

**Inhibition de quelques bactéries pathogènes
et potentiellement pathogènes par
Streptococcus lactis, *Streptococcus thermophilus*,
Lactobacillus acidophilus
et *Lactobacillus helveticus***

par

G. DUBOIS*, Wanda SMORAGIEWICZ, R. CHARBONNEAU
et M. GAGNON

Centre de Recherches en Sciences Appliquées à l'Alimentation (C.R.E.S.A.L.A.^R)
Université du Québec à Montréal C.P. 8888, Succ. « A »
Montréal, H3C 3P8 (Canada)

R é s u m é

Streptococcus lactis, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus acidophilus* inhibent plus ou moins certaines bactéries pathogènes et potentiellement pathogènes, selon la méthode des stries croisées. Il semble que *Streptococcus lactis* produise une autre substance inhibitrice différente de la nisine ou de la lactostrepcine capable d'inhiber les bactéries Gram — ; elle serait plus efficace que celle produite par *Streptococcus thermophilus*. *Lactobacillus helveticus* semble produire une substance inhibitrice moins efficace que celle de *Lactobacillus acidophilus*.

Mots clés

Inhibition - *S. lactis* - *S. thermophilus* - *L. acidophilus* - *L. helveticus* - Pathogènes.

* Adresse actuelle : C.R.E.S.A.L.A.^R, Institut Armand-Frappier, 531, bd des Prairies, C.P. 100, Succ. L.D.R., Laval, Québec H7N 4Z3 (Canada)

Summary

INHIBITION OF SOME PATHOGENIC AND POTENTIALLY PATHOGENIC BACTERIA BY *STREPTOCOCCUS LACTIS*, *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*, *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* AND *LACTOBACILLUS HELVETICUS*

Streptococcus lactis, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus acidophilus* differently inhibits some pathogenic and potentially pathogenic bacteria as seen with the cross streaking technique. *Streptococcus lactis* seems to produce another inhibition substance different from nisin or lactostrepcin, which is able to inhibit the Gram — bacteria much more strongly than the one produced by *Streptococcus thermophilus*. *Lactobacillus helveticus* would produce an inhibitory substance less efficient than the one produced by *Lactobacillus acidophilus*.

Key words

Inhibition - *S. lactis* - *S. thermophilus* - *L. acidophilus* - *L. helveticus* - Pathogenic.

I. INTRODUCTION

De nombreux auteurs ont déjà démontré que certaines bactéries lactiques produisent des substances inhibitrices. Ainsi Hurst (1978) et Kozak *et al.* (1978) indiquent que *Streptococcus lactis* produit de la nisine ou de la lactostrepcine. Rao et Pulusani (1981) et Pulusani *et al.* (1979) démontrent que *Streptococcus thermophilus* produit une substance inhibant les bactéries Gram-. Branen *et al.* (1975) remarquent la même chose avec *Streptococcus diacetylactis* et *Leuconostoc citrovorum*. De plus, d'autres substances ont été isolées de Lactobacilles que ce soit de *Lactobacillus brevis* (Kavasnikov et Sudenko, 1967), de *Lactobacillus acidophilus* (Hosono *et al.*, 1977; Shahani *et al.*, 1977) ou de *Lactobacillus bulgaricus* (Shahani *et al.*, 1977). Enfin, il est possible que les *Pediococcus sp.* produisent aussi une substance inhibitrice (Gilliland et Speck, 1975). Dubois *et al.* (1979), Mikolajcik et Hamdan (1975) et Daly *et al.* (1972) remarquent qu'en général, les bactéries lactiques semblent avoir la capacité de produire des substances inhibitrices différentes de l'acide lactique.

La production par *S. lactis* de nisine contre les bactéries Gram + a été très largement étudiée (Hurst, 1978). Par contre, peu de travaux ont été effectués sur d'autres bactériocines qui pourraient être produites par la même bactérie contre les bactéries Gram—. Dans la famille des *Lactobacillaceae*, les travaux ont surtout porté sur *L. acidophilus* et peu ou pas du tout sur *L. helveticus*.

Nous avons donc entrepris de comparer les inhibitions causées par *S. lactis* et *L. helveticus* à celles causées par *S. thermophilus* et *L. acidophilus* sur des bactéries pathogènes et potentiellement pathogènes afin de savoir si les deux premières bactéries produisent aussi des substances inhibitrices agissant aussi bien contre les bactéries Gram + que Gram —.

II. MATERIEL ET METHODES UTILISES

1. Origine des souches

Quatre souches de bactéries lactiques, 18 souches de bactéries pathogènes et potentiellement pathogènes (certaines psychrotrophes, d'autres mésophiles) et 1 souche anaérobie de l'espèce *Clostridium perfringens* ont été utilisées (tab. 1). Ces souches provenaient de l'American Type Culture Collection, des Instituts Rosell et Armand-Frappier situés à Montréal, et de notre collection.

2. Inhibition

Les bactéries lactiques ont été repiquées de façon routinière dans du lait écrémé contenant 20 p.100 de matières sèches (Reddy *et al.* 1970). Pour mettre en évidence les zones d'inhibition, ces bactéries ont étéensemencées selon la technique des stries croisées sur milieu Plate Count Agar (PCA) (Difco) (Dubois *et al.* 1979) puis incubées 24 h à 37° C. Ensuite les autres bactéries furent striées à angle droit. Les boîtes de Petri ont alors été gardées à la température de la pièce (20° C) pour permettre une croissance des bactéries mésophiles aussi bien que psychrotrophes. *Clostridium perfringens* fut gardé en anaérobiose dans une jarre GasPack (BBL). Après 24 et 48 h, les longueurs des zones d'inhibition ont été mesurées en mm.

III. RESULTATS

Les longueurs des zones d'inhibition variaient de 0 à 25 mm. Elles étaient plus grandes vis-à-vis des bactéries Gram + (de 4 à 7,5 mm en moyenne) que vis-à-vis des bactéries Gram — (de 2 à 6,5 mm en moyenne) (tab.2). Les longueurs des zones d'inhibition ont diminué rapidement de telle sorte que pour *S. thermophilus* et *L. helveticus*, il n'y avait pour ainsi dire aucune inhibition après 48 h. Avec *L. acidophilus* l'inhibition était moyenne vis-à-vis des bactéries Gram + et Gram —. Elle était uniquement due à la grande sensibilité de quelques souches de bactéries pathogènes ou potentiellement pathogènes car le pourcentage de souches encore inhibées après 48 h n'était que de 31 % comparés au 58 % obtenus avec

TABLEAU 1

Origine des souches bactériennes

Bactéries	Caractéristique	Pathogénéicité	Origine
<i>Streptococcus lactis</i> A.T.C.C. 14871			A.T.C.C.
<i>Streptococcus thermophilus</i>			I.R.
<i>Lactobacillus helveticus</i>			I.R.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>			I.R.
<i>Staphylococcus aureus</i> A.T.C.C. 25923		Pathogène	I.A.F.
<i>Staphylococcus epidermidis</i> A.T.C.C. 12228			I.A.F.
<i>Staphylococcus sp.</i>	Psychrotrophe		C.R.E.S.A.L.A.
<i>Bacillus cereus</i>	Psychrotrophe		C.R.E.S.A.L.A.
<i>Bacillus subtilis</i>	Psychrotrophe		C.R.E.S.A.L.A.
<i>Streptococcus faecalis</i> A.T.C.C. 19433		Pathogène	I.A.F.
<i>Streptococcus faecium</i>			I.R.
<i>Streptococcus pyogenes</i> A.T.C.C. 19615		Pathogène	I.A.F.
<i>Clostridium perfringens</i>	Anaérobie	Pathogène	I.R.
<i>Escherichia coli</i> A.T.C.C. 25922		Pathogène	I.A.F.
<i>Salmonella typhimurium</i> A.T.C.C. 14028		Pathogène	I.A.F.
<i>Salmonella enteritidis</i>			I.R.
<i>Proteus vulgaris</i> A.T.C.C. 13315			I.A.F.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A.T.C.C. 27853		Pathogène	I.A.F.
<i>Serratia marcescens</i> A.T.C.C. 8100			I.A.F.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> A.T.C.C. 13883			I.A.F.
<i>Enterobacter cloacae</i> A.T.C.C. 23355			I.A.F.
<i>Pseudomonas putida</i>	Psychrotrophe		C.R.E.S.A.L.A.
<i>Achromobacter sp</i>	Psychrotrophe		C.R.E.S.A.L.A.

A.T.C.C. : American Type Culture Collection.

I.A.F. : Institut Armand-Frappier.

C.R.E.S.A.L.A. : Centre de Recherches en Sciences Appliquées à l'Alimentation.

I.R. : Institut Rosell.

S. lactis. Cette dernière espèce fut parmi les bactéries lactiques la plus inhibitrice vis-à-vis des bactéries Gram — alors que *L. acidophilus* le fut vis-à-vis des bactéries Gram +.

Au niveau des bactéries pathogènes et potentiellement pathogènes les résultats variaient d'une espèce à l'autre ; *Staphylococcus epidermidis* a été fortement inhibé par *L. acidophilus*, il ne l'était pas par *S. thermophilus* ni par *L. helveticus*. *Staphylococcus aureus* a été plus fortement inhibé par *S. thermophilus* et par *S. lactis* que par *L. acidophilus*. L'inhibition maximale de *Bacillus cereus* fut obtenue avec *L. helveticus* qui n'inhibait pas *Streptococcus pyogenes* alors que les autres bactéries lactiques inhibaient ce streptocoque. *S. lactis* n'a pas inhibé *Streptococcus faecium* mais a plus inhibé *Streptococcus faecalis* que les trois autres souches lactiques.

TABLEAU 2

Longueurs des zones d'inhibition (mm) mesurées après 24 h et 48 h d'incubation à 20° C

Bactéries	Souches lactiques							
	<i>S. lactis</i>		<i>S. thermophilus</i>		<i>L. acidophilus</i>		<i>L. helveticus</i>	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Gram + (moyenne)	7,3	4,5	6,3	1	8,7	6,2	3,6	2,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	7	15	0	8	0	4	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	4	0	0	13	12	0	0
<i>Staphylococcus sp.</i>	0	0	3	0	2	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	5	0	0	0	2	0	10	5
<i>Bacillus subtilis</i>	4	0	6	0	3	0	2	0
<i>Streptococcus faecalis</i>	11	10	4	0	4	0	3	0
<i>Streptococcus faecium</i>	0	0	3	0	3	0	4	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	17	9	15	0	19	19	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	11	11	11	10	25	25	10	10
Gram — (moyenne)	8,5	3,1	4,4	0	7,1	2,9	4,4	0
<i>Escherichia coli</i>	7	0	4	0	4	0	3	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	5	0	4	0	3	0	5	0
<i>Salmonella enteritidis</i>	8	0	3	0	3	0	3	0
<i>Proteus vulgaris</i>	10	9	7	0	8	0	5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	0	4	0	6	0	4	0
<i>Serratia marcescens</i>	10	5	0	0	4	0	—	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11	3	5	0	9	5	5	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	10	3	4	0	4	0	3	0
<i>Pseudomonas putida</i>	8	5	7	3	20	17	8	4
<i>Achromobacter sp.</i>	8	6	6	0	10	7	8	0

L'inhibition de *Clostridium perfringens* fut la plus forte avec *L. acidophilus*. Il y eu aussi des divergences avec les bactéries Gram—. *Pseudomonas putida* a été très fortement inhibé par *L. acidophilus* et *Salmonella enteritidis* l'a peu été. *S. lactis* a inhibé plus fortement cette dernière et *Escherichia coli* que les trois autres bactéries lactiques *L. helveticus* s'est comporté comme *S. thermophilus*.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats confirment des travaux antérieurs montrant que les bactéries Gram+ étaient en général plus inhibées que les bactéries Gram—, quelle que soit la bactérie lactique utilisée (Dubois *et al.*, 1979). On remarque aussi que pour les bactéries lactiques les résultats diffèrent et que *S. lactis* inhibe plus d'espèces que les trois autres bactéries. Fait intéressant, cette souche étant la plus inhibitrice vis-à-vis des bactéries Gram—, nous nous attendions surtout à ce qu'elle le soit vis-à-vis des bactéries Gram+ à cause de la nisine (Hurst, 1978).

Pulusani *et al.* (1979) ont montré que *S. thermophilus* produit une substance inhibitrice qui agit contre les bactéries pathogènes et plusieurs auteurs ont déjà montré que *L. acidophilus* produisait une substance inhibitrice agissant aussi contre les bactéries pathogènes (Shahani *et al.*, 1977). Kozak *et al.*, (1978) ont indiqué que les *S. lactis* non producteurs de nisine produisaient de la lactostrepcine qui agit contre les bactéries Gram+. A la lumière de nos résultats, il semble donc que la lactostrepcine agisse aussi contre les bactéries Gram— ou alors que *S. lactis* produise une autre substance inhibitrice agissant contre les bactéries Gram— et ayant un pouvoir inhibiteur semblable à celui des substances produites par *S. thermophilus* et *L. acidophilus*. Quant à *L. helveticus*, son pouvoir inhibiteur est beaucoup moins grand que celui des trois autres bactéries quoiqu'il soit sensiblement le même que celui de *S. thermophilus* contre les bactéries Gram— et que *L. helveticus* inhibe plus fortement *Bacillus cereus* que les autres.

Il se pourrait fort bien que la substance excrétée par *S. lactis* soit apparentée à celle produite par *S. thermophilus*. *L. helveticus* quant à lui, produirait une substance ayant un pouvoir inhibiteur plus faible que *L. acidophilus*. Des études sont entreprises afin d'isoler et de caractériser les différentes substances produites par *S. lactis* d'une part et *L. helveticus* d'autre part.

Elles semblent confirmer que les inhibitions causées envers les bactéries Gram— sont bien produites par une bactériocine, car des extractions témoins faites avec de l'acide lactique donnent moins d'inhibition, ce qui est en accord avec les travaux de Shahani *et al.* (1976) et de Daly *et al.* (1972).

Reçu pour publication en juillet 1982.

Remerciements

Ce travail a été effectué grâce à une subvention du Ministère de l'Agriculture du Canada.

Bibliographie

- BRANEN (A. L.), GO (H. C.), and GENSKE (R. P.) (1975). — Purification and properties of antimicrobial substances produced by *Streptococcus diacetilactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Food Sci.*, 40, 646-662.
- DALY (C.), SANDINE (W. E.) and ELLIKER (P. R.) (1972). — Interactions of food starter cultures and Food-Borne pathogens: *Streptococcus diacetilactis* versus Food Pathogens. *J. Milk Food Technol.*, 35 (6), 349-357.
- DUBOIS (G.), BEAUMIER (H.) and CHARBONNEAU (R.) (1979). — Inhibition of bacteria isolated from ground meat by *Streptococcaceae* and *Lactobacillaceae*. *J. Food Sci.*, 44, 1649-1652.
- GILLILAND (S. E.) and SPECK (M. L.) (1975). — Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactobacilli and pediococci in non fermented refrigerated foods. *J. Food Sci.*, 40, 903-907.
- HOSONO (A.), YASTUKI (K.) and TOKITA (F.) (1977). — Isolation and characterization of an inhibitory substance against *Escherichia coli* produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Mikrowissenschaft*, 32, 727-730.
- HURST (A.) (1978). — Nisin in «Streptococci» pp 297-314, edited by Skinner T.A. and Quesnel L. B. Academic Press Inc., London.
- KAVASNIKOV (E. J.) and SUDENKO (I.) (1967). — Antibiotic properties of *Lactobacillus brevis*. *Mikrobiol. Zn. Kyiv.*, 29, 146.
- KOZAK (W.), BARDOWSKI (J.) and DOBRZANSKI (W. T.) (1978). — Lactostrepcins -acid bacteriocins produced by lactic streptococci. *J. Dairy Res.*, 45, 247-254.
- MIKOLAJCZIK (E. M.) and HAMDAN (I. Y.) (1975). — *Lactobacillus acidophilus* I: Growth characteristics and metabolic products. *Cult. Dairy Prod. J.*, 10, 10-17.
- PULUSANI (S. R.), RAO (D. R.) and SUNKI (G. R.) (1979). — Antimicrobial activity of lactic cultures: partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.*, 44, 575-578.
- REDDY (S. G.), HENRICKSON (R. L.) and OLSON (H. C.) (1970). — The influence of lactic cultures on Ground beef quality. *J. Food Sci.*, 35, 787-791.
- RAO (D. R.) and PULUSANI (S. R.) (1981). — Effect of cultural conditions and media on the antimicrobial activity of *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.*, 46, 630-632.
- SHAHANI (K. M.), VAKIL (J. R.) and KILARA (A.) (1976). — Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. I. Cultural conditions for the production of antibiotics. *Cult. Dairy Prod. J.*, 11, 14-17.
- SHAHANI (K. M.), VAKIL (J. R.) and KILARA (A.) (1977). — Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. II. Isolation of acidophilin from *L. acidophilus*. *Cult. Dairy Prod. J.*, 12, 8-11.
-