

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université IBN KHALDOUN Tiaret**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**



**THESE de Doctorat en Sciences**  
**en Sciences Biologiques**  
**Option: Microbiologie**

**Présentée par**  
**HOCINE Laredj**

**Thème :**

**Caractérisation microbiologique et physicochimique  
des miels produits au niveau de la région de Tiaret**

**Soutenue le :13 Décembre 2017      Devant le jury :**

M MAATOUG M	Professeur, U. Ibn Khaldoun Tiaret	Président
M <sup>elle</sup> REZZOUG W.	Professeure, U. Ibn Khaldoun Tiaret	Directrice de Thèse
M. BEKADA M. A. A	Professeur, C. U. Tissemsilt	Examineur
M. HOMRANI A.	Professeur, U. Mostaganem	Examineur
M. YABRIR B.	MCA, U. Djelfa	Examineur
M. GUEMOUR D.	MCA, U. Ibn Khaldoun Tiaret	Examineur

**Année Universitaire 2017-2018**

## *Remerciements*

Je commence par le nom de Allah, Celui Qui accorde Sa miséricorde à toutes les créatures dans le bas monde mais aux seuls croyants dans l'au-delà, Celui Qui accorde beaucoup de miséricordes aux croyants

La louange est à Allah, nous Le louons, nous implorons Son aide, nous Lui demandons de nous guider sur le droit chemin, nous le remercions et nous recherchons Sa protection contre le mal de nos âmes et de nos mauvais actes. Celui que Allah guide, nul ne peut l'égarer, et celui que Allah égare, nul ne peut le guider.

Que l'honneur et l'élévation les plus complets et les plus parfaits soient accordés à notre prophète Mohammed le Messager de Allah

Je tiens à remercier Melle REZZOUG Waffa d'avoir accepté de diriger ce travail et pour ses encouragements. Qu'elle trouve ici ma profonde reconnaissance.

Je remercie Mr MAATOUG Mhamed d'avoir accepté de présider le jury. Vous me faites l'honneur d'assurer la présidence de ce jury.

Je remercie MM BEKADA Mohamed Ahmed Ali, HOMRANI Aek, YABRIR Benalia et GUEMOUR Djillali d'avoir accepté de faire partie du jury et de consacrer ainsi votre temps pour lire le document et de juger ce travail. Je vous présente mes sincères remerciements.

Je remercie vivement Mr Paul Schweitzer, Directeur de recherche du CETAM-Lorraine, d'avoir accepté ma demande de stage au CETAM, pour son aide, son assistance et surtout sa disponibilité durant les trois périodes de stage. Je remercie également tous les membres de l'équipe du CETAM (M. Clausset et S. Duval) de m'avoir bien accueilli au niveau du laboratoire et pour leur aide.

Je remercie également Dr Albert Becker, président du CETAM de m'avoir accepté au CETAM.

Je remercie les responsables Pharmaciens-Biologistes du laboratoire d'analyses médicales Bernard Dory Medilab Est de Sarreguemines (département de la Moselle) pour les analyses microbiologiques.

Je remercie Mr Gilles RATIA président de l'Apiservices d'avoir orienté ma demande de stage vers le CETAM-Lorraine et de m'avoir recommandé à M Paul Schweitzer.

Je remercie M Benaichata L pour l'analyse statistique et M Ait Hammou M pour les données sur la région de Tiaret et pour son aide.

Je remercie Mme Gourchalla F et Mme Mihoub F pour leur soutien et leur assistance au cours de la préparation de l'article.

J'adresse mes remerciements à tous les collègues et en particulier MM Ouadah S, Sassi M Ait Hammou M et, Benaichata L.

Je tiens à remercier vivement et chaleureusement Professeur Choukri Ali, Ex recteur de l'Université de Djelfa.

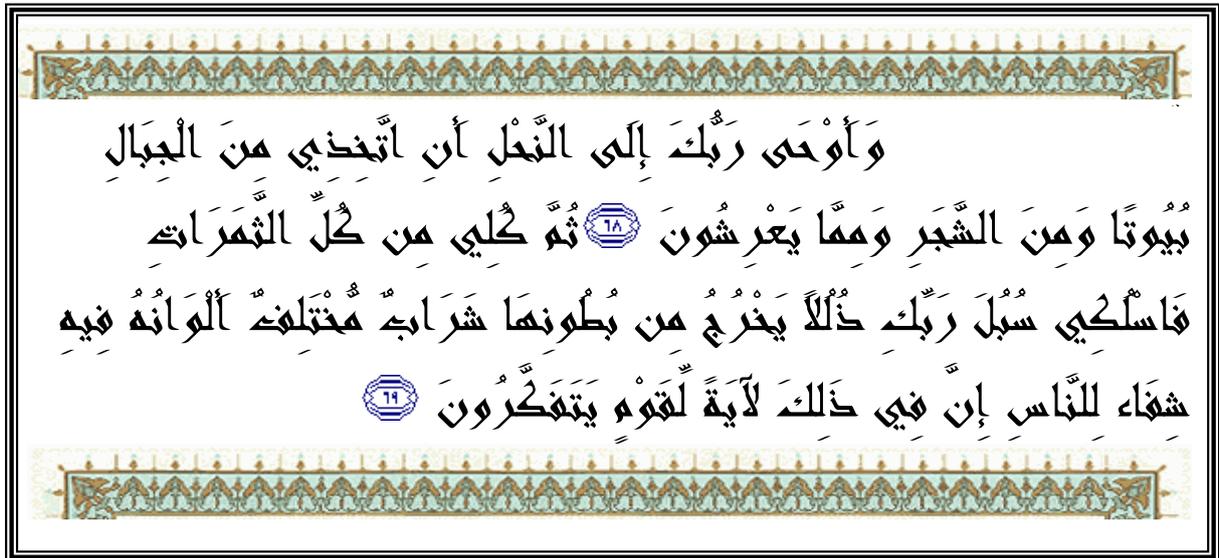
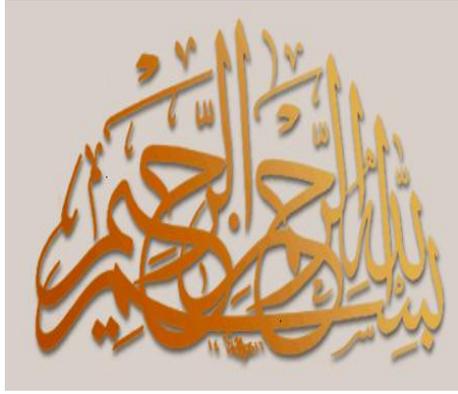
Mes remerciements vont également à tous les techniciens des différents laboratoires de la faculté SNV.

Que tous ceux qui n'ont cessé de m'encourager trouvent ici ma profonde reconnaissance.

## *Dédicace*

**Je dédie ce travail à :**

- **Mes parents**
- **Ma femme et mes enfants**
- **Mes frères et sœurs**
- **Ma belle mère**
- **Mes beaux frères et mes belles sœurs**
- **Mes amis**



### سورة النحل

« [Et voilà] ce que ton seigneur enseigna aux abeilles : « Prenez des demeures dans les montagnes, les arbres et les treillages que les hommes font \* Puis mangez de toute espèce de fruits, et suivez les sentiers de votre Seigneur, rendus faciles pour vous. De leur ventre, sort une liqueur, aux couleurs variées, dans laquelle il y a une guérison pour les gens. Il y a vraiment là une preuve pour les gens qui réfléchissent » .Versets 68 et 69.

Selon Aïcha (qu'Allah l'agrée) : le Prophète (que la prière d'Allah et Son salut soient sur lui) aimait le sucré et le miel. (Rapporté par Boukhari)

D'après Abou Al Ahwas, Abdallah Ibn Mas'oud (qu'Allah l'agrée) a dit: « Il y a deux guérisons qui sont mentionnées dans le Coran: le Coran (1) et le miel (2). Le Coran est une guérison de ce qu'il y a dans les poitrines et le miel est une guérison contre toutes les maladies ».

(Rapporté par Al Bayhaqi dans Al Sounan Al Koubra n°19566 qui l'a jugé authentique)

*La vie des abeilles est une source miraculeuse.*

*Plus on y puise, plus on la voit couler abondamment.*

*Karl Von FRISH, Prix Nobel de médecine en 1973.*

## Résumé

Le miel est un produit organique présentant de multiples propriétés physico-chimiques et biologiques. Des analyses physico-chimiques et microbiologiques ont été réalisées afin de caractériser les miels produits au niveau de la région de Tiaret. Les résultats des analyses physicochimiques (teneur en eau, hydroxyméthylfurfural: HMF, pH et acidité libre, conductivité électrique et cendres) ont montré que tous les échantillons répondent aux normes internationales, à l'exception d'un échantillon, montrant une teneur en HMF (42,05 mg / kg) légèrement supérieure à la norme européenne mais toujours compatible avec le Codex Alimentarius. Les résultats des analyses microbiologiques (Flore mésophile aérobie totale (FMAT), coliformes et coliformes fécaux, spores de *Clostridium sulfitoréducteur*, *Bacillus cereus*, Spores de *Clostridium botulinum*, Staphylocoques, Streptocoques, Salmonelles et Shigelles et la recherche des levures et des moisissures) ont montré que les échantillons étudiés ne contiennent ni spores ni germes pathogènes. Le nombre de levures et moisissures est pour la majorité compatible aux normes avec plus de 80% d'échantillons de très bonne qualité microbiologique et seulement 3 échantillons contiennent un nombre élevé en levures et une teneur en eau supérieure à 18% les exposant ainsi au risque de fermentation. L'ensemble des résultats obtenus montre que les différents miels produits dans cette région sont d'une très bonne qualité hygiénique, sanitaire et marchande.

Les levures identifiées sont : *Saccharomyces cerevisiae* (79.3%), *Zygosaccharomyces rouxii* (72.41%), *Zygosaccharomyces bailii* (58.62%), *Kluyveromyces* (37.93%), *Torulaspota* (31%), *Debaryomyces* (17.24%), *Hansenula* (10.34%), *Pichia* (10.34%).

Les moisissures répandues dans nos échantillons sont : *Penicillium spp* (47.37%), *Apergillus* (28.95%) (*Aspergillus flavus* 11.84%, *Aspergillus terreus* 6.58%, *Aspergillus fumigatus* 6.58%, *Aspergillus niger* 3.95 %), *Rhizopus* (3.95%) et *Mucor* (2.63%) et certaines moisissures non identifiées.

Mots clés : Caractérisation, Microbiologique, Physicochimique, Miel

## Summary

Honey is an organic product with many physicochemical and biological properties. Physico-chemical and microbiological analyzes were carried out to characterize the honeys produced in the Tiaret region. The results of physicochemical analyzes (water content, hydroxymethylfurfural: HMF, pH and free acidity, electrical conductivity and ash) showed that all samples meet international standards, with the exception of a single sample, showing an HMF content (42.05 mg / kg) slightly higher than the European standard but still compatible with the Codex Alimentarius. The results of microbiological analysis (Flora mesophilic total aerobic (MTAF), coliforms and fecal coliforms, spores Spores of Sulfite-Reducing Clostridia, *Bacillus cereus*, spores of *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella* and *Shigella* and the search for yeasts and molds) showed that the samples studied contain neither spores nor pathogenic germs. The number of yeasts and molds is for the majority compatible with standards with more than 80% of samples of very good microbiological quality and only 3 samples contain a high number of yeasts and a water content of more than 18% thus exposing them to the risk of fermentation. All the results obtained show that the various honeys produced in this region are of very good hygienic, sanitary and commercial quality.

The yeasts identified are: *Saccharomyces cerevisiae* (79.3%), *Zygosaccharomyces rouxii* (72.41%), *Zygosaccharomyces bailii* (58.62%), *Kluyveromyces* (37.93%), *Torulaspota* (31%), *Debaryomyces* (17.24%), *Hansenula* (10.34%), *Pichia* (10.34%).

Molds prevalent in our samples are: *Penicillium spp* (47.37%), *Apergillus* (28.95%) (*Aspergillus flavus* 11.84%, *Aspergillus terreus* 6.58%, *Aspergillus fumigatus* 6.58%, *Aspergillus niger* 3.95 %), *Rhizopus* (3.95%) et *Mucor* (2.63%) and some unidentified molds.

Key words: Characterization, Microbiological, Physicochemical, Honey

## المخلص

العسل هو منتج عضوي متميز بعدد من الخصائص الفيزيوكيميائية و البيولوجية. أجريت التحاليل الميكروبيولوجية، الفيزيائية والكيميائية لتمييز العسل المنتج في منطقة تيارت.

نتائج التحاليل الفيزيائية ( محتوى الماء، هيدروكسي ميثل فورفورال ، ودرجة الحموضة والحموضة الحرة، التوصيل الكهربائي والرماد). أظهرت أن جميع العينات مطابقة للمعايير الدولية، باستثناء عينة بمحتوى هيدروكسي ميثل فورفورال (42.05 مغ / كغ) أعلى قليلا من المعيار الأوروبي ولكن لا تزال متوافقة مع الكودكس الغذائي.

نتائج التحليل الميكروبيولوجي (البكتيريا الهوائية متوسطة الحرارة، القولونيات والقولونيات البرازية، جراثيم كلوستريديوم الخافضة للكبريت ، عصية سيربيوس ، جراثيم كلوستريديوم البوتولينوم ، المكورات العنقودية، المكورات العقدية (البكتيريا السحبية) ، السالمونيلا والشيجلا والبحث عن الخمائر والعفن) أظهرت أن العينات المدروسة لا تحتوي على الجراثيم ولا البكتيريا المسببة للأمراض.

عدد الخمائر والعفن هو أكثر اتساقا مع المعايير مع أكثر من 80% من العينات ذات جودة ميكروبيولوجية جيدة جدا و 3 عينات فقط تحتوي على عدد كبير من الخميرة ومحتوى عالي من الماء يفوق 18% مما يعرضها لخطر التخمر.

تظهر النتائج الإجمالية أن أنواع العسل المختلفة التي تنتج في هذه المنطقة هي ذات جودة صحية و تسويقية عالية.

يهيمن على الخمائر سكاروميساس سيريفيسياي، زيغوساكاروميساس روكسي، زيغوساكاروميساس بايلي ، كلويفيروميسز (37.93%)، تورولاسپورا (31%)، دباريوميسز (17.24%)، هانسينولا (10.34%)، بيشيا (10.34%)

ويهيمن على الفطريات البنسليوم (47.37%) ، أسبرجيلوس (28.95%) (أسبرجيلوس فلافوس 11.84% ، أسبرجيلوس تيربيوس 6.58% ، أسبرجيلوس فوميفاتوس 6.58%، أسبرجيلوس النيجر 3.95 % )، ريزوبيوس (3.95%) و موكور (2.63%) وبعض الفطريات مجهولة الهوية

الكلمات المفتاحية: توصيف، ميكروبيولوجية، فيزيوكيميائية، عسل

# Sommaire

-Liste des Abréviations

-Liste des Tableaux

-Liste des Figures

Introduction ..... 1

## Chapitre 1: Généralités sur le miel

1. Définition du miel ..... 4

2. Origine du miel ..... 4

2. a-nectar ..... 4

2. b- miellat..... 4

2. c- fruit ..... 4

3. Différents types de miel..... 5

3-1 selon l'origine ..... 5

a/miel de nectar : ..... 5

b/miel de miellat : ..... 5

3-2 selon le mode d'obtention ..... 5

3-3 selon les taxons butinés ..... 5

4. Miels biologiques ..... 6

5. Miels toxiques ..... 6

6. Formation du miel ..... 6

7.Récolte du miel ..... 9

8. Composition du miel ..... 9

8-1-Eau ..... 11

8-2-Glucides ..... 11

8-3-Acides Organiques ..... 11

8-4-Acides Aminés et Protéines ..... 11

8-5-Sels minéraux et Oligo-éléments..... 12

8-6-Lipides..... 12

8-7-Substances diverses..... 12

8-7-1-Enzymes..... 12

8-7-2- Vitamines..... 12

8-7-3 Colloïdes ..... 13

8-7-4. Substances aromatiques .....	13
8-7-5 Facteur antibiotique .....	13
9. Propriétés du miel .....	13
10. Critères de qualité des miels.....	13
10-1 Humidité ou teneur en eau .....	13
10-2 La teneur en HMF .....	14
10-4 Acidité et pH.....	15

### Chapitre 2 : Microbiologie du Miel

1- Sources de contamination du miel.....	17
1.1- Contamination primaire.....	17
1.2- Contamination secondaire.....	18
2- Les microorganismes rencontrés dans le miel.....	18
2.1- Moisissures.....	19
2.2- Levures.....	19
2.3- Bactéries et spores bactériennes .....	20
2.4- Autres microorganismes.....	21
3- Les effets antimicrobiens du miel .....	21
3.1- l'effet antibactérien .....	21
3.2- Effet antifongique.....	23
4- Altérations du miel.....	23
4-1 - Fermentation du miel :.....	23
4.1.1 - Produits de la fermentation : .....	25
4.1.2 - Détection de la fermentation : .....	25
4.1.3- Technique de blocage d'une fermentation : .....	25
4.2- Effet du vieillissement.....	26
4.3- Effet de la température.....	26
4.4- Action de la lumière .....	26

### Chapitre 3: Matériels et Méthodes

Présentation de la Zone d'étude.....	27
I- Matériel .....	28
1-1 Échantillonnage des miels : .....	28
II- Méthodes.....	30
1-Protocole expérimental:.....	30

<b>Première partie : Analyses physico-chimiques .....</b>	<b>32</b>
<b>1- Appareillage: .....</b>	<b>32</b>
<b>2-Produits Chimiques: .....</b>	<b>32</b>
<b>Méthodes physico-chimiques.....</b>	<b>32</b>
<b>1-Détermination de la teneur en eau : .....</b>	<b>32</b>
<b>2- Détermination de l' HMF .....</b>	<b>33</b>
<b>3- pH et Acidité libre .....</b>	<b>33</b>
<b>4- Conductivité électrique : .....</b>	<b>34</b>
<b>5-Détermination des cendres :.....</b>	<b>35</b>
<b>Deuxième partie : Analyses microbiologiques .....</b>	<b>36</b>
<b>1. Appareillage :.....</b>	<b>36</b>
<b>2. Verrerie : .....</b>	<b>36</b>
<b>3.Petit matériel.....</b>	<b>36</b>
<b>4. Produits et réactifs : .....</b>	<b>36</b>
<b>5. Milieux de culture : .....</b>	<b>36</b>
<b>I- Analyses bactériologiques :.....</b>	<b>37</b>
<b>a/préparation de la solution mère :.....</b>	<b>37</b>
<b>b/Germes recherchés :.....</b>	<b>37</b>
<b>1- la flore aérobie mésophile totale (FMAT) : .....</b>	<b>37</b>
<b>2- Coliformes totaux et Coliformes fécaux (Thermo-tolérants) : .....</b>	<b>37</b>
<b>3- Recherche des spores des anaérobies Sulfitoréducteurs .....</b>	<b>38</b>
<b>4- Recherche de Bacillus cereus .....</b>	<b>38</b>
<b>5. Spores de Clostridium botulinum .....</b>	<b>38</b>
<b>6. Recherche d'autres germes.....</b>	<b>39</b>
<b>c- Observations microscopiques.....</b>	<b>40</b>
<b>-Coloration simple.....</b>	<b>40</b>
<b>-Coloration de Gram.....</b>	<b>40</b>
<b>-Coloration des spores.....</b>	<b>40</b>
<b>II-Analyses Mycologiques : .....</b>	<b>41</b>
<b>Choix du milieu de culture: .....</b>	<b>41</b>
<b>1. Culture sur OGA ;.....</b>	<b>41</b>
<b>1.1 Ensemencement : .....</b>	<b>42</b>
<b>1.2 Isolement: .....</b>	<b>42</b>

2. Ensemencement sur le milieu gélosé à extrait de malt : .....	43
3. Recherche des levures osmophiles et des moisissures xérophiles : .....	43
3 -1.Préparation du diluant et ensemencement .....	43
3-2. Identification des levures : .....	44
3.2.1. Etude des caractères culturaux :.....	44
3.2.2. Etude des caractères morphologiques cellulaires : .....	44
3.2.2.1-Observation microscopique des cellules végétatives .....	44
3.2.2.2-Test de filamentation .....	45
3.2.2.3-Test de sporulation.....	45
3.2.3 Etude des caractères biochimiques .....	45
3.2.3.1- tests de fermentation des sucres.....	46
3.2.3.2-Assimilation des sources carbonées .....	46
3.2.3.3-Assimilation des sources azotées : .....	47
3-3. Dénombrement des levures par la technique de plaque :.....	47
3.4- Identification des moisissures : .....	47
3.4.1- Examen macroscopique : .....	47
3.4.2- Examen microscopique : .....	48
3.4.2-1-Technique de drapeau :.....	48
3.4.2-2-Technique sur lame : .....	48
3.4.2.3-Technique d'hydrolyse :.....	48
Analyse Statistique .....	49

#### Chapitre 4: Résultats et Discussion

1. Résultats des analyses physico-chimiques.....	50
1.1. Teneur en eau .....	50
1.2.Hydroxyméthyl furfural (HMF) .....	52
1.3. pH et Acidité libre .....	55
1.4. Conductivité électrique (CE).....	56
1.5. Cendres.....	57
2. Traitement statistique .....	59
3. Résultats des analyses Microbiologiques.....	61
3.1-Résultats Bactériologiques .....	62
3.1.1-FMAT (à 30 °C).....	62
3.1.2-Coliformes et Coliformes fécaux(ou Thermotolérants).....	64

<b>3.1.3- Spores des anaérobies sulfitoréducteurs .....</b>	<b>65</b>
<b>3.1.4- Bacillus cereus .....</b>	<b>67</b>
<b>3.1.5- Spores de Clostridium botulinum.....</b>	<b>69</b>
<b>3.1.6-Streptocoques, Staphylocoques, Salmonelles et Shigelles .....</b>	<b>70</b>
<b>3.2- Résultats des Analyses Mycologiques.....</b>	<b>71</b>
<b>3.2.1- Levures.....</b>	<b>71</b>
<b>3.2.1-1 Nombre de levures (par culture).....</b>	<b>71</b>
<b>3.2.1-2 Détermination des levures par la technique de plaques .....</b>	<b>73</b>
<b>3.2.1-3 Risque de fermentation.....</b>	<b>77</b>
<b>3.2.1-4 identification des levures .....</b>	<b>79</b>
<b>3.2.2-Moisissures.....</b>	<b>89</b>
<b>3.2.2-1 Identification des moisissures .....</b>	<b>90</b>
<b>3.3-Analyse Cytologique .....</b>	<b>96</b>
<b>3.4-Résultats de l'Analyse statistique des données microbiologiques.....</b>	<b>97</b>
<b>3.5- Corrélation entre les paramètres physicochimiques et les microorganismes.....</b>	<b>99</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>101</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>103</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>118</b>

# Liste des Abréviations

CE : Conductivité électrique

CF : Coliformes fécaux

CT : Coliformes totaux

HMF: Hydroxyméthylfurfural

M.E.A : Malt- Extrait – Agar

meq/kg : milliéquivalent/kg

mS/cm : milli Siémens/cm

OGA : Gélose glucosée à l'oxytétracycline

PCA: Plat Count Agar

PDA :Potato Dextrose Agar

TPGY: Trypticase-Peptone-Glucose-Yeast Extract Broth

UFC : unité formant une colonie

V.R.B.L Cristal violet rouge, bilié, lactosé

VF: Viande de foie

YCB :Yeast Carbone Base

YCB: Yeast Nitrogen Base

YM40G : Yeast-Malt-40% Glucose (gélose glucosée à 40% à extrait de levure et extrait malt)

# Liste des Tableaux

Tableau 01: Composition moyenne du miel.....	11
Tableau 02: Principales propriétés du miel.....	15
Tableau 03: Les microorganismes qui peuvent être rencontrés dans le miel .....	19
Tableau 04: Relation entre la teneur en eau, le nombre de levures et le risque de fermentation	25
Tableau 05: Description des échantillons de miel étudiés .....	32
Tableau 06: Résultats des analyses physico-chimiques.....	53
Tableau 07: Matrice de corrélation des paramètres physicochimiques avec les probabilités associées .....	62
Tableau 08: Résultats des analyses microbiologiques.....	64
Tableau 09: Pourcentage de risque de fermentation en fonction de la teneur en eau.....	81
Tableau 10: Aspects des colonies observées sur les deux milieux de culture .....	87
Tableau 11: Résultats des observations microscopiques, tests de filamentation, de sporulation et fermentation des sucres.....	88
Tableau 12: Résultats des tests d'assimilation des sources carbonées et azotées.....	89
Tableau 13 : Répartition des levures identifiées dans les différents échantillons.....	90
Tableau 14 : Nombre d'espèces et/ou genres par échantillon.....	90
Tableau 15 : Aspects macroscopiques des moisissures obtenues sur les deux milieux.....	96
Tableau 16 : Aspects microscopiques des moisissures obtenues sur les deux milieux.....	97
Tableau 17 : Niveau de contamination par échantillon.....	100
Tableau 18 : Matrice de corrélation des données microbiologiques avec r=coefficient de corrélation linéaire, P=probabilité associé à r.....	101
Tableau 19: corrélation entre les paramètres physicochimiques et le nombre de microorganismes présents dans le miel. ....	102

# Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Schéma d'élaboration du miel .....	9
<b>Figure 02:</b> Les principales causes de fermentation du miel .....	23
<b>Figure 03:</b> Présentation des échantillons de miels étudiés .....	31
<b>Figure 04:</b> Carte de la région de Tiaret .....	33
<b>Figure 05:</b> Protocole expérimental .....	34
<b>Figure 06:</b> Procédure de la coloration des spores .....	43
<b>Figure 07:</b> Répartition du nombre des échantillons en fonction de la teneur en eau.....	55
<b>Figure 08:</b> Répartition du nombre d'échantillons en fonction des normes de fraîcheur.....	57
<b>Figure 09 :</b> Répartition de la CE et les cendres en fonction des normes.....	62
<b>Figure 10 :</b> Nombre de germes sur PCA et GN er relation avec la teneur en eau.....	70
<b>Figure 11 :</b> Quelques frottis de la coloration de Gram.....	65
<b>Figure 12 :</b> Résultats de l'observation macroscopique et microscopique de l'Ech 18.....	71
<b>Figure 13 :</b> Risque de fermentation.....	80
<b>Figure 14 :</b> Répartition des échantillons en fonction de la teneur eau.....	81
<b>Figure 15 :</b> Résultats de l'examen microscopique des frottis colorés par la fuchsine.....	83
<b>Figure 16 :</b> Résultat du test de filamentation.....	84
<b>Figure 17 :</b> Observation microscopique des pseudomyceliums de quelques cellules levuriennes à partir du milieu PDA.....	85
<b>Figure 18 :</b> Observations microscopiques des ascospores de quelques cellules Levuriennes à partir du milieu Mac Clary .....	85
<b>Figure 19 :</b> Résultats du test de sporulation.....	86
<b>Figure 20 :</b> Fermentation des sucres.....	88
<b>Figure 21 :</b> Taux de présence des espèces (ou genres) de levures identifiées dans les miels analysés .....	91

<b>Figure 22</b> : Quelques exemples d'observations de la technique de drapeau .....	94
<b>Figure 23</b> : Observations microscopiques de la technique d'hydrolyse.....	95
<b>Figure 24</b> : Observations microscopiques de la technique de culture sur lame.....	95
<b>Figure 25</b> : Les différentes moisissures rencontrées dans le miel.....	97
<b>Figure 26</b> : Spectre de fréquence des levures et moisissures en % des échantillons .....	99

## Introduction

Le miel est un aliment que l'humanité a connu depuis l'antiquité. Il s'agit d'un mélange constitué principalement d'eau et de sucres, contenant également de l'acide gluconique, des composés d'azote, des lactones, des minéraux et des vitamines (White, 1983). Le miel est une substance sucrée produite naturellement par l'abeille à miel (*Apis mellifera*) à partir du nectar des fleurs et de miellat.

Le miel est apprécié pour ses qualités organoleptiques et énergétiques et pour ses multiples propriétés thérapeutiques. Si le miel est consommé comme aliment énergétique, en Algérie, vu sa faible production, il a été utilisé beaucoup plus à des fins médicinales et religieuses.

La Commission internationale du miel (IHC) et les Normes du Codex Alimentarius pour la qualité du miel ont proposé plusieurs paramètres chimiques et physiques comme critères de qualité pour le miel. Il s'agit notamment de la teneur en humidité, la teneur en minéraux, l'acidité, la teneur en hydroxyméthylfurfural (HMF), l'activité diastase, la teneur apparente en sucre. Le terme de qualité dans le cas spécifique du miel est déterminé par ses caractéristiques sensorielles, chimiques, physiques et microbiologiques.

Malgré sa richesse en sucre et inhibines, le miel est soumis à des contaminations bactériennes ou fongiques qui peuvent entraîner sa détérioration.

Le miel, comme toutes les solutions aqueuses, sucrées et acides, est instable (Schweitzer, 2005). Il a deux sources de contamination par les microorganismes: les sources primaires comprenant le pollen, les voies digestives des abeilles, des poussières, de l'air, du sol et du nectar; les sources secondaires sont celles qui découlent de la manipulation du miel par les apiculteurs et comprennent l'air, les manipulateurs d'aliments, la contamination croisée, l'équipement et les bâtiments. Les sources primaires de contamination du miel sont très difficiles à contrôler. À l'inverse, les sources secondaires de contamination du miel peuvent être contrôlées par de bonnes pratiques de fabrication. Les micro-organismes qui intéressent le miel sont les champignons, les levures et les bactéries formant des spores. Les levures sont responsables de la fermentation du miel lorsque sa teneur en humidité est élevée (Louveaux, 1985). Un certain nombre de bactéries sont présentes dans le miel, la plupart étant inoffensives pour les humains (Zucchi et al, 2001). Cependant, le miel a été incriminé en tant

que source de spores de *Clostridium botulinum* responsables des cas de botulisme infantile (Amon et al., 1981).

Bien que les microorganismes (à l'exception des levures et moisissures) ne puissent pas pousser dans le miel, ils peuvent être transmis lorsque le miel est utilisé comme ingrédient dans la préparation d'autres aliments et se multiplier jusqu'à détérioration du produit (Snowdon, 1999).

Les moisissures et les levures sont les seuls micro-organismes qui sont capables de pousser dans le miel. Certaines bactéries survivront dans le miel, mais leur croissance est peu probable. En pratique, les spores de *Bacillus*, de moisissures et des levures ont tendance à être présentes dans le miel sur une base régulière (Snowdon et Cliver, 1996).

Les tests microbiologiques devraient garantir à la fois une bonne hygiène et de bonne qualité commercialisable de ce produit et une bonne efficacité de production.

À l'échelle internationale, les critères de qualité du miel sont spécifiés par les règlements présentés dans le Codex Alimentarius mais qui concernent surtout les paramètres physicochimiques, tandis que les critères microbiologiques font défaut puisque souvent les normes proposées par certains organismes ou législation de certains pays ne sont pas spécifiques au miel et aux produits de la ruche.

En plus, comme pour tous les produits d'origine naturelle, les miels ont leur propre flore microbienne, comme les autres produits alimentaires, mais avec un comportement microbiologique caractéristique (Salamanca Grosso et al., 2001).

Les pratiques d'hygiène pour la préparation du produit doivent être conformes au règlement technique des conditions sanitaires et les bonnes pratiques de fabrication pour les établissements de transformation alimentaire ou de fabrication.

Les différents programmes et leur fonds FIDA (Fond International de Développement Agricole, FNA, FNRDA (Fond National de Régulation et Développement Agricole) et PNRDA (Programme National de Régulation et Développement Agricole) ont permis au secteur agricole de connaître un grand essor en particulier dans le domaine apicole en offrant aux apiculteurs du matériel apicole, des essaims d'abeilles et pour les jeunes des petites parcelles et matériel pour pratiquer cette activité. Même en absence de chiffres fiables de production de miel dans la région, les constatations faites sur le terrain par la direction du

secteur agricole, les producteurs, les chercheurs et par nous-même durant plus d'une décennie montrent une nette augmentation de la production du miel. Ceci nécessite de lancer des études pour améliorer la production et la qualité des produits apicoles.

Si des études de caractérisation physico-chimique des miels algériens ou de certaines régions en Algérie ont été publiées par certains travaux scientifiques, la caractérisation microbiologique des miels algériens, à l'exception de l'effet anti microbien, reste maigre ou inexistante. La caractérisation des miels produits au niveau de la région de Tiaret et les régions avoisinantes est quasi- nulle. C'est pour cette raison que les caractéristiques physico-chimiques, microbiologiques et sanitaires du produit doivent être réglementées dans la mesure du possible, de la production à la consommation et ceci sur la base de données concrètes caractérisant la région d'étude.

Les analyses microbiologiques nous permettront de détecter les problèmes de manipulation qui entravent la production de miel typifié de haute qualité et ses résultats nous donneront les données de base pour proposer des améliorations dans la récolte et la post-récolte de miel.

Ainsi, le but du présent travail est la caractérisation physico-chimique du miel produit dans la région de Tiaret, en utilisant certains paramètres communs (teneur en eau, pH, acidité libre, cendre, conductivité électrique et HMF) et la Caractérisation microbiologique fondée sur la recherche de la flore aérobie mésophile et la recherche des germes indicateurs de qualité hygiénique tels que les coliformes, coliformes fécaux et des germes indicateurs de qualité sanitaire (*Clostridium botulinum*, *Clostridium* sulfito-réducteurs et le *Bacillus cereus*) et d'autres microorganismes dont la présence est indésirable comme les spores de champignons et les levures agents de fermentation des miels.

Dans la démarche globale de cette étude, le document est subdivisé quatre chapitre : le premier chapitre englobe des généralités sur le miel, le deuxième donne un aperçu sur la composition microbiologique du miel et les effets antimicrobiens du miel et les conditions microbiennes de sa détérioration.

Le troisième chapitre résume le matériel et la méthodologie du travail et le dernier chapitre traite la présentation des résultats et leurs comparaisons avec des travaux précédents. Enfin cette étude se termine par une conclusion générale.

## 1. Définition du miel

Selon la législation européenne, le miel est défini comme : « une substance sucrée naturelle produite par les abeilles de l'espèce *Apis mellifera* à partir du nectar de plantes, des sécrétions provenant des organes végétaux ou des excréments laissés sur celles-ci par des insectes suceurs, qu'elles butinent, transforment en les combinant avec des matières spécifiques propres, déposent, déshydratent, entreposent et laissent mûrir dans les rayons de la ruche » (JOCE, Directive 2001/110/CE, 2002). Cette denrée peut être fluide, épaisse ou cristallisée" (Donadieu, 2003).

## 2. Origine du miel

### 2. a-nectar

Le nectar est un liquide sucré, sécrété par les nectaires ou glandes nectarifères de certains végétaux, que les abeilles récoltent pour en faire du miel (Marcel *et al.*, 2002).

D'après Alphandéry (1992), le nectar est une substance douce et parfumée. Il peut contenir jusqu'à "80 %" d'eau, "7 à 60 %" sucre, des traces d'acides aminés, d'hormones végétales, de vitamines.

Les trois sucres principaux contenus dans le nectar sont le fructose, le glucose et le saccharose ; les sucres mineurs sont le maltose, mélézitose.....etc. Les abeilles ne récoltent pas le nectar s'il contient moins de 14% de sucres (Philippe, 1991).

### 2. b- miellat

Selon Biri (1999), le miellat est un liquide sucré excrété par certains insectes qui ont sucé la sève des plantes. C'est l'excrétion des pucerons, de cochenilles ou des autres hémiptères, qui sucent la sève élaborée, qui est filtrée dans le corps de ces insectes ; les sucres et l'eau qu'elle contient en excès sont rejetés par l'anus sous forme de gouttelettes (Gonnet, 1982 ; Bogdanov, 2011).

C'est un exsudat brillant, gluant, riche en sucres que viennent lécher et récolter les abeilles butineuses et qui se trouve sur les feuilles des plantes en général, en particulier les conifères (Codex alimentaire, 2001).

### 2. c- fruit

En absence de nectar sur les fleurs, les abeilles prélèvent aussi les matières sucrées des fruits.

Il existe une autre source naturelle pratiquée par les apiculteurs : c'est le nourrissage qui se fait à base d'eau et de sucre.

### **3. Différents types de miel**

Selon Loiriche (1979), le miel peut être soit d'origine florale (nectar des fleurs), soit d'origine animale (excrétions d'insectes).

#### **3-1 selon l'origine**

a/miel de nectar :

Provient de nectar butiné par les abeilles sur diverses plantes mellifères. Les abeilles choisissent les plantes dont le nectar est le plus sucré (Alphandéry, 1992).

b/miel de miellat :

Les abeilles récoltent le miellat sur les conifères. Le miel de miellat est plus foncé que le miel de fleurs surtout quand il provient du sapin (Libis, 1971 ; Fronty, 1997), son goût est agréable et il est très riche en sels minéraux (Biri, 1999). Les miels de miellat ont très souvent une teinte foncée, cristallisent généralement peu et contiennent moins de glucose et de lévulose (Jean-Prost et Le Conte, 2005).

#### **3-2 selon le mode d'obtention**

a/miel en rayons : miel emmagasiné par les abeilles dans les alvéoles operculés des rayons et vendu en rayons entiers ou sections des rayons.

b/miel centrifugé : est obtenu par centrifugation des rayons désoperculés.

c/miel pressé : obtenu par pressage des rayons.

#### **3-3 selon les taxons butinés**

a/miels mono-floraux: appelés également uni floraux ou miels de cru. D'après Loiriche (1979), ce sont des miels où prédomine le pollen d'une espèce de fleurs. Selon leur origine botanique, les miels unifloraux possèdent des propriétés diverses (Marchenay, 1984).

b/miels multi-floraux: appelés aussi miels de toutes fleurs ou polyfloraux, sont produits par plusieurs espèces végétales et présentent une grande variété de pollen. Les miels polyfloraux proviennent de multiples récoltes faites par des abeilles sur une période plus ou moins longue et sans dominance nette d'une plante particulière (Louveaux, 1980).

#### 4. Miels biologiques

Leur production exige un butinage sur des zones exemptes de pesticides. Le chauffage à des températures supérieures à 40°C est à déconseiller afin d'éviter la destruction ou apparition de certains constituants tels :HMF, enzymes,...( Goût et Jardel, 1998).

#### 5. Miels toxiques

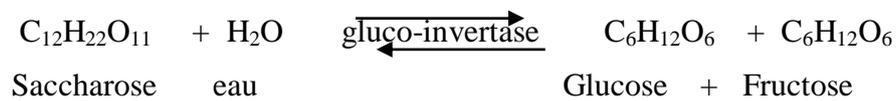
Le miel, produit naturel par excellence n'est pas toujours inoffensif (Mermoz, 2015). D'après Marchenay (1984), certains miels sont toxiques pour l'homme à cause de leurs propriétés nocives dues aux espèces butinées .Le nectar de ces plantes sans être toxique pour les abeilles, peut être toxique pour l'homme.

Il existe relativement peu de plantes toxiques pour les abeilles et peu de miels toxiques pour l'homme (Philippe, 2007). Les empoisonnements dus au miel toxique sont en particulier provoqués par la consommation du miel contenant des substances du groupe des andromédotoxines, des tutines et des hyénanchines (White, 1981 cité par Bogdanov et *al.*, 2004a). Il s'agit le plus souvent de miels provenant de plantes de la famille des Ericaceae (Bogdanov et *al.*, 2004a).

En janvier 2013, à l'île de la Réunion plusieurs cas d'intoxication ont été signalés à l'Agence de santé Océan Indien, suite à la consommation de miel dit miel fou. Il est produit à partir d'un nectar contenant des molécules, récolté sur les fleurs de certaines espèces appartenant toutes à la famille des Éricacées (rhododendrons et azalées). Ces molécules ont été identifiées comme étant des grayanotoxines non toxiques pour les abeilles qui les butinent (Epirem, 2008 ; Mermoz, 2015).

#### 6. Formation du miel

L'élaboration du miel commence lorsque les abeilles butineuses prélèvent le nectar et/ou le miellat par aspiration avec leur langue et qu'elles emmagasinent dans leur jabot en y ajoutant de la salive contenant une enzyme (la gluco-invertase) qui transforme le saccharose en deux molécules de sucres simples (Chauvin, 1987; Huchet et *al.*, 1996; Donadieu, 2003). La scission de la molécule de saccharose se fait selon l'équation suivante sous l'action de la « gluco-invertase » de l'abeille (Gonnet, 1982 ; Schweitzer, 2005) :



Ce miel brut est ensuite travaillé et stocké par de jeunes ouvrières. L'élaboration du miel comporte les phases suivantes:

L'abeille dégorge tout d'abord rapidement par saccades le contenu de son jabot et l'étale en une goutte à l'aide de sa trompe puis le réabsorbe (Alphandéry, 1992). Une fois dans la ruche, le nectar ou le miellat est transmis d'une abeille à une autre. Ce phénomène est appelé trophalaxie ; il permet d'enrichir le butin en enzyme et de le concentrer partiellement (Jean-Prost et Le Conte, 2005)

Plus la goutte de matière circule plus il y'a de sécrétion glandulaires et de ferments qui y pénètrent.

Parallèlement une partie de l'eau s'évapore de sorte que le miel brut qui contenait 25 à 40g de matière sèche deviendra du miel à moitié mûr contenant environ 60% de matière sèche (Clément, 2014)

A ce stade il est déposé dans les alvéoles où se déroulera la deuxième phase de l'élaboration sous l'influence de l'air sec passant au travers des rayons de la ruche (Clément, 2014).

Selon Donadieu (1978), le nectar et le miellat qui peu à peu deviennent le miel subissent dans la ruche des concentrations sous la double influence :

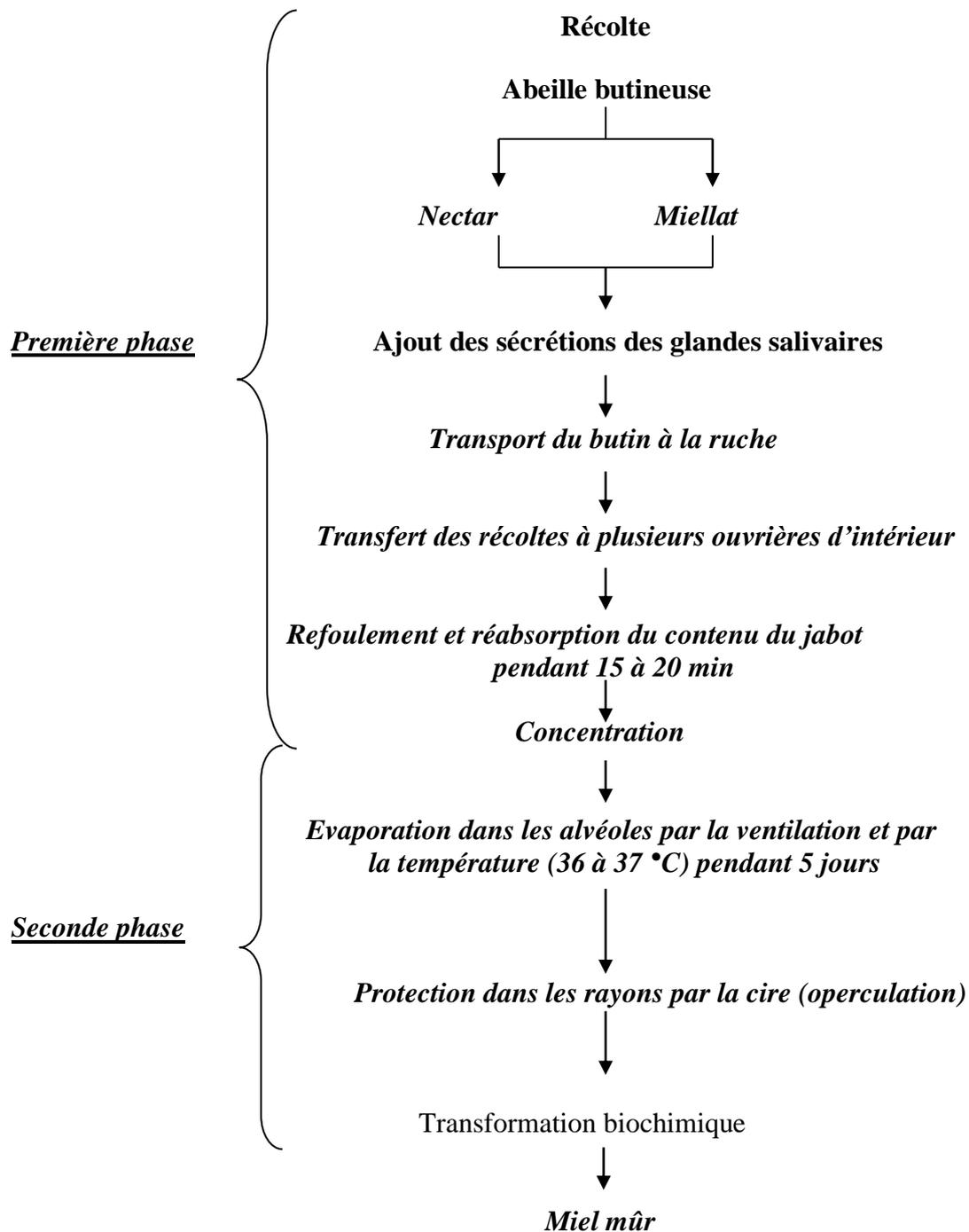
- D'abord de la chaleur régnant dans la ruche et qui est d'environ 36°C.
- La ventilation assurée par le travail des ventileuses qui entretiennent un puissant courant d'air ascendant par un mouvement très rapide de leurs ailes.

On arrive progressivement au bout de quelques jours à une solution ne contenant plus, en moyenne que 18% d'eau et près de 80% de fructose et de glucose. Cette solution, stockée par les abeilles dans les cellules de rayons de la ruche, est devenue le miel. Les cellules sont alors operculées de cire afin qu'il se conserve parfaitement (Donadieu, 2003).

Selon Bogdanov et *al.* (2004a), lors de la préparation du miel, les teneurs en protéines (enzymes), en acide organique et en sels minéraux augmentent.

Pendant le processus de maturation de même que plus tard dans les alvéoles operculés, le miel subit des transformations chimiques importantes en particulier une augmentation des

hexoses (Bogdanov et *al.*, 2004a). La figure 1 Schématise les principales étapes de la formation du miel.



**Figure 1** : Schéma d'élaboration du miel établi à partir des références suivantes: Gonnet, 1982 ; Fronty, 1997; Biri, 1999 ; Clement, 2003 ; Ravazzi, 2014.

## 7. Récolte du miel

Selon Donadieu (1978), Signorini (1978), la récolte du miel a lieu en général après une miellée, et lorsque les 3/4 des alvéoles des rayons de cire sont operculés. Un rayon bien garni peut donner jusqu'à 2Kg de miel (Signorini, 1978).

D'après Pfefferle (1984) et Donadieu (2003), cette récolte se pratique schématiquement comme suit:

L'apiculteur retire les cadres des ruches dans son atelier d'extraction afin de procéder à la désoperculation (manuellement avec un couteau ou le mécaniquement avec une machine spéciale conçue pour cette opération).

Ensuite une extraction du miel contenu dans les alvéoles par centrifugation à l'aide d'extraction tangentiel ou radiaire. Ce miel est recueilli dans un bac à travers un filtre.

Après un deuxième filtrage, le miel est recueilli dans un maturateur (simple récipient de décantation) où il va rester entre 2 et 8 jours au cours des quels les bulles d'air retenues dans la masse du miel montent à la surface et les dernières impuretés solides résiduelles sont éliminées par ascensum ou par descendum.

Enfin, l'apiculteur procède au conditionnement puis au stockage dernière étape avant la distribution commerciale.

## 8. Composition du miel

Le miel est un produit biologique d'une grande complexité d'où sa composition dépend de très nombreux facteurs: espèces butinées, nature du sol, race d'abeilles, état physiologique de la colonie, etc... (Bogdanov, 2011). La composition moyenne est présentée dans le tableau 1.

La composition du miel est très complexe et ses principaux constituants chimiques sont proches de ceux du nectar et du miellat : l'eau, les glucides, les acides organiques (libres ou combinés sous formes de lactones), les protides et les matières minérales (Bogdanov et *al.*, 2004a).

Tableau 1 : Composition moyenne du miel (Louveaux, 1980 ; Gonnet, 1991 ; Huchet et *al.*, 1996 ; Codex alimentaire, 2002, Donadieu, 2003 ; Bogdanov et *al.*, 2004a ; Ravazzi, 2014).

Constituants	Teneur
Eau	Max 20 %. Norme européenne max 21% sauf exception (ancienne norme européenne et codex alimentaire) miel de bruyère (Calluna) et miel destiné à l'industrie en général pas plus de 23% L'optimum est de 17 -18 %.
Glucides	Glucose (dextrose) :31 %. Fructose (lévulose) :38 %. Maltose : 07 %. Saccharose : 1,5 - 02 %. faux acacia, luzerne, banksie de Menzies, hedysaron, eucalyptus, agrumes spp. <b>pas plus de 10 g/100 g</b> lavande, bourrache <b>pas plus de 15 g/100 g</b>  Polysaccharides : 1,5 - 02 %.
Protides	Représentent moins de 1% ; ce sont des colloïdes, des protéines et des acides aminés tel que l'alanine et la proline.
Acides organiques.	Représentent 0,3 % L'acide gluconique (principal acide organique dans le miel).
Eléments minéraux	0,2 jusqu'à 0.6 % pour les miels de nectar. 01 % pour les miels de miellat.
Enzymes	Les principales sont les amylases $\alpha$ et $\beta$ , les gluco-invertases et les gluco-oxydases.
Vitamines	Le miel n'en contient que très peu. On peut trouver des traces de vitamines de groupes B, C et accessoirement les vitamines A, D et K.
HMF	$\leq 40$ mg/kg (norme européenne) $\leq 80$ mg/kg (pays chauds).
Facteurs antibiotiques naturels	Inhibines, qui sont en faits de puissants bactériostatiques.
Autres éléments	Ce sont des grains de pollen, des levures et des spores.

### **8-1-Eau**

D'après Donadieu (1978), le pourcentage d'eau varie en moyenne de 16 à 20%. Cette teneur est une des caractéristique importantes du miel car elle conditionne pratiquement sa qualité, l'optimum se situé entre 17 et 18%, sauf de très rares exceptions: miel de bruyère et de trèfle où ce pourcentage ne doit pas dépasser 23%. La norme européenne admis un maximum de 21% (Bogdanov et *al.*, 2000). Cette norme a été remplacée par un maximum de 20%. Récemment certains scientifiques et experts ont proposé de revenir à la norme de 21%.

### **8-2-Glucides**

Les glucides représentent de 95 à plus de 99% de la matière sèche des miels (Philippe, 2007 ; Riddle, 2016) ; l'eau et les sucres ensemble forment la quasi-totalité du miel.

Les deux sucres les plus abondants dans le miel sont le glucose (ou dextrose) et le fructose (ou lévulose) (Codex Alimentaire FAO/ OMS, 1993).

D'après Louveaux (1968a), Marchenay (1984), la teneur moyenne en lévulose des miels est de 38% environ, celle du glucose est de 31%, viennent ensuite les disaccharides qui sont principalement le maltose et le saccharose (respectivement 7,3 et 1,3%).

### **8-3-Acides Organiques**

Selon Bogdanov (2011), l'analyse des acides organiques contenus dans les miels a montré qu'ils sont nombreux, mais c'est l'acide gluconique, provenant du glucose, qui domine. On trouve aussi d'autres acides (acide succinique, malique, oxalique.....etc.(Jean-Prost et Le Conte, 2005).

### **8-4-Acides Aminés et Protéines**

Selon Louveaux (1968a), les substances azotées ne représentent qu'une infime partie du miel pur. Il s'agit d'acides aminés libres et de protéines qui peuvent être d'origines diverses (nectar, pollen, abeilles).

La teneur en proline donne des informations sur la maturité du miel et peut servir à détecter des falsifications. On considère qu'un miel est arrivé à maturité lorsque sa teneur en proline est supérieure à 183 mg/kg, des valeurs plus basses indiquent un manque de maturité ou une falsification (Bogdanov et *al.*, 2004a).

### **8-5-Sels minéraux et Oligo-éléments**

D'après Donadieu (2003), les éléments minéraux représentent 0,2% pour les miels de nectar, et jusqu'à 1% pour les miels de miellat, avec plus d'une trentaine d'éléments déjà inventoriés dont le principal élément est le potassium.

Les miels foncés sont globalement plus riches quantitativement en matières minérales que les miels clairs (Donadieu, 2003).

D'après Weiss (1985), les miels de forêts donnent plus de cendre que les autres miels.

A côté des éléments majeurs on peut trouver dans le miel un nombre très important d'éléments rares ou oligo-éléments qui n'existent qu'à l'état de traces (Gonnet, 1991).

### **8-6-Lipides**

Le miel contient de faibles quantités de lipides, principalement l'acide palmitique et oléique et très peu d'acides laurique, myristoleique, stéarique et linoléique (Philippe, 2007).

### **8-7-Substances diverses**

Selon Louveaux (1968a), comme toutes les substances naturelles, le miel renferme à côté de ses constituants majeurs que sont les sucres et l'eau, des composés organiques très variés dont l'inventaire est certainement loin d'être achevé.

#### **8-7-1-Enzymes**

Selon Jean-Prost et Le Conte (2005), le miel contient plusieurs enzymes. Les principales enzymes du miel sont: l'invertase ( $\alpha$ -glucosidase), l'amylase ( $\alpha$ -amylase; diastase), glucose oxydase, catalase et la phosphatase. L'invertase et l'amylase sont importantes pour l'appréciation du miel (Donadieu, 1978; Bogdanov *et al.*, 2004a).

Selon Weiss (1985), la glucose oxydase transforme de petites quantités de glucose en acide gluconique en provoquant la formation de peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est déterminant dans la fonction stérilisante d'un miel (action inhibitrice).

#### **8-7-2- Vitamines**

Selon Donadieu (2003), le miel contient essentiellement les vitamines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> ou vitamine PP, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, C, et accessoirement les vitamines A, B<sub>8</sub> ou vitamine H, B<sub>9</sub>, D et K.

La teneur du miel en vitamines dépend de sa teneur en pollen (Loiriche, 1979).

### **8-7-3 Colloïdes**

La teneur en colloïdes des miels varie approximativement de 0,1 à 1%, les miels les plus foncés étant les plus riches. Ces colloïdes sont constitués par des protéines, substances cireuses, des pigments, des pentosanes et des substances diverses non identifiées avec précision (Gonnet, 1982).

### **8-7-4. Substances aromatiques**

Selon Bogdanov et *al.*, (2004a), environ 100 à 150 différentes substances aromatiques ont été isolés dans le miel et certaines ont même été caractérisées du point de vue chimique. Elles jouent un rôle important dans l'appréciation sensorielle du miel.

### **8-7-5 Facteur antibiotique**

D'après Bogdanov et *al.*, (2004a), plusieurs facteurs antibiotiques naturels regroupés sous le nom générique d'inhibine, sont en fait de puissants bactériostatiques.

## **9. Propriétés du miel**

Les principales propriétés physico chimiques du miel sont présentées dans le tableau 02.

## **10. Critères de qualité des miels**

Selon Jean-Prost et Le Conte (2005), l'expertise d'un miel est complexe et seule l'interprétation des analyses organoleptiques, polliniques et physico-chimiques permet la caractérisation complète d'un échantillon.

### **10-1 Humidité ou teneur en eau**

L'humidité est un paramètre déterminant. C'est également un paramètre de qualité car la teneur en eau conditionne l'avenir du miel : cristallisation et fermentation. Le risque de fermentation est d'autant plus élevé que la teneur en eau est grande (Philippe, 2007). Il est quasi nul lorsque cette dernière est inférieure à 17%.

Tableau 2 : Principales propriétés du miel (Caillas, 1984 ; Chauvin, 1987 ; Jean-Prost et Le Conte, 2005)

Propriétés		Caractéristiques
propriétés mécanique	Densité	la densité d'un miel à 20°C est en moyenne de 1.4225
	Viscosité	De 30 à 35°C la viscosité est minimale. La viscosité est très élevée à basse température.
	Hygroscopicité	un miel contenant 18 % d'eau, peut atteindre un hygrométrie de 55%.
propriétés calorifiques	chaleur spécifique	à 20°C, la chaleur spécifique d'un miel à 17% d'eau est de 0.54 Cal/°C. pour un miel cristallisé à 20°C elle est de 0.55 à 0.57 Cal/°C.
	conductibilité thermique	pour un miel à 20% d'eau finement cristallisé elle est de $1.29 \cdot 10^{-4}$ cal/cm/s/°c.
	conductibilité électrique	à 20°C, pour une solution à 20% de matière sèche la conductibilité va de moins de 1 et plus de $10 \cdot 10^{-4}$ S/cm
	abaissement de point de congélation	dépend de la proportion en sucres, il serait de 1.42°C à 1.53°C en solution aqueuse à 15% et de 2.75 à 3.15°C en solution aqueuse à 25%.
propriétés optiques	indice de réfraction	l'indice de réfraction est plus élevé que sa teneur en eau est plus basse. il est de 1.47 à 1.50 à température de 20°C.
	pouvoir rotatoire	la plus part des miels sont lévogyres mais il existe quelques un dextrogyres.
	mutarotation	elle peut atteindre près de 3° elle serait liée au passage du $\beta$ -glucose peu actif à l' $\alpha$ -glucose très actif sur la lumière polarisée.
	coloration	varie selon l'espèce butinée. le miel est coloré en jaune très clair au brun presque noir en passant par toutes les gammes de jaune, de l'orange, de roux ou de brun parfois verdâtre. à l'échelle de <b>P.FUND</b> , la couleur varie de 1 à 14.
	turbidité	le miel naturel contient toujours en suspension des particules solides où des matières colloïdales qui leur donnent une certaine turbidité.
	fluorescence	sous l'action de l'ultraviolet, beaucoup des miels présentent une fluorescence dont les couleurs sont aussi très variables selon la composition du miel examiné.

## 10-2 La teneur en HMF

Ramirez Cervantes et *al.*, (2000) affirment que parmi les principaux paramètres de qualité utilisés dans le commerce international du miel, en plus des caractéristiques sensorielles (couleur, arôme et saveur), est le taux d'hydroxyméthylfurfural (HMF), ce dernier est lié à la déshydratation du fructose lors du chauffage ou stockage du miel.

L'hydroxyméthylfurfural est un aldéhyde cyclique ( $C_6H_6O_3$ ) issu de la dégradation des sucres, en premier lieu par déshydrogénation du fructose et du glucose en milieu acide et à température élevée (Ramírez Cervantes et *al.*, 2000). Ni les nectars ou miellats, ni les miels frais n'en contiennent (Schweitzer, 2005).

Les miels défigés dans de mauvaises conditions, chauffés excessivement trop longtemps, augmentent très sensiblement leur teneur naturelle en hydroxyméthylfurfural (Regard, 1981).

La teneur en HMF est un indice de vieillissement de miel. Cette substance est quasi inexistante dans le miel à l'état natif. Sa production est liée à l'acidité du miel ; plus un miel est acide, plus la production d'HMF est rapide. Au-delà de 40mg/kg, le miel ne peut plus être commercialisé que comme miel industriel (Bogdanov et *al.*, 1999; Schweitzer, 2002). Les miels d'origine tropicale (provenant de régions chaudes) ne doivent pas dépasser 80 mg/kg. L'analyse de la quantité d'HMF est donc une excellente méthode pour apprécier la qualité d'un miel : son vieillissement et son chauffage (Gonnet, 1963, Bogdanov et *al.*, 1997).

### **10-3 Activité diastasique ou amylasique**

L'activité enzymatique dépend de l'origine florale du miel et du traitement que ce dernier a subi, la chaleur détruit les enzymes (Schweitzer, 2002).

A l'exception de certains miels naturellement pauvres en enzymes, l'activité amylasique doit être au minimum de 8 unités de Schade. Les miels naturellement pauvres en enzymes peuvent avoir une activité enzymatique faible (jusqu'à 3 unités de Schade) à la condition que leur HMF ne dépasse pas 15 mg/kg (Huchet et *al.*, 1996).

### **10-4 Acidité et pH**

L'acidité libre est susceptible de traduire une altération du miel. Selon Bogdanov et *al.* (1999), l'acidité est un critère de qualité ; la fermentation du miel provoque une augmentation de l'acidité dans le miel. Les normes européennes fixent une valeur maximale de 40 milliéquivalents/kg. Dans le projet du codex alimentaire, elle a été augmentée à 50 milliéquivalents/kg, étant donné qu'il existe quelques sortes de miels qui ont une teneur naturelle en acides plus élevée. Cette teneur a été retenue dans le codex alimentaire (2001).

D'après Gonnet (1982), le pH d'un miel est fonction de la quantité d'acides qu'il renferme (ions H<sup>+</sup>) ainsi que de sa composition minérale (ions OH<sup>-</sup>). Plus le taux des matières minérales est fort et plus le pH du miel se rapproche de la neutralité.

Le pH du miel varie entre 3,2 et 4,5 (Molan, 1992a). Les miels de fleurs possèdent le plus souvent des valeurs de pH faibles (3,3 à 4,6) à l'exception des miels de fleurs de châtaignier qui ont une valeur de pH relativement élevée allant de 5 à 6. Les miels de miellat ont des pH élevés par rapport à ceux de nectar.

### **10-5 La teneur en glycérol**

Plus récemment, le dosage du glycérol est apparu comme pertinent dans la détection de la fermentation des miels en raison de la corrélation observée entre sa teneur en mg/kg dans les miels et le nombre de levures.

D'après Becker et Schweitzer (2000), les miels qui contiennent plus de 300mg/kg de glycérol ne sont plus commercialisables.

## Microbiologie du Miel

Le miel est un produit alimentaire constitué principalement d'eau et de sucres (80 à 90%). Mais il contient aussi de l'acide gluconique, des lactones, des composés azotés, des minéraux et des vitamines (Ramírez Cervantes *et al.*, 2000).

Vu sa composition, cette denrée alimentaire peut être sujette à différents microorganismes tels que les moisissures, les bactéries, les levures etc... la conséquence de la croissance de ces êtres vivants se traduit par la détérioration du miel.

Cependant, le miel a des propriétés antimicrobiennes qui empêchent la croissance ou la persistance de nombreux micro-organismes. Généralement, on peut s'attendre à ce que le miel contienne des nombres faibles et une variété limitée de micro-organismes (Snowdon et Cliver, 1996). Le miel peut inhiber la croissance d'une large gamme de microorganismes.

### 1- Sources de contamination du miel

La contamination microbienne est inévitable chez presque tous les aliments, on l'envisage sous deux formes primaire et secondaire.

#### 1.1- Contamination primaire

La contamination primaire du miel est la présence des microorganismes dans le miel avant l'extraction.

Les sources primaires de la contamination microbienne du miel sont susceptibles d'inclure le pollen, les régions digestives des abeilles, l'air, la poussière et les fleurs (Snowdon et Cliver, 1996).

Selon Fléché *et al.* (1997), les microorganismes qui peuvent être rencontrés dans le miel peuvent être de deux types différents: une flore habituelle, mésophile et mycélienne et une flore occasionnelle.

D'après Tysset et Durand (1968) et Tysset *et al.* (1970a), les intestins des abeilles peuvent contenir: levures, bactéries Gram<sup>+</sup> comprenant des espèces de bacille et bactéries Gram<sup>-</sup>. Gilliam *et al.* (1983), affirment que le pollen peut être la source originale des germes dans l'intestin de l'abeille.

Root (1983), indique que les fleurs et les ruches sont des sources plus importantes de microorganismes dans le miel.

## 1.2- Contamination secondaire

La contamination secondaire du miel peut avoir lieu pendant et après l'extraction, causée par défaut de manipulation de l'apiculteur et l'utilisation de matériel d'extraction qui ne correspond pas aux normes exigées.

Tysset et Rousseau (1981), précisent que les sources secondaires de la contamination du miel sont les humains, l'équipement, les récipients, le vent, la poussière et les insectes.

## 2- Les microorganismes rencontrés dans le miel

Les microorganismes souvent rencontrés dans le miel pourraient être classés en trois catégories (Snowdon et Cliver, 1996 ):

- Les microorganismes qui sont couramment trouvée dans le miel : des souches de levures et de bactéries formant des spores;
- Microorganismes qui indiquent une qualité sanitaire ou commerciale ou qualité marchande (coliformes ou levures);
- Des microorganismes qui pourraient causer une maladie.

On peut rencontrer une autre catégorie de microorganismes ; ce sont ceux qui causent des maladies chez les abeilles comme la loque américaine causée par *Paenibacillus larvae* et le couvain plâtré provoqué par un champignon « *Ascochera apis* ». Une liste des germes actuellement rapportés dans le miel est présentée dans le tableau 3

**Tableau 03:** Les microorganismes qui peuvent être rencontrés dans le miel (Snowdon et Cliver, 1996).

Bactéries	Champignons	
	Levures	Moisissures
<i>Alcaligenes</i>	<i>Ascosphaera</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Atichia</i>
<i>Bacteridium</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Bettsia alvei</i>
<i>Bacterium</i>	<i>Lipomyces</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Pichia</i>	<i>Chaetomium</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Coniothecium</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Hormiscium</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Schwanniomyces</i>	<i>Peronsporaceae</i>
<i>Neisseria</i>	<i>Trichosporan</i>	<i>Peyronelia</i>
<i>Proteus</i>	<i>Torula</i>	<i>Triposporium</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Uredianaceae</i>
<i>Xanthomonas</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Ustilaginaceae</i>

## 2.1- Moisissures

Certains scientifiques ont décrit la présence des moisissures xérophiles dans le miellat et le miel de miellat.

La moisissure est associée au contenu intestinal des abeilles, à la ruche et à l'environnement dans lequel les abeilles se nourrissent.

Les moisissures trouvées dans le miel sont : *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Penicillium*, *Ascosphaera* (Tysset et *al.*, 1970a). *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* et les *Rhizopus* (Ward et Trueman, 2001).

En outre, Morse et Hooper (1985), rapportent que les pattes de l'abeille peuvent transporter des spores de champignons et que le pollen stocké par les abeilles peut être attaqué par une moisissure appelée *Bettisia alvei*.

Piana et *al.* (1991), affirment que les moisissures puissent survivre mais ne peuvent pas se développer dans le miel.

Un nombre élevé de moisissures peut être révélateur d'une contamination récente de moisissures par le milieu du butinage de l'abeille, de la ruche ou de l'équipement de traitement et d'extraction (Snowdon et Cliver, 1996). Le miellat et par conséquent le miel de miellat contiennent plus de spores de champignons.

## 2.2- Levures

Les levures peuvent se développer dans des conditions acides et ne sont pas empêchées par la forte teneur en sucre.

Les levures osmophiles ou osmotolérantes constituent un véritable problème dans la production du miel. Ces microorganismes peuvent se développer même à de faibles teneurs d'eau comme celle disponible dans le miel mûr. Ces levures osmophiles sont la cause majeure de la fermentation du miel.

L'origine des levures rencontrées dans le miel peut être primaire (abeilles, nectar, miellat..) ou secondaire c'est-à-dire au cours de l'extraction (Gonnet, 1982 ; fléché et *al.*, 1997). Les levures du miel proviennent surtout du nectar des fleurs, car ce dernier est très riche en sucre (Morse et Hooper, 1985).

Selon Tysset et Rousseau (1981), les espèces de *Saccharomyces* représentent les levures les plus dominantes trouvées dans le miel. Ainsi la fermentation du miel est due à des levures osmophiles que l'on peut trouver dans tous les miels.

Crane (1979), ajoute que les levures rencontrées dans le miel appartiennent essentiellement aux genres: *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torula*, *Zygosaccharomyces*.

Il est généralement admis que le nombre de spores de levure dans différents miels peut varier de 1 par 10 g à 100 000 / g (Graham, 1992).

D'après Louveaux (1968a), la richesse en levures constitue un facteur important pour la fermentation du miel. Ce facteur est très variable d'un échantillon à l'autre. Le nombre de germes peut passer de 1 à 1 million par gramme. Selon le même auteur quatre types de levures osmophiles susceptibles de provoquer une fermentation d'un miel ont été isolés (*Zygosaccharomyces barkeri*, *Z. mellis*, *Z. nussbaumeri*, *Z. richteri*), toutes appartiennent au genre *Zygosaccharomyces*.

D'après Becker et Schweitzer (2000), la présence des levures osmophiles dans le miel est liée à :

- Une teneur trop élevée en eau.
- Une forte concentration en sucres.

### **2.3- Bactéries et spores bactériennes**

Les bactéries ramenées dans le miel par les abeilles sont probablement des bacilles à Gram<sup>+</sup> (Tysset et Rousseau, 1981). La flore mésophile totale, introduite par les abeilles, est sans conséquence pour le consommateur et n'a pas d'action néfaste sur le miel (Fléché et al., 1997). La flore aérobie mésophile totale comprend des bactéries, des levures et des moisissures se développant en aérobiose à 30 °C (Jouve, 1996 ; Guiraud et Rosec, 2004).

Selon Snowdon et Cliver (1996), Les formes végétatives de bactéries pathogènes n'ont jamais été trouvées dans le miel; si elles sont présentes, elles peuvent survivre dans le miel pendant des périodes prolongées, en particulier aux températures fraîches.

Les spores des bactéries des genres *Bacillus* et *Clostridium* peuvent être trouvées dans le miel (Snowdon et Cliver, 1996).

Selon Fléché et al. (1997), Les spores bactériennes, en particulier celles de *Bacillus*, surtout *Bacillus cereus* sont régulièrement trouvées dans le miel.

*Clostridium botulinum* et ses spores sont largement répandus dans la nature (Solomon et Lilly, 2001). La poussière et le miel ont été signalés comme une source de spores (Chin et al., 1979). Le botulisme infantile a été reconnu en 1976 comme une maladie paralysante causée par l'ingestion de spores viables qui germeraient et coloniseraient le tractus intestinal des nourrissons, avec la production locale et l'absorption de la toxine de *Clostridium botulinum*

(Rall *et al.*, 2003). Cependant, les niveaux de pH (3,4 à 5,5, moyenne, 4,4) et les niveaux d'activité de l'eau (0,5 à 0,6) dans le produit fini sont inhibiteurs de la croissance des spores de *C. botulinum*, bien que les spores restent viables (Aureli *et al.*, 2002).

Le botulisme infantile est une forme commune de botulisme et le miel a été identifié comme une source potentielle d'infection (Midura, 1996 ; Becker, 2004). Les enfants âgés entre 2 semaines et 1 an sont les plus sensibles (Arnon *et al.*, 1981).

Le miel a été identifié à la fois comme un facteur de risque alimentaire pour le botulisme infantile et comme réservoir naturel de spores de *C. botulinum* de type A et de type B (Solomon et Lilly, 2001). Cependant, le nombre de cas de botulisme infantile reste faible (Bogdanov, 2011).

Les traitements conventionnels pour détruire les spores ne peuvent pas être utilisés pour le miel parce qu'ils modifieraient ses caractéristiques organoleptiques, le rendant impropre à la consommation humaine (Aureli *et al.*, 2002).

Les spécifications d'achat actuellement utilisées comprennent certaines exigences concernant les bactéries coliformes, les levures, les moisissures et certaines bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus*, *Salmonella* et *Clostridium* (Snowdon et Cliver, 1996).

Les Streptocoques du groupe D de Lancefield (ou Entérocoques), les Coliformes et *Escherichia coli*, les Salmonelles dont l'absence est impérative et enfin les anaérobies sulfite-réducteurs (comme *Clostridium perfringens*) sont des germes témoins de contamination entérique. Ces germes peuvent contaminer le miel, la gelée royale, le pollen au cours des manipulations nécessaires au conditionnement, effectuées dans de mauvaises conditions hygiéniques (Fléché *et al.*, 1997).

Selon Watte *et al.* (1977), les Clostridiens sulfitoréducteurs principalement *Clostridium perfringens*, sont des anaérobies sporulés, hôtes habituels du tube digestif de l'homme.

## **2.4- Autres microorganismes**

Autres que les levures, les moisissures et les bactéries, les algues peuvent être présentes dans le miel de miellat sous certains facteurs climatiques comme la forte humidité (Crane, 1979).

## **3- Les effets antimicrobiens du miel**

### **3.1- l'effet antibactérien**

Le miel, en raison de sa faible teneur en eau, sa haute pression osmotique et sa forte acidité constitue un milieu défavorable à la multiplication bactérienne (Fléché *et al.*, 1997).

En outre Snowdon et Cliver (1996), rapportent que le bas potentiel d'oxydoréduction du miel inhibe la croissance des bactéries.

Fléché et *al.* (1997), ajoutent que le miel est bactériostatique grâce à la présence d'enzymes secrétées par l'abeille et de substances biologiques issues de nectars.

Selon Molan (1992b), les propriétés antibactériennes des miels sont dues à l'acidité, l'osmolarité et conversion du glucose en peroxyde d'hydrogène par l'intermédiaire de la glucose-oxydase.

#### - *Osmolarité*

Le miel d'abeille est une solution sucrée concentrée avec une pression osmotique élevée, cette dernière empêche la croissance microbienne par l'absorbance de l'eau vitale des agents pathogènes.

#### - *Peroxyde d'hydrogène "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>"*

Aujourd'hui, l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aussi appelée peroxyde d'hydrogène, est considérée comme la principale inhibine contenue dans le miel (Bogdanov et Blumer, 2001).

D'après Masson (2003), le miel contient une enzyme appelée glucose oxydase : celle-ci permet la transformation constante de petites quantités de sucre en peroxyde d'hydrogène.

La formation de l'eau oxygénée est en outre influencée par la chaleur et la lumière, ces dernières altèrent la glucose oxydase et ralentissent ainsi la production d'eau oxygénée (Bogdanov et Blumer, 2001).

#### - *Acidité*

Le miel présente la plupart du temps un pH faible de 3 à 4, les bactéries ne peuvent se multiplier dans un milieu acide (Bogdanov et Blumer, 2001).

#### - *Divers*

Selon Molan (1992b), différentes inhibines dites non peroxydes telles que des lysozymes, flavonoïdes, acides aromatiques, et autres composants indéterminés du miel possèdent des propriétés antimicrobiennes.

Bogdanov et Blumer (2001), rapportent que le rôle des inhibines non peroxydes, souvent sous-estimées, est très important car elles sont, dans une mesure, insensibles à la chaleur, à la lumière et à la durée de stockage. Radwan et *al.*, (1984), rapportent que le miel contient des facteurs inconnus actifs principalement contre les bactéries Gram négatives et les moisissures tels que *Aspergillus*.

### 3.2- Effet antifongique

Snowdon et Cliver (1996), affirment que les facteurs antimicrobiens du miel sont efficaces contre beaucoup d'espèces fongiques, y compris *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium* et *Saccharomyces*. Ainsi Hamdi et Zeako (2000), indiquent qu'en plus de son activité antibactérienne, le miel exprime une activité antifongique révélée et ayant un effet sur *Aspergillus niger* et *Penicillium chrysogenum*.

### 4- Altérations du miel

Le miel comme toutes les denrées alimentaires peut subir des altérations sous l'influence du vieillissement, du chauffage, de la lumière ou des microorganismes qui peuvent s'y développer.

#### 4-1 - Fermentation du miel :

D'après Gonnet (1982) et Becker et Schweitzer (2000), la fermentation du miel est un accident grave, il provoque une altération profonde et irréversible du miel et il entraîne sa perte irrémédiable. Selon Louveaux (1968a), la fermentation est un phénomène essentiellement lié à la teneur en eau, la température et la présence de germes susceptibles de se multiplier au sein de la masse du produit.

Ce phénomène est très souvent lié à la cristallisation. En effet, la fermentation est l'action des levures sur le glucose et le fructose du miel en produisant des acides divers, d'alcool éthylique et de CO<sub>2</sub> (Ward et Trueman, 2001).

Selon Philippe (2007), la teneur en eau et la richesse en levures sont les facteurs déterminants de la fermentation du miel ; la relation établie entre ces deux paramètres est résumée dans le tableau 04.

Selon Lesage-Meessen et Cahagnier (1998), les levures osmophiles sont capables de se développer à de faible  $a_w$  sur milieu contenant 50 à 60% de glucose.

Les levures osmophiles sont responsables de la fermentation du miel lorsque sa teneur en eau est supérieure à 18 %, plus d'autres facteurs (Chauvin, 1987)

Les différentes causes de la fermentation du miel sont résumées dans le schéma suivant (fig 2).

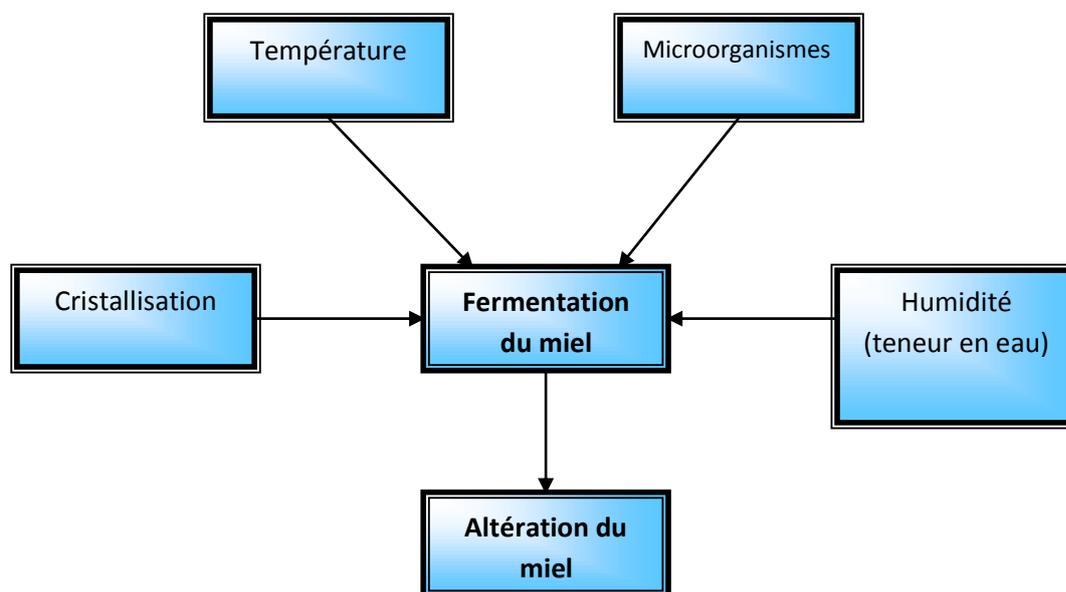


Figure 2 : Les principales causes de fermentation du miel (Gonnet, 1982 ; National Honey Board, 2002)

La fermentation peut intervenir lorsque plusieurs facteurs sont réunis :

1-La teneur en eau est un facteur déterminant (tab 4)

L'augmentation de la teneur en eau du miel de 1 g / 100 g provoque une augmentation 5 fois supérieure de la teneur en levure (Stephen, 1946 cité par Bogdanov, 2011)

Tableau 4 : Relation entre la teneur en eau, le nombre de levures et le risque de fermentation (Lochhead, 1933 cité par Louveaux, 1968a et Bogdanov, 2011)

<i>Teneur en eau du miel</i>	<i>Effet de la richesse en levure : Le nombre de germes de fermentation par gramme de miel.</i>
Moins de <b>17.1%</b>	Pas de fermentation quelle que soit la richesse en levures.
<b>17.1 à 18.0%</b>	Pas de fermentation si le nombre de levure ne dépasse pas 1000.
<b>18.1 à 19.0%</b>	Pas de fermentation si le nombre de levure ne dépasse pas 10.
<b>19.1 à 20.0%</b>	Pas de fermentation si le nombre de levure ne dépasse pas 1.
Plus de <b>20%</b>	Danger de fermentation dans tous les cas.

2- La présence des levures saccharophiles vivantes en quantité suffisante (importante) (Borneck et Gonnet ,1976).

3- Une température favorable comprise entre 20 °C et 25°C (Minh-Hà- Pham, 1999).

4- Stockage réalisé dans de mauvaises conditions (Borneck et Gonnet ,1976).

#### 5- Une conservation mal organisée (Anchling, 2001).

Chauvin (1987), affirme que lorsque le miel se sépare en deux couches, une couche de cristaux et une couche liquide, la fermentation est presque fatale, à cause de l'enrichissement relatif de la teneur en eau de la couche liquide qui favorise l'activité des levures. D'après Gonnet (1982), les levures responsables de la fermentation peuvent se développer dans le miel, soit à partir de la surface en aérobiose, et gagner ensuite en profondeur, soit directement dans la masse du produit en anaérobiose

La fermentation est activée sous l'influence de la température, elle débute à basse température pour être maximale entre 30°C et 40°C (Becker et Schweitzer, 2000).

En outre, le miel contient d'autres microorganismes susceptibles de provoquer d'autres fermentations (lactique, butyrique, acétique...) qui altèrent le miel (Gonnet, 1982).

#### 4.1.1 - Produits de la fermentation :

Les levures osmophiles présentes dans le miel peuvent réduire les sucres fermentescibles comme le glucose, le mannose, le fructose en alcools (D. arabitol, mannitol), CO<sub>2</sub> (95%), glycérol (3 à 5%), acide succinique (0.5%) et autre produits secondaires (butane 2.3 – diol (0.5%)) (Gonnet, 1982; Becker et Schweitzer, 2000).

#### 4.1.2 - Détection de la fermentation :

La recherche d'une fermentation ou une pré fermentation dans les miels se fait par le dosage du glycérol qui est l'un des sous-produits de la fermentation des levures osmophiles dans le miel.

Pour les miels qui contiennent plus de 300 mg/kg de glycérol, la fermentation est bien installée. Entre 50 mg/kg et 300 mg /kg, une amorce de la fermentation a eu lieu, mais ils restent consommables. En dessous de 50 mg/kg, absence de fermentation (Becker et Schweitzer, 2000).

Gonnet (1982), ajoute qu'on peut détecter la fermentation d'un miel, soit au goût légèrement acidulé ,soit au dégagement de CO<sub>2</sub> qui se révèle par une multitude de bulles le long de la paroi des pots ,soit enfin à l'écume qui remonte en surface.

#### 4.1.3- Technique de blocage d'une fermentation :

D'après Anchling (2001), en chauffant le miel, on peut stopper l'activité des levures. Il a été calculé qu'à 60°C, il faut 11 minutes, à 66°C deux minutes et à 68°C une minute.

Une pasteurisation à 65° C est insuffisante pour écarter tous risques de fermentation. Les levures osmophiles du miel sont très sensibles à la chaleur. Pour éliminer tout risque de fermentation on chauffe le miel à 70°C pendant une minute. Le miel pasteurisé est garanti contre toute fermentation ultérieure (Gonnet et *al.*, 1964)

Avant d'exposer le miel à une forte chaleur il est conseillé de le liquéfier lentement sans dépasser les 40°C ensuite il est plus facile de le porter dans tout son volume à la température souhaitée.

Selon Gonnet (1982), la pasteurisation est le traitement préventif le plus efficace pour les miels à haut risque de fermentation. La pratique de la cristallisation dirigée et le stockage dans des locaux non humides peut également limiter les risques de fermentation.

#### **4.2- Effet du vieillissement**

Selon Chauvin (1987), d'abord la couleur du miel fonce rapidement, l'acidité et la teneur en HMF augmentent puis la teneur relative en sucres se modifie. Les sucres simples comme le fructose et le glucose ont tendance à se regrouper pour donner du saccharose (activité enzymatique faible).

#### **4.3- Effet de la température**

Les températures élevées ont sur le miel un effet assez semblable à celui du vieillissement. Les basses températures ont au contraire un effet de protection par blocage des réactions enzymatiques et chimiques (Louveaux, 1968a).

#### **4.4- Action de la lumière**

L'action de la lumière, selon LOUVEAUX (1968a), est principalement la cause de:

- La décoloration du miel
- La destruction importante de l'inhibine et de la saccharase

## Matériels et Méthodes

### Présentation de la Zone d'étude

Les renseignements de cette partie nous ont été fournis par notre collègue Mr Ait Hammou à partir des données de base de sa thèse de Doctorat (Ait Hammou, 2015).

Cette région s'étend sur un espace délimité entre 0°.34' à 2°.5' de longitude Est et 34°.05' à 35°.30' de latitude Nord. Elle couvre une partie de l'atlas Tellien au nord et les hauts plateaux au centre et au sud.

Elle englobe deux parties bien distinctes, la région agricole du Nord, où la céréaliculture se trouve associée à l'élevage, et la zone steppique au Sud, où l'élevage extensif et transhumant est pratiqué.

Les précipitations moyennes annuelles sont estimées à 360,4 mm environ. Les précipitations mensuelles maximale et minimale enregistrées sont respectivement de 47.1 mm durant le mois de janvier et de 5.6mm durant le mois de juillet.

On distingue, au cours de l'année, deux périodes :

- une période froide qui s'étale du mois d'Octobre jusqu'au mois de Mai. Les mois de Décembre, Janvier et Février sont les mois les plus froids avec respectivement 2 °C, 1 °C et 0 °C .
- une période chaude qui s'étale du mois de Juin jusqu'au mois d'octobre de l'année. Les mois de Juillet et Août sont les mois les plus chauds de l'année avec respectivement 35°C et 36°C.

La région se situe au contact du Tell-hautes plaines, les massifs sont généralement des forêts, les plaines sont occupées par la steppe.

Sur les deux millions d'hectares que compte la wilaya, 48% de la surface représente la surface agricole totale (SAT), soit environ 960000 ha, dont 70% représentent la surface agricole utile (SAU). La steppe occupe plus de la moitié de l'ensemble de l'espace de la wilaya avec 1.100.000 ha. Alors que la forêt ne couvre qu'une surface de l'ordre de 150 000 ha.

## I- Matériel

### 1-1 Échantillonnage des miels :

Les échantillons de miels étudiés proviennent de différentes régions de la Wilaya de Tiaret. Au départ le travail concernait les miels algériens et suite au changement de thème qui traite et caractérise seulement les miels produits dans la wilaya de Tiaret, Nous avons donc procédé à la sélection des échantillons de Tiaret parmi une centaine d'échantillons recouvrant tout le nord d'Algérie (y compris le nord du Sahara).

L'étude a porté sur 29 échantillons des années 2004 -2010 de différentes zones de la région de Tiaret (tab 5 et fig 4). Nous avons attribué à chaque échantillon un numéro ; la quantité de chaque échantillon est de 250g. Nous avons récolté, auprès des apiculteurs, les renseignements suivants:

- Date de récolte.
- Mode d'extraction: Manuel, Electrique, autre.
- Plante dominante dans la région.
- Région.

Chaque échantillon a été réparti en deux lots l'un pour les analyses microbiologiques et l'autre pour les caractéristiques physicochimiques. Les échantillons de miels des deux lots ont été conservés dans des étuis noirs propres et secs fermés hermétiquement (fig 03). Chaque étui porte un numéro d'identification correspondant à l'échantillon.



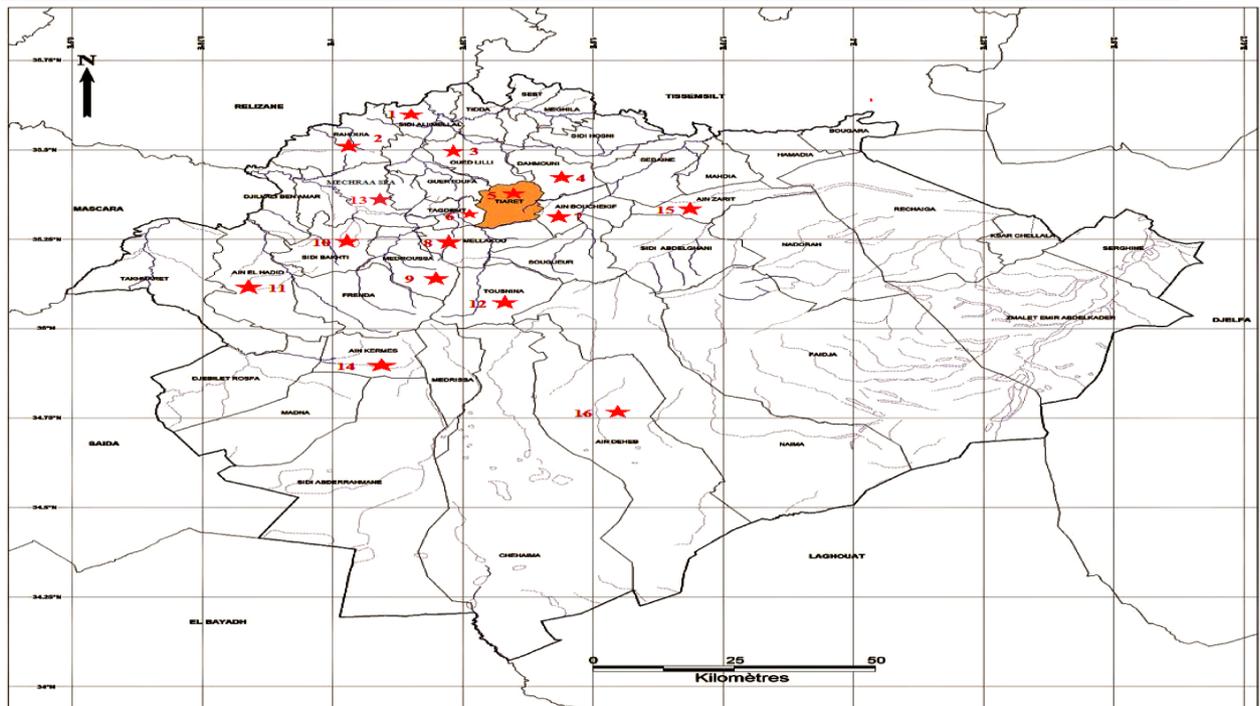
Figure 3: Présentation des échantillons de miels étudiés

Tableau 5 : Description des échantillons de miel étudiés.

<b>Ech</b>	<b>Région</b>	<b>Origine Florale</b>	<b>Mode d'extraction</b>	<b>L'année de récolte</b>
01	Mechraasfa	Multiflorale	Manuel	Juillet 2004
02	Tagdempt	Multiflorale- foret	Manuel	Juillet 2004
03	Sidi ali	Multiflorale- foret	Manuel	Juillet 2004
04	Dahmouni	Multiflorale	Manuel	Juin 2005
05	Tiaret (ville)	Multiflorale	Manuel	Juillet 2005
06	Aindheb	Multiflorale	Manuel	Mai 2005
07	Kharrouba	Forêts	Manuel	Juin 2005
08	Ain dzerit	Multiflorale	Manuel	Juin 2006
09	Tousnina	Multiflorale	Manuel	Mai 2006
10	Mellakou	Multiflorale	Extracteur	Juillet 2006
11	Ain hdid	Multiflorale	Manuel	Aout 2006
12	Ain kermes	Multiflorale	Manuel	Aout 2006
13	Oued lili	Foret	Manuel	Juin 2006
14	Sidi bakhti	Toutes fleurs	Manuel	Août 2006
15	Ain kermes	Toutes fleurs	Manuel	Juillet 2007
16	Oued lili	Toutes fleurs	Manuel	Août 2007
17	Ain kermes	Eucalyptus	Manuel	Juillet 2007
18	Tagdempt	Forêt	Manuel	Juillet 2007
19	Mechraa sfa	Forêt	Manuel	Juin 2007
20	Mellakou	Toutes fleurs	Extracteur	Juillet 2007
21	Mellakou	Toutes fleurs	extracteur	Juillet 2008
22	Boucekif	Toutes fleurs	Traditionnel	juillet 2008
23	Rahouia	Multiflorale	Manuel	Juillet 2008

Suite tableau 5

24	Medroussa	Multiflorale	Manuel	Juillet 2008
25	Sidi bakhti	Foret	Traditionnel	Juin 2009
26	Mellakou	Toutes fleurs	extracteur	Fin mai 2009
27	Mellakou	Toutes fleurs	extracteur	Septembre 2009
28	Mellakou	Toutes fleurs	extracteur	Juin 2010
29	Mellakou	Toutes fleurs	extracteur	Septembre 2010



1 Sidi ali , 2 Rahouia, 3 Oued lili, 4 Dahmouni, , 5 Tiaret (ville), 6 Tagdempt, 7 Bouchekif, 8 Mellakou, 9 Medroussa, 10 Sidi bakhti, 11 Ain eLhdid, 12 Tousnina, 13 Mechraasfa, 14 Ain kermes, 15 Ain dzerit, 16 Aindheb

Figure 4 : Carte de la région de Tiaret

Nous avons éliminés les échantillons de miel produits en dehors de la région d'étude par des apiculteurs de la Wilaya de Tiaret pratiquant la transhumance dans d'autres wilayas.

## II- Méthodes

### 1-Protocole expérimental:

La figure 5, résume la démarche suivie dans notre travail.

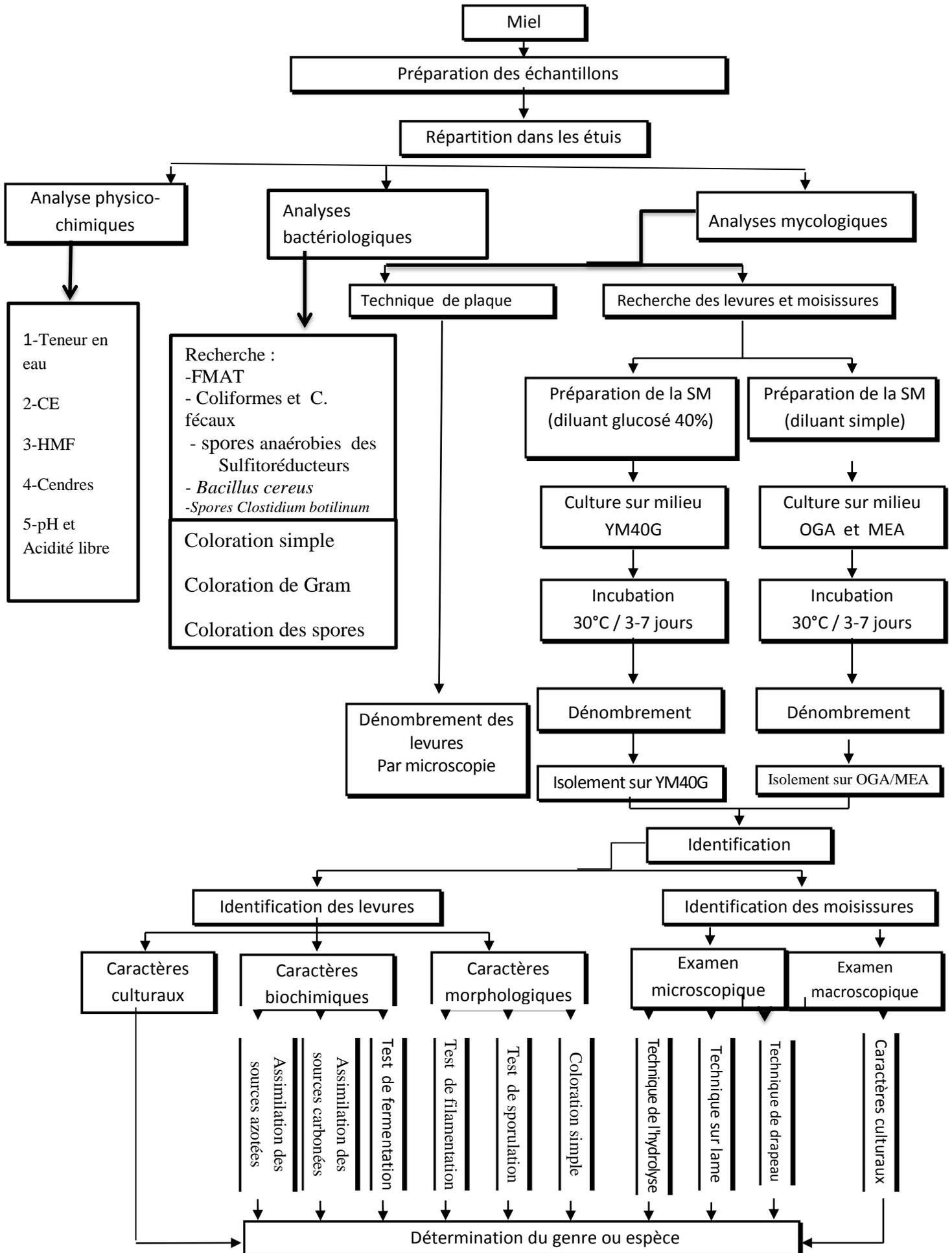


Figure 5: Schéma du Protocole expérimental

## Première partie : Analyses physico-chimiques

### 1- Appareillage:

-Réfractomètre de type Abbe relié à un bain thermostaté par circulation d'eau grâce à une pompe RL2.

- pH mètre (HANNA 2211)
- Spectrophotomètre UV/visible (Shimadzu, 1201).
- Balance analytique (Satorius).
- Agitateur magnétique.
- Etuve.
- Four à moufle électrique.
- Plaque chauffante.
- Bain marie munie d'un thermomètre.
- Burette automatique.
- Conductimètre (PHYWE instruments , 1370193)

### 2-Produits Chimiques:

- Hydroxyde de sodium.
- Acide acétique.
- Acide barbiturique.
- Paratoluidine.
- Iso Propanol.
- Solution tampon pH = 7, pH = 4.
- Chlorure de Potassium

## Méthodes physico-chimiques

### 1-Détermination de la teneur en eau :

L'indice de réfraction du miel est fonction de la teneur en eau et de la température, la mesure se fait au moyen de réfractomètre. C'est une méthode rapide et l'une des plus sûres pour évaluer la teneur en eau des miels (Louveaux, 1968a).

La teneur en eau est déterminée à partir de l'indice de réfraction du miel en se référant à la table standard de Chataway, revue et mise à jour par la Commission Internationale du miel (IHC, 2009).

Le miel à analyser doit être homogénéisé et parfaitement liquide. Dans le cas où l'échantillon est cristallisé, on le met dans un flacon fermé hermétiquement et on le place à l'étuve à 40°C ou dans un bain marie à 50°C ( $\pm 0,2$ ) jusqu'à ce que tous les cristaux de sucre soient dissous.

Après refroidissement à température ambiante, une goutte de miel est déposée et étalée en couche mince sur la surface du prisme.

La détermination de l'indice de réfraction se fait à 20 °C, puis on se réfère à la table de Chataway (table en annexe) pour déduire les teneurs en eau (Bogdanov et *al.*, 1997 ; Commission internationale du miel, 2009).

## 2- Détermination de l' HMF

Le taux d'HMF a été déterminé par spectrophotométrie, Selon la méthode de Winkler (1955) décrite par les méthodes harmonisées de la Commission européenne du miel (Bogdanov et *al.*, 1997) et le Rapport de la Commission Internationale du miel (2009).

### 2-1 Préparation de la solution de paratoluidine

Dissoudre 10 g de paratoluidine dans un peu d'isopropanol. Ajouter 10 ml d'acide acétique cristallisable. Transvaser dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'isopropanol et mélanger par retournements. Conserver le réactif en flacon brun et au réfrigérateur. Il est renouvelé journalièrement.

### 2-2 Préparation de la solution d'acide barbiturique

Dissoudre 0,5 g d'acide barbiturique dans un peu d'eau distillée. Transvaser dans une fiole jaugée de 100 ml et ajuster jusqu'au trait de jauge.

### 2-3 Dosage de l'HMF

- Préparer une solution mère en dissolvant 10 g du miel, sans chauffer, dans 50 ml d'eau distillée;
- Prendre deux éprouvettes et introduire dans chacune 2 ml de la solution mère, puis y ajouter 5 ml de solution para toluidine;
- Ajouter 1 ml d'eau dans l'éprouvette N° 01 et agiter puis ajouter 1 ml de solution d'acide barbiturique dans l'éprouvette N° 02, agiter. Introduire rapidement les solutions en cuve de 1 cm dans le spectrophotomètre réglé  $\lambda = 550 \text{ nm}$ ;
- Lire les extinctions de la solution 2 par rapport à la solution 1 de minute en minute pendant 4 à 5 min à partir de l'adjonction de la solution barbiturique;
- La teneur en HMF (mg/Kg) s'obtient par la formule suivante :

$$\text{HMF} = \frac{192 \times \text{Extinction } (^{\circ}D)}{\text{Epaisseur de la cuve en cm}}$$

## 3- pH et Acidité libre

Pour mesurer l'acidité, nous avons utilisé la technique décrite par les méthodes harmonisées de la Commission européenne du miel (Bogdanov et *al.*, 1997) et le Rapport de la Commission Internationale du miel (2009), qui consiste à dissoudre 10 g de miel dans 75 ml d'eau distillée dans un bécher de 250 ml. Mélanger ensuite à l'aide d'un agitateur magnétique et, après étalonnage du pH mètre, plonger l'électrode dans la solution, noter la

valeur du pH initial et commencer par la suite le titrage par une solution de NaOH 0,1 N jusqu'à un pH de 8,5.

Le résultat est exprimé par la formule suivante :

$$\text{Acidité libre (meq/kg)} = \text{Volume en ml de NaOH versé} \times 10$$

#### 4- Conductivité électrique :

Selon le Schweitzer (2002), dans beaucoup de cas la mesure de la conductivité électrique permet de bien différencier les miels de miellat des miels de nectar.

La conductivité électrique (CE) a été mesurée selon les méthodes harmonisées de la Commission européenne du miel (Bogdanov *et al.*, 1997) et le Rapport de la Commission Internationale du miel (IHC, 2009) et est exprimée en mS / cm. La CE est mesurée à 20 °C pour une solution de miel à 20% de matière sèche.

La masse du miel est mesurée comme suit :

$$M \text{ (g)} = \frac{5 \times 100}{M_s}$$

$M_s$  : teneur en matière sèche.

Au début on calcule la constante de la cellule de l'électrode du conductimètre, par la méthode suivante: 40 ml de la solution de chlorure de potassium sont transférés dans un bécher.

L'électrode est reliée au conductimètre, elle est rincée complètement avec la solution de chlorure de potassium puis immergée dans la solution. La constante de la cellule K est calculée en utilisant la formule suivante :

$$k = 11,961 \times 1 / g$$

k : constante de la cellule en  $\text{cm}^{-1}$  ;

g : la conductance en mS, mesurée avec la solution de KCl ;

11.961 : la valeur moyenne de la conductivité électrique de l'eau distillée en  $\text{ms.cm}^{-1}$  et la conductivité électrique de la solution de chlorure de potassium 0,1N à 20°C.

Dissoudre la masse M du miel dans quelques ml d'eau distillée, puis compléter à 25 ml dans une fiole jaugée, cette solution de miel est transférée dans un bécher et chauffée à une à environ 20 °C.

Après étalonnage de l'appareil avec la solution de chlorure de potassium, l'électrode du conductimètre est plongée dans la solution de miel. La lecture est faite lorsque la température est à 20 °C ( $\pm 0.5$ ). En fin, la conductivité du miel est calculée d'après la formule suivante :

$$CE = k \times G$$

CE : la conductivité électrique du miel exprimée en  $\text{mS.cm}^{-1}$  ;

k: constante de la cellule ;

G : conductance de l'échantillon.

### 5-Détermination des cendres :

On appelle cendres l'ensemble des produits obtenus après incinération du miel. La détermination de la teneur en cendre a été effectuée selon les méthodes harmonisées de la Commission européenne du miel (Bogdanov et *al.*, 1997) et le Rapport de la Commission Internationale du miel (IHC, 2009).

05 à 10g de miel sont pesés dans une capsule en porcelaine calciné et taré. Pour éviter la production de mousse ou débordement, l'échantillon est carbonisé à l'aide d'un bec bunsen par la suite l'échantillon est placé dans un four à moufle à 600 °C jusqu'à obtention d'un poids constant. Les capsules de porcelaines sont refroidies dans un dessiccateur et pesées. La teneur en cendre ( $W_A$ ) du miel (g/100g) est calculée en utilisant la formule suivante :

$$W_A = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100$$

$m_0$  : Poids du miel pris.

$m_1$  : Poids de la capsule +cendre.

$m_2$  : Poids de la capsule.

Les échantillons des années de 2004-2007 ont été analysés également au niveau du CETAM-Lorraine. Les analyses effectuées sont : la teneur en eau, teneur en HMF, pH et acidité.

## Deuxième partie : Analyses microbiologiques

### 1. Appareillage :

Balance électrique	Plaque chauffante	Autoclave
Agitateur magnétique	Vortex	Balance électrique
Microscope optique.	Microscope pour prise de photos.	Etuve
Compteur de colonies	Réfrigérateur	Loupe
Plaque chauffante	Etuves thermostatées	
Bain Marie thermostaté réglable à $44\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .		

### 2. Verrerie :

Bechers. Tubes à essai, Lames et lamelles, Erlenmeyer, Pipettes graduées, Verres de montre.

### 3. Petit matériel

Boîtes de Pétri	Papier absorbant	Bac de coloration	Bec Bunsen
Étiquettes	Papier filtre	Bandelettes de pH	Anses de platine
Gants	Papier hygiénique	Minuterie.	Spatules
Lunettes protectrices	Portoirs	Etuis en plastique	Pinces en bois
Masques	Spatules	Ruban adhésif (scotch)	

### 4. Produits et réactifs :

Peptone, Alcool, Fuchsine, Lugol, Violet de Gentiane.

### 5. Milieux de culture :

Eau peptonée	Milieu YCB
Gélose nutritive et PCA	Milieu YNB
Gélose à extrait de malt	Milieu VRBL
Milieu OGA	Milieu PDA
Milieu YM40G	Milieu Mac Clary
Milieu de Sabouraud	

Les analyses microbiologiques que nous avons réalisées se scindent en deux types : les analyses bactériologiques et les analyses mycologiques comprenant levures et moisissures.

## **I- Analyses bactériologiques :**

Les analyses bactériologiques ont été réalisées dans les conditions d'asepsie à proximité d'un bec Bunsen dans une zone nettoyée à l'eau de Javel et en utilisant du matériel stérilisé.

### **a/préparation de la solution mère :**

Elle consiste à peser 10 g de miel qu'on dilue dans 90 ml d'eau peptonée, c'est la solution au 1/10ème. Le diluant utilisé est l'eau peptonée à 0.1 %. Cette solution est préconisée par Ward et Trueman (2001) pour l'analyse bactériologique des miels. La solution obtenue est agitée jusqu'à homogénéisation puis stérilisée à 120 °C pendant 15 min.

### **b/Germes recherchés :**

#### **1- la flore aérobie mésophile totale (FMAT) :**

Cette recherche ne précise pas la nature des germes recherchés ou obtenus. Suivant la norme ISO -2293- (1993), Delarras (2000) , Guiraud et Rosec (2004) et Bekele et *al.* (2006), le dénombrement de ces germes se fait par culture en masse sur gélose.

Introduire 1ml de la solution mère précédemment préparée, dans une boîte de Pétri stérile puis couler le milieu de culture maintenu en suffusion à 45 C°. Après homogénéisation et solidification du milieu, incuber les boîtes en position inversée dans l'étuve à 30 C° pendant 72 h. La lecture consiste à dénombrer toutes les colonies quelques soit leur taille et leur forme

Ward et Trueman (2001), préconisent l'utilisation du milieu PCA pour la recherche de la flore mésophile totale dans le miel. Mais dans un but de comparaison, Nous avons utilisé également le milieu de culture GN (composition des deux milieux en annexe) qui est un milieu général préconisé dans l'analyse des denrées alimentaires (Guiraud, 1998).

#### **2- Coliformes totaux et Coliformes fécaux (Thermo-tolérants) :**

La mise en évidence de ces germes se fait par culture en masse sur gélose VRBL en adoptant les normes internationale ISO -4832- (1993), Larpent et *al.* (1997) et Guiraud (2003) NF ISO 4832 (V 08-015) ( 2006), NF V08-050 ( 2009) et NF V08-060 (2009).

1 ml de la solution mère préparée précédemment est déposée dans une boîte de Pétri stérile puis le milieu VRBL maintenu en surfusion est ensuite coulé dans les boîtes. Après homogénéisation et refroidissement du milieuensemencé, les boîtes inversées sont incubées à 30°C pour les coliformes et à 44°C pour les coliformes fécaux pendant 24 à 48 h. La lecture se fait par comptage des colonies rouge foncées ou violacées.

### 3- Recherche des spores des anaérobies Sulfitoréducteurs

Suivant Petransxiene et Lapied (1981); Guiraud (1998), La recherche des spores anaérobies Sulfitoréducteurs est réalisée sur le milieu VF (viande de foie) comme ci-dessous:

Placer 5 ml de solution mère dans un tube stérile et les porter au bain d'eau à 80 °C pendant 10 min puis le refroidir rapidement sous l'eau de robinet (destruction des formes végétatives). Faire fondre au bain d'eau bouillante le milieu de viande de foie et le refroidir aux environs de 65 °C puis, ajouter au milieu 5 ml de sulfite de sodium et 2,5 ml d'alun de fer (pour un flacon de 250 ml). Couler la VF, déjà additionnée de ses réactifs, dans les tubes contenant 5 ml de la solution mère. Rendre ensuite l'ensemble homogène par un mouvement rotatoire vertical sans faire de bulles et solidifier sous l'eau froide. La température d'incubation est 46 °C pendant 24 à 48 h. Les spores des Sulfitoréducteurs se développent en donnant des colonies entourées d'un halo noir.

### 4- Recherche de *Bacillus cereus*

D'après Guillaume (2004), le dénombrement de *Bacillus cereus* se fera sur un milieu sélectif, le milieu de Mossel, pour les dilutions  $10^{-1}$  à la température de 30 °C. L'agent sélectif du milieu est un antibiotique, le sulfite de polymyxine (inhibe les bacilles gram négatif). Ce milieu est additionné du jaune d'œuf pour mettre en évidence la présence de la lécithinase.

Répartir 90 ml de milieu dans des flacons de 150 ml, autoclaver 15 min à 120 °C au moment de l'emploi, faire fondre au bain marie bouillant, puis refroidir à 50 °C. Ajouter alors à 90 ml de base précédente, 10 ml d'une émulsion stérile de jaune d'œuf à 20 % et 1 ml d'une solution de sulfate de polymyxine à 0,1 %. Couler en boîte de pétri. L'ensemencement se fera par étalement de  $0,1 \text{ cm}^3$  de solution mère et incubé à 30-35 °C pendant 24 h à 48 h (Larpen-Gourgaud et Larpen, 1997).

Selon Larpen (1997), les colonies caractéristiques de *Bacillus cereus* présumées sont grandes, roses (ne fermentent pas le mannitol) et presque toujours entourées d'une zone blanche de précipité (dû à l'action d'une lécithinase).

Guillaume (2004), ajoute que si il y'a croissance alors présence de la souche *Bacillus cereus* : Colonies roses rouges (mannitol -); Halo blanchâtre (lécithinase +).

### 5. Spores de *Clostridium botulinum*

Deux fractions de 2,0 ml de solution de miel ont été inoculées dans des tubes contenant 15 ml de bouillon d'extrait de viande et deux portions aliquotes supplémentaires ont

été inoculées dans des tubes contenant le même volume de bouillon TPGY. Immédiatement avant l'utilisation, les tubes ont été bouillis pendant 15 minutes, suivis d'un bain de glace. Les deux tubes de bouillon d'extrait de viande ont été incubés à 35 ° C et les deux tubes TPGY ont été incubés à 28 ° C. Après une période d'incubation de 7 jours, chaque culture a été examinée pour déterminer la turbidité, la production de gaz. Les cultures qui n'ont pas présenté de croissance dans les 7 jours ont été réincubées pendant 3 jours supplémentaires afin de permettre une éventuelle germination tardive des spores. Si aucune croissance n'a été détectée après cette période, la culture est considérée comme négative (Solomon et *al.*, 2001).

## 6. Recherche d'autres germes

Des analyses cytologiques, bactériologiques et mycologiques ont été faites par le laboratoire d'analyses médicales Bernard Dory Medilab Est de Sarreguemines (département de la Moselle) suite à la demande et au frais du Laboratoire apicole du CETAM-Lorraine. 12 échantillons (1, 3-10, 12-14) ont subi les analyses suivantes [les analyses ont été effectuées sur 20 échantillons dont 12 de la région de Tiaret] :

-Analyse cytologique

-Analyse Bactériologique : Elle comprend

1-Examen direct

2-Culture : recherche des germes suivants :

a- *Clostridium botulinum*

b- *Clostridium perfringens*

c- *Bacillus cereus*

d- *Escherichia coli*

e- Staphylocoques (en particulier *S. aureus*)

f- Streptocoques (en particulier *Streptocoques fécaux* ou Entérocoques)

g- Salmonelles et Shigelles

-Analyse Mycologique : recherche des levures pathogènes

### c- Observations microscopiques

#### - Coloration simple

La coloration simple indique la forme, l'arrangement et la taille des bactéries, cette coloration est réalisée dans l'ordre des opérations suivantes:

Préparer une suspension bactérienne; Mettre une ou deux gouttes sur une lame; Sécher et fixer le frottis; Recouvrir de quelques gouttes de réactif de violet gentiane, laisser en contact 30 secondes; Laver à l'eau et laisser sécher; Observer à l'objectif à immersion (Lambin et German, 1969).

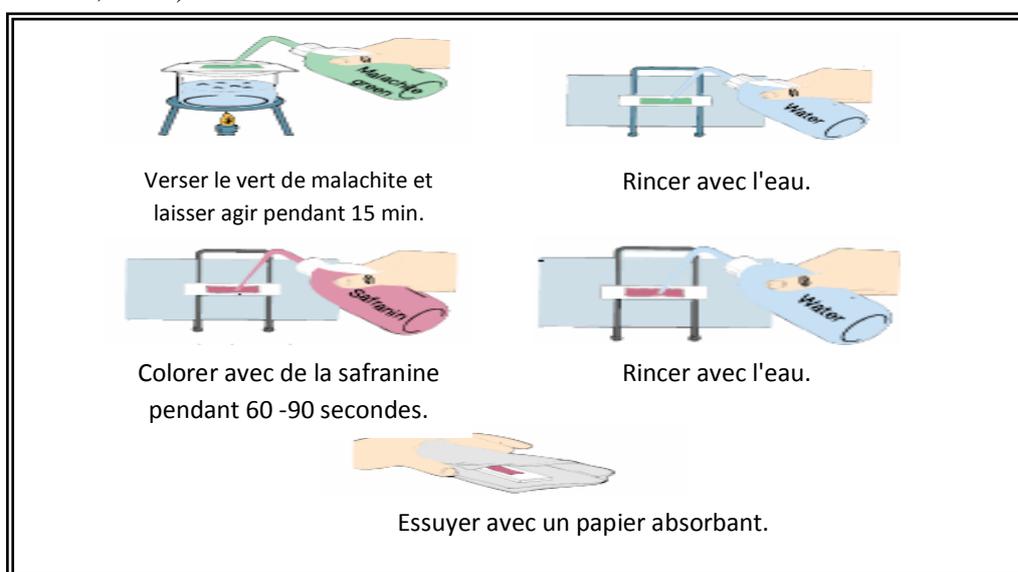
#### - Coloration de Gram

Cette méthode est basée sur la différence de la composition chimique des parois des bactéries et détermine les épreuves subséquentes de l'identification bactérienne. Les cellules Gram (+) sont colorées en violet foncé et les bactéries Gram (-) restent rose (annexe).

#### - Coloration des spores

Les spores sont des organes de résistances produites par quelques groupes bactériens. La technique de coloration employée est réalisée comme suit:

Réaliser un frottis de colonies, fixer à la flamme; Après fixation, ajouter une solution aqueuse de vert de malachite à 5 % porter sur un bain d'eau bouillante et laisser agir pendant 15 minutes, laver à l'eau; Colorer avec de la safranine pendant 60 - 90 secondes, laver à l'eau et sécher (figure 6); Les spores sont colorées en vert et les cellules végétatives en rouge (Prescott, 2002).



**Figure 06:** Procédure de la coloration des spores (Prescott, 2002).

## **II-Analyses Mycologiques :**

### **Choix du milieu de culture:**

Le choix du milieu de culture dépend des espèces microbiennes que l'on veut cultiver et de leurs exigences nutritionnelles bien évidemment.

Les milieux choisis pour le dénombrement des xérophiles et des osmophiles devraient refléter les caractéristiques de l'aliment à analyser. Des géloses et des diluants additionnés de glucose, saccharose ou glycérol devraient être utilisés pour l'analyse des produits à forte teneur en sucre. Tandis que pour les produits à forte teneur en sel, l'utilisation de milieux contenant du chlorure de sodium en combinaison avec un sucre, est plus appropriée (Douey et Wilson, 2004).

Selon Moreau (1996), pour détecter et dénombrer le maximum d'éléments de levures et moisissures, il est recommandé d'utiliser au moins deux milieux de culture gélosés.

Les milieux gélosés pour la culture, l'isolement et la numération sont les milieux MEA, OGA, PDA et Sabouraud (Guiraud et Rosec, 2004) et YM40G (Ward et Trueman, 2001). Dans cette étude nous avons utilisé trois milieux de culture pour la recherche des levures et moisissures. Ces milieux sont : OGA, Extrait de malt (MEA) et YM40G.

### **1. Culture sur OGA ;**

D'après Guiraud et Rosec (2004), la norme internationale V08 – 022, norme homologuée ; ISO 7954 (1987) remplacée par LISO 21527-2 (2008) concerne le dénombrement des levures et des moisissures dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation des animaux, dont l'activité de l'eau est inférieure ou égale à 0,95.

Cette méthode préconise l'utilisation des géloses glucosés au chloramphénicol ou à l'Oxytétracycline (OGA) (composition en annexe) pour le dénombrement des levures et moisissures en milieu solide.

Le diluant utilisé est l'eau peptonée à 0,1 %. La solution obtenue est stérilisée à 120°C pendant 15 mn (Ward et Trueman, 2001).

Peser 10 g de l'échantillon de miel à analyser et à l'aide d'une spatule les ajouter à 90 ml du diluant simple stérilisé puis agiter légèrement jusqu'à l'obtention d'une solution mère homogène.

### 1.1 Ensemencement :

Selon Bouix et Leveau (1980) et le diagnostic Pasteur (1987), il faut faire fondre le milieu de base OGA au bain- marie bouillant, puis le refroidir à 50°C environ. Ajouter à chaque 100 ml du milieu 10 ml d'une solution stérile d'Oxytétracycline à 0,1 mg/1ml puis mélanger soigneusement. Couler à raison de 15 ml par boîte de pétri stérile et laisser solidifier.

L'inoculum est déposé à l'aide d'une pipette graduée stérile en un point sur milieu OGA. Nous avons pris en compte la notion de King et *al.* (1984) cités par Martins et *al.* (2003) qui rapportent qu'il faut ensemer 0,2 ml de la SM par boîte et l'étaler à l'aide d'une pipette Pasteur (Technique du râteau). Incuber les boîtes à une température de 28 à 30°C pendant 3 jours et plus (Guiraud, 2003).

Douey et Wilson (2004), précisent que les levures osmophiles peuvent être incubées jusqu'à 7 jours.

D'après Leclerc et *al.* (1989), le dénombrement des moisissures et des levures doit toujours être réalisé par ensemencement en surface ce qui facilite l'observation et l'identification ultérieure des souches isolées. Les résultats s'expriment en unités formant colonie ou ufc (Guiraud, 2003).

### 1.2 Isolement:

Le but d'isolement est l'obtention de cultures pures issues d'une seule cellule, ce qui facilite leur étude. L'isolement a été fait sur milieu OGA en tubes solidifiés de manière inclinée (Guiraud, 2003).

Pour les levures, prélever une colonie levurienne à l'anse puis la déposer et l'étaler directement sous formes de stries d'épuisement à la surface de la gélose OGA inclinée. Alors que pour les moisissures, l'isolement se fait par prélèvement d'un fragment de thalle et le déposer en un seul point (Moreau, 1996).

Incuber les tubes à 28°C pendant 03 jours après fermeture sans serrer le bouchon (pour assurer l'aérobiose pour les moisissures et l'aéro-anaérobiose pour les levures).

## **2. Ensemencement sur le milieu gélosé à extrait de malt :**

La solution mère est préparée en dissolvant 2 g de miel dans 18 ml d'eau peptonée. Mettre 1 ml de la solution mère dans chaque boîte de Pétri puis couler le milieu gélosé à l'extrait de malt (composition en annexe) en sur couche puis homogénéiser. L'incubation se fait à 30 C° pendant 3 jours ou plus. Compter le nombre colonies apparues sur le milieu gélosé à extrait de malt.

L'isolement et l'identification se font de la même manière que pour le milieu OGA. Nous avons utilisé également ce milieu acidifié à pH 4 par l'acide tartrique dans les tests préliminaires.

## **3. Recherche des levures osmophiles et des moisissures xérophiles :**

Les levures osmophiles et les moisissures xérophiles doivent trouver des conditions de développement aussi proches que possible de celles dont ils bénéficient dans leur milieu naturel.

Il faut donc leur fournir le milieu de culture idéal ou celui qui s'en rapproche le plus. Les levures osmophiles et les moisissures xérophiles sont isolées sur des milieux à forte teneur de glucose YM40G (composition en annexe).

### **3 -1.Préparation du diluant et ensemencement**

Le diluant est préparé en ajoutant à l'eau peptonée à 0,1 %, 40 g de glucose, la solution obtenue est agitée jusqu'à l'homogénéisation et la dissolution du glucose. La stérilisation se fait à 120C° pendant 15 mn (Ward et Trueman, 2001 ; Douey et Wilson, 2004).

Peser 10 g de miel dans une fiole ajouter 90 ml de diluant glucosé à 40 % ; homogénéiser la solution. Etaler 0.1 ml de cette solution par la technique de râteau sur le milieu gélosé YM40G ; incubé à 28 à 30 °C pendant 3 jours ou plus. Après dénombrement, l'isolement des colonies caractéristiques se fait sur le milieu YM40G incliné en tube par la méthode de stries.

Pour l'isolement des levures, prélever la colonie levurienne à l'anse puis la déposer et l'étaler directement sous formes de stries d'épuisement à la surface du milieu incliné en tube (YM40G). Pour les moisissures, l'inoculation se fait sur le milieu incliné (YM40G) en un seul

point (Guiraud, 2003). Incuber les tubes à 28 à 30°C pendant 03 jours après fermeture sans serrer le bouchon (pour assurer l'aérobiose pour les moisissures et l'aero-anaérobiose pour les levures).

### **3.2. Identification des levures :**

D'après Boeufgras et *al.* (1991) et Koenig (1995), la première étape de l'identification du genre de la levure est basée sur des caractères morphologiques :

- Examen macroscopique de la colonie (Couleur, texture et aspect).
- Recherche de pseudofilamentation ou de filamentation.
- Le type de reproduction (sexuée, asexuée).

L'identification des levures fait appel à la sexualité, aux caractères culturaux, morphologiques et physiologiques (Guiraud, 2003).

#### **3.2.1. Etude des caractères culturaux :**

Les caractères culturaux sont étudiés en milieu solide incliné. L'ensemencement se fait en stries (Guiraud, 1998). Selon Bouix et Leveau (1980), l'observation de la culture permet de définir :

La taille des colonies ;

Leur forme (contours nets ou irréguliers, convexes ou concaves);

Leur aspect (mat ou brillant);

Leur pigmentation.

#### **3.2.2. Etude des caractères morphologiques cellulaires :**

Ils sont très importants à préciser pour l'identification des levures. Certains éléments peuvent être caractéristiques d'un genre ou même d'une espèce donnée (Koenig, 1995).

##### **3.2.2.1-Observation microscopique des cellules végétatives**

La coloration simple par la fuchsine s'effectue en recouvrant le frottis fixé par quelques gouttes de colorant que l'on laisse agir 30 seconde à 2 minutes, puis on le rince à l'eau.

L'examen s'effectue généralement à l'immersion, après séchage à la flamme du bec bunsen (Guiraud, 1998). Cette technique permet d'observer la taille et la forme des cellules

levuriennes et même le mode de reproduction (bourgeoisement monopolaire, bipolaire, multipolaire ou scissiparité).

### **3.2.2.2-Test de filamentation**

Selon Guiraud (2003), la recherche systématique de l'aptitude à la filamentation d'une souche doit cependant s'effectuer après culture sur un milieu spécifique : PDA (potato-dextrose-agar ; composition du milieu en annexe).

La meilleure technique consiste à effectuer une culture sur lame comme suit :

Après stérilisation à l'autoclave des milieux et refroidissement à 45°C, tremper une lame stérile dans le milieu PDA, puis l'égoutter et la placer sur un support placé dans la boîte de pétrie. Après gélicification, inoculer la lame par deux stries parallèles sur le milieu, la recouvrir en suite d'une lamelle stérile, verser dans le fond de la boîte, 1 à 2 ml d'eau stérile afin d'humidifier l'atmosphère.

Incuber à 28-30°C pendant 4 à 5 jours. Observer au microscope la formation de pseudo-mycélium ou vrai mycélium, en plaçant la lame de culture sous l'objectif de grossissement 40, après avoir enlevé la couche de gélose sur sa face inférieure (Hennebert, 1998).

### **3.2.2.3-Test de sporulation**

Toutes les levures n'ont pas les mêmes exigences, plusieurs milieux de sporulation doivent être utilisés simultanément afin de mettre en évidence la sporulation si la levure est ascosporegène. Le milieu le plus couramment employé est le milieu mac Clary (composition en annexe) (Bouix et Leveau, 1980).

D'après Bouix et Leveau (1993), Le test se fait par un ensemencement en stries en surface sur milieu Mac Clary à partir des cultures jeunes faites sur milieu YM40G et le milieu OGA, puis incuber les tubes à une température de 30°C pendant 8-10 jours.

Des préparations microscopiques à l'état frais ont été régulièrement effectuées entre lame et lamelle. Dans le cas des levures ascosporegènes, on note la forme des asques, le nombre et la forme des ascospores.

### **3.2.3 Etude des caractères biochimiques**

D'après Boeufgras *et al.* (1991) *et* Koenig (1995), La deuxième étape qui est l'identification de l'espèce de la levure est basée principalement sur des caractères physiologiques et biochimiques :

- test de fermentation des sucres.
- test d'assimilation des substances azotées et carbonées.

### **3.2.3.1- tests de fermentation des sucres**

Les sucres habituellement testés en fermentation sont : le glucose, le galactose, le saccharose, le maltose, le lactose, le rhamnose.

Le milieu de base utilisé pour la fermentation du sucre est le milieu eau peptonée stérilisée à 120°C pendant 20 mn. Ce milieu est conditionné en tube muni d'une cloche de Durham (Bouix et Leveau, 1993).

Avant ensemencement, des solutions des sucres à tester sont ajoutées dans ces tubes. La concentration finale en sucre doit être de 2 % pour tous les sucres en utilisant 0,2 g dans 10 ml d'eau peptonée (composition en annexe) additionnés d'indicateur de pH: le rouge de phénol qui est caractérisé par une zone de virage de couleur située entre 6,8 et 8,4.

Les cultures sont incubées à 28-30 °C pendant 48<sup>h</sup> à 3 semaines. Un sucre est fermenté quand il y a présence de gaz dans la cloche avec virage de couleur du rouge au jaune (Bouix et Leveau, 1980).

### **3.2.3.2-Assimilation des sources carbonées**

Selon Guiraud (2003), le test d'assimilation des sources carbonées est pratiqué sur un grand nombre de substrats , Nous avons testé le saccharose , le lactose , le maltose , le galactose , le glucose , l'amidon , le glycérol , l'acide lactique , l'acide citrique , rhamnose.

Le test le plus utilisé consiste en une culture sur le milieu YNB (yeast nitrogène base) (composition en annexe) qui ne contient pas de substrats carbonés.

Selon Koenig (1995), la technique la plus courante est la technique auxanographique : 1 ml d'une suspension levurienne est placé dans une boîte de pétri, puis le milieu YNB fondu à 45°C est coulé et agité de façon à obtenir un mélange homogène. Une fois le milieu refroidi et solidifié, les sources de carbone à tester sont déposées à la surface du milieu gélosé sous forme de disques en papier imprégnés de la source de carbone souhaitée.

Les boîtes sont incubées à 28-30°C. La lecture est possible après 24 à 48 heures. L'assimilation se traduit par un développement de colonies dans la zone de diffusion de ce composé. Un témoin est effectué sans source de carbone.

### **3.2.3.3-Assimilation des sources azotées :**

Selon Bouix et Leveau (1980), ce test est pratiqué comme le test d'assimilation des sources carbonées mais avec un milieu ne contenant pas d'azote. Le milieu utilisé est le yeast carbone base (YCB, composition en annexe).

Après l'inoculation, nous avons déposé sur le milieu YCB, des disques en papier stériles imprégnés de la solution de nitrate de potassium ( $KNO_3$ ) à 20 % (Koenig, 1995). La croissance des levures autour du disque indique l'assimilation du nitrate de potassium.

### **3-3. Dénombrement des levures par la technique de plaque :**

On peut déterminer le nombre total de cellules levuriennes par la technique de numération par microscopie ou examen direct (Guiraud, 1998). Dans notre essai nous avons choisi la technique usuelle de l'analyse pollinique de Murizio et Louveaux (1963) cité par Louveaux (1968b) et Louveaux et *al.* (1970).

Cette technique est utilisée pour le dénombrement des grain de pollen dans le miel, mais compte tenue de l'observation des levures et des corps étrangers à côté des grains de pollen, Mr Paul Schweitzer, Directeur de recherche au niveau du laboratoire d'analyses apicoles CETAM-lorraine, nous a proposé de faire des essais de dénombrement des levures par cette technique et de faire un comptage automatique en utilisant une caméra numérique de marque Quancoll pour la prise de photos et un programme de comptage automatique et rapide à partir des photos numériques prises.

### **3.4- Identification des moisissures :**

Selon Koenig (1995), l'identification des moisissures repose sur :

- L'examen macroscopique.
- L'examen microscopique.

#### **3.4.1- Examen macroscopique :**

Observer attentivement, dans un endroit bien éclairé, l'aspect des moisissures :

- La consistance de la colonie : glabre, duveteuse, poudreuse, plâtreuse, Soyeuse, laineuse, floconneuse;
- La surface : plane, en dôme, plissée, cérébriforme ;
- La présence de rayons fins ou larges, courts ou longs, s'enfonçant dans la gélose, etc.

- La couleur de l'avvers et le revers;
- La présence d'un pigment diffusible dans la gélose

### **3.4.2- Examen microscopique :**

Elle est réalisée par les techniques suivantes :

#### **3.4.2-1-Technique de drapeau :**

Selon Guiraud (2003), encore dite technique de scotch , Elle consiste à faire un prélèvement en appuyant un morceau de ruban adhésif transparent (scotch) sur la surface de la colonie, appliquer légèrement à la surface de la culture, puis coller sur une lame sur laquelle on a déjà déposée une goutte de bleu coton (bleu au lactophenol). Observer au microscope (Midgley *et al.*, 1998).

Cette technique permet d'observer les spores et thalles, leur taille , leur morphologie , la façon dont les spores sont rattachées aux filaments : conidiogènes : isolées , en chaîne ramifiées ou non , en amas , portées par des conidiophores isolés ou ramifiés , produites par des phialides ou non (Guiraud, 1998).

#### **3.4.2-2-Technique sur lame :**

Cette technique est pratiquée comme le test de filamentation mais sur le milieu Sabouraud (composition en annexe). L'inoculation se fait en un seul point. Cette technique est réalisée pour l'observation des organes de fructification.

D'après *Koenig (1995)*, Cette technique consiste à:

Remplir un bécher stérile de Sabouraud, maintenu en surfusion à 45 C°, puis tremper à l'aide d'une pince une lame stérile dans le milieu et la déposer sur une boîte de pétri stérile.

À partir de l'isolat, ensemercer un fragment de la culture au centre de la lame. L'incubation se fait à 30 C° pendant 7 jours, après avoir humidifier le fond de la boîte.

#### **3.4.2.3-Technique d'hydrolyse :**

Elle consiste à prélever un fragment de la colonie de moisissure et le plonger dans une solution de bleu de lactophénol pendant 18 à 24h (colorant spécifique de la callose qui est un des principaux constituants de la paroi des hyphes des champignons). Après dilacération par une spatule, ajouter du KOH ou NaOH concentrée. Ensuite étaler sur une lame propre et recouvrir d'une lamelle. Eliminer le colorant en utilisant du papier absorbant (cette technique peut se faire sans colorant). Le but de cette technique est l'observation de la forme du thalle et la fructification.

### **Analyse Statistique**

Nous avons effectué des analyses de comparaison entre les résultats des différents paramètres physicochimiques et microbiologiques pour chercher l'existence d'éventuelles relations entre ces paramètres. L'analyse a été réalisée par le programme libre « R » disponible en ligne. Nous avons déterminé également un résumé de statistique descriptive tels que l'écart-type, la valeur moyenne, la valeur minimale et la valeur maximale de chaque analyse.

## Résultats et Discussion

### 1. Résultats des analyses physico-chimiques

Les résultats des analyses physicochimiques sont regroupés dans le tableau 6

Tableau 6 : Résultats des analyses physico-chimiques

Paramètres	Valeur moyenne ± écart-type	Min-Max	Valeur seuil des normes internationales
Teneur en eau	<b>16.51 ±1.654</b>	<b>14.20 - 20.80</b>	20%, ancienne norme 21%
HMF	<b>10.07 ±8.907</b>	<b>2.11 - 42.05</b>	Max 40 mg/Kg normes européenne Max 80 mg/Kg miel des climats chauds
pH	<b>4.16 ±0.671</b>	<b>3.12 - 6.23</b>	Pas de limites
Acidité libre	<b>17.79 ±9.113</b>	<b>3.80 - 38.00</b>	Max 50 meq/kg
CE	<b>0.49 ±0.182</b>	<b>0.21 - 0.98</b>	Pas de valeur limite ≤0.8 miel de nectar ou mélange >0.8 miel de miellat
Teneur en Cendres	<b>0.20 ±0.135</b>	<b>0.02 - 0.642</b>	Pas de valeur limite <0.6 miel de nectar ≥0.6 miel de miellat

#### 1.1. Teneur en eau

La teneur en eau des échantillons analysés varie entre 14.20 et 20.80 avec une moyenne de 16.51 (tab 6). Tous les échantillons sont conformes à la valeur seuil ( $\leq 20\%$ ) fixée par le codex alimentarius (2001) et la Législation Européenne (EC Directive 2001/110 du JOCE, 2002). Un seul échantillon (ech 3) dépasse légèrement ce seuil avec une valeur de 20.80. Cette teneur reste encore conforme à l'ancienne norme de 21% du codex alimentarius de 1993 et de la directive européenne de 1974 et cette valeur a été récemment recommandée par les experts (Bogdanov et al., 2004a).

L'étude réalisée par Mehdi et al. (2016), sur 4 échantillons de certaines communes de la région de Tiaret a donné des valeurs allant de 15.9 à 17.2.

La teneur en eau des échantillons de miel de la wilaya d'El-Tarf varie de 17,15 à 18,58% (Nedji, 2015). Ouchmoukh et al. (2007), en analysant des échantillons de miel de Béjaïa ont enregistré des valeurs allant de 14.6 à 19%. Chouia (2014), a trouvé des teneurs en eau des miels de la région de Ain zaâtout (Beni Ferah) aux Aures (entre Biskra et Batna) variant entre 15.8 et 16.2.

Makhloufi et al. (2010) et Makhloufi (2011), en analysant 66 échantillons de miels de différentes régions d'Algérie ont obtenu un minimum de 13.92 et un maximum de 20.2. Quant à Amrouche et Kessi (2003) ont obtenu des valeurs comprises entre 15 et 22,6 pour des échantillons de miels algériens. Nos résultats sont similaires à ces trois travaux.

Les valeurs obtenues par Yaiche et Khali (2014), dans les miels algériens, sont comprises entre 13 et 15%. Haderbache *et al.* (2013), ont trouvé 13.4 à 15.5 dans le miel du jujubier, 12.8 à 16.8 dans le multifloral contenant du jujubier et 13.7 à 15.2 dans le miel l'euphorbe (*Euphorbia bupleuroides*).

Bettar *et al.* (2015), ont enregistré un intervalle de 15.80 à 21.70 dans les miels d'euphorbe au Maroc. Toujours pour les miels du Maroc, Onze parmi douze échantillons avaient des teneurs en humidité comprises entre 16,0 et 18,5% (Terrab *et al.*, 2003). Les échantillons de miel de châtaignier corses ont une teneur moyenne en eau allant de 15,3-18,6 % (Yang *et al.*, 2012a).

L'étude menée par Pridal et Vorlova (2002) sur 55 échantillons de miels tchèques a révélé des teneurs comprises entre 13.8-19.5. Conti *et al.* (2014), ont obtenu des teneurs allant de 16.0 à 17.5 pour les miels unifloraux et 15.0 à 19.0 pour les Multifloraux argentins.

Les teneurs en eau des miels Camerounais analysés par Mbogning *et al.*, (2011) sont très élevées allant de 16 à 35%.

La teneur en eau est un paramètre lié au degré de maturité, il est responsable de la stabilité du miel lors de l'entreposage. Elle dépend de la saison des récoltes et du degré de maturité atteint dans la ruche. Ce paramètre est très important pour la durée de conservation du miel pendant le stockage.

17.24 % (5/29) de nos échantillons ont des teneurs en eau supérieures ou égales à 18% (fig 7) dont un échantillon (éch 3) marque une teneur supérieure à 20%. Ceci pourrait les exposer aux risques d'altération en fonction de leurs teneurs en levures (cette relation va être discutée dans la partie mycologie). L'échantillon 3 est sujet au risque de fermentation quel que soit le nombre de levures. La majeure partie (plus de 82%) des échantillons a une teneur en eau inférieure à 18%.

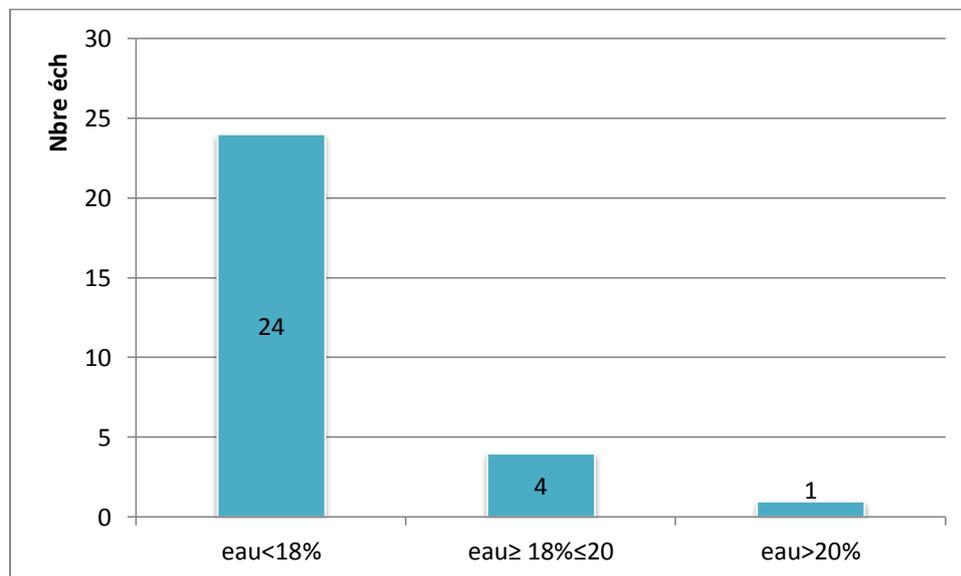
Les résultats de nos échantillons sont révélateurs des meilleures conditions de récolte et de bon stockage des miels. La teneur en eau du miel dépend des conditions environnementales et de la période de récolte. Ce paramètre peut varier d'une année à une autre.

L'humidité du miel influence directement les propriétés physiques telles que la viscosité et la cristallisation (Bogdanov *et al.*, 2004a) mais aussi la dégradation du produit car une forte humidité accélère les processus de fermentation. Dans la ruche, le miel est operculé par les

abeilles lorsque la teneur en eau atteint environ 18%, valeur considérée par Gonnet (1986) comme une limite supérieure pour la bonne conservation des produits.

Généralement, les miels de miellat ont une teneur en eau plus faible que les miels de nectar (Persano Oddo *et al.*, 1995 ; Persano Oddo *et al.*, 2004).

Les fortes teneurs en eau proviendraient d'une récolte trop précoce ou sont seulement dues à l'hygroscopicité du miel.



**Figure 7** : Répartition du nombre des échantillons en fonction de la teneur en eau

## 1.2. Hydroxyméthyl furfural (HMF)

La détermination de la quantité d'HMF est un excellent indicateur pour apprécier la qualité et la fraîcheur d'un miel (Mendes *et al.*, 1998; Terrab *et al.*, 2002). C'est un critère important pour évaluer le temps de stockage et les dommages causés par la chaleur et le vieillissement du miel (Gonnet, 1963 ; Ruoff et Bogdanov, 2004).

L'HMF de nos échantillons varie entre 2.11 et 42.05 avec une moyenne de 10.07 (tab 6). Tous les échantillons sont conformes à la valeur seuil ( $\leq 40\%$ ) fixée par le codex alimentarius (2001) et le Journal officiel des Communautés européennes (2002) à l'exception d'un seul échantillon (ech 23) qui dépasse légèrement cette norme avec une valeur de 42.05 mg/kg. Mais si on prend en considération la norme réservée aux miels produits sous climats chauds et qui doit être  $\leq 80$  mg /kg, tous les échantillons répondent à cette norme de qualité. White (1994) et certains autres auteurs ont proposé l'augmentation de la limite européenne jusqu'à 80 mg / kg. Les États-Unis d'Amérique recommandent de conserver un niveau de 80 mg/kg de HMF dans le miel (Commission du codex alimentarius, 1999).

En analysant 4 échantillons de miel de la région de Tiaret, Mehdi et *al.* (2016) ont trouvé des valeurs allant de 5.760 à 36.483. Ces résultats se rapprochent des nôtres.

Makhloufi et *al.*(2007) ont obtenu des valeurs comprises entre 0.5 et 124.0 mg/kg dans les miels du nord d'Algérie. Amir et *al.* (2010) ont obtenu des valeurs très basses se situant entre 0.003 et 1.29 mg/kg dans 20 échantillons de miels récoltés principalement dans la wilaya de Tizi-ouzou et quelques autres wilayas d'Algérie.

L'analyse de la teneur en HMF montre des valeurs comprises entre 1,64 et 6,34mg/kg (Yaiche et Khali, 2014). Les valeurs obtenues par Yahia et Yahaia (2015) des différents types de miel de la wilaya de Ain-defla oscillent entre 4.04 et 31.58 mg/kg. Les valeurs obtenues pour l'hydroxyméthylfurfural (HMF) de 28 échantillons de miels provenant des principales régions mellifères de la plaine de la Mitidja se situent entre 0.80 mg/kg et 38.70 mg/kg (Benaziza-Bouchema et Schweitzer, 2010).

Les analyses faites par Amri et Ladjama (2013) sur 20 échantillons du nord-est algérien ont montré des teneurs d' HMF comprises entre 1.11 et 11.26 mg /kg de miel. Les mêmes auteurs, Amri et Ladjama (2015) ont obtenu, à partir de 40 échantillons du Centre et l' Est d'Algérie , des teneurs variant entre 0.86 et 38.84.

Haderbache et *al.* (2013) ont noté des valeurs basses allant de 0.0 à 6.0 pour le miel de jujubier et 0.0 à 18.7 pour les multif floraux contenant du jujubier et 1.98 à 5.3 dans le cas des miels d'Euphorbe provenant des régions de Laghouat, Djelfa, Elbeyadh et Médéa.

Chefrour et *al.* (2009) en étudiant des échantillons de miel du nord-est d'Algérie, ont obtenu une valeur minimale de 1.728 et une maximale égale à 14.590 et un échantillon avec une valeur de 480 mg/kg.

Au Maroc, Bettar et *al.* (2015) ont obtenu des valeurs d' HMF comprises entre 0.75 et 85.48 mg / kg dans les échantillons de miel d'Euphorbia. Alors que Terrab et *al.* (2003) ont noté des valeurs variant entre 5.05 et 43.30 dans les miels d'agrumes marocains.

Dans 5 échantillons de miels portugais, Gomes et *al.* (2010) ont relevé des teneurs en HMF de 18.0 à 94.0 (mg/kg) dont 3 échantillons parmi les cinq ont des teneurs élevées.

Les niveaux d'HMF du miel du cotonou (Bénin) varient de 17.06 à 41.96 mg/ kg (Djossou et *al.*, 2013).

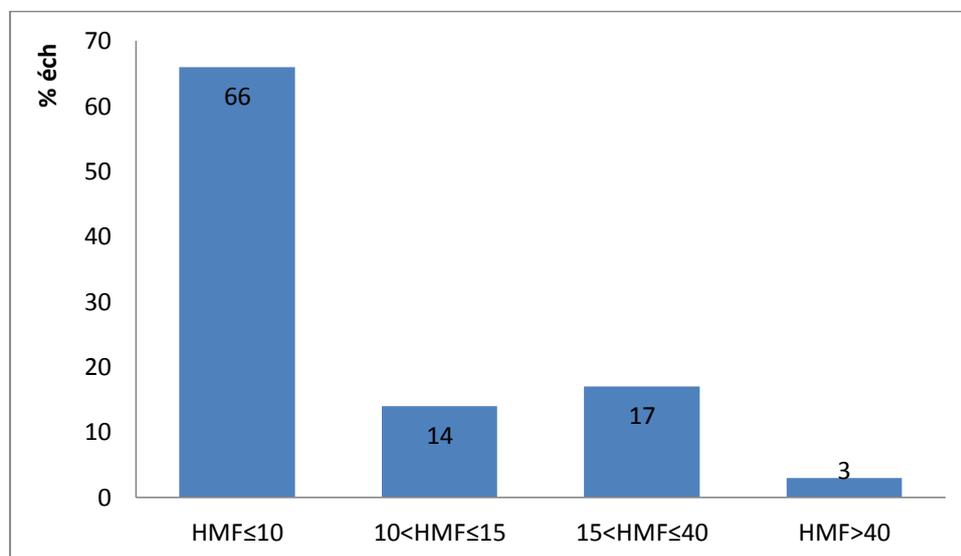
A travers toutes ces références, nous pouvons dire que nos échantillons sont similaires à la plupart de ces résultats et conformes à toutes les normes internationales. Ceci montre également que L'HMF des miels de qualité est toujours est inférieure à 80 mg/kg et voire 40 mg/kg

Environ 66.5% (19 éch) des échantillons étudiés (fig 8) ont des valeurs très faibles (<10 mg / kg); indiquant que ces miels ont été fraîchement récoltés (Bogdanov et *al.*, 2004b) ou n'ont pas été chauffés et ont été bien conservés (Ramírez Cervantes et *al.*, 2000 ; IHC, 2009). Selon Bogdanov et *al.* (2004a), le miel frais provenant de climats tempérés ne contient pratiquement pas d'hydroxy-méthylfurfural (HMF) ou seulement des traces, sa teneur augmente pendant le stockage, en fonction du pH du miel et de la température de stockage.

Les miels vendus directement par les apiculteurs ne dépassent que rarement les 10 mg/kg (Schweitzer, 1999).

Si l'on se réfère au J.O.C.E (2002), 13.8% (4 éch) des échantillons (fig 8) enregistrent des valeurs supérieures à 10 mg/kg mais inférieures à 15 mg/kg et peuvent être considérés de très bonne qualité. Au total, et tenant compte de l'HMF comme un des critères clés de la qualité du miel, environ 80% des échantillons analysés sont de très bonne valeur marchande. Ces valeurs confirment la fraîcheur des échantillons étudiés au regard de ce paramètre.

Selon Makhloufi et *al.* (2010), Le climat chaud de l'Algérie pourrait être la cause de l'augmentation des teneurs de l'HMF.



**Figure 8:** Répartition du nombre d'échantillons en fonction des normes de fraîcheur.

### 1.3. pH et Acidité libre

Les valeurs de pH sont d'une grande importance lors de l'extraction et du stockage du miel, en raison de l'influence de ce paramètre sur la texture et la stabilité du miel (Terrab et *al.*, 2002).

Le pH des différents échantillons de la région de Tiaret varient entre 3.12 et 6.23 avec une moyenne de 4.16 et l'acidité libre varie entre 3.80 et 38.00 avec une moyenne de 17.79 meq/kg (tab 6). Les valeurs de l'acidité sont inférieures à la valeur seuil fixée par le codex-stan (2001) et le conseil de l'union européenne (JOCE, 2002) et qui est de l'ordre de 50 meq/kg.

Mehdi et *al.* (2016) ont noté des valeurs de pH variant entre 3.83 et 4.34 et une acidité libre de 21 à 32 pour des échantillons de miels de la région de Tiaret. L'intervalle de nos résultats est plus vaste pour les deux paramètres. Ceci est peut-être dû au nombre réduit d'échantillons (4 éch) de l'étude de Mehdi et ses collaborateurs.

Le pH des miels du nord d'Algérie (pH 3.40–6.23) analysés par Makhloufi et *al.* (2010) sont similaires à nos résultats. Les valeurs minimales de l'acidité libre sont similaires aux résultats de ces auteurs (3.0-22.5 meq/kg) alors que nos valeurs maximales sont un plus élevées. Il faut souligner que les travaux de Makhloufi et *al.* (2007), Makhloufi et *al.* (2010) et Makhloufi (2011) comprennent des échantillons de de la région de Tiaret.

Une acidité très élevée peut indiquer une fermentation des sucres en acides organiques (Gomes et *al.*, 2010).

13.8 % des échantillons (4/29) ont des teneurs en acidité libre dépassant la valeur de 30 meq/kg. Ce qui est peut-être dû à leurs richesses en acides organiques ou à leur activité enzymatique. Cette acidité peut les exposer à des altérations telles que la dégradation des hexoses conduisant à l'augmentation de l'HMF sous certaines conditions.

Selon Louveaux (1968a), Certains acides proviennent à partir des sécrétions digestives des abeilles lors de l'élaboration du miel et peuvent les rendre sensibles à une altération par fermentation. Ceci peut être éclairci dans l'étude microbiologique de la partie suivante.

Les résultats du pH (tab 6) montrent que 25.6% des échantillons (8/29) ont des pH  $\geq 4.5$  et  $\leq 6.23$  et sont probablement des miels de miellat et 74% (21/29) ont des pH compris entre 4.3 et 3.12 pouvant être considérés comme miels de nectar. Les miels de miellat ont, en raison

de leur teneur plus élevée en sel à effet tampon, des valeurs de pH en moyenne plus élevées (4,2 à 5,5) que les miels de fleur (Bogdanov *et al.*, 2004a).

En effet, tous les miels sont acides, Ils contiennent des acides organiques libres ou combinés sous forme de lactones (Gonnet, 1982). L'acidité est aussi un critère de qualité important, car elle donne des indications fort-importantes de l'état du miel (Bogdanov *et al.*, 1999). Une acidité forte du miel est susceptible de provoquer la dégradation des hexoses en HMF.

L'étude de caractérisation des miels monofloraux marocains effectuée par Terrab *et al.* (2002), a révélé des valeurs de pH comprises entre 2.25 et 4.71 et des teneurs en acidité libre allant de 10.31 à 102 meq/kg. Au-delà de 50 meq/kg le miel ne répond pas aux normes et reflète une altération pouvant être due à la fermentation.

L'analyse des miels portugais a révélé des pH de 3.7 à 4.3, et une acidité libre comprise entre 16 et 32 (Gomes *et al.*, 2010).

Serrano *et al.*, (2004), en caractérisant les miels monofloraux d'eucalyptus et de citrus d'Andalousie (Espagne) ont obtenu pour l'Eucalyptus des pH= 3.72 - 4.64 et une acidité libre entre 19.20 et 41.51 ; alors que pour le Citrus le pH varie de 3.80 à 4.52 et l'acidité libre se situant entre 9.20 et 29.20 meq/kg.

46 échantillons de miel artisanal prélevés dans la province de Madrid, ont donné des pH de 3.63 à 5.01, et une acidité libre de 13.1 à 51.2 (meq/ kg) (Soria *et al.*,2004)

Les miels malgaches étudiés par Rabeharifara (2011) ont un pH compris entre 4,53 et 4,75 et une acidité libre entre 10 et 67 meq/kg.

Eu égard à tous ces travaux, les échantillons de miel de la région de Tiaret semblent être produits dans de bonnes conditions.

#### **1.4. Conductivité électrique (CE)**

La conductivité des échantillons de la région de Tiaret enregistrent des valeurs se situant entre 0.21 et 0.98 avec une moyenne de 0.49 mS/cm (tab 6). Ces résultats sont comparables à ceux des miels d'Algérie obtenus par Makhloufi *et al.* (2007 et 2010) et qui varient respectivement de 0.21 à 1.24 et de 0.11 à 0.93mS/cm.

L'intervalle de nos résultats est beaucoup plus vaste par rapport à celui de Mehdi et *al.* (2016) qui ont obtenu des conductivités allant de 0.38 à 0.48 à partir de 4 échantillons de certaines zones de la région de Tiaret. Les résultats de l'analyse de 11 échantillons de Béjaia obtenus par Ouchemoukh et *al.* (2007) varient entre 0,70 et 1,61 mS/cm. Certains échantillons d'Ouchemoukh proviennent de régions forestières de Béjaia ce qui se traduit par des valeurs élevées.

Pour Gomes et *al.* (2010), aucun des échantillons de miel analysés n'a montré de conductivité électrique supérieure à 0,8 mS / cm (variation entre 0,19 et 0,53 mS / cm), ce qui montre que tous les échantillons proviennent du miel de nectar ce qui est corroboré par la teneur en cendres totales inférieure à 0,6% (JOCE, 2002).

Pour 46 échantillons de miel artisanal prélevés dans la province de Madrid, la conductivité va de 0.119 à 1.515 (Soria et *al.*, 2004). Pour les miels de châtaigniers corses, les valeurs de la CE varient entre 0.69 et 1.90 mS/cm (Yang et al, 2012a), 0.38 à 1.10 pour les Miels de « maquis de printemps » corses (Yang et *al.*, 2012b) et 0.73 à 2.12 mS/cm pour les Miels de miellat corses (Yang, 2014)

La Conductivité électrique de l'Eucalyptus varie entre 0.36 et 0.68 et entre 0.11 et 0.37 mS/cm pour le Citrus de la province d'Andalousie (Serrano et *al.*, 2004).

Les miels malgaches présentent une conductivité électrique très élevée allant de 1,10 à 2,02 mS/cm avec une moyenne de 1,59 mS/cm (Rabeharifara, 2011)

Par ailleurs, la conductivité électrique du miel apporte une indication dans la définition d'une appellation qui sont les miels issus de nectar ayant une Conductivité allant de 0,1 à 0,5 mS/cm, et ceux issus de miellats ayant une conductivité allant de 1 à 1,5 ms/cm (Gonnet, 1986). Comparés aux normes, 6.7 % (2/29) [ech 9 et 11] des échantillons de miels considérés présentent des conductivités supérieures à 0,8 mS/cm ; ceci est probablement dû à la présence de teneur élevée en ions dissouts dans ces miels et sont probablement des miels de miellat selon le codex-stan (2001) et UE (JOCE, 2002). Alors que 92.3% des échantillons (fig 9) ont des valeurs de CE < 0.8 mS/cm et sont des miels floraux ou néanmoins de mélange pour ceux dont la valeur se rapproche de 0.8 mS/cm.

### 1.5. Cendres

La teneur en cendre des échantillons étudiés varie entre 0.02 et 0.64 g/100g avec moyenne de 0.20 (tab 6).

Nos résultats sont en parfaite concordance avec ceux trouvés par Belaid (1999) cité par Makhloufi (2011) et qui sont de l'ordre de 0,02-0,65% avec une moyenne de 0,21%. Les résultats de Makhloufi (2011) [0,01 à 0,40] concordent avec les nôtres pour les valeurs minimales par contre les valeurs maximales de nos échantillons sont beaucoup plus élevées.

Les résultats obtenus par Mehdi et *al.* (2016), à partir des échantillons de Tiaret (0.04 à 0.46%), sont dans un intervalle plus réduit que celui de nos résultats. Ceci est probablement dû au nombre restreint d'échantillons (4 ech) de l'étude de Mehdi et collaborateurs.

La teneur en cendre du miel naturel de la région d'Ain Zaâtout présente une moyenne de 0,217 (Chouia, 2014)

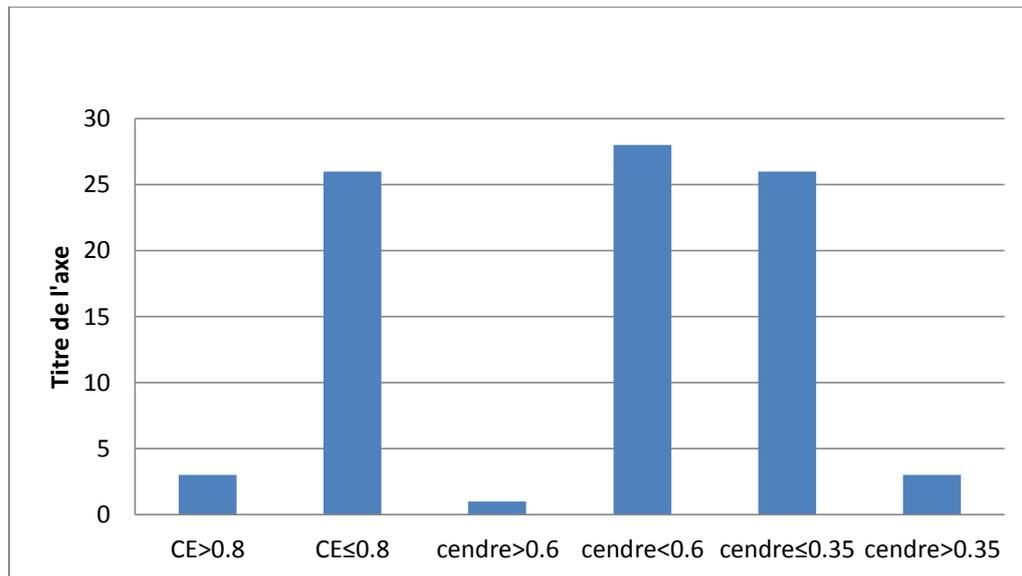
Soria et *al.*, (2004), en analysant 46 échantillons de miel artisanal prélevés dans la province de Madrid, ont obtenu des valeurs minimales très faibles allant de 0.003 et un maximum de 0.99%. Les résultats des miels portugais obtenus par Gomes et *al.* (2010) varient de 0.07 à 0.35%.

L'intervalle des miels d'eucalyptus malgache étudiés par Rabeharifara (2011) varient de 0.46 à 1.02 g/100g.

Les miels de fleurs contiennent 0.1 à 0.35 g de sels minéraux et d'oligo-éléments/100 g de miel (exception faite pour le miel de châtaignier avec plus de 1 g/100 g), les miels de miellat quant à eux jusqu'à 1 g/100 g et plus (Bogdanov et *al.*, 2004a). La faible teneur en cendres des miels est caractéristique des miels floraux (Finola et *al.*, 2007).

En se basant sur ces dernières références, 3 de nos échantillons (éch 9, 11 et 28) enregistrent des valeurs supérieures à 0.35, respectivement 0.642, 0.492 et 0.381%. Ces échantillons enregistrent également des conductivités élevées 0.980, 0.818 et 0.797 mS/cm respectivement (fig 9). Ces trois échantillons peuvent être considérés des miels de miellat.

Selon la norme du Codex alimentarius CX/S 00/3 Novembre (1999) et le C.R.C (2015), la teneur en cendre des miels de nectar est au maximum de 0,6 g/100 g et le Miel de miellat ou mélange de miel de miellat et de miel de nectar ou miel de châtaignier, au maximum 1,2 g/100 g (codex alimentarius) et 1g/100g (CRC).



**Figure 9** : Répartition de la CE et les cendres en fonction des normes

## 2. Traitement statistique

Les résultats de l'analyse du coefficient de corrélation et de sa probabilité sont présentés dans le tableau 7 sous forme de matrice de corrélation.

Tableau 7 : Matrice de corrélation des paramètres physicochimiques avec les probabilités associées (en Gras les probabilités significatives au seuil de 5%).

	teneur_eau		HMF		pH		Acidité_ libre		CE		Cendres	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
teneur_eau	1											
HMF	0.33	0.0785	1									
pH	-0.52	<b>0.004</b>	-0.24	0.2065	1							
Acidité_ libre	0.46	<b>0.0112</b>	0.58	<b>0.0009</b>	-0.62	<b>0.0004</b>	1					
CE	-0.49	<b>0.007</b>	-0.44	<b>0.0171</b>	0.68	<b>0</b>	-0.73	<b>0</b>	1			
Cendres	-0.43	<b>0.0199</b>	-0.39	<b>0.0364</b>	0.71	<b>0</b>	-0.7	<b>0</b>	0.96	<b>0</b>	1	

Les résultats de l'analyse statistique (tab. 7), montrent une forte corrélation entre la conductivité électrique et la teneur en cendre ( $r=0.96$ ,  $p<0.000$ ). Ceci permet de dire qu'il existe une relation linéaire entre le contenu en cendres et la conductivité électrique. Ce résultat confirme les travaux d'Accorti et al, (1987). Ce résultat renforce l'idée de remplacer la mesure de la teneur en cendre par la mesure de la CE proposée par plusieurs auteurs dont

Bogdanov et *al.*, (2004a) pour la caractérisation des miels monofloraux et Naman et *al.*,(2005).

La teneur en eau est corrélée significativement à l'acidité libre ( $r=0.46$ ,  $p<0.0112$ ) et au pH ( $r= -0.52$ ,  $p<0.004$ ), ce qui s'explique par le fait que tant que la teneur en eau augmente, la production d'acide augmente aussi tandis que le pH diminue.

La teneur en eau est également corrélée négativement à la conductivité électrique ( $r= -0.49$ ,  $p<0.007$ ) et à la teneur en cendres ( $r= -0.43$ ,  $p<0.0199$ ). Ceci peut s'expliquer par le fait que plus la teneur en eau diminue et plus la teneur en matière minérale se concentre et augmente entraînant une augmentation de la conductivité. La conductivité électrique et la teneur en cendre sont fortement corrélées ( $r=0.96$ ,  $p=0.000$ ).

La teneur en eau est faiblement corrélée à la quantité d'HMF avec un coefficient de corrélation linéaire de 0.33 et une signification alpha égale à 0.0785.

La teneur en HMF est fortement corrélée à l'acidité libre ( $r =0.58$ ,  $p<0.0009$ ). L'HMF se forme plus ou moins rapidement à partir du sucre sous l'influence des acides et en fonction de la valeur du pH et de la température du miel (Bogdanov et *al.*, 2004a).

L'HMF est corrélé négativement avec la CE ( $r= -0.44$ ,  $p<0.0171$ ) et avec la teneur en cendre ( $r = -0.44$ ,  $p<0.0171$ ). Etant donné que lorsque la teneur en HMF augmente, la teneur en eau, augmente également et par conséquent, la matière minérale devient moins concentrée conduisant à la diminution de la CE.

Cette étude montre qu'il existe une forte corrélation entre le pH et les deux paramètres CE et cendres (respectivement,  $r=0.68$ ,  $p<0.000$  et  $r=0.71$ ,  $p<0.000$ ). Les miels de miellat ont, en raison de leur teneur plus élevée en sel à effet tampon, des valeurs de pH en moyenne plus élevées avec des valeurs comprises entre 4, 2 et 5, 5 (Bogdanov et *al.*, 2004a). Quant à l'acidité libre, elle est fortement corrélée à la CE ( $r= -0.73$ ,  $p<0.000$ ) et les cendres ( $r=-0.7$ ,  $p<0.000$ ). Ceci s'explique par le fait que les miels de nectar ont des pH bas, acidité élevée, et  $CE<0.8$  mS/cm, alors que les miels de miellat ont des pH élevés, donc acidité faible et  $CE>0.8$  mS/cm. La conductivité et les cendres évoluent dans le même sens.

Selon Bogdanov et Gfeller (2006), la classification des miels de fleurs et de miels de miellat peut se faire en utilisant des paramètres facilement mesurables : le fructose, le glucose, la conductivité et le pH. Ceci est particulièrement adapté à l'analyse courante du miel.

### 3. Résultats des analyses Microbiologiques

Les résultats des analyses microbiologiques des échantillons de miel analysés sont empilés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Résultats des analyses microbiologiques (CT=Coliforles totaux ; CF=Coliformes fécaux ; SR=sulfitoréducteurs ; B.c=Bacillus cereus ; C. bot=Clostridium botulinum ; Moisis=Moisissures)

Ech	FMAT							Levures				Moisissures	
	GN	PCA	CT	CF	SR	<i>B. c</i>	<i>C. bot</i>	levures1 YM40G	Levures2 OGA	levures3 MEA	levures plaques	Moisis YM40G	Moisis OGA
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9												3	0
10													
11													
12													
13													
14													
15													
16													
17													
18													
19													
20													
21													
22													
23													5
24													2
25													32
26													17
27													0
28													2
29													1
<b>Moy</b>													
<b>Min</b>													
<b>Max</b>													
<b>ET</b>	<b>180.19</b>	<b>838.44</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>3.714</b>	<b>0.000</b>	<b>496.66</b>	<b>90.438</b>	<b>0.677</b>	<b>594.304</b>	<b>74.968</b>	<b>20.334</b>

### 3.1-Résultats Bactériologiques

#### 3.1.1-FMAT (à 30 °C)

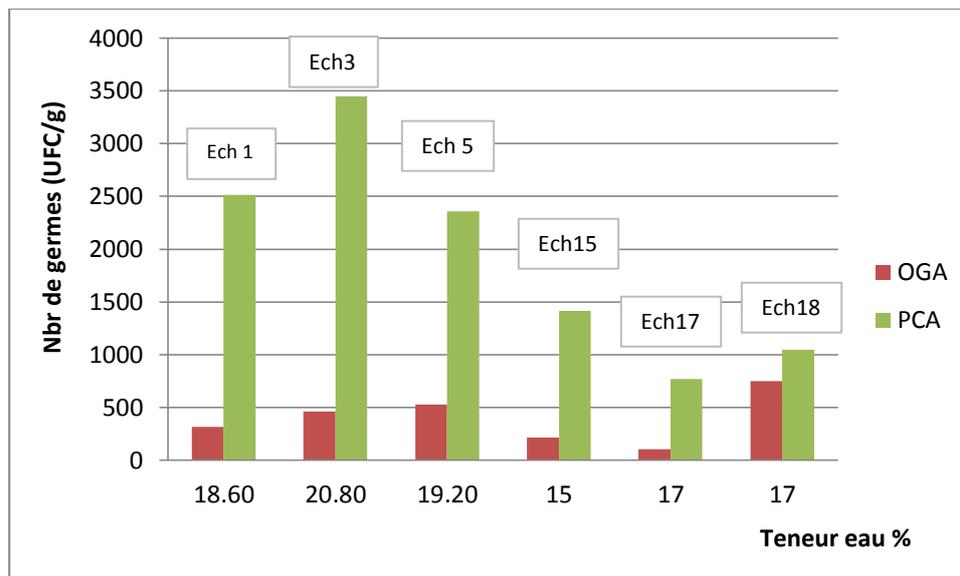
La recherche de la flore mésophile aérobie totale a été effectuée sur deux milieux de culture, PCA et Gélose nutritive (GN). Les résultats du milieu PCA varient entre 10 et  $3.45 \times 10^3$  ufc/g avec une moyenne de  $0.566 \times 10^3$ . Sur milieu GN, l'intervalle est de 0.00 à  $0.75 \times 10^3$  avec une moyenne de  $0.11 \times 10^3$  (tab 8).

Le milieu PCA semble plus propice au développement de la flore mésophile du miel. Ward et Trueman (2001) préconisent l'utilisation de ce milieu pour la recherche de la flore mésophile du miel. En effet Richard (1998) estime que la gélose nutritive ordinaire est un milieu peu riche et exempt de sucres fermentescibles. Une gélose plus nutritive donne des nombres de germes nettement plus élevés (Gram, 1990 cité par Bornesent, 1999).

La détection de la flore aérobie mésophile reflète la qualité microbiologique générale des produits naturels et permet de les contrôler (Guiraud et Rosec, 2004). L'absence de normes pour l'analyse microbiologique des miels rend l'interprétation difficile (Ward et Trueman, 2001).

Le nombre total des mésophiles varie de 10 à  $3.45 \times 10^3$  ufc / g (tab 8). La plupart des miels étudiés ont un nombre inférieur à 500 ufc / g; Valeur limite de qualité recommandée par Fleché et *al.*(1997). Le miel n'est pas sujet au développement de germes par rapport à d'autres aliments, en raison de sa teneur élevée en sucre, de sa faible activité hydrique, de son faible pH et de ses substances antimicrobiennes (Snowdon et Cliver, 1996).

Bien que les échantillons 15, 17 et 18 aient un nombre élevé respectivement de  $1,416 \times 10^3$ ,  $0,77 \times 10^3$  et  $1,05 \times 10^3$  ufc / g par rapport à la valeur limite, ils sont moins exposés aux altérations bactériennes dues à leur teneur en humidité inférieure à 18% (tab 7, fig 10). Les échantillons 1, 3, 5 marquent un nombre beaucoup plus élevé respectivement  $2,513 \times 10^3$ ,  $3,450 \times 10^3$ ,  $2,358 \times 10^3$  ufc / g et sont beaucoup plus exposés aux altérations en particulier la fermentation à cause de leur teneur en eau supérieure à 18% (tab 7, fig 10). Sur milieu OGA, ce sont les échantillons 5 et 18 qui dépassent la limite de qualité avec un nombre  $0,527 \times 10^3$  et  $0,750 \times 10^3$  ufc/g respectivement. L'origine de la contamination par la flore aérobie mésophile de ces miels résulte d'une éventuelle contamination lors du traitement, de la manipulation et du stockage ou de la flore normale du tractus gastro-intestinal des abeilles (Kačaniová et *al.*, 2004).



**Figure 10 :** Nombre de germes sur PCA et GN er relation avec la teneur en eau

79% des échantillons contiennent moins de 500 ufc /g sur PCA. Résultat similaire à celui de Fléché et *al.* (1997) qui ont enregistré 83.7 % contenant moins de 500 ufc/g.

L'étude de caractérisation de 5 miels marocains menée par Naman et *al.* (2005) a révélé un nombre de la flore mésophile compris entre 00 et 200 ufc/g. Pour Iurlina et Fritz (2005) le nombre de mésophile varie entre 30 et 1200 ufc/g à l'exception d'un sel échantillon avec  $3 \times 10^4$  ufc. Kunová et *al.* (2015) ont obtenu un nombre compris entre 75 et 1380 ufc/g.

Pour Omafuvbe et Akanbi (2009), Le nombre total de bactéries mésophiles aérobies varie de  $1,0 \times 10^3$  à  $5,0 \times 10^3$  cfug/g. Róžańska (2011) a trouvé un nombre beaucoup plus élevé ( $1.0 \times 10^1$  à  $7.5 \times 10^4$  ufc/g) dans les miels polonais.

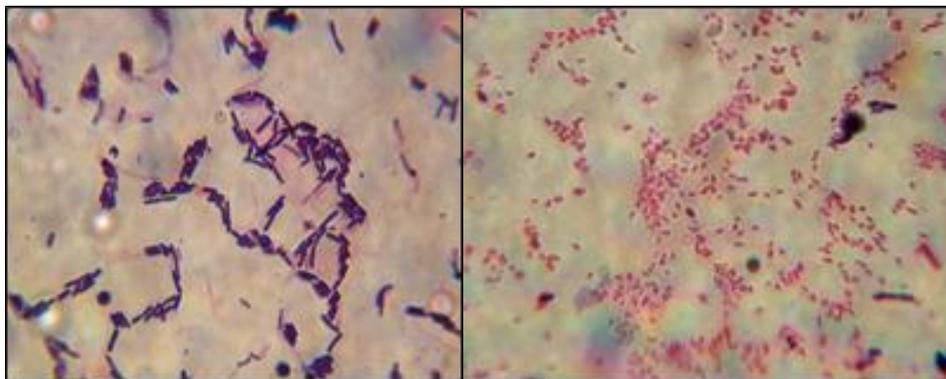
La variation du nombre de bactéries, entre les différents travaux, peut être due au type d'échantillon, à la fraîcheur du miel, au temps de récolte et aux techniques analytiques utilisées (Snowdon et Cliver, 1996).

Le nombre de la flore mésophile aérobie provenant des échantillons de miel peut varier de zéro à plusieurs dizaines de milliers par gramme sans raison apparente (Snowdon et Cliver, 1996 ; Kačaniová et *al.*, 2004 ; Iurlina et Fritz, 2005). Néanmoins, on trouve dans le miel beaucoup moins de bactéries que dans d'autres produits crus de provenance animale (Tysset et Rousseau, 1981). L'évolution des germes aérobies mésophiles à 30°C traduit l'hygiène générale appliquée. Selon Ward et Trueman (2001), certains chercheurs estiment que 1000ufc/g de miel peut être considéré comme une marque de la bonne pratique hygiénique.

Les bactéries ne peuvent pas se multiplier dans le miel. Leur nombre élevé pourrait indiquer une contamination pendant le traitement, la manipulation et le stockage. Cela devrait être contrôlé par les bonnes pratiques de production (Rózańska, 2011). Guiraud (1998), a signalé qu'un nombre élevé de germes totaux peut être compatible avec un produit sain. Ainsi Bourgeois et Leveau (1980), confirment la même hypothèse du fait qu'ils n'ont pas trouvé une corrélation étroite entre l'importance de la flore totale et la présence de microorganismes pathogènes dans le produit analysé.

Les observations microscopiques de la coloration simple et de la coloration de Gram ont montré que certains échantillons contiennent des Bacilles Gram positifs et quelques rares cas des coques, des levures (ech 1, 3, 5, 9,13,14, 15 21).

Les analyses de nos échantillons réalisées par le laboratoire d'analyses médicales Bernard Rody (France) par examen direct (sur lame) signalent la présence de rares bacilles gram+ dans les échantillons 9, 13 et 14 (fiches d'analyse en annexe).



Ech 5 Bacille G+.

Ech 3 Coque G<sup>-</sup>

**Figure 11 :** Quelques frottis de la coloration de Gram

### 3.1.2-Coliformes et Coliformes fécaux(ou Thermotolérants)

Pour les échantillons de miel analysés, il y'a une absence totale de coliformes et de coliformes fécaux (tab 8). Nos 12 échantillons analysés par le laboratoire d'analyses médicales de Bernard Dory (France) sont exemptes de coliformes fécaux (représentés par *Escherichia coli*). Ces résultats concordent avec ceux trouvés par Rall et al. (2003); Iurlina et Fritz (2005); Naman et al.(2005) , Sodré et al. (2007), Gomes et al. (2010) et Kunová et al. (2015), cela s'explique par le fait que le miel est un environnement hostile au développement de cette flore et indique que nos miels sont de bonne qualité hygiénique. Dans une étude

similaire, Omafuybe et Akanbi (2009) ont détecté la présence d'un nombre très réduit (30 ufc/g) de coliformes totaux dans un seul échantillon. Au contraire, Kitambala (1999) a noté la présence de coliformes fécaux (en particulier *E. coli*) dans les miels vendus au marché de Bukavu (Congo). L'auteur a mis le point sur l'origine de cette contamination et qui, entre autre, provient de la pratique des apiculteurs de cette région qui enduisent leurs mains et visages de la bouse pour inhiber les abeilles et que l'extraction se fait manuellement.

Pour Adjlane et al. (2017), les résultats obtenus de l'analyse du pollen ont montré des charges de coliformes totaux entre 08 et  $300.10^3$  ufc / g et absence de coliformes fécaux.

Selon Ratia (2001), Le miel constitue un milieu bactériostatique défavorable à la multiplication des coliformes.

La Méthodologie analytique officielle du Code alimentaire argentin (1989) rapporté par Coll Cárdenas et al. (2008) n'admet aucune présence de coliformes ( $n=5$ ,  $c=0$  et  $m=0$ ). Selon les mêmes auteurs, la législation argentine (valable à tous les pays du Mercosur) exige l'absence totale de microorganismes pathogènes ou de toxines de pathogènes, ainsi que l'absence d'*Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* et *Salmonella-Shigella*.

Selon Raymonds (1979), Petransxien et Lapied (1981), les coliformes appartiennent à la famille des Entérobactériaceae et indiquent le plus souvent une contamination d'origine fécale, leur mise en évidence permet d'estimer l'hygiène appliquée à l'aliment. Les Coliformes sont des bactéries vivant principalement dans les intestins. De plus, les Coliformes thermotolérants ou Coliformes fécaux survivent difficilement hors de l'intestin traduisant donc une contamination fécale récente (Joffin et Joffin, 1999).

Lorsque l' $a_w$  d'un produit est progressivement réduite, la croissance microbienne se trouve réprimée. D'après Guiraud (1998) et Ribeiro et Seravalli (2004), l' $a_w$  limite des coliformes est supérieure à 0.91 (à titre d'exemple 0.93 pour *Escherichia coli* et de 0.94 pour *Salmonella* et *Yersinia enterocolitica*) mais l' $a_w$  du miel ne dépasse pas 0.75 (De Korry, 1998) ce qui a empêché probablement la croissance des coliformes. La contamination du miel par des germes pathogènes pour l'homme ne peut provenir que d'anomalies grossières au cours des manipulations (Ratia, 2001).

### 3.1.3- Spores des anaérobies sulfitoréducteurs

On appelle anaérobies sulfitoréducteurs, les bactéries sulfitoréductrices qui poussent en anaérobiose en donnant des colonies caractéristiques dans un milieu défini (Larpen, 1997).

Selon Watte et al (1977), les Clostridiiums sulfitoréducteurs principalement *Clostridium perfringens*, sont des anaérobies sporulés, hôtes habituels du tube digestif de l'homme.

La présence de Clostridium sulfitoréducteurs dans le miel peut être considérée comme un indicateur de contamination due à une négligence des conditions d'hygiène dans les locaux d'extraction ou au cours du conditionnement et du stockage du miel (Collins et al., 1999).

Les résultats des spores des sulfito-réducteurs sont négatifs, c'est-à-dire absence totale de sulfitoréducteurs dans tous les échantillons (tab 8). Les 12 échantillons analysés par le laboratoire d'analyses médicales de Bernard Dory (France) sont également négatifs, ce qui indique que nos miels ont été produits conformément à de bonnes pratiques d'hygiène pendant l'extraction, l'emballage et le stockage (Guiraud, 2003).

Nos résultats sont similaires à ceux de Martins et al (2003) ayant signalé l'absence de spores de *Clostridium perfringens* dans 80 échantillons analysés et à ceux de Gomes al. (2010).

Finola et al. (2007), ont obtenu des résultats positifs de Clostridium sulfitoréducteurs dans environ 70% des échantillons (16 sur 23); 56% des échantillons (13 sur 23) contiennent des cellules végétatives et environ 39% des échantillons (9 sur 23) contiennent les spores. 6 échantillons ont montré un nombre de cellules végétatives supérieures à la valeur stipulée par le Mercosur de 1 à 10<sup>2</sup> ufc / g, et 4 échantillons ont montré un nombre de spores supérieur à la valeur stipulée par le Mercosur. Róžańska et al. (2011) ont obtenu un nombre relativement élevé d'échantillons de miel contaminés par des bactéries anaérobies sulfitoréducteurs. Ces microorganismes font partie de la flore normale du tractus gastro-intestinal des abeilles et peuvent contaminer le miel (Gliński et al, 1994; Kačaniová et al, 2004). Ces bactéries se trouvent fréquemment dans les intestins de l'homme et de beaucoup d'animaux domestiques et sauvages (Dromigny, 2012). Les cellules végétatives ne se développent pas aux activités de l'eau en-dessous de 0.95, aux pH inférieurs à 5 et au-dessus de 6% de sel (FAO, 2004 cité par Dromigny, 2012). Ces micro-organismes pathogènes pour l'homme et les animaux viennent du sol ou de l'eau (flore hydrotellurique) et ils sont considérés également comme indicateurs d'hygiène (Dromigny, 2012).

L'isolement de Clostridium sulfitoréducteurs peut indiquer la présence de spores de *C. botulinum* qui sont la cause principale du botulisme infantile (Monetto et al., 1999).

### 3.1.4- *Bacillus cereus*

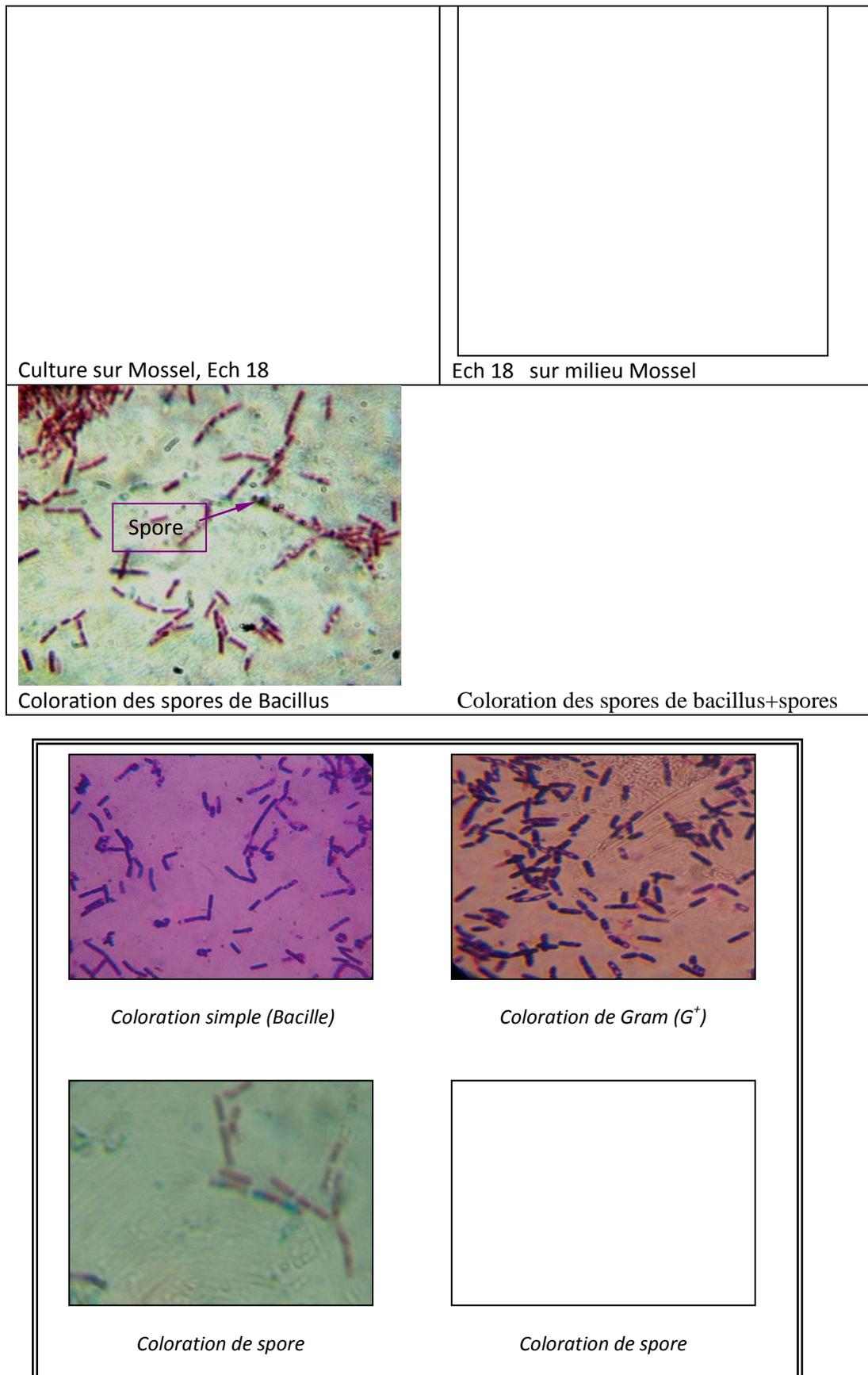
Les bactéries du genre *Bacillus* se multiplient en général en 24 h, à pH voisin de la neutralité (Pilet et *al.*, 1997). *Bacillus cereus* est un bacille à Gram positif, sporulé, aéro-anaérobie facultatif qui se développe à des températures comprises entre 10 °C et 45 °C (Leclerc et Mossel, 1989). Cette bactérie, en plus de son caractère pathogène, peut être utilisée comme indicateur d'hygiène des procédés (Domigny, 2012).

Les résultats de la recherche de *Bacillus cereus* montrent l'absence de cette bactérie dans la quasi-totalité des échantillons. Ceci a été confirmé par les résultats du laboratoire d'analyses médicales (France). Seul l'échantillon 18 contient 20 cfu / g de *Bacillus cereus* (tab 8, fig 12), résultat très faible par rapport à ceux obtenus par Martins et al. (2003), avec un minimum de moins de  $10^2$  (dans 50 % d'éch) et un maximum de  $10^4$  cfu/g et un seul échantillon à plus de  $10^5$  ufc/g. Au-delà de  $10^5$  cfu / g, un risque toxigène est possible (Jouve, 1996 ; Snowdon et Cliver, 1996 ; Martins et al, 2003). Beaucoup de réglementations admettent un nombre maximal de  $10^5$  ufc/g (Domigny, 2012). Selon Fleché (1997), les *Bacillus* dans le miel font partie de la flore mésophile induite par l'abeille (nectar ou miellat). Pour les résultats d'Omafuvbe et Akanbi (2009), la forme végétative des *Bacillus* a constitué la majeure partie de la flore mésophile.

Les spores de *Bacillus* se trouvent dans la plupart des échantillons « 60% » avec nombre compris entre 10 et 200 ufc/g (Naman et al, 2005). Le nombre d'endospores bactériennes variait de  $8,0 \times 10^2$  à  $2,0 \times 10^3$  ufc/g (Omafuvbe et Akanbi, 2009). Piana et *al.* (1991) ont noté la présence de 1.0 ufc/g de *B. cereus* dans 48% des échantillons. Ces auteurs ont trouvé des spores de bactéries aérobies dans tous les échantillons de miel à des taux variables (1-67 spores/g).

Les spores de *B. cereus* peuvent contaminer de nombreux produits, restent viables et donnent naissance aux formes végétatives de la bactérie (Berche et *al.*, 1994).

D'après Avril (1991); Nauciel et Vilde (2005), *Bacillus cereus* est une bactérie ubiquitaire qui possède une spore très résistante, responsable de toxi-infection alimentaire.



**Figure 12:** Résultats de l'observation macroscopique et microscopique de l'Ech 18

### 3.1.5- Spores de *Clostridium botulinum*

Les résultats de la recherche des spores de *Clostridium botulinum* montrent l'absence de ces spores dans tous les miels étudiés (tab 8). Même résultats obtenus par le laboratoire d'analyses médicales (France) sur 12 de nos échantillons.

Ces résultats sont cohérents avec ceux de Huhtanen et *al.*(1981) réalisés sur 80 échantillons de miel et les travaux de Piana et *al.* (1991) menés sur 50 échantillons malgré que ces auteurs ont trouvé des spores de bactéries anaérobies non identifiées dans 22 ech/50. D'autres études ont rapporté un faible nombre de spores de *Clostridium botulinum*, 2 spores pour 100 échantillons (Kautter et *al.*, 1982) et 6 spores pour 48 échantillons (kuplulu et *al.*, 2006). En effet les travaux menés par Criseo et *al.* (1994) concernant la recherche des spores de *Clostridium botulinum* dans des échantillons de miel en Allemagne, en Australie et au Japon ont révélé une absence des spores de *Clostridium botulinum* de la quasi-totalité des échantillons à l'exception d'un seul échantillon dans une région européenne. Rall et *al.* (2003), ont retrouvé des spores *Clostridium botulinum* dans 3% d'échantillons.

Dans de nombreux travaux scientifiques à travers le monde sur environ 2300 échantillons, seulement 104 (5.11%) contenaient des spores de *C. botulinum* à des niveaux détectables (Snowdon et Cliver, 1996).

Plusieurs travaux ont fait le point sur la possibilité d'intoxication de type botulisme infantile suite à la consommation du miel contenant des spores de *Clostridium botulinum* (Bourgeois et Leveau, 1980 ; Austin, 1998)

Le sol est la principale source de *Clostridium*, bien que la poussière, l'équipement, les bâtiments et l'environnement puissent également contenir ce microorganisme.

Pour réduire la possibilité de contamination du miel par les spores de *C. botulinum*, la chaîne de fabrication et la maturité du produit lors de la récolte doivent être contrôlées ( Finola et *al.*, 2007).

De nombreuses études indiquent le risque potentiel lié à la présence de *Clostridium botulinum* dans les denrées alimentaires. Cette bactérie est responsable du botulisme infantile. Les spores de *Cl. botulinum* peuvent survivre dans le miel, mais elles sont incapables de produire des toxines. Dans certains cas, le botulisme infantile peut être causé par une ingestion de miel. Raison pour laquelle, le miel ne doit pas être administré aux nourrissons de moins d'un an.

*C. botulinum* et certains autres Clostridia capables de produire des neurotoxines constituent le seul danger microbiologique pertinent lié au miel (Anses, 2012).

### **3.1.6-Streptocoques, Staphylocoques, Salmonelles et Shigelles**

Les résultats des analyses effectuées par le laboratoire d'analyses médicales de Bernard Dory (France) sur 12 de nos échantillons concernant la recherche des Streptocoques (Streptocoques fécaux ou Entérocoques en particuliers), des Salmonelles et des Shigelles ont montré l'absence de ces germes de nos échantillons. L'absence de ces germes indicateurs de la qualité hygiénique (Streptocoques fécaux) et sanitaire ou sécuritaire (Salmonelles et Shigelles, Staphylocoques) reflète la qualité des miels produits dans la région de Tiaret.

Fléché et *al.* (1997) ont obtenu un nombre de 26 échantillons (sur 393) contaminés par des entérocoques dont la plupart contiennent moins de 24 germes, et 4 échantillons avec un nombre compris entre 101 et 1000. Quant aux salmonelles, ces auteurs n'en ont noté aucune présence.

Nos résultats concordent avec ceux de Rall et *al.* (2003), Iurlina et Fritz (2005) qui ont obtenu des résultats négatifs relatifs à la recherche des Salmonelles et des shigelles. Rózańska (2011) a noté l'absence de salmonelles dans ses échantillons.

Certaines études ont montré que certains genres de *Salmonella* sont capables de résister 34 jours dans le miel lorsqu'il est conservé à 10 ° C, ce qui poserait un risque si le produit contaminé est utilisé comme ingrédient dans l'industrie alimentaire ou à la maison (Coll Cárdenas et *al.*, 2008). Des essais de laboratoire (challenge-test) ont montré des durées de survie inférieures à un mois pour *Salmonella* et *Staphylococcus aureus* notamment (Anses, 2012).

Selon le code alimentaire argentin (CAA) : Mercosur/GMC/RES. N° 56/99 (1999) cité par Coll Cárdenas et *al.* (2008), le miel ne doit contenir aucun germe de type *Salmonella* spp et de *Shigella* spp ( n=10,c=0, m=0).

Adjlane et *al.* (2017) ont noté l'absence totale de Staphylocoques et de salmonelles dans les échantillons de pollen commercialisé par les apiculteurs dans la région centre d'Algérie.

## 3.2- Résultats des Analyses Mycologiques

### 3.2.1- Levures

#### 3.2.1-1 Nombre de levures (par culture)

Les levures souvent rencontrées dans le miel, qui est un produit de forte concentration en sucre et de faible teneur en eau, sont des levures osmophiles (Gonnet, 1982). Ces levures osmophiles sont probablement de bons indicateurs de la qualité microbiologique du miel (Nasser, 2004).

Les résultats obtenus (Tab 8) diffèrent selon le milieu culture OGA et YM40G. Sur YM40G, le nombre de levures varie entre 2 et 1769 ufc/g avec une moyenne de 284.86.

Sur milieu OGA, le nombre des levures est plus faible avec un minimum de 0.00 et un maximum de 457 avec une moyenne de 48.41 ufc/g.

Sur milieu MEA, le nombre est très faible compris entre 1 et 2 ufc/g dans seulement 3 échantillons (1, 3 et 5).

Il semble que le milieu MEA n'est pas très propice au développement des levures du miel et les résultats obtenus sont négligeables par rapport aux deux autres milieux de cultures utilisés.

Le milieu YM40G est probablement plus adéquat aux levures et en particulier les levures osmophiles compte tenu de sa teneur élevée en glucose (40%). Ceci concorde avec les suggestions de Ward et Trueman (2001) pour l'utilisation de ce milieu dans la recherche des levures osmophiles. Ces levures sont exigeantes en fortes concentration en sucre pour leurs croissances.

Le milieu OGA est un milieu destiné également à la recherche des champignons (levures et moisissures) plus particulièrement les moisissures. Le nombre de levures apparues sur ce milieu n'est pas négligeable et peut refléter la présence des microorganismes très peu ou non osmophiles.

Amir et *al.* (2010) ont obtenu un nombre très faible de levures et moisissures dans deux échantillons parmi 19 analysés en utilisant le milieu OGA. Ce résultat ne reflète pas, peut-être, la réalité du fait que les auteurs ont utilisé OGA pour les levures et les moisissures, or les osmophiles exigent une certaine pression osmotique pour pouvoir se développer sur un milieu de culture.

Les levures et les moisissures sont des microorganismes habituels des miels (Snowdon et Cliver, 1996).

Des chercheurs français ayant étudié 175 échantillons de miel ont trouvé un intervalle de 0 à 2500 ufc de levures et moisissures en moyenne 90 cfu / g (Tysset et Rousseau, 1981). Piana *et al.* (1991), en analysant 50 échantillons de miel d'Italie, ont enregistré un nombre compris entre 1 et 3500 ufc/g dans 34 échantillons. Rózańska (2011) a obtenu un nombre de levures et moisissures compris entre moins de 50 jusqu'à  $3.3 \times 10^3$  ufc/g, et jusqu'à  $8 \times 10^4$  ufc/g de miel de citron.

La plupart des échantillons de miel étudiés par Kunová *et al.* (2015), contiennent des niveaux détectables de levures, bien que le nombre de levures dans de nombreux échantillons de miel soit inférieur à 100 ufc/g. Des résultats similaires ont été rapportés par Finola *et al.* (2007).

Le nombre des levures et des moisissures varie entre 15 et  $280 \times 10^3$  ufc/g de pollen produit par les apiculteurs en Algérie (Adjlane *et al.*, 2017).

Le nombre de levure dans différents types de miels peut varier entre 1/10g à 100 000 / g (Root, 1983 ; Graham, 1992).

Tysset *et al.* (1970a) estiment que le miel n'est plus commercialisable s'il contient plus de 1000 spores de levure / g. Ces auteurs rapportent qu'un tel miel puisse être utilisé dans des produits nécessitant une chaleur élevée (par exemple, la fabrication des bonbons).

Le nectar, le corps de l'abeille, le sol et de l'air et l'équipement de la miellerie sont tous des sources possibles de levure (Crane, 1979, Graham, 1992). Troller (1979) estime que le réservoir ultime pour les levures dans le miel peut être la ruche.

Les levures peuvent se développer dans des conditions acides et ne sont pas inhibées par la forte concentration en sucre (Snowdon et Cliver, 1996). Les levures osmophiles ou tolérantes au sucre constituent un problème dans l'industrie du miel, car elles peuvent se développer même au niveau limité d'eau disponible dans le miel mûr. En conséquence, les levures osmophiles fermentent facilement le miel (Snowdon et Cliver, 1996).

Les levures et les moisissures peuvent être trouvées dans le miel à des niveaux variables et peuvent être contrôlées par les pratiques classiques de l'industrie. Un nombre de routine pour les levures et les moisissures combinées serait un moyen économique d'indiquer la qualité et l'état du miel, et de prédire ainsi la durée de conservation et le potentiel de détérioration de ce produit (Tysset *et al.*, 1970a). Etant donné que le nombre des moisissures

est généralement faible par rapport aux levures, le nombre de levures peut être suffisant (ou le nombre combiné) pour estimer la qualité d'un miel (Tysset et *al.*, 1970a).

Pour Fléché et *al.* (1997), le Mercosur (marché des pays de l'Amérique latine) in Finola et *al.* (2007) et le Codex Alimentarius de la République slovaque (Kunová et *al.*, 2015), La valeur limite maximale pour un miel de bonne conservation est de 100 ufc / g.

Fléché et *al.* (1997) ajoutent d'autres fourchettes de normes, ainsi :

- de 500 à 1 000 levures par gramme : le miel commence à fermenter ;
- au-dessus de 1 000 levures par gramme : le miel ne peut plus être commercialisé.

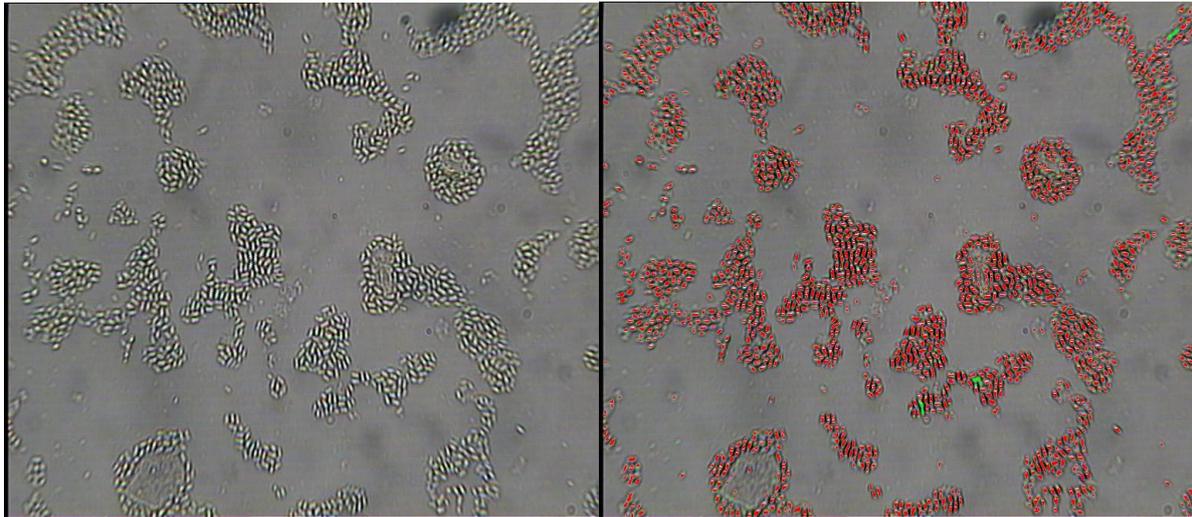
Quant à la flore occasionnelle, elle ne doit pas être tolérée pour un miel de qualité.

En se référant à ce seuil de qualité, 72.5% (21/29 éch) sont de bonne qualité de conservation contre 27.5% (8/29) contenant un nombre de levures supérieur à 100 ufc/g dont 17.24% (5/29) ayant un nombre supérieur à 100 mais inférieur ou égal à 1000 ufc/g et seulement 3 échantillons (10.34%) dépassent 1000 ufc/g.

En se basant sur le nombre de levure, on peut dire qu'environ 90% de nos échantillon sont des miels de très bonne qualité.

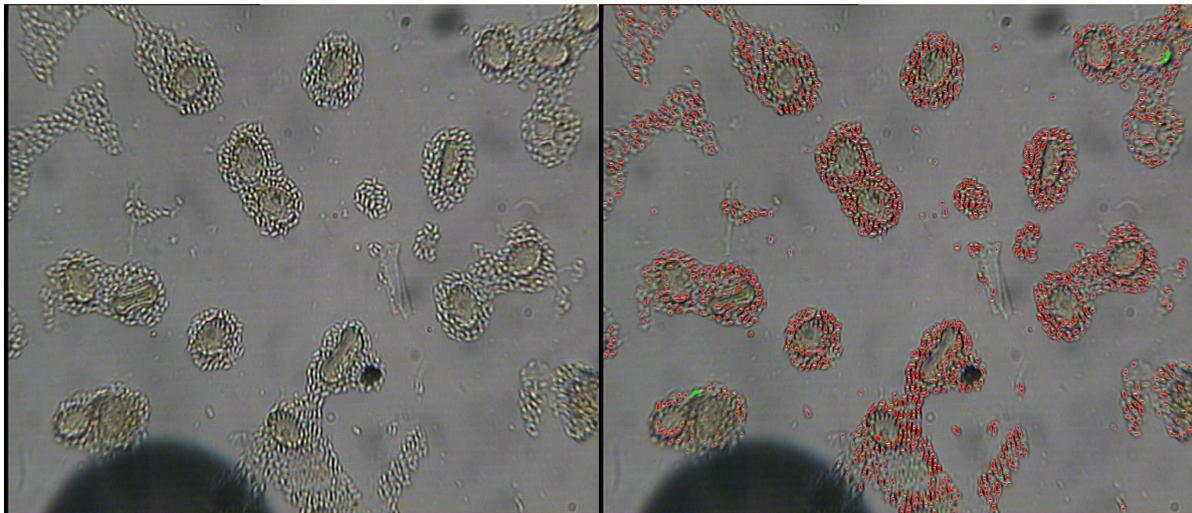
### **3.2.1-2 Détermination des levures par la technique de plaques**

La technique de comptage des levures en utilisant la méthode utilisée pour la détermination des grains de pollen dans le miel semble très fiable compte tenu de la forte corrélation entre le nombre de levure par technique classique et le nombre obtenu sur plaque ( $r=0.97$ ,  $p=0.000$ ). Le programme conçu au départ pour le comptage des grains de pollen a bien fonctionné avec le dénombrement automatique des levures. Les photos ci-après montrent l'aspect des champs observés contenant les grains de pollen et les levures, et l'aspect du marquage des éléments désignés pour être compté, en l'occurrence les levures.



Levures sans marquage (éch 3 )

après marquage (éch 3)



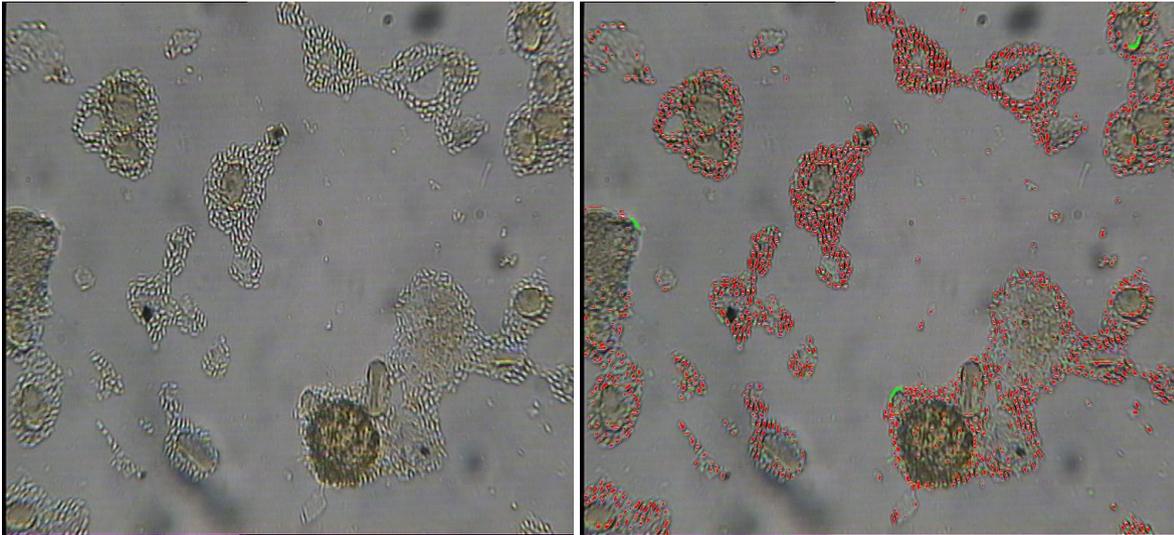
Levures sans marquage (éch 5 )

après marquage (éch 5 )

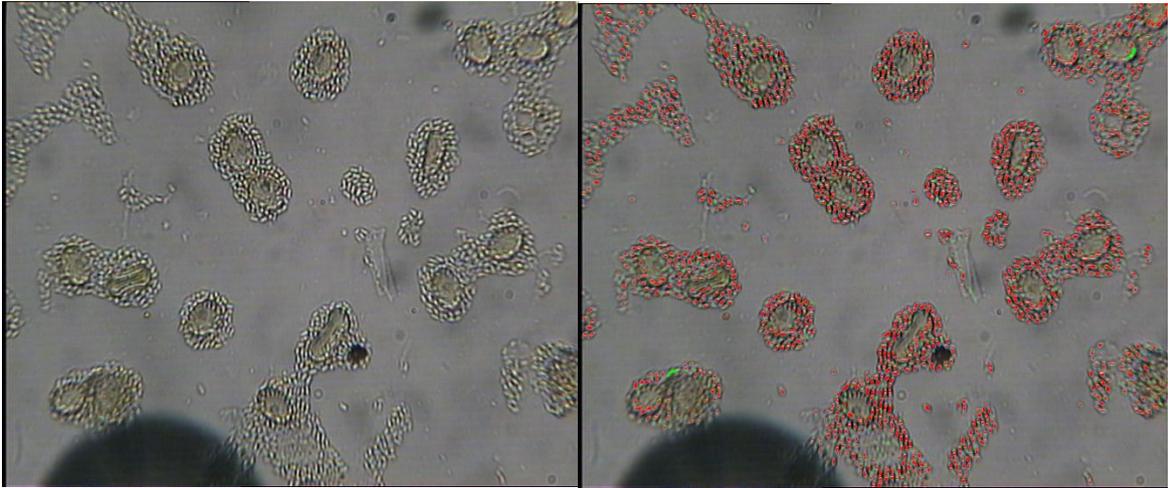
Le marquage en rouge désigne les éléments programmés par l'observateur pour être dénombrés. Dans ces photos, on observe clairement les levures entourant les grains de pollen. Ceci est valable à tous les miels riches en levures et en grains de pollen.

L'avantage de cette technique c'est la rapidité des comptages, l'observation des aspects de présentation des levures et leurs dimensions.

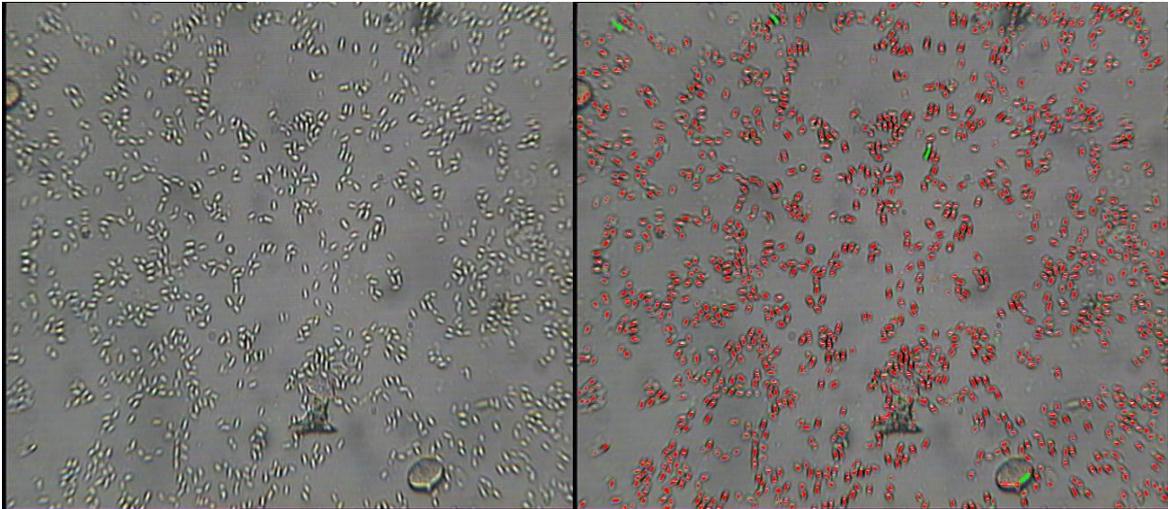
Quand le nombre des levures est très faible, ou quand les frottis ne sont pas de qualité la technique ne donne pas de bons résultats. Ceci dépend également du bon réglage de l'appareil et du programme pour reconnaître les éléments à dénombrer.



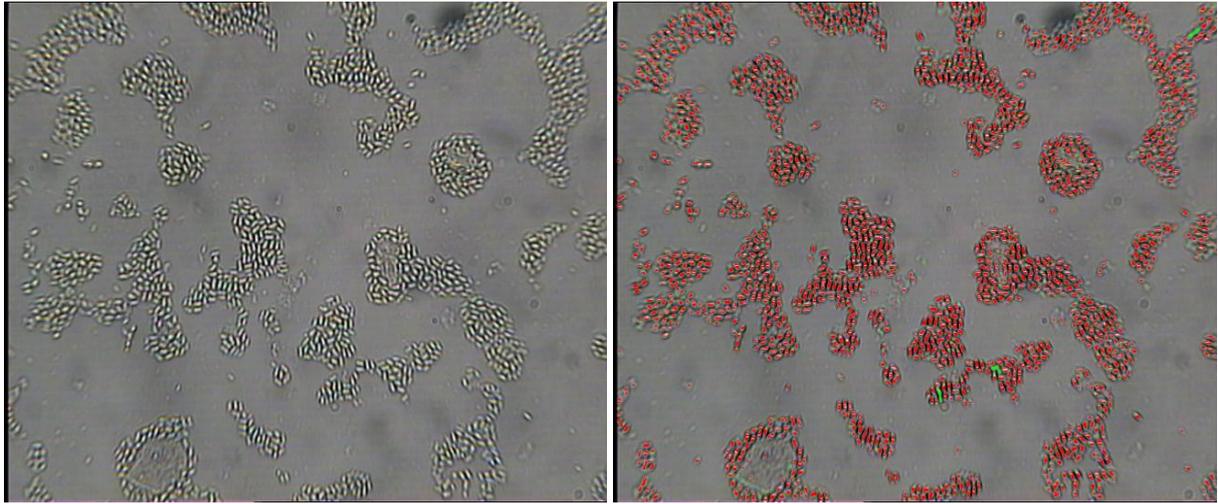
Ech 1



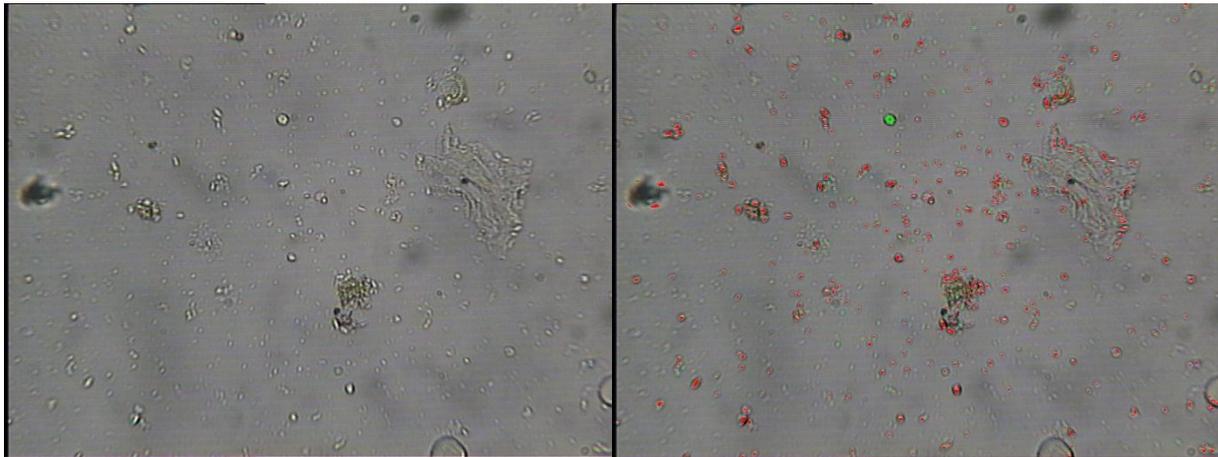
Ech 1



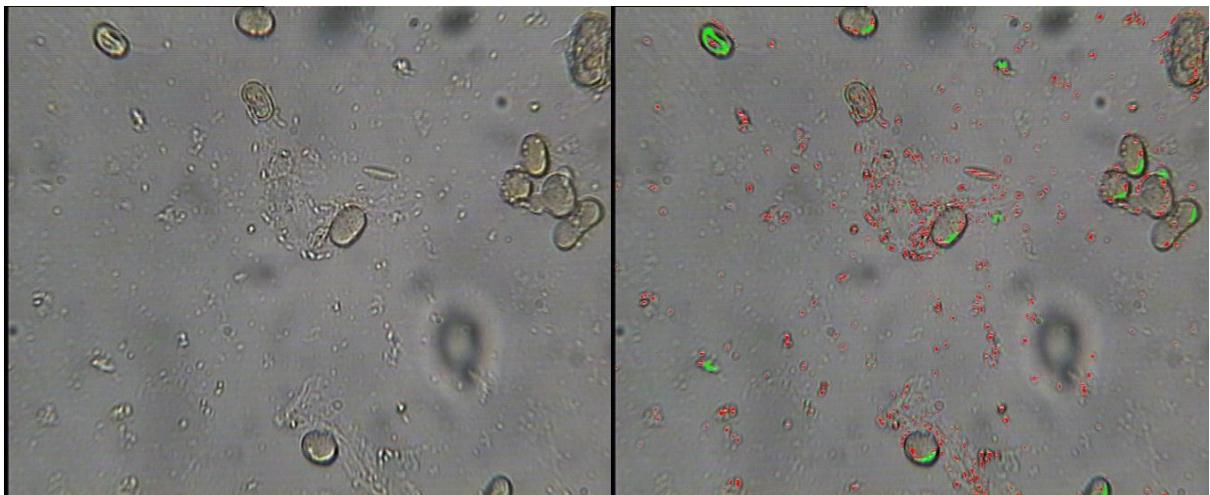
Ech 18



Ech 15



Ech 26



Ech 2

Les échantillons 1, 3, 5, 15 et 18 contiennent une charge de levure très élevée. L'aspect microscopique des frottis de ces échantillons concorde avec les observations faites sur les différents milieux de culture utilisés pour le dénombrement des levures.

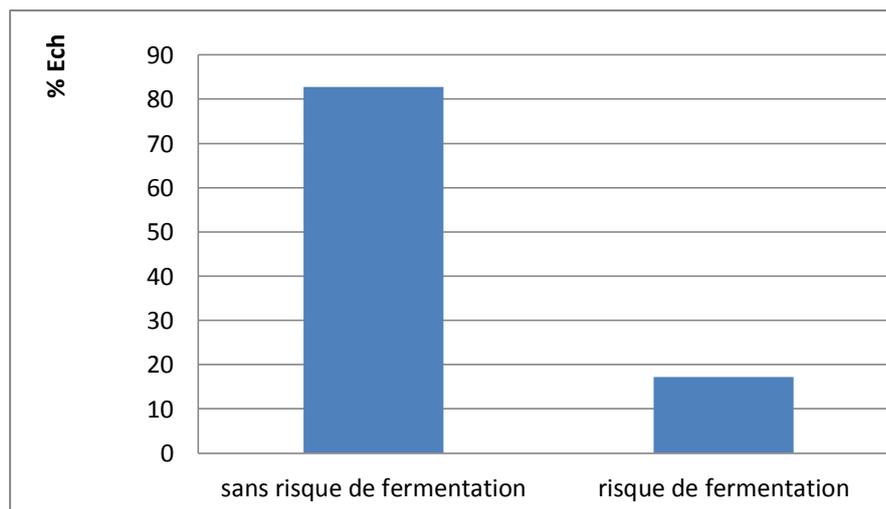
Les échantillons 2 et 26 sont très pauvres en levures observées sur lame, ceci concorde avec le dénombrement sur les différents milieux de culture de ces échantillons.

### 3.2.1-3 Risque de fermentation

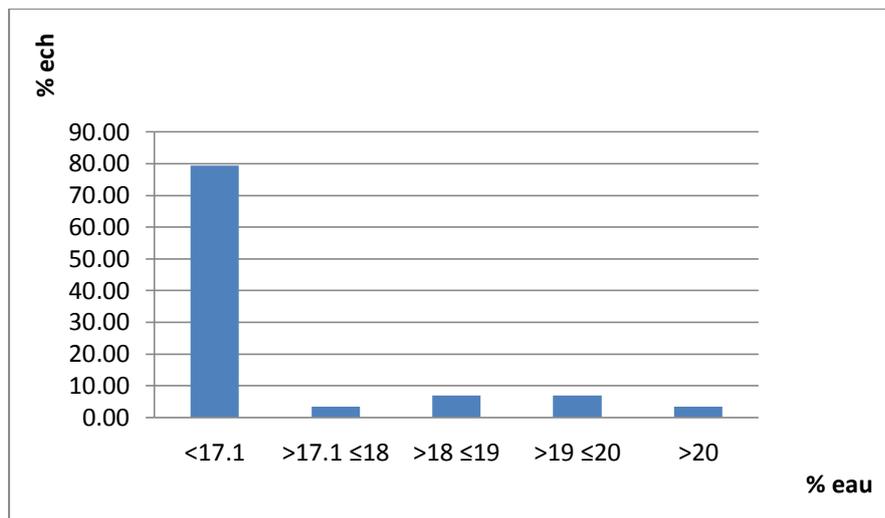
Les conditions qui favorisent la fermentation dans le miel comprennent l'augmentation de l'humidité, des températures modérées, la granulation, un nombre élevé de levures et la présence de cendres et d'azote (Crane, 1979).

La fermentation du miel peut être évitée par stockage à 10 ° C ou moins avec une humidité relative inférieure à 50% ou par pasteurisation (Tysset et Rousseau, 1981). Les levures tolérantes au sucre ne pousseront pas en dessous de 11 °C ou supérieures à 38 ° C. Le miel qui contient plus de 17% d'eau est sensible à la fermentation et le miel de plus de 19% d'humidité est très susceptible de fermenter (Snowdon et Cliver, 1996).

En se basant sur la répartition de Lochhead (1933) cité par Louveaux (1968a) et Bogdanov (2011), il apparaît que 82.8% d'échantillons étudiés ne risquent pas de fermenter contre 17.2% avec des degrés de risque variables (fig 13 et 14).



**Figure 13 :** Risque de fermentation



**Figure 14 :** Répartition des échantillons en fonction de la teneur eau

Les échantillons exposés au risque de fermentation sont 1, 24, 5, 19 et 3 avec un nombre de levures 1333, 60, 1476, 100 et 1769 respectivement (tab 9).

Tous les échantillons ayant une teneur en eau inférieure à 17.1% quel que soit leur nombre de levures (23/29) et l'échantillon 28 (levures=72, eau=17.80) ne sont pas exposés au risque de fermentation (tab 9).

Tableau 9 : Pourcentage de risque de fermentation en fonction de la teneur en eau

% Eau	Nombre éch	%	Ech	nbre levure	Norme levures	risque de fermentation
<17.1	23	79.31	reste		>1000	Néant
>17.1 ≤18	1	3.45	28	72	pas plus de 1000	Néant
>18 ≤19	2	6.90	1, 24	1333 et 60	pas plus de 10	+++ (ECH1)
>19 ≤20	2	6.90	5, 19	1476 et 100	pas plus de 1	+++ (ech 5), ++ (ech19)
>20	1	3.45	3	1769	moins de de 1	++++

++++=très très élevé, +++=très élevé, ++= élevé,

Parmi les échantillons de la première catégorie (<17.1%), 3 contiennent des charges en levure supérieures à 500 ufc/g ce qui peut constituer un risque d'altération au cours du stockage si leur teneur en eau augmente et si les conditions de stockage ne sont pas bonnes. Il s'agit des échantillons 15, 17 et 18 dont les teneurs en levures sont respectivement 960, 620 et 875 ufc/g.

D'après Tysset et *al.* (1970a), Le miel avec un nombre de FMAT assez élevé (10 000 / g) pourrait être acceptable si d'autres critères microbiens (par exemple la présence de levure ou l'absence de contamination fécale) étaient satisfaisants.

Si on tient compte du nombre de FMAT $\leq$ 10000, nombre de levures  $\leq$ 100 (critère fixé par la législation de certains pays) et absence de germes pathogènes, 72.4 % (21 éch) sont de très bonne qualité du fait que le nombre maximal de FMAT obtenu, correspondant aux échantillons ayant moins de 100 levures, est de 464 ufc/g.

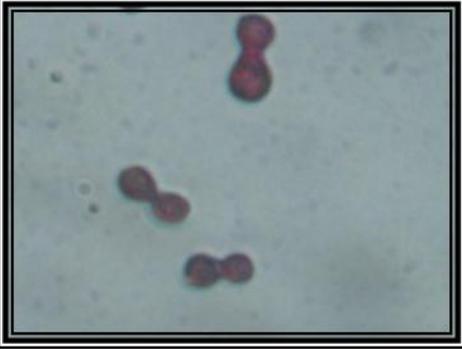
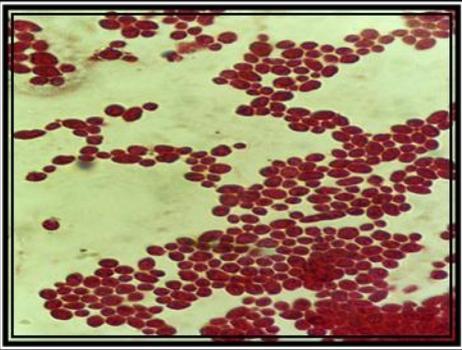
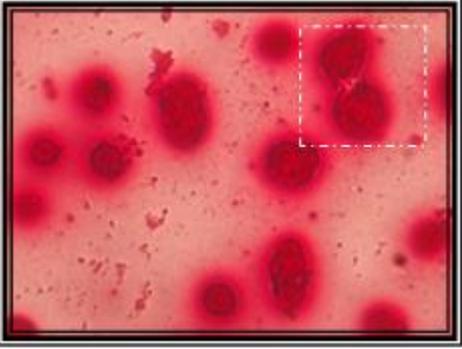
Deux échantillons (10 et 22) contiennent moins de 500 FMAT et moins de 500 levures et peuvent être considérés comme de bonne qualité.

6 échantillons (20.7%) contiennent un nombre de levure supérieur à 500 (620-1769) et un nombre de flore totale compris entre 770 et 2513 ufc/g de miel. Parmi lesquels 3 échantillons sont de qualité moyenne (teneur en eau entre 15-17) il s'agit des échantillons 15, 17 et 18 et les trois autres (1,3 et 5) de qualité médiocre vu que leur teneur eau est supérieure à 18%.

### **3.2.1-4 identification des levures**

Des exemples d'observations des frottis des levures obtenues sur les milieux de culture sont illustrés par la figure 15.

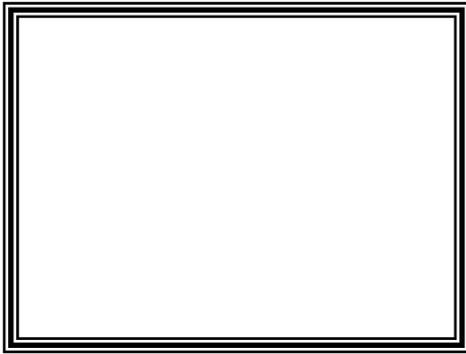
La figure 15 montre la reproduction des cellules de levures. Les différentes photos montrent un type de division, le bourgeonnement, le type de division le plus fréquent chez les levures. Au niveau de la photo 2, on observe un bourgeonnement multipolaire, photo 4 bipolaire et la photo 6 monopolaire. La photo 8 montre des cellules de formes hexagonales à cause de la condensation des cellules, sinon les cellules sont ovales en phase de division par bourgeonnement.

 <p>1</p> <p>Ech 7 G (100x10)</p>	<p>2</p> <p>Ech 7 G ( 40x 10)</p>
<p>3</p> <p>Ech 26 G ( 40x 10)</p>	<p>4</p> <p>Ech 28 G ( 40x 10)</p>
 <p>5</p> <p>Ech 5 G (100x 10)</p>	<p>6</p> <p>Ech 5 G (100x 10)</p>
 <p>7</p> <p>Ech 18 (100x 10)</p>	<p>8</p> <p>Ech 18 (100x 10)</p>
<p><b>Figure 15 :</b> Résultats de l'examen microscopique des frottis colorés par la fuchsine</p>	

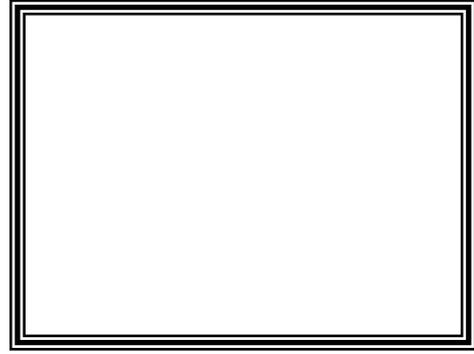
**A -Test de filamentation :**

L'observation microscopique des lames ensemencées montre que les levures à identifier ont l'aptitude de former un pseudomycelium (fig 16 et 17).

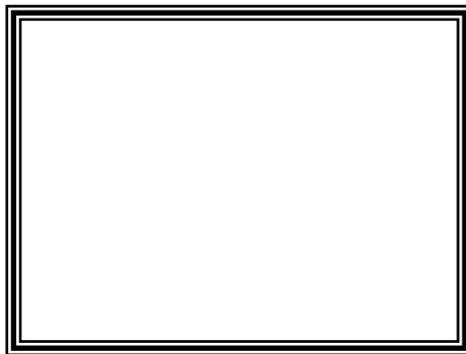
On note aussi que dans les échantillons 5 et 18 il y'a formation de bouquets de blastopores.



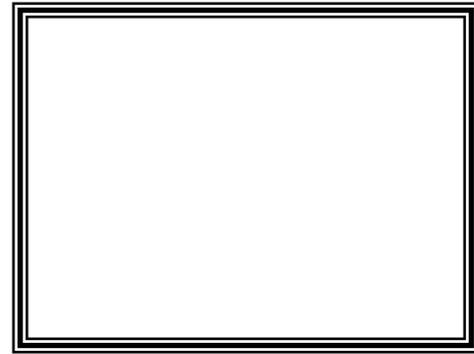
Ech 18 G (40x 10)



Ech 5 G (40x 10)



Ech 18 G (40x 10)



Ech 26 G (40x 10)

**Figure 16:** Résultat du test de filamentation.

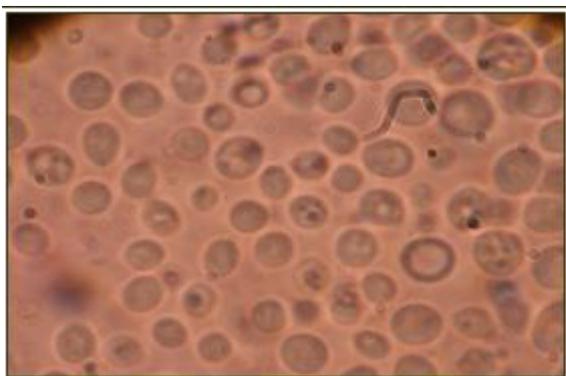
	
Formation de pseudomycelium (levures obtenues sur OGA, E3)	Formation de pseudomycelium (levures obtenues sur YM40G, E8)

**Figure 17:** Observation microscopique des pseudomyceliums de quelques cellules levuriennes à partir du milieu PDA.

### **B -Test de sporulation :**

Le milieu de Mac Clary représente un milieu favorable à la reproduction sexuée par la formation des ascospores.

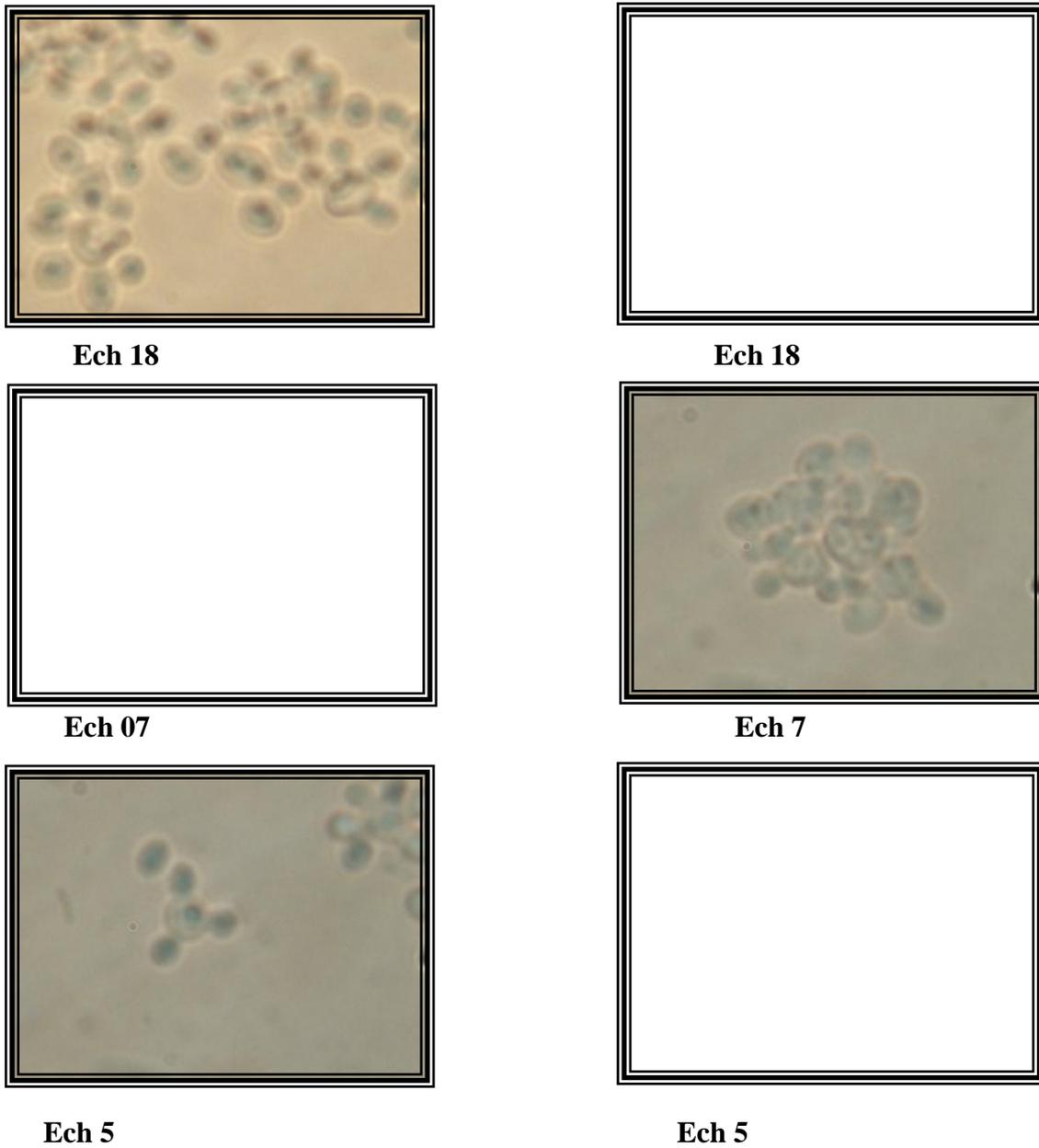
Tous les frottis observés révèlent la capacité des levures à se reproduire par voie sexuée en formant des asques contenant un nombre variable d'ascospores allant de 1 à 4 spores par asque (Fig 18 et 19).



Formation des ascospores (OGA, E4)

Formation des ascospores (YM40G, E4)

**Figure 18:** Observations microscopiques des ascospores de quelques cellules Levuriennes à partir du milieu Mac Clary ( Gr x 1000).



**Figure 19:** Résultats du test de sporulation.

Les résultats des différents tests employés pour identifier les principaux types de colonies observées sont empilés dans les tableaux 10, 11 et 12.

Tableau 10 : Aspects des colonies observées sur les deux milieux de culture

types	Milieu	Forme	Couleur	Surface	Élévation	Opacité	Diamètre
1	YM40G	Régulière	Blanche à crème	Lisse Brillante	Bombée	Opaque	≤1mm
2	YM40G	Régulière	Crème	Lisse Brillante	Bombée	Opaque	≤1mm
3	YM40G	Irrégulière	crème	Rugueuse	Plate	Opaque	≤1mm
4	YM40G	Irrégulière	Blanche	Rugueuse	Bombée	Opaque	≤1mm
5	YM40G	Régulière	Crème	Lisse Brillante	Bombée	Opaque	≤1mm
6	OGA	Régulière	Crème	Lisse Brillante	Bombée	Opaque	≤1mm
7	YM40G	Régulière	Crème	Lisse Brillante	Plate	Translucide	≤1mm
8	YM40G	Régulière	Crème	Lisse Brillante	Bombée	Opaque	≤1mm
9	OGA	Régulière	Blanche	Lisse Brillante	Bombée	Opaque	1-2 mm
10	OGA	Régulière	Blanche à crème	Lisse Brillante	Bombée	Opaque	≈ 2mm
11	OGA	Régulière	Crème	Lisse Brillante	Bombée	Opaque	>1mm

Tableau 11 : Résultats des observations microscopiques, tests de filamentation, de sporulation et fermentation des sucres

Echantillons	Observation des cellules végétatives		Test de filamentation	Test de sporulation	Fermentation des sucres					
	Forme des cellules	Reproduction			Glucose	Galactose	Saccharose	Maltose	Lactose	Rhannose
1	Sphérique	Bourgeoisement mono et bilatéral	Pseudomycélium rudimentaire	Ascospores (1-4spores, chapeau)	+	-	+	+	-	-
2	Ovoïde	Bourgeoisement bi et multilatéral	±	Ascospores (4, ovale)	+	-	+	+	-	-
3	Sphérique	Bourgeoisement Mono et bilatéral	Pseudomycélium rudimentaire	Ascospores (1-2,sphérique)	+	-	+	-	-	-
4	Ovoïde	Bourgeoisement bi et „Mono multilatéral	±	Ascospores (1-2,sphérique)	+	-	+	+	-	-
5	Ovoïde	Bourgeoisement et bilatéral Mono	Pseudomycélium	Ascospores 1-2	+	-	+	+	-	-
6	Ovoïde	Bourgeoisement monolatéral	Pseudomycélium rudimentaire	Ascospores (1-4)	+	-	-	+	-	-
7	Ovoïde	Bourgeoisement monolatéral	Pseudomycélium	Ascospores 1-2	+	-	+	+	-	-
8	Ovoïde	Bourgeoisement monolatéral	±	Ascospores 1-2, sphérique	+	-	-	-	-	-
9	sphérique	Bourgeoisement monolatéral	Pseudomycélium rudimentaire	Ascospores 1 spore, réniforme	+	+	+	+	-	-
10	sphérique	Bourgeoisement bilatéral	-	Ascospores 1 spore, chapeau	+	+	+	+	-	-
11	Sphérique	Bourgeoisement et bilatéral Mono	Pseudomycélium	Ascospores	+	-	+	+	-	-

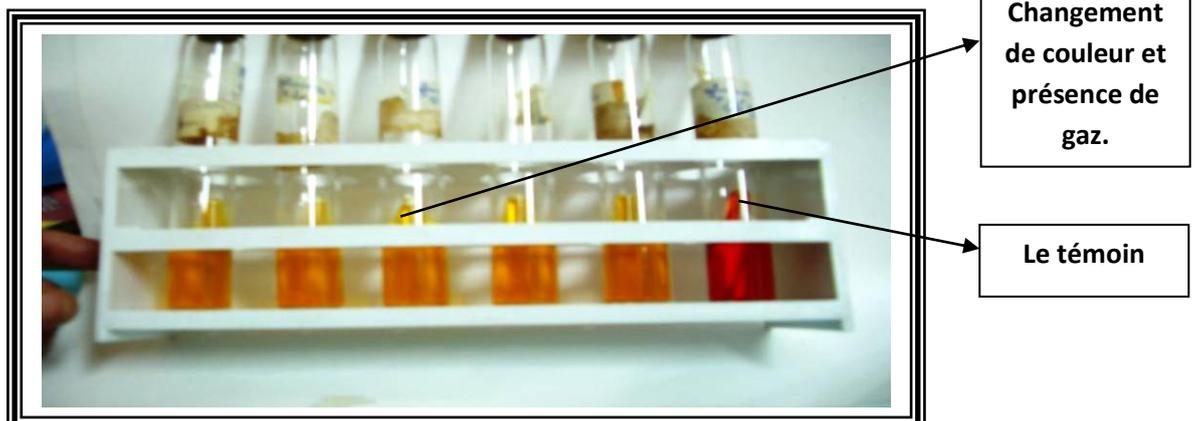


Figure 20 : Fermentation des sucres.

Tableau 12 : Résultats des tests d'assimilation des sources carbonées et azotées

Echantillons	Assimilation des sources carbonées et azotées											Espèces de levures correspondantes
	Glucose	Galactose	Saccharose	Maltose	Lactose	Rhamnose	Amidon	Glycérol	A. lactique	A. citrique	KNO3	
1	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>Pichia</i>
2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	<i>Torulaspota</i>
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
5	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	Non identifiée
6	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>Debaryomyces</i>
7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	Non identifiée
8	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
9	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>Kluyveromyces</i>
10	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>Hansenula</i>
11	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	Non identifiée

Pour affiner l'identification de ces 11 types de levures, nous avons programmé une analyse moléculaire (à Nancy, France). Cette analyse permet d'identifier les espèces et sous espèces. Mais suite à une contrainte technique ( la panique causée par la grippe aviaire au niveau mondial et surtout dans les contrôles au niveau des aéroports), les échantillons ne sont pas arrivés au laboratoire d'analyse.

Par manque de tests d'analyse moléculaire, nous avons envoyé les caractéristiques de ces levures ( tab 10, 11 et 12) à deux experts mycologiques pour l'identification des taxons.

L'ensemble de ces tests et analyses nous ont permis d'identifier certaines espèces (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bailii*), pour les autres cas nous nous sommes limités au genre du fait que d'autres tests peuvent nous révéler différentes espèces. Nous n'avons pas pu identifier trois types de levures (types 5, 7 et 11).

### Les principales levures identifiées.

*Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Debaryomyces*,

La répartition de ces levures identifiées dans les différents échantillons est présentée dans le tableau 13.

Tableau 13 : Répartition des levures identifiées dans les différents échantillons

Levure	Echantillons concernés
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1-3, 5-8, 10-13,15-19, 21-25, 28-29
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1,3-6, 9, 11, 13,14, 16-25, 27, 29
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	3-5, 9,11,13,15-18, 20-22,24, 25,27, 29
<i>Torulaspora sp</i>	2,3, 6,7,1,17,21, 24, 29
<i>Kluyveromyces</i>	1,3,5,10,13,17,18,22,23,26,29
<i>Hansenula</i>	3,15, 18
<i>Pichia</i>	1,6,15
<i>Debaryomyces</i>	1,3,5,10,14

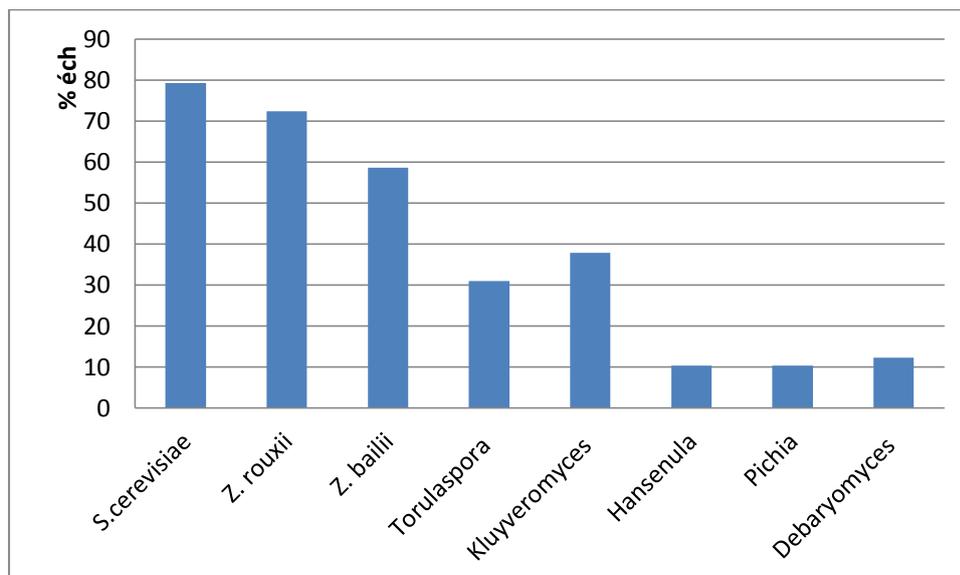
Le degré de contamination en fonction du nombre d'espèces par échantillon est présenté dans le tableau 14.

Tableau 14 : Nombre d'espèces et/ou genres par échantillon

nombre d'espèces/échantillon	Echantillons concernés
<b>7</b>	3
<b>5</b>	1,5,13,17,18,29
<b>4</b>	6,15,21,22,24
<b>3</b>	10,11,16,23,25
<b>2</b>	2,4,7,9,14,19,20,27
<b>1</b>	8,12,26,28

L'analyse par échantillon, montre que l'échantillon 3 contient 7 types de levures sauf *Pichia* et les échantillons 8,12, et 28 contiennent une seule espèce, *Saccharomyces cerevisiae* et le 26 contient *Pichia*.

A partir de ces deux tableaux et la figure 21, on constate que la levure *Saccharomyces cerevisiae* est la plus dominante par sa présence dans la plupart des échantillons et par le niveau contamination. Les deux espèces de *Zygosaccharomyces* sont présentes dans beaucoup d'échantillons mais le niveau de contamination par échantillon est un peu plus faible par rapport *Sac. cerevisiae*. Nous avons mentionné le taux d'infestation par des signes (+++) fortes présence, (++) présence moyenne, (+) faible (voir tableau récapitulatif en annexe).



**Figure 21 :** Taux de présence des espèces (ou genres) des levures identifiées dans les miels analysés.

Martins et *al.* (2003), ont rapporté que les espèces de levure identifiées (*Candida humicola* et *Saccharomyces sp.*) ont été détectées à une fréquence très élevée et à des niveaux élevés de contamination.

Les levures *Saccharomyces* et *Torula* peuvent être trouvées dans des produits sucrés riches en humidité (Snowdon et Cliver, 1996). Tysset et Rousseau (1981) ont souligné la dominance de la levure *Saccharomyces*. Crane (1979), rapporte la présence des levures suivantes: *Nematospora*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Torulu* et *Zygosaccharomyces*.

Furuta and Okimoto (1978) cités par Snowdon et Cliver (1996) ont isolé les genres suivants à partir des miels japonais : *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Oosporidium*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, et *Trichosporan*

Toutes les levures rencontrées dans nos échantillons ne sont pas pathogènes et font, en majeure partie, de la flore de contamination primaire (nectar, abeilles, sol, ruches...). Une forte présence de ces levures reflète également une contamination secondaire durant les opérations d'extraction et de conditionnement, le personnel. Cette contamination peut provenir essentiellement du matériel souillé par ces levures presque omniprésentes. L'analyse de certains de nos échantillons par le laboratoire d'analyse médicale (France) n'a révélé aucune présence de levures pathogènes.

### 3.2.2-Moisissures

Les moisissures ont été recherchées sur deux milieux de culture OGA et YM40G. Sur le premier le nombre varie entre 0.00 et 88 moisissures avec une moyenne de 12.48 avec 69% d'échantillons (20/29) contiennent moins de 10 ufc/g et 31% contiennent un nombre compris entre plus de 10 et pas plus de 100. Par contre sur YM40G, le nombre est plus élevé, compris entre 0.00 et 286 avec une moyenne de 43.62 ufc/g. 48.3% (14 éch) contiennent moins de 10 et 34.46% entre plus de 10 et  $\leq 100$ , 17.24% plus de 100 ufc/g. Si on tient compte seulement du milieu YM40G, il ressort que 82.76% d'échantillons sont conformes aux normes de qualité ( $\leq 100$  ufc/g).

Les moisissures apparues sur Le milieu OGA sont probablement des moisissures non xérophiles ou peu xérophiles puisque ce milieu est destiné à la recherche des moisissures dans tous les aliments. Le milieu YM40G, est très riche en sucre répondant aux exigences des levures osmophiles et des moisissures xérophiles.

Le nombre de moisissures est souvent plus faible par rapport au nombre de levures (Tysset et *al.*, 1970a). Certains travaux mentionnent le nombre combiné des levures et moisissures sans distinction. Selon Snowdon et Cliver (1996), Il y'a peu de publications qui quantifient les niveaux de moisissures séparément des levures dans le miel.

Piana et *al.* (1991) ont trouvé des moisissures dans les 50 échantillons de miel italiens analysés. Tysset et *al.* (1970b) ont trouvé une moyenne de 254 ufc / g de miel avec une fourchette de 0 à 2500 ufc / g. Iurlina et Fritz (2005) ont obtenu un nombre combiné de

levures et moisissures inférieur à  $10^3$  ufc/g dans 70 échantillons analysés. Martins et *al* (2003) ont noté la présence des levures et moisissures dans 71 échantillons (88.8%) avec un taux de contamination compris entre 1 et 100 ufc/g.

Toujours selon Piana et *al.* (1991), les moisissures sont moins tolérantes au sucre que les levures et leur présence dans miel traduit une récente contamination.

La réglementation des pays de l'Amérique latine fixe un maximum de levures et moisissures de 100 ufc/g (Coll Cárdenas et *al.*, 2008). Finola et *al.* (2007) ont obtenu des valeurs inférieures à 100 ufc de levures et moisissures. Naman et *al.* (2005) ont obtenu un nombre maximal de 10 ufc/g dans 30% d'échantillons. Kunová et *al.* (2015) ont eu des valeurs comprises entre 0 et moins 100 moisissures.

Nasser (2004), en analysant 45 échantillons de miels de différentes origines vendus en Arabie saoudite a constaté que 40 échantillons sont contaminés par les moisissures et seulement 9 échantillons parmi les 40 contiennent des levures et moisissures.

La contamination des miels par les champignons est faible par rapport à celle des levures. Selon Fléché et *al.*, (1997) les champignons (moisissures) sont rares et se trouvent sous forme de spores. Le miel étant un milieu pauvre en protides, leur activité métabolique n'est pas favorisée.

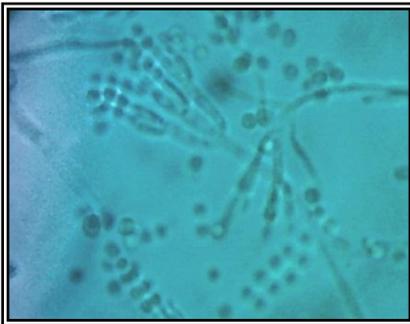
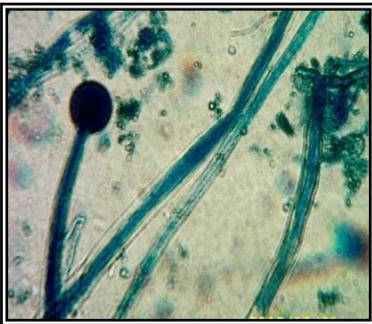
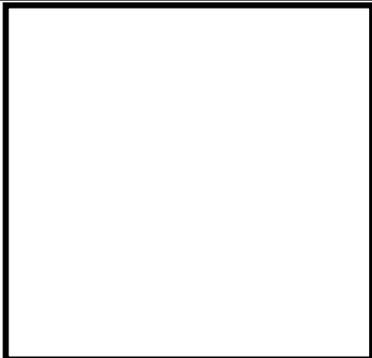
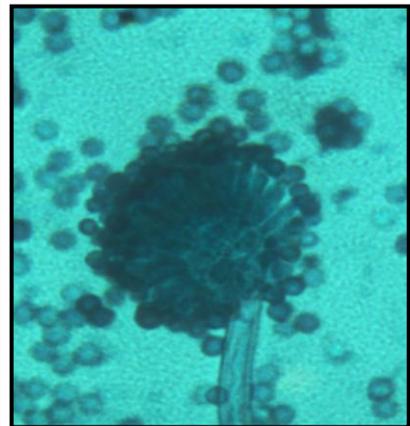
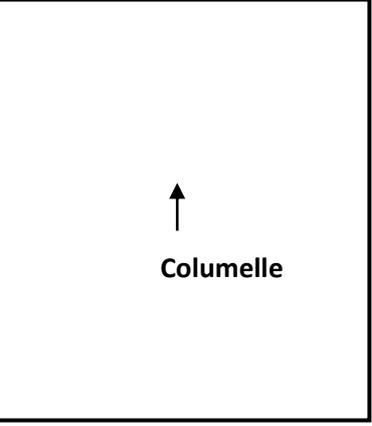
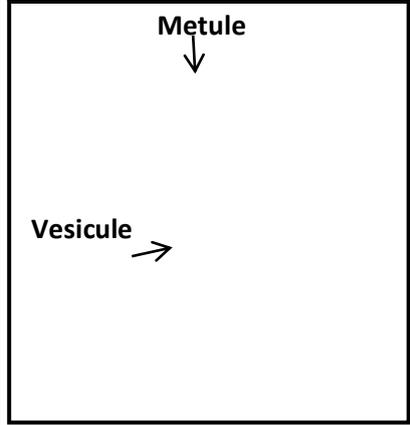
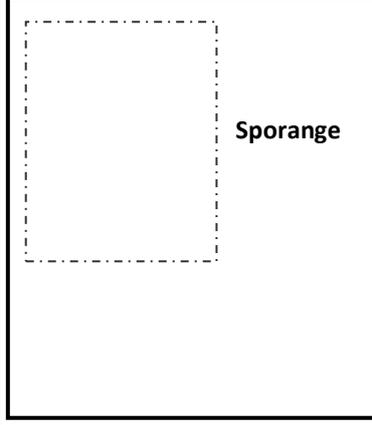
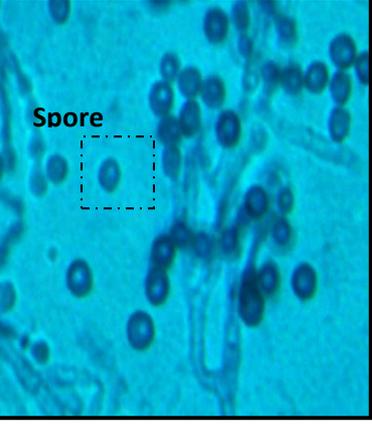
La contamination du pollen récolté auprès des apiculteurs est estimée entre 15 et  $280 \times 10^3$  ufc de levures et moisissures par gramme de pollen (Adjlane et *al.*, 2017).

### **3.2.2-1 Identification des moisissures**

Pour l'identification des moisissures, nous avons noté l'aspect microscopique dont les résultats sont présentés dans le tableau 15 et les aspects microscopiques obtenus par les trois techniques (Technique de drapeau, technique d'hydrolyse et la technique de culture sur lame) dont les résultats sont présentés dans les figures 22-24. Le tableau 16 regroupe tous les aspects observés (macroscopiques et microscopiques).

#### **a) – Technique de drapeau**

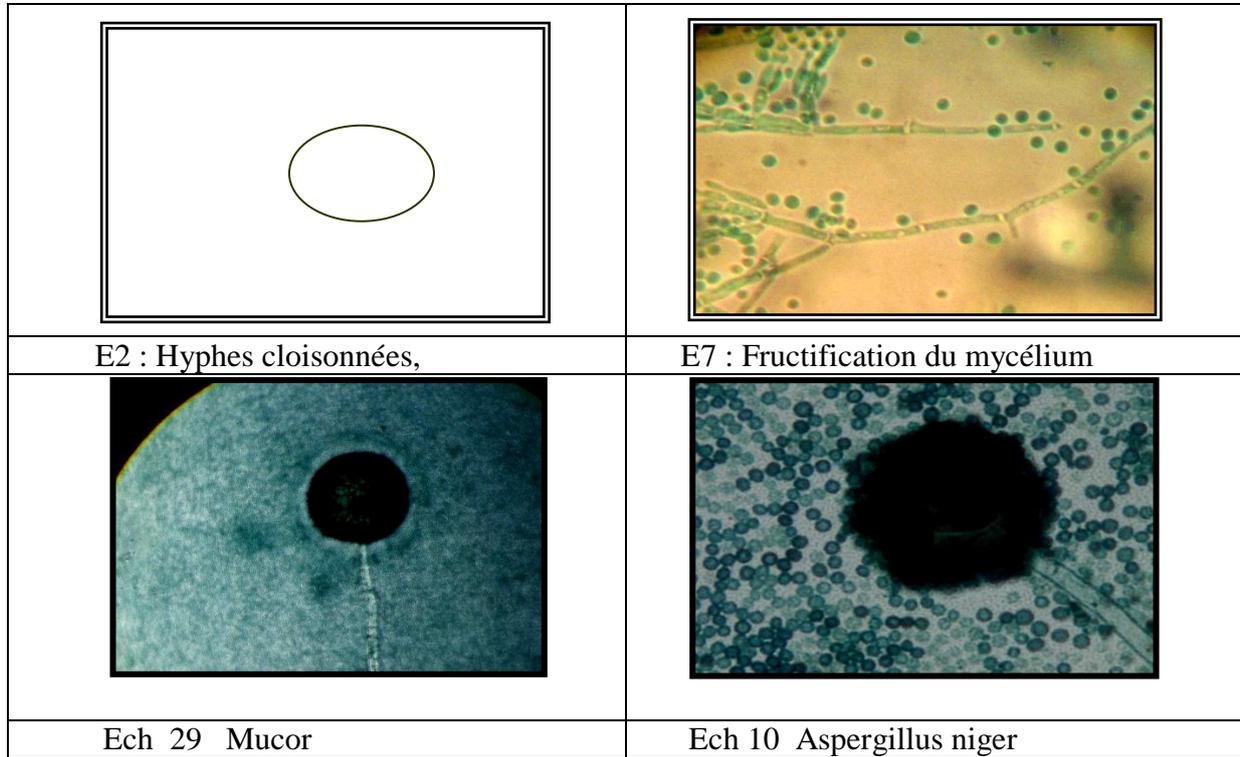
L'utilisation d'un microscope optique muni d'un appareil photo numérique nous a permis d'obtenir des photos de quelques champs illustrés dans la figure 22, Cette technique permet d'observer la forme et l'enchaînement des spores et parfois même la fructification du mycélium

		
<p>E 1, sur YM40G, Penicillium</p>	<p>E6 sur OGA, Mucor</p>	<p>E 16 YM40G <i>Aspergillus fumigatus</i></p>
		
<p>E24, sur OGA Aspergillus</p>	<p>E5, sur OGA, Penicillium</p>	<p>E 12 OGA, Non déterminée</p>
		
<p>Ech 24 OGA, A niger</p>	<p>Ech 17 YM40G, Penicillium.</p>	<p>Ech 15 YM40G, Rhizopus</p>
		
<p>Ech 18 YM40G, A flavus</p>	<p>Ech 28 OGA, Mucor</p>	<p>Ech2 YM40G, Penicillium.</p>

**Figure 22** : Quelques exemples d'observations de la technique de drapeau

**b) – Technique d’hydrolyse (après coloration) :**

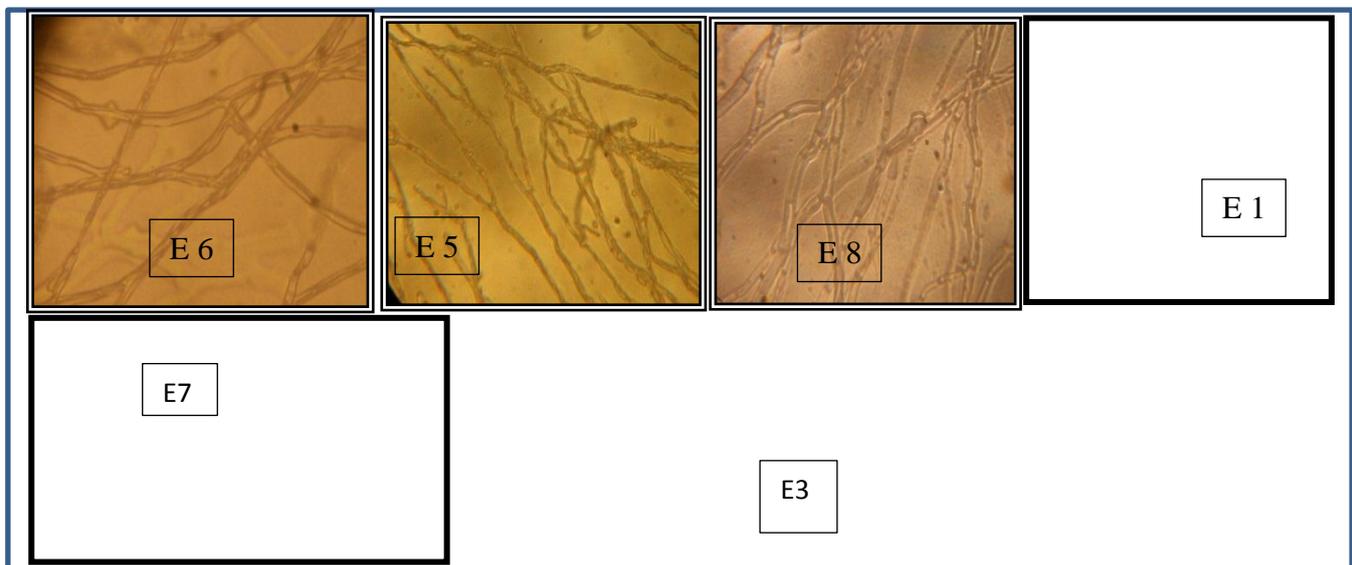
L’examen microscopique des frottis a révélé la présence des cloisons dans les hyphes des certains mycéliums, donc on parle d’hyphes cloisonnés. Les résultats de certains exemples sont illustrés dans la figure 23.



**Figure 23 :** Observations microscopiques de la technique d’hydrolyse (Gr x 1000).

**c) Technique de culture sur lame :**

La figure 24 représente des exemples obtenus par cette technique



**Figure 24 :** Observations microscopiques de la technique de culture sur lame (Gr x 1000).

Les résultats des différentes techniques nous permettent de préciser la nature des champignons, c'est à dire reconnaître le genre et parfois même l'espèce.

La description des moisissures observées sur les deux milieux de culture OGA et YM40G, l'identification de ces moisissures et leurs répartitions dans les différents échantillons sont présentées dans les tableaux 15 et 16.

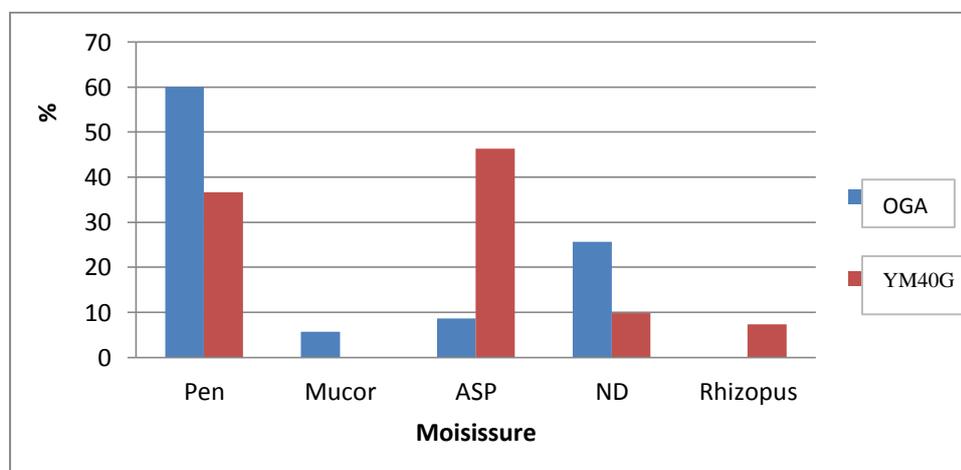
Tableau 15 : Aspects macroscopiques des moisissures obtenues sur les deux milieux

N°	Milieu	Consistance	Forme	Couleur	
				Avers (Face)	Revers
1	OGA	Poudreuse duveteuse	Bombée	Verte	Vert
2	OGA	Poudreuse cotonneuse	convexe	Centre vert, aux extrémités blanches	Chamois
3	OGA	Mucoïde devenant veloutée	Bombée	Brune foncée	Marron foncé
4	OGA	Laineuse	plate	Grise	Chamois
5	OGA	Duveteuse	Plate	blanche	Jaune pâle
6	OGA	Granuleuse	Convexe	Noire	
7	OGA	Poudreuse	Plate	Verte	Blanc
8	OGA	Duveteuse	Bombée	Grise au départ devenant noirâtre.	Vert foncé
9	OGA	Duveteuse	Plate	blanche	Jaune pâle
10	OGA	Duveteuse	Convexe	Verte jaunâtre	Blanc
11	YM40G	Cotonneuse	Irrégulière	Blanche	Brun grisâtre
12	YM40G	Duveteuse à poudreuse	Convexe	Verte jaunâtre	Jaune
13	YM40G	Duveteuse à poudreuse	Plate	Beige	Jaune
14	YM40G	poudreuse	Plate	Centre vert, aux extrémités blanches	Blanc
15	YM40G	Floconneuse	Plissée	Orange	Rouge brun
16	YM40G	Duveteuse	Convexe	Grise	Noir
17	YM40G	Duveteuse	Bombée	Grise au départ devenant noirâtre.	Vert foncé
18	YM40G	Poudreuse cotonneuse	convexe	Centre vert, aux extrémités blanches	Chamois

Nous avons utilisé différentes sources bibliographique et plus particulièrement Olds (1979), Roquebert (1998), Cahagnier (1998) et les données des Inspecteurs de mycologie dans les laboratoires internationaux (2005), pour interpréter les résultats des différents tests d'identification consignés dans les tableaux 15 et 16. La figure 25 montre le pourcentage des moisissures présentes dans les miels analysés

Tableau 16 : Aspects microscopiques des moisissures obtenues sur les deux milieux

N°	Description	Genres ou espèces	Echantillons
1	Hyphe cloisonnés, spores sphériques et petites, fructification biverticillée.	<i>Penicillium 1</i>	1, 3,5,8,18, 21,25,26
2	Mycélium cloisonné, spores sphériques en chaînettes, fructifications triverticillées.	<i>Penicillium 2</i>	1,2,3,4,5,8,13, 15,17,18,19,
3	Hyphe septés, conidies ovales à cylindriques.	Non déterminée	1,3,18,20,25
4	Thalle siphonné, sporangiophore hyalin globuleux, columelle sphérique, spores elliptiques, lisses monocellulaires.	<i>Mucor</i>	28, 29
5	Mycélium cloisonné	Non déterminée	7
6	Thalle cloisonné, tête aspergillaire bisériée, radiée, noire, vésicules globuleuses.	<i>Aspergillus niger</i>	10, 23,24
7	Mycélium cloisonné, spores sphériques, à pinceau monoverticillé.	<i>Penicillium 3</i>	6,14
8	Hyphe septés, produisent des arthrospores rectangulaires ou en forme de tonnelet	Non déterminée	11
9	Mycélium coenocytique	Non déterminée	12
10	Mycélium cloisonné	Non déterminée	22
11	Sporange vide en forme de méduse, spores lisses ovoïdes, mycélium siphonné.	<i>Rhizopus</i>	6,15,18
12	Thalle cloisonné, tête aspergillaire bisériée, phialides portées par des métules, conidiophores long, vésicules sphériques.	<i>Aspergillus flavus</i>	1,2,3,9,16,18, 23,26,27
13	Mycélium cloisonné, tête aspergillaire bisériée, avec une disposition en colonne évasée (aspect en éventail).	<i>Aspergillus terreus</i>	5,7,13,20,22,
14	Mycélium cloisonné, spores sphériques, à pinceau biverticillé	<i>Penicillium 4</i>	1,2,3,5,7,10,12, 15,17,18,23,24
15	Thalle cloisonné, tête unisériée en colonnes, vésicule hémisphérique, phialides dressées densément groupées.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11,16,19,21,25
16	Hyphe septés	Non déterminée	11,12
17	Hyphe septés, produisent des arthrospores rectangulaires ou en forme de tonnelet	Non déterminée	17,25
18	Mycélium cloisonné, spores sphériques en chaînettes, fructifications triverticillées.	<i>Penicillium 5</i>	5, 28,29



Pen : *Penicillium* ; ASP : *Aspergillus* ; ND : non déterminée

**Figure 25** : Les différentes moisissures rencontrées dans le miel

La figure 25 montre une forte présence de *Penicillium* dans la plupart des échantillons, suivie par les *Aspergillus* puis une faible présence de *Mucor* et de *Rhizopus*.

*Penicillium* avec un taux d'infestation de 60% (sur OGA) et 36.6% (sur YM40G) arrive en tête des moisissures, il y' a au minimum 3 espèces de *penicillium* (*Penicillium spp*). La plupart des *Penicilliums* ont été obtenus sur milieu OGA. Les pénicilliums du miel n'ont pas été déterminés par leurs espèces, car la notion d'espèce chez ce genre est difficile à appréhender comme l'a signalé Roquebert (1998) et ceci nécessite peut être d'autre tests comme les tests moléculaires. La détection des *Aspergillus* a été faite beaucoup plus sur le milieu YM40G. *Mucor* a été observé uniquement sur OGA alors que le *Rhizopus* sur YM40G. Toutes ces moisissures appartiennent à la flore fongique banale fréquente dans le milieu extérieur, les zones rurales, ruches et les salles et le matériel d'extraction.

Fléché et *al.* (1997) affirment que les champignons filamenteux du genre *Aspergillus* sont rares et se trouvent à l'état dormant (spores) et font partie de la flore banale.

Nasser (2004) a constaté que les moisissures les plus répandues isolées étaient *Aspergillus flavus*, *Asp. niger*, *Asp. fumigatus*, *Asp. versicolor*.

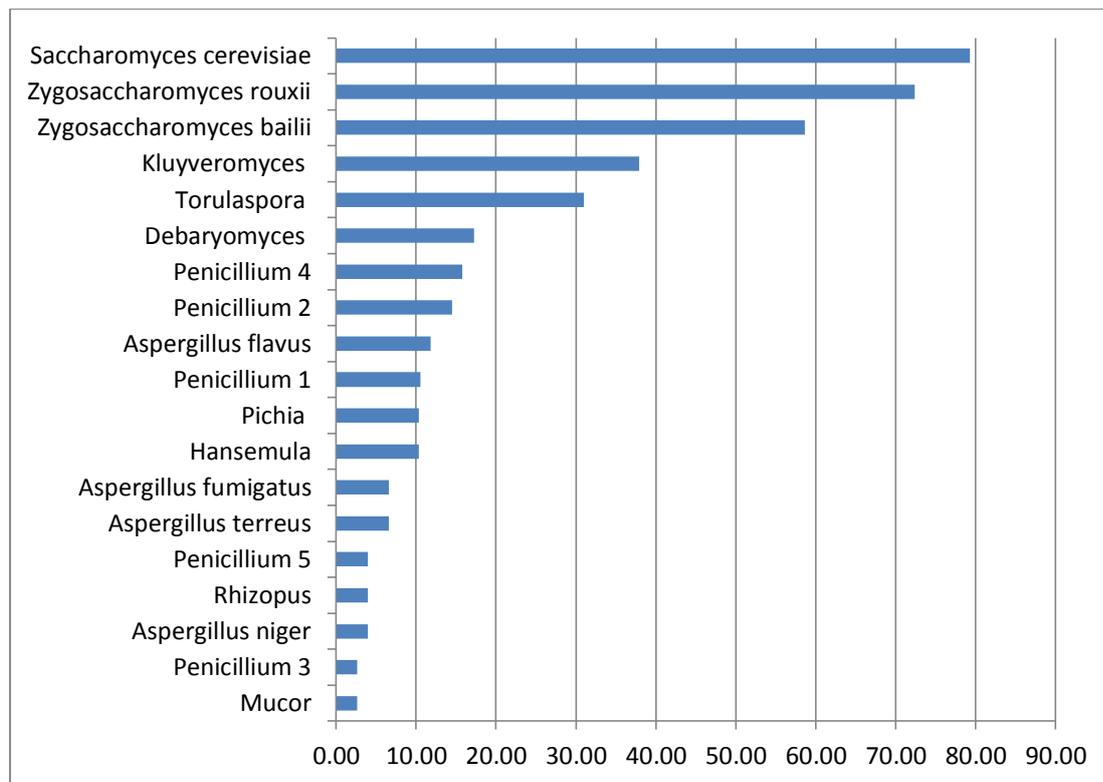
Les moisissures identifiées par Martins et al (2003) sont : *Asp. candidus* (28.7%), *Asp. flavus* (57.5%), *Asp. fumigatus* (45.0%), *Asp. niger* (51.3%), *Mucor sp.* (31.3%) et *Penicillium spp.* (38.8%).

Kunová et *al.* (2015) ont constaté la forte présence de *Penicillium corylophilum* et *Asp. niger* (50 % et 32 % des échantillons respectivement).

Les genres *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria* et *Aspergillus* sont considérés comme des contaminants communs du miel (Nasser, 2004).

Si nous tenons compte du nombre total des moisissures apparues sur les deux milieux de culture (OGA et YM40G), il apparaît que *Penicillium spp* est présent dans 47.37% (*Penicillium4* 15.79%, *Penicillium2* 14.47%, *Penicillium1* 10.53%, *Penicillium5* 3.95% et *Penicillium3* 2.63%), *Apergillus* 28.95% (*Aspergillus flavus* 11.84%, *Aspergillus terreus* 6.58%, *Aspergillus fumigatus* 6.58%, *Aspergillus niger* 3.95 %), *Rhizopus* 3.95% et *Mucor* 2.63% et 17.11% de moisissures non identifiées.

La figure 26 représente la fréquence de chaque type de champignon (levures et moisissures) par rapport au nombre total d'échantillons.



**Figure 26 :** Spectre de fréquence des levures et moisissures en % des échantillons.

La figure 26 montre clairement la dominance des levures par rapport aux moisissures. Selon Snowdon et Cliver (1996) le nombre de moisissures dans le miel est généralement faible. Troller (1979) pense que d'autres facteurs, outre que la pression osmotique, sont responsables de la faible présence des moisissures dans le miel. Ceci a poussé de nombreux scientifiques et laboratoires et parfois même certaines législations à compter un nombre combiné englobant les deux. Cependant, si on compte identifier les espèces des levures et des moisissures présentes dans les échantillons, on procède alors à la distinction entre le nombre de levures de celui des moisissures.

Le niveau de contamination de chaque moisissure par rapport aux échantillons est présenté dans le tableau 17. De ce tableau il apparaît clairement que *Penicillium4*, *Penicillium2*, *Penicillium1* et *Aspergillus flavus* sont les plus répandus.

### 3.3-Analyse Cytologique

L'analyse cytologique de 12 échantillons parmi les 29 échantillons effectuée par le laboratoire d'analyses médicales de Bernard Dory (France), a montré l'absence de cellules autres que les bactéries et les champignons.

Tableau 17 : Niveau de contamination par échantillon

éch	OGA					YM40G					YM40G	OGA	
	Penicillium1	Penicillium2	Mucor	Aspergillus niger	Penicillium3	Rhizopus	Aspergillus flavus	Aspergillus terreus	Penicillium4	Aspergillus fumigatus			Penicillium5
1	x	xx					xxx		xxx			286	34
2		x					x		x			14	8
3	xxx	xx					xxx		xxx			164	88
4		x										2	5
5	xx	xx						xx	xxx		x	210	70
6					x	x						2	4
7								x	x			16	1
8	x	x										0	13
9							x					3	0
10				x					x			6	1
11										x		15	4
12									xx			22	7
13		xx						x				9	12
14					x							0	5
15		x				x			xxx			142	8
16							x			x		2	0
17		x							xx			96	6
18	x	x				xx	xx		xxx			166	11
19		x								x		16	9
20								x				1	1
21	x									x		13	10
22								x				8	6
23				x			x		x			20	5
24				x					xx			16	2
25	x									x		15	32
26	xx						x					8	17
27							x					1	0
28				x							x	6	2
29				x							x	7	1

### 3.4-Résultats de l'Analyse statistique des données microbiologiques

L'analyse statistique s'est basée principalement sur les corrélations recherchant les liens entre les paramètres étudiés. Les résultats sont présentés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Matrice de corrélation des données microbiologiques avec  $r$ =coefficient de corrélation linéaire,  $P$ =probabilité associé à  $r$ .

	FMAT				Levures YM40G		levures_ plaques		Moisissures_ YM40G		Moisissures_ OGA	
	GN		PCA		r	p	r	p	r	p	r	p
	r	p	r	p								
GN	1											
PCA	0.75	<b>0</b>	1									
levuresYM40G	0.82	<b>0</b>	0.98	<b>0</b>	1							
levures_plaques	0.73	<b>0</b>	0.96	<b>0</b>	0.97	<b>0</b>	1					
Moisissures_YM40G	0.81	<b>0</b>	0.89	<b>0</b>	0.93	<b>0</b>	0.95	<b>0</b>	1			
Moisissures_OGA	0.58	<b>0.001</b>	0.8	<b>0</b>	0.77	<b>0</b>	0.77	<b>0</b>	0.78	<b>0</b>	1	

Il ressort du tableau 18, qu'il existe une forte corrélation entre les différents microorganismes et les différents milieux de culture et les différentes techniques. Ainsi :

- 1- Le nombre de la flore mésophile (FMAT) sur les deux milieux de culture est hautement significatif ( $r=0.75$ ,  $p=0.000$ )
- 2- On note une forte corrélation entre la flore totale sur PCA et le nombre de levures sur milieu YM40G ( $r=0.98$ ,  $p=0.000$ ), les levures obtenues par comptage direct ( $r=0.96$ ,  $p=0.000$ ), le nombre de moisissures sur YM40G ( $r=0.89$ ,  $p=0.000$ ) et les moisissures sur OGA ( $r=0.8$ ,  $p=0.000$ ).
- 3- Des résultats similaires entre la flore mésophile sur milieu GN et les levures et moisissures avec un coefficient de corrélation élevé.
- 4- Un résultat important ressort de cette étude montrant une forte corrélation entre les levures sur plaque et celles obtenues sur milieu MY40G ( $r=0.97$ ,  $p=0.000$ ) et les moisissures sur YM40G ( $r=0.95$ ,  $p=0.000$ ).

La technique de comptage des levures sur plaque semble prometteuse et nécessite plus d'échantillonnage pour cerner tous les paramètres ayant trait à la technique.

Le miel est un produit très stable en ce qui concerne les microorganismes, notamment en raison: de sa faible  $a_w$ ; son pH acide (3,5 - 4,5); son osmolarité et à cause de ses inhibines, en particulier le peroxyde d'hydrogène.

Le nombre de la flore totale fournit des informations très générales et est utile en tant que point de comparaison avec d'autres données et comme indicateur général de la qualité microbienne du miel. La recherche d'autres types de germes présents est souvent nécessaire conjointement avec un nombre élevé de flore mésophile (Tysset et al., 1970a)

Les moisissures et les levures sont les seuls microbes qui sont capables de pousser dans le miel. Certaines bactéries survivront au miel, mais leur croissance est peu probable. En pratique, les spores de Bacillus, de moisissures et de levures ont tendance à être présentes dans le miel sur une base régulière (Snowdon et Cliver, 1996).

Les levures et moisissures, ne semblent pas être aussi sensibles à l'eau oxygénée que les bactéries (White et al., 1962).

Bien que les microorganismes (à l'exception de la levure et des moisissures) ne puissent pas pousser dans le miel, ils peuvent être transmis lorsque le miel est utilisé comme ingrédient dans la préparation d'autres aliments et se multiplier jusqu'à détérioration du produit (Snowdon, 1999).

### 3.5- Corrélation entre les paramètres physicochimiques et les microorganismes

Les résultats de la recherche d'éventuelle corrélation entre les paramètres physicochimiques et les microorganismes détectés dans les miels analysés sont regroupés dans le tableau 19.

Tableau 19: Corrélation entre les paramètres physicochimiques et le nombre de microorganismes présents dans le miel.

Correlation	teneur_eau		HMF		pH		Acidie_libre		CE		Cendres	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
GN	0.47	<b>0.0105</b>	0.34	0.073	-0.3	0.109	0.36	<b>0.054</b>	-0.47	<b>0.011</b>	-0.34	0.068
PCA	0.61	<b>0.0004</b>	0.24	0.213	-0.28	0.143	0.3	0.12	-0.44	<b>0.018</b>	-0.35	0.066
Levures (YM40G)	0.58	<b>0.0009</b>	0.24	0.202	-0.26	0.181	0.35	0.064	-0.47	<b>0.011</b>	-0.37	<b>0.05</b>
levures_plaques	0.53	<b>0.003</b>	0.2	0.308	-0.22	0.246	0.34	0.076	-0.44	<b>0.017</b>	-0.34	0.067
Moisissures_YM40G	0.5	<b>0.0059</b>	0.27	0.16	-0.25	0.189	0.35	0.066	-0.48	<b>0.008</b>	-0.36	0.057
Moisissures_OGA	0.52	<b>0.0042</b>	0.17	0.379	-0.36	0.057	0.14	0.476	-0.36	<b>0.058</b>	-0.33	0.085

Nous remarquons l'existence d'une corrélation significative entre la teneur en eau et les microorganismes sur les différents milieux. Ceci montre l'importance de la teneur en eau dans la préservation de la qualité de ce produit.

On note corrélation négative significative entre la Conductivité électrique et les différents micro-organismes (FMAT, Levure et moisissures) quel que soit le milieu de culture ou la technique utilisés.

Il existe une corrélation faible et non significative entre l'acidité libre et la flore totale (GN), les levures et les moisissures sur YM40G.

On remarque une faible corrélation significative entre la teneur en cendre et les levures isolées sur milieu YM40G.

Il semble que la teneur en HMF n'a pas d'influence sur les différents microorganismes.

## Conclusion

Les résultats analytiques physicochimiques et microbiologiques des miels produits dans la région de Tiaret indiquent un bon niveau de qualité.

Les valeurs de l'HMF et de l'acidité libre ont été très satisfaisantes, ce qui montre une bonne qualité de ces miels. L'exception concerne l'échantillon 23, qui a une valeur en HMF légèrement supérieure à la norme européenne mais reste inférieure à la norme Codex Alimentarius pour les pays chauds (Tiaret se caractérise par un climat chaud et sec en été, période des premières récoltes du miel). Le pH des miels étudiés est acide. Sept échantillons ont des valeurs supérieures à 4,5 et peuvent donc avoir une origine de miellat. Alors que d'autres, peuvent avoir une origine florale ou mélange nectar et miellat. Le contenu en eau est conforme aux normes européennes et internationales à l'exception d'un seul échantillon avec une teneur eau légèrement supérieure aux normes internationales.

La conductivité électrique et les valeurs de cendres sont faibles et cohérentes les unes avec les autres. Selon la plupart des scientifiques, la conductivité électrique est fortement liée au contenu minéral. Ceci est confirmé par l'analyse statistique de nos résultats avec forte corrélation entre ces deux paramètres.

Les résultats des analyses microbiologiques montrent l'absence de germes pathogène (Staphylocoque, Salmonelles et Shigelles), toxigènes, (C. botulinum, C. perfringens, B. cereus), indicateurs de qualité hygiénique (Coliformes totaux et fécaux, Streptocoques fécaux) et une charge très satisfaisante en flore inoffensive pour le consommateur. Ceci nous permet de dire que les échantillons étudiés présentent une très bonne qualité microbiologique et hygiénique.

Néanmoins, certains échantillons ont une teneur élevée en levure, mais avec des teneurs en eau inférieures à 18% et peuvent être sujet au risque de fermentation si les conditions de stockage ne sont pas respectées et seulement trois échantillons contiennent une charge en levure et/ou en flore totale élevée avec une teneur en eau dépassant 18% remplissant toutes les conditions d'altération microbienne.

Si la qualité physicochimique de tous les miels étudiés est conforme aux normes européennes et du Codex Alimentarius, la qualité microbiologique est également très bonne en ce qui concerne la flore pathogène et toxigène. Quant à la flore d'altération, bactéries banale et levures, 80% d'échantillons répondent aux normes de qualité exigées par certains

scientifiques et la réglementation spécifique au miel de certains pays tel que l'Argentine, deuxième plus grand producteur et premier exportateur de miel. Les 20% ou moins d'échantillons restant, peuvent être améliorés du fait que la flore décelée est une flore de contamination secondaire dont le taux peut être fortement réduit en se conformant aux bonnes pratiques de production : hygiène des locaux, du matériel et des manipulateurs. La flore fongique est représentée essentiellement par les levures. Ceci ne fait pas l'exception du fait que cette constatation a été faite par de nombreux travaux scientifiques.

A l'instar de nos résultats, il ressort que le meilleur milieu pour la recherche de la flore mésophile aérobie totale du miel est le milieu PCA et le milieu YM40G est le plus propice pour la recherche et l'isolement des levures osmophiles et moisissures xérophiles.

Les levures rencontrées dans les échantillons de miel de la région de Tiaret sont :

*Saccharomyces cerevisiae* (79.3%), *Zygosaccharomyces rouxii* (72.41%), *Zygosaccharomyces bailii* (58.62%), *Kluyveromyces* (37.93%), *Torulaspota* (31%), *Debaryomyces* (17.24%), *Hansenula* (10.34%) et *Pichia* (10.34%).

Les moisissures répandues dans nos échantillons sont : *Penicillium spp* (47.37%), *Apergillus* (28.95%) (*Aspergillus flavus* 11.84%, *Aspergillus terreus* 6.58%, *Aspergillus fumigatus* 6.58%, *Aspergillus niger* 3.95 %), *Rhizopus* (3.95%) et *Mucor* (2.63%).

En fin de ce travail certaines recommandations peuvent être faites, ainsi :

- Formation des apiculteurs pour augmenter la production
- Assister les jeunes apiculteurs surtout ceux sortant des centres de formation agricole
- Programmer des formations à tous les apiculteurs pour améliorer les conditions de production d' autant plus que la politique du pays s'oriente vers les productions agricoles afin de diminuer les effets de la diminution des rentes pétrolières
- Améliorer encore plus la qualité microbiologique du miel en respectant les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de production (BPP) et de fabrication (BPF) :
  - Hygiène du personnel
  - Nettoyage du matériel d'extraction ( coteaux, extracteurs, maturateurs, filtres...)
  - Désinfection des pots de conditionnement.
  - entretien des lieux d'extraction.

**Références bibliographiques**

Accorti M; Gioia Piazza M; Persano Oddo L (1987) La conductivité électrique et le contenu en cendre du miel. *Apiacta* 22 (1): 19-20.

Adjlane N., Hadj Ali L.M. , Benamara M., Bounadi O , Haddad N. (2017). Qualité microbiologique du pollen produit par les apiculteurs et commercialise en Algérie. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol 11, N°1, p 31-39

Ait hammou M. (2015). Analyse taxonomique et écologique de la région de Tiaret. Thèse de doctorat, Univ oran1 ahmed benbella. P277

Alphandéry R. (1992). La route du miel. Le grand livre des abeilles et de l'apiculture. Ed Nathan. P 262

Amir Y., Yesli A., Bengana M., Sadoudi R., Amrouche T. (2010). Physico-chemical and microbiological assessment of honey from Algeria. *EJEFAChe*, 9(9), 1485-1494

Amon SS, Damus K, Chin J. (1981). Infant botulism: epi-demiology and relation to sudden infant death syndrome. *Epidemiol Rev.*; (3):45–66.

Amri A and Ladjama A (2013). Physicochemical characterization of some multifloral honeys from honeybees *Apis mellifera* collected in the Algerian northeast. *African Journal of Food Science*. Vol. 7(7) pp. 168-173, July . DOI: 10.5897/AJFS2013.0986

Amri A and Ladjama A (2015). Enzymes activities, Hydroxymethylfurfural content and pollen spectrum of some Algerian honey. *African Journal of Agricultural Research*. Vol. 10(7) pp. 613-622, February . DOI: 10.5897/AJAR2014.9231

Amrouche L. et Kessi L., (2003) - Etude de la qualité physico-chimique de quelques miels. Mémoire. Ingénieur. U.S.T.H.B. ALGER. 49 p.

Anchling F (2001). Apiculture en sommeil, apiculture en éveil. *Revue abeille de France*. P 10-13

ANSES ( 2015). Avis de l'Anses , Saisine n° 2011-SA-0170 du 15 mars 2012.

Arnon, S. S., Damus, K., & Chin, J. (1981). Infant botulism: Epidemiology and sudden infant death syndrome. *Epidemiologic Reviews*, 3, 45–66.

- Aureli P, Francios G, and Fenicia L, (2002). Infant botulism and honey in Europe: a commentary. *Pediatr Infect Dis J*, 2002;21:866–868.
- Austin.J.W, (1998) : Détection de *Colstridium botulinum* dans le miel et les sirops ; Direction générale de la protection de la santé OTTAWA, CANADA ;
- Avril. J.L (1991), Dictionnaire pratique de bactériologie clinique, 2eme édition; Ed. Marketing, Paris, P 16.
- Becker A et Schweitzer P. (2000). Fermentation des miels : Intérêt du dosage du glycérol (glycérine). *CTAM –Lorraine. Revue l’abeille de France. N° 856 .p04*
- Becker A. (2004). Botulisme et miel. *Abeille de France. Apiservices. Copyright; Ed. 1995-2004.*
- Bekele B, Tetemke M, Mogessie A (2006). Yeast and lactic acid flora of tej, an indigenous Ethiopian honey wine: Variations within and between production units. *Food Microbiology Vol 23, Issue 3, May , 277-282*
- Benaziza-Bouchema D et Schweitzer P (2010). Caractérisation des principaux miels des régions du Nord de l’Algérie. *Cah Agric, vol. 19 • N° 6 • novembre-décembre. P 432-438*
- Berche P, Gaillard J-L et Simonet M (1994). *Bactériologie : bactéries des infections humaines*, © Ed. Flammarion Médecine- sciences, p 660
- Bettar I, M. Lourdes Gonza´lez-Miret b, Dolores Hernanz c, Alfredo Marconi d, Francisco J. Heredia b, Anass Terrab (2015). Characterisation of Moroccan Spurge (*Euphorbia*) honeys by their physicochemical characteristics, mineral contents and colour. *Arabian Journal of Chemistry* . <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.01.003>
- Biri M. (1999). *Le grand livre des abeilles: l'apiculture moderne*. Edition DEVECCHI S.A. PARIS. p p 76 – 191.
- Boeufrag J.M., Bonaly R. et Larpent J.P. (1991). L’identification des levures. In *Biotechnologie des levures*. Ed masson. P 171-204
- Bogdanov S, Martin P, Lullmann C, Borneck R, Flamini C, et al. (1997). Harmonised methods of the European honey commission. *Apidologie. (Extra issue): 1–59.*

Bogdanov S., Lüllmann C., Martin P., von der Ohe W., Russmann H., Vorwohl G., Persano Oddo et al (1999). Honey Quality and International Regulatory Standards: Review of the Work of the International Honey Commission. Swiss Bee Research Centre. P 7

Bogdanov S et Blumer P (2001). Propriétés antibiotiques naturelles du miel, Centre Suisse de recherches apicoles. Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld, CH- 3003 Berne; RSA 98 (3), pp: 107-114.

Bogdanov S, Bieri K, Gremaud G, Iff D, A. Känzig, K. Seiler, H. Stöckli, K. Zürcher. (2004a). Produits apicoles. 23A Miel. Revue par le groupe d'experts "produits apicoles". MSDA.; 1- 37.

Bogdanov S, Rouff K, Persano-Oddo L,(2004b). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. Apidologie; (35): 4-17

Bogdanov S. Gfeller M (2006). Classification of honeydew and blossom honeys by discriminant analysis. ALP science, Nr. 500

Bogdanov S (2011). The honey book. Bee Product Science

Borneck R, Gonnet M (1976). Hygiène des produits de la ruche in l'abeille règles d'élevage, les produits de la ruche règles d'hygiène. Edition : Information technique des services vétérinaires. P 94

Bornesent . (1999). Evaluation de la qualité des poissons frais. Ed.Huss. H.H.p198.

Bourgeois CM et Leveau J.Y (1980). La microflore aérobie mésophile totale in : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Ed. APRIA .672 P.

Bouix M et Leveau J .V (1980). Les levures in technique d'analyses et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Edition technique et documentation, paris, volume 03. P 130-143

Bouix M et Leveau J. V (1993). Microbiologie industrielle Tome 01 .Edition Lavoisier technique et documentation. Paris Pp 5-32

Cahagnier B. (1998). Moisissures des aliments peu hydratés. Ed tec & do lavoisier. P 222

Caillas A (1984). Le rucher de rapport, les produits de la ruche, traité pratique, l'apiculture moderne .10 édition Paris.PP:492-497.

Chauvin R. (1987). La ruche et l'homme. Ed. Calmann-Levy, Paris, p32-33.

- Chefrour A, Draiaia R, Tahar A, Ait Kaki Y, Bennadja S and Battesti MJ (2009). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some north-east Algerian honeys. *AJFAND*. Volume 9 No. 5 August. P 1276-1293
- Chouia A. (2014). Analyses polliniques et caractérisations des composés phénoliques du miel naturel de la région d'Ain zaâtout. *Mem Mag Biologie. Univ Biskra*. P 102.
- Ceyhan, N. et Ugur A. ( 2001). Investigation of in vitro antimicrobial activity of honey. *Revista di Biologia / Biology Forum*, 94: 363–72
- Chin, J., Arnon, S. S., & Midura, T. F. (1979). Food and environmental aspects of infant botulism in California. *Reviews of Infectious Diseases*, 1, 693–696
- Clement H. (2003). *Créer son rucher, les cahiers de l'élevage*. Edition : Rustica Paris. P 112
- Clément H. (2014). *L'apiculture pour les nuls*.first edition. Paris. P376
- Codex Alimentaire F.A.O/O.M.S. (1993) : Extraits de la révision de Mai 1993. p02.
- Codex alimentarius Commission (1999). Programme mixte FAO/OMS. Projet de norme codex révisée pour le miel. CX/S 00/3 Novembre 1999
- Codex Alimentarius Commission (2001). Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires.
- Codex Alimentarius Commission Codex standard 12, Revised Codex Standard for Honey, Standards and Standard Methods. FAO- Rome ; 2001. p. 1–7. <http://www.codexalimentarius.net>Codex alimentaire (2001).
- Collins CH, Lyne PM, Grange JM. ( 1999). Collins and Lyne's microbiological methods. 7th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann;. p. 213–21.
- Conti M E, FinoiaMG, Fontana L, Mele G, Botrè F and Iavicoli I . (2014). Characterization of Argentine honeys on the basis of their mineral content and some typical quality parameters. *Chemistry Central Journal* 8:44
- Coll Cárdenas F, Villat C, Laporte G, Noia M, Mestorino N. (2008). Microbial characteristic of honey. A Review. *Veterinaria Cuyana Año 3 n° 1 y 2*.
- Crane, E. (1979). *Honey: A Comprehensive Survey*, Heinemann, London. p 608

Criseo et al (1994) : Quel sont les microorganismes que l'on isole dans le miel ? In : caractéristiques microbiologique du miel (UNAAPI).

C.R.C , ch. 287 — 27 octobre (2015). Règlement sur le miel. Publié par le ministre canadien de la Justice à l'adresse suivante :<http://lois-laws.justice.gc.ca>

De Korry (1998), Moisissures des aliments peu hydratés; © Ed. Technique et documentation, P 21.

Delarras C. (2000). Microbiologie de l'environnement avec législation; © Ed. Gaétan Morin Editeur; Europe, Paris, P 74.

Diagnostic Pasteur (1987). Milieux et réactifs laboratoire de Pasteur: Mycologie, immunologie.

Djossou J.A., Tchobo F.P., Yédomonhan H., Alitonou A.G. & Soumanou M.M. (2013). Evaluation des caractéristiques physico-chimiques des miels commercialisés à Cotonou. *Tropicultura*, 31, 3, 163-169

Donadiou Y, (1978): Le miel, les thérapeutiques naturelles. 2ème Edition. Edition Maloine. p 32.

Donadiou Y (2003). Qu'est-ce que le miel ? Faculté de médecine, Paris, P 6

Douey D et Wilson P (2004): Dénombrement des levures et des moisissures dans les aliments division de l'évaluation Bureau des dangers microbiens Direction des aliments, Santé Canada in agence canadienne d'inscription des aliments P: 1-19

Dromigny E. (2012). Les critères microbiologiques des denrées alimentaires. Ed tec & doc lavoisier. P 509

Epirem (2008). Bulletin Épidémiologique de la Réunion et Mayotte. Juillet 2008. P 3-4

Finola MS, Mirta F, Lasango C, Marioli JM. (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina, Departamentos de Química y de 10-Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicoquímicas y Naturales, Universidad Nacional de Rio Cuarto. *Food Chemistry*. 2007; 100:1649–953.

Fléché C., Clément, M.-C. Zeggane S & Faucon J.-P. (1997). Contamination des produits de la ruche et risques pour la santé humaine : situation en France. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 16 (2), 609-619

- Fronty A. (1997), L'apiculture d'aujourd'hui, 2eme édition; Ed. Rustica, Paris, p 222
- Gilliam M., Moffett J.O. et KAUFFELD N.M (1983). Examination of floral nectar of citrus, cotton and Arizona desert plants for microbes. *Apidologie* 14, pp: 299-302.
- Gliński Z., Chmielewski M. (1994) Pathology and therapy of diseases of usable insects. Agricultural Academy Press, Lublin, Poland.
- Gomes S, Dias L G., Moreira L.L., Rodrigues P, Estevinho L(2010). Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 48, Issue 2. FebruaryPages 544-548
- Gonnet M. (1963). L'hydroxyméthylfurfural dans les miels. Mise au point d'une méthode de dosage. *Ann. Abeille*, 6, (1), 53-67.
- Gonnet M, Lavie P.et Louveaux J. (1964). La pasteurisation des miels. *Ann. Abeilles*, 7 (2) : 81-102
- Gonnet M, (1982). Le miel, composition, propriétés, conservation. INRA station expérimentale d'apiculture.
- Gonnet M. (1986). L'analyse des miels. Description de quelques méthodes de contrôle de la qualité. *Bull.Tech. Apic*, 13(1), 17-36.
- Gonnet M., (1991). Composition du miel. Edition APIDA. p105
- Goût J., Jardel C., (1998). Le monde du miel et des abeilles. Michel Larrieu, Paris. P160
- Graham, J.M. (Ed.) (1992). *The Hive and the Honey Bee*, Dadant and Sons, Hamilton, Illinois. P3330
- Guillaume. P (2004). Milieu de culture PCA, milieu de culture GN, [www.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio](http://www.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio).
- Guiraud. JP, (1998). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris, pp 79-352
- Guiraud JP, Rosec JP (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. ed. AFNOR.;1-96.
- Guiraud JP. (2003). Microbiologie alimentaire. Paris: Dunod . p 651

Haderbache L, Bousdira M and Mohammedi A (2013). *Ziziphus Lotus* and *Euphorbia bupleuroides* Algerian Honeys. *World Applied Sciences Journal* 24 (11): 1536-1543.

Hamdi J N. et Zeako B .C (2000). Antimicrobial potentiel of honey on some microbial isolates; © Sultan Qaboos university, pp: 75-78.

Hennebert G.L (1998). Classification et identification des levures in *Moisissures des aliments peu hydratés*. Edition Technique et documentation. Paris P 101 - 115.

Huchet E., Coustel J., Guinot L., (1996). Les constituants chimiques du miel, méthodes d'analyses chimiques. Ecole nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires. Cedex- France. p 14.

Huhtanen CN, Knox D, Shimanuki H. (1981). Incidence and Origin of *Clostridium botulinum* Spores in Honey. *J Food Protection*.; (44):812–814. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-44.11.812>

Inspecteurs de mycologie des laboratoires internationaux (2005). Environmental protective agency. *Aspergillus species*. Copyright © 2002-2005, dernière révision 13-07-2005. STTP : WWW, mold - PH/ aspergillus HTM

International Honey Commission (IHC) (2009). Harmonized methods of the international honey commission. <http://www.bee-hexagon.net/en/network.htm>.; 1-63.

ISO 2293 (1993). Recueil des normes française : Contrôle de la qualité des produits alimentaires : contrôle microbiologique ; Paris, p 802.

ISO 4832 (1993). Méthode pour le dénombrement des coliformes en milieu solide. p 4

Iurlina M. O , Fritz R.(2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology* 105, 297– 304

Jean-Prost P et Le Conte Y. (2005). Apiculture, connaître l'abeille, Conduire le rucher. 7<sup>ème</sup> éd Lavoisier, France p 698

Joffin C, Joffin J.N (1999): Microbiologie alimentaire (5eme édition) centre régional de documentations pédagogiques d'AQUITOINE France PP:69-72.

Journal officiel des Communautés européennes . 12.1.2002 N°10, 47-52.( The Council of the European Union (2002). Council Directive 2001/110/ec of 20 December 2001 relating to honey).

- Jouve L. J (1996). La qualité microbiologique des aliments maîtrise et critères, 2eme édition; Ed. Polytechnica, Paris, pp : 186-354.
- Kačaniová M., Chlebo R., Kopernický M., Trakovická A.( 2004). Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia Microbiol.*; (49): 169-171.
- Kitambala K (1999). Etude bactériologique et biochimique du miel vendu au marché central de Bukavu (Congo). *Tropicultura*, 16-17, 4, 189-192.
- Kautter DA, Timothee LJr, Solomon HM, Lynt RK. (1982). *Clostridium botulinum* Spores infant foods: A survey. *J Food Protection.*; (45):1028–9. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-45.11.1028>
- Koenig H. (1995). Guide de mycologie médicale. Ellipse édition Marqueting Paris. P 288 40
- Kunová S , Kačaniová M, Haščík P, Čuboň J (2015). Microbiological and chemical quality of slovak and european honey. *J Microbiol Biotech Food Sci.* 4 (special issue 1) 41-44
- Kuplulu O, Goncuoglu M, Ozdemir H, Koluman A (2006). Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in Turkey. *Food Contol.*; (17):222–4.
- Lambin S. et German A (1969). Précis de microbiologie, 2eme édition, tome I. Ed. Masson et Cie, Paris, pp 152-160.
- Larpent J. P (1997), Microbiologie alimentaire, technique de laboratoire; Ed. technique et documentation, Lavoisier, Paris. P1072
- Larpent-Gourgaud M, Larpent JP. (1997). Mémento technique de microbiologie. Lavoisier, Tec et Doc. P 280
- Leclerc H. Mossel P.A.A (1989). Microbiologie de tube digestif. l'eau et les aliments. Tome 2. Ed. Doin. Paris. P 260
- Leclerc H, Mosson D A A, Bernier J J et Fourries A (1989). Microbiologie : le tube digestif l'eau et les aliments. Editeurs Doin Paris. P 478
- Lesage-Meesen L, Cahagnier B (1998). Mécanismes d'adaptation des micromycetes aux activités de l'eau réduites in Moisissures des aliments peu hydratés. Ed Technique et documentation Paris PP:25-27.
- Libis E. (1971). L'apiculture pour tous. Edition: © Flammarion Paris. Page134.
- Loirriche N, (1979). Les abeilles: pharmaciennes ailées. Edition MIR-MORSCOU. p 137

- Louveaux J. (1968a). Composition, propriétés et technologie du miel. In traité de biologie de l'abeille. Tome 3 : les produits de la ruche, Sect l'abeille et la fleur © Ed. Masson et CIE, Paris. P 277-318.
- Louveaux J. (1968b). L'analyse pollinique des miels. In traité de biologie de l'abeille. Tome 3: les produits de la ruche, Sect l'abeille et la fleur; Ed. Masson et CIE, Paris. P 325-362.
- Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwhol, G., (1978). Commission internationale de botanique apicole de L'U.I.S.B. Les méthodes de la méliko-palynologie. *Apidologie* 1 (2), 211-227.
- Louveaux J. (1980). Les abeilles et leur élevage. Edition Hachette. p 325
- Louveaux J. (1985). Les abeilles et leurs élevages. Ed OPIDA. P 265.
- Makhloufi C, Schweitzer, Azouzi B, Persano Oddo L, Choukri A, Hocine L, Ricciardelli D'Albore G. (2007). Some Properties of Algerian Honey. *Apiacta* (42). P 73 - 80
- Makhloufi C, Kerkvliet J D, Ricciardelli D'Albore G, Choukri A, Samar R (2010). Characterization of Algerian honeys by palynological and physico-chemical methods. *Apidologie* 41 509–521.
- Makhloufi C (2011). Melissopalynologie et étude des éléments bioactifs des miels algériens. Thèse de Doctorat en Sc. Agronomiques. Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach. P 184
- Marcel M, Aubineau M, Bermond A, B Ougler J, Vey B et Estrade J. R (2002), Larousse Agricole, le monde agricole au 21 siècle; © Ed. Larousse/ Vuff, P 418.
- Marchenay P. (1984). L'homme et l'abeille. Edition Berger Levrault- Paris. P 209
- Martins HM, Martins ML, Bernardo FMA. (2003). Bacillaceae spores, fungi and aflatoxins determination in honey. *Revista Portuguesa De Ciências Vet- erinárias*. 98(546) :85–8.
- Masson M (2003). Le miel, un antibiotique naturel, Encyclopédie A à Z; Ed. Radio-Canada.ca. <http://www.radio-canada.ca/actualite/decouverte/encyclopedie.html>.
- Mbogning E, Tchoumboue j, Damesse F, Sanou Sobze M.& Canini A (2011). Caractéristiques physico-chimiques des miels de la zone Soudano-guinéenne de l'Ouest et de l'Adamaoua Cameroun. *Tropicultura*, 29, 3, 168-175
- Mehdi Y, Mebrek S, Djebara S, Aissaoui Y, Benahmed K, Benali Ai, Benali M & Belbraouet S (2016). Characterization of Algerian Honey from Tiaret Region and Immunoassay Study of Its Immunomodulatory Effect in BALB/c Mice. *Journal of Food Research*; Vol. 5, No.1. 26-32

- Mendes E, Brojo PE, Ferreira I, Ferreira MA (1998). Quality evaluation of Portuguese honey. *Carbohydr. Polym.* 37(3):219-223.
- Mermoz C. (2015). Intoxication au miel fou : état des lieux des connaissances actuelles. Thèse de Doctorat en pharmacie. Lyon 4<sup>ème</sup>. P147
- Midura, T. F. (1996). Update: infant botulism. *Clinical Microbiology*, 9, 119–125.
- Midgley G, Yvonn E, Clayton M. et Roderick. J. H (1998). Atlas de poche de mycologie. Flammarion. Paris, p15.
- Minh-Hà \_ Pham-Delegué (1999). Les caractéristiques de l'ouvrière. Connaître et découvrir les abeilles. Ed Minerva. Genève (Suisse). P 214
- Molan P C (1992a). The Antibacterial Activity of Honey.1. The nature of the antibacterial activity *Journal Bee World* Volume 73, - Issue 1
- Molan P C (1992b). The antibacterial activity of honey: 2. Variation in the potency of the antibacterial activity . *Journal Bee World* Volume 73, Issue 2
- Monetto A. M., Francavilla A., Rondini A., Manca L., Siravegna M., et Fernandez R. (1999). A study of botulinum spores in honey. *Anaerobe*, 5, 185–186.
- Moreau C (1996). Les moisissures in microbiologie alimentaire. Tome I. Edition: Technique and documentation. Paris. P 237-247.
- Morse, R. and Hooper, T. (1985). *The Illustrated Encyclopedia of Beekeeping*. E.P. Dutton, Inc. NY, NY.
- Naman M., Faid M, El adlouni C. (2005). Microbiological and physico-chemical properties of moroccan honey. *Int J Agri Biol.*; (7):773–6.
- Nasser Laila A. (2004). Isolation and characterization of fungi contaminating packaged honey commonly consumed in saudi arabia. *Ass. Univ. Bull. Environ. Res.* Vol. 7 No. 1, March. 1-7
- Nauciel. CH, Vilde. J. L (2005), *Bactériologie médicale*; © Ed. Masson, Paris, P 116.
- Nedji N (2015). Effets des acaricides sur l'abeille domestique *Apis mellifera intermissa* et analyse de l'activité antimicrobienne de la propolis et du miel. Thèse de Doctorat en BA. Univ. Annaba. P 133

NF ISO 4832 (V 08-015). Juillet (2006). Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes. Méthode par comptage des colonies.

NF V08-050. Avril (2009). Microbiologie des aliments. Dénombrement des coliformes présumés par comptage des colonies obtenues à 30°C.

NF V08-060. Avril (2009). Microbiologie des aliments. Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44°C.

National Honey Board (2002). I'm here to tell you the bear facts about honey, pp: 2-7. [www.nhb.org](http://www.nhb.org).

Olds R.J. (1979). Atlas en couleurs de microbiologie. Ed. Maloine, p 289 .

Omafuvbe B. O. and Akanbi O. O. (2009). Microbiological and physico-chemical properties of some commercial Nigerian honey. African Journal of Microbiology Research Vol. 3(12) December. P 891-896

Ouchemoukh S., Louaileche H., Schweitzer P. (2007). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. J. Food. Control, 18, 52-58.

Persano Oddo, L., Piazza, M. G., Sabatini, A. G., & Accorti, M. (1995). Characterization of unifloral honeys. *Apidologie*, 26, 453-465.

Persano Oddo, L., Piro, R., with the collaboration of: Bruneau, E., Guyot-Declerck, C., Ivanov, T., Piskulova, J., Flamini, C., Lheritier, J., Morlot, M., Russmann, H., Von der Ohe, K., Gotsiou, P., Karabournioti, S., Kefalas, P., Passaloglou-Katrali, M., Thrasyvoulou, A., Tsigouri, A., Marcazzan, G. L., Piana, M. L., Piazza, M. G., Sabatini, A. G., Kerkvliet, J., Godinho, J., Bentabol, A., Ortiz Valbuena, A., Bogdanov, S., & Ruoff K. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35, S38-S81

Petransxiene D et Lapied L (1981). La qualité bactériologique du lait et des produits laitiers, analyses et tests, 2eme édition Technique et Documentation, Lavoisier, Paris. P 228

Pfefferle K. (1984). L'apiculture avec la Ruche à hausses multiples et la varroase. 6ème Edition. Edition Européens Apicoles.

Philippe J. M (2007). Le guide de l'apiculture; 3<sup>ème</sup> Ed Edisud. P 347

Philippe J.M, (1991): La pollinisation par les abeilles. Ed Edisud. P 182

- Piana M. L, Poda G, Cesaroni D, Cuetti L, Bucci, M.A et Gotti P (1991). Research on microbial characteristics of honey samples of Udine province. Riv. Sot. Ital. Sci. Aliment. 20, 293-301.
- Pilet C, Bourdon J.L, Btoma B, Marchal N, Balbastre C (1997). Bactériologie médicale et vétérinaire, systématique. Ed Doin. P 437
- Pridal A et Vorlova L (2002). Honey and its physical parameters. Czech J. anim. Sci. 47 (10) : 439-444.
- Rabeharifara Z.P.(2011). Caractérisation alimentaire des miels malgaches en vue d'une authentification : cas des miels d'eucalyptus. Mém DEA en Biochimie. Univ d'antananarivo, Madagascar. P 102
- Radwan S, EL-essawy A et Sarhan. M (1984). Experimental evidence for the occurrence in honey of specific substances active against microorganisms. Zbl. Mikrobiol. 139, 249-255
- Rall, V.L.M., Bombo A.J, Lopes T.F, Carvalho L.R., Silva M.G.. (2003) Honey consumption in the state of Sao Paulo:a risk to human health? Anaerobe (9 ) :299–303
- Ramírez Cervantes M.A., González Novelo S.A, Sauri Duch E. (2000). Les effets du traitement thermique sur la qualité du miel pendant l'entreposage – Mexique. Apiacta, 35 (4), 162 - 170
- Ratia G. (2001) : Cahier des charges concernant le mode de production biologique du miel. Bureau des signes de qualité et de l'apiculture biologique. France. p 13.
- Ravazzi G. (2014). Abeille et apiculture. Edition de Devecchi S.A. Paris. P159
- Raymonds R, (1979) : Le réseau de boucherie et le veau d'élevage. Ed: AGRIC, Nathan. Paris. p 53.
- Regard A., (1981): Apiculture intensive en rucher sédentaire. Edition J.B. Bailliere p p 97-131
- Ribeiro E.P., Seravalli E.A.G. (2004) - Química de Alimentos. São Paulo: Edgard Blücher, 184p.
- Richard E (1998). Les isolements en bactériologie in traité de microbiologie clinique. Ed Piccin Nuova Librarias. P. A. p 1400

- Riddle S (2016). The Chemistry of Honey. Bee Culture. The magazine of American Beekeeping. P 6
- Roquebert M. F (1998). Taxonomie des moisissures in moisissures des aliments peu hydratés. Ed Tech et Doc. P37 à 91.
- Root, A.I. (Ed.). (1983) The ABC and XYZ of Bee Culture. The A. I. Root Co., Medina, OH.
- Róžańska H (2011). Microbiological quality of polish honey. Bull Vet Inst Pulawy 55, 443-445
- Ruoff, K. et Bogdanov, S., (2004). Authenticity of honey and other bee products. Apiacta 38, 317–327.
- Salamanca Grosso, G; Henaó Rojas, C; Moreno, I; Luna, A (2001). Características microbiológicas de las mieles tropicales de Apis mellifera. Galeria Apícola virtual. Apiservices.
- Schweitzer P. (1999). L’HMF et les miels. L’Abeille de France, 848, 190-191
- Schweitzer P. (2000). Journée de l'abeille à Sombernon. Revue abeille de France.
- Schweitzer P. (2002) : Les contrôles de qualité du miel. Laboratoire d’analyses et d’écologie Apicole. Abeille de France N° 883.
- Schweitzer P. (2005). Quelques éléments sur le vieillissement des miels. Abeille de France, n° 916.
- Serrano S, Villarejo Ma, Espejo R, Jodral M (2004). Chemical and physical parameters of Andalusian honey: classification of Citrus and Eucalyptus honeys by discriminant analysis. Food Chemistry 87, 619–625.
- Signorini R. (1978). Le miel source de vie. Edition Retz. CEPL. Paris. p 169
- Snowdon J.A. (1999) - The microbiology of honey - meeting your buyers’ specifications (Why they do what they do). Am. Bee J . 139: 51-60.
- Snowdon J.A., Cliver D.O. (1996) - Microorganisms in honey. Int. J. Food Microbiol. 31: 1-26.
- Sodré G.S., Marchini L.C., Moreti A.C.C.C., Rosa V.P., Carvalho C.A.L. (2007) - Conteúdo microbiológico de méis de Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) dos Estados do Ceará e Piauí. Boletim de Indústria Animal. 64: 39-42.

Solomon, H. M., & Lilly, T. Jr., (2001). *Clostridium botulinum*. Bacteriological Analytical Manual (8th Ed.), Chapter 17, disponible sur site : <http://vmcfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>.

Solomon HM, Johnson EA, Bernard DT, Arnon SS; Ferreira JL (2001). *Clostridium botulinum* and its toxins. In: Downes FP, Ito K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. Washington (DC): APHA; p.317-24.

Soria A.C., M. Gonzalez M., de Lorenzo C, Martinez-Castroa I, Sanza J. (2004). Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. *Food Chemistry* 85, 121–130.

Terrab A, Diez MJ, Heredia FJ (2002). Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chem.* 79:373-379.

Terrab A, Diez MJ, Heredia FJ (2003). Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys. II. Orange (*Citrus sp.*) honey. *International Journal of Food Science and Technology* 2003, 38, 387–394

Troller, J.A. (1979) Food spoilage by microorganisms tolerating low-A, environments. *Food Technol.* 33, 72-75.

Tysset, C. et Rousseau, M (1981). Le problème du microbisme et de l'hygiène des miels du commerce, *Rev. Med. vet.*132, 591-600.

Tysset, C., Durand, C. and Taliergio, Y.P. (1970a) Contribution to the study of the microbial contamination and the hygiene of commercial honey. *Rec. Med. Vet.* 146, 1471-1492.

Tysset, C., Brisou, J., Durand, C. and Malaussene, J. (1970b) Contribution to the study of intestinal microbial infection of healthy honey bees (*Apis mellifera*): inventory of bacterial populations by negative gram. *Ass. Diplom. Microbial. Fat. Pharm. Univ. Nancy Bull.* 116, 41-53.

Yahia S. et Yahaia W0. (2015). Analyses physico-chimique du miel de quelque miel de la wilaya : Ain Defla , Djendel, Bathia , Bourached et Miliana. Mém master. CU.Khemis-meliana. P 86

- Yaiche- Achour H et Khali M (2014). Composition physicochimique des miels algériens. Détermination des éléments traces et des éléments potentiellement toxiques. *Afrique Science* 10(2) 127 – 136.
- Yang Y, Battesti MJ, Djabou N, Muselli A, Paolini J, Tomi P, Costa J. (2012a). Melisso palynological origin determination and volatile composition analysis of Corsican “chestnut grove” honeys . *Food Chemistry* 132 , 2144–2154
- Yang Y, Battesti M-J, Paolini J , Muselli A, Tomi P, Costa J (2012b). Melissopalynological origin determination and volatile composition analysis of Corsican “Erica arborea spring maquis” honeys. *Food Chemistry* 134, 37–47
- Yang Y (2014). Qualification des miels de corse par une approche multifactorielle : diversité pollinique & variabilité chimique. Thèse de Doctorat. Université de corse-pascal paoli. P 198
- Ward WH et Truman KF (2001). A quality survey of Australian Honeys. Ed : RIRDC. P 41
- Watte P, Heclerc H, Buttiaux R, Guillaîne J (1977). *Microbiologie appliquée*; © Ed. DOIN, Paris, pp: 99-141. [www.he-sc.gc.ca](http://www.he-sc.gc.ca).
- Weiss, (1985): *L'apiculture de Week-end*. Edition Européen apicole BRUXELLE. p 252
- White JWJr. (1983). Honey. *Advances in Food Research*. (24):287–374.
- White J. W. Jr. (1994). The role of HMF and diastase assays in honey quality evaluation. *Bee World*, 75(3), 104–117.
- White JWJr., Subers M.H. and Schepartz A.T. (1962) The identification of inhibine the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochim. Biophys. Acta*. 73, 57-79.
- Zucchi P, Bassignani V, Carpana E. *Honey microbiology* (2001). *Industrie Alimentari.*; 40(409):1346–50.

## Annexes

Relation entre la teneur en eau et l'indice de réfraction de miel. Table de Chataway révisée et mise à jour par la Commission Internationale du miel (2002 et 2009).

<b>Teneur en eau g/100g</b>	<b>Indice de réfraction 20°C</b>	<b>Teneur en eau g/100g</b>	<b>Indice de réfraction 20°C</b>
13.0	1.5044	19.0	1.4990
13.2	1.5038	19.2	1.4885
13.4	1.5033	19.4	1.4880
13.6	1.5028	19.6	1.4875
13.8	1.5023	19.8	1.4870
14.0	1.5018	20.0	1.4865
14.2	1.5012	20.2	1.4860
14.4	1.5007	20.4	1.4855
14.6	1.5002	20.6	1.4850
14.8	1.4997	20.8	1.4845
15.0	1.4992	21.0	1.4840
15.2	1.4987	21.2	1.4835
15.4	1.4982	21.4	1.4830
15.6	1.4976	21.6	1.4825
15.8	1.4971	21.8	1.4820
16.0	1.4966	22.0	1.4815
16.2	1.4961	22.2	1.4810
16.4	1.4956	22.4	1.4805
16.6	1.4951	22.6	1.4800
16.8	1.4946	22.8	1.4795
17.0	1.4940	23.0	1.4790
17.2	1.4935	23.2	1.4785
17.4	1.4930	23.4	1.4780
17.6	1.4925	23.6	1.4775
17.8	1.4920	23.8	1.4770
18.0	1.4915	24.0	1.4765
18.2	1.4910	24.2	1.4760
18.4	1.4905	24.4	1.4755
18.6	1.4900	24.6	1.4750
18.8	1.4895	24.8	1.4745
		25.0	1.4740

*Résultats des analyses physicochimiques*

Echantillon	teneur en eau %	HMF meq/kg	pH	Acidité libre meq/kg	CE mS/cm	Cendres g/100g
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
<b>Moy</b>						
<b>Min</b>						
<b>Max</b>						
<b>ET</b>	<b>1.654</b>	<b>8.907</b>	<b>0.671</b>	<b>9.113</b>	<b>0.182</b>	<b>0.135</b>

Tableau des résultats d'analyse statistique

<b>Correlation</b>	teneur eau	HMF	pH	Acidité libre	CE	Cendres	GN	PCA	levures1 YM40G	levures plaques	Moisissures YM40G	Moisissures OGA
teneur_eau	1	0.33	-0.52	0.46	-0.49	-0.43	0.47	0.61	0.58	0.53	0.5	0.52
HMF	0.33	1	-0.24	0.58	-0.44	-0.39	0.34	0.24	0.24	0.2	0.27	0.17
pH	-0.52	-0.24	1	-0.62	0.68	0.71	-0.3	-0.28	-0.26	-0.22	-0.25	-0.36
Acidie_libre	0.46	0.58	-0.62	1	-0.73	-0.7	0.36	0.3	0.35	0.34	0.35	0.14
CE	-0.49	-0.44	0.68	-0.73	1	0.96	-0.47	-0.44	-0.47	-0.44	-0.48	-0.36
Cendres	-0.43	-0.39	0.71	-0.7	0.96	1	-0.34	-0.35	-0.37	-0.34	-0.36	-0.33
GN	0.47	0.34	-0.3	0.36	-0.47	-0.34	1	0.75	0.82	0.73	0.81	0.58
PCA	0.61	0.24	-0.28	0.3	-0.44	-0.35	0.75	1	0.98	0.96	0.89	0.8
levures1	0.58	0.24	-0.26	0.35	-0.47	-0.37	0.82	0.98	1	0.97	0.93	0.77
levures_plaques	0.53	0.2	-0.22	0.34	-0.44	-0.34	0.73	0.96	0.97	1	0.95	0.77
Moisissures_YM40G	0.5	0.27	-0.25	0.35	-0.48	-0.36	0.81	0.89	0.93	0.95	1	0.78
Moisissures_OGA	0.52	0.17	-0.36	0.14	-0.36	-0.33	0.58	0.8	0.77	0.77	0.78	1
<b>Probabilités</b>	teneur eau	HMF	pH	Acidité libre	CE	Cendres	GN	PCA	levures1 YM40G	levures plaques	Moisissures YM40G	Moisissures OGA
teneur_eau	1	0.0785	0.004	0.0112	0.007	0.0199	0.0105	0.0004	0.0009	0.003	0.0059	0.0042
HMF	0.0785	1	0.2065	0.0009	0.0171	0.0364	0.0726	0.213	0.2021	0.3076	0.1598	0.379
pH	0.004	0.2065	1	0.0004	0	0	0.1087	0.1433	0.1805	0.2463	0.1885	0.0573
Acidie_libre	0.0112	0.0009	0.0004	1	0	0	0.0541	0.1198	0.0635	0.0756	0.0655	0.4756
CE	0.007	0.0171	0	0	1	0	0.0105	0.0179	0.0105	0.017	0.0081	0.058
Cendres	0.0199	0.0364	0	0	0	1	0.068	0.0662	0.0502	0.0671	0.0571	0.0846
GN	0.0105	0.0726	0.1087	0.0541	0.0105	0.068	1	0	0	0	0	0.0011
PCA	0.0004	0.213	0.1433	0.1198	0.0179	0.0662	0	1	0	0	0	0
levures1	0.0009	0.2021	0.1805	0.0635	0.0105	0.0502	0	0	1	0	0	0
levures_plaques	0.003	0.3076	0.2463	0.0756	0.017	0.0671	0	0	0	1	0	0
Moisissures_YM40G	0.0059	0.1598	0.1885	0.0655	0.0081	0.0571	0	0	0	0	1	0
issures_OGA	0.0042	0.379	0.0573	0.4756	0.058	0.0846	0.0011	0	0	0	0	1

*Fréquence des levures par échantillon*

<i>Ech</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Torulaspota</i>	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Pichia</i>	<i>Debaryomyces</i>
1	xxx	xx			x		x	x
2	xx			x				
3	xxx	xx	xx	x	x	x		x
4		x	x					
5	xxx	xx	xx		x			x
6	xx	x		x			x	
7	xx			x				
8	x							
9		x	x					
10	x				x			x
11	x	x	x					
12	x							
13	xx	x	x	x	x			
14		x						x
15	xx		x			x	x	
16	xx	x	x					
17	xxx	x	xx	x	x			
18	xxx	x	x		x	x		
19	x	x						
20		x	x					
21	xx	x	x	x				
22	xx	x	x		x			
23	x	x			x			
24	xx	x	x	x				
25	xx	x	x					
26					x			
27		x	x					
28	x							
29	x	x	x	x	x			

Tableau 13 : Répartition des levures identifiées dans les différents échantillons

Levure	Echantillons concernés	Taux de présence
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1-3, 5-8, 10-13,15-19, 21-25, 28-29	79.3%
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1,3-6, 9, 11, 13,14, 16-25, 27, 29	72.41%
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	3-5, 9,11,13,15-18, 20-22,24, 25,27, 29	58.62%
<i>Torulaspota sp</i>	2,3, 6,7,1,17,21, 24, 29	31%
<i>Kluyveromyces</i>	1,3,5,10,13,17,18,22,23,26,29	37.93%
<i>Hansenula</i>	3,15, 18	10.34%
<i>Pichia</i>	1,6,15	10.34%
<i>Debaryomyces</i>	1,3,5,10,14	17.24%

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biososelle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

**ECHANTILLON DE MIEL N 1** (Dossier 775754 du 10/05/2006)

MYCOLOGIE  
 Levures pathogènes : néant

**B.DORY** \*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\* **F.NOEL**

Page 2 / 2  
 MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzwald - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) String

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biososelle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

**ECHANTILLON DE MIEL N 1**

SARREGUEMINES, le 16/05/2006  
 Dossier 775754 du 10/05/2006

**Tiaret, Ech 1**

**RAPPORT D'ANALYSES BIOLOGIQUES**

**EXAMEN BACTERIOLOGIQUE**

PRELEVEMENT MIEL 1  
 \*\*\*\*\*

CYTOLOGIE  
 Néant

**BACTERIOLOGIE**  
 EXAMEN DIRECT :  
 Absence de germes à l'examen direct

CULTURE :  
 Absence de Clostridium Botulinum  
 Absence de Clostridium Perfringens  
 Absence de bacillus Cereus  
 Absence d'Escherichia Coli  
 Absence de Staphylocoques  
 Absence de Streptocoques  
 Absence de Salmonelles et de Shigelles

**B.DORY** \*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\* **F.NOEL**

Page 1 / 2  
 MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzwald - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) String

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biososelle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

**ECHANTILLON DE MIEL N 3**

SARREGUEMINES, le 16/05/2006  
 Dossier 775755 du 10/05/2006

**Tiaret, Ech 3**

**RAPPORT D'ANALYSES BIOLOGIQUES**

**EXAMEN BACTERIOLOGIQUE**

PRELEVEMENT MIEL 3  
 \*\*\*\*\*

CYTOLOGIE  
 Néant

**BACTERIOLOGIE**  
 EXAMEN DIRECT :  
 Absence de germes à l'examen direct

CULTURE :  
 Absence de Clostridium Botulinum  
 Absence de Clostridium Perfringens  
 Absence de Bacillus Cereus  
 Absence d'Escherichia Coli  
 Absence de Staphylocoques  
 Absence de Streptocoques  
 Absence de Salmonelles, Shigelles

**B.DORY** \*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\* **F.NOEL**

Page 1 / 2  
 MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzwald - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) String

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biososelle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

**ECHANTILLON DE MIEL N 3** (Dossier 775755 du 10/05/2006)

MYCOLOGIE  
 Levures pathogènes : néant

**B.DORY** \*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\* **F.NOEL**

Page 2 / 2  
 MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzwald - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) String

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biomoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 57-100  
 Email : labory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 16**

Tiaret, Ech 4

SARREGUEMINES, le 16/05/2006  
 Dossier 775759 du 10/05/2006

**RAPPORT D'ANALYSES BIOLOGIQUES**

**EXAMEN BACTERIOLOGIQUE**

PRELEVEMENT MIEL 16  
 \*\*\*\*\*

CYTOLOGIE  
 Néant

**BACTERIOLOGIE**  
 EXAMEN DIRECT :

Absence de germes à l'examen direct

CULTURE :

Absence de Clostridium Botulinum  
 Absence de Clostridium Perfringens  
 Absence de Bacillus Cereus  
 Absence d'Escherichia Coli  
 Absence de Staphylocoques  
 Absence de Streptocoques  
 Absence de Salmonelles et de Shigelles

**B.DORY** **F. NOEL**

Page 1 / 2

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzfeld - ZNS FELTEN (F) Ilkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) Stiring

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biomoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 57-100  
 Email : labory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 16** (Dossier 775759 du 10/05/2006)

MYCOLOGIE  
 Levures pathogènes : néant

**B.DORY** **F. NOEL**

\*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\*

Page 2 / 2

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzfeld - ZNS FELTEN (F) Ilkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) Stiring

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biomoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 57-100  
 Email : labory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 18**

Tiaret, Ech 5

SARREGUEMINES, le 16/05/2006  
 Dossier 775760 du 10/05/2006

**RAPPORT D'ANALYSES BIOLOGIQUES**

**EXAMEN BACTERIOLOGIQUE**

PRELEVEMENT MIEL 18  
 \*\*\*\*\*

CYTOLOGIE  
 Néant

**BACTERIOLOGIE**  
 EXAMEN DIRECT :

Absence de germes à l'examen direct

CULTURE :

Absence de Clostridium Botulinum  
 Absence de Clostridium Perfringens  
 Absence de Bacillus Cereus  
 Absence d'Escherichia Coli  
 Absence de Staphylocoques  
 Absence de Streptocoques  
 Absence de Salmonelles et de Shigelles

**B.DORY** **F. NOEL**

Page 1 / 2

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzfeld - ZNS FELTEN (F) Ilkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) Stiring

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biomoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 57-100  
 Email : labory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 18** (Dossier 775760 du 10/05/2006)

MYCOLOGIE  
 Levures pathogènes : néant

**B.DORY** **F. NOEL**

\*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\*

Page 2 / 2

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzfeld - ZNS FELTEN (F) Ilkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) Stiring

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY** Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL** Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biomoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 51-100  
 Email : labory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 20**

SARREGUEMINES, le 16/05/2006  
 Dossier 775761 du 10/05/2006

**Tiaret, Ech 6**

**RAPPORT D'ANALYSES BIOLOGIQUES**

**EXAMEN BACTERIOLOGIQUE**

PRELEVEMENT MIEL 20  
 \*\*\*\*\*

CYTOLOGIE  
 Néant

**BACTERIOLOGIE**  
 EXAMEN DIRECT :

Absence de germes à l'examen direct

CULTURE :

Absence de Clostridium Botulinum  
 Absence de Clostridium Perfringens  
 Absence de Bacillus Cereus  
 Absence d'Escherichia Coli  
 Absence de Streptocoques  
 Absence de Staphylocoques  
 Absence de Salmonelles et de Shigelles

B.DORY F. NOEL

Page 1 / 2

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Cruzelwald - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlabaach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) String

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY** Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL** Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biomoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 51-100  
 Email : labory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 20** (Dossier 775761 du 10/05/2006)

MYCOLOGIE  
 Levures pathogènes : néant

B.DORY \*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\* F. NOEL

Page 2 / 2

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Cruzelwald - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlabaach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) String

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY** Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL** Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biomoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 51-100  
 Email : labory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 22**

SARREGUEMINES, le 16/05/2006  
 Dossier 775762 du 10/05/2006

**Tiaret, Ech 7**

**RAPPORT D'ANALYSES BIOLOGIQUES**

**EXAMEN BACTERIOLOGIQUE**

PRELEVEMENT MIEL 22  
 \*\*\*\*\*

CYTOLOGIE  
 Néant

**BACTERIOLOGIE**  
 EXAMEN DIRECT :

Absence de germes à l'examen direct

CULTURE :

Absence de Clostridium Botulinum  
 Absence de Clostridium Perfringens  
 Absence de Bacillus Cereus  
 Absence d'Escherichia Coli  
 Absence de Streptocoques  
 Absence de Staphylocoques  
 Absence de Salmonelles et de Shigelles

B.DORY F. NOEL

Page 1 / 2

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Cruzelwald - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlabaach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) String

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY** Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL** Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biomoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 51-100  
 Email : labory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 22** (Dossier 775762 du 10/05/2006)

MYCOLOGIE  
 Levures pathogènes : néant

B.DORY \*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\* F. NOEL

Page 2 / 2

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Cruzelwald - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlabaach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) String

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY** Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL** Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biomoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

**ECHANTILLON DE MIEL N 8**

SARREGUEMINES, le 16/05/2006  
 Dossier 775756 du 10/05/2006

**Tiaret, Ech 8**

**RAPPORT D'ANALYSES BIOLOGIQUES**

**EXAMEN BACTERIOLOGIQUE**

PRELEVEMENT MIEL 8  
 \*\*\*\*\*

CYTOLOGIE  
 Néant

**BACTERIOLOGIE**  
 EXAMEN DIRECT :

Absence de germes à l'examen direct

CULTURE :

Absence de Clostridium Botulinum  
 Absence de Clostridium Perfringens  
 Absence de Bacillus Cereus  
 Absence d'Escherichia Coli  
 Absence de Streptocoques  
 Absence de Staphylocoques  
 Absence de Salmonelles et de Shigelles

**B.DORY** **F.NOEL**

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzfeld - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) Stiring

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY** Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL** Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biomoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

**ECHANTILLON DE MIEL N 8** (Dossier 775756 du 10/05/2006)

MYCOLOGIE  
 Levures pathogènes : néant

**B.DORY** **F.NOEL**

\*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\*

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzfeld - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) Stiring

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY** Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL** Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biomoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

**ECHANTILLON DE MIEL N 24**

SARREGUEMINES, le 18/05/2006  
 Dossier 775764 du 10/05/2006

**Tiaret, Ech 9**

**RAPPORT D'ANALYSES BIOLOGIQUES**

**EXAMEN BACTERIOLOGIQUE**

PRELEVEMENT MIEL 24  
 \*\*\*\*\*

CYTOLOGIE  
 Néant

**BACTERIOLOGIE**  
 EXAMEN DIRECT :

Présence de rares bacilles gram+.

CULTURE :

Présence de rares colonies de Bacillus Saprophytes  
 Absence de Bacillus Cereus  
 Absence de Bacillus Lavae  
 Absence de Clostridium Botulinum  
 Absence de Clostridium Perfringens  
 Absence d'Escherichia  
 Absence de Streptocoques  
 Absence de Staphylocoques

**B.DORY** **F.NOEL**

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzfeld - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) Stiring

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY** Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL** Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biomoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

**ECHANTILLON DE MIEL N 24** (Dossier 775764 du 10/05/2006)

Absence de Salmonelles et de Shigelles.

MYCOLOGIE  
 Levures pathogènes : néant

**B.DORY** **F.NOEL**

\*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\*

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzfeld - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) Stiring

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biosmoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 57-100  
 Email : labory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 23**

SARREGUEMINES, le 16/05/2006  
 Dossier 775763 du 10/05/2006

**Tiaret, Ech 10**

**RAPPORT D'ANALYSES BIOLOGIQUES**

**EXAMEN BACTERIOLOGIQUE**

PRELEVEMENT MIEL 23  
 \*\*\*\*\*

**CYTOLOGIE**  
 Néant

**BACTERIOLOGIE**  
 EXAMEN DIRECT :  
 Absence de germes à l'examen direct

**CULTURE :**  
 Absence de Clostridium Botulinum  
 Absence de Clostridium Perfringens  
 Absence de Bacillus Cereus  
 Absence d'Escherichia Coli  
 Absence de Streptocoques  
 Absence de Staphylocoques  
 Absence de Salmonelles et Shigelles

B.DORY F.NOEL

Page 1 / 2

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzfeld - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) Strling

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biosmoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 57-100  
 Email : labory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 23** (Dossier 775763 du 10/05/2006)

MYCOLOGIE  
 Levures pathogènes : néant

B.DORY \*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\* F.NOEL

Page 2 / 2

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzfeld - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) Strling

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biosmoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 57-100  
 Email : labory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 27**

SARREGUEMINES, le 16/05/2006  
 Dossier 775765 du 10/05/2006

**Tiaret, Ech 12**

**RAPPORT D'ANALYSES BIOLOGIQUES**

**EXAMEN BACTERIOLOGIQUE**

PRELEVEMENT MIEL 27  
 \*\*\*\*\*

**CYTOLOGIE**  
 Néant

**BACTERIOLOGIE**  
 EXAMEN DIRECT :  
 Absence de germes à l'examen direct

**CULTURE :**  
 Absence de Clostridium Botulinum  
 Absence de Clostridium Perfringens  
 Absence de Bacillus Cereus  
 Absence d'Escherichia Coli  
 Absence de Streptocoques  
 Absence de Salmonelles et de Shigelles

B.DORY F.NOEL

Page 1 / 2

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzfeld - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) Strling

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biosmoselle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 57-100  
 Email : labory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 27** (Dossier 775765 du 10/05/2006)

MYCOLOGIE  
 Levures pathogènes : néant

B.DORY \*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\* F.NOEL

Page 2 / 2

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Creutzfeld - ZNS FELTEN (F) Illkirch - CENTRAL (B) Bluche - DE RUNZ (DR) Sarreguemines | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) Strling

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biososelle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 57-100  
 Email : labdory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 13**

**Tiaret, Ech 13**

SARREGUEMINES, le 18/05/2006  
 Dossier 775757 du 10/05/2006

**RAPPORT D'ANALYSES BIOLOGIQUES**  
**EXAMEN BACTERIOLOGIQUE**

PRELEVEMENT MIEL 13  
 \*\*\*\*\*

CYTOLOGIE  
 Néant

**BACTERIOLOGIE**  
 EXAMEN DIRECT :  
 Présence de rares bacilles gram+.

CULTURE :  
 Présence de rares colonies de Bacillus Saprophytes  
 Absence de Bacillus Cereus et Larvae  
 Absence de Clostridium Botulinum et Perfringens  
 Absence d'Escherichia Coli  
 Absence de Streptocoques et Staphylocoques  
 Absence de Salmonelles et de Shigelles

MYCOLOGIE  
 Levures pathogènes : néant

\*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\*

B.DORY F. NOEL

Page 1 / 1

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Cruzwald - ZNS FELTEN (F) Ilkch - CENTRAL (B) Blche - DE RUNZ (DR) Sarreguemins | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) String

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biososelle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 57-100  
 Email : labdory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 14**

**Tiaret, Ech 14**

SARREGUEMINES, le 18/05/2006  
 Dossier 775758 du 10/05/2006

**RAPPORT D'ANALYSES BIOLOGIQUES**  
**EXAMEN BACTERIOLOGIQUE**

PRELEVEMENT MIEL 14  
 \*\*\*\*\*

CYTOLOGIE  
 Néant

**BACTERIOLOGIE**  
 EXAMEN DIRECT :  
 Présence de rares bacilles gram+

CULTURE :  
 Présence de rares colonies de Bacillus Saprophytes  
 Absence de Bacillus Cereus  
 Absence de Bacillus Larvae  
 Absence de Clostridium Botulinum  
 Absence de Clostridium Perfringens  
 Absence d'Escherichia  
 Absence de Streptocoques  
 Absence de Staphylocoques  
 Absence de Salmonelles et de Shigelles

\*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\*

B.DORY F. NOEL

Page 1 / 2

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Cruzwald - ZNS FELTEN (F) Ilkch - CENTRAL (B) Blche - DE RUNZ (DR) Sarreguemins | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) String

**LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES BERNARD DORY**  
**MEDILAB EST** SELARL agrément préfectoral n° 25  
 3, RUE LOUIS PASTEUR - 57200 SARREGUEMINES - TÉLÉPHONE 03.87.98.53.83 - FAX 03.87.98.61.02

**BERNARD DORY**  
 Pharmacien Biologiste  
 Titulaire des CES hématologie - immunologie  
 mycologie médicale - chimie minérale  
 Agréé PMA intraconjugale  
 Biologiste expert

**FREDERIC NOEL**  
 Pharmacien Biologiste  
 Docteur en Pharmacie  
 CES Immunologie bactériologie  
 hématologie biochimie

Site internet : biososelle.fr  
 Ouvert tous les jours de 7 h à 12 h et de 13 h 45 à 18 h sauf samedi après-midi et dimanche

Laboratoire enregistré N° 57-100  
 Email : labdory.dory@medilabest.fr

**ECHANTILLON DE MIEL N 14** (Dossier 775758 du 10/05/2006)

**Tiaret, Ech 14**

MYCOLOGIE  
 Levures pathogènes : néant

\*\*\*\*\* EDITION COMPLETE \*\*\*\*\*

B.DORY F. NOEL

Page 2 / 2

MEDILAB EST CONTRAT DE COLLABORATION AVEC SCM BIO MOSELLE EST  
 ZNS TRINH (Z) Cruzwald - ZNS FELTEN (F) Ilkch - CENTRAL (B) Blche - DE RUNZ (DR) Sarreguemins | LANG (L) Merlebach - CITE (T) Behren - SCHMITT (SCH) String

**Milieux de Culture*****Préparation du milieu YM40G :***

Glucose ..... 40 g  
 Extrait de malt ..... 0,5 g  
 Extrait de levure... ..... 2g  
 Agar..... 2g  
 Eau distillée ..... 100ml

Faire dissoudre les ingrédients dans l'eau distillée avec une agitation sur la plaque chauffante jusqu'à l'ébullition puis ajouter progressivement le glucose.

Stériliser à 120°C pendant 15 mn.

**Composition de milieu M.E.A (Malt- Extrait – Agar )**

Extrait de malt ..... 20 g.  
 Peptone ..... 1 g.  
 Glucose ..... 20 g.  
 Agar – Agar ..... 15 g.  
 Eau distillée ..... 1000 g

**Composition de milieu OGA (gélose oxytétracycline glucose)**

Extrait de levure..... 5g  
 Glucose ..... 20g  
 Gélose ..... 16g  
 Eau distillée..... 1000g

Autoclavage à 120°C pendant 15 minutes

Ajouter avant emploi au milieu en sus fusion, 100ml d'oxytétracycline à 1mg /100ml et i en boîtes de pétri.

***Préparation du milieu de culture PDA:***

Laver et couper en petits cubes 200 g de pommes de terre non pelées (Vieilles de préférence).

Les mettre dans un litre d'eau distillée et porter à l'ébullition pendant 1 heure, écraser et filtrer afin d'obtenir l'extrait de pomme de terre .

***La composition finale du milieu PDA (Potato Dextrose Agar)***

Extrait de pomme de terre .....200 g  
 Glucose.....20g  
 Agar.....15g  
 Eau distillée.....1000ml.  
 Stériliser à 120C°pendant 15 mn.

**Composition de milieu Sabouraud**

Peptone chapoteaut.....10g  
 Glucose massé .....20g  
 Agar.....15g  
 Eau distillée.....1000ml  
 pH :6 - 6,3  
 Stérilisation 15 minutes à120°C

***Préparation du milieu de culture Mac Clary:***

Glucose .....1g  
 Chlorure de potassium .....1,8g  
 Extrait de levure .....2, 5g  
 Acétate de sodium .....8, 2g  
 Agar .....15g  
 Eau distillée.....1000ml  
 pH =7.  
 Répartir le milieu en tubes à essais (6 à 7 ml).  
 Autoclaver à 120C° pendant 15mn, solidifier en position inclinée.

***Préparation du milieu de fermentation des sucres :***

Extrait de levure .....4, 5g  
 Peptone.....7,5g  
 Sucre .....20g  
 Eau distillée.....1000ml  
 Ajouter l'indicateur coloré le rouge de Phénol .  
 Stériliser à110 C° 20mn pendant 20mn.

**Préparation du milieu YNB (Yeast Nitrogène base).**

SO <sub>4</sub> NH <sub>4</sub> .....	5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1g
Mg SO <sub>4</sub> (7 H <sub>2</sub> O).....	0,5g
Agar .....	20g
Eau distillée.....	1000ml

L'autoclavage se fait à 120 C° pendant 15 mn.

**Préparation du milieu YCB (Yeast Carbone Base)**

Glucose .....	20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1g
Mg SO <sub>4</sub> (7 H <sub>2</sub> O).....	0,5g
Agar .....	20g
Eau distillée .....	1000ml

L'autoclavage se fait à 120 C° pendant 15 mn.

**Eau peptonée**

Peptone.....	1 g
Eau distillée.....	1000 ml.

Faire dissoudre la peptone dans l'eau distillée, répartir dans les tubes à essais de 18 ml par tube, stériliser à l'autoclave 120 °C pendant 20 min.

**Gélose nutritive ordinaire (GN)**

Extrait de viande.....	1 g
Extrait de levure.....	2 g
Peptone.....	5 g
Agar.....	15 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Eau distillée.....	1000 ml.

Dissoudre tous ces produits dans de l'eau à ébullition ajuster le pH à 7,4 à 20 °C, remplir le milieu dans des flacons en raison de 200 ml par flacon, stériliser à 115 °C pendant 20 min.

**Plat count agar (PCA)**

Extrait de levure.....	2,5 g
Peptone tryptique.....	5 g
Glucose.....	1 g
Agar-Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 g.

La préparation consiste à dissoudre ces produits dans de l'eau à ébullition ajuster le pH à 7,4 à 20 °C, remplir le milieu dans des flacons en raison de 200 ml par flacon, stériliser à 115 °C pendant 20 min.

**Cristal violet rouge, bilié, lactosé (V.R.B.L) :**

Extrait de levure .....	3g
Hydrolysate pancréatique de gélatine .....	7g
Sels biliaires (bovins ou ovin).....	1,5g
Lactose monohydraté (bovin).....	10g
Glucose monohydraté .....	10g
Chlorure de sodium .....	5g
Agar .....	15g
Rouge neutre .....	30mg
Cristal violet .....	2mg

Dissoudre les composants dans de l'eau puis porter à ébullition, ajuster le pH à 7,4 puis autoclaver à 115 °C pendant 15 min.

**Trypticase-Peptone-Glucose-Yeast Extract Broth (TPGY)**

Trypticase.....	50 g
Peptone.....	5 g
Extrait de levures.....	20 g
Glucose .....	4 g
Sodium thioglycollate .....	1 g
Eau distillée .....	1000 ml

Autoclaver les tubes 10 min at 121°C. pH Final, 7.0 ± 0.2. Réfrigérer à 5°C

**Bouillon d'extrait de viande**

Extrait de cœur de bœuf (de 454 g).....	30 g
D (+) glucose.....	2 g
Peptone de viande.....	20 g
Chlorure de sodium .....	5 g
Eau distillée qsp.....	1000 ml
pH final 7,2 ± 0,2 (25 °C)	

**Viande de foie (VF)**

Base viande de foie.....	10 g
Peptone.....	20 g
Extrait de levure.....	10 g
Glucose.....	5 g
Agar- Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH 7,4 ± 0,2.	

**Milieu MOSSEL**

Extrait de viande de bœuf.....	1 g
Peptone.....	10 g
Mannitol.....	10 g
Na Cl.....	10 g
Rouge de phénol.....	0,025 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 g
pH 7,2.	

## Coloration de Gram

Après étalement, séchage et fixation à la chaleur, le frottis doit être parfaitement refroidi et destiné à la coloration de Gram

Recouvrir la lame du violet de gentiane phénique, laisser agir 2 min. jeter l'excès de colorant Toutes les bactéries sont colorées en violet sans discrimination;

- Verser sur la lame quelques gouttes de solution d'iode (liquide de Lugol) et laisser agir une minute, laver à l'eau;
- Rincer à l'alcool 95% jusqu'à ce qu'il s'écoule incolore puis laver à l'eau.
- Recolorer à la fuchsine avec un temps de réaction de deux minutes;
- laver à l'eau et sécher puis observer au microscope, grossissement à l'immersion.

## Compositions des colorants utilisés

### Safranine

Safranine.....	0,5 g
Alcool à 95 %.....	10 ml
Eau distillée.....	100 ml.

### Fuchsine phénique de Ziehl

Fuchsine basique.....	1 ml
Alcool à 96 %.....	10 ml
Phénol cristallisé.....	5 g
Eau distillée.....	100 ml.

Dissoudre la fuchsine basique dans l'alcool, puis dissoudre le phénol dans l'eau distillée et en fin mélanger les deux solutions.

### Vert de malachite

Vert de malachite.....	5 g
Eau distillée.....	100 ml.



# Microbiological and Physicochemical Characterization of Honeys from the Tiaret Region of Algeria

Hocine Laredj<sup>1\*</sup> and Rezzoug Waffa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Agro-Biotechnology and Nutrition in Semi-Arid Areas, Faculty of Sciences of Nature and of Life, University Ibn Khaldoun BP 78 Zaaroura Tiaret, Algeria; lar\_hocine@yahoo.fr

<sup>2</sup>Laboratory of Geomatics and Sustainable Development, Faculty of Sciences of Nature and of Life, University Ibn Khaldoun BP 78 Zaaroura Tiaret, Algeria; rezzougwaffa@yahoo.fr

## Abstract

Honey is an organic product with a multiple physicochemical and biological properties. Microbiological analysis (total search germs, coliforms and fecal coliforms, spores of sulfite-reducing, *Clostridium botulinum* and *Bacillus cereus* and research yeasts) showed that the samples studied contain no spores or coliform and fecal coliform. The physicochemical analyzes (water content, Hydroxymethylfurfural: HMF, pH and free acidity, conductivity electrical and ash) showed that all samples meet International standards with the exception of one sample showed an HMF content (42.05 mg/kg) which is slightly above the European norm but still consistent with the Codex Alimentarius. The result of analyzes show that different honeys produced in this region are of good hygienic and market qualities.

**Keywords:** Characterization, Honey, Microbiological, Physicochemical, Tiaret

## 1. Introduction

Honey is a food that mankind has known since antiquity. It is a mixture consisting mainly of water and sugars, also containing gluconic acid, lactones nitrogen compounds, minerals and vitamins<sup>1</sup>. The term quality in the specific case of honey is evaluated by a physicochemical and microbiological analysis of its constituents.

The International Honey Commission (IHC) and the Codex Alimentarius Standard for honey quality have proposed several chemical and physical parameters as quality criteria for honey. These include: moisture content, mineral content, acidity, hydroxymethylfurfural (HMF) content, diastase activity, apparent sugar content.

Honey, despite its richness in sugar and inhibins, is subject to bacterial or fungal contaminations which can cause its deterioration.

Honey has two sources of contamination with microorganisms: primary sources include pollen, the digestive tracts of honey bees, dust, air, soil and

nectar; secondary sources are those arising from honey manipulation by people, they include air, food handlers, cross-contamination, equipment and buildings. Primary sources of honey contamination are very difficult to control. Conversely, secondary sources of honey contamination can be controlled by good manufacturing practices. The microbes of concern in honey are fungi, yeasts and spore-forming bacteria. Yeasts are responsible for honey fermentation when the moisture content is high<sup>2</sup>. A number of bacteria are present in honey, most of them being harmless to humans<sup>3</sup>.

Honey has been incriminated as a source of *Clostridium botulinum* spores responsible for infant botulism cases<sup>4</sup>.

Microbiological testing should guarantee both a good hygienic and good marketable qualities of this product and good production efficiency.

In Algeria, Honey has been used more for medicinal and religious purposes than as a nutritional food. Only few studies have been developed at local level.

Thus, the aim of the present work is the

\* Author for correspondence

physicochemical characterization of some honeys produced in the Tiaret region in Algeria, by the analysis of some common physicochemical parameters (water content, pH, free acidity, ash, electrical conductivity and HMF), and microbiological characterization (Research of mesophilic aerobic flora and research of germs hygienic quality indicators such as coliforms, fecal coliforms and other bacteria whose presence is undesirable such as *Clostridium botulinum*, sulfite-reducing *Clostridia* and *Bacillus cereus* and yeast fermentation agent honeys).

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Sample Collection

Ten multifloral honey samples were randomly collected from beekeepers, in the city of Tiaret, Algeria. Samples (500 g of honey/sample) were transported aseptically to the laboratory for the study and distributed in sterile covers, sealed, labeled and stored at room temperatures (20°C).

### 2.2 Physicochemical Analysis

#### 2.2.1 Moisture Content

Water content (moisture) was determined following Chataway and a method established by the International Honey Commission<sup>5</sup>. We used an Abbe-type refractometer, obtaining the corresponding percentage of water from the Chataway table. All measurements were performed at 20°C.

#### 2.2.2 Hydroxymethylfurfural Content

According to the method of Winkler (1955) described in the report of the International Honey Commission<sup>5,6</sup>, ten grams of each of the samples were treated with a Carrez I and II (clarifying agent). The volume was completed to 50 ml and the solution was filtered. The absorbance of solution was measured at 550 nm.

#### 2.2.3 Electrical Conductivity (EC)

The electrical conductivity was measured by analyzing a solution of 20 g of dry matter of honey dissolved in 100 ml of distilled water using a conductivity meter PHYWE instruments (1370193). EC values are expressed in milli Siemens per centimeter ( $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ )<sup>6</sup>.

#### 2.2.4 pH and Free Acidity

pH and free acidity were measured by the titrimetric method. 10 g of honey were dissolved in 75 ml,  $\text{CO}_2$ -free distilled water. The electrode of the pH meter (HANNA 2211) was immersed in the solution, stirred and titrated with carbonate-free 0.10 NaOH until the pH reached 8.5<sup>6</sup>.

#### 2.2.5 Ash Content

According to International Honey Commission<sup>5</sup>, Samples of 5-10 g were incinerated in a Muffle furnace at a temperature no higher than 600°C to constant weight, cooled and the residue weighed. The result was expressed as g of ash/100 g of honey.

### 2.3 Microbiological Analysis

#### 2.3.1 Pre-Treatment of Samples

Ten grams of each sample were homogenized for 3 min in 90 ml ( $10^{-1}$  suspension) peptone water. Ten-fold dilutions were prepared till  $10^{-3}$ .

#### 2.3.2 Count of Mesophilic aerobic flora at 30°C

Place 1 ml of the microbial suspension in a petri dishes, add 12 ml of plate count agar (PCA) medium, mix by rotating movements and let solidify. Place the Petri dishes in inverted position and incubate at 30 °C for 72 h<sup>7-10</sup>.

#### 2.3.3 Detection of Coliforms and Fecal Coliforms

According to Guiraud<sup>11</sup>, the counting is done by lactose agar with purple crystal and neutral red (VRBL). Put 1 ml of solution in a sterile petri dish and add about 12 ml of the culture medium (pre-cooled to 45 °C) and then mix all and let solidify; after solidification, incubated coliforms at 30°C and fecal coliforms at 44°C for 24 to 48 h.

#### 2.3.4 Detection of Spores of Sulfite-Reducing *Clostridia*

Melt in boiling water bath liver meat medium and cooling to about 65°C. and then added to the medium 5 ml of sodium sulfite and 2.5 ml of iron alum (for a 250 ml); Place 5 ml of stock solution (10 g honey/90 ml diluent) into a sterile tube and carry them to the water bath at 80°C for 10 min (destruction of vegetative forms) then rapidly cooled in water; filling the tube with the prepared

medium and homogenize the mixture, incubated at 46°C during 24h to 48h. The sulfite spores appear as colonies surrounded by a black halo<sup>11,12</sup>.

### 2.3.5 Detection of Vegetative Cells of *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* sought was performed on middle mossel. To 90 ml of melted medium mossel and cooled to 50°C, 10 ml of a sterile emulsion of egg yolk with 20% and 1 ml of polymyxin sulphate solution 0.1% were added. Pour the mixture into petri dishes and allow to cool. Spread 0.1 ml of the dilution of the honey (10<sup>-1</sup>) on the surface of the culture medium and incubated at 30-35°C for 24 h to 48 h. count the pink colonies mannitol (-) surrounded by a white area (lecithinase +)<sup>13,14</sup>.

### 2.3.6 Detection of *Clostridium botulinum* Spores

Take 25 g of honey in a sterile beaker. Add 100 ml of distilled water containing 1% Tween 80 and mix until the suspension is homogeneous. Transfer 125 ml from the honey slurry in centrifuge bottles of 300 ml. Place in a water bath at 65°C for 30 min and centrifuged at 15,000 g for 20 minutes. Filter the supernatant through a membrane filter Millex HA de 0,45 MF (millipore). Keep the sediment temporarily at 4°C and filter.

After filtration, rinse dilution bottle and the funnel with about 5 ml of water sterile cold distilled and then filtered through the filter membrane. In a laminar flow hood, transferring the MF in 110 ml of TPGYB medium (Trypticase-Peptone-Glucose-Yeast extract-Beef extract). Carefully add the obtained sediment upon centrifugation at a dilution bottle containing the medium

and the TPGYB filtered. Incubate at 35°C for 7 days under anaerobic conditions. Show the bottles daily. Culture was examined for turbidity, gas production and microscopic appearance. In the absence of growth, re-incubated for 10 additional days<sup>15,16</sup>.

### 2.3.7 Yeast Counting Method

The diluent is prepared by adding peptone water (0.1%) and 40% glucose; the solution was stirred until complete dissolution of glucose and sterilized at 120 °C for 15 min<sup>17,18</sup>. The honey solution is obtained by mixing 10g of honey and 90 ml of diluent, the solution should be stirred and allowed to stand.

The culture was performed on the media YM40G (Yeast, Malt, 40% Glucose). This medium is intended to osmophilic yeasts. It consists in spreading 0.1 ml of the solution on surface using the technique of the rake, the observations are made after 5-7 days of incubation at 30°C The result was expressed as cfu/g<sup>17,18</sup>.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Physicochemical Characteristics

Table 1 shows various physicochemical parameters analyzed: Moisture content, HMF content, Ash content, electrical conductivity, pH and free acidity.

#### 3.1.1 Water Content

The water content of the different honey samples varies from 14.4 to 19.7%. Eight samples of honey (80%) have water content less than 18%; limit value for fermentation

**Table 1.** Physicochemical characteristics of honey samples

N° sample	Moisture content (%)	HMF content (mg/kg)	Ash content (g/100g)	Electrical conductivity (mS/cm)	pH	Free acidity (meq/g)
01	15	4.6	0.16	0.454	4.7	21.3
02	17	9,6	0.11	0.432	4.19	24.1
03	17	4,6	0.25	0.512	5.18	17.7
04	17	23	0.09	0.222	3.8	31.2
05	19.7	14.24	0.054	0.309	3.23	35.25
06	15.28	14.01	0.02	0.292	3.12	38
07	14.4	11.52	0.13	0.419	4.3	22
08	15.9	6.53	0.166	0.49	4.9	18.8
09	15.28	42.05	0.242	0.58	5.1	18.45
10	19	28.8	0.056	0.223	3.5	31.5

risk<sup>19</sup>. All samples have water content less than 20%, value fixed by the Codex Standards<sup>20</sup> and the Council of the European Union Commission<sup>21</sup>.

The water content is one of the most important characteristics of honey, because it plays an important role in its quality and shelf-life of honey<sup>22,23</sup>.

### 3.1.2 Hydroxymethylfurfural Content

Although there is a disparity in the values obtained for the HMF of the various honeys (4.6 to 42.05 mg/kg), the HMF levels of the majority of the honeys studied do not exceed 40 mg / kg (standard given by the European Union)<sup>20</sup> except for the sample N°9 with a slightly higher value. This is probably due to a slight heating exerted by the beekeeper during the extraction or storage at high temperature. Moreover, for all samples, HMF contents are well below the threshold of tropical countries (80 mg/kg) given by Codex Alimentarius<sup>20</sup>. About 50% of samples studied have very low values (<10 mg / kg); indicating that these honeys have been freshly harvested<sup>24</sup> or were not heated and were well stored<sup>5,25</sup>. According to Bogdanov *et al.*<sup>19</sup>, fresh honey contains substantially no Hydroxy-Methylfurfural (HMF), its content increases during storage, depending on the pH of the honey and the storage temperature.

### 3.1.3 Electrical Conductivity (EC)

The electrical conductivity of the analyzed honeys varied from 0.222 to 0.580 mS/cm; these values remain in the range of 0.1 to 0.5 mS/cm for flower honeys except for samples N° 3 and 9 which could correspond to a mixture of nectar and honeydew<sup>26</sup>. However, a classification of our values allows us to distinguish two classes of honeys probably having the same floral origin<sup>27</sup>: class 1: samples N° 4, 5, 6 and 10, class 2: samples N° 1, 2, 3, 7, 8 and 9 (Table 1). Although the EC is a characteristic of the plant species from which the honey comes, it is also proportional to the amount of ash and acidity of honey<sup>28-30</sup>. Conductivity is an interesting parameter because it is easy to distinguish honeydew honey from flower honeys<sup>31</sup>. In general, the honeydew honeys conduct much better current than the flower honeys<sup>27</sup>.

### 3.1.4 pH and Free Acidity

The pH values are ranged from 3.12 to 5.18 (Table 1). All samples of honey studied are acid; these values agree with

those reported by White and his collaborators<sup>32</sup> whose pH range from 3.5 to 5.5 due to the presence of organic acids. According to Schweitzer<sup>33</sup>, the most acid honeys deteriorate quickly. Variations in pH can be attributed to diversity of melliferous plants in the Tiaret region. Indeed, honey nectars have pH of 3.5 to 4.5 vs. honeydew honeys with a pH between 5 and 5.5<sup>19</sup>. These observations confirm the results of the electrical conductivity where all honeys studied are of nectarifer origin; except samples N° 3 and 9 which have pH > 4.5. The free acidity of the samples varies between 17.7 and 38 meq/kg. These values are well below the limit (50 mEq/kg) recommended by the harmonized methods of the European Commission<sup>6</sup>. Furthermore, samples N° 4, 5, 6 and 10 have values in free acidity > 30 mEq/kg; this could be explained by some acids from the digestive secretions of bees during the elaboration of honey or make them susceptible to alteration by fermentation<sup>34</sup>.

### 3.1.5 Ash Content

For the majority of honeys, the ash contents are ranged from 0.02 to 0.16%; values do not exceed 0.2% for the category of nectar honeys<sup>35</sup>. Samples N° 3 and 9 with the values of 0.25 and 0.24% respectively, included them in the range of 0.2 to 1% corresponding to honey obtained from nectar and honeydew mixture<sup>35</sup>. Bogdanov and collaborators<sup>19</sup> reported that the ash content is a quality criterion that depends on the botanical origin of the honey. The values obtained for the ash are in conformity with those found for the EC. It has been reported that EC is sufficient for routine controls in determining botanical origin<sup>24</sup>. The variability of the ash content observed for the different honeys (Table 1.) could also be due to the number of pollinated plants, soil type and processes and beekeeping techniques used<sup>36,37</sup>.

## 3.2 Microbiological characteristics

Table 2 shows various Microbiological results: Coliforms and Fecal Coliforms, sulfite-reducing anaerobes, *Bacillus cereus* spores, *Clostridium botulinum* spores and Yeast.

### 3.2.1 Mesophilic Aerobic Flora at 30°C

The detection of the mesophilic aerobic flora reflects the general microbiological quality of the natural products and allows controlling them<sup>9</sup>. The absence of standards for the microbiological analysis of honeys makes

**Table 2.** Microbiological results (in colony forming units per gramme: cfu/g)

N° sample	Mesophilic aerobic flora	Coliforms and Fecal Coliforms	Sulfite-reducing anaerobes	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	Yeasts
01	1416	0	0	0	0	960
02	87	0	0	0	0	30
03	770	0	0	0	0	620
04	1050	0	0	20	0	875
05	170	0	0	0	0	100
06	10	0	0	0	0	4
07	100	0	0	0	0	77
08	340	0	0	0	0	110
09	410	0	0	0	0	100
10	180	0	0	0	0	60

interpretation difficult<sup>18</sup>. The total number of mesophilic range of 10 to 1.4 10<sup>3</sup> cfu/g (Table 2). Most honeys studied have a count below 500 cfu/g; quality limit value recommended by Fleché et al.<sup>38</sup>. Honey is not subject to the development of germs compared to other foods, due to its high sugar content, low water activity, low pH and antimicrobial substances<sup>39</sup>. Although samples 1, 3 and 4 have high numbers respectively of 1.4 10<sup>3</sup>, 7.7 10<sup>2</sup> and 1.1 10<sup>3</sup> cfu/g compared with the limit value, they are less exposed to bacterial alterations due to their moisture content below 18% (Table 1). The origin of contamination by the mesophilic aerobic flora in these honeys result from possible contamination during processing, handling and storage or of the normal flora of the gastrointestinal tract of bees<sup>40</sup>.

### 3.2.2 Coliforms and Fecal Coliforms

For the 10 samples of honey analyzed, there is a total absence of coliforms and fecal coliforms, these results agree with those found by Omafuvbe and Akanbi<sup>41</sup>, Naman et al.<sup>42</sup>, this is explained by the fact that honey is an environment hostile to the development of this flora and indicates that our honeys are of good hygienic quality.

### 3.2.3 Spores of Sulfite-Reducing *Clostridium*

The presence of Sulfite-reducing *Clostridium* in honey can be considered as an indicator of contamination<sup>43</sup>. The spores of sulfite-reducing *Clostridium* were not detected in any sample, indicating that honeys were produced in accordance with good hygiene practices during extraction, packaging and storage<sup>11</sup>.

### 3.2.4 *Bacillus cereus*

Only Sample N° 4 contains 20 cfu / g of *Bacillus cereus* (Table 2), a very low result compared to those obtained by Martins et al.<sup>44</sup>, with maximum of 10<sup>4</sup> cfu/g. Exceeding 10<sup>5</sup> cfu/g a toxigenic risk is possible<sup>39,44,45</sup>. According to Fleché<sup>38</sup>, *Bacillus* in honey are part of the mesophilic flora induced by the bee (nectar or honeydew).

### 3.2.5 *Clostridium botulinum* Spores

The results for all the honeys studied showed no spore of *Clostridium botulinum* in both culture media (Table 2). These results are consistent with those of Huhtanem et al.<sup>46</sup> carried out on 80 samples of honey. Other studies have reported low numbers of *Clostridium botulinum* Spores, i.e., 2 spores for 100 samples<sup>47</sup> and 6 spores for 48 samples<sup>15</sup>.

### 3.2.6 Yeasts

The number of yeasts varies from 4 to 960 cfu/g, their origin is exogenous and could come from: nectar, bees (paws, tongues, craw) and contamination during extraction<sup>27,38</sup>. The samples N° 1, 3 and 4, with a high number of yeasts; 960, 620 and 875 cfu / g respectively, are not subject to any fermentation risk since their moisture content is ≤ 17% (Table 1). In contrary, samples N° 5 and 10, with a lower number of yeasts (100 and 60 cfu/g respectively) but with water contents ≥ 19% are subject to the fermentation risks<sup>48,49</sup>. This risk can be detected by the yeast count<sup>50</sup>. If only the number of yeasts is taken into account, there is a disparity between the values of the different samples, a

distribution of our results according to the limits reported by Fleché et al.<sup>38</sup> regarding the conservation of honey, allows to distinguish two classes:

- Seven samples (N° 2, 5, 6, 7, 8, 9 and 10) contain approximately 100 cfu/g: good conservation of honey.
- The samples N° 1, 3 and 4 with values between 500 and 1000 cfu/g: honeys start to ferment.

## 4. Conclusion

The physicochemical and microbiological analytical results of honeys produced in Tiaret region (Algeria), indicate a good level of quality.

The values of HMF and free acidity were very satisfactory showing good quality of these honeys. The exception is for sample 9, which has an HMF value slightly higher than the European standard but remains below the Codex Alimentarius standard for hot countries (Tiaret is characterized by a warm and dry climate in summer, period of the first harvests of the honey)

The pH of the honey studied is acidic. Three samples have values greater than 4.5 and can therefore have a honeydew origin. While others, may have a floral origin. Water content is lower than European and international standards.

The electrical conductivity and ash values are low and consistent with one another. According to most scientists the electrical conductivity is strongly related to the mineral content.

The result of the microbiological analyzes show that the samples studied are of very good microbiological and hygienic quality. Nevertheless, some samples have high yeast contents but with water contents of less than 18% and can constitute a fermentation risk if the storage conditions are not respected.

## 5. Acknowledgement

We would like to thank Ms. Gourchala Freha and Mihoub Fatma, teachers' researchers at Ibn Khaldoun University at the Faculty of Nature and Life Sciences for their help and scientific contributions.

## 6. References

1. White JWJr. Honey. *Advances in Food Research*. 1983; (24):287–374.

2. Louveaux J. *Les abeilles et leurs élevages*. Ed OPIDA; 1985. p. 265.
3. Zucchi P, Bassignani V, Carpana E. Honey microbiology. *Industrie Alimentari*. 2001; 40(409):1346–50.
4. Amon SS, Damus K, Chin J. Infant botulism: epi-demiology and relation to sudden infant death syndrome. *Epidemiol Rev*. 1981; (3):45–66.
5. International honey commission. *Harmonized Methods of the International Honey Commission*. 2009; 1-63. <http://www.bee-hexagon.net/en/network.htm>
6. Bogdanov S, Martin P, Lullmann C, Borneck R, Flamini C, et al. Harmonised methods of the European honey commission. *Apidologie*. (Extra issue): 1997; 1–59.
7. Bekelle B, Tetemke M, Mogessie A. Yeast and lactic acid flora of tej, indigenous Ethiopian honey wine, variations with in and between production. *Addis Ababa Ethiopia* ; 2007. 1–3.
8. Delarras C. *Microbiologie de l'environnement avec législation*. Europe, Paris: Gaétan Morin Editeur; 2000. p. 1–74.
9. Guiraud JP, Rosec JP. *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. AFNOR ; 2004. 1–96.
10. Normes Internationale ISO 4833. *Méthode pour le dénombrement de germes aérobies en milieu solide*; 1993. p. 3.
11. Guiraud JP. *Microbiologie alimentaire*. Paris: Dunod ; 2003. p. 401–15.
12. Petransxiene D, Lapied L. *La qualité bactériologique du lait et des produits laitiers, analyses et tests*. 2nd ed. Paris: Technique et Documentation, LAVOISIER; 1981. p. 228.
13. Guillaume P. *Mictobiologie. Les milieux de culture*; 2004. [www.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio](http://www.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio)
14. Larpent-Gourgaud M, Larpent JP. *Mémento technique de microbiologie*. Lavoisier, Tec et Doc; 1997.
15. Kuplulu O, Goncuoglu M, Ozdemir H, Koluman A. Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in Turkey. *Food Contol*. 2006; (17):222–4.
16. Solomon HM, Lilly TJr. *Clostridium botulinum*. *Bacteriological Analytical Manual*. 8th Ed. 2001. Available from: <http://vmcfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>
17. Douey D, Wilson P. *Dénombrement des levures et des moisissures dans les aliments in agence canadienne d'inscription des aliments Direction des aliments. Santé CANADA*. 2004; 1–19.
18. Ward WH, Trueman KF. *A quality survey of Australian Honeys*. Ed: RIRDC. 2001; 1–41.
19. Bogdanov S, Bieri K, Gremaud G, Iff D, Känzig A, Seiler K, Stöckli H, Zürcher K. *Produits apicoles*. 23A Miel. *Revue par le groupe d'experts "produits apicoles"*. MSDA. 2004; 1– 37.
20. Codex Alimentarius. *Codex standard 12, Revised Codex Standard for Honey, Standards and Standard Methods*. FAO- Rome ; 2001. p. 1–7. <http://www.codexalimentarius.net>
21. The Council of the European Union. *Council Directive 2001/110/ec of 20 december relating to honey*. *Official Journal of the European Communities*. 2002; (10):47–52.
22. Bruneau E. *Voyage au cœur du miel, l'essentiel du pro-*

- gramme européen de miel. Resp, CARI, Louvain- La neuve. 2006; 2-4.
23. Terrab A, Diez MJ, Heredia FJ. Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys. II. Orange (Citrus sp.) honey. *International Journal of Food Science and Technology*. 2003; (38):387-94. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2003.00714.x>
  24. Bogdanov S, Rouff K, Persano-Oddo L, Physico-chemical methods for the characterisation of uniflora honeys: A review. *Apidologie*. 2004; (35):4-17. <https://doi.org/10.1051/apido:2004047>
  25. Levantes MAR, Novelo SAG, Duch ES. Les effets du traitement thermique sur la qualité du miel pendant l'entreposage. *Apiacta*. 2000; 35(4):162-70.
  26. Jean-Prost P, Medori P. Apiculture: Connaitre l'abeille conduire le rucher. Paris : J. B. Baillière; 1987.
  27. Gonnet M. Le miel: Composition. Propriété et conservation. OPIDA-INRA; 1982.
  28. Bogdanov S, Bieri K, Kilchemann V, Gallmann P. Miels monofloraux Suisses. *ALP forum* N° 23F. 2005; 55.
  29. Terrab A, Diez MJ, Heredia FJ. Characterization of Moroccan uniflora honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chemistry*. 2002; (79):373-9. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00189-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00189-9)
  30. Terrab A, Recamales AF, Hernanz D, Heredia FJ. Characterisation of Spanish thyme honeys by physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chemistry*. 2004; (88):537-42. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.068>
  31. Bogdanov S, Bieri K. Miels monofloraux suisses. *Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP*. 2008; 1-56.
  32. White JW, Petty J, Hoger R. Composition of honey II. Lactone content. *J AOAC*. 1958; 41. PMID:13561914.
  33. Schweitzer P. Les critères de qualité du miel. *CETAM -Lorraine. Revue l'abeille de France*; 2004. N° 908.
  34. Louveaux J. Composition de technologie du miel. in traité de la biologie de l'abeille. Tome 3: les produits de la ruche; Paris: Ed. Masson et CIE; 1968. 277-318.
  35. Donadieu Y. Qu'est ce que le miel? *Faculté de médecine, Paris*; 2004. p. 1-6.
  36. Huchet E, Coustel J, Guinot L. Les constituants chimiques du miel, méthodes d'analyses chimiques. *Departement Sciences de l'aliment*; 1996. p. 1-5.
  37. Monica S, Mirta F, Lasango C, Marioli JM. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina, Departamentos de Química y de 10-Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Fisicoquímicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. *Food Chemistry*. 2007; 100:1649-953.
  38. Fleche M, Clement C, Zeggane S, Faucon JP. Contamination des produits de la ruche et risque pour la sante humaine. situation en France. *Rev SCI TECH INT Epiz*. 1997; 609-12.
  39. Snowdon JA, Cliver DQ. Micro-organisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*. 1996; (31):1-26. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00970-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00970-1)
  40. Kacaniova M., Chlebo R., Kopernicky M., Trakovicka A. Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia Microbiol*. 2004; (49):169-71. <https://doi.org/10.1007/BF02931394>
  41. Omafuvbe BO, Akanbi OO. Microbiological and physico-chemical properties of some commercial Nigerian honey. *African Journal of Microbiology Research*. 2009 Dec; 3(12):891-6.
  42. Naman M., Faid M, El adlouni C. Microbiological and physico-chemical properties of moroccan honey. *Int J Agri Biol*. 2005; (7):773-6.
  43. Collins CH, Lyne PM, Grange JM. Collins and Lyne's microbiological methods. 7th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1999. p. 213-21.
  44. Martins HM, Martins ML, Bernardo FMA. Bacillaceae spores, fungi and aflatoxins determination in honey. *Revista Portuguesa De Ciências Vet-erinárias*. 2003; 98(546):85-8.
  45. Jouve L. La qualité microbiologique des aliments maîtrise et critères, 2eme ed. Paris: Polytechnica; 1996; p. 186-354.
  46. Huhtanen CN, Knox D, Shimanuki H. Incidence and Origin of *Clostridium botulinum* Spores in Honey. *J Food Protection*. 1981; (44):812-4. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-44.11.812>
  47. Kautter DA, Timothy LJr, Solomon HM, Lynt RK. *Clostridium botulinum* Spores infant foods: A survey. *J Food Protection*. 1982; (45):1028-9. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-45.11.1028>
  48. Merlet PY. Le miel. These de doctorat veterinaire. Toulouse : Universite Paul Sabatier; 1981. p. 153.
  49. Bogdanov S, Martin P. Honey authenticity: A review. *Swiss Bee Research Centre*; 2002. p. 1-20.
  50. Beckh G, Lüllmann C. Les composants naturels de miel - Levures et leur Métabolites. *Tel 1: teneur en levure. Dtsch. Lebensm. Psychosom*. 1999; (95):457-63.