

Caractérisation biochimique des lactobacilles brassicoles

MC Curk¹, F Peladan¹, JC Hubert²

¹ TEPRAL, centre de recherche de la branche bière BSN, 68, rte d'Oberhausbergen,
67037 Strasbourg Cedex;

² Laboratoire de microbiologie, URA CNRS 1481, 4, rue Blaise-Pascal,
67070 Strasbourg Cedex, France

Résumé — Cinquante deux souches du genre *Lactobacillus*, réparties en 9 espèces et 4 sous-espèces fréquemment rencontrées en milieu brassicole, ont été analysées par le système API 50 CHL et ont été étudiées pour leurs exigences en acides aminés et en bases sur le milieu Ledesma, milieu complet synthétique. Une analyse des correspondances multiples (ACM) et une classification hiérarchique ascendante réalisées sur les profils fermentaires glucidiques et sur ceux des exigences nutritionnelles ont confirmé le faible pouvoir discriminant du système API pour les différentes espèces. Cependant, la combinaison des résultats nutritionnels et de ceux obtenus par le système API permet de distinguer les espèces étudiées les unes par rapport aux autres.

Lactobacillus / brasserie / identification

Summary — Characterization of *Lactobacilli* isolated in breweries. Fifty-two *Lactobacilli* strains distributed in 9 species and 4 subspecies, and frequently found in breweries, have been tested by the API 50 CHL system and studied for their amino acid and base requirements on Ledesma agar, a rich synthetic medium. The data, sugar fermentation profiles and nutritional profiles have been analysed by statistical methods (multiple correspondence analysis (SPAD.N) and cluster analysis). The results confirm a weak capacity to characterize *Lactobacilli* species by the API system; however, the use of nutritional and fermentation profiles permits discrimination between the various species.

Lactobacillus / brewery / identification

INTRODUCTION

La qualité d'une bière est définie par la stabilité organoleptique, la stabilité physico-chimique et biologique, toutes 3 étant étroitement liées.

La stabilité biologique est dépendante de la présence et du développement des micro-organismes dans le produit. Il est à

noter, cependant, que les micro-organismes pathogènes pour l'homme peuvent difficilement se développer dans un milieu tel que la bière, dont les conditions physico-chimiques sont assez drastiques. Les risques pour la santé humaine sont donc minimales et les altérations conséquentes sont l'apparition d'un trouble et de produits secondaires du métabolisme

modifiant la flaveur. Les micro-organismes contaminants majoritaires en brasserie à l'heure actuelle sont les bactéries lactiques. Le genre *Lactobacillus* représente 80% de celles-ci, le genre *Pediococcus* 15% et les autres genres 5%.

Actuellement, la détection de ces bactéries est effectuée par filtration du produit et dépôt de la membrane sur un milieu sélectif, tel que le milieu MRS additionné d'actidione (inhibiteur de la croissance des levures) et d'alcool β -phényléthylique (inhibiteur de la croissance des bactéries Gram négatives) en anaérobiose. La présence de colonies de bactéries lactiques est vérifiée par une coloration de Gram positive, un test à la catalase négatif et par observation microscopique de leur morphologie. Cette première approche permet une présomption de la présence des bactéries lactiques.

L'identification des espèces du genre *Lactobacillus* est réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire glucidique à l'aide du système API 50 CHL (API system); cependant, dans de nombreux cas, les identifications réalisées ainsi manquent de précision et les interprétations peuvent être délicates. C'est pourquoi, il est nécessaire d'améliorer ou d'affiner les méthodes de détection et d'identification des espèces du genre *Lactobacillus*.

Dans un premier temps, nous avons voulu situer les lactobacilles d'origine brassicole par rapport à la classification établie de par leurs caractéristiques biochimiques (fermentation des glucides et exigences nutritionnelles) et comparer la discrimination de ces divers caractères biochimiques.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Organismes

L'étude biochimique concerne 52 souches du genre *Lactobacillus*, dont 13 isolats d'origine

brassicole (tableau I). Ces 52 souches sont réparties en 9 espèces et 4 sous-espèces différentes, fréquemment rencontrées en brasserie : *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. casei alactosus*, *L. casei pseudoplantarum*, *L. casei rhamnosus*, *L. cellobiosus*, *L. coryniformis*, *L. coryniformis torquens*, *L. delbrueckii lactis*, *L. fermentum*, *L. leichmannii*, *L. plantarum*.

Les divers micro-organismes sont repiqués sur milieu MRS (DeMan *et al*, 1960) liquide, puis sur milieu MRS solide en anaérobiose à 45 °C pour *L. casei rhamnosus*, *L. delbrueckii lactis*, *L. fermentum* et *L. leichmannii* et à 30°C pour les autres espèces étudiées citées auparavant.

Test API 50 CHL

Les 52 souches sont analysées pour leur capacité fermentaire sur les 49 glucides constituant les galeries API 50 CHL, qui sont le glycérol, l'érythritol, le D-arabinose, le L-arabinose, le ribose, le D-xylose, le L-xylose, l'adonitol, le méthyl-xyloside, le galactose, le D-glucose, le D-fructose, le D-mannose, le L-sorbose, le rhamnose, le dulcitol, l'inositol, le mannitol, le sorbitol, le méthyl-D-mannoside, le méthyl-D-glucoside, la glucosamine N acétylée, l'amygdaline, l'arbutine, l'esculine, la salicine, le cellobiose, le maltose, le lactose, le mélibiose, le saccharose, le tréhalose, l'inuline, le mélézitose, le D-raffinose, l'amidon, le glycogène, le xylitol, le gentiobiose, le D-turanose, le D-lyxose, le D-tagatose, le D-fucose, le L-fucose, le D-arabitol, le L-arabitol, le gluconate, le 2-cétogluconate, le 5-cétogluconate; les tests étant exécutés selon les instructions du fournisseur.

Étude des exigences nutritionnelles

Les exigences en bases et acides aminés des 52 souches bactériennes ont été testées sur un milieu complet synthétique Ledesma (Ledesma *et al*, 1977) constitué de 20 acides aminés, l'acide glutamique, l'alanine, l'acide aspartique, la cystéine, la phénylalanine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la proline, la sérine, la thréonine, le tryptophane, la valine, la glycine, la glutamine, l'asparagine, l'arginine, la tyrosine, la lysine, ainsi que de 6 bases azotées, l'adénine, la guanine, la cytidine, la thymidine, l'uracile, la désoxyguanosine.

À partir du milieu MRS solide, chaque souche est repiquée sur le milieu Ledesma solide pendant 48 h en anaérobiose aux températures optimales citées ci-dessus. Chaque souche est ensuite inoculée dans 1 ml d'eau distillée stérile. Une goutte (5 µl) de chaque souche est déposée sur le milieu MRS solide, le milieu Ledesma solide et les différents milieux Ledesma solides, auxquels une base ou un acide aminé a été omis. Les résultats sont obtenus par visualisation des croissances ou absence de croissance sur les différents milieux.

Traitement statistique des données

Les données, profils de la fermentation des sucres composant la galerie API 50 CHL et les profils des exigences nutritionnelles, sont soumis à une analyse des correspondances multiples (ACM), et à une classification hiérarchique ascendante, les dendrogrammes étant calculés par l'algorithme de Ward (Ward, 1963). L'outil statistique utilisé est le logiciel SPAD.N Version 2.0 (CISIA).

RÉSULTATS

Résultats API

Les profils de fermentation des glucides obtenus par le système API 50 CHL des isolats brassicoles, ainsi que des souches de collections internationales, sont répertoriés dans les tableaux II et III. Nous pouvons constater que, même pour les souches issues de collections internationales, sur la base des profils fermentaires glucidiques, les données ne sont pas suffisantes pour une identification correcte des souches.

Certains glucides n'apportent aucune discrimination au sein du genre *Lactobacillus* en ce qui concerne les souches sélectionnées : il s'agit du glycérol, de l'érythritol, du D-arabinose, du L-xylose, du D-glucose, du maltose, de l'amidon, du glyco-

gène, du xylitol, du D-lyxose, du D-fucose, du L-fucose et du 2-cétogluconate.

L'analyse statistique effectuée sur les 52 souches du genre *Lactobacillus* de par leur profil fermentaire glucidique indique une répartition de ceux-ci en 4 groupes homogènes selon l'espèce considérée (fig 1).

La première classe regroupe les Lactobacilles obligatoirement hétérofermentaires du groupe des Bétabactéries (Orla-Jensen, 1919), c'est-à-dire les souches des espèces *L brevis*, *L buchneri*, *L cellobiosus* et *L fermentum*. Ce groupe est majoritairement caractérisé par la fermentation du gluconate, du D-xylose, du L-arabinose, du 5-cétogluconate, du mélibiose et l'absence de fermentation du mannose, de l'arbutine, de la salicine, du mannitol, du cellobiose, du sorbitol, de l'amygdaline, du gentiobiose, du tréhalose, de l'esculine, de la glucosamine N acétylée, du turanose, du tagatose, du lactose, du saccharose et du mélézitose.

Le second groupe est constitué des souches de l'espèce *L coryniformis* et sa sous-espèce *L coryniformis torquens*, ainsi que des souches strictement homofermentaires du groupe des Thermobactéries (Orla-Jensen, 1919), *L leichmannii* et *L delbrueckii lactis*. Les souches de cette classe se distinguent des autres groupes par l'absence de fermentation du ribose, du gluconate, du mélézitose, du galactose, du mélibiose, du L-arabinose, du turanose, du méthyl-D-glucoside et de l'amygdaline.

La troisième classe est représentée par toutes les souches de l'espèce *L plantarum* et la souche *L casei* DSM 2648; cette dernière a été identifiée *L plantarum* par le système API 50 CHL (tableau III). *L plantarum* se distingue des autres groupes par les caractères suivants : fermentation du raffinose, du méthyl-D-mannoside, du D-arabitol, du mélibiose, du gentiobiose, du lactose, du sorbitol, de l'amygdaline, du

Tableau I. Souches bactériennes et leurs origines.

<i>Souches</i>	<i>Collections d'origine</i>	<i>Origines d'isolement</i>
<i>L. brevis</i>	DSM 20054	Feces
<i>L. brevis</i>	NCIMB 8561	Bière
<i>L. brevis</i>	DSM 20556	Olives vertes fermentées
<i>L. brevis</i>	CIP 71.35	
<i>L. brevis</i>	CST 10931	Bouteille de bière recyclée
<i>L. brevis</i>	CST 10932	Mout de bière
<i>L. brevis</i>	CST 11025	Bière
<i>L. brevis</i>	CST 11038	Bière
<i>L. buchneri</i>	DSM 20057	Pulpe de tomates
<i>L. buchneri</i>	NCIMB 8838	Salive humaine
<i>L. buchneri</i>	ATCC 11307	Bière
<i>L. buchneri</i>	CST 10849	Bière
<i>L. casei alactosus</i>	DSM 20020	Salive
<i>L. casei alactosus</i>	DSM 20006	Bière
<i>L. casei alactosus</i>	NCIMB 8001	
<i>L. casei alactosus</i>	CST 11037	Bière
<i>L. casei alactosus</i>	CST 11063	Bière
<i>L. casei casei</i>	DSM 20011	Fromage
<i>L. casei casei</i>	DSM 2648	Ensilage
<i>L. casei casei</i>	DSM 2649	Ensilage
<i>L. casei casei</i>	CIP 71.37	
<i>L. casei casei</i>	NCIMB 8822	Salive humaine
<i>L. casei casei</i>	CST 10960	Bière
<i>L. casei pseudopiantarum</i>	DSM 20008	Machine laitière
<i>L. casei pseudopiantarum</i>	DSM 20207	Lait
<i>L. casei pseudopiantarum</i>	CST 11019	Bière
<i>L. casei rhamnosus</i>	DSM 20021	
<i>L. casei rhamnosus</i>	CIP A158	
<i>L. casei rhamnosus</i>	CIP 71.38	
<i>L. casei rhamnosus</i>	DSM 20247	
<i>L. cellobiosus</i>	DSM 20055	Salive
<i>L. coryniformis coryniformis</i>	DSM 20001	Ensilage
<i>L. coryniformis coryniformis</i>	DSM 20007	Ensilage
<i>L. coryniformis torquens</i>	DSM 20005	Fumier de vache
<i>L. delbrueckii lactis</i>	DSM 20072	Emmental
<i>L. delbrueckii lactis</i>	NCIMB 7278	
<i>L. delbrueckii lactis</i>	NCIMB 8170	
<i>L. fermentum</i>	DSM 20052	Betteraves fermentées
<i>L. fermentum</i>	NCIMB 2797	Intestin de nourisson
<i>L. fermentum</i>	NCIMB 8829	Salive humaine
<i>L. leichmannii</i>	DSM 20076	

Tableau I. (suite)

<i>Souches</i>	<i>Collections d'origine</i>	<i>Origines d'isolement</i>
<i>L leichmannii</i>	NCIMB 8118	Starter pour la fermentation de produits à base de viandes
<i>L leichmannii</i>	NCIMB 8964	
<i>L plantarum</i>	DSM 20174	Choux au vinaigre
<i>L plantarum</i>	DSM 20205	
<i>L plantarum</i>	CIP 71.39	
<i>L plantarum</i>	NCIMB 8531	Déchets sulfiteux en industrie papetière
<i>L plantarum</i>	NCIMB 8826	Salive humaine
<i>L plantarum</i>	CST 10952	
<i>L plantarum</i>	CST 10967	Bière
<i>L plantarum</i>	CST 11023	Bière
<i>L plantarum</i>	CST 11031	Bière

Lactobacillus; ATCC : american type culture collection; DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen; CIP : collection de l'Institut Pasteur; CST : collection de souches TEPRAL; NCIMB : National collections of industrial and marine bacteria.

cellobiose, de la salicine, du mannitol et de l'arbutine.

Le quatrième groupe est constitué de l'espèce *L casei* et ses 3 sous-espèces *L casei alactosus*, *L casei pseudoplantarum* et *L casei rhamnosus*, caractérisées par la fermentation du tagatose, du cellobiose, de la salicine, du mannitol, de l'arbutine, de l'amygdaline, du turanose, de l'esculine, du sorbitol, du mélézitose, du mannose, du gentiobiose, du tréhalose, du sorbose, de l'inuline, de la glucosamine N acétylée et par l'absence de fermentation du L-arabinose, du mélibiose, du raffinose ainsi que du D-xylose.

Ainsi, les regroupements des souches bactériennes sont homogènes en fonction de l'espèce. Toutefois, le système API ne semble pas assez discriminant pour la caractérisation de chacune des espèces de lactobacilles étudiées.

Résultats nutritionnels

Les exigences en acides aminés et en bases des 52 souches bactériennes testées sont indiqués dans le tableau IV. Parmi les 28 caractères étudiés (20 acides aminés, 6 bases, l'ensemble des purines et l'ensemble des pyrimidines), 8 ne sont pas retenus en raison de leur faible discrimination : l'asparagine, l'acide aspartique, la glutamine, la leucine, la valine, la thymidine, l'uracile et la désoxyguanosine. Les profils nutritionnels permettent une classification de ces 52 individus en 6 groupes significatifs (fig 2).

La classe 1 est constituée de toutes les souches des espèces *L buchneri* et *L plantarum*, ainsi que la souche représentant l'espèce *L coryniformis torquens*. La souche *L casei* DSM 2648 est également regroupée parmi les souches de l'espèce *L*

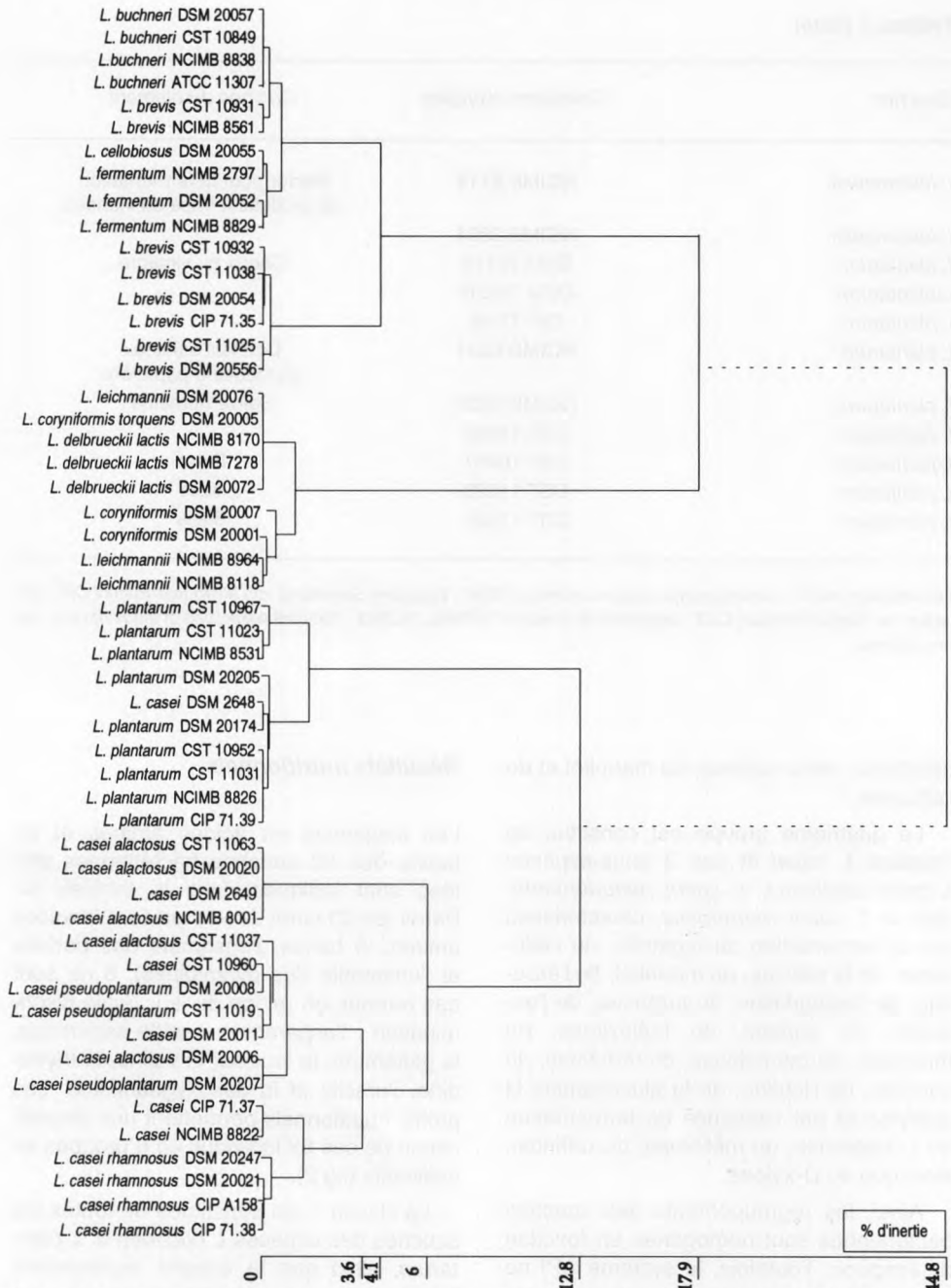


Fig 1. Dendrogramme issu de l'analyse des profils fermentaires des glucides des 52 lactobacilles. Méthodes statistiques : ACM et classification hiérarchique; logiciel : SPAD.N; *L* : *Lactobacillus*; — proportionalité des distances respectée; ---- proportionalité des distances non respectée.

plantarum; nous l'avons par ailleurs identifié *L. plantarum* par le système API. *L. casei pseudoplantarum* CST 11019 est localisée dans la classe 1 au niveau du dendrogramme. Cependant, des représentations bidimensionnelles de cette analyse indiquent que la position de cette souche est limitrophe par rapport aux deux classes 1 et 3 et son attribution à l'une ou l'autre classe entre dans la frange d'incertitude de l'algorithme utilisé. Les individus de la classe 1 sont caractérisés par une croissance en absence de l'arginine, de la phénylalanine, de la tyrosine, du tryptophane, de l'histidine, de la serine, de la thréonine, de la lysine et de l'ensemble des pyrimidines.

Le groupe 2 est représenté par l'espèce *L. coryniformis* (deux souches étudiées) distincte des autres groupes principalement par leur capacité de croître en absence d'isoleucine.

Les individus du groupe 3 sont les représentants de l'espèce *L. casei* et ses 3 sous-espèces. Leurs caractéristiques nutritionnelles dominantes sont des exigences en tyrosine, en phénylalanine, en serine, en arginine et une croissance en l'absence de l'ensemble des pyrimidines, de la cystéine, de l'alanine, de la thréonine, de l'ensemble des purines, de la lysine et de l'histidine.

La classe 4 est composée de toutes les souches des espèces *L. cellobiosus*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii lactis*, mais aussi de la souche *L. casei rhamnosus* DSM 20247, dont la position attendue serait la classe 3. Aucune explication n'a pu être émise, dans la mesure où l'identification par le système API ne permet aucune ambiguïté et la position sur les représentations bidimensionnelles n'est pas limitrophe par rapport aux classes correspondantes. Cette souche semblerait avoir un profil particulier du point de vue des exigences en acides aminés et bases par rapport aux souches de

la même espèce. Les souches du groupe 4 exigent la présence de l'alanine, de l'histidine, de la thréonine, de la lysine et de l'ensemble des pyrimidines pour leur croissance.

Les 3 souches de l'espèce *L. leichmannii* représentent le groupe 5. Elles sont caractérisées par des exigences en guanine, en cytidine et en l'ensemble des purines.

Le dernier groupe, la classe 6, est constitué de toutes les souches de l'espèce *L. brevis* se distinguant des autres groupes par leurs exigences en proline, en glycine, en thréonine, en l'ensemble des purines, en l'histidine, en cystéine, en l'ensemble des pyrimidines et en lysine.

Les profils des exigences en acides aminés et en bases permettent un regroupement homogène des souches selon l'espèce considérée, à une seule exception près. Les caractères nutritionnels semblent plus discriminants que les caractères de fermentation des différents glucides. Seules 2 classes regroupent plusieurs espèces. Il s'agit de la classe 1 (*L. buchneri*, *L. plantarum* et *L. coryniformis torquens*) et de la classe 4 (*L. cellobiosus*, *L. fermentum* et *L. delbrueckii lactis*). Par ailleurs, ces espèces sont différentes du point de vue du profil fermentaire. Ces observations nous ont conduit à analyser la classification des 52 souches par la combinaison des résultats, profils fermentaires des sucres et profils des exigences en acides aminés et bases.

Traitement statistique de la combinaison des résultats

L'analyse statistique est effectuée sur les 52 souches de lactobacilles, en tenant compte uniquement de 57 caractères sur un total de 77, puisque 20 ont une faible capacité discriminante. Ces derniers sont, concernant les nutriments, l'acide aspartique

Tableau II. (suite)

Souches	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>L. leichmannii</i> NCIMB 8118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. leichmannii</i> NCIMB 8964	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> DSM 20174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> DSM 20205	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CIP 71.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> NCIMB 8531	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> NCIMB 8826	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CST 10952	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CST 10967	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CST 11023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CST 11031	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L : *Lactobacillus*; L casei pseudo : *L. casei pseudoplantarum*; L corynif torquens : *L. coryniformis torquens*; 1 : glycérol; 2 : erythritol; 3 : D-arabinose; 4 : L-arabinose; 5 : ribose; 6 : D-xylose; 7 : L-xylose; 8 : adonitol; 9 : méthyl-xyloside; 10 : galactose; 11 : D-glucose; 12 : D-fructose; 13 : D-mannose; 14 : L-sorbose; 15 : rhamnose; 16 : dulcitol; 17 : inositol; 18 : mannitol; 19 : sorbitol; 20 : méthyl-D-mannoside; 21 : méthyl-D-glucoside; 22 : N acétyl glucosamine; 23 : amygdaline; 24 : arbutine; 25 : esculine; 26 : salicine; 27 : cellobiose; 28 : maltose.

que, l'asparagine, la glutamine, la leucine, la valine, la thymidine, l'uracile et la dés-oxyguanosine; concernant les glucides, l'érythritol, le L-xylose, le D-fucose, le L-fucose, le D-arabinose, le D-glucose, l'amidon, le glycogène, le 2-cétogluconate, le glycérol, le maltose et le xylitol. Le dendrogramme (fig 3) représentant les résultats de cette analyse indique une séparation significative des 52 individus en 8 classes.

Les individus de la classe 1 représentent toutes les souches de l'espèce *L. buchneri*, caractérisées par l'absence de fermentation de la glucosamine N acétylée et du mannose.

La classe 2 regroupe les souches des espèces *L. cellobiosus* (une seule souche) et *L. fermentum* (trois souches), ces espèces étant considérées synonymes selon des résultats d'hybridation ADN-ADN

(Miller *et al*, 1971; Vescovo *et al*, 1979; Sri-ranganathan *et al*, 1985). Ce groupe se distingue par les caractères suivants : absence de fermentation de la glucosamine N acétylée, exigence en thréonine et en alanine.

Les souches du groupe 3 sont les souches *L. delbrueckii lactis* caractérisées par l'absence de fermentation du ribose et du gluconate ainsi que l'exigence en lysine pour leur croissance.

Le groupe 4 représente l'espèce *L. coryniformis* et sa sous-espèce *L. coryniformis torquens*, caractérisées par l'absence de fermentation de l'isoleucine, du ribose ainsi que du gluconate.

La classe 5 est constituée des 3 souches de l'espèce *L. leichmannii* se distinguant par l'absence de fermentation du galactose, du ribose, du gluconate, et par

Tableau III. Suite des profils fermentaires des glucides de lactobacilles obtenus par analyse des galeries API 50 CHL.

Souches																			Identification par							
	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	9	API 50	CHM				
<i>L. brevis</i> DSM 20054	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+				
<i>L. brevis</i> NCIMB 8561	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	<i>L. collinocides</i>		
<i>L. brevis</i> DSM 20556	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+			
<i>L. brevis</i> CIP 71.35	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+			
<i>L. brevis</i> CST 10931	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. brevis</i> CST 10932	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+			
<i>L. brevis</i> CST 11025	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. brevis</i> CST 11038	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+			
<i>L. buchneri</i> DSM 20057	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+			
<i>L. buchneri</i> NCIMB 8838	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+			
<i>L. buchneri</i> ATCC 11307	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. buchneri</i> CST 10849	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. casei alactosus</i> DSM 20020	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. casei alactosus</i> DSM 20006	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	<i>L. casei</i>		
<i>L. casei alactosus</i> NCIMB 8001	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. casei alactosus</i> CST 11037	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. casei alactosus</i> CST 11063	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. casei</i> DSM 20011	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>L. casei pseudo</i>		
<i>L. casei</i> DSM 2648	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	<i>L. plantarum</i>		
<i>L. casei</i> DSM 2649	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>L. casei alactosus</i>		
<i>L. casei</i> CIP 71.37	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. casei</i> NCIMB 8822	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. casei</i> CST 10960	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. casei pseudo</i> DSM 20008	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>L. casei</i>		
<i>L. casei pseudo</i> DSM 20207	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	<i>L. casei</i>		
<i>L. casei pseudo</i> CST 11019	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. casei rhamnosus</i> DSM 20021	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>L. casei rhamnosus</i> CIP A158	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. casei rhamnosus</i> CIP 71.38	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>L. casei rhamnosus</i> DSM 20247	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. cellobiosus</i> DSM 20055	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+			
<i>L. coryniformis</i> DSM 20001	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>L. coryniformis</i> DSM 20007	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>L. corinif torquens</i> DSM 20005	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>L. delbrueckii lactis</i> DSM 20072	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>L. delbrueckii lactis</i> NCIMB 7278	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>L. delbrueckii lactis</i> NCIMB 8170	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>L. fermentum</i> DSM 20052	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. fermentum</i> NCIMB 2797	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
<i>L. fermentum</i> NCIMB 8829	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-			

Tableau III. (suite)

Souches	2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 4 4 4 4 4 4 4 4																			Identification par API 50 CHM	
	9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9																				
<i>L. leichmannii</i> DSM 20076	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>L. delbrueckii</i>
<i>L. leichmannii</i> NCIMB 8118	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. leichmannii</i> NCIMB 8964	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> DSM 20174	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> DSM 20205	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CIP 71.39	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> NCIMB 8531	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>L. pentosus</i>
<i>L. plantarum</i> NCIMB 8826	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CST 10952	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CST 10967	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CST 11023	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CST 11031	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L. : *Lactobacillus*; *L. casei pseudo*; *L. casei pseudoplanarum*; *L. corynif torquens* : *L. coriniformis torquens*; 29 : lactose; 30 : mélibiose; 31 : saccharose; 32 : tréhalose; 33 : inuline; 34 : mélezitose; 35 : D-raffinose; 36 : amidon; 37 : glycogène; 38 : xylitol; 39 : gentiobiose; 40 : D-turanose; 41 : D-lyxose; 42 : D-tagatose; 43 : D-fucose; 44 : L-fucose; 45 : D-arabitol; 46 : L-arabitol; 47 : gluconate; 48 : 2-céto-gluconate; 49 : 5-céto-gluconate.

les exigences en guanine, en cytidine et en l'ensemble des purines.

Le groupe 6 est composé de toutes les souches de l'espèce *L. brevis*; celles-ci se différencient des autres groupes par leur capacité fermentaire du L-arabinose et du 5-cétogluconate, par leur incapacité à fermenter le D-xylose, le mannose, le saccharose, le tréhalose, l'arbutine, la salicine, le mannitol, le cellobiose, le mélezitose, l'amygdaline, le sorbitol, le lactose, le gentiobiose et l'esculine, et par leurs exigences nutritionnelles en proline, en glycine, en thréonine, en l'ensemble des purines, en histidine, en cystéine, et en l'ensemble des pyrimidines.

La classe 7 est représentée par l'espèce *L. plantarum*, mais aussi par les souches *L. casei* DSM 2648 et *L. casei pseudoplanarum* CST 11019, dont les po-

sitions ont été discutées précédemment. Ces souches sont principalement caractérisées par la fermentation du rhamnose, du méthyl-D-mannoside, du D-arabitol, du mélibiose, du gentiobiose, de l'amygdaline, du sorbitol, du cellobiose, du mannitol, de la salicine, de l'arbutine, de l'esculine, du lactose ainsi que par la possibilité de croître en l'absence d'arginine, de phénylalanine, de tyrosine, du tryptophane, d'histidine, de sérine et de l'ensemble des pyrimidines.

Le dernier groupe, 8, est représenté par l'espèce *L. casei* et ses sous-espèces *L. casei alactosus*, *L. casei pseudoplanarum* et *L. casei rhamnosus*. Les souches de cette classe se distinguent des autres par la fermentation du tagatose, du turanose, du cellobiose, de la salicine, du mannitol, de l'arbutine, de l'amygdaline, du mélezitose, du tréhalose, de l'esculine, du sorbi-

Tableau IV. (suite)

Souches	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3																																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
<i>L. leichmannii</i> NCIMB 8118	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>L. leichmannii</i> NCIMB 8964	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
<i>L. plantarum</i> DSM 20174	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. plantarum</i> DSM 20205	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. plantarum</i> CIP 71.39	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. plantarum</i> NCIMB 8826	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. plantarum</i> NCIMB 8531 (<i>L. pentosus</i>)	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+		
<i>L. plantarum</i> CST 10952	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. plantarum</i> CST 10967	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. plantarum</i> CST 11023	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. plantarum</i> CST 11031	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

L : *Lactobacillus*; 1 : MRS; 2 : milieu Ledesma; 3 : milieu Ledesma sans acides aminés; 4 : Ledesma sans acide glutamique; 5 : Ledesma sans alanine; 6 : Ledesma sans acide aspartique; 7 : Ledesma sans cystéine; 8 : Ledesma sans phénylalanine; 9 : Ledesma sans histidine; 10 : Ledesma sans isoleucine; 11 : Ledesma sans leucine; 12 : Ledesma sans méthionine; 13 : Ledesma sans proline; 14 : Ledesma sans sérine; 15 : Ledesma sans thréonine; 16 : Ledesma sans tryptophane; 17 : Ledesma sans valine; 18 : Ledesma sans glycine; 19 : Ledesma sans glutamine; 20 : Ledesma sans asparagine; 21 : Ledesma sans arginine; 22 : Ledesma sans tyrosine; 23 : Ledesma sans lysine; 24 : Ledesma sans bases; 25 : Ledesma sans adénine; 26 : Ledesma sans guanine; 27 : Ledesma sans cytidine; 28 : Ledesma sans thymidine; 29 : Ledesma sans uracile; 30 : Ledesma sans désoxyguanosine; 31 : Ledesma sans purines; 32 : Ledesma sans pyrimidines.

tol, du mannose, du sorbose, du gentiobiose, de l'inuline, de l'inositol, par l'absence de fermentation du mélibiose, du L-arabinose, du raffinose, du D-xylose, par leurs exigences en tyrosine, en phénylalanine, en sérine, en arginine et leur possibilité de croissance en l'absence de l'ensemble des pyrimidines, de l'alanine, de la cystéine, de l'ensemble des purines et de la thréonine.

Ainsi, la combinaison des profils fermentaires glucidiques et des profils nutritionnels permet la distinction des 9 espèces sélectionnées pour leur fréquence dans le milieu brassicole (Priest, 1987), sa-

chant toutefois que le nombre de souches étudiées est limité.

DISCUSSION

L'analyse statistique de l'étude biochimique confirme une faible capacité de différenciation des espèces du genre *Lactobacillus* par l'utilisation du système des galeries API 50 CHL. Ce faible pouvoir discriminant a été confirmé ultérieurement par un traitement statistique effectué sur 194 lactobacilles distribués en 25 espèces, et 7 sous-espèces révélant des résultats

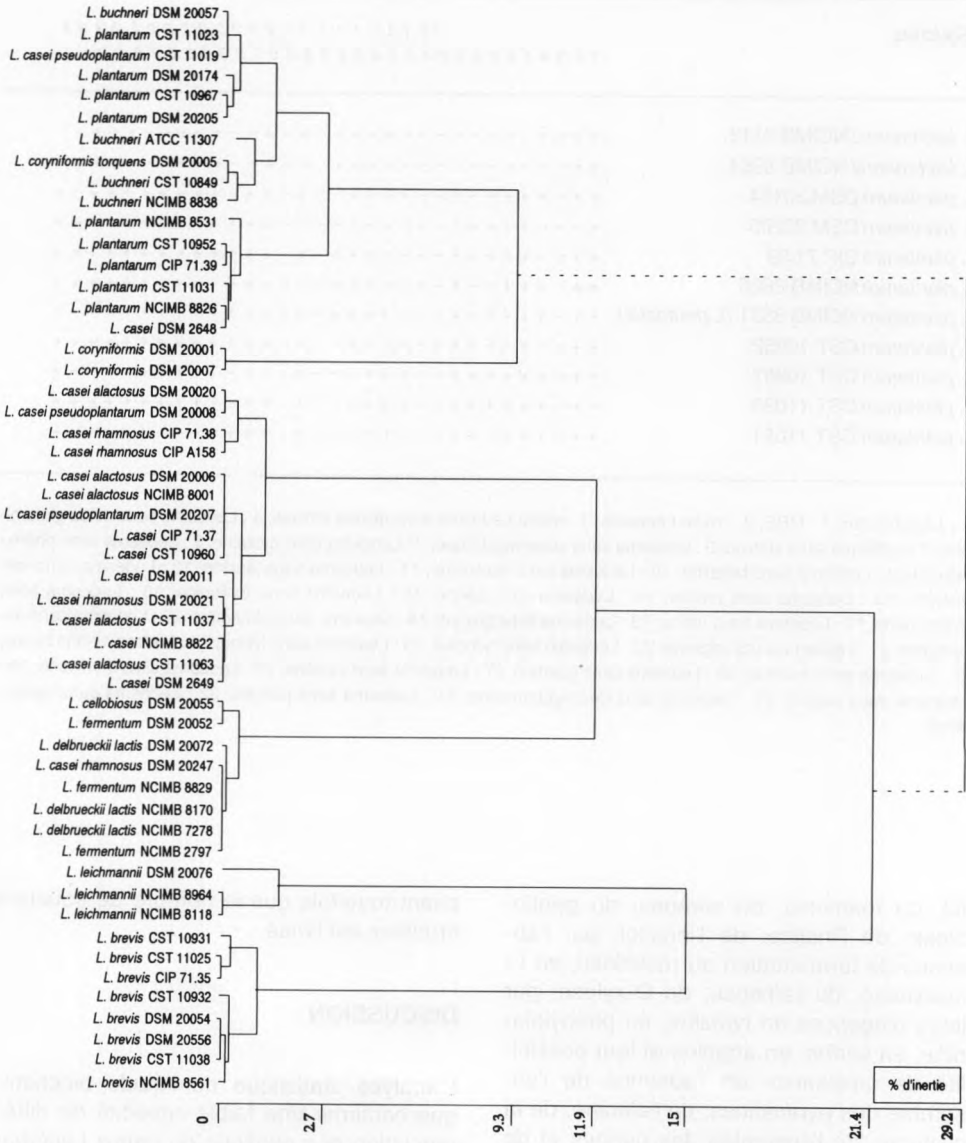


Fig 2. Dendrogramme issu de l'analyse des profils nutritionnels des 52 lactobacilles. Méthodes statistiques : ACM et classification hiérarchique; logiciel : SPAD.N; L : *Lactobacillus*; — proportionalité des distances respectée; --- proportionalité des distances non respectée.

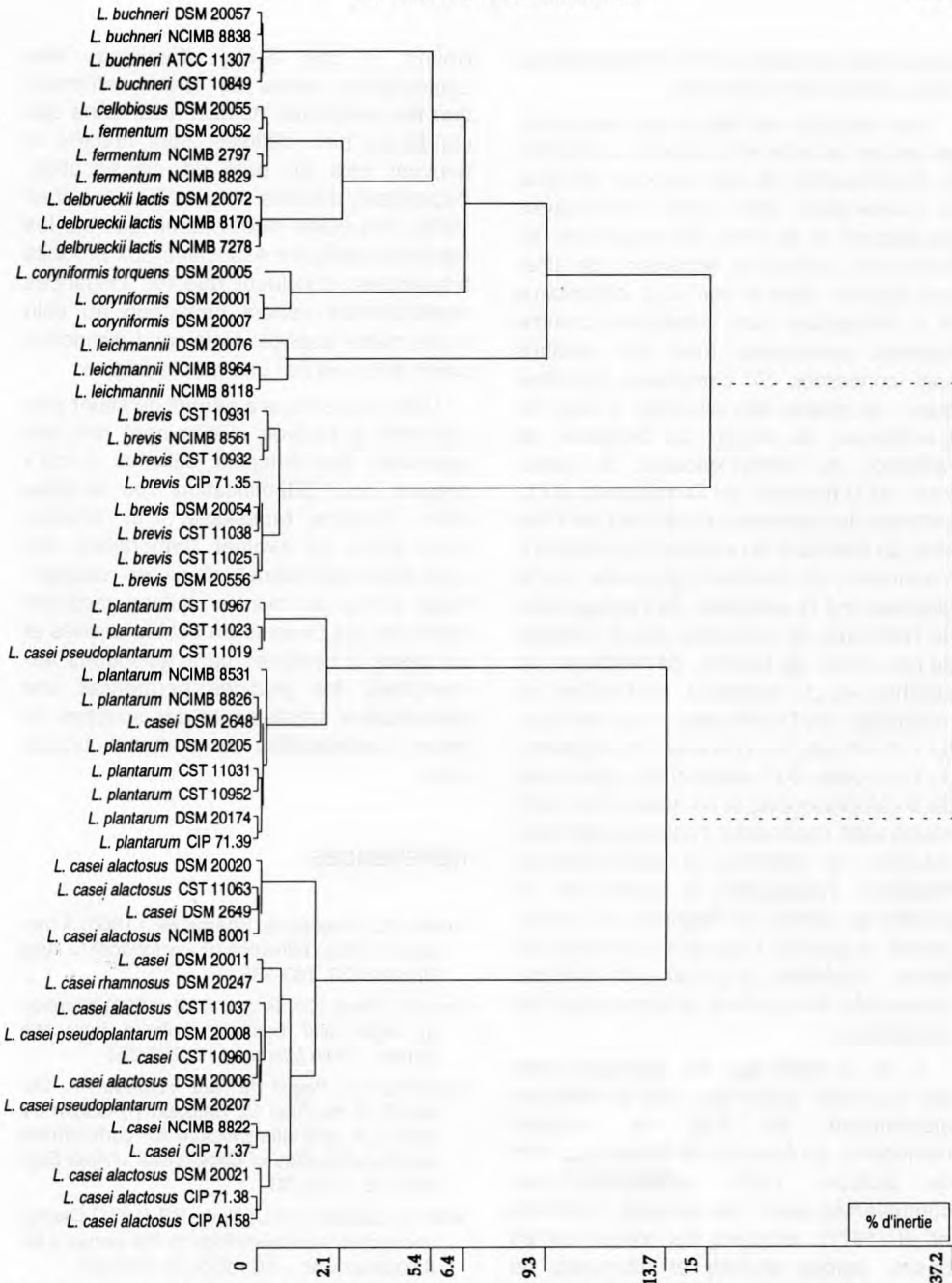


Fig 3. Dendrogramme issu de l'analyse des profils fermentaires des glucides et ceux des exigences nutritionnelles des 52 lactobacilles. Méthodes statistiques : ACM et classification hiérarchique; logiciel : SPAD.N; L : *Lactobacillus*; — proportionalité des distances respectée; --- proportionalité des distances non respectée.

concernant la méthode API comparables à ceux décrits dans cet article.

Les résultats de l'étude des exigences en acides aminés et en bases améliorent la discrimination de ces espèces; de plus, la combinaison des profils fermentaires glucidiques et de ceux des exigences en nutriments permet la séparation de chaque espèce, dans le cas où *L. cellobiosus* et *L. fermentum* sont considérés comme espèces synonymes. Pour ces résultats sont concernés 57 caractères biochimiques : au niveau des glucides, il s'agit du L-arabinose, du ribose, du D-xylose, de l'adonitol, du méthyl-xyloside, du galactose, du D-fructose, du D-mannose, du L-sorbose, du rhamnose, du dulcitol, de l'inositol, du mannitol, du sorbitol, du méthyl-D-mannoside, du méthyl-D-glucoside, de la glucosamine N acétylée, de l'amygdaline, de l'arbutine, de l'esculine, de la salicine, du cellobiose, du lactose, du mélibiose, du saccharose, du tréhalose, de l'inuline, du mélézitose, du D-raffinose, du gentiobiose, du D-turanose, du D-lyxose, du tagatose, du D-arabitol, du L-arabitol, du gluconate, du 5-cétogluconate; et au niveau des nutriments sont concernés, l'acide glutamique, l'alanine, la cystéine, la phénylalanine, l'histidine, l'isoleucine, la méthionine, la proline, la serine, la thréonine, le tryptophane, la glycine, l'arginine, la tyrosine, la lysine, l'adénine, la guanine, la cytidine, l'ensemble des purines et l'ensemble des pyrimidines.

Il est à noter que les regroupements des souches, quelle que soit la méthode biochimique, se font de manière homogène, en fonction de l'espèce et non du biotope. Cette constatation est controversée selon les auteurs. Ledesma *et al* (1977), étudiant les exigences en bases, acides aminés et vitamines de lactobacilles, incriminent les différences de composition de milieux pour justifier les différences nutritionnelles obtenues entre les divers auteurs. Ford *et al* (1958), se

limitant à une étude vitaminique des Lactobacilles isolés du rumen, affirment que les caractères nutritionnels, dans des conditions bien définies, sont stables et peuvent être un outil de classification. Cependant, d'autres auteurs (Russel *et al*, 1954), lors d'une étude vitaminique sur les bactéries lactiques associées aux produits brassicoles, concluent que les exigences nutritionnelles varient beaucoup au sein d'une même espèce; mais cette distinction serait atténuée par une même origine.

Cette étude nous a permis de situer précisément le pouvoir discriminant réel des méthodes biochimiques utilisées jusqu'à présent pour l'identification des lactobacilles d'origine brassicole. Par ailleurs, nous avons pu évaluer l'importance des caractères nutritionnels dans ces résultats. Nous avons pu montrer qu'une méthode associant les besoins en acides aminés et en bases à certaines caractéristiques fermentaires des glucides permettrait une identification satisfaisante des souches du genre *Lactobacillus* du domaine brassicole.

RÉFÉRENCES

- DeMan JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J Appl Bacteriol* 23, 130-135
- Ford JE, Perry KD, Briggs CAE (1958) Nutrition of lactic acid bacteria isolated from the rumen. *J Gen Microbiol* 18, 273-284
- Ledesma OV, Pesce de Ruiz Holgado AA, Oliver G, S de Giori G, Raibaud P, Galpin JV (1977) A synthetic medium for comparative nutritional studies of *Lactobacilli*. *J Appl Bacteriol* 42, 123-133
- Miller A, Sandine WE, Elliker, PR (1971) Deoxyribonucleic acid homology in the genus *Lactobacillus*. *Can J Microbiol* 17, 625-634
- Orla-Jensen AD (1919) The lactic acid bacteria. Andr Fred Host & Son, Copenhagen
- Priest FG (1987) Gram-positive brewery bacteria. In: *Brewing microbiology* (Priest FG,

