



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ DE TISSEMSILT
INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du
diplôme de Master Académique en

Filière : **Sciences Biologiques**

Spécialité : **Microbiologie appliqué**

Thème

Caractérisation et isolement des bactéries lactiques à partir des produits de la ruche

Présentée par : Mlle. ZGHARI Chaimaa
Mlle. KETOU Imène

Soutenu le 24/06/2026

Devant le Jury

RABAH Fadlallah Hocine

Président

M.C.B.

Univ-Tissemsilt

SENOUCI Djamel Eddine

Encadrant

M.C.B.

Univ-Tissemsilt

DRIZI Nadjia

Examinatrice

M.A.A.

Univ-Tissemsilt

Année universitaire : 2025-2026



سُورَةُ النَّحْلِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

أَوْحَىٰ رَبُّكَ إِلَى النَّحْلِ أَنِ اتَّخِذِي مِنَ الْجِبَالِ بُيُوتًا وَمِنَ
الشَّجَرِ وَمِمَّا يَعْرِشُونَ ﴿٦٨﴾ ثُمَّ كُلِي مِن كُلِّ الثَّمَرَاتِ
فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلَالًا يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُّخْتَلِفٌ
أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ

﴿٦٩﴾

« ٦٨ - ٦٩ »

﴿ صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ ﴾

Remerciement

Avant tout, je tiens à remercier Allah le Tout-Puissant pour m'avoir accordé la santé, la volonté et la patience nécessaires à l'accomplissement de ce travail.

Nos plus sincères remerciements s'adressent à notre encadreur **Mr. SENOUCI Djamel Eddine**, pour son accompagnement, ses précieux conseils, sa disponibilité et son soutien tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous remercions Mr. **RABAH Hocine Fadelallah**, Maître de Conférences -B- à l'université de Tissemsilt, pour avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Nous sommes aussi très honorés que **Madame DRIZI Nadja**, Maître assistante -A- à l'Université de Tissemsilt, ait accepté d'évaluer notre travail. Nous remercions chaleureusement **Monsieur TEFIAL Hakim**, Directeur de l'Institut des Sciences de la Nature et de la Vie, pour leur contribution à la bonne réalisation de ce travail.

Nos remerciements vont également à **Madame NADIR, ZIDANI, ABDELLAH** ainsi que **ABDI** pour leur aide, leurs orientations et leurs encouragements

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à **Madame CHEHIH Hadjira**, ingénieure au laboratoire de microbiologie, pour son assistance technique, sa disponibilité et son soutien durant les travaux pratiques.

Nos remerciements s'adressent également à l'ensemble des membres du **Laboratoire de Recherche en Agriculture et Environnement** pour leur accueil et les moyens mis à notre disposition.

Nous tenons aussi à remercier **l'unité de l'Algérienne des Eaux (ADE)**, ainsi que l'ensemble du personnel du Laboratoire Central de Tissemsilt, pour nous avoir ouvert les portes de leur établissement et pour leur collaboration. Nos remerciements s'adressent tout particulièrement à **Monsieur LAHLOUH Mustapha**, responsable du laboratoire.

Nos sincères remerciements vont également au personnel du **Centre Algérien du Contrôle de la Qualité et de l'Emballage (CACQE) de Tissemsilt** pour leur aide et leur coopération.

Enfin, merci également à toutes personnes qui, de près ou de loin, ont contribué, par leur soutien et leurs conseils, à l'accomplissement de ce travail.



À moi-même, pour la patience, la persévérance et les efforts constants que j'ai déployés pour surmonter les obstacles et concrétiser ce projet académique.

À ma mère, mon ange au ciel. Tu es partie trop tôt, mais ton souvenir, ton amour et tes prières continuent d'éclairer mon chemin. Que ton âme repose en paix. Ce succès est le résultat de ce que tu as semé en moi.

À mon cher père, mon exemple de force, de sacrifice et de soutien inconditionnel. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir poussé vers l'excellence. Que Dieu te préserve et te garde à mes côtés.

À ma deuxième mère, pour sa tendresse, sa présence bienveillante et ses précieux conseils qui m'ont enveloppée tout au long de ce parcours.

À ma sœur ZGHARI Nour El Houda et mon frère ZGHARI Achref Yacine, pour leur amour fraternel, leur soutien moral et leur complicité qui font ma force au quotidien.

À ma grande famille ZGHARI, pour l'union, les encouragements et la fierté partagée. À mes chers oncles : ZGHARI Rabeh et ZGHARI Abdelhadi, pour leur bienveillance, leurs conseils et leur soutien précieux.

À mes chères tantes : ZGHARI Zohra et ZGHARI Yamina, pour leur affection constante et leurs prières chaleureuses.

À mes adorables petites sœurs : Israa et Sendes, les rayons de soleil de ma vie, à qui je souhaite le meilleur des parcours.

À mes fidèles amies : Imene, Sihem, Ikhlal et Maroua, pour les moments de partage, les rires, l'entraide au laboratoire et leur présence indéfectible durant les moments de doute.

À mon cher cœur de la vie, ISTABREQ, pour sa place unique dans mon cœur, son soutien absolu et sa lumière précieuse au quotidien. Je te remercie pour ton soutien constant, pour ta confiance en mes capacités, et pour chaque parole qui m'a remonté le moral et m'a donné la force de continuer. Ta présence dans ma vie a été une immense bénédiction, et je prie Dieu de perpétuer l'affection entre nous et de nous offrir un avenir rempli de bien, de bonheur et de réussite.

À tous ceux et toutes celles qui se sont sacrifiés pour moi, qui m'ont tendu la main, de près ou de loin

CHaimaa

Dédicaces 2

À moi-même, pour avoir cru en moi malgré les doutes, pour ma patience, ma persévérance et tous les efforts fournis afin d'arriver jusqu'ici. Je dédie ce modeste travail

À ma très chère mère, source infinie de tendresse et de sacrifice, tes prières ont été ma lumière dans les moments d'ombre.

À mon très cher père, symbole de force, de patience et de courage, merci pour tous tes efforts et pour m'avoir appris à ne jamais abandonner.

À mes chers frères, Abdellah et Mohamed, pour leur amour, leur présence et leurs encouragements.

À mon amie et sœur de cœur, Meriem Aouad, merci d'avoir toujours été là, avec sincérité et affection.

À mes fidèles amies, Chaimaa, Ikhlal, Sihem et Marwa, pour leur amitié sincère.

À ceux qui ont été présents dans l'ombre, pour leur soutien discret et leur bienveillance, sans jamais attendre quoi que ce soit en retour.

À tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Merci

Imène



Résumé

Les produits de la ruche - miel, propolis, pollen, pain d'abeille et gelée royale - constituent des matrices biologiques complexes reconnues pour leurs propriétés nutritionnelles et bioactives. La présente étude a pour objectif l'isolement et la caractérisation phénotypique et biochimique des bactéries lactiques (BAL) associées à ces produits, en vue d'évaluer leur diversité et leur potentiel fonctionnel.

Les analyses physicochimiques réalisées sur quatre échantillons de miel ont révélé des indices de réfraction compris entre 1,492 et 1,497, des pH acides variant de 3,50 à 4,19, une teneur en eau inférieure à 18 % et des conductivités électriques comprises entre 223 et 346 $\mu\text{S}/\text{cm}$, valeurs conformes aux normes de qualité. L'isolement des BAL a été effectué sur milieux sélectifs MRS et M17 à partir de l'ensemble des produits apicoles.

Six isolats bactériens ont été obtenus puis soumis à une série d'analyses d'identification microbiologique (morphologique et biochimique). L'examen macroscopique a révélé des colonies de petite taille, circulaires, lisses, de couleur blanchâtre à crème. L'examen microscopique après coloration de Gram a montré des cocci Gram positifs disposés en paires ou courtes chaînes, catalase négative. Les tests biochimiques ont mis en évidence une activité hétérofermentaire chez tous les isolats (production de CO_2 en cloche de Durham), une fermentation de la majorité des sucres testés (glucose, fructose, lactose, maltose, saccharose), ainsi qu'une variabilité dans l'hydrolyse de l'arginine et de l'esculine selon l'origine du produit. La croissance a été observée sur une large gamme de pH (4 à 9) et de températures (15 à 45 °C selon les souches).

L'ensemble de ces résultats confirme la présence de BAL adaptées aux environnements apicoles et dotées de caractéristiques biochimiques diversifiées, ouvrant des perspectives d'exploitation biotechnologique dans les domaines alimentaire et apithérapeutique.

Mots-clés : bactéries lactiques, produits de la ruche, miel, isolement, caractérisation,



Abstract

Hive products like: honey, propolis, bee pollen, bee bread and royal jelly are complex biological matrices recognised for their nutritional and bioactive properties. The present study aimed to isolate and phenotypically and biochemically characterise lactic acid bacteria (LAB) associated with these products, in order to assess their diversity and functional potential.

Physicochemical analyses carried out on four honey samples revealed refractive indices ranging from 1.492 to 1.497, acidic pH values between 3.50 and 4.19, water content below 18%, and electrical conductivities between 223 and 346 $\mu\text{S}/\text{cm}$, all consistent with quality standards. LAB were isolated on selective MRS and M17 media from all apicultural products

Six isolates were obtained and subjected to a series of microbiological characterisations. Macroscopic examination revealed small, circular, smooth, whitish to cream-coloured colonies. Microscopic observation after Gram staining showed Gram-positive cocci arranged in pairs or short chains, with a negative catalase reaction. Biochemical tests demonstrated a heterofermentative profile in all isolates (gas production in Durham tubes), fermentation of most tested sugars (glucose, fructose, lactose, maltose, sucrose), and variable arginine hydrolase and aesculin hydrolysis activity depending on sample origin. Growth was observed over a wide range of pH (4–9) and temperature (15–45) °C depending on the strain.

These results confirm the presence of LAB well adapted to apicultural environments, exhibiting diversified biochemical characteristics that open promising prospects for biotechnological applications in food science and apitherapy.

Keywords: lactic acid bacteria, hive products, honey, isolation, characterisation,



تُعدّ منتجات الخلية مثل العسل، البروبوليس، حبوب اللقاح، خبز النحل والغذاء الملكي موادًا بيولوجية ذات طبيعة معقدة تتميز بخصائص غذائية ونشاطات حيوية مهمة. تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتوصيف البكتيريا اللبنية (BAL) المرتبطة بهذه المنتجات من حيث خصائصها الشكلية والحيوية، وذلك لتقييم تنوعها وإمكاناتها التكنولوجية.

أظهرت التحاليل الفيزيائية والكيميائية لأربع عينات من العسل أن معامل الانكسار تراوح بين 1.492 و1.497، مع درجة حموضة بين 3.50 و4.19، ونسبة رطوبة أقل من 18%، وناقلية كهربائية بين 223 و346 ميكروسيمنز/سم، وهي قيم توافق معايير الجودة المعمول بها. كما تم عزل البكتيريا اللبنية باستعمال أوساط زرع انتقائية MRS و M17 انطلاقًا من مختلف منتجات النحل المدروسة.

تمكنا من الحصول على ستة (06) عزلات تنتمي إلى اصناف البكتيرية اللبنية. أظهر الفحص العياني وجود مستعمرات بكتيرية صغيرة، دائرية، ملساء، ذات لون أبيض مائل إلى لون القشدة. بينت الدراسة المجهرية أن هذه العزلات تمتاز بكونها كروية موجبة الغرام، غير منتجة للإنزيم الكاتالاز، وتظهر نشاطًا تخميريًا متنوعًا، إضافة إلى قدرتها على النمو في مجالات واسعة من الحموضة ودرجات الحرارة، مع اختلاف في بعض الخصائص البيوكيميائية بين السلالات

تؤكد هذه النتائج وجود تنوع مهم للبكتيريا اللبنية في منتجات خلية النحل، ما يفتح آفاقًا لاستخدامها في مجالات الغذاء والتكنولوجيا الحيوية والطب الحيوي

الكلمات المفتاحية: البكتيريا اللبنية، منتجات خلية النحل، العسل، العزل، التوصيف

Sommaire

Remerciement	i
Dédicace 1	ii
<i>Dédicaces 2</i>	iii
Résumé	iv
Abstract	v
ملخص	vi
Sommaire	vii
Liste des abréviations	x
Liste de figure	xi
Liste de tableaux	xii
I. Partie Bibliographique	3
1. Les produits de la ruche	3
1.1. Le miel	3
1.2. La propolis	3
1.3. Le pollen d'abeille	4
1.4. La Gelee Royale	4
1.5. Le pain d'abeille	4
2. Caractéristique et composition physico-chimique des produits de la ruche	5
2.1. Caractéristiques générales	5
2.2. Caractéristiques organoleptiques	6
2.3 caractéristiques physico-chimiques	7
3. La microflore naturelle de produit de la ruche	9
3.1. Microflore naturelle	9
3.1.1. Microflore naturelle du miel	9
3.1.2. Microflore naturelle de la propolis	10
3.1.3. Microflore naturelle du pollen d'abeille	10
3.1.4. Microflore naturelle du pain d'abeille	10
3.1.5. Microflore naturelle de la gelée royale	10
3.2. La microflore contamination	11
3.2.1. Sources et voies de contamination microbienne	11
3.2.2. Contaminations microbiennes du miel	11
3.2.3. Contaminations de pollen et pain d'abeille	12
3.2.4. Gelée royale	12

3.2.5. Propolis	12
4. Les bactéries lactique	12
4.1. Généralités sur les Bactéries Lactiques (LAB)	12
4.2. Métabolisme fermentaire	13
4.3. Habitats naturels	13
4.4.1. Position taxonomique générale	14
4.4.2. Genres trouvés dans les produits de la ruche	16
Matériels et méthodes	3
1. Lieu et période d'étude	16
2. Echantillonnage de produit de la ruche	16
3. Analyse physico-chimique des produits de la ruche	16
3.1. Indice de Brix (Réfractométrie)	16
3.2. pH	17
3.3. Conductivité	17
4. Analyse Microbiologie	18
4.1. Préparation de solution mère et des dilutions décimales	18
4.2. Isolement des bactéries lactique	19
4.3. Purification	20
4.4. Examen macroscopique	21
4.5. Examen microscopique	21
4.6. Tests biochimiques	22
4.6.5. Test de croissance en différent pH et température	23
4.7. Test de fermentation des carbohydrate	24
4.7.2. Préparation de la suspension bactérienne	24
4.7.3. Test d'utilisation des sucres en microplaque	25
4.8. Conservation des isolats bactériens	25
Résultats et discussion	5
1. Résultats des Analyses physico-chimique	26
1.1. Détermination de l'indice de réfraction des échantillons de miel	26
1.2 pH des échantillons de miel	26
1.3. Conductivité électrique des échantillons de miel	27
2. Résultats de l'analyse microbiologique	27
2.1. Résultats d'isolement et de purification des bactéries lactiques	27
2.2. Examen macroscopique	28

2.3. Examen microscopique	29
3. Résultats des tests biochimiques	29
3.1. Test catalase	29
3.2. Hydrolyse d'arginine	30
3.3. Résistance a la bille et hydrolyse esculine	31
3.4. Type fermentaire	31
3.6. Fermentation des carbohydrates	33
Discussion	18
Conclusion	18
Référence bibliographique	18
Annexes	45

Liste des abréviations

ADH Arginine Dihydrolase

AGPI Acides Gras Polyinsaturés

Aw : Activité de l'eau

BAL : Bactéries Acides Lactiques

BCP : Bromocrésol Pourpre

C.A.C.Q.E : Centre Algérien du Contrôle de la Qualité et de l'Emballage

CO₂ : Dioxyde de carbone

EMP : Embden–Meyerhof–Parnas

g: Gramme

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HDA: Hydroxydecanoic Acid

ITS2: Internal Transcribed Spacer 2

MRS: Man, Rogosa and Sharpe

M17 : Milieu M17

mL : Millilitre

MRJP : Major Royal Jelly Proteins

NH₃ : Ammoniac

pH : Potentiel Hydrogène

tr/min : Tours par minute

μS/cm : Microsiemens par centimètre

°C : Degré Celsius

BCP : : Bromocresol Purple (indicateur de pH)

ADH : Arginine Dihydrolase (enzyme de dégradation de l'arginine)

MRJP : Major Royal Jelly Proteins (protéines majeures de la gelée royale)

10-HDA / HDA : 10-Hydroxy-2-decenoic acid (acide spécifique de la gelée royale)

HMF: Hydroxymethylfurfural (indicateur de qualité du miel)

EMP: Embden-Meyerhof-Parnas (voie métabolique de la glycolyse)

BEA :Bile Esculine Azide.

Figure 1 : Echantillons de miel analyses dans cet étude	3
Figure 2: la gelée royale (Khalfan Saeed Alwali Alkindi <i>et al.</i> , 2024)	4
Figure 3 : Échantillon de pain d'abeille	5
Figure 4 : Réfractomètre utilisé pour la mesure de l'indice de Brix	16
Figure 5 : pH metre	17
Figure 6 : Mesure de la conductivité par conductimètre,	18
Figure 7 : Préparation des échantillons pour fermentation en milieu lait	18
Figure 8 : Schéma représentatif de préparation des dilutions	19
Figure 9 : Technique de repiquage par stries sur milieu solide	21
Figure 10 : Test d'hydrolyse de l'arginine sur milieu M16B	23
Figure 11 :Tyndallisation des sucres au bain marie	24
Figure 12 Centrifugation des échantillons	24
Figure 13 :Test des sucres par la méthode de la galerie API classique	25
Figure 14 : Aspect des colonies après isolement et purification sur milieu MRS.	28
Figure 15 : Aspect macroscopique des isolats sur gélose MRS	28
Figure 16 : Aspect microscopique des isolats	29
Figure 17 : Test de catalase	29
Figure 18 : résultats du test d'ADH positive	30
Figure 19 : Résultats du Test d'ADH négative	30
Figure 20 :Type fermentaire sur milieu MRS liquide contenant la cloche de durham.	31
Figure 21 : Résultats du test de fermentation des sucres	34



Liste de tableaux

Tableau 1 : Composition physico-chimique des principaux produits de la ruche	7
Tableau 2 : Diversité taxonomique et types de fermentation des bactéries lactiques	14
Tableau 3 : Genres de BAL associés aux produits de la ruche et leurs rôles fonctionnels	16
Tableau 4 : Indice de réfraction des échantillons de miel	26
Tableau 5 : les résultats de mesure de pH	26
Tableau 6 : Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de miel	27
Tableau 7 : Effet de la température et du pH sur la croissance des isolats bactériens	32
Tableau 8 : résultats de croissance en différentes températures, pH et fermentation des sucres	34



INTRODUCTION



INTRODUCTION

Les produits de la ruche occupent une position particulière en raison de leur richesse biochimique et de leurs propriétés biologiques diversifiées. Le miel, la propolis, le pollen, le pain d'abeille et la gelée royale constituent des matrices biologiques complexes, dont les effets nutritionnels, thérapeutiques et antimicrobiens sont reconnus et documentés depuis l'Antiquité (Bogdanov *et al.*, 2008; Fratini *et al.*, 2016). Ces produits apicoles renferment une grande diversité de composés bioactifs notamment les polyphénols, les flavonoïdes, les acides organiques, les enzymes et les peptides qui confèrent à ces matrices des propriétés antibactériennes, antifongiques, anti-inflammatoires et antioxydantes remarquables (Sanlier *et al.*, 2026)

Des études récentes ont démontré que le microbiote associé aux produits de la ruche n'est pas uniquement composé de bactéries pathogènes ou de contaminants environnementaux au contraire, il héberge une flore spécifique adaptée à ces environnements riches en sucres et pauvres en eau (Plăder *et al.*, 2025). Il a notamment été mis en évidence que l'intestin moyen des abeilles (*Apis mellifera*) contient une communauté de BAL phylogénétiquement distinctes, appartenant principalement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, qui participent activement à la fermentation du nectar et du pollen ainsi qu'à la protection sanitaire de la colonie. Dans le pain d'abeille en particulier, ce processus de fermentation lactique assure la conservation des ressources alimentaires de la ruche tout en enrichissant le substrat en composés bénéfiques pour la colonie (Nowak *et al.*, 2021; Pradeep *et al.*, 2025)

Les bactéries lactiques (BAL) constituent un groupe hétérogène de micro-organismes à Gram positif, non sporulants, dépourvus de catalase et incapables de synthétiser des porphyrines. Elles sont caractérisées par leur capacité à fermenter les glucides en produisant principalement de l'acide lactique comme métabolite final (Carr *et al.*, 2002; Holzapfel et Wood, 2014; Negm, 2018). Sur le plan taxonomique, elles regroupent plusieurs genres dont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus* et *Weissella* (De Vuyst et Leroy, 2007; Von Wright et Axelsson, 2019). Ces micro-organismes occupent une niche écologique particulièrement large, colonisant des habitats variés tels que les végétaux, les produits laitiers, les viandes fermentées, le tractus gastro-intestinal des mammifères et des abeilles ainsi que divers produits d'origine animale (Leroy et De Vuyst, 2004; Albanese *et al.*, 2026)

INTRODUCTION

Sur le plan fonctionnel, les BAL jouent un rôle déterminant dans de nombreux processus biologiques et technologiques. Leur activité fermentaire leur confère des propriétés acidifiantes, conservatrices et organoleptiques essentielles dans l'industrie agroalimentaire (Anumudu *et al.*, 2024). En outre, certaines souches produisent des substances antimicrobiennes appelées bactériocines, telles que la nisine, la lacticine ou encore la plantaricine, qui inhibent la croissance de bactéries pathogènes et d'altération (Alvarez-Suarez, 2017). Par ailleurs, les BAL participent activement à la production d'exopolysaccharides (EPS), de vitamines du groupe B et d'enzymes d'intérêt biotechnologique (Linares *et al.*, 2017). Leur capacité à moduler le microbiote intestinal et à renforcer les fonctions immunitaires leur vaut également une reconnaissance croissante en tant que probiotiques, au sens défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (Sadiq, 2022).

L'isolement et la caractérisation des BAL à partir des produits de la ruche représentent donc un domaine de recherche en plein essor, à l'intersection de la microbiologie alimentaire, de l'apithérapie et de la biotechnologie. Plusieurs travaux ont signalé la présence de souches de BAL dotées de propriétés probiotiques et antimicrobiennes exceptionnelles dans ces matrices apicoles (Fontana *et al.*, 2013; Pobiega *et al.*, 2019; Iorizzo *et al.*, 2022; Meradji *et al.*, 2023; Pradeep *et al.*, 2025; Albanese *et al.*, 2026). La valorisation de ces souches pourrait ouvrir des perspectives intéressantes dans les domaines de la conservation des aliments, de la santé humaine et animale, mais aussi de l'apiculture durable.

En Algérie, les produits apicoles sont abondamment produits et largement utilisés dans la médecine traditionnelle, notamment dans les régions du Tell et du Sahara septentrional (Khalil *et al.*, 2012; Homrani *et al.*, 2020; Meradji *et al.*, 2023). Cependant, les études portant sur leur microbiote, et plus particulièrement sur leurs bactéries lactiques, demeurent rares et insuffisamment documentées.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail, dont l'objectif principal est d'isoler et de caractériser les bactéries lactiques présentes dans différents produits de la ruche (miel, propolis, pollen, pain d'abeille et gelée royale), en vue d'évaluer leurs propriétés biologiques et leur potentiel biotechnologique.



I. Partie Bibliographique

1. Les produits de la ruche

Les produits de la ruche sont des substances naturelles produites par les abeilles mellifères, notamment le miel, la gelée royale, la propolis, Le pain d'abeille et le pollen. Ils possèdent des caractéristiques nutraceutiques et pharmaceutiques en raison de leurs composés bioactifs, présentant des propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires et anti oxydantes (Bava *et al.*, 2024)

1.1. Le miel

Le miel est un produit naturellement sucré fabriqué par les abeilles (*Apis mellifera*) à partir du nectar des fleurs ou de sécrétions végétales, qu'elles transforment, déshydratent et conservent dans les alvéoles de la ruche. C'est un produit visqueux et parfumé qui se compose principalement de glucose et de fructose (Viteri *et al.*, 2021)



Figure 1 : Echantillons de miel analysés dans cet étude

1.2. La propolis

La propolis, également appelée « colle d'abeille », est une substance résineuse produite par les abeilles à partir de sécrétions végétales combinées avec de la cire et des sécrétions de leur salive (Wagh, 2013; Hossain *et al.*, 2022). Elle joue un rôle crucial dans la sauvegarde de la ruche en obstruant les fissures et en freinant la prolifération des microorganismes nuisibles (Ouadjir, 2021)

1.3. Le pollen d'abeille

Le pollen d'abeille est un produit apicole qui se compose de grains de pollen, de nectar et des sécrétions salivaires des abeilles collectrices.(El Ghouizi *et al.*, 2023) . C'est une source cruciale de protéines,de lipides, de glucides,de vitamines, de minéraux et de composés phénoliques indispensables à la croissance de la colonie.(Attia *et al.*, 2025)

1.4. La Gelee Royale

La gelée royale est une matière onctueuse produite par les glandes hypo pharyngiennes et mandibulaires des abeilles nourrices de l'espèce *Apis mellifera*. Elle sert de régime alimentaire exclusif pour les larves de reines et jouent un rôle crucial dans la différenciation des castes au sein de la colonie .(Melliou et Chinou, 2014).

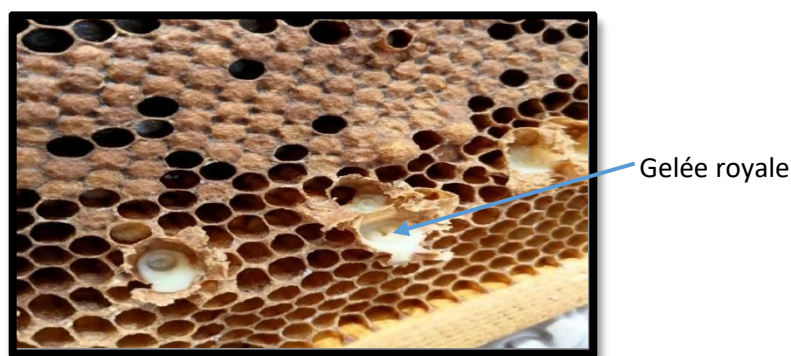


Figure 2: la gelée royale (Khalfan Saeed Alwali Alkindi *et al.*, 2024)

Elle contient des composants bioactifs particuliers tels que le 10-HDA, la royalactine et les protéines majeures de la gelée royale (MRJP), qui sont à l'origine de ses qualités antimicrobiennes, antioxydantes, immunomodulatrices et anticancéreuses. (Sönmez, 2025)

1.5. Le pain d'abeille

Le pain d'abeille (également appelé bee bread ou perga) est un produit de la fermentation lactique anaérobie du pollen, combiné avec du nectar et des sécrétions salivaires d'abeilles, le tout se réalisant au sein des alvéoles de la ruche (Bakour *et al.*, 2022). Cette fermentation, assurée principalement par des bactéries lactiques comme *Lactobacillus* sp. et *Fructobacillus* sp., entraîne une diminution du pH et améliore la conservation du produit. Comparé au pollen brut, le pain d'abeille présente une meilleure digestibilité (Bakour *et al.*, 2022; Ergun *et al.*, 2024) Il s'agit d'une ressource alimentaire significative pour les larves d'abeilles et est reconnu

comme un aliment fonctionnel aux qualités antioxydantes, antibactériennes, antifongiques et antitumorales.(Bakour *et al.*, 2022; Urcan, 2025)



Figure 3 : Échantillon de pain d'abeille

2 . Caractéristique et composition physico-chimique des produits de la ruche

2.1. Caractéristiques générales

Les produits de la ruche constituent un ensemble de matrices naturelles d'une remarquable richesse nutritionnelle et fonctionnelle (Pasupuleti *et al.*, 2017). Ces produits sont riches en nutriments et en composés biologiquement actifs, tels que les glucides, les protéines, les acides aminés, les lipides, les vitamines, les composés phénoliques et les minéraux (Matuszewska *et al.*, 2021).

Le miel, dont la composition varie selon l'origine florale et les conditions climatiques, est principalement constitué de glucides simples et d'eau, mais renferme également des enzymes, des acides organiques et des polyphénols aux propriétés antioxydantes (Pasupuleti *et al.*, 2017). Le pollen d'abeille est particulièrement remarquable pour sa teneur en protéines, constituant une protéine complète contenant les huit acides aminés essentiels, ainsi que des niveaux significatifs de vitamines du groupe B, de vitamine C, de caroténoïdes, de minéraux et de nombreuses molécules flavonoïdes (Komosinska-Vassev *et al.*, 2015). La gelée royale, quant à elle, contient environ 12 % de protéines, 5 à 6 % de lipides et 12 à 15 % de glucides, en plus de composés bioactifs uniques tels que les acides gras hydroxy-décénoïques (Otręba *et al.*, 2021). La propolis, résine végétale élaborée par les abeilles, se distingue par sa concentration élevée en composés phénoliques et en flavonoïdes elle est notamment riche en acides phénoliques, terpènes et enzymes, auxquels sont attribuées des fonctions biologiques dans la prévention de certaines maladies et la promotion de la santé (Bankova *et al.*, 2014).

De manière générale, le potentiel thérapeutique de ces produits d'origine apicole est attribué à leur teneur en acides aminés, acides gras, glucides, vitamines, minéraux, flavonoïdes, polyphénols et divers autres composants bioactifs contribuant au soutien du système immunitaire (Pasupuleti *et al.*, 2017; Rzepecka-Stojko *et al.*, 2015)

2.2. Caractéristiques organoleptiques

Le miel possède des propriétés organoleptiques qui varient selon son origine florale. Il présente une couleur allant du jaune clair à l'ambre foncé, tandis que son arôme et sa saveur sont influencés par les composés volatils issus du nectar. Sa consistance est généralement visqueuse à semi-fluide, en raison de sa forte teneur en sucres et de sa faible teneur en eau (Bogdanov *et al.*, 2008; Alvarez-Suarez, 2017)

Le pollen d'abeille se manifeste sous forme de petits grains dont les couleurs varient du jaune clair à l'orange ou au brun, en fonction des espèces de fleurs. Il a un parfum floral délicat et une saveur subtilement sucrée et amère. Elle possède une texture granuleuse et sèche (Komosinska-Vassev *et al.*, 2015)

La propolis est une substance résineuse de couleur brun-vert à brun foncé. Elle possède une odeur aromatique forte et caractéristique due à la présence de composés phénoliques et d'huiles essentielles. Sa texture est collante à température ambiante et devient dure à basse température (Huang *et al.*, 2014; Sforcin, 2016)

Le pain d'abeille a une teinte plus profonde que le pollen, qui est généralement de couleur brun-jaunâtre. Il dégage une senteur fermentée et une saveur un peu aigrelette grâce à la fermentation lactique. Sa texture est plus molle et compacte que le pollen (Bakour *et al.*, 2019)

La gelée royale est une substance crémeuse de couleur blanc nacré à jaunâtre. Elle présente une odeur acide caractéristique et un goût légèrement acide et piquant. Sa texture est gélatineuse et homogène (Ramadan et Al-Ghamdi, 2012) (Guo *et al.*, 2021)

2.3 caractéristiques physico-chimiques

La composition physicochimique des produits de la ruche est complexe et susceptible de varier en fonction de leur provenance botanique et géographique, le tableau (1) recapitule la différences dans les paramètres des différents produits de la ruche

Tableau 1 : Composition physico-chimique des principaux produits de la ruche

Produit	Ph	Humidité	Composants majeurs
Miel	3,2–4,5 (Kiran et Riyaz, 2026)	≤ 20 % (Al-Kafaween <i>et al.</i> , 2023)	Fructose 31–44 %, Glucose 23–38 %, eau, acides organiques, enzymes, polyphénols (Stanojević <i>et al.</i> , 2024)
Propolis	3,5– 6,5 (Chong et Chua, 2020)	1,6–2,8 % (Bankova <i>et al.</i> , 2000)	Résines 40–60 %, cires 25–35 %, flavonoïdes, acides phénoliques, huiles essentielles (Selamoglu <i>et al.</i> , 2025)
Pollen d'abeille	4,7–5,4 (Naghizadeh <i>et al.</i> , 2025)	2–13 % (Naghizadeh <i>et al.</i> , 2025; Tesfaye, 2025)	Glucides 54 %, protéines 21 %, lipides 5 %, fibres 9 %, minéraux, vitamines, polyphénols (Thakur et Nanda, 2020; El Ghouizi <i>et al.</i> , 2023)
Pain d'abeille	< 4,5 (Dranca <i>et al.</i> , 2020)	Variable (Dranca <i>et al.</i> , 2020; Ćirić <i>et al.</i> , 2022)	Protéines 22,6 %, sucres 26,8 %, AGPI 64,7 %, acide lactique, kaempférol, myricétine (Dranca <i>et al.</i> , 2020; Ćirić <i>et al.</i> , 2022; Chelucci <i>et al.</i> , 2023)
Gelée royale	3,4–4,5 (Khalfan Saeed Alwali Alkindi <i>et al.</i> , 2024)	60–78 % (Khalfan Saeed Alwali Alkindi <i>et al.</i> , 2024) (Botezan <i>et al.</i> , 2023)	Eau 60–78 %, protéines 9–18 % (MRJPs), glucides 7–18 %, lipides 3–8 %, 10-HDA $\geq 1,4$ % (Botezan <i>et al.</i> , 2023; Khalfan Saeed Alwali Alkindi <i>et al.</i> , 2024; Oršolić et Jazvinščak Jembrek, 2024)

3. La microflore naturelle de produit de la ruche

3.1. Microflore naturelle

3.1.1. Microflore naturelle du miel

Les bactéries de miel

Le miel contient une microflore bactérienne qui provient principalement du système digestif des abeilles, du nectar, du pollen et de l'habitat de la ruche. Le microbiote intestinal de l'*Apis mellifera* est principalement composé de bactéries comme *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Gilliamella apicola* et *Snodgrassella alvi*, qui sont considérées comme les principaux éléments du « microbiote cœur » des abeilles. (Motta et Moran, 2024)

On peut trouver des différentes bactéries à Gram positif et négatif comme *Bacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* et *Enterobacter spp.* Lors du transport du nectar des fleurs, une partie de cette microflore est transférée à la ruche. (Grabek-Lejko et Worek, 2024)

Les bactéries lactiques (BAL) représentent un groupe fonctionnel clé dans le miel, les genres *Lactobacillus*, *Fructobacillus* et *Apilactobacillus kunkeei* sont régulièrement identifiés (Olofsson et Vásquez, 2008)

Levures et champignons du miel

Les levures osmophiles constituent la principale flore fongique du miel, grâce à leur capacité à tolérer de faibles activités de l'eau ($aw < 0,60$), ce qui leur permet de survivre dans ce milieu hypertonique et parfois de s'y multiplier. Leur présence en quantité élevée est généralement associée à une fermentation et à une altération de la qualité du miel. Selon (Luca *et al.*, 2024) les espèces les plus fréquemment isolées incluent *Zygosaccharomyces bailii*, *Starmerella spp.* et *Candida magnoliae*, ainsi que plusieurs genres extrêmophiles comme *Aureobasidium* et *Sporobolomyces*, confirmés par des analyses ITS2, des études complémentaires ont également mis en évidence des espèces comme *Yarrowia lipolytica* présentant un potentiel biotechnologique intéressant (Pérez Matos *et al.*, 2023) Enfin, les analyses métagénomiques révèlent une diversité fongique importante incluant des levures (*Candida*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*) et des champignons filamenteux (*Penicillium*, *Cladosporium*), principalement issus du pollen et de l'environnement floral (Xiong *et al.*, 2023)

Les champignons filamenteux du miel sont principalement d'origine environnementale (poussières, sol, plantes). Selon Plăder *et al.* (2025), les genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Mucor*, *Cladosporium* et *Chaetomium* sont les taxons fongiques filamenteux les plus documentés dans le miel. Les espèces *Penicillium apimei*, *P. mellis*, *P. meliponae* et *P. polonicum* sont particulièrement fréquentes ; leurs spores pénètrent dans le miel via le nectar, le pollen ou les abeilles elles-mêmes (Plăder *et al.*, 2025).

3.1.2. Microflore naturelle de la propolis

La propolis constitue un réservoir microbien diversifié de la ruche, dont la composition est fortement influencée par l'origine géographique et botanique, en raison de l'incorporation de résines et d'exsudats végétaux (Bankova, 2005; Bankova *et al.*, 2014). L'analyse par séquençage par l'outil de séquençage de nouvelle génération Illumina MiSeq de propolis d'*Apis mellifera* a révélé une microflore dominée par des genres tels que *Rhodopila*, *Corynebacterium* et *Sphingomonas*, avec une forte variabilité entre échantillons liée à l'hétérogénéité des sources végétales (Pérez Matos *et al.*, 2023).

3.1.3. Microflore naturelle du pollen d'abeille

Le pollen d'abeille présente une microflore variée d'origine florale, tellurique et intestinale. Les genres bactériens les plus fréquemment détectés incluent *Pseudomonas*, *Lactobacillus* et *Acinetobacter*, en lien avec la microflore des plantes visitées par les abeilles (Anderson *et al.*, 2013). Les analyses métagénomiques confirment également la dominance des *phyla* *Proteobacteria*, *Firmicutes* et *Actinobacteria*, avec des genres récurrents tels qu'*Acinetobacter*, *Erwinia*, *Sodalis* et *Sphingomonas* (Dew *et al.*, 2020).

3.1.4. Microflore naturelle du pain d'abeille

Le pain d'abeille se distingue par une microflore riche et dynamique issue d'un processus de fermentation en trois étapes : des bactéries aérobies comme *Pseudomonas spp.* initient la pré-digestion du pollen, suivies par les bactéries lactiques (*Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*) qui produisent l'acide lactique et abaissent le pH, puis les levures comme *Saccharomyces spp.* qui métabolisent les sucres résiduels (Peřka *et al.*, 2025).. La fermentation augmente significativement la diversité microbienne par rapport au pollen brut (Ghosh *et al.*, 2022).

3.1.5. Microflore naturelle de la gelée royale

La gelée royale se caractérise par une quasi-absence de microflore intrinsèque, en raison de ses fortes propriétés antimicrobiennes liées à des composés tels que les MRJPs, le 10-HDA, la

royalisine et les jelleines. Elle exerce une activité bactéricide contre plusieurs pathogènes à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*) ainsi que contre certains Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*, avec une efficacité variable (Bagameri *et al.*, 2022)

3.2. La microflore contamination

3.2.1. Sources et voies de contamination microbienne

Les produits de la ruche peuvent être contaminés par des micro-organismes provenant de sources multiples. (Luca *et al.*, 2024) recensent les principales voies de contamination :

- Le pollen, principal vecteur de micro-organismes vers l'intestin des abeilles et les produits de la ruche
- Le tube digestif des abeilles
- Les opérateurs humains et les équipements lors de la récolte et du conditionnement
- Les contenants et récipients de stockage
- Le vent, la poussière et l'environnement extérieur.

3.2.2. Contaminations microbiennes du miel

Le risque microbiologique le plus significatif associé au miel est la contamination par des spores de *Clostridium botulinum*. Ces spores, présentes dans les sols et poussières, peuvent atteindre le nectar et être incorporées dans le miel lors de la récolte. Dans l'intestin immature des nourrissons (< 12 mois), ces spores peuvent germer et produire la toxine botulique, provoquant le botulisme infantile (Luca *et al.*, 2024). Rappelent que les spores de *C. botulinum* peuvent survivre dans le miel à basse température sans modification notable du pH, du taux de HMF ou de l'activité diastasique du miel.

Des analyses microbiologiques de miels commerciaux ont isolé des pathogènes d'origine alimentaire tels que *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Acinetobacter baumannii* et des *coliformes totaux*. Leur présence dans le miel est généralement attribuable à une contamination post-récolte par les opérateurs, les équipements ou les contenants (Luca *et al.*, 2024)

Les moisissures et levures peuvent constituer une source de non-conformité dans les miels présentant une teneur en eau excessive ($a_w > 0,62$). Dans ce cas, des espèces osmophiles comme *Zygosaccharomyces bailii* peuvent provoquer la fermentation du miel et sa détérioration organoleptique. Des genres de moisissures comme *Aspergillus*, *Fusarium*,

Trichoderma et *Chaetomium* ont été identifiés dans des miels contaminés, généralement en lien avec de mauvaises pratiques de stockage ou un excès d'humidité (Hudson *et al.*, 2024)

3.2.3. Contaminations de pollen et pain d'abeille

Le pollen d'abeille, en raison de sa composition riche en protéines, glucides et lipides, est particulièrement sensible à la contamination fongique, notamment par des moisissures productrices de *mycotoxines*. Plusieurs études ont détecté des souches d'*Aspergillus spp.* (producteurs d'*aflatoxines*) et de *Fusarium spp.* dans des pollens mal conservés (Zastulka *et al.*, 2015). Le respect des conditions de séchage (teneur en eau < 8 %), de congélation et de conditionnement hermétique est indispensable pour prévenir ces contaminations (Kacemi et Campos, 2023)

3.2.4. Gelée royale

En raison de son puissant arsenal antimicrobien, la gelée royale fraîche présente peu de contaminations microbiologiques significatives en conditions normales de récolte. Néanmoins, une mauvaise hygiène lors de la collecte, un stockage prolongé à température ambiante ou des conditions de congélation insuffisantes peuvent conduire à des contaminations par des bactéries mésophiles aérobies, des coliformes ou des levures. Le stockage recommandé à -18 °C préserve l'intégrité microbiologique de la gelée royale (Bagameri *et al.*, 2022)

3.2.5. Propolis

Bien que la propolis soit reconnue pour ses propriétés antimicrobiennes, ses extraits ou préparations commerciales peuvent être contaminés lors de la transformation (dilution, chauffage, conditionnement). Les préparations non standardisées peuvent présenter des charges microbiennes variables. (Sallemi *et al.*, 2022) ont constaté que la variabilité géographique de la microflore fongique de la propolis est fortement influencée par les pratiques agricoles locales (traitements chimiques des cultures), qui modifient les communautés microbiennes des plantes sources et, par extension, celles de la propolis.

4. Les bactéries lactique

4.1. Généralités sur les Bactéries Lactiques (LAB)

Les bactéries lactiques (LAB) forment un vaste groupe fonctionnel de micro-organismes procaryotes définis par leur capacité commune à produire de l'acide lactique comme principal ou l'un des principaux produits finaux de la fermentation des glucides. (Ayed *et al.*, 2024).

Les LAB sont des bactéries à Gram positif, non sporulantes, de forme bacillaire (bâtonnets) ou coques (sphères), généralement non mobiles. Elles sont aérotolérantes et anaérobies facultatives. Elles sont protégées des dérivés oxygénés (H_2O_2) par des peroxydases mais sont dépourvues de catalase (catalase-négatives), ce qui les distingue des autres Gram positifs. La division cellulaire s'effectue dans un seul plan, à l'exception des *Pediococcus* (Ayed *et al.*, 2024).

4.2. Métabolisme fermentaire

Sur le plan métabolique, les LAB sont définies par leur fermentation des glucides en acide lactique. On distingue trois grands groupes métaboliques selon le substrat et les produits finaux :

Homofermentaires obligatoires : fermentent les hexoses (glucose) presque exclusivement en acide lactique via la voie glycolytique (Embden-Meyerhof-Parnas). Exemples : *Lactobacillus* (*s.s.*), *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* (Nowak *et al.*, 2021; Ayed *et al.*, 2024)•

Heterofermentaires facultatifs : fermentent les hexoses en acide lactique par la voie EMP, mais peuvent aussi utiliser la voie phosphocétolase avec les pentoses (acide acétique, éthanol, CO_2). Exemples : *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus*.(Ayed *et al.*, 2024)

Heterofermentaires obligatoires : utilisent la voie des pentoses phosphates (phosphocétolase) pour fermenter aussi bien les hexoses que les pentoses, produisant acide lactique, acide acétique, éthanol et CO_2 . Exemples : *Fructilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Leuconostoc*, *Fructobacillus* (Nowak *et al.*, 2021; Ayed *et al.*, 2024).

4.3. Habitats naturels

Les LAB sont ubiquitaires dans la nature. On les retrouve dans les végétaux en décomposition et les fruits, les produits laitiers, les viandes et poissons fermentés, les céréales, les betteraves, les légumes marinés, les levains, les ensilages, les boissons fermentées, les jus, les eaux usées, et dans les cavités des humains et des animaux (tractus digestif, cavité buccale, vagin). Dans le contexte apicole, les LAB colonisent abondamment le jabot (estomac à miel), le tractus gastro-intestinal des abeilles, ainsi que les produits de la ruche (miel, pain d'abeille, pollen, gelée royale, propolis).(Ayed *et al.*, 2024; Nowak *et al.*, 2021)

4.4. Classification bactéries lactique

4.4.1. Position taxonomique générale

Les LAB appartiennent au *phylum Bacillota* (anciennement *Firmicutes*), classe *Bacilli*, ordre *Lactobacillales*. Cet ordre comprend actuellement six familles principales : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*. Ces familles regroupent des dizaines de genres et des centaines d'espèces décrites, avec de nouvelles espèces régulièrement publiées .(Rossi, 2023; Ayed *et al.*, 2024)

Le tableaux (02) décrit les principaux genres des bactéries lactiques

Tableau 2 : Diversité taxonomique et types de fermentation des bactéries lactiques

Famille	Genres principaux	Fermentation dominante	Referances
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Apilactobacillus</i> , <i>Bombilactobacillus</i> , <i>Fructilactobacillus</i> , <i>Lactiplantibacillus</i> , <i>Lacticaseibacillus</i> , <i>Limosilactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> ,, <i>Weissella</i> , <i>Leuconostoc</i>	Homo- et hétérofermentaires (selon le genre)	(Ayed <i>et al.</i> , 2024; Rossi, 2023)
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i>	Homofermentaire	
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>Vagococcus</i> , <i>Tetragenococcus</i>	Homofermentaire	
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i> , <i>Dolosigranulum</i> , <i>Alloiococcus</i>	Homofermentaire	
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	Hétérofermentaire	
<i>Leuconostocaceae</i> (distincte)	<i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> ,	Hétérofermentaire obligatoire	

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

	<i>Weissella,</i> <i>Fructobacillus</i>		
--	--	--	--

4.4.2. Genres trouvés dans les produits de la ruche

Tableau 3 : Genres de BAL associés aux produits de la ruche et leurs rôles fonctionnels

Produit	Genres lab dominants	Rôle principal	Références
Miel	<i>Apilactobacillus</i> , <i>Fructobacillus</i> , <i>Fructilactobacillus</i>	Conservation, protection antimicrobienne, biofilms	(Asama <i>et al.</i> , 2015; Ramos <i>et al.</i> , 2020; Leska <i>et al.</i> , 2022; Itatani <i>et al.</i> , 2025; Bernal-Castro <i>et al.</i> , 2025; Albanese <i>et al.</i> , 2026)
Pollen d'abeille	<i>Apilactobacillus</i> , <i>Fructobacillus</i> , <i>Lactiplantibacillus</i> , <i>Pediococcus</i>	Inoculation lors du transit, début de fermentation	
Pain d'abeille	<i>Apilactobacillus</i> , <i>Lactiplantibacillus</i> , <i>Bombilactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Pediococcus</i>	Fermentation lactique principale, conservation, amélioration nutritionnelle	
Propolis	<i>Lactobacillus</i> <i>Lacticaseibacillus</i> , <i>Limosilactobacillus</i>	Microflore propre peu abondante ; synergie avec propolis antimicrobienne	
Gelée royale	<i>Apilactobacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>Panisapium</i>	Biotransformation de la 10-HDA, immunostimulation par fermentation	



Matériels et méthodes

1. Lieu et période d'étude

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire pédagogique de microbiologie de l'institut des sciences de la nature et de la vie de l'université, et laboratoire de centre algérien du contrôle de la qualité et de l'emballage (C.A.C.Q.E) de Tissemsilt. La première partie de l'étude qui a été l'analyse physico-chimique de miel a été déroulée au C.A.C.Q.E.

La deuxième partie qui a été l'isolement et la pré-identification des caractéristiques phénotypiques, et biochimiques des isolats des bactéries lactiques a été élaborée au laboratoire de l'institut.

2. Echantillonnage de produit de la ruche

Dans le cadre de cette recherche, une collecte systématique de divers produits de la ruche a été réalisée afin d'évaluer leurs propriétés microbiologiques et biologiques. Quatre spécimens de miel ont été obtenus à partir de sources florales distinctes. Le spécimen initial était un miel monofloral dérivé de Sidra (jujube), tandis que l'échantillon suivant était un miel multifloral composé principalement de sorbier, de haricot et de chardon-Marie. Le troisième spécimen provenait d'un amalgame floral de Sidra (jujube), de haricot et de chardon-Marie, tandis que le quatrième était principalement composé de chardon-Marie et de haricot. Outre les spécimens de miel, divers autres produits apicoles ont également été collectés, notamment du pollen frais, de la propolis, de la gelée royale et du pain d'abeille.

3. Analyse physico-chimique des produits de la ruche

3.1. Indice de Brix (Réfractométrie)

L'indice Brix des échantillons de miel a été évalué à l'aide d'un réfractomètre.



Figure 4 : Réfractomètre utilisé pour la mesure de l'indice de Brix

Avant la procédure analytique, les échantillons de miel cristallisé ont été immergés dans un bain-marie maintenu à une température approximative de 50 °C jusqu'à ce que les structures cristallines soient complètement dissoutes, facilitant ainsi la formation d'une solution homogène. Par la suite, le réfractomètre a été étalonné avec de l'eau distillée pour garantir des mesures précises. Après le processus d'homogénéisation, une gouttelette de miel a été appliquée sur le prisme de l'instrument et l'indice Brix a été enregistré directement conformément aux spécifications du fabricant (Koudegnan *et al.*, 2021). Entre les mesures successives, le prisme a été méticuleusement nettoyé avec du papier Joseph pour éviter toute contamination croisée potentielle entre les échantillons.

3.2. pH

Peser 10 g de miel dans un bécher propre, puis ajouter 75 mL d'eau distillée pour chaque échantillon. Homogénéiser soigneusement le mélange à l'aide d'une spatule jusqu'à dissolution complète du miel. Ensuite, mesurer le pH de la solution obtenue à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné avec des solutions tampons de pH 7 et pH 4. (Achour et Khali, 2014) Les mesures sont réalisées à température ambiante et chaque analyse est effectuée en triplicat afin d'assurer la reproductibilité des résultats.



Figure 5 : pH metre

3.3. Conductivité

Peser environ 6 g de miel dans un bécher propre, puis ajouter 50 mL d'eau distillée chauffée. Homogénéiser soigneusement le mélange jusqu'à dissolution complète du miel. La solution obtenue est ensuite maintenue à une température constante de 25 °C avant la mesure.

II. PARTIE EXPERIMENTALE

La conductivité électrique est déterminée à l'aide d'un conductimètre préalablement étalonné avec une solution standard appropriée. L'électrode est rincée à l'eau distillée puis immergée dans la solution de miel, et la valeur de la conductivité est enregistrée en $\mu\text{S}/\text{cm}$. (Achour et Khali, 2014) Toutes les mesures sont réalisées à température ambiante et en triplicat afin d'assurer la précision et la reproductibilité des résultats.

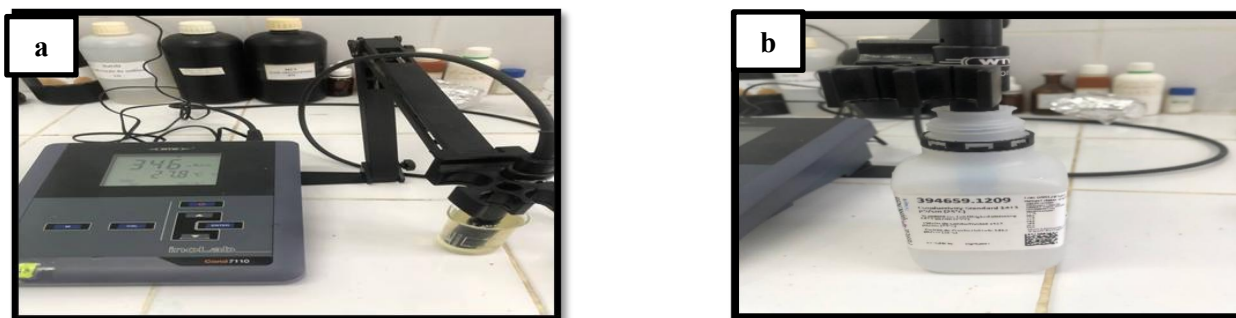


Figure 6 : Mesure de la conductivité par conductimètre,

a) dispositif de l'appareillage b) solution standard d'étalonnage de conductimètre

4. Analyse Microbiologie

4.1. Préparation de solution mère et des dilutions décimales



Figure 7 : Préparation des échantillons pour fermentation en milieu lait

Les analyses microbiologiques ont été réalisées à partir de quatre échantillons de miel ainsi que d'autres produits de la ruche, notamment le pollen frais, la propolis, le pain d'abeille et la gelée royale. Dans des conditions aseptiques, 1 g de chaque échantillon a été pesé à l'aide d'une balance analytique puis introduit dans un tube stérile contenant 9 mL de lait stérile pour fermentation

II. PARTIE EXPERIMENTALE

Le mélange obtenu a ensuite été homogénéisé au moyen d'un agitateur de type vortex afin d'obtenir une suspension homogène correspondant à la solution mère.

À partir de cette solution mère, une série de dilutions décimales successives a été préparée. Pour cela, 1 mL de la dilution précédente a été transféré aseptiquement dans un tube contenant 9 mL de eau physiologique stérile, puis homogénéisé au vortex. La même procédure a été répétée successivement jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-5}

À partir de cette solution mère, une série de dilutions décimales successives a été préparée. Pour cela, 1 mL de la dilution précédente a été transféré aseptiquement dans un tube contenant 9 mL de eau physiologique stérile, puis homogénéisé au vortex. Cette opération a permis d'obtenir la dilution 10^{-2} . Le même procédé a été répété successivement jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-5}

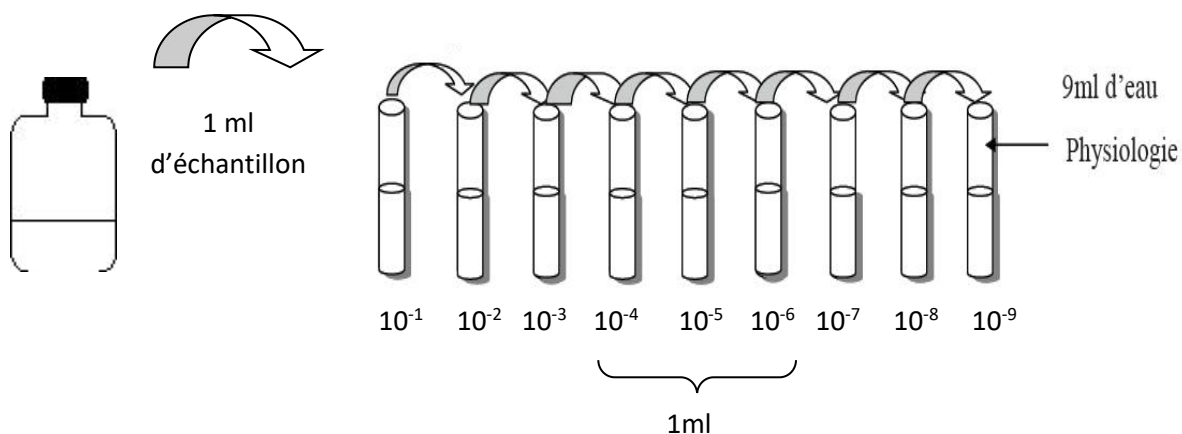


Figure 8 : Schéma représentatif de préparation des dilutions

Ces dilutions ont été utilisées pour l'isolement des microorganismes présents dans les différents produits de la ruche

4.2. Isolement des bactéries lactique

Après avoir dilué les échantillons, l'isolement des bactéries lactiques a été réalisé selon deux techniques : la méthode d'ensemencement en surface (étalement) et la méthode en profondeur (en masse).

Pour la méthode en surface, 0,1 mL de chaque dilution d'échantillon (10^{-1} jusqu'à 10^{-5}) a été prélevé et transféré aseptiquement dans des boîtes de Petri stériles contenant un milieu sélectif spécifique aux bactéries lactiques (MRS ou M17), préalablement préparé et solidifié.

L'inoculum a ensuite été étalé uniformément à la surface du milieu à l'aide d'un étaioir stérile, afin de permettre une distribution homogène des micro-organismes. Cette opération a été répétée pour l'ensemble des échantillons dans des conditions d'asepsie strictes.

Concernant la méthode en profondeur, 1 mL de chaque dilution a été introduit dans des boîtes de Petri stériles vides. Ensuite, le milieu de culture, maintenu à une température tiède afin d'éviter tout choc thermique, a été ajouté. Le mélange a été homogénéisé délicatement par des mouvements en forme de huit « 8 » afin de bien répartir les microorganismes dans la masse du milieu gélosé. Cette procédure a également été répétée pour tous les échantillons.

Enfin, l'ensemble des boîtes de Petri a été incubé à 30 °C pendant 48 heures afin de permettre la croissance et le développement des colonies de bactéries lactiques, en vue de leur isolement et de leur caractérisation ultérieure.

Après incubation des boîtes de Pétri, les colonies présumées appartenant aux bactéries lactiques ont été sélectionnées.

Après la période d'incubation, une sélection de cinq (02) colonies caractéristiques des bactéries lactiques de chaque échantillon (en tenant compte des caractéristiques morphologiques des colonies : forme, taille, pigmentation, contour et viscosité) est choisie au hasard

Les colonies développées en profondeur dans la gélose ont été prélevées aseptiquement à l'aide d'une anse de platine stérile, puis repiquées dans des tubes contenant du bouillon MRS afin de réaliser un enrichissement bactérien. Les tubes ont ensuite été incubés à 30 °C pendant 24 à 48 heures afin de favoriser la multiplication des bactéries et d'obtenir des cultures pures destinées aux différentes analyses de caractérisation.

4.3. Purification

Le processus de purification a été effectué par transferts successifs, impliquant une série de transplantations pour chaque isolat individuel. La purification des souches bactériennes consiste à les inoculer en stries sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose MRS et M17, soumises à une température d'incubation de 30 °C pendant 72 heures dans des conditions anaérobies. Cette procédure est réitérée jusqu'à ce que l'émergence de colonies pures soit atteinte.

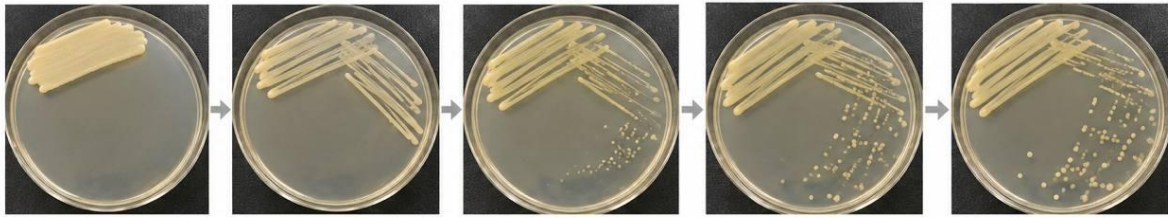


Figure 9 : Technique de repiquage par stries sur milieu solide

4.4. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures constitue une étape préliminaire essentielle dans l'étude des isolats microbiens obtenus. Il consiste en une observation visuelle directe des colonies développées sur les géloses MRS et M17. Cette analyse permet de caractériser les colonies selon plusieurs critères phénotypiques, notamment la taille, la forme, les bords, la texture, ainsi que la pigmentation et l'aspect général (lisse, muqueux ou rugueux).

4.5. Examen microscopique

La coloration de Gram a été effectuée afin de distinguer la structure de la paroi cellulaire des bactéries isolées et de les classer en Gram positif ou Gram négatif. Après incubation, cinq colonies représentatives ont été sélectionnées pour l'analyse.

À l'aide d'une anse stérile, une petite quantité de chaque colonie isolée a été prélevée puis déposée sur une lame microscopique propre. Étant donné que les cultures proviennent d'un milieu solide, une goutte d'eau distillée stérile a été ajoutée afin de faciliter la dispersion des cellules. L'échantillon a ensuite été étalé de manière homogène pour former un frottis mince. Celui-ci a été laissé à sécher à l'air libre, puis fixé par passage rapide de la lame trois fois au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

Le frottis fixé a été recouvert de violet de gentiane pendant 1 minute, puis rincé délicatement à l'eau distillée. Ensuite, la lame a été traitée avec une solution de lugol pendant 1 minute afin de former le complexe colorant. Après rinçage, une étape de décoloration a été réalisée à l'aide d'éthanol à 95 % pendant environ 15 secondes, suivie d'un rinçage immédiat à l'eau. Enfin, une contre-coloration à la safranine a été appliquée pendant 1 minute, puis la lame a été rincée et laissée sécher à l'air libre avant observation microscopique.

4.6. Tests biochimiques

4.6.1. test enzyme de la catalase

Le test de la catalase est une méthode qualitative utilisée pour détecter la présence de l'enzyme catalase chez les bactéries. Cette enzyme permet de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène, ce qui se manifeste par un dégagement gazeux visible.



La réalisation du test consiste à déposer une goutte de solution de peroxyde d'hydrogène (à 3%) sur une lame de verre propre et sèche. À l'aide d'une pipette pasteur, une colonie bactérienne fraîche et bien isolée est prélevée puis mise en contact direct avec la goutte d'eau oxygénée.

L'observation est immédiate : la formation de bulles ou d'une effervescence indique un résultat positif traduisant la présence de l'enzyme catalase. En revanche, l'absence de réaction signifie un résultat négatif.

4.6.2. Hydrolyse Arginine sur milieu M16-bcp

La capacité des bactéries lactiques à hydrolyser l'arginine a été étudiée sur milieu M16-BCP, un milieu permettant la mise en évidence de l'activité de l'enzyme arginine dihydrolase (ADH), impliquée dans la dégradation de l'arginine et la production de composés alcalins tels que l'ammoniac (Thomas, 1973). Les isolats ont été ensemencés par stries à la surface du milieu à l'aide d'une anse stérile, puis incubés à 30 °C pendant 48 à 72 heures en conditions d'anaérobiose. Après incubation, les souches dépourvues de l'activité ADH fermentent principalement le lactose, ce qui provoque une acidification du milieu accompagnée d'une coloration jaune. En revanche, les souches capables d'utiliser l'arginine produisent des métabolites alcalins qui neutralisent l'acidité du milieu et maintiennent sa coloration initiale (Badis *et al.*, 2004). Ce test constitue un critère phénotypique couramment utilisé dans la caractérisation des bactéries lactiques.

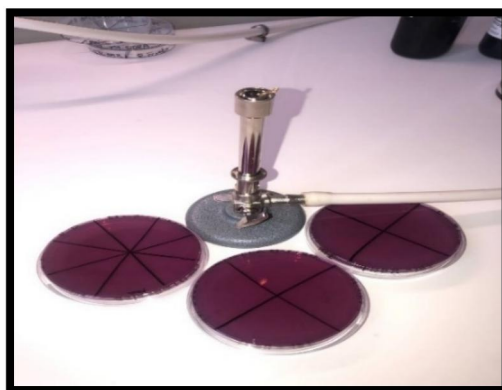


Figure 10 : Test d'hydrolyse de l'arginine sur milieu M16B

4.6.3. Hydrolyse bile esculine

La résistance à la bile et l'hydrolyse de l'esculine ont été évaluées sur le milieu BEA contenant des sels biliaries et de l'esculine. Ce test repose sur la capacité des souches à croître en présence de bile et à hydrolyser l'esculine en esculetine, laquelle réagit avec les ions ferriques du milieu en produisant une coloration brun-noir caractéristique (Lindell et Quinn, 1975). Après ensemencement et incubation à 30 °C pendant 24 à 48 heures, la croissance accompagnée d'un noircissement du milieu a été considérée comme un résultat positif et les isolats sont dit bile (+) et esculine (+), tandis si il y'a une croissance et absence de coloration noir est interprétée comme des isolats bile (+) et esculine (-).

4.6.4. Type fermentaire

Le type fermentaire des isolats a été testé sur milieu MRS liquide additionné d'une cloche de Durham, ce qui permet de distinguer les isolats homofermentaires des hétérofermentaires. Les tubes sont ensemencés avec une culture bactérienne jeune d'isolats, puis on les incube à 30 °C pendant 48-72 heures.

4.6.5. Test de croissance en différent pH et température

Les isolats lactiques étudiés ont été introduits dans des tubes à essai contenant du milieu de bouillon MRS.

Étude du pH sur la croissance des isolats

Trois tubes à essai distincts de bouillon MRS ont été préparés, chacun présentant des niveaux de pH distincts : pH 4, pH 6 et pH 9.

Chaque tube a été inoculé avec la souche bactérienne puis incubé pendant 24 heures.

Étude de température sur la croissance des isolats

Des tubes à essai remplis de bouillon MRS ont été inoculés avec la même souche bactérienne puis soumis à une incubation à différentes températures : 15 °C, 30 °C et 45 °C.

Après la période d'incubation, la prolifération bactérienne a été évaluée par la manifestation de turbidité dans les tubes.

4.7. Test de fermentation des carbohydrate

4.7.1. Préparation des solutions glucidiques (tyndallisation)

Treize (13) solutions de sucre a été préparées en dissolvant 1 g de chaque sucre dans 10mL d'eau distillée stérile. chaque sucre a été préparés séparément, puis stérilisés par tyndallisation au bain-marie à 75 °C pendant 30 minutes. Ce procédé a été répété pendant trois jours successifs afin d'assurer une stérilisation efficace des solutions.



Figure 11 : Tyndallisation des sucres au bain marie

4.7.2. Préparation de la suspension bactérienne

La suspension bactérienne a été obtenue à partir des cultures en bouillon MRS. Un volume de culture a été transféré dans des tubes Eppendorf, puis soumis à trois cycles de centrifugation successifs (centrifugation à 6000 g/min pendant 5 min). Après chaque centrifugation, un lavage a été effectué à l'aide d'eau distillée stérile afin d'éliminer les résidus du milieu de culture. Après le dernier cycle, le culot bactérien obtenu a été récupéré puis remis en suspension dans de l'eau physiologique stérile afin d'obtenir une suspension homogène.



Figure 12 Centrifugation des échantillons

4.7.3. Test d'utilisation des sucres en microplaque

Le test de fermentation des carbohydrates a été réalisé dans des microplaques. Les deux premières rangées ont été réservées aux témoins : la première ligne contenait uniquement le milieu MRS-BCP (exempte d'extrait de viande et de glucose) , tandis que la deuxième contenait le milieu MRS-BCP additionné du sucre correspondant, sans inoculation bactérienne.

Dans les autres puits, le milieu MRS-BCP a été distribué en premier, suivi de la solution glucidique puis de la suspension bactérienne préalablement préparée. Après remplissage de l'ensemble des puits, 50 μ l d'huile de paraffine stérile a été ajoutée afin de recouvrir la surface de puit et de maintenir des conditions favorables à la fermentation en anaérobiose. Les microplaques ont ensuite été incubées à 30 °C pendant 24 à 48 heures. Les résultats ont été interprétés en fonction des modifications de couleur observées dans les puits, indiquant la capacité des isolats à fermenter les différents sucres.

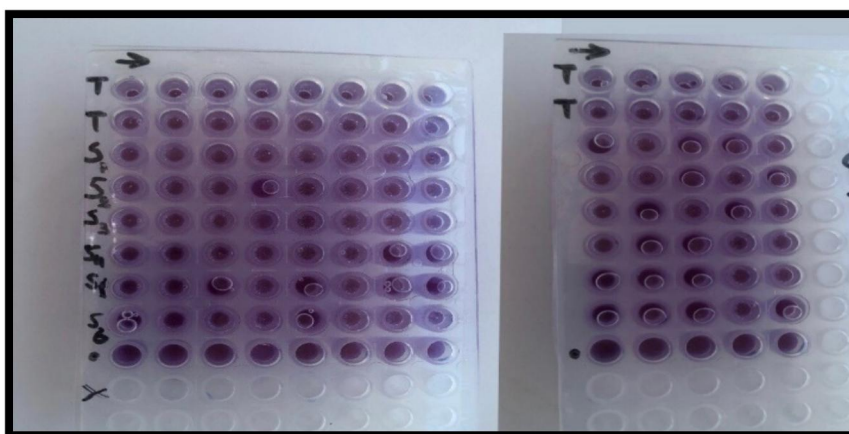


Figure 13 :Test des sucres par la méthode de la galerie API classique

4.8. Conservation des isolats bactériens

Les isolats bactériens ont été conservés dans du lait écrémé stérile afin de préserver leur viabilité.

Pour cela, les suspensions bactériennes ont été transférées dans des microtubes de type eppendorf contenant du lait écrémé stérile, puis homogénéisées soigneusement. Les microtubes ont ensuite été stockés au congélateur à 4 °C pour assurer la conservation des souches



Résultats et discussion



1. Résultats des Analyses physico-chimique

1.1. Détermination de l'indice de réfraction des échantillons de miel

Les résultats obtenus (tableau 4) pour l'indice de réfraction des échantillons de miel ont montré des valeurs très proches comprises entre 1,494 et 1,497, traduisant une homogénéité des échantillons étudiés.

Tableau 4 : Indice de réfraction des échantillons de miel

Echantillon de miel	Indice de réfraction
Echantillon 1	1,4925
Echantillon 2	1,494
Echantillon 3	1,495
Echantillon 4	1,4975

Cette similarité des valeurs reflète une composition physicochimique relativement stable, notamment en ce qui concerne la teneur en sucres, constituants majeurs du miel. Les faibles variations observées entre les échantillons peuvent être attribuées à de légères différences dans la concentration des matières solubles ou dans la teneur en eau. Toutefois, ces écarts restent minimes et non significatifs. Globalement, les résultats obtenus indiquent une bonne qualité ainsi qu'une stabilité des caractéristiques physicochimiques des miels analysés.

1.2 pH des échantillons de miel

Les résultats obtenus (tableau 5) montrent que les échantillons de miel présentent un pH acide variant entre 3,504 et 4,190. Cette acidité est une caractéristique naturelle du miel, principalement liée à la présence d'acides organiques tels que l'acide gluconique.

Tableau 5 : les résultats de mesure de pH

Echantillon de miel	pH
Echantillon 1	3,504
Echantillon 2	3,869
Echantillon 3	4,190
Echantillon 4	3,994

Les valeurs enregistrées indiquent que les différents échantillons possèdent une bonne stabilité microbiologique, puisque le pH acide limite le développement de nombreux microorganismes indésirables. L'échantillon 03 a présenté la valeur de pH la plus élevée (4,190), tandis que l'échantillon 01 a montré le pH le plus faible (3,504). Ces variations peuvent être expliquées par l'origine florale, les conditions de récolte ou encore la composition chimique propre à chaque miel

1.3. Conductivité électrique des échantillons de miel

Les résultats obtenus (tableau 06) montrent que la teneur en eau des échantillons de miel varie entre 15,6 % et 17,6 %, des valeurs conformes aux normes de qualité et indiquant une faible probabilité de fermentation.

Tableau 6 : Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de miel

Echantillon	Eau %	Matière sèche %	Conductivité $\mu\text{S}/\text{cm}$	Température	conductivité
Ech 1	17,6	82,4	223	25,8	6,06
Ech 2	17,0	83,0	346	27,8	6,02
Ech 3	16,6	83,4	309	27,5	5,99
Ech 4	15,6	84,4	328	27,3	5,92

La matière sèche varie entre 82,4 % et 84,4 %, traduisant une richesse importante en composés solides du miel. La conductivité électrique est comprise entre 223 $\mu\text{S}/\text{cm}$ et 346,4 $\mu\text{S}/\text{cm}$, avec la valeur la plus élevée observée pour l'échantillon

ECH02, ce qui peut refléter une teneur plus importante en sels minéraux et substances ioniques

2. Résultats de l'analyse microbiologique

2.1. Résultats d'isolement et de purification des bactéries lactiques

Après l'incubation des échantillons sur des milieux de culture MRS et M17 agar, diverses colonies bactériennes ont été discernées dans chaque échantillon de produit de la ruche. Les colonies observées présentaient diverses caractéristiques macroscopiques concernant leur morphologie, leurs dimensions et leur aspect général, suggérant ainsi la présence d'une diversité bactérienne au sein des échantillons analysés (figure 14).

Deux (02) types de colonies distincts ont été aléatoirement choisis pour les procédures de purification ultérieures. Les souches sélectionnées ont été transférées successivement sur la gélose MRS ou M17 (selon le milieu d'isolement) pour obtenir des cultures pures, qui sont destinées à d'autres investigations microbiologiques, morphologiques et biochimiques.

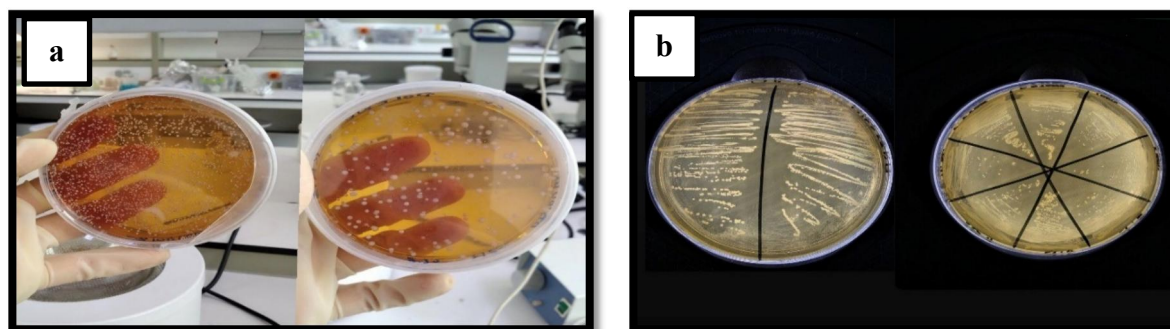


Figure 14 : Aspect des colonies après isolement et purification sur milieu MRS.
a) Aspect des colonies sur gélose MRS b) colonies purifiées sur gélose MRS

2.2. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des isolats bactériens obtenus sur milieux MRS et M17 a révélé la présence de colonies présentant des caractéristiques typiques des bactéries lactiques (figure 15). Les colonies observées étaient généralement de petite taille, à aspect lisse, de forme circulaire à lenticulaire, avec des bords réguliers et bien définis. La pigmentation était majoritairement blanchâtre à crème, sans production de pigments diffusibles dans le milieu. Certaines colonies présentaient également un aspect légèrement muqueux, traduisant une production variable d'exopolysaccharides.

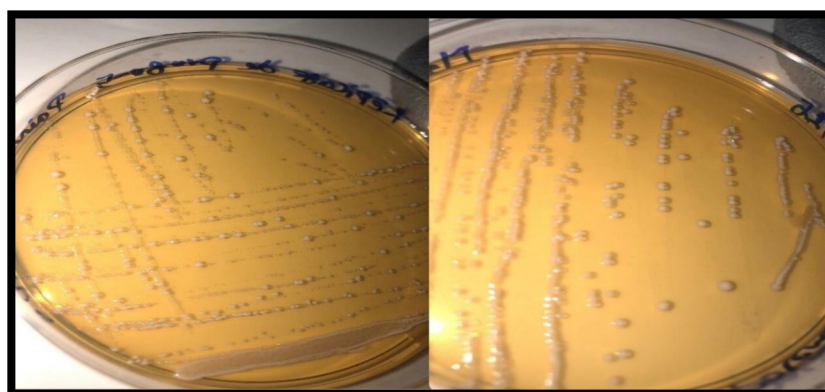


Figure 15 : Aspect macroscopique des isolats sur gélose MRS

2.3. Examen microscopique

Après réalisation de la coloration de Gram et observation au microscope optique à immersion (objectif 100×) (figure 16). Les isolats lactiques ont présenté une coloration violette, caractéristique des bactéries Gram positives. Cette coloration traduit la rétention du complexe cristal violet–iode par une paroi cellulaire riche en peptidoglycane, indiquant une structure pariétale épaisse. L’observation microscopique a également révélé des cellules de forme arrondie (cocci), disposées isolément, en paires (diplocoques) ou parfois en courtes chaînes selon les champs observés.

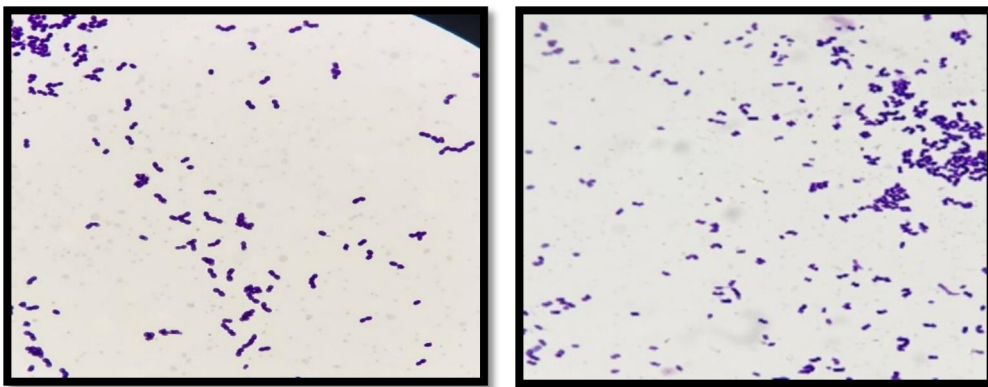


Figure 16 : Aspect microscopique des isolats

3. Résultats des tests biochimiques

3.1. Test catalase

Le test de la catalase réalisé sur les différents isolats a montré une absence totale de réaction d’effervescence après l’ajout de peroxyde d’hydrogène (H_2O_2). Cette absence de formation de bulles indique que les souches étudiées ne possèdent pas l’enzyme catalase, ce qui permet de conclure que tous les isolats sont catalase négative. Ce résultat est conforme aux caractéristiques générales des bactéries lactiques.

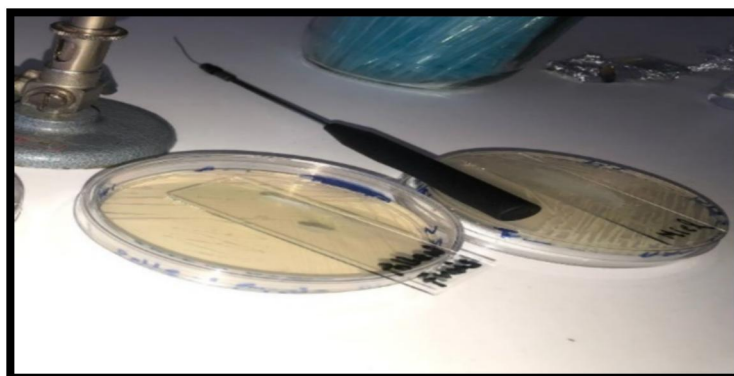


Figure 17 : Test de catalase

3.2. Hydrolyse d'arginine

Lors du test de dégradation de l'arginine sur milieu M16 BCP, on a remarqué une croissance avec aucun changement de couleur du milieu vers le jaune n'a été observé pour les échantillons de pollen et de gelée royale, indiquant un résultat positif. Cela signifie que les souches étudiées possèdent l'activité enzymatique de l'arginine déshydrolase et sont donc capables de dégrader l'arginine dans les conditions expérimentales utilisées. Cette activité enzymatique entraîne la libération d'ammoniac (NH_3), provoquant une augmentation du pH du milieu et, par conséquent, l'indicateur de pH va rétablir sa coloration vers le pourpre.

En revanche, un changement de couleur du milieu a été observé pour les échantillons de miel de sidra, de pain d'abeille et de miel ibl hrml, traduisant une réaction négative. Cette modification de la couleur vers le jaune du milieu témoigne de la dégradation de sucre par les isolat.

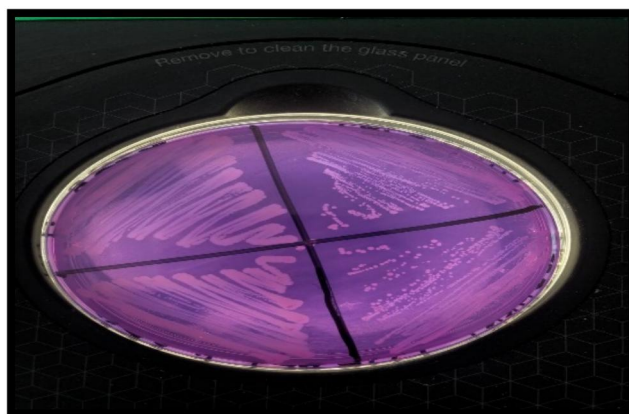


Figure 18 : résultats du test d'ADH positive



Figure 19 : Résultats du Test d'ADH négative

3.3. Résistance a la bile et hydrolyse esculine

Lors du test de résistance à la bile et d'hydrolyse de l'esculine, un changement de couleur du milieu avec apparition d'une coloration noirâtre a été observé pour les échantillons de miel de sidr et de miel ibl harmel, indiquant un résultat positif. Cette modification traduit l'hydrolyse de l'esculine par les souches bactériennes grâce à la production de l'enzyme β -glucosidase, conduisant à la formation d'esculetine qui réagit avec les ions ferriques du milieu. En revanche, aucune modification de couleur n'a été observée dans les échantillons de pain d'abeille, de pollen et de gelée royale, ce qui indique un résultat négatif pour ces souches.

3.4. Type fermentaire

Les résultats du test de type fermentaire réalisé à l'aide des cloches de Durham ont montré une production de gaz chez les six isolats étudiés. La présence de bulles gazeuses dans les cloches indique une activité fermentaire hétérofermentaire, traduisant la capacité des souches à fermenter les substrats glucidiques avec production de dioxyde de carbone (CO_2).

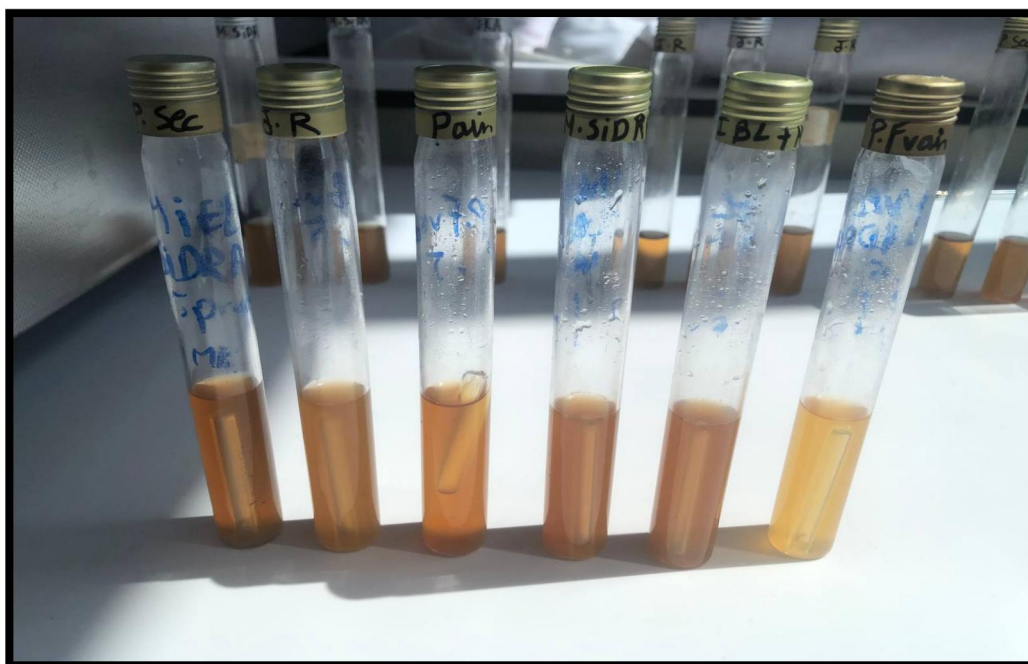
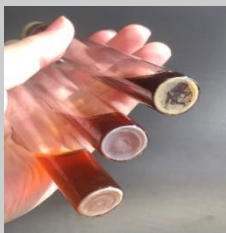
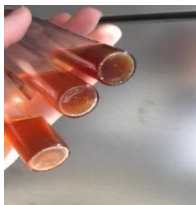
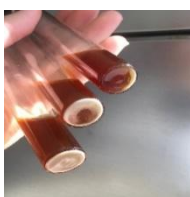


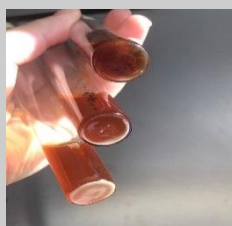
Figure 20 :Type fermentaire sur milieu MRS liquide contenant la cloche de durham.

3.5 Croissance des isolats à différents pH et température

Le tableau (7) récapitule les résultats de la croissance en différents pH et différentes températures pour les isolats étudiées

Tableau 7 : Effet de la température et du pH sur la croissance des isolats bactériens

Échantillons	15°C	30°C	45°C	Résultat	pH 4	pH 6	pH 9	Résultat
Pain d'abeille	+	+	-		+	+	+	
Polène frais	+	+	-		+	+	+	
Miel IBL+HARML	+	+	-		+	+	+	
Miel de sidra	+	+	+		+	+	+	

Gelée royale	+	+	+		+	+	-	
Poléne sec	+	+	+		+	+	+	

(+) : croissance observée. (-) : absence de croissance

3.6. Fermentation des carbohydrates

Les six souches bactériennes isolées à partir de différentes sources naturelles (pollen frais, pain, miel, gelée royale et pollen sec) ont été soumises à des tests de fermentation de 13 sucres différents à l'aide d'un milieu MRS sans glucose additionné de l'indicateur BCP. Toutes les souches étudiées ont présenté une réaction Gram positive et une activité catalase négative, caractéristiques des bactéries lactiques. Les colonies observées étaient de forme ronde avec une coloration blanchâtre. Les résultats de fermentation (Tableau 8 et figure 21) montrent une variation dans la capacité des souches à utiliser les différents glucides. La majorité des souches ont fermenté le glucose, le fructose, le lactose, le maltose et le saccharose, indiquée par un changement de couleur du milieu du violet vers le jaune. En revanche, certains sucres comme le rhamnose, le sorbitol ou l'amidon ont montré des réactions variables selon les souches. Cette diversité métabolique suggère une variabilité physiologique entre les isolats et pourrait indiquer l'appartenance à différents genres ou espèces de bactéries lactiques.

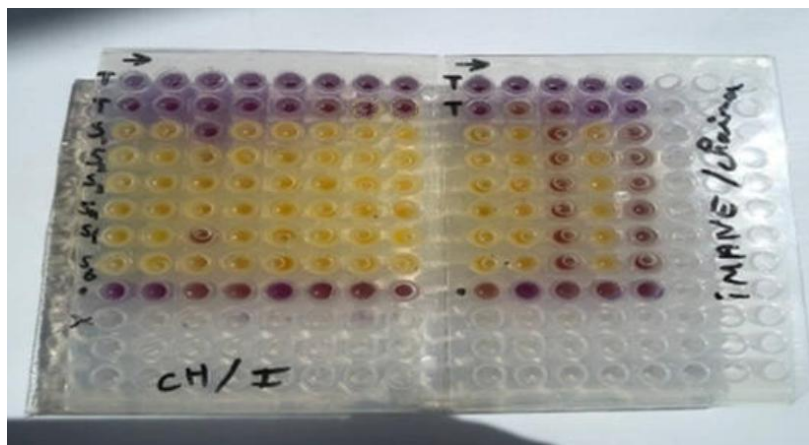


Figure 21 : Résultats du test de fermentation des sucres

Tableau 8 : résultats de croissance en différentes températures, pH et fermentation des sucres

Isolat	Croissance à différentes températures			Croissance à différents pH			Fermentation des glucides												
	15°C	30°C	45°C	pH 4	pH 6	pH 9	Glucose	Mannitol	Sorbitol	Rhamnose	Arabinose	Amidon	Xylose	Saccharose	Maltose	Galactose	Lactose	Fructose	Tréhalose
Pollen frais	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Miel (Jujubier + Harmel)	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pain d'abeille	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Miel de Sidr	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelée royale	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Pollen sec	/	/	/	/	/	/	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) présence de croissance ou fermentation ; (-) absence de croissance ou fermentation ; / (test non réalisé pour cet isolat).



L'objectif principal de cette étude est l'isolement et l'identification des bactéries lactiques des produits de la ruche et ainsi l'analyse de la qualité de miel de quatre échantillons de miel et d'autres produits apicoles (Gellé royale, pain d'abeille, pollen). Les analyses physicochimiques préalables ont révélé une bonne qualité globale et une maturité adéquate des matrices, avec des indices de réfraction homogènes (1,492 à 1,497) (Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2021). Les valeurs de pH, variées entre 3,504 (miel de sidra) et 4,190 (miel multifloral), s'inscrivent dans la fourchette normative (3,2–4,5). Cette acidité, due principalement à l'acide gluconique, constitue un facteur clé de défense antimicrobienne intrinsèque (Ozbilge *et al.*, 2024). De plus, les teneurs en eau (15,6 % à 17,6 %) restent inférieures au seuil de 20 % fixé par le Codex Alimentarius, ce qui prévient toute fermentation indésirable par les levures osmophiles (Codex alimentarius, 2001). Enfin, la conductivité électrique (223 à 346 $\mu\text{S}/\text{cm}$) reflète fidèlement la richesse en minéraux et en acides organiques des échantillons (Achour et Khali, 2014).

L'ensemencement sur les milieux sélectifs MRS et M17 en conditions d'anaérobiose (30 °C pendant 48 h) a permis d'isoler des colonies bactériennes à partir de l'ensemble des produits analysés, confirmant ainsi leur premier critère d'appartenance au groupe des BAL (Vásquez et Olofsson, 2009). L'examen macroscopique a révélé un profil morphologique homogène, caractérisé par de petites colonies circulaires à lenticulaires, de texture lisse et de couleur blanchâtre à crème. L'aspect légèrement muqueux de certaines souches témoigne d'une production d'exopolysaccharides (EPS) aux propriétés bioprotectrices (Ruas-Madiedo et De Los Reyes-Gavilán, 2005). Après purification, l'évaluation phénotypique a montré que tous les isolats sont Gram positifs et présentent une morphologie de cocci agencés isolément, en courtes chaînes ou en paires (diplocoques), ce qui oriente vers des genres comme *Lactococcus* et *Pediococcus* ou *Leuconostoc*. De plus, la négativité absolue au test de la catalase confirme définitivement leur identité en tant que BAL strictes (De Vos et Garrity, 2009). Les tests enzymatiques différentiels ont mis en évidence une variabilité selon l'origine des isolats. Le test de l'arginine dihydrolase (ADH) s'est révélé positif pour les souches des miels et du pain d'abeille, suggérant l'appartenance aux genres *Leuconostoc*, tandis que les isolats de pollen et de gelée royale sont restés négatifs et peuvent être attribués aux genres *Lactococcus* ou *Enterococcus*. De même, le test bile-esculine a été positif uniquement pour les isolats de miels, indiquant une tolérance aux sels biliaires et une activité β -glucosidase caractéristiques du genre *Enterococcus* (Rossi, 2023).

Cette capacité à tolérer la bile représente un critère fonctionnel crucial pour la sélection de souches probiotiques candidates. Concernant le type fermentaire, la totalité des six isolats a produit du gaz (CO₂) dans les cloches de Durham, attestant d'un métabolisme exclusivement hétérofermentaire via la voie de la phosphocétolase. Ce profil est en parfaite adéquation écologique avec les matrices de la ruche, riches en fructose et en pentoses, et joue un rôle majeur dans la maturation et la conservation du pain d'abeille (Filannino *et al.*, 2019). L'évaluation thermique montre deux comportements distincts : les souches de pain d'abeille, de pollen frais et de miel multifloral se limitent à un profil psychrotrophile à mésophile (15 et 30 °C), alors que celles du miel de sidra, du pollen sec et de la gelée royale tolèrent une température de 45 °C, révélant un caractère thermotolérant. Au niveau du pH, la quasi-totalité des souches fait preuve d'une euryphilie acido-basique en croissant à pH 4, 6 et 9, s'adaptant ainsi aux gradients de pH naturels de la ruche. La viabilité observée à pH 4 est particulièrement intéressante sur le plan probiotique, car elle indique une résistance essentielle aux conditions gastriques (Pelka *et al.*, 2025).

Enfin, les profils de fermentation sur 13 sucres confirment une grande diversité métabolique. Les sucres majoritaires (glucose, fructose, lactose, maltose et saccharose) ont été fermentés de manière quasi systématique, validant la spécialisation enzymatique de ces bactéries envers le fructose, sucre dominant de leur habitat naturel (Olofsson et Vásquez, 2008).

Les réponses variables obtenues pour le rhamnose, le sorbitol et l'amidon témoignent de dotations enzymatiques distinctes et suggèrent fortement le caractère multispécifique de la collection, ce qui nécessite une confirmation ultérieure par galerie API50chl (50 sucres) et par séquençage du gène de l'ARNr 16S (Clarridge, 2004).

En conclusion, l'ensemble des analyses phénotypiques, tinctoriales et biochimiques menées dans cette étude converge vers l'identification préliminaire d'une collection bactérienne exclusivement composée de cocci à Gram positif et catalase négative, confirmant leur appartenance absolue au groupe des bactéries lactiques (BAL). L'absence totale de formes bacillaires dans nos observations restreint l'orientation taxonomique vers les genres cocciques de l'ordre des Lactobacillales. De plus, les variations observées lors des tests enzymatiques (ADH, bile-esculine), environnementaux (tolérance au pH et à la température) et nutritionnels (profils de fermentation des glucides) révèlent le caractère multispécifique de cette collection. Ces critères phénotypiques orientent fortement vers des genres de cocci lactiques stricts et hétérofermentaires adaptés à l'écosystème *apicole*, tels que les *Leuconostoc* Hétérofermentaires.

(notamment *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*.), *Lactococcus* (notamment *L. lactis* ou *L. garvieae*) et certains *Enterococcus*. Bien que ces caractéristiques biochimiques offrent une orientation taxonomique solide, une confirmation définitive par séquençage du gène de l'ARNr 16S reste indispensable pour identifier avec certitude les différentes espèces et souches de cette collection.



Conclusion

Le présent travail avait pour objectif l'isolement et la caractérisation phénotypique et biochimique des bactéries lactiques (BAL) associées à six produits de la ruche — miel, propolis, pollen frais, pollen sec, pain d'abeille et gelée royale, et l'évaluation conjointe de la qualité physicochimique des miels analysés. Il s'inscrit dans un contexte scientifique en plein essor, celui de la valorisation microbiologique des produits apicoles algériens, dont le potentiel biotechnologique reste insuffisamment documenté.

Les analyses physicochimiques réalisées sur les quatre échantillons de miel ont démontré leur conformité aux normes de qualité en vigueur. Les indices de réfraction (1,492–1,497), les pH acides (3,504–4,190), les faibles teneurs en eau (15,6–17,6 %) et les conductivités électriques (223–346 $\mu\text{S}/\text{cm}$) témoignent de l'authenticité et de la stabilité microbiologique des miels analysés, en accord avec les travaux récents sur les miels algériens aux différences d'origine florale des miels étudiés, soulignant l'importance de l'analyse physicochimique comme outil de caractérisation et d'authentification.

Sur le plan microbiologique, l'isolement sélectif sur milieux MRS et M17 a permis d'obtenir six isolats à partir de l'ensemble des matrices apicoles analysées. Leur caractérisation phénotypique a confirmé leur appartenance au groupe des bactéries lactiques sur la base des critères suivants : morphologie cocci Gram positive avec présence de diplocoques, catalase négative, et profil hétérofermentaire. La présence de diplocoques, en particulier, oriente l'identification vers les genres *Leuconostoc*, *Lactococcus* ou *Enterococcus*. L'étude des critères biochimiques a révélé une hétérogénéité fonctionnelle notable entre les isolats selon leur source d'origine : activité ADH positive pour les souches du miel et du pain d'abeille (compatibles avec *Leuconostoc*), résistance à la bile et hydrolyse de l'esculine exclusives aux isolats des miels, et fermentation préférentielle du fructose, glucose, lactose, maltose et saccharose par la majorité des souches. Ces résultats, pris dans leur ensemble, sont cohérents avec la composition glucidique particulière des matrices apicoles et avec les données disponibles dans la littérature récente sur les BAL de la ruche. La tolérance à une large gamme de pH (4–9 pour la majorité des isolats) et de températures (15–45 °C pour certaines souches) ouvre des perspectives fonctionnelles prometteuses. La résistance au pH acide satisfait notamment l'un des critères de présélection *in vitro* des souches probiotiques suggérant que certains isolats pourraient présenter un intérêt pour des applications dans la

Conclusion

santé humaine ou animale, ou comme agents de bioconservation dans les filières agroalimentaires

En définitive, ce travail apporte une contribution à la connaissance de la diversité des bactéries lactiques associées aux produits apicoles , et s'inscrit dans une démarche scientifique visant à valoriser les ressources microbiologiques local à fort potentiel applicatif dans les domaines de l'agroalimentaire et de l'apithérapie.

Référence bibliographique

Références bibliographiques

- Achour, H. Y., & Khali, M. (2014). Composition physicochimique des miels algériens. Détermination des éléments traces et des éléments potentiellement toxiques. *Afrique Science: Revue Internationale Des Sciences Et Technologie*, 10(2).
- Al-Kafaween, M. A., Alwahsh, M., Mohd Hilmi, A. B., & Abulebdah, D. H. (2023). Physicochemical characteristics and bioactive compounds of different types of honey and their biological and therapeutic properties: A comprehensive review. *Antibiotics*, 12(2), 337.
- Albanese, G., Giurgiu, A. I., Urcan, A. C., Paşca, C., Ternar, T. N., Bonta, V., Di Criscio, D., Iorizzo, M., De Cristofaro, A., & Dezmirean, D. S. (2026). Probiotic Assessment of Lactic Acid Bacteria Strains and Consortia for Enhancing Honey Bee Health and Nutrition. *Microorganisms*, 14(3), 579.
- Alvarez-Suarez, J. M. (2017). *Bee products-chemical and biological properties*. Springer.
- Amessis-Ouchemoukh, N., Maouche, N., Otmani, A., Terrab, A., Madani, K., & Ouchemoukh, S. (2021). Evaluation of Algerian's honey in terms of quality and authenticity based on the melissopalynology and physicochemical analysis and their antioxidant powers. *Mediterranean journal of nutrition and metabolism*, 14(3), 305–324.
- Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., Walton, A., Jones, B. M., & Corby-Harris, V. (2013). Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 8(12), e83125.
- Anumudu, C. K., Miri, T., & Onyeaka, H. (2024). Multifunctional applications of lactic acid bacteria: Enhancing safety, quality, and nutritional value in foods and fermented beverages. *Foods*, 13(23), 3714.
- Asama, T., Arima, T. H., Gomi, T., Keishi, T., Tani, H., Kimura, Y., Tatefuji, T., & Hashimoto, K. (2015). Lactobacillus kunkeei YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *Journal of applied microbiology*, 119(3), 818–826.
- Attia, Y. A., Abd El-Hack, M. E., Alagawany, M. M., & Elnaggar, A. S. (2025). *Phytogenic and Phytochemical as Alternative Feed Additives for Animal Production*. Bentham Science Publishers.
- Ayed, L., M'hir, S., Nuzzolese, D., Di Cagno, R., & Filannino, P. (2024). Harnessing the health and techno-functional potential of lactic acid bacteria: A comprehensive review. *Foods*, 13(10), 1538.
- Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B. M., Henni, D., & Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21(5), 579–588.
- Bagameri, L., Baci, G.-M., & Dezmirean, D. S. (2022). Royal jelly as a nutraceutical natural product with a focus on its antibacterial activity. *Pharmaceutics*, 14(6), 1142.
- Bakour, M., Fernandes, Â., Barros, L., Sokovic, M., & Ferreira, I. C. (2019). Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties. *Lwt*, 109, 276–282.
- Bakour, M., Laaroussi, H., Ousaaid, D., El Ghouizi, A., Es-Safi, I., Mechchate, H., & Lyoussi, B. (2022). Bee bread as a promising source of bioactive molecules and functional properties: an up-to-date review. *Antibiotics*, 11(2), 203.
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 114–117.
- Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2014). Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 28.
- Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3–15.
- Bava, R., Castagna, F., Lupia, C., Poerio, G., Liguori, G., Lombardi, R., Naturale, M. D., Bulotta, R. M., Biondi, V., & Passantino, A. (2024). Hive products: Composition, pharmacological properties, and therapeutic applications. *Pharmaceutics*, 17(5), 646.

- Bernal-Castro, C., Camargo-Herrera, Á., Gutiérrez-Cortés, C., & Díaz-Moreno, C. (2025). Probiotic and Technological Potential of Native Lactic Acid Bacteria Strains from High Andean Forest Bee Bread: In Vitro Study. *Plant Foods for Human Nutrition*, 80(4), 163.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American college of Nutrition*, 27(6), 677–689.
- Botezan, S., Baci, G.-M., Bagameri, L., Paşca, C., & Dezmirean, D. S. (2023). Current status of the bioactive properties of royal jelly: a comprehensive review with a focus on its anticancer, anti-inflammatory, and antioxidant effects. *Molecules*, 28(3), 1510.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281–370.
- Chelucci, E., Chiellini, C., Cavallero, A., & Gabriele, M. (2023). Bio-functional activities of Tuscan bee pollen. *Antioxidants*, 12(1), 115.
- Chong, F. C., & Chua, L. S. (2020). Effects of solvent and pH on stingless bee propolis in ultrasound-assisted extraction. *AgriEngineering*, 2(2), 308–316.
- Ćirić, J., Haneklaus, N., Rajić, S., Baltić, T., Lazić, I. B., & Đorđević, V. (2022). Chemical composition of bee bread (perga), a functional food: A review. *Journal of Trace Elements and Minerals*, 2, 100038.
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840–862.
- Codex alimentarius. (2001). Revised codex standard for honey. *Codex stan*, 12, 1982.
- De Vos, P., & Garrity, G. M. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer.
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 13(4), 194–199.
- Dew, R. M., McFrederick, Q. S., & Rehan, S. M. (2020). Diverse diets with consistent core microbiome in wild bee pollen provisions. *Insects*, 11(8), 499.
- Dranca, F., Ursachi, F., & Oroian, M. (2020). Bee bread: Physicochemical characterization and phenolic content extraction optimization. *Foods*, 9(10), 1358.
- El Ghouizi, A., Bakour, M., Laaroussi, H., Ousaid, D., El Menyiy, N., Hano, C., & Lyoussi, B. (2023). Bee pollen as functional food: insights into its composition and therapeutic properties. *Antioxidants* 2023; 12: 557. In.
- Ergun, H., Taner, G., Yigit Cinar, A., & YÜCEER, Y. (2024). PHYSICOCHEMICAL, BIOCHEMICAL AND SENSORY CHARACTERIZATION OF BEE BREAD FROM BURSA (TURKIYE) REGION Türkiye'de Bursa bölgesinde An Ekmeginin Fizikokimyasal, Biyokimyasal ve Duyusal Karakterizasyonu. *Uludag Arıcilik Dergisi*, 24(2).
- Filannino, P., Di Cagno, R., Tlais, A. Z. A., Cantatore, V., & Gobbetti, M. (2019). Fructose-rich niches traced the evolution of lactic acid bacteria toward fructophilic species. *Critical reviews in microbiology*, 45(1), 65–81.
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British journal of nutrition*, 109(S2), S35–S50.
- Fratini, F., Cilia, G., Mancini, S., & Felicioli, A. (2016). Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiological research*, 192, 130–141.
- Ghosh, S., Namin, S. M., & Jung, C. (2022). Differential bacterial community of bee bread and bee pollen revealed by 16s rRNA high-throughput sequencing. *Insects*, 13(10), 863.
- Grabek-Lejko, D., & Worek, M. (2024). Honeydew honey as a reservoir of bacteria with antibacterial and probiotic properties. *Antibiotics*, 13(9), 855.
- Guo, J., Wang, Z., Chen, Y., Cao, J., Tian, W., Ma, B., & Dong, Y. (2021). Active components and biological functions of royal jelly. *Journal of Functional Foods*, 82, 104514.
- Holzappel, W. H., & Wood, B. J. (2014). *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. John Wiley & Sons.
- Homrani, M., Escuredo, O., Rodríguez-Flores, M. S., Fatiha, D., Mohammed, B., Homrani, A., & Seijo, M. C. (2020). Botanical origin, pollen profile, and physicochemical properties of Algerian honey from different bioclimatic areas. *Foods*, 9(7), 938.

- Hossain, R., Quispe, C., Khan, R. A., Saikat, A. S. M., Ray, P., Ongalbek, D., Yeskaliyeva, B., Jain, D., Smeriglio, A., & Trombetta, D. (2022). Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. *Chinese medicine*, 17(1), 100.
- Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F.-L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610–19632.
- Hudson, A., Axon, A., Stoneley, A., Kane, C., French, E., Adams, L., Smythe, L., & Iheozor-Ejiofor, P. (2024). Honey risk profile. *FSA Research and Evidence*, 10.
- Iorizzo, M., Letizia, F., Ganassi, S., Testa, B., Petrarca, S., Albanese, G., Di Criscio, D., & De Cristofaro, A. (2022). Functional properties and antimicrobial activity from lactic acid bacteria as resources to improve the health and welfare of honey bees. *Insects*, 13(3), 308.
- Itatani, H., Yamaki, A., Konishi, K., Okamoto, H., Okumura, N., Shigematsu, N., Misumi, S., & Takenaka, S. (2025). Fermented royal jelly enriched with 10-hydroxydecanoic acid and its potential for enhancing mucosal immunity. *Food Science & Nutrition*, 13(2), e70041.
- Kacemi, R., & Campos, M. G. (2023). Translational research on bee pollen as a source of nutrients: A scoping review from bench to real world. *Nutrients*, 15(10), 2413.
- Khalfan Saeed Alwali Alkindi, F., El-Keblawy, A., Lamghari Ridouane, F., & Bano Mirza, S. (2024). Factors influencing the quality of Royal jelly and its components: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 10(1), 2348253.
- Khalil, M. I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, M. A., Islam, M. N., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules*, 17(9), 11199–11215.
- Kiran, C., & Riyaz, M. (2026). Understanding the physicochemical profile of honey: A comprehensive review of quality and authenticity parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, 108993.
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 297425.
- Koudegnan, C., Coulibaly, S., Quashie, M.-L., Radji, P., & Kokou, K. (2021). Caractérisations physico-chimiques des miels de la zone Guinéenne du Togo. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 9(2).
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67–78.
- Leska, A., Nowak, A., Szulc, J., Motyl, I., & Czarnecka-Chrebelska, K. H. (2022). Antagonistic activity of potentially probiotic lactic acid bacteria against honeybee (*Apis mellifera* L.) pathogens. *Pathogens*, 11(11), 1367.
- Linares, D., Fitzgerald, G., Hill, C., Stanton, C., & Ross, P. (2017). Production of vitamins, exopolysaccharides and bacteriocins by probiotic bacteria. *Probiotic dairy products*, 359–388.
- Lindell, S. S., & Quinn, P. (1975). Use of bile-esculin agar for rapid differentiation of Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology*, 1(5), 440–443.
- Luca, L., Pauliuc, D., & Oroian, M. (2024). Honey microbiota, methods for determining the microbiological composition and the antimicrobial effect of honey—A review. *Food chemistry: X*, 23, 101524.
- Matuszewska, E., Klupczynska, A., Maciołek, K., Kokot, Z. J., & Matysiak, J. (2021). Multielemental analysis of bee pollen, propolis, and royal jelly collected in west-central Poland. *Molecules*, 26(9), 2415.
- Melliou, E., & Chinou, I. (2014). Chemistry and bioactivities of royal jelly. *Studies in Natural Products Chemistry*, 43, 261–290.
- Meradji, M., Bachtarzi, N., Mora, D., & Kharroub, K. (2023). Characterization of lactic acid bacteria strains isolated from Algerian honeybee and honey and exploration of their potential probiotic and functional features for human use. *Foods*, 12(12), 2312.
- Motta, E. V., & Moran, N. A. (2024). The honeybee microbiota and its impact on health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 22(3), 122–137.

- Naghizadeh, S., Mehrabian, A., Maleki, H., & Shakoory, Z. (2025). Botanical origin, chemical composition, and microbiological quality of bee pollen from Iran. *Scientific Reports*.
- Negm, G. E. S. (2018). Classification, antimicrobial potential, industrial applications and probiotic capability of lactic acid bacteria: A review article. *Research Journal of Applied Sciences*, 13(12), 742–757.
- Nowak, A., Szczuka, D., Górczyńska, A., Motyl, I., & Kręgiel, D. (2021). Characterization of *Apis mellifera* gastrointestinal microbiota and lactic acid bacteria for honeybee protection—A review. *Cells*, 10(3), 701.
- Olofsson, T. C., & Vásquez, A. (2008). Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current microbiology*, 57(4), 356–363.
- Oršolić, N., & Jazvinščak Jembrek, M. (2024). Royal jelly: biological action and health benefits. *International journal of molecular sciences*, 25(11), 6023.
- Otręba, M., Marek, Ł., Tyczyńska, N., Stojko, J., & Rzepecka-Stojko, A. (2021). Bee venom, honey, and royal jelly in the treatment of bacterial infections of the oral cavity: A review. *Life*, 11(12), 1311.
- Ouadjir, T. (2021). *Propolis: production, composition, propriétés biologiques et utilisation* Université Mouloud Mammeri].
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017(1), 1259510.
- Pełka, K., Hafeez, A. B., Worobo, R. W., & Szweda, P. (2025). Probiotic potential of *Bacillus* isolates from polish bee pollen and bee bread. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 17(1), 364–377.
- Pérez Matos, A. E., Bacci, G., Borruso, L., Landolfi, M., Petrocchi, D., Renzi, S., & Perito, B. (2023). Characterization of the bacterial communities inhabiting tropical propolis of Puerto Rico. *Microorganisms*, 11(5), 1130.
- Pląder, M., Sękul, J., Kot, A. M., & Pobiega, K. (2025). From hive to laboratory—biotechnological potential of microorganisms from honey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 41(10), 361.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., & Gniewosz, M. (2019). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 53–62.
- Pradeep, S., YS, J. T. E., Angappan, S., Murugaiyan, S., Ramasamy, S. V., & Boopathi, N. M. (2025). Lactic acid bacteria: a probiotic to mitigate pesticide stress in honey bee. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 17(4), 2212–2226.
- Ramadan, M. F., & Al-Ghamdi, A. (2012). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 39–52.
- Ramos, O. Y., Basualdo, M., Libonatti, C., & Vega, M. F. (2020). Current status and application of lactic acid bacteria in animal production systems with a focus on bacteria from honey bee colonies. *Journal of applied microbiology*, 128(5), 1248–1260.
- Rossi, F. (2023). Special issue “functional characterization of lactic acid bacteria”. In (Vol. 11, pp. 1190): MDPI.
- Ruas-Madiedo, P., & De Los Reyes-Gavilán, C. (2005). Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of dairy science*, 88(3), 843–856.
- Rzepecka-Stojko, A., Stojko, J., Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Kabała-Dzik, A., Kubina, R., Moździerz, A., & Buszman, E. (2015). Polyphenols from bee pollen: structure, absorption, metabolism and biological activity. *Molecules*, 20(12), 21732–21749.
- Sadiq, M. B. (2022). Lactic acid bacteria as potential probiotics. *Probiotics, prebiotics and synbiotics: technological advancements towards safety and industrial applications*, 57–72.
- Sallemi, S., Lekired, A., Korbi, N., Saadouli, I., Cherif, A., Zidi, I., Klibi, N., Ouzari, H.-I., & Mosbah, A. (2022). Fungal community investigation from propolis natural products: diversity and

- antibacterial activities evaluation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022(1), 7151655.
- Sanlier, N., Kaya, E. Y., & Yucel, I. I. (2026). Health Effects of Bee Products: A Comprehensive Review. *Food Science & Nutrition*, 14(2), e71165.
- Selamoglu, Z., Dogan, H., Naeem, M., Ozdemir, B., Issa, H., & Akgul, H. (2025). Oxidant/antioxidant status of propolis samples obtained from Turkey. *Archives of Razi Institute*, 80(1), 69.
- Sforcin, J. M. (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy research*, 30(6), 894–905.
- Sönmez, E. (2025). Royal Jelly in modern biomedicine: A review of its bioactive constituents and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 134, 107062.
- Stanojević, S. P., Milinčić, D. D., Smiljanić, N., Pešić, M. B., Nedić, N. M., Kolašinac, S., Dojčinović, B., Dajić-Stevanović, Z., & Kostić, A. Ž. (2024). Conventional vs. Organically Produced Honey—Are There Differences in Physicochemical, Nutritional and Sensory Characteristics? *Foods*, 13(22), 3573.
- Tesfaye, O. (2025). Effect of floral variation on the proximate and mineral composition of bee pollen in Dale Sedi District, Kellem Wollega Zone, Western Ethiopia. *BMC Plant Biology*, 25(1), 1068.
- Thakur, M., & Nanda, V. (2020). Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 82–106.
- Thomas, T. (1973). Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from other bacteria. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 8(2), 70–71.
- Urcan, A. C. (2025). Health Benefits and Uses of Bee Bread in Medicine. In *Bee Products—Chemical and Biological Properties* (pp. 473–491). Springer.
- Vásquez, A., & Olofsson, T. C. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of apicultural research*, 48(3), 189–195.
- Viteri, R., Zacconi, F., Montenegro, G., & Giordano, A. (2021). Bioactive compounds in *Apis mellifera* monofloral honeys. *Journal of food science*, 86(5), 1552–1582.
- Von Wright, A., & Axelsson, L. (2019). Lactic acid bacteria: an introduction. In *Lactic acid bacteria* (pp. 1–16). CRC Press.
- Wagh, V. D. (2013). Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2013(1), 308249.
- Xiong, Z. R., Sogin, J. H., & Worobo, R. W. (2023). Microbiome analysis of raw honey reveals important factors influencing the bacterial and fungal communities. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1099522.
- Zastulka, O., Yakubchak, O., Solodka, L., & Halatyuk, O. (2015). The contamination of bee pollen by microscopic fungi. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва*(223), 41–45.

Milieu MRS (De Man, Rogosa and Sharpe, 1960)

Extrait de levure 5 g

Extrait de viande 10 g

Peptone 10 g

Acétate de sodium 5 g

Citrate de sodium 2 g

Glucose 20 g

KH₂PO₄ 2 g

MgSO₄ 0,25 g

MnSO₄ 0,05 g

Eau distillée 1000 ml

pH = 6,2 Autoclavage : 121°C pendant 15 minutes.

Eau physiologique

Chlorure de sodium 8.5 g

Peptone 0.5 g

Eau distillée 1000 ml

pH = 7 Autoclavage : 120 °C, 20 minutes

Milieu M16 BCP

Extrait de levure 2.5 g

Extrait de viande 5 g

Lactose 2 g

Biopolytone 5 g

Peptone papainique de soja 5 g

Acide ascorbique 0.5 g

Acétate de sodium 1.8 g

L-Arginine 4 g

Pourpre de bromocrésol 0.05 g

Agar 10 g

Eau distillée 1000 ml

pH = 6.5 Autoclavage : 120 °C pendant 20 minutes.