



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH**

**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**

**Département de biologie**

**Licence Sciences et Techniques (LST)**

**PROJET DE FIN D'ETUDES**

**Biotechnologie, Hygiène et Sécurité Alimentaires**

**Evaluation de la qualité hygiénique des  
glaces et des crèmes glacées  
commercialisées dans la ville de Fès**

**Présenté par :** Melle OURGHA Nicerine

**Encadré par :** -Dr BERRADA. S LRDEHM

-Dr EL OUALI LALAMI. A LRDEHM

- Pr AZZOUZI .A FST-FES

**Soutenu le 14/06/2014 devant le jury composé de :**

-Dr BERRADA. S LRDEHM

-Dr EL OUALI LALAMI .A LRDEHM

- Pr AZZOUZI .A FST-FES

-Pr EL FARRICHA. O FST-FES

Stage effectué au Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et  
d'Hygiène du Milieu de Fès

***Année Universitaire 2013-2014***



# Sommaire

<i>Introduction</i>	1
<i>Revue bibliographique</i>	
I-crèmes glacées	
1- Définition	2
2- Historique	3
II- composition et mode de fabrication des glaces	3
A-composition	3
1- Denrées de base	3
2- Principales composants de l'extrait sec de glaces	4
B- processus de fabrication	7
1- Préparation du mix	7
2- Transformation du mix en glaces	8
III- indicateurs de la non-conformité des glaces et crèmes glacées	10
A- les germes totaux ou la flore aérobie mésophile totale	10
B- les germes témoins d'une contamination fécale	10
C- germes pathogènes	11
IV- risques sanitaires liées à la consommation des crèmes glacées	12
1- Les intoxications alimentaires	13
2- Les toxi-infections alimentaires collectives(TIAC)	13
3- Situation épidémiologique au Maroc	13
4- Prévention des toxi-infections alimentaires	14
V-qualité hygiénique des glaces	15
 <i>Matériel et méthodes</i>	
1- Type et période de stage	16
2- Lieu de prélèvements	



3- Lieu d'étude	
4- Prélèvements, acheminement, transport et réception des échantillons au laboratoire	16
5- Analyse de la qualité bactériologique des crèmes glacées	16
A-Matériel, équipements et consommables utilisés	16
B-méthode d'interprétation	17
1-Préparation des échantillons d'aliments pour analyse microbiologique	17
2-Broyage et homogénéisation	18
3-Ensemencement	18
4-Dénombrement et identification des germes	18

## *Résultats*

1- Répartition des échantillons analysés par catégories	27
2- Pourcentage de non-conformité globale	27
3- Pourcentage de non-conformité par catégorie de glaces	28
4- Distribution de la positivité des germes	29
5-Répartition de la non-conformité par germe et par catégorie	29

## *Discussion*

32

## *Conclusions, recommandations et perspectives*

34

## *Références bibliographiques*

35

## *Annexe*

38



# Résumé

Les crèmes glacées sont des denrées alimentaires à base de lait, de produits laitiers, d'eau potable, de sucres, d'ovo-produits, de fruits, de jus de fruits ou de graisses végétales, ou à partir de mélanges. Autorisées par la réglementation en vigueur, elles ont une consistance pâteuse ou solide obtenue par congélation ou surgélation, stockées, transportées, distribuées et consommées sous forme congelée.

La surveillance de leur qualité hygiénique est une nécessité afin de garantir leur innocuité et prévenir la survenue de toxi-intoxications collectives, pouvant résulter par les germes totaux (GT), les Coliformes totaux (CT), les *Staphylococcus aureus* (*St. aureus*) et les Salmonelles.

Notre étude réalisée au LRDEHM, a porté sur l'appréciation de la qualité microbiologique des glaces et des crèmes glacées, vendues dans la ville de Fès. Un total de 23 échantillons a été analysé, dont 11 sont issus de la catégorie artisanale et 12 de la catégorie industrielle. Un dénombrement des germes d'altération (GT et CT) et des *Staphylococcus aureus*, ainsi que la recherche des Salmonelles, ont été effectués selon les normes en vigueur.

Une non-conformité globale de 21% a été notée. Le % de non-conformité était de 27% pour la catégorie des glaces industrielles et de 17% pour la catégorie des glaces artisanales. Les contaminations ont été causées par les GT (4%), les CT (21%) et les *Staphylococcus aureus* (4%). La présence de (*St. aureus*) a été notée dans la catégorie artisanale. Ces résultats témoignent de mauvaises pratiques de préparation, de souillures d'origine fécale par des mains sales et de non-respect des bonnes pratiques d'hygiène lors de la préparation et/ou de stockage de ces aliments.

Afin de prévenir les toxi-infections alimentaires liées aux crèmes glacées, il serait intéressant de :

- ✓ Réaliser le contrôle de l'eau de rinçage ;
- ✓ Contrôler et maîtriser la chaîne du froid ;
- ✓ Assurer une bonne gestion des stocks et conserver une traçabilité ;
- ✓ Adapter une gestion de sécurité alimentaire basée sur l'analyse des risques-points critiques ou HACCP qui pourrait améliorer la qualité des glaces et crèmes glacées au niveau des restaurants et manufacturées.

**Mots clés :** Crèmes glacées, glaces, qualité hygiénique, catégorie industrielle, catégorie artisanale, LRDEHM, Fès, Maroc.



# Introduction

Les glaces sont définies par la législation suisse comme étant « une préparation gelée ou semi-gelée, obtenue à partir de lait, de produits laitiers, d'eau potable, de sucres, d'ovo - produits, de fruits, de jus de fruits ou de graisses végétales, ou à partir de mélanges (**Ordonnance du DFI sur les sucres, les denrées alimentaires sucrées et les produits à base de cacao**).

Ces produits, agréables au goût et nutritifs, constituent un milieu très favorable à la prolifération microbienne en raison de leur valeur nutritive élevée (lactose, protéines etc.) et de leur pH presque neutre (pH~6-7) (**Bell C, Kyriakides A (1998)**), causant des cas d'intoxications, comme celles déclarées en Asie par (**F. chug et al, (1996)**), en Europe, et en Amérique du Nord.

Toutefois, les maladies d'origine alimentaire sont l'un des problèmes de santé publique les plus communs; elles créent un fardeau social et économique ainsi que des souffrances humaines et posent un problème auquel tous les pays sont confrontés (**A. Brisabois et al.,**). Les toxi-infections alimentaires au Maroc ne sont pas négligeables. En 2009, le Maroc a enregistré 292 cas d'intoxications dont 50 étaient d'origine laitière y compris les produits glacés (**Bulletin de Pharmacovigilance, 2009**).

L'évaluation des risques microbiologiques peut être considérée comme un outil à utiliser pour la gestion des risques présentés par des pathogènes d'origine alimentaire et pour l'élaboration de normes pour les aliments faisant l'objet d'un commerce international (**A. Brisabois et al.,**).

Devant le risque sanitaire accru lié à ce type de denrées alimentaires, le suivi de leur qualité hygiénique est devenu une nécessité, afin d'éviter les risques sanitaires qui peuvent être engendrés par la consommation des glaces contaminées par des germes pathogènes.

Dans ce contexte et dans le cadre de notre projet de fin d'étude, nous avons réalisé ce travail intitulé :

« **Evaluation de la qualité hygiénique des glaces et des crèmes glacées commercialisées dans la ville de Fès** »

Notre travail a comporté une revue bibliographique, suivie par matériels et méthodes, résultats et discussions, conclusions, recommandations et perspectives. Son objectif principal était d'évaluer la qualité hygiénique de ces produits par le dénombrement des microorganismes d'altération microbienne et la recherche des germes pathogènes.



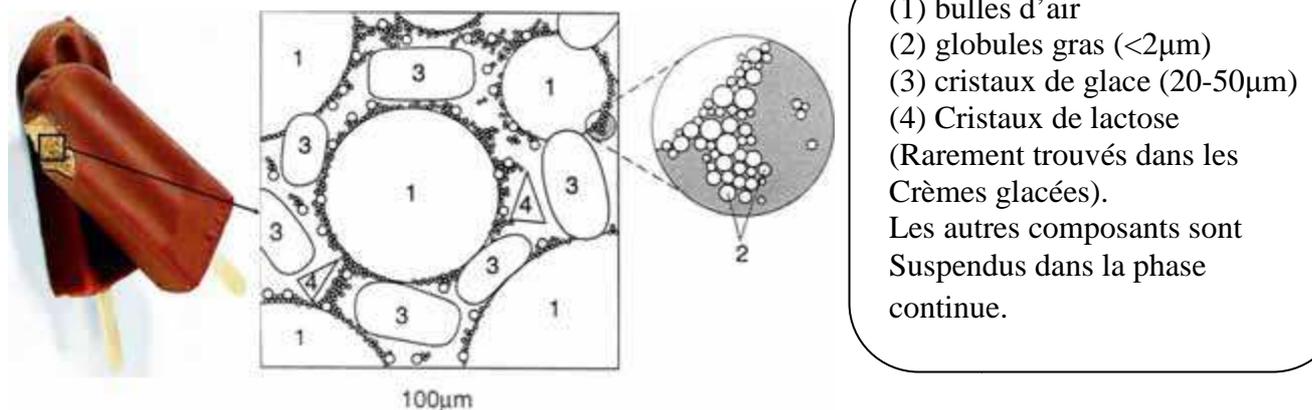
# REVUE

## BIBLIOGRAPHIQUE

### I- Crèmes glacées

#### **1. Définition :**

Les crèmes glacées sont des préparations obtenues par congélation d'un mélange de lait, de crème, de sucre et de parfum. Elles sont formées suite à une combinaison d'une mousse et d'une émulsion partiellement congelées. Ce système hétérogène et complexe comprend notamment des globules gras, des bulles d'air et un réseau de cristaux de glace, tous dispersés dans une solution aqueuse visqueuse macromoléculaire (Figure 1) (Stanley D. W et al., (1996)).



**Figure 1:** Structure de la crème glacée (Marshall et Goff, 2003)

Les proportions de ses différentes phases de crèmes glacées varient selon la formule. La crème glacée est généralement composée d'environ 50% en volume d'air incorporé. Le reste



est un mélange de 60 à 65% d'eau en poids, de 10 à 15% de matière grasse, de 10% de lait sous forme solide, de 15% de sucre. La différence principale entre crèmes glacées et sorbets est que ces derniers ne contiennent pas de matière grasse. L'eau se trouve dans cette structure à la fois dispersée et dispersante. (**Anis HADDAD AMAMOU (2009)**).

## **2. Historique**

Depuis toujours, le froid et la glace sont utilisés pour conserver les aliments en les préservant de la pourriture.

C'est dans l'ancienne Chine (300 ans avant J.-C.) que l'on a commencé à confectionner des glaces pour rafraîchir les boissons. Les Chinois, en faisant couler sur l'extérieur des récipients remplis de sirop un mélange de neige et de salpêtre (sel), constatèrent que le sirop gelait (**Société Suisse de Nutrition. Dossier(2013)**).

Dans la Grèce antique puis à Rome, les empereurs dégustaient de la neige, venue directement des glaciers, parfumée au miel, à l'eau de rose ou aux fruits. A cette époque, les glaces étaient réservées uniquement aux rois et empereurs (**Société Suisse de Nutrition. Dossier(2013)**).

Au XIII<sup>ème</sup> siècle, Marco Polo fit grandement avancer son développement en apportant en Italie la technique de fabrication observée en Chine, c'est-à-dire la « sorbetière ».

La fabrication des sorbets arriva en France en 1533 lors du mariage de Catherine de Médicis avec Henri II. Cependant, leur mode ne se popularisa que vers le XVII<sup>ème</sup> siècle et firent leur apparition dans les salons de café, grâce à l'Italien Procope, qui ouvrit le premier café de Paris vendant des glaces en 1660. Son succès fut immédiat et d'autres cafetiers en commercialisèrent ((**Société Suisse de Nutrition. Dossier(2013)**, **Vierling E. (2008)**, **Toussaint-Samat, M(1987)**).

Au XIX<sup>ème</sup> siècle, grâce aux avancées technologiques et à la mise au point d'une sorbetière plus opérante, la fabrication ménagère de crème glacée se répandit rapidement. Dès les années 1900, la glace en bâton ainsi que les cornets firent leur apparition. Le principe de la surgélation se développa également à cette époque (**Toussaint-Samat, M(1987)**).

Depuis, les techniques de fabrication se sont améliorées et le monde des glaces ne cesse de s'accroître, tant au niveau des formes qu'au niveau des parfums (**Toussaint-Samat, M(1987)**).

L'origine du mot « sorbet » vient de l'italien *sorbetto* emprunté au turc *chorbêt*, qui provient de l'arabe *charâb*. Celui-ci signifie « boisson de fruits » ou « sirop » (**Toussaint-Samat, M(1987)**).

## ***II- Composition et mode de fabrication des glaces***

### **A- Composition**



Les glaces et les sorbets font partie des produits sucrés, ils sont placés dans la pointe de la pyramide alimentaire de la Société Suisse de Nutrition (SSN) et peuvent faire partie de l'alimentation équilibrée. Il est recommandé de les consommer avec modération vue leur richesse énergétique. Cependant, ils peuvent être pris en dessert ou en collation dans l'après-midi (**Société Suisse de Nutrition(2011)**).

Les glaces sont composés de :

## **1. Denrées de base**

Les différents ingrédients utilisés dans une crème glacée jouent un rôle spécifique qui varie selon leur nature et leur teneur. Ainsi les matières grasses et les produits sucrés varient en proportion suivant la qualité désirée et la matière sèche totale préconisée. De la matière sèche, dépendent le point de congélation, la durée de vie et d'autres attributs sensoriels : saveur sucre, texture,... ; les sources de matière grasse sont le lait, la crème et le beurre, mais on utilise de plus en plus la matière grasse végétale (huile de coprah, huile de palme,...). Les produits sucrants sont pour l'essentiel le saccharose, mais aussi les sirops de glucose et les malts dextrines. Les stabilisants ont pour rôle d'empêcher la formation de gros cristaux de glace et sont ajoutés à des doses trop faibles pour modifier la teneur en matière sèche ou la valeur nutritionnelle. Les émulsifiants sont incorporés dans le «mix» pour stabiliser l'émulsion, donner une structure moelleuse et réduire le temps de battage de la crème .ils permettent une incorporation de fines bulles d'air dans la masse (**dossier cedus avec la collaboration de l'université Reims**).

## **2. Principaux composants de l'extrait sec des glaces**

### **2.1. Extrait sec de graisse lactique**

L'extrait sec de graisse lactique (ESDL) peut être apporté par différentes sources telles que le lait frais, le lait concentré en matière sèche ou le lait en poudre. D'autres poudres sont également utilisées dans l'industrie des glaces comme les poudres de lactosérum ou de babeurre. Les principaux intérêts de l'ESDL dans les crèmes glacées résident dans l'apport de protéines et de minéraux bénéfiques pour la structure de la crème glacée et par conséquent pour sa texture. En outre, l'apport de lactose représente une source d'extrait sec peu onéreuse (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.2. L'air**

L'air, qui est incorporé à débit variable dans le mix, a été préalablement filtré (classe100). Il remplit plusieurs rôles principaux dans les glaces. Lorsque le taux de foisonnement augmente, on constate une réduction de la taille des cristaux de glace et des bulles d'air, ce qui contribue à une amélioration de la texture du produit fini. La présence d'air dans les glaces permet d'alléger la valeur énergétique de celles-ci, de même que leur prix de revient. C'est la raison pour laquelle la glace est un des rares produits alimentaires solides vendus au litre.



L'air étant un isolant thermique, il confère à la glace une meilleure résistance à la fonte lors d'une élévation de température et procure une moindre sensation de froid, qui est désagréable lors de la dégustation (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.3. L'eau**

Celle-ci est également indispensable car son rôle de solvant permet à l'eau de solubiliser l'extrait sec dégraissé lactique ainsi que les sucres. En outre, son rôle de dispersant facilite l'émulsification de la matière grasse. Son passage partiel de l'état liquide à l'état solide et la création de réseaux solides cristallins permet une stabilisation de la structure physico-chimique complexe des glaces. Par ailleurs, elle doit être d'excellente qualité bactériologique afin de ne pas véhiculer de germes microbiens (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.4. Matière Grasse**

La matière grasse des crèmes glacées est exclusivement d'origine laitière ; elle peut être apportée par de la crème fraîche, du beurre ou encore des beurres concentrés. La présence de matière grasse dans une crème glacée présente de nombreux avantages tels que la réduction de la vitesse de foisonnement, la stabilisation de la mousse, l'amélioration de la texture, du corps et de la flaveur du produit fini, ainsi que l'accroissement de sa valeur énergétique (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.5. Sucres**

Les glaces sont des aliments par excellence sucrés. En outre, les sucres représentent une source d'extrait sec peu onéreuse. Enfin, ils jouent un rôle très important sur la quantité d'eau liée c'est-à-dire non disponible pour la congélation. Autrement dit, la nature et les doses des sucres apportés dans la formulation vont influencer de manière prépondérante la stabilité thermique de la glace et sa vitesse de fonte à la sortie du congélateur. En contrepartie, ils limitent le taux de foisonnement du mix, et peuvent en cas de dosage important générer une texture collante en bouche et entraîner une cristallisation excessive et grossière (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.6. Ingrédients d'origine végétale**

#### **2.6.1. Sucres et émulsifiants**

Le saccharose reste le sucre majoritairement utilisé en raison de sa solubilité et de son pouvoir sucrant élevés ; par ailleurs, c'est un composant peu onéreux dans la formulation. Néanmoins, il est rarement utilisé tout seul. C'est ainsi que l'on rencontre le plus souvent des sirops de glucose qui sont issus de l'hydrolyse de solutions d'amidon (**Jean-Luc BOUTONNIER**).



### **2.6.2. Cacaos et chocolats**

Le cacao et le chocolat peuvent être utilisés seuls ou en mélange dans la fabrication du mix. Tout dépend du positionnement du produit sur le marché et de son coût matières visé. Le chocolat est une préparation obtenue à partir de cacao et de sucre avec au moins 35 % de matière sèche totale dont au moins 18 % de beurre de cacao et au moins 14 % de cacao sec dégraissé (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.6.3. Fruits et dérivés**

Des purées de fruits sont utilisées dans la fabrication des mixes pour les crèmes glacées à la fraise par exemple et ainsi que pour la plupart des sorbets. Ces préparations de fruits spécialement élaborées pour les glaciers peuvent se présenter réfrigérées et conditionnées sous atmosphère modifiée, surgelées ou plus rarement déshydratées voire lyophilisées (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.7. Alcools**

L'addition d'alcool dans le mix peut abaisser de manière très importante sa température cryoscopique et poser ainsi des problèmes de stabilité physico-chimique du produit fini. C'est la raison pour laquelle, on recherche plus la saveur typique de liqueur qu'un degré d'alcool élevé (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.8. Œufs et ovo-produits**

Certaines glaces et crèmes glacées peuvent renfermer des œufs entiers, ou encore des jaunes d'œufs qui présentent certains avantages.

Le jaune, outre son pouvoir colorant, il contient de la lécithine qui est un agent émulsionnant très hydrophile intéressant pour la fabrication du mix qui est une émulsion de type huile dans l'eau. Quant au blanc d'œuf, c'est un excellent agent moussant qui permet de faciliter le foisonnement du mix. Ces ovo-produits se présentent soit sous forme liquide réfrigérée, soit sous forme congelée pouvant être sucrée ou encore déshydratée (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.9. Additifs**

#### **2.9. 1. Emulsifiants**

Au cours de l'élaboration du mix, première étape de la fabrication des crèmes glacées, on doit réaliser une émulsion dans laquelle la phase aqueuse doit disperser la phase grasse. Pour cela, il faut trouver dans le milieu des agents tensioactifs très hydrophiles, c'est le cas des protéines lactières et de la lécithine du jaune d'œuf.

Ensuite lors de la transformation du mix en crème glacée dans le freezer, on recherche une déstabilisation partielle de cette émulsion de manière d'une part à faciliter lors du foisonnement la dispersion de l'air dans la phase liquide sous forme de fines bulles et d'autre part à flocculer la phase grasse par agglomération partielle des globules gras, cela afin de stabiliser la dispersion d'air dans le mix (**Jean-Luc BOUTONNIER**).



### **2.9.2. Epaississants et gélifiants**

Dans le but de diminuer la quantité d'eau libre congelable dans les préparations, on peut recourir à l'emploi de ces agents texturants. De nombreux additifs sont autorisés par la réglementation tels que les alginates de sodium (E401), de potassium (E402), et d'ammonium (E403), l'agar-agar (E406), la farine de graines de caroube (E410), la farine de graines de guar (E412), la pectine (E440 i), la pectine amidée (E440 ii), les carraghénanes (E407), la gomme xanthane (E415) et la carboxyméthyl-cellulose (E466) (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.9.3. Stabilisants**

Afin de renforcer notamment le rôle des gélifiants, on peut ajouter du phosphate tricalcique (E341 iii) ainsi que certains phosphates et polyphosphates (E450 ai uniquement). De même, la gélatine alimentaire et le blanc d'œuf sont autorisés dans les glaces (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.9.4. Acidifiants**

La correction du pH du milieu peut être réalisée par addition d'acides organiques ou de leurs sels. C'est ainsi que les correcteurs d'acidité suivants sont autorisés : l'acide citrique (E330) ainsi que ses sels tels que les citrates de sodium (E331), de potassium (E332), de calcium (E333) (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.9.5. Colorants**

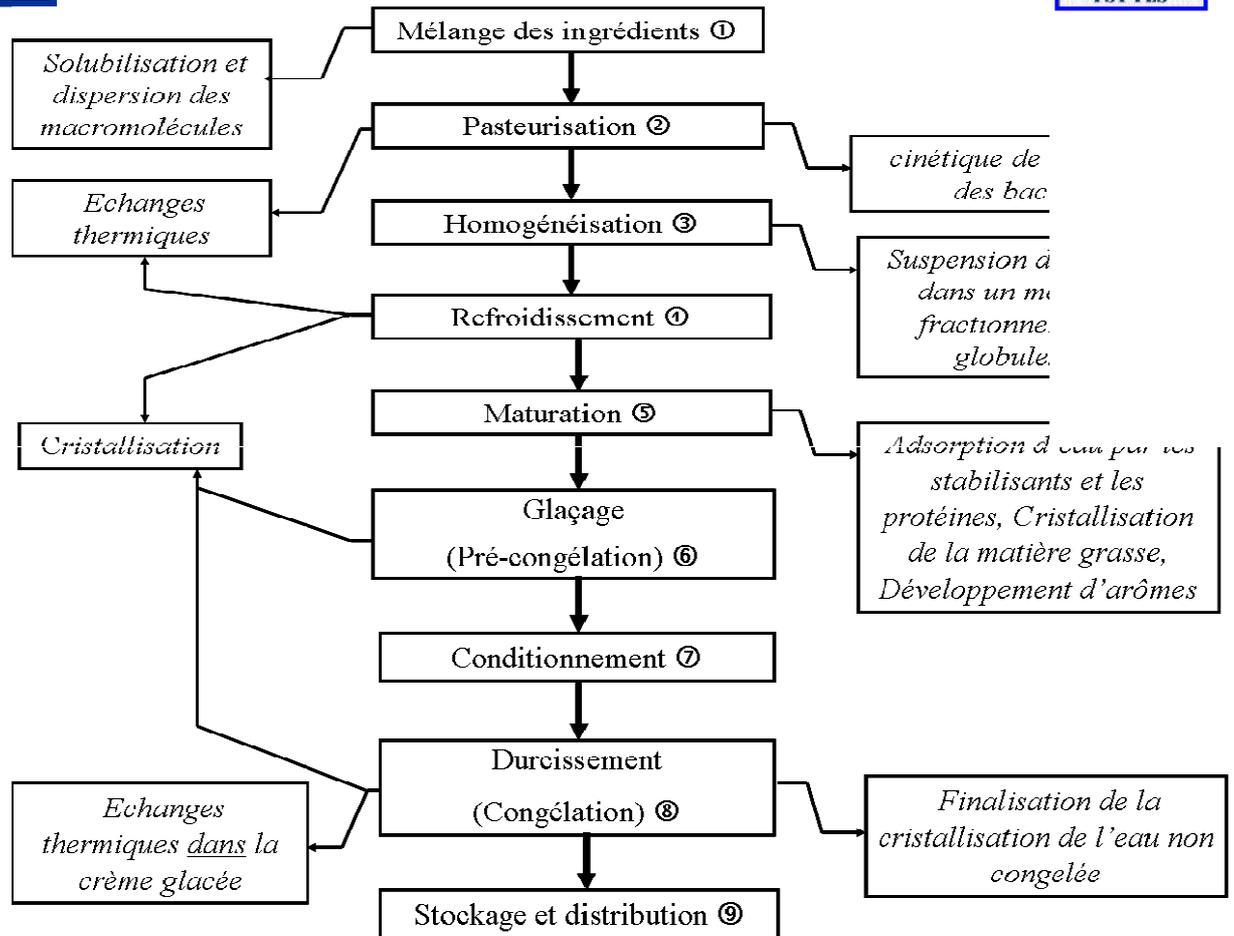
Une série de substances est autorisée afin de renforcer les couleurs des produits du jaune au noir, en passant par l'orange, le rouge, le vert, le bleu et le marron (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.9.6. Arômes**

Les quantités minimales d'arômes à employer pour la fabrication des glaces sont variables. En outre, ils peuvent être utilisés seuls ou en complément pour renforcer la saveur des fruits (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

## **B- Processus de fabrication :**

La fabrication des crèmes glacées est un ensemble de plusieurs opérations unitaires. Ces étapes sont résumées sur la **Figure 1**, sur laquelle sont montrés également les différents phénomènes qui peuvent avoir lieu et les principaux facteurs dont les industriels tiennent compte (**Anis HADDAD AMAMOU (2009)**).



**Figure 2 :** Procédé de fabrication de la crème glacée.

## 1. Préparation du mix :

C'est le premier stade de la fabrication des glaces, il comprend six étapes qui sont le dosage des ingrédients, l'agitation, l'homogénéisation du mélange couplée à la pasteurisation, le refroidissement et la maturation (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### 1.1. Dosage des ingrédients et agitation

Les différents ingrédients solides ou liquides sont entreposés dans des tanks-silos de grande capacité et sont dosés et acheminés automatiquement selon un programme correspondant à une formulation. Cette cuve de section carrée à fond pyramidal comprend la base un système combiné de pompage et de dispersion rotatif développant des forces de cisaillement très importantes (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### 1.2. Homogénéisation

Quand cette opération est terminée, on obtient une dispersion grossière insuffisante pour aboutir à une glace d'excellente qualité. On procède alors à un affinage de la dispersion grâce



à une opération physique qui met en œuvre des pressions relativement élevées (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **1.3.Pasteurisation et réfrigération**

Dès la sortie de l'homogénéisateur, le mix est véhiculé en continu vers un échangeur afin d'y être à la fois pasteurisé puis refroidi.

Outre l'optimisation de l'hydratation et de la dissolution des poudres, cette opération a pour principal but de détruire tous les micro-organismes pathogènes éventuellement présents dans le mix, ainsi qu'une grande majorité de la flore d'altération à fin d'obtenir un produit fini conforme aux exigences réglementaires visant à préserver la santé du consommateur. Un barème de chauffage (Couple temps/température), plus ou moins sévère, est appliqué au mix de manière à atteindre les objectifs précédemment évoqués ; ainsi, on peut opérer pendant 30 s à 80°C, 3 s à 90°C et dans certains cas, on peut aller jusqu'à un traitement de type Ultra-haute température à 140°C pendant 1 à 2 s. Cette opération qui est immédiatement suivie d'un refroidissement du mix à 4°C, elle s'effectue en continu dans un échangeur thermique à plaques qui autorise un coefficient de récupération énergétique relativement élevé. La réfrigération du mix, quant à elle, vise d'une part à régler la température de maturation et à éviter une prolifération des micro-organismes ayant survécu au traitement thermique (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **1.4.Maturation**

C'est la seule opération qui, pendant la fabrication des glaces, est discontinuée en raison d'un temps de séjour du mix dans les cuves de maturation de quelques heures. Ces cuves peuvent également servir de tanks de stockage de mixes dans l'attente de la transformation pendant plusieurs jours (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

## **2. Transformation du mix en glace :**

Ce deuxième stade de la fabrication des glaces comporte cinq opérations successives, le foisonnement et le glaçage réalisés dans un seul et même appareil appelé le freezer, ainsi que le conditionnement, la surgélation finale et le stockage des produits finis (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.1.Foisonnement**

Cette opération, qui consiste à injecter de l'air filtré sous pression, se réalise avec un débit régulé automatiquement de façon à maîtriser le taux de foisonnement et par conséquent la masse volumique du produit fini. On obtient ainsi une mousse qui est une dispersion d'air dans un liquide visqueux. Lors de l'incorporation d'air dans le mix à la faveur d'une agitation énergétique, les protéines solubles, présentes dans le milieu, diffusent à l'interface gaz/liquide, se déplissent, se concentrent et s'étalent entre l'air et la phase aqueuse. La présence de ce film



protéique diminue la tension inter-faciale et contribue ainsi d'une part à un accroissement de l'incorporation et de la dispersion de l'air et d'autre part à une stabilisation durable de la mousse grâce à une dénaturation partielle de ces protéines au contact de l'air. Certaines protéines sont d'excellents agents moussants, c'est le cas de la caséine bêta (lait et dérivés), de la gélatine (peau et os des bovins et porcins), du lysozyme (œuf et ovo-produits). À l'inverse, la matière grasse et notamment les triglycérides riches en acides gras saturés à moyennes et longues chaînes sont des agents anti-mousses qui nécessitent un renforcement de la dose d'agents moussants à fin d'obtenir un taux de foisonnement élevé (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.2. Glaçage**

Ce terme ne reflète en fait qu'une partie des transformations importantes que le mix va ainsi subir lors de son passage de quelques dizaines de secondes dans le freezer. Le mélange liquide avec une plus ou moins grande quantité d'air grossièrement dispersée va subir une double action simultanée (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.3. Conditionnement**

À la sortie du freezer, la glace sera dosée soit de manière volumétrique grâce à l'utilisation de volumétries à piston pour le produit suffisamment malléables, soit par temporisation ; c'est alors la cadence de la chaîne de conditionnement qui déterminera le niveau de remplissage de chaque contenant. Les doseuses temporisées autorisent des débits plus élevés que les doseuses volumétriques et fonctionnent soit avec des soupapes, soit par extrusion et dans ce dernier cas, la glace doit avoir une texture très ferme (Température comprise entre  $-6$  et  $-8^{\circ}\text{C}$ ). Les glaces peuvent être dosées directement dans leur conditionnement final (pots, cornets, bacs) ou coulées dans un moule avec enrobage et conditionnement (bâtonnets classiques), ou encore extrudées grâce à une préforme qui leur donnera leur aspect définitif (bâtonnets, barres). Ensuite, et selon les présentations recherchées, les produits pourront recevoir différents décors tels que des enrobages déposés par immersion ou ruissellement (préparation à base de chocolat, coulis de fruits), des cornets fabriqués à partir de gaufrettes et différentes garnitures (meringues, morceaux de fruits secs, coulis, etc.) (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.4. Surgélation finale**

Cette opération, appelée également durcissement, a pour principaux objectifs de poursuivre la cristallisation de l'eau libre congelable, ce qui nécessite un abaissement de la température à  $-20^{\circ}\text{C}$  et permet d'assurer une stabilisation microbiologique au produit fini. Plusieurs systèmes peuvent être utilisés pour cette surgélation finale utilisant les principes de la convection (ventilation d'air froid) ou de vaporisation ou de pulvérisation de fluides cryogéniques (azote, anhydride carbonique) ou de la conduction (contact avec une paroi derrière laquelle circule une saumure à basse température de congélation). Compte tenu que le



produit est immobile, massif et souvent conditionné dans un emballage constituant une barrière à l'échange thermique, on utilise des températures relativement basses, comprises entre 35 et – 45 °C (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

### **2.5. Stockage et commercialisation**

Le respect de la chaîne du froid négatif est une condition indispensable au maintien de la qualité physico-chimique et bactériologique des glaces. Toute remontée de la température se traduit inévitablement par un processus de recristallisation. En effet, tout apport de chaleur au produit provoque la fusion de petits cristaux avec libération d'eau liquide, qui lors d'un nouvel abaissement lent de température vient entraîner un accroissement des gros cristaux. Il s'ensuit une augmentation de leur taille moyenne avec pour conséquence une sensation granuleuse et aqueuse lors de la dégustation. C'est la raison pour laquelle les températures d'entreposage des glaces se situent entre – 25 et – 30°C et si celles-ci sont respectées sans faille à tous les niveaux (stockages, transports, présentation en linéaires), on peut espérer des durées de vies de l'ordre de 18 à 24 mois (**Jean-Luc BOUTONNIER**).

## **III - Indicateurs de la non-conformité microbiologique des crèmes glacées**

Etant formé d'un mélange de lait, de crème, de sucre et de parfum, les crèmes glacées peuvent être contaminées aussi bien par les germes de l'environnement que par les coliformes et les germes pathogènes.

### **A- Les germes totaux ou la flore mésophile aérobique totale :**

Les germes aérobies mésophiles comprennent l'ensemble des bactéries, des levures et des moisissures que l'on rencontre dans l'environnement des denrées alimentaires.

La présence de la flore mésophile aérobique totale est tolérable s'elle ne dépasse pas le seuil d'acceptabilité. Son dénombrement élevé signifie qu'une contamination ou de fausses manipulations ou une conservation déficiente ont eu lieu, et peut provoquer une altération rapide du produit et diminuer le délai de sa conservation (**BULLETIN OFFICIEL, 2004**).

La recherche de la flore mésophile aérobique totale est d'un grand intérêt, son dénombrement permet notamment:

- D'évaluer la qualité hygiénique et marchande du produit fini ;
- De contrôler la propreté de l'équipement et des manipulations ;
- De vérifier les déficiences au cours des opérations ;
- De prendre des mesures préventives pour améliorer l'hygiène de la fabrication (**CHRISTIAN STEPHAN SECKE, 2007**).



## **B- Les germes témoins d'une contamination fécale :**

### **B.1. Les coliformes totaux**

Ils regroupent plusieurs espèces bactériennes de la famille des Enterobacteriaceae, ils se présentent sous formes de bâtonnets, Gram négatif, non sporulés, mobiles ou non, possédant l'enzyme  $\beta$ -galactosidase permettant l'hydrolyse du lactose à 37°C afin de produire des colonies rouges avec des reflets métalliques sur un milieu bien approprié. Ils sont oxydases négatives et réduisent les nitrates en nitrites sous conditions anaérobioses. Les coliformes totaux incluent, entre autres, les genres suivants : *Escherichia*, *Entérobactérie* et *Klebsiella*. Les coliformes ne sont généralement pas pathogènes, ce sont des marqueurs de la qualité hygiénique générale et des indicateurs de la contamination fécale (Edberg et al. 2000).

### **B.2. Les coliformes fécaux**

Les coliformes fécaux ou coliformes thermo- tolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux, en forme de bâtonnets, ne formant pas de spores, à Gram négatif, oxydase négative, aérobies ou anaérobies facultatifs, capables de croître en présence de sels biliaries, ou autres agents de surface ayant des propriétés inhibitrices de croissance analogues et capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 48 heures à la température de 44 °C (Edberg et al, 2000 ; GOUIRAND,2003).

## **C- Germes pathogènes :**

### **C.1. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus* et *Micrococcus* constituent deux genres bactériens qui ont été longtemps regroupés au sein de la famille des *Micrococcaceae*. Cette famille a été, en raison de l'éloignement phylogénétique de ces deux genres.

Ce sont des microorganismes Gram positif halophile, formant des colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques à la surface d'un milieu de culture sélectif (Chapman, Baird Parker) et donnant une réaction fortement positive à la coagulasse (De Buyser M.L. (1996)).

Leur principal habitat est la muqueuse nasale, la bouche, la gorge et la peau d'individus sains. Cette bactérie peut être disséminée facilement dans l'environnement et peut ainsi contaminer les aliments (Y LE LOIR, 2010).

Les *Staphylococcus aureus* coagulase positive souvent recherchés ne sont pas forcément entérotoxigènes, et seuls les *S. aureus* coagulase positive capables de produire une entérotoxine qui causent les intoxications alimentaires (SIGNS et al, 2011).

Des souches de *S. aureus* d'origine variée (animale, humaine ou environnementale) peuvent contaminer les aliments crus. Cependant, étant thermosensibles, elles sont généralement détruites au cours de la pasteurisation ou de la cuisson des aliments. En outre, leur croissance dans les aliments est favorisée principalement par les crèmes glacées, les pâtisseries la crème,



les aliments traités tels que les jambons, les pâtes et rillettes, ainsi que par les salades de pomme de terre, de volaille et de thon (**Lambert, 2003**).

Leur présence dans les aliments chauffés et manipulés après cuisson est plutôt un indice de contamination humaine et possiblement de mauvaises pratiques sur le plan des manipulations et de l'hygiène des manipulateurs (défaut d'hygiène) (**Y LE LOIR, 2010**).

### **C.2. *Salmonella sp***

Les Salmonelles sont des bactéries à Gram négatif de type aérobie-anaérobie facultatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et possédant toutes leurs caractéristiques biochimiques. Elles sont mobiles grâce à une ciliature péritriche, et se développent à une température comprise entre 5 °C et 45 °C avec un optimum entre 35 et 37 °C, à un pH variant de 4,5 à 9 avec un optimum compris entre 6,4 et 7,5. La plupart des salmonelles peuvent se développer dans les aliments présentant une activité de l'eau ( $A_w$  comprise entre 0,945 et 0,999). Le potentiel d'oxydoréduction peut aussi être un facteur déterminant dans la croissance de ce micro-organisme (**D'Aoust J.V. (1989)**).

L'intestin des animaux constitue le réservoir le plus important en salmonelles et contribue fortement à leur dissémination dans l'environnement où elles peuvent survivre mais sans se multiplier. La contamination de l'Homme peut se faire de façon directe par contact, ou le plus souvent, par l'intermédiaire d'aliments souillés, un grand nombre de produits alimentaires étant susceptibles d'être vecteurs (**Doyle M.P. & Cliver D.O. (1990)**).

### **C-3-*Listeria monocytogenes***

Les bactéries du genre *Listeria* se présentent sous la forme de petits bacilles de forme régulière de 0,5 µm à 2 µm de long et de 0,4 µm à 0,5 µm de diamètre, arrondis aux extrémités et ne formant ni capsule ni spore. Elles sont à Gram positif, pouvant apparaître à la coloration de Gram, isolées, en V, en amas et parfois même en chaînettes (**See linger H.P.R. & Jones D. (1986)**).

Leur croissance est possible entre 0 °C et 45 °C, avec un optimum entre 30 et 37 °C, à un pH compris entre 4,5 et 9,6, jusqu'à 10 % NaCl et pour une activité de l'eau ( $A_w$ ) de 0,92. Elles sont mobiles grâce à une ciliature péritriche (**Lovett J. (1989)**).

*Listeria monocytogenes* peut être considérée comme un agent pathogène alimentaire « parfait » car elle est ubiquiste, très résistante aux conditions difficiles (Température,  $A_w$ , pH...) et surtout elle est capable de se développer aux températures de réfrigération des aliments. La virulence des souches pourrait d'ailleurs être exaltée par leur développement à basse température (**Larpent J.P. (1995)**).

Le lait constitue un ingrédient principal dans la composition des aliments de glaces et crèmes glacées. Des études ont montré que les produits lactés sont la source de risque de la listériose (**Pearson, 1990 ; Maifreni, 1993**).



## **IV- Risques sanitaires liés à la consommation des crèmes glacés**

Les membres de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), ont exprimé leur inquiétude au sujet de la sécurité sanitaire des aliments aux niveaux tant nationaux qu'international. L'incidence croissante des maladies d'origine alimentaire au cours des dernières décennies semble dans de nombreux pays être liée à une augmentation des maladies dues à la présence de microorganismes dans les aliments.

Le secteur des crèmes glacées industrielles et artisanales est étroitement contrôlé et les mesures d'hygiène sont drastiques. Cependant, le risque sanitaire est associé à la glace dite à l'ancienne, fabriquée «comme à la maison» par l'Homme "au blouson blanc", le plus souvent vendu devant les écoles, dans des kiosques spécialisés ou dans des crèmeries. Ce type de glaces demeure très prisé par le consommateur à cause du prix très abordable à une grande Catégorie de la population marocaine. Devant le risque sanitaire lié la consommation de ces crèmes glacées, un suivi de la qualité microbiologique de ces aliments s'impose afin d'éviter la survenue de toxi-infections alimentaires qui peuvent avoir des conséquences dramatiques sur la santé des consommateurs mais également sur les intérêts économiques du pays (**Abdelhakim EL OUALI ALAMI et al., (2010)**).

### **1. Les intoxications alimentaires :**

Les intoxications résultent de l'ingestion d'une toxine préformée dans l'aliment. Il s'agit essentiellement des intoxications botuliniques, staphylococciques et à *Bacillus cereus*. Les microorganismes synthétisent ces toxines de nature protéique au cours de la phase exponentielle de croissance (*C. botulinum*) ou en fin de cette phase (*S. aureus*) (**AMAT-ROSE J.M, 1997**).

Plusieurs cas de toxi-intoxications alimentaires (TIA) liés à la contamination des produits glacés par *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* ont été enregistrés en Asie, en Europe et en Amérique. Au Maroc, les TIA ne sont pas négligeables, 292 cas ont été enregistrés en 2009, dont 50% était d'origine laitière y compris les glaces et crèmes glacées (**L'Institut Danone France (association loi 1901)**).

### **2. Les toxi-infections alimentaires collectives(TIAC) :**

Elles sont fréquentes et parfois graves, elles représentent un véritable problème de santé publique et sont de ce fait, incluses parmi les maladies transmissibles à déclaration obligatoire. Un foyer de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) est définie comme la survenue d'au moins 2 cas similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter selon (**haeghebaer et al, 1997**) la cause a une même origine



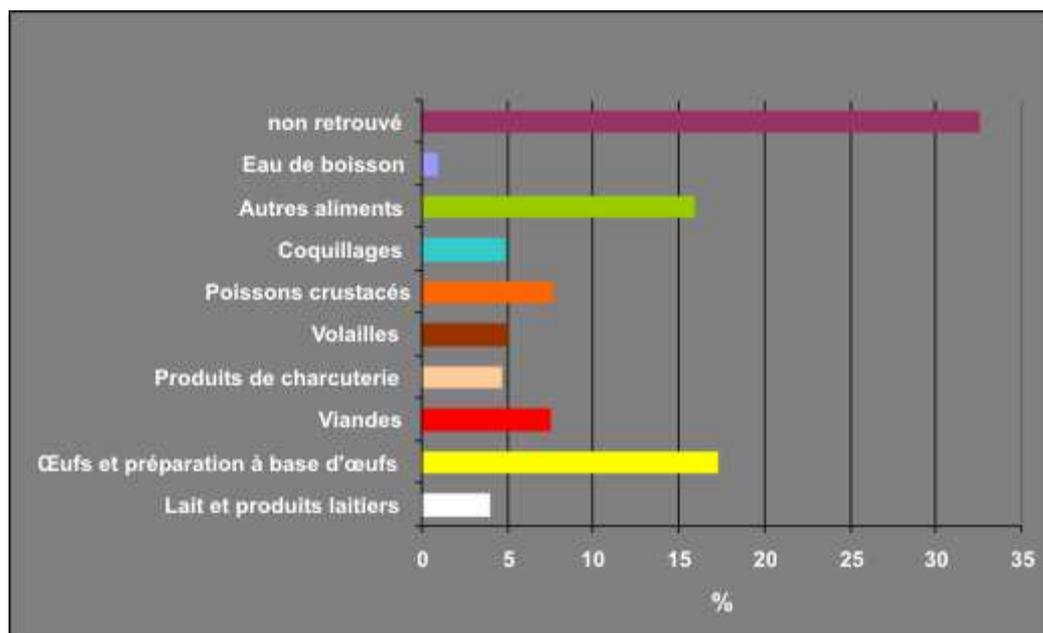
alimentaire. le diagnostic est d'abord clinique et la symptomatologie est fonction de l'agent responsable. Les signes digestifs (diarrhées, vomissement, nausées, douleurs abdominales) peuvent s'accompagner de signes généraux (fièvre).

Trois agents pathogènes semblent ainsi être la plupart du temps mis en cause lors de T.I.A.C : *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*. Les aliments qui apparaissent le plus à risque sont les œufs, les poissons, crustacés et les viandes en général. (BELOMARIA *et al*, 2007).

### **3. Situation épidémiologique au Maroc :**

Les intoxications sont loin d'être négligeables au Maroc. Une étude épidémiologique des TIAC entre 1999 et 2001 a montré une augmentation progressive au cours des 10 dernières années. Les glaces ont été incriminées dans 10% des cas de TIAC (Le Minor L. (1989).

En 2009, les dernières statistiques du centre antipoison et de pharmacovigilance ont déclaré 292 cas de TIAC au Maroc. Parmi les produits incriminés, les produits laitiers et leur dérivés représentent environ 5% (Figure 3) (D'Aoust J.V. (1989).



**Figure 3 :** Pourcentage respectif des aliments incriminés ou suspectés de TIAC entre 1996 et 2008 (G. Delmas *et al*. INVS, 1996).

### **4. Prévention des toxi-infections alimentaires**



La sécurité bactériologique est le critère de base de la sécurité alimentaire. La présence dans un aliment d'une bactérie potentiellement pathogène n'entraîne pas forcément une T.I.A. symptomatique. En effet, les germes dans l'aliment se trouvent dans un environnement physico-chimique variable dont les conditions peuvent ne pas être favorables à leur développement (température, pH, substances inhibitrices...). D'autre part le micro-organisme n'est pas seul mais se trouve au sein d'une population bactérienne où la compétition existe entre chaque espèce présente. En conséquence, si les bactéries sont déjà présentes dans un aliment ou si elles sont involontairement ajoutées au cours de la préparation, il faut à tout prix éviter leur multiplication avant la consommation de l'aliment.

Dans le cas des glaces, la prévention des toxi-infections alimentaires impose de respecter la chaîne du froid et les bonnes pratiques d'hygiène, depuis la fabrication jusqu'au stockage, distribution et consommation, et d'éviter de les laisser à une température ambiante qui favorise la multiplication des bactéries.

En outre, au niveau industriel ou collectif, il est primordial de disposer de matières premières (œuf, sucre, additifs,..) contrôlées comme étant « microbiologiquement propres ». Mais il convient aussi de stocker les produits fragiles dans des enceintes frigorifiques et de respecter la chaîne du froid sans rupture de celle-ci. Toutefois, au niveau individuel et familial, les règles à respecter sont finalement extrêmement proches de celles préconisées pour les collectivités : il faut maintenir la chaîne du froid, conserver les produits au réfrigérateur, se laver les mains avant de toucher un aliment et vérifier la propreté des instruments utilisés (L'Institut Danone France (association loi 1901).

## V- Qualité hygiénique des glaces

La qualité hygiénique des glaces et des crèmes glacées est régie par le circulaire conjoint N° 3 du 3-12-84 du Ministre de l'agriculture et de la réforme agraire et du Ministre de la sante publique. Les germes recherchés ainsi que leurs critères d'acceptabilité sont présentés dans le tableau suivant.

**Tableau1** : Critères microbiologiques des crèmes glacés (CONFEDERATION NATIONALE DES GLACIERS DE FRANCE, 1998)

Seuil	Les paramètres recherchés				
	GT	CT	CF	<i>St. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
<b>M</b>	$5.10^5$	100	100	100	ABS

**M** : seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants.



- ✓ Si la valeur est  $\leq M$ : Conforme
- ✓ Si la valeur est  $> M$  : Non conforme

# MATERIEL ET METHODES

## **1- Type et période d'étude:**

Il s'agit d'une étude prospective réalisée durant le mois de mai 2014. Elle a concerné l'étude de la qualité microbiologique des crèmes glacées prêtes à être consommées.

## **2- Lieu de prélèvements:**

Les prélèvements ont été réalisés dans différents crémeries de la région de Fès. Le nombre de prélèvement réalisé était de 23.

## **3- Lieu d'étude:**

Les prélèvements réalisés ont été analysés au laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu de Fès (LRDEHM) au niveau de l'unité d'hygiène alimentaire.

## **4- Prélèvements, acheminement, transport et réception des échantillons au laboratoire :**



Les prélèvements ont été effectués aseptiquement dans des sachets stériles par les techniciens d'hygiène du milieu dépendant du Ministère de la santé, selon la norme (NM03.7.059).

Les échantillons prélevés ont été acheminés immédiatement au LRDEHM, dans une glacière maintenue à une température de  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Un contrôle qualité des échantillons reçus a été fait systématiquement au laboratoire avant d'être analysés, il englobait :

- La mesure de la  $T^{\circ}$  de la glacière,
- L'identification des échantillons,
- L'heure de prélèvement,
- Le délai de transport,
- La conformité du prélèvement, etc.,...

**N.B** : Les échantillons ne répondant pas aux conditions et consignes de prélèvement et d'acheminement ne sont pas analysés. Toute non-conformité détectée est enregistrée puis mentionnée au responsable du prélèvement afin que des actions d'amélioration puissent avoir lieu.

## **5- Analyse de la qualité bactériologique des crèmes glacées :**

### **A- Matériel, équipements et consommables utilisés:**

Le matériel nécessaire pour le contrôle de l'analyse de la qualité bactériologique des crèmes glacées comprend :

- Matériel de stérilisation: autoclave ( $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) et four pasteur ( $175\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) ;
- Matériel de prélèvement: ciseaux, pinces et spatule ;
- Matériel d'homogénéisation: Stomacher, vortex ;
- Matériel d'incubation: Etuves ( $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) ;
- Matériel pour préparation et conservation de milieux de culture : balance, bain-marie, réfrigérateur réglé à  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  ;

Matériel de mesure: pipettes stériles, pro- pipette et balance analytique;

Milieux de culture : PCA, EPT, VBRL, BP, RP, HK, BHI, DNase et Kligler ;

- Réactifs pour identification : test catalase, plasma de lapin, urée, Kovacs, disques oxydase, disque ONPG;
- Divers : Éthanol 70 % pour flambage, becs bunsen, boîtes de pétries, compteur des colonies, tubes et flacons stériles, anses,...

**N.B** : - La composition des milieux de culture est décrite en **annexe B**.

### **B- Méthode d'interprétation :**



L'analyse des crèmes glacées été réalisée selon le circulaire conjoint N° 3 du 3-12-84. Les microorganismes dénombrés ou recherchés étaient essentiellement :

- La flore mésophile aérobies totale (FMAT), **(NM 08.0.102)**
- Les coliformes totaux (CT), **(NM 08.0.115)**
- Les *Staphylococcus aureus*, **(NM 08.01.104, ISO 6888(2004))**
- Les *Salmonella*. **(NM 08.0.116(2004))**.

Une schématisation des techniques utilisées est illustrée en **annexe A**.

## **1-Préparation des échantillons d'aliments pour analyse microbiologique**

### **a- Solution mere (SM)**

La préparation de la solution mère consiste à peser aseptiquement dans un sachet stérile 25 g de l'échantillon, le mélanger ensuite avec une quantité neuf fois égale à celle de l'eau peptonée tamponnée (EPT) (soit 225ml) et enfin souder le sachet en flambant son bord légèrement à la chaleur.

**N.B:** Il est important de prélever au minimum à 4 ou 5 endroits dans l'échantillon afin d'obtenir la représentativité.

### **b- Dilutions décimales subséquentes**

#### **❖ Principe:**

La préparation de dilutions décimales a lieu si nécessaire, en vue de réduire le nombre de micro-organismes par unité de volume pour permettre, après incubation, d'observer leur éventuel développement (cas des tubes) ou effectuer le dénombrement des colonies (cas des boites de pétri).

#### **❖ Protocole:**

Transvaser, à l'aide d'une pipette stérile 1ml de la SM dans un tube de 9 ml de l'eau physiologique stérile. Mélanger le tout avec un agitateur mécanique (vortex).

Cette opération est répétée sur les dilutions décimales allant de  $10^{-2}$  à  $10^{-4}$ , en utilisant à chaque dilution une nouvelle pipette stérile.

## **2-Broyage et homogénéisation**

L'utilisation d'un homogénéisateur de type péristaltique (Stomacher) est préconisée. Les microorganismes seront délogés de l'échantillon par de forts jets de liquide et par l'écrasement de l'aliment. Habituellement, l'aliment devrait être homogénéisé pour une période d'une minute et demie jusqu'à 2 minutes.

## **3-Ensemencement**



Les échantillons sont ensemencés en profondeur ou en surface selon les flores recherchées et ceci en respectant les normes préconisées pour chaque germe recherché. Le **tableau 2** montre un résumé des méthodes d'analyses utilisées.

**Tableau 2 : Résumé des méthodes d'analyse bactériologique utilisées.**

Paramètre microbiologique	Volume d'inoculum	Milieu d'ensemencement	Méthode d'ensemencement	Condition d'incubation
FMAT	1ml	PCA	En profondeur	30±1°C/ 24h
CT	1ml	VBRL	En profondeur	30±1°C/ 24h
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1ml	Baird Parker	Par étalement	37±1°C/24h
<i>Salmonella</i> (*)	0,1ml de la culture de PE	Rappaport	Transfert dans un tube de 10ml	44±0,5°C/24h
	50µl	Hektoen	Epuisement du bouillon sélectif sur le milieu HK	37±1°C/24h

**N.B :** (\*) signifie qu'un 1<sup>er</sup> enrichissement des *Salmonella* est réalisé en incubant la solution mère préalablement préparée 37±1°C/24h±3h.

#### 4-Dénombrement et identification des germes

##### 4-a- Dénombrement des germes totaux (FMAT)

Le dénombrement des germes totaux inclut toutes les cellules végétatives et les spores de bactéries, les levures et les moisissures qui peuvent pousser à une température donnée sur ou dans un milieu de culture donné.

Des micro-organismes strictement mésophiles ont une température optimale de 30-37°C. Leur dénombrement est déterminé sur un milieu Plate Count Agar (PCA), milieu nutritif sans inhibiteurs dans le but de favoriser le développement à 30°C/24h de tous les germes.

Aseptiquement, on transfère 1ml de SM dans les boîtes de pétrie stériles à l'aide d'une pipette stérile, on répète l'opération avec d'autres dilutions s'il le faut. On coule dans chaque boîte de pétri environ 15ml de PCA préalablement préparé, fondu et refroidi à l'étuve à une T° de 45±1°C, on mélange soigneusement l'inoculum, on laisse solidifier puis on incube à 30±1°C pendant 21h±3h.

Après le temps d'incubation, on compte les colonies pour chaque boîte, les résultats sont exprimés en UFC/ml ou par g. (NM 08.0.102).



Gélose PCA avant incubation



Gélose PCA après incubation

#### 4-b- Dénombrement des coliformes totaux(CT)

On transfère dans une boîte de pétri stérile 1ml de la SM à l'aide de pipette stérile, puis on coule dans la boîte du milieu VBRL préalablement refroidie. On mélange soigneusement l'inoculum, puis on incube à  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant  $21\text{h}\pm 3\text{h}$  après solidification.

Après incubation à  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ , l'apparition de colonies rouges brique sur un milieu de culture lactosé sélectif et différentiel avec production d'acide indique la présence de coliformes totaux (NM 08.0.115).



Milieu VBRL avant incubation



Milieu VBRL après incubation

#### 4-c- Dénombrement de *Staphylococcus aureus*

Toujours près de la flamme, on transfère à l'aide d'une pipette stérile 0,1 ml de la suspension mère (dilution  $10^{-1}$ ) à la surface de boîte de milieu sélectif gélosé (BP). On répète l'opération avec la dilution  $10^{-2}$  et les dilutions suivantes si nécessaire.

On étale soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à la surface du milieu gélosé (BP) puis on incube à  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durant 24 à 48 h $\pm 3\text{h}$ .

#### $\alpha$ -Lecture

Les colonies caractéristiques de *Staphylococcus aureus* sont noires, brillantes et convexes (1 à 1,5 mm de diamètre après 24 h d'incubation et 1,5 à 2,5 mm de diamètre après 48 h d'incubation) et entourées d'une zone claire qui peut être partiellement opaque. Après 18 à 24 heures d'incubation, peut apparaître dans cette zone claire un anneau opalescent immédiatement au contact des colonies.



**N.B.**: Les colonies non caractéristiques sont semblables en apparence, mais sont dépourvues de zone claire. Les colonies non caractéristiques sont souvent constituées de souches de *Staphylococcus aureus* contaminant les produits laitiers. Elles ne sont pas produites, fréquemment, par les souches de *Staphylococcus aureus* qui contaminent les autres produits.



Gélose sélective BP avant  
Incubation : absence de *St. aureus*.



Gélose sélective BP après incubation :  
Présence de *Staphylococcus aureus*.



### **β-Confirmation**

Pour le test de confirmation et d'après la norme (NM 08.01.104), on choisit 5 colonies caractéristiques.

La confirmation se fait à travers la recherche de la coagulase. Cependant, on peut passer d'abord par le test DNase, ensuite on réalise le test coagulase aux colonies confirmées DNase positive.

#### **β-1- Test DNase :**

##### **❖ Principe**

Le milieu gélose à l'acide désoxyribonucléique permet la recherche de l'ADN des bactéries, et particulièrement celle des *Staphylococcus aureus*.

La révélation se fait par l'acide chlorhydrique (1fois normal) qui, une fois appliqué et laissé pénétrer dans le milieu, les microorganismes positifs à la DNase, comme *Staphylococcus aureus*, sont entourés d'une zone claire d'ADN dépolymérisé, tandis que les parties du milieu plus éloignées de la bande d'ensemencement sont opaques et blanchâtres, sous l'effet de l'ADN polymérisé. Les colonies de microorganismes négatifs à la DNase ne présentent pas de zones plus claires en périphérie des colonies. Si la zone autour de la strie est claire, la souche est DNase (+) ; sinon, elle est DNase (-).

##### **❖ Technique**

A partir d'une culture purifiée identifiée *Staphylococcus*, on ensemence par épuisement le milieu Gélosé à l'acide désoxyribonucléique à l'aide d'une anse à fil droit, on incube à 37°C pendant 24 h.



### ❖ Lecture

Si après addition de l'acide chlorhydrique, la zone autour de la strie est claire, la souche est DNase.



Test DNase negative



Test DNase positive

### β-2-Test coagulase:

#### ❖ Principe

Le plasma de lapin est un milieu idéal pour la recherche de la coagulase libre de *Staphylococcus aureus*. La production de la coagulase permet de différencier les souches de *Staphylococcus aureus* des autres souches (*épidermes*,...)

Les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma le plus souvent au cours des 3 premières heures. Dans certains cas, la coagulation est plus légère et plus tardive, mais la réaction ne doit être considérée comme négative que si le phénomène n'intervient pas après la 24ème heure.

#### ❖ Technique

Après une étape d'enrichissement sur milieu BHI de l'inoculum de *Staphylococcus* préalablement identifié et confirmé DNase+, on prélève 0,5 ml de ce dernier, et on l'ajoute à 0,5 ml du plasma de lapin et on incube à  $37\pm 1^\circ\text{C}$  pendant 24 h.

#### ❖ Lecture

Si la coagulation se produit dans les 24 h, la souche de *Staphylococcus* est coagulase positive.



Aspect du test négatif.



Aspect du test positif.

### 4-d- Recherche des Salmonelles :



La méthodologie employée au LRDEHM permettant d'isoler et identifier la bactérie *Salmonella* dans les aliments est celle préconisée dans la norme (NM 08.0.116). Elle comprend 4 étapes : le pré-enrichissement, l'enrichissement, l'isolement et l'identification (biochimique et par galerie API 20<sup>E</sup>).

#### 4-d-1- Pré-enrichissement en milieu non-sélectif

Il consiste à prélever de façon aseptique, différentes parties de la crème glacée, à l'ensemencer dans l'eau peptonée tamponnée, puis l'incuber à  $37\pm 1^\circ\text{C}$  pendant  $24\text{h}\pm 3\text{h}$

**N.B :** La solution mère préalablement préparée pour le dénombrement de la flore totale, des coliformes, des *Staphylococcus* et des ASR sert pour le pré-enrichissement des *Salmonella*.

#### 4-d- 2 Enrichissement en milieu sélectif

Les cultures de pré-enrichissement sont ensemencées dans un milieu nutritif contenant des agents inhibiteurs actifs sur les germes qui font concurrence à *Salmonella*. Pour cela, on transfère à l'aide d'une pipette stérile 0,1 ml de la culture de pré-enrichissement dans 10 ml de bouillon Rappaport et on incube à  $44\pm 0,5^\circ\text{C}$  pendant  $21\text{h}\pm 3\text{h}$

#### 4-d-3- Culture sur gélose sélective

Les cultures d'enrichissement sélectif sont étalées par stries sur des géloses sélectives qui inhibent la croissance des bactéries concurrentes et permettent un examen visuel des colonies présumées *Salmonella*.

Après  $21\text{h}\pm 3\text{h}$  d'incubation du milieu d'enrichissement à  $44\pm 0,5^\circ\text{C}$ , on ensemence par épuisement à l'aide d'une anse flambée du bouillon sélectif sur une gélose Hektoen de façon à obtenir les colonies bien isolées, on incube la gélose  $37\pm 1^\circ\text{C}$  pendant  $24\text{h}\pm 3\text{h}$ .

#### ❖ Lecture

Sur gélose HK : Les colonies typiques de *Salmonella* ont une coloration bleu-vert avec ou sans centre noir. Celui-ci peut s'élargir et rendre la colonie complètement noire. Certaines souches atypiques produisent des colonies jaunes avec ou sans centre noir.

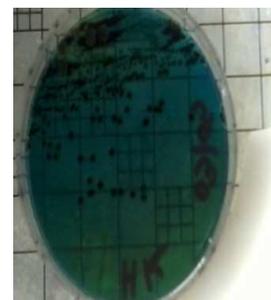
**N.B :** Après  $21\text{h}\pm 3\text{h}$  d'incubation s'il n'y a pas de colonies indiquant la présence de *Salmonella* sur la gélose Hektoen, on peut ré-incuber les boîtes pendant  $24\text{h}\pm 3\text{h}$  de plus.



Gélose Hektoen



Gélose Hektoen



Gélose Hektoen



Avant incubation  
incubation

Après incubation

Absence de *Salmonella*



Après

Suspicion de *Salmonella*

#### 4-d- 4- Identification :

##### 5-d-4-1- Identification par galerie classique

Préalablement à l'identification complète, la colonie suspecte peut être soumise à des tests d'orientation de diagnostic miniaturisés ou à quelques tests d'identification appartenant à la galerie classique d'identification afin de s'assurer son appartenance aux Entérobactéries. Dans cas, il peut s'avérer nécessaire d'ensemencer les milieux et réactifs suivants: Kligler-Hajna, urée indole, réactif pour la recherche de la  $\beta$ -galactosidase.

##### a- Milieu Kligler-Hajna

Ce milieu est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des *Enterobacteriaceae*.

##### ❖ Principe

Il s'agit d'un milieu différentiel de couleur rouge qui permet de confirmer la fermentation du glucose et du lactose, la production de gaz, et aussi la réduction des composés soufrés qui se traduit par la production de  $H_2S$ . Comme les milieux contiennent des sels de fer, la production de  $H_2S$  est révélée par la formation du sulfure métallique de couleur noire.

##### ❖ Technique

Avec les colonies sélectionnées et après purification éventuelle sur gélose nutritive, on ensemence la pente du milieu en stries serrées et parallèles et le culot par piqûre profonde, puis on incube à  $37\pm 1^\circ C$  pendant  $24h\pm 3h$ .

##### ❖ Lecture

- Si la souche fermente le lactose, la surface inclinée vire au jaune. Sinon, sa couleur reste inchangée.
- Si la souche fermente le glucose, le culot vire au jaune. Sinon, sa couleur reste inchangée.
- Si la souche produit l' $H_2S$ , il se produit un noircissement de la zone joignant le culot à la pente.

Les cultures typiques de *Salmonella* correspondent à une pente alcaline (rouge) et un culot acide (jaune), avec formation de gaz, et avec (dans environ 90 % de cas) formation de sulfure d'hydrogène (noircissement de la gélose).



Milieu Kligler Avant  
incubation

Milieu Kligler  
Après incubation (1)

Milieu Kligler  
Après incubation (2)

(1) Pente rouge et culot jaune ; (2) : Pente rouge , culot jaune et formation d' $H_2S$

### b- Test Uréase:

#### ❖ Principe

Il se fait sur milieu urée tryptophane, appelé improprement milieu Urée Indole. Le milieu Urée Tryptophane est un milieu synthétique (milieu dont la composition est connue exactement tant qualitativement que quantitativement). C'est un milieu complexe qui permet de rechercher l'Uréase et l'indole, utiles à l'identification de nombreuses bactéries notamment parmi les *Enterobacteriaceae*.

Les bactéries Uréase (+) hydrolysent l'urée en ammoniacque, qui fait varier l'indicateur de pH, entraînant un changement de la couleur du milieu, ainsi il devient alcalin par formation de carbonate d'ammonium, et vire au rouge violacé, alors qu'il était jaune orange.

#### ❖ Technique

On ensemence le milieu urée avec l'isolat purifié sur milieu gélosé, puis on incube à  $37 \pm 1^\circ C$  pendant 18 à 24 h.

#### ❖ Lecture

L'apparition d'une couleur rouge traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée et formation de carbonate d'ammonium, la bactérie est Uréase positive.



La persistance de la couleur orange montre qu'il n'y a pas eu d'alcalinisation, la bactérie est Uréase négative.



Test Uréase négatif



Test Uréase positif

**N.B** : Si l'Uréase est négative, on passe au test indole

### c- Test Indole:

#### ❖ Principe

Après addition du réactif de Kovacs, le diméthyle-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole produit par l'activité du tryptophane, et produit un anneau rouge à la partie supérieure du milieu urée-indole préalablement ensemencé.

#### ❖ Technique

Ajouter une goutte de Kovacs au milieu Urée-indole préalablement ensemencé

#### ❖ Lecture

Si formation d'un anneau rouge : indole positif

Si absence d'un anneau rouge : indole négatif



Test indole négatif



Test indole positif

### d- Test ONPG (Orthonitrophényl -D-Galactopyranoside):



### ❖ Principe

Le terme ONPG hydrolase est plus propre que celui de D-galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose.

En effet, il existe des germes qui reconnaissent l'ONPG du côté nitro-2-phénol et non celui du D-galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase sans fermenter le lactose. Le test à l'ONPG est une technique basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'Ortho-Nitrophényl-D Galactopyranoside, ou le 2-naphtol-D-galactopyranoside. Ceux-ci sont utilisés comme substrat et libèrent respectivement l'orthonitrophénol (jaune) et le b-naphtol.

### ❖ Technique

A partir d'une culture purifiée de bacille Gram négatif et oxydase négative, nous avons réalisé une suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile, puis nous avons ajouté un disque imprégné d'ONPG.

### ❖ Lecture

Une réaction positive se traduit par un virage du milieu au jaune



Test ONPG Négatif



Test ONPG positif

#### 4-d-4-2- Identification par API 20<sup>E</sup>

Si les tests d'orientation sont ceux de *Salmonella*, on passe à l'identification par l'API 20<sup>E</sup>.

#### ✓ Galerie API 20<sup>E</sup>

C'est une galerie de 20 micro-tubes prêts à l'emploi permettant de réaliser 23 tests biochimiques afin d'identifier des bacilles Gram – appartenant à la famille des *ENTEROBACTERIACEAE*.

#### 5-Interprétation des résultats

La conformité des échantillons analysés est effectuée selon le circulaire conjoint N° 3 du 3-12-84.

#### 6- Outil d'analyse

La saisie et le traitement des données ont été faits à l'aide du programme Excel.

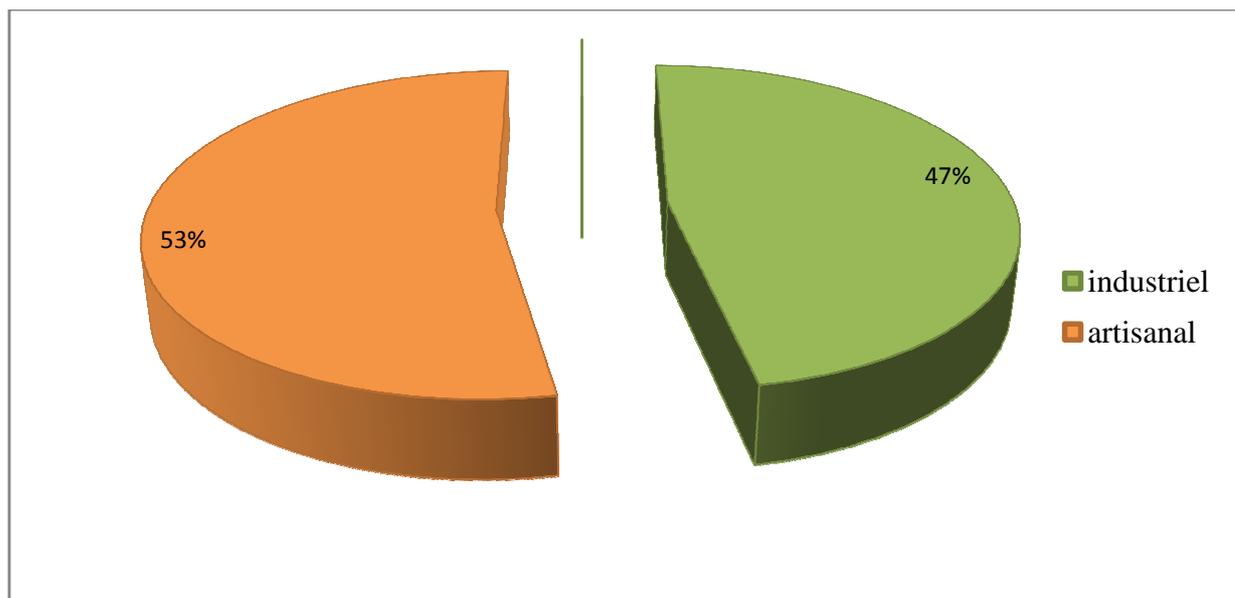


# RESULTATS

Au cours de notre étude, nous avons réalisé le contrôle hygiénique des échantillons de glaces reçus au laboratoire régional d'épidémiologie et d'hygiène de milieu (LRDEHM).

## 5- Répartition des échantillons de crèmes glacées analysés par catégories

Le nombre d'échantillons analysés était de 23. Leur répartition par catégorie est montrée dans La figure suivante :

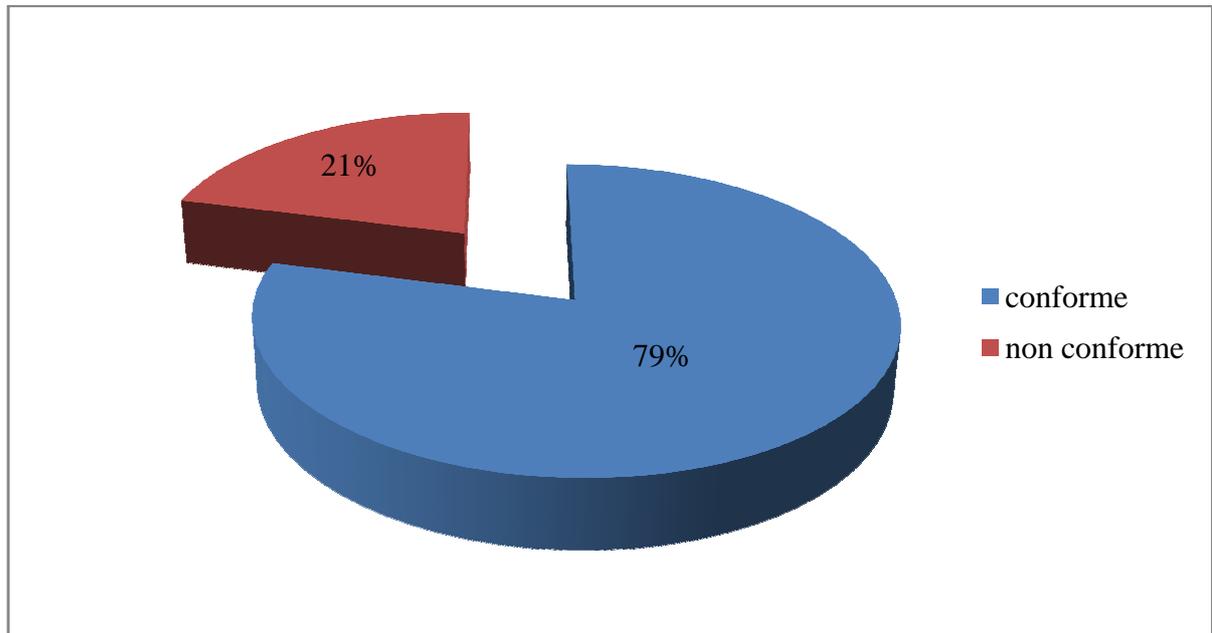


**Figure 4 : Répartition des échantillons analysés par catégorie.**

Sur un total de 23 échantillons, 47% des produits glacées analysés étaient issus de fabrication industrielle et 53% de fabrication artisanale.

## 6- Pourcentage de non-conformité globale

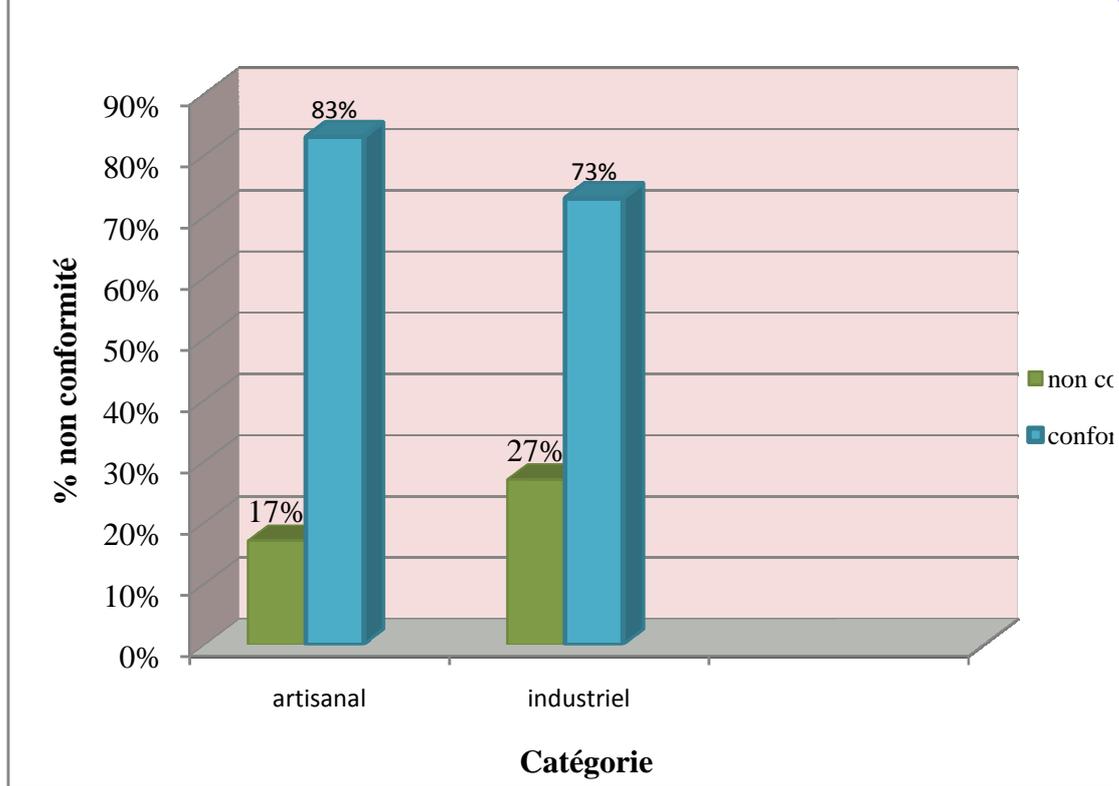
Comme le montre la figure 5, on constate que sur 23 échantillons de glaces analysées, la non-conformité a été notée dans 5 cas, soit un pourcentage de non-conformité de l'ordre de 21%.



**Figure 5:** pourcentage de la non-conformité globale.

#### 7- Pourcentage de non-conformité par catégorie de glaces

Comme illustré en figure 6, nous avons noté une non-conformité plus élevée dans le cas des glaces industrielles (% de N.C : 27%) que dans les glaces artisanales (% de N.C :17%).

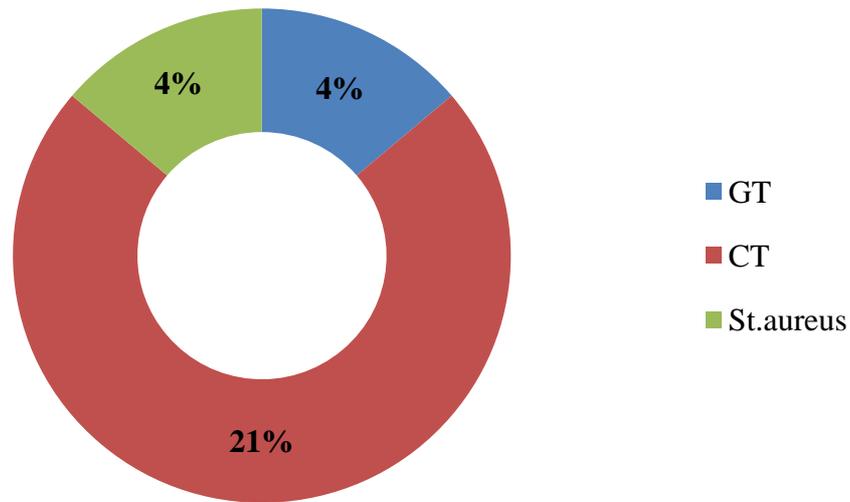


**Figure 6: Répartition de la non-conformité par catégorie de crèmes glacées.**

#### 8- Distribution de la positivité des germes

Les germes responsables de la non-conformité des glaces sont montrés dans la figure 7. On remarque que la contamination par les coliformes totaux est la plus dominante (21%), alors que les germes totaux et les *Staphylococcus aureus* n'ont été responsables que de 4% de non-conformité.

L'absence de Salmonelle a été notée dans tous les échantillons.

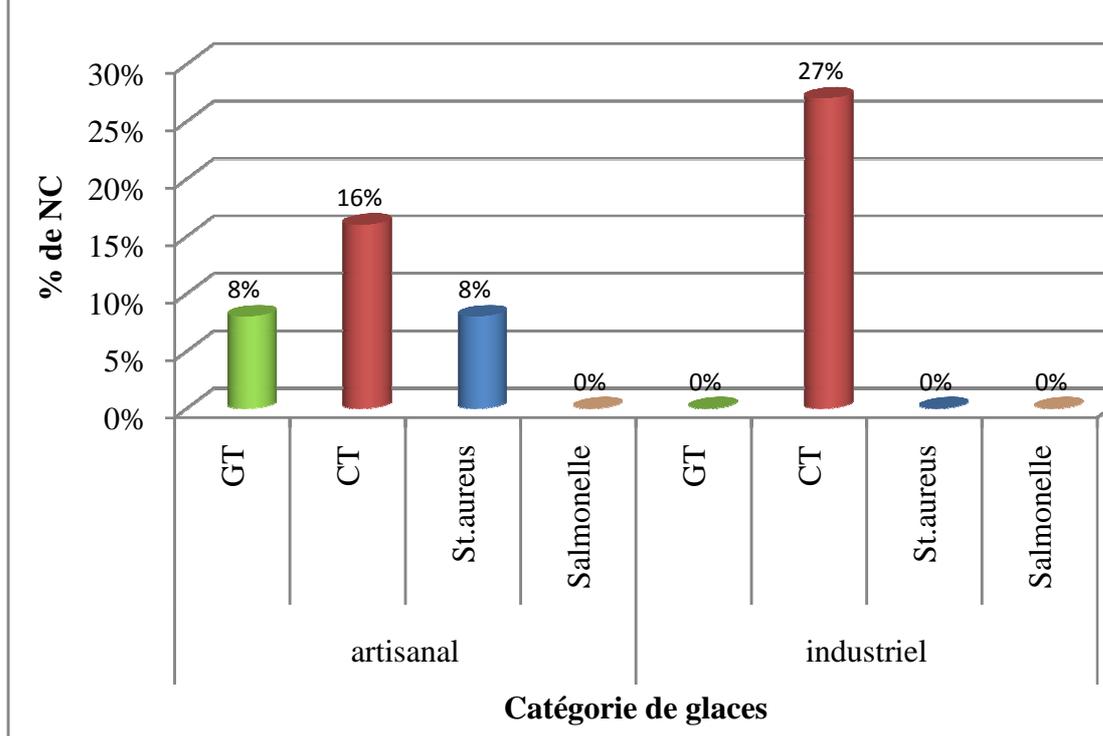


**Figure 7 : distribution de la positivité des germes.**

#### **9- Répartition de la non-conformité par germe et par catégorie**

Comme montré dans la figure 8, nous avons remarqué que la non-conformité des produits traditionnels a été causée par les germes totaux et les staphylocoques (8%), les coliformes totaux (16%), alors que celle des glaces industrielles n'a été causée que par les coliformes totaux (27%).

La contamination par les germes pathogènes (*St. aureus*) a été remarquée seulement dans les glaces traditionnelles. Le % de N.C est de 8%.



**Figure8 :** Répartition de la non-conformité par germes et par catégories des glaces.



# Discussion

La surveillance de la qualité hygiénique des crèmes glacées est une nécessité afin de garantir leur innocuité et prévenir la survenue de toxi-intoxications collectives (**EL OUALI ALAMI. A et al. (2010)**).

Cette étude a été réalisée au LRDEHM dans le but d'évaluer la qualité hygiénique des crèmes glacées. Les échantillons étaient au nombre de **23**, dont **11** sont issus de la catégorie industrielle et **12** de la catégorie artisanale.

La non-conformité globale a été constatée dans 5 échantillons, soit un pourcentage de **21%**.

Ce pourcentage est faible par rapport au résultat de l'étude réalisée par **S. L. Kruiy, et al.**, à la ville de Phnom Penh durant la période (**avril 1996 – 1997**) et qui avait noté un pourcentage de contamination de l'ordre de 50%.

La non-conformité des crèmes glacées industrielles est plus élevée (27%) que celle des glaces artisanales (17%). Ce résultat ne concorde pas à celui noté par **EL OULI ALAMI .A et al**, en **2010**, qui avaient révélé que 83% des glaces artisanales analysées étaient impropres à la consommation, et l'absence totale de souillure dans les glaces industrielles.

La non-conformité des crèmes glacées pourrait être liée à un défaut d'hygiène des ustensiles de manipulation lors de la fabrication, au manque de maintenance de la chaîne du froid et de la conservation des produits finis, au manque d'hygiène du personnel au cours des manipulations. En outre, le non-respect de la température de pasteurisation lors de la fabrication des crèmes glacées industrielles à base de lait, pourrait contribuer à leur contamination (**MÉMENTO TECHNIQUE N° 2 7 BONNES PRATIQUES— VENTE DE GLACES (2011)**).

21% des échantillons de crèmes glacées industrielles ont été contaminés par des coliformes totaux. Cette non-conformité pourrait être liée aux non-respect des bonnes conditions d'hygiène de fabrication, à la qualité de l'eau de rinçage et de désinfection des instruments (**MÉMENTO TECHNIQUE N° 2 7 BONNES PRATIQUES— VENTE DE GLACES (2011)**).

La présence de germes totaux (8%) et de coliformes totaux (16%) dans les produits traditionnels, témoigne de mauvaises pratiques de préparation, de souillures d'origine fécale par des mains sales et de non-respect des bonnes pratiques d'hygiène lors de la préparation et/ou de stockage de ces aliments, au non-respect vestimentaire (coiffe, blouses, gants,...). D'autre part, ces crèmes glacées sont vendues en petites portions à partir de grands récipients



en vrac, qui ont été exposés à l'air libre pour certains commerçants (**Abdelhakim EL OUALI ALAMI et al., (2010)**).

Par rapport au germe pathogène, un seul cas de contamination par *Staphylococcus.aureus* a été détecté, contrairement à d'autres études réalisées, dans d'autres pays : 38% de contamination en Lybie ,32% de contamination en Turquie (**Ojokoh AO (2006)**), et 100% de contamination au Nigeria et en Inde (**Warke R, Kamat A, Kamat M, Thomas P (2000)**).

La présence de *S.aureus* dans les crèmes glacées pourrait résulter d'une contamination du lait à partir de la flore initiale lors de la traite des vaches (**Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA(2006)**). Cette contamination peut être d'origine endogène suite à une excrétion mammaire de l'animal malade, ou d'origine exogène suite à un contact direct avec des troupeaux infectés ou en rapport avec l'environnement (eaux, personnel). L'ensemble des procédés de traitement et de transformation du lait peut freiner la multiplication des germes éventuellement présents ou au contraire favoriser leur développement.

Le personnel qui manipule les glaces peut aussi être une source majeure de cette bactérie pathogène (*S.aureus*) qui se trouve fréquemment dans les fosses nasales, la gorge, les coupures, les abcès et les sécrétions.

Les Salmonelles étant l'agent pathogène le plus fréquemment incriminé dans les toxi-infections alimentaires. Leur recherche est systématiquement réalisée dans toutes les denrées alimentaires. Leur présence est à déclaration obligatoire auprès des services sanitaires quel que soit le type d'aliment. Leur prospection dans nos échantillons de crèmes glacées n'a révélé aucun cas de contamination, contrairement à d'autres études qui ont montré un taux de contamination de 6,8% en Turquie (**Yaman H, Elmali M et al., (2006)**), de 5% en Lybie (**Bettelheim KA (2007)**), de 1% à Venezuela (**Wouafo, 1998**), et de 5% au Cameroun (**Tamsut, 1989**).



# Conclusions, recommandations et perspectives

En guise de notre étude prospective sur 23 échantillons de glaces commercialisées à la ville de Fès, nous pouvons conclure que :

- Le % de la non-conformité globale des échantillons analysés est de **21%**.
- Les niveaux de contamination par les coliformes totaux représentent **21%**, et par les germes totaux et *Staphylococcus aureus* (**4%**),
- L'absence totale des Salmonelles ;

La présence des coliformes totaux, notamment dans la catégorie des glaces industrielles témoigne :

- d'une hygiène incorrecte pendant la fabrication des produits glacés
- de l'utilisation des surfaces et des appareils contaminés,
- du non-respect de la température de conservation,
- du manque du respect des bonnes conditions d'hygiène par le personnel.

Suite à ce travail, il serait recommandé de renforcer :

L'éducation sanitaire, la promotion de l'hygiène individuelle et de l'hygiène alimentaire. Elles sont essentielles à les intégrer dans les programmes scolaires et dans les séances d'information destinées aux manipulateurs, aux vendeurs et ainsi aux consommateurs afin d'éviter toutes sortes de contamination et ainsi de minimiser les cas d'intoxication par les microorganismes pathogènes.

En perspective, il serait intéressant de :

- Prévenir les contaminations par :



- Le contrôle de l'eau de rinçage et la désinfection des instruments servant à l'extraction manuelle de la glace, juste avant emploi.
  - La maîtrise de la chaîne du froid par un contrôle quotidien des températures des congélateurs, des vitrines et des autres espaces de stockage.
- Assurer une bonne gestion des stocks et conserver une traçabilité.
- Adapter une gestion de sécurité alimentaire basée sur l'analyse des risques-points critiques ou HACCP qui pourrait améliorer la qualité des glaces et crèmes glacées au niveau des restaurants et manufacturées.

## Références bibliographiques

### A

Abdelhakim EL OUALI ALAMI, Sanae BERRADA, Saâd MANIAR, Bouchra OUM OKHTAR (2010) ; Qualité microbiologique des crèmes glacées commercialisées au centre du Maroc et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées.

Anis HADDAD AMAMOU (2009) thèse Pour obtenir le grade de Docteur De L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech) Spécialité : Génie de procédés.

Aoued L, Benlarabi S, Ouammi L, Soulaymani-Bencheikh R (2010) Maladies d'origine Alimentaires Données du centre antipoison du Maroc (1989-2008). Toxicologie 6:7-10  
6. Circulaire conjointe n°3 du 3-12-1984 du ministère d'Agriculture et de la réforme agraire et du ministère de la santé fixant les critères microbiologiques pour les glaces et crèmes glacés.

A. Brisabois( 1 ) , V. Lafarge( 1 ) , A. Brouillaud( 1 ) , M.-L. de Buyser( 1 ) , C. Collette( 1 ) , B. Garin-Bastuji( 2 ) & M.-F. T h o r e, Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe

### B

Bell C, Kyriakides A (1998) *Listeria*: A practical approach to the organism and its control.in foods. Blackie Academic & Professional. London.

Bettelheim KA (2007) the non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. Crit Rev Microbiol 33(1):67-87).

Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA. Transfert de technologie en agriculture (2006). Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et des Pêches Maritime. Maroc).

### C



Chug K (1996) *Salmonella* outbreak from ice cream. *Indian Pediatrics* 33:976–977.

Chug 1996 ; Hennes et al. 1996 ; Djuretic et al. ; 1997 ; Dodhia et al., 1998 ;Daniels et al.,2002).

## D

Dossier cedus avec la collaboration de l'université Reims : proph mathlouthi, MC Barbara Roge.

De Buyser M.L. (1996). - Les staphylocoques. *In* Microbiologie alimentaire, Tome 1 (C. Bourgeois & J.F. Mescle, édit.). Technique et documentation, Lavoisier, Paris, 106-119.

D'Aoust J.V. (1989). - *Salmonella*. *In* Food borne bacterial pathogens (M.P. Doyle, edit.). Marcel Dekker Inc., New York, 327-445.

Doyle M.P. & Cliver D.O. (1990). - *Salmonella*. *In* Food borne diseases. Académique Press Inc., 11, 185-204.

Daniels NA, Mackinnon L, Rowe SM et al (2002) Food borne disease outbreaks in United.

## J

Jean-Luc BOUTONNIER : Professeur à l'École nationale des industries du lait et des biotechnologies (ENILBIO) de Poligny : Crèmes glacées, glaces et sorbets ; formulation et fabrication.

## L

Le Minor L. (1989). - *Salmonella*. *In* Bactériologie médicale (L. Le Minor & M. Véron, édit.). Flammarion, Paris, 411-425.

Lovett J. (1989). - *Listeria monocytogenes*. *In* Food borne bacterial pathogens (M.P. Doyle, edit.). Marcel Dekker Inc., New York, 288-310. 54. McDonough F.E. & Hargrove R.E. (1968). - Heat resistance.

Larpent J.P. (1995). - Les listérioses, les *Listeria* et les produits alimentaires. *In* Les *Listeria* (J.P. Larpent, édit.). Technique et documentation, Lavoisier, Paris, 41-53.

L'Institut Danone France (association loi 1901).

## M

MÉMENTO TECHNIQUE N° 2 7 BONNES PRATIQUES— VENTE DE GLACES (2011).

## N



**NM 08.0.116(2004).** Recherche de salmonella.

**NM 08.0.102.**Dénombrement des colonies par comptage de colonies obtenues à 30°C.

**NM 08.01.104, ISO 6888(2004).** Directives générales pour le dénombrement de *Staphylococcus aureus*.

**NM 08.0.115.** Dénombrements des coliformes totaux par comptage des colonies à 30°C.

## O

Ojokoh AO (2006) Microbiological Examination of Ice Cream Sold in Akure. Pakistan Journal of Nutrition 5(6): 536-8.

Ordonnance du DFI sur les sucres, les denrées alimentaires sucrées et les produits à base de cacao ; Chapitre 5 Glace comestible, art. 22-30 (23 novembre 2005).

## R

Rapport de la Direction de l'épidémiologie et de la Lutte Contre les Maladies, 2002.

## S

Société Suisse de Nutrition. Dossier : Voici venir l'été – Le temps des glaces En ligne. Consulté le 8 janvier 2013. Disponible : <http://www.sge-ssn.ch/fr/meta/newsletter/archives-2012/juin-2012/>

Société Suisse de Nutrition(2011). La pyramide alimentaire suisse, Recommandations alimentaires pour Adultes, alliant plaisir et équilibre Brochure. SSN: Berne.

See linger H.P.R. & Jones D. (1986). - *Listeria*. In Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2 (P.H.A. Sneath, edit.). Williams & Wilkins, Baltimore, 1235-1245.  
84. Sinha R.N. (1994). - *Mycobacterium bovis*. In The significance.

Stanley D. W., Goff H. D. & Smith A. K. (1996). Texture-structure relationships in foamed dairy. Emulsions. *Food Research International*, Vol. 29, No. 1, p. 1-13.

## T

Toussaint-Samat, M (1987). Histoire naturelle et morale de la nourriture. Paris: Bordas.



V

Vierling E. (2008) Aliments et boissons. Filières et produits. 3 éd. Paris: Doin Editions

W

Warke R, Kamat A, Kamat M, Thomas P (2000) Incidence of pathogenic psychrotrophs in ice creams sold in some retail outlets in Mumbai, India. *Food Control* 11:77-83).

Windrantz P, Arias ML (2000) Evaluation of the bacteriological quality of ice cream sold at San Jose, Costa Rica *Archivos Lation americanos de Nutricion* 50:301-3. 9.

Wouafo MN, Nijine T, Tailiez R (1998) Hygiene and microbiological quality of ice cream produced in Cameroon: A problem of public health. *Bulletin De la Société de pathologie Exotique* 89(5): 58-362).

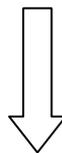
Y

Yaman H, Elmali M, Ulukanli Z, Tuzcu M, Genctav K (2006) : Microbial quality of ice Cream sold openly by retail outlets in Turkey. *Revue Med V et* 157(10):457-462).

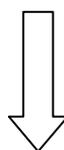
## Annexe A : Fiche technique

**Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (NM 08.0.102)**

1ml de dilution décimale (10<sup>-1</sup>) d'aliment

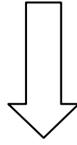


Boite de pétri stérile

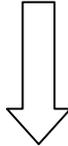




Couler 15ml de Gélose PCA



Mélanger l'inoculum et laisser solidifier

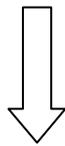


Incuber les boites retournées à «37°C pdt 24h

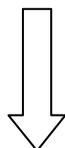
## **Annexe A : Fiche technique (suite)**

**Dénombrement des coliformes totaux et fécaux (NM 08.01.124)**

1ml de dilution décimale (10<sup>-1</sup>) d'aliment

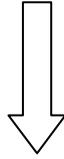


Boites de pétri stériles

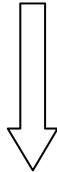




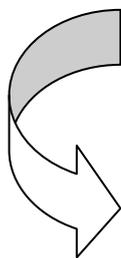
Couler 15ml de Desoxycholate Lactose



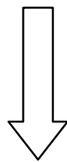
Mélanger l'inoculum au milieu et laisser solidifier



Incuber les boites retournées pdt 24h+/-2h



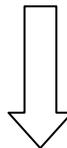
37°C pour les CT



44°C pour les CF



Compter les colonies rouge briques d'un diamètre de 5mm



Exprimer les résultats en UFC/ml

## **Annexe A : Fiche technique (suite)**

**Dénombrement des Staphylocoques pathogènes : (NM 08 .01.104)**

0,1 ml de dilution décimale  $10^{-1}$  d'aliment



Etalement



Boites de pétri contenant le milieu gélosé Braid –Parker



---

Faculté des sciences et techniques – Fès  
B.P.2427-Route d'Imouzzar-FES



Incuber à 37°C pdt 24h



Retenir pour conformation les colonies noires, brillantes et convexes entourées d'une zone Claire et d'un anneau opaque.



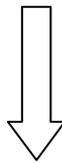
Ensemencement en tube de bouillon cœur cerveau (BHI)



Ajouter stérilisation 0,1 ml de chaque culture à 0,3 ml de plasma de lapin



La coagulase est positive pdt le coagulase occupe plus de  $\frac{3}{4}$  de volume



Exprimer les résultats par UFC/ml

## **Annexe A : Fiche technique (suite)**

**Recherche des Salmonelles : (NM 08.1.116)**

**Etape1 :Pré-enrichissement**

25ml de boisson + 225 ml d'eau peptonée tamponnée



Incubation à 37°C pdt 24h

**Etape2 : Enrichissement sélectif**



---

Faculté des sciences et techniques – Fès  
B.P.2427-Route d'Imouzzar-FES



0,1ml de culture +10ml de bouillon Rappaport Vassiliadis



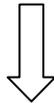
Incubation à 44°C pdt 24h

**Etape3 : Isolement**

Isolement sur milieu Hektoen



Incubation à 37°C pdt 24h



Colonies à centre noir

**Etape4 : Identification**

Galerie biochimique



Confirmation sérologique



Présence ou absence de Salmonelle dans 25ml

## Annexe B : Composition des milieux de culture

**NB** :La composition des milieux est en gramme par litre d'eau distillée.

### *Milieu : PCA*

Pastone	5,00
Extrait de levure	2,50
Glucose	1,00



Agar	15,00
------	-------

***Gélose lactose au Desoxycholate 0.1% :***

Peptone	10
Lactose	10
Citrate de sodium	1
Rouge neutre	0,03
Desoxycholate de sodium	1
Chlorure de sodium	15
Agar agar bactériologique	13
Eau distillée	1litre

***Gélose Braid-Parker(BR) :***

Bio-Trypcase	10
Extrait de viande de bœuf	55
Extrait de levure	2
Chlorure de lithium	5
Pyruvate de sodium	10
Glycocolle	12
Tellurite de potassium	1ml
Emulsion de jaune d'œuf à 10%	1ml
Agar	15

***Milieu Hajna-Kligler :***

Extrait de viande de bœuf	3
Extrait de levure	3
Peptone (riche en lysine)	20
NaCl	5
Citrate ferrique	0,3
Thiosulfate de sodium	10
Lactose	1
Glucose	5
Rouge de phénol	5ml
Agar	12
Eau distillée	1L

***Milieu EMB :***

Peptone bactériologique	10
Lactose	10



Eosine	0,4
Bleu de méthylène	0,0065
Phosphate dipotassique	2
Agar	1L

### Milieu Gélose Hektoen :

Protéose peptone	12
Extrait e levure	3
Chlorure de sodium	5
Thiosulfate de sodium	5
Sels biliaires	9
Citrate de fer III et d'ammonium	1,5
Salicine	2
Lactose	12
Saccharose	12
Fushine acide	0,1
Bleu de bromothymol	0,065
Agar	14
Eau distillée	1000ml

### Milieu Bouillon cœur-cervelle(BHC) :

Protéose-peptone	10,0
Infusion de cervelle de veau	12,5
Infusion de cœur de bœuf	5,0
Glucose	2,0
Chlorure de sodium	5,0
Hydrogénophosphate d sodium	2,5
ph=7,4	

### Milieu Urée- Indole :

L-tryptophane	0,3
Ethanol	1ml
Rouge de phénol	0,25
Dihydrogénophosphate de potassium	0,1
Urée	2
Chlorure de sodium	0,5
Hydrogénophosphate de potassium	0,1



*Milieu Gélose nutritive :*

Peptone pancréatique d'organe	10
Extrait de viande	10
Chlorure de sodium	5
Agar	20

*Milieu Rappaport Vissiliadis :*

Peptone e soja	4,5
Vert de malachite	0,04
Chlorure de sodium	7,2
Dihydrogénophosphate sodium	1,5
Chlorure de magnésium	37,3

*Eau peptonée tamponné :*

Peptone	10
Chlorure de sodium	5
Eau distillée	1L