

DESTRUCTION DE L'AFATOXINE M1 PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES DU LBEN MAROCAIN ET DU YAOURT (*)

M. KHADDOR ⁽¹⁾, **A. TANTAOUI-ELARAKI** ⁽²⁾,
A. BEHAJIBA ⁽¹⁾, **A. LAMARTI** ⁽³⁾, **M. EZZIYYANI** ⁽⁴⁾,
M.E. CANDELA CASTILLO ⁽⁴⁾, **A. BADO** ⁽⁵⁾

*Des bactéries lactiques du lben marocain (produit laitier de fermentation mésophile) et du yaourt (fermentation thermophile) ont été testées sur l'évolution de la teneur en aflatoxine M1 ajoutée artificiellement au lait à 5 µg/l. Les bactéries thermophiles n'entraînent qu'une faible élimination de l'aflatoxine M1 (19 % pour *Lactobacillus bulgaricus*, 10 % pour *Streptococcus thermophilus* et 8 % pour les deux souches combinées). Les bactéries mésophiles permettent une destruction de l'aflatoxine M1 totale pour *L. lactis* en culture pure ou combiné avec *Lactococcus diacetylactis*. Pour cette dernière souche, la destruction est importante (58 %), même si elle n'est pas totale.*

(*) *Manuscrit reçu le 7 avril 2003.*

(1) *Laboratoire de Microbiologie alimentaire, Département des Sciences naturelles, École Normale Supérieure, BP 229, 93150 Martil, Maroc.*

(2) *Sup'Agro (École Supérieure de l'Agro-alimentaire), 22, rue le Câtelet, Belvédère, 20300, Casablanca, Maroc. supagroschool@yahoo.fr*

(3) *Unité de Biotechnologie et d'Amélioration des plantes, Département de Biologie, Faculté des Sciences M'hannech II, BP 2121, 93002 Tétouan, Maroc. alamarti@fst.ac.ma*

(4) *Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Biología vegetal, Facultad de Biología, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia, Espagne.*

(5) *Laboratoire de Mycologie et Biotechnologie végétale – EA 3675, Faculté des Sciences pharmaceutiques, Université Victor-Segalen Bordeaux 2, 146, rue Léo-Sagnat, 33076 Bordeaux Cedex. jbtalenc@club-internet.fr*

INTRODUCTION

L'aflatoxine M1 est rencontrée dans le lait des vaches ayant ingéré des aliments contaminés par l'aflatoxine B1 [2,7,13]. La lactation n'est pas la principale voie d'excrétion de l'aflatoxine M1, mais elle est primordiale pour la contamination humaine du fait de la consommation quotidienne de lait.

Les effets des traitements technologiques (pasteurisation, stérilisation, écrémage, séchage) du lait contaminé naturellement ou artificiellement par l'aflatoxine M1 ont été étudiés, mais ne suppriment pas l'aflatoxine M1 [2,7,9,19]. De même, les traitements chimiques ne permettent pas son élimination et ne sont pas dénués de toxicité pour le consommateur [1].

L'aflatoxine M1 se retrouve dans les produits laitiers fermentés. Divers auteurs [2,7,9] ont montré que, lors de la formation des fromages, la fermentation lactique n'affecte pas la teneur initiale en aflatoxine M1. Cette toxine a une faible affinité pour la fraction lipidique [20] et une forte affinité pour la caséine du lait, ce qui favorise son passage dans le caillé plutôt que dans le lactosérum [4,13].

L'objectif de ce travail consiste à étudier l'effet des bactéries lactiques responsables des fermentations mésophiles (cas du lben, produit laitier fermenté très répandu au Maroc) et des fermentations thermophiles (cas du yaourt) sur l'aflatoxine M1 ajoutée artificiellement au lait.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches utilisées

Bactéries mésophiles

Lactococcus lactis subsp. *lactis* (*Lactococcus lactis*) et *L. lactis* subsp. *diacetylactis* (*Lactococcus diacetylactis*) font partie de la collection du Département de Microbiologie alimentaire et Biotechnologie de l'Institut agronomique et vétérinaire Hassan II (Rabat) et ont été isolés d'échantillons commerciaux de lben traditionnel.

Bactéries thermophiles

Streptococcus thermophilus et *Lactobacillus bulgaricus* ont été isolés à partir de yaourt nature Danone commercialisé à Tétouan.

L'identification de *Streptococcus thermophilus* est réalisée par le système Api 20 strep. Celle de *Lactobacillus bulgaricus* est surtout basée sur la fermentation des sucres.

Préparation du lait

Des Erlenmeyers de 250 ml sont préparés avec 100 ml de lait écrémé en poudre reconstitué à 10 % et stérilisé. Ils sont inoculés avec des volumes de levains purs ou combinés ajustés de manière à obtenir une densité bactérienne de 10^6 cellules/ml.

Contamination du lait

Le lait est contaminé en ajoutant une solution étalon d'aflatoxine M1 (2 µg/ml) de façon à avoir une concentration de 5 µg /l. Un Erlenmeyer n'est pas contaminé et sert de témoin.

Des solutions témoins nonensemencées par les bactéries lactiques et préparées dans les mêmes conditions sont aussi suivies.

Le lait ainsi préparé est incubé à 30°C s'il est inoculé par les bactéries mésophiles ou à 44°C s'il est inoculé par des bactéries thermophiles.

Afin de suivre l'évolution de la concentration en aflatoxine M1 au cours des différentes fermentations, des prélèvements sont réalisés à des intervalles de temps réguliers. La durée d'incubation dépend de l'acidité Dornic (quantité d'acide lactique en décigramme/l) terminale des échantillons, 70°D pour la fermentation mésophile et 90°D pour la fermentation thermophile.

Méthodes d'analyse de l'aflatoxine M1

La méthode comprend trois étapes : l'extraction et la purification, faites selon la méthode de Blanc [3] et le dosage, réalisé d'après la méthode de Fremy *et al.* [8].

Extraction

L'acidité Dornic des échantillons, pris à différents temps, est réajustée à 70°D pour la fermentation mésophile et à 90°D pour la fermentation thermophile (valeurs choisies dans les essais témoins). Ce réajustement évite l'action des différentes concentrations d'acide lactique enregistrées au cours de la fermentation sur l'extraction de l'aflatoxine M1 tel que soupçonné par Applebaum *et al.* [2]. 10 ml du lait contaminé artificiellement par 5 µg/l sont mis dans une ampoule à décanter de 250 ml. On ajoute 25 ml de méthanol et 12,5 ml de chloroforme. Le mélange est

agité énergiquement cinq minutes puis on rajoute 12,5 ml de chloroforme. On laisse décanter jusqu'à la séparation des deux phases. On récupère la phase inférieure chloroformique dans une deuxième ampoule à décanter. 10 ml d'une solution saturée de NaCl sont ajoutés pour éliminer les émulsions d'eau dans la phase chloroformique qui sera filtrée à travers un lit de sulfate de sodium anhydre. Le filtrat, récupéré dans un ballon rodé à fond rond, est concentré au rotavapeur jusqu'à 1 ml.

Préparation de la colonne

On remplit une colonne pour chromatographie (30 cm de long et 1,2 cm de diamètre) à moitié avec du chloroforme. On ajoute 2 g de Na_2SO_4 anhydre, et 5 g de gel de silice activé pendant 2 heures à 100°C (granulométrie de 0,05 à 0,2 mm). Après agitation, on retire le chloroforme pour tasser le gel puis on rince la colonne par 50 ml de chloroforme, 30 ml d'éther et 30 ml d'hexane. Une fois le gel de silice mis en place avec environ 3 ml de chloroforme surnageant, on ajoute 3 g de Na_2SO_4 anhydre et on rince la colonne avec du chloroforme. On l'élimine en laissant un surnageant de 1 cm au-dessus du niveau de Na_2SO_4 anhydre.

Purification

Le filtrat concentré est versé sur la colonne. On rince au chloroforme la paroi de la colonne et on laisse s'écouler la quantité ajoutée tout en réglant le débit d'écoulement entre 8 et 12 ml/minute. On élimine les lipides avec 75 ml d'hexane et 75 ml d'éther. Pour éluer l'aflatoxine M1, on verse 100 ml du mélange chloroforme-acétone (75/25 ; v/v). L'éluant est récupéré en totalité dans un ballon rodé et concentré à sec à 45°C au rotavapeur. Le résidu sec, repris dans 1 ml de chloroforme, est transvasé dans un tube à hémolyse après avoir été filtré (millipores de 0,22 μm de diamètre). L'extrait est laissé dans l'obscurité à température ambiante jusqu'à évaporation totale.

Dosage de l'aflatoxine M1 récupérée

L'extrait sec est repris par 1 ml du solvant eau-acétonitrile (75/25 ; v/v). Ce solvant représente la phase mobile dans le système CLHP. 20 μl d'extrait sont injectés et pompés à travers une colonne ODS.RP.18 à 1 ml/minute. L'aflatoxine M1 sort entre 5 et 10 minutes (ondes d'excitation 360 nm, ondes d'émission 410 nm). Au maximum de sensibilité du détecteur, le bruit de fond se traduit par une base irrégulière ne permettant pas l'utilisation d'un intégrateur. Les hauteurs des pics ont donc été mesurées et comparées avec celles d'une courbe étalon établie par injection de solutions standards d'aflatoxine M1 de concentrations décroissantes. Chaque résultat est la moyenne de trois essais.

Fiabilité de la méthode d'analyse de l'aflatoxine M1

Le rendement est déterminé à partir de lait contaminé artificiellement par 5, 1 et 0,25 $\mu\text{g/l}$ d'aflatoxine M1. Ces doses correspondent aux niveaux de contamination artificielle du lait utilisés par un certain nombre d'auteurs [7,10,15] et des normes de tolérance établies en Europe (arrêté de 1976 modifié en Juillet 1998 EC N°1525/98) indiquant que la teneur maximale admise est de l'ordre de 5 ppb (partie par billion ou 10^{-9} g/l) d'aflatoxine M1 dans le lait, 0,5 ppb dans le fromage et 0,01 ppb dans le lait deshydraté.

Rendement R = quantité d'aflatoxine M1 récupérée x 100 / quantité d'aflatoxine M1 initiale.

Après extraction et purification, les concentrations 0,25 et 1 ppb présentent des difficultés pour leur détection par CLHP, aussi seuls les résultats obtenus avec un lait contaminé par 5 ppb ont été retenus.

Les rendements obtenus oscillent entre 90 et 115 %. Ils sont similaires à ceux de Fremy et Roiland (90 ± 15 %) [9] et Fremy *et al.* (87-113 %) [8] qui utilisent la CLHP. Ils sont meilleurs que ceux de Stubblefield et Shannon (82-84 %) [18] et Kiermeier et Mashaley (65-88 %) [14], qui font une extraction chloroformique de l'aflatoxine M1 et un dosage par CCM.

Effet de la nisine sur l'aflatoxine M1

Lactobacillus lactis permettant une dégradation efficace de l'aflatoxine M1, on a étudié l'effet de la nisine, caractéristique de cette espèce bactérienne.

Une solution de nisine à 0,1 g/ml est diluée dans HCl 0,02N de manière à obtenir 2,5 mg/ml. Deux ml de cette solution sont ajoutés à 96 ml de lait écrémé et stérilisé et 2 ml de NaOH 0,02N, ce qui permet d'avoir une concentration de nisine de 50 $\mu\text{g/ml}$ ou 2000 UI/ml (l'activité d'1 μg correspond à 40 unités internationales). 2000 UI/ml est la concentration maximale que peut produire *L. lactis* dans un milieu où les concentrations des ingrédients sont optimisées tout en neutralisant le pH [12]. Un lait témoin, additionné de 5 $\mu\text{g/l}$ d'aflatoxine M1, est préparé en lui ajoutant 2 ml d'HCl 0,02N sans nisine et 2 ml de NaOH 0,02N. La dégradation a été observée sur 24 heures. Le pH des deux laits (avec ou sans nisine) reste voisin de 7. L'expérience a été répétée trois fois.

RÉSULTATS

Afin de comparer l'évolution de l'aflatoxine M1 au cours des fermentations lactiques mésophiles et thermophiles, l'indice 100 est donné à la valeur en aflatoxine M1 trouvée pour le premier prélèvement (0 heure).

Effet de la fermentation mésophile sur l'aflatoxine M1

On constate une importante dégradation d'aflatoxine M1 par *Lactococcus diacetylactis* (Figure 1). Au bout de six heures et relativement au témoin, 37 % d'aflatoxine M1 sont transformés, 54 % à 18 heures et 58 % à 24 heures.

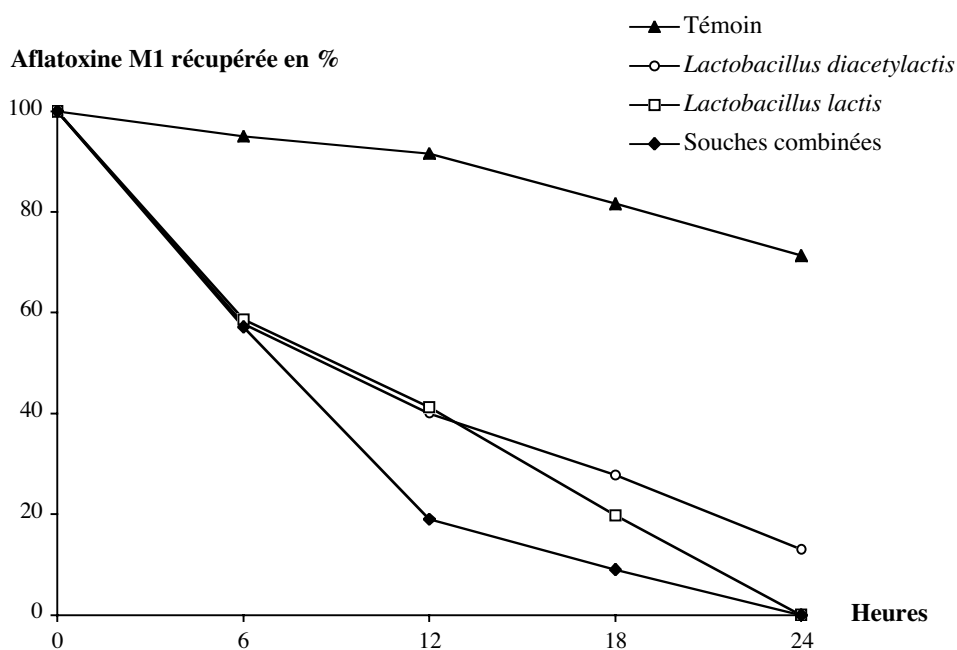


Fig. 1 : Effet de deux bactéries lactiques mésophiles en cultures pures ou combinées sur l'évolution de la concentration d'aflatoxine M1 d'un lait contaminé (5 ppb).

Lactococcus lactis est plus efficace après 12 heures. À 18 heures, l'aflatoxine M1 est dégradée à 62 % et elle n'est plus détectée à 24 heures. Cette différence pourrait être due à un métabolisme de la fermentation lactique plus actif.

La combinaison des deux souches a montré un effet plus important (Figure 1). Cela se traduit à partir de 6 heures, par une pente plus raide de la courbe. Au bout de 12 heures et relativement au témoin, l'aflatoxine a disparu à 73 % (contre 50 % avec *L. lactis*) et elle est très faible à 18 heures.

Effet de la fermentation thermophile sur l'aflatoxine M1

La valeur finale de l'acidité Dornic (90°D) de *Lactobacillus bulgaricus* est atteinte au bout de 6 heures d'incubation (Figure 2). Cette bactérie transforme de manière significative l'aflatoxine M1 à 4 et 6 heures d'incubation relativement au témoin (23 et 19 % de toxine transformée).

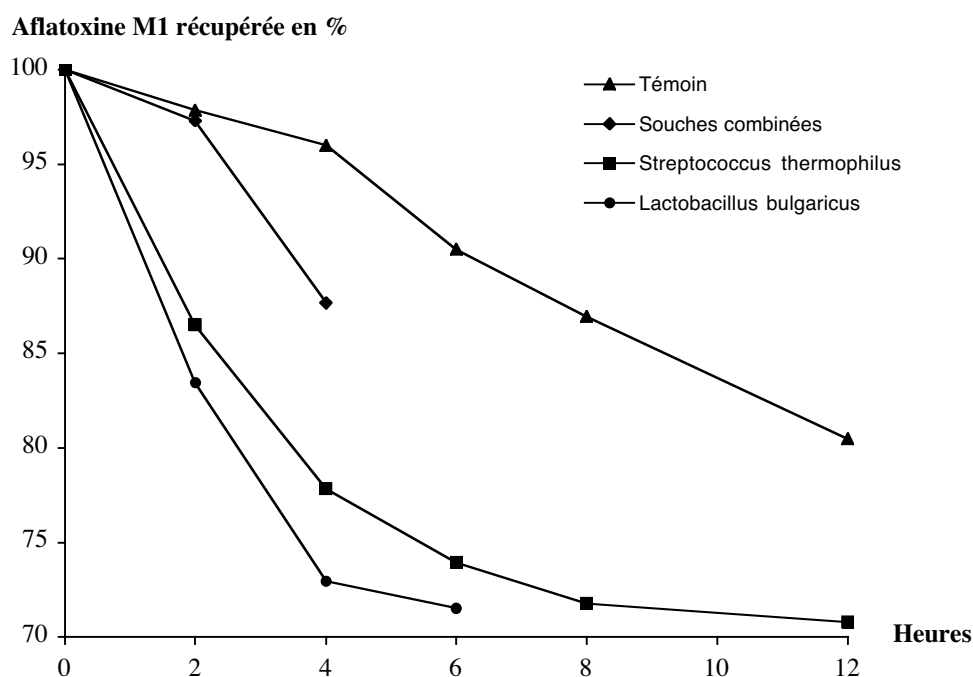


Fig. 2 : Effet de deux bactéries lactiques thermophiles en cultures pures ou combinées sur l'évolution de la concentration d'aflatoxine M1 d'un lait contaminé (5 ppb).

Il en est de même de *Streptococcus thermophilus* après 4 heures d'incubation (18 à 10 % d'aflatoxine M1 transformée relativement au témoin). La valeur finale d'acidité Dornic (90°D) est atteinte au bout de 12 heures.

La valeur d'acidité Dornic de 90°D est atteinte au bout de 4 heures avec les deux souches combinées. La combinaison ne permet alors la transformation que de 8 % d'aflatoxine M1 de manière significative.

Effet de la nisine sur l'aflatoxine M1

Relativement au témoin, la nisine semble n'avoir pas d'effet sur l'aflatoxine M1 (Figure 3).

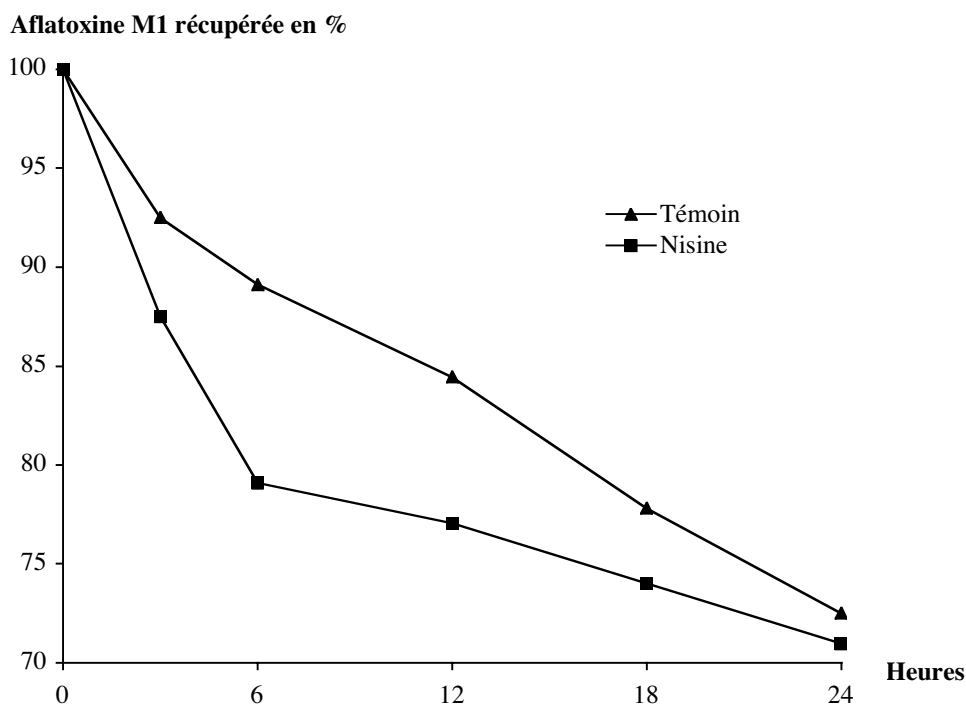


Fig. 3 : Effet de la nisine sur l'aflatoxine M1 (5 ppb).

DISCUSSION ET CONCLUSION

On observe dans tous les essais une baisse progressive d'aflatoxine récupérée pour le témoin au cours de l'incubation. Elle pourrait s'expliquer par une extraction d'autant plus difficile que l'affinité avec les protéines du lait est plus forte suite à un contact prolongé avec les protéines du lait.

Toutes les bactéries lactiques testées dégradent, à des degrés différents, l'aflatoxine M1, les mésophiles étant plus efficaces que les thermophiles. La souche considérée acidifiante (*Lactococcus lactis* pour les mésophiles et *Lactobacillus bulgaricus* pour les thermophiles) est plus efficace que celle utilisée comme souche aromatisante (*L. diacetylactis*

d'une part et *Streptococcus thermophilus* d'autre part). La combinaison des souches n'est efficace que pour les bactéries lactiques mésophiles.

Ciegler *et al.* [5] ont constaté que *Flavobacterium aurantiacum* est capable de faire disparaître l'aflatoxine B1 à partir de solutions aqueuses. Lillehoj *et al.* [16] ont montré que cette même bactérie mésophile peut supprimer complètement l'aflatoxine M1 à partir de lait contaminé de manière naturelle ou par 7.10^{10} cellules bactériennes/ml après 4 heures d'incubation à 30°C.

Brevibacterium linens, bactérie utilisée dans la maturation du fromage Brick, entraîne une légère inhibition de la croissance d'*Aspergillus parasiticus* et de la production d'aflatoxine B1 [21]. L'effet de *Lactococcus lactis* sur la production d'aflatoxine B1 par *A. parasiticus* dans le fromage a été étudié par Wiseman et Marth [22]. Ils ont constaté que cette bactérie n'affecte la production d'aflatoxine B1 que si elle estensemencée dans le milieu avant *A. parasiticus*. *Lactobacillus casei* cultivé simultanément avec *A. parasiticus* réduit sa production d'aflatoxine B1 ; cette réduction est plus importante si *L. casei* est ajouté au milieu trois jours avant sa contamination par *A. parasiticus* [6].

Néanmoins, divers travaux [2,7,9] suggèrent que la fermentation lactique n'a pas d'effet sur l'aflatoxine M1. Cependant, le réajustement de l'acidité Dornic de chaque échantillon avant l'extraction aurait peut-être permis d'éviter une amélioration de la récupération de la toxine en cas de pH plus acide.

La concentration faible (5 ppb) initialement utilisée rend difficile l'identification des produits de dégradation de l'aflatoxine M1 et la détermination du type d'action (enzymatique ou chimique). Cependant, certaines hypothèses peuvent être avancées en se basant sur des travaux antérieurs utilisant l'aflatoxine B1. Une solution d'acide citrique 0,1N transforme après agitation l'aflatoxine B1 en aflatoxine B2a (hydroxydihydroaflatoxine B1) [5,11].

Utilisant une souche productrice d'acide lactique (*Lactococcus lactis* ATCC 11454) Megalla et Mohran [17] ont constaté une transformation de l'aflatoxine B1 en aflatoxine B2a, 18 fois moins toxique que l'aflatoxine B1, et en aflatoxicol (Ro), dénué de toxicité.

Dans la cellule hépatique, l'aflatoxine B2a est le produit d'action des enzymes microsomiales et l'aflatoxicol des deshydrogénases NADH cytoplasmiques [7,13].

L'inefficacité de la nisine sur l'aflatoxine M1 a été mise en évidence pour un lait à pH neutre. Or, sa stabilité et donc son action sont importantes à pH acide. Un tel pH peut être obtenu par la formation d'une quantité d'acide lactique croissante par fermentation lactique. Il reste donc à vérifier que l'action de la nisine sur l'aflatoxine M1 ne peut être favorisée par l'acide lactique.

Ce travail suggère que ni l'acide lactique produit par les bactéries testées, ni la nisine produite par *Lactococcus lactis*, ne dégradent à pH neutre l'aflatoxine M1, ce qui rend difficile l'implication d'une action chimique et met en valeur l'action enzymatique des bactéries sur l'aflatoxine M1.

RÉFÉRENCES

- 1 - Applebaum (R.S.), Marth (E.H.) - Use of sulphite or bentonite to eliminate aflatoxin M1 from naturally contaminated raw whole milk. - *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 1982, **174**(4), 303-305.
- 2 - Applebaum (R.S.), Brackett (R.E.), Wiseman (D.W.), Marth (E.H.) - Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products - a review. - *J. Food Prot.*, 1982, **45**(8), 752-777.
- 3- Blanc (B.) - Méthode rapide de dosage de l'aflatoxine M1 dans les produits laitiers. - *Ind. Aliment. Agric.*, 1980, (9), 893-900.
- 4 - Blanc (B.), Lauber (E.), Sieber (R.) - Fixation de l'aflatoxine sur les protéines du lait. - *Microbiol., Aliment., Nutr.*, 1983, **1**(2), 163-177.
- 5 - Ciegler (A.), Lillehoj (E.B.), Peterson (R.E.), Hall (H.H.) - Microbial detoxification of aflatoxin. - *Appl. Microbiol.*, 1966, **14**(6), 934-939.
- 6 - El-Gendy (S.M.), Marth (E.H.) - Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. - *J. Food. Prot.*, 1981, **44**(3), 211-212.

- 7 - Fremy (J.M.) - Aflatoxines et produits laitiers. - *Bull. Lab. Vét.*, 1982, (6), 57-64.
- 8 - Fremy (J.M.), Cariou (T.), Terrier (C.) - Évaluation de la contamination en aflatoxine M1 dans le lait en poudre par HPLC en phase inversée. - *Ann. Fals. Expert. Chim. Toxicol.*, 1981, **74**(801), 547-554.
- 9 - Fremy (J.M.), Roiland (J.C.) - Devenir de l'aflatoxine M1 au cours de la fabrication du fromage de type camembert. - *Ann. Nutr. Alim.*, 1973, **33**(5), 619-630.
- 10 - Grant (D.W.), Carlson (F.W.) - Partitioning behavior of aflatoxin M1 in dairy products. - *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1971, **6**(6), 521-524.
- 11 - Hafez (A.H.), Megalla (S.E.) - The potential value of silage in detoxifying aflatoxin B1. - *Mycopathologia*, 1982, **79**(1), 31-34.
- 12 - Hurst (A.) - Nisin. - In *Advances in applied microbiology* Volume 27, Perlman (D.) Ed., 1981, p 85-123.
- 13 - Jacquet (J.J.), Lafont (J.), Lafont (P.) - Sur la contamination du lait par les aflatoxines. - *Rev. Lait. Fr.*, 1979, (412), 63-67.
- 14 - Kiermeier (F.), Mashaley (R.) - Einfluss der milkereitechnischen Behandlung der Rohmilch auf den Aflatoxin M1. Gehalt der daraus hergestellten Produkte. - *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 1977, **164**(3), 183-187.
- 15 - Lafont (P.), Lafont (J.), Mousset (S.), Frayssinet (C.) - Étude de la contamination du lait de vache lors de l'ingestion des faibles quantités de l'aflatoxine M1. - *Ann. Nutr. Aliment.*, 1980, **34**(4), 699-707.
- 16 - Lillehoj (E.B.), Stubblefield (R.D.), Shannon (G.M.), Shotwell (O.L.) - Aflatoxin M1 removal from aqueous solution by *Flavobacterium aurantiacum*. - *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 1971, **45**(3), 259-266.
- 17 - Megalla (S.E.), Mohran (M.A.) - Fate of aflatoxin B-1 in fermented dairy products. - *Mycopathologia*, 1984, **88**(1), 27-29.
- 18 - Stubblefield (R.D.), Shannon (G.H.) - Aflatoxin M1. Analysis in dairy products and distribution in dairy foods made from artificially contaminated milk. - *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1974, **57**(4), 847-851.

- 19 - Tantaoui-Elaraki (A.), Khabbazi (N.) - Contamination éventuelle des fromages par les mycotoxines : une revue. - *Lait*, 1984, **64**(635-637), 46-71.
- 20 - Tantaoui-Elaraki (A.), Berrada (M.), El Marrakchi (A.), Berramon (A.) - Préparation de lben marocain pasteurisé à l'aide de souches bactériennes sélectionnées *Streptococcus lactus*, *S. diacetylactis*, *Leuconostoc lactis* et *L. cremonis*. - *Actes Inst. Agron. Vét.*, 1983, **3**, 49-58.
- 21 - Weckbach (L.S.), Marth (E.H.) - Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a competitive environment. - *Mycopathologia*, 1977, **62**(1), 39-45.
- 22 - Wiseman (D.W.), Marth (E.H.) - Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis*. - *Mycopathologia*, 1981, **73**(1), 49-56.

ABSTRACT

Destruction of aflatoxin M1 by lactic bacteria of Moroccan lben and yogurt

Lactic bacteria of Moroccan lben (milk product of mesophilic fermentation) and of yogurt (thermophilic fermentation) were tested on the evolution of aflatoxin M1 levels artificially added to milk at 5 µg/l. Thermophilic bacteria led only to a low elimination of aflatoxin M1 (19% for *Lactobacillus bulgaricus*, 10% for *Streptococcus thermophilus*, and 8% for the combined strains). Mesophilic bacteria allowed the total destruction of aflatoxin M1 for *L. lactis* in pure culture or combined with *Lactococcus diacetylactis*. Destruction was significant in the latter strain (58%), even if it was not total.

Key-words: aflatoxin, mesophilic fermentation, thermophilic fermentation, lben, nisin, yogurt.
