

## LES BACTERIES LACTIQUES LOCALES

PAR E. HARRATI

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE

I.N.A. EL-HARRACH ALGER

Les bactéries lactiques forment un groupe de microorganismes très hétérogène tant sur le plan morphologique que physiologique.

Les auteurs qui ont eu à s'occuper de leur systématique se sont heurtés à la difficulté de pouvoir établir une classification simple pouvant englober tous les caractères différentiels.

Ce fait a engendré nécessairement plusieurs méthodes d'approche et de nomenclature.

Ces bactéries présentent les caractères communs suivant:

- batonnets ou cocci, généralement immobiles
- gram +
- non sporules
- ne possèdent ni de cytochrome oxydase, ni catalase
- sont anaérobies facultatifs ou microaérophiles
- ne réduisent pas les nitrates en nitrite.

Ces bactéries ont de nombreux habitats naturels. On peut les trouver:

- chez l'homme et les animaux (principalement le genre *Lactobacillus* dans le tractus alimentaire, mais aussi dans les cavités naturelles: bouche, vagin).
- dans les produits alimentaires.

Elles sont abondantes dans les laits crus, lait fermentés, fromages, végétaux en fermentation.

Leur rôle fondamental, c'est d'assurer la conservation de certains aliments par le biais de la fermentation lactique.

Cette fermentation ou acidification coïncide avec la multiplication (Fig. 1).

Il faut donc assurer la prolifération de ces germes pour que le pH bas puisse agir vis à vis des germes pathogènes et de la putréfaction.

Les espèces qu'on y trouve sont des agents de transformation pour certains secteurs des industries alimentaires, mais également des contaminants susceptibles de compromettre le processus technologique et la qualité des produits finis.

### IMPORTANCE DES BACTERIES LACTIQUES

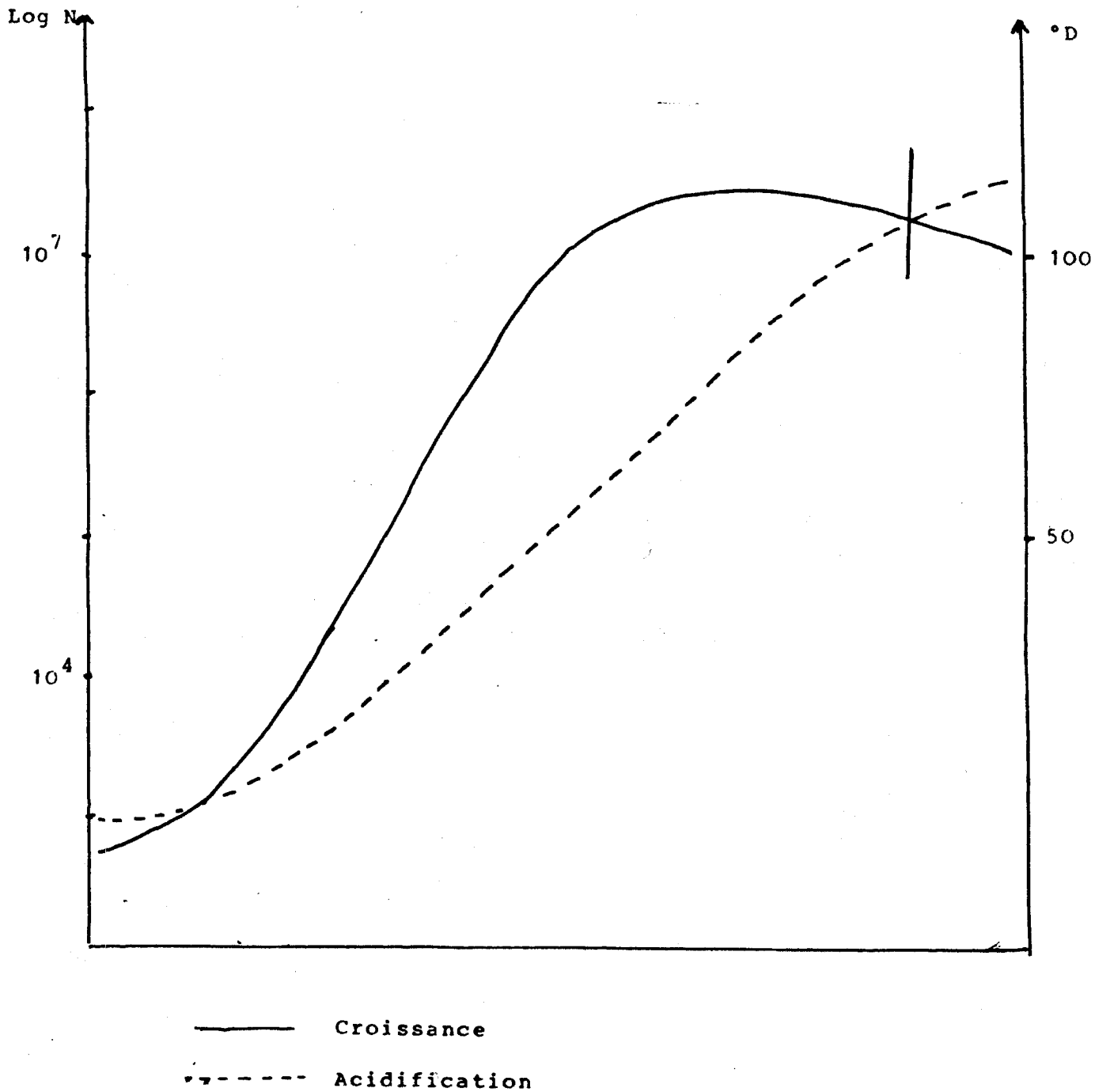
#### A. Rôle bénéfique

- Yaourts - fermentation lactique
- Laiterie      Fromages-caillage, égouttage, affinage
- Beurre - acidification de la crème et production de l'arôme
- Olives de table - fermentation lactique
- Saucisses - conservation et goût

#### B. Rôle néfaste

- Jus de betterave
- Jus de fruits                      Contaminants susceptibles de compromettre la qualité commerciale
- Bière
- Limonades

Fig. 1 : Courbes de croissance et d'acidification



La laiterie occupe une place à part et cela pour deux raisons:

- il n'y a pas d'industries laitières sans bactéries lactiques, qu'on appelle encore levains lactiques ou starters.

- l'Algérie importe la quantité intégrale des ferments lactiques qui lui sont nécessaires ce qui évidemment augmente le coût de produits finis.

Le travail, mené depuis quelques temps au Laboratoire de Microbiologie de l'I.N.A. s'insère dans ce cadre précis et son objectif est le suivant:

- 1.- Attirer l'attention de tout un chacun sur cette question de levains d'une façon générale.
- 2.- Arriver par des méthodes appropriées d'isolement et de caractérisation à constituer une collection de souches locales de ferments lactiques.
- 3.- Tester ces souches sur le plan des principaux caractères technologiques.
- 4.- Apporter une réflexion globale sur leurs possibilités d'utilisation industrielle.

#### Sources d'isolement

Pour constituer une collection de souches locales, il faut évidemment s'adresser à des produits locaux.

La bactérie lactique dont l'origine est le yaourt est une bactérie étrangère, importée qui nous a intéressé également dans le cadre de ce travail, mais seulement à titre de comparaison.

Nous avons procédé à l'isolement à partir du:

- lait cru
- lait cru enrichi
- lait caillé
- leben artisanal et semi-artisanal
- saumure d'olive
- ensilage
- jus de betterave

### Milieux de culture d'isolement

La connaissance des exigences physiologiques et nutritionnelles des bactéries lactiques et des microbes qui leur sont le plus souvent associés, a conduit les microbiologistes à proposer un certain nombre de milieu sélectifs en vue de leur isolement.

Ces milieux de culture ne sont pas commercialisés par l'Institut Pasteur.

Lorsqu'on les prépare avec les produits de base cela est parfois fastidieux et décourage le débutant, d'autant plus lorsqu'on ne dispose pas des produits de qualité exigé (tel peptone Evans par exemple).

Les milieux de culture que nous avons utilisés sont les suivants:

pour Lactobacillus:

1. Milieu de Rogosa, Mitchel et Wiesman
2. Milieu de Brigs
3. Milieu de Rogosa modifié
4. Milieu de De Man Rogosa et Sharpe
5. Milieu d'Abdelmalek et Gibson

pour Streptocoques

1. Milieu d'Elliker
2. Milieu de Chalmers
3. Milieu ST

pour Leuconostoc

1. Milieu de Mayeux
2. Gélose hypersaccharose des ~~Mayeux~~ et Colmer
3. Milieu de Donough et al.
4. Milieu au jus de tomate

A l'issu de cet essai coûteux, nous pouvons vous recommander ceux qui sont soulignés.

### IDENTIFICATION

Identifier un germe cela veut dire lui donner le nom de l'espèce. (attention, pour un travail plus approfondi, il est souvent nécessaire d'aller vers le chimiotype, le sérotype ou le lysotype.

Dans le cas de Lactobacillus, il est d'abor important de ne pas le confondre avec le genre Bacillus.

La recherche du cytochrome oxydase s'avère satisfaisante. Une fois le genre caractérisé, il faut déterminer le groupe et le problème se resout facilement à condition d'employer le milieu Gibson et Abdelmalek, de préparation délicate.

Genre Lactobacillus

Groupe Thermobacterium		homofermentaires		Milieu Gibson
Streptobacterium		hétérofermentaires		
Batabactérium				

Tableau 1 - CARACTERES DES THERMOBACTERIUM

	Espèces de lactobacillus							
	Helve- ticus	jugur- ti	bulga- ricus	Lactis	Acido- philus	Leich- manii	Del- brucckii	Sali- varius
Présence de granu.	-	-	+	+	-	+	-	-
Culture à 15°C	-	-	+	+	-	+	-	-
Culture à 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+
%d'acide ds le lait	DL	DL	D(-)	DL	D(-)	D(-)	D(-)	L(+) .DL
NH <sub>3</sub> /arginine	-	-	-	-	-	±	±	-
Hydrolyse esculine	-	-	-	-	+	+	-	±
Fermentation de								
- Amygdaline	-	-	-	-	+	+	+	+
- Cellobiose	-	-	-	-	+	+	-	-
- Galactose	+	+	+	+	+	±	±	+
- Lactose	+	+	+	+	+	±	-	+
- Maltose	+	-	-	+	+	+	±	+
- Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	+
- Salicine	-	-	-	+	+	+	-	+
- Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	+
- Saccharose	-	-	-	+	+	+	+	+
- Trehalose	±	±	-	+	+	+	-	+
Groupe sérologique	A	A	E	E	?	?	?	Nouveau
Exigences nutrition.								
- Riboflavine	+	+	+	+	+	-	+	+
- Puridoxal	+	+	-	-	-	-	-	-
- Acide folique	-	-	-	-	+	+	-	+
- Vitamine B <sub>12</sub>	-	-	-	±	±	+	-	-
- Thymidine	-	-	-	-	-	-	+	-
Survie à 63°C pdt 30'	-	-	+	-	-	+	+	-

Aucune souche ne fermente l'arabinose, le xylose et le melizitose.

Aucune n'exige de thiamine.

Aucune ne produit de CO<sub>2</sub> à partir de glucose.

En allant vers l'espèce à l'intérieur du groupe vous allez rencontrer quelques obstacles.

Regarder le Tableau 1.

N'est-ce pas que vous pouvez confondre facilement un *L. helveticus* avec un *L. jugurti*?

En plus, remarquer-le, la détermination devient fastidieuse et très coûteuse.

Bien sur qu'en utilisant la méthode API le travail devient plus élégant mais l'élégance ne résout pas le problème d'espèce et encore moins de prix.

Les Streptocoques lactiques ne posent pas de problèmes pour un microbiologiste suffisamment averti de la taxonomie. Ces bactéries poussent bien sur le milieu Chalmers et l'identification est simplifiée du fait qu'il y a un nombre restreint d'espèces.

Tableau 2 : Caractères distinctifs des Streptocoques

	Lactis	Cremoris	Diacetylactis	Thermophilus
CO <sub>2</sub> /glucose	-	-	-	-
NH <sub>3</sub> (arginine)	⊕	⊖	+	-
Acétone	-	-	⊕	-
Culture : 10°C	+	+	+	+
37°C	+	+	+	±
40°C	+	-	+	+
45°C	-	-	-	⊕
Résistance 65° à 30'	-	-	-	⊕
Lait tournesolé	R - C	R - C	R - C	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">A - C</span>

R - réduit ; C - coagulé; A - acidifié.



Une mini galerie comportant:

- un bouillon additionné d'arginine
- du lait écrémé (recherche d'acétoïne)
- un bouillon pour incubation à 45°C
- du lait tournesolé, est suffisante pour déterminer l'espèce

Quant au *Leuconostoc*, l'aspect de colonie sur le milieu Mayeux que nous vous avons recommandé vous amène au diagnostic:

- . colonie très petite, *L. citrovorum*
- . colonie muqueuse, caractéristique, *L. dextranicum* ou *L. mensenteroides*

Par ces quelques remarques au sujet de l'identification de bactéries lactiques je voulais rappeler que dans le domaine précis de la technologie laitière et des levains, il n'est pas tellement important de savoir qu'il s'agit de telle ou telle espèce.

Les critères basés sur les aptitudes technologiques sont ceux qui comptent d'avantage.

### Aptitudes technologiques

Après isolement et identification, partielle ou complète, il est nécessaire de tester les souches sur un certain nombre de caractères, recherchés en technologie laitière.

Les critères de sélection initiale sont:

- aptitude à l'identification
- aptitude à la proteolyse
- aptitude à la production d'arôme.

Cette sélection préliminaire ne résout pas le problème, car, une fois lancées à l'échelle industrielle, les bactéries lactiques se trouvent fréquemment en présence de divers obstacles tels que:

- Les antibiotiques qui les empêchent de proliférer et donc d'acidifier les produits.
- Les bactériophages, qui les lysent rapidement.

Ce qui évidemment oblige le producteur de ferments lactiques à faire appel aux starters constitués d'un mélange d'espèces différentes. Cette façon de faire amène une autre difficulté qui est celle de l'antagonisme entre les différentes espèces.

Il s'avère donc qu'une recherche appliquée liée à une recherche plus approfondie, fondamentale, sont nécessaires pour résoudre le problème d'utilisation des bactéries lactiques, non seulement en laiterie, mais également dans d'autres domaines.

En effet, les débouchés de ces bactéries sont très grands:

- Starters, pour la fabrication de produits laitiers ou la préparation de l'olive de table.
- Synthèse d'acide lactique, après une fermentation dirigée à partir du lactoserum par exemple.

Cet acide a des usages alimentaires (limonades, sirops), en tannerie (pour décalcifier les peaux), en pharmacie (la fabrication des médicaments).

- Le dextrane, synthétisé par les *Leuconostoc* remplace le plasma du sang.
- Les bactéries lactiques synthétisent les antibiotiques tel que nazine qui inhibe les *Clostridium*s (en laiterie, en particulier, les *Clostridium*s sont des germes redoutables en fabrication de fromage à pâte ferme).
- Certaines souches, faisant partie des collections, sont utilisées pour le dosage très précis de vitamines et de facteurs de croissance.

Cela me permet de saisir l'occasion pour dire qu'il est nécessaire de créer un Laboratoire à l'échelle du pays, doté de moyens matériels et de personnels qui s'occupent de la question des levains en général. Cela va permettre de limiter les gaspillages de toute sorte (temps, argent, énergie) et de résoudre ce problème, dont les conséquences économiques ne sont pas négligeables. Une quantité de données dont on dispose à l'INA peut servir comme une base pour un démarrage rapide à tous ceux qui s'intéressent à ce problème.

### Quelques résultats expérimentaux

Au total 188 souches de bactéries lactiques ont été étudiées. L'identification a été faite par la méthode API, sauf quelques cas particuliers.

Le tableau (3) montre la répartition des espèces à l'intérieur des genres. Il indique le produit d'origine auquel il faut s'adresser pour isoler telle ou telle espèce en particulier.

On remarque également l'absence de *Lactobacillus bulgaricus*, l'espèce utilisée pour la fabrication de yaourt et qui est responsable du goût particulier de ce produit.

On constate aussi la richesse particulière de leben en *Leuconostoc*.

Au Maroc, par contre, on signale leur absence dans le même produit, issu d'une technologie artisanale tout à fait semblable. Peut-on conclure alors que le lait local est un milieu très favorable au *Leuconostoc* et se poser des questions sur la nature d'un certain facteur qui oblige ce microorganisme à se manifester d'avantage, donnant au leben familial son aspect caractéristique, filant.

Tabl. 3 -COLLECTION DE BACTERIES LACTIQUES LOCALES (188 Souches)

Espèces	Lait	Lait caillé	L.enrichi	Leben	Saumure	Total/genre
L. casei-casei		+		+		47
L. casei-rhamnosus		+		+		
L. plantarum		+			+	
lactis		+		+		
helveticus			+			
acidophilus		+				
salivarius		+				
fermenti		+			+	
tuchneri		+				
brevis					+	
Str. lactis	+	+		+		42
cremoris	+	+		+		
diacetylachis	+	+		+		
Str. thermophilus		+	+			5
Leuc. mesenteroides	+	+		+		94
dextranicum	+	+		+	+	
citrovorum				+	+	
lactis				+		

L'étude des aptitudes technologiques a été faite, en comparaison avec les souches d'origine étrangère dont voici les références:

Str. lactis 720	Lacto-labo	France
cremoris 720	Lacto-labo	France
diacetylactis 1106	Lacto-labo	France
thermophilus	Milles	France
Lb. Casei 702 720	Milles	France
plantarum 1462	Bern	Allemagne
helveticus 1182	Bern	Allemagne
lactis	Flora Danica	Danemark
Leuconostoc citrovorum 1473	Bern	Allemagne

Le pouvoir d'acidification qui est le critère primordial de sélection est un caractère d'espèce.

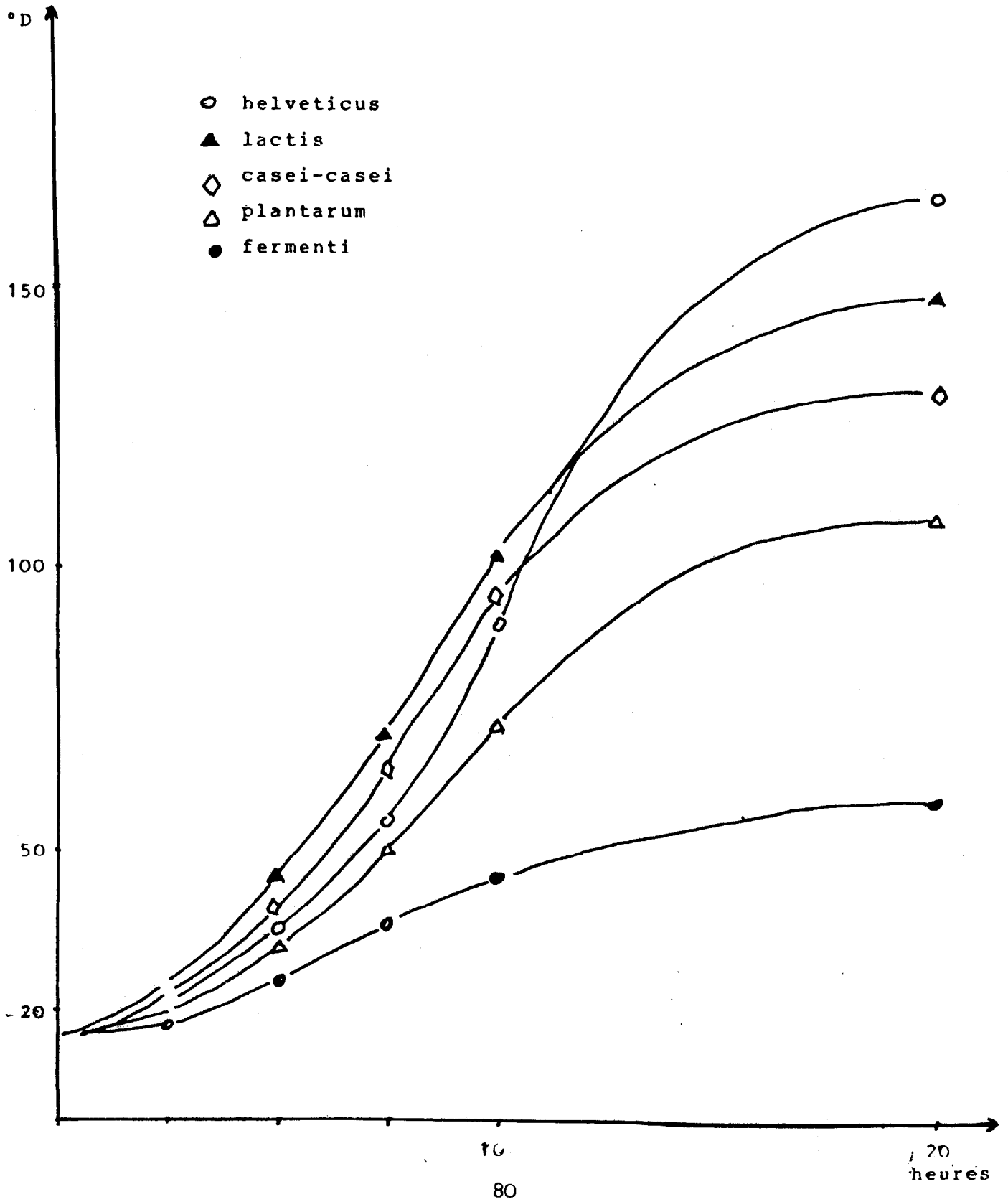
Les différences enregistrées entre les différentes souches sont négligeables (Fig.2,3). Les meilleurs acidifiants sont thermobacterium et les résultats sont sensiblement identiques aux souches étrangères.

L'activité protéolytique semble être, très appréciable et les souches identifiées aux espèces Lb. helveticus, lactis, casei-casei doivent attirer d'avantage notre attention et mériteraient de ce fait une étude approfondie au laboratoire (Fig.4).

Les souches appartenant aux espèces Leuconostoc citrovorum Str. diacetylactis sont les plus grands producteurs de diacétyle.

Cette constatation rejoint les observations faites par de nombreux auteurs qui ont signalés en plus que ces espèces peuvent produire des autres composants de l'arôme, à savoir: l'acetaldehyde, l'éthanol et les acides organiques.

Fig. 2 - Courbes moyennes de la production d'acide par les souches locales de Lactobacillus



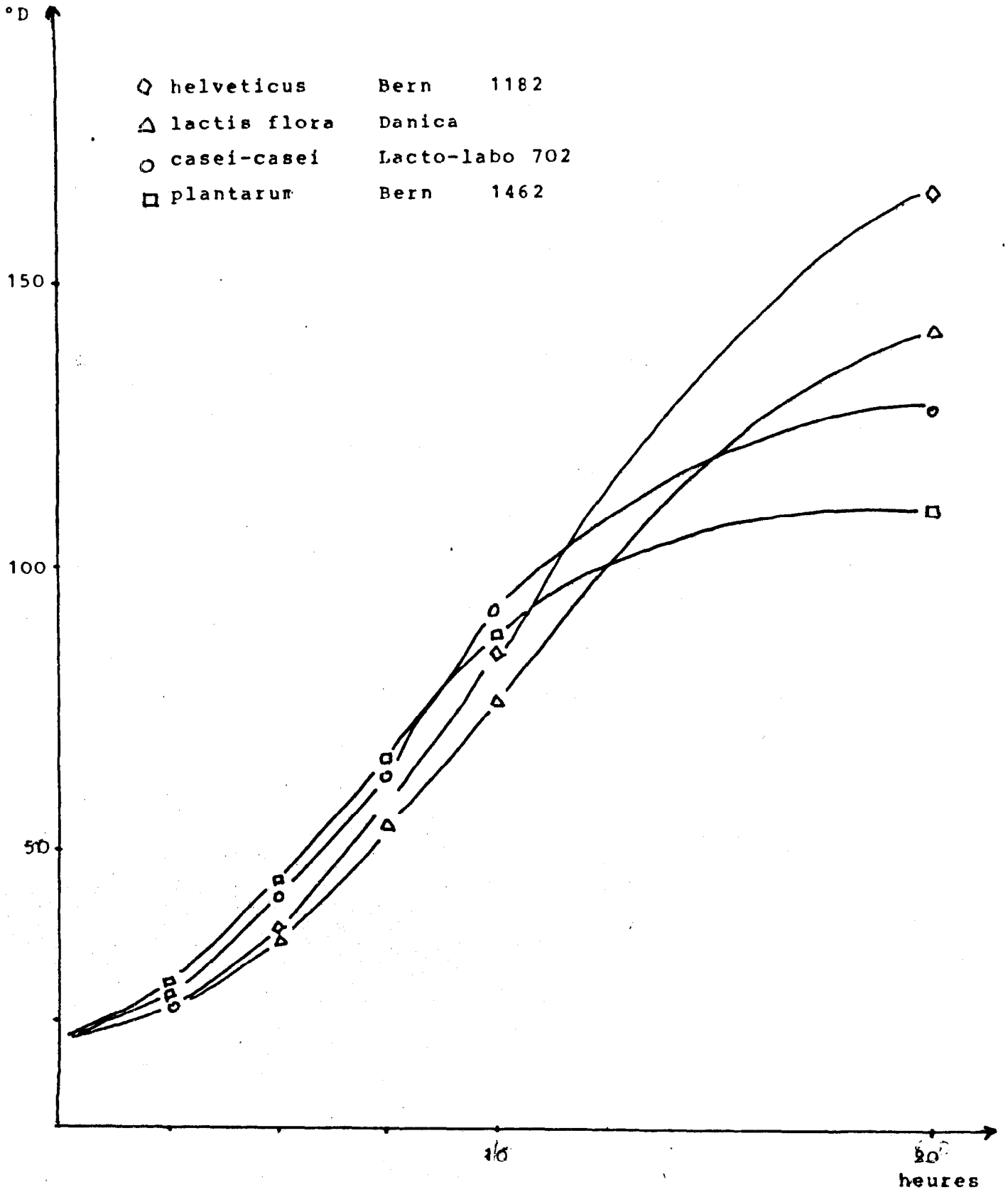


Fig. 3 - Courbes comparatifs d'acidification de quelques souches commerciales de Lactobacillus

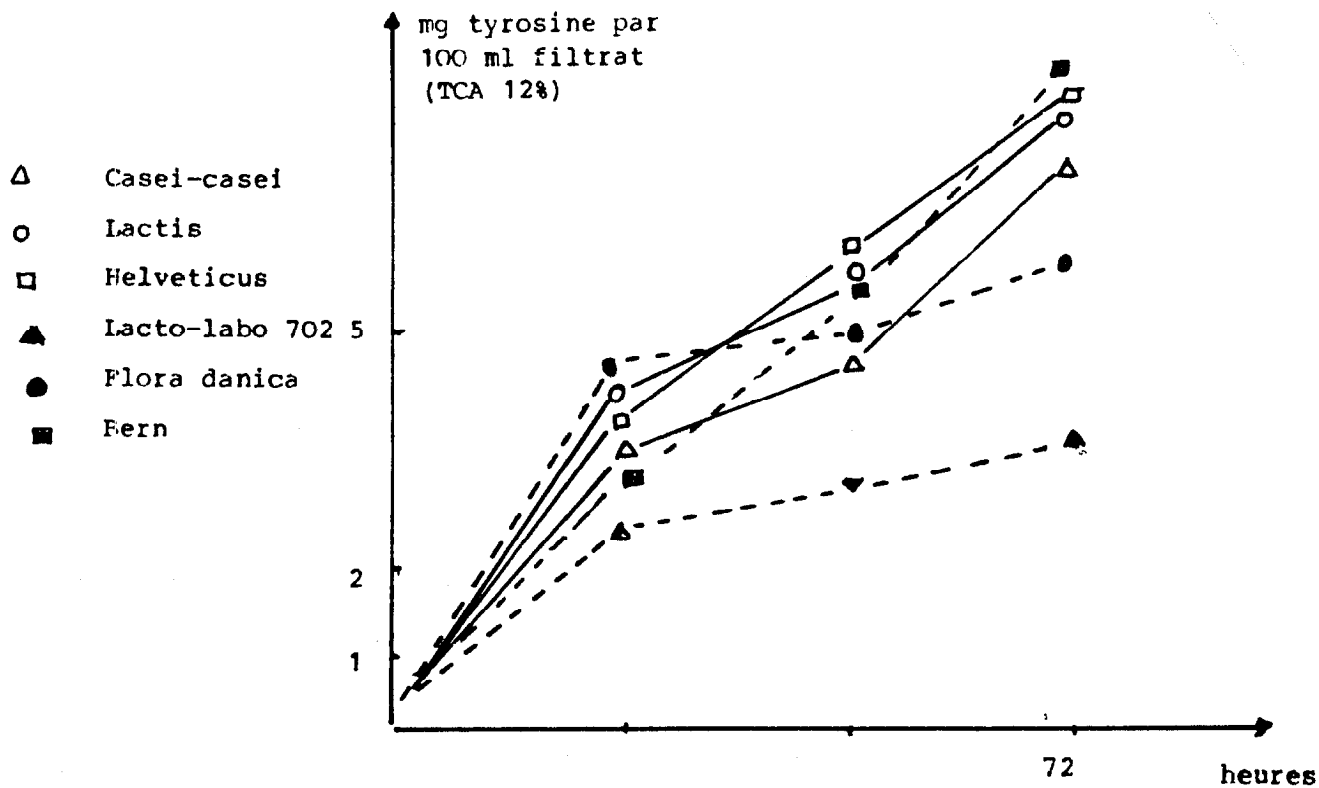


Fig. 4 : Courbes d'activités Proleolytiques des souches de Lactobacillus

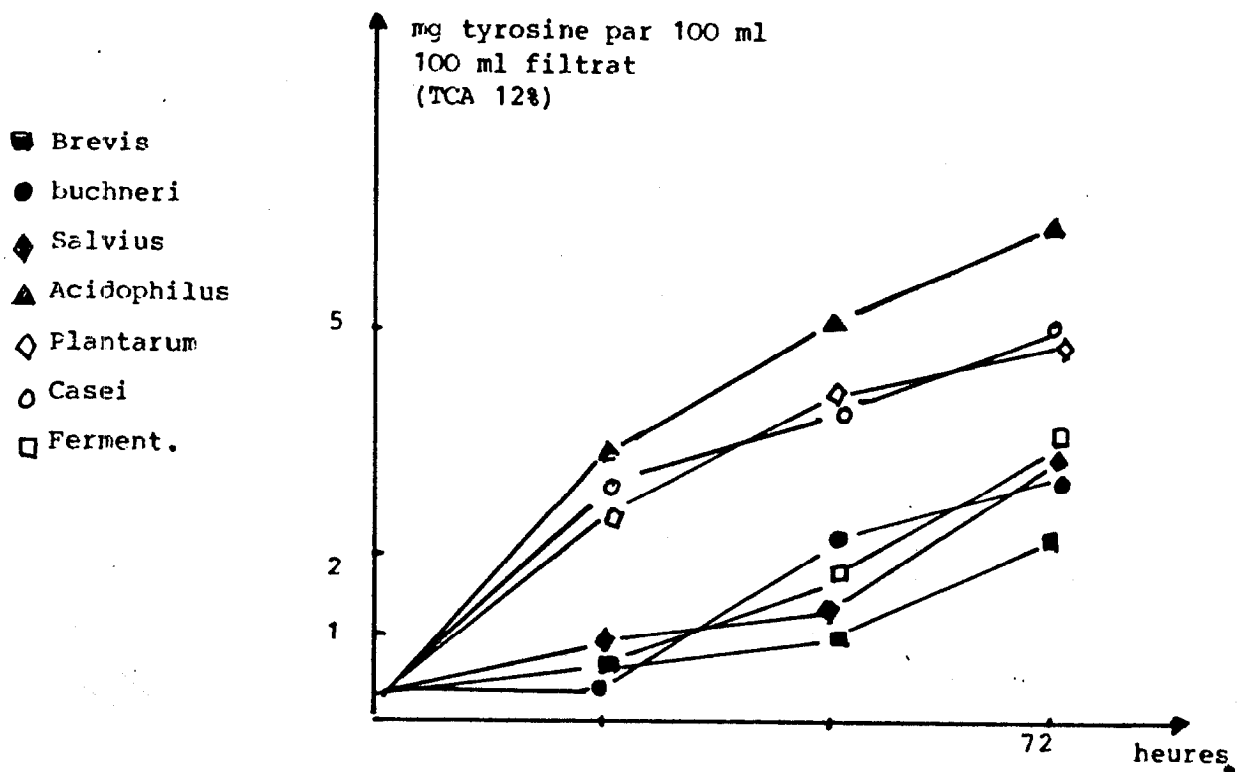




Tableau 4 - Production de diacétyle

Espèce	Origine	Densité optique	Diacétyle (ppm)
Str. diacetylactis...	Lait frais	0,247	0,99
	Lait caillé	0,306	1,242
L. citrovorum	Lait frais	0,258	1,03
	Lait caillé	0,199	0,80
	Leben	0,294	1,176
	Leben	0,312	0,94
Bern 1473		0,155	0,47

Tableau 5 - Influence de 5 antibiotiques étudiés sur les ferments lactiques

Antibiotique	Charge ug	% R	% I	% S
Bacitracine	10	87	10	3
Streptomycine	30	43	27	30
Penicilline	6	33	17	50
Oleandomycine	15	27	13	60
Chloramphenicol	30	0	0	100

Nous remarquons (tableau 4 ) que la teneur moyenne fournie par les souches de *Leuconostoc* est assez élevée comparativement à la souche commerciale qui n'en produit que la moitié.

L'étude de la résistance aux ATB les plus couramment utilisés dans le traitement des maladies, a donnée également des résultats très significatifs. (tableau 5).

Aucune résistance au chloramphénicol n'a été décelée. Par contre, la bacitracine exerce l'action la plus faible.

Relativement, les *Lactobacilles* sont plus résistants à la pénicilline, les *Leuconostoc* plus résistants à la Streptomycine et oleandomycine.

On constate de grandes variations à l'intérieur de l'espèce aussi que, fréquemment des résistances multiples.

Il est donc indispensable que l'on dispose d'une collection importante, des souches de bactéries lactiques fabriquées sous la forme de levains (lyophilisés concentrés congelés) et disponibles à tout moment, pour les employer à l'échelle industrielle.

Ceci est d'autant plus nécessaire, que le lait en poudre que nous importons est d'origine très diverse, pouvant supprimer la croissance de certaines espèces et ne pas s'opposer à d'autres.

Il est indispensable en somme, de connaître, aussi bien les aptitudes technologiques des différents laits que celle des bactéries lactiques pour mieux contrôler notre technologie. et notre économie.