



Composés bioactifs

Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus reticulata*

Antimicrobial activity of essential oil extracted from *Citrus reticulata* peels

Ali BOUGUERRA ¹, Louiza HIMED, Malika BARKAT

Laboratoire de Biotechnologie et Qualité des aliments (BIOQUAL).
Département des Biotechnologies Alimentaires. Institut de la Nutrition de
l'alimentation et des Technologies Agroalimentaires (I.N.A.T.A.A.),
Université Constantine 1. 7^e Kilomètre du centre-ville.

Reçu le 30 septembre 2013, Accepté le 09 mai 2014

¹Auteur correspondant : ali.bouguerra@umc.edu.dz

Résumé Introduction. Les conservateurs alimentaires synthétiques ont été limités dans plusieurs pays, en raison de leurs effets indésirables sur la santé. En plus, la tendance actuelle des consommateurs à chercher une alimentation plus naturelle a augmenté durant ces dernières décennies. Plusieurs travaux de recherche ont été concentrés sur les extraits naturels. Les différents résultats publiés indiquent qu'elles sont douées de plusieurs propriétés biologiques. **Objectif.** Le but de cette étude est d'évaluer *in vitro* l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus reticulata*. **Matériel et Méthodes.** L'extraction a été réalisée par hydrodistillation. Afin de mettre en évidence l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites et la détermination de la résistance ou la sensibilité des bactéries responsables d'altération des aliments, les méthodes de diffusion de disque et de microatmosphère ont été utilisées. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été estimées par la méthode de dilution d'Agar. **Résultats.** Les huiles essentielles des zestes de *Citrus reticulata* ont montré une activité antibactérienne contre *Bacillus cereus* plus élevée que celle de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Escherichia Coli* ATCC 25922. La méthode de microatmosphère des huiles essentielles des écorces de *Citrus reticulata* a permis de constater une absence totale de l'activité inhibitrice à une dose de 5µl/boîte. Les CMI obtenues de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *E. Coli* ATCC 25922 sont de 1%, 2% et >2% respectivement. **Conclusion.** Ces résultats laissent suggérer que les huiles essentielles des écorces de *Citrus reticulata* peuvent éventuellement remplacer les conservateurs chimiques.

Mots clés : *Activité antimicrobienne, Méthode de diffusion, Microatmosphère, Huile essentielle, CMI, Citrus reticulata*

Abstract Introduction. The synthetic food conservatives are limited in several countries, because of their undesirable effects on health. Moreover, the current trend of the consumers seeks a more natural food increased during these last decades. Several research tasks have concentrated on the natural extracts. The various results published have indicated that they are endowed with several biological properties. **Objective.** The aim of this study was to evaluate *in vitro* the antimicrobial activity of the essential oil extracted from *Citrus reticulata* peel. **Material and Methods.** The extraction was carried out using hydrodistillation. The disc diffusion and the microatmosphere methods were used in order to highlight the antimicrobial activity of the extracted essential oils and the sensitivity of some bacteria involved in food deterioration. Minimal inhibiting concentrations (MIC) was estimated by the agar dilution method. **Results.** Antimicrobial activity of *Citrus reticulata* peel essential oils extract against *Bacillus cereus* was higher than that of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *E. Coli* ATCC 25922. The microatmosphere method showed that there was no inhibiting activity when using 5µL/plate. The observed MIC for *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia Coli* ATCC 25922 were 1%, 2% and >2% respectively. **Conclusion.** These results suggest that the essential oils of *Citrus reticulata* peel could probably replace the conservative chemical agents.

Keywords : *Antimicrobial activity, Disc diffusion method, Microatmosphere, Essential oils, MIC, Citrus reticulata*

Introduction

La valeur alimentaire est modifiée par la présence et la prolifération des microorganismes qui consomment des molécules à haute valeur énergétique [1]. Dans la plupart des cas d'altération, les microorganismes présents sur l'aliment ainsi que les produits de leur activité métabolique, ne constituent pas un réel danger pour la santé du consommateur. Cependant, le développement dans un aliment de certaines espèces microbiennes peut être à l'origine d'intoxications [2]. Les conservateurs alimentaires synthétiques font partie de la panoplie des techniques et des moyens qui permettent d'assurer la sécurité du consommateur, de rallonger la durée de vie des produits alimentaires et de limiter leurs altérations par les micro-organismes [3]. En raison de son efficacité et de son application facile et

pratique, l'utilisation des produits chimiques constitue à l'heure actuelle la technique la plus utilisée pour lutter contre les microorganismes nuisibles. Par la suite, plusieurs conservateurs synthétiques ont été limités dans plusieurs pays, en raison de leurs effets toxicologiques indésirables à long terme, y compris la cancérogénicité [4]. Pour cela, le retour vers le naturel est devenu indispensable. Cependant, il doit suivre certaines conditions en vue de son utilisation dans le monde vaste des anti-infectieux, qui s'élargit d'un jour à l'autre avec des substances plus puissantes, plus toxiques et plus coûteuses. Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antimicrobiennes [5] et pourraient servir d'agents de conservation alimentaire, ou approuvés comme additifs alimentaires. Dans la famille des *Rutaceae*, le genre *Citrus* est reconnu à travers les vertus de ses huiles essentielles qui peuvent avoir de multiples activités, à titre d'exemple des activités

biologiques. L'objectif de la présente étude est d'évaluer le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus reticulata*, en vue de son utilisation comme agent aromatique et conservateur dans l'industrie agro-alimentaire. Ce choix est justifié par la richesse du zeste en huiles essentielles par rapport aux autres parties du fruit, la possibilité de valorisation d'un sous-produit agricole et l'absence de toxicité des huiles essentielles de la mandarine, ces dernières pouvant être employées comme agent aromatique et conservateur naturel.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Le matériel végétal choisi dans la présente étude est représenté par les écorces (zestes) de *Citrus reticulata*. La mandarine a été récoltée à la fin du mois de février 2011, durant laquelle le fruit était mature, au niveau de la région de Boumehra Ahmed (Wilaya de Guelma). La mandarine a subi un lavage, une élimination des taches et un essuyage, puis elle a été récupérée dans des sacs propres et conservée à 4°C pour servir ultérieurement à l'extraction.

Extraction de l'huile essentielle de la mandarine

Principe de l'extraction

L'extraction de l'huile essentielle des écorces de la mandarine a été réalisée selon la méthode de Clevenger [6]. Cent grammes d'écorce de mandarine sont placés dans un erlenmeyer à vide de 2L contenant 600mL d'eau distillée, puis porté à ébullition. Les huiles essentielles sont alors entraînées par la vapeur d'eau et sont ensuite condensées. Le temps d'extraction est d'environ 3 heures. Le distillat obtenu est récupéré dans une ampoule à décanter. Le mélange est laissé au repos pendant 15 min. Le distillat est par la suite recueilli dans un collecteur et l'huile essentielle des écorces de mandarine est récupérée dans un flacon approprié. L'extrait d'huiles essentielles est déshydraté par le sulfate de sodium (Na_2SO_4 , Biochem Chemopharma, Montréal, Québec) puis conservé à 4°C, à l'abri de l'air et de la lumière [7,8].

Détermination du rendement d'extraction

Selon la norme AFNOR (Association Française de

Normalisation) [9], le rendement en huile essentielle (R_{HE}), est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Il est donné par la formule suivante: $R_{HE} = (M'/M) \times 100$

Evaluation de l'activité antibactérienne

Origine et choix des souches bactériennes

Les souches bactériennes choisies pour cette étude sont des bactéries à Gram positif (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) et une bactérie à Gram négatif (*E. coli* ATCC 25922). Ces souches ont été fournies par le Service de Microbiologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Constantine. Le choix de ces souches nous a semblé d'autant plus intéressant qu'elles sont responsables de toxico-infections alimentaires.

Choix des milieux de culture

Pour obtenir une culture jeune de bactéries afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Citrus reticulata*, plusieurs milieux de culture ont été utilisés comme le milieu Chapman pour *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, la gélose nutritive (GN) pour *Bacillus cereus* CHUC et MacConkey pour *E. coli* ATCC 25922.

Le milieu de culture utilisé pour étudier l'activité antibactérienne est l'Agar de Muller Hinton (AMH) qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents anti-bactériens [10].

Préparation des suspensions bactériennes

Les bactéries à tester sont ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) ou autres milieux, selon les souches, et incubées pendant 24h, afin d'obtenir une culture jeune de bactéries et des colonies isolées. A partir de ces boîtes, à l'aide d'une anse de platine, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées et mises dans 5mL de sérum physiologique stérile à 0,9% de NaCl. La suspension bactérienne est homogénéisée, et la densité optique lue à 625 nm est ajustée de 0,08 à 0,10. On admet que cette densité mesurée à 625 nm est équivalente à 10^{+8} Colony Forming Units (CFU).L⁻¹ [11].

Tests de l'activité antibactérienne

Méthode de diffusion

La méthode des aromagrammes est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle testée. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Elle permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'huile essentielle sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cette huile essentielle. La méthode de diffusion sur disques appliquée est celle décrite par Hussain et al. [10], avec quelques modifications. Vingt mL d'Agar de Muller Hinton en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, la suspension bactérienne (10^{10} CFU/mL) testée est étalée en surface. Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier filtre imbibés d'huiles essentielles de *Citrus reticulata* (2 disques/boîte) sont déposés sur l'agar, précédemment inoculé avec le microorganisme choisi. Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 1h pour que l'huile essentielle puisse diffuser. L'érythromycine et l'acide fusidique sont utilisés comme contrôle positif, ce choix est dû à la sensibilité des souches choisies à ces antibiotiques. Les boîtes ont été incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h. La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque en millimètre. D'après Ponce et al. [12], les résultats peuvent être symbolisés par des signes selon la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle : non sensible (-) ou résistante: diamètre <8mm ; sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm; très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm; extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

Méthode des microatmosphères

L'activité antibactérienne des composés volatils des écorces de *Citrus reticulata* a été testée par la méthode des microatmosphères [13]. Vingt mL d'Agar Muller Hinton (AMH) en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, la suspension bactérienne à tester est étalée en surface. Un disque stérile de papier filtre (6 mm), imbibé par 5 µL d'huile essentielle de zeste de *Citrus reticulata*, a été placé

au centre du couvercle de chaque boîte de Pétri.

Les boîtes sont fermées par du parafilm (dépôt en position inversée, sur le couvercle de la boîte de Pétri). Ces dernières ont été incubées (sur le couvercle de sorte que les composés volatils puissent atteindre les souches bactériennes) à l'étuve à 37°C pendant 24h. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins net. Les résultats sont lus avec une règle et sont exprimés par un diamètre moyen en mm [13].

Méthode de dilution d'agar

Cette technique donne un intervalle de valeurs de la CMI, elle est économique puisqu'elle permet de tester plusieurs souches bactériennes dans la même boîte. Pour déterminer les concentrations d'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata*, la méthode de dilution d'agar rapportée par Hammer et al. [14] a été utilisée avec quelques modifications.

Une série de dilution de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* a été préparée en AMH (20 mL) additionnée de 0,5% (v/v) de tween 20, allant de 2% à 0,0625% (v/v). Le mélange est homogénéisé et ramené à 45°C. Ce mélange, à différentes concentrations, est immédiatement coulé dans des boîtes de Pétri (90 mm de diamètre). Après solidification de la gélose, les boîtes ont été séchées à 37°C pendant 1h. Chaque boîte de Pétri est ensuite partagée en trois parties dans lesquelles sont mises les trois souches bactériennes, sous forme de stries (10^{10} UFC/mL). Des témoins négatifs (AMH + tween 20) sont réalisés pour chaque souche. Les boîtes de Pétri (avec et sans huile essentielle) ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h. Les boîtes de Pétri, dont les concentrations ayant montré une absence totale de croissance bactérienne, ont été sélectionnées pour déterminer les CMI. Cette dernière représente la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu, après 24h d'incubation à 37°C.

Analyse statistique

Les différents résultats sont présentés sous forme de moyennes $\pm$ l'écart type de deux essais.

Résultats

Rendement

L'huile essentielle obtenue est de couleur jaune-pâle avec une odeur aromatique et un rendement de $0,88 \pm 0,08\%$.

Sensibilité des bactéries à l'huile essentielle

La détermination de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* a été réalisée par la méthode de diffusion sur disques (aromatogramme). Cette dernière est généralement employée comme une analyse préliminaire pour étudier l'activité antibactérienne, ensuite, viennent des méthodes plus détaillées.

Dans la présente étude, nous avons testé l'huile essentielle à une seule concentration. Selon Bagamboula *et al.* [15], il n'y a aucun rapport entre la concentration d'huile essentielle ou du composé actif et la zone d'inhibition; cette dernière semble dépendre de la capacité des huiles essentielles à diffuser uniformément sur l'agar. Généralement, les huiles essentielles sont insolubles dans l'eau, ce qui pose beaucoup de problèmes pour étudier leur activité antibactérienne.

La méthode de diffusion des disques est intensivement employée pour étudier l'activité antibactérienne des substances naturelles et des extraits des plantes. Cette technique est basée sur l'utilisation des disques comme réservoirs contenant la solution des substances à examiner. Elle nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de

l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* vis-à-vis des souches bactériennes.

Les mesures des halos d'inhibition ont permis de classer les bactéries suivant leur degré de sensibilité à l'huile essentielle de l'écorce de *Citrus reticulata*.

Dans le Tableau I, il est à noter que *B. cereus* est la bactérie la plus sensible. En effet, l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* a montré une activité contre cette bactérie à une valeur de halo d'inhibition de plus de 26 mm.

La sensibilité bactérienne aux composés volatils des huiles essentielles

Bien que de nombreux rapports existent sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de contact direct (aromatogramme), des informations sur l'activité antibactérienne de la phase volatile d'huile essentielle sont rares. Les composés volatils de l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* se sont avérés dépourvus d'activité antibactérienne. Dans la présente étude, la vapeur de l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* n'a montré aucune activité inhibitrice à une dose de 5 μ L/boîte.

Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les huiles essentielles peuvent être utiles en tant qu'agents antimicrobiens parce qu'elles affectent plusieurs cibles simultanément et il n'y a aucun

Tableau I. Diamètres (mm) des zones d'inhibition de l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata*

Produit Espèce	Huile essentielle de Citrus reticulata (5 μ L/disque)	Degré de sensibilité	Acide Fusidique	Erythromycine
<i>Bacillus cereus</i>	26,5 $\pm$ 3,8	+++	17 $\pm$ 1,4	36,5 $\pm$ 2,1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7 $\pm$ 0	-	/	10 $\pm$ 1,4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	10,5 $\pm$ 0,7	+	38 $\pm$ 1,4	38,5 $\pm$ 0,7

/ : Aucun effet inhibiteur ; - : non sensible ou résistante ; + : sensible ; +++ : Extrêmement sensible. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type

Tableau II. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata*

<i>Souches bactériennes</i>	<i>CMI (%)</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	1%
<i>Bacillus cereus</i>	2%
<i>E. coli</i>	> 2%

rapport de résistance ou d'adaptation des micro-organismes à cause de la diversité des composés chimiques [16]. Plusieurs travaux ont confirmé la présence de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata*. De même, nos résultats montrent l'existence de cette activité et indiquent que les huiles essentielles des écorces de *Citrus reticulata* ont une activité antibactérienne qui n'est pas négligeable. Avant d'utiliser une molécule antibactérienne comme conservateur dans un aliment, la concentration minimale inhibitrice (CMI) doit être estimée. Par conséquent, ces concentrations sont mesurées dans le but de définir les frontières de l'acceptabilité sensorielle et l'efficacité antibactérienne des huiles essentielles [17]. Dans ce contexte les valeurs des CMI de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus reticulata* de la mandarine sont déterminées par la méthode de dilution d'agar et sont présentées dans le Tableau II. L'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* n'a pas montré une bonne susceptibilité contre les trois souches bactériennes, suite aux valeurs élevées de CMI.

Discussion

D'après la classification de Ponce *et al.* [12], *B. cereus* est extrêmement sensible à l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata*. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les bactéries à Gram+ possèdent des dispositifs structuraux qui sont plus susceptibles aux huiles essentielles.

Bien que la bactérie *Staphylococcus aureus* est à Gram⁺, et selon les résultats obtenus, elle représente un degré de sensibilité (10,5 mm) plus faible que *B. cereus*. Ceci peut être expliqué par le fait que les composants actifs d'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* auraient des difficultés pour détruire les *Staphylococcus aureus* à cause

de leur association en amas. Selon Bassole *et al.* [18], les staphylocoques sont déjà connus par leur antibio-résistance.

Les résultats obtenus montrent que les souches bactériennes testées n'ont pas la même zone d'inhibition, ce qui signifie que le type de bactérie est un facteur important influençant l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Ces résultats ont été déjà rapportés par plusieurs auteurs, notamment Hammer *et al.* [14]. Il est bien connu que les espèces bactériennes n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis d'un agent antibactérien. De même, dans une population bactérienne, il peut exister des différences individuelles de sensibilité. Ainsi, l'action antibactérienne est parfois partielle et après une diminution du nombre de bactéries, il y a une reprise de la croissance bactérienne. Malgré l'existence des zones d'inhibition relativement faibles, nos résultats montrent l'existence d'une activité antibactérienne contre les trois souches testées, qui sont des microbes pathogènes impliqués dans les intoxications alimentaires, d'où l'intérêt d'estimer les CMI. En effet, les trois souches testées ont exprimé une résistance considérable vis-à-vis de l'huile essentielle vue l'absence totale des halos d'inhibition pour les trois souches. La méthode de microatmosphère n'a pas été concluante pour l'huile essentielle de l'écorce de mandarine, ceci pourrait être expliqué par le fait que les composants d'huile essentielle de *Citrus reticulata* ne sont pas actifs. D'après Kalemba & Kunicka [19], la sensibilité d'un microorganisme aux huiles essentielles dépend des propriétés de l'huile essentielle et du microorganisme lui-même. Il est bien connu que les bactéries à Gram⁺ sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries à Gram⁻. Plusieurs études testant l'activité inhibitrice des huiles essentielles confirment ce phénomène [20,21]. Les interactions entre les agents émulsifiants (Tween 20) et les constituants des huiles essentielles représentent un facteur important pour la mesure de leur activité antibactérienne car elles peuvent diminuer l'activité antimicrobienne [14]. L'absence de relation entre les trois méthodes d'étude pourrait s'expliquer par l'environnement où se trouve l'huile essentielle ainsi que le type de contact. Dans la méthode de diffusion, les constituants actifs ont trouvé une

difficulté pour diffuser sur la gélose, alors qu'avec la méthode de dilution, les constituants actifs sont en émulsion avec les ingrédients du milieu de culture et sont donc en contact direct avec les constituants du milieu de culture.

En revanche, dans la méthode des microatmosphères, les molécules ne sont pas en contact direct (état volatil).

Beaucoup de questions technologiques devraient être soulevées avant que de nouveaux conservateurs naturels puissent être considérés comme additifs. Le mécanisme d'action, la solubilité et la stabilité dans les aliments, l'impact sur la saveur ou la couleur du produit et la concentration appropriée requise sont importants pour les industries alimentaires. Dans beaucoup de cas, des antimicrobiens d'origine naturelle n'ont pas pu répondre à certaines de ces questions (la solubilité, l'odeur et la couleur sont les limites les plus communes).

Indépendamment des questions ou des préoccupations mentionnées tout en recherchant de nouvelles sources de conservateurs naturels, la culture des plantes ou les conditions climatiques devraient être prises en considération. Ces facteurs influencent la composition des plantes et donc leurs propriétés. Néanmoins, la recherche devraient se poursuivre pour trouver des sources prometteuses d'antioxydants et d'antimicrobiens ou effectuer des investigations détaillées, sur l'optimisation des techniques d'isolement, sur des études biochimiques vers la sûreté des sources nouvellement découvertes, et la disponibilité biologique des composés actifs.

Conclusion

L'objectif de la présente étude est d'évaluer *in vitro* l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus reticulata*, afin de la proposer comme agent aromatique et conservateur dans les industries agro-alimentaires. L'huile essentielle des zestes de *Citrus reticulata* a montré une activité antibactérienne contre *Bacillus cereus* plus élevée que celle de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *E. Coli* ATCC 25922. La méthode des microatmosphères a permis de constater l'absence totale d'activité inhibitrice des composés volatiles de l'huile essentielle à une dose de

5µL/boîte. Les CMI obtenues de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *E.Coli* ATCC 25922 sont de 1, 2 et >2%, respectivement.

Au vu de ces résultats, l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* semble avoir un pouvoir antibactérien non négligeable. Par conséquent, il serait intéressant de tester cette huile dans les aliments pour développer de nouveaux agents antibactériens et pour empêcher ou ralentir la détérioration des denrées alimentaires.

Conflit d'intérêts

Les auteurs n'ont aucun conflit d'intérêt vis-à-vis de cet article.

Références

1. Guiraut JP. Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD, Paris : 2003; p.110-112.
2. Bonnefoy C., Guillet F., Leyral G., Bourdais EV. Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Lavoisier, Paris, 2002; p.100-106.
3. Multon JL. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Paris: Lavoisier, 2002; p. 207-231.
4. Barkat M., Bouguerra A. Study of the antifungal activity of essential oil extracted from seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. For its use as food conservative. *Afric J Food Sci* 2012; 6(9): 239-44.
5. Valnet M. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth International. *J Food Microbiol* 2005; 85:73-81.
6. Clevenger JF. Apparatus for the determination of volatile oil. *J Am Pharm Assoc*, 1928; 17:345-9.
7. Bajpai VK., Shukla S., Kang SC. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Biores Technol* 2008; 99:8903-08.
8. Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie. Plantes médicinales. Technique et documentation. 3^e édition, Lavoisier, Paris : 1999 ; 1120p.
9. AFNOR. Recueil des Normes Françaises «huiles essentielles», AFNOR. Paris : 1986; 57p.

10. Hussain AI., Anwar F., Chatha SAS., Jabbar A., Mahboob S., Nigam PS. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian J Microbiol* 2010;41:1070-08.
11. OMS. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. 4^e Edition, *MSPRH selon les recommandations de l'OMS*, Algérie, 2005; 115 p.
12. Ponce AG., Fritz R., Del Valle C., Roura SI. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm Wiss Technol* 2003;36:679-84.
13. Deans SG., Ritchie G. Antibacterial properties of plant essential oils. *Int J Food Microbiol* 1987;5:162-80.
14. Hammer KA., Carson CF., Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999;86(6):985-90.
15. Bagamboula CF., Uyttendaele M., Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol* 2004;21:33-42.
16. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. Biological effects of essential oils - a review. *Food Chem Toxicol* 2008; 446-75.
17. Tiwari BK., Valdramidis VP., O'donnell CP., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen PJ. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J Agric Food Chem* 2009;57: 5987-6000.
18. Bassole HN., Kabore Z., Traore AS. Étude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale. *Pharm Méd Trad Afi* 2002;11:113-22.
19. Kalemba D., Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Cur Med Chem* 2003;10: 813-29.
20. Poole K. Multidrug resistance in Gramnegative bacteria. *Cur Opinion Microbiol* 2001;4:500-8.
21. Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N. *et al.* Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharm* 2002;79 : 213-20.