

Bactériologie marquée

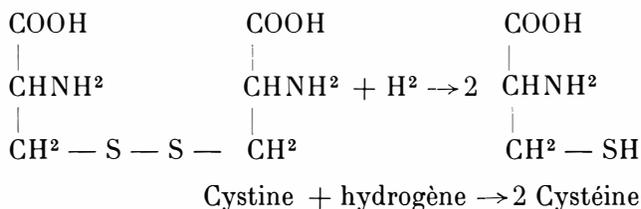
Technique rapide d'étude du catabolisme microbien de la Cystine par le radio-soufre

par J. MORRE et L. RICHOU

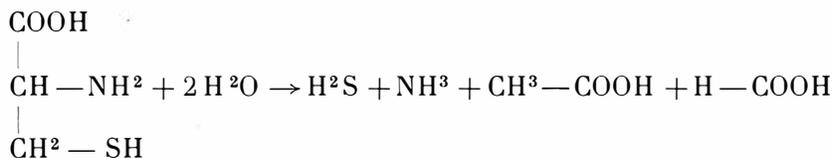
La méthionine et surtout la cystine représentent deux des principaux acides aminés des protéines.

Certains germes sont capables d'attaquer la cystine en libérant de l'hydrogène sulfuré, alors que d'autres ne peuvent le faire, d'où un élément de diagnostic microbien.

Selon TARR (1933) le mécanisme de la réaction serait le suivant : d'abord une réduction :

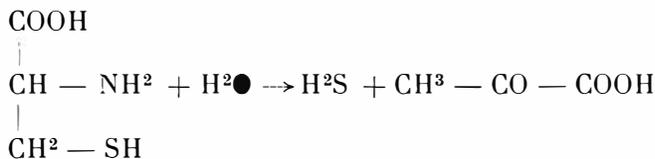


suivie d'une hydratation :



Cystéine + eau \rightarrow hydrogène sulfuré + ammoniac + acide acétique + acide formique.

D'après FROMAGEOT et TCHEN (1953) qui ont expérimenté sur « bacillus subtilis », après la réduction, la réaction d'hydratation serait la suivante :



Cystéine + eau \rightarrow hydrogène sulfuré + acide pyruvique.

Elle aboutirait à la production d'hydrogène sulfuré avec de l'acide pyruvique au lieu d'acide acétique et d'acide formique.

Détection de l'hydrogène sulfuré :

Quels sont les moyens dont dispose le bactériologiste pour apprécier le dégagement d'hydrogène sulfuré ? On sait que les sulfures des métaux lourds (plomb, fer, bismuth, antimoine, cobalt et nickel) sont fortement colorés. Le sel du métal est incorporé au milieu de culture solide ou liquide, ou bien déposé sur une languette de papier filtre que l'on suspend au-dessus du milieu de culture.

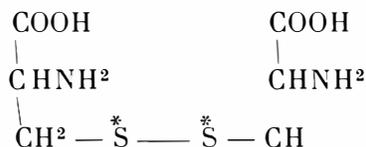
Ces techniques sont simples, mais nécessitent un certain temps : Avec l'eau peptonée, où le donneur de soufre est la cystine et le révélateur du citrate de fer, la réaction exige un minimum de quatre heures. Le papier au sous-acétate de plomb ne vire au noir qu'après neuf heures. Le milieu de HAJNA modifié par ROLAND, où la source de soufre est le thio-sulfate de sodium et le révélateur le sulfate de fer ammoniacal, donne un résultat seulement après huit heures.

Protocole de nos recherches :

Pour diminuer la durée de l'examen, il fallait révéler les quantités infinitésimales d'hydrogène sulfuré, qui se dégagent dès les premiers stades du développement microbien.

C'est pour quoi nous avons pensé à utiliser le radio-soufre dont la détection, grâce à la radio-activité émise, est facile. Un milli-Curie de soufre 35 qui correspond à une activité importante, ne pèse qu'un milliardième de gramme. En pratique on n'emploie que les sous-multiples du milli-Curie. Ainsi des quantités extrêmement faibles d'hydrogène sulfuré peuvent être décelés facilement.

Nous avons employé comme molécule radio-active ajoutée au milieu de culture synthétique de la cystine marquée sur les deux atomes du pont soufré :



En solution, il s'établit un équilibre :

Cystine \rightleftharpoons Cystéine suivant le pH et le rH du milieu.

En fournissant aux germes un acide aminé soufré, leur croissance se trouve facilitée et le nombre de germes susceptibles de réagir augmente, car certains qui métabolisent la cystine, ne peuvent attaquer les sulfates et les thio-sulfates.

L'équipement spécial de détection ainsi que la cystine radioactive sont assez coûteux, mais cette technique permet dès maintenant de se prononcer en trois heures sur le pouvoir sulphydrogène de germes.

Application à la bactériologie alimentaire :

Il est retenu comme normes générales de salubrité bactériologique pour les produits alimentaires les conditions suivantes :

1° absence d'espèces pathogènes au premier rang desquelles sont placées les salmonelles ;

2° absence d'espèces microbiennes dont la présence ou la prolifération peut altérer la denrée considérée.

La production d'hydrogène sulfuré par une population microbienne isolée d'un aliment, apporte de graves éléments de présomption en faveur de la non-salubrité : on sait que dans la très grande majorité des cas les salmonelles sont des germes sulphydrogènes. On admet par ailleurs que la présence de germes sulphydrogènes souligne la possibilité d'une détérioration des protides alimentaires avec protéolyse et attaque des acides aminés.

On conçoit dans ces conditions, l'intérêt de cette méthode rapide de révélation de l'hydrogène sulfuré appliquée à la bactériologie alimentaire.

Réalisation de l'expérimentation :

Les difficultés rencontrées pour la mise au point de cette technique ont été grandes : impossibilité d'emploi des milieux de culture ordinaires avec les volumes habituels, échec de l'entraînement de l'hydrogène sulfuré radioactif par un courant d'azote ou d'hydrogène sulfuré stable. Finalement, nous avons retenu une micro-méthode : chaque tube contient un millilitre du milieu synthétique de LwOFF enrichi en glucose, en acide et amide nicotamique avec adjonction de cystine marquée. Au-dessus se trouve une nacelle de verre avec une rondelle de papier filtre humectée de sous-acétate de plomb.

Détection radioactive :

A la fin de l'expérience, la rondelle est déroulée dans une coupelle en acier inoxydable, séchée à l'étude à 70° puis passée au compteur GEIGER-MULLER.

Le soufre 35 est un isotope qui émet des rayons β de faible énergie (0,17 Mev.) comparables à ceux du carbone 14. On doit donc employer un compteur GEIGER spécial à fenêtre mince : Nous avons utilisé un compteur TRACERLAB type TG CE 14 à fenêtre de MYLAR de 0,9 mg/cm² (Le Mylar est une matière synthétique voisine du nylon).

Cette fenêtre est poreuse, il est nécessaire d'établir en continu un courant de gaz inerte (ici de l'Hélium) pour éviter une entrée intempestive d'oxygène, d'où le nom de compteur à gaz de ces détecteurs.

Cette technique ainsi réalisée nous a donné déjà des résultats intéressants, mais nous avons cherché à l'améliorer.

Facteurs modifiant la sensibilité :

Comme nous utilisons une micro-méthode et des temps d'incubation très courts, la production de l'hydrogène sulfuré a lieu en quantités très faibles. Des phénomènes qui normalement seraient sans importance viennent alors troubler la réaction. Il y a d'abord la dissolution du gaz radioactif dans l'eau du milieu nutritif. Puis il se forme entre la cystine et l'hydrogène sulfuré des composés d'addition grâce à des « ponts soufrés », ainsi que des éthers-sels entre l'acide et le radical aminé de la cystine. Enfin, l'hydrogène sulfuré s'oxyde au contact des composés métabolisés par les germes. Il y a production de soufre qui précipite.

Ces trois faits s'opposent au dégagement de l'hydrogène sulfuré. Pour y remédier, le volume nutritif est réduit à 1 ml ce qui limite les possibilités de passage du gaz en solution. Les composés d'addition et les éthers-sels sont détruits en ajoutant en fin d'incubation 1 ml d'acide phosphorique dilué. Le soufre radioactif précipité au fond du tube est réduit par de l'hydrogène naissant. On obtient ce dernier par action du zinc sur l'acide phosphorique. La réaction de réduction est la suivante : $4 \text{H}^+ + \overset{*}{\text{S}}^2 + 4\text{e} \rightarrow 2 \text{H}^2 \overset{*}{\text{S}}$ (0,14 volt). Il est nécessaire de chauffer.

Le chauffage produit une réaction secondaire gênante : une quantité non négligeable de cystine se décompose par la chaleur en hydrogène sulfuré. Il faut donc protéger la cystine non attaquée par les germes. On sait que les aldéhydes et les cétones donnent avec la cystine des composés d'addition, nous employons le glyoxal qui produit un composé jaune ambré résistant bien au chauffage.

Mode opératoire :

En conséquence des essais précédents, la technique suivante a été mise au point :

Nous préparons les tubes de cultures avec nacelles et papier filtre qui sont stérilisés à l'autoclave. Au milieu synthétique de LwöFF (1) préparé stérilement, on ajoute au moment de l'emploi la cystine marquée (2). L'activité finale est de 10^{-4} mCi/ml. Un ml du mélange est versé dans chaque tube. On prépare l'inoculum microbien que l'on dépose à raison d'une goutte par tube. Des témoins sont conservés.

Chaque nacelle reçoit une solution de sous-acétate de plomb (3). On met 6 tubes au bain-marie à 37° : 3 inoculés et 3 témoins.

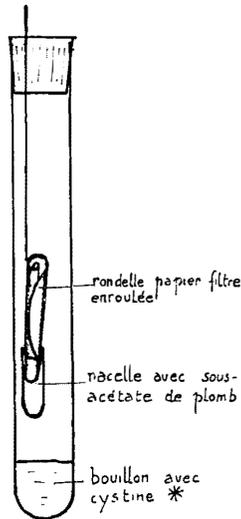


FIG. 1. — Tube de culture avec nacelle recevant le s/acétate de Pb et la rondelle de papier filtre.

On prélève 2 tubes : un ensemencé et un témoin toutes les heures. Après l'incubation, c'est-à-dire après 1, 2 ou 3 heures, on ajoute un ml d'une solution de glyoxal (4) et on met au bain-marie à 60° pendant 10 minutes.

On verse une pincée de grenaille de zinc et un ml d'acide phosphorique dilué (5). On laisse au bain-marie pendant 10 minutes.

La rondelle de papier filtre est séchée quelques minutes à l'étuve à 70° et collée au fond d'une coupelle en acier inoxydable, puis on

(1) On trouvera « in fine » la formule de tous les réactifs.

procède au comptage pendant 1.000 secondes (environ 17 minutes) ce qui correspond à la précision désirée.

On fait le rapport : nombre de chocs du tube ensemencé (E), nombre de chocs du témoin (T). Un rapport de deux s'est révélé positif.

Comparaison avec les méthodes traditionnelles :

Pour établir la valeur de cette méthode radioisotopique, nous avons fait la comparaison avec les techniques habituelles.

Seuls sont rapportés ici les résultats obtenus avec 4 souches de germes purs et 3 mélanges microbiens non identifiés provenant de produits de charcuterie.

La mesure de la radioactivité (E) du tube ensemencé a été faite après deux heures d'incubation à 37° au bain-marie. La radioactivité est exprimée en chocs/1.000 secondes, mouvement propre déduit (voisin de 150 chocs/1.000 sec.).

La radioactivité portée par le tube témoin (T) est la moyenne de 7 mesures obtenues avec les témoins (moyenne 94, écart quadratique à la moyenne 2).

Le rapport E/T a été calculé : un rapport égal ou supérieur à 2 a été reconnu comme positif (+), égal ou supérieur à 4 comme très positif : (++).

L'erreur de ce rapport a été calculée avec une probabilité de 90 % (1,645 σ) en ne tenant compte que de l'erreur statistique due aux fluctuations de la désintégration des radio-éléments.

On admet que la présence des témoins élimine une grande partie des autres sources d'erreur :

- production et fixation irrégulière d'hydrogène sulfuré à partir d'un milieu biologique ;
- auto-absorption variable de la rondelle de papier filtre, importante à cause de la faiblesse énergétique du soufre 35 ;
- variation de la « géométrie de l'ensemble source-compteur » due au séchage de la rondelle de papier ;
- pouvoir réflecteur variable de la coupelle.

Conclusions :

Nous pensons avoir mis au point une technique d'étude particulièrement rapide du métabolisme microbien des composés soufrés, qui sera utile notamment à l'hygiène alimentaire. Les radioisotopes ouvrent à la bactériologie des perspectives nouvelles : détection extrêmement fine et rapide et possibilité de donner des réponses chiffrées.

	Méthode radio-isotopique Résultats après 3 h.				Résultats	Méthodes traditionnelles		
	Activité Nette (mouvement propre déduit)		Rapport E/T	Erreur sur E/T à 90 %		Papier au sous-acé- tate de Plomb	Eau peptonée au Citrate de Fer	Milieu de HAJNA modifié ROLAND
	Témoin : T	Ensemencé : E						
Paratyphique B	94	532	5,6	± 2,5	++	+ après 7 h.	+ après 4 h.	++ après 6 h.
Salmonella Montevideo	94	304	3,2	± 1,6	+	+ après 7 h.	+ après 4 h.	++ après 6 h.
Proteus Mirabilis	94	333	3,6	± 1,7	++	+ après 7 h.	+ après 4 h.	++ après 6 h.
Salmonella Anatum	94	283	3,1	± 1,5	+	+ après 7 h.	+ après 4 h.	++ après 6 h.
Mélange de germes (A) Produits charcuterie	94	89	0,9	± 0,6	—	trace après 24 h.	+ après 20 h.	
Mélange de germes (B) Produits charcuterie	94	263	2,7	± 1,4	+	+ après 7 h.	+ après 7 h.	
Mélange de germes (C) Produits charcuterie	94	614	6,5	± 2,8	++	+ après 5 h.	++ après 6 h.	

Travail effectué au Laboratoire de radiobiologie du service vétérinaire du département de la Seine.

Nous remercions tout particulièrement MM. BASILE, CHAPPEVILLE et PANTALÉON qui nous ont donné l'idée de ce travail.

Note

Milieux et réactif :

1) MILIEU DE LWÖFF.

KH^2PO^4	1,2 g
$\text{Na}^2\text{HPO}^4, 12\text{H}^2\text{O}$	8,6 g
NH^4Cl	1 g
$\text{MgSO}^4, 7\text{H}^2\text{O}$	0,2 g
$\text{CaCl}^2, 6\text{H}^2\text{O}$	0,01 g
$\text{FeSO}^4, 7\text{H}^2\text{O}$	0,001 g
Eau distillée	QS 1.000 ml

Répartir en flacons de 100 ml. Stériliser à l'autoclave 120°, 20 minutes.

Puis :

glucose stérile en ampoules	6 g
acide nicotinique	0,25 g
amide nicotinique	0,25 g
milieu de LWÖFF	QS 100 ml

garder au réfrigérateur.

Enfin au moment de l'emploi :

2) { le milieu	1 ml
{ Solution de Cystine radioactive à 10^{-3} mCi/ml	1 ml

Répartir à raison d'un ml par tube de culture.

3) { Plomb, Acétate basique en solution D = 1,32	5 ml
{ Eau distillée	QS 100 ml
4) { Glyoxal solution à 30 % du commerce	1 ml
{ Eau distillée	9 ml
5) { Acide phosphorique D = 1,61 ; 55° B	100 ml
{ Eau distillée	100 ml

BIBLIOGRAPHIE

- CHAPPEVILLE (F.) et FROMAGEOT (P.). — Formation de sulfite, d'acide cystéique et de taurine à partir de sulfate par l'œuf embryonné. *Biochemica, Biophysica Acta* (1957), **26**, p. 538 à 558.
- JACOB (M. F.). — Cours de Microbiologie Institut Pasteur (1956-55), 16^e leçon.

- LEVIN (G.), HARISON (R.) et HESS (W.). — « A Radioisotopic technic for the rapid detection of coliform organisms ». *Amer. J. of Public Health* (1956), p. 1405 à 1414.
- ROLAND (F.). — *Bull. Med.* (1946), **60**, p. 397.
- VERON (M.) et GASSER (F.). — Sur la détection de l'hydrogène sulfuré produit par certaines entéro-bactériacées dans les milieux dits de diagnostic rapide. *Annales Institut Pasteur* (1963), **105**, 3, p. 524 à 534.
- ZAHN (H.) et GOLSCHE (E.). — Réaction d'acides aminés soufrés : décomposition de la Cystine, de la Cystéine..... en solution aqueuse. *Z (Hoppe Seyler's) Physiol. Chemie* (Deut.) (1962), **330**, 1-3, p. 38-45.
- ZERVAS (L.) et PHOTAKI (I.). — On cysteine and cystine peptides I/ : New S-protecting for Cysteine. *J. Amer. Chem. Soc.* (1962), **84**, **20**, p. 3387.
-