



Étude de l'activité antimicrobienne des margines issues de Fès Boulman vis-à-vis de souches pathogènes [Study of antimicrobial activity of olive mille wastewater (OMWW) from Fez Boulman against some pathogenic strains]

A. Esmail*^{1,2}, N. Chahboun¹, Z. Mennane³, R. Amiyare¹, H. Abed¹, M. Barrahi¹, A. Qebibo¹, M. Ouhssine¹, E. H. Berny¹

¹Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Qualité (LBEQ), Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofaïl, BP 133, 14000 Kénitra, Maroc.

² Department of medical microbiology, Faculty of Science, Ibb University, 1120 Ibb, Yemen.

³ Département de bactériologie, Institut national d'hygiène, avenue Ibn Batouta, B.P. 769, Agdal, Rabat, 11000, Maroc.

Received 1 July 2014, Revised 30 Sept 2014, Accepted 30 Sept 2014

*Auteur correspondant: abeer.a.esmail@gmail.com

Résumé

La margine constitue un problème environnemental pour les pays producteurs de l'huile d'olive comme le Maroc. La margine est riche en polyphénols qui se caractérisent par leur pouvoir anti-microbien. Le but de notre étude est d'évaluer l'activité antimicrobienne des margines et déterminer leurs CMI et la CMB. Nous avons constaté que les margines sont très efficaces contre les bactéries à Gram-positif avec un diamètre variant entre 15 et 23 mm. La zone d'inhibition maximale a été observée chez *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (23mm), tandis que la zone d'inhibition minimale a été observée chez *Escherichia coli* ATCC 25921 (15mm). Nos résultats ont montré que les margines inhibent la plupart des germes testés qui ne présentent pas la même sensibilité. *S. aureus* et *E. coli* ont montré une plus grande sensibilité à une concentration inhibitrice de 0,125 mg / ml par rapport aux autres souches testées : *Acinetobacter sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) dont la croissance a été inhibée à 0,25mg / ml. L'effet bactéricide des margines a été de 0,25 mg /ml pour *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *Acinetobacter sp*, (0,5 mg / ml) pour *E. coli* et *Enterobacter cloacae* (à Gram négatif) et *S. aureus* (à Gram positif).

Mots clés : Margine, activité antimicrobienne, concentration minimale inhibitrice, souches multirésistantes.

Abstract

The olive mille waste water is an environmental problem for olive oil producing countries of as Morocco. OMWW is rich in polyphenols, which are characterized by the anti-microbial power. The aim of our study was to evaluate the antimicrobial activity of OMWW and determine the MIC and MBC. We found that the OMWW are highly effective against Gram-positive with a diameter between (15 and 23) mm. The maximum zone of inhibition was observed in *S. aureus* ATCC25923 (23mm), while the minimum inhibition zone was observed in *Escherichia coli* ATCC 25921 (15mm). Our results showed that the OMWW inhibits most of the tested organisms which do not exhibit the same sensitivity, *E.coli* and *S.aureus* showed a higher sensitivity with an inhibitory concentration of (0,125mg/ml) compared to others strains tested: *Acinetobacter sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, whose growth was inhibited at (0, 25 mg/ml). In other hand, the bactericidal effect of OMWW was (0.25mg/ml) in *K.pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *Acinetobacter sp*, (0.5 mg/ml) for *E.coli* and *Enterobacter cloacae* (Gram negative); and *S.aureus* (Gram positive).

Keywords: OMWW, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration, multi-drug resistant strains.

1. Introduction :

La margine constitue un problème environnemental pour les pays qui produisent de l'huile d'olive dont le Maroc. De nombreuses études ont mis l'accent sur le traitement et la valorisation des margines. Ces derniers sont riches en éléments nutritifs minéraux et organiques [1]. Ce critère a amené les chercheurs à mettre au point de nombreux procédés de valorisation et d'exploitation des margines [2]. Parallèlement aux recherches réalisées sur le traitement des margines, des études de valorisation ont été effectuées. Les margines sont riches en polyphénols qui se caractérisent par leur pouvoir anti-microbien [3-7]. Les composés phénoliques des margines sont très divers et leur structure est très variable. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction. Les chercheurs ont identifié dans le margine dérivés d'acide cinnamique tels que (l'acide caféique), (1-cafféil-glucose), les acides benzoïque, l'acide vanillique, éthanol / 3-3,4 dérivés dihydroxyphényl (4-hydroxytyrosol - poids-glucoside, 4-hydroxytyrosol - diglucoside et oleuropéine) et les flavonoïdes tels que (l'apigénine, flavanone, la lutéoline, lutéoline-7-glucoside) et de la quercétine, l'acide protocatéchique, l'acide vanillique, l'acide p-hydroxybenzoïque, le p-hydroxybenzaïdéhyde, le tyrosol, l'hydroxytyrosol, l'acide hydroxyphényl, syringaldehyde, l'acide p-cumarique, p-vanilline, l'acide férulique, le 3,4-dihydroxymandélique acide et sculetine [8-14]. Le but de notre étude est pour évaluer de l'activité antimicrobienne de la margine vis-à-vis des souches pathogènes et déterminer de leur CMI et CMB.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Collecte des margines :

Les margines utilisées dans cette étude ont été recueillies à partir de Fès Boulman. Les caractéristiques microbiologiques et physico-chimiques ont été déjà étudiées [15].

2.2. Préparation des margines pour l'étude:

Les margines ont été utilisées avec un pH (4,77)[15], après filtration pour élimination des matières solides flottantes. Les margines ont été concentrées par l'évaporation dans un four au 103°C, pour se débarrasser de l'eau, jusqu'à l'obtention de 0% de l'eau.

2.3. Les souches testées:

Sept microorganismes pathogènes ont été testés (six bactéries et une levure). Les souches utilisées dans les tests de l'activité antimicrobienne font parties de deux groupes de micro-organismes pathogènes : les bactéries et les levures (Tableau 1).

Tableau 1: Souches pathogènes testées vis-à-vis des margines.

Groupe microbienne	Souches testées	Origine de la souche
Gram – Entérobactéries	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25921	Infection urinaire
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Infection urinaire
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Infection urinaire
Gram – Non Entérobactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Infection cutanée
	<i>Acinetobacter sp</i>	Infection urinaire
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Infection urinaire
Levure	<i>Candida albicans</i>	Infection vaginale

2.4. Evaluation des activités antimicrobiennes :

L'évaluation *in vitro* des margines a été réalisée en utilisant deux techniques : la méthode de diffusion en gélose comme décrit par CLSI [16] afin de mettre en évidence le pouvoir antimicrobienne des margines.

2.4.1. Méthode de diffusion en milieu solide

L'activité antimicrobienne a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion sur les milieux gélose de Muller-Hinton (MH) et sabouraud (SB) selon les recommandations de CLSI [16]. Ainsi, les milieux (MH) et (SB) sont uniformément ensemencés à l'aide d'un écouvillon stérile par une suspension en saline (NaCl 0,9%) de la souche à étudier, préalablement ajustée à l'aide de l'étalon 0,5 McFarland à une turbidité environ de 10⁶ bactéries/ml et 10⁴ levures/ml. Des disques en papier absorbant de Whatman de 6 mm de diamètre sont

stérilisés à l'autoclave (121°C pendant 15 minutes), Ils sont imbibés par les margines à tester (introduits dans les flacons contenant les margines évaporés de différent concentration). Les disques ainsi préparés sont déposés sur les milieux de (MH) et (SB). Après 24 h d'incubation à 37°C pour les bactéries et à 48h d'incubation à 30°C pour les levures. Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré à l'aide d'une règle. Les manipulations sont répétées 3fois pour chaque test.

2.4.2. Technique de macrodilution en milieu solide pour détermination de (CMI):

La technique de dilution en milieu solide est recommandée par le Clinical and Laboratory Standards Institute « CLSI » [16] pour évaluer la sensibilité des bactéries microaérophiles aux agents antibactériens. Les essais de détermination de la CMI sont effectués selon la méthode de dilution standard sur milieu gélosé MHA. Une gamme de dilution de base 0,5 est réalisée, dans d'eau distille, à partir de 1g de margine à tester. Les tubes ont été stérilisés à l'autoclave, 1,5 ml de chacune des dilutions de la gamme sont ajoutés dans des tubes stériles contenant 13,5 ml de milieu gélosé MHA, maintenu en surfusion dans un bain thermostatée à 55°C. La gamme de concentrations ainsi générée est comprise entre 0,5 et 0,0313 mg.ml⁻¹. Le contenu de chaque tube est immédiatement versé dans une boîte de Pétri stérile après une agitation de 15 secondes. Des spots de 2 µl d'un inoculum standardisé à 10⁸ UFC.ml⁻¹ (soit 2.10⁵ UFC par spot) sont déposés sur les boîtes de gélose. L'eau distille est utilisée comme contrôle négatif. Les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37°C. La CMI de la margine est définie à partir de la première boîte de la gamme dépourvue de croissance bactérienne. Chaque expérience est répétée trois fois.

2.4.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) en milieu solide

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) définit l'effet bactéricide d'une margine. La concentration minimale bactéricide CMB a été déterminée en repiquant par ensemencement à l'aide d'une anse sur milieu de Muller-Hinton agar et sabouraud agar, les boites sans croissance bactérienne visible. Après l'incubation, les boites ou il n'y avait pas une croissance des microbes correspondaient aux concentrations des margines qui représentent les CMB.

3. Résultats et discussion

3.1. Évaluation l'activité antibactérienne des margines vis-à-vis des souches à la collection American (ATCC).

Nous avons testé des souches des bactéries et de levure isolées à partir de prélèvements pathologiques et qui inclus des souches qui appartiennent à la collection américaine ATCC (Tableau 1). Les souches (*Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter sp* et *Candida albicans*) ont été isolées dans le cadre d'un mémoire de Master intitulé "Risque d'infection nosocomiale en milieu hospitalier: cas de la salle de réanimation de l'hôpital El Idrissi de Kenitra" soutenu le 22 juin 2011 à la faculté des sciences, Université Ibn Tofaïl, Kenitra. En cela nous avons utilisé la margine concentré. Les résultats montrent que l'activité antibactérienne n'est pas le même sur les six bactéries donnant des diamètres zones d'inhibition entre 15 et 23 mm, (Tableau 2).

Tableau 2 : Résultats de l'activité antibactérienne des margines vis-à-vis des souches à la collection American (ATCC).

Groupe microbienne	Souches testées	Diamètres d'inhibition en (mm)
Gram – Entérobactéries	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25921	15
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
	<i>Enterobacter cloacae</i>	13
Gram – Non Entérobactéries	<i>Pseudomonas aeruginosae</i> ATCC 27853	19
	<i>Acinetobacter sp.</i>	20
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	23
Levure	<i>Candida albicans</i>	0

Nous avons constaté que le margine est très efficace contre les bactéries gram positives avec un diamètre variant entre (23-15) mm, elle a été constaté que la zone d'inhibition maximale a été observée chez *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (23mm), tandis que la zone d'inhibition minimale était observée chez *Escherichia coli* ATCC 25921 (15mm) (**Figures 1et 2**).

Dans ce tableau, nous avons montré qu'il n'y a pas eu un effet du margine contre les levures. La présence de levures dans 100% des échantillons de margines [15] qui ont été étudiés peut expliquer le manque d'efficacité contre les levures examinés.

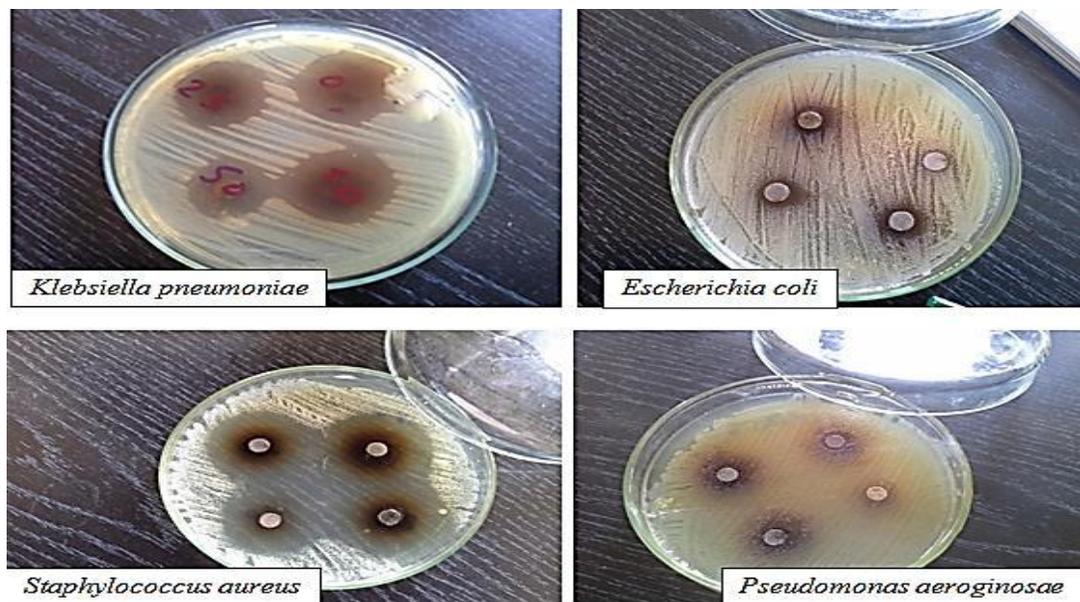


Figure 1: Activité antibactérienne de la margine en différent dilutions (jusqu'à 0%, 10%, 25% et 50% d'eaux) vis-a-vis les souches multi résistantes aux antibiotiques

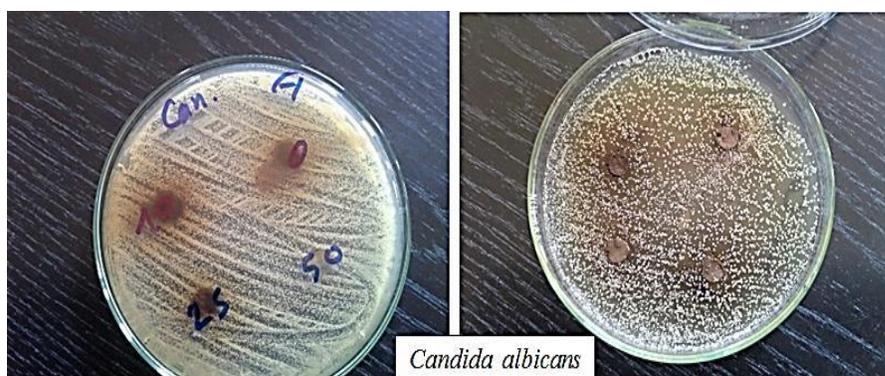


Figure 2 : Activité antimicrobienne de la margine dans différent dilutions sur la souche de *Candida albicans*

3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice des souches pathogènes

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré que la margine inhibe la plupart des germes testés. Ces bactéries ne présentent pas la même sensibilité par la margine, pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25921 qui ont montré une plus grande sensibilité à la concentration inhibitrice de 0,125mg/ml par rapport à celle des autres souches (*Acinetobacter sp*, *K.pneumoniae*, *E.cloacae*, *P. aeruginosae* ATCC 27853) dont la croissance a été inhibée à 0,25mg/ml (Tableau 3 et Figure 3).

Tableau 3: Résultats de la concentration minimal inhibitrice de la margine.

Souches testées	0,5 mg/ml	0,25mg/ml	0,125 mg/ml	0,0625 mg/ml	0,0313 mg/ml
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25921	-	-	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosae</i> ATCC 27853	-	-	-	+	+
<i>Acinetobacter sp</i>	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	+	+

+ : présence d'une croissance & - : absence d'une croissance

Ces résultats ne sont pas comparables à ceux obtenus par Larif et al, [7] qui ont montré que la concentration minimale inhibitrice de polyphénols extraits de la margine sur des souches testées est variable entre 1/50 pour *E.coli* et *K.pneumoniae*1/24 pour les espèces *P.aeruginosae* et *S.aureus* [7].

3.2.1. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

A partir des résultats de détermination de la CMI, nous avons calculé la concentration minimale bactéricide (CMB) qui est la plus faible concentration de margine laissant seulement 0,01% ou moins de l'inoculum initial survivant après 18 h de culture à 37 °C selon [7], (Tableau4). Cette valeur caractérise l'effet bactéricide de la margine étudiée, qui est de 0,25 mg/ml pour *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosae* ATCC 27853 et *Acinetobacter sp* (à Gram négatif) et 0,5 mg/ml pour *Escherichia coli* ATCC 25921 et *Enterobacter cloacae* Gram (à Gram négatif) et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (à Gram positif) (Figure 4).

Nos résultats n'ont pas comparables à celles obtenues par M. Larif et al [7] qui ont montré la concentration minimale bactéricide de polyphénols extraits de margine sur des souches testées est variable entre (0,02 pour *K.pneumoniae* et 0,04 pour les espèces *E.coli*, *P.aeruginosae* et *S.aureus*.) [7].

La margine a montré un pouvoir inhibiteur sur les bactéries testées alors aucune activité n'a été signalée sur les levures. Les composés phénoliques confèrent à la margine un pouvoir [17- 19] dont le montant, la nature chimique et l'activité antimicrobienne ont été largement examinés [3,4] et étudiés contre une grande variété de micro-organismes [5-7]. Ils peuvent inhiber également l'activité des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote dans le tube digestif des ruminants en inhibant leur activité enzymatique [20]. Selon plusieurs études, les interactions synergiques entre les différents composés peuvent être à l'origine de l'activité beaucoup plus prononcée que celle prévue pour les principaux composés [21, 22]. Les composés phénoliques (acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins) forment un groupe de polyphénols les plus importants photochimiques [23, 24]. De point de vue quantitatif et qualitatif, des différences remarquables sont notées entre les résultats obtenus par différents auteurs dans l'étude de la composition de l'acide phénolique de la margine. Alors que certains auteurs soulignent l'acide caféique comme étant particulièrement abondante [9].

D'autres auteurs n'ont pas détecté de grandes quantités de ce composé [25, 8]. Les composés phénoliques sont également caractérisés par une très forte réticulation des protéines et dénaturation des protéines-activité, les études d'activité antimicrobienne présentent une différente sensibilité vers les composés phénoliques et les acides phénoliques dans lequel la margine est riche [26,27]. En raison de leur chaîne latérale acide (4,77) [15], les acides phénoliques sont beaucoup moins polaires. Cette propriété peut faciliter le transport de ces molécules à travers la membrane cellulaire, ce qui pourrait être lié à son tour à l'effet inhibiteur plus fort des acides phénoliques. D'autre part, ils sont connus pour interagir avec les lipides de la membrane par une neutralisation du potentiel électrique de la membrane après la pénétration de la molécule. Leur activité est probablement due à leur capacité à se complexer avec les protéines extracellulaires et solubles et de se complexer avec les parois des cellules bactériennes, comme c'est le cas pour les quinones. Aussi les flavonoïdes sont plus lipophiles et peuvent également perturber les membranes microbiennes [28, 23].

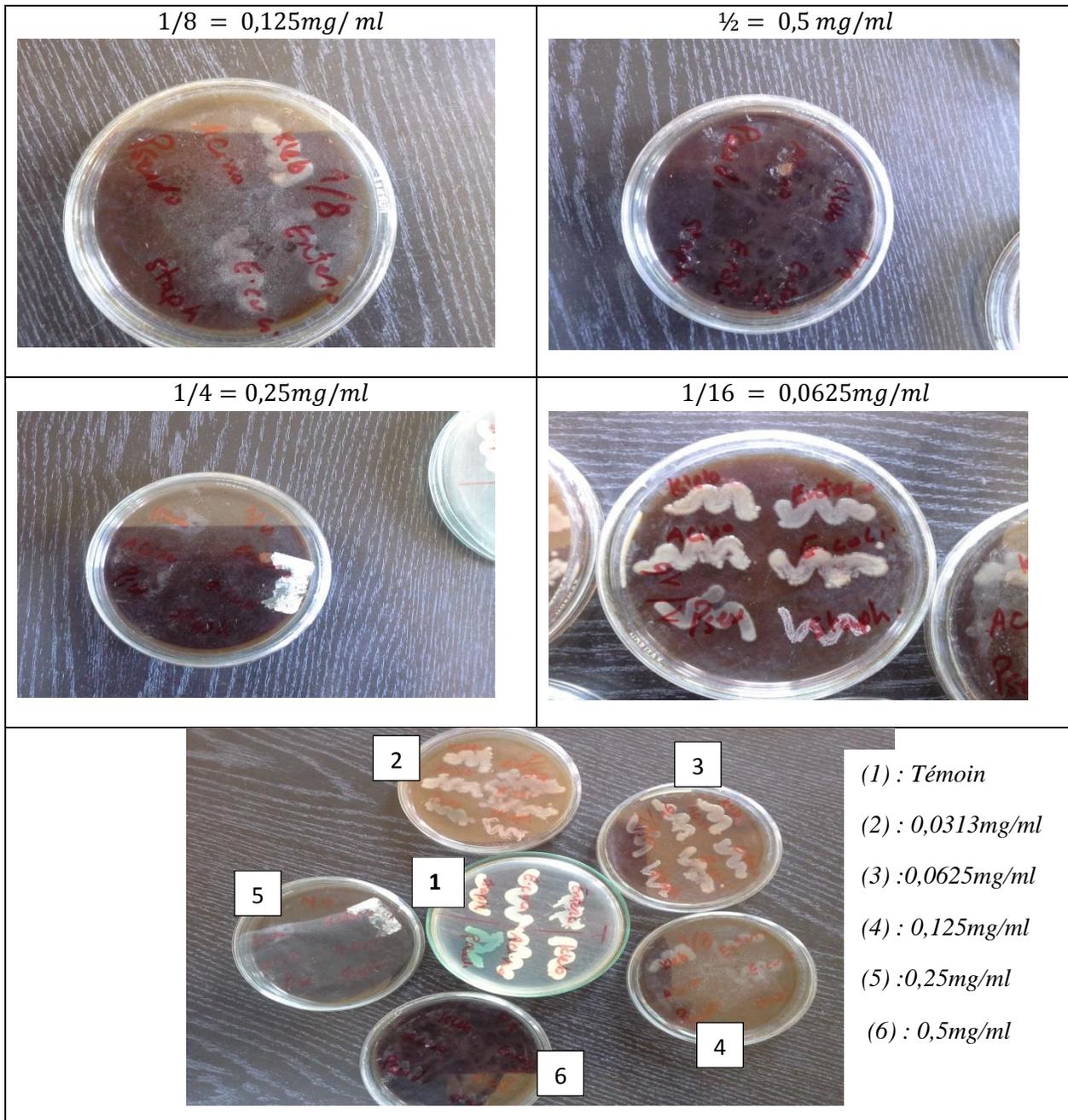


Figure 3: Concentration minimal inhibitrice de margines vis-à-vis des souches pathogènes

Tableau 4: Résultats de la concentration minimale bactéricide de la margine.

Souches testées	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,125 mg/ml
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25921	-	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	+
<i>Acinetobacter sp</i>	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	+	+

+ : présence d'une croissance & - : absence d'une croissance

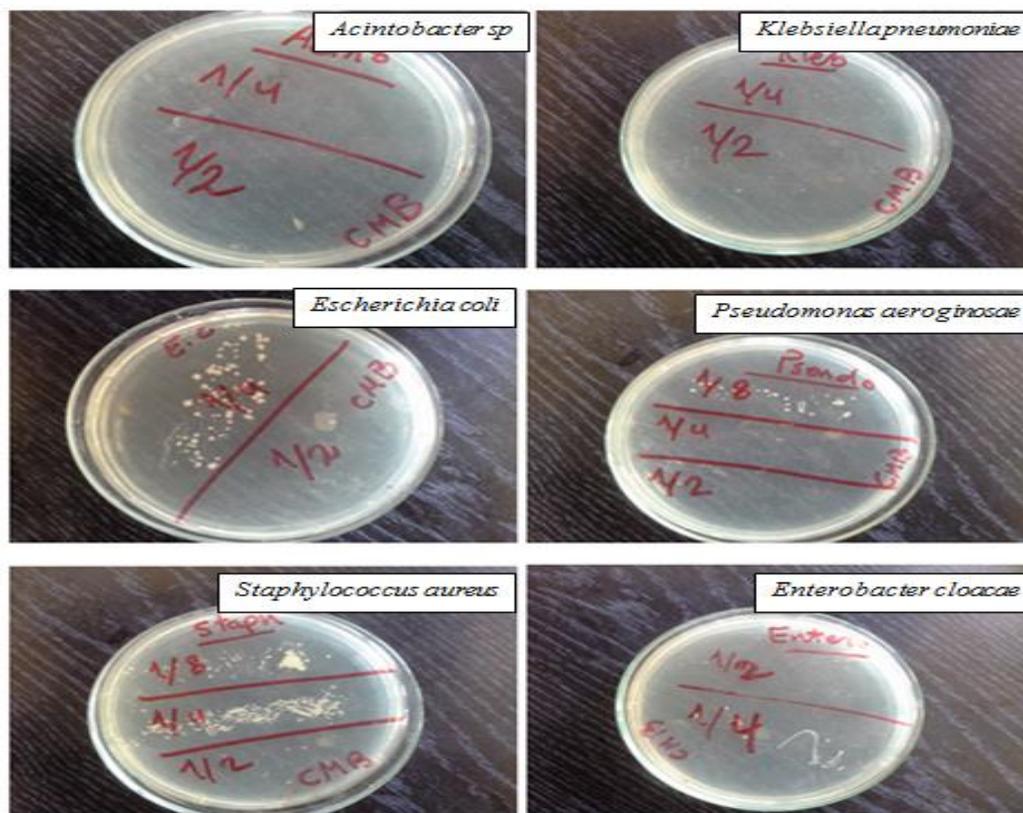


Figure 4: Concentration minimale bactéricide des margines vis-à-vis des souches pathogènes
(1: 0,0313mg/ml, 2: 0,0625mg/ml, 3: 0,125mg/ml, 4: 0,25mg/ml, 5: 0,5mg/ml).

Un effet similaire peut se produire dans la membrane cellulaire bactérienne affectant leur métabolisme énergétique. En effet, l'activité antibactérienne de polyphénols peut être expliquée par le mécanisme de la toxicité des flavonoïdes contre les micro-organismes, par exemple, les interactions non spécifiques telles que l'établissement d'une liaison hydrogène avec des protéines ou des enzymes de la paroi cellulaire, la chélation des ions métalliques, l'inhibition du métabolisme bactérien, ou séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries [29].

L'absence de bactéries pathogènes dans les échantillons des margines [15] peut expliquer sa capacité à inhiber la croissance des bactéries et d'autre part, la présence de levures dans 100% [15] des échantillons des margines qui ont été étudiés peut expliquer le manque d'efficacité contre les levures examinés.

Conclusion :

Le Maroc est l'un des pays qui produisent de l'huile d'olive qui génère des quantités énormes en margines et qui présentent un risque environnemental. De nombreuses études ont mis l'accent sur le traitement et la valorisation des margines. Ces derniers sont riches en matière organique et les polyphénols qui se caractérisent par leur pouvoir anti-microbien. Le coût d'extraction de polyphénols est élevé par contre l'utilisation des margines qui sont filtrés et stérilisés comme désinfectant ne demande rien. Les résultats de notre étude ont montrés que le margine devient très efficace contre les bactéries testés et donne des résultats étonnants par rapport aux études sur les polyphénols extrait des margines qui demande une technologie d'extraction très cher. Nos résultats ont montré que le margines inhibent la plupart des germes testés surtout vis-à-vis *S.aureus* et *E. coli* avec à une concentration inhibitrice de (0,125 mg/ml) suivi par *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *Acinetobacter sp*, (CMI=0,25 mg / ml). Ces résultats préliminaires peuvent être complétés par d'autres études plus détaillées (tests toxicologiques, détermination de la nature des structures chimiques et leurs proportions, coût du projet, mode de livraison et autres).

Références:

1. Bouknana D., Hammouti B., Salghi R., Jodeh S., Zarrouk A., Warad I., Aouniti A and Sbaa M., *J. Mater. Environ. Sci.* 4 (2014) 1039
2. Fiestas Ros d'Ursinos J.A., *Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO)*. (1981) 93.
3. Ramos-Cormenzana A., *FAO, Madrid*. pp.(1986).
4. Moreno E., Quevedo J. and Ramos-Cormenzana A., *In Encyclopedia of Environmental Control Technology, ed. P. N. Cheremissoff. Gulf Publishing Co., Houston.* (1990) 731.
5. Ramos-Cormenzana A., Juarez-Jimenez B. et Garcia-Pareja M.P., *International Biodeterioration et Biodegradation*. 38 (1996) 283.
6. Capasso R., Evidente A., Shivo L., Orru G., Marcialis M. A. and Cristinzio, G., *J. Appl. Bacteriol.*, 79 (1995) 393.
7. Larif M., Ouhssine M., Soulaymani A., Elmidaoui A., *Res Chem Intermed*. DOI (2013) 13-1267-0.
8. Pompei C., and Codovilli F., *Sci. Technol. Aliment.*, 4 (1974) 363.
9. Vazquez-Roncero, A., Graciani-Constante E., and Maestro-Duran R., *Polifenoles de la pulpa. Grasas y Aceites*, 25(1974) 269.
10. Ellis B. E., *Degradation of aromatic compounds in plants. Lloydia*, 37 (1974) 168.
11. Martinez-Nieto L., Garrido Hoyos S. E., Camacho Rubio F., Garcia-Pareja M. P. and Ramos-Cormenzana A., *Biores. Technol.*, 43(1993) 215.
12. Perez J., De la Rubia T., Moreno J., and Martinez J., *Environ. Toxicol. Chem.*, 11 (1992) 489.
13. Rodriguez M., Perez J., Ramos-Cormenzana A., and Martinez J., *J. Appl. Bacteriol.*, 64 (1988) 219.
14. Saez-Mestre E., *Contenido fenolico del alpechin y actividad antibacteriana. Memoria de Licenciatura. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada*. (1989).
15. Esmail A., Abed H., Firdaus M., Chahboun N., Mennane Z., Berny E., et Ouhssine M., *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (2014) 121.
16. Clinical and laboratory standards Institute CLSI., (*Document M100-S9*). 8th ed. Wayne, PA.
17. Singleton V.L., Rosi J.A., *Am. J. Oenol. Vitic.* 16 (1965) 144.
18. Hanato T., Kagawa H., Yasuhara T., Okuda T., *Chem. Pharm. Bull.* 36(1988) 2090.
19. Ranalli A., *Olivae*, 37 (1991) 30.
20. Hattenschwiler S. et Vitousek P.M., *Trends in Ecology and Evolution*. 15(2000) 238.
21. Zhiri A., Baudoux D., *Édition Inspir Development, Luxembourg* (2005).
22. Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Alvarez J., *J. Food Saf.* 4 (2008) 567.
23. Dhiman A., Nanda A., Sayeed A., *Arab. J. Chem.* doi:10.1016/j.arabjc.(2012).05.001.
24. Beta T., Nam S., Dexter J.E., *Cereal Chem.* 82(2005) 390.
25. Balice V. and Cera., *Grasas y Aceites*, 28 (1984) 178.
26. Ciafardini G., Zullo B.A., *Ann. Microbiol.* 53(2003) 283.
27. Sousa A, Ferreira IC, Calhelha R, Andrade PB, Valentão P, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira JA., *Med. Chem.* 14 (2006) 8533.
28. Firas A., Hassan F., *J. Zhejiang Univ. Sci.* 9(2) (2008) 154.
29. Karou D., Dicko M. H., Simpore J., Yameogo S., Sanon S. et Traore A. S., *African J. of Biotechnology*. 8 (2005) 823.

(2015) ; <http://www.jmaterenvirosci.com/>