

**ETUDE DES PROFILS BACTERIOSTATIQUES ET BACTERICIDES
D'EXTRAITS VEGETAUX VIS-A-VIS DE GERMES PATHOGENES
IMPLIQUES DANS LA CONTAMINATION DES DENREES
ALIMENTAIRES D'ORIGINE ANIMALE**

H. N. BASSOLE¹, Z. I. KABORE², A.S. TRAORE¹

1 : Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles/
Université de Ouagadougou BP 7021

2 : Institut de Recherche en Sciences de la Santé BP 7047 Ouagadougou

RESUME

Ce travail s'inscrit dans la perspective d'une valorisation des ressources végétales du Burkina et l'amélioration de la qualité hygiénique des aliments. Il a pour but d'identifier de nouveaux conservateurs alimentaires et de nouveaux antibiotiques, disponible localement, contre les germes couramment impliqués dans la contamination des denrées alimentaires et responsables de diarrhées.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles des fruits de *Xylopia aethiopica* et des feuilles de *Lippia multiflora* a été évaluée sur deux souches du genre *Staphylococcus* et une souche d'*Escherichia coli* par les méthodes diffusion et la dilution. Les deux huiles essentielles ont présenté une activité antibactérienne. La plus forte activité a été obtenue avec l'huile essentielle des feuilles de *Lippia multiflora* vis-à-vis de *staphylococcus spp* avec une concentration minimale inhibitrice de 0,17 µg /ml et une concentration minimale bactéricide de 0,35 µg /ml.

Des tests comparatifs de l'activité ont été effectués avec des disques de pénicilline et de gentamicine.

Key words : *Lippia multiflora*, *Xylopia aethiopica*, méthode, concentration minimale inhibitrice, concentration minimale bactéricide, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

INTRODUCTION

Le Burkina est un pays où prédomine l'activité agropastorale. Près de 80% de la population active tire une partie de ses revenus de l'élevage [6]. L'élevage constitue la deuxième source de revenus de la population burkinabé après l'agriculture. La production annuelle de viande est estimée à 106000

tonnes et celle du lait à 165000 tonnes [14]. Cette contribution à l'alimentation est importante mais présente des risques du point de vue de l'hygiène alimentaire.

Des enquêtes menées dans le cadre du Programme National Pilote de Développement laitier sur le lait et les troupeaux ont donné des taux de positivité de 1,3% à 7,8% pour la tuberculose, 7% pour la brucellose et 30,9% pour les mammites. La qualité micro biologique du lait demeure inconnue, alors qu'il participe à 79% de sa production à l'alimentation des populations [14]. De plus la conservation du lait est difficile et sa contamination facile. Les intoxications et les infections dues à la contamination du lait sont courantes. Il se pose donc un problème de santé publique lié à sa consommation.

La connaissance de sa qualité micro biologique pourrait permettre de réduire les risques alimentaires par l'utilisation de méthodes de traitements physiques ou par des transformations permettant l'adjonction d'additifs alimentaires telles que les huiles essentielles.

Les huiles essentielles sont connues à la fois pour leurs propriétés aromatisantes et antimicrobiennes et leur toxicité réduite comparée à celle des additifs alimentaires synthétiques [5,10]. Les propriétés fongicides des huiles essentielles des fruits de *Xylopi aethiopica* et des feuilles de *Lippia multiflora* ont été mises en évidence [4]. L'essence des feuilles de *Lippia multiflora* possède une activité antimalariale [15]. Les fruits de *Xylopi aethiopica* sont utilisés dans le traitement de la dysenterie, des parasitoses et comme épices [11]. Quant aux feuilles de *Lippia multiflora*, elles sont utilisées sous forme de boissons théïformes dans le traitement de la jaunisse, du paludisme, des insuffisances hépatiques et des furoncles [15, 12].

La présente étude a porté sur le contrôle de la qualité micro biologique du lait cru de vache de trois zones périphériques de la ville de Ouagadougou et sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des fruits de *Xylopi aethiopica* et des feuilles de *Lippia multiflora*.

MATERIEL ET METHODES

Contrôle de qualité

Matériel biologique

Trente échantillons de lait cru de vache provenant de trois zones périphériques de la ville de Ouagadougou (Zagtouli, Loumbila et Hamdallaye) ont été analysés.

Méthodologie d'analyse

Les méthodes d'analyse utilisées sont celles décrites par les normes AFNOR de 1996 [1, 2].

Echantillonnage du lait de vache analysé

Les échantillons ont été prélevés à partir des stocks des livreurs.

Les prélèvements ont été effectués avec des seringues stériles de 10 ml. Le lait prélevé a été conditionné dans des flacons stériles de 125 ml. Les échantillons ont été transportés dans une glacière contenant de la glace pilée [1, 2]. Le temps de transport variait d'une heure à quatre heures. Les échantillons ont fait l'objet d'un traitement immédiat au laboratoire.

Dénombrements des germes et analyses statistiques des résultats

Le dénombrement des flores microbiennes a été réalisé par la technique du " Standard Plate Count ". Les milieux de culture et les conditions d'incubation sont consignés dans le tableau I [1, 2].

Le nombre d'unités formatrices de colonies (UFC=N) par millilitre de lait est donné par la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1+0,1n_2)d}$$

où

$\sum C$ est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives et dont une contient au moins 15 colonies et au plus 150 colonies pour les milieux spécifiques. Pour la gélose nutritive ces valeurs sont 30 et 300.

V est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitre ;

n_1 est le nombre des boîtes retenues à la première dilution ;

n_2 est le nombre des boîtes retenues à la seconde dilution ;

d est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Les résultats donnés correspondent aux moyennes de dix analyses par échantillons. Ils sont exprimés log UFC avec un intervalle de confiance de 95% [1, 2]. Les germes ont été identifiés par des tests biochimiques de routines [1, 2,]

Préidentification et identification des germes

La pré identification des germes a consisté en une observation à l'état frais, une coloration de Gram, une recherche de la catalase et un recherche de l'oxydase.

Les tests d'identification ont été sélectifs des genres bactériens. Les caractères biochimiques suivants ont été testés :

- la fermentation du glucose et du lactose par les coliformes, les shigelles et les salmonelles,
- le métabolisme du mannitol et à la recherche de la désoxyribonucléase des staphylocoques,
- la fermentation du lactose, et la liquéfaction de la gélatine par les clostridies,
- la résistance des entérocoques sur le bouillon bilié à 40 % [1, 2].

Extraction des huiles essentielles

Matériel végétal

Les échantillons végétaux ont été achetés dans deux marchés locaux de la ville de Ouagadougou. Les fruits secs de *Xylopiya aethiopica* ont été achetés au marché du secteur 29 et les feuilles sèches de *Lippia multiflora* à la place Naba Koom.

Méthode d'extraction

Les huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation sous pression atmosphérique [3,15].

Etude de l'activité antibactérienne

Matériel biologique

Les tests antibactériens ont été effectués sur les germes les plus courants et numériquement majoritaires et couramment responsables de diverses pathologies. Ces germes présentent généralement une résistance aux antibiotiques. Il s'agit de deux souches *staphylococcus spp* et d'une souche d'*E. coli*

Méthodologie

Deux méthodes ont été utilisées pour cette étude.

La méthode de dilutions ou méthode de Kirby-Bawer 1960

La méthode de dilution consiste à préparer une série de tubes de bouillon Mueller-Hinton contenant des concentrations d'huile essentielle variant de 0,25µg/ml à 20µg/ml et on inocule avec une population de l'organisme à tester [5, 9, 13].

La concentration la plus faible de l'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 16 à 20 heures d'incubation à 37°C est la concentration minimale inhibitrice notée CMI [13].

On détermine la concentration minimale bactéricide ou CMB en ensemençant un échantillon des tubes ne présentant pas de croissance sur la gélose de Mueller-Hinton. La concentration d'huile essentielle la plus faible à laquelle 99,99% des bactéries sont tuées, après 24 heures d'incubation à 37°C correspond à la CMB [13].

La méthode de diffusion

Dans la méthode de diffusion, la gélose de Mueller- Hinton estensemencée avec une suspension bactérienne de 16 à 20 heures [5, 13].

Un disque stérile de 9 mm de diamètre découpé dans du papier Whatman n°1 stérilisé, est déposé sur la gélose. Le disque est ensuite imbibé d'un volume donné d'huile essentielle.

Le disque s'humidifie progressivement et l'huile essentielle diffuse radialement du disque dans la gélose en formant un gradient de concentration [13].

Après 16 à 20 h d'incubation, une zone ou un halo claire est présent autour du disque si l'huile essentielle inhibe le développement bactérien. Plus la zone entourant le disque est grande, plus le germe est sensible [13].

Test de mise en évidence de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites

Il a été réalisé par la méthode de diffusion [7,13].

Les germes testés sont :

- Staphylocoque I (germes isolés sur chapman mannité) : coques à Gram (+), catalase (+), DNase (+), mannitol (+) ;
- Staphylocoque II (germes isolés sur chapman mannité) : coques à Gram (+), catalase (+), DNase (-), mannitol (-) ;
- *E. coli* I (germes isolés sur le milieu des coliformes) : batonnets à Gram (-), catalase (+), oxydase (-), Indole (+), lactose (+), glucose (+), gaz (+).

Les masses d'huiles essentielles utilisées sont :

- 5µg pour l'huile essentielle des feuilles de *lippia multiflora* ;
- 20 µg pour l'huile essentielle des fruits *Xylopiæ aethiopicæ*.

Détermination de la CMI et de la CMB de l'huile essentielle des feuilles de *Lippia multiflora* pour les staphylocoques

Nous avons utilisé la méthode des dilutions. Les solutions consignés dans le tableau II ont été préparées

Les huiles essentielles sont dissoutes dans l'alcool à titre élevé, 95°.

La densité bactérienne du tube 1 a été déterminée par dilution en cascade puis ensemencement sur gélose de Mueller-Hinton. Un tube est ensemencé avec 100 µl d'alcool en vu de l'évaluation de l'effet de l'alcool à la concentration de 2% [5].

Etude comparée de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de *lippia multiflora* avec celle de deux antibiotiques : la pénicilline et la gentamicine.

La méthode utilisée est celle de l'antibiogramme par diffusion.

- l'huile essentielle des feuilles de *Lippia multiflora* 4 µg,
- Pénicilline :disque de 10 µg,

- Gentamicine : disque de 10 µg

Nous avons comparé les diamètres des zones d'inhibition [4].

RESULTATS

Contrôle de qualité

Dénombrement

En ce qui concerne le dénombrement, les valeurs moyennes de germes obtenus pour chaque lot de lait, sur les différents milieux de culture, sont nettement supérieures à celles admises par les critères micro biologiques de satisfaction à la consommation des normes AFNOR de 1996 [1, 2]. Les plus fortes valeurs ont été observées sur le milieu de Chapman, la gélose lactosée biliée au rouge neutre et au violet cristal et la gélose SS Tableau III.

Identification

Les tests biochimiques ont permis d'identifier des germes pathogènes appartenant aux genres : *Staphylococcus* dont *Staphylococcus aureus*, *Entérocooccus*, *Clostridium* et des germes d'altération appartenant aux genres : *Escherichia* dont *E. coli*, *Proteus*, *Enterobacter* (tableau IV). Ces germes sont susceptibles de provoquer de nombreuses pathologies en particulier les diarrhées [8]. Cela impose donc un traitement thermique préalable du lait avant sa consommation. Cependant, on ne peut ignorer les dangers liés à la consommation de ce lait. Le traitement de ces pathologies par les antibiotiques revient généralement très active vis-à-vis des souches de *Staphylococcus spp*. Les valeurs obtenues étaient 0,88 µg/ml pour la CMI et 1,8 µg/ml pour la CMB. Le rapport de la CMB/CMI était de 2.05. L'huile essentielle des feuilles de *Lippia multiflora* possédait donc une activité bactéricide vis-à-vis des souches de *Staphylococcus spp* [13]. Ces résultats confirment donc la forte activité de l'essence de *Lippia multiflora*.

Tests comparatifs des activités antibactériennes

Les résultats des tests de comparaison des diamètres d'inhibition de l'huile essentielle des feuilles de *lippia multiflora*(4µg) à ceux des disques de 10µg pénicilline et de gentamicine sont reportés dans le tableau V.

A une dose 2.5 fois inférieure à celle de la pénicilline et de la gentamicine, l'huile essentielle des feuilles de *Lippia multiflora* a provoqué une inhibition supérieure.

Les valeurs de la CMI, de la CMB et des diamètres d'inhibition des tests de comparaison montrent les deux souches de *Staphylococcus* testées sont très sensibles à l'essence de *Lippia multiflora* et confirment l'usage traditionnel des feuilles de *Lippia multiflora* dans le traitement des furoncles et des diarrhées [12].

Les staphylocoques sont connus pour leur implication dans la contamination des aliments et comme agents causaux de nombreuses pathologies. Leur antibio-résistance est également connue. Il apparaît donc de plus en plus urgent de trouver des antibiotiques alternatifs que l'on pourrait non seulement utiliser de traitement de ces pathologies mais également comme agents conservateurs de certains aliments tels les jus et les yaourts afin de réduire les risques de contamination alimentaires [10]. Cette utilisation des huiles essentielles locales à cet effet ne pourrait se faire sans les preuves scientifiques de leur activité d'une part et la connaissance de leurs propriétés physico-chimiques d'autre part.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats de notre étude indiquent la présence, dans le lait cru de vache analysé, de germes de contamination appartenant aux genres : *Escheric* fruits de *Xylopi* *aethiopica*.

Ces résultats justifient l'utilisation thérapeutique de ces plantes dans le traitement de certaines pathologies. Ils pourraient cependant être améliorer : Pour ce qui est des analyses microbiologiques, un élargissement de l'échantillonnage à l'ensemble de la ville de Ouagadougou voire du pays fournirait une banque de données intéressantes sur les laits locaux. Pour ce qui concerne l'huiles essentielle des feuilles de *Lippia multiflora*, un approfondissement de l'étude des paramètres d'extraction, de sa composition chimique et de on spectre d'activité antibactérienne constituerait une valorisation des ressources locales. Elle pourrait être utilisée en agroalimentaire comme additif alimentaire et dans le traitement de certaines pathologies.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - Association Française de Normalisation (1996). Méthodes horizontales. Analyses microbiologiques, I. *AFNOR* 521.
- 2 - Association Française de Normalisation (1996). Méthodes sectorielles. Analyses microbiologiques, II. *AFNOR* 521.
- 2 - **AYEDOUN M. A.** (1995). Contribution à la connaissance chimique des huiles essentielles de plantes aromatiques du Bénin en vue de leur valorisation. *Thèse, Université Nationale du Bénin*, 7-118.
- 4 - **BABA-MOUSSA F., KOUMAGLO K., AYEDOUN A., AKPAGANA K., MOUDACHIROU M., BOUCHET P.**, 1997. Antifungal activity of essential oils extracted in the African states of Togo and Benin. *Cryptogamie, Mycologie*, 165-168.
- 5 - **CARSON C.F., HAMMER K.A. and RILEY T.V.** (1995). Broth micro-dilution method for determining the suceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternafolia* (tea tre oil). *Microbios*, 82, 181-185.
- 6 - Institut National des Santé et de la Démographie (1993). Analyse des résultats de l'enquête démographique de 1991. Ministère de l'Economie et des Finances, Macro International Inc., 327.
- 7 - **JANSEN A. M., CHIN N. L. J., SCHEFFER J.J.C. and BAERHEM SVENDSEN A.** (1986). Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. *Pharm Weekbl [Sci]* , 8 289-292.
- 8 - **JAY J. M.** (1996). Modern food microbiology. *Ochapman ∞ Hall*, 5^è éd., 661.
- 9 - **LANGEZAAL C.R., CHANDRA A. and SCHEFFER J.J.C.** (1992). Antimicrobial screening of essntial oils extacts of some *Humulus lupulus* l. cultivars. *K Pharma. Weekl.*, 14, 353-356.

- 10 - LIS-BALCHIN M. and DEANS S.G. (1997). Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol., 82 , 759-762
- 11 - MAURY M. (1987). Milieux et réactifs de laboratoire pasteur. Microbiologie, Immunologie. *Diagnostic Pasteur*, 545.
- 12 - NACOULMA / OUEDRAOGO O. G. (1996). Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso : cas du plateau central. *Thèse d'état*, Université de Ouagadougou, 92-93, 155, 250-251.
- 13 - PRESCOTT, HARLEY, KLEIN (1995). Microbiologie. *De Boek-Wesmael S.A.*, 1014.
- 14 - Service des Statistiques Animales (1996). Rapport 1995 *Ministère des Ressources Animales*, 30.
- 15 - VALENTIN A., PÉLISSIER Y., BENOÎT F., MARION C., KONÉ D., MALLIE M., BASTIDE J.M. and BESSIÈRE J. M. (1995). Composition and anti-malaria activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*. *Phytochemistry*, 40, 1439-1442.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre profonde gratitude à Madame Laurentine OUEDRAOGO du Laboratoire National d'Élevage.