



<http://www.remise.ma>

Détection des résidus d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers par méthode microbiologique

Detection of antibiotic residues in milk and dairy products by a microbiological method

A. ZINEDINE ^{1*}, M. FAID ² et M. BENLEMLIH ³

1*: Laboratoire de Toxicologie Alimentaire, Institut National d'Hygiène, 27 avenue Ibn Batouta. BP 769 Agdal, Rabat, Maroc.

2 : Département de Génie et Technologie Alimentaire, I.A.V Hassan II. BP 6202 Rabat-Instituts. Maroc.

3 : Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement. Faculté des Sciences Dhar El- mahrèz. BP 1796, Fès Atlas. Maroc.

* Auteur pour correspondance: E-mail: zinedineab@yahoo.fr (Abdellah Zinedine), Tél :+ 212 37 77 20 67. Fax : +212 37 77 20 67.

Résumé

Un total de 136 échantillons de lait et dérivés, prélevés dans les régions de Rabat et Kénitra, ont été analysés pour la détection des substances inhibitrices et résidus d'antibiotiques par une méthode microbiologique. La méthode utilisée est le test d'inhibition des souches de *Streptococcus thermophilus* isolées du lait cru et du « Lben » traditionnel. Dans ce test, la mesure de l'acidité dornic à 45°C et l'essai de diffusion sur gélose ont été utilisés. Les résultats ont révélé l'existence d'une contamination du lait cru, du lait pasteurisé, du yaourt et du « Raïbi » par les substances inhibitrices. La mesure du diamètre de la zone d'inhibition a permis de conclure que 42,87, 6,65 et 3,33 % respectivement des échantillons analysés du lait cru, du lait pasteurisé et du « Raïbi » pourraient être contaminés par des résidus d'antibiotiques. C'est le premier rapport sur la présence des résidus d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers marocains.

Mots-clés: Lait, Produits laitiers, Résidus d'antibiotiques, *Streptococcus thermophilus*, Détection.

Summary

A total of 136 samples of raw milk, pasteurized milk and other dairy products (yogurt and "Raïbi"), sampled from Rabat and Kénitra areas, were analyzed for the detection of inhibitory compounds and antibiotics residues by a microbiological method. The method used in this study is the inhibition of strains of *Streptococcus thermophilus* that were isolated from raw milk and traditional "Lben". Determination of dornic acidity at 45°C and the diffusion agar assay were used for the detection of inhibitory compounds. Results showed the presence of inhibitory compounds in most samples of both milk and dairy products. Determination of the diameter of the zone inhibition showed that 42.87, 6.65 and 3.33 % respectively of analyzed samples of raw milk, pasteurized milk and « Raïbi » could be contaminated by antibiotics residues. This is the first report on antibiotic residues in milk and dairy products from Morocco.

Key-words: Milk, Dairy products, Antibiotics residues, Detection, *Streptococcus thermophilus*.

Introduction

Au Maroc, la commercialisation du lait cru et sa transformation en dérivés laitiers traditionnels s'effectuent dans des lieux traditionnels appelés «mahlabas». Le «Raïb », le «Zebda beldia» ou beurre fermier et le «Lben» sont des produits laitiers traditionnels largement consommés au Maroc. Plusieurs études ont été entreprises pour établir l'état hygiénique de ces produits. En effet ils sont le plus fréquemment contaminés par les coliformes fécaux, les staphylocoques (Tantaoui *et al.*, 1983 ; Benkeroum *et al.*, 1984 ; Hamama et Bayi, 1991) et par une microflore d'altération notamment les levures et les moisissures à fort pouvoir lipolytique et protéolytique (Faid *et al.*, 1992 ; Zinedine *et al.*, 1996). Le lait séjournant dans les centres de collecte non réfrigérés peut être contaminé par une microflore étrangère. La charge globale du lait en micro-organismes peut être réduite par ajout volontaire de substances inhibitrices (Jurdi et Asmar, 1981). L'administration des antibiotiques aux vaches laitières atteintes de mammites pose un risque de contamination du lait par voie intramammaire au moment de la récolte (Labie, 1981). La pénicilline et ses dérivés sont largement utilisés dans le traitement des mammites, des infections vaginales et peuvent de ce fait contaminer le lait (Ryan *et al.*, 1986). La présence de substances inhibitrices tels que les antibiotiques dans le lait peut provoquer une inhibition partielle ou totale de la production d'acide par les levains lactiques (Everson, 1984) ce qui pourrait engendrer des pertes économiques importantes pour l'industrie laitière (Beyer, 1986).

Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature pour détecter les substances antimicrobiennes dans le lait. Parmi ces méthodes, les tests microbiologiques utilisent des microorganismes tests et se basent sur la modification de leur métabolisme au cours de la fermentation. Flory *et al.* (1941) ont été les premiers à introduire la Cylinder Plate Method (CPM) à *Sarcina lutea*, modifiée après par Carter (1974), pour la détection des inhibiteurs dans le lait.

Van Os et Beukers (1980) ont publié le Delvotest-P à *Bacillus stearothermophilus*. Ce dernier test a été modifié par Gilbertson *et al.* (1995) en introduisant dans la méthode la pénicillinase et la céphalosporinase. Les bactéries lactiques ont été utilisées par plusieurs chercheurs notamment *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* (Jurdi et Asmar, 1981).

Au Maroc, les informations relatives à la contamination du lait et ses dérivés par les inhibiteurs et les résidus d'antibiotiques restent assez limitées. Nous avons entrepris donc cette étude dans le but d'établir l'état de connaissance actuelle sur le sujet. Nous avons utilisé *S. thermophilus* pour

la détection des substances inhibitrices dans le lait cru et dans certains dérivés laitiers industriels tels le yaourt et le «Raïbi» (produit laitier préparé à base du lait acide, sucré, coloré et aromatisé).

Matériel et Méthodes

- Microorganismes tests

Des souches de *S. thermophilus* ont été isolées à partir du lait cru et du « Lben » traditionnel sur milieu Lactic Agar (Difco). Le choix de cette bactérie est justifié par son utilisation en industrie laitière en particulier dans la production du yaourt. La thermophilie de cette bactérie, son utilisation réussie dans la détection des résidus d'antibiotiques dans le lait et ses dérivés par certains chercheurs notamment par Jurdi et Asmar (1981), et sa sensibilité aux antibiotiques est d'un grand avantage et peuvent expliquer en partie notre choix de son utilisation dans la détection de ces substances. Les souches sélectionnées ont été identifiées par observation microscopique (coloration de Gram), la recherche de la catalase, la croissance à 6.5% de NaCl et la fermentation du lait reconstitué (10%) à 45°C. La sensibilité des souches de *S. thermophilus* à la pénicilline a été étudiée dans le lait reconstitué stérile additionné de concentrations croissantes de la pénicilline G sodique (10^6 UI) allant de 0.001 à 1 ppm.

- Méthodes de détection des antibiotiques

Mesure de l'acidité Dornic

La présence d'un inhibiteur altère la croissance du microorganisme test et la production de l'acide lactique. 100 ml de chaque échantillon du lait à analyser sont inoculés par une préculture de *S. thermophilus* à 1% et sont incubés à 45°C pendant 6 h. La détermination de l'acidité dornic se fait par titration de 10 ml de lait prélevés toutes les 2 heures de fermentation par une solution de NaOH (0.1N) en présence de la phénolphtaléine. La coagulation du lait peut avoir lieu à des temps aléatoires et variables. Nous avons constaté que l'enrichissement du lait par de l'extrait de levure à 0.05% conduit à une coagulation rapide au bout de 6 heures, à une charge de l'inoculum de 1% et à une température de 45°C.

Essai de diffusion sur gélose

La souche de *S. thermophilus* estensemencée dans le milieu Lactic Agar (Difco) pour obtenir une culture étalée. 50µl de chaque échantillon à analyser sont déposés dans des puits de 8 mm de

diamètre creusés dans la gélose. Après incubation à 45°C pendant 24 heures, on mesure le diamètre de la zone d'inhibition.

Résultats

Nous avons sélectionné cinq souches de *S. thermophilus*. Les souches isolées sont des cocci possédant une catalase, acidifiants le lait à 45°C et sont incapables de croître à 6.5% de NaCl (à la différence des souches de *S. faecalis*). L'étude de la sensibilité des souches à la pénicilline G nous a permis de sélectionner une seule souche *S. thermophilus* Lc8 capable de détecter une concentration de l'ordre de 0.002 ppm de pénicilline G dans le lait reconstitué stérile (tableau I).

- Lait cru

Un total de 35 échantillons du lait cru ont été analysés par cette méthode. 22 échantillons ont été prélevés des étables de la région du Gharb et 13 échantillons recueillis dans les « mahlabas » de la ville de Kénitra. Les résultats ont montré que 20 échantillons ont produit une zone d'inhibition de la croissance de *S. thermophilus* soit un pourcentage de 57,14% des échantillons (tableau II). Le diamètre de la zone d'inhibition nous permet de conclure sur la présence des antibiotiques. Dans cette étude 15 échantillons du lait cru ont produit une zone d'inhibition dont le diamètre est supérieur à 16 mm (tableau 3) soit un pourcentage de l'ordre 42,85% des échantillons totaux analysés.

- Lait pasteurisé

Un total de 61 échantillons du lait pasteurisé provenant de quatre unités de production à l'échelle nationale ont été analysés par la mesure de l'acidité dornic. Après fermentation à 45°C pendant 6 heures, nous avons noté que respectivement 12,50%, 57,14%, 26,66% et 82,25% des échantillons des unités A, B, C et D ont été incapables de produire une acidité supérieure à 30°D. Ce qui correspond à un pourcentage total de 44,26% des échantillons analysés (tableau II). La recherche des résidus d'antibiotiques par essai de diffusion sur gélose a montré que seuls 4 échantillons analysés du lait pasteurisé ont produit une zone d'inhibition de *S. thermophilus* de 17 mm de diamètre (tableau III). Ce qui correspond à un pourcentage de 6,55% des échantillons présumés contaminés par les résidus d'antibiotiques.

Tableau I : Sensibilité des souches de *S. thermophilus* à la pénicilline G.

Souche	Pénicilline G (ppm)							
	0.001	0.002	0.003	0.01	0.02	0.03	0.05	0.1
1	+	+	+	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	-	-	-	-	-	-

1 : *S.thermophilus* Lc5 ; **2** : *S.thermophilus* L7 ; **3** : *S.thermophilus* L10 ; **4** : *S.thermophilus* Lc8 ;
5 : *S.thermophilus* L9 ;
+ : Croissance ; - : Inhibition.

Tableau II: Pourcentages de contamination des produits laitiers analysés par les inhibiteurs et les résidus d'antibiotiques.

Produit	% de contamination par les inhibiteurs	% de contamination par les antibiotiques
Lait cru	57,14	42,87
Lait pasteurisé	44,26	6,55
« Raïbi »	50	3,33
Yaourt	40	NC

NC : non contaminé.

Tableau III: Diamètre de la zone d'inhibition de *S. thermophilus* Lc8 dans les produits analysés.

Produit	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
	< 16	16-25	> 25
Lait cru	5	15	-
Lait pasteurisé	23	4	-
« Raïbi »	14	1	-
Yaourt	4	-	-

- Produits laitiers

Un total de 40 échantillons dont 10 échantillons du yaourt produit par l'unité A et 30 échantillons du "Raïbi" (10 de l'unité A, 10 de l'unité B et 10 de l'unité C) ont été analysés par la méthode de l'essai de diffusion sur gélose. Les résultats ont montré que 14 échantillons du «Raïbi» de toutes les unités de production ont produit des zones d'inhibition dont le diamètre est situé entre 10 et 15 mm et un seul échantillon a produit une zone de 17 mm de diamètre, ce qui correspond à un pourcentage de 50% des échantillons du « Raïbi » analysés. Concernant les échantillons du yaourt, nous avons noté que seulement 4 échantillons ont produit une zone dont le diamètre est compris entre 12 et 16 mm soit un pourcentage d'altération de l'ordre de 40%.

Discussion

Les taux élevés de contamination du lait cru et du lait pasteurisé par les inhibiteurs en général et les résidus d'antibiotiques en particulier peuvent être probablement expliqués d'une part par l'usage massif et incontrôlé des préparations pharmaceutiques intramammaires pour le traitement et la prévention des mammites bovines et le non respect des délais d'attente après traitement, et d'autre part par un ajout volontaire des inhibiteurs de croissance des germes (antibiotiques, antiseptiques) dans le lait de commerce dans le but de freiner la croissance des bactéries et stabiliser le lait. Quoique le lait soit contaminé par les inhibiteurs, la fermentation lactique peut avoir lieu en employant des levains produits à base de souches résistantes.

Les produits industriels fermentés ont montré un pourcentage d'inhibition de *S.thermophilus* assez élevé respectivement de l'ordre de 40 et 50% pour le yaourt et le «Raïbi». Pour les échantillons du yaourt de l'unité A, ces pourcentages d'inhibition peuvent être expliqués probablement par la présence de substances antimicrobiennes qui sont produites naturellement par les bactéries lactiques au cours de la fermentation comme les bactériocines. En effet, certaines bactériocines produites par les bactéries lactiques au cours de la fermentation du yaourt peuvent avoir un antagonisme contre d'autres bactéries lactiques (Dave et Shah, 1997 ; Herreros et al., 2005).

Pour les échantillons du «Raïbi» prélevés des trois unités, ces pourcentages d'inhibition peuvent être expliqués par la contamination du lait servant pour leur fabrication. En effet, le «Raïbi » est un produit laitier qui se fabrique au Maroc à partir du lait acide qui ne peut être pasteurisé, ce produit ne subit aucune fermentation par les bactéries lactiques, le lait acide est alors sucré,

aromatisé, coloré et conditionné (Zinedine et al., 1996). Les taux d'inhibitions élevés trouvés dans le «Raïbi» suggèrent plutôt un ajout volontaire des inhibiteurs par les industriels ou bien par les agriculteurs dans la ferme, ou bien une contamination indirecte de ces produits par le lait contaminé pendant le traitement des mammites bovines.

Conclusion

Il ressort de ce travail que certains produits laitiers marocains analysés sont contaminés par des inhibiteurs de *S. thermophilus*. La mesure du diamètre d'inhibition nous a permis de conclure sur la contamination probable de certains échantillons du lait cru, du lait pasteurisé et du «Raïbi» par les antibiotiques. Les pratiques incorrectes d'ajout des antibiotiques au lait cru trouvent lieu dans l'absence d'une législation nationale fixant les limites résiduelles des inhibiteurs légaux dans le lait et ses dérivés, mais aussi dans l'absence des contrôles de routine au niveau de l'industrie et par les services compétents de la répression des fraudes pour détecter ces substances et protéger les consommateurs dont la majorité sont inconscients des problèmes liés à l'existence des antibiotiques dans ces produits.

Remerciements

Ce travail a été effectué au Département de Génie et Technologie Alimentaire, I.A.V Hassan II (Rabat). Les auteurs remercient Dr Bouazza Kherrati, vétérinaire responsable des abattoirs de la ville de Kénitra, ainsi que les agriculteurs de la région du Gharb pour leur contribution aux prélèvements des échantillons et à la réalisation de ce travail.

Références bibliographiques

- Benkerroum M., Tantaoui-Elaraki A. et Elmarrakchi A. (1984) Qualité hygiénique du lben marocain. *Microbiol. Alim. Nutr.* 2, 199-206.
- Beyer F. (1986) Hemmstoffe in milch aus technologischer sicht. *Deutch Mokerei-ztg.* 107, 898-899.
- Carter G.G. (1974) Detection of penicillin in dry powdered milk by the *Sarcina lutea* CPM. National Center of Antibiotic and Insulin Analysis. Food and Drug Administration. Washington D.C.

- Dave R.I. et Shah N.P. (1997) Characteristics of bacterocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LA-1. *Int. Dairy J.* 7, 707-715.
- Everson T.C. (1984) Concerns and problems processing and manufacturing in super plants. *J. Dairy Sci.* 67, 2095-2099.
- Faid M., Touraibi A., Tantaoui-Elaraki A. et Breton A. (1992) Characterization of Yeasts and Moulds isolated from Moroccan butter. *Microbiol. Alim. Nutr.* 10, 273-278.
- Florey H.W., Abraham E.P., Chain E., Fletcher C.M., Gardner A.D., Heatley N.Y. et Jennings M.A (1941) Further observations on penicillin. *Lancet* 2: 177-181.
- Gilbertson T.J., Mejeur R.L., Yein F.S. et Jaglan P.S. (1995) Modified microbiological method for the screening of antibiotics in milk. *J. Dairy Sci.* 78, 1032-1038.
- Hamama A. et Bayi M. (1991) Composition and microbiological profile of two Moroccan dairy products: Raib and Jben. *J. Soc. Dairy Technol.* 44, 118-120.
- Herreros M.A., Sandoval H., Gonzales L., Castro G.M., Fresno J.M. et Tornadijo M.E. (2005) Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada Cheese (A Spanish goats milk cheese). *Food Microbiol.*, 22, 455-459.
- Jurdi D.A. et Asmar J.A. (1981) Use of a simple fermentation test to detect antibiotic residues in milk. *J. Food Prot.* 44, 674-676.
- Labie C.H. (1981) Dispositions législatives destinées à éviter la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait. *Rec. Med. Vet.* 157, 187-190.
- Ryan J.J., Wildman, E.E., Duthie A.H., Atherton V.H. (1986) Detection of penicillin, cephalosporin, and cloxacillin in commingled raw milk by the spot test. *J. Dairy Sci.* 59, 1510-1517.
- Tantaoui-Elaraki, Berrada M., Elmarrakchi A. et Berramou A. (1983) Etude sur le lben marocain. *Le lait* 63, 230-245.
- Van Os J.L. et Beukers R. (1980) A multitest system for detection of antibiotics in milk. *J. Food Prot.* 43, 510-511.
- Zinedine A., Faid M., Benlemlih M., Simard R.E. et Lefebvre G. (1996) Microflores d'intérêt hygiénique et d'altération des produits laitiers traditionnels marocains. *Microbiol. Alim. Nutr.* 14, 331-338.