

## CARACTERISATION IN VITRO DU POTENTIEL PROBIOTIQUE DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES DES POISSONS D'EAUX DOUCES

Rim EL JENI<sup>1,2</sup>, Balkiss BOUHAOUALA-ZAHAR<sup>2</sup>, Monia EL BOUR<sup>1</sup>

1- Laboratoire de Biodiversité et biotechnologie marines (INSTM Salammbô), 28 rue du 2 mars 1934, 2015 Tunis Tunisie.

2-Institut Pasteur de Tunis, Laboratoire des Venins et Molécules Thérapeutiques, 13 Place Pasteur, BP-74, 1002 Tunis,

E-mail : eljeni.rime@gmail.com; balkiss.bouhaouala@pasteur.rns.tn; monia.elbour@instm.rnrt.tn

### ABSTRACT

The possible use of novel lactic acid bacteria, isolated from diverse organs of freshwater fish and their potential application as probiotics in raw and processed foods was herein examined. As main results, we demonstrated that the isolates (4 strains) survived at pH 3.0 in presence of bile salts, pancreatin and pepsin, without any detectable hemolytic activity. Furthermore, moderate heat-resistance as well as adhesion ability to steel surface and sensitivity to clinically-relevant antimicrobial agents was revealed for all the isolates, demonstrating a significant probiotic profiles.

### RESUME

L'isolement d'espèces de bactéries lactiques d'organes différents en pisciculture dulçaquicole et leur usage en tant que probiotique a été réalisé dans ce travail. Aux termes d'une batterie de tests, nous avons démontré que les isolats ont des profils probiotiques importants. En plus de leur capacité avérée de survie à pH 3,0 en présence de sels biliaries, de la pancréatine et de la pepsine, sans aucune activité hémolytique détectable, ils possèdent en outre, une intéressante résistance à la chaleur modérée et une capacité d'adhérence à la surface de l'acier. Leur sensibilité aux agents antimicrobiens cliniquement pertinents a été révélée pour tous les isolats.

### INTRODUCTION

Les probiotiques bénéfiques sont des microorganismes (i) non pathogènes, (ii) sans gènes de résistance aux antibiotiques, (iii) résistants aux sels biliaries et au pH acides, (iv) en mesure d'adhérer et de coloniser la muqueuse intestinale, (v) présentent des caractéristiques de croissance avantageuses et viables dans des conditions normales de stockage, (vi) produisent des substances antimicrobiennes, (vii) ayant la capacité d'inhiber les bactéries pathogènes dans l'intestin, et (viii) sont dotés d'une capacité de moduler la réponse immunitaire même de façon transitoire (Da Cruz et al., 2007). Ainsi, l'objectif de la présente étude est la caractérisation *in vitro* du profil probiotique pour quatre bactéries lactiques, récemment isolées des poissons d'eaux douces (El Jeni et al., 2015) à travers notamment l'étude de leur capacité d'adhésion à une surface lisse.

### MATERIEL ET METHODES

#### Matériel

A partir d'une collection de 177 isolats, trois isolats de bactéries lactiques isolées à partir des branchies et du mucus de *Tilapia oreochromis* (appartenant au genre *Enterococcus* (*E. faecium* (R.A2) (EMBL: HG937695), *E. faecium* (R.A5) (EMBL: HG937696) et *E. faecium* (R.A73) (EMBL: HG937697)) et une souche isolée à partir du mucus de *Mugil cephalus*, appartenant au genre *Leuconostoc* (*Leuconostoc mesenteroides* R.A76 (EMBL: HG937700)) ont été sélectionnées et ont fait l'objet d'une étude

approfondie afin de montrer leur potentiel probiotique à travers leur capacité d'adhérence à des plaques en acier inoxydable.

#### Adhérence bactérienne à des plaques en acier

**inoxydable** : Chaque isolat est cultivé sur milieu MRS selon un protocole standard comme décrit précédemment (El Jeni et al., 2015) puis déposés sur une plaque en acier. Leur capacité d'adhésion *in vitro* est estimée après rinçage en pourcentage de charge restante par rapport à la charge bactérienne de départ.

### RESULTATS

#### Survie dans les conditions simulant le tractus gastro-intestinal humain

Les quatre isolats caractérisés comme appartenant au genre *Enterococcus* (*E. faecium* (R.A2) (EMBL: HG937695), *E. faecium* (R.A5) (EMBL: HG937696) et *E. faecium* (R.A73) (EMBL: HG937697)) et au genre *Leuconostoc* (*Leuconostoc mesenteroides* R.A76 (EMBL: HG937700)) ont été préalablement soumis à une batterie de tests *in vitro* (El Jeni et al., 2015). Les résultats de ces travaux ont permis de démontrer que la viabilité des quatre isolats bactériens lactiques dans des conditions de faible pH démontre une réduction substantielle ( $P < 0,05$ ) avec une viabilité bactérienne détectée après exposition 3h à faible pH de 0,2, 3,0 et 4,0. Le pourcentage de réduction est passé de 8,47 à 43,10% et de 2,23 à 50,15%, respectivement. L'exposition modérée des cultures bactériennes à différents taux d'oxgall et d'acide taudeoxycholic, a affecté la viabilité des isolats. Aucun des isolats sélectionnés n'a montré une activité hémolytique ni de survie en présence de

pepsine (pH 2,0), alors qu'elles ont survécu à pH 3,0 avec un taux de survie estimé entre 65-79%. De plus, toutes les cultures ont survécu à la pancréatine à pH 8 avec des taux de viabilité qui varient entre 86-99%. Aucun isolat n'a survécu après 1 min d'exposition à 75 °C, alors qu'ils ont résisté pendant 5 minutes à 60 °C et pendant 1 min à 65 °C (El Jeni et al, 2015). Testés pour leur capacité d'adhésion à une plaque d'acier inoxydable, nous

avons pu démontrer que les 4 isolats possèdent une capacité d'adhésion *in vitro* dont les taux d'adhérence varient de 32% à 35% (Figure1). Ces résultats sont très intéressants et dénotent du potentiel probiotique de ces quatre isolats.

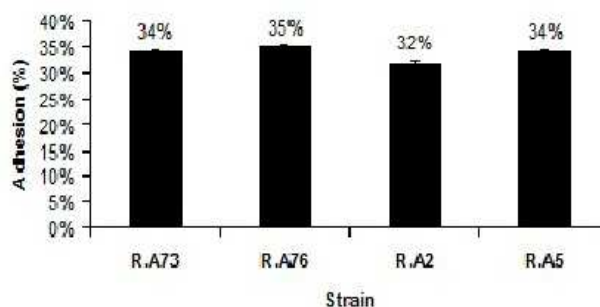


Figure 1 : L'adhérence des bactéries lactiques aux plaques en acier inoxydable.

## DISCUSSION

La présente étude montre que ces quatre isolats bactériens possèdent un potentiel d'application avéré en tant que probiotique. Les critères décrits par Merrifield et al. (2010) ont été appliqués. Ces quatre isolats bactériens lactiques ont survécu à pH acides et à de fortes concentrations en sels biliaires dans des conditions d'acidité gastrique. En outre, aucun des isolats n'était capable d'hydrolyser l'acide taurodeoxycholique ou l'oxgall et ont une capacité de survie *in vitro* en présence de pepsine et/ou de pancréatine. Ces caractéristiques devraient leur permettre de survivre en conditions de transit gastro-intestinal. Ces résultats corrélés avec les données précédentes ont révélé l'absence de viabilité des bactéries à pH 2,0 (Paramithiotis et al., 2006) et la résistance aux sels biliaires à une concentration d'environ 0,15 à 0,3%, laquelle a été recommandée pour la sélection des probiotiques à usage humain (Gilliland et al., 1984). De plus, les quatre isolats présents présentent une capacité d'adhérence *in vitro* à une plaque en acier, lorsqu'elles sont testées dans les mêmes conditions que celles précédemment rapportées (Paramithiotis et al., 2006). Cette propriété démontre leur capacité potentielle de coloniser la muqueuse du tractus gastro-intestinal.

## CONCLUSION

Ces résultats résument le potentiel probiotique de bactéries lactiques qui peuvent être considérés ainsi, et les présentant comme bio-ingrédients pour la conservation du poisson ou autre produit de la pêche.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été mené dans le cadre du projet transfrontalier BIOVecQ PS1.3\_08 co-financé par l'UE.

## BIBLIOGRAPHIE

- DA CRUZ AG., FARIA JAF., VAN DENDER AGF. (2007) - Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Res. Int.*, 40: 725-732.
- EL JENI R., EL BOUR M., CALOMATA P., BOHEM K., IMMACULATA FC., BARROS-VELASQUEZ J., BOUHAOUALA-ZAHAR B. (2015). *In-vitro* probiotic profiling of *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* Lactic Acid Bacteria strains from Tunisian freshwater fishes. *Canadian J. Microbiol.*(Sous Presse)
- GILLILAND SE., STALEY TE., BUSH LJ (1984)- Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.*, 67: 3045-3051.
- MERRIFIELD DL., DIMITROGLOU A., FOEY A., DAVIES S.J., BAKER RTM., BØGWALD J., CASTEX M., RINGØ E. (2010) - The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302: 1-18.
- PARAMITHIOTIS S., GIOULATOS S., TSAKALIDOU E., KALANTZOPOULOS G. (2006) - Interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process. Biochem.*, 41: 2429-2433.