



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de
la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Latifa HAMMOUDI

Le : mardi 9 juillet 2019

Contribution à l'étude du pH et la qualité bactériologique d'olive verte fermentée (aliments de rue d'origine végétale) dans la ville de BISKRA

Jury :

M.	Fateh GUEMAZ	MAA	Université de Biskra	Président
Mme.	Sara BOULMAIZ	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
M.	Mohamed TITAOUINE	MCA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier le Bon Dieu tout puissant de m'avoir accordé le courage, la patience et la santé pour réaliser ce travail.

Je également à remercier Madame **Sara BOULMAIZ** pour toutes ces orientations et ces conseils durant ce travail.

Je remercie l'ensemble des membres du Jury, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Remercions toute l'équipe du laboratoire, pour leur aide et surtout pour leur gentillesse.

Enfin, je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce Modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce travail

A tous ceux qui me sont très chers A mes parents, ceux qui j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et que jamais je ne saurais m'exprimer quant à l'éducation qu'ils m'ont prodigué.

A mon chère mari.

Mes adorables sœurs Karima et Ahlam, Amina, Atra, et mes chers frères Abd elrahim et Abd ellatif, Abd elraouf pour leur encouragement, leur assistance et leur soutien. Que dieu vous préserve !

A toutes mes amies.

A mes grandes familles.

Et à tous mes proches.

Latifa HAMMOUDI

Sommaire

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III

Introduction générale**Partie I : Etude bibliographique****Chapitre 01 : généralités sur l'olivier**

1. Définition de l'olivier	1
2. Systématique.....	1
3. Cycle végétatif et productif de l'olivier.....	1
4. L'olive	2
5. L'oléiculture	2
5.1. Oléiculture mondiale et Algérien.....	2
5.2. L'oléiculture à Biskra.....	2

Chapitre 02 : Les végétaux fermentées

1. Les produits végétaux fermentés et acidifiés.....	3
2. La norme 66-1981 du Codex Alimentarius	3
3. Les microorganismes impliqués dans la fermentation de l'olive	4

Partie II : Etude expérimentale**Chapitre 03 : Matériels et méthodes**

1. Echantillonnage	5
2. Analyses physico-chimiques	5
2.1. pH.....	5
3. Analyse microbiologique.....	5
3.1. Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.....	5
3.2. Dénombrement des <i>coliformes totaux et fécaux</i>	5
3.3. Recherche des <i>staphylocoques spp</i>	5
3.4. Recherche des <i>salmonelles spp</i>	6
3.5. Recherche des <i>Bacillus ssp</i>	6
4. Identification morphologique et biochimique.....	6
5. Etude de la résistance aux antibiotiques	7

Chapitre 04 : Résultats et discussion

1. Mesure du pH	10
2. Les analyses microbiologiques	10

3. Résultats de l'identification biochimique	12
4. Sensibilité et résistance aux antibiotiques	12

Conclusion

Bibliographie

Annexes

Résumés

Tableau 1. Diamètres critiques de l'antibiotique utilisé pour l'appréciation de la Sensibilité/Résistance selon les recommandations de la comite de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.	8
Tableau 2. Les caractères des souches étudiées.	10
Tableau 3. Profils de résistance/sensibilité aux antibiotiques chez les <i>E.coli</i>	12
Tableau 4. Profils de résistance/sensibilité aux antibiotiques chez les <i>Salmonella spp</i>	13
Tableau 5. Profils de résistance/sensibilité aux antibiotiques chez les <i>Staphylococcus spp</i> ...	13
Tableau 6: Table de Mac Grady.....	26

Figure 1. Cycle végétatif et productif de l'olivier..... 1
Figure 2. Résultats de pH des échantillons d'olive..... 10

AFNOR : Association Française de normalisation.

BLBVB : Bouillon lactosé billé de vert brillant.

BP : BAIRD-PARKER.

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute.

COI : CONSIL OLEICOL INTERNATIONAL.

DSA : Direction des services agricole.

Ech : Echantillon.

E. Coli : *Escherichia Coli*.

EPT : Eau peptonnée tamponnée.

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne.

ISO : International Standard Organization

MH : Mueller Hinton.

MKTTn : Muller- Kauffmann au Tétrathionate-novobiocine.

NPP : Nombre le plus probable.

pH : Potentiel hydrogène.

RVS : Rappaport- Vassiliadis au soja.

Sal : *salmonella*.

SAU : Surface agricole utile.

SM : Solution mère.

SS : *Salmonella-Shigella*.

Staph: *staphylococcus*.

TSI : Triple Sugar Iron.

Introduction

En pratique, les aliments fermentés ont été considérés comme moins susceptibles de causer une infection d'origine alimentaire ou une intoxication. Ceci grâce à la survenue, lors de leur fermentation, des facteurs antimicrobiens : y compris une activité de l'eau (a_w) faible, un pH acide, une teneur élevée en sel et des concentrations élevées en acides gras, ainsi que d'autres composés chimiques tels les poly- phénols présentes naturellement dans les olives. En général, dans la littérature il a été reporté que les olives vertes de table sont préservés grâce à ces facteurs de l'altération par *Bacillus* et /ou *Clostridium* ou autres micro- organismes indésirables.

Cependant, malgré que la transmission de bactéries pathogènes dans les olives vertes fermentées n'a pas été documentée jusqu'à maintenant, et qu'aucune épidémie n'a été liée à leur consommation, le risque de contamination par *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* O 157: H7 a été signalé récemment par certains scientifiques. Ces auteurs ont pu démontrer que les agents pathogènes pourraient survivre plus tard dans les olives vertes fermentées posant donc un plus grand risque en cas de non stabilité du produit (Alves *et al*, 2012).

Dans cette étude, on envisage d'évaluer la qualité hygiénique des olives vertes vendues dans le marché traditionnel dans la région de Biskra. L'ensemble des facteurs physico chimiques qui contrôlent leur qualité (pH) ont été déterminés. Les analyses microbiologiques ont concerné les pathogènes « *coliformes totaux, fécaux, bacillus spp, salmonella spp et staphylocoques spp* ».

L'objectif de notre travail est destiné on:

Analyse bactériologique de denrées alimentaire d'origine végétale (olive verte fermentée), Recherche et isolement de quelques germes d'altération à partir des échantillons étudiés et évaluer la sensibilité aux antibiotiques des germes recherchés.

Cette présente étude est subdivisée en deux parties :

Une revue bibliographique aborde des généralités décrivant l'olive et, avant de terminer par les différents marchés des olives.

Une étude expérimentale est réservée en premier temps à la présentation de l'ensemble des méthodes mises en œuvre pour l'évaluation de la qualité bactériologique d'olive à l'égard de 4 souches bactériennes. En dernier temps, une partie est consacrée à la présentation des résultats obtenus et leur discussion.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Généralités sur l'olivier

1. Définition de l'olivier

L'olivier est un arbre méditerranéen très âgés, se multiplie très facilement par voie végétative ou à partir de boutures, soumis à l'alternance (production une année sur deux), Il exige un climat doux, lumineux, craint l'humidité, mais supporte par contre des sécheresses. La zone de culture en latitude en général 25°-45°. L'arbre est aussi célèbre pour sa rusticité, il supporte des sols pauvres, une relative aridité (Amouretti et Comet, 2000). Un arbre produit supérieur à 50 kg d'olives, il peut donner supérieur à 10 litres d'huile d'olive selon les variétés (Djadoun ,2011).

2. Systématique

La classification botanique de l'olivier selon Guignard et Dupont (2004), est la suivante :

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Sous classe: Astéridées

Ordre: Lamiales

Famille: Oléacées

3. Cycle végétatif et productif de l'olivier

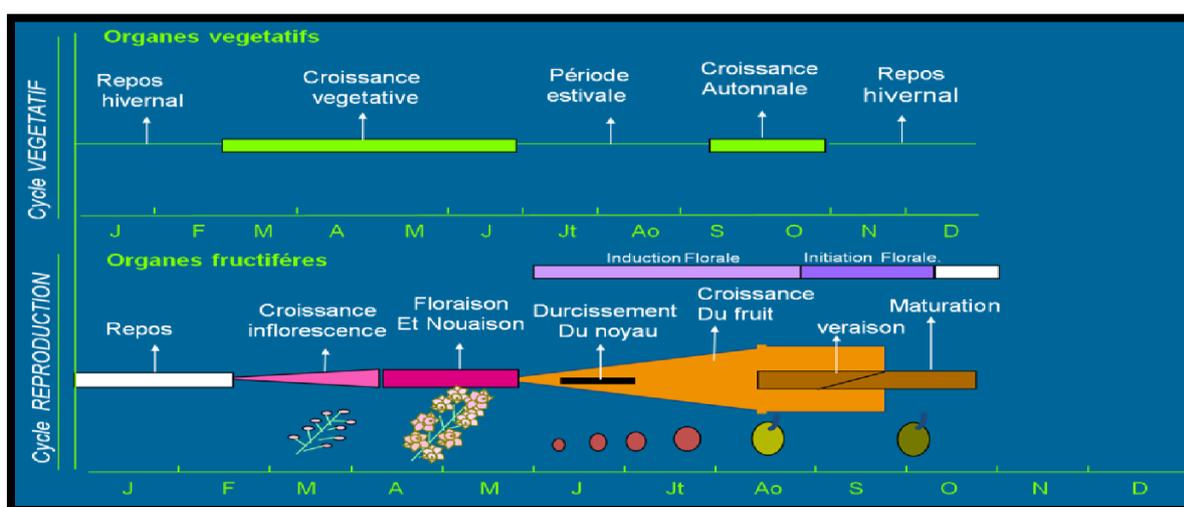


Figure 1. Cycle végétatif et productif de l'olivier (COI, 2004).

4. L'olive

Est une drupe de forme ovale constituée d'un péricarpe et d'un endocarpe. Elle pèse de 2 à 12 g, bien que certaines variétés puissent peser jusqu'à 20g. Le péricarpe comprend deux parties: l'épicarpe (la peau) et le mésocarpe (la pulpe) qui représente environ 65-83% du poids total. L'endocarpe (noyau) représente 13% à 30% du poids total. L'épicarpe est couvert de cire et passe du vert clair au noir quand le fruit mûrit. La composition chimique moyenne de l'olive est la suivante : l'eau, 50%; huiles 22%; polyphénols 1,5%; protéines 1,5%; sucres 18%; cellulose 5,5%; minéraux (cendres) 1,5%. D'autres constituants importants sont les pectines, les acides organiques, les pigments et les glycosides de phénols (Benlemlih et Ghanam, 2012).

5. L'oléiculture

5.1. Oléiculture mondiale et Algérien

L'olivier est aujourd'hui cultivé dans toutes les régions du globe se situant entre les latitudes 30 et 45 des deux hémisphères (Lazzeri, 2009). Plus de 70% de ces arbres se trouvent en Europe méditerranéenne, 13% se situent au Proche-Orient, 13% en Afrique du nord et 3% en Amérique Latine (Amouretti et Comet, 2000). La production d'huile d'olive de l'union européenne représente près de 75% de la production mondiale.

La culture de l'olivier est connue depuis l'antiquité à travers le monde et le bassin méditerranéen représente le milieu favorable à l'oléiculture par excellence. Cette espèce est présentée à travers l'ensemble du territoire national en raison de ses capacités d'adaptation à tous les étages bioclimatiques, allant des zones de montagne; en particulier Bejaïa (37,2%) , TiziOuzou(17%), Jijel(11,6%), Sétif(9,5%), Bouira(6,5%) et Borj Bouarreridj, qui représentent ensemble 69% de la superficie totale de l'oléiculture, durant la campagne 2010/2011, la production était de 60000 tonnes d'huile soit 1.7% de production mondiale (COI, 2011).

Aux zones arides et sahariennes, elle assure, de ce fait, des fonctions multiples de lutte contre l'érosion. Dans le cadre de mise en œuvre du programme du Renouveau rurale, il est prévu la plantation d'un million (1.000.000) Ha d'oliviers à l'horizon 2014 (DSA).

5.2. L'oléiculture à Biskra

La wilaya de Biskra compte actuellement une superficie de plus de 3.381 Ha d'oliviers caractérisée par un mode cultural traditionnel. En effet, la superficie cultivée ne représente que 3,5 % de la S.A.U irriguée. Les variétés les plus cultivées dans la wilaya sont, la Sigoise à 70% et Chemlal à 25% (DSA).

Chapitre 2

Les végétaux fermentés

1. Les produits végétaux fermentées et acidifiés

Sont altérés par un pH faible (généralement pH 3 et 4) et la présence d'acides organiques, notamment lactiques et acides acétiques. Plusieurs excellentes critiques des produits finaux métaboliques microbiens de la bactérie lactique provenant de fermentations végétales ont été publiées. Aux États-Unis, les légumes fermentés sont considérés comme des aliments acides, ayant un pH inférieur à 4,6. Les exemples incluent les cornichons au concombre et la choucroute. Acidifié les légumes sont des aliments auxquels des acides ou des ingrédients alimentaires acides ont été ajoutés abaisser le pH au-dessous de 4,6. Le règlement sur les aliments acidifiés a été promulgué prévenir le botulisme dans les aliments mal acidifiés. Des recherches ont montré que *Clostridium botulinum* ne peut pas se développer et produire de la toxine à un pH inférieur ou égal à 4,6. Le marché des produits végétaux acides et acidifiés est actuellement dominé cornichons de concombre acidifiés et non fermentés. Les ventes les plus importantes de produits fermentés sur le marché américain sont les hamburgers cornichons à l'aneth. Les autres produits végétaux fermentés et acidifiés comprennent les olives, choucroute, poivrons marinés et assortiment de légumes marinés. Concombre acidifié les cornichons sont généralement produits avec une valeur de pH de ca. 3,7 et avoir de l'acide acétique comme le primaire acidulent (Doyle, 2009).

2. La norme 66-1981 du Codex Alimentarius

Aucun critère microbiologique officiel pour les olives de table n'est disponible. Cependant, la norme 66-1981 du Codex Alimentarius a prescrit les exigences minimales liées à l'hygiène pour les olives de table. Et le produit final doit être exempt de micro-organismes et de parasites en quantités pouvant présenter un risque pour la santé et ne doit contenir aucune substance provenant de micro-organismes en quantités pouvant représenter un risque pour la santé. Selon COI (2004), les olives fermentées détenues en vrac dans un liquide de couverture peut contenir des bactéries lactiques et / ou des levures utilisé pour la fermentation. Le nombre de ces microorganismes dans un le milieu de culture sélectif peut, pour chacun, constituer jusqu'à 10⁹ colonies formant des unités / mL de saumure ou par gramme de chair selon le niveau de fermentation. D'autre part, les olives conservées par stérilisation à la chaleur (comme les olives noircies par oxydation) doit avoir reçu un traitement suffisant en temps et en température détruire les spores de *Clostridium botulinum* (COI, 2004).

Le problème de sécurité le plus important concernant les olives fermentées semble risque de croissance de *C. botulinum* et de formation de toxines. Malgré olives noires ont été

incriminées dans un petit foyer de botulisme type B, l'apparition de *C. botulinum* semble toutefois être rare (Doyle, 2009).

3. Les microorganismes impliqués dans la fermentation de l'olive

Les principaux groupes microbiens impliqués dans la fermentation de l'olive sont principalement les bactéries lactiques et les levures. Lorsque la croissance de bactéries lactiques surmonte la croissance de levures, la fermentation lactique est favorisée et un produit alimentaire final ayant un pH inférieur est obtenu, comme dans les olives à l'espagnole. Cependant, si les levures deviennent les microorganismes dominants, les olives produites auront des valeurs de pH plus élevées que celles des olives à la grecque. Les principales fonctions des levures dans la transformation des olives fermentées sont liées à la production d'alcools, d'acétate d'éthyle, d'acétaldéhyde et d'acides organiques, des composés qui jouent un rôle important dans le développement du goût et de l'arôme et dans les caractéristiques de conservation de cet aliment fermenté. Néanmoins, dans certaines conditions de traitement et après conditionnement, les levures peuvent avoir un rôle négatif car elles sont responsables de la production de CO₂, du ramollissement des fruits dû à l'activité pectinolytique, de l'obscurcissement des saumures, de la production de biofilms et, probablement, de la production d'arômes (Alves *et al.*, 2012).

La qualité des olives de table est étroitement liée à la fermentation processus, qui se produit naturellement par les microorganismes présent sur les drupes, dans la saumure ou dans les ferments utilisés conférer les caractéristiques organoleptiques distinctives du produit final. Traditionnellement, ces microorganismes ne sont pas considérés nocifs. Cependant, de mauvaises conditions d'hygiène pendant la phase de vente au détail peuvent créer des conditions favorables à la croissance de microorganismes altérants et pathogènes (Franzetti *et al.*, 2011).

**PARTIE
EXPERIMENTALE**

Chapitre 3

Matériel et Méthodes

1. Echantillonnage

6 échantillons d'olive (Ech1, Ech2, Ech3, Ech4, Ech5, Ech6) préparé traditionnellement commercialisés dans la rue, de la ville Biskra.

2. Mesure du pH

Les valeurs de pH ont été déterminées par l'utilisation d'un pH-mètre. 25 g de l'échantillon ont été mélangés dans un mixeur avec 225 ml d'EPT jusqu'à l'obtention d'une suspension fluide (Moumene *et al*, 2013).

3. Analyse microbiologique

Une prise d'essai de 25g de chaque échantillon a été mélangée avec 225 ml d'EPT. Le mélange homogénéisé présente la solution mère utilisée pour la fabrication d'une série de dilutions pour les autres déterminations microbiologiques (Moumene *et al*, 2013).

3.1. Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales selon NF EN ISO 6887- 1.

3.2. Dénombrement des *coliformes totaux et fécaux*

La technique du NPP a été utilisée, à l'aide du bouillon BLBVB réparti à raison de 10 ml par tubes munis d'une cloche de Durham.

Préparer dans un portoir une série de tubes contenant le milieu sélectif (BLBVB) à raison de trois tubes par dilution. A partir des dilutions décimales 10⁻⁵ à 10⁻³, porter aseptiquement 1 ml dans chacun des trois tubes correspondant à une dilution donnée. Chassez le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et bien mélangé le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures. La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table de Mac Grady (Annexe 02).

Les tube trouvé positive dans le dénombrement de CT est ensemencé dans nouvel des tube de BLBVB. L'incubation se fait à 44°C pendant 48 heures. (Avril *et al*, 1992).

3.3. Recherche des *staphylocoques spp* (AFNOR V 08-057-1)

Le milieu utilisé est la gélose de Baird-Parker BP additionnée d'une suspension de jaune d'oeuf au tellurite de potassium. L'ensemencement se fait à partir de 0.1 ml de la SM, dilution 10⁻¹ que l'on étale sur la surface de la gélose déjà solidifiée. Les boîtes sont ensuite

laissées à sécher à température ambiante, pendant 15 mn, couvercle fermé. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48h. Les colonies caractéristiques sont noires ou grises, brillantes et convexes et entourées d'une auréole d'éclaircissement.

On réalise le test de la coagulase, La coagulation de plus de la moitié du volume signifie un résultat positif, l'absence de coagulation révèle un résultat négatif.

3.4. Recherche des *salmonelles spp* (ISO 6579)

Nous avons suivi la méthode classique obéissant au protocole suivant :

Pré enrichissement : il consiste à incuber la solution mère à 37 °C pendant 18h ± 2h ;

Enrichissement : il se fait dans des tubes contenant chacun 10 ml de bouillon MKTTn et de bouillon RVS. Dans le tube contenant le MKTTn, on transfère 1ml de culture pré enrichie que l'on incube à 37°C pendant 24h ± 3h. Dans le tube contenant le RVS, on transfère 0,1 ml de la même culture que l'on incubé à 41,5°C pendant 24h ± 3h ;

Isolement : il se fait par stries sur les milieux sélectifs SS. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 ± 3h.

3.5. Recherche des *Bacillus ssp*

10 ml de chaque échantillon ont été transférés dans un tube stérile et chauffés à 80 ° C pendant 10 minutes. Ensuite, 1 ml de chaque échantillon a été homogénéisé avec 9 ml d'EPT et une série de dilutions décimales ont été réalisées dans EPT pour chaque échantillon. 0,5 mL de chaque dilution de tube a été strié sur la gélose MH. Le nombre total de spores aérobies a été dénombré après une incubation à 30 ° C pendant 24h pour tous les échantillons. Parallèlement, des numérations de spores aérobies thermophiles ont été effectuées, après une incubation de 48 h à 55 ° C. Une sélection de 20 colonies de morphologie distincte a été sélectionnée au hasard et isolée sur GN (Ziane et al, 2016).

4. Identification morphologique et biochimique

4.1. Coloration de Gram selon (Delarras, 2007).

4.2. Identification biochimique

➤ Le test de catalase selon (Hanker et Rabin, 1975).

Les dosages de la catalase ont une application pratique dans les études microbiennes dans la mesure où la détermination de la catalase est une méthode utile pour différencier la

plupart des bactéries aérobies des anaérobies et des anaérobies facultatifs. Les anaérobies ne sont pas capables de décomposer H₂O₂ et sont classés comme catalase négatifs.

La plupart des tests de catalase effectués sont basés sur l'action catalytique de l'enzyme, qui résulte dans la décomposition de H₂O₂ et la libération d'O₂. Tests dépendant du catalytique sont potentiellement dangereux en raison de la production d'aérosols chargés de bactéries par l'oxygène libéré. De plus, ces tests doivent être surveillés tout au long de la procédure car il ne reste aucune trace des résultats une fois que l'effervescence a cessé.

➤ **Le test de l'oxydase** selon (Delarras, 2007).

➤ **Ensemencement d'une galerie biochimique**

On prépare une suspension bactérienne pour effectuer une série de tests biochimiques qui sont les suivants :

-Le milieu mannitol mobilité

Ce milieu permet de rechercher simultanément la mobilité, et l'utilisation du mannitol. L'ensemencement du milieu s'est fait par piqûre centrale jusqu'au fond du tube avec la souche à tester à l'aide d'une anse de platine et incubé pendant 24h à 37 °C (Djelouat, 1990).

-Milieu TSI

Ce milieu de culture, proposé par Hajna (1945), est principalement utilisé pour la Caractérisation biochimique des entérobactéries. C'est un milieu différentiel par la capacité à mettre en évidence les fermentations du : glucose, lactose et/ou saccharose, ainsi que la production d'hydrogène sulfuré (H₂S) et de gaz. Le rouge de phénol est l'indicateur colorant virant du rouge au jaune pour un résultat positif (Djelouat, 1990).

Ce milieu est réparti en tube à essai sous forme semi-inclinée avec un culot et une petite pente. Il est ensemencé par piqûre centrale du culot et par stries sur la pente. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h.

-Galerie API 20E (Holmes *et al*, 1978)

-Galerie API *staph* (Marples et Richardson, 1982)

5. Etude de la résistance aux antibiotiques

- **Antibiogramme** (Jehl *et al*, 2016)

La détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques a été réalisée selon la méthode de diffusion sur gélose MH selon les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015).

A partir d'une culture bactérienne pure et jeune (de 24 h sur milieu gélosé), réaliser une suspension en ensemencant une colonie bien isolée dans 5 ml d'eau physiologique, puis homogénéiser la suspension bactérienne au vortex ; sa densité optique doit être de 0,08 à 0,13 à une longueur d'onde de 625nm.

- Des boîtes de géloses MH ont été ensemencées par écouvillonnage à partir la suspension bactérienne.

- Des disques d'antibiotiques ont été déposés sur la boîte à l'aide d'une pince stérile.

- Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24H.

-La lecture se fait en mesurant avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition. Comparer ce résultat aux valeurs critiques figurant dans le tableau 01, classer les bactéries dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire et Résistante.

Tableau 1. Diamètres critiques de l'antibiotique utilisé pour l'appréciation de la Sensibilité/Résistance selon les recommandations de la comite de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Antibiotiques	Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)	
		Sensible (S)	Résistante (R)
Ofloxacin (OFX)	5	≥24	< 22
Erythromycin (E)	15	≥ 21	<16
Gentamycin (CN)	10	≥ 17	< 14
Vancomycin (VA)	30	≥ 21	< 15
Tobramycin (TOB)	10	≥ 18	< 18
streptomycin (S)	10	≥ 15	< 13

Ciprofloxacine (CIP)	5	≥ 20	< 17
Ticarcillin (TIC)	75	≥ 23	< 20
Céfotaxime (CTX)	30	≥ 26	< 23
Amikacin(AK)	30	≥ 18	< 15

Chapitre 4

Résultats et Discussion

1. Mesure du pH

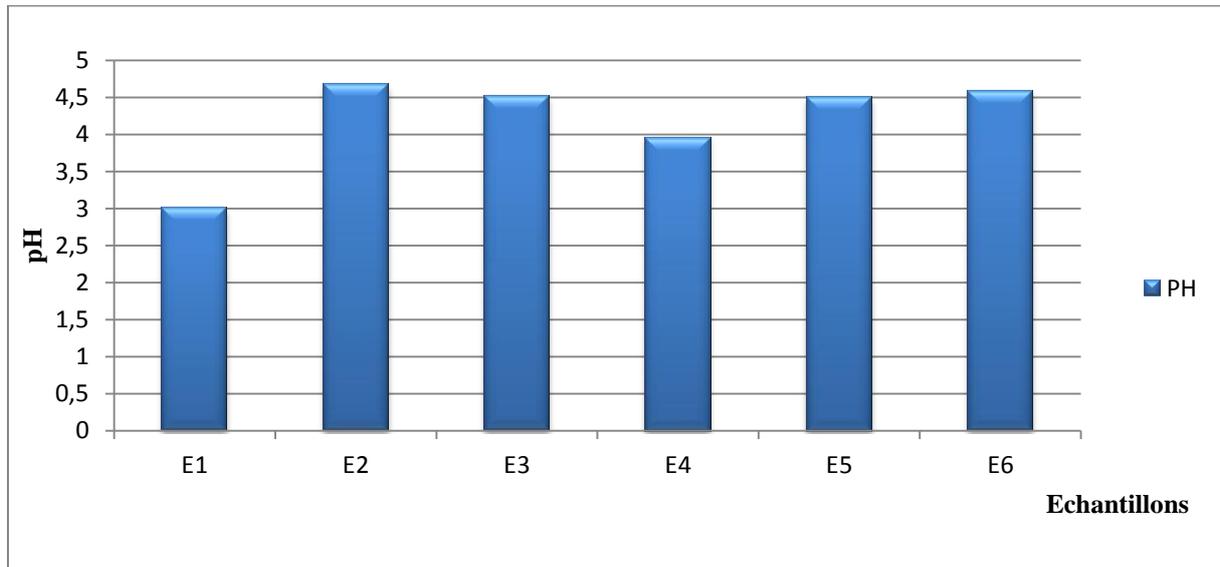


Figure 2. Résultats de pH des échantillons d'olive.

2. Les analyses microbiologiques

Tableau 2. Les caractères des souches étudiées.

	Caractères souches recherchées	Aspect des colonies sur gélose	Observation microscopique	Catalase	Oxydase	Culot	TSI		Mannitol	Mobilité
							Pente	Gaz		
Ech1	<i>Escherichia coli</i>	colonies vert métallique	cocci gram +	+	+	Jaune	Jaune	+	+	+
	<i>Stapylococcus spp</i>	colonies noire, bombées	cocci gram +	+	-	/ /	/	/	/	/
	<i>bacillus spp</i>	colonies grand et blanches	bacille gram +	+	/	/ /	/	/	/	/
Ech2	<i>Escherichia coli</i>	colonies vert métallique	bacille gram -	+	+	Jaune	Jaune	+	+	-
	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	colonies roses	bacille gram -	+	+	Rouge	Jaune	+	+	-

	<i>Stapylococcus spp</i>	colonies noire, bombées	cocci gram +	+	-	/	/	/	/	/
Ech3	<i>Escherichia coli</i>	colonies vert métallique	bacille gram -	+	+	Jaune	Jaune	+	+	+
	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	colonies roses	bacille gram -	+	+	Jaune	Jaune	+	+	-
	<i>salmonelle spp</i>	colonies noire	bacille gram -	+	+	Jaune	Jaune	+	+	+
	<i>Stapylococcus spp</i>	colonies noire, bombées	cocci gram +	+	-	/	/	/	/	/
Ech4	<i>Escherichia coli</i>	colonies vert métallique	bacille gram -	+	-	Jaune	Jaune	+	+	+
	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	colonies roses	bacille gram +	+	+	Jaune	Jaune	+	+	+
	<i>salmonelle spp</i>	colonies noire	bacill gram -	+	+	Jaune	Jaune	+	+	+
	<i>Stapylococcus spp</i>	colonies noire, bombées	cocci gram +	+	-	/	/	/	/	/
Ech5	<i>Escherichia coli</i>	colonies vert métallique	cocci gram +	+	+	Rouge	Jaune	-	-	-
	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	colonies roses	cocci gram +	+	+	Jaune	Jaune	-	-	-
Ech6	<i>salmonelle spp</i>	colonies noire	cocci gram +	+	+	Jaune	Jaune	-	-	-
	<i>bacillus spp</i>	colonies grand et blanches	bacill gram+	+	/	/	/	/	/	/

Selon la littérature, les olives vertes fermentées qui ont atteint des niveaux appropriés de pH et d'acidité après la procédure de fermentation devraient être salubres. La présence de sel, d'acides lactique et d'acide acétique dans la saumure du produit final sont considérés comme un facteur majeur pour accroître l'hygiène microbienne.

D'après les données obtenues dans le tableau 2, on constate bien une contamination bactérienne significative des olives vertes et dans presque toutes les zones étudiées.

L'analyse réalisée à révéla la présent dans tous les échantillons de *coliformes totaux et fécaux* avec un absent dans le cas d'échantillon (Ech6). Nos résultats présentent une discordance avec les résultats décrits par López-López *et al.* (2004).

Les *staphylocoques* sont présents dans la majorité des échantillons analysés sauf dans l'échantillon (Ech5, Ech6) nos résultats présentent une discordance avec les résultats décrits par Moumene *et al.* (2013).

Et également la contamination de la moitié des échantillons (Ech3, Ech4, Ech6) en *salmonelle spp* avec une faible charge.

Les *Bacillus spp* sont présents sauf dans les échantillons (Ech1, Ech6). Les travaux de Franzetti. (2011) ont montré aussi la présence de *Bcillus spp* en nombre important.

Les agents pathogènes appartenant à *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp*, *bacillus spp*, *E. coli O157: H7*. Représentant un risque alimentaire potentiel (Pereira *et al.*, 2008).

Floriano *et al.* (1998) ont aussi isolé des *S. aureus* dans les olives vertes fermentés style espagnol. Pereira *et al.* (2008) ont démontré également que des *coliformes* sont détectés seulement dans les échantillons d'olives vertes qui venaient du marché traditionnel.

3. Résultats de l'identification biochimique

Parmi les échantillons testés dans notre recherche, et après les tests biochimiques on trouve que l'espèce et les genres suivants : *Raoultella terrigena*, *Salmonella spp*, *Rahnella aquatilis*, *Citrobacter youngae*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus xylosus*.

L'identification des bactéries a été effectuée en comparant nos résultats avec ceux relevés sur des références de systématiques bactériennes (Holt *et al.*, 1994).

4. Sensibilité et résistance aux antibiotiques

Tableau 3. Profils de résistance/sensibilité aux antibiotiques chez les *E.coli*.

Antibiotiques Souches recherchée	CN	CIP	TIC	CTX	AK
<i>E,coli</i> E1	S	S	R	I	S
<i>E,coli</i> E2	S	S	R	R	S

<i>E.coli</i> E3	S	S	S	R	S
<i>E.coli</i> E4	S	S	I	R	S
<i>E.coli</i> E5	R	R	R	R	R
<i>E.coli</i> O157:H7 E2	S	S	R	R	S
<i>E.coli</i> O157:H7 E3	S	S	S	R	S
<i>E.coli</i> O157:H7 E4	S	S	R	R	S
<i>E.coli</i> O157:H7 E5	R	R	R	R	R

Tableau 4. Profils de résistance/sensibilité aux antibiotiques chez les *Salmonella* spp.

Antibiotiques Souches recherchée	Antibiotiques				
	E	S	CIP	CTX	AK
<i>Sal</i> E3	R	S	S	S	S
<i>Sal</i> E4	R	S	S	S	S
<i>Sal</i> E6	R	R	R	R	R

Tableau 5. Profils de résistance/sensibilité aux antibiotiques chez les *Staphylococcus* spp.

Antibiotiques Souches recherchée	Antibiotiques				
	OFX	E	VA	TOB	AK
<i>staph</i> E1	S	R	R	S	S
<i>staph</i> E2	S	R	R	S	S
<i>staph</i> E3	S	R	R	S	S
<i>staph</i> E4	S	R	R	S	S

Comme nous avons mentionné précédemment, chaque souche identifiée a été soumise à un antibiogramme afin de déterminer la sensibilité et la résistance aux différents antibiotiques.

D'après notre étude, les résultats obtenus montrent que la plupart des souches testées d'*Escherichia coli* sont résistantes à Céfotaxime, par contre elles présentent le phénotype sensible aux Amikacin, gentamycine, et Ciprofloxacine. En ce qui concerne les autres antibiotiques, nous observons qu'au sein de la même espèce et pour le même antibiotique il y a des souches qui présentent le phénotype sensible et d'autres présentent le phénotype résistant.

D'une manière générale, en prenant le cas de Céfotaxime, nous remarquons que nos résultats sont conformes à ceux rapportés par Ferjani *et al.* (2010). Par contre dans le cas par

exemple de la gentamycine, nos résultats d'accord avec les résultats décrits par Allen *et al.* (2011) qui ont confirmé la résistance d'*Escherichia coli* à la gentamycine.

Dans le cas de *salmonella spp* les résultats obtenus montrent que toutes les souches testées sont résistantes à Erythromycin sont conformes à ceux rapportés par Tunung *et al.* (2007). Par contre elles présentent une sensibilité à Ciprofloxacine, Amikacin, Streptomycine et Céfotaxime Yildirim *et al.* (2011).

Dans le cas de *staphylococcus spp* les résultats obtenus montrent que toutes les souches testées sont résistantes à Erythromycin et Vancomycin nos résultats sont conformes à ceux rapportés par Garnier *et al.* (2002). Par contre elles présentent une sensibilité à Ofloxacin, Amikacin et tobramycin nos résultats sont conformes à ceux rapportés par Elhamzaoui *et al* (2009).

Après les résultats obtenus et la comparaison avec JORA il détermine que les *staphylococcus spp* dépassé les normes avec une teneur de contamination plus élevé dans les Ech E1 et E2. Et les *salmonella spp* selon JORA la présence dans l'aliment indique que cette aliment et satisfaisants.

Les *coliformes totaux* ont été détectés dans tout l'échantillon d'olives (sauf Ech6) provenant du marché traditionnel. Ces micro-organismes sont des indicateurs de contamination fécale; leur présence dans les échantillons révèle donc un manque de bonnes pratiques d'hygiène pendant ou après la fabrication (Pereira *et al*, 2008).

Les olives vertes sont par la suite exposées à un risque élevé de contamination qui vient de leur environnement soit lors de leur commercialisation, dans des récipients ouverts, ou vient d'autres matières utilisées pour la farce (Moumene *et al*, 2013)

Alors les microorganismes peuvent entrer dans les étapes de fermentation des olives vert et ainsi que de l'environnement de vente, de l'équipement et des manipulateurs qui peuvent avoir un impact significatif sur le statut microbiologique des produits finis.

D'une manière générale, les résultats obtenus ont montré que l'optimisation des procédures d'hygiène dans le processus de production est nécessaire pour améliorer la qualité et la sécurité des olives de table, en particulier celles du marché / des producteurs traditionnels. Afin de réduire les risques de maladies d'origine alimentaire et de détérioration des aliments, il convient d'améliorer les bonnes pratiques en matière d'agriculture (BPA), d'hygiène (BPH) et de fabrication (BPF).

Pour arriver à un produit irréprochable, il faut respecter quelques règles de bases. En fait, les caractéristiques de la saumure doivent être en conformité avec les bonnes pratiques de fabrication pour assurer la stabilité ultérieure des olives. Le COI recommande une concentration en sel de 5 à 7 % et une acidité libre exprimée en acide lactique de 0,4 à 0,7 %. La norme marocaine ne fixe la concentration en sel de la saumure qu'à 5 % et le pH à 3. (*Moumene et al, 2013*)

Conclusion

Conclusion

Dans notre étude on a étudiés la qualité microbiologique d'olive vert fermentée vendue dans la wilaya de Biskra.

Après les résultats obtenus dans notre étude on a constaté une variation de taux des germes ce qui influence sur la qualité sanitaire des aliments qui a été apparue nettement. La contamination par les *coliformes*, ainsi que les analyses de recherche des germes pathogènes, ont permis de mettre en évidence la présence de *Staphylococcus*, *Salmonella* et *Bacillus* responsables d'intoxication alimentaire.

La présence des germes dans tous les échantillons analysée des olives vert fermentée considéré comme des produits contiennent un risque biologique liées au manque d'hygiène du matériel et personnelles au coure de préparation des aliments, ou l'utilisation de matière première contaminé. Nous avons constaté que ce dernier présente un véritable danger pour la santé et la vie publique.

Donc il est nécessaire aussi veiller à ce que le personnel qui manipule ses olives vertes ne risque pas de contaminer le produit. Les manipulateurs doivent avoir reçu une formation sur l'hygiène personnelle et sur les connaissances techniques nécessaires, aussi la compréhension requise pour des activités ou procédés dont ils sont responsables.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

AFNOR V 08-057-1 : (2004). Microbiologie des aliments : Méthode de routine pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 37°C – Technique avec confirmation des colonies. - Paris : AFNOR.- p. 15.

Amouretti M. et Comet G. 2000. Le livre de l'olivier, Ed, Edi, sud, 107p.

Allen, S. E., Boerlin, P., Janecko, N., Lumsden, J. S., Barker, I. K., Pearl, D. L., ... & Jardine, C. 2011. Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolates from wild small mammals living in swine farm, residential, landfill, and natural environments in southern Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(3), 882-888.

Alves, M., Gonçalves, T., & Quintas, C. 2012. Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' fermentations. *Food Control*, 23(2), 363-368.

Avril, J. L., Dabernat, H., Denis, F., & Monteil, H. 1992. bactériologie clinique, 2ème édition, édition marketing, p. 21.

Benlemlih M et Ghanam J .2012 . Polyphénols d'huile d'olive. *MEDICATRIX*, 123pp.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015).

Conseil Oléicole International (COI) .2004.Techniques de production en oléiculture

Delarras, C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.

Djadoun, S. 2011. Influence de l'hexane acidifié sur l'extraction de l'huile d'olive assistée par micro-ondes (Doctoral dissertation, UMMTO).

Djelouat S. 1990. Le diagnostic biochimique bactérien ; collection guides pratiques de microbiologie médicale, éditions sciences et techniques, Constantine, PP : 45.

Doyle, M. P. 2009. Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. Springer Science & Business Media.

DSA. 2013. Direction des services agricole de Biskra.

Elhamzaoui, S., Benouda, A., Allali, F., Abouqual, R., & Elouennass, M. 2009. Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylocoques aureus* isolées dans deux hôpitaux universitaires à Rabat, Maroc. *Médecine et maladies infectieuses*, 39(12), 891-895.

Ferjani, A., Mkaddemi, H., Tilouche, S., Marzouk, M., Hannechi, N., Boughammoura, L., & Boukadida, J. 2011. Caractéristiques épidémiologiques et bactériologiques des bactéries uropathogènes isolées dans un milieu pédiatrique. *Archives de pédiatrie*, 18(2), 230-234.

Floriano B., Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R. 1998. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4883–4890.

Franzetti, L., Scarpellini, M., Vecchio, A., & Planeta, D. 2011. Microbiological and safety evaluation of green table olives marketed in Italy. *Annals of microbiology*, 61(4), 843-851.

Jehl, F., Bonnet, R., Bru, J., Caron, F., Cattoen, C., & Cattoir, V. 2016. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations 2016. V1. 0 Février, 117.

Hajna, A. A. 1945. Triple-sugar iron agar medium for the identification of the intestinal group of bacteria. *Journal of bacteriology*, 49(5), 516.

Hanker, J. S., & Rabin, A. N. 1975. Color reaction streak test for catalase-positive microorganisms. *Journal of clinical microbiology*, 2(5), 463.

Holmes, B., Willcox, W. R., & Lapage, S. P. 1978. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system. *Journal of clinical pathology*, 31(1), 22-30.

Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., et al. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore. 787 p.

ISO 6579. 2002 .Microbiologie des aliments : Méthode horizontale pour la recherche des Salmonella spp. ISO 27p.

ISO 6887-1 .1999 . Microbiologie des aliments : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales. ISO 5p.

Garnier, F., Mariani-Kurkdjian, P., Nordmann, P., Ferroni, A., Vu-Thien, H., Philippe, J. C., & Raymond, J. 2002. Sensibilité aux antibiotiques des souches de staphylocoques et d'entérocoques isolées en pédiatrie. *Médecine et maladies infectieuses*, 32(8), 432-438.

Guignard J.L., Dupont F. 2004. *Abrégé de botanique : Systématique moléculaire*, 13ème édition : Masson, Paris, p : 209- 222.

Lazzeri, Y. 2009. Les défis de la mondialisation pour l'oléiculture méditerranéenne, L'olivier en Méditerranée. In Conférence Centre Culturel Français de Tlemcen-Algérie.

López-López, A., García-García, P., Durán-Quintana, M. C., & Garrido-Fernández, A. 2004. Physicochemical and microbiological profile of packed table olives. *Journal of food protection*, 67(10), 2320-2325.

Marples, R. R., & Richardson, J. F. 1982. Evaluation of a micromethod gallery (API Staph) for the identification of staphylococci and micrococci. *Journal of clinical pathology*, 35(6), 650-656.

Moumene, H., Hasib, A., Soumia, A. M. I. R., & Jaouad, A. 2013. Qualité Hygiénique des olives de table vendus en vrac dans la région Marrakech-Tensift El Hawz. *Les technologies de laboratoire*, 8(32).

Pereira, A. P., Pereira, J. A., Bento, A., & Estevinho, M. L. 2008. Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), 2895-2902.

Tunung, R., Chai, L. C., Usha, M. R., Lesley, M. B., Cheah, Y. K., Patrick, G. B., ... & Son, R. 2007. Incidence and characterization of *Salmonella* species in street food and clinical samples. *Journal of food safety*, 27(4), 345-361.

Yildirim, Y., Gonulalan, Z., Pamuk, S., & Ertas, N. 2011. Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. on raw chicken carcasses. *Food Research International*, 44(3), 725-728.

Ziane, M., Couvert, O., Le Chevalier, P., Moussa-Boudjema, B., & Leguerinel, I. 2016. Identification and characterization of aerobic spore forming bacteria isolated from commercial camel's milk in south of Algeria. *Small ruminant research*, 137, 59-64.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Les milieux de cultures.

➤ Milieu EMB (Eosine Bleu de Méthylèn)

-Composition type (g/l)

Peptone	10
Lactose	10
Eosine	0,4
Bleu de méthylène	0,065
Hydrogénophosphate de potassium	2
Agar	15

➤ Milieu MC (mac conkey)

-Composition type (g/l)

Peptone	20
Lactose	10
Sels biliaires	1.5
Cristal violet	0.001
Rouge neutre	0.05
Chlorure de sodium	5
Agar	15

➤ Milieu TSI (Triple sugar iron)

-Composition type (g/l)

Digestion pancréatique de caséine	10,0 g
Digestion peptique de tissu animal	10,0
Chlorure de sodium	5,0
Lactose	10,0
Saccharose	10,0
Glucose	1,0
Sulfate d'ammonium ferreux	0,2
Thiosulfate de sodium	0,2
Rouge de phénol	0,025

Gélose	13,0
--------	------

➤ Milieu MM (mannitol mobilité)

- Composition type (g/l)

Peptone de viande	15
Extrait de viande	03
Mannitol	10
Potassium nitrate	01
Rouge de phenol	0,05
Agar	05

➤ Milieu BLBVB

- Composition type (g/l)

Peptone pepsique de viande	10
Bile de bœuf desséchée	20
Lactose	10
Vert brilliant	2ml

➤ Milieu MH (Muller-Hinton)

-Composition type (g/l)

Infusion de viande de boeuf déshydratée	3 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar-agar	16 g

➤ Milieu BP (BAIRD-PARKER)

-Composition type (g/l)

COMPOSITION	(grammes/litre)
Tryptone	10,0
Extrait de viande de bœuf	5,0
Extrait de levure	1,0
Pyruvate de sodium	10,0
Glycocolle	12,0

Chlorure de lithium	5,0
Agar	20,0

➤ Bouillon MKTTn (MULLER-KAUFFMANN Tétrathionate Novobiocine)

-Composition type (g/l)

COMPOSITION	(grammes/litre)
Tryptone	7,0
Peptone de soja	2,3
Chlorure de sodium	2,3
Carbonate de calcium	25,0
Thiosulfate de sodium	40,7
Bile de bœuf	4,75

➤ BOUILLON RVS (RAPPAPORT VASSILIADIS SOJA)

-Composition type (g/l)

COMPOSITION	(grammes/litre)
Peptone de soja	4,5
Chlorure de sodium	7,2
Dihydrogénophosphate de potassium	1,26
Hydrogénophosphate de potassium	0,18
Chlorure de magnésium (anhydre)	13,58
Vert malachite	0,036

➤ Gélose SS (*Salmonella-Shigella.*)

-Composition type (g/l)

COMPOSITION	(grammes/litre)
Extrait de viande de bœuf	5,0
Peptone	5,0
Lactose	10,0
Sels biliaires	5,5

Citrate de sodium	10,0
Thiosulfate de sodium	8,5
Citrate ferrique	1,0
Vert brillant	0,00033
Rouge neutre	0,025
Agar	12,0

Annexe 02 :

Tableau 6: Table de Mac Grady.

Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre Caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	222	3.5
001	0.3	223	4.0
010	0.3	230	3.0
011	0.6	231	3.5
020	0.6	232	4.0
100	0.4	300	2.5
101	0.7	301	4.0
102	1.1	302	6.5
110	0.7	310	4.5
111	1.1	311	7.5
120	1.1	312	11.5
121	1.5	313	16.0
130	1.6	320	9.5
200	0.9	321	15.0
201	1.4	322	20.0
202	2.0	323	30.0
210	1.5	330	25.0
211	2.0	331	45.0
212	3.0	332	110.0
220	2.0	333	140.0
221	3.0		

ملخص

6 عينات من الزيتون الأخضر المخمر المحضر تقليدياً في الشارع من مدينة بسكرة. يتم تقييمها لجودتها الصحية. في كل منطقة ، يتم تحليل عينة لخصائصها البكتريولوجية.

تكشف الفحوصات البكتريولوجية عن وجود كائنات تتحكم في التلوث البرازي والمكورات العنقودية المسببة للأمراض والسالمونيلا والعصية. ويشهد وجود هذا التلوث على عدم وجود نظافة في أماكن البيع بسبب عدم احترام قواعد النظافة وعدم وجود ممارسات تصنيع جيدة لضمان استقرار الزيتون بشكل جيد.

الكلمات المفتاحية: الزيتون ، التحليل البكتريولوجي ، الجودة الصحية.

Résumé

6 échantillons d'olives vertes fermentées préparé traditionnellement commercialisés dans la rue, de la ville Biskra. Sont évalués pour leur qualité hygiénique. Dans chaque zone, un échantillon sont analysés pour leurs propriétés bactériologiques.

Les examens bactériologiques y révèlent la présence de germes témoins de contamination fécale, de *staphylocoques* pathogènes, de *salmonella* et de *bacillus*.

La présence de cette flore de contamination témoigne d'un manque d'hygiène dans les lieux de vente à cause du non-respect des règles d'hygiène et d'un manque des bonnes pratiques de fabrication pour assurer la bonne stabilité des olives.

Mots Clés : Olive, analyse bactériologiques, qualité hygiénique.

Summary

6 samples of fermented green olives prepared traditionally marketed in the street, from the city Biskra. Are evaluated for their hygienic quality. In each zone, a sample is analyzed for their bacteriological properties.

Bacteriological examinations reveal the presence of fecal contamination control organisms, pathogenic staphylococci, salmonella and bacillus.

The presence of this flora of contamination testifies to a lack of hygiene in the places of sale because of the non-respect of the rules of hygiene and a lack of good manufacturing practices to ensure the good stability of the olives.

Key words: Olive, bacteriological analysis, hygienic quality.