



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
Entrer votre filière
Entrer votre spécialité

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Abir HAMMI et Souheila HARABI

Le : lundi 3 juillet 2023

Thème

Analyse de la qualité microbiologique de pain commercialisé dans la wilaya de Biskra

Jury :

Mdm Asma MEDDOUR	MCB	Université de Biskra	Président
Mdm Kenza MOHAMMEDI	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Mdm Manal DJOUAMAA	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu ALLAH, le tout puissant de nous avoir donné courage, patience et santé pour achever ce modeste travail et durant ces longues années d'étude. (EL HAMDOULILLAH).

*Nos remerciements s'étendent également à notre encadreur **Mme.Mohammedi Kenza** pour nous avoir proposé ce thème si intéressant, et pour ses conseils, ses bonnes remarques et ses bonnes directions au cours la période de travail.*

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

*Nous exprimons nos plus vifs remerciements aux techniciennes de laboratoire de microbiologie de biologie pour leurs orientations, leurs conseils, leurs aides : **Alima, Oussama ...etc***

Nous adressons également nos remerciements à tous les professeurs et enseignants qui nous ont beaucoup encouragés et soutenus depuis le début de la première session de nos études jusqu'à la fin de la cinquième année universitaire.

Enfin, nous exprimons notre sincère et profonde gratitude à tous ceux qui ont été associés, de près ou de loin, au développement de cette humble œuvre.

Dédicace

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que : **Je dédie ce mémoire à :***

***A mon très cher Père Boubakeur:** Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.*

*A la personne la plus chère de mon cœur, **ma mère, Fella**, qui m'a encouragé à aller de l'avant et m'a donné tout son amour et son prières pour reprendre mes études.*

A ma chère sœur jumelle ...Omaima

A mes charmantes sœurs...Ahlem, Imane

A mon frère adoré Brahim et sa femme

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, que ce travail soit le fruit de Vos aide précieuse pendant toute ces années.....

A ma chère binôme Abir ,Merci de me soutenir, et pour votre sympathie.

*Mes très chères amies **Rahima Chekkal, Malak Benhafid, Narimene Djellab, Rania kebkoub et Abdelbassat Djeddoul.** Je suis très heureuse et fière de ces années que j'ai passées avec vous, ainsi que pour les moments que nous avons passés ensemble...Qu'Allah vous protège et vous accorde tout le succès*

À tous mes amis de promo 2022-2023.

Toutes les personnes merveilleuses de ma vie.

SouheiLa

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 Saïd

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

Ma chère mère Chafia

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

... Mes charmantes sœurs...

Sahar, Amira, Nour et

A ses mariés Mounir, Ali, Abd Errazzak,

Merci de me soutenir, et vos encouragements.

*A ma chère binôme **Souheila**, Merci de me soutenir, et pour votre sympathie et encouragements.*

A tous ceux-qui ont participé à ma réussite. A tous mes amis Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible.

Merci de me soutenir, et pour votre patience, et vos conseils précieuses que dieu vos protège tous.

Abir

Sommaire

Liste des Tableaux	I
Liste des Figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1: Généralités sur le pain commercialisé

1.1. Définition du pain commercialisé	2
1.2. Paramètres de la panification	2
1.2.1. Farine	2
1.2.2. Levure	2
1.2.3. Eau et Sel	2
1.3. Différentes étapes du procédé de panification	3
1.4. Qualité nutritionnelle et microbienne du pain	4
1.5. Détérioration du pain commercialisé	4
1.6. Risque pour la santé	5

Chapitre 2: Microbiologie du pain Commerciale

2.1. Sources de micro-organismes dans les aliments	6
2.2. Facteurs affectant la croissance microbienne	6
2.2.1. Environnement intrinsèque	6
2.2.1.1. Acidité, pH et pouvoir tampon	6
2.2.1.2. Activité de l'eau (a_w)	7
2.2.1.3. Teneur en éléments nutritifs	7
2.2.1.4. Potentiel redox (Eh)	7
2.2.2. Environnement extrinsèque	8
2.2.2.1. Température de conservation	8
2.2.2.2. Humidité relative de l'environnement	8
2.3. Germes responsables de la détérioration du pain commercial	8
2.3.1. Flore aérobie mésophile total (FTAM)	8
2.3.2. Les coliformes totaux	8
2.3.3. <i>Escherichia Coli</i>	9
2.3.4. <i>Staphylococcus aureus</i> à coagulase positif	9

2.3.5.	Clostridium sulfito-réducteur.....	9
2.3.6.	<i>Salmonella</i>	9
2.3.7.	Levures et moisissures.....	9
2.4.	Maladies transmises par le pain commercial.....	10
2.4.1.	Intoxication.....	10
2.4.2.	Infection.....	10
2.4.3.	Toxi-infection alimentaire.....	10

Chapitre 3: Matériel et méthodes

3.1.	Objectif du travail.....	11
3.2.	Matériel de laboratoire.....	11
3.3.	Méthodologie.....	11
3.3.1.	Echantillonnage et prélèvement.....	11
3.3.2.	Analyse microbiologique des échantillons collectés.....	12
3.3.3.	Germes recherchés.....	12
3.3.3.1.	Préparation des milieux de culture.....	12
3.3.3.2.	Préparation de la solution mère.....	13
3.3.3.3.	Dilutions décimales.....	13
3.3.4.	Recherche et dénombrement des différents microorganismes.....	14
3.3.4.1.	Recherche et dénombrement de la Flore Totale Aérobie Mésophile (FTAM) ...	14
3.3.4.2.	Recherche et dénombrement des coliformes totaux.....	15
3.3.4.3.	Recherche d' <i>Escherichia Coli</i>	16
3.3.4.4.	Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> à coagulase positif.....	17
3.3.4.5.	Recherche des spores des anaérobies sulfito-réducteurs (ASR).....	19
3.3.4.6.	Recherche et dénombrement de <i>salmonella</i>	20
3.3.4.7.	Recherche des levures et moisissures.....	22
3.3.5.	Identification microbiologique et tests complémentaires.....	23
3.3.5.1.	Caractères morphologiques.....	23
3.3.5.2.	Caractères enzymatiques.....	26
3.3.5.3.	Caractères biochimiques.....	27
3.4.	Lecture et interprétation des résultats.....	30
3.4.1.	Expression des résultats.....	30
3.4.2.	Méthode d'interprétation.....	30

Chapitre 4: Résultats et discussion

4.1.	Résultats des analyses microbiologiques.....	32
------	--	----

4.1.1.	Flore Mésophile Aérobie totale	32
4.1.1.1.	Aspect macroscopique.....	32
4.1.2	Coliforme totaux.....	33
4.1.2.1	Aspect macroscopiques	33
4.1.3.	<i>Escherichia coli</i>	33
4.1.3.1.	Aspect macroscopique.....	33
4.1.3.2.	Aspect microscopique	34
4.1.3.3.	Tests biochimiques	35
4.1.4.	<i>Staphylococcus aureus</i>	36
4.1.4.1.	Aspect Macroscopique	36
4.1.4.2.	Aspect microscopique	37
4.1.4.3.	Tests biochimiques	37
4.1.5.	<i>Clostridium sulfito-réductrice</i>	38
4.1.6.	<i>Salmonella</i>	39
4.1.6.1.	Aspect Macroscopique	39
4.2.	Résultats des analyses de la flore fongique	40
4.2.1.	Aspect Macroscopiques	40
4.2.2.	Aspect microscopiques.....	40
4.3.	Présentation et discussion des résultats de dénombrement.....	42
4.3.1.	Variation globale de niveau de contamination.....	43
4.3.2.	Variation de niveau de contamination en fonction de germes dans chaque site	44
	Conclusion.....	48
	Références Bibliographique.....	49
	Annexes	

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Plages de croissance de microorganismes au pH.....	6
Tableau 02 : plan d'échantillonnage.....	11
Tableau 03 : Références normatives des microorganismes.....	30
Tableau 04 : Résultats d'identification des germes par APi20 ^E	35
Tableau 05 : Résultats des tests biochimiques des colonies obtenus sur le milieu BP.....	38
Tableau 06 : Résultats des aspects macroscopiques et microscopiques du l'étalement sur milieu Saboraud.....	40
Tableau 07 : Résultats de dénombrement et interprétation de présence des germes.....	42

Liste des Figures

Figure 01: Etapes des procédées de panification	3
Figure 2: Pain commerciale.....	5
Figure 3: Etape de la préparation de la solution mère.....	13
Figure 4: Shéma de préparation des dilutions décimales.. ..	14
Figure 5: Shéma des étapes de recherche de la Flore Totale Aérobie Mésophile (FTAM).....	Error! Bookmark not defined.
Figure 6: Schéma des étapes de recherche des coliformes totaux	16
Figure 7: Schéma des étapes de recherche d' <i>Escherichia coli</i>	17
Figure 8: Schéma des étapes de recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> à couagulase positif	18
Figure 9 : Schéma des étapes de la recherche des anaérobies sulfito-réducteurs	20
Figure 10: Schéma représente la recherche des <i>Salmonella</i>	22
Figure 11 : Schéma des étapes de Recherche des champignons (levures et moisissures).....	23
Figure 12 : Schéma montre le protocole de la coloration de Gram.....	26
Figure 13 : La galerie Api 20 ^E	29
Figure 14 ; Résultats de recherche de la Flore Aérobie Mésophile Totale sur milieu PCA.....	32
Figure 15 : Résultats de recherche des coliformes totaux sur milieu VRBG.....	33
Figure 16 : Résultats d'ensemencement sur milieu MacConckey.....	34
Figure 17 : Résultat de l'observation microscopique des colonies obtenues sur milieu MacConckey après coloration de Gram	34
Figure 18 : Résultats du test catalase.....	35
Figure 19 : Résultats de la galerie API 20 E de l'échantillon P1.....	36
Figure 20 : Résultat de recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Baird Parker.....	36
Figure 21 : Observation microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Figure 22. Résultat du test catalase.....	37
Figure23. Résultat du test coagulase.....	38
Figure 24. Résultats de test TSI.....	38
Figure 25. Résultats de recherche des spores de <i>Clostridium sulfito réducteur</i>	39
Figure 26. Résultat de recherche des <i>salmonella</i> sur la gélose Hecktoen.....	39
Figure 27. Distribution de la qualité microbiologique de pain.....	43
Figure 28. Répartition des niveaux de contamination du pain à la sortie de four et au niveau des points de vente.....	44
Figure 29. Répartition des niveaux de contamination du pain au sort de four.....	45
Figure 30. Répartition des niveaux de contamination du pain à niveau des points de vente.....	45

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

ASR : Anaérobies-sulfito-réductrices.

A_w : Activité de l'eau.

BP : Baird Parker.

DM : Dilution Mère.

Eh : potentiel redox

EPT : eau péptonée tamponnée.

FTAM : Flore aérobie mésophile Total

JORA : Journal officiel de la république algérienne.

PCA : Plate Count Agar.

pH: Potentiel d'hydrogène.

RV : Rappaport vasiladis.

SM : Solution mère.

TIA : toxi-infection alimentaire

TIAC : toxi-infection alimentaire collective

TSI : Triple-Sugar-Iron

UFC: Unité formant colonie.

VF: Viande foie.

VP : Voges-Proskauer

VRBG : Gélose Glucosée Brier au Cristal Violet et au Rouge Neutre.

Introduction

La qualité microbiologique des aliments est un élément essentiel, représentant un défi considérable pour assurer une alimentation saine et nutritive. La disponibilité d'aliments sains et nutritifs est l'un des droits fondamentaux de l'être humain, et un facteur essentiel pour son état de santé adéquat (Nicklin *et al.*, 2000).

Les produits de boulangerie sont les aliments de base importante dans la plupart des pays et des cultures. Les produits de boulangerie et les céréales sont une source précieuse de nutriments dans notre alimentation, nous fournissant la plupart de nos calories alimentaires et environ la moitié de nos besoins (Saranraj et Geetha, 2012).

Le pain occupe une place fondamentale dans l'alimentation humaine. Il est l'aliment traditionnel de base de nombreuses cultures. En Afrique, les populations du Maghreb en sont les plus grands consommateurs (Kone *et al.*, 2020).

En microbiologie alimentaire, il est plus important de rechercher l'absence ou la présence de germes et d'être en mesure de dire si le produit est conforme ou non aux normes de la consommation humaine (Lightfoot, 2002). La réglementation concernant la sécurité alimentaire et l'hygiène se concentrait principalement sur le contrôle de la matière première jusqu'au produit final, dans le but de garantir la conformité aux normes de sécurité et de qualité (Becila, 2009).

Ce travail a pour objectif d'évaluer la qualité microbiologique de quelques échantillons de pain commercialisé dans la région de Biskra, par la recherche et le dénombrement de flore aérobie mésophile total, coliformes totaux, *Escherichia coli*, *Clostridium sulfito-réducteurs*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* et flore fongique.

Nous avons structurés notre mémoire en quatre chapitres interdépendants :

Le premier et le second chapitre, strictement théoriques, rassemblant d'une part des généralités sur le pain commercialisées ainsi que sa qualité microbiologique.

Le troisième chapitre est consacré aux matériels et aux méthodes et aux techniques employées pour la réalisation de ce travail pour la recherche et le dénombrement des germes.

Le quatrième chapitre analytique traite et discute les différents résultats de notre étude pratique. Et on termine par une conclusion.

Synthèse

Bibliographique

Chapitre 1

Généralités sur le pain commercialisé

1.1.Définition du pain commercialisé

La définition du mot pain tient en quelques mots « Aliment fait de farine pétrie et cuite » (Soumoy et Lisse, 2022).

Le pain est généralement formulé à partir de farine de blé, d'eau, de levure et de sel. Des ingrédients tels que de la farine sans blé, du sucre, des enzymes, des conditionneurs de pâte, des vitamines et des minéraux peuvent également être ajoutés pour améliorer la qualité sensorielle, texturale et nutritionnelle.

Le pain est l'un des aliments les plus couramment consommés, avec une consommation moyenne mondiale par habitant allant de 41 à 303 kg/an et c'est donc une source principale d'énergie et de nutrition pour l'homme (Villarino *et al.*, 2016).

1.2.Paramètres de la panification

Plusieurs ingrédients peuvent être utilisés pour la fabrication du pain dont les plus importants sont la farine, la levure et l'eau (Giannou *et al.*, 2003).

1.2.1. Farine

La plus importante matière première. C'est l'ingrédient principal entrant dans la fabrication du pain. Sa qualité conditionne la réussite du pain (Shapter, 2007).

1.2.2. Levure

La levure de boulanger est souvent attribuée aux principales propriétés du processus de fermentation, ces propriétés sont : l'augmentation du volume du pain due aux gaz dégagés lors de la décomposition des glucides, l'évolution de la texture et de la structure du pain par la bonne maturation de la pâte, la libération de substances aromatiques, de dioxyde de carbone et d'éthanol, formant la saveur unique du pain (Zinedine, 2004).

1.2.3. Eau et Sel

L'eau est un ingrédient essentiel pour la formation de la pâte et sa fluidité. Il est responsable de la dispersion des cellules de levure et de la dissolution des sucres et des sels (Giannou *et al.*, 2003).

Dans la production de pain, le sel a un effet profond pendant la transformation et sur les caractéristiques du produit final, un élément important dans la perception du goût du pain, sa couleur et sa conservation (Jourdren, 2017).

Ainsi selon Jourdren (2017) les différents ingrédients entrant dans la composition du pain jouent chacun un rôle dans la formation de la structure et des composés aromatiques du

pain. Les caractéristiques finales du pain vont cependant être impactées bien plus fortement par les différents paramètres du procédé de panification (temps de pétrissage et de fermentation, température de cuisson...) que par la qualité des ingrédients.

1.3. Différentes étapes du procédé de panification

Les différents procédés de panification varient surtout dans la manière dont les ingrédients de la pâte sont mélangés (Cauvain et Young, 2011).

Les différentes étapes du procédé de panification peuvent être réparties en trois grandes catégories : le pétrissage, la fermentation et la cuisson (Figure 1).

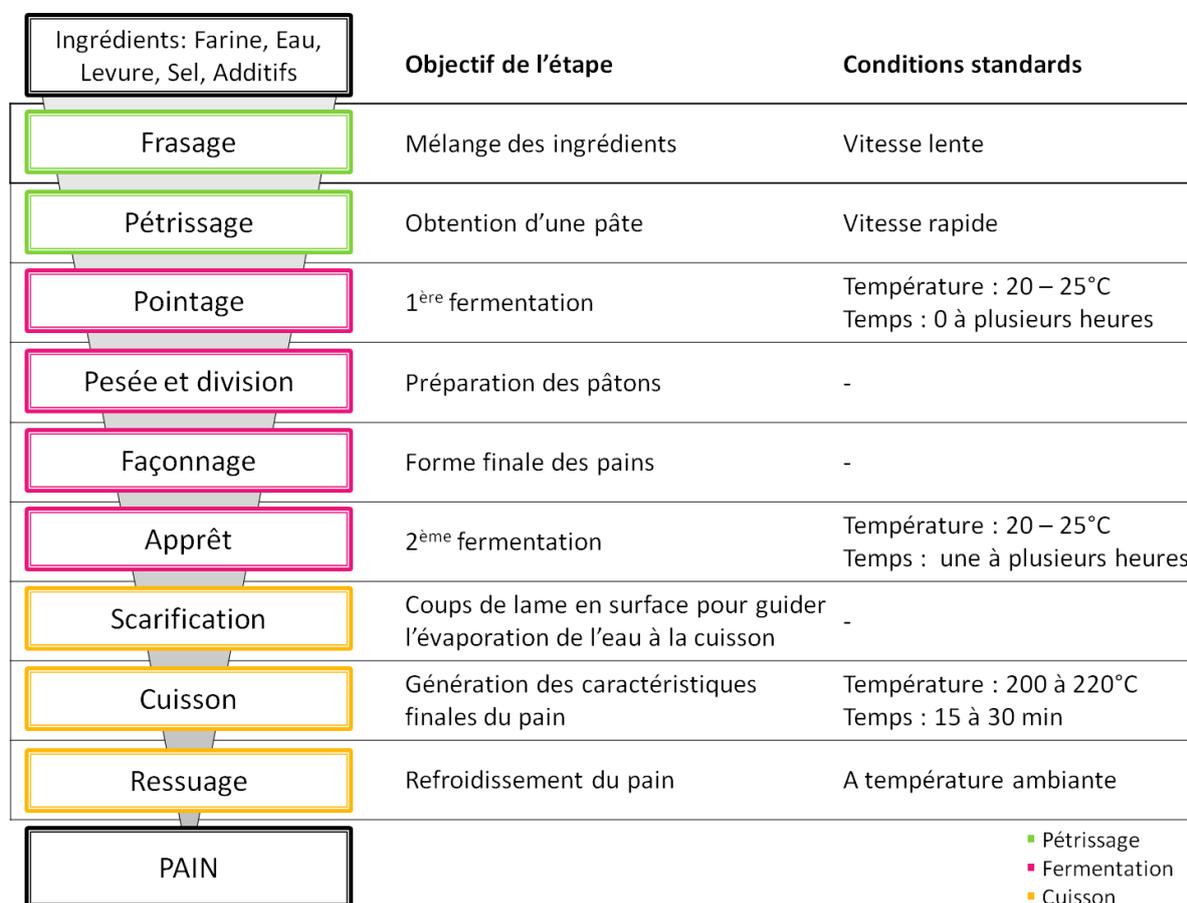


Figure 01: Etapes des procédées de panification

La première étape est le pétrissage, dans ce processus, la farine et l'eau sont d'abord mélangées (broyées) à basse vitesse. Ajoutez ensuite le reste des ingrédients et mélangez à grande vitesse jusqu'à l'obtention d'une pâte. La pâte est ensuite laissée au repos pendant le processus de fermentation, qui est la première étape de la fermentation. La pâte initiale est

ensuite divisée en pâtons et mise en forme. C'est cette étape qui va donner au pain sa forme définitive, vient ensuite de la seconde étape de fermentation dite de levée, suivie de l'étape de grattage des pâtons (le boulanger tapote des tranches de pâte avec des lames pour permettre à la vapeur d'eau de s'évaporer pendant la cuisson et d'éviter que les pains ne se déforment), juste avant de les mettre au four pour les cuire. La dernière étape avant de servir est le refroidissement, permettant au pain de revenir à température ambiante. Cette étape prendra environ une heure selon la forme du pain (Jourdren, 2017).

1.4. Qualité nutritionnelle et microbienne du pain à la farine de blé

Les céréales et les produits alimentaires de boulangerie apportent suffisamment de nutriments et d'énergie pour les besoins quotidiens.

Les produits de boulangerie répondent à différents besoins en nutriments, à savoir les protéines, les glucides, les lipides, les minéraux et les vitamines (Saranraj et Geetha, 2012).

Le pain et la farine de blé occupent un bon pourcentage du modèle de consommation alimentaire quotidienne, jusqu'à cinquante pour cent de l'énergie totale requise est obtenue à partir d'un seul pain.

Selon le point de vue microbien, on pense que les microbes pathogènes peuvent survivre pendant une longue période au lieu d'arrêter leur croissance sous une activité aussi faible de l'eau.

Les produits alimentaires cuits au four et les grains céréaliers qui sont stockés dans des conditions de stockage inappropriées peuvent contribuer à la multiplication de divers microbes pathogènes. Microbes pathogènes (par exemple, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, autres microbes d'altération des aliments) . Outre la croissance bactérienne, la croissance de moisissures dans la farine est familière pour dégrader considérablement la qualité de la farine et du pain (Ali Zaber, 2022).

1.5. Détérioration du pain commercialisé

La durée de conservation est généralement définie comme le temps pendant lequel un produit alimentaire reste sûr et conserve les caractéristiques sensorielles, chimiques, physiques et microbiologiques souhaitées lorsqu'il est stocké dans les conditions recommandées (Giménez *et al.*, 2012).

Les détériorations peuvent être de plusieurs types :

- Micro-organismes : est souvent le principal facteur limitant la durée de conservation des produits à humidité élevée et intermédiaire.

- Physique : la perte d'eau et le gain d'humidité peuvent provoquer des changements de texture, et même favoriser la détérioration physique et chimique.

- Chimique : caractérisé par la dégradation des lipides, provoquant une odeur désagréable, rendant le produit inacceptable et réduisant la durée de conservation (Smith *et al.*, 2004).

Il existe différents types de modifications de produits qui peuvent limiter la durée de conservation des aliments. Essentiellement, la durée de conservation d'un aliment dépend de quatre facteurs principaux, à savoir la formulation, la transformation, l'emballage et les conditions de stockage. Les quatre facteurs sont essentiels, mais leur importance relative dépend du caractère périssable de l'aliment. (Galić *et al.*, 2009).

1.6. Risque pour la santé

Les risques pour la santé se répartissent en trois catégories :

1 - Contamination initiale des matières premières et produits secondaires livrés pendant le stockage, la fabrication et la manipulation.

2 - Interruption de la chaîne du froid ou refroidissement inadéquat entraînant la prolifération de micro-organismes déjà présents dans le produit.

3 - Survie des micro-organismes après une cuisson insuffisante, c'est-à-dire non-respect des critères de couple temps/température nécessaires pour garantir l'hygiène du produit (Millet et Cabut , 1997).



Figure 2: Pain commerciale (site web)

Chapitre 2
Microbiologie du pain
Commerciale

2.1. Sources de micro-organismes dans les aliments

Les micro-organismes alimentaires ont trois sources possibles :

-Il préexistait dans la matière première ou dans l'aliment avant toute manipulation ou modification

-Ils sont introduits accidentellement lors de la manipulation ultérieure des aliments

-Ils sont ajoutés volontairement (Joffin et Joffin, 1999). Cet effet peut provenir du matériel et de l'eau de lavage non stérile, ou de la peau, de la bouche, des vêtements du manipulateur, ou de la poussière dans l'air, ou d'insectes comme les mouches, qui sont de très dangereux porteurs de micro-organismes (Ait abdelouahab, 2007).

2.2. Facteurs affectant la croissance microbienne

Divers facteurs affectent la croissance et la survie des micro-organismes dans les aliments. Ces facteurs peuvent être intrinsèques comme les propriétés de l'aliment ou du micro-organisme lui-même, ou extrinsèques comme celles de l'environnement (Tewari et Juneja, 2008).

2.2.1. Environnement intrinsèque

2.2.1.1. Acidité, pH et pouvoir tampon

Les aliments dont le pH est inférieur à 4,6 sont appelés aliments très acides et ceux dont le pH est supérieur à 4,6 sont appelés aliments peu acides. Cette limite a été fixée parce que dans les aliments dont le pH est inférieur à 4,6, les spores de *Clostridium botulinum* ne peuvent pas sporuler et produire de toxine. Le pH optimal pour la croissance des micro-organismes est proche de la neutralité (pH 7) et la plupart des bactéries ne se développent pas en dessous de pH 4,6 (Tewari et Juneja, 2008).

Tableau 1. Plages de croissance de microorganismes au pH

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

2.2.1.2. Activité de l'eau (a_w)

L'eau est souvent le principal constituant des aliments. Même les aliments relativement «secs» comme le pain contiennent généralement plus de 35 % d'eau (Dilbaghi et Sharma, 2007).

Les besoins en eau des micro-organismes dans les aliments sont généralement décrits en termes d'activité de l'eau (a_w) de l'aliment (Hamad, 2012).

Selon la réglementation, si la valeur de l'activité de l'eau d'un aliment est inférieure à 0,85, il est généralement considéré comme inoffensif. En effet, en dessous d'une activité de l'eau de 0,91, la plupart des bactéries, y compris les pathogènes tels que *Clostridium botulinum*, ne peuvent se développer. Mais l'exception est *Staphylococcus aureus*, qui peut être inhibé dans des conditions anaérobies avec une valeur d'activité de l'eau de 0,91. La plupart des moisissures et des levures peuvent se développer à une valeur minimale d'activité de l'eau de 0,80. Ainsi, les aliments secs comme le pain sont généralement gâtés par la moisissure plutôt que par les bactéries. En général, les micro-organismes ont un besoin en activité en eau décroissant dans l'ordre suivant : bactéries > levures > moisissures. En dessous de 0,60, aucune croissance microbienne n'est possible (Dilbaghi et Sharma, 2007).

2.2.1.3. Teneur en éléments nutritifs

Certains nutriments de base sont nécessaires aux micro-organismes pour la croissance et le maintien des fonctions métaboliques. Ces nutriments comprennent l'eau, une source d'énergie, l'azote, les vitamines et les minéraux.

Les micro-organismes d'origine alimentaire peuvent fournir de l'énergie à partir de glucides, d'alcools et d'acides aminés (Preetha et Narayanan, 2020).

Certains micro-organismes sont plus exigeants dans leurs besoins nutritionnels que d'autres. En général, les bactéries Gram positives sont plus exigeantes dans leurs besoins nutritionnels (Tewari et Juneja, 2008).

2.2.1.4. Potentiel redox (E_h)

Le potentiel redox (E_h) ou potentiel d'oxydo-réduction est défini comme le rapport entre le pouvoir oxydant total (accepteur d'électrons) et le pouvoir réducteur total (donneur d'électrons) d'un aliment. Généralement, les bactéries aérobies peuvent mieux tolérer des

valeurs (Eh) plus élevées que les anaérobies qui nécessitent des valeurs (Eh) négatives pour leur croissance (Tewari et Juneja, 2008).

2.2.2. Environnement extrinsèque

2.2.2.1. Température de conservation

Le contenu microbien dans l'environnement de stockage affecte directement la durée de conservation des produits de boulangerie. La température et l'humidité influencent grandement la production de toxines par les moisissures, car ces microbes ont tendance à se développer principalement à 25–30 °C avec une humidité relative supérieure à 90%. Les conditions optimales de refroidissement du pain étaient une température de l'air de 20°C (Qian *et al.*, 2021).

2.2.2.2. Humidité relative de l'environnement

Il existe une relation entre la température et l'humidité qu'il convient de garder à l'esprit. En général, plus la température est élevée, plus l'humidité relative est faible et vice-versa.

Les aliments dont la surface se détériore à cause des moisissures, des levures et de certaines bactéries doivent être entreposés dans des conditions de faible humidité relative pour augmenter leur durée de conservation (Dilbaghi et Sharma, 2007).

2.3. Germes responsables de la détérioration du pain commercial

2.3.1. Flore aérobie mésophile total (FTAM)

La flore aérobie mésophile comprend des micro-organismes qui forment des colonies dénombrables lorsqu'ils sont propagés dans des conditions de laboratoire définies (Ghafir et Daube, 2007). Ce groupe représente tous les micro-organismes qui peuvent se développer en présence d'oxygène et à des températures allant de 20 à 37 °C (Rachedi *et al.*, 2021).

2.3.2. Les coliformes totaux

Les coliformes totaux ont été définis comme toutes les bactéries aérobies ou anaérobies facultatives, Gram-négatives, non sporulées, oxydase-négatives, en forme de bâtonnet qui ont la capacité de fermenter le lactose avec formation de gaz et d'acide en 48 h à 35 °C (Naidoo et Olaniran, 2014). Ils sont couramment utilisés comme indicateur bactérien de la qualité sanitaire des aliments et de l'eau et considérés comme un indicateur de pollution microbienne (Saranraj *et al.*, 2012). Ces bactéries vivent dans l'intestin humain et animal et comprennent plusieurs espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*, appartenant aux genres *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* et *Enterobacter* (Naidoo et Olaniran, 2014).

2.3.3. *Escherichia Coli*

Escherichia coli fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bâtonnets courts et mobiles avec des flagelles péritriches, Gram-négatifs, non sporulés et oxydase-négatifs. La multiplication à 44 °C (optimal 40°C et extrêmes 45,5°C). En tant qu'espèce anaérobie facultative prédominante dans l'intestin et les matières fécales, la présence d'*E. coli* dans les aliments et l'eau est considérée comme un signe de contamination fécale (Salifou *et al.*, 2013).

2.3.4. *Staphylococcus aureus* à coagulase positif

Le *Staphylococcus aureus* à Gram positif est un agent pathogène bactérien majeur souvent impliqué dans les intoxications alimentaires en raison de son taux élevé de portage cutané et nasal humain, de sa propagation efficace dans l'air et de sa forte survie dans les fomites (Le *et al.*, 2021). Il est immobile et positif pour la catalase et la coagulase (Yves *et al.*, 2003).

2.3.5. *Clostridium sulfito-réducteur*

La majorité des *Clostridium spp* pertinents pour l'industrie alimentaire possèdent la capacité métabolique de réduire le sulfite en sulfure dans des conditions anaérobies pour générer de l'énergie cellulaire ; leur présence dans l'aliment est un indicateur de contamination fécale éventuellement ancienne (Doyle *et al.*, 2015 ; Joffin et Joffin, 1999).

2.3.6. *Salmonella*

La salmonelle est une bactérie Gram-négative en forme de bâtonnet qui appartient à la famille des entérobactéries. C'est l'un des agents pathogènes d'origine alimentaire les plus courants et il a été considéré comme une menace importante pour la santé publique (Islam *et al.*, 2019).

2.3.7. Levures et moisissures

Les spores fongiques sont les principales coupables de la détérioration du pain et des produits de boulangerie (Garcia et Copetti, 2019). La levure est une cause beaucoup moins importante, mais la croissance de l'une ou l'autre peut causer une détérioration de la surface. La détérioration des denrées périssables par ces microbes est généralement un signe que la nourriture a simplement été stockée trop longtemps.(Sperber et Doyle 2009).

2.4. Maladies transmises par le pain commercial

2.4.1. Intoxication

L'intoxication alimentaire est un ensemble de symptômes causés par la consommation d'aliments contaminés par des bactéries (Aljamali *et al.*, 2021).

L'une des raisons de la contamination des aliments est la présence de bactéries ou de leurs toxines dans les aliments, qui sont également produites par des toxines animales, des produits chimiques, des additifs, etc. L'empoisonnement alimentaire au staphylocoque et *clostridium* est un exemple (Flesch *et al.*, 1998).

2.4.2. Infection

Une infection d'origine alimentaire survient lorsqu'un individu ingère des aliments contenant des microbes nocifs. Ces micro-organismes se développent dans le tractus gastro-intestinal humain et sont responsables d'un éventail de maladies. Certains types de bactéries peuvent causer des maladies par infection.

Les espèces bactériennes entraînant des maladies d'origine alimentaire comprennent *Salmonella*, *Escherichia coli* (Sharif *et al.*, 2018).

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 deux cas d'une symptomatologie, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (Esbelin, 2009).

Chapitre 3

Matériel et méthodes

3.1. Objectif du travail

L'objectif général de ce travail est d'étudier l'hygiène dans les boulangeries commerciales de manière séquentielle dans la région de Biskra. De manière spécifique pour rechercher et dénombrer certains types de micro-organismes et identifier les agents microbiens présents dans le pain commercial.

3.2. Matériel de laboratoire

L'ensemble des milieux de cultures, réactifs, instruments et appareillage seront cités au fur et à mesure de leurs utilisations.

3.3. Méthodologie

3.3.1. Echantillonnage et prélèvement

Dans le but d'évaluer la qualité microbiologique des échantillons prélevés, nous avons sélectionné de façon aléatoire deux grandes boulangeries dans la région de wilaya de Biskra dans la période entre fins d'avril et début mai. Dans chaque boulangerie, deux baguettes de pains ont été prélevées par différents sites comme suit : 1 baguette au sort du four au-delà de deux heures et 1 baguette au niveau de point de vente que la boulangerie le distribuer.

Ces échantillons ont été prélevés dans des sacs stériles et mis dans une glacière contenant carboglace puis immédiatement convoyés au laboratoire pédagogique de département de science de la nature et de la vie de l'université de Biskra pour les analyses microbiologiques.

Tableau 02: plan d'échantillonnage

	BOULANGERIE 1	BOULANGERIE 2	Nombre des échantillons
Au sort du four	F1	F2	2
Point de vente	P1	P2	2
Nombre des échantillons	2	2	4

F1 : l'échantillon collecté au sort de four de la boulangerie 1.

P1 : l'échantillon collecté au niveau de point de vente de la boulangerie 1.

F2 : l'échantillon collecté au sort de four de la boulangerie 2.

P2 : l'échantillon collecté au niveau de point de vente de la boulangerie 2.

3.3.2. Analyse microbiologique des échantillons collectés

Le développement des normes internationales est généralement réalisé par le Comité technique de l'ISO, qui est une organisation internationale de normalisation.

La norme fournit des lignes directrices pour le dénombrement des micro-organismes 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 inspiré des normes AFNOR (Association Française de Normalisation).

3.3.3. Germes recherchés

Pour chaque échantillon, l'analyse microbiologique a concerné :

- Indicateurs bactériens de qualité commerciale
 - ✓ Flores aérobie mésophile totale (FMAT).
 - ✓ Les coliformes totaux
 - ✓ *Echerichia coli*
- Germes indicateurs de la qualité hygiénique
 - ✓ Les Staphylocoques
 - ✓ Anaérobies sulfite-réducteurs (ASR).
 - ✓ Les salmonelles.
 - ✓ La flore fongique (levures et moisissures).

3.3.3.1. Préparation des milieux de culture ISO 11133. 2014

Préparez les milieux selon les procédures indiquées sur l'étiquette de chaque boîte de milieu, selon le besoin et les bactéries que vous recherchez.

Les milieux de cultures sont des milieux commercialisés sous formes déshydratées et réduites en poudre. Pour leur préparation, ces milieux de cultures ont été pesés à l'aide d'une balance de précision et dissolvent dans de l'eau distillée stérile suivant les indications du fabricant. Après reconstitution, la solution obtenue est mise en bain d'eau jusqu'à ébullition. Après ébullition, ces milieux ont été stérilisés à l'autoclave pendant 15 min à 121°C pour les milieux de cultures autoclavables.

3.3.3.2. Préparation de la solution mère selon la norme ISO 6887:2017

Pour la préparation de la suspension mère (SM), 25g sont prélevés et pesés aseptiquement d'échantillon de pain, puis transformé à l'aide d'une balance de précision dans un bécher stérile dans lequel on ajoute 225 ml d'eau peptonée stérile. L'homogénéisation du contenu dure 5 min, puis la solution est récupérée dans une fiole ou dans un bêcher stérile. L'opération est effectuée tout en respectant les conditions d'asepsies strictes, ensuite mélangé et laissé au repos 30 min à 1 h à la température du laboratoire pour assurer la revivification des germes et obtenir un surnageant.



Figure 3: Etape de la préparation de la solution mère. (Photos originales, 2023).

3.3.3.3. Dilutions décimales

La préparation des dilutions décimales a été réalisée selon la norme Française NF V057-2000. Ainsi, un millilitre de cette suspension a été transféré aseptiquement dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau peptonée stérile à 0,1% (la dilution 10^{-1}). On procède de la même manière jusqu'à la dilution 10^{-5} , On a mis :

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

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

1 ml de la solution 10^{-3} dans 9 ml 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 prête à l'emploi.

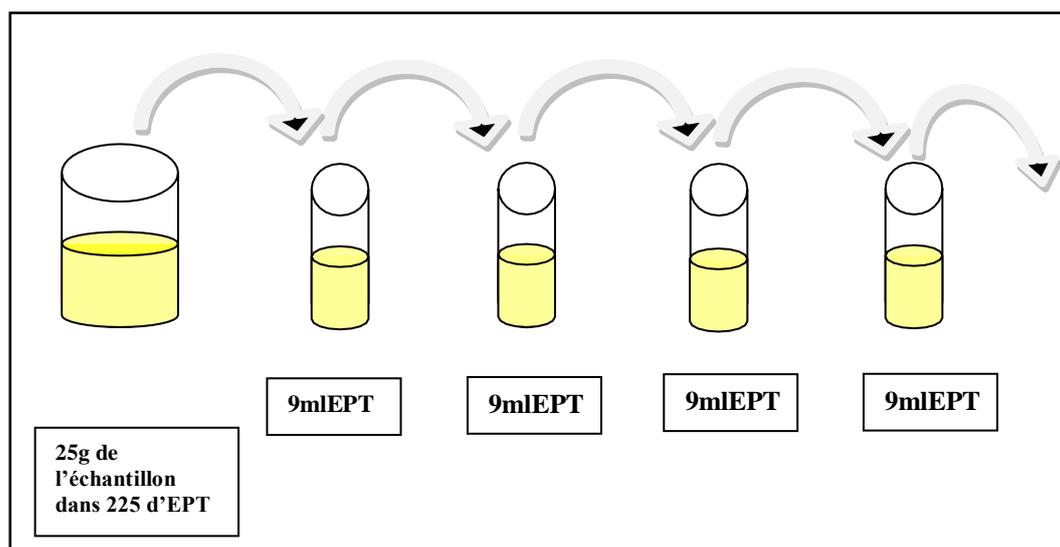


Figure 4: Schéma de préparation des dilutions décimales. (NF V08-010).

3.3.4. Recherche et dénombrement des différents microorganismes

3.3.4.1. Recherche et dénombrement de la Flore Totale Aérobie Mésophile (FTAM) (ISO4833/2003)

➤ Principe

Cette flore indique le degré de contamination bactérienne globale et est utilisée comme méthode de contrôle de la qualité hygiénique (Dennaï *et al.*, 2001).

Dans cette étude, les normes françaises NF V 08-011 N et NF V 08-51 a été utilisée pour la recherche et le dénombrement des Flore Aérobie Mésophile Total (FAMT) été réalisé par la méthode d'ensemencement en profondeur sur la gélose PCA « plate count agar».

➤ Mode opératoire

Pour chaque dilution 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 1 ml a été déposé dans des boîtes de pétri stériles à l'aide de pipettes stériles auquel on a ajouté environ 15 ml de gélose PCA maintenue à l'avance à une température de 47 °C et refroidie à 37°C. Effectuer ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de "8" pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose utilisée. Laisser se solidifier sur la paillasse. Toutes les manipulations ont été effectuées dans des conditions stériles à côté de la flamme du bec Bunsen. L'incubation a été effectuée dans l'étuve à 37 °C pendant 48 h. Après 72 h

d'incubation, toutes les colonies ont été comptées sur deux plaques de dilution successives. Des colonies de différentes tailles et de couleurs blanchâtres ou jaunâtres ont été comptées.

➤ **Lecture**

Les germes totaux se présentent sous forme des colonies lenticulaires poussant en masse, ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies (Saidane *et al.*, 2023).

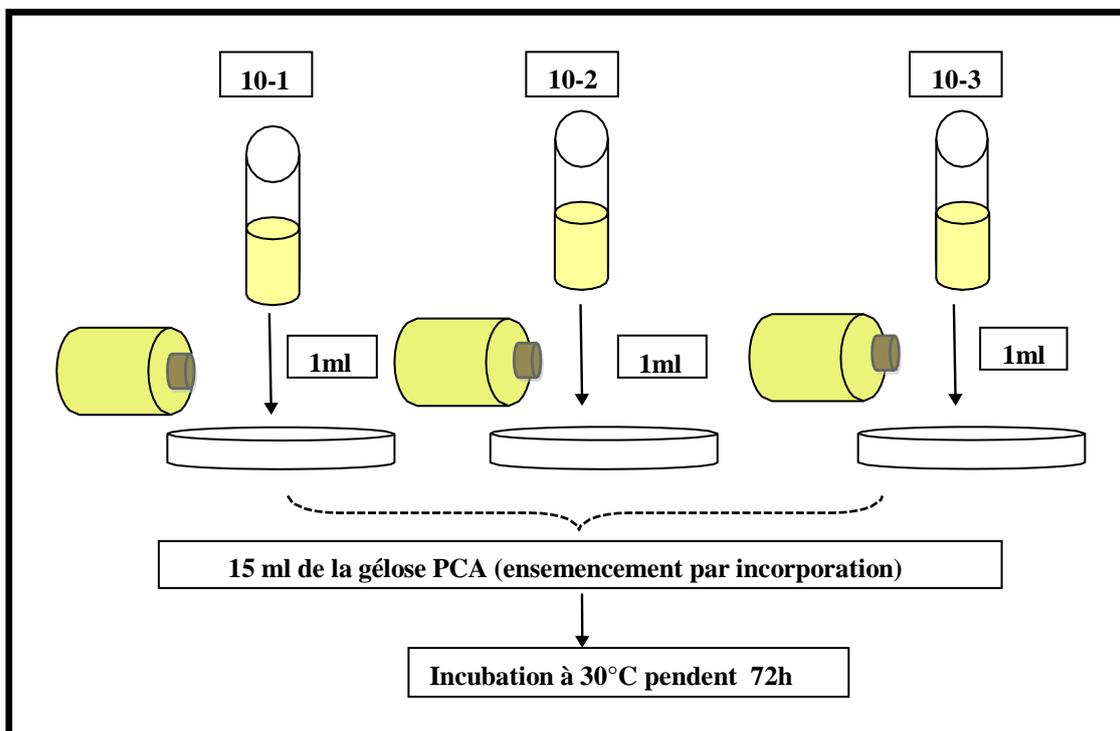


Figure 15: Schéma des étapes de recherche de la flore totale aérobie mésophile (FTAM).

3.3.4.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux (ISO 4832:2006)

➤ **Principe**

Nous avons utilisé le milieu VRBG (Violet Red Bile Glucose) pour la recherche sur les coliformes (Hocine *et al.*, 2018).

➤ **Mode opératoire**

Pour chacun des échantillons dans lesquels les coliformes totaux ont été dénombrés, nous avons déposé 1 ml de chaque dilution décimale au moyen d'une pipette graduée stérile dans une boîte de Pétri stérile. Environ 15 ml de la gélose VRBG ont été coulés sur l'inoculum. Chaque boîte a été ensuite soigneusement homogénéisée avec des mouvements circulaires en forme de huit (8) pour pouvoir réaliser un ensemencement homogène et laissée solidifier. Une 2^{ème} couche d'environ 5 ml de VRBG a été réalisée.

Après solidification, l'incubation a été effectuée à 37 °C pendant 24 h (Bachtarzi *et al.*, 2015).

➤ Lecture

Les colonies caractéristiques rouges violacées d'un diamètre de 0,5 mm avec halo de précipité de sels biliaires ont été dénombrées en profondeur de la masse de gélose sur les boîtes contenant 15 à 150 colonies (Hammoudi *et al.*, 2013).

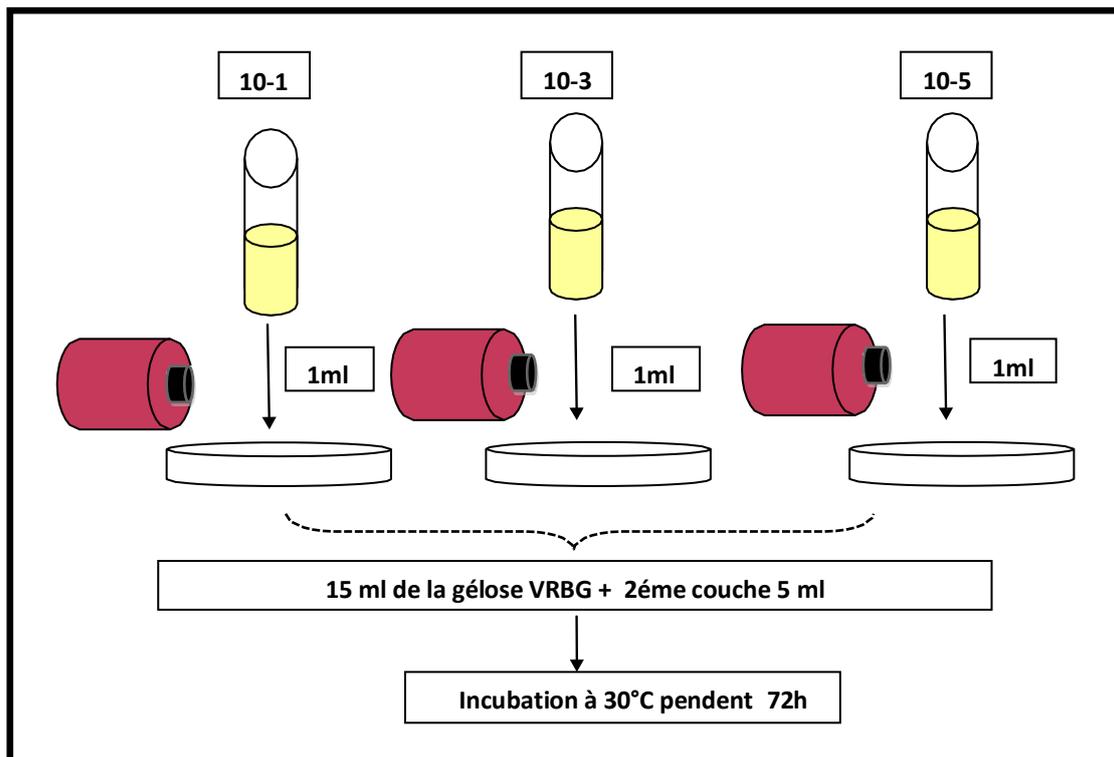


Figure 5: Schéma des étapes de recherche des coliformes totaux

3.3.4.3. Recherche d'*Escherichia Coli*

Les *Escherichia coli* sont des hôtes communs de la microflore intestinale, sa présence dans les aliments prêts à consommer est un signe de contamination fécale, rendant ainsi ces derniers sensibles à la consommation humaine (Savoie, 2011).

➤ Principe

La gélose MacConkey est le milieu le plus utilisé pour isoler et différencier les *Enterobacteriaceae*. Ce milieu différencie les bactéries Gram-négatives aérobies en détectant l'utilisation du lactose avec un indicateur rouge neutre (Filius *et al.*, 2003).

➤ Mode opératoire

À l'aide d'une pipette Pasteur, on prend 0,1 ml de la suspension mère et des dilutions préparées et ensemencées par stries sur la surface de la gélose MacConkey pré-coulée. Les différentes boîtes ensemencées sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 heures (Delarras, 2007).

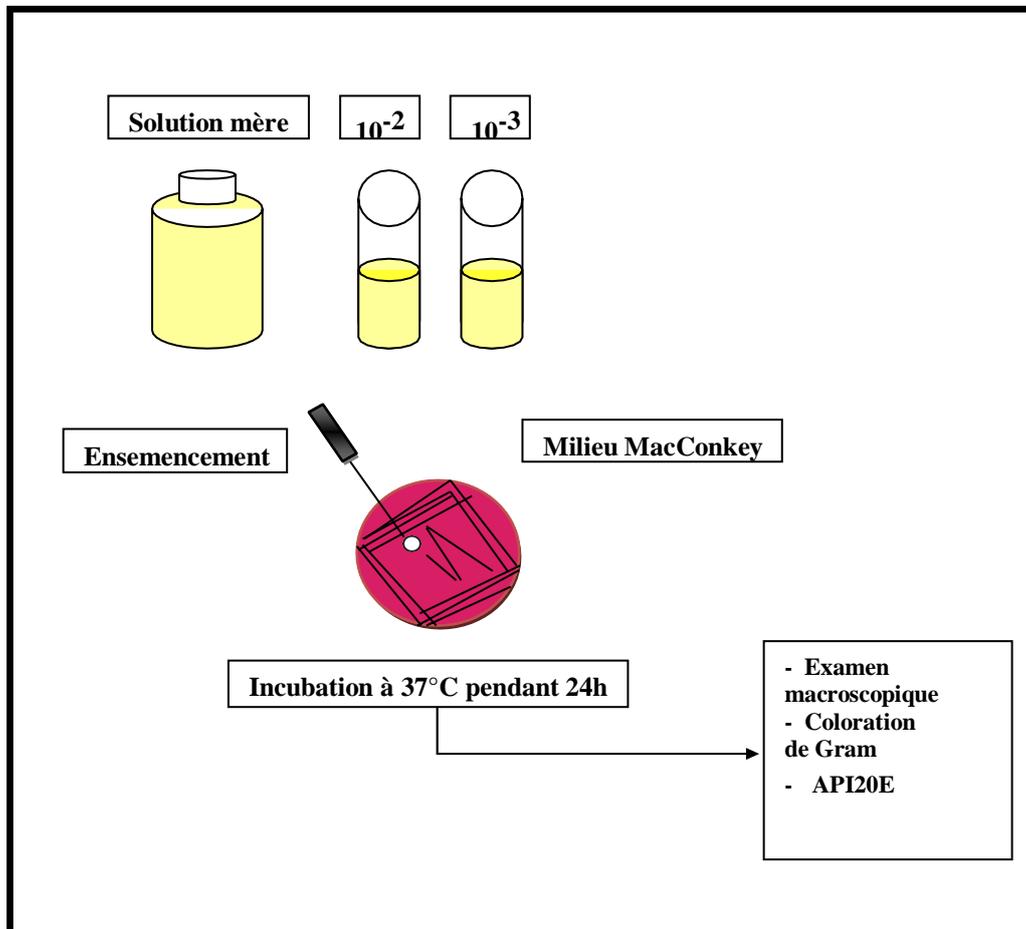


Figure 6: Schéma des étapes de recherche d'*Escherichia coli*

➤ Lecture

Les colonies lactose-positives sont rouges et entourées d'un anneau de sels biliaires précipités. Les colonies lactose-négatives sont incolores. Pour l'identification, plusieurs tests ont été réalisés : examen microscopique (coloration de Gram), quelques tests biochimiques et galerie API 20^E (Delarras, 2007).

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

➤ Principe

Le milieu gélose utilisée dans cette technique est le milieu Baird-Parker qui est additionné par l'émulsion de jaune d'œuf et de tellurite de potassium (Ates *et al.*, 2011).

➤ Mode opératoire

Le milieu de choix pour cette étude était le Baird-Parker (BP) additionné d'un mélange de jaune d'œuf et de tellurite de potassium. À l'aide d'une pipette stérile, transférer 0,1 ml de chaque dilution à la surface de la plaque de gélose.

L'inoculum déposé a été étalé avec précaution et le plus rapidement possible à la surface du milieu gélosé. Laisser sécher la boîte de Pétri couverte à température ambiante pendant environ 15 min, puis retourner et incuber pendant 24 ± 2 h, puis incuber encore 24 ± 2 h dans une étuve à 37°C (JORA, 2014).

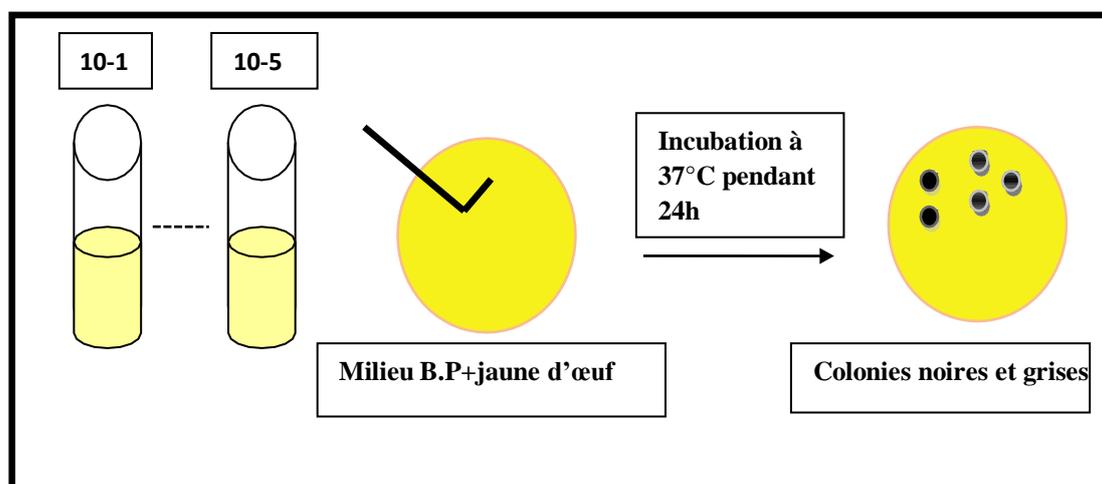


Figure 7: Schéma des étapes de recherche de *Staphylococcus aureus* à couagulase positif (JORA, 2014).

➤ Lecture

Après 24 et 48 heures d'incubation, des colonies noires ou grises, luisantes, surélevées et entourées d'auréoles fulgurantes sont caractéristiques. Après au moins 24 heures d'incubation, un anneau blanc laiteux peut apparaître dans la zone claire au contact de la colonie (JORA, 2014).

Pour confirmer l'identification des colonies suspectes de *Staphylococcus aureus* à coagulase positive, quelques tests supplémentaires ont été utilisés tels que : coloration de Gram, test catalase et test oxydase, et pour confirmer l'espèce (aureus ou non) le test coagulase a été réalisé.

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

➤ Principe

Les anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) se présentent sous forme de résistance appelées spores (Hamdi *et al.*, 2022).

Les ASR ont été dénombrés sur la gélose Viande Foie (VF) additionnée d'une ampoule d'Alun de Fer et d'une ampoule de sulfite de sodium (Ouahchia *et al.*, 2015). Elles se développent entre 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 (Hamdi *et al.*, 2022).

➤ Mode opératoire

Quatre tubes stériles contenant 1 ml des dilutions $10^{-2}/10^{-3}$ (deux tubes par dilution), ont été placés dans un bain marie à 80°C , pendant 10 min, puis ils ont été refroidis sous l'eau de robinet (destruction des formes végétatives). 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 au foie de viande ont été fondus puis refroidis à $45^\circ\text{C} \pm 1$, et 0,2 ml d'alun de fer et 0,5 ml de sulfite de sodium à 5 % ont été ajoutés.

Le milieu préparé mélangé à l'inoculum est agité doucement pour éviter la formation de bulles d'air. Après solidification sur la paillasse, incuber les tubes à 37°C pendant 24 à 48 h (JORA, 2013).

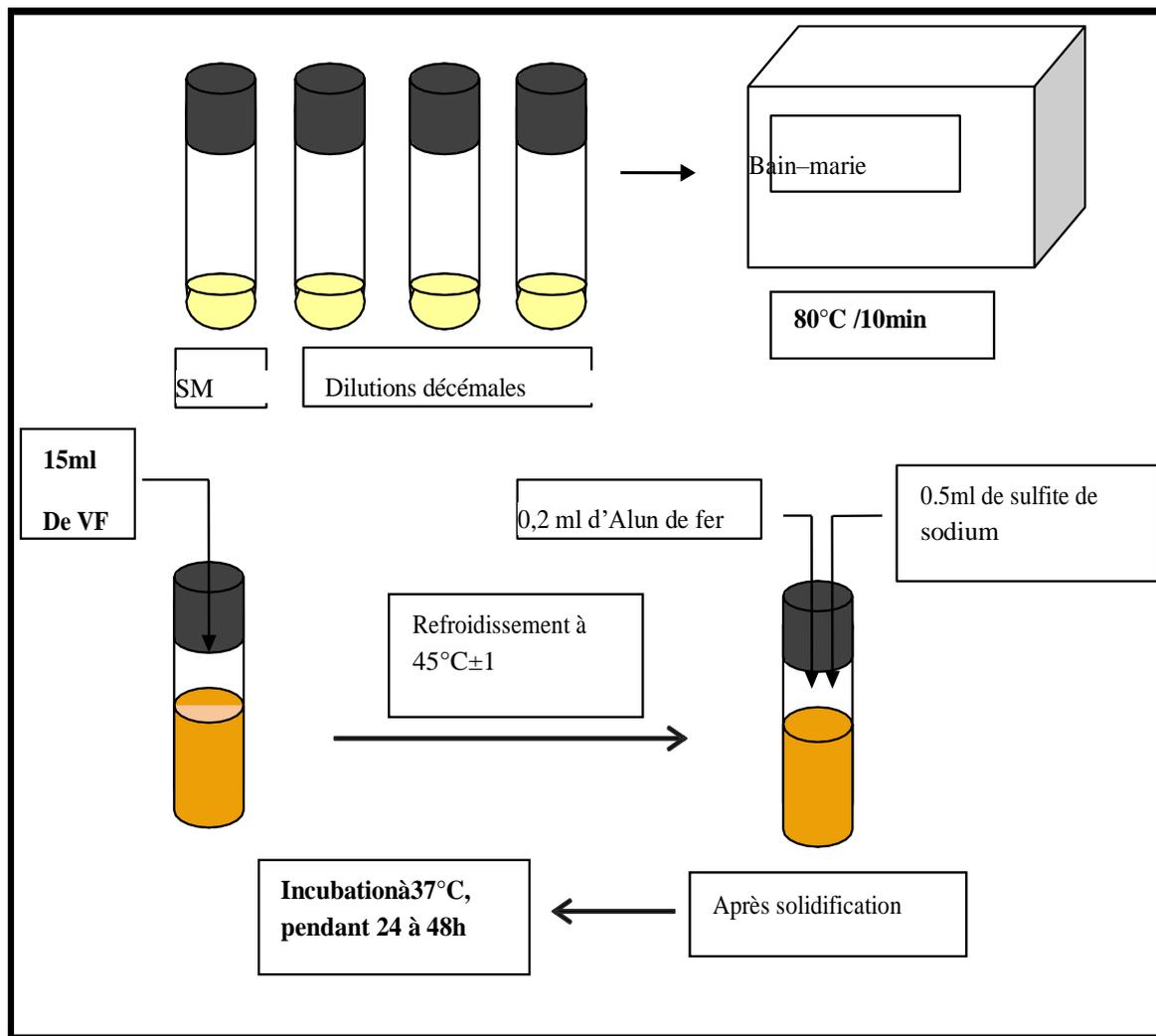


Figure 9 : Schéma des étapes de la recherche des anaérobies sulfito-réducteurs (JORA, 2013).

➤ Lecture

Après 24 h et après 48 h, selon le degré de coloration noire et le taux de croissance des micro-organismes. Les colonies noires, éventuellement entourées d'une zone noire indiquent la présence des ASR (JORA, 2013).

3.3.4.6. Recherche et dénombrement de *salmonella*

➤ Principe

La recherche de *Salmonella* a été faite en 4 étapes selon la norme ISO 6579:2017 : le pré-enrichissement, l'enrichissement, l'isolement et enfin l'identification (Alloui, 2013).

➤ **Mode opératoire**

○ **Pré-enrichissement milieu non-sélectif**

La solution mère est incubée à 37 °C pendant 18+ 2 heures pour le développement des salmonelles stressées. (Diouf *et al.*, 2022).

○ **Enrichissement en milieu sélectif**

Le bouillon (Rappaport-Vassiliadis-soja /RVS) est le milieu de culture utilisé. On ajoute 0.1 ml de la SM dans des tubes contenant respectivement 10 ml de RVS. Après homogénéisation, les tubes sont incubés à 41,5 °C pendant 24 h (Diouf *et al.*, 2022).

○ **Isolement**

À l'aide d'une anse de platine, une goutte de culture d'enrichissement estensemencée sur la gélose Hecktoen (Fguiri *et al.*, 2017). Ensuite, les boîtesensemencées ont été incubées à 37°C pendant 24 h à 48 h. Cela permet de visualiser les colonies caractéristiques, dont le nombre aura été considérablement augmenté durant les phases précédentes.

○ **L'identification**

L'étape de confirmation, qui suit l'isolement, consiste en la sélection d'une ou plusieurs colonies caractéristiques en vue de leur purification. L'identité des colonies doit être confirmée en fonction de caractéristiques biochimiques (Korsak *et al.*, 2004).

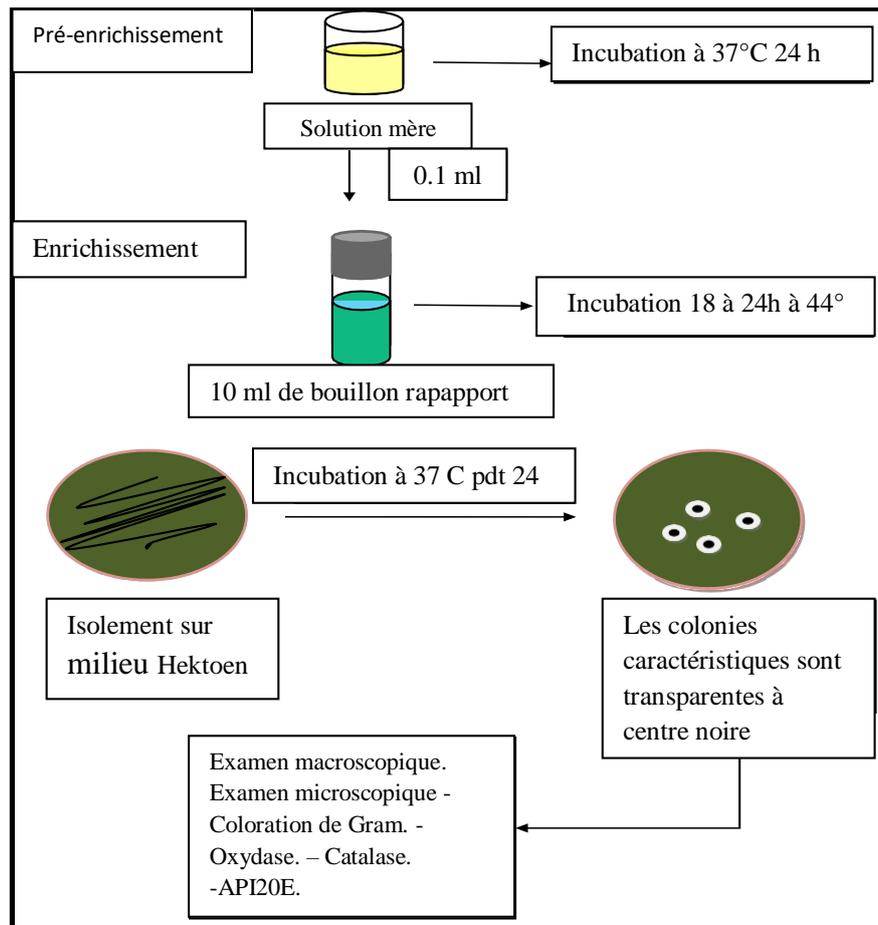


Figure 10: Schéma représente la recherche des *salmonella* (Korsak et al., 2004)

3.3.4.7. Recherche des levures et moisissures

➤ Principe

La technique standard de la plaque d'étalement a été suivie pour déterminer le nombre total de levures et de moisissures.

➤ Mode opératoire

Une aliquote de suspension de 0,1 ml et ses dilutions décimales ont été étalées sur de la gélose Sabouraud dextrose et incubées à 25 °C pendant 5 jours.

Le dénombrement des colonies blanches ou colorées, lisses et crémeuses de levures et des moisissures sous forme poudreuse (Shamimuzzaman *et al.*, 2022).

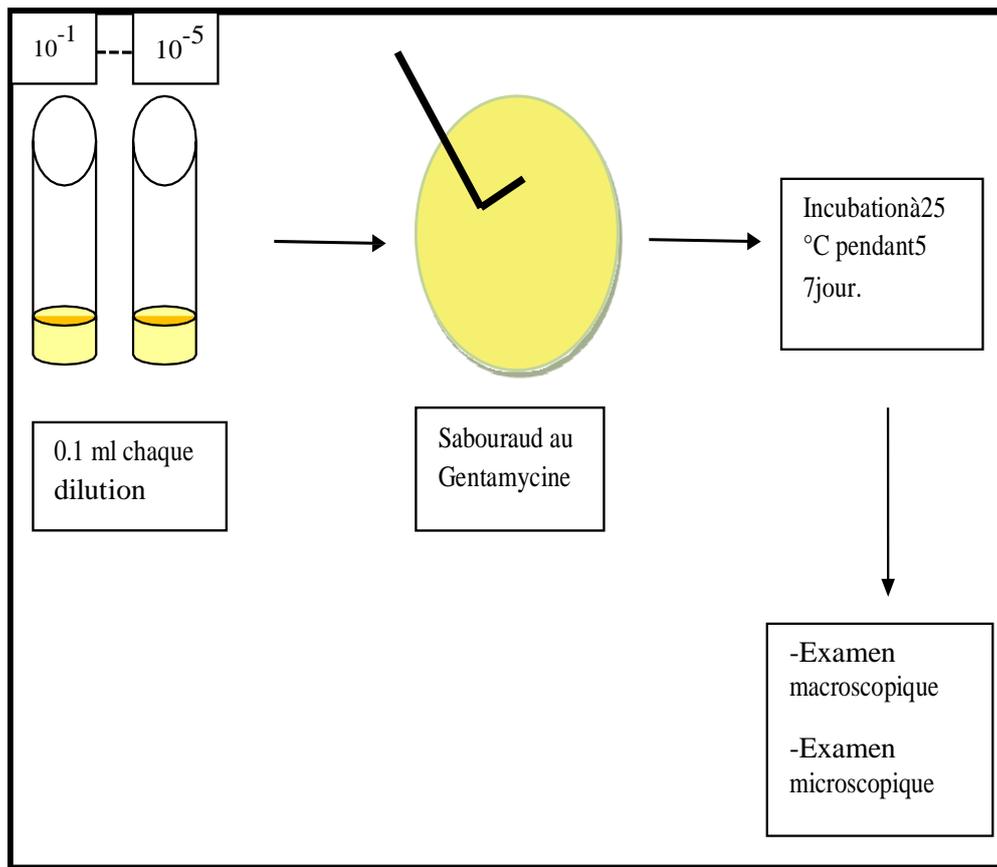


Figure 11 : Schéma des étapes de Recherche des champignons (levures et moisissures).

➤ Observation microscopique

Une seule colonie de levure a été mélangée dans une goutte d'eau distillée stérile sur une lame de verre et enduite jusqu'à ce que le frottis sèche. Le frottis a ensuite été coloré à l'aide d'un colorant bleu coton au lactophénol dilué, séché à l'air et observé au microscope optique à un grossissement de $\times 100$ (Karki *et al.*, 2017).

L'examen microscopique des spores a été réalisé par la méthode du « scotch test » (Clotaire *et al.*, 2011).

3.3.5. Identification microbiologique et tests complémentaires

3.3.5.1. Caractères morphologiques

➤ Fermentation des sucres en milieu TSI (Tri-Sugar-Iron)

• Principe

TSI (Tri Sugar Iron) Ce complexe permet de confirmer la fermentation du glucose avec ou sans production de gaz et de guider l'identité du germe en étudiant l'attaque du saccharose,

du lactose et la production de H₂S. La fermentation des sucres entraîne la production d'acides provoquant le jaunissement de l'indicateur de pH, le rouge de phénol.

- **Technique**

TSI consiste à ensemencer en stries serrées la pente de la gélose puis par piqûre centrale la base, la lecture se fait après 18 heures d'incubation à 37 °C.

- **Lecture**

La production de gaz se traduit par la formation de bulles de gaz dans la masse du bouchon. La fermentation du glucose et/ou du saccharose entraîne le jaunissement de la masse du nerf. La production d'H₂S entraîne le noircissement du milieu (Chama *et al.*, 2021).

➤ **Examen macroscopique des caractères cultureux**

L'aspect des colonies varie selon le milieu, la durée et la température d'incubation. Elle ne sera pas adéquatement décrite, sauf dans les colonies bien isolées. La description des colonies doit mentionner un certain nombre d'éléments (Joffin et Leyral, 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 de Gram est basée sur les différentes affinités de coloration des bactéries pour certains colorants en raison de l'architecture de leurs parois. Cette coloration permet également d'observer la morphologie bactérienne (forme allongée pour les bacilles et ronde pour les coques) (Astier-Théfenne *et al.*, 2014).

➤ **Préparation du frottis bactérien**

- Un groupe de bactéries a été mélangé dans une goutte d'eau sur la lame pour faire une suspension.
- À l'aide d'une boucle d'inoculation, l'échantillon a été étalé sur la lame pour obtenir une fine couche et laissé sécher à l'air.

- En tenant la lame avec des pinces, fixez la tache sèche avec de la chaleur en passant doucement la lame vers le haut à travers la flamme d'un bec Bunsen 2 à 3 fois. Ne pas chauffer ou endommager les parois cellulaires bactériennes et la morphologie cellulaire sera détruite (Moyes *et al.*, 2009).
- **Coloration simple** : une coloration au cristal violet est ajoutée sur la culture fixée. Après 10 à 60 secondes, la tâche est déversée et l'excédent de tâche est rincé à l'eau.
- **Fixation et mordantage** : verser la solution d'iode pour recouvrir le frottis pendant 10 à 60 secondes et la lame est rincé à l'eau courante.
- **Décoloration**: quelques gouttes de décolorant sont ajoutées à la lame. Les décolorants sont souvent le solvant mixte d'éthanol et d'acétone. La lame est rincée à l'eau en 5 secondes.
- **Recoloration** : le frottis est contre-coloré avec une solution basique de fuchsine pendant 40 à 60 secondes. La solution de fuchsine est lavée à l'eau et l'excès d'eau est épongé avec le papier absorbant. La lame peut également être séchée à l'air après avoir secoué l'excès d'eau.

➤ Examen microscopique de lame

La lame doit subir un examen au microscope sous immersion dans l'huile. L'examen initial des lames doit utiliser l'objectif (x 40) pour évaluer la distribution des frottis, puis ils doivent être examinés à l'aide de l'objectif à immersion dans l'huile (x100).

Les bactéries Gram-positives apparaissent violettes par rapport aux bactéries Gram-négatives, qui apparaissent roses (Tripathi et Sapra, 2020).

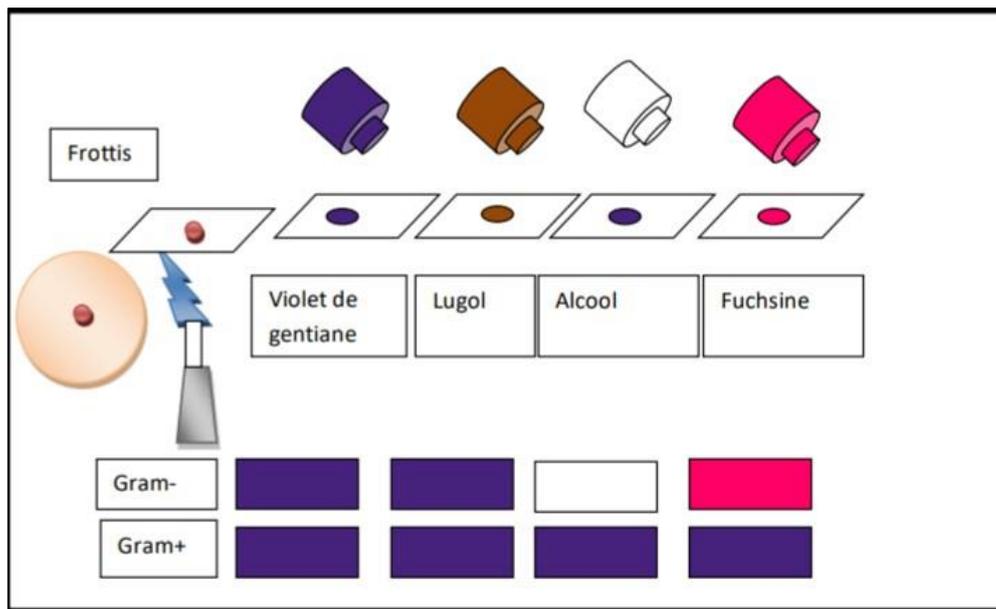
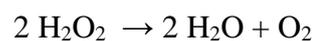


Figure 12 : Schéma montre le protocole de la coloration de Gram (Tripathi et Sapa, 2020).

3.3.5.2. Caractères enzymatiques

➤ Test catalase

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante : (Adnan et Tan, 2007).



○ Technique

Un millilitre de peroxyde d'hydrogène à 3 % a été placé sur les lames de microscope à l'aide d'une pipette Pasteur et l'inoculum bactérien a été ajouté.

○ Lecture

Les bulles provenant de la solution ont été enregistrées comme réaction positive. (Demissie *et al.*, 2018).

➤ Test coagulase

La production d'enzyme coagulase par *Staphylococcus aureus* est considérée comme un critère pour déterminer sa pathogénicité et est évaluée par le test de coagulase (Choudhary *et al.*, 2022)

○ **Technique**

Ensemencer une aliquote de chaque colonie sélectionnée dans 5 ml de bouillon cœur-cerveille (BCC) à l'aide d'une ligne stérile et incubé à 37 °C pendant 24 h ±2 h.

Ajouter aseptiquement 0,1 ml de chaque culture à 0,3 ml de plasma humaine dans un hémolyse stérile. Des contrôles de la coagulation du plasma ont été effectués après 4 à 6 heures d'incubation à 37 °C avec des tubes inclinés.

○ **Lecture**

La réaction à la coagulase est considérée comme positive quand le coagulum occupe plus de la moitié du volume initialement occupé par le liquide. Si le test est négatif, un nouveau test sera nécessaire après 24 heures d'incubation. Comme contrôle négatif, ajouter 0,1 ml de BCC à la quantité recommandée de plasma et incubé sans inoculation. Pour que la réaction soit valide, le plasma dans le tube de contrôle ne doit pas montrer de signes de coagulation (JORA, 2014).

3.3.5.3. Caractères biochimiques

➤ **La galerie miniaturisée API 20^E**

La galerie API 20^E est un système d'identification standardisé des *Enterobacteriaceae* et autres bâtonnets Gram-négatifs non exigeants qui utilise 20 tests biochimiques miniaturisés et une base de données.

○ **Principe**

La bandelette API 20^E est constituée de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Ces tests sont ensemencés avec une suspension bactérienne qui reconstitue le milieu. Au cours de l'incubation, le métabolisme produit des changements de couleur qui sont soit spontanés, soit révélés par l'ajout de réactifs.

Les réactions sont lues selon le tableau de lecture et l'identification est obtenue en se référant à l'index du profil analytique ou à l'aide du logiciel d'identification (Rakotovo-Ravahatra, 2021).

○ Mode opératoire

a. Préparation de la galerie : nous avons réparti 5 ml d'eau distillée dans les boîtes d'incubation pour créer une atmosphère humide, puis nous y avons placé la galerie.

b. Préparation de l'inoculum : nous avons prélevé une seule colonie bien isolée sur le milieu gélose à l'aide d'une anse de platine. Nous avons préparé une suspension bactérienne avec une ampoule de suspension Médium.

c. Inoculation de la galerie : à l'aide d'une pipette, nous avons rempli les tubes et cupules des tests |CIT |, |VP |, |GEL|.

Nous avons ensuite rempli les tubes (et non les cupules) des autres tests.

Nous avons créé une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, URE, H₂S remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

La boîte d'incubation a été refermée avec son couvercle et placée à l'étuve à 37 °C pendant 18 – 24 heures.

○ Lecture de la galerie

Après 18 – 24 h, nous avons lu les réactions conformément au tableau de lecture.

Si trois tests ou plus (test Glu + ou -) sont positifs, révéler les tests nécessitant l'addition des réactifs.

- test TDA : ajouter une goutte de réactifs + AD, s'il donne la couleur marron-rougeâtre → réaction positive

- test IND : ajouter une goutte de réactif de Kovacs, s'il donne un anneau rouge obtenu en 2 minutes → réaction positive

- test VP : ajouter une goutte des réactifs VP1 et VP2, attendre 10 min, s'il donne une couleur rose au rouge → réaction positive

- test NO₂ : ajouter une goutte des réactifs NiT 1 et NiT 2 dans le tube Glu. Attendre 2 à 5 min, s'il donne la couleur rouge → réaction positive. Et s'il donne une coloration jaune → réaction positive.

Elle peut être due à la production d'azote : ajouter 2 à 3 mg de réactif Zn à des cupules Glu. Après 5 min : si on observe un tube jaune → réaction positive. Et si on observe la couleur orange-rouge → réaction négative (Sira, 2004).

○ 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 (Delarras, 2007).

Remarque : il est important de veiller à ne pas créer de bulles d'air lors de l'inoculation, ce qui pourrait affecter les résultats. De plus, l'apparition de bulles d'air après incubation fournira des caractères de reconnaissance supplémentaires (GAZ+).

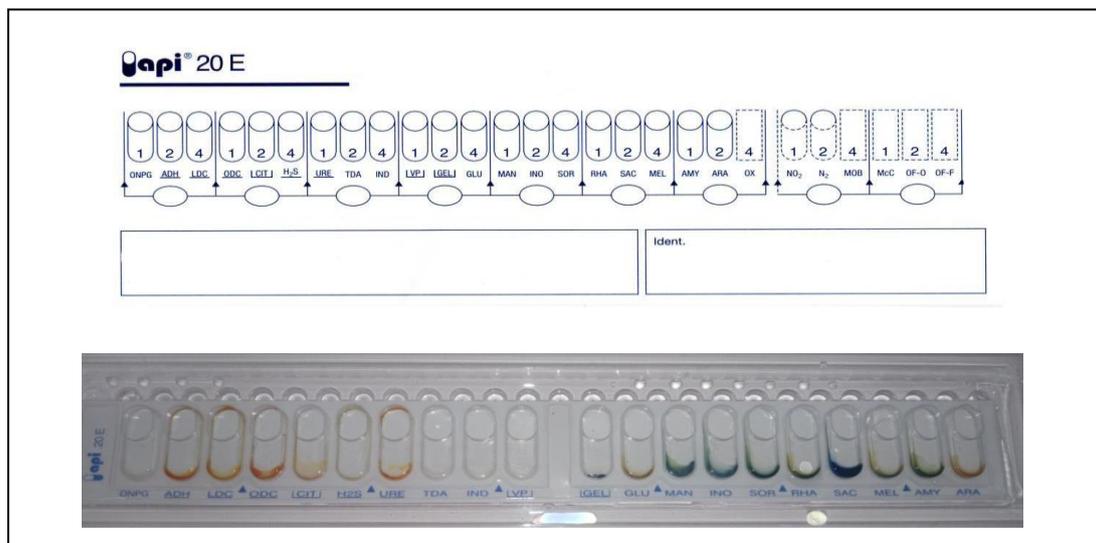


Figure 13 : La galerie Api 20E

3.4. Lecture et interprétation des résultats

3.4.1. Expression des résultats

Le nombre de microorganismes présents dans un échantillon de produit donné s'obtient par la formule suivante selon la norme AFNOR (2001) :

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

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.

3.4.2. Méthode d'interprétation

Les résultats de l'analyse microbiologique ont été interprétés selon les critères microbiologiques fixés par les normes ISO (Dromignye, 2011) et les normes Algériennes. Ces derniers critères d'évaluation ont été fixés par arrêté ministériel du 2 juillet 2017 et publiés sur le Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire n°39.

Tableau 3. Références normatives des microorganismes.

Germe	FMAT/g	Coliforms totaux	<i>Staphyloco</i> <i>c-cus/g</i>	Salmonelle /25g	Moisissure s
m	10 ³	10 ²	10 ²	Absence	10 ²
Normes	JORA	(ISO 4832 : 2006)	JORA	JORA	JORA

Selon Mutsch (2015), le critère microbiologique est « un ensemble d'éléments qualitatifs et quantitatifs définissant les caractéristiques microbiologiques essentielles

attendues d'un produit donné qu'il est possible d'atteindre par des interventions appropriés». Le tableau 3 montre les critères microbiologiques utilisés pour cette étude.

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



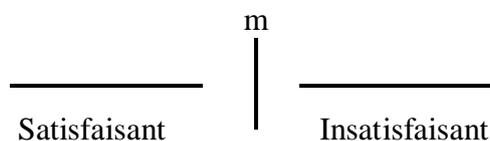
- Si les résultats sont inférieurs ou égaux à 3m, le produit est « satisfaisant ».
- Si les résultats sont supérieurs à 3m et inférieurs ou égaux à 10m, le produit est « acceptable » (M=10m).

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 ou n'inférieur à la norme m: le résultat est satisfaisant,
- Présence ou n supérieur à la norme m : le résultat est insatisfaisant « aliment impropre à la consommation humaine ».

Chapitre 4

Résultats et discussions

4.1. Résultats des analyses microbiologiques

Les résultats des échantillons de pain analysés dans cette étude ont montré que le pain présente une communauté bactérienne très diversifiée.

4.1.1. Flore Mésophile Aérobie totale

Correspondant au grand nombre de micro-organismes, la charge bactérienne globale présente dans les aliments peut être évaluée.

4.1.1.1. Aspect macroscopique

Après un temps d'incubation de 24 à 72 heures à 37°C, l'aspect macroscopique des colonies de la FTAM obtenue sur les boîtes de pétri est montré dans la figure 14

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

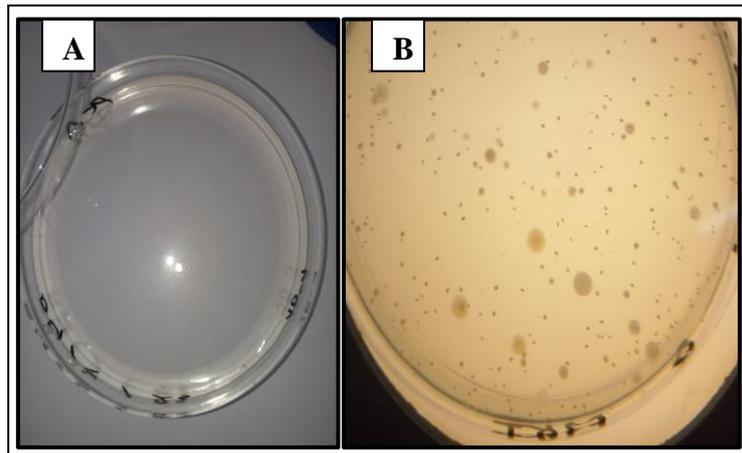


Figure 14 : Résultats de recherche de la Flore Aérobie Mésophile Totale sur milieu PCA
(Photo originale, 2023).

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

4.1.2. Coliforme totaux

4.1.2.1. Aspect macroscopiques

Les boîtes montrent sur la figure ci-dessous des petites colonies de moins de 2 mm de diamètre, de couleur violette, de forme lenticulaire.

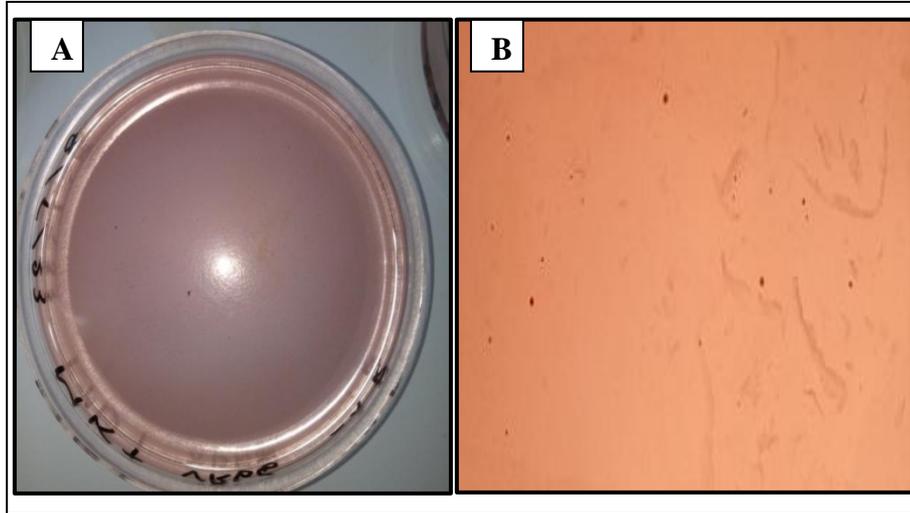


Figure 15 : Résultats de recherche des coliformes totaux sur milieu VRBG (Photo originale, 2023).

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

4.1.3. *Escherichia coli*

4.1.3.1. Aspect macroscopique

Les boîtes MacConkey présentent des colonies roses à bords réguliers, bombés, de consistance crémeuse, de taille moyenne de couleur crémeuse. D'autres colonies jaunes poussent sur le milieu MacConkey.

La coloration de Gram et les tests biochimiques : catalase et API 20E sont réalisés pour les quatre échantillons.

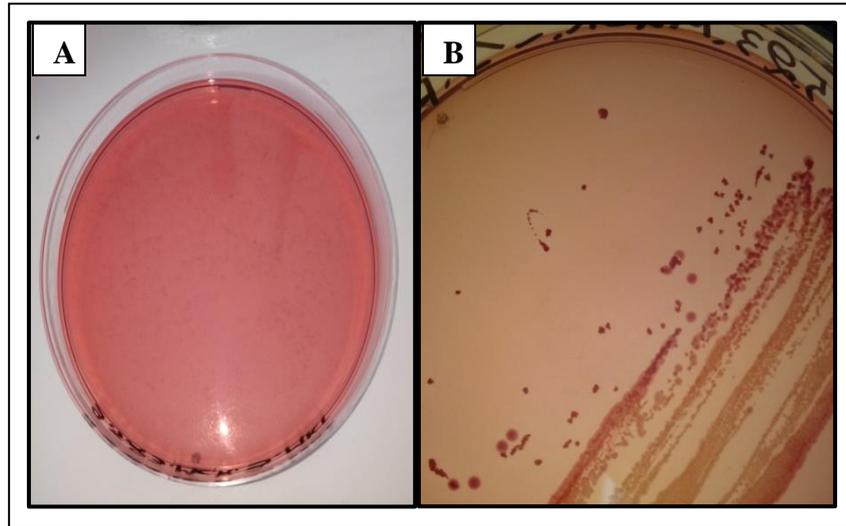


Figure 16 : Résultats d'ensemencement sur milieu MacConkey (Photo originale, 2023).

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

4.1.3.2. Aspect microscopique

L'examen microscopique (état frais et coloration de Gram) a été fait pour toutes les cultures, le résultat est représenté dans la figure

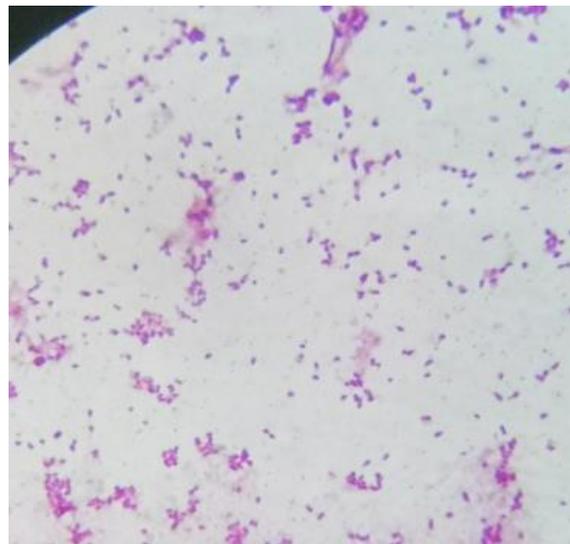


Figure 17 : Résultat de l'observation microscopique des colonies obtenues sur milieu MacConkey après coloration de Gram (grossissement 10×100) (Photo originale, 2023).

4.1.3.3. Tests biochimiques

➤ Test catalase

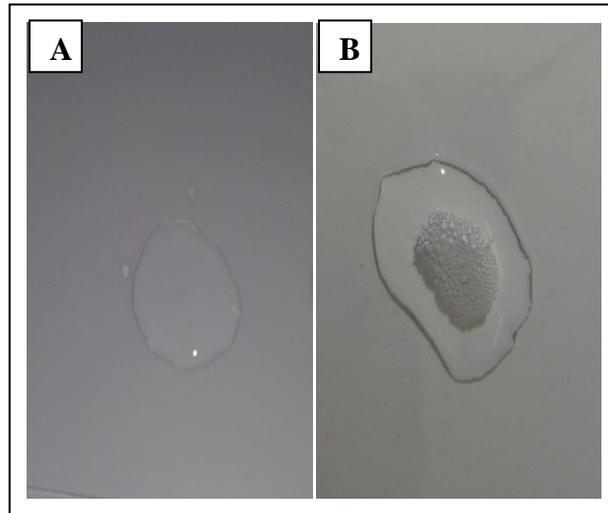


Figure 18 : Résultats du test catalase

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

➤ GalerieAPI 20 E

Tableau 4.Résultats d'identification des germes par APi20E

Echantillon	Numéro de code	Nom de la bactérie
F1	5107773	<i>Serratia liquefaciens</i>
P1	5164463	<i>Escherichia coli</i>
F2	7314773	<i>Enterobacter cloacae</i>
P2	5105773	<i>Klebsiella aerogenes</i>

Le résultat d'échantillon P1 est présenté dans la figure ci-dessous qui montre la présence d'*Escherichia coli*. Pour les autres échantillons voir l'annexe N 4 :



Figure 19 : Résultats de la galerie API 20 E de l'échantillon P1

4.1.4. *Staphylococcus aureus*

4.1.4.1. Aspect Macroscopique

Les boîtes présentées dans la figure ci-dessous, montrent la présence des colonies noires de petite taille, rondes noires à surface lisse, bords réguliers, aplaties, visqueuses, entourées d'un halo transparent.

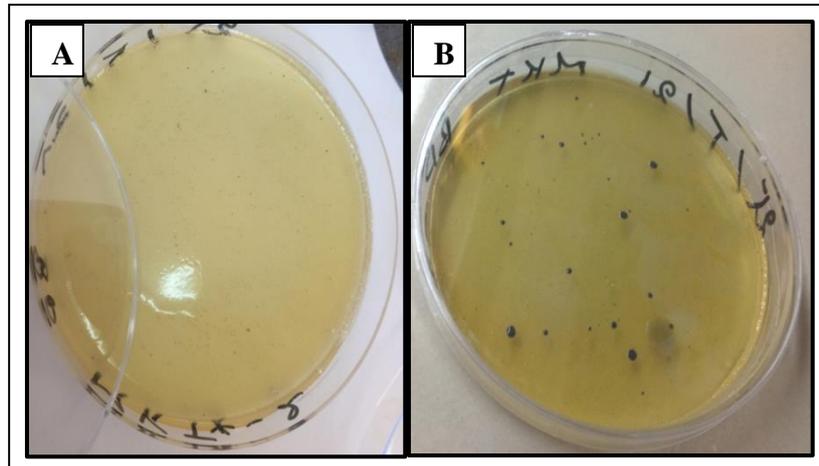


Figure 20 : Résultat de recherche de *Staphylococcus aureus* sur milieu Baird Parker (Photo originale, 2023).

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

4.1.4.2. Aspect microscopique

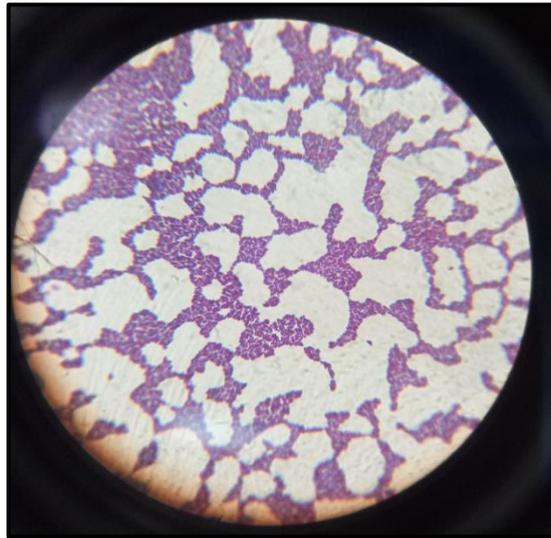


Figure 21 : Observation microscopique de *Staphylococcus aureus* (un grossissement 10×100) (Photo originale, 2023).

4.1.4.3. Tests biochimiques

A- Test catalase

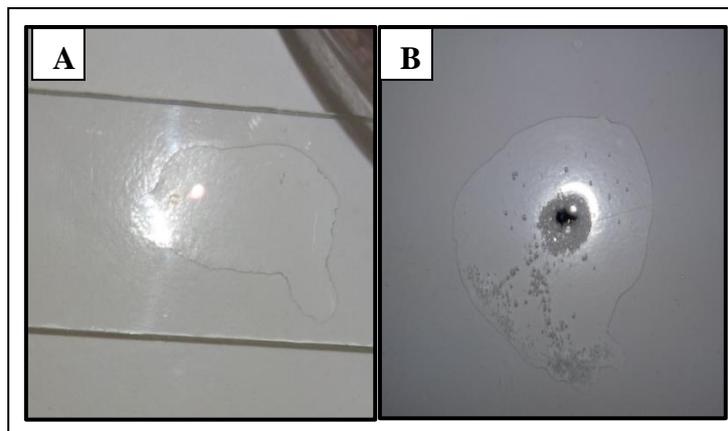


Figure 22. Résultat du test catalase (photo originale, 2023).

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

B- Test couagulase**Figure23.** Résultat du test coagulase. (Photos originales, 2023)**C- Test TSI****Figure 24.**Résultats de test TSI**Tableau 5.**Résultats des tests biochimiques des colonies obtenus sur le milieu BP.

Milieu	Colonie	Catalase			TSI			Coagulase
			Glu	Lac	Sac	H ₂ S	Gaz	
BP	Noire	+	+	+	+	-	-	+

4.1.5. Clostridium sulfito-réductrice

Tous les échantillons étaient exempts des spores de *Clostridium sulfito-réducteur*, cela est montré dans la figure ci-dessous.

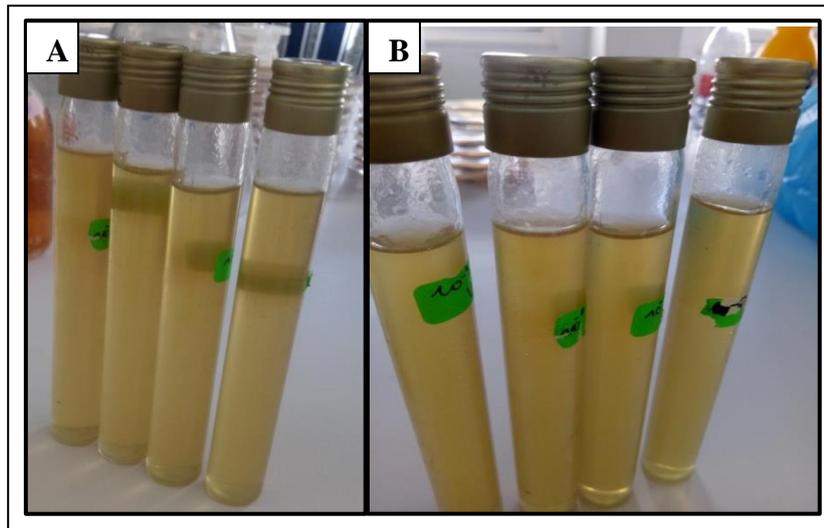


Figure 25. Résultats de recherche des spores de *Clostridium sulfite réducteur*
(Photo originale, 2023).

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

4.1.6. *Salmonella*

4.1.6.1. Aspect Macroscopique

Les salmonelles ont été absentes dans tous les échantillons, cela est montré dans la figure ci-dessous.

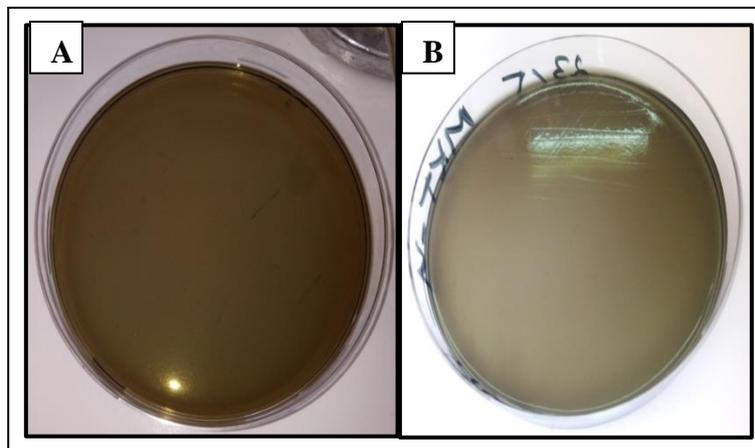


Figure 26. Résultat de recherche des *salmonella* sur la gélose Hecktoen
(Photo originale, 2023).

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

4.2. Résultats des analyses de la flore fongique

4.2.1. Aspect Macroscopiques

Après 96 heures d'incubation, les caractères macroscopiques des différentes souches sont étudiés, Le tableau suivant résume l'aspect du mycélium des souches isolées, la consistance des colonies, la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.

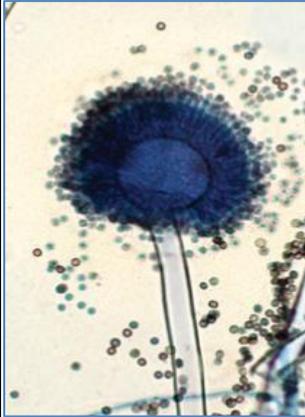
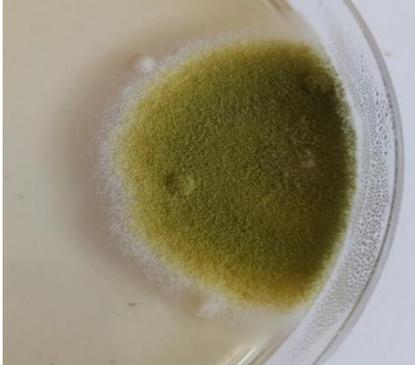
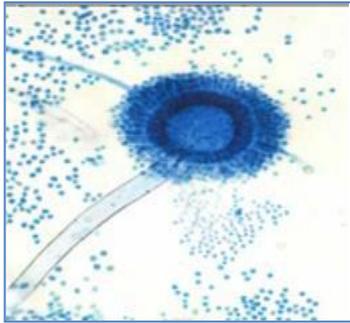
4.2.2. Aspect microscopiques

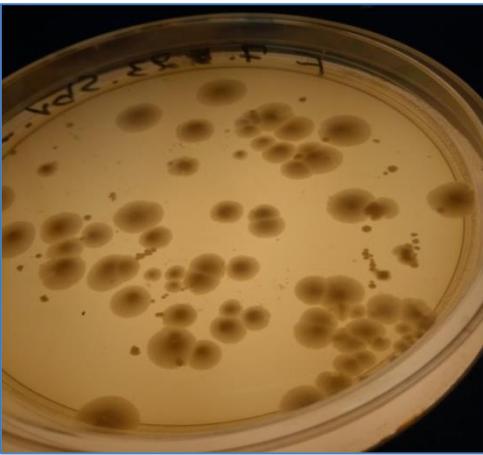
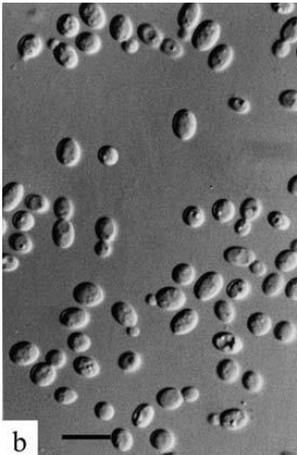
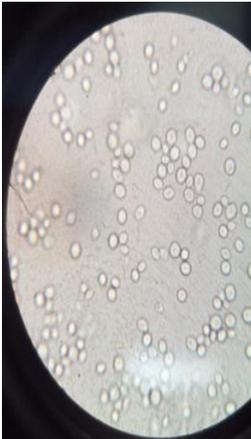
L'identification microscopique repose principalement sur des études morphologiques du mycélium (présence de cloisons, couleur, différenciation) et des spores (forme, couleur, texture des parois).

L'identification de ces genres s'est essentiellement basée sur les clés identifiées décrites dans la littérature (Tabuc, 2007 ; Pitt et Hocking, 2009) et présentées dans les tableaux suivantes :

Tableau 6. Résultats des aspects macroscopiques et microscopiques (grossissement 10×100) du l'étalement sur milieu Saboraud

Espèce/ Genre	Aspect Macroscopique (Photo originale, 2023).	Description
<i>Aspergillus niger</i>		<ul style="list-style-type: none"> -Aspect : granuleuse -Recto : noir -Vitesse : rapide (2-3 jours) -Pigment : pas de pigment

	<p>Photos de reference (Tabuc, 2007)</p> 	<p>Aspect microscopique (Photos originale, 2023)</p> 	<p>Caractères microscopique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hyphe : non cloisonnée. - Conidiophore lisse et hyalin. - Vésicules : globuleuse. - Phialides: insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule. - Têtes aspergillaire: bisériées, radiées, noire à maturité
	<p>Aspect Macroscopique</p> 		<p>Description</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aspect: duveteuse à poudreuse. - Recto : vert-jaune. - Vitesse : rapide. - Pigment : incolore, pas de pigment.
<p><i>Aspergillus flavus</i></p>	<p>Photos de reference (Tabuc, 2007).</p> 	<p>Aspect microscopique</p> 	<p>Caractères microscopiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Têtes aspergillaire: unisériées ou bisériées. - Hyphe : non cloisonnée. - Conidiophores hyalins. - Vésicules : sphérique. - Phialides : directement insérées sur la vésicule ou portées par des métules.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aspect Macroscopique		Description
			<ul style="list-style-type: none"> - Forme : ronde plate - Aspect : crémeuse lisse - Recto:blanchâtres - Vitesse :rapide
	Photos de référence	Aspect microscopique	Caractères microscopiques
			<ul style="list-style-type: none"> - Les cellules sont, plus ou moins sphériques, pourvues d'un noyau, marges circulaires, surface luisante, se reproduisant par bourgeonnement irrégulier

4.3. Présentation et discussion des résultats de dénombrement

Tableau 7. Résultats de dénombrement et interprétation de présence des germes.

	Ech	F1	P1	F2	P2
Flore totale (UFC/g)	N	$3.45. 10^2$	$1.22. 10^3$	$6.18. 10^2$	$7.81. 10^3$
	Intr	S	A	S	A
Coliformes totaux (UFC/g)	N	$<10^2$	$3. 10^2$	$<10^2$	$6.63. 10^2$
	Intr	S	A	S	A

S. aureus (UFC/g)	N	4.10^2	$1.3.10^3$	$2.90.10^2$	$4.54.10^2$
	Intr	A	IN	A	A
Salmonelle (UFC/g)	N	00	00	00	00
	Intr	S	S	S	S
Moisissures (UFC/g)	N	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	Intr	S	S	S	S
Conformité		C	NC	C	C

N : charge microbienne, **intr** : interprétation, **S** : satisfaisant, **A** : acceptable, **IN** : insatisfaisant, **C** : conforme, **NC** : non conforme.

4.3.1. Variation globale de niveau de contamination

L'appréciation du niveau de contamination globale est consignée dans la figure ci-dessous

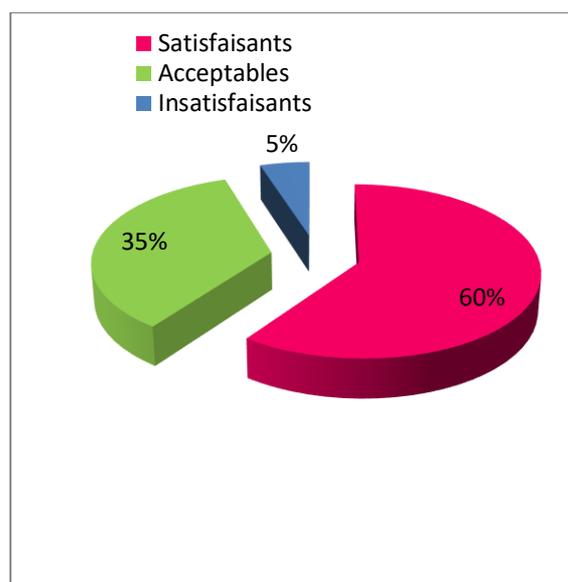


Figure 27. Distribution de la qualité microbiologique de pain.

Le résultat de la figure 27 montre que 60 % des échantillons testés ont une qualité satisfaisante, 35 % ont une qualité acceptable tandis que 5 % ont une qualité non satisfaisants.

Les résultats du pourcentage des niveaux de contamination dans les deux sites étudiés, à la sortie de four et au niveau des points de vente sont représentés dans la figure ci-dessous

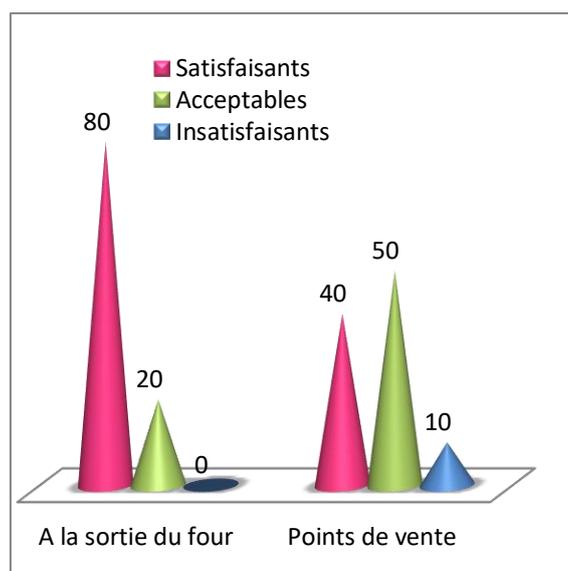


Figure 28. Répartition des niveaux de contamination du pain à la sortie de four et au niveau des points de vente

La figure montre une grande variation entre les deux sites, si que le pourcentage de pain satisfaisant au sort de four est plus élevée par rapport ce qui est au niveau des points de vente c'est-à-dire la contamination du pain à la sortie de four est plus réduites, ce résultat est similaire à celui de Umba et al.,(2018), qui, lors d'une étude d'évaluation de la qualité microbiologique des pains commercialisés, indique que le pain vendu au niveau du détaillant est le plus contaminé.

La flore contaminant à la sortie de four est très réduite, en raison des fortes températures utilisées lors de la cuisson du pain. Tout indique que les quelques germes présents proviennent de la contamination apporté par les manipulations du pain lors de la sortie du four et à l'ensachage. (Umba et all., 2018)

4.3.2. Variation de niveau de contamination en fonction de germes dans chaque site

Les figures ci-dessous montrent un taux de satisfaction des germes recherchés à la sortie de four et au niveau des points de vente

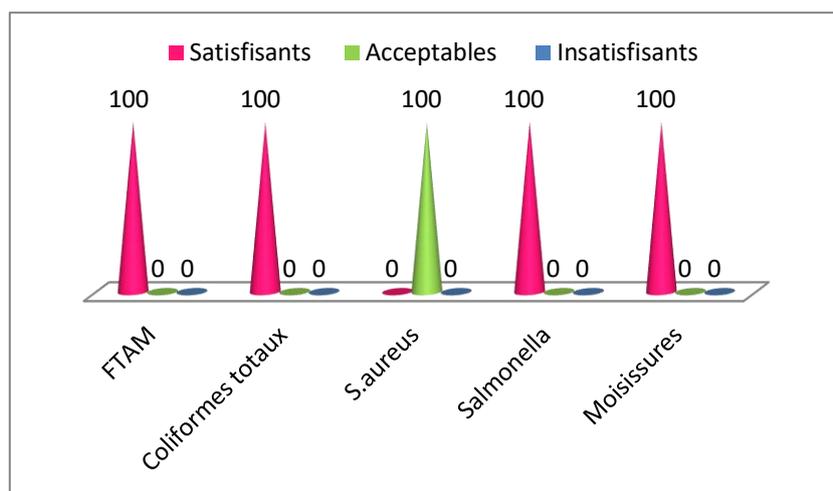


Figure 29. Répartition des niveaux de contamination du pain au sort de four.

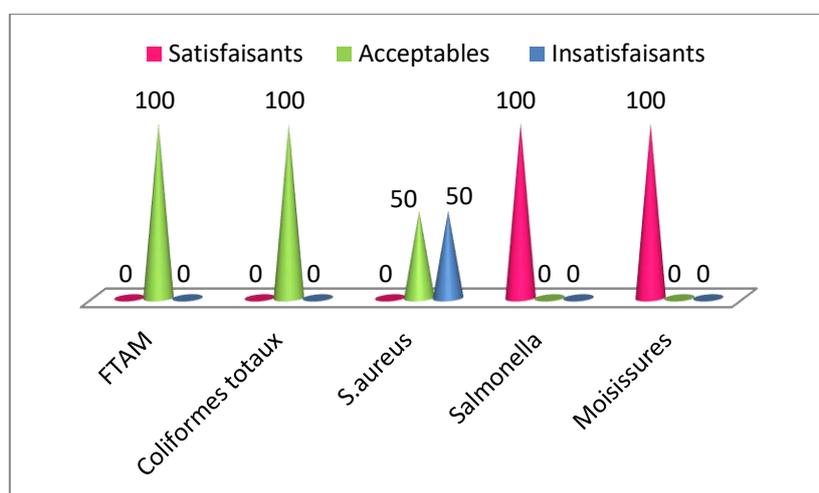


Figure 30. Répartition des niveaux de contamination du pain à niveau des points de vente.

Pour les FTAM, la qualité du pain à la sortie de four est 100% satisfaisante, alors qu'elle est 100% acceptable au niveau des points de vente. Ces résultats sont en concordance avec celui de KONE (2020) qui a trouvé un pourcentage de 77.4% de FTAM dans des échantillons prélevés au niveau des boulangeries et 98,9% au niveau des points de vente. Ceci pourrait s'expliquer par l'exposition prolongée du pain à l'air libre, les aérobies mésophiles étant présents dans ce milieu. La charge en FTAM permet de s'informer sur la qualité microbiologique et hygiénique des denrées alimentaires. En effet, l'excès de ces germes témoigne du non-respect des règles d'hygiène lors de la fabrication, des mauvaises conditions d'entreposage et de la mauvaise qualité des matières premières (Ennadir et al., 2012).

Pour les coliformes totaux, la qualité du pain à la sortie de four est 100% satisfaisante par rapport au qu'au niveau des points de vente dont la qualité est 100% acceptable, ce qui signifie qu'il est conforme au règle de consommation, ces résultats sont comparable à celui de Ennadir et al.(2012) qui a trouvé, un taux de coliformes totaux inférieur au seuil de la norme, et que ses échantillons de farines du blé analysés possèdent généralement une qualité microbiologique satisfaisante. Lorsque la satisfaction totale est atteinte en ce qui concerne les coliformes totaux, cela dénote d'une absence récente de contamination fécale, témoignant ainsi du respect des règles hygiène, notamment en ce qui concerne une hygiène corporelle appropriée du personnel et une utilisation adéquate des installations sanitaires. La présence de mouches (qui sont souvent porteuses de matières fécales) et d'animaux près des points de rejet justifie également la présence de coliformes.

Des isolats appartiennent aux genres *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* et *Serratia* qui forment le groupe des coliformes, considérés comme indicateurs de contamination fécale ont été trouvés, Ces résultats sont similaires à ceux d'Umba *et al.*(2018) et de Djogbe *et al.* (2019). La presque totalité de ces espèces ne sont pas pathogènes et ne représentent pas de risque direct pour la santé, à l'exception de certaines souches de *E. coli* qui est devenu l'un des agents pathogènes d'origine alimentaire les plus importants (Mladenović *et al.*, 2021), ainsi que de rares bactéries pathogènes opportunistes (Degnon *et al.*, 2020).

Concernant les *S.aureus*, le pain à la sortie de four montre une qualité acceptable à 100% et au niveau des points de vente montre une qualité acceptable dans 50% des échantillons et une qualité insatisfaisante dans 50% des échantillons. Ce résultat est similaire à celui d'Umba *et al.* (2018) et Djogbe *et al.*(2019) qu'ils ont trouvés la présence d'un taux de *S.aureus* supérieur à la norme .L'existence de staphylocoques dans le pain présente un risque pour la santé du consommateur. Leur présence peut également indiquer une recontamination par des matières premières ou de mauvaises conditions d'entreposage.

Aucune salmonelle n'a été trouvée dans l'ensemble des échantillons analysés, nos résultats sont en accord avec ceux établi par Kone *et al.* (2020) et Irma Caro *et al.*(2022). Cependant les résultats obtenus par Djogbe *et al.* (2019) indique la présence des salmonelles avec un pourcentage de 25 %. Notre résultat montre le respect des normes d'hygiène lors des manipulations et aussi l'absence des sources de ce germe tel que les volailles et les œufs.

Concernant les Anaérobies Sulfite-Réductrices, les résultats obtenus indiquent une absence totale des spores des ASR dans tous les échantillons, ce résultat est similaire à celui

trouvé par Kone *et al.*, (2020). Cette absence peut être expliquée par l'efficacité des mesures de nettoyage, désinfection et une cuisson adéquate des denrées. La présence des spores est indicative d'une contamination ancienne.

Des *Saccharomyces cerevisiae* ont été trouvés, ce germe représente la principale levure impliquée dans la fermentation de pâte du pain. Les levures sont généralement inoffensives pour l'homme, cependant, Djogbe *et al.* (2019) a montré qu'elles peuvent provoquer quelques troubles gastro-intestinaux lors d'une absorption massive.

Pour les moisissures, nos résultats ont montré la présence de différentes espèces comme *Aspergillus Niger* et *Aspergillus flavus* mais leur nombre reste sous les normes. En revanche, Caro *et al.* (2022) a signalé la présence *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium camemberti*, *Aspergillus niger* et *Candida*. Les résultats obtenus par Vagelas *et al.* (2011) ont prouvé que la contamination du pain par les moisissures est d'origine externe (après la cuisson) car les spores existantes dans la farine au cours d'un processus technologique normal n'ont aucune condition de multiplication et pendant la cuisson, elles sont détruites. La propagation des spores de moisissures et la contamination du pain peuvent avoir lieu indirectement par l'air dans la salle de stockage ou par contact direct avec des boîtes, des caisses, du matériel de transport, etc.

Conclusion

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer la qualité microbiologique du pain commercialisé au niveau du centre-ville de la Wilaya de Biskra par la recherche et le dénombrement des germes suivants : FTAM, coliformes totaux, *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus*, anaérobies sulfito-réducteurs, *Salmonella* et flore fongique.

Les analyses microbiologiques ont permis de mettre en évidence les résultats suivants :

- La qualité du pain à la sortie du four était 80% satisfaisante et 20% acceptable ;
- La qualité du pain au niveau des points de vente était 40% satisfaisante, 50% acceptable et 10% non satisfaisante.

Les résultats de l'évaluation du niveau de contamination du chaque germe sont les suivants :

- Le pain à la sortie de four : la qualité était 100% satisfaisante pour les FTAM, les coliformes totaux, les salmonelles et les moisissures alors qu'elle était 100% acceptable pour *S.aureus*.
- Le pain au niveau des points de vente : la qualité était 100% satisfaisante pour les salmonelles et les moisissures, 100% acceptable pour les FTAM et les coliformes totaux et pour *S. aureus*, elle était 50% acceptable et 50% insatisfaisante.

Recommandations

Nous recommandons de renforcer les mesures prises pour garantir la qualité des pains commercialisés en améliorant l'éducation et la formation du personnel en matière d'hygiène et de sécurité alimentaire sur toute la chaîne de distribution .

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

Références Bibliographique

Bibliographie

1. **Adnan A. F. M., Tan I. K. 2007.** Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource technology*, 98(7) :1380-1385.
2. **Ait abdelouahab N. 2007.** Microbiologie Alimentaire. 3rd Edition. Office des publications universitaires, Alger, pp. 12-24.
3. **Ali Zaber M. 2022.** ACRYLAMIDE QUANTITATION AND QUALITY ASSESSMENT OF LOCALLY AVAILABLE BREADS IN CHATTOGRAM (Doctoral dissertation, Chattogram Veterinary & Animal Sciences University, Bangladesh, 61p.
4. **Aljamali N. M., AlNajim M. M., Alabbasy A. J. 2021.** Review on food poisoning (types, causes, symptoms, diagnosis, treatment). *Global Academic Journal of Pharmacy and Drug Research*, 3(4): 54-61.
5. **Alloui N., Guergueb N., &Ayachi A. 2013.** Relation entre les pratiques d'hygiène d'abattage contamination bactérienne des carcasses de poulets dans la région de Biskra (Algérie). *Dixièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, La Rochelle*.
6. **Astier-Théfenne H., Wolf A., Darles C., Garnotel É. 2014.** Vérification des performances d'une méthode selon le SH FORM 44 : application à la coloration de Gram. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2014(461) : 37-46.
7. **Ates M., Ozkizilcik A., Tabakoglu C. 2011.** Microbiological analysis of stuffed mussels sold in the streets. *Indian Journal of Microbiology*, 51(3): 350-354.
8. **Bachtarzi N., Amourache L., Dehkal G. 2015.** Qualité du lait cru destiné à la fabrication d'un fromage à pâte molle type Camembert dans une laiterie de Constantine (Est algérien) [Quality of rawmilk for the manufacture of a Camembert-type soft cheese in a dairy of Constantine (eastern Algeria)]. *Int J Innov Sci Res*, 17(1): 34-42.
9. **Becila A. 2009.**Prévention des Altérations et les Contaminations Microbiennes desAliments. En vue de l'obtention du diplôme de Poste-Garde Spécialiste, option : Alimentaire, Nutrition et Santé, Filière : Science Alimentaire et nutrition. 75p.
10. **Caro I., Portales S., Gómez M. 2023.** Microbial characterization of discarded breads. *LWT*, 173 : 1-8.
11. **Cauvain S. P., & Young L. S. 2011.** The stability and shelf life of bread and other bakery products. In *Food and beverage stability and shelf life*. Woodhead Publishing. pp. 657-682.
12. **Chama Z., Benabbou A., Derras H., Benchiha N. N., Hasnia D., Klouche L. 2021.**Bacteriological Profile of Urinary Tract Infections and Antibiotic Resistance Profile in the Telagh Region (West Algeria). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology*, 13(2): 275-296.
13. **CLOTAIRE V., MOLINIE J., GROS O., PETIT R. H. 2011.** Spores de moisissures en air intérieur : cas d'un bâtiment en Guadeloupe Mold spores in indoor air : example of a building in Guadeloupe. pp. 197-204.
14. **Choudhary D., Jawa C., Dhuria D., Sain M., Mehara M., Kalwaniya M. K. 2022.** Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw fish meat samples and assessment of the coagulase test in the identification of *Staphylococcus aureus* isolates. *1324-1327* :(7)11 .

15. **Degnon R. G., Konfo C. T., Aboudou K., Bagbonon Y. M. 2020.** Influence de la variété sur les caractéristiques microbiologiques, physico-chimiques et sensorielles du afitin, un condiment produit à base de graines de soja au Bénin. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 29(4): 1153-1160.
16. **Delarras C. 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier, Paris. 476p.
17. **Demissie S., Natea G., Raga D. 2018.** Microbial quality and safety of bread sold in cafeteria, tea and bread shop of Jimma town, Oromia regional state, southwest Ethiopia. *Int J Adv Res*, 6(1) : 771-779.
18. **Dennaï N., Kharrati B., El Yachioui M. 2001.**Appréciation de la qualité microbiologique des carcasses de bovins fraîchement abattus. *Annale de la Médecine Vétérinaire*, 145(4) : 270-274.
19. **Dilbaghi N., Sharma S. 2007.** Food spoilage, food infections and intoxications caused by microorganisms and methods for their detection.42 p.
20. **Diouf A. B. K., AYSSIWEDE S. B., DIAWARA A., MUSABYEMARIA B. 2022.** Évaluation de la qualité microbiologique des poissons transformés artisanalement dans la Commune de Joal–Fadiouth, Département de Mbour (Sénégal).10 p.
21. **Djogbe A. A. M., Tchekessi C. K. C., Sachi P., Degbey C., Bleoussi R., Banon J., Yaou I. B. 2019.** Microbiological Characterization of Salty Bread, Soy Cheese and Three Yogurt Varieties Sold in the Streets of Benin. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, 8(8) : 2201-2216.
22. **Dromignye, 2011.** Les critères microbiologiques des denrées alimentaires : réglementation, agents microbiens, autocontrôle, Lavoisier, Paris, 509 p.
23. **Doyle C. J., Gleeson D., Jordan K., Beresford T. P., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Cotter P. D. 2015.** Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 197 : 77-87.
24. **Doyle M. P. 2009.** Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. Springer Science & Business Media.Griffin, GA, USA.376p.
25. **Ennadir J., Hassikou R., Ohmani F., Hammamouchi J., Bouazza F., Qasmaoui A., ... & Khedid K. 2012.** Qualité microbiologique des farines de blé consommées au Maroc. *Canadian journal of microbiology*, 58(2): 145-150.
26. **Eselin 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, d'Avignon, France, 197 p.
27. **Feillet P. 2000.** Le grain de blé : composition et utilisation. Editions Quae.308 p.
28. **Fgui I., Ayeb N., Arroum S., Dbara M., Hammadi M., &Khorchani T. 2021.** Décongélation de la viande cameline et qualité microbiologique. *Viandes & Produits Carnés*. 4p.
29. **Filius P. M. G., van Netten D., Roovers P. J. E., Vulto A. G., Gyssens I. C., Verbrugh H. A., &Endtz H. P. 2003.**Comparative evaluation of three chromogenic agars for detection and rapid identification of aerobic Gram- bacteria in the normal intestinal microflora. *Clinical microbiology and infection*, 9(9), 912-918.

30. **Flesch F., Tournoud C., Jaeger A. 1998.** Acute poisoning by barbiturates, tranquilizers, tricyclics, paracetamol, salicylates. Diagnosis, treatment. *La Revue du praticien*, 48(11) : 1257-1261.
31. **Galić K., Ćurić D., Gabrić D. 2009.** Shelf life of packaged bakery goods—A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(5):405-426.
32. **Garcia M. V., Copetti M. V. 2019.** Alternative methods for mould spoilage control in bread and bakery products. *International Food Research Journal*, 26(3) : 737-749.
33. **Ghafir Y., Daube G. 2007.** Le point sur les méthodes de surveillance de la contamination microbienne des denrées alimentaires d'origine animale. Université de Liege, Belgium. In *Annales de Médecine Vétérinaire* 151 : 79-100.
34. **Giannou V., Kessoglou V., Tzia C. 2003.** Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. *Trends in Food Science & Technology*, 14(3) : 99-108.
35. **Giménez A., Ares F., Ares G. 2012.** Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches. *Food research international*, 49(1) : 311-325.
36. **Hamad S. H. 2012.** Factors affecting the growth of microorganisms in food. *Progress in food preservation*, pp. 405-427.
37. **Hamdi W., Touil Y., Ould Elhadj M. 2022.** Influence de l'environnement sur la qualité des eaux domestiques localités de la cuvette de ouargla (SAHARA SEPTENTRIONAL EST ALGERIEN). *Algerian journal of arid environment*, 12(1): 53-70.
38. **Hammoudi A., Bousmaha F., Bouzid R., 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.
39. **Hocine L., Tefiel B., Moustapha A., Allaoui A., Benamara K. 2018.** Microbiological and physicochemical quality of honeys from South and South-West of Niger. *Journal of Food and Nutrition Research*, 6(6) : 406-413.
40. **Islam M. S., Zhou Y., Liang L., Nime I., Liu K., Yan, T, et al. 2019.** Application of a phage cocktail for control of Salmonella in foods and reducing biofilms. *Viruses*, 11(9) : 841p.
41. **ISO 4832 (V 08-015). 2006.** microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes, méthode par comptage des colonies obtenues à 37°C. 6p.

42. **ISO 4833-1 . 2003.** Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes — Partie 1 : Comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en profondeur. 9 p.
43. **ISO 6579-1 . 2017.** Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* — Partie 1: Recherche des *Salmonella spp.* 50p.
44. **ISO 6887-1 :2017.** Microbiologie de la chaîne alimentaire — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1 : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales. 28p.
45. **ISO 11133. 2014.** Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture. 103p.
46. **Joffin C et Joffin J. N. 1999.** Microbiologie alimentaire. 5^{ème} édition. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine. 212p
47. **Joffin C and Joffin J.N. 2003.** Microbiologie alimentaire, Edition : Canopé -CRDP, 5^{ème} édition, Bordeaux, France, 213p.
48. **Joffin J. N., Leyral G. 2001.** Microbiologie technique 1 dictionnaire des techniques. 3^e éd. Biologie technique ; 312p.
49. **Jourdren S. 2017.** Le processus oral, une étape clé à l'origine des propriétés sensorielles de texture et d'arôme du pain. Quels sont les rôles de sa structure et de sa déstructuration en bouche sur les dynamiques de perceptions ? Thèse de doctorat d'état, Université Paris Saclay (COMUE), 277p.
50. **JORA (Journal officiel de la République algérienne). 2012.** Arrêté ministériel N°51 au 29 juillet 2012 : rendant obligatoire la méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies, p.19.
51. **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.
52. **JORA (Journal officiel de la République algérienne). 2017.** Arrêté interministériel N°39 du 2 juillet 2017 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires : techniques de prise d'essai et interprétation des résultats d'analyses microbiologiques, p. 31.
53. **Karki T. B., Timilsina P. M., Yadav A., Pandey G. R., Joshi, Y., Bhujel S., Adhikari R., Neupane, K. 2017.** Selection and Characterization of Potential Baker's Yeast from Indigenous Resources of Nepal. *Biotechnology research international*. 10p.
54. **Kone S., Samake M., Camara M. A., Maiga O. S., Kone A. Z., MAIGA A. M., ... & TOURE, O. 2020.** Evaluation de la Qualité Microbiologique et Chimique du Pain et de la Farine Servant à faire le Pain dans les Boulangeries de Bamako. *Revue Malienne de Science et de Technologie*, 1(23) : 4-11.

55. **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(4) : 174-193.
56. **Lightfoot N., 2002.** Analyses microbiologiques des aliments et de l'eau. Directive pour l'assurance qualité. Edition. Lavoisier, France : 387 p.
57. **Le H H. T., D'Asgard A., Andersen P. S., Nguyen H. M., Ta Y. T., & Nguyen T. T. 2021.** Large-scale *Staphylococcus aureus* foodborne disease poisoning outbreak among primary school children. *Microbiology Research*, 12(1) : 43-52.
58. **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- Glacerie de France, p. 7.
59. **Mladenović, K. G., Grujović, M. Ž., Kiš, M., Furmeg, S., Tkalec, V. J., Stefanović, O. D., & Kocić-Tanackov, S. D. (2021).** *Enterobacteriaceae* in food safety with an emphasis on raw milk and meat. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(23): 8615-8627.
60. **Moyes R. B., Reynolds J., Breakwell D. P. 2009.** Differential staining of bacteria: gram stain. *Current Protocols in Microbiology*, 15(1), A-3C.
61. **Mutsch L. 2015.** Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Lignes directrices pour l'interprétation. Service de la sécurité alimentaire/Direction de santé, F-054 Rev03, L-2361 Strassen, Luxembourg. 57 p.
62. **Naidoo S., Olaniran, A. O. 2014.** Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources. *International journal of environmental research and public health*, 11(1) : 249-270.
63. **Nicklin J., Graeme-Coo K., Killington R. 2000.** L'essentiel en microbiologie. Berti Editions, *Port Royal Livres*, 2000, Paris. pp 362.
64. **Ouahchia C., Hamaidi-Chergui F., Hamaidi M. S., Saidi F. 2015.** Qualité bactériologique de l'eau potable des différents réservoirs et chez les consommateurs de la commune de Tipaza alimentés par la station de Sidi Amar à partir de l'eau de surface du Lac-Barrage de Boukhourdane. *LARHYSS Journal*, (23) : 139-154.
65. **Pajohi-Alamoti M., Rezaei A., Mahmoudi R. 2016.** Microbial contamination of pastry cream: evidence from Hamedan, Iran. *Archives of Hygiene Sciences*, 5(3) : 207-213.
66. **Pitt J. I., Hocking A. D. 2009.** Fungi and food spoilage, vol. 519, New York: Springer, 388p.
67. **Preetha S. S., Narayanan, R. 2020.** Factors influencing the development of microbes in food. *Shanlax International Journal of Arts, Science and Humanities* 7(3): 57-77.
68. **Qian M., Liu D., Zhang X., Yin Z., Ismail B. B., Ye X., & Guo M. 2021.** A review of active packaging in bakery products: Applications and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 114 : 459-471.
69. **Rachedi K., Bekhouche S., Boughachiche F., Zerizer, H. 2021.** Contrôle microbiologique de denrées alimentaires servies en restauration collective. *Algerian Journal of Nutrition and Food Sciences*, 1(3) :22–30.
70. **Rakotovao-Ravahatra Z. D., Rahajamanana L., Rakotondraoelina L., Raskine L., Rasoanandrasana S., Rafalimanana C., ... & Rakotovao A. L. 2021.** Comparison of Bis NEG-D and API 20E for the Identification of Gram-negative Bacilli in the Laboratory of

- the University Hospital of Befelatanana Antananarivo Madagascar. *European Journal of Biology and Biotechnology*, 2(5) : 76-80.
71. **Saidane Z., Homrani M., Dahou A. E., Bouabssa F. S., Homrani A. 2023.** Pratiques d'élevage dans une ferme laitière à Hassi-Mamèche et leurs impacts sur les paramètres physico-chimiques et microbiologiques du lait. 6 p.
72. **Salifou C. F. A., Boko K. C., Ahounou G. S., Tougan P. U., Kassa S. K., FAROUGOU S., MENSAH G.A., CLINQUART A. YOUSAO A.KI. 2013.** Diversité de la microflore initiale de la viande et sécurité sanitaire des consommateurs. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7(3) : 1351-1369.
73. **Saranraj P., Geetha M. 2012.** Microbial spoilage of bakery products and its control by preservatives. *International Journal of Pharmaceutical & biological archives*, 3(1) : 38-48.
74. **Sira B. I. M. N. 2004.** Contrôle de Qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne, Doctoral dissertation, UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR. 119p.
75. **Savoie F. 2011.** Optimisation du protocole de recherche des *Escherichia coli* Producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les aliments. Doctoral dissertation, Université de Bourgogne. 198 p.
76. **Sharif M. K., Javed K., Nasir, A. 2018.** Foodborne illness: threats and control. In *Foodborne diseases*. Academic Press, pp. 501-523.
77. **Shamimuzzaman M., Roy R. K., Majumder T. R., Barman N. C., Lina N. N., Hasan M. T., Dash B. K. 2022.** Microbial profile of some ready-to-cook frozen food items sold in Dhaka city, Bangladesh. *Food Science and Human Wellness*, 11(2): 289-296.
78. **Shapter J. 2007.** Le grain livre des machines à pains : les meilleures recettes. Éditions deborée. 256 p.
79. **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.
80. **Soumoy H., Lisse M. 2022.** Analyse d'un poème de Francis Ponge : Le Pain. Faculté de philosophie, arts et lettres, Université catholique de Louvain. 30 p.
81. **Tewari G. & Juneja V. 2008.** *Advances in thermal and non-thermal food preservation*. Blackwell, Australia, Victoria. 281p.
82. **Tabuc C. 2007.** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines (Doctoral dissertation). 190p.
83. **Tripathi N., Sapra A. 2020.** Gram staining.
84. **Vagelas I., Gougoulas N., Nedesca E. D., Liviu G. 2011.** Bread contamination with fungus. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 3(2): 1-6.
85. **Villarino C. B. J., Jayasena V., Coorey R., Chakrabarti-Bell S., Johnson S. K. 2016.** Nutritional, health, and technological functionality of lupin flour addition to bread and other baked products: Benefits and challenges. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(5): 835-857.
86. **Umba J. M., Masimango T. N., Kashala J. C. K., Kusika, C. N., Musay P. N. 2018.** Analyse de la qualité microbiologique du pain commercialisé et consommé en l'état à Kinshasa (RD Congo). *Journal of Animal & Plant Sciences*. 38(2): 6244-6256.

- 87. Yves L. L., Florence B., Michel G. 2003.**[i] *Staphylococcus aureus* [/i] and food poisoning. Genetics and molecularresearch : GMR, 2(1) : 63-76.
- 88. Zinedine A. 2004.**Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. Thèse de doctorat d'état, université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Maroc, 162 p.
- 89. Site Web** https://www.lemonde.fr/culture/article/2022/11/30/la-baguette-de-pain-francaise-inscrite-au-patrimoine-immateriel-de-l-humanite-par-l-unesco_6152331_3246.html

Annexes

Annexe 1 : Préparation et Composition des Milieux de Culture.

Eau peptonée tamponnée	Gélose PCA
Peptone (20g).	Peptone (5g).
Chlorure de sodium (5g).	Extrait de viande (2,5g).
Phosphate di sodique (9g).	Glucose (facultatif : présent dans le milieu
Phosphate mono potassique (1, 5g).	PCA) (1g).
Eau distillée (1000ml).	Gélose (15g).
pH = 7.2	pH =7.2
Gélose VRBG	Macconkey
Extrait de levure (3g)	Peptone bactériologique (20 g).
Peptone (7g)	Sels biliaires (1.5 g).
Chlorure de sodium (5g)	Chlorure de sodium (5 g).
Sels biliaires (1.5g)	Lactose (10 g)
Glucose (10g)	Rouge neuter (0.03 g).
Rouge neutre (0.03g)	Cristal violet (0.001 g).
Cristal violet (0.002g)	Agar (15 g).
Agar (12g)	Eau distillée (1000 ml).
pH = 7.4	pH = 7.1
Gélose Hektoen	Gélose (BP) Baird Parker
Protéase peptone (2g).	Peptone (10.0g).
Extrait de levure (3g)	Extrait de viande de bœuf (4.0g).
Chlorure de sodium (5g)	Extrait de levure (2.0g).
Thiosulfate de sodium (5g)	Pyruvate de sodium (10,0g).
Sels biliaires (9g)	Glycocolle (12.0g).
Citrate de ferammoniacale (1.5g)	Chlorure de lithium (5.0g).
Salicine (2g)	Agar-agar (20.0g).
Saccharose (12g)	Eau distillée (1000m)l.
Lactose (2g)	- A ajouter en conditions stériles juste avant
Fuchsine acide (0.1g)	l'ensemencement : Émulsion de jaune
Agar (1.4g)	d'oeuf (<i>stérile</i>) : (50.0ml).

Eau distillée 1000ml pH = 7.5	Tellurite de potassium (0.1g). pH = 7.2
Sabouraud	Gélose viande foie (VF)
Peptone de gélatine (10g).	Extrait viande –foie (30g).
Glucose (20g).	Glucose (2g).
Agar (17).	Amidon (2g).
Eau distillé (1000ml).	Gélose (12g).
Après l'autoclavage et avant l'écoulement	Eau distillée (1000ml).
ajouter (Gentamycine) : pour 1L de milieu	pH = 7.6.
0.004 ml de Gentamycine	
pH= 5.6	
TSI : (Triple Sugar Iron)	
Tryptone (14,0 g).	
Extrait autolytique de levure (3,0 g).	
Extrait de viande (3,0 g).	
Glucose (1,0 g).	
Lactose (10,0 g).	
Saccharose (10,0 g).	
Chlorure de sodium (5,0 g).	
Thiosulfate de sodium (0,3 g).	
Citrate ferrique ammoniacal (0,3 g).	
Rouge de phénol (24,0 mg).	
Agar agar bactériologique (13,5 g).	
Eau distillée (1000ml).	
pH = 7,4 ± 0,2 à 25°C	

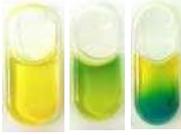
Réactifs utilisés :

Réactif de Vosges Proskauer (VP) Pour la recherche de l'acétoïne. VP1, VP2.	Réactif de Kovacks La mise en évidence de la production d'indole.
Réactif IND La mise en évidence de la production d'indole.	Réactif TDA pour la recherche du tryptophane désaminase
Réactifs de Griess pour les nitrites	Les colorants

NIT 1. NIT 2.	Violet de Gentiane, Lugol, Ethanol, Fushine, Huile d'immersion, Bleu de méthylène
--------------------------------	---

Annexe 02 : TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20E

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte	Résultat (+)	Résultat (-)
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Lecture directe		
LD	Lysine	Lysine décarboxylase			
OC	Ornithine	Ornithine décarboxylase			
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H2S	Thiosulfate desodium	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 03 : Les plans appliqués dans l'Interprétation des résultats d'analyses microbiologiques :

II. Interprétation des résultats d'analyses microbiologiques :

1. Interprétation selon un plan à trois classes :

L'interprétation des résultats s'effectue selon un plan à trois classes, dans le cas où la valeur « c » est différente de zéro (0).

Les résultats s'expriment de la façon suivante :

- si le résultat de l'analyse est inférieur ou égal à « m », le résultat du critère microbiologique est satisfaisant ;
- si le résultat de l'analyse n'excède pas « M » et si le nombre d'unités de l'échantillon donnant un résultat supérieur à « m » et compris entre « l » et « c », le résultat du critère microbiologique est acceptable ;
- si le résultat de l'analyse excède « M » ou si le nombre d'unités de l'échantillon donnant un résultat compris entre « m » et « M » est supérieur à « c », le résultat du critère microbiologique est non satisfaisant.

❖ Cas particulier pour l'histamine dans les produits de la pêche et de l'aquaculture provenant d'espèces de poissons associées à une grande quantité d'histidine, sauf dans la sauce de poisson produite par fermentation de produits de la pêche et de l'aquaculture.

Les résultats s'expriment de la façon suivante :

- Le résultat du critère microbiologique est satisfaisant lorsque les exigences suivantes sont remplies :

1. la valeur moyenne observée est inférieure ou égale à « m » ;

2. un maximum de c/n valeurs observées se situent entre « m » et « M » ;

3. aucune valeur observée ne dépasse la limite « M ».

- Le résultat du critère microbiologique est non satisfaisant lorsque la valeur moyenne observée dépasse « m », lorsque plus de c/n valeurs se situent entre « m » et « M » ou lorsqu'une ou plusieurs valeurs observées sont supérieures à « M » ;

2. Interprétation selon un plan à deux classes :

L'interprétation des résultats s'effectue selon un plan à deux classes, dans le cas où la valeur « c » est égale à zéro (0).

Les résultats s'expriment de la façon suivante :

- Pour l'expression "absence dans" :

- le résultat du critère microbiologique est satisfaisant lorsqu'il y a absence du micro-organisme dans toutes les unités de l'échantillon ;

- le résultat du critère microbiologique est non satisfaisant, lorsque la présence du micro-organisme est détectée dans, au moins, une unité de l'échantillon. Dans le cas des micro-organismes suivants : *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter spp* (thermotolérants), le résultat révèle que le lot contrôlé est impropre à la consommation.

- Pour la valeur limite "m=M" :

Si le résultat de l'analyse est inférieur ou égal à « m », le résultat du critère microbiologique est satisfaisant ;

Si le résultat de l'analyse excède « m », le résultat du critère microbiologique est non satisfaisant. Dans le cas de *Listeria monocytogenes*, le résultat révèle que le lot contrôlé est impropre à la consommation.

Annexe 04:



Résultats des galeries Api20E

الملخص

الخبز هو غذاء شائع الاستهلاك. خلال سلسلة إنتاجه وتوزيعه ، يخضع لتحضيرات متعددة. أجريت هذه الدراسة على 4 عينات من الخبز التجاري في موقعين مختلفين (عند مخرج الفرن وعلى مستوى نقاط البيع) ، وقد تم أخذ هذه العينات من مناطق مختلفة من ولاية بسكرة من أجل تقييم الجودة الميكروبيولوجية بإحصاء الجراثيم الملوثة المختلفة. أظهرت النتائج أنه عند الخروج من الفرن ، كان الخبز بنسبة 100٪ مرضياً من قبل FTAM وإجمالي القولونيات والقوالب ، و 100٪ مقبول بالنسبة لـ *S. aureus* ، بينما على مستوى نقاط البيع كان مقبولاً بنسبة 100٪ من قبل FTAM وإجمالي القولونيات ، و 50٪ من *S.aureus* كانت مقبولة و 50٪ الأخرى كانت غير مرضية. مع الغياب التام للسالمونيلات و ASR ، وهذا يوضح لنا أن الخبز في نقاط البيع هو الأكثر تلوثاً. في هذه الدراسة تم عزل *Escherichia coli* ونوعين من النباتات الفطرية: *Aspergillus sp* ، *Saccharomyces sp*.

الكلمات المفتاحية : الخبز ، الغذاء ، الجودة الميكروبيولوجية ، التلوث

Résumé

Le pain est un aliment couramment consommé. Tout au long de sa chaîne de production et de distribution, il fait l'objet de multiples manipulations. Cette étude a été réalisée sur 4 échantillons de pain commercialisé dans deux sites différents (à la sortie de four et au niveau des points de vente) au niveau du centre-ville de la Wilaya de Biskra afin d'évaluer leur qualité microbiologique par le dénombrement des différents germes de contamination. Les résultats nous ont montré qu'à la sortie de four, 100% de pain a été satisfaisant pour les FTAM, les coliformes totaux et les moisissures, 100% a été acceptable pour *S. aureus*, tandis qu'au niveau des points de vente a été 100% acceptable pour les FTAM et les coliformes totaux, 50% acceptable et 50% non satisfaisante pour *S.aureus*. Dans cette étude *Escherichia coli* et deux genres de flores fongiques ont été isolés : *Aspergillus sp*, *Saccharomyces sp*. L'absence totale des salmonelles et ASR a été marquée dans tous les échantillons testés. Ce qui nous montre que le pain au niveau des points de vente est le plus contaminé.

Mots clés : Pain, aliment, Qualité microbiologique, contamination.

Abstract

Bread is a commonly consumed food. Throughout its production and distribution chain, it is subject to multiple manipulations. This study was carried out on 4 samples of marketed bread, at two different sites (at the oven outlet and at the points of sale), these samples were taken from the different region of the wilaya of Biskra in order to assess the microbiological quality by counting the different germs of contamination. The results show us that at the exit of oven, 100% of bread was satisfactory by FTAM and total coliforms and molds, 100% was acceptable for *S.aureus*, while at the point of sale was 100% acceptable by FTAM and total coliforms 50% of *S.aureus* was acceptable and the other 50% was unsatisfactory, with total absence of salmonella and ASR and, is that show us that the bread at the point of sale is the most contaminated. In this study, *Escherichia coli* and two genera of fungal flora were isolated: *Aspergillus sp*, *Saccharomyces sp*.

Keywords: bread, food, microbiological quality, contamination