

Flore lactique et entérocoques du lait caillé (Pindidam) produit dans l'Adamaoua (Cameroun)

C Jiwoua¹, JB Millière^{2*}

¹ ENSIAAC, BP 455, Ngaoundere, Cameroun;

² ENSAIA-INPL, 2, avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

(reçu le 8 juin 1990; accepté le 10 septembre 1990)

Résumé — Dans le centre-nord du Cameroun, un lait caillé traditionnel est produit de façon empirique par les éleveurs de zébu. Sur 30 échantillons, la flore bactérienne cultivée sur milieux MRS et Elliker à 30°C, présente des niveaux élevés : 26 laits contiennent plus de 1×10^6 ufc/ml, dont respectivement 10 et 6 ont des populations supérieures à 1×10^7 et 1×10^8 ufc/ml. Les 426 isolats sont identifiés à 210 *Lactobacillus*, dont 60 possèdent des caractères phénotypiques les assimilant à *L. delbrueckii*, 21 *L. helveticus*, 78 *L. fermentum*, 47 *L. plantarum* et 4 *L. casei*, et à 216 *Streptococcaceae*, comprenant 128 *Enterococcus* (82 *E. faecalis* var *faecalis* et 46 *E. faecium*), 80 *Streptococcus salivarius* var *thermophilus* et 8 *Leuconostoc*. Les 60 *L. delbrueckii* sont classés dans la sous-espèce *bulgaricus*, mais tous fermentent le mannose, le maltose et le tréhalose et 9 fermentent le galactose. Parmi les espèces présentes, *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* possèdent un intérêt en technologie des laits fermentés. La qualité hygiénique n'est pas satisfaisante, en raison d'une contamination massive par les entérocoques et par des levures; de plus, associés à *L. fermentum* et à *L. plantarum*, ces micro-organismes modifient défavorablement la composition physico-chimique du caillé, sa texture et ses qualités organoleptiques.

lait fermenté camerounais / flore lactique / entérocoque

Summary — Lactic flora and enterococci of fermented milk (Pindidam) produced in Adamaoua (Cameroon). In the Northern area of the Cameroon, a traditional fermented raw milk is produced by the zebu farmers. From 30 samples, the levels of bacterial flora growing in MRS and Elliker media at 30°C were high; 26 samples contained more than 1×10^6 cfu/ml, with 10 and 6 having more than 1×10^7 and 1×10^8 cfu/ml, respectively. Four hundred and twenty-six isolates were identified: 210 *Lactobacillus* — 60 *L. delbrueckii*, 21 *L. helveticus*, 78 *L. fermentum*, 47 *L. plantarum*, 4 *L. casei* and 216 belonged to *Streptococcaceae*: 128 classified in the genus *Enterococcus*, with 82 *E. faecalis* var *faecalis* and 46 *E. faecium*, and 88 were lactic species, 80 *S. salivarius* var *thermophilus* and 8 *Leuconostoc*. The 60 *L. delbrueckii* were classified in the subspecies *bulgaricus*, but all fermented mannose, maltose and trehalose, and 9 galactose. As regards selection of starter bacteria for dairy manufacture, only *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* and *L. casei* are of industrial interest. In addition to the two species of yogurt, present at high levels, this fermented milk was greatly contaminated by *Enterococcus* and by yeasts, which combined with *L. fermentum* and *L. plantarum*, greatly modified the hygienic, textural and organoleptic qualities.

Cameroon fermented milk / lactic flora / enterococcus

* Correspondance et tirés à part

INTRODUCTION

Au Centre Nord du Cameroun, dans la province de l'Adamaoua, les éleveurs possèdent un cheptel numériquement important de zébus, destinés à la boucherie. Le volume de la collecte de lait est difficile à chiffrer en raison de la méconnaissance des litrages produits et d'une auto-consommation immédiate. Une fraction variable, relativement faible, est vendue, après fermentation, par les femmes sur les marchés locaux. Ce lait caillé, ou Pindidam en langue fofoulédé, est obtenu à température ambiante, par une acidification spontanée résultant de la prolifération de la flore banale de contamination. Peu de données bibliographiques sont relatives à des fabrications similaires, réalisées en climat tropical à partir de lait cru, sans précaution élémentaire d'hygiène. A notre connaissance, seul le lben a fait l'objet d'études de caractérisations microbiologiques et physico-chimiques, en vue de sa fabrication au stade industriel, dans les pays du Maghreb et au Moyen-Orient (Harrati, 1974; Baroudi et Collins, 1976; Abo-Elnaga *et al*, 1982; Tantaoui-Elaraki *et al*, 1983; Benkerroum *et al*, 1984).

Le but de cette étude est de caractériser ce lait caillé, sur le plan bactériologique, par la détermination de la fréquence et des niveaux de population en bactéries lactiques et en entérocoques, intervenant de façon plus ou moins favorable sur les qualités hygiénique, nutritionnelle et organoleptique. Leur identification jusqu'à l'espèce est fondée sur des caractères phénotypiques.

Parmi les bactéries lactiques, l'obtention de souches sauvages, spécifiques à cet écosystème naturel, doit permettre de comparer leur physiologie à celle de souches de collection et de sélectionner les isolats possédant des propriétés technologiques intéressantes, afin de proposer

un levain lactique, pour la fabrication d'un lait fermenté hygiénique, exempt de micro-organismes indésirables.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Échantillons

Trente échantillons de lait caillé ont été collectés au cours du mois de juin 1988 sur le marché de Ngaoundéré et auprès de vendeurs ambulants. Les prélèvements, d'un volume de 200 ml, ont été effectués aseptiquement dans des erlenmeyers stériles et stockés à + 4°C pendant leur acheminement par avion au Laboratoire de microbiologie alimentaire de l'ENSAIA-INPL, à Nancy. Les analyses microbiologiques ont été réalisées entre 72 et 96 h après la collecte des échantillons.

Acidité et composition glucidique

L'acidité du lait a été mesurée avec un pH-mètre Tacussel T 500/N1 et avec un acidimètre Dornic (NaOH N/9). La détermination des concentrations en acide lactique et en lactose, glucose et galactose a été réalisée par HPLC (pompe Waters 501, réfractomètre différentiel Waters R 401, imprimante Waters 745, Millipore) avec des colonnes Fam Pak et Sugar Pak 1 (Millipore).

La précipitation des protéines du lait et des cellules était obtenue par addition de 4 volumes d'éthanol absolu (99,85%) à 1 volume d'échantillon (Vidal-Valverde *et al*, 1984). Après agitation et repos pendant 16 h à 4°C, la centrifugation à 12 000 g pendant 15 min à 4°C permettait de récolter le surnageant, filtré sur filtres Millipore de 0,22 µm.

Dénombrement des flores microbiennes

La technique de dénombrement retenue avait pour but de mettre en évidence la flore lactique présente, même en faible proportion, en favorisant, pour chaque dilution, la croissance des différentes espèces dans des bouillons appropriés.

Les dénombrements étaient réalisés en milieux liquides selon la méthode des dilutions décimales, jusqu'à 1×10^{-8} , en utilisant la Tryptone-sel (Merck 15421), comme diluant. Ces bouillons sont adaptés à la culture des bactéries lactiques : bouillon MRS de de Man, Rogosa et Sharpe (1960) (Difco 0881-01-3), pour la croissance préférentielle des lactobacilles, et bouillon d'Elliker *et al* (1956) (Difco 0974-01-1), pour mettre davantage en évidence les streptocoques. La présence d'une croissance, après incubation à 30°C pendant 72 h permet d'estimer, à une puissance de 10 près, la charge microbienne du lait caillé, car cette méthode est fondée sur l'acceptation qu'une seule cellule peut être à l'origine du trouble observé. L'examen microscopique de chaque culture était réalisé par coloration de Gram.

Isolement et conservation des souches

Les isollements en stries étaient réalisés, pour les cultures en bouillon MRS, sur milieu MRS gélosé à 1,5% d'agar, tandis que ceux en bouillon d'Elliker étaient effectués sur gélose à l'acide nalidixique, afin d'éviter la prolifération des levures (composition en g/l : peptone, 10; NaCl, 5; extrait de viande, 2; extrait de levure, 5; chlorhydrate de cystéine, 0,3; glucose, 2; acide nalidixique, 0,04; agar, 15; pH 7,4-7,5). L'incubation était conduite à 30°C, en atmosphère à 10% de CO₂ dans une étuve (Forma Scientific 3157). Pour chaque échantillon de lait caillé, l'observation des colonies était réalisée simultanément pour toutes les dilutions. Les colonies, présentant des morphologies et des pigmentations différentes, étaient prélevées et repiquées, selon leur provenance, soit en bouillon MRS, soit en bouillon Elliker. La pureté de la culture était contrôlée par coloration de Gram et isolement en stries sur les 2 milieux gélosés, précédemment mentionnés. Une colonie était alors repiquée en bouillon MRS ou Elliker. Les cultures pures étaient stockées à + 4°C ou à - 25°C

Identification

En vue de l'identification de la flore lactique, seuls ont été retenus les isolats à Gram-positif, en forme de bâtonnets ou de coques, dépourvus de catalase et de cytochrome-oxydase.

Les bâtonnets non sporulés, appartenant au genre *Lactobacillus* ont été identifiés jusqu'à l'espèce à l'aide des propositions énoncées par Sharpe (1962), Dutta et Devriese (1981), Kandler et Weiss (1986) et Lee *et al* (1986). Les tests physiologiques et biochimiques retenus étaient : croissance à 15°C et à 45°C en bouillon MRS; production de CO₂ à partir du glucose, observée par la méthode de Gibson et Abd-el-Malek (1945) et par culture en bouillon MRS, contenant une cloche de Durham; fermentation des hydrates de carbone (Merck), arabinose, cellobiose, galactose, gluconate, lactose, maltose, mannitol, mannose, mélibiose, raffinose, ribose, saccharose, sorbitol : les solutions d'hydrates de carbone, à une concentration de 10% (p/v), stérilisées sur filtre Millipore, diamètre 0,22 µm, étaient ajoutées pour une concentration finale de 0,5% au milieu de base (composition en g/l : trypticase, 15; extrait de levure, 5; agar, 1; Tween 80, 1; rouge de chlorophénol, 0,04; pH 6,4); hydrolyse de l'esculine (0,2%) observée en bouillon MRS dépourvu de chlorhydrate de cystéine et de glucose, mais additionné de citrate de fer ammoniacal (0,1 g/l); recherche d'une arginine dihydrolase (ADH) par la technique de Möller (1955), en utilisant le milieu de base (Bio-Mérieux 69260) additionné de 1% (p/v) de L-chlorure d'arginine (Merck); détermination enzymatique du type d'isomère de l'acide lactique, L (+) (kit 139084); Boehringer-Mannheim) ou D(-), avec la D(-) lactate deshydrogénase (106941).

Dans la famille des *Streptococcaceae*, la distinction entre les différents genres reposait sur les tests suivants : croissance à 45°C en bouillon d'Elliker; production de CO₂ à partir du glucose en bouillon MRS avec cloche de Durham; halotolérance en présence de 6,5% de NaCl (composition en g/l : tryptone, 20; extrait de levure, 5; gélatine, 2,5; NaCl, 65; acétate de sodium, 15; acide ascorbique, 0,5); recherche d'une arginine dihydrolase (ADH) par la technique de Möller.

L'identification jusqu'à l'espèce était fondée sur la fermentation des hydrates de carbone (arabinose, lactose, mannitol, raffinose, ribose, saccharose, sorbitol, tréhalose), ajoutés pour une concentration finale de 0,5% au milieu de base (composition en g/l : extrait de viande, 1; protéose-peptone n° 3, 10; NaCl, 5; agar, 1; rouge de phénol, 0,018); hydrolyse de l'esculine (0,2%); hydrolyse de la gélatine par la méthode du disque de Kohn (disque de gélatine au char-

bon; Bio-Mérieux 55611), milieu de base (composition en g/l : extrait de viande, 3; peptone Evans, 20; glucose, 2; Na₂HPO₄, 12H₂O, 1), réparti à raison de 10 ml; production de polysaccharides (dextrane) dans un milieu saccharosé à 5% (composition en g/l : agar, 15; tryptone, 15; extrait de levure, 5; K₂HPO₄, 5; citrate d'ammonium, 5; saccharose, 50); recherche de réactions d'acidification et de réduction en lait tournesolé (composition en g/l : lait écrémé (Difco 0032-01), 100; teinture de tournesol (Ral D 113), 10).

RÉSULTATS

Acidité et composition glucidique

Les 30 échantillons de laits caillés présentent des niveaux de fermentation élevés : l'acidité Dornic (acidité titrable) est comprise entre 103 et 202° et le pH varie entre 3,55 et 3,94 (tableau I); la corrélation entre ces deux paramètres est faible ($r = 0,41$). La valeur de r entre l'acide lactique produit (g/l) et l'acidité Dornic est seulement de 0,18; elle est respectivement de 0,64 ou quasi nulle (0,07), entre d'une part la quantité de lactose fermenté et d'autre part l'acidité Dornic ou l'acide lactique, dosé par HPLC. La proportion de lactose hydrolysé est très variable selon les échantillons et représente entre 38 et 90% de la teneur initiale dans le lait à l'origine (50 g/l en moyenne). Le glucose n'est pas détecté et le galactose n'est mis en évidence que dans 3 échantillons, sans relation avec le degré d'acidification. Le rapport acide lactique produit/lactose fermenté est variable, de 1,00 à 3,33, et traduit une grande hétérogénéité dans les niveaux de fermentation, due à la composition de la microflore de contamination.

Dénombrement et identification des flores bactériennes

Le dénombrement des flores microbiennes cultivées en bouillons MRS et Elliker est élevé. Vingt-six laits caillés ont une population supérieure à 1×10^6 ufc/ml, avec respectivement 10 et 6 échantillons contenant plus de 1×10^7 et 1×10^8 ufc/ml. Les niveaux de population en *Lactobacillaceae* et en *Streptococcaceae* sont rapportés dans le tableau II.

Dans le genre *Lactobacillus*, 210 isolats sont prélevés; les 78 lactobacilles hétérofermentaires, cultivées à 45°C et possédant une ADH, sont identifiés à *L. fermentum* (tableau III). Leurs profils glucidiques diffèrent par des réponses variables aux tests de la fermentation de l'arabinose, du mélibiose, du raffinose, du saccharose et du cellobiose, mais correspondent à celui de la souche type ATCC 9338.

Les 132 lactobacilles homofermentaires sont identifiés par ordre décroissant à 60 *L. delbrueckii*, 21 *L. helveticus*, 47 *L. plantarum* et à 4 *L. casei*. Les 60 isolats regroupés dans l'espèce *L. delbrueckii* se différencient de *L. delbrueckii* var *bulgaricus* par la possibilité de fermenter le mannose, le maltose et le tréhalose. Tous élaborent de l'acide lactique D(-) et les cellules âgées en culture sur lait possèdent des granulations métachromatiques (grains de volutine). Le profil glucidique des 47 *L. plantarum* est identique à celui de la souche de référence ATCC 14917. Les 4 *L. casei*, décelés dans un seul échantillon, sont identifiés à la sous-espèce *pseudoplantarum*, capable de fermenter le gluconate, le lactose et le saccharose.

Les Lactobacilles sont présents dans tous les échantillons. Les espèces homo-

Tableau I. Acidité et composition glucidique des 30 échantillons de lait caillé de zébu. * Dosage sur colonne Fam Pak. ** Dosage sur colonne Sugar Pak.
*Acidity and glucidic composition of 30 zebus'curd milk samples. * Determination with Fam Pack column. ** Determination with Sugar Pack column.*

Code échantillon	Acidité pH	Acidité ° Dornic	Ac lactique HPLC*(g/l)	Lac résiduel HPLC** (g/l)	Lac résiduel %	Gal excrété HPLC** (g/l)	Ac lac/Lac ferm mole/mole
1	3,8	122,0	17,3	20,1	40,1		2,3
2	4,0	118,0	15,5	29,8	59,6		3,07
3	4,0	127,0	14,0	20,3	40,5	8,2	1,88
4	3,8	128,0	11,0	15,1	30,2	2,8	1,26
5	4,0	116,0	12,2	17,4	34,7		1,5
6	3,8	117,0	12,2	21,2	42,3		1,7
7	3,8	125,0	13,2	23,0	46,0		1,96
8	3,7	122,0	11,5	17,1	34,2		1,4
9	3,8	120,0	8,8	20,3	40,6		1,18
10	3,8	111,0	14,8	22,7	45,4		2,16
11	3,7	119,0	13,0	17,4	39,7		1,59
12	3,7	123,0	9,8	21,5	43,0	2,7	1,37
13	3,9	118,0	8,8	24,9	50,0		1,4
14	3,7	117,0	12,0	17,8	35,6		1,49
15	3,8	125,0	12,3	20,9	41,8		1,68
16	3,8	103,0	12,8	18,2	36,4		1,6
17	3,8	113,0	15,3	20,1	40,2		2,04
18	3,7	111,0	9,5	21,1	42,1		1,31
19	3,7	121,0	10,3	18,1	36,1		1,28
20	3,8	103,0	12,3	20,0	40,0		1,63
21	3,9	118,0	15,8	31,1	62,2		3,33
22	3,7	116,0	10,0	19,8	39,6		1,32
23	3,7	148,0	10,8	20,8	41,5		1,48
24	3,6	165,0	14,5	11,3	22,6		1,5
25	3,8	138,0	12,5	22,8	45,6	10,0	1,84
26	3,8	142,0	15,8	19,3	38,6		2,05
27	3,6	138,0	13,8	11,3	22,6		1,42
28	3,6	193,0	9,5	12,2	24,4		1
29	3,9	141,0	12,5	20,3	20,7		1,69
30	3,7	202,0	18,0	5,0	10,0		1,6

Tableau II. Niveaux de population des espèces isolées de 30 échantillons de lait caillé. Les dénombrements sont réalisés en bouillons Elliker et MRS, après incubation à 30 °C. * Nombre de laits où il y a respectivement présence et dominance de chaque espèce.

Population levels of species isolated from 30 curd milk samples. Numerations were performed in Elliker and MRS broths, after incubation at 30 °C. * Number of milk samples where each species was respectively present or dominant.

	Niveaux de population (log ufc/ml)								Nb laits Prés/Domin*	Nb isolats		
	0<N<11	11<N<22	22<N<33	33<N<44	44<N<55	55<N<66	66<N<77	77<N<88		88<N<9		
<i>Lactobacillaceae</i>											210	
<i>L delbrueckii</i>	1		3	7	3	4	1		1	20	5	60
<i>L helveticus</i>	1			2	2	2	1			8	4	21
<i>L fermentum</i>	3	4	1	5	4	5	1			23	0	78
<i>L plantarum</i>		4	4		3		2			13	2	47
<i>L casei</i>		1								1	0	4
<i>Streptococcaceae</i>											216	
<i>E faecalis</i>			2	3	2	1	5	2	3	18	9	82
<i>E faecium</i>	2	4	4	1	4	2	2	1		20	3	46
<i>S thermophilus</i>					1		2	9	4	16	15	80
<i>L m dextranicum</i>		2								2	0	2
<i>L paramesenter</i>	1	1		1	2					5	0	6

fermentaires *L delbrueckii*, *L helveticus* et *L plantarum* représentent la flore dominante de 5, 4 et 2 échantillons et sont identifiées dans respectivement 20, 8 et 13 laits caillés (tableau II). Malgré des niveaux de populations jusqu'à 1×10^7 ufc/ml, *L fermentum*, mis en évidence dans 23 laits, ne domine cependant jamais. La répartition du genre *Lactobacillus* indique que 4 laits caillés ne contiennent qu'une seule espèce, 3 avec *L fermentum* et 1 avec *L delbrueckii* (tableau IV). Dans 13 échantillons, deux espèces coexistent, soit *L fermentum* et *L delbrueckii* (7 échantillons), soit *L delbrueckii* et *L plantarum* (2), soit *L fermentum* et *L plantarum* (3), soit *L helveticus* et *L fermentum* (1 prélèvement). Six laits caillés contiennent trois espèces et un, quatre espèces.

Dans la famille des *Streptococcaceae*, 216 isolats sont retenus; 157 sont prélevés à partir des cultures en bouillon d'Elliker et 59 proviennent des cultures en bouillon MRS.

Cent vingt huit isolats sont classés dans le groupe des streptocoques dits fécaux (groupe D de Lancefield); tous sont cultivés à 45°C, en présence de 6,5% NaCl et possèdent une ADH. Ils sont identifiés à 82 *Enterococcus faecalis* var *faecalis* et à 46 *E faecium* (tableau V). Ces espèces sont isolées dans respectivement 18 et 20 échantillons et elles constituent la flore dominante de 9 et 3 laits caillés.

Cette flore de contamination est mise en évidence dans 25 échantillons. Sa répartition indique que 12 laits contiennent une seule espèce (5 avec *E faecalis* var *faecalis* et 7 avec *E faecium*) et 13 ces deux espèces (tableau VI).

Quatre vingt-huit *Streptococcaceae* sont identifiées à 80 *Streptococcus salivarius* var *thermophilus*, prélevés uniquement du milieu d'Elliker, à 2 *Leuconostoc mesenteroides* var *dextranicum* et à 6 *Leuconostoc paramesenteroides*. *S salivarius* var *thermophilus*, présent dans 16 échantillons avec des populations comprises entre $1 \times$

Tableau III. Caractères physiologiques et biochimiques des 210 *Lactobacillus* isolés des 30 échantillons de lait caillé. * Nombre d'isolats.

*Physiological and biochemical characteristics of 210 Lactobacillus isolated from 30 curd milk samples. * Number of isolates.*

Espèces bactériennes	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. fermentum</i>
Nombre d'isolats	60*	21	47	4	78
<u>Origine des isolats</u>					
30°C ELLIKER	20	13	13	0	15
M.R.S.	40	8	34	4	63
<u>Caractères physiologiques</u>					
Croissance à 15 °C	0	0	47	4	0
Croissance à 45 °C	60	21	0	0	78
Hétérofermentation	0	0	0	0	78
Arginine dihydrolase	0	0	0	0	78
Hydrolyse de l'esculine	0	0	47	4	0
Production d'acide					
- Arabinose	0	0	47	0	14
- Cellobiose	0	0	47	4	0
- Galactose	9	21	47	4	78
- Gluconate	0	0	47	4	78
- Lactose	60	21	47	4	78
- Maltose	60	21	47	4	78
- Mannitol	0	0	47	4	0
- Mannose	60	21	47	4	78
- Melibiose	0	0	47	0	65
- Raffinose	0	0	47	0	61
- Ribose	0	0	47	4	78
- Saccharose	0	0	47	4	67
- Sorbitol	0	0	47	4	0
- Acide lactique	D(-)	DL	DL	DL	DL

10^4 et 1×10^9 ufc/ml, est la flore dominante de 15 laits caillés. Le genre *Leuconostoc* est mis en évidence dans 7 laits : deux échantillons sont contaminés par *L. mesenteroides* var *dextranicum* et cinq par *L. paramesenteroides*, mais à de faibles niveaux de population.

DISCUSSION

Par les aspects sociaux et culturels liés à sa consommation, le lait caillé de zébu

(Pindidam) est un aliment traditionnel des éleveurs nomades. La fabrication empirique reste au stade familial. Sa fermentation non dirigée réalise un écosystème microbien où se multiplient de façon simultanée et/ou successive diverses flores, en fonction de l'évolution physico-chimique du produit. L'abaissement du pH conduit à l'élimination de certains groupes micro-biens et à la dominance d'espèces mieux adaptées. L'hétérogénéité dans la composition de la microflore résulte de la compétition entre les espèces présentes

Tableau IV. Niveaux de population et identification des lactobacilles des 30 échantillons de lait caillé. **a:** Dénombrement bactérien exprimé en \log_{10} N. Cette valeur est obtenue par la méthode des dilutions décimales, après ensemencement des bouillons MRS et Elliker et incubation à 30°C pendant 72 h. **b:** Nombre total de colonies, de chaque espèce, isolées du milieu MRS gélosé et de la gélose à l'acide nalidixique, à diverses dilutions (*cf. Matériels et méthodes*). **c:** Le dénombrement bactérien souligné indique que l'espèce considérée domine dans la flore bactérienne analysée (flore lactique et entérocoques). **d:** Nombre d'isolats provenant des bouillons de dénombrement Elliker ou MRS.

Population levels and identification of Lactobacilli from 30 curd milk samples. a) Bacteria numeration expressed as \log_{10} N. That value was obtained by the decimal dilution method, after incubation of MRS and Elliker broths at 30°C for 72 h. b) Total number of colonies of each species isolated from MRS agar and nalidixic acid agar, at several dilutions (see Materials and Methods). c) The underlined bacteria numeration shows that the retained species was dominant in the analyzed bacterial flora (lactic flora and enterococci). d) Number of isolates from Elliker or MRS broths.

Code échantillon	Lactobacillus				Nombre d'isolats	
	L delbrueckii	L helveticus	L fermentum	L plantarum		L casei
1					0	
2			5<N<6 (4)		4	
3			5<N<6 (3)		3	
4	(a)0<N<1	(b)(3)	0<N<1 (1)		4	
5			4<N<5 (2)		2	
6	(c)5<N<6	(5)	4<N<5 (2)		7	
7			2<N<3 (1)		1	
8		0<N<1 (2)	1<N<2 (2)		4	
9	3<N<4 (5)			2<N<3 (1)	6	
10	3<N<4 (5)				5	
11	3<N<4 (6)		3<N<4 (5)		11	
12	3<N<4 (3)		1<N<2 (3)		6	
13	<u>8<N<9</u> (3)		3<N<4 (3)		6	
14	5<N<6 (4)	5<N<6 (1)	0<N<1 (2)		7	
15	4<N<5 (6)		3<N<4 (4)		10	
16	3<N<4 (3)		6<N<7 (9)	1<N<2 (1)	13	
17	2<N<3 (2)		5<N<6 (8)	1<N<2 (1)	11	
18	5<N<6 (2)		4<N<5 (9)		15	
19	2<N<3 (1)		4<N<5 (5)	1<N<2 (1)	7	
20	3<N<4 (2)			2<N<3 (1)	3	
21			5<N<6 (2)	<u>6<N<7</u> (7)	9	
22	2<N<3 (2)		3<N<4 (2)		4	
23			3<N<4 (5)	2<N<3 (1)	6	
24	<u>4<N<5</u> (2)	<u>4<N<5</u> (2)	1<N<2 (1)		5	
25	3<N<4 (1)	3<N<4 (2)	5<N<6 (3)	4<N<5 (2)	8	
26	<u>6<N<7</u> (1)	<u>6<N<7</u> (7)		4<N<5 (4)	12	
27	<u>4<N<5</u> (1)	<u>4<N<5</u> (5)		1<N<2 (2)	8	
28			0<N<1 (1)	<u>6<N<7</u> (16)	17	
29	5<N<6 (3)	5<N<6 (1)		4<N<5 (4)	8	
30		3<N<4 (1)	1<N<2 (1)	2<N<3 (6)	8	
Nombre d'isolats	60	21	78	47	4	210
(d)Elliker	24	9	15	13	0	61
(d)MRS	36	12	63	34	4	149

(phénomènes d'antagonisme et de proto-coopération), de divers paramètres technologiques, tels que température, âge du lait, acidité, potentiel rédox, agitation.

La présence du genre *Lactobacillus* n'est pas surprenante, car il possède un avantage compétitif vis-à-vis des autres flores microbiennes par sa croissance

Tableau V. Caractères physiologiques et biochimiques des 216 *Streptococcaceae* (128 *Streptococcus* fécaux, 80 *Streptococcus* lactiques et 8 *Leuconostoc*), isolés de 30 échantillons de lait caillé de zébu. * Nombre d'isolats. ND : Non déterminé. Ac : Acidification-coagulation.

*Physiological and biochemical characteristics of 216 Streptococcaceae (128 fecal Streptococci, 80 Lactococci and 8 Leuconostoc) isolated from 30 zebus'curd milk samples. * Number of isolates. ND : Not tested. Ac : Acidification-coagulation.*

Espèces bactériennes	<i>E faecalis</i> <i>var faecalis</i>	<i>E faecium</i>	<i>S salivarius</i> <i>thermophilus</i>	<i>L mesente-</i> <i>roides</i> var <i>dextranicum</i>	<i>L parame-</i> <i>senteroides</i>
Nombre d'isolats	(82)	(46)	(80)	(2)	(6)
<u>Origine des isolats</u>					
30°C ELLIKER	44	31	80	0	6
MRS	38	15	0	2	0
<u>Caractères physiologiques</u>					
Croissance à 45°C	82	46	80	0	0
Hétérofermentation	0	0	0	2	6
Arginine dihydrolase	82	46	0	0	0
Halotolérance 6,5%NaCl	82	46	0	0	0
Hydrolyse de l'esculine	82	46	0	0	6
Production d'acide					
-Arabinose	0	0	ND*	ND	0
-Lactose	82	46	80	2	6
-Mannitol	82	6	ND	ND	ND
-Raffinose	ND	ND	0	2	0
-Ribose	ND	ND	0	0	6
-Saccharose	ND	ND	80	2	6
-Sorbitol	82	0	ND	ND	ND
-Tréhalose	ND	ND	ND	0	6
Hydrolyse gélatine	0	0	ND	ND	ND
Lait tournesolé	ND	ND	Ac**	ND	ND
Formation dextrane	ND	ND	ND	2	0

dans une gamme étendue de températures, par sa capacité à résister à des pH bas (pH 3,5-4,0) et par son métabolisme glucidique actif sur de nombreux hydrates de carbone. Les lactobacilles sont communément isolés d'un grand nombre d'habitats, notamment de végétaux, de boissons fermentées, de produits alimentaires tels que le lait (Axelsson et Lindgren, 1987). Ils sont des hôtes communs du tractus intestinal des ruminants et les bouses sont une

source importante de contamination du lait (Marounek *et al*, 1988).

Nos 60 *L delbrueckii* ne peuvent être identifiés parfaitement; ils correspondraient à *L delbrueckii* var *bulgaricus*, mais possèdent en plus la capacité de fermenter le tréhalose et le maltose; contrairement à *L delbrueckii* var *lactis*, ils donnent des réponses négatives avec le saccharose et la salicine. A l'inverse des travaux de Kandler et Weiss (1986), la fermentation du man-

Tableau VI. Niveaux de population et identification des espèces de la famille des *Streptococcaceae* des 30 échantillons de lait caillé. **a:** Dénombrement bactérien exprimé en $\log_{10}N$. Cette valeur est obtenue par la méthode des dilutions décimales, après ensemencement des bouillons MRS et Elliker et incubation à 30°C pendant 72 h. **b:** Nombre total de colonies, de chaque espèce, isolées du milieu MRS gélosé et de la gélose à l'acide nalidixique, à diverses dilutions (cf *Matériels et Méthodes*). **c:** Le dénombrement bactérien souligné indique que l'espèce considérée domine dans la flore bactérienne analysée (flore lactique et entérocoques). **d:** Nombre d'isolats provenant des bouillons de dénombrement Elliker ou MRS.

Population levels and identification of species belonging to the Streptococcaceae family, isolated from 30 curd milk samples. a) Bacteria numeration expressed as $\log_{10}N$. That value was obtained by the decimal dilution method, after incubation of MRS and Elliker broths at 30°C for 72 h. b) Total number of colonies of each species isolated from MRS agar and nalidixic acid agar, at several dilutions (see Materials and Methods). c) The underlined bacteria numeration shows that the retained species was dominant in the analyzed bacteria flora (lactic flora and enterococci). d) Number of isolates from Elliker or MRS broths.

Code échantillon	Streptococcus		S thermophilus	Leuconostoc		Nombre d'isolats
	S faecalis var faecalis	S faecium		L paramesenteroides	L mesenter var dextranicum	
1	(a,c) <u>7<N<8</u>	(b) (4) <u>7<N<8</u>	(1) <u>7<N<8</u>	(1)		6
2	<u>6<N<7</u>	(5)				5
3	<u>6<N<7</u>	(10)	4<N<5 (1)		3<N<4 (2)	13
4	4<N<5 (1)	2<N<3 (1)	<u>8<N<9</u>	(3)	4<N<5 (1)	6
5	<u>8<N<9</u>	(7)	2<N<3 (2)			9
6		0<N<1 (1)			1<N<2 (1)	2
7	4<N<5 (3)	4<N<5 (7)	<u>8<N<9</u>	(4)		14
8	<u>7<N<8</u>	(12)	1<N<2 (1)			13
9	<u>8<N<9</u>	(1)	1<N<2 (2)	<u>8<N<9</u>	(4)	8
10	5<N<6 (2)	0<N<1 (1)	<u>7<N<8</u>	(3)	1<N<2 (1)	6
11	<u>6<N<7</u>	(2)				2
12	2<N<3 (2)	<u>6<N<7</u>	(1)			3
13	6<N<7 (8)	4<N<5 (2)				10
14	<u>8<N<9</u>	(5)		<u>8<N<9</u>	(5)	11
15		1<N<2 (2)	<u>7<N<8</u>	(13)	1<N<2 (1)	15
16			<u>7<N<8</u>	(4)		4
17			<u>7<N<8</u>	(5)		5
18		5<N<6 (3)	<u>6<N<7</u>	(3)		6
19		1<N<2 (2)	<u>7<N<8</u>	(8)		10
20	3<N<4 (1)		<u>7<N<8</u>	(9)		10
21	<u>6<N<7</u>	(12)	4<N<5 (2)			14
22				<u>7<N<8</u>	(6)	6
23		2<N<3 (1)	<u>6<N<7</u>	(6)	0<N<1 (1)	8
24	2<N<3 (3)					3
25	3<N<4 (2)	<u>6<N<7</u>	(8)			10
26	3<N<4 (2)	3<N<4 (1)	4<N<5 (3)			6
27		2<N<3 (5)				5
28						0
29		5<N<6 (2)	<u>7<N<8</u>	(3)	4<N<5 (1)	6
30						0
Nombre d'isolats	82	46	80	6	2	216
(d) Elliker	44	31	80	2	0	157
(d) MRS	38	15	0	4	2	59

nose est toujours observée. Pour cette espèce, actuellement décrite comme incapable de fermenter le galactose (Turner et

Martley, 1983; Kandler et Weiss, 1986), 9 isolats possèdent cette activité, comme le mentionnait Rogosa (1974).

L'existence de souches atypiques de *L. bulgaricus* a été rapportée par Dellaglio et Torriani (1986). Celles-ci diffèrent notablement de la définition de l'espèce par l'absence de grains de volutine et par la production d'acide lactique DL, comme la souche 73 cit de Bosi *et al* (1986), mais leur profil biochimique ne correspond pas à *L. helveticus*.

La fréquence et les niveaux de population élevés en isolats sauvages de *L. delbrueckii* var *bulgaricus* et en *S. salivarius* var *thermophilus* pourraient rapprocher certains échantillons de lait caillé du yaourt. Cependant, ils en diffèrent notablement par la composition de la flore microbienne. La particularité de ce produit repose sur une proportion importante en lactobacilles d'origine végétale (*L. fermentum*, *L. plantarum*), associée à une contamination massive en entérocoques. Dans nos conditions expérimentales, les streptocoques lactiques (*Lactococcus*) ne sont pas mis en évidence. La présence de levures est toujours observée lors des examens microscopiques des bouillons de dénombrement.

Pour certains laits caillés, la proportion de la flore lactique reste relativement faible (inférieure à 10^5 ufc/ml) et ne permet pas à elle seule la coagulation du lait. Elle ne constitue qu'une fraction plus ou moins importante de la microflore de contamination.

La détermination de la qualité hygiénique de 28 laits caillés de zébu (Jiwoua *et al*, 1990), dont l'acidité moyenne est pH 3,5 et 164° Dornic, indique une flore aérobie mésophile toujours supérieure à 1×10^9 ufc/ml. Les taux de contamination en levures et en moisissures de 28 et 20 échantillons, sont compris entre 1×10^7 et 1×10^9 et entre 1×10^3 et 1×10^9 cellules par ml. Ce résultat est lié à leur caractère acidophile et à leur faible sensibilité aux bactéries lactiques antagonistes (Benkerroum *et al*, 1984).

Dans d'autres laits fermentés comme le lben, d'origine orientale, l'acidité est également importante, avec une valeur moyenne de pH de 4,4, pour 24 échantillons. Les niveaux de population en micro-organismes sont de 1×10^6 ufc/ml, en Egypte (Abd-el-Malek, 1978) ou supérieurs à 1×10^9 ufc/ml, au Maroc (Tantaoui-Elaraki *et al*, 1983) et en Algérie (Harrati, 1974). Les teneurs en streptocoques lactiques sont comprises entre $5,9 \times 10^5$ et $15,8 \times 10^8$ ufc/ml, alors que les lactobacilles sont en nombre très faible, dans le lait à l'origine. Dans les lbens libanais et irakiens, il y a toujours présence de *S. thermophilus* (Baroudi et Collins, 1976) associé ou non à *S. lactis* var *lactis* (Abo-Elnaga *et al*, 1982). Dans le lben marocain, la microflore lactique est représentée en majorité par *S. lactis* var *lactis*, *S. lactis* var *diacetyllactis*, *Leuconostoc lactis* et *L. cremoris* (Tantazoui-Elaraki *et al*, 1983). La présence de *S. lactis* var *cremoris* est mentionnée dans le lben algérien (Harrati, 1974).

Dans le lben marocain, pour 12 échantillons, les niveaux moyens en entérocoques sont de $1,35 \times 10^3$ ufc/ml et l'espèce *S. faecalis* var *liquefaciens* est la plus représentée (Benkerroum *et al*, 1984).

Les bactéries lactiques confèrent des qualités hygiéniques, nutritionnelles et organoleptiques aux produits fermentés : la présence de cette flore lactique et l'obtention d'un pH bas (3,5) réalisent une véritable barrière sanitaire vis-à-vis des germes responsables de toxi-infections. La fermentation lactique rend le lait caillé plus assimilable aux personnes intolérantes au lactose. De plus, l'acide lactique favoriserait la digestion et faciliterait l'implantation de bactéries probiotiques, dans la flore intestinale. Cependant la présence massive des entérocoques porte un jugement défavorable. Seules des conditions hygiéniques rigoureuses élimineraient cette flore,

dont le métabolisme fermentaire et la résistance à des conditions hostiles lui permettent de proliférer rapidement.

BIBLIOGRAPHIE

- Abd-el-Malek Y (1978) Traditional Egyptian dairy fermentation. In: *Global Impacts of Applied Microbiology* (WR Stantan, EJ Da Silva, eds) UNEP/UNESCO, Kuala-Lumpur, Malaysia, 198-208
- Abo-Elnaga LG, El Aswad M, Moqui M (1982) Some chemical and microbiological characteristics of Iben. *Milchwissenschaft* 32, 521-524
- Axelsson L, Lindgren S (1987) Characterization and DNA homology of *Lactobacillus* strains isolated from pig intestine. *J Appl Bacteriol* 62, 433-440
- Baroudi AC, Collins EB (1976) Microorganisms and characteristics of Iben. *J Dairy Sci* 59, 200-202
- Benkerroum N, Tantaoui-Elaraki A, El Marrakchi A (1984) Qualité hygiénique du Iben marocain. *Microbiol Aliments Nutr* 2, 199-206
- Bosi F, Morelli L, Bottazzi V (1986) Physiological and genetic characteristics of variant strains of *Lactobacillus delbrueckii* var *bulgaricus*. *Microbiol Aliments Nutr* 4, 287-292
- Dellaglio F, Torriani S (1986) DNA-DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria isolated from maize silage. *J Appl Bacteriol* 60, 83-92
- de Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 23, 130-135
- Dutta DN, Devriese LA (1981) Sensitivity and resistance to promoting agents in animal Lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 51, 283-288
- Elliker PR, Anderson AW, Hannesson G (1956) An agar culture medium for lactic acid Streptococci and Lactobacilli. *J Dairy Sci* 39, 1611-1612
- Gibson T, Abd-el-Malek Y (1945) The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a culture method of detecting the process. *J Dairy Res* 14, 35-44
- Harrati E (1974) Recherche sur le Iben et le kila marocain. Thèse, Caen, France
- Jiwoua C, Laurent G, Millière JB (1990) La qualité hygiénique du lait caillé produit dans l'Adamaoua (Cameroun). *Cam J Biol Biochem Sci* (in press)
- Kandler O, Weiss N (1986) Regular nonsporing gram-positive rods. Genus *Lactobacillus* (Beijerinck 1901,22). In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe, JG Holt, eds). Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1209-1234
- Lee BH, Hache S, Simard RE (1986) A rapid method for differentiation of dairy lactic acid bacteria by enzyme systems. *J Ind Microbiol* 1, 209-217
- Marounek M, Jehlickova K, Kmet V (1988) Metabolism and some characteristics of lactobacilli isolated from the rumen of young calves. *J Appl Bacteriol* 65, 43-47
- Rogosa M (1974) Genus 1. *Lactobacillus*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (RE Buchanan, NE Gibbons, eds) Williams and Wilkins Company, Baltimore, 576-593
- Sharpe ME (1962) Taxonomy of the Lactobacilli. *Dairy Sci Abstr* 24, 109-118
- Tantaoui-Elaraki A, Berrada M, El Marrakchi A, Berramou A (1983) Étude sur le Iben marocain. *Lait* 63, 230-245
- Turner KW, Martley FG (1983) Galactose fermentation and classification of thermophilic lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 45, 1932-1934
- Vidal-Valverde C, Martín-Villa C, Herranz J (1984) Determination of soluble carbohydrates in yogurts by High Performance Liquid Chromatography. *J Dairy Sci* 67, 759-763