

PIGMENTS HÉMATINIQUES DE *BACILLUS COAGULANS* CULTIVÉ EN  
AÉROBIOSE OU EN ANAÉROBIOSE

par

PAULETTE CHAIX ET PAULE FLAMENS

*Laboratoire de Chimie Physiologique de la Faculté des Sciences, Lyon (France)*

L'étude systématique des caractères morphologiques et biochimiques proposés comme critères de classification bactériologique dans la "Standard Descriptive Chart"<sup>8</sup>, nous a montré que les organismes homolactiques pourvus de pigments hématiniques et de cystéinedésulfhydrase, désignés précédemment<sup>3</sup> sous le nom de Souches C et *F*<sub>5</sub>, appartiennent au groupe des bacilles décrits en 1915 par HAMMER<sup>5,9</sup>, sous le nom de *Bacillus coagulans*, et en 1938-1940 par WERKMAN ET ANDERSEN<sup>1,11</sup> sous le nom de *Bacillus dextrolacticus*. La souche C est à présent cataloguée à l'"American Type Culture Collection" sous le nom de *Bacillus coagulans* Strain C (non-coagulating strain) n° 11,369.

Ayant reconnu que cette souche C est capable de proliférer non seulement en semi-aérobiose mais aussi en aérobiose stricte et en anaérobiose stricte, il a paru intéressant de préciser l'état de ses pigments hématiniques en fonction de ses conditions de culture. Le spectre hématinique de la souche C précédemment décrit<sup>3</sup> se rapportait en effet à des cultures réalisées dans des conditions mal définies de semi-aérobiose.

Les observations décrites ici renseignent à la fois sur les conditions de synthèse des pigments hématiniques et sur l'évolution de ces pigments en fonction de la phase de croissance. Elles se rapportent à la souche C et aussi à un autre *B. coagulans* (A.T.C.C 10,545).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Dans tous les cas, les différents milieux de culture sont stérilisés par autoclavage d'une demi-heure à 120°, et la croissance de *B. coagulans* a lieu à une température de 50°. La récolte et le lavage des masses bactériennes sont faits comme antérieurement<sup>3</sup>.

*Conservation des souches.* Les souches de *B. coagulans* A.T.C.C. 10,545 et 11,369 sont conservées sur milieu solide S à l'agar incliné (glucose 5% ; peptone pancréatique "Prolabo" 1% ; "Bacto yeast extract dehydrated Difco" 0,5% ; CO<sub>3</sub>Ca 2% ; agar 4%).

*Précultures.* Soit sur milieu solide S identique au milieu de conservation, soit sur milieu liquide I précédemment décrit<sup>3</sup>, soit sur milieu liquide L : extrait de levure (obtenu à partir d'une suspension de levure de boulangerie à 20% autoclavée 3 heures à 120° décantée et filtrée) additionné de glucose 2%, de Bacto Yeast Extract Dehydrated Difco 0,5% et de CO<sub>3</sub>Ca 2%.

*Cultures en grandes masses.* Elles ont toujours été faites sur le milieu II de composition précédemment décrite<sup>3</sup>.

*Cultures en anaérobiose stricte.* 4 litres de milieu II sont placés dans un ballon de 6 litres fermé par un bouchon de caoutchouc, muni de deux tubulures dont une seulement plonge dans le liquide. L'élimination de l'air est effectuée, avant l'ensemencement, par passage pendant 20 minutes d'un courant d'azote spécialement garanti par la Société de l'"Air Liquide", Lyon (Azote R) contenant au maximum 3·10<sup>-5</sup> % d'oxygène. L'ensemencement est fait sous courant gazeux en soulevant le bouchon en caoutchouc. Aussitôt après, la tubulure ne plongeant pas dans le liquide de culture est mise en liaison avec une soupape au mercure, et le barbotage est poursuivi durant encore au moins

15 minutes avant la mise à l'étuve. La soupape au mercure est destinée à éviter les excès de pression survenant au cours de l'incubation par suite du déplacement de  $\text{CO}_2$  du carbonate de calcium au fur et à mesure que le milieu s'acidifie. Le carbonate de calcium est maintenu en suspension par agitation au cours de l'incubation.

*Cultures en forte aérobiose.* 1 litre de milieu II est placé dans un ballon de 6 litres bouché par un bouchon de caoutchouc, muni de 2 tubulures dont une seulement plonge dans le liquide. Après l'ensemencement, durant toute l'incubation, la tubulure ne plongeant pas dans le liquide est branchée sur une trompe à eau, ce qui assure le renouvellement constant de l'air du ballon qui, de plus, est continuellement agité à grande vitesse dans l'étuve.

*Cultures en semi-aérobiose.* 4 litres de milieu II sont placés dans un ballon de 6 litres; surface de contact du liquide avec l'air = environ  $4 \text{ dm}^2$ ; bouchon de coton. Le carbonate de calcium est mis en suspension par agitation à la main à deux ou trois reprises au cours de l'incubation. C'est dans de telles conditions semi-anaérobies qu'ont été faites les cultures étudiées dans le précédent mémoire<sup>9</sup>.

#### Procédé d'étude des pigments hématiniques

Examen spectroscopique direct de la récolte bactérienne placée sous forme de pâte dans un anneau de Scheibe entre deux lames de verre ou de plexiglass. De telles préparations, dont l'épaisseur est de 2.5 mm, sont examinées avec le spectroscope de poche Zeiss ou avec le spectroscope à réversion de Hartridge.

Examen spectroscopique de la récolte bactérienne traitée par l'hydrosulfite de sodium et par la pyridine dans les conditions précédemment décrites<sup>3</sup>.

Les bactéries traitées ou non par l'hydrosulfite de sodium et la pyridine ont été dans un certain nombre de cas, portées à la température de  $-192^\circ$  par immersion dans l'azote liquide pendant 7 minutes *cf.*<sup>6</sup>; dans ce dernier cas, l'épaisseur des préparations est de 1 mm.

## RÉSULTATS

#### Possibilités de croissance semi-aérobiose, aérobiose ou anaérobiose

Les conditions de préculture et d'ensemencement étant les mêmes, la souche C est capable de se multiplier activement soit dans un milieu continuellement saturé d'air, soit dans un milieu rigoureusement exempt d'oxygène. Le poids frais des masses bactériennes récoltées dans des expériences parallèles effectuées en aérobiose stricte ou en anaérobiose stricte, est donné dans le Tableau I.

TABLEAU I

CROISSANCE EN AÉROBIOSE STRICTE ET EN ANAÉROBIOSE STRICTE  
DE BACILLUS COAGULANS (A.T.C.C. 11,369)

- Précultures: milieu S — âge = 17 heures (phase exponentielle de croissance)  
— Cultures: milieu liquide I.

Durée d'incubation en heures	Poids frais des récoltes en gramme par litre de milieu	
	anaérobiose stricte	aérobiose stricte
12	< 0.1	2.9
20	4	4
45	< 4 (lyse importante)	3.9

On voit que la masse bactérienne formée est, dans les 12 premières heures qui suivent l'ensemencement, fortement accrue par la présence d'oxygène, mais que cette masse s'accroît ensuite en anaérobiose plus rapidement qu'en aérobiose, de telle sorte que la masse bactérienne formée est la même après 20 heures d'incubation dans les deux types de cultures. Entre la vingtième et la quarante-cinquième heure, la croissance ne se poursuit pas, les bacilles subissent une légère lyse dans la culture aérobiose et une

lyse très importante dans la culture anaérobiose. La souche *B. coagulans* 10,545 a des possibilités de croissance anaérobiose à peu près égale à celles de la souche C.

### *Pigments hématiniques des cultures en forte aérobiose*

#### *Evolution en fonction du temps de culture*

Le Tableau II donne la position du centre des bandes d'absorption repérée soit avec le spectroscope de poche Zeiss, soit avec le spectroscope de HARTRIDGE, les pâtes microbiennes étant à l'état réduit et maintenues soit à la température ordinaire, soit à la température de l'azote liquide. Il ressort de ces données que la souche C cultivée en aérobiose stricte présente à l'état réduit un spectre visible correspondant à deux pigments hématiniques: l'un, type cytochrome  $b_1$ , dont la bande est située à 559 m $\mu$ ; l'autre, type cytochrome  $a$ , dont la bande se trouve à 603 m $\mu$ . Le refroidissement dans l'azote liquide à  $-192^\circ$  ne modifie pas sensiblement la position de ces bandes. Le fait que ces deux pigments correspondent aux cytochromes  $a$  et  $b_1$  est confirmé par l'apparition, après traitement par la pyridine, de deux bandes respectivement centrées sur 588 m $\mu$  (bande de l'hémochrome de pyridine du cytochrome  $a$ ) et 557 m $\mu$  (bande de l'hémochrome de pyridine du protohème). Le refroidissement à  $-192^\circ$  ne modifie pas le nombre ni la position de ces bandes.

TABLEAU II

SPECTRE VISIBLE (A L'ÉTAT RÉDUIT) OBSERVÉ CHEZ BACILLUS COAGULANS (A.T.C.C. 11,369)  
CULTIVÉ EN ANAÉROBIOSE STRICTE ET EN AÉROBIOSE STRICTE

Préculture de 17 heures sur milieu S.

— o = absence de bande d'absorption

— la longueur d'onde du centre des bandes d'absorption observées est exprimée en m $\mu$ .

Age des cultures en heures	Cytochrome a				Cytochrome $b_1$			
	Examen direct		Hémochrome de pyridine		Examen direct		Hémochrome de pyridine	
	+ 20°	- 192°	+ 20°	- 192°	+ 20°	- 192°	+ 20°	- 192°
<b>I. Aérobies strictes</b>								
12	603	605	587.5	587.5	561	557	557	558
20	602	604	587.5	587.5	559	560	556.5	555
45	603.5	605	588	588	558.5	558.5	558.5	555
<b>II. Anaérobies strictes</b>								
12	o	o	o	o	o	o	o	o
20	o	o	o	o	o	o	o	o
45	o	o	o	o	o	o	o	o

Des observations faites sur *B. coagulans* 10,545 conduisent aux mêmes conclusions.

Le Tableau II montre en outre que contrairement à ce que l'on observe chez la levure et *B. subtilis*<sup>2</sup>, le spectre des cultures en aérobiose stricte de *B. coagulans* n'évolue pas en fonction du temps: le cytochrome  $b_1$  apparu après 12 heures de culture reste le même cytochrome  $b_1$  après 45 heures de culture sans qu'à aucun moment le spectre du cytochrome  $c$  ne soit décelable. Cette absence d'évolution des pigments hématiniques est corroborée par le fait que l'hémochrome de pyridine des cultures de 12 heures comme

celui des cultures de 20 ou 45 heures est dans tous les cas un hémochrome vert ou blanchâtre, jamais rose.

#### *Cultures en anaérobiose stricte*

Sur les récoltes provenant de culture strictement anaérobiose, il n'a été possible par aucun moyen de mettre en évidence la présence de composés hématiniques. Les examens spectroscopiques directs à la température ordinaire ou à la température de l'azote liquide, aussi bien que les examens des récoltes traitées à la pyridine (à la température ordinaire ou à  $-192^{\circ}$ ) sont tous négatifs et ceci après 12, 20 ou 45 heures de culture. *B. coagulans* cultivé en anaérobiose stricte et dépourvu de cytochrome, est d'autre part capable de transformer quantitativement le glucose en acide lactique; ces caractères le rendent très proche des bactéries lactiques vraies.

#### *Cultures semi-aérobies*

Les observations spectroscopiques réalisées à propos de chacune des nombreuses récoltes semi-aérobies effectuées au cours de ces dernières années, prêtent aux remarques suivantes: Quand le milieu liquide remplit presque totalement le récipient qui le contient (contact avec l'air réduit) et quand le milieu est peu agité, aucune bande d'absorption n'est révélée par l'examen spectroscopique direct; mais le traitement par la pyridine donne lieu à la formation d'un hémochrome dont la bande d'absorption est centrée entre 547  $m\mu$  et 550  $m\mu$ . Quand le récipient est peu rempli et le milieu agité assez souvent à la main, il existe une bande faible centrée vers 560  $m\mu$ , et visible par examen direct: cytochrome  $b_1$ ; la zone rouge du spectre ne contient aucune bande visible; une bande paraissant soit unique (centrée sur 553.5  $m\mu$ ) soit double (centrée à 549 et 560  $m\mu$ ) et visible seulement après traitement à la pyridine. Ces derniers examens ont été faits uniquement à la température ordinaire.

#### CONCLUSIONS

*Bacillus coagulans* dont un grand nombre de caractères ont été précédemment décrits<sup>1, 3, 5, 9, 11</sup> a des possibilités égales de croissance en aérobiose stricte et en anaérobiose stricte. La croissance en absence totale d'oxygène se distingue par une très longue période d'induction. Cultivé en anaérobiose stricte, il ne contient aucun pigment hématinique type cytochrome. Cultivé en forte aérobiose, il possède les cytochromes  $a$  et  $b_1$ , dont le spectre est visible indifféremment sur des cultures âgées de 12, 20 et 45 heures, sans que jamais n'apparaisse un spectre classique des cytochromes  $a$ ,  $b$  et  $c$ . A tous les âges de la culture, l'hémochrome de pyridine est vert ou blanchâtre, jamais rose.

Contrairement à ce qui se passe chez les levures et *B. subtilis*, la synthèse des cytochromes s'arrête aux composantes  $a$  et  $b_1$  et n'évolue pas avec le temps.

Dans les cultures semi-aérobies, le spectre du cytochrome  $a$  n'est généralement pas visible, le spectre du cytochrome  $b_1$  est faible ou inapparent, dans ce dernier cas il n'est révélé que par le traitement par la pyridine.

*B. coagulans* se montre devoir être un matériel particulièrement favorable à l'étude de l'induction par l'oxygène<sup>4, 10</sup> de la synthèse des pigments hématiniques, et en particulier des cytochromes  $a$  et  $b_1$ .

## RÉSUMÉ

*Bacillus coagulans* fournit en cultures aérobies et anaérobies des masses bactériennes totales pratiquement égales. Les cultures strictement anaérobies sont dépourvues de cytochromes. Les cultures aérobies possèdent les cytochromes *a* et *b*<sub>1</sub> qui n'évoluent pas avec le temps vers les cytochromes classiques *a*, *b* et *c*. Les cultures semi-aérobies, généralement dépourvues de cytochrome *a*, présentent un spectre de cytochrome *b*<sub>1</sub> d'intensité variable.

## SUMMARY

In aerobic and anaerobic cultures, *Bacillus coagulans* yields practically equal bacterial masses. The strictly anaerobic cultures do not contain cytochromes. Aerobic cultures possess cytochrome *a* and *b*<sub>1</sub>, which do not change in the course of time into the classical cytochromes *a*, *b* and *c*. The semi-aerobic cultures, generally free of cytochrome *a*, give a spectrum of cytochrome *b*<sub>1</sub> of variable intensity.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Bacillus coagulans* liefert in aerobischen und anaerobischen Kulturen praktisch vollständig gleiche bakterielle Massen. Streng anaerobische Kulturen enthalten keine Cytochrome. Aerobische Kulturen besitzen Cytochrom *a* und *b*<sub>1</sub>, die nicht mit der Zeit die klassischen Cytochrome *a*, *b* und *c* geben. Halbaerobische, im allgemeinen von Cytochrome *a* freie Kulturen zeigen ein in der Intensität veränderliches Cytochrom *b*<sub>1</sub>-Spektrum.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> A. A. ANDERSEN ET C. H. WERKMAN, *Iowa State Coll. J. Sci.*, 14 (1940) 187.
- <sup>2</sup> P. CHAIX ET G. RONCOLI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 268.
- <sup>3</sup> P. CHAIX ET P. FLAMENS, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1950) 38.
- <sup>4</sup> B. EPHRUSSI ET P. SLONIMSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 256.
- <sup>5</sup> B. W. HAMMER, *Iowa Agr. Exp. St. Res. Bull.*, 19 (1915) 119.
- <sup>6</sup> D. KEILIN ET E. F. HARTREE, *Nature*, 164 (1949) 254.
- <sup>7</sup> R. LEMBERG ET J. W. LEGGE, *Hematin Compounds and Bile Pigments*, Interscience Publishers, New York 1949.
- <sup>8</sup> *Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria of the Society of American Bacteriologists*, Geneva, N.Y.
- <sup>9</sup> W. B. SARLET ET B. W. HAMMER, *J. Bact.*, 23 (1932) 301.
- <sup>10</sup> P. SLONIMSKI, Thèse Sciences Naturelles, Paris 1952.
- <sup>11</sup> C. H. WERKMAN ET A. A. ANDERSEN, *J. Bact.*, 35 (1938) 69.

Reçu le 9 Mars 1953