

MODULE MIL SESSION 2017

**ANALYSES DES MIELS ET DES PRODUITS DE LA
RUCHE**

MICROBIOLOGIE BIOTECHNOLOGIE

ETUDE 1 ANALYSE DES MIELS POUR REpondre A DES QUESTIONS DE QUALITE DU PRODUIT AGROALIMENTAIRE.

DEGUSTATION DES MIELS

CHIMIE DU MIEL

MICROBIOLOGIE DU MIEL

ANALYSES POLLINIQUES

ETUDE 2 ANALYSES SUR LES PRODUITS DE LA RUCHE POUR REpondre AUX QUESTIONS DES EFFETS INHIBITEURS DES PRODUITS DE LA RUCHE

MICROBIOLOGIE DE LA PROPOLIS

MICROBIOLOGIE DE LA GELEE ROYALE

MICROBIOLOGIE DU MIEL

ETUDE 3 ANALYSES DES HMF DE LA GELEE ROYALE POUR DETERMINER LA QUALITE DU PRODUIT ET VOIR SI NOUS AVONS UNE CORRELATION AVEC LES EFFETS INHIBITEURS.

THEME 1

LA QUALITE DES MIELS :

**DEGUSTATION DES MIELS
CHIMIE DES MIELS
MICROBIOLOGIE DES MIELS**

Introduction

Question : Je peux commercialiser le miel si

L'étiquetage du miel est conforme à la législation en vigueur.

Il comportera :

- l'origine florale pour les miels mono-floraux
- l'appellation de formation végétale pour les miels multi-floraux (landes, garrigues, maquis, forêts, bocages, prairies, montagne, haute-montagne, cultures, ...) afin de bien qualifier le produit.
- le poids
- le nom et l'adresse de l'apiculteur
- la date de la récolte
- la date de conditionnement
- le numéro du lot de conditionnement
- la date limite d'utilisation ou de consommation (2 ans après le conditionnement du miel)
- l'inscription "produits préservés" attestant l'adhésion à la charte.

Le miel correspond aux Normes.

Le taux d'H.M.F. : 5 hydroxyméthyl – 2 furfural

En pot, le taux maximum admissible est de 40 mg/ kg.

L'H.M.F. provient de la décomposition du fructose en présence d'acide lorsque le miel est conservé longtemps à température ambiante élevée.

Teneur en eau :

Elle ne devra pas dépasser 20 % et du miel de callune (23 %). Le taux d'humidité le plus bas sera un gage de bonne qualité du miel.

Microbiologie :

Les germes mésophiles seront inférieurs à 30 UFC/ g. Il n'y aura pas de germes coliformes fécaux, ni de micro-organismes pathogènes pour l'homme (germes, levures, champignons).

Résidus exogènes :

Aucune Limite Maximale de Résidu (LMR) n'est fixée officiellement pour le miel alimentaire. Toutefois, les experts s'accordent sur une valeur de 3 mg/kg.

Pour le miel à vocation thérapeutique, on ne devra trouver aucun résidu quel qu'il soit.

I/ Dégustation:

I.1 Rappel simple sur les miels et la dégustation Une semaine avant la rencontre avec Monsieur Camus.

I.11 Les arômes.

Les arômes, c'est ce qui nous rappelle l'odeur du gâteau fait par notre grand-mère, c'est la balade dans la garrigue, c'est le lait qu'on boit le matin ou les épices d'un tajine...

Les arômes ce sont des centaines de molécules chimiques qui se trouvent dans les aliments, les objets, les substances qui nous entourent et qui font qu'une orange sent l'orange, que le beurre sent le beurre, que l'herbe fraîche sent...bon, vous avez compris.

On détecte les arômes par le nez qui envoie un signal au cerveau. Ainsi, si vous avez le nez bouché, non seulement, vous ne sentez rien, mais vous ne goûtez rien non plus...tout au plus, les saveurs dont la perception n'est pas la même que les arômes.

La dégustation à la miellerie permettra de s'initier à la découverte des arômes que l'on peut trouver dans les miels. Cf Monsieur Bruno Camus.

I.12 Les saveurs.

Les saveurs sont détectées par les papilles de la langue...

Les plus connues sont : le salé, le sucré, l'acide et l'amer.

Il en existe un 5e, plus difficile à trouver, nommé par un japonais : l'umami. L'umami n'est ni sucré, ni salé, ni acide, ni amer et en même temps, ce sont les 4 saveurs regroupées ensemble...

Pour le miel, on se limitera aux 4 saveurs de base.

I.13 Les textures.

Le miel se présente sous différentes textures : solide, crémeux, liquide. Une quatrième texture existe, mais elle est particulière à un miel : gélatineux pour le miel de callune.

Le miel cristallise naturellement en raison du glucose qu'il contient. A la récolte, tous les miels sont liquides, à l'exception du miel de callune qui est gélatineux. Petit à petit, avec le temps, les miels cristalliseront, à l'exception de ceux qui contiennent beaucoup de fructose, tel que le miel d'acacia qui ne cristallise jamais.

Les miels cristallisent plus ou moins rapidement sans qu'on intervienne et des cristaux plus ou moins gros caractériseront la texture du miel. La grosseur des cristaux dépend de la rapidité de cristallisation qui elle-même dépend de la température, de la flore butinée, de la présence d'impuretés.

Les miels crémeux ont subi un lent malaxage pendant leur cristallisation afin que les liens entre les cristaux soient brisés. Il s'agit d'une technique "mécanique" pratiquée par les apiculteurs pour répondre à la demande des consommateurs et rendre le miel plus agréable à tartiner.

Les apiculteurs peuvent aussi choisir de **diriger la cristallisation du miel, afin que les cristaux soient fins, agréables et fondants en bouche.** Cette technique consiste à "ensemencer" le miel récolté avec une petite quantité d'un miel ayant une texture adéquate, c'est-à-dire le plus souvent lorsque la texture est fine et peu granuleuse. Les cristaux se formeront selon le "modèle" des cristaux du miel préalablement incorporé. Cette technique n'influence pas le goût du miel et a pour but d'en améliorer les qualités sensorielles.

Ces techniques sont connues des apiculteurs et font l'objet de formations pour en améliorer la maîtrise.

I.2 DEGUSTATION SUR LES MIELS DE MONSIEUR CAMUS.

Noter les paramètres de la salle de dégustation.

**Luminosité
Température
Humidité
Place
Etat personnel**

Avec l'aide de la grille de dégustation, établir les caractéristiques organoleptiques du miel.

II CHIMIE

Cf dossier de Monsieur Carle

III Microbiologie du miel

Dénombrements microbiens et numérations.

Les microorganismes présents dans le miel sont essentiellement des levures et des bactéries sporulantes. Les formes végétatives de ces bactéries sont absentes.

Les levures que l'on peut trouver dans le miel sont des levures osmophiles, capables de se multiplier dans des solutions très concentrées en sucre. Elles peuvent être responsables d'une fermentation du miel. Il faut faire le lien avec la partie chimie de l'analyse.

III.1 Effectuer un dénombrement microbien (flore aérobie totale et levures)

Peser 10,0 g de miel dans un sac stomacher. Ajouter 90 mL de diluant (eau distillée **stérile** préalablement chauffée au bain marie 30°C) et effectuer une gamme de dilution jusqu'à 10⁻²

Variante : Faire stériliser des flacons schott bleus avec 90 ml d'eau stérile, puis ajouter 10 g de miel pour la recherche des levures.

III.11 Dénombrement en milieu solide sur milieu PCA et Sabouraud au chloramphenicol:

- Ensemencer en surface 0,1 mL des dilutions 10⁻¹ 10⁻² sur le milieu Sabouraud (Dénombrement levures)
- Ensemencer en surface 0,1mL des dilutions 10⁻¹ 10⁻² sur le milieu PCA (Dénombrement flore aerobie 30°)

Placer à l'étuve à 30°C 72h pour le milieu PCA et 25°C 5 jours pour le milieu Sabouraud

Déterminer le nombre de levures.mL⁻¹ et le nombre de levures.g⁻¹ de miel analysé.

III.12 Dénombrement en cellule Kova

- Ensemencer la cellule avec la solution contenue dans le sac stomacher.
- Déterminer le nombre de levures.μL⁻¹ et en déduire le nombre de levures.mL⁻¹
- Déterminer le nombre de levures.g⁻¹ de miel analysé.

IV Etude des pollens présents dans les miels.

Recherche de pollens dans le miel

IV.1 La méliissopalynologie.

L'identification ne peut se faire que par comparaison de la morphologie et des dimensions des grains de pollens observés avec celles de grains connus qui constituent des références. Celles-ci peuvent être des microphotographies, soit sur papier, soit numérisées : elles constituent une banque de données que l'on peut consulter pour comparaison. Les photographies ne sont utilisables que lorsqu'elles sont de qualité et effectuées selon différents plans, seule façon d'avoir une bonne vision spatiale du pollen. Il est important également de connaître l'échelle de la photographie. Malheureusement beaucoup de documents sont peu exploitables à cause de leur mauvaise qualité.

IV.2 Démarche dans la recherche des pollens

Peser 10 g de miel dans un tube type « falcon » et les dissoudre dans 10mL d'eau distillée **stérile** préalablement chauffée (bain marie 30°C).

Centrifuger à 4000 tr.min⁻¹ pendant 5min. Jeter le surnageant.

Reprendre les culots dans 1mL de KOH 10% et placer dans un tube eppendorf.

Placer dans un bain marie bouillant 10 min. Centrifuger 5 min 4000 tr.min⁻¹ Eliminer le surnageant.

Reprendre le culot dans 100µL de glycérine 30% (colorée à la fuchsine). Centrifuger 5 min 4000 tr.min⁻¹

Reprendre le culot dans 100µL de glycérine 80%.

Prélever une goutte et la déposer délicatement sur une lame de Malassez.

Observer au microscope (X40) prendre des photographies numériques.

Identification des pollens Site :www.pollens.net ALLER DANS « SITE AERE » → PALYNOTHEQUE

THEME 2

EXPERIENCES MICROBIOLOGIQUE SUR LES PRODUITS DE LA RUCHE.

NOTION D'APITHERAPIE

EVALUER LES EFFETS BACTERICIDES ET/OU BACTERIOSTATIQUES

DE LA PROPOLIS,
DE LA GELEE ROYALE
DU MIEL

Utilisé depuis des siècles, le miel, la propolis et la gelée royale sont connus pour leurs vertus nutritives, cicatrisantes, antibactériennes, anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antifongiques ou encore antivirales. Au fil des années, l'Homme a renforcé ses connaissances, d'abord de manière empirique, puis de façon scientifique jusqu'à isoler et développer certaines molécules actives.

De nos jours, ces trois produits de la ruche s'emploient à la fois à l'hôpital (Ex : pansements à base de miel pour les ulcères et les brûlures) mais également en officine.

A la pharmacie, on peut retrouver la gelée royale dans certaines crèmes ou sous différentes formes pour effectuer des cures avant et pendant l'hiver. La propolis, elle, peut être présente dans les pastilles contre les maux de gorge ou en association avec la gelée royale afin de stimuler les défenses immunitaires.

I/ Etude des propriétés antimicrobiennes de la propolis:

La propolis est une matière résineuse âcre d'odeur agréable, que les abeilles prélèvent sur les écorces et bourgeons, et dont elles se servent pour boucher les trous et les fentes de leurs ruches, consolider les rayons, lisser les parois ...

Sa couleur varie du jaune au brun (selon l'origine des résines).

Elle est dure et friable jusqu'à 15° C environ.

Elle devient molle et malléable aux alentours de 30°, puis collante ou gluante.

Elle fond entre 60 et 90° (selon l'origine des résines).

La propolis est insoluble dans l'eau. Chauffée doucement au bain-marie, elle se divise en deux parties bien distinctes: l'une qui tombe au fond du récipient, l'autre liquide qui surnage à la surface qui correspond à la cire de propolis et qui trouve de nombreux usages dans le domaine apicole.

I.1 Mise en évidence des propriétés bactériostatiques, bactéricides de la propolis sur des cultures bactériennes en batch selon 24h (*Staphylococcus aureus*)

Introduction

Le but de la problématique est de démontrer la sensibilité de Staphylococcus aureus en fonction du temps à l'action de la propolis.

I.11 Matériel et méthodes :

Microorganismes : *Staphylococcus aureus*.

Extrait éthanoïque de propolis (EEP) : Solution à 50g.L⁻¹ soit 50% (dans éthanol 70°).

Les essais seront effectués à partir de la **solution mère EEP qui sera diluée** dans les tubes de cultures pour donner une concentration finale à **5%** dans les tubes de cultures du protocole ci-joint.

I.12 Protocole de la manipulation:

a/ Préparation de la suspension bactérienne S de *Staphylococcus aureus* :

A partir d'une boîte de Petri contenant une souche pure de *Staphylococcus aureus* après incubation 18H à 37°C, prélever une colonie dans 5 mL d'eau physiologique **pour effectuer une dilution au 1/100** (soit 90µL dans 9mL d'eau physiologique stérile) afin d'obtenir la suspension S (de l'ordre de 0,5 à 10⁵ UFC.mL⁻¹)

Remarque : Si l'on part d'une souche bactérienne en bouillon BCC incubé 18H à 37°C, Placer 100µL de suspension dans 9 ml de diluant, recommencer l'opération (100µL de suspension dans 9 ml de diluant) La dernière dilution constitue la suspension S

b/ Préparation des 3 tubes de cultures (BCC)

Témoin simple : absence de propolis et d'alcool 70°: témoin : permet de déterminer le dénombrement de la population microbienne au départ de l'expérience.

Témoin avec éthanol: absence de propolis et présence d'alcool 70° permet d'évaluer l'effet désinfectant de l'alcool

Essai à 5% : présence de 5% EEP permet d'évaluer l'effet désinfectant de la propolis en solution alcoolique.

| | Témoin | Témoin Ethanol | EEP |
|------------------------------|--------|----------------|------|
| BCC en mL | 10 | 10 | 10 |
| EEP en µL | | | 1000 |
| Alcool 70° en µL | | 1000 | |
| Suspension bactérienne en µL | 100 | 100 | 100 |

Remarque : Lors de l'ensemencement de la suspension S, il faut démarrer le chronomètre.

c/ Les prélèvements dans les bio réactions

Il faut prélever 1ml dans les tubes témoins et essais

Faire des gammes de dilutions selon les besoins de la réaction

Ensemencer en surface 0,1 mL des tubes ci-dessus sur **gélose Chapman** selon l'explication suivante :

- à H₀=0H dilutions 10⁻² 10⁻³ 10⁻⁴ pour T0 uniquement
- à H₄=4H dilutions 10⁻³ 10⁻⁴ 10⁻⁵ pour Témoin
10⁻¹ 10⁻² 10⁻³ pour Téthanol
10⁻¹ 10⁻² 10⁻³ pour E5%
- à H₆= 6H dilutions 10⁻³ 10⁻⁴ 10⁻⁵ pour Témoin
10⁻¹ 10⁻² 10⁻³ pour Téthanol
10⁻¹ 10⁻² 10⁻³ pour E5%
- à H₂₄= 24H dilutions 10⁻⁴ 10⁻⁵ 10⁻⁶ pour Témoin
10⁻² 10⁻³ 10⁻⁴ pour Téthanol
10⁰ 10⁻¹ 10⁻² pour E5%

Placer les boîtes à l'étuve à 37°C et effectuer le dénombrement en UFC.mL⁻¹

I.13 Expression des Résultats :

| | Dilution | Tube témoin | Tube éthanol | Tube propolis |
|--------------------|-----------|-------------|--------------|---------------|
| Prélèvement 0h | 10^{-2} | | | |
| | 10^{-3} | | | |
| | 10^{-4} | | | |
| Prélèvement 4h | 10^{-1} | | | |
| | 10^{-2} | | | |
| | 10^{-3} | | | |
| | 10^{-4} | | | |
| | 10^{-5} | | | |
| Prélèvement 6h | 10^{-1} | | | |
| | 10^{-2} | | | |
| | 10^{-3} | | | |
| | 10^{-4} | | | |
| | 10^{-5} | | | |
| Prélèvement 24h | 10^0 | | | |
| | 10^{-1} | | | |
| | 10^{-2} | | | |
| | 10^{-3} | | | |
| | 10^{-4} | | | |
| | 10^{-5} | | | |
| | 10^{-6} | | | |

I.14 Expression des résultats

Tracer des courbes pour bien montrer les effets des différents tubes.

I.2 Mise en évidence des propriétés inhibitrices de la propolis sur des souches bactériennes selon la méthode des antibiogrammes.

(*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus epiderminis*)

I.21 Notion d'antibiogramme.

Un **antibiogramme** est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Faire le lien avec le produit testé.

I.22 Protocole

a/ Réaliser cette opération pour *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus epiderminis*. et préparer une boîte de pétri par souche

b/ Séquence :

- A partir d'une boîte de Pétri contenant une souche pure **ayant** incubé 18H à 37°C, transférer une colonie dans 5 mL d'eau physiologique.
- Ensemencer **avec l'écouvillon** toute la surface de la gélose avec 3 la dilution du germe.
- Enlever l'excès en inclinant la boîte et en respirant à la pipette Pasteur.
- **Laisser sécher 15 minutes à 37 °C (boîte légèrement ouverte).**
- Déposer respectivement sur chaque disque buvard 20 µL de propolis et 20 µL d'alcool 70°
Discuter avec l'enseignant pour bien mettre en œuvre.
- Déposer sur la boîte les 2 disques buvards sur une gélose de Mueller Hinton
- Incuber la boîte à 37°C 24H

I.3 Conclusions et perspectives.

Discuter des résultats de l'action de la propolis..

II Etude des effets antimicrobiens de la gelée royale.

Mise en évidence des propriétés inhibitrices de plusieurs échantillons de gelée royale sur des souches bactériennes selon la méthode des antibiogrammes.

(Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus cereus et Staphylococcus epiderminis)

II.1 Consignes de travail et préparation des échantillons :

Il faudra tester 3 gelées royales dans cette séquence : Une gelée royale de l'année, une gelée royale ancienne et une gelée royale chinoise.

Les échantillons seront sous le PSM, il faudra faire un prélèvement de 50mg à l'aide de la petite cuillère pour le transférer dans un tube eppendorf stérile.

Placer les trois tubes eppendorf dans le bain marie à 40 °C pendant 50 minutes.

II.2 Protocole

a/ Réaliser cette opération pour *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus epiderminis*. en préparant une boîte de pétri par souche.

b/ Séquence 1 : (Première méthode)

- A partir d'une boîte de Pétri contenant une souche pure **ayant** incubé 18H à 37°C, transférer une colonie dans 5 mL d'eau physiologique.
- Ensemencer **avec l'écouvillon** toute la surface de la gélose avec la dilution du germe.
- Enlever l'excès en inclinant la boîte et en respirant à la pipette Pasteur.
- **Laisser sécher 15 minutes à 37 °C (boîte légèrement ouverte).**
- Déposer respectivement sur chaque disque buvard 10 µL de gelée royale (3 disques) et 10 µL d'alcool 70°.
- Déposer sur la boîte les 4 disques buvards sur une gélose de Mueller Hinton.

Discuter avec l'enseignant pour bien mettre en œuvre.

- Incuber la boîte à 37°C 24H

c/ Séquence 2 : (deuxième méthode)

- A partir d'une boîte de Pétri contenant une souche pure **ayant** incubé 18H à 37°C, transférer une colonie dans 5 mL d'eau physiologique.
- Ensemencer **avec l'écouvillon** toute la surface de la gélose avec la dilution du germe.
- Enlever l'excès en inclinant la boîte et en respirant à la pipette Pasteur.
- **Laisser sécher 15 minutes à 37 °C (boîte légèrement ouverte).**
- Réaliser sur la boîte 4 trous à l'emporte-pièce, sur une gélose de Mueller Hinton
- Déposer respectivement sur chaque trou 50 µL de gelée royale (3 disques) et 20 µL d'alcool 70°. Discuter avec l'enseignant pour bien mettre en œuvre.
- Incuber la boîte à 37°C 24H

Remarques durant les séquences pour une amélioration de la technique :

I.3 Conclusions et perspectives.

Discuter des résultats de l'action des gelées royales.**Méthode 1 :**

| Diamètre de l'inhibition mm | Gelée Royale récente | Gelée Royale ancienne | Gelée Royale chinoise | Ethanol 70% |
|----------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | | | | |
| <i>Staphylococcus epidermis</i> | | | | |
| <i>Bacillus cereus</i> | | | | |

Méthode 2 :

| Diamètre de l'inhibition mm | Gelée Royale récente | Gelée Royale ancienne | Gelée Royale chinoise | Ethanol 70% |
|----------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | | | | |
| <i>Staphylococcus epidermis</i> | | | | |
| <i>Bacillus cereus</i> | | | | |

III Etude des effets antimicrobiens du miel.

Mise en évidence des propriétés inhibitrices du miel sur des souches bactériennes selon la méthode des antibiogrammes.

(Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus cereus et Staphylococcus epiderminis)

III.1 Consignes de travail et préparation des échantillons :

Faire un prélèvement de miel dans un tube eppendorf stérile.

A partir du tube eppendorf de miel, réaliser une dilution 1/3, une dilution 1/2 et une dilution 3/4

III.2 Protocole

a/ Réaliser cette opération pour *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus epiderminis*. en préparant une boîte de pétri par souche.

b/ Séquence 1 : (Première méthode)

- A partir d'une boîte de Pétri contenant une souche pure **ayant** incubé 18H à 37°C, transférer une colonie dans 5 mL d'eau physiologique.
- ensemencer **en inondant** toute la surface de la gélose avec 3 à 4 mL de la dilution du germe.
- Enlever l'excès en inclinant la boîte et en respirant à la pipette Pasteur.
- **Laisser sécher 15 minutes à 37 °C (boîte légèrement ouverte).**
- Déposer sur la boîte 5 disques buvards contenant une gélose de Mueller Hinton.
- Déposer respectivement sur chaque disque buvard 20 µL de miel (4 échantillons : dilutions 0, 1/3, 1/2 et 3/4) et 20 µL d'alcool 70.
- Incuber la boîte à 37°C 24H

III.3 Conclusions et perspectives.

- **Discuter des résultats de l'action des miels.**

Rapport d'analyse :

Laboratoire d'analyses et d'écologie apicole

Références client :

Produit : Miel

Date de récolte

DLUO

Examen physique et sensorielle

visuel
olfactif
gustatif

Analyses physico-chimiques

Humidité
HMF

Conductivité

pH initiale
Acidité libre
Acidité totale

Chimie des sucres :

glucose
Fructose

Autres sucres

Analyse pollinique

Importance du culot

Nombre de grains pour 10g de miel

Pollens dominants

Pollens minoritaires

Éléments divers

Microbiologie du miel

Nombre de levures

Nombre de bactéries

Effet bactériostatique

Conclusion :

Rapport d'analyse :

Laboratoire d'analyses et d'écologie apicole

Références client :

Produit : Propolis

Date de récolte

DLUO

Effet bactériostatique

Etude 1 :

Nature

Résultat

Etude 1 :

Nature

Résultat

Conclusion :