

Chapitre 2 : Etude microbiologique

I. Etude microbiologique des huiles :

L'Huile d'olive vierge est obtenue à partir des olives, uniquement par des procédés mécaniques ou par d'autres procédés physiques, dans des conditions thermiques notamment, qui n'entraînent pas d'altération de l'huile, et n'ayant subi aucun traitement autre que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration.

Certes, la variété et la région de provenance de l'olive (Sol, climat...) influencent la qualité finale de l'huile d'olive vierge. Mais, le savoir faire des hommes intervient, également, à chaque étape de la production, le choix d'une technique n'est jamais anodin sur la qualité de la production de ce jus de fruit qu'est l'huile d'olive vierge. L'homme participe ainsi à la valorisation de l'huile d'olive, que ce soit au niveau du choix de la date de récolte, de la technique ou des conditions d'extraction d'huile (AFIDOL, 2005)

Des analyses microbiologiques ont été effectuées sur les prélèvements des huiles d'olives de chaque variété.

Les prélèvements d'huile d'olive ont été effectués dans les conditions d'asepsie, recueillis dans des flacons stériles et acheminés dans les plus brefs délais vers le service microbiologie des aliments du laboratoire vétérinaire régional de Tlemcen.

I.1. Techniques d'analyses :

I.1.1. Préparations de la suspension mère et ses dilutions décimales :

I.1.1.1. Prise d'essai :

On prélève aseptiquement 25 ml de l'échantillon de l'huile d'olive à analyser qu'on dilue avec 225 ml du TSE, cette suspension mère une fois homogénéisée est alors au $1/10$ ou 10^{-1} .

I.1.1.2. Dilutions décimales :

- Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette en verre graduée et stérile, 1 ml de la dilution 10^{-1} dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml du même diluant TSE, cette dilution est alors au $1/100$ ou 10^{-2} .
- Introduire par la suite 1ml de la dilution 10^{-2} dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml du même diluant : cette dilution est alors au $1/1000$ ou 10^{-3}

I.2. Méthodes d'analyses :**I.2.1. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux –
Norme NF ISO 4833**

A partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} , porter aseptiquement 1 ml dans une boîte de Pétri vide préparée à cet usage et numérotée.

Compléter ensuite avec environ 20 ml de gélose PCA (**voir annexe 5**) fondue puis refroidie à $45 \pm 1^\circ\text{C}$. Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose utilisée.

Incubation :

Les boîtes seront incubées couvercle en bas à 30°C pendant 72 heures.

Lecture :

On effectue le dénombrement des colonies qui se présentent sous forme lenticulaire en masse.

**I.2.2. Recherche et dénombrement des Coliformes fécaux
NF V 08-060**

A partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} , porter aseptiquement 1 ml dans une boîte de Pétri vide préparée à cet usage et numérotée.

Compléter ensuite avec environ 20 ml de gélose VRBL (**voir annexe 5**) fondue puis refroidie à $45 \pm 1^\circ\text{C}$. Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose utilisée. Laisser solidifier sur paille, puis rajouter une deuxième couche d'environ 5 ml de la même gélose ou de gélose blanche. Cette double couche a un rôle protecteur contre les contaminations diverses.

Incubation :

Les boîtes seront incubées à 44°C pendant 24 h

Lecture :

On effectue le dénombrement des colonies rouges ayant poussé en masse et fluorescentes.

I.2.3. Recherche de Staphylococcus aureus - Norme ISO 6888

A partir des dilutions, porter aseptiquement 1 ml en surface des boîtes contenant le milieu de Baird Parker + jaune d'œuf au Tétracycline de potassium puis étaler. (**Voir annexe 5**)

Incubation.

L'incubation se fait à 37°C pendant 48 heures.

Lecture.

Seront considérées comme positives, les boîtes contenant des colonies caractéristiques à savoir des colonies noires, brillantes, convexes entourées d'une zone de transparence qui peut être translucide. Pour s'assurer qu'il s'agit bien de colonies de *Staphylococcus aureus*, effectuer sur plusieurs colonies de chaque boîte des tests biochimiques catalase et coagulase.

I.2.4. Recherche et dénombrement de Levures - Norme NF ISO 7954

A partir des dilutions, porter aseptiquement 4 gouttes dans une boîte de pétri contenant de la gélose Sabouraud au Chloramphénicol (**voir annexe 5**).

Incubation :

Incuber à 20 - 25°C pendant 5 jours.

Lecture.

- Pour revenir à 1 ml, il faut multiplier le nombre des levures trouvé par 5 puis par l'inverse de la dilution.

I.2.5. Recherche de Salmonella - Norme NF EN ISO 6579Jour 1 : Pré-enrichissement.

Prélever 25 ml de l'huile d'olive à analyser dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée et incuber après homogénéisation à 37°C pendant 18 heures.

Jour 2 : Enrichissement.

L'enrichissement doit s'effectuer par 1 ml sur le milieu de Rappaport Vassiliadis avec Soja réparti à raison de 10 ml par tube et incuber à 37°C pendant 24 h. (**voir annexe 5**)

Jour 3 : Isolement.

Un ensemencement sur le milieu gélosé Hektoen. (**Voir annexe 5**)

Jour 4 : Identification.

Celle-ci s'effectue par les divers tests : Morphologique, biochimique et antigénique.

I.3. Résultats des analyses microbiologiques des huiles :

	<i>Flores Totales</i>	<i>Coliformes Fécaux</i>	<i>Levures</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Qualité
Huile Sigoise (Sebdou)	AB	AB	AB	AB	AB	Qualité satisfaisante
Huile Chemlal (Remchi)	- 40 - 60 - 30 - 10 ² - AB	AB	-AB -AB -AB -10 -AB	AB	AB	Qualité satisfaisante
Huile Chemlal (B.Snous)	-50 -AB -AB -70 -90	AB	-AB -AB -AB -AB -10	AB	AB	Qualité satisfaisante
Huile Oléastre (Ourit)	-10 ² -10 ² -70 -70 -60	AB	-10 -10 -AB -AB -AB	AB	AB	Qualité satisfaisante

*AB : Absence.

I.4. Interprétation des résultats :

Nous avons procédé à l'analyse microbiologique des 4 prélèvements : **Sigoise** de Sebdou, **Chemlal** de Remchi, **Chemlal** de Beni Snous et **Oléastre** d'Ourit à raison de 5 échantillons par prélèvement comme l'oblige la norme Algérienne (Journal Officiel du 27 mai 1998) (**Voir Annexe 4**)

On note une absence totale dans la gamme des germes pathogènes recherchés à savoir salmonella et staphylocoque aureus et pour les coliformes fécaux aussi, ceci est expliqué par le fait que l'huile d'olive est un milieu hostile pour les bactéries.

La présence de levures à des taux tolérés dans certains lots s'explique par le fait que l'huile d'olive est un milieu favorable au développement de certaines levures.

La flore totale témoin de l'exposition de l'huile à l'air diffère d'un lot à un autre mais toujours à des seuils tolérés par le journal officiel. La faculté que possède l'huile d'olive à faciliter le développement des levures et des germes totaux oblige un suivi rigoureux des conditions de stockage. Les résultats ont été satisfaisants et tous les prélèvements analysés répondent à la conformité microbiologique. (**Voir Annexe 4**).