



Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2024

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

### EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV      Filière : Sciences biologique

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenté par :

*M<sup>lle</sup>* AZIZI Sabrina

### *Thème*

**Evaluation de la diversité du microbiote du miel de  
différentes régions du centre d'Algérie  
(Méthode culturelle)**

Soutenu le : 26 / 06 /2024

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M KADRI, N</i>	<i>PROF</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>Mme DJENADI, K</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promotrice</i>
<i>M REMINI, H</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>

Année Universitaire : 2023/2024

# ***Remerciements***

## **Remerciements**

*Je souhaite avant tout remercier notre **Dieu Allah**, le Tout-Puissant, pour m'avoir doté de la santé, de la patience, de la force et de la volonté nécessaires tout au long de mes années d'études et pour la réalisation de ce modeste travail.*

*J'adresse ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à ma chère promotrice, **Madame DJENADI Katia**, pour avoir accepté de superviser ce travail. Je la remercie chaleureusement pour sa gentillesse, son aide, sa bienveillance, sa patience, ses précieux conseils, ses orientations avisées, ses encouragements constants et sa disponibilité tout au long de ce projet.*

*Je remercie les membres du jury **Monsieur REMINI Hocine** et **Monsieur KADRI Nabil** pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'évaluer ce travail.*

*Je remerciements vont également à l'ensemble de mes enseignants qui ont contribué à ma formation tout au long de mon parcours pédagogique.*

*Ainsi, les ingénieurs de labo 7 **Mme. GHAREBI, F** et de labo 8 **Mme. Messerane, K** pour leurs encouragements et gentillesse.*

*Enfin je tiens à exprimer vivement mes remerciements avec une profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.*

**Merci à tous**



# *Dédicaces*



## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*À ma très chère **Mère**, mon modèle d'amour, de gentillesse, sans toi tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir soutenu et supporté tout au long de ma vie. Que ce travail soit le témoignage de ma sincère gratitude, reconnaissance et de mon éternel amour.*

*À la mémoire de mon défunt **Père**, Je prie Dieu de l'accueillir avec miséricorde dans son vaste paradis. Ce travail est le fruit de nombreuses années de sacrifices et de privations, faits pour m'aider à avancer dans mes études. Merci pour les valeurs nobles, l'éducation exemplaire, la confiance et le soutien indéfectible que tu m'as offert.*

*Je déduis ce travail également à mon cher frère **Saber** pour son aide, son soutien, Et pour avoir toujours été là pour moi, je ne te remercierai jamais assez.*

*À ma chère promotrice **Mme DJENADI Katia**, que j'aime infiniment, ma source de volonté, celle qui m'a toujours poussé vers l'avant.*

*À tous mes enseignants et mes enseignantes sans exception.*

*À mon cher **Khalef HANSALI** pour son soutien et son encouragement avant et pendant la réalisation de ce travail.*

*À ma famille et à toutes mes chères amies, collègues, et à tous ceux qui me sont très chers, ceux qui m'ont offert leur aide, m'ont appuyée et supportée.*

*Je n'arriverais jamais à vous exprimer mon amour sincère.*

*Sabrina*



## *Liste des figures*

## Liste des figures

Fig. 01 : Diagramme en cercle représentant les éléments constitutifs du miel. ....	4
Fig. 02 : La dégradation du fructose en 5-HMF.....	7
Fig. 03 : La structure morphologie des abeilles .....	10
Fig. 04 : Les origines principales de micro-organismes dans le miel .....	12
Fig. 05 : Les échantillons de miel utilisés .....	16
Fig. 06 : Carte géographique des sites d'échantillonnage du miel.....	17
Fig. 07 : Mesure de pH.....	18
Fig. 08 : La préparation des suspension mère .....	20
Fig. 09 : Les résultats du pH des échantillons de miels .....	25
Fig. 10 : La mesure du (HMF) dans les échantillons de miels.....	26
Fig. 11 : Nombre de cellules dans les échantillons de miel .....	28
Fig. 12: Les résultats obtenue sur milieu PCA.....	28
Fig. 13 : La croissance obtenue dans le différentes milieux .....	31
Fig. 14: Les résultats obtenue sur milieu EMB .....	33
Fig. 15: Les résultats obtenue sur CHROMAGAR.....	33
Fig. 16: Les résultats obtenue sur MSA .....	34
Fig. 17: Les résultats de coloration de Gram .....	35
Fig. 18: Les résultats de test Catalase .....	35

# **Liste des tableaux**

## Liste des Tableaux

<b>Tableau I</b> : Les variétés de miel utilisées.....	17
<b>Tableau II</b> : Les résultats d'ensemencement sur milieu VF .....	29
<b>Tableau III</b> : Les résultats de la recherche des Entérocoques.....	30
<b>Tableau IV</b> : La diversité bactérienne détectée dans divers échantillons de miel, sur différents milieux de culture, MRS, EMB et MSA... ..	30
<b>Tableau V a</b> : L'identification des isolats de milieu MRS.....	32
<b>Tableau V b</b> : Les résultats de milieu EMB.....	32
<b>Tableau V c</b> : Les résultats de milieu MSA .....	34

## *Liste des abréviations*

## **Liste des abréviations**

**pH** : Potentiel hydrogène

**HMF** : Hydroxy-Méthyl-Furfural

**PCA** : Plate Count Agar

**VF** : Viande foie

**MRS** : Gélose de Man, Rogosa, Sharpe

**EMB** : La gélose éosine-bleu de méthylène

**MSA** : Mannitol Salt Agar

**C/ml** : Cellule par millilitre

**UFC** : Unité formant colonie

# ***Table de matière***

## Table de matière

Remerciements.....	i
Dédicace.....	ii
Liste des figures .....	iii
Liste des tableaux.....	iv
Liste des abréviations.....	v
Introduction.....	1
<b>Partie Bibliographique .....</b>	
<b>I. Généralités sur le miel .....</b>	<b>3</b>
1 Définition du miel.....	3
2 Composition chimique.....	3
2.1. Les sucres .....	3
2.2. L'eau .....	5
2.3. Composants secondaires .....	5
3 Propriétés Physicochimique .....	7
3.1. Le pH.....	7
3.2. Hydroxy-Méthyl-Furfural (HMF) .....	7
3.3. La conductibilité électrique .....	8
3.4. Viscosité.....	8
3.5. Indice de réfraction (pourcentage BRIX).....	8
3.6. Pouvoir colorant .....	8
3.7. Fluorescence.....	8
4 Les types du miel.....	9
4.1. Selon l'origine-floral .....	9
4.1.1. Miel mono floraux .....	9
4.1.2. Les miels polyfloral .....	9
5 Le parcours du nectar au miel (Fabrication du miel par les abeilles).....	9
<b>II. Flore microbienne du miel et son origine .....</b>	
1. Origine des microorganismes présents dans le miel .....	11
1.1. Sources primaires.....	11
1.2. Sources secondaires .....	13
2. Microorganismes indicateurs de qualité sanitaire.....	13

3. Les trésors microbiens du miel : les microorganismes au service de la santé humain  
14

**Partie Expérimentale .....**

**I. Matériels et méthodes .....**

1. Échantillonnage..... 16
2. Evaluation des paramètres physico-chimiques ..... 18
- 2.1. Mesure du potentiel hydrogène (pH)..... 18
- 2.2. Mesure de l'HMF ..... 18
3. Analyse microbiologique du miel..... 19
- 3.1. Dénombrement de la flore mésophile totale ..... 20
- 3.2. Isolement et identification du microbiote du miel ..... 20
- 3.2.1. La recherche des spores de bactéries anaérobies et sulfite réductrice.... 20
- 3.2.2. La recherche des *Enterococcaceae* ..... 21
- 3.2.3. Isolement des *Lactobacillaceae* ..... 22
- 3.2.4. Isolement des *Enterobacteriaceae* ..... 22
- 3.3. Identification phénotypique ..... 22
- 3.3.1. Observation à l'état frais ..... 23
- 3.3.2. Coloration de Gram ..... 23
- 3.3.3. Test Catalase..... 24

**II. Résultats et discussion .....**

1. Évaluation des caractéristiques physicochimiques ..... 25
- 1.1. Mesure du potentiel hydrogène (pH)..... 25
- 1.2. Mesure de l'HMF ..... 25
2. Analyse microbiologique du miel..... 27
- 2.1. Le comptage de la variété bactérienne..... 27
- 2.2. La recherche des spores de bactéries anaérobies et sulfite réductrice..... 29
- 2.3. La recherche des *Enterococcaceae*..... 29
3. Evaluation de la diversité de microbiote du miel..... 30

**Conclusion ..... 38**

**Références bibliographiques**

# ***Introduction***

## Introduction

Depuis la préhistoire, L'homme récolte artisanalement le miel synthétisé par les abeilles pour ses valeurs nutritives et curatives. Aujourd'hui, malgré une tendance mondiale au déclin et à la disparition des essaims d'abeilles. Les apiculteurs s'emploient à ce que leurs abeilles produisent des éléments de qualité supérieure en quantités appropriées pour répondre aux attentes des consommateurs le miel est perçu par le grand public comme un aliment naturel, pur, reconnu pour ses nombreux bienfaits. indispensable pour sa bonne santé (Lequet, 2010).

La compréhension et l'utilisation du miel par l'humanité remontent aux temps les plus anciens, grâce à ses bienfaits médicaux à la fois préventifs et thérapeutiques. C'est le produit le plus célèbre du nid d'abeilles qui n'a pas d'égal, est l'un des principaux aliments naturels purs entrant dans l'alimentation humaine, en tant que source essentielle de glucides à haute teneur en énergie de composition chimique abondante et de ses divers propriétés thérapeutiques (antimicrobiennes, cicatrisantes, antioxydantes, etc.) et prophylactiques (Bogdanov, 2011, Hocine et al., 2018). Bien que le miel soit riche en sucre et en inhibiteurs, il reste sensible à la contamination bactérienne ou fongique, ce qui peut l'abîmer, tout comme les autres solutions sucrés et acides, peut subir des altérations au fil du temps (Schweitzer, 2005).

Le miel peut être contaminé par des microorganismes issus soit de la source principale ou primaire à savoir : le pollen, le tractus gastro-intestinal des abeilles, l'environnement aérien, le nectar, les particules atmosphériques et le sol ; ou bien d'une source secondaire émergent lors du traitement du miel par les apiculteurs, incluant l'exposition à l'air, la manipulation des denrées alimentaires et le risque de la contamination croisée et l'utilisation de matériel. Bien que le contrôle des principales sources de contamination du miel soit complexe, celui des sources secondaires peut être assuré grâce à la mise en place de bonnes pratiques de production. Les micro-organismes notables présents dans le miel incluent les bactéries sporulées, les champignons, et notamment les levures, qui jouent un rôle clé dans le processus de fermentation du miel lorsqu'il contient un taux d'humidité élevé (Louveaux, 1985). Le miel renferme une grande diversité de bactéries, la plupart étant inoffensives pour les humains (Zucchi et al., 2001).

Dans cette perspective, notre projet de fin d'étude a été menée au sein du Laboratoire de microbiologie pédagogique de la Faculté SNVST de l'Université Akli Mohand Oulhadj, située à Bouira. À l'occasion d'évaluation des propriétés physicochimiques (pH, HMF) et le contrôle de la qualité microbienne (bactéries totales, coliformes, spores sulfites réductrices),

ainsi que l'identification du microbiome de plusieurs échantillons de miel provenant de différentes régions d'Algérie (à savoir : Bouira, Béjaïa, Djelfa et Msila).

# *Partie Bibliographique*

## I. Généralité sur le miel

### 1. Définition du miel

Un glucide complexe fabriqué par les abeilles domestiques et sauvages, appelées « mellifères », qui sont largement répandues à travers le monde. Le miel le plus couramment récolté par l'humain, c'est celui d'abeille européenne *Apis mellifera* (Alaerjani et Mohammed, 2024 ; Bonté et Desmoulière, 2013).

Cette substance sucrée est principalement découlant du nectar, et parfois du miellat, qui est issu des sécrétions des plantes ou même des excréments d'insectes comme les pucerons et les cochenilles. Ces matières sont recueillies par les abeilles butineuses, puis transformées en les combinant avec d'autres substances qui leur sont propres, déposées, déshydratées, stockées et laissées mûrir dans leurs nids. Le produit final peut être soit fluide, soit épaisse ou cristallisée (Alaerjani et Mohammed, 2024).

### 2. Composition chimique

Le miel est une combinaison extrêmement complexe de différents nutriments et éléments, dont les taux de concentration diffèrent en fonction de divers éléments (Ranneh, 2021). Lors de sa préparation et de sa maturation, il traverse de multiples étapes qui sont pris en considération et qui influencent sa structure chimique finale. Cela englobe divers aspects tels que la localisation géographique, la variété de la flore butinée, les saisons, la qualité du sol, les interactions environnementales et la race des abeilles. Il inclut également les enzymes présentes chez les abeilles butineuses, ainsi que les paramètres de la ruche tels que l'humidité, température, ventilation et l'état physiologique général, les pratiques apicoles employées, ainsi la durée de stockage (Ballot-Flurin, 2010, Chikhaoui, 2024).

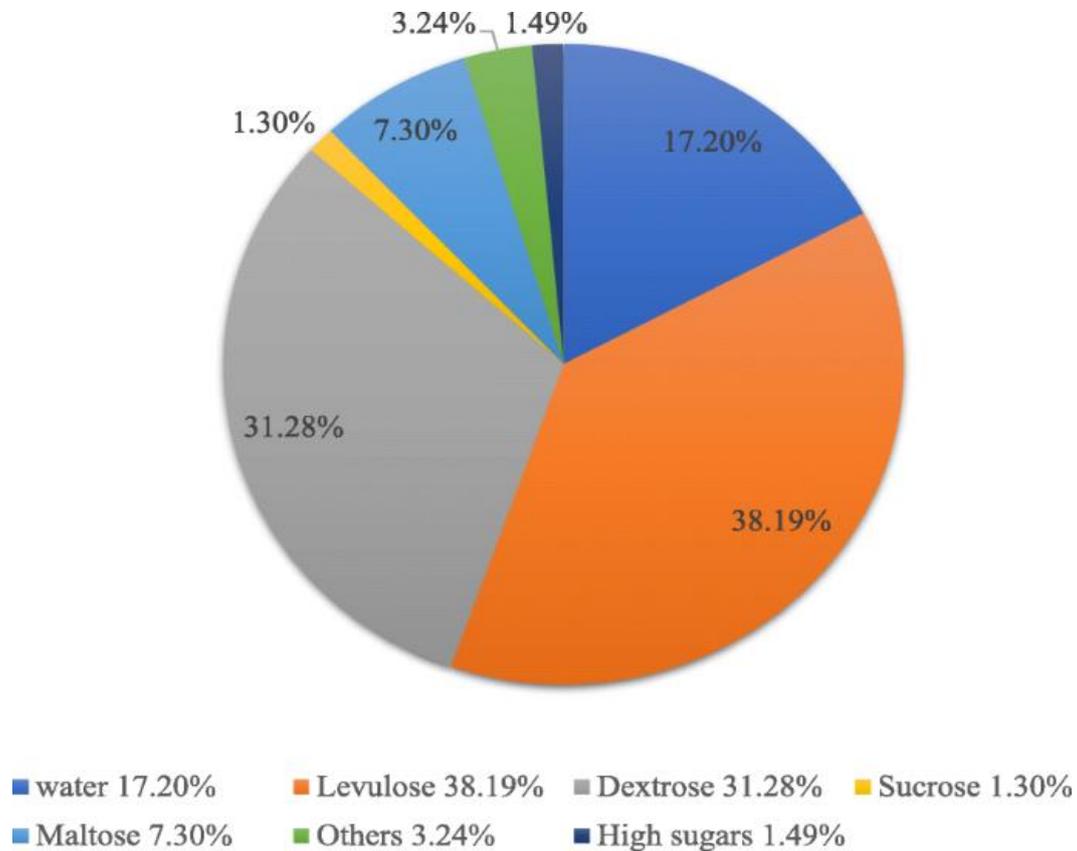
Ce n'est qu'environ 80 % de la composition physique et chimique des miels est commune. Cette diversité se traduit par une variété de teintes, de saveurs et de consistances dans le miel (Ranneh et al., 2021).

Typiquement, le miel est principalement constitué de sucres, d'eau et de composants secondaires.

#### 2.1. Les sucres

La majeure partie de la composition du miel, approximativement 80 %, est composée de sucres comme la **figure n°1** montre, ce qui influe particulièrement sur sa viscosité, son hygroscopique et sa cristallinité (Louvain, 2005), Les monosaccharides, fructose et glucose constituent la grande majorité (environ 75 %) des sucres présents en quantité significative dans le miel avec des taux respectivement de 28 à 40 % et 20 à 35 % (Mehdi, 2016 ; Ranneh *et al.*,

2021). D'autres sucres, tels que le saccharose, la kestose et la mélézitose, sont également présents en moindre quantité dans le miel et raffinose, tous d'origine végétale (ils font partie du nectar ou du miellat). D'autres sucres, tels que le maltose, sont des produits dérivés de l'activité enzymatique des abeilles (Lequet, 2010).



**Fig. 1** : Diagramme en cercle représentant les éléments constitutifs du miel (Ranneh et al., 2021).

La **figure 1** décrit une concentration importante de glucides qui forment le noyau principal du miel révèle une quantité près de 80 %, cependant d'environ 17 % d'eau, et de 3,24 % d'autres composants comme les enzymes, les protéines et les vitamines, dans des recherches menées sur des échantillons de miel de diverses régions géographiques ont révélé la présence de plus de 20 types de glucides différents (Lovain, 2005 ; Ranneh et al., 2021). Les chiffres présentés dans le diagramme varient en fonction du type de miel.

## 2.2. L'eau

La teneur en eau du miel dépend principalement de l'humidité du nectar au moment de la collecte, mais cette caractéristique peut être modifiée par plusieurs éléments, Des aspects additionnels à considérer englobent le timing de la récolte, les techniques de stockage et les paramètres météorologiques au moment de la collecte (Lovain, 2005).

D'après les normes légales, le miel peut avoir une humidité entre 14 - 20 %, mais pour garantir une bonne conservation, il est recommandé que cette humidité reste inférieure à 18%.

Au-dessus de ce seuil, le risque de fermentation augmente, ce qui peut altérer le goût du miel et créer un arrière-goût désagréable (Gallina et al., 2010 ; Louvain, 2005).

## 2.3. Composants secondaires

### a. Acide organique

Les acides organiques présents dans le miel influent sur son pH global relativement faible, dominé par l'acide gluconique, dérivé du glucose grâce à une bactérie nommée *Gluconobacter*. Cependant, on trouve également une variété d'acides organiques dans le miel, comprenant l'acide acétique, l'acide lactique, citrique... contribuent à son caractère acide (Bonté et Desmoulière, 2013 ; Huchet *et al.*, 1996).

### b. Les protides

Les miels correctement récoltés présentent généralement une teneur réduite en protéines, se situant généralement autour de 1,7 gramme par kilogramme de miel, soit environ 0,26 %. Originaires d'une source végétale ou animale, Ces protéines du miel sont principalement affiliées aux peptones, d'albumines, de globulines et de nucléoprotéines. De plus, on trouve des acides aminés libres tels que la proline soit 50 % et 85 %, ainsi que de la glycine, de l'arginine, de la valine et de la tyrosine, provenant des sécrétions salivaires des abeilles (Mehdi, 2016 ; Sellali, 2017).

### c. Les enzymes

Le miel contient des enzymes, des protéines qui accélèrent les réactions biochimiques. Leur concentration varie en fonction de l'origine florale du miel et de l'intensité de la récolte (Bruneau, 2005).

Les enzymes présentes dans le miel proviennent principalement de deux sources : végétale et animale. Elles peuvent provenir des nectars floraux ou des sécrétions salivaires des abeilles. Parmi ces enzymes figure la saccharase, également appelée invertase, et la diastase (ou amylases alpha et bêta qui dégradent l'amidon) sont plus précieuses. Ainsi, la catalase, la

phosphatase, des enzymes acidifiante, la gluco-oxydase qui convertit le glucose en acide glucan (Bruneau, 2005 ; Rossant, 2011).

Ces enzymes sont sensibles à la chaleur et particulièrement affectées par le vieillissement. Elles fournissent une indication plus précise des chocs thermiques que le HMF (Hydroxyméthylfurfural) dans le miel, ce qui les rend utiles comme indicateurs de surchauffe (Bruneau, 2005 ; Rossant, 2011).

#### **d. Les vitamines**

Le miel est pauvre en vitamines et ne contient pas de vitamines liposolubles telles que la vitamine A et la vitamine D. Cependant, il renferme des vitamines B, apportées par les grains de pollen en suspension, comme la thiamine (B1), la biotine, l'acide nicotinique (B3) et la vitamine B9. De plus, il contient de la vitamine C, principalement provenant du nectar de menthe. Les vitamines dans le miel sont mieux préservées dans un environnement à pH plus bas (Rossant, 2011).

#### **e. Sels minéraux**

Le miel contient environ 0,05 % de minéraux, bien que les variétés plus foncées en possèdent davantage, jusqu'à 0,17 %. Environ 50 % des minéraux du miel sont constitués de potassium. Le miel contient également du calcium, du sodium, du magnésium, du cuivre, du manganèse, du chlore, du soufre, du silicium et du fer (Clément, 2015).

#### **f. Lipides**

La proportion de lipides dans le miel est très faible, sous forme de glycérides et d'acides gras tels que l'acide palmitique, oléique et linoléique. Ces lipides proviendraient probablement de la cire (Nair, 2014).

#### **g. Composés aromatiques**

Presque cent composés aromatiques présents dans le miel ont été identifiés et analysés. Ces arômes ont un impact important sur l'expérience sensorielle du miel. C'est une combinaison de différents composés : alcools, cétones, acides et aldéhydes. Il est préférable de conserver ces arômes en les réfrigérant dans un récipient hermétique (Bogdanov et al., 2003); (Lachman et al., 2010).

#### **h. Pigmentation**

Les pigments, tels que les caroténoïdes et les flavonoïdes, sont essentiels dans la coloration du miel (da Silva et al., 2016). Les flavonoïdes, qui appartiennent à la catégorie des polyphénols, se distinguent par leurs propriétés antioxydantes, participant ainsi à la

neutralisation des radicaux libres, et leur abondance ainsi que leur type varient selon la source florale spécifique. Il est à noter que la noirceur du miel est souvent corrélée à sa richesse (Couquet, 2013).

#### i. Autres constituants :

Le miel peut renfermer une variété d'éléments, notamment des pollens, oligo-éléments, algues unicellulaires, spores, levures osmotolérantes capables de fermentation, ainsi que des champignons microscopiques (Couquet et al., 2013).

### 3. Propriétés Physicochimique

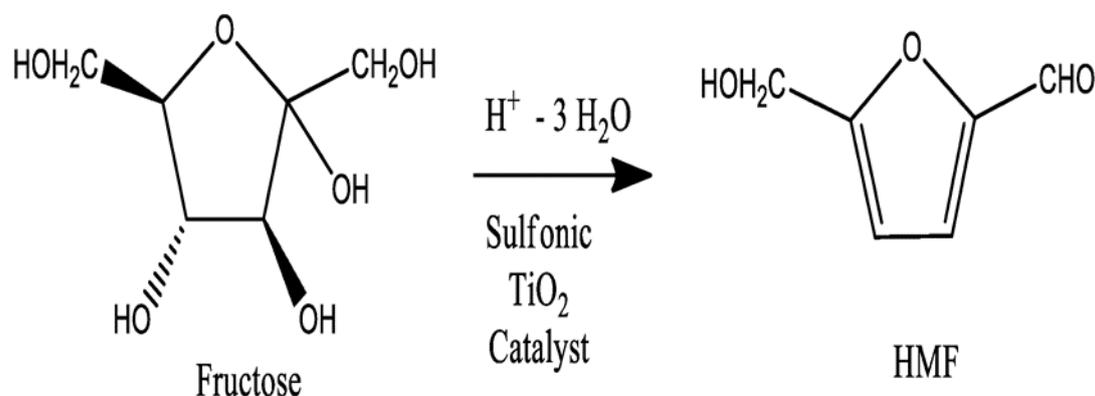
#### 3.1. Le pH

Également connu sous le nom de potentiel hydrogène, est une mesure qui évalue la teneur en ions  $H^+$  d'une solution (Sellali, 2017). Les miels sont tous acides et c'est sans doute l'abeille qui lui donne cette caractéristique, qui est influencée par la présence d'acides organiques. Il se situe généralement entre 3,5 et 4,5 pour le miel, tandis qu'il se trouve entre 4,5 et 5,5 pour le miellat (Bruneau, 2005).

#### 3.2. Hydroxy-Méthyl-Furfural (HMF)

Une molécule obtenue par dessiccation des hexoses (monosaccharides) (**figure n°2**). Le miel n'abrite pas cette substance dès sa récolte, mais elle peut se former ultérieurement sous l'influence du temps et de la température.

Tout miel se dégrade lentement, et le fait de chauffer le miel pendant une courte période ne provoque qu'une simple dégradation et une légère augmentation du HMF. Mais il se dégrade rapidement lors du chauffage prolongé, ce qui fait du HMF synonyme de fraîcheur du miel (Laudine, 2010 ; Bogdanov *et al.*, 2004a ; Bradbear, 2010).



**Fig. 2** : La dégradation du fructose en 5-HMF (Testa et al., 2020).

### 3.3. La conductivité électrique

La conductivité électrique mesure la capacité d'un matériau à conduire le courant électrique. Elle dépend de la quantité de substances ionisables, qu'elles soient minérales ou organiques, présentes dans le matériau. L'évaluation de la conductivité électrique fournit des indications sur l'origine botanique du miel et permet de distinguer entre différents types de miel.

Il est important de souligner que les miels de couleur plus foncée tendent à avoir une concentration plus élevée en ions, ce qui leur confère une conductivité plus élevée (Makhloufi, 2010).

### 3.4. Viscosité

La viscosité d'un fluide est une mesure de friction interne, proportionnelle à la masse d'eau et à la température. Il est essentiel pour assurer la fluidité du miel. Quand la température atteint 30°C, elle baisse et fluctue doucement au-dessus de 35°C (Chauvin, 1968 ; Rossant, 2011).

### 3.5. Indice de réfraction (Pourcentage BRIX)

L'indice de réfraction est une propriété optique caractéristique de toutes les substances transparentes. Cette caractéristique est influencée par la quantité d'eau présente et la température. Dans le cas du miel, un indice de réfraction plus élevé indique une teneur en eau plus basse et est également associé à une concentration plus élevée en sucre. En revanche, cet indice diminue avec l'augmentation de la température.

La teneur en humidité de la plupart des miels se situe entre 13 % et 18 %, avec des valeurs d'indice de réfraction variant entre 1,5041 et 1,4915 à 20 °C (Guerzou et Nadji, 2009 ; Terrab *et al.*, 2004).

### 3.6. Pouvoir colorant

Selon **Hoyet (2005)**, selon l'origine florale, la localisation et la composition, le miel peut avoir des teintes variées. En général, les différentes teintes du miel sont toutes vont du clair et incolore (comme l'eau), jaune brun, peuvent également présenter des teintes verdâtres (miellat), grisâtres (tournesol), ou rougeâtres, voire certaines nuances foncées allant jusqu'au presque noir. Il est noté que le processus de chauffage et de vieillissement entraîne généralement une intensification de la couleur du miel (Lequet, 2010).

### 3.7. Fluorescence

En effet, différents types de miels présentent une fluorescence variable lorsqu'ils sont exposés à la lumière ultraviolette. Cette fluorescence peut se manifester sous différentes couleurs. Par exemple, certains miels, comme ceux provenant du châtaignier, peuvent présenter une légère fluorescence en présence de lumière UV (Nair, 2014).

## 4. Les types du miel

### 4.1. Selon l'origine florale

Les propriétés spécifiques des différentes espèces de plantes à fleurs ont un impact majeur sur la composition macroscopique du miel, entraînant ainsi des variations notables dans les différentes variétés de miel (Bodor *et al.*, 2021). En fonction de leur origine botanique, les miels sont généralement répartis en deux catégories :

#### 4.1.1. Miel mono-floral

Le miel mono-floral, également désigné comme miel unifloral, est issu du nectar ou du miellat d'une unique espèce de fleurs. Sa fabrication nécessite souvent l'installation de ruches à proximité des plantes spécifiques dont on souhaite extraire le nectar. Leur origine florale peut être identifiée en identifiant les principaux grains de pollen (Altman, 2010 ; Rossant, 2011).

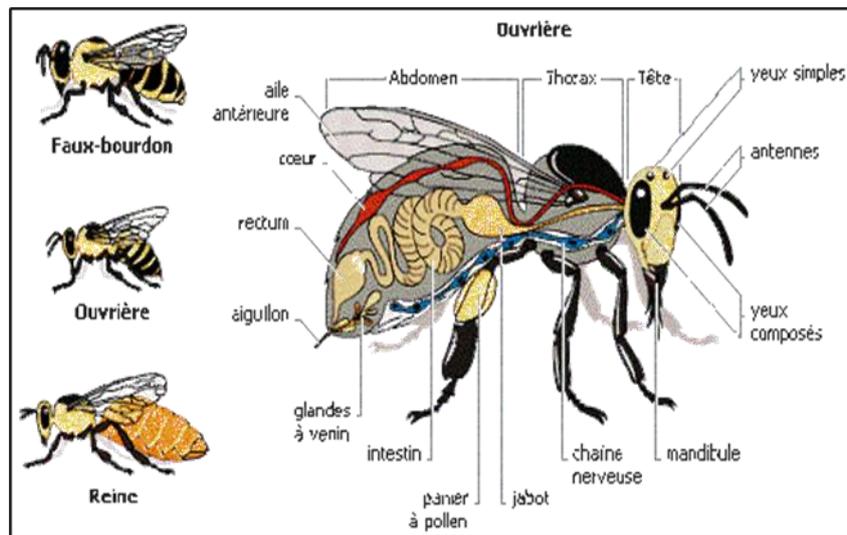
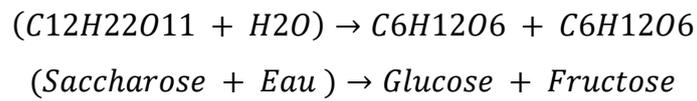
#### 4.1.2. Miel polyfloral

Comme leur nom l'indique, les miels multi floraux proviennent de variétés végétales différentes sans avantage spécifique : ils sont le résultat d'un butinage dans un contexte où diverses plantes fournissent du nectar en même temps. On peut donc, en règle générale, les désigner selon leurs caractéristiques géographiques (région, terrain...) : « Miel montagnoux », ou par genre de paysage floral : « Miel de forêt » (Bonté et Desmoulière, 2013 ; Rossant, 2011).

## 5. Le parcours du nectar vers le miel

Les abeilles sont connues pour leur comportement social et sont organisées en trois castes comme **figure n° 3** expliquer, chacune effectuant des fonctions spécifiques au sein de la colonie à savoir : **la reine**, responsable de la ponte des œufs et de la gestion des activités de la colonie. **Les ouvrières (femelles)**, s'occupent de toutes les tâches domestiques, notamment le nettoyage, le nourrissage des larves, la surveillance, la production de cire et l'évaporation. **Les faux-bourdon (mâles)** ont en effet pour seule fonction de garantir la fertilité de ces reines (Bonté et Desmoulière, 2013 ; Page Jr, 2001)

Une fois récupérée, la matière première est rapidement combinée aux sécrétions des glandes salivaires nectarifères de l'abeille, ce qui la liquéfie et l'enrichit en enzymes. Parmi celles-ci, l'invertase joue un rôle clé en décomposant le saccharose en glucose et fructose, selon l'équation suivante (Bogdanov *et al.*, 1995).



**Fig. 3** : La structure morphologie des abeilles (Lien 01)

Tandis que la butineuse retourne à la ruche, et par trophallaxie, elle draine le liquide collecté de la récolte aux autres abeilles ouvrières en utilisant sa langue. Cet échange constant entre les abeilles enrichit le liquide en enzymes provenant des sécrétions salivaires et le déshydrate progressivement. Lorsque la teneur en eau de ce liquide diminue entre 40 % et 50 %, le miel est donc déposé dans une alvéole, où il poursuit sa maturation pendant quelques jours. Ceci représente une étape de double évaporation qui se déroule à des températures de ruche d'environ 36-38 °C, avec une ventilation assurée par les abeilles ventilatrices, qui maintiennent un courant d'air important, grâce au mouvement rapides de ses ailes, ce qui réduit le taux d'humidité à environ 17-18 %. Une fois ces valeurs atteintes, les ouvrières couvrent les rayons de la ruche avec la cire, qui est imperméable à l'air, elle devient donc une herméticité idéale pour conserver le miel pendant une longue période (Evans et Butler, 2010 ; Bogdanov *et al.*, 2004 ; Nair, 2014 ; Prost et Le Conte, 2005).

## II. Flore microbienne du miel et son origine

La présence d'acides et d'autres produits chimiques varie, ainsi le taux élevé de sucre dans le miel, lui permet d'avoir une activité antibactérienne et empêche la croissance de plusieurs germes (Silva *et al.*, 2017). Les micro-organismes couramment observés dans le miel peuvent être divisés en trois catégories bien définies à savoir : microorganismes sporulés et les levures, microorganismes servant d'indicateurs de la qualité sanitaire ou commerciale du miel, tels que les coliformes et les levures, les micro-organismes pathogènes nécessitent une attention particulière lors de la transformation et de la manipulation post-récolte afin d'assurer la sécurité du consommateur. D'autre part, il existe des micro-organismes connus sous le nom de probiotiques qui sont bénéfiques pour la santé humaine (Rajindran *et al.*, 2024).

### 1. Les origines des microorganismes présents dans le miel

Les principales sources potentielles de contamination microbienne incluent le pollen, le tractus digestif des abeilles mellifères, les particules en suspension dans l'air, la poussière, le sol et le nectar, dont le contrôle est souvent difficile. Ces mêmes sources peuvent également être des vecteurs secondaires de contamination (après récolte) qui influencent tout produit alimentaire sont également des sources de contamination du miel. Parmi celles-ci figurent l'exposition à l'air, la manipulation des aliments, la contamination croisée, l'utilisation d'équipements et les conditions de stockage. La gestion des sources secondaires de contamination repose sur l'adoption de bonnes pratiques de fabrication (Snowdon et Cliver, 1996).

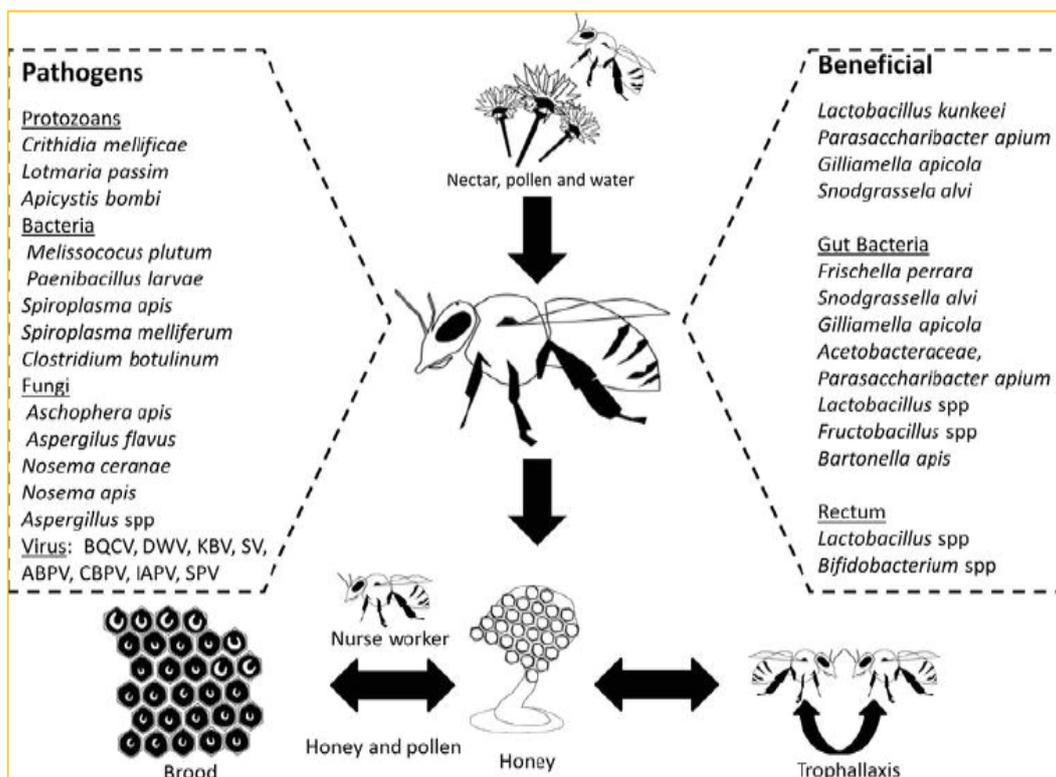
Malgré les nombreux facteurs inhibiteurs, certains micro-organismes peuvent survivre dans le miel, au moins sous forme latente, et peuvent constituer un moyen de transfert vers les consommateurs (Sinacori *et al.*, 2014).

#### 1.1. Les sources primaires

La propolis, un enduit qui protège une ruche, maintient son asepsie grâce à ses propriétés antibactériennes et antifongiques. Ils conservent ainsi le miel dans des conditions aseptiques. Dans ces circonstances, seuls quelques micro-organismes peuvent se développer ou subsister dans le nid d'abeilles. Principalement, ce sont des bactéries et des levures, issues des abeilles elles-mêmes, des matières premières telles que le nectar, ou de sources externes (**figure n°4**). Les larves peuvent être initialement stériles, mais elles se nourrissent du nectar et du pollen. De cette manière, elles sontensemencées avec le nectar, le pollen et la flore bactérienne des abeilles

ouvrières avant de passer par leur métamorphose en nymphe. Ce qui permet la propagation des microorganismes dans la colonie (Olaitan *et al.*, 2007).

Les sources primaires désignent tous les éléments favorisant la présence des microorganismes dans le miel avant son extraction. Ces sources de contamination, incluant notamment le tube digestif des abeilles, qui héberge une diversité naturelle de microorganismes, varient selon les saisons et les périodes de floraison. Elles comprennent les éléments collectés tels que le nectar, le pollen et la propolis, ainsi que des composants environnementaux comme l'air, le sol, l'eau, les fleurs et les conditions internes de la ruche. Ces microorganismes sont particulièrement dominants dans le miel (Laredj, 2017 ; Róžańska et Osek, 2012).



**Fig. 4** : Les origines principales de micro-organismes dans le miel (Silva *et al.*, 2017)

Selon le schéma présenté dans **la figure n°4**, Les abeilles mellifères ont un microbiote bénéfique composé de différentes espèces de bactéries à Gram positif et à Gram négatif et de levures. Ce microbiote est acquis par l'abeille lorsqu'elle se nourrit de pollen, de miel et d'autres substances, même lors des interactions entre les différents individus, bien que les abeilles mellifères aient un microbiote bénéfique, elles sont également exposées à des microorganismes pathogènes.

## 1.2. Les sources secondaires

Le miel comme tout aliment prêt à être consommé, peut être exposé à des différents micro-organismes pendant les étapes de manipulation qui ne respectent pas les normes exigées pendant et après la récolte, sont considérés comme une cause directe de contamination des miels (Laredj, 2017 ; Tesfaye *et al.*, 2024).

Certaines manipulations humaines, telles que les infections cutanées, les éternuements ou la contamination fécale, ainsi que les équipements contaminés dans les mielleries, les récipients, l'air (à domicile ou lors du emboîtement du miel, la présence de poussière, les conditions de transport et de stockage, ainsi que leur durée, peuvent impacter la qualité nutritionnelle du miel, favorisent ainsi la prolifération des micro-organismes qui sont capables de survivre dans la composition inhérente du miel (Olaitan *et al.*, 2007).

## 2. Les microorganismes

Les études menées par Sackett en 1919 ont mis en évidence la présence de bactéries telles que *Bacillus*. Les levures peuvent être naturellement isolées des ruches et des abeilles adultes. De multiples espèces microbiennes ont aussi été trouvées dans les excréments des larves d'abeilles (Olaitan *et al.*, 2007). Les espèces de *Bacillus* sont les plus couramment trouvées, suivies par des bactéries pléomorphes à Gram variable. Des moisissures, des actinomycètes, des bactéries Gram négative. Cette composition bactérienne présente une similarité avec celle de la microflore intestinale des abeilles matures (White, 1996).

### 2.1. Les microorganismes indicateurs de qualité sanitaire

#### 2.1.1. *Clostridium botulinum*

Les micro-organismes pathogènes les plus connus dans le miel incluent *Bacillus cereus* et les bactéries du genre *Clostridium*. D'autres espèces fongiques souvent trouvées dans le miel sont *Alternaria alternata* et *Aspergillus niger*. Il existe également un risque potentiel de botulisme en raison de la présence possible de spores de *Clostridium botulinum*. Surtout chez les nourrissons, d'un à deux ans en raison de leur système digestif immature, ceci pourrait encourager une multiplication excessive de cette bactérie et la production de la toxine botulique. C'est pourquoi certains pays interdisent l'incorporation du miel dans l'alimentation des nourrissons (Nicolaÿ, 2014).

### 3. Les trésors microbiens du miel : Les micro-organismes au service de la santé humaine

La microflore intestinale joue un rôle crucial dans le métabolisme humain, en favorisant la production et l'assimilation des nutriments essentiels, ainsi la régulation du système immunitaire. La flore intestinale est constituée de 500 à 600 espèces de micro-organismes (Engelkirk et Duben-Engelkirk, 2011).

Lors du processus de production de miel, les abeilles collectent du nectar qu'elles enrichissent en y ajoutant des enzymes et des micro-organismes symbiotes liés à leur système digestif, qui peuvent être bénéfiques pour la santé humaine. En favorisant la fermentation, ces micro-organismes, appelés probiotiques. Ces enzymes et micro-organismes peuvent contribuer à la digestion et à l'assimilation de certains nutriments essentiels, tels que les acides gras à chaîne courte, les ions, les amines et les protéines (Anadón *et al.*, 2016 ; Endo et Salminen, 2013).

Contrairement aux autres bactéries, la *Gluconobacter oxydans*, identifiée dans le miel prélevé directement de la ruche, a démontré une survie élevée dans des conditions acides. Elle peut passer de l'estomac à l'intestin grâce à cette capacité de survie, où elle peut se développer et profiter de l'environnement. En outre, ces bactéries ont la capacité de diminuer l'assimilation du cholestérol dans le corps et sont donc perçues comme des probiotiques avantageux pour l'alimentation (Begum *et al.*, 2015 ; Kappeng et Pathom-Aree, 2009).

Les bactéries lactiques fructophiles, comme les *Lactobacillus kunkeei*, ont été rencontrées dans l'estomac des abeilles mellifères et dans leurs ruches. Ces bactéries ont une capacité accrue à décomposer le fructose présent dans le miel et à synthétiser des bactériocines, qui sont une barrière contre d'autres micro-organismes et renforcent le système immunitaire (Endo et Salminen, 2013).

Les bactéries qui vivent dans le miel peuvent produire des composés qui ont la capacité de réduire ou d'éliminer d'autres bactéries, *Lactobacillus helsingborg ensis* et *Lactobacillus kunkei* sont les bactéries les plus prometteuses concernant la production de bactériocines afin de diminuer la compétition pour les nutriments (Veress *et al.*, 2016). Sont étudiés en tant qu'alternatives aux antibiotiques. Selon les recherches, il a été démontré que certaines souches bactériennes extraites du miel peuvent générer des bactériocines qui ont un effet inhibiteur sur des champignons tels que *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* et *Botrytis cinerea* (Zhao *et al.*, 2013).

Les probiotiques, également connus sous le nom de prébiotiques, jouent un rôle crucial dans la formation de micro-organismes bénéfiques pour notre santé. Il s'agit de prébiotiques, comme les oligosaccharides, qui ne sont pas assimilés par le corps humain, mais

qui jouent un rôle essentiel en tant que nutriments pour la croissance et l'activité des probiotiques. Selon les recherches, l'association de probiotiques et d'oligosaccharides qui agissent comme des prébiotiques, stimulent la croissance et l'activité antibactérienne des probiotiques. Certains types de miel renferment des malto-oligosaccharides, comme l'isomaltose, la cellobiose, le panose, la raffinose et le maltose (Da Costa Leite *et al.*, 2000 ; Silva *et al.*, 2017).

# *Partie Expérimentale*

## Matériels et méthodes

Grâce à son image de produit sain et diététique, le miel retrouve une grande popularité en tant que produit naturel. Cela soulève des questions sur ses propriétés physicochimiques au cours du temps et sa composition microbiologique.

Le miel, à l'instar de tous les produits d'origine animale, contient une flore microbienne spécifique, qui est une composante essentielle du produit et repose sur ses caractéristiques physico-chimiques.

Dans cette optique, cette étude a été menée au sein du laboratoire pédagogique de la Faculté SNVST de l'université de Bouira. L'objectif est d'évaluer les caractéristiques physicochimiques (pH, HMF).et d'effectuer un contrôle de qualité microbiologique, ainsi que l'identification microbiologique de plusieurs échantillons de miel provenant de différentes régions de l'Algérie.

### 1. Echantillonnage

Cette recherche a impliqué huit (8) échantillons de miel (**Figure n° 5**) présenter dans le tableau I et tableau II, collectés en 2022 de différentes wilayas d'Algérie (**Figure n°6**) qui compte : Wilaya de Bouira, Béjaïa, Msila et la Wilaya de Djelfa. Ces échantillons ont été conservés à température ambiante à l'abri de la lumière. Le choix s'est porté sur ces régions en raison de leur réputation en apiculture, et leurs diversités florales.



**Fig. 5** : Les échantillons de miel utilisés (Photographie originale)



**Fig. 6** : Carte géographique des sites d'échantillonnage du miel

**Tableau I** : les variétés de miel utilisées

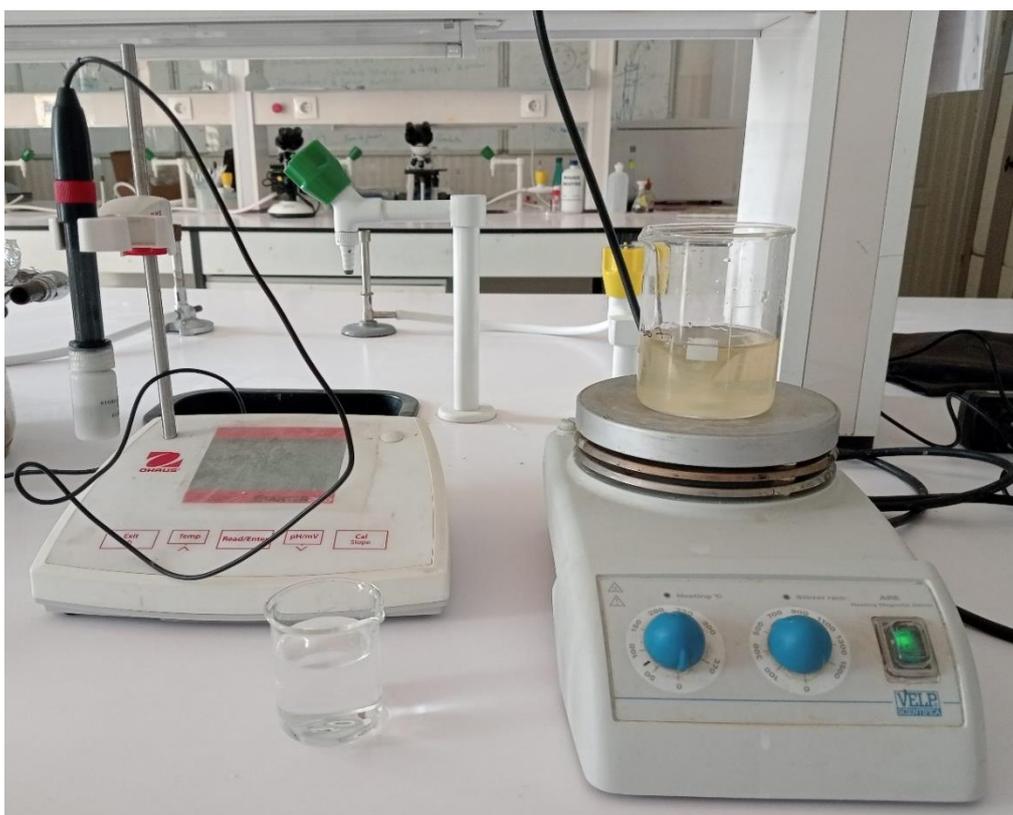
**Coordonné**

Numéro de l'échantillon	Code	Origine floral	Date de récolte	Localisation	Cordonnée GPS	Information climatique
1	S	<i>Eruca sativa</i>	2022	Aïn Lahdjet (Msila)	DD: 3,8451731 35,613995	Méditerranéen à 19,7°C
2	E	Euphorbe	mai-22	Benhar (Djelfa)	DD: 34,672773 3,263	Subtropical humide à 18,4°C
3	R	Romarin	2022	Hammam Fraksa (Bouira)	5XP7+C26 Hammame Fraksa, El Hachimia 10000	Méditerranéen à 18,5°C
4	M	Montagne	juil-22	Aït Laaziz (Bouira)	DD: 36,44086 3,86985	Chaud et sec à 27,7°C
5	TF	Toutes fleurs	fin juin 2022	Semmache (Bouira)	DD: 36,34992 4,15605	Chaud et sec à 24,8°C
6	GM	Lbina (Miellée)	janv-22	Aïn Bessam (Bouira)	DD: 36,29333 3,67319	Méditerranéen à 10,6°C
7	DJ	Jujubier	2022	Aïn Oussara (Djelfa)	DD: 35,45139 2,90583	Subtropical humide à 15,9°C
8	Ruch	Toutes fleurs	2022	Beni Maouche (Béjaïa)	DD: 36,483689 4,737453	Méditerranéen à 17,8°C

## 2. Evaluation des paramètres physicochimiques

### 2.1. Mesure du potentiel hydrogène (pH)

Un bécher a été utilisé pour peser dix grammes (10 g) de miel, ont ensuite été dissous dans 100 ml d'eau distillée. Ensuite, l'électrode du pH-mètre a été rincée avec de l'eau distillée et séchée avec du papier absorbant, celle-ci a été immergée dans le bécher placé sur un agitateur magnétique (**Figure n°7**). La valeur du pH s'est affichée directement sur l'écran de l'appareil une fois stabilisée.



**Fig.07** : Mesure de pH (Photographie originale)

### 2.2. Mesure de l'HMF

Pour mesurer l'HMF, la première étape consiste à préparer les réactifs nécessaires à savoir :

- **La solution Carrez I (à 15%)** : après avoir pesé 15 g d'hexacyanoferrate de potassium [ $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ] dans une balance analytique ; Il a été dissous dans de l'eau distillée et diluer dans une fiole jaugée jusqu'à atteindre un volume de 100 ml.
- **La solution Carrez II (30%)** : 30 g de l'acétate de zinc [ $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ] a été mesuré sur une balance analytique ; Ensuite a été dissous avec l'eau distillée afin d'avoir un volume de 100 ml.

- **La solution de bisulfite de sodium [NaHSO<sub>3</sub>-0,2%] (m/v)** a été réalisée en pesant 0,2 g sur une balance analytique, liquéfié avec l'eau distillée jusqu'à 100ml. Selon (Sereia et al., 2017), cette solution doit être utilisée le jour même de sa préparation.

Dans 25 ml d'eau distillée, 5 g de miel ont été dissous, puis homogénéisés avec 0,5 ml de la solution de Carrez I, et ensuite avec 0,5 ml de la solution de Carrez II. Le volume du mélange a été ajusté à 50 ml en ajoutant de l'eau distillée. Ensuite, la solution a été filtrée à travers du papier filtre Whatman.

Ensuite, 5 ml du filtrat ont été mélangés avec 5 ml de la solution de sodium bisulfite (0,2 %) pour former la solution de référence, tandis que le même volume du filtrat a été mélangé avec 5 ml d'eau distillée pour former la solution échantillon. Une fois que la solution a été homogénéisée. En utilisant un spectrophotomètre, L'absorbance de la solution d'échantillon par rapport à celle de la solution de référence a été mesurée à des longueurs d'onde de 284 et 336 nm dans une cuve en quartz.

Lorsque l'absorbance à 284 nm dépasse environ 0,6, pour réduire l'absorbance de l'échantillon à un niveau adéquat, Il est recommandé de diluer la solution d'échantillon avec de l'eau et la solution de référence avec une solution de bisulfite de sodium pour garantir une précision optimale des mesures d'absorbance. Lorsque des dilutions sont nécessaires, le facteur de dilution (D) est déterminé par (Bogdanov *et al.*, 1997) :

$$D = \frac{\text{Volume final de solution échantillon}}{10}$$

La valeur de HMF a été calculé par l'équation suivante

$$HMF \left( \frac{mg}{kg} \right) = \frac{(A_{284} - A_{336}) \times 149,7 \times 5}{W}$$

**Soit :**

- A<sub>284</sub> : L'absorbance à 284 nm
- A<sub>336</sub> : L'absorbance à 336 nm
- W : La masse en grammes de l'échantillon de miel
- 149,7 = Une constante
- 126 = Le poids moléculaire de HMF

### 3. Analyse microbiologique du miel

Avant de se lancer dans toutes analyses microbiologiques soit : dénombrement de la flore mésophile totale, ou la recherche des germes pathogènes ou voir évaluer la flore bactérienne cultivable, nous avons préparé la solution mère d'une concentration de 1g/ml comme le montre la figure n°8. Sous les conditions d'asepsie un gramme de chaque miel est

dissous dans un millilitre d'eau distillé. Par la suite les solutions mères sont conservées à 4°C pour d'éventuelle investigation.



**Fig. 8 :** La préparation des suspension mère

### 3.1. Dénombrement de la flore mésophile totale.

En première étape pour procéder au dénombrement de la flore totale mésophile, des dilutions décimales sont préparées à partir de la solution mère. À partir de la dilution ( $10^{-1}$ ) une autre dilution de  $10^{-2}$ . Cette opération a été répétée pour tous les échantillons. Et toutes les étapes ont été effectuées dans des conditions stériles pour prévenir toute contamination éventuelle.

Afin de déterminer le nombre de la flore totale mésophile dans les échantillons du miel un ensemencement en masse a été réalisé en utilisant le milieu PCA (Plate Count Agar). Dans des conditions aseptiques, 100  $\mu$ l de chaque dilution à  $10^{-2}$  des échantillons ont été prélevés et transférés individuellement dans des boîtes de Pétri étiquetées. Ensuite, environ 15 ml de gélose PCA ont été ajoutés en surfusion dans chaque boîte. Chaque boîte a été mélangée de manière homogène à l'aide d'un mouvement circulaire lent et en forme de huit ce qui permet à l'inoculum de se mélanger à la gélose. Enfin, l'incubation des boîtes a été réalisée dans une étuve à 37 °C pendant 48 heures. Cela permet de vérifier la présence et la croissance de micro-organismes.

### **3.2. Isolement et identification du microbiote du miel**

Afin de lancer la recherche des bactéries ; la plus importante étape c'est d'augmenter la charge bactérienne pour cela une étape d'enrichissement a été réalisée.

A partir de la suspension mère, une quantité de 1000µl a été inoculé dans des tubes de 5 ml de bouillon LB. Par la suite, ces tubes ont été placés dans une étuve à une température stable de 37°C, pendant 24 heures, ce qui a favorisé la croissance des bactéries. Le lendemain, les tubes incubés ont été recueillis et traités afin de préparer les dilutions adéquates (Guiraud, 2012).

#### **3.2.1. La recherche des spores de bactéries anaérobies et sulfito-réductrices**

La recherche des anaérobies sulfito-réducteurs et la détection du type respiratoire des microorganismes, sont réalisées en tubs de gélose profonde en utilisant le milieu viande foie (VF). Dans huit tubes à essais stériles, environ 15 ml du milieu VF ont été coulé en surfusion et laisser refroidir, une fois préparé la dilution  $10^{-2}$  pour tous les échantillons, une pipette Pasteur stérile a été utilisé pour ensemencher le tube de gélose VF en piqûre centrale. Cette opération a été réalisée pour tous les échantillons, par la suite l'incubation des tubes a été faite pendant 48 heures à une température de 37°C (Guiraud, 2012).

#### **3.2.2. La recherche des *Enterococcaceae***

Cette recherche est basée sur la sécession de deux milieux liquides : présomptif et confirmatif.

Pour la recherche présomptive, un milieu contenant un azide (milieu de Rothe) a été utilisé, dans lequel 1 ml de suspension mère de chaque échantillon a été introduit dans des tubes à essai contenant une concentration unique de ce milieu, au totale huit tubes ont été utilisés. Après 48 heures d'incubation à 37°C, les tubes à essai positifs étaient présumés contenir des entérocoques. La confirmation a été réalisée par une subculture, 1 ml de milieu Rothe a été introduite dans des tubes de milieu Litsky, pendant 24 à 48 heures à 37°C. La lecture se base sur la formation d'un halo rouge ou pas à la surface de milieu (Guiraud, 2012).

#### **3.2.3. Isolement des *Staphylococcaceae* du miel**

En se basant sur une dilution en série adéquate, une pipette à râteau a été utilisée pour effectuer l'inoculation, En transférant aseptiquement 100 µl de chaque suspension diluée à  $10^{-2}$  de chaque échantillon dans des boîtes de Pétri distinctes contenant du milieu à base de sel de mannitol (Mannitol Salt Agar) (MSA). L'incubation des boites a durée 24 heures dans un

incubateur à 37°C pour favoriser la croissance et le développement des micro-organismes (Guiraud, 2012).

### 3.2.3. Isolement des *Lactobacillaceae* du miel

Il est recommandé d'utiliser le milieu de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) pour l'isolement et la culture des *Lactobacillus*. C'est un environnement propice à la prolifération de toutes les bactéries lactiques, quelles que soient leurs sources. Pour cela une quantité de 100µl de la dilution 10<sup>-2</sup> de chaque échantillon a été introduite a été versé dans des boîtes de pétri qui contient la gélose MRS. Avec une pipette Pasteur l'inoculum a été étalé sur toute la surface de la gélose. Ensuite les boites ont été incubées pendant 48 heures à 37°C (Guiraud, 2012).

### 3.2.4. L'isolement des *Enterobacteriaceae*

La méthode d'inondation a été adaptée pour la mise en évidences des coliformes, à partir de chaque dilution de 10<sup>-2</sup>, un volume de 100µl a été inoculé sur les boites de Petri contenant de la gélose Eosin Methylene Blue (EMB) à l'aide d'une pipette à râteau stérilisée. Une fois terminées, les boîtes ont été incubées pendant un délai de 24 heures à 37°C.

Après l'apparition des résultats purs sur milieu EMB un repiquage a été effectué sur gélose Chromogenic UTI Agar de marque TM Media, qui est un milieu d'orientation notamment pour les Entérobactéries, la lecture de résultat a été faite après 24h d'incubation à 38°C (Guiraud, 2012).

Une fois que la croissance bactérienne a été assurée dans les boîtes de culture, à savoir les milieux : MRS, MSA, EMB, les colonies bactériennes ont été purifiées par un repiquage d'une colonie isolée de chaque boîte dans le même milieu approprié. Ensuite, les boîtes ont été placées en incubation dans les conditions appropriées à chaque milieu.

Une fois les boîtes sont purifiées et dans le but de conserver ces souches, on a sous-cultivé une colonie de chaque boîte purifiée dans un tube Eppendorf contenant 500µl de bouillon LB, à 37°C pendant une durée de 24 heures.

Le jour suivant, on a retiré les tubes de l'incubateur et on les additionnés avec 50 ml de glycérol. Par la suite, ont été homogénéisé avec vortex et conservés dans un réfrigérateur à une température de 4 °C.

### 3.3. Identification phénotypique

Dans le but de cette étude, les méthodes phénotypiques ont été adaptées pour l'identification bactérienne, en se basant sur les caractères morphologiques des colonies, observation à l'état frais, la coloration de Gram, et le test catalase.

On peut dire que l'identification phénotypique ce n'est que des techniques pour l'orientation d'identification, et ça reste que l'identification génotypique la plus précise.

#### 3.3.1. Observation à l'état frais

Avec une l'anse de platine stérile on a prélevé une quantité de la colonie a testé, et on l'a déposé sur une lame, on a ajouté une goutte d'eau distillé.

On a recouvert la goutte avec une lamelle, puis on l'a observé sous microscope à fin d'avoir la forme et la mobilité des bactéries.

#### 3.3.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de différencier les bactéries en Gram positif et Gram négatif, selon la structure de leur paroi cellulaire :

##### Préparation du frottis :

- Une petite quantité de la culture bactérienne a été étaler uniformément sur une lame propre.
- La lame a été brièvement passé au-dessus d'une flamme pour fixer les cellules, assurant ainsi leur adhérence à la lame.

##### Coloration primaire :

- Le violet de gentiane a été appliqué sur la lame et laisser agir environ 1min.
- Un rinçage à l'eau a été effectué à fin d'enlever l'excès de colorant.

##### Fixation avec du Lugol :

- La solution de Lugol a été appliquée sur la lame pendant environ une minute pour fixer le violet de gentiane dans la paroi des bactéries.

##### Décoloration :

- On à réaliser ensuite un autre rinçage avec l'éthanol (pendants 15-30seconds) pour décolorer les bactéries.

Cette étape est critique car elle permet de différencier les bactéries Gram-positives, qui ont une paroi épaisse et conservent la coloration violette, des bactéries Gram-négatives, qui ont une paroi plus mince et perdent cette coloration.

##### Contre-coloration :

- La solution de fuchsine à été étalé sur la lame pendant environ une minute pour colorer les bactéries décolorées.

**Rinçage final :**

- La lame ensuite a été rincé à l'eau pour éliminer l'excès de colorant

**Séchage :**

- On a séché la lame avec du papier buvard.

On a passé ensuite à l'observation sous microscope à un grossissement de 100x en utilisant une goutte d'huile d'immersion."

**3.3.3. Test Catalase**

Après avoir prélevé une petite quantité de la culture bactérienne sur une lame propre, quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène ont été ajoutées. La formation de bulles d'air signale la présence de l'enzyme catalase, qui décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène.

## **Résultats et discussion**

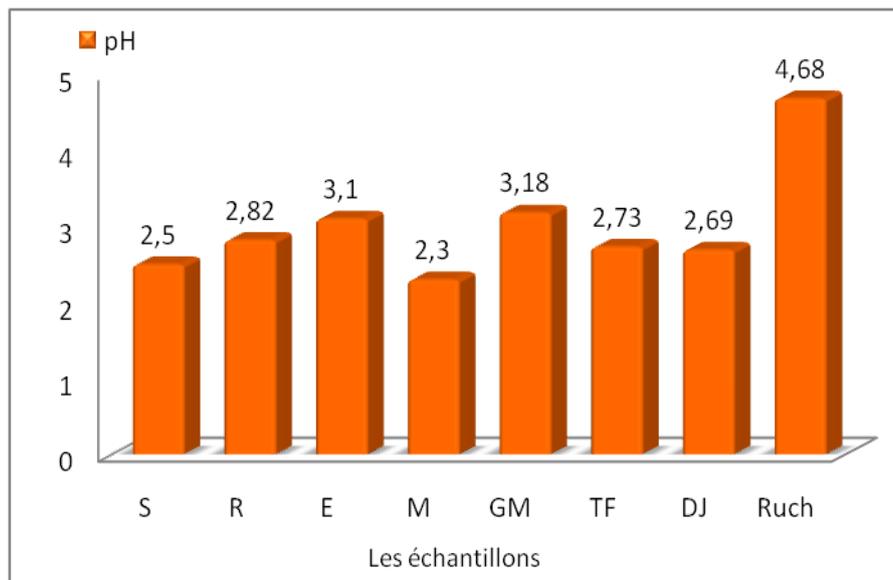
## Résultats et discussion :

### 1. Evaluation des caractéristiques physico chimiques

#### 1.1. Mesure du potentiel hydrogène (pH)

Les variations de pH observées entre les différents échantillons de miel sont dues à la diversité des plantes butinées, aux sécrétions salivaires des abeilles et aux processus de transformation impliqués (BELHAJ *et al.*, 2015).

Comme le montre la **figure n°9** La plupart des miels étudiés présentent une tendance à l'acidité, avec des fluctuations très importantes, allant de (4,68) pour le miel de la ruche (Ruch), suivi par le miel de Lbina (GM) (3,18) ainsi le miel d'Euphorbe (E) (3,10), par contre les autres échantillon à savoir Romarin (R), Toutes fleurs (TF) et le miel de Jujubier (DJ) révèlent plus d'acidité avec des valeurs plus proche, respectivement (2,82), (2,73), (2,69), et les miels qui ont indiqué l'acidité la plus élevé sont le miel d' *Eruca sativa* (S) ( 2,50),et celui de la Montagne (M) (2,30).

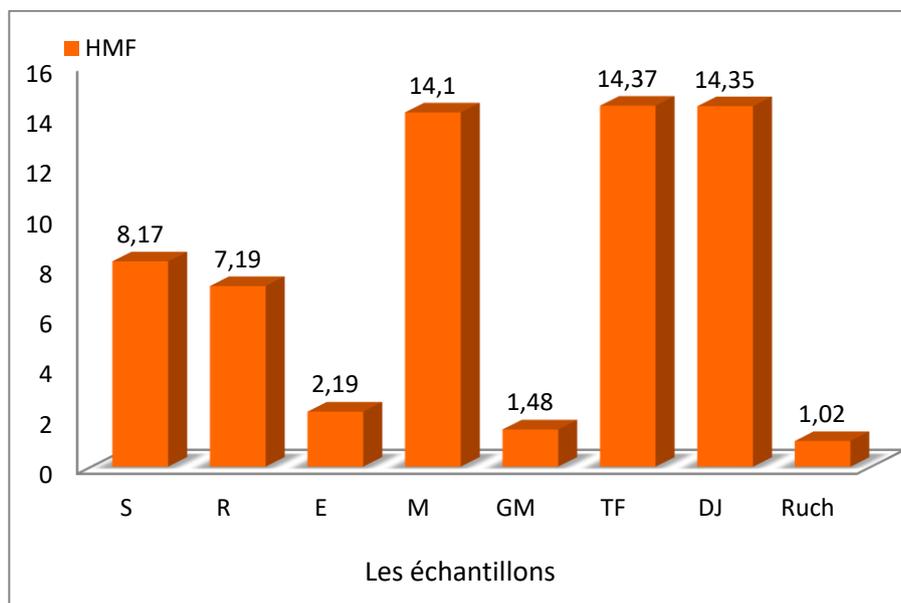


**Fig. 9** : Les résultats du pH des échantillons de miels : (S) : *Eruca sativa*, (R) : Romarin, (E) : Euphorbe, (M) : Montagne, (GM) : Lbina, (TF) : Toutes fleurs, (DJ) : Jujubier, (Ruch) : échantillon de la ruche.

#### 1.2. Mesure de l'HMF

La synthèse de l'HMF est un processus naturel qui se déroule lentement à température ambiante. En revanche, le fait de chauffer le miel accélère la synthèse de l'HMF considérablement, peu importe la nature du miel (plus ou moins acide) (Perdrix, 2003).

Tel qu'illustré par la **figure n°10**, l'analyse spectrale des échantillons de miel a montré des niveaux de HMF compris entre 1,02 et 14,37.



**Fig. 10** : La mesure du (HMF) dans les échantillons de miels : : (S) : *Eruca sativa*, (R) : Romarin, (E) : Euphorbe, (M) : Montagne, (GM) : Lbina, (TF) : Toutes fleurs, (DJ) : Jujubier, (Ruch) : échantillon de la ruche.

Le miel de ruche (**Ruch**) avait la valeur la plus faible (1,02) parmi tous les échantillons testés, accompagné du miel de Lbina (**GM**) (1,48) et du miel d'Euphorbe (**E**) (2,19). Des valeurs moyennes étaient présentées par le miel de Romarin (**R**) (7,19) et le miel de *Eruca sativa*(**S**) (8,17). Pour le reste des échantillons, le miel de Montagne (**M**), le miel de Jujubier (**DJ**) et le miel de Toutes fleurs (**TF**) avaient des teneurs en HMF plus élevées, qui étaient respectivement (14,10), (14,35) et (14,37).

Le pH du miel oscille entre 3,5 et 5,5, dépendant de plusieurs facteurs tels que son origine botanique, le pH de son nectar, son sol et sa composition végétale. Cependant, la plupart de nos échantillons étaient acides avec un pH (2,30), ce qui indique qu'ils avaient subi une fermentation des sucres en acides organiques (Gomes *et al.*, 2010), pendant le stockage depuis 2022. Seul le miel de la ruche présente un bon pH (4,68), c'est un indice qu'il est de bonne qualité et qu'il été bien conservé.

L'HMF représente un stade intermédiaire dans la réaction de Maillard, se formant lors de la déshydratation rapide des sucres, qui se produit lors de la déshydratation immédiate du sucre dans des conditions acides. Il est principalement formé par la décomposition du fructose lors du traitement thermique des aliments. Dans le miel, l'HMF joue un rôle d'un marqueur de qualité qui permet d'identifier la fraîcheur à faible concentration. Une concentration supérieure

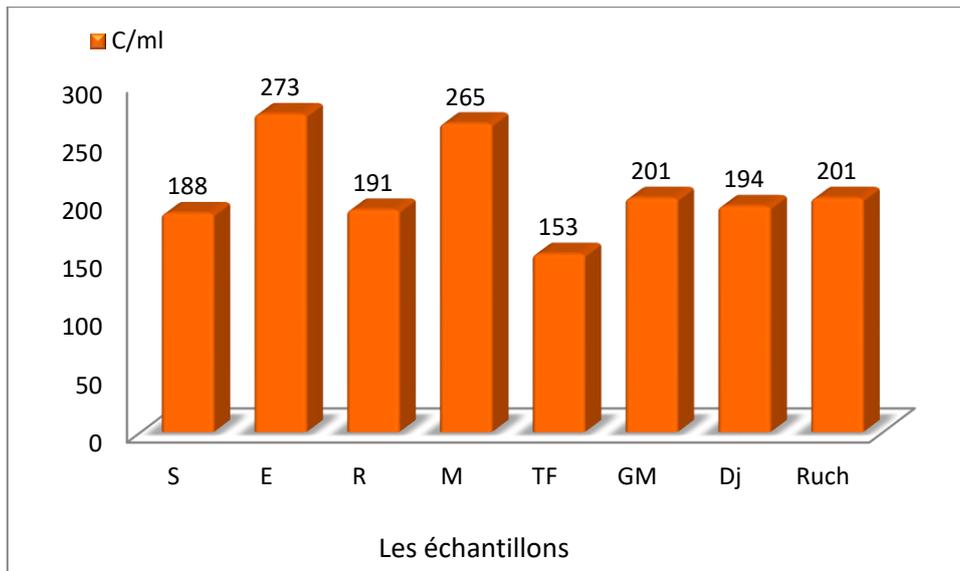
à la concentration autorisée peut signifier que le produit peut être altéré par l'ajout d'un sucre inverti ou le stockage dans des conditions inappropriées, d'un stockage de longue durée, que le produit a été chauffé ou a été dénaturé par l'acidité, l'eau ou les minéraux (Sereia *et al.*, 2017). Les teneurs obtenues en HMF confirment que les échantillons testés correspondent à des miels de qualité étant donné qu'ils respectent la limite maximale recommandée par le Codex Alimentarius (2001). (HMF inférieures à 40 mg / kg).

Selon (Shapla *et al.*, 2018) le pH déterminé se réfère aux ions hydrogène présents dans une solution de miel et peut influencer formation d'autres composants tels que la production de HMF. On compare entre le pH et l'HMF obtenues dans cette étude, on peut confirmer qu'un pH plus faible (acide) peut accélérer la formation de HMF, tandis qu'un pH davantage élevé (moins acide) à l'attitude de retarder ce développement.

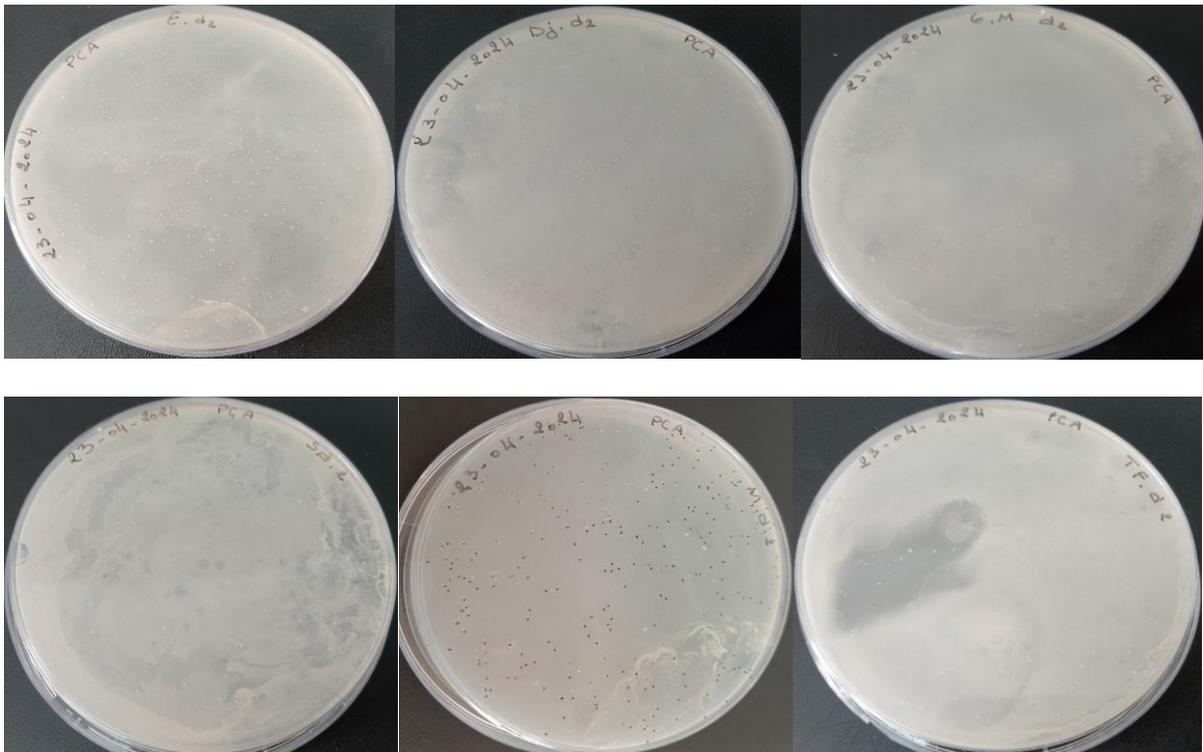
## 2. Analyse microbiologique du miel

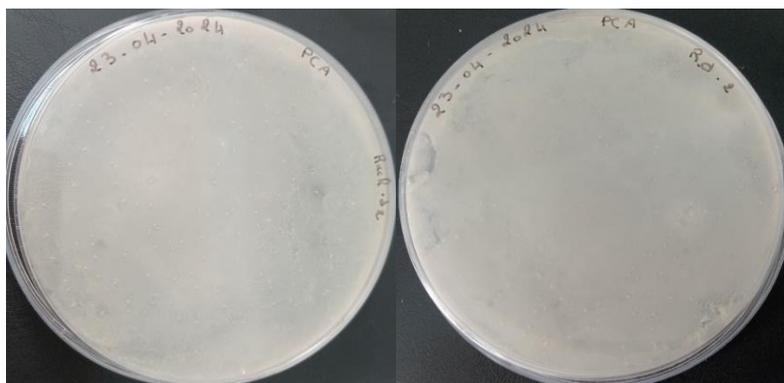
### 2.1. Le comptage de la variété bactérienne

Le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale dans les différents échantillons du miel a révèlés qu'il y a une diversité microbienne importante dans les échantillons du miel analysés (**Figure n°12**). D'après la **figure n°11**, on constate que le miel de tout fleurs (**TF**) a présenté la petite charge 153 UFC, avec un nombre de cellule de 153 cellules /ml , suivi par le miel de *Eruca sativa* (**S**) 207 UFC, soit 188 cellules/ml , et le miel de Romarin (**R**) 210 UFC, soit 191 cellules/ml, ainsi le miel de Jujubier (**DJ**) 213 UFC, soit 194 cellules/ml , suivi par les deux miel : miel de Lebina (**GM**) et le miel de la ruche (**Ruch**) avec une valeur équivalente 221 UFC, soit 201 cellules/ml , et le valeurs les plus élevés fournis par le miel de Montagne (**M**) 292 UFC, soit 265 cellules/ml, ainsi le miel d'Euphorbe (**E**) avec une charge de 300 UFC, ou 273 cellules/ml, comme la **figure n°11** et **n°12** montrent.



**Fig. 11** : Nombre de cellules dans les échantillons de miel : (S) : *Eruca sativa*, (R) : Romarin, (E) : Euphorbe, (M) : Montagne, (GM) : Lbina, (TF) : Toutes fleurs, (DJ) : Jujubier, (Ruch) : échantillon de la ruche.





**Fig. 12 :** Les résultats obtenue sur milieu PCA

La recherche de la flore mésophile aérobie totale sur milieu PCA fournit une indication de la qualité microbiologique globale des produits naturels, cependant tous miels étudiés avaient des taux bactériens de 168-300 UFC, inférieurs à 500 UFC/g, qui est la limite de qualité suggérée par Fléché *et al.*, (1997). Comparé à d'autres aliments, Le miel est moins favorable à la croissance bactérienne grâce à sa forte teneur en sucre, sa faible activité de l'eau, son pH acide et ses composés antibactériens naturels (Snowdon et Cliver, 1996).

## 2.2. La recherche des spores de bactéries anaérobies et sulfito-réductrices

A cette étape nous avons procédé à l'ensemencement en piqure central des tubes à essais contenant du milieu VF. Au terme de l'incubation à 37°C des résultats sont visualisés (**Tableau II**). Ces derniers ont révélé une croissance bactérienne soit en aérobie et avec caractère de mobilité avec tous les échantillons à l'exception de l'échantillon du miel de la Ruche qui a montré une croissance de type aéro-anaérobie facultatif et mobile. Cependant, aucune croissance de bactéries sulfito-réductrices n'est visualisée.

**Tableau II :** Les résultats d'ensemencement sur milieu VF

Echantillon	S	R	E	M	GM	TF	DJ	Ruch
<b>Croissance sur tube VF</b>	Aerobie stricte Mobile	Aerobie facultatif Mobile	Aerobie stricte Mobile	Aeroanaerobie facultatif Mobile				

## 2.3. La recherche des *Entérococcaceae*

L'incubation des tubes de milieu Litsky qui ont été sub cultivés à partir de milieu Rothe, n'a montré aucun changement significatif dans tous les échantillons (**voir Tableau III**). Ce qui signifie qu'il n'y a pas de présence d'entérocoques.

**Tableau III** : Les résultats de la recherche des Entérocoques

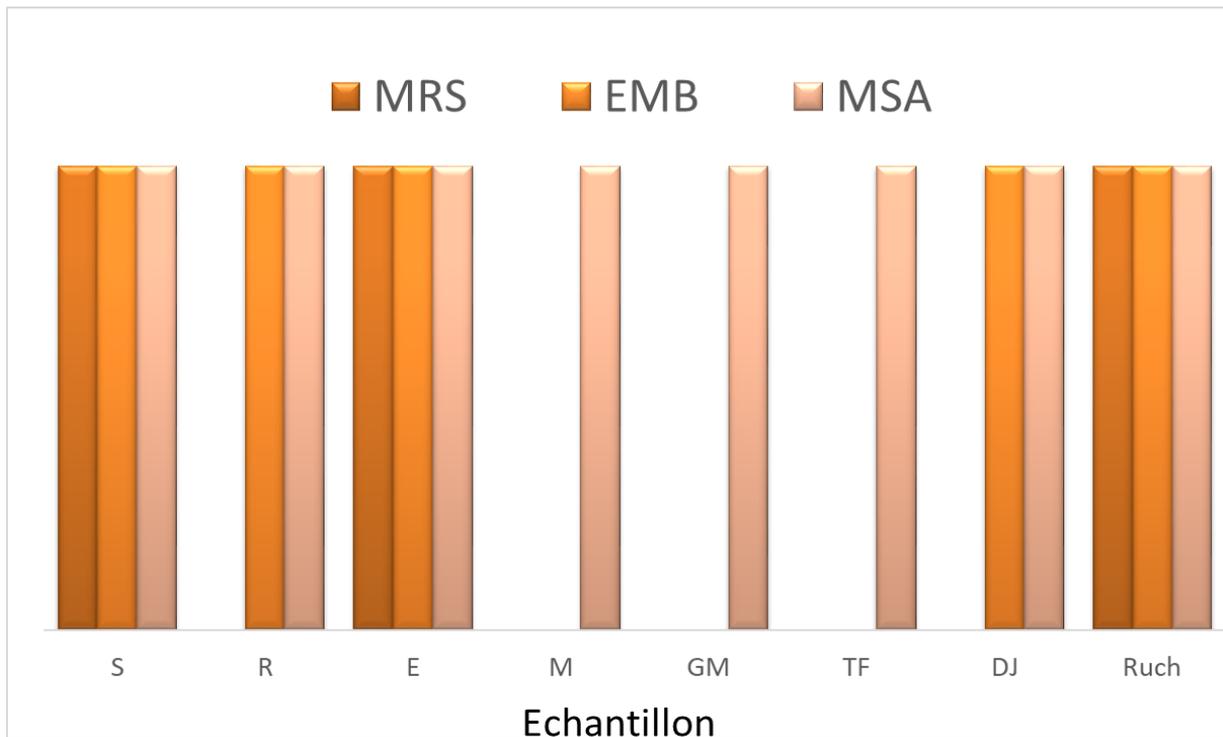
Echantillon	S	R	E	M	GM	TF	DJ	Ruch
Apparition d'halo rouge sur milieu Litsky	-	-	-	-	-	-	-	-

### 3. Evaluation de la diversité du microbiote du miel

Au terme d'incubation à température 37°C des colonies sont visualisées sur les boîtes d'isolement. La croissance bactérienne présente une divergence dans les différents milieux utilisés et avec les échantillons du miel. Le **tableau IV** compile la diversité bactérienne détectée dans divers échantillons de miel, après ensemencement sur différents milieux de culture, notamment MRS, EMB et MSA.

**Le tableau IV** : la diversité bactérienne détectée dans divers échantillons sur différents milieux

Lot	Code	Milieu MRS		Milieu EMB		Milieu MSA	
<b>Eruca sativa</b>	<b>S</b>	+	Présence de Lactobacilles	+	Présence de Enterobacteries	+	Présence de Staphylocoques
<b>Romarin</b>	<b>R</b>	-	Absence de Lactobacilles	+	Présence de Enterobacteries	+	Présence de Staphylocoques
<b>Ephorbe</b>	<b>E</b>	+	Présence de Lactobacilles	+	Présence de Enterobacteries	+	Présence de Staphylocoques
<b>Montagne</b>	<b>M</b>	-	Absence de Lactobacilles	-	Absence de Enterobacteries	+	Présence de Staphylocoques
<b>Lbina (Miellée)</b>	<b>GM</b>	+	Présence de Lactobacilles	-	Absence de Enterobacteries	+	Présence de Staphylocoques
<b>Tout fleur</b>	<b>TF</b>	-	Absence de Lactobacilles	-	Absence de Enterobacteries	+	Présence de Staphylocoques
<b>Jujubier</b>	<b>DJ</b>	-	Absence de Lactobacilles	+	Présence de Enterobacteries	+	Présence de Staphylocoques
<b>Ruche</b>	<b>Ruch</b>	+	Présence de Lactobacilles	+	Présence de Enterobacteries	+	Présence de Staphylocoques



**Fig. 13 :** La croissance obtenue dans les différents milieux

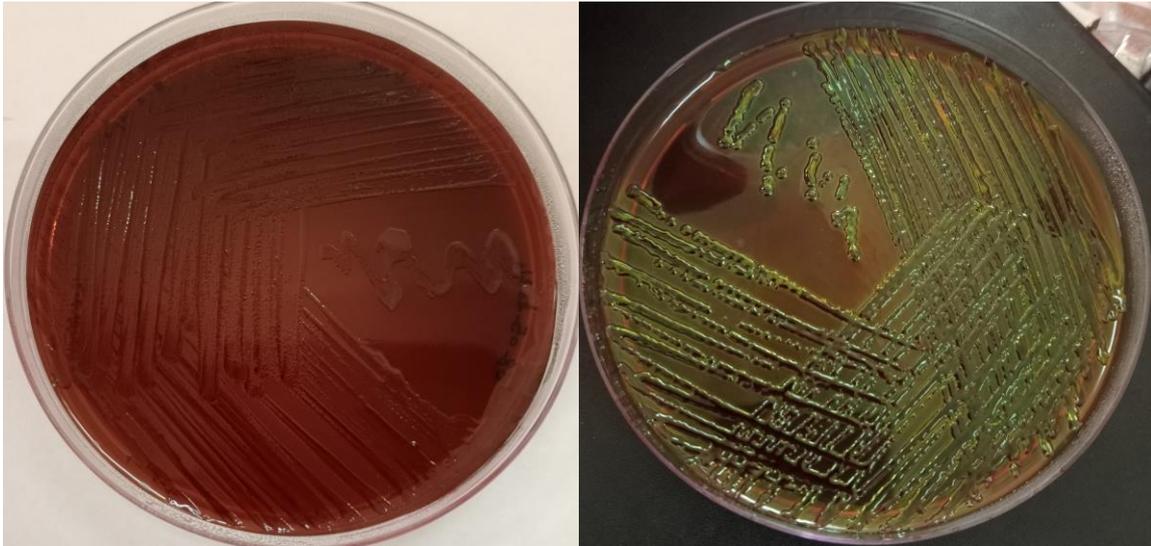
En se basant sur la similitude entre les isolats, nous avons procédé à une caractérisation phénotypique en utilisant une méthode qui comprend une analyse macromorphologique, Une analyse micro-morphologique, incluant la coloration de Gram et des tests biochimiques tels que le test de la catalase, a été réalisée. Le tableau V (a), (b) et (c) présente un résumé des résultats obtenus.

**Tableau V a : L'identification des isolats de milieu MRS**

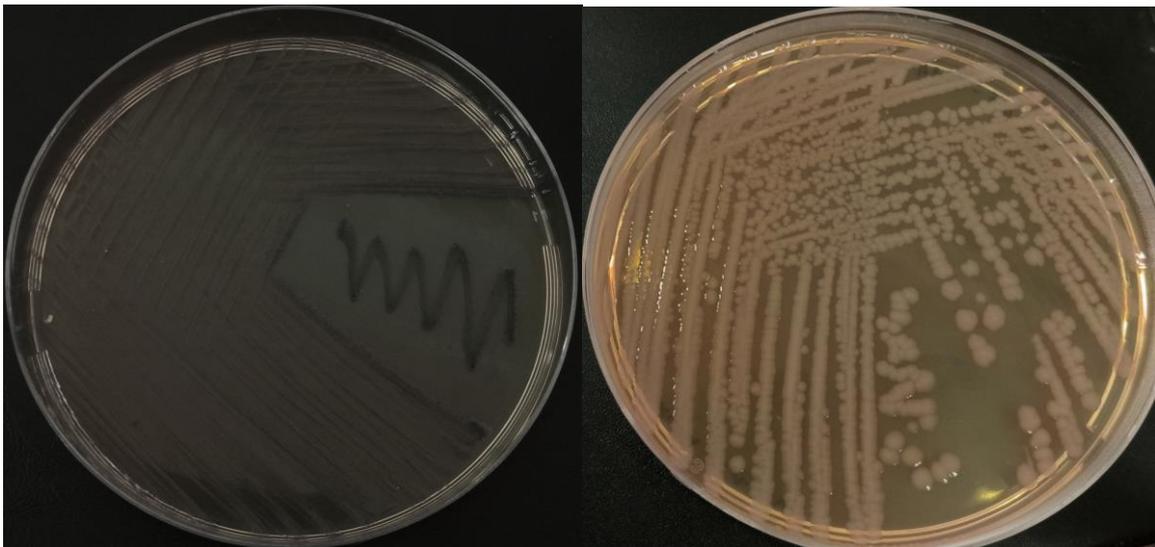
Lot	Code	Isolats	Aspect	Couleur	Forme	Taille	Forme de la cellule	Mobilité	Gram	Catalase
<i>Eruca sativa</i>	S	S	Sèche	Blanche	Rond	Grande	Cocci	+	+	+
<i>Euphorbe</i>	E	E1-1	Sèche	Blanche	Rond	Grande	Cocci	+	+	+
		E1-2	Sèche	Blanche	Rond	Petite	Cocci	+	+	-
		E2-1	Sèche	Blanche	Rond	Petite	Cocci	+	+	-
		E2-2	Sèche	Blanche	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
		E2-3	Sèche	Blanche	Rond	Petite	Cocci	+	+	-
		E3	Sèche	Blanche	Rond	Petite	Cocci	+	+	-
<i>Lbina</i>	GM	GM	Sèche	Blanche	Rond	Petite	Cocci	+	+	-
<i>Ruche</i>	Ruch	Ruch	Sèche	Blanche	Rond	Petite	Cocci	+	+	-

**Tableau V b : Résultats de milieu EMB**

Lot	Code	Isolats	Aspect	Couleur	Forme	Taille	Forme de la cellule	Mobilité	Gram	Catalase
<i>Eruca sativa</i>	S	S1-1-2	Sèche	Noir éclat vert	Rond	Petite	Bacille	+	-	+
		S1-2-1	Muqueuse	Violet transparent	Rond	Petite	Bacille	+	-	+
<i>Romarin</i>	R	R2-1-1-M	Muqueuse	Violet transparent	Rond	Petite	Bacille	+	-	+
		R2-1-1-V	Sèche	Noir éclat vert	Rond	Petite	Bacille	+	-	+
<i>Romarin</i>	R	E2-1-2	Muqueuse	Violet transparent	Rond	Petite	Bacille	+	-	+
		E2-2-2	Sèche	Noir éclat vert	Rond	Petite	Bacille	+	-	+
<i>Jubier</i>	DJ	DJ-2-2-2	Muqueuse	Violet transparent	Rond	Petite	Bacille	+	-	+
		DJ-3-2-1	Sèche	Noir éclat vert	Rond	Petite	Bacille	+	-	+
<i>Ruche</i>	Ruch	Ruch2-1-2V	Sèche	Noir éclat vert	Rond	Petite	Bacille	+	-	+
		Ruch2-1-2M	Muqueuse	Vert	Rond	Petite	Bacille	+	-	+



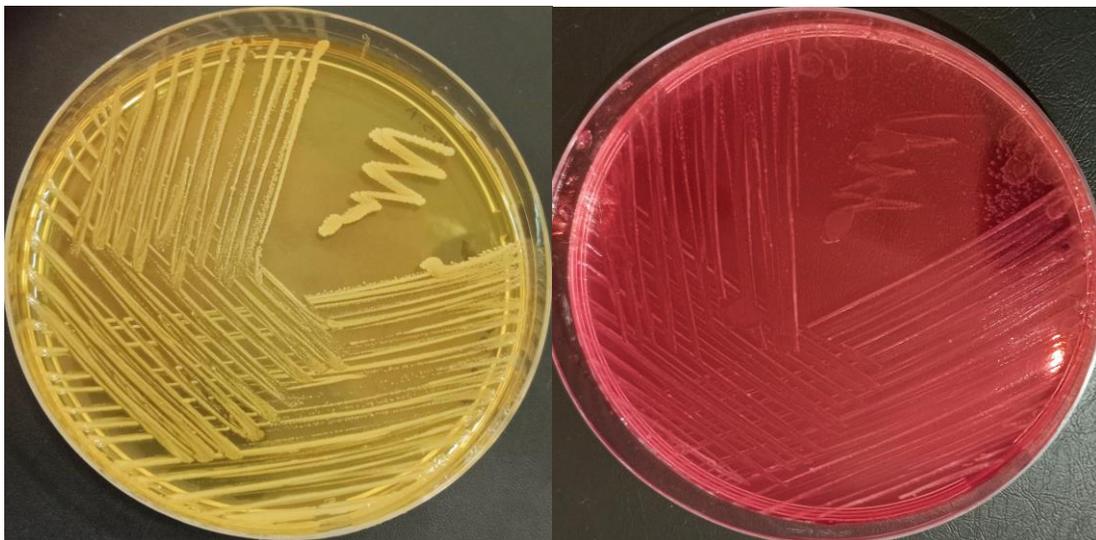
**Fig. 14** : Les résultats obtenu sur milieu EMB



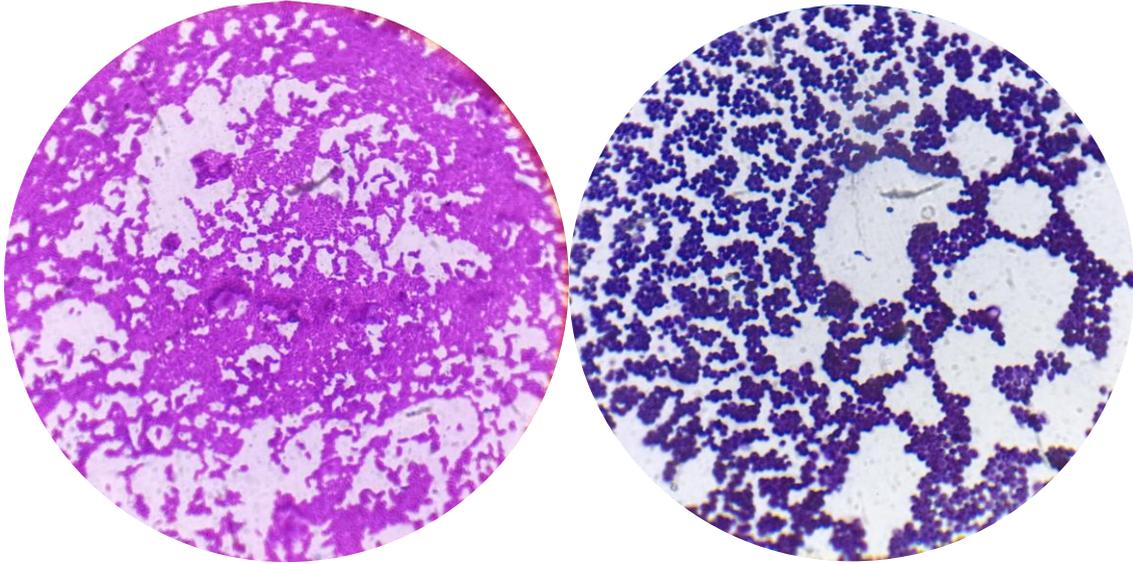
**Fig. 15** : Les résultats obtenue sur milieu CHROMAGAR

**Tableau V c : Résultats de milieu MSA**

Lot	Code	Isolats	Aspect	Couleur	Forme	Taille	Forme de la cellule	Mobilité	Gram	Catalase
<i>Eruca sativa</i>	S	S1	Seche	Jaune	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
		S2	Seche	Rouge	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
Romarin		R1	Seche	Jaune	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
		R2	Seche	Rouge	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
Euphorbe	E	E1	Seche	Rouge	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
		E2	Seche	Jaune	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
Montagne	M	M1	Seche	Jaune	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
		M2	Seche	Rouge	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
Lbina (Miellée)	GM	GM1	Seche	Jaune	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
		GM2	Seche	Rouge	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
Toute Fleur	TF	TF1	Seche	Jaune	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
		TF2	Seche	Rouge	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
Jujubier	DJ	DJ1	Seche	Jaune	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
		DJ2	Seche	Rouge	Rond	Petite	Cocci	+	+	+
Ruche	Ruch	Ru1	Seche	Rouge	Rond	Petite	Cocci	+	+	+



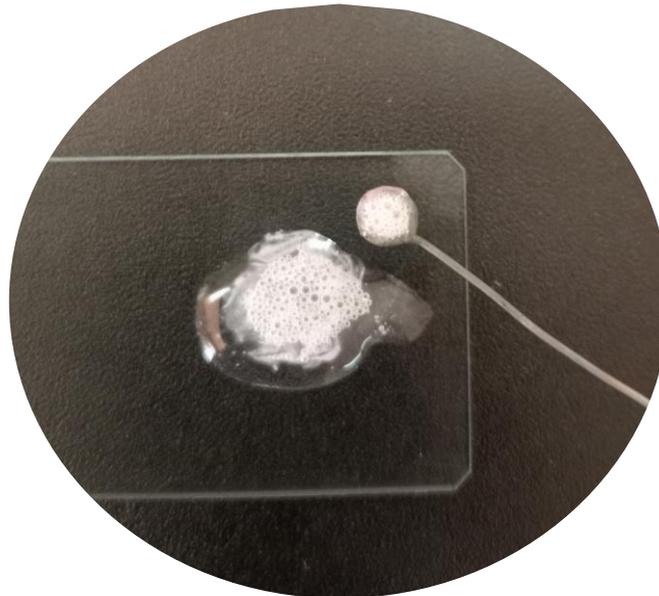
**Fig.16 : Les résultats obtenue par l'ensemencement sur milieu MSA**



(1)

**Fig. 17** : résultats de la coloration de Gram : (1) Bacille à Gram négatif ;  
(2) Cocci à Gram positif

(2)



**Fig. 18** : Résultat de Test Catalase

Le milieu MRS est spécialement conçu pour l'isolement des lactobacilles. Les cultures obtenues à partir des différents échantillons de miel ont montré des colonies macromorphologiques de grande taille, rondes et blanches, de ce fait nous sommes orientés vers la présence des isolats du genre de *Lactobacillus*, affilié au grand phylum des *Firmicute*. Ce qui est confirmé avec le Gram positif et la catalase négatif.

Ces *Lactobacillus* sont principalement isolées du miel Euphorbe (E), miel Lbina (GM) et miel de la ruche. Sachant que ces miels sont caractérisés avec un pH acide avoisinant le 3 et 4 et un HMF très bas.

Cependant, avec le test de catalase on a eu des isolats avec un catalase positif qui peut nous orienter vers d'autre bactérie lactique à savoir : *Pediococcus* et *Enterococcus*, qui sont principalement isolées du miel d'*Eurica sativa* et Euphrobe.

D'un autre côté, le milieu EMB qui est un milieu sélectif d'un large éventail des Gram négatif dont les *Enterobacteriaceae*. D'après nos résultats, nous avons eu des colonies noires avec un éclat vert, un aspect macromorphologique spécifique à l'espèce *E coli* dans une grande proportion des échantillons du miel à savoir les miels d'origine florale : Euphrobe, Erica sativa, Romarin et Jujubier. L'identité de ces isolats est confirmée par le Gram négatif et la catalase positif. Cependant, sur le milieu EMB on a eu des colonies violet transparente et d'une production de la catalase, ce qui peut les affilier au genre de *Klebsiella*. Ces germes à Gram négatif ont été isolés du miel d'*Eurica sativa*, du miel de romarin, du miel d'euphorbe, du miel de jujubier et du miel de ruche. Ces résultats sont corroborés par ceux obtenus sur gélose CHROMAGAR, comme présenté dans la **figure n°15**. Olaitan et al., 2007 ont constaté que l'intestin des abeilles contenait, 27 % de bactéries Gram-positives, 70 % de bactéries Gram négatives ou à Gram variable, dont *Achromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* et *Pseudomonas*. Donc on peut suspecter que les isolats que n'a trouvé sont dérivé de l'abeille.

Avec le milieu de MSA, nous avons peut isoler des espèces du genre *Staphylococcus* dans tous les échantillons du miel testés. Avec un aspect macromorphologique de jaune sur la gélose signifie que l'isolat peut être affilié *Staphylococcus aureus*. Cependant, les autres isolats sont identifiés comme étant des *Staphylococcus epidermidis*.

Des études antérieures ont révélé que le miel frais renferme des souches probiotiques de Bifidus et de *Lactobacillus*. Cependant, ces bactéries ne sont viables que dans le miel frais, âgé d'environ 2 à 3 mois (Bogdanov, 2012 ; Olofsson et Vásquez, 2008), cela explique nos résultats obtenus de la recherche des lactobacilles dans milieu MRS.

D'autre part, Raymann et Moran ont confirmé que les bactéries d'acide lactiques ou bien les bactéries affilées au genre de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les espèces majoritaires des échantillons du miel (Raymann et Moran, 2018). Notamment, il a été démontré que la flore microbienne du sol ou des plantes peuvent être transmises aux abeilles puis aux miels et aux produits apicoles. Certaines espèces sont bénéfiques telles que les *Acitobacteria*. Et de nombreuses autres espèces sont affiliées aux grands groupes des *Enterobacteriaceae* et des

*Firmicutes* retrouvées dans le miel avec une grande proportion (Anderson et al., 2013 ; Xiong et al., 2022). Cependant suivant la méthode culturelle dans l'étude de la diversité bactérienne du miel montre que les *Staphylococcus* ainsi que les *Bacillus* sont des germes les plus dominants de la flore cultivable aérobie (Xiong et al., 2022), ce qui corrobore avec nos résultats. Sur 35 isolats obtenus des huit échantillons du miel, onze isolats (31%) sont affiliés au grand groupe des *Enterobacteriaceae* et neuf isolats (16%) sont classés dans le grand phylum des *Firmicute* (Lactobacilles), et 15 isolats (40%) sont attribués au phylum des *Bacillota* (*Staphylococcus*). Il est important de signaler que la diversité bactérienne dans le miel est influencée par un grand nombre de facteurs abiotiques à savoir le pH, sachant que le pH du miel varie entre 3 à 5, suit à la présence des acides organiques telles les acides gluconiques (Balzan et al., 2020, Olaitan et al., 2007).

# ***Conclusion***

## Conclusion

Le miel est un don de la nature d'une valeur inestimable. En plus d'être un aliment de haute qualité, le miel est utilisé dans l'industrie, le cosmétique, la médecine etc. Deux sources sont à la base de la production du miel par les abeilles : le nectar ou le miellat. La composition du nectar dépend de l'espèce végétale d'où il provient. Plusieurs facteurs influencent la qualité du miel. On note entre le processus d'extraction du miel qui est complexe et influence sa qualité. Il existe également des stratégies de conservations qui peuvent favoriser une plus longue conservation en préservant la plupart des propriétés intactes.

Les résultats des analyses physicochimiques et microbiologiques du miel produit dans différentes wilayas en Algérie indiquent un bon niveau de qualité.

Bien que les valeurs de HMF et d'acide libre soient très satisfaisantes, le pH des miels étudiés demeure très acide, probablement en raison de leur durée de conservation prolongée (2 ans).

En raison de ses propriétés chimiques, le miel ne favorise pas la croissance de micro-organismes, mais il peut contenir une riche communauté microbienne, notamment des microbes viables, stressés et non viables. Le microbiote du miel, composé de bactéries, levures et moisissures, dérive des composants végétaux, du tube digestif de l'abeille et de l'environnement (y compris la ruche et les mielleries dans lesquelles le miel est récolté et stocké) (Silva et al., 2017).

Quant aux analyses microbiologiques, elles révèlent l'absence de bactéries pathogènes et de toxines, telles que la bactérie botulique et les entérocoques. De plus, le nombre de flore bactérienne présent est très satisfaisant et ne représente aucun risque pour les consommateurs. Ces résultats confirment la très bonne qualité microbiologique et hygiénique des échantillons étudiés.

D'autre part la flore microbienne identifiée révèle que le miel peut contenir des germes non pathogènes mais qui peuvent avoir un effet bénéfique « probiotique » à la santé humaine.

Cependant, il serait intéressant d'approfondir notre étude avec une caractérisation phénotypique et génotypique des isolats obtenus.

# *Références Bibliographiques*

## Références bibliographiques

**Alaerjani, W. M. A., & Mohammed, M. E. A. (2024).** Impact of floral and geographical origins on honey quality parameters in Saudi Arabian regions. *Scientific Reports*, 14(1), 8720.

**Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., ... & Corby-Harris, V. (2013).** Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 8(12), e83125.

**Ballot-Flurin. C. (2010).** Les fondements de la santé par les abeilles : l'apithérapie. Les bienfaits de l'apithérapie, 36268, 1-162.p

**Balzan, S., Carraro, L., Merlanti, R., Lucatello, L., Capolongo, F., Fontana, F., ... & Cardazzo, B. (2020).** Microbial metabarcoding highlights different bacterial and fungal populations in honey samples from local beekeepers and market in north-eastern Italy. *International journal of food microbiology*, 334, 108806.

**Belhaj, O., Oumato, J., & Zrira, S. (2015).** Étude physico-chimique de quelques types de miels marocains. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 3(3), 71-75.

**Bodor, Z., Kovacs, Z., Benedek, C., Hitka, G., & Behling, H. (2021).** Origin identification of hungarian honey using melissopalynology, physicochemical analysis, and near infrared spectroscopy. *Molecules*, 26(23), 7274.

**Bogdanov S., Bieri K., Figar M., Figueiredo V., Iff D., Kànzig A., Stockli H., Zurcher K. (1995).** « Miel : définition et directives pour l'analyse et l'appréciation » ; In : *Livre Suisse des denrées alimentaires* ; Ed.OCFIM :1-26.

**Bogdanov S., Kanzing A., Frey T., Iff D. (2004).** « Manuel des denrées alimentaires » ; Ed : MSDA :1-39.

**Bogdanov S., Ruoff K., Oddo P L.2004a.** Physicochemical methods for the characterisation of unifloral honeys. *Apidologie* P : 17-35.

**Bogdanov, S. (1999).** Produits apicoles. *Complément*.

**Bogdanov, S., (2011).** « Le livre du miel », Bee Product Science.

**Bogdanov, S., Bieri, K., Gremaud, G., Iff D., Kanzig, A., Seiler, K., Stockli, H. et Zurcher, K. (2003).** Produits Apicoles. *Miel*, 23: 1-37.

**Bogdanov, S., Martin, P., & Lüllmann, C. (1997).** Harmonised Methods of the International Honey Commission. *Apidologie*, 28(1), 1-59.

**Bonté, F., & Desmoulière, A. (2013).** Le miel : origine et composition. *Actualités pharmaceutiques*, 52(531), 18-21.

**Bradbear, N. (2010).** Le rôle des abeilles dans le développement rural. Manuel sur la récolte, la transformation et la commercialisation des produits et services dérivés des abeilles. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome.

**Bruneau, E. (2005).** Voyage au cœur du miel. *ActuApi*, 31(3), 1-8.

**Chauvin, R. (1968).** Traité de biologie de l'abeille.

**Chikhaoui, M., Elagdi, C., Badri, W., Mouslim, J., & El Hajjouji, H. (2024).** Caractérisation physico-chimique des miels collectés dans la région de Béni Mellal-Khénifra. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 12(1), 1-6.

**Clément, H. (2015).** Le guide des miels : 50 miels à découvrir (Editions Fleurus). Paris, France.

**Couquet, Y., Desmolière, A., & Rigal, M. L. (2013).** Le miel, quel intérêt en cicatrisation. Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel. *Actualités pharmaceutiques*, 22-25.

**Cousin, L. (2014).** L'abeille et le conseil à l'officine (Doctoral dissertation).

**da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016).** Honey : Chemical composition, stability and authenticity. *Food chemistry*, 196, 309-323.

**Engelkirk, P. G., & Duben-Engelkirk, J. (2011).** *Burton's microbiology for the health sciences*.

**Evans, E., & Butler, C. A. (2010).** *Why Do Bees Buzz?: Fascinating Answers to Questions about Bees*. Rutgers University Press.

**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. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE (France)*, 16(2).

**Gallina, A., Stocco, N., Mutinelli, F. (2010).** Karl Fischer titration to determine moisture in honey: a new simplified approach. *Food Control*, 21, 942-944.

**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*, 48(2), 544-548.

**Guerzou, M. N., & Nadji, N. (2009).** Étude comparative entre les miels locaux et les miels importés. *Mémoire online*, 97.

**Guiraud JP. (2003).** *Microbiologie alimentaire*. Paris: Dunod . p 651

**Guiraud, J. P. (2012).** *Analyse microbiologique des aliments, Microbiologie alimentaire, RIA*. Paris : Dunod, 2012. 652 p. (Industries agroalimentaires).

**Hocine, L., Tefiel, B. , Moustapha, A. , Allaoui, A. et Benamara, K. (2018).** Qualité Microbiologique et Physicochimique des Miels du Sud et Sud-Ouest du Niger. *Journal de recherche sur l'alimentation et la nutrition*, 6 (6), 406-413.

**Huchet, E., Coustel, J., & Guinot, L. (1996).** Les constituants chimiques du miel, méthodes d'analyses chimiques. Département Sciences de l'aliment, 1-5.

**Kačaniová M., Chlebo R., Kopernický M., Trakovická A. (2004).** Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia Microbiol.*; (49): 169-171

**Lachman, J., Orsak, M., Hejtmankova, A. et Kovarova E. (2010).** Evolution of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech Honeys. *Food Science and Technology*, 1(43), Pp.52-58.

**Laredj, H. O. C. I. N. E. (2017).** Caractérisation microbiologique et physicochimique des miels produits au niveau de la région de Tiaret (Doctoral dissertation, Université Ibn Khaldoun-Tiaret-).

**Laudine L. (2010) :** « Du nectar a un miel de qualité : contrôles analytiques du miel et conseils pratiques a l'intention de l'apiculteur amateur ». Ed. Ecole Nationale Veterinaire de Lyon. Thèse de Docteur Vétérinaire n°085, Univ. Lyon.175PP.

**Lequet, L. (2010).** Du nectar à un miel de qualité : contrôles analytiques du miel et conseils pratiques à l'intention de l'apiculteur amateur (Doctoral dissertation).

**Louvain, L.N. (2005).** L'essentiel du programme européen miel : Voyage au coeur du

**Makhloufi C. (2010).** Mellisso-palynologie et étude des éléments bioactifs des miels Algérien. Thèse de doctorat en production animale, école nationale supérieur agronomique d'El Harrach.

**Mehdi, Y. (2016).** Caractérisation physicochimique, palynologique et effets antibactérien, antioxydant et immunomodulateur des miels de la région ouest d'algerie (Doctoral dissertation). *miel. Actualité Apiculture*, 31(3): 3-8.

**Nair, S. (2014).** Identification des plantes mellifères et analyse physicochimique des miels algériens, Thèse de Doctorat en Biologie, Biochimie, Université d'Oran, p : 202.

**Nicolaÿ, J. (2014).** Perspectives d'avenir en Apithérapie à l'officine. Th. Doc. En.

**Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., & Iyabo, O. O. (2007).** Honey : a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African health sciences*, 7(3).

**Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., & Iyabo, O. O. (2007).** Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African health sciences*, 7(3).

**Page Jr, RE et Peng, CYS (2001).** Vieillesse et développement chez les insectes sociaux avec un accent sur l'abeille domestique, *Apis mellifera L.* *Gérontologie expérimentale*, 36 (4-6), 695-711.

Priscila Missio da Silva and others, 'Honey : Chemical Composition, Stabilité and Authenticity', Food Chemistry, 196, 309–323, 2016.

**Prost, J. P., & Le Conte, Y. (2005).** Apiculture : connaître l'abeille, conduire le rucher. Ed. Lavoisier, Tec & Doc, Paris.

**Pulau Banggi Sabah : A Preliminary Study: Microbial Diversity in Green Honey from Pulau Banggi Sabah. Journal of Tropical Life Science, 14(1), 13-20.**

Rajindran, N., Ab Wahabb, R., Huda, N., Oyewusi, H. A., Gunam, I. B. W., Shariff, A. H. M., ... & Huyop, F. (2024). Exploring Microbial Diversity in Green Honey from

**Ranneh, Y., Akim, A. M., Hamid, H. A., Khazaai, H., Fadel, A., Zakaria, Z. A., ... & Bakar, M. F. A. (2021).** Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. BMC complementary medicine and therapies, 21, 1-17.

**Raymann, K., & Moran, N. A. (2018).** The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. Current opinion in insect science, 26, 97-104.

**Rossant, A. (2011).** Le miel : un composé complexe aux propriétés surprenantes (Doctoral dissertation).

**Róžańska, H., & Osek, J. (2012).** Effect of storage on microbiological quality of honey. Journal of Veterinary Research, 56(2), 161-163.

**Sackelt, W.G. (1919).** Honey olorado State Univ. as a carrier of intestinal diseases. Bull. CExp. Stad; 252: 1-18. 15.

**Sellali, Y. S. (2017).** Etude physicochimique et palynologique de quelques miels locaux et importés, Institut des sciences vétérinaires.

**Sereia, M. J., Março, P. H., Perdoncini, M. R. G., Parpinelli, R. S., de Lima, E. G., & Anjo, F. A. (2017).** Techniques for the evaluation of physicochemical quality and bioactive compounds in honey. Honey analysis, 193-214.

**Shapla, U. M., Solayman, M., Alam, N., Khalil, M. I., & Gan, S. H. (2018).** 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. Chemistry central journal, 12, 1-18.

**Silva, M. S., Rabadzhiev, Y., Eller, M. R., Iliev, I., Ivanova, I., & Santana, W. C. (2017).** Microorganisms in honey. Honey analysis, 500, 233-257.

**Sinacori, M., Francesca, N., Alfonso, A., Cruciata, M., Sannino, C., Settanni, L., & Moschetti, G. (2014).** Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin. Food microbiology, 38, 284-294.

**Snowdon, J. A., & Cliver, D. O. (1996).** Microorganisms in honey. International journal of food microbiology, 31(1-3), 1-26.

**Terrab, A., Recamales, A. F., Hernanz, D., & Heredia, F. J. (2004).** Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chemistry*, 88(4), 537-542.

**Tesfaye, O., Desalegn, A., & Muleta, D. (2024).** Melissopalynological analysis and microbiological safety of fresh and market honey (*Apis mellifera* L. and *Meliponula beccarii* L.) from Western Oromia, Ethiopia. *Heliyon*, 10(7).

**Testa, M. L., Miroddi, G., Russo, M., La Parola, V., & Marci, G. (2020).** Dehydration of fructose to 5-HMF over acidic TiO<sub>2</sub> catalysts. *Materials*, 13(5), 1178.

**White, P. B. (1996).** The normal flora of the bee. Agricultural research service. US Department of Agriculture Washinton AC, 301-309.

**Xiong, Z. R., Sogin, J. H., & Worobo, R. W. (2023).** Microbiome analysis of raw honey reveals important factors influencing the bacterial and fungal communities. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1099522.

**Zurcher, K. (2003).** Produits Apicoles. *Miel*, 23: 1-37.

### **Référence électronique**

Agriculturemono. Abeille de terre un insecte miraculeuse ; Mise à jour 2020. Disponible sur <https://agriculturemono.net/abeille-de-terre-une-insecte-miraculeuse/>. Consulté le 20/05/2024.

# *Résumé*

## Résumé

Le miel est le produit sucré naturel élaboré par les abeilles mellifères à partir du nectar des fleurs ou de la sécrétion des parties vivantes des plantes, sécrétions chimiques. En raison de ses propriétés, le miel n'encourage pas la croissance des micro-organismes, bien qu'il puisse abriter une communauté microbienne diversifiée, comprenant des microbes viables, stressés et non viables. Afin de caractériser le microbiote du miel. Notre étude a été menée sur huit échantillons du miel de différentes régions en centre d'Algérie, d'où on a basé sur des méthodes dépendantes de culture pour la recherche de ces microorganismes. Nous avons trouvé une présence de ces isolats : *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* et *Lactobacillus*. Ces bactéries ont pu être détectées, isolées et caractérisées par des tests morphologiques et biochimiques (test Catalase). Ce qui peut indiquer l'importance du microbiote dans la qualité du miel sachant que ces bactéries sont naturellement présentes dans le processus de création du miel.

**Mots clés :** Miel, Algérie, Méthodes dépendantes de culture, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Lactobacillus*

## Summary

Because of its properties, honey does not support the growth of microorganisms, although it can harbor a diverse community of microbes, including viable, stressed and non-viable microbes. Because of its properties, honey does not support the growth of microorganisms, although it can harbor a diverse microbial community, including viable, stressed and non-viable microbes. In order to characterize the honey microbiota. Our study was carried out on eight honey samples from different regions in central Algeria, using culture-dependent methods to search for these microorganisms. We found the presence of the following isolates: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* and *Lactobacillus*. These bacteria were detected, isolated and characterized by morphological and biochemical tests (Catalase test). This may indicate the importance of the microbiota in honey quality, given that these bacteria are naturally present in the honey-making process.

**Keywords :** Honey, Algeria, Culture-dependent methods, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Lactobacillus*.

## المخلص

العسل هو المنتج الحلو الطبيعي الذي يصنعه النحل من رحيق الأزهار أو من إفرازات أجزاء النباتات الحية. وبسبب خصائصه، لا يشجع العسل على نمو الكائنات الحية الدقيقة، على الرغم من أنه يمكن أن يؤوي مجتمعاً ميكروبياً متنوعاً، بما في ذلك الميكروبات القابلة للحياة والمجهددة وغير القابلة للحياة. من أجل توصيف ميكروبات العسل. أُجريت دراستنا على ثماني عينات من العسل من مناطق مختلفة في وسط الجزائر، باستخدام طرق تعتمد على المستنبت للبحث عن هذه الكائنات الحية الدقيقة. وقد وجدنا وجود العزلات التالية: الإشريكية القولونية، والكلبسيلا، والمكورات العنقودية الذهبية، والمكورات العنقودية البشرية، والمكورات العنقودية البشرية، والمكورات اللبنية. تم الكشف عن هذه البكتيريا وعزلها وتوصيفها باستخدام الاختبارات المورفولوجية والكيميائية الحيوية (اختبار الكاتالاز). وقد يشير ذلك إلى أهمية الميكروبيوتا في جودة العسل، نظراً لأن هذه البكتيريا موجودة بشكل طبيعي في عملية صناعة العسل

**الكلمات المفتاحية:** العسل، الجزائر، الطرق المعتمدة على المزرعة، الإشريكية القولونية، الكلبسيلا، المكورات العنقودية الذهبية، المكورات العنقودية الذهبية، المكورات العنقودية البشرية، العصيات اللبنية