

SÉLECTION DE SOUCHES DE BACTÉRIES LACTIQUES ANTIBACTÉRIENNES (*)

Hicham LABIOUI ⁽¹⁾, ***Laaroussi ELMOUALDI*** ⁽¹⁾,
Mohammed EL YACHIOUI ⁽¹⁾, ***Mohammed OUHSSINE*** ⁽¹⁾

Les bactéries lactiques peuvent synthétiser des substances antibactériennes et sont utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments. Vingt souches de bactéries lactiques appartenant notamment aux genres Streptococcus, Lactobacillus, Enterococcus et Lactococcus ont été sélectionnées à partir de lait de vache, de jus de presse de canne à sucre avant et après chaulage.

La souche BL_{h5} du genre Streptococcus, a été retenue pour sa forte activité bactéricide, notamment vis-à-vis de Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25921, Salmonella enteritidis et Streptococcus agalactiae.

Cette activité antibactérienne est due à une substance extracellulaire, de nature protéique et thermostable.

(*) *Manuscrit reçu le 20 août 2005.*

(1) *Laboratoire de biotechnologie microbienne, Département de Biologie, UFR Amélioration et transformation microbienne et végétale, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofaïl, 14000 Kénitra, BP 133, Maroc. hicham19772000@yahoo.fr, elmoualdi@yahoo.fr, ouhssine40@yahoo.fr, elyachioui@hotmail.com*

INTRODUCTION

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique. Elles appartiennent à divers genres comme *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloicoccus* et *Carnobacterium*.

Elles interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires : saumurage des légumes, boulangerie, fabrication du vin, saurissage des poissons, des viandes et des salaisons, etc. Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques.

Elles fermentent les glucides en acide lactique, d'où une diminution du pH favorable à la conservation des aliments. Leur pouvoir antagoniste résulte aussi d'une compétition pour les substrats et, si les conditions de développement sont favorables [5], de l'élaboration de bactériocines [11] comme la nisine [7,13].

Les bactériocines sont des peptides antibactériens [8]. Elles présentent un spectre d'activité étroit envers des espèces pathogènes [1]. Elles ont un optimum de stabilité, de solubilité et d'activité à pH acide. Elles sont inactivées par les protéases et sont thermostables.

Dans le présent travail, nous avons isolé des souches lactiques, testé leur pouvoir acidifiant, leur effet bactéricide et recherché la nature des substances inhibitrices.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Isolement et identification des souches lactiques

Vingt souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir de trois biotopes différents : lait de vache (BL_{h1} à BL_{h4}) jus de presse de la Canne à sucre (BL_{h5} à BL_{h14}), et jus de presse additionné de lait de chaux (BL_{h15} à BL_{h20}), le chaulage étant une étape de la transformation des tiges de canne à sucre permettant la précipitation d'impuretés. Seules les bactéries à Gram positif et catalase négative ont été retenues.

L'isolement est réalisé sur milieu MRS (Difco, Detroit, USA) [6] solide, milieu adapté à la recherche spécifique des lactobacilles. Les cultures sont incubées 24 heures à 30°C dans des boîtes de Petri à l'obscurité. La purification est effectuée par quatre repiquages successifs d'étalement en milieu MRS solide. La conservation se fait sur milieu MRS incliné à +4°C en tubes à essais à l'obscurité.

L'identification est établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : catalase, température de croissance, production de gaz carbonique, fermentation de divers sucres [12].

pH des bactéries lactiques en milieu MRS liquide

Les vingt souches bactériennes ont été cultivées trois jours sur milieu MRS liquide dans des fioles à $30 \pm 2^\circ\text{C}$ et à l'obscurité.

Les pH initial et final sont mesurés à l'aide d'un pH mètre type Orion Research à électrode combinée. Le titrage de l'acidité est effectué sur 10 ml de culture par une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N à l'aide d'une burette de Mohr à robinet, en présence d'une goutte d'une solution méthanolique de phénophtaléine à 1 % utilisée comme indicateur coloré. L'acidité est exprimée en mg d'acide lactique (PM = 90,08 g) par 100 ml de culture.

Pouvoir antibactérien des souches

Les nombreuses méthodes décrites pour la détection de souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible. La production de bactériocine est détectée par le pouvoir inhibiteur du filtrat du micro-organisme testé sur la croissance du germe cible [3].

Les vingt souches de bactéries lactiques après culture sur milieu MRS trois jours à 30°C sont testées pour leur pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion [2] en milieu gélosé de TSA (Tryptic Soja Agar, Difco, Detroit, USA).

On réalise deux à trois puits par boîte de Petri de 5 mm de diamètre, à raison de quatre boîtes par condition et avec trois répétitions à des moments différents.

Les boîtes sont inondées par la souche pathogène *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, puis les puits sont remplis par 60 à 80 µl de surnageant filtré, obtenu après centrifugation à 10 000 tours /min de 20 ml du milieu MRS cultivé avec la souche lactique. Le surnageant a été neutralisé par NaOH 0,1N de façon à obtenir un pH de 6,50, puis on ajoute quelques gouttes de catalase pour éliminer l'effet du peroxyde d'oxygène. Après incubation 24 heures à $30 \pm 2^\circ\text{C}$, les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits sont mesurés (moyenne de deux diamètres perpendiculaires).

Spectre antibactérien des souches à fort pouvoir acidifiant

Pour les tests d'activité antibactérienne, nous avons choisi une large gamme de sept micro-organismes pathogènes. Ils ont été isolés et identifiés à partir de produits biologiques contaminés au Laboratoire de recherche et d'analyses médicales de la Gendarmerie royale de Rabat. Toutes ces souches ont été testées pour leur résistance en utilisant des galeries ATB® (Biomérieux SA, France).

Souches pathogènes	Prélèvement
Gram négatif	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25921	urinaire
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	urinaire
<i>Proteus mirabilis</i>	urinaire
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	de pus
<i>Salmonella enteritidis</i>	coproculture
Gram positif	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	urinaire
<i>Streptococcus agalactiae</i>	vaginal

Ces sept souches sont purifiées et conservées sur gélose nutritive inclinée TSA (Tryptic Soja Agar) à $+4^\circ\text{C}$ à l'obscurité. Avant leur utilisation dans les tests d'inhibition, elles ont été activées par transfert sur bouillon nutritif et incubées 16 à 18 heures à 37°C .

Les trois souches lactiques les plus performantes pour leur pouvoir acidifiant, BL_{h5}, BL_{h10} et BL_{h17}, qui étaient stockées à +4°C, ont été activées avant leur utilisation dans les tests d'inhibition par transfert sur bouillon MRS, enrichi avec 2 % d'extrait de levure pour optimiser le milieu de culture, puis incubées 24 heures à 30°C afin d'obtenir des cellules jeunes avec un rendement maximal en substances inhibitrices. Un volume de 20 ml est centrifugé dix minutes à 10 000 tours /min. Le filtrat est conservé à +4°C à l'obscurité après neutralisation et ajout de quelques gouttes de catalase pour éliminer l'effet de peroxyde d'oxygène.

Comme précédemment, on utilise la méthode de diffusion en milieu gélosé TSA pour mettre en évidence le pouvoir bactéricide.

Localisation de la substance inhibitrice de la souche BL_{h5}

À partir d'une culture de la souche BL_{h5} en milieu MRS liquide, incubée 24 heures à 30 ± 2°C, un volume de 50 ml de culture est centrifugé dix minutes à 10 000 tours / min. Les tests d'inhibition sont réalisés comme précédemment à la fois sur le surnageant, représentant la fraction extracellulaire, et sur le culot, correspondant à la fraction cellulaire. L'influence de la neutralisation et de l'addition de quelques gouttes de catalase a été testée sur ces deux fractions. Pour chacun des sept pathogènes, quatre boîtes de Petri avec deux puits par boîtes (avec et sans neutralisation et ajout de catalase) ont été utilisées avec trois répétitions.

Confirmation de la présence de bactériocines

Les bactéries lactiques peuvent produire des substances inhibitrices différentes des bactériocines. Pour éliminer l'effet des acides organiques, notamment des acides lactique et acétique, le surnageant a été neutralisé à pH 6,5 par une solution de NaOH 0,1N. Afin d'éliminer le peroxyde d'hydrogène accumulé dans le milieu de culture, le surnageant a aussi été traité deux heures par une catalase à 30°C avant de procéder au test d'inhibition.

Les bactériocines étant connues pour être des protéines résistant à des températures élevées, la thermostabilité des substances inhibitrices a été testée par chauffage à 100°C pendant 0, 15, 20, et 30 min des surnageants de la souche BL_{h5}. Comme précédemment, on utilise la méthode de diffusion en milieu gélosé TSA pour mettre en évidence le pouvoir bactéricide sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec trois répétitions.

RÉSULTATS

Activité antibactérienne et pouvoir acidifiant des vingt souches isolées

Parmi les vingt souches de bactéries lactiques, six sont sans activité et seulement trois, BL_{h5}, BL_{h10} et BL_{h17} présentent une forte activité antibactérienne contre *Escherichia Coli* ATCC25921 (Tableau I).

Ces souches appartiennent aux genres *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Lactococcus*.

Tableau I :
Effet antibactérien vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de vingt souches de bactéries lactiques par la méthode de diffusion sur milieu solide Tryptic Soja Agar.

Biotope	Souche	Genre	Test bactéricide
Lait de vache	BL _{h1}	<i>Lactococcus</i>	+
	BL _{h2}	<i>Lactobacillus</i>	++
	BL _{h3}	<i>Lactobacillus</i>	-
	BL _{h4}	indéterminé	-
Jus de presse de Canne à sucre	BL _{h5}	<i>Streptococcus</i>	+++
	BL _{h6}	indéterminé	++
	BL _{h7}	indéterminé	+
	BL _{h10}	<i>Enterococcus</i>	+++
	BL _{h11}	<i>Enterococcus</i>	+
	BL _{h12}	<i>Lactococcus</i>	-
	BL _{h13}	indéterminé	-
	BL _{h14}	<i>Streptococcus</i>	-
Jus de presse de Canne à sucre après chaulage	BL _{h15}	<i>Lactobacillus</i>	+
	BL _{h16}	<i>Lactobacillus</i>	++
	BL _{h17}	<i>Lactobacillus</i>	+++
	BL _{h18}	indéterminé	-
	BL _{h19}	indéterminé	+
	BL _{h20}	<i>Streptococcus</i>	++

+ : positif

- : négatif

Le suivi du pH et de l'acidité montre une diminution progressive du pH pour toutes les souches isolées. La souche BL_{h5} s'avère la plus performante avec 0,37 mg d'acide lactique par 100 ml de milieu de culture (Tableau II).

Tableau II :
pH et acidité de vingt souches de bactéries lactiques cultivées en milieu MRS liquide trois jours à 30°C à l'obscurité.

Souche	pH initial	pH final	Acidité mg d'acide lactique / 100 ml
BL _{h1}	6,58	4,45	0,18
BL _{h2}	6,58	4,84	0,14
BL _{h3}	6,58	3,93	0,25
BL _{h4}	6,58	4,23	0,21
BL _{h5}	6,58	3,75	0,37
BL _{h6}	6,58	4,40	0,11
BL _{h7}	6,58	4,04	0,25
BL _{h10}	6,58	3,86	0,30
BL _{h11}	6,58	4,12	0,21
BL _{h12}	6,58	4,02	0,23
BL _{h13}	6,58	3,82	0,14
BL _{h14}	6,58	4,16	0,11
BL _{h15}	6,58	4,08	0,27
BL _{h16}	6,58	3,98	0,30
BL _{h17}	6,58	3,87	0,35
BL _{h18}	6,58	4,00	0,28
BL _{h19}	6,58	3,96	0,21
BL _{h20}	6,58	4,22	0,20

Spectre antibactérien des trois souches les plus acidifiantes

Les souches BL_{h5}, BL_{h10} et BL_{h17}, retenues pour leur pouvoir acidifiant important, possèdent un fort effet bactéricide vis-à-vis des germes pathogènes utilisés (Tableau III, Photo 1).

La souche BL_{h5} présente une activité bactéricide forte sur *Escherichia coli* ATCC 25921, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Klebsiella pneumoniae*, avec une zone d'inhibition de plus de 30 mm (Tableau III). Les deux autres souches sont moins actives. *Proteus mirabilis* leur est totalement résistant.

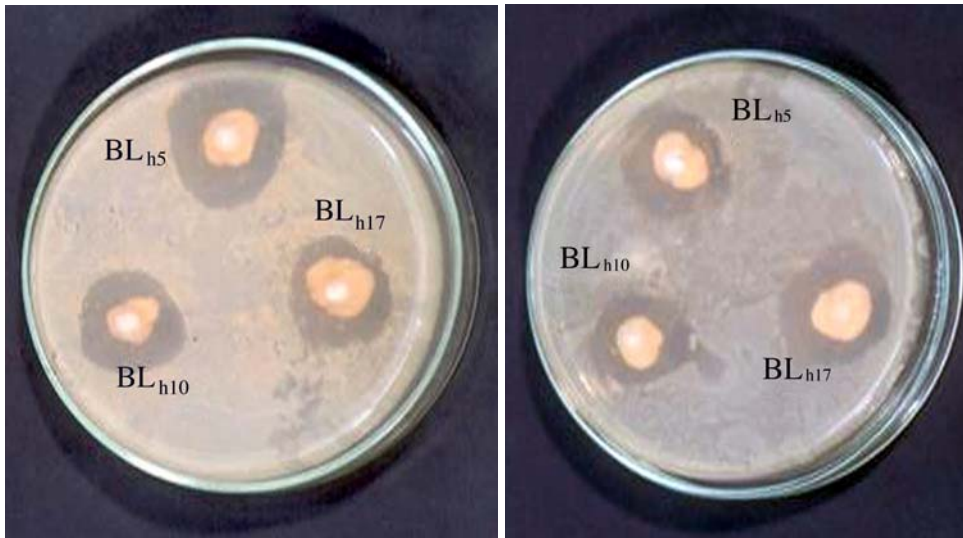


Photo 1 : Activité antibactérienne des souches lactiques BL_{h5}, BL_{h10} et BL_{h17} vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (1) et *Streptococcus agalactiae* (2) par la méthode de diffusion sur milieu Tryptic Soja Agar après 24 heures d'incubation à 30°C à l'obscurité.

Localisation de l'effet inhibiteur de la souche BL_{h5}

La fraction cellulaire (culot) ne présente aucun effet sur la croissance des souches bactériennes utilisées (Tableau IV). Par contre, la fraction extracellulaire correspondant au surnageant présente un fort pouvoir antibactérien (Photo 2).

Tableau III :
Diamètre de la zone d'inhibition de trois bactéries lactiques vis-à-vis de sept souches pathogènes par la méthode de diffusion sur milieu TSA après 24 heures à 30°C à l'obscurité.

Souche pathogène	diamètre d'inhibition (mm)		
	BL5	BL10	BL17
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25921	31,5 ± 1,1	27,6 ± 1,0	22,5 ± 0,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25,7 ± 0,2	20,4 ± 0,5	24,4 ± 0,5
<i>Proteus mirabilis</i>	27,2 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	19,4 ± 1,0	23,2 ± 0,4	22,6 ± 0,1
<i>Salmonella enteritidis</i>	28,2 ± 1,0	23,2 ± 0,3	20,3 ± 0,1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	32,5 ± 1,0	28,2 ± 1,0	23,3 ± 0,3
<i>Streptococcus agalactiae</i>	30,3 ± 1,0	23,5 ± 0,5	25,2 ± 0,6

Tableau IV :
Activité antibactérienne des fractions cellulaire et extracellulaire neutralisées et additionnées de catalase de la souche BL₅ par la méthode de diffusion sur milieu TSA après 24 heures à 30°C à l'obscurité.

Souche pathogène	diamètre d'inhibition (mm)	
	Surnageant (fraction extracellulaire)	Culot (fraction cellulaire)
Gram négatif		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25921	29,2 ± 1,0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	27,2 ± 0,5	0
<i>Proteus mirabilis</i>	23,4 ± 0,4	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	19,5 ± 0,2	0
<i>Salmonella enteritidis</i>	28,2 ± 0,6	0
Gram positif		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	33,3 ± 1,0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	30,1 ± 1,0	0



Photo 2 : Effet antibactérien vis-à-vis de Proteus mirabilis (boîte de gauche) et Klebsiella pneumoniae (boîte de droite) de la fraction extracellulaire de la souche BL_{h5} avec (à droite) ou sans (à gauche) neutralisation et action de la catalase, par la méthode de diffusion sur milieu Tryptic Soja Agar après 24 heures d'incubation à 30°C à l'obscurité.

L'effet inhibiteur est élevé pour les deux bactéries Gram positif *Staphylococcus aureus* (33 mm) et *Streptococcus agalactiae* (30 mm). Parmi les bactéries Gram négatif, il est élevé pour *Escherichia coli* (29 mm), et *Salmonella enteritidis* (28 mm).

La neutralisation du surnageant et l'ajout de catalase tendent à augmenter le degré d'inhibition (Photo 2).

Traitement thermique de la substance inhibitrice de la souche BL_{h5}

Quel que soit le temps de traitement thermique à 100°C, le surnageant garde son activité antibactérienne et la zone d'inhibition dépasse 30 mm (Photo 3).

Le témoin 0 min n'a pas subi de neutralisation et d'addition de catalase contrairement aux traitements thermiques pendant 15, 20 et 30 minutes et présente un diamètre d'inhibition plus faible.



Photo 3 : Effet antibactérien vis-à-vis de Staphylococcus aureus ATCC 25923 de la fraction extracellulaire de la souche BL_{h5} après traitement thermique à 100°C pendant 0, 15, 20 et 30 minutes par la méthode de diffusion sur milieu Tryptic Soja Agar après 24 heures d'incubation à 30°C à l'obscurité.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Sur vingt souches de bactéries lactiques isolées, l'activité bactéricide et le pourcentage d'acidité apparaissent très variables et sans relation apparente avec le biotope. Les trois souches les plus efficaces, BL_{h5}, BL_{h10} et BL_{h17} ne présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis des bactéries pathogènes. Elles sont toutes actives sur les Gram+, mais seule la souche BL_{h5} est efficace contre *Proteus mirabilis*, bactérie Gram-. Par sélection à partir de divers biotopes, il est donc possible de sélectionner des souches d'intérêt.

Les bactéries Gram+ sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques [9]. Les bactériocines sont surtout actives sur les pathogènes à Gram+ et agissent en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires [4]. Song et Richard [13] ont montré chez *Listeria*, bactéries à Gram positif, que les cellules résistantes aux bactériocines ont une membrane de composition différente de celle des cellules sensibles.

L'activité bactéricide de la souche BL_{h5} se retrouve exclusivement dans le milieu de culture. On a donc formation de substances extracellulaires.

Ces dernières diffèrent des acides organiques et du peroxyde d'oxygène. En effet, la neutralisation du surnageant et l'ajout de catalase n'entraînent pas de diminution du diamètre d'inhibition (Photo 2). L'élimination de l'effet de l'acide lactique et du peroxyde d'oxygène favoriserait plutôt l'activité des substances antibactériennes.

Pour un traitement à 100°C pendant 20 et 30 min, la zone d'inhibition importante suggère que la ou les molécules inhibitrices sont thermostables. Ces caractéristiques font penser qu'on a affaire à des bactériocines [10].

RÉFÉRENCES

- 1 - Aymerich (M.T.), Garriga (M.), Monfort (J.M.), Nes (I.), Hugas (M.) - Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. - *Food Microbiol.*, 2000, **17**(1), 33-45.
- 2 - Barefoot (S.F.), Klaenhammer (T.R.) - Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 1983, **45**(6), 1808-1815.
- 3 - Benkerroum (N.), Ghouati (Y.), Sandine (W.E.), Tantaoui-Elaraki (A.) - Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. - *Lett. Appl. Microbiol.*, 1993, **17**(2), 78-81.

- 4 - Biswas (S.R.), Ray (P.), Johnson (M.C.), Ray (B.) - Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57**(4), 1265-1267.
- 5 - Callewaert (R.), De Vuyst (L.) - Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**(2), 606-613.
- 6 - De Man (J.C.), Rogosa (M.), Sharpe (M.E.) - A. medium for the cultivation of lactobacilli. - *J. Appl. Bacteriol.*, 1960, **23**, 130-135.
- 7 - Hurst (A.) - Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In Branen (A.L.), Davidson (P.M.), *Antimicrobials in foods*. 1983, New York: Marcel Dekker Inc., p. 327-351.
- 8 - Klaenhamner (T.R.) - Bacteriocins of lactic acid bacteria. - *Biochimie*, 1988, **70**, 337-349.
- 9 - Onda (T.), Yanagida (F.), Tsuji (M.), Shinohara (T.), Yokotsuka (K.) - Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. - *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, **87**(1-2), 153-159.
- 10 - Parente (E.), Ricciardi (A.), Addario (G.) - Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. - *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, **41**(4), 388-394.
- 11 - Piard (J.C.), Desmazeaud (M.J.) - Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. - *Lait*, 1992, **72**, 113-142.
- 12 - Sharpe (M.E.), Fryer (T.F.), Smith (D.G.) - Identification of the lactic acid bacteria. In Gibbs (B.M.), Skinner (F.A.) (Eds) *Identification methods for microbiologist's*. Part A. London: Acad. Press, 1966.
- 13 - Song (H.J.), Richard (J.) - Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. - *Int. J. Food Microbiol.*, 1997, **36**(2), 155-161.

ABSTRACT

Selection of antibacterial lactic bacteria strains

Lactic bacteria can synthesize antibacterial substances and are used in the fermentation and bioconservation of foods. Twenty strains of lactic bacteria, belonging notably to *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Lactococcus*, were selected from cow milk and sugar cane press juice before and after liming.

The BL_{h5} strain was retained for its strong bactericidal activity notably against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25921, *Salmonella enteritidis* and *Streptococcus agalactiae*.

This antibacterial activity was assigned to an extracellular substance which proved to be proteic and thermostable.

Key-words: bactericidal activity, lactic bacteria, *Streptococcus*.
