

Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel

Halima Zadi Karam* & N-E. Karam

Keywords: Camel milk- Lactic Acid Bacteria- Identification- *Lactococcus*- Growth within 6.5% NaCl- Algeria

Résumé

Des bactéries lactiques ont été isolées à partir de laits crus de chamelle; elles comprenaient des coques lactiques, des leuconostocs et des lactobacilles.

*Parmi les coques lactiques résistants à 6,5% de NaCl, des isolats s'apparentant à des lactocoques ont été distingués des entérocoques à l'aide de galeries d'identification API 20Strep. Ces lactocoques, originaux par leur résistance à 6,5% NaCl, ont été soumis à une identification par analyse de leurs protéines solubles par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS, ce qui a permis de révéler le même profil protéique que pour l'espèce *Lactococcus lactis*. Tous les entérocoques ont été identifiés à l'espèce *Enterococcus faecalis* (34,6%) alors que les lactocoques se répartissaient en *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (1,2%), *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (4,9%) et *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* (28,4%). Les espèces du genre *Leuconostoc* étaient *Leuconostoc lactis* (7,4%) et *Leuconostoc dextranicum* (4,9%). *Lactobacillus plantarum* (18,5%) a été la seule espèce du genre *Lactobacillus* trouvée dans nos échantillons.*

Summary

Lactic Acid Bacteria of Camel Milk: Presence of Salt Resistant Strains of *Lactococcus*

*Different lactic acid bacteria were isolated from raw camel milk; respectively *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* strains. 6.5% salt resistant coccal isolates were identified with API 20Strep identification systems to be either enterococcal strains or lactococcal strains. Electrophoretical analysis by SDS-PAGE of whole soluble proteins of these salt resistant lactococcal strains showed that all of them were *Lactococcus lactis* species. *Lactococcus* strains regrouped *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (1.2%), *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (4.9%) and *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* (28.4%) while all of the enterococcal strains (34.6%) belonged to *Enterococcus faecalis* specie. *Leuconostoc* strains were either *Leuconostoc lactis* (7.4%) or *Leuconostoc dextranicum* (4.9%). *Lactobacillus plantarum* (18.5%) was the only member of *Lactobacillus* genera found.*

Introduction

Dans les conditions de sécheresse extrême et en manque de pâturages, contrairement aux autres animaux, les femelles des dromadaires (*Camelus dromedarius*), désignées ci-dessous par "chamelles", sont capables de produire un lait de très bonne qualité (17, 18, 19). Knoess *et al.*, (10) ont rapporté que la production journalière de lait varie entre 3,5 et 35 kg par animal, selon les saisons et l'alimentation.

La préoccupation majeure des laitiers et technologues est de pouvoir transformer le lait de chamelle en produits laitiers dérivés présentant une conservabilité satisfaisante. Les études entreprises sur ce lait ont porté sur la composition et les caractéristiques physico-chimiques, en comparaison avec le lait de vache ainsi que sur les potentialités de transformation en produits dérivés (4, 7, 12, 13, 14, 16, 19).

On constate que le nombre de produits dérivés est presque inexistant, le lait de chamelle étant le plus souvent consommé à l'état frais.

La transformation de ce lait nécessite, entre autres, une bonne connaissance de sa microflore lactique. A notre connaissance, les bactéries lactiques du lait de chamelle restent peu décrites dans la littérature.

Dans la présente étude nous avons cherché à caractériser et identifier la microflore lactique du lait de chamelle du sud-ouest algérien.

Matériel et méthodes

Prélèvements et préparation des échantillons

Huit échantillons de laits crus de chamelle ont été collectés à partir de huit animaux différents dans cinq fermes des régions de Timimoun et Béchar (Sud algérien). Pour chaque échantillon, 100 à 150 ml de lait étaient recueillis de la mamelle de l'animal après avoir bien lavé le pis et éliminé les deux ou trois premiers jets de lait. Les échantillons étaient transportés à 4 °C jusqu'au laboratoire où ils étaient répartis dans deux flacons qui étaient alors incubés, l'un à 30 °C et l'autre à 45 °C, jusqu'à obtention d'un coagulum sous l'effet de l'acidification due à la flore lactique endogène mésophile ou thermophile.

Dès coagulation, le coagulum était homogénéisé et des dilutions décimales en eau physiologique stérile étaient réalisées en triple exemplaire à partir de ce coagulum. Un volume de 0,1 ml de chaque dilution était utilisé pour l'ensemencement en surface des milieux de culture.

*Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie, Université d'Oran-Sénia, 31000, Oran, Algérie.

Reçu le 07.02.05 et accepté pour publication le 31.08.05.

Souches bactériennes de référence

Les souches *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* A89 et *Lc. lactis* ssp. *cremoris* H12 de la collection du laboratoire ainsi que la souche *Lc. lactis* ssp. *lactis* ML3, de la collection de l'INRA de Jouy-en-Josas, sont sensibles à 6,5% de NaCl et ne croissent pas à 45 °C.

Milieux et conditions de culture

Les milieux et conditions de culture étaient les suivants:

- pour les lactobacilles: milieu MRS-Agar, pH 5,5 (1) commercialisé par DIFCO et incubation à 30 °C ou 45 °C pendant 48 heures.
- pour les coques lactiques: milieu M17 (15) commercialisé par BOKAR. Diagnostics et incubation à 30 °C ou à 45 °C pendant 48 heures.

Purification et identification des bactéries lactiques

La purification des bactéries isolées était effectuée selon la méthode décrite par Karam et Karam (8). Les bactéries présentant une réaction positive à la coloration de Gram et dénuées d'activité catalase ont été retenues pour être identifiées. Elles ont alors été soumises à une série de tests simples permettant une pré-identification: croissance en milieu (MRS pour les lactobacilles, M17 pour les coques lactiques) additionné de 6,5% NaCl, croissance à 45 °C et recherche du type homo- ou hétérofermentaire par la méthode classique de Gibson & Abd El Malek (5).

Les bactéries ont ensuite été identifiées au niveau de l'espèce ou de la sous-espèce en établissant leurs profils fermentaires à l'aide du micro-système d'identification API50 CH (API50 CHS et API50 CHL). L'identification des coques croissant en présence de 6,5% NaCl et à 45 °C a été établie à l'aide du micro-système d'identification API 20Strep.

Analyse des protéines solubles des souches.

L'identification des lactocoques résistants à 6,5% NaCl rencontrés parmi les coques résistants à cette concentration saline a été confirmée par une analyse électrophorétique des protéines solubles en conditions dénaturantes, et en comparaison avec des souches de référence. Plusieurs travaux (2, 3, 9) ont rapporté cette méthode électrophorétique, qui permet d'obtenir et comparer les "empreintes protéiques" de bactéries cultivées dans les mêmes conditions de croissance.

Les cultures bactériennes ont été réalisées dans 10 ml de milieu M17 et incubées à 30 °C. Lorsque l'absorbance (DO_{600nm}) était égale à 1, les cultures étaient arrêtées par centrifugation pendant 10 mn à 6.000 g. Après avoir écarté le surnageant, le culot cellulaire a été suspendu dans 200 µl de tampon 0,03 M Tris-HCl, pH 8; 0,19 M glycine; 0,1% SDS. Après

une incubation de 2 mn à 100 °C, les préparations ont été soumises à une sonication (Sonic Dismembrator 60, Fischer Scientific, sonde de 3 mm, 8 watts, 4 cycles de 30 s, chaque cycle était suivi de 20 s de refroidissement sur de la glace). Le lysat obtenu a été soumis à une centrifugation (10 mn, 10.000 g) afin d'éliminer les débris cellulaires. Un volume de 20 à 50 µl du surnageant était alors soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide 10%, SDS 0,5% selon la technique de Laemmli (11).

Résultats

Identification des souches bactériennes

Quatre-vingt-une souches de bactéries lactiques ont été isolées et identifiées. Les genres bactériens rencontrés dans nos échantillons étaient représentés par des souches de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*.

Les coques lactiques homofermentaires poussant en présence de 6,5% de NaCl ont d'abord été classiquement considérés comme appartenant à *Enterococcus*. Cependant l'utilisation des galeries API 20Strep pour identifier les espèces bactériennes nous a permis de différencier parmi ces coques homofermentaires des souches s'apparentant à *Enterococcus faecalis* et des souches s'apparentant à *Lactococcus*. Ces dernières, qui résistaient à 6,5% de NaCl, – ce qui les distingue des espèces habituellement décrites dans la littérature – ont été identifiées à *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* et *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

Les coques lactiques hétérofermentaires appartenaient aux espèces *Leuconostoc dextranicum* et *Leuconostoc lactis*.

Les lactobacilles identifiés appartenaient tous à l'espèce *Lactobacillus plantarum*.

Confirmation de l'identification des lactocoques résistants à 6,5% NaCl

L'identification des lactocoques résistants au sel a été confirmée par analyse électrophorétique de leurs protéines solubles, en comparaison avec celles de souches de référence (*Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* A89 et *Lc. lactis* ssp. *cremoris* H12 et *Lc. lactis* ssp. *lactis* ML3) ainsi qu'avec les données de la littérature (2, 3, 6, 9). Les résultats obtenus (Figure 2) montrent que les profils protéiques de six souches lactiques isolées du lait de chamelle de Timimoun (codées CHT2, CHT4, CHT5, CHT7, CHT12 et CHT20) étaient fortement similaires entre eux et aussi avec les profils protéiques des bactéries de référence *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* A89, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* H12 et *Lc. lactis* ssp. *lactis* ML3. On retrouvait sept protéines de poids moléculaires 84, 81, 74, 34, 31, 26 et 25 kDa, qui étaient aussi retrouvées chez les souches de référence A89, H12 et ML3. Les bactéries CHT2, CHT4, CHT7, CHT12 et CHT20 s'apparentaient donc

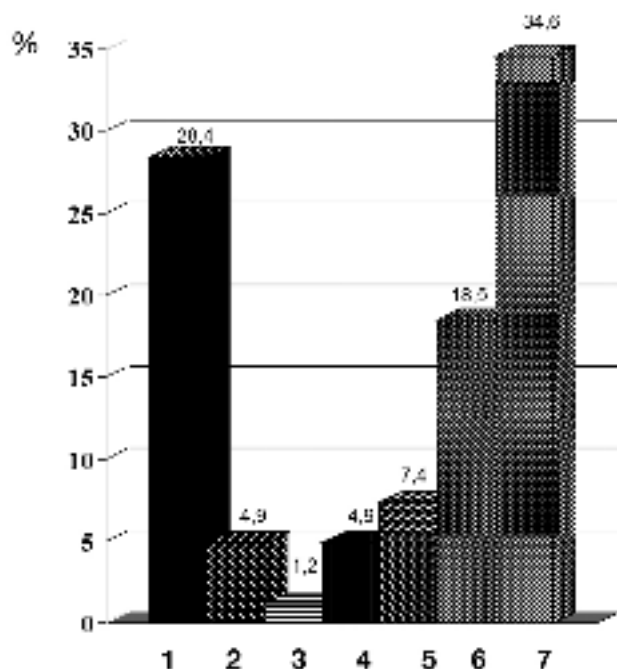


Figure 1: Répartition des souches bactériennes.

1: *Lactococcus diacetylactis*; 2: *Lactococcus cremoris*;
 3: *Lactococcus lactis*; 4: *Leuconostoc dextranicum*;
 5: *Leuconostoc lactis*; 6: *Lactobacillus plantarum*;
 7: *Enterococcus faeca*.

à *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* et la bactérie CHT5 s'apparentait à *Lc. lactis* ssp. *cremoris*.

Par ailleurs, le profil obtenu pour la souche CHT15, provenant elle aussi du lait de même origine, était nettement différent: en effet ce profil montrait une dizaine de protéines majoritaires de poids moléculaires 80, 74, 66, 50, 49, 46, 44, 40, 36 et 35 kDa, correspondant à celles décrites pour *Ec. faecalis* (6).

Distribution des souches lactiques

Les quatre-vingt-une bactéries lactiques isolées de lait de chamelle se distribuaient comme suit: 23 souches de *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*, 1 souche de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, 4 souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, 28 souches de *Enterococcus faecalis*, 4 souches de *Leuconostoc dextranicum*, 6 souches de *Leuconostoc lactis* et 15 souches de *Lactobacillus plantarum*. Les fréquences des souches identifiées sont montrées en figure 1.

Au total, plus de la moitié des bactéries lactiques isolées appartenaient aux genres *Enterococcus* (34,6%) et *Lactococcus* (34,6%). Pour ce dernier genre les espèces étaient présentes en proportions différentes: *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* (28,4%), *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (4,9%) et *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (1,2%). Le genre *Leuconostoc* était représenté par 12,3% des souches isolées et comprend *Leuconostoc lactis* (7,4%) et *Leuconostoc dextranicum* (4,9%). Les souches de *Lactobacillus plantarum* constituaient 18,5% des bactéries lactiques isolées.

L'électrophorèse était réalisée dans un gel de 10% polyacrylamide – 1,5% SDS. Les protéines étaient révélées par coloration au Bleu de Coomassie.

Canal 1: CHT15; Canal 2: CHT5; Canal 3: CHT7; Canal 4: CHT4; Canal 5: CHT20; Canal 6: CHT12; Canal 7: CHT2; Canal 8: H12; Canal 9: A89; Canal 10: ML3; Canal 11: protéines étalons de poids moléculaires (kDa).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

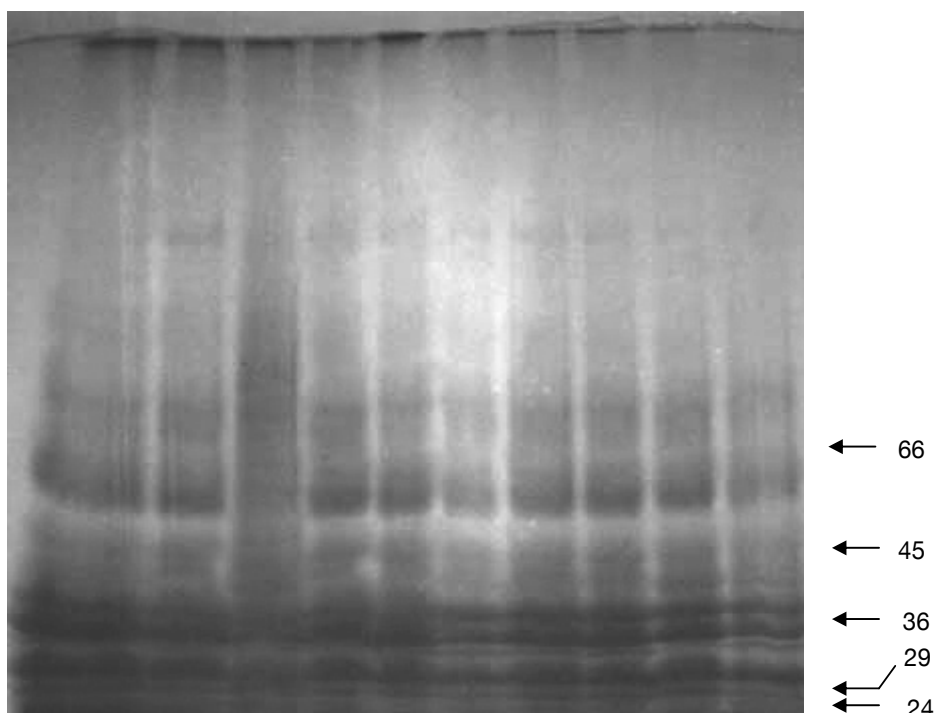


Figure 2: Analyse des protéines totales solubles des souches des bactéries par électrophorèse en gel de polyacrylamide –SDS.

Discussion – Conclusion

La présence de divers genres de bactéries lactiques dans le lait de chamelle était prévisible car des bactéries lactiques ont été trouvées dans la microflore de tous les laits étudiés, quelle que soit l'origine de ces laits (ovine, caprine, bovine, ...). Les résultats de notre étude indiquent des particularités de la flore lactique du lait de chamelle du sud-ouest algérien.

C'est d'abord la présence de *Lb. plantarum* comme seule espèce de lactobacilles trouvée dans les échantillons de lait de chamelle. Cette espèce lactique, réputée être habituellement l'hôte de plantes, a été signalée comme espèce majoritaire de la flore lactique des laits crus de vache, de brebis ou de chèvre d'Algérie mais toujours auprès d'autres lactobacilles, comme par exemple *Lactobacillus casei* ou *Lactobacillus brevis* (8).

C'est ensuite la présence dans le lait de chamelle de souches de lactocoques, identifiés à *Lactococcus*, ayant la capacité inattendue de résister à une concentration de 6,5% de NaCl. Cette concentration saline est plus élevée que celle de 4,5% NaCl communément rapportées dans la littérature pour des souches décrites de *Lactococcus lactis*, à la différence

notable que ces dernières ne provenaient pas de laits ou produits laitiers camélins. Ce résultat, original et assez surprenant, peut sans doute s'expliquer par une sélection due à l'environnement naturel de ces bactéries, c'est-à-dire le lait de chamelle. En effet, on sait que le lait de chamelle est légèrement salé (4); ceci est notamment vérifié dans la région de Timimoun, où il est notoire que ces animaux consomment principalement et préférentiellement une plante halophile, *Limoniastrum guyonianum*, communément appelée "zita". La raison de cette salinité du lait est donc vraisemblablement une adaptation physiologique de l'animal au milieu: l'animal doit excréter du sel, qui est en excès dans son alimentation.

Au-delà de leur caractère original assez inattendu, les souches de lactocoques résistantes au sel peuvent présenter un intérêt technologique car elles pourraient en effet être testées pour transformer le lait camelin lui-même, ou encore dans des fermentations de produits salés (fromages salés, olives, concombres, viandes, ...).

Références bibliographiques

- de Man J.C., Rogosa M. & Sharpe M.E., 1960, A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.
- de Roissart H. & Luquet F.M., 1994, Bactéries lactiques, I et II. Loric (Chemin de Saint Georges, F-38410), France.
- Dicks L.M.T. & Van Vuuren H.J.J., 1987, Relatedness of heterofermentative *Lactobacillus* species revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns. *International Journal of Systematic and Bacteriology*, 37, 4, 437-440.
- Farah Z., 1993, Composition and characteristics of camel milk. A review. *Journal of Dairy Research*, 60, 603-626.
- Gibson T. & Abd-El-Malek Y., 1945, The formation of carbon dioxide by Lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *Journal of Dairy Research*, 14, 35-38.
- Huygens F., 1995, Vancomycin resistance is not inducible in *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Enterococcus faecalis* A256. *South African Journal of Sciences*, 91, 94-98.
- Kamoun M. & Ramet J.P., 1988, Fabrications expérimentales de fromages à pâtes pressées à partir de lait de dromadaire. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*.
- Karam N-E. & Karam H., 1994, Isolement et caractérisation de bactéries lactiques de laits crus d'Algérie. In: Alimentation, génétique et santé de l'enfant, Eds J.F. Desjeux et M. Touhami, L'Harmattan. 257-264.
- Kerstens K. & Pot B., 1991, Classification and identification methods for lactic acid bacteria with emphasis on protein gel electrophoresis. In: Les bactéries lactiques, Actes du colloque LACTIC 91, Adria Normandie, Caen. 33-40.
- Knoess K.H., Makhudum A.J., Rafiq M. & Hafeez M., 1986, Potentiel laitier de la chamelle. *Revue mondiale de zootechnie*, 57, 11-21.
- Laemmli U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 5259, 680-685.
- Ramet J.P., 1985, Study of enzymatic coagulation of camel milk. Report W/R 5322. Saudi Arabia, F.A.O., Roma, Italy.
- Ramet J.P., 1987a, Use of bovine calf rennet to coagulate raw camel milk. *World Animal Review*, 61, 11-16.
- Ramet J.P., 1987b, Production de fromages à partir de lait de chamelle en Tunisie. Rapport F.A.O. Rome, Italie.
- Terzaghi B.E. & Sandine W.E., 1975, Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29, 807-813.
- Wilson R.T., 1984, The camel. Ed. Longman, London. London and New York.
- Yagil R., 1982, Camels and camel milk. F.A.O. Animal Production and Health Papers, 26, F.A.O., Roma, Italy.
- Yagil R. & Etzion Z., 1980, The effect of draught conditions on the quality of camel milk. *Journal of Dairy. Research*, 47, 147-166.
- Yagil R., Saran A. & Etzion Z., 1984, Camels milk: for drinking only? *Comparative Biochemistry and Physiology*, 78, 2, 263-266.

Halima Zadi Karam, Algérienne, Docteur-Ingénieur en Microbiologie, Titulaire d'un Doctorat d'Etat en Microbiologie, Enseignante au Département de Biotechnologie de l'Université d'Oran-Sénia, Maître de Conférence.

N-E. Karam, Algérien, Titulaire d'un Doctorat de 3^{ème} cycle de Microbiologie et d'un Doctorat d'Etat en Biologie moléculaire et Génétique. Professeur de Biologie moléculaire au Département de Biotechnologie de l'Université d'Oran Sénia, Directeur du Laboratoire de Biologie des microorganismes et Biotechnologie de l'Université d'Oran-Sénia.