <p>Citrate ferrique ammoniacal (0,3 g).</p> <p>Rouge de phénol (24,0 mg).</p> <p>Agar agar bactériologique (13,5 g).</p> <p>Eau distillée (1000ml).</p>	<p><input type="checkbox"/> Gélose SS</p> <p>pH = 7.</p> <p>Peptone (10g).</p> <p>Extrait de viande (5g).</p> <p>Lactose (10g).</p> <p>Sels biliaires (6g).</p> <p>Citrate de sodium (8,5g).</p> <p>Citrate de fer ammoniacal (1g).</p> <p>Thiosulfate de sodium (8,5g).</p> <p>Rouge neutre (25mg).</p> <p>Vert brillant (0,33mg).</p> <p>Gélose (13g).</p> <p>Eau distillée (1000ml).</p>



Réactifs utilisés

<p><input type="checkbox"/> Réactif de Vosges Proskauer (VP)</p> <p>Pour la recherche de l'acétoïne.</p> <p>VP1, VP2.</p>	<p><input type="checkbox"/> Réactif de Kovacks</p> <p>La mise en évidence de la production d'indole.</p>
<p><input type="checkbox"/> Réactif IND</p> <p>pour la recherche del'indole.</p>	<p><input type="checkbox"/> Rouge de Methyl.</p> <p><input type="checkbox"/> Réactif TDA</p> <p>pour la recherche dutryptophane désaminase</p>
<p><input type="checkbox"/> Les colorants</p> <p>Violet de, Gentiane, Lugol, Ethanol, Fushine, Huile d'immersion.</p>	<p>Réactifs de Griess pour les nitrites</p> <p>NIT 1.</p> <p>NIT 2.</p>

Annexe 2

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20^E

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture directe Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		

IND	Pyruvate de sodium	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe Lecture indirecte dans la cupule GLU		
NO2- / N	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de 1		

Annexe 3

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

Annexe 4



Résultats de la galerie API 20E pour la souche 01.

Annexe 5



Résultats de la galerie API 20E pour la souche 02.

Annexe 6

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 qualitatifs "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 7

- 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 : « *Résultats 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.

ملخص

تعتبر الدونات الصغيرة من المنتجات ذات القيمة الغذائية العالية. ومع ذلك ، فهي سبب شائع للتسمم الغذائي. أجريت هذه الدراسة على 03 عينات لأنواع مختلفة من الكعك الصغير (ميني دونات قديم الطراز ، ميني دونات مزجج بالشوكولاتة السائلة البيضاء والداكنة ، كعك جوز الهند الصغير ، دونات فواكه صغيرة ، ميني رويال دونات). تم أخذ عينات عشوائية من مركز ولاية بسكرة بهدف تقييم الجودة الميكروبيولوجية من خلال عد الجراثيم الملوثة المختلفة. كشفت التحليلات أن 100% من الدونات الصغيرة كانت مرضية جميع العينات كانت موجبة بالنسبة لمجموع القولونيات 100% ، يليها الفطريات 67% ، الخمائر 33% ، مع غياب كلي للسالمونيلا و الكلوستريديوم، الإشريكية القولونية . في هذه الدراسة تم عزل نوعان من الفطريات: *Aspergillus sp*, *Saccharomyces sp*

الكلمات المفتاحية: الدونات الصغيرة ، التحليلات الميكروبيولوجية، الجودة، النظافة.

Résumé

Les Mini donuts 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 03 échantillon de différents types de Mini donuts (Mini donuts à l'ancienne, Mini donuts simple glacé au chocolat liquide noir et blanc, Mini donuts à la noix de coco, Mini donuts fruit, Mini donuts royal), les prélèvements ont été faits au hasard dans le centre de la wilaya de Biskra dont l'objectif est d'évaluer la qualité microbiologique des Mini donuts par dénombrement de différents germes de contamination. Les analyses ont révélé que 100% de Mini donuts étaient satisfaisants. Tous les échantillons étaient positifs pour les FTAM (100%), suivi par les moisissures (67%), les levures (33%), Absence totale de *salmonella*, *E.coli*, *Staphylococcus aureus* et ASR. Dans cette étude 2 genres de flore fongiques ont été isolés : *Aspergillus sp*, *Saccharomyces sp*.

Mots clés : Mini donuts, analyses microbiologique, qualité, hygiène.

Abstract

Mini doughnuts are considered high nutritional value food products. However, they are a common cause of food poisoning. This study was conducted on 03 samples of different types of Mini doughnuts (old-fashioned mini doughnuts, mini doughnuts iced with dark and white liquid chocolate, mini coconut doughnuts, mini fruit doughnuts, mini royal doughnuts), the samples were randomly collected in the center of the wilaya of Biskra whose objective is to evaluate the microbiological quality of Mini doughnuts by counting different germs contamination. The analysis revealed that 100% of Mini doughnuts were satisfactory. All samples were positive for FTAM (100%), followed by molds (67%), yeasts (33%), total absence of *E.coli*, *Staphylococcus aureus* and ASR. In this study 2 fungal flora genera were isolated *Aspergillus sp*, *Saccharomyces sp*.

Key words: Mini doughnut, microbiological analyzes, quality, hygiene.