



Amlou produit de terroir Marocain: Qualité hygiénique et étude de l'antibiorésistance des souches de contamination (Amlou Moroccan terroir product: hygienic quality and study of the bacteria resistance)

S. Nabbouti^{1,2}, A. Hasib², K. Khedid¹, A. Quasmaoui¹, G. Al Askari³, Z. Mennane^{*1}

1 Institut National d'Hygiène, Rabat

2 Equipe EVAR; Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal

3 Faculté des Sciences, Rabat

Received 24 Sept 2013, Revised 16 Jan 2014, Accepted 18 Jan 2014

* Corresponding author. E mail: menzakaria@hotmail.com ; Tel 0664214907.

Résumé

Amlou est un produit de terroir marocain composé d'huile d'argan, d'amandes et du miel. Actuellement, beaucoup de points de vente préparent Amlou par l'utilisation d'huile végétale de tournesol ou de soja, cacahuètes avec du miel sucré. Nous avons prélevé de différents points de vente, 30 échantillons traditionnels et 18 échantillons industriels. Les analyses physico chimiques ont porté sur l'indice d'acide (IC), l'acidité (Ac), le potentiel redox (PR) et l'extrait sec total (EST), alors que les contrôles microbiologiques ont concerné : la flore mésophile aérobie totale (FMAT), les coliformes totaux (CT) et coliformes fécaux (CF), les *Salmonelles* (*salm*), les *Staphylococcus aureus* (SA), le *Clostridium perfringens* (CP), les levures (*Lev*), les moisissures (*Ms*) et les bactéries lactiques (BL). Les résultats obtenus sur Amlou traditionnel dépassent de loin les normes marocaines concernant l'hygiène des aliments surtout que 80% des échantillons traditionnels montrent des valeurs de (IC) >3.3% et sont trop chargés en FMAT ($3.90 \cdot 10^7$ ufc /g), CT ($6.48 \cdot 10^4$ ufc /g) et CF. Ceci témoigne des manipulations non hygiéniques au cours de la préparation du produit. Quant au Amlou industriel, 83.4% des échantillons ont une (IC) <3.3% et que les moyennes en FMAT, CT et CF sont successivement de $5.18 \cdot 10^5$, 30 et 7 ufc /g ce qui indique sa conformité. Les résultats d'identification des coliformes isolés à partir d'Amlou traditionnel montrent la prédominance de *Klebsiella* (77%) suivi des *Escherichia coli* (8%) et dont 30% de ces deux dernières entérobactéries présentent un mécanisme de résistance de type pénicillinase. Pour les souches lactiques isolées, elles appartiennent en majorité au genre *Lactobacillus*.

Mots clés : Amlou, qualité hygiénique, analyses microbiologiques, antibiogramme.

Abstract

Amlou is a production purely in the region of Souss and Tamezert of Morocco. It is composed of argan oil, almonds and honey. Currently, in many retail outlets (cakes, snack ...) Amlou is prepared by using sunflower oil or soybean oil, peanut and honey sweet. In our study 30 samples of traditional and 18 industrial samples of Amlou were taken from various areas of Rabat and Salé. The established characterizations were the physicochemical (pH, redox potential and the dried matter) and microbiological (total mesophil aerobic flora, total and faecal coliforms, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, yeasts and lactic bacteria). The results obtained were confronted with national and international standards. The microbial profiles found had non-conformance to the standard for a traditional type. Quality is acceptable for 65% of industrial samples, it is essential to adopt certain practices include hand hygiene; ensure the quality of ingredients that goes into preparing Amlou.

Keywords: Amlou, hygienic quality, microbiology, susceptibility testing

1. Introduction

Amlou est un aliment très estimé par les populations locales montagnaises et commercialisé principalement d'une manière traditionnelle dans les différents Souks hebdomadaires de Souss. Sa préparation est réalisée d'une manière traditionnelle soit individuellement ou en coopérative, ou bien d'une façon semi industrielle par des entreprises dont le nombre est limité. Amlou est une préparation à base d'huile d'argan (1) (2) sous

forme d'un liquide très visqueux, de couleur marron clair et à l'odeur de noisette. C'est un produit alimentaire de terroir très apprécié typique de la région de Sous.

L'analyse chimique a révélé que l'huile d'argan est particulièrement bien équilibrée en termes de composition en acides gras (3) et (4). L'huile d'argan est riche (80%) en acides gras insaturés, dont 43% sont des acides gras mono-insaturés (acide oléique en particulier). L'huile d'argan est également connue riche en composés phénoliques et stérols (3) et (5). Il présente diverses propriétés biologiques largement connues par la médecine traditionnelle et démontrées scientifiquement. Il est notamment le cas pour les utilisations traditionnelles de l'huile d'amande pour diminuer le cholestérol et l'hypertension (6) et (7), pour traiter les maladies de la peau telles l'acné et la varicelle pustule (3), et peut jouer un rôle analgésique, anti-inflammatoire (8) et antimicrobien (3). Les recherches cliniques les plus avancées ont établi qu'un régime alimentaire enrichi par l'huile d'argan peut être recommandé pour les patients ayant des maladies cardio-vasculaires (9).

Actuellement, beaucoup des points de vente (pâtisserie, snack etc.) préparent Amlou par l'utilisation d'huile végétale de tournesol ou soja, cacahuètes et le miel sucré. Généralement pour un litre d'huile d'argan, on utilise un kilo d'amandes ou de cacahuètes et 250 à 300 g de miel ou de sucre. La préparation se fait grâce au moulin traditionnel à bras qui assure à la fois le broyage des amandes et l'homogénéisation du miel avec le reste des constituants. Amlou est répandu dans la médecine populaire comme aphrodisiaque (10). En moyenne, 100 g d'Amlou d'amandes apportent environ 690 kcal, 8,7 g de protéides, 67 g de lipides, 23 g de glucides, 111 mg de Calcium et 108 mg de Magnésium (11).

Au cours de ces dernières années nous assistons à une forte demande d'Amlou par les Marocains ce qui encourage à étudier la qualité de ce produit. C'est dans ce cadre que s'inscrit l'objectif de ce travail qui a porté sur la caractérisation physico-chimique et microbiologique d'Amlou par l'évaluation de la qualité hygiénique de 50 échantillons d'Amlou traditionnel et industriel. Nous avons étudiés également, l'antibiorésistances de certaines souches isolées.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Echantillonnage

48 échantillons d'Amlou ont été prélevés à partir de différents points de ventes des régions de Rabat et Salé (30 échantillons traditionnels) : 6 échantillons de quartier Takadoume, 9 échantillons de quartier Kammra, 6 échantillons de quartier G3, 6 échantillons de quartier Hassan et 3 échantillons de Salé qui sont comparés aux 18 échantillons industriels de trois entreprises de marques notées de 1 à 6. La fréquence des prélèvements est fixée à une fois par semaine et la période de collecte se situe entre les mois de mars et juin 2010.

2.2. Analyses physicochimiques:

-pH et potentiel redox rH :

Le pH et le potentiel redox sont mesurés en même temps à l'aide d'un pH mètre multi-paramètres préalablement étalonné par les solutions tampons à pH = 4 et pH = 7 ; cette méthode est décrite par la norme NM00.2.2.213-2008 (12).

-L'acidité libre :

L'acidité libre a été déterminée par la mise en solution d'une prise d'essai de 1 g d'huile d'Amlou dans 50 ml d'éthanol en présence de phénophtaléine, comme indicateur coloré, puis titrage des acides gras libres présents avec une solution d'hydroxyde de potassium 0.1 N (13).

-Extrait sec total :

L'extrait sec total est obtenu par étuvage d'une masse pesée d'Amlou à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant selon la norme d'essai NM ISO 5534- 2001 (14).

2.3. Analyses microbiologiques:

-Flore mésophile aérobie totale (FMAT) :

Le dénombrement de la FMAT a été effectué après dilutions appropriées de l'échantillon dans le bouillon eau péptonnée tamponnée puis ensemencé sur milieu Plat Count Agar (PCA) et incubation à 30°C pendant 72 heures (15).

-Coliformes totaux (CT) et coliformes fécaux (CF): Le dénombrement des coliformes totaux a été effectué sur milieu MacConkey Agar et incubé à 30°C pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes fécaux. Après 24h d'incubation, nous avons dénombré les colonies rouges (16).

-Staphylococcus aureus :

Le dénombrement est effectué sur milieu Baird Parker, après incubation à 37°C pendant 24 h (17).

-Salmonella spp :

Pré-enrichissement : Dans un erlenmeyer de 250 ml, qui contient 225 ml d'eau peptonée tamponnée, on ajoute 25g de l'échantillon. Le flacon est incubé à 37°C pendant 12 heures.

Enrichissement : on utilise deux milieux pour l'enrichissement, le bouillon Muller Kauffman au tétrathionate (MKTn) (Merck, Allemagne).

Isolement : les tubes de MKTn montrant une culture sont repiqués sur gélose XLDA. L'ensemencement du milieu est effectué par isolement en surface de la gélose. Le milieu est incubé à 37°C pendant 24 h. Les colonies de salmonelles apparaissent vertes (17) ce qui recommande l'utilisation du MKTn.

Identification : la procédure décrite par Poelma et Silliker (18).

-Bactéries lactiques :

L'isolement des bactéries lactiques est effectué sur le milieu Man Rogosa et Sharpe (MRS). L'incubation est effectuée à 30°C pour les espèces mésophiles pendant 48h (17).

-Levures et moisissures

Le comptage des levures et des moisissures se fait sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) fortement acidifié (pH=3, pH=3.5) par l'acide lactique. Le dénombrement est effectué après 3 jours d'incubation à 30°C pour les levures et 6 à 7 jours pour les moisissures (17).

-Clostridium sulfato- réducteurs (CSR)

Le dénombrement des CSR a été réalisé sur le milieu SPS (Sulfite de sodium- Polymixine-Sulfite de Cystéine) (16).

2.4. Isolement et identification des entérobactéries isolés

Les colonies des coliformes ont été transférées dans DL agar, toutes les souches ont été testées par gramme de taches et d'activité oxydase. L'identification des isolats a été réalisée par la détermination du profil biochimique de la réaction à l'aide des API 20 (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, France).

2.5. Profil de sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques (des 13 souches) a été effectuée par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton selon les recommandations du NCCLS. Les disques d'antibiotiques (Oxoid Ltd., Angleterre) testés sont : AMP: ampicilline 25µg, AMX : amoxicilline 25µg, CTX : Céfotaxime 30µg, AMC : amoxicilline + Ac clavulanique 20/10µg, CF: céfalotine 30µg, GM: gentamicine 10µg, CIP : ciprofloxacine 5µg, STX: co-trimoxazole 10µg, CRO : Céftriaxone 30µg, TIC: Ticarcilline 75µg, NA : acide nalidixique 30µg et le CN : céfalexine 30µg.

2.6. Isolement et identification des souches lactiques :

Des souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir d'Amlou. L'isolement est réalisé sur milieu de Man Rosoga et Sharpe (MRS) (Difco, Detroit, USA) solide, milieu adapté à la recherche spécifique des lactobacilles. Les cultures sont incubées à l'obscurité pendant 24 heures à 30°C. La purification est effectuée par quatre repiquages successifs d'étalement en milieu MRS solide.

L'identification est établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : catalase, température de croissance, production de gaz carbonique et fermentation de divers sucres.

3. Résultats et discussion

3.1. Analyses physico-chimiques

Les analyses physico-chimiques des échantillons d'Amlou traditionnel (AT) prélevés à partir de différents points de ventes, et d'Amlou industriel (AI) montrent des valeurs moyennes de pH et de matière sèche successivement de 6.46 et 96.62% pour AT et de 6.10 et 96.85% pour AI (tableau 1 et 2).

Pour l'acidité d'huile utilisée dans la préparation d'Amlou traditionnel exprimée en pourcentage d'acide oléique est en moyenne de 3.42%.

Concernant le potentiel redox, la moyenne trouvée pour Amlou industriel est de 29.35 mV, il représente plus que le double par rapport au potentiel redox calculé pour Amlou traditionnel soit 13.16 mV.

L'analyse de toutes les huiles utilisées dans la préparation d'Amlou traditionnel quels que soient leurs points de vente semble les classer dans la catégorie « d'huile vierge lampante » puisque la teneur en acide gras libre des échantillons est supérieure de 2.5%. Alors que 50 % des échantillons préparés industriellement se classent dans les catégories « d'huile vierge courante » et 50% dans la classe « d'huile vierge lampante ».

L'indice d'acidité des différents échantillons a été comparé à la norme commerciale du Conseil Oléicole International (COI) (19) a révélé que 80% des échantillons traditionnels montrent des valeurs d'acidité libre supérieures à 3.3% ; ceci témoigne de leur non-conformité. Par contre, 83.4% des échantillons industriels sont considérés conformes puisque leur acidité libre est inférieure à 3.3%.

Le potentiel redox d'Amlou industriel représente plus que le double par rapport au produit traditionnel ; ce qui explique le développement des microorganismes indicateurs de contamination chez ce dernier.

3.2. Analyses microbiologiques :

L'analyse microbiologique montre que les charges moyennes en FMAT, levures et bactéries lactiques sont respectivement de $3.9 \cdot 10^7$, $3.3 \cdot 10^4$ et $3.0 \cdot 10^4$ UFC/g (tableau 3).

-Amlou traditionnel :

L'analyse de tous les échantillons d'Amlou traditionnel a montré une charge très élevée en FMAT avec une moyenne de $3.9 \cdot 10^7$ UFC/g. Pour les bactéries indicatrices de contamination (CT et CF), l'analyse a révélé une contamination de tous les échantillons avec des charges moyennes de $6.48 \cdot 10^4$ UFC/g et $6.14 \cdot 10^4$ UFC/g pour les CT et CF respectivement. Ce résultat est attribué à la contamination fécale et au manque d'hygiène lors de la préparation. Tandis que la moyenne de la charge en levures et moisissures est respectivement de $3.30 \cdot 10^4$ UFC/g et de $2.40 \cdot 10^4$ UFC/g.

La recherche de la flore pathogène (*les salmonelles, les shigelles, les clostridium perfringens, et les staphylocoques aureus*) s'est révélée négative.

En ce qui concerne les bactéries lactiques qui jouent un rôle important dans l'industrie de fermentation, on trouve qu'Amlou traditionnel contient une charge moyenne importante de $3 \cdot 10^4$ UFC/g, ce qui montre la possibilité de sélectionner des souches lactiques pour les utiliser comme un probiotique dans Amlou ou dans d'autres produits alimentaires.

Les résultats d'analyses microbiologiques des échantillons d'Amlou traditionnel dépassent de loin les normes. Cette qualité défectueuse est certainement due à la matière première contaminée (le miel, l'amande et l'huile) ou au manque d'hygiène du personnel, des locaux et des équipements utilisés.

-Amlou industriel :

La charge moyenne en FMAT de l'ensemble des échantillons est de l'ordre de $5.18 \cdot 10^5$ UFC/g ; cette charge est inférieure à celle trouvée dans Amlou traditionnel, ce qui reflète la bonne qualité hygiénique du produit industriel.

La recherche des microorganismes indicateurs de la contamination d'origine fécale permet de juger l'état hygiénique du produit. Dans notre étude le résultat a montré un taux moyen en coliformes (CT et CF) qui est respectivement de l'ordre de 30 UFC/g et de 7 UFC/g. Ce résultat est largement inférieur à celui trouvé dans Amlou traditionnel. Tandis que la charge moyenne en levures et moisissures est respectivement de l'ordre de $1.9 \cdot 10^3$ UFC/g et $1.1 \cdot 10^3$ UFC/g. Ce résultat indique un début d'altération du produit par les moisissures.

Concernant les germes pathogènes (*les salmonelles, les shigelles, les clostridium perfringens, et les staphylocoques aureus*) on constate leur absence totale dans le produit.

Pour les microorganismes d'intérêt technologique, la numération des bactéries lactiques montre une valeur moyenne assez importante de l'ordre de $2.2 \cdot 10^4$ UFC/g,

En comparant les deux types d'Amlou, on conclue que seul le produit préparé de façon industrielle est de qualité hygiénique acceptable. Ces résultats montrent l'importance de l'application des règles de bonnes pratiques d'hygiène au sein des unités de fabrication d'Amlou, et aussi on peut penser à l'effet antibactérienne et antioxydant de l'huile d'Argan le composé principal d'Amlou industriel (3) et (4).

3.3. Identification des souches isolées

Les résultats d'identification de 13 échantillons isolés à partir d'Amlou traditionnel (figure 1) montrent la prédominance de *klebsiella* avec un taux de 77% suivi par *E coli* avec un taux de 8%.

Les résultats d'identification des BL (Figure2) de 4 souches lactiques isolées à partir d'Amlou montrent que l'ensemble appartient au genre des *lactobacillus*.

3.4. L'antibiogramme

Les souches étudiées présentent différents comportements vis-à-vis des antibiotiques testés (figure3) (GN, CIP, CTX, AMC, AML, CAZ). En effet, elles sont sensibles à 100% à la GN, CIP et CTX. Pour les autres

antibiotiques, elles ont montré une résistance avec un taux de 54%, 39%, 31% et 15.30% respectivement pour l'AML, la KF, l'AMC et la CAZ.

Tableau 1: Résultats des analyses physico-chimiques d'Amlou traditionnel

| | NE | pH | rH (mV) | Acidité | EST (%) |
|----------------|----|-----|---------|---------|---------|
| Takadoum | 6 | 6.5 | 11,16 | 3.41 | 96,00 |
| Kamra | 9 | 6.4 | 13,00 | 3,32 | 97,40 |
| G3 | 6 | 6.4 | 15,56 | 3,00 | 98,00 |
| Hassan | 6 | 6.4 | 15.38 | 3.72 | 96,10 |
| Hay Salam Salé | 3 | 6.6 | 8.42 | 3.56 | 96.41 |
| Moyenne | 6 | 6.5 | 12.27 | 3.42 | 96.62 |

Tableau 2: Résultats moyennes des analyses physico-chimiques d'Amlou semi industriel

| | NM | NE | pH | rH (mV) | Acidité (%) | EST (%) |
|---------|----|----|------|---------|-------------|---------|
| Moyenne | 6 | 18 | 6.10 | 29.35 | 2.49 | 96,85 |

Tableau 3 : Résultats des analyses microbiologiques d'Amlou traditionnel

| Lieu de prélèvement | NE | FMAT 10^7 ufc/g | CT 10^4 ufc/g | CF 10^4 ufc/g | Sa, Sh, Cl, SAF | Lev 10^5 ufc/g | BL 10^5 ufc/g | Ms 10^5 ufc/g |
|---------------------|----|----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| Takadoum | 6 | 3.62 | 8.73 | 6.55 | 0 | 0.34 | 0.17 | 0.50 |
| Kamra | 9 | 2.50 | 7.80 | 8.30 | 0 | 0.47 | 0.44 | 0.14 |
| G3 | 6 | 4.12 | 7.00 | 6.90 | 0 | 0.02 | 0.35 | 0.11 |
| Hassan | 6 | 8.65 | 5.55 | 3.60 | 0 | 0.50 | 0.26 | 0.27 |
| Hay Salam Salé | 3 | 0.63 | 5.56 | 5.34 | 0 | 0.34 | 0.31 | 0.19 |
| Moyenne | 30 | 3.90 | 6.48 | 6.14 | 0 | 0.33 | 0.30 | 0.24 |

Tableau 4: Résultats moyennes des analyses microbiologiques d'Amlou industriel

| Lieu de prélèvement | NM | NE | FMAT 10^7 ufc/g | CT 10^4 ufc/g | CF 10^4 ufc/g | Sa, Sh, Cl, SAF | Lev 10^5 ufc/g | BL 10^5 ufc/g | Ms 10^5 ufc/g |
|---------------------|----|----|----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| Moyenne | 6 | 18 | 0.52 | 0.3 | 0.07 | 0 | 0.19 | 0.22 | 0.11 |

NM : nombre des marques, NE : nombre d'échantillons, FMAT : flore mésophile aérobie totale ; CT : Coliformes totaux ; CF : Coliforme Fécaux ; SAF : Staphylococcus, St: streptocoques Fécaux ; Sa: Salmonella ; Sh: Shigella ; Cl: Clostridium perfergins ; Lev : levures ; Ms : moisissure, BL: bactéries lactiques

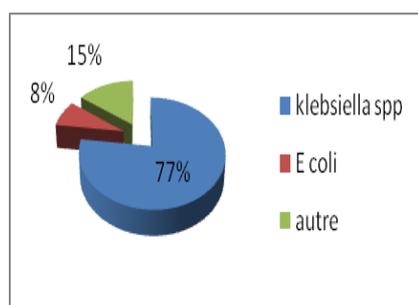


Figure 1 : Résultat d'identification des coliformes

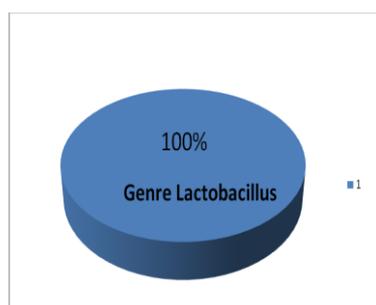


Figure2 : identification des quatre BL isolés

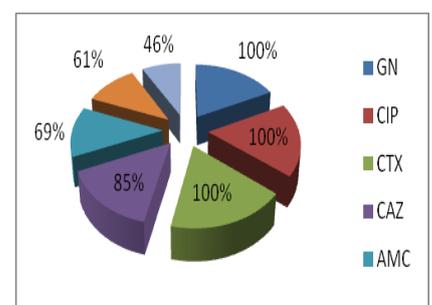


Figure 3 : Résultat des tests de sensibilité aux antibiotiques

4. Conclusion

Les résultats montrent que 80% des échantillons traditionnels ont une acidité libre supérieure à la norme et que ces produits sont chargés en *coliforme* dont *klebsiella pneumoniae* est l'espèce la plus rencontrée avec un taux de 77% dont 30% présentent un mécanisme de résistance de type pénicillinase. Ces résultats témoignent du manque de respect des bonnes pratiques d'hygiène au cours de la préparation et de la conservation. Une grande vigilance s'impose pour le consommateur vis-à-vis d'Amlou traditionnel. Tandis que la qualité hygiénique d'Amlou industriel reste acceptable pour les deux tiers des échantillons analysés (effet protecteur de l'huile d'Arganier), ce qui nécessite un renforcement des règles d'hygiène, de sensibilisation et de formation continue du personnel au sein des unités de production .

Références

1. Charouf Z, Guillaume D. Contribution à l'étude chimique de l'huile d'Argania spinosa (L.) (Sapotaceae), Thèse Sciences Université de Perpignan, (2002).
2. Charrouf Z. Valorisation d'Argania spinosa (L.) Sapotaceae : Etude de la composition chimique et de l'activité biologique du tourteau et de l'extrait lipidique de la pulpe, Thèse Sciences, Université Mohammed V, Rabat (1995)
3. Charrouf Z, Guillaume D. *J Ethnopharmacol.* 67 (1999) 7.
4. Chimi H, Cillard J, Cillard P. *Sciences des Aliments*, 14 (1994) 117.
5. Khallouki F, Younos C, Soulimani R, Oster T, Charrouf Z, Spiegelhalder B. *Eur J Cancer Prev.* 12 (2003) 67.
6. Berrada Y, Settaf A, Baddouri K, Cherrah A, Hassar M. *Therapie.* 55 (2000) 375.
7. Drissi A, Girona J, Cherki M, Godas G, Derouiche A, El Messal M. *Clin Nutr.* 23 (2004) 1159.
8. Alaoui K, Lagorce JF, Cherrah Y, Hassar M, Amarouch H, Roquebert J. *Ann Pharm Fr.* 56(1998b) 220.
9. Charrouf Z, M. Benomar, D. Guillaume. *Revue Coeur Vaisseaux.* 4(2007) 50.
10. Bellakhdar J. La pharmacopée marocaine traditionnelle, édition Ibis Press (1997)
11. Randoin L., Legallic P., Dupuis Y. Table de composition des aliments, éditions Jacques Lanore, (2000).
12. SNIMA catalogue des normes marocaines, Ministère de l'industrie Maroc(2008).
13. SNIMA catalogue des normes marocaines, Ministère de l'industrie Maroc (2007).
14. SNIMA catalogue des normes marocaines, Ministère de l'industrie Maroc (2001).
15. SNIMA catalogue des normes marocaines, Ministère de l'industrie Maroc (2010).
16. SNIMA catalogue des normes marocaines, Ministère de l'industrie Maroc (2006).
17. SNIMA catalogue des normes marocaines, Ministère de l'industrie Maroc (2011)
18. Poelma P L Andrews W H & Silliker J H Salmonella In Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (American Public Health Association) 2a ed pp 2 6-32, Washington DC Marvin L Speck 1984).
19. COI T /NC n /Rev 4 Norme commerciale applicable à l'huile d'olive et à l'huile de grignons d'olive (2009)

(2014) ; <http://www.jmaterenvirosci.com/>