

Diss. ETH NO. 18287

**Biodiversity and microbial safety of artisanal Malian sour milk *fènè* and
development of adapted starter cultures for controlled production**

A dissertation submitted to

ETH Zurich

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

Stephan Markus Wullschleger

Dipl. Lm-Ing., ETH Zurich

Born February 4, 1980

Citizen of

Aarburg (AG)

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Christophe Lacroix, examiner

Prof. Dr. Leo Meile, co-examiner

Prof. Dr. Bassirou Bonfoh, co-examiner

Zurich, 2009

Summary

Background:

Ancient Malian pastoral practices are evolving; traditional production of *fènè*, a spontaneously fermented sour milk, is moving toward commercial manufacture and already provides a substantial foundation for developing local economies. This economic boon through commercialization of traditional raw milk and dairy products, a major source of proteins in Malian diets, is accompanied unfortunately with a commensurate risk to human health due to the presence of putative human pathogens and the lack of standardized hygienic processes in domestic and commercial *fènè* production. This is further complicated by the absence of sufficient commercial logistics; controlled transport and storage of milk and perishable foodstuffs. Farmers cannot sell their milk in a timely manner locally and the commercial local dairy industry still in its infancy is unable to process the milk safely. Sustainable production of safe dairy products, with regard to the spontaneous *fènè* fermentation process, which has not been investigated until now, will bring healthier food to market and regular income to farmers.

Objectives:

Elucidation of seasonal and process-driven variation of bacterial strain diversity of *fènè* microbiota during spontaneous fermentation was the goal of the first part of this thesis work. The practical application of this data through development of an adapted starter culture improving reproducible quality, establishing hygienic production standards eliminating opportunistic pathogens, decreasing antibiotic resistant bacteria and increasing food safety were the goals set in the latter half of this thesis.

Results:

A simple and powerful strategy for rapid, unequivocal identification/quantification of individual bacterial strains has proven itself invaluable in our primary objective of determining the complex commensal *fènè* flora composition as well as elevated levels of putative human pathogens within complex food matrices later on. The diversity of native *fènè* microbiota was assayed during three seasons (hot, cold and rainy) at one domestic production site and one small-scale dairy. A total of 1583 catalase-negative, Gram-positive bacteria were isolated from 98 samples. Enterococci and streptococci dominated the increased biodiversity range of lactic acid bacteria (LAB) evidenced by

[isolates/strain numbers]: *Lactobacillus fermentum* (77/18), *Weissella confusa* (75/21), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (62/21), *Pediococcus pentosaceus* (36/30), *Lactobacillus plantarum* (24/9), *Weissella paramesenteroides* (11/3), *Lactococcus garvieae* (11), *Lactobacillus* sp. (10) and *Pediococcus acidilactici* (8/4).

Production-type and seasonal influences on strain diversity and bacterial populations were observed and recorded. Of the total 126 strains; only four were isolated repeatedly in two out of three seasons and a maximum of seven strains were found consistently in any single season at domestic and small-scale production. Highest bacterial counts for presumptive lactobacilli, lactococci and enterococci were found with 9.2 ± 0.5 , 9.2 ± 0.3 and 8.8 ± 0.3 Log₁₀ colony forming unit (cfu)/ml during hot and lowest with 7.9 ± 0.5 , 8.2 ± 0.8 and 7.8 ± 1.0 Log₁₀(cfu/ml) during rainy season, respectively. No impact of the type of production was found on bacterial populations except for presumptive *Enterobacteriaceae*-counts, with lowest counts of 7.1 ± 0.4 Log₁₀(cfu/ml) at small-scale production.

Presumptive *Enterobacteriaceae* (6.5 - 9.0 Log₁₀(cfu/ml)) and *Staphylococcus aureus* (5.2 ± 0.9 Log₁₀(cfu/ml)), pose a significant human health hazard. This treat was further corroborated by the identification of 596 enterococci and 454 streptococci from 1583 isolates. The identification of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* as putative dominante streptococci species with the conspicuous absence of *St. thermophilus* – usually occupying a central fermentative role – pointed towards spontaneously fermented *fènè* as a likely source for human infection and transmission.

Bacteria of the *St. bovis* / *St. equinus* complex (SBSEC) were the dominant species identified and main acidifier in spontaneous *fènè* fermentation. 29 traditional sour milks collected in the circle of Bamako (Mali), Kenya and Somalia were investigated on the presence of SBSEC bacteria and on their acquired antibiotic resistances. 95 *St. infantarius* subsp. *infantarius* and 26 *St. gallolyticus* subsp. *macedonicus* were isolated from 29 samples and identified by PCR, RFLP and rep-PCR to strain level. 13 of 20 selected SBSEC bacteria isolated from different products displayed resistance to tetracycline and harbored either the *tet(M)*, *tet(L)* or *tet(S)* gene. Five of these strains displayed multidrug resistance against ampicillin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, gentamicin, neomycin, penicillin, streptomycin and tetracycline and only five

were susceptible to all 11 tested antibiotics. Combined erythromycin and tetracycline resistance of two *St. gallolyticus* subsp. *macedonicus* strains was related to the *erm(B)* and the *tet(M)* genes.

118 enterococci and 84 non-*Enterococcus* lactic acid bacteria (LAB) were tested on antibiotic susceptibility. The antibiotic resistance prevalence against tetracycline and oxytetracycline was directly linked to the amount of oxytetracycline purchased by farmers during the preceding season, with 40%, 26% and 17% tetracycline resistant enterococci found during cold, hot and rainy seasons, respectively. Tetracycline resistant enterococci harbored the *tet(L)*, *tet(M)* and *tet(S)* resistance genes. One enterococci strain transferred its *tet(L)* and *tet(M)* genes to the donor strain *E. faecalis* JH-2-2 with a transfer rate of 1.9×10^{-6} transconjugants per donor. Tetracycline resistance was also predominant with 17% among non-*Enterococcus* LAB and was induced by the *tet(M)* gene in one *Lb. plantarum* and by the *tet(S)* gene in four *Lc. lactis* subsp. *lactis* and seven *St. infantarius* subsp. *infantarius*.

Ten isolates among the 1583 isolates of *fènè* microbiota belong to four strain clusters of the novel species *Vagococcus teuberi* sp. nov. *V. teuberi* was phenotypic resistant to tetracycline (minimal inhibition concentration (MIC) 64 µg/ml) and trimethoprim (MIC 256 µg/ml), but harbored only the trimethoprim resistance gene *dfr(G)*.

The screening of 51 antibiotic susceptible LAB strains on acidification properties, antimicrobial activity and exopolysaccharide production led to the development of a defined two-species starter culture consisting of *St. thermophilus* (industrial culture to replace *St. infantarius* subsp. *infantarius*) and *Lb. plantarum* and a defined multi-species starter culture (DMS) consisting of *St. thermophilus*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *W. paramesenteroides*. Both cultures showed high antimicrobial activity against *Listeria ivannovii* HPB28 and *Enterococcus faecalis* DSM 2048^T at 30°C and 35°C as well as high acidification and stability during five back-slopping cultures at 35°C and 40°C. The DMS and an industrial *St. thermophilus* starter culture were applied at ambient temperature (27-36°C) in small-scale fermentations in Mali. Fastest acidification was found for the DMS, reaching pH 4.8 ± 0.2 within 9 hours.

Conclusion:

The microbial composition of spontaneous *fènè* fermentation processes was dependent on season, environment of production-type and showed elevated biodiversity of lactic acid bacteria. Opportunistic pathogens are predominant in *fènè* microbiota beside lactobacilli, lactococci, pediococci and *Weissella* and the key microorganism for spontaneous *fènè* fermentation is the animal and human pathogen *St. infantarius* subsp. *infantarius*. The *fènè* microbiota composes a gene pool of transferable antibiotic resistance genes, of which the same tetracycline resistance genes are found among different genera. Recontamination of heat-treated milk during fermentation is reduced but not eliminated with the application of starter cultures. Food safety and quality of *fènè* can be improved through standardized and temperature-controlled fermentation processes, rigorous hygienic control and the ban of uncontrolled antibiotic use in animal husbandry.

Summarized, we analyzed the first time growth dynamics and strain fluctuations of spontaneous *fènè* fermentation processes, described the novel species *V. teuberi* sp. nov., determined a remarkably high tetracycline gene pool, and finally developed a safe and adapted starter culture, which's application has been proven at small-scale production in rural Mali.

Zusammenfassung

Hintergrund:

Mali hat eine ausgeprägte landwirtschaftliche Tradition, die immer noch auf extensiven Produktionssystemen basiert obwohl Milch ein wichtiger Eiweisslieferant in der lokalen Ernährung darstellt und für die nationale Wirtschaft von grosser Bedeutung ist. Die traditionelle Herstellung von *fènè* – eine spontan fermentierte Sauermilch – entwickelt sich in Richtung kommerzielle Produktion und bildet eine wesentliche Basis für die wirtschaftliche Entwicklung. Leider weist einheimische Milch, die auf dem lokalen Markt informell verkauft wird, eine ungenügende hygienische Qualität auf. Dies weil die Bauern ihre Milch nicht täglich verkaufen können, und keine national organisierte Milchindustrie die Milch verarbeitet. Eine wirtschaftlich nachhaltige Produktion von mikrobiologisch einwandfreien Milchprodukten, mit speziellem Bezug auf den spontanen *fènè* Fermentierungsprozess, welcher bis jetzt noch nicht untersucht wurde, würde die Bevölkerung mit sicheren und somit gesünderen lokalen Nahrungsmitteln versorgen und den Bauern ein regelmässiges Einkommen ermöglichen.

Ziele:

Als erstes Ziel wurde die Mikroflora von Sauermilchfermentationsprozessen analysiert und untersucht, ob die Produktionsart oder die Jahreszeit einen Einfluss auf die bakterielle Zusammensetzung der *Fènè*-Mikroflora hat. Das Hauptziel war anschliesslich das Entwickeln einer sicheren und adaptierten Starterkultur, mit welcher qualitativ ausgezeichnete und mikrobiell sicherere *Fènè* hergestellt werden kann. Dafür wurden Sicherheitsaspekte, wie Antibiotikaresistenz in Bakterien oder opportunistisch pathogene Bakterien genau untersucht.

Resultate:

Die komplexe symbiotische *Fènè*-Mikroflora, potentielle humanpathogene Bakterien und eine neue Bakterienspezies konnten mit einer einfachen aber wirkungsvollen Typisierungsstrategie auf Stammesniveau bestimmt werden. Die Diversität der bakteriellen *Fènè*-flora wurde während den drei Jahreszeiten, d.h. der heissen Jahreszeit, der kalten Jahreszeit und der Regenzeit in Mali untersucht. Die dafür benötigten Proben wurden auf einem Familienhof und in einer Kleinmolkerei gesammelt. Total wurden 1583 Gram-positive und katalase-negative Bakterien von 98 Proben isoliert. Die Genera *Enterokokkus* und *Streptokokkus* dominierten über eine Mikroflora

die eine hohe Biodiversität an folgenden Milchsäurebakterien (MSB) aufwies [Anzahl Isolate / Anzahl Stämme]: *Lactobacillus fermentum* (77/18), *Weissella confusa* (75/21), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (62/21), *Pediococcus pentosaceus* (36/30), *Lactobacillus plantarum* (24/9), *Weissella paramesenteroides* (11/3), *Lactococcus garvieae* (11), *Lactobacillus* sp. (10) and *Pediococcus acidilactici* (8/4). Dabei konnte gezeigt werden, dass bakterielle Verunreinigungen von der Umgebung der Kleinmolkerei in die erhitzte Milch gelangen und somit die spontane Fermentation der Milch zu *Fènè* verursachen.

Die Bakterienpopulation sowie die Biodiversität der Bakterien auf Stammesniveau wurden durch die Jahreszeiten und die unterschiedlichen Produktionsverfahren beeinflusst. Von total 126 bestimmten Stämmen wurden nur vier Stämme in mindestens zwei Jahreszeiten und sieben Stämme in der *Fènè*produktion auf dem Familienhof und der Kleinmolkerei gefunden.

Die höchsten Bakterienzahlen wurden für vermutliche Laktobazillen, Laktokokken und Enterokokken mit jeweils 9.2 ± 0.5 , 9.2 ± 0.3 and 8.8 ± 0.3 Log_{10} keimbildender Einheiten (KBE)/ml in der heissen Jahreszeit und die tiefsten mit jeweils 7.9 ± 0.5 , 8.2 ± 0.8 and 7.8 ± 1.0 Log_{10} (KBE/ml) in der Regenzeit gefunden. Die Bakterienzahlen wurden nicht von der Produktionsart beeinflusst, ausser, dass die Zahlen von vermutlichen *Enterobacteriaceae* mit 7.1 ± 0.4 Log_{10} (KBE/ml) in *Fènè*, welcher in der Kleinmolkerei produziert wurde, am tiefsten waren.

Vermutliche *Enterobacteriaceae* ($6.5 - 9.0$ Log_{10} (KBE/ml)) und *Staphylococcus aureus* (5.2 ± 0.9 Log_{10} (KBE/ml)) deuten auf ein hohes Gesundheitsrisiko für die Bevölkerung hin. Diese Gefahr wurde erhärtet, nachdem von den 1583 Isolaten aus der *Fènè*mikroflora 596 als Enterokokken und 454 als Streptokokken identifiziert wurden. Die Identifizierung von *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* als mögliche dominierende Streptokokken Spezies und die überraschende Absenz von *St. thermophilus*, welcher gewöhnlich eine zentrale Rolle in der Sauermilchproduktion einnimmt, legen nahe, dass spontan fermentierter *Fènè* eine mögliche Übertragungsquelle von menschlichen Infektionserkrankungen darstellen kann.

29 Proben von traditionell hergestellter Sauermilch wurden in verschiedenen Dörfern in Mali, Kenia und Somalia gesammelt und auf das Vorkommen von Bakterien die zum *St.*

bovis / *St. equinus* Komplex (SBSEK) gehören und dessen aufgenommene Antibiotikaresistenzen untersucht. Es wurden 95 *St. infantarius* subsp. *infantarius* und 26 *St. gallolyticus* subsp. *macedonicus* Isolate mittels PCR, RFLP und rep-PCR bestimmt. 13 von 20 SBSEK Bakterien, welche von unterschiedlichen Proben isoliert wurden, waren tetracyclinresistent und trugen die entsprechenden Resistenzgene *tet(L)*, *tet(M)* und *tet(S)*. Fünf dieser Bakterien zeigten Multiresistenzen gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Gentamicin, Neomycin, Penicillin, Streptomycin und Tetracycline und nur fünf dieser Bakterien waren empfindlich gegenüber alle 11 getesteten Antibiotika. Kombinierte Erythromycin und Tetracycline Resistenz von zwei *St. gallolyticus* subsp. *macedonicus* Stämmen basierte auf den Resistenzgenen *erm(B)* und *tet(M)*.

118 Enterokokken und 84 nicht-Enterokokken MSB wurden auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl tetracyclineresistenter Bakterien in direktem Zusammenhang zu der Menge verkaufter Oxytetracycline in der vorangegangenen Jahreszeit stand. Es wurden jeweils 40%, 26% und 17% tetracycline resistente Enterokokken in der kalten und heißen Jahreszeit sowie der Regenzeit gefunden. Tetracyclineresistente Enterokokken besaßen folgende Resistenzgene: *tet(L)*, *tet(M)* und *tet(S)*. Die Tetracyclineresistenz überwiegt mit 17% auch bei nicht-Enterokokken MSB. Dabei wurde die Tetracyclinresistenz bei einem *Lb. plantarum* durch das *tet(M)* Gen und bei vier *Lc. lactis* subsp. *lactis* und sieben *St. infantarius* subsp. *infantarius* durch das *tet(S)* Gen induziert.

Zehn von 1583 Isolaten der Fäunemikroflora gehörten zur neuen Spezies *Vagococcus teuberi* sp. nov. und konnten in vier verschiedene Stammgruppen eingeteilt werden. *V. teuberi* DSM 21459^T zeigte phenotypische Tetracycline- (minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) 64 µg/ml) und Trimethoprimresistenzen (MHK 256 µg/ml), trug aber nur das Trimethoprimresistenzgen *dfr(G)*.

51 antibiotikaempfindliche MSB-Stämme wurden auf ihre Ansäuerungseigenschaften, antimikrobielle Aktivität und Exopolysaccharidproduktion getestet. Schliesslich konnte eine Zweispeziesstarterkultur, bestehend aus *St. thermophilus* (Industriekultur um *St. infantarius* subsp. *infantarius* zu ersetzen) und *Lb. plantarum* und eine Multispeziesstarterkultur (MSK), bestehend aus *St. thermophilus*, *Lb. fermentum*, *Lb.*

plantarum, *Lc. lactis* subsp. *lactis* und *W. paramesenteroides*, entwickelt werden. Beide Kulturen zeigten hohe antimikrobielle Aktivität gegen *Listeria ivannovii* HPB28 und *Enterococcus faecalis* DSM 2048^T bei 30°C und 35°C sowie gute Ansäuerungseigenschaften und Stabilität während fünf „back-slopping“ Kulturen bei 35°C und 40°C. Die Anwendung der MSK sowie einer industriellen *St. thermophilus* Starterkultur wurde bei Umgebungstemperatur (27°C – 36°C) in der Kleinmolkerei in Mali getestet. Die beste Ansäuerung zeigte die MSK und erreichte ein pH von 4.8±0.2 nach 9 h. Erneute bakterielle Verunreinigungen erhitzter und beimpfter Milch konnten durch den Einsatz von Starterkulturen nicht eliminiert aber gegenüber der traditionellen Fènerstellung reduziert werden.

Schlussfolgerungen:

Die Zusammensetzung der Mikroflora von spontanen Fènermentierungsprozessen wurde durch die Jahreszeiten und die Produktionsarten beeinflusst und zeigte eine hohe Biodiversität. Die Fènemikroflora wurde von mutmasslich pathogenen Bakterien dominiert und der tier- und humanpathogene *St. infantarius* subsp. *infantarius* stellte sich als Schlüsselorganismus in der Milchfermentation zu Fèner heraus. Im Weiteren stellt die Fènemikroflora einen Genpool von transferierbaren Antibiotikaresistenzgenen dar, wovon dieselben Tetracyclineresistenzgene in verschiedenen Genera der Fènemikroflora gefunden wurden. Erneute Verunreinigungen erhitzter Milch mit vermeintlich pathogenen Bakterien konnte mit dem Einsatz von Starterkulturen reduziert aber nicht verhindert werden. Das beste Ansäuerungsverhalten zeigte die neu entwickelte Multispeziesstarterkultur in Laborexperimenten und der Fènerproduktion in der Kleinmolkerei in Mali. Die Lebensmittelsicherheit und Produktequalität von Fèner könnte stark erhöht werden, indem standardisierte und temperaturkontrollierte Fermentationsprozesse in Kleinmolkereien implementiert würden, rigorose Hygienemassnahmen eingeführt würden und der unkontrollierte Einsatz von Antibiotika in der Viehwirtschaft verhindert würde.

Wir analysierten das erste Mali Wachstumsdynamik und Stammfluktuationen im spontanen Fèner Fermentationsprozess, beschrieben die neue Spezies *V. teuberi* sp. nov., bestimmten einen sehr hohen tetracyclineresistenz Genpool und schliesslich entwickelten eine sichere und angepasste Starterkultur, deren Anwendung für die Kleinproduktion im ländlichen Mali gezeigt werden konnte.

Résumé

Fond:

L'agriculture malienne est encore aujourd'hui basée sur un système de production extensive et est d'une grande importance pour l'économie du pays. Le lait est généralement consommé sous forme de lait fermenté spontanément (*fènè*), et joue un rôle primordial dans la vie sociale et économique. Le lait est la principale source de protéines dans l'alimentation quotidienne des Maliens. Les laits produits localement et vendus dans les marchés locaux ont malheureusement une qualité hygiénique médiocre. En effet les producteurs ou bergers ne peuvent pas vendre quotidiennement leur lait car il n'existe pas d'industrie laitière qui transforme le lait local au Mali. Une production durable des produits laitiers sains en termes de la qualité microbienne, surtout dans le processus de la fermentation spontanément du *fènè*, qui n'est pas du tout étudié, conféra à une alimentation saine pour les consommateurs et des revenus réguliers aux producteurs/bergers.

Objectifs:

Le premier l'objectif de cette étude était d'analyser l'effet des saisons et des processus de la fabrication du *fènè* sur la diversité des souches dans la microflore du *fènè* pendant la fermentation spontanée. Le second objectif était orienté sur le développement d'un ferment adapté pour la production de *fènè* de qualité sûre. Les aspects de la sécurité liés à la résistance des bactéries aux antibiotiques et aux bactéries opportunistes pathogènes sont analysés en détail.

Résultats:

Une stratégie simple et efficace pour la quantification et l'identification des souches bactériennes individuelles a été testée pour déterminer la composition complexe de la microflore symbiotique du *fènè*, et démontrer des niveaux élevés des bactéries potentiellement pathogènes pour l'homme. Cela a permis la découverte d'espèces bactériennes nouvelles dans les matrices complexes d'aliment. La diversité de la microflore naturelle du *fènè* a été analysée pendant trois saisons (chaude, fraîche et hivernale) dans une production de taille familiale et dans une mini-laiterie. Un total de 1583 bactéries catalase-négative à Gram positive a été isolé de 98 échantillons de *fènè*. Les entérocoques et les streptocoques dominaient avec une biodiversité élevée des bactéries acido lactiques (BAL) identifiées avec [isolats/souches]: *Lactobacillus*

fermentum (77/18), *Weissella confusa* (75/21), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (62/21), *Pediococcus pentosaceus* (36/30), *Lactobacillus plantarum* (24/9), *Weissella paramesenteroides* (11/3), *Lactococcus garvieae* (11), *Lactobacillus* sp. (10) et *Pediococcus acidilactici* (8/4).

L'équipement et l'environnement de la mini-laiterie sont les points d'entrée des contaminations bactériennes dans le lait préalablement chauffé utilisé pour la production du *fènè* dans la mini-laiterie. La saison et le type de production ont un effet significatif ($p < 0.05$) sur la diversité des souches et les populations bactériennes. Seulement quatre souches ont été isolées plusieurs fois pendant deux saisons et seulement sept souches ont été isolées de la production familiale et de la production dans la mini-laiterie pendant la même saison sur un total de 126 souches. Le nombre de bactéries était plus élevé pour les lactobacilles, lactocoques et les entérocoques présumés étaient déterminés avec $9,2 \pm 0,5$, $9,2 \pm 0,3$ and $8,8 \pm 0,3$ Log_{10} unités formant des colonies (ufc)/ml pendant la saison chaude et les nombres plus bas avec $7,9 \pm 0,5$, $8,2 \pm 0,8$ and $7,8 \pm 1,0$ Log_{10} (ufc/ml) pendant la saison hivernale, respectivement. Le procédé de la fabrication du *fènè* n'a pas eu d'effet sur les populations microbiennes, sauf pour le nombre d'*Enterobacteriaceae* présumés avec moins de $7,1 \pm 0,4$ Log_{10} (ufc/ml) dans la production de la mini-laiterie.

Le nombre d'*Enterobacteriaceae* présumés ($6,5 - 9,0$ Log_{10} (ufc/ml)) et de *Staphylococcus aureus* ($5,2 \pm 0,9$ Log_{10} (ufc/ml)), pendant la saison chaude indique un danger significatif pour la santé des consommateurs. Ceci est corroboré par l'identification de 596 entérocoques et 454 streptocoques comme populations dominantes. L'identification du *St. infantarius* subsp. *infantarius* comme espèce dominante présumée des streptocoques et l'absence frappante de *St. thermophilus* – normalement occupant un rôle central dans la fermentation des laits acidifiés – montre que le *fènè* fermenté spontanément peut être une source de transmission des infections pathogènes pour l'homme.

Les bactéries du complexe *St. bovis* / *St. equinus* (CSBSE) se sont révélées comme l'espèce dominante et l'acidifiant principal dans les fermentations spontanées du *fènè*. Près de 29 laits acidifiés traditionnels ont été collectés dans la périphérie de Bamako (Mali), au Kenya et en Somalie et investigé pour la présence des bactéries CSBSE et les

résistances aux antibiotiques. 95 *St. infantarius* subsp. *infantarius* et 26 *St. gallolyticus* subsp. *macedonicus* ont été isolés et typés par PCR, RFLP et rep-PCR jusqu'au niveau des groupes des souches. 13 des 20 bactéries CSBSE sélectionnées et isolées des différents produits montraient une résistance contre la tétracycline et portaient les gènes résistants aux antibiotiques *tet(M)*, *tet(L)* et *tet(S)*. Cinq de ces souches montraient une multi-résistance contre ampicilline, chloramphénicol, clindamycine, érythromycine, gentamicine, néomycine, pénicilline, streptomycine et tétracycline et seulement cinq étaient sensibles à tous les onze antibiotiques testés. La résistance combinée d'érythromycine et de tétracycline de deux souches de *St. gallolyticus* subsp. *macedonicus* était basée aux gènes de résistance d'*erm(B)* et de *tet(M)*.

118 entérocoques et 84 non-entérocoques BAL étaient testés sur la susceptibilité aux antibiotiques. La résistance contre la tétracycline était directement liée aux ventes d'oxytétracycline dans la saison précédente, avec 40%, 26% et 17% d'entérocoques résistantes à la tétracycline trouvées pendant les saisons froide, chaude et hivernale, respectivement. Les entérocoques résistantes à la tétracycline portaient les gènes de résistance *tet(L)*, *tet(M)* et *tet(S)*. La résistance contre la tétracycline était aussi dominante avec 17% parmi des non-*Enterococcus* BAL et était représentée par le gène *tet(M)* dans un *Lb. plantarum* et par le gène *tet(S)* dans quatre *Lc. lactis* subsp. *lactis* et sept *St. infantarius* subsp. *infantarius*.

Dix isolats parmi 1583 de la microflore du fène correspondaient à quatre groupes de souches de la nouvelle espèce *Vagococcus teuberi* ssp. nov. *V. teuberi* qui était phénotypiquement résistante à la tétracycline (CMI (concentration minimal d'inhibition) 64 µg/ml) et triméthoprim (CMI 256 µg/ml), mais portait seulement le gène de résistance triméthoprim *dfr(G)*.

La sélection de 51 BAL sensibles aux antibiotiques d'après leur propriété d'acidification, activité antimicrobienne et leur production des exopolysaccharides a abouti au développement d'un ferment composé de deux espèces constitué de *St. thermophilus* (un ferment industriel pour remplacer le *St. infantarius* subsp. *infantarius*) et *Lb. plantarum* ainsi que d'un ferment défini multi-espèces (FME) constitué de *St. thermophilus*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *W. paramesenteroides*. Les deux ferments montraient des activités antimicrobiennes élevées contre *Listeria invannovii* HPB28 et

Enterococcus faecalis DSM 2048^T à 30°C et 35°C et aussi un potentiel d'acidification élevé et une bonne stabilité pendant cinq cultures « back-slopping » à 35°C et 40°C. Le FME et un ferment industriel de *St. thermophilus* étaient appliqués dans les fermentations du *fèné* à la mini-laiterie au Mali à température ambiante (27°C-36°C). L'acidification s'est déroulée plus rapidement pour le FME à un pH de 4.8±0.2 après 9 heures. La recontamination du lait chauffé et inoculé par le ferment par les pathogènes opportunistes était plus faible mais pas complètement éliminé comparativement à la fermentation traditionnelle du *féné*.

Conclusion:

La composition de la microflore de la fermentation spontanée du *fèné* dépend de la saison et de l'environnement de production et montre une biodiversité élevée des bactéries lactiques. Les pathogènes opportunistes sont dominants à côté des lactobacillies, lactocoques, pedicocoques et *Weissella* dans la microflore du *fèné* et la bactérie principale de la fermentation spontanée du *fèné* est le pathogène pour les animaux et les hommes *St. infantarius* subsp. *infantarius*. La microflore du *fèné* contient un pool de gènes de résistances aux antibiotiques transférables. Les mêmes gènes de résistance à la tétracycline ont été trouvés parmi plusieurs genres. La recontamination du lait chauffé pendant la fermentation était réduite mais pas éliminée avec l'application de ferment. L'acidification rapide a été confirmée au laboratoire et à la mini-laiterie pour le nouveau ferment défini multi-espèces. La sécurité alimentaire et la qualité du *fèné* pourraient augmenter avec une fermentation standardisée et contrôlée en température, des mesures hygiéniques rigoureuses et l'interdiction d'utilisation d'antibiotiques non-contrôlés dans l'élevage.

En résumé, nous avons analysé pour la première fois les dynamiques de croissance et les fluctuations des souches dans la fermentation spontanément du *fèné*, caractérisé la nouvelle souche *V. teuberi* sp. nov., déterminé un grand pool de gènes de résistance à la tétracycline et finalement développé un ferment sûr et adapté, dont l'application a été prouvée en production rurale au Mali.