

Fig. 5. Macrophage incubé pendant 30 min avec la suspension liposomiale, puis après lavage, incubé durant 60 min avec du milieu frais. Les liposomes intacts (L) dominent, tout en voisinant parfois avec des liposomes ouverts (Lo). $\times 20\,000$.

posés aux liposomes. Ces vacuoles sont chargées de débris membranaires, provenant probablement de liposomes dégradés et de liposomes identifiables, encore refermés.

Des liposomes non dégradés sont aussi présents dans les vacuoles des macrophages qui, après avoir été exposés à la suspension liposomiale pendant 10 ou 30 min, ont été rincés et incubés pendant 60 ou 120 min avec du milieu de culture frais (figure 5). Il ressort de cette dernière expérience que 2 h après la phagocytose, les liposomes ne sont pas encore totalement dégradés par les macrophages.

En conclusion, nos résultats démontrent que les liposomes sont phagocytés par les macrophages. Ils sont en accord avec d'autres travaux sur l'endocytose des liposomes⁷⁻¹⁰ et confirment nos observations antérieures sur la lenteur de la dégradation des liposomes après leur incorporation cellulaire¹¹.

⁸ G. GREGORIADIS et R. A. BUCKLAND, *Nature* 244, 170 (1973).

⁹ Y. E. RAHMAN et al., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 146, 1173 (1974).

¹⁰ Y. E. RAHMAN et B. J. WRIGHT, *J. Cell Biol.* 65, 112 (1975).

¹¹ A. MALNOË et al., *Biochem. Soc. Transact.* 3, 730 (1975).

Milieux à base de poudre de muscle pour la numération des microorganismes protéolytiques

Muscle Powder Media for Enumeration of Proteolytic Microorganisms

J. PROTH, A. MOUREY et G. KILBERTUS

Laboratoire de Botanique et de Microbiologie, Université de Nancy I, Case officielle 140, F-54037 Nancy-Cedex (France), 25 juin 1976.

Summary. New media, with ox muscle powder as a substrate, are proposed for enumeration of proteolytic microorganisms in meat products.

Les milieux de culture classiques pour la détection et la numération des microorganismes protéolytiques au sein d'une population microbienne sont essentiellement à base de caséine ou de gélatine.

La caséine permet la mise en évidence des microorganismes caséolytiques, susceptibles de dégrader les produits laitiers¹. L'utilisation de la gélatine est justifiée par le fait que les études taxonomiques des microorganismes nécessitent l'utilisation de substrats bien définis. Dans

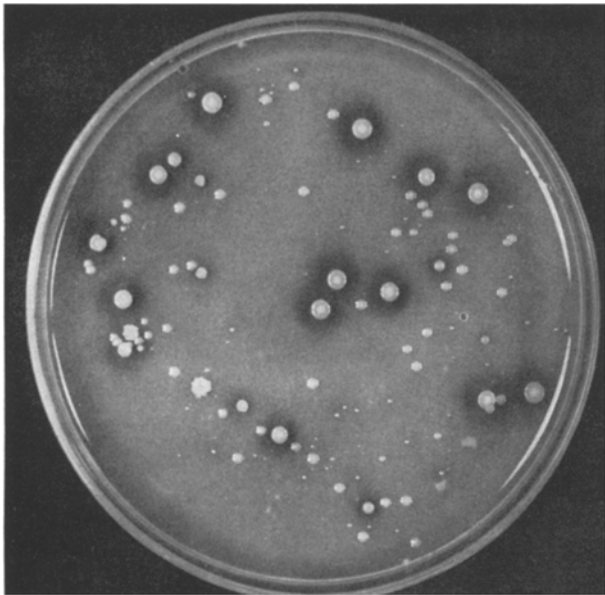
les cas de numérations, on doit incorporer ce produit dans des milieux solides en boîtes de Pétri (gélose-gélatine) et la mise en évidence de la gélatinolyse nécessite l'emploi de «révélateurs» qui en précipitant le substrat entraînent en même temps la destruction des colonies de microorganismes. L'emploi de la gélatine ou de la caséine est lié à des cas bien précis et l'hydrolyse de l'une de ces deux substances n'implique pas forcément pour le micro-organisme en cause la possibilité de l'hydrolyse de l'autre².

Recherchant des microorganismes protéolytiques dans les denrées à base de viande, il nous est apparu que ces milieux classiques ne convenaient pas entièrement au but recherché. C'est pourquoi, nous proposons ici des milieux à base de poudre acétonique de muscle de bœuf qui ont l'avantage de mettre en évidence les microorganismes capables de provoquer seuls la disparition ou la solubilisation des protéines. Les résultats obtenus à l'aide de la poudre de muscle sont comparés à ceux obtenus à l'aide de gélatine et de caséine.

Action de différents microorganismes sur les trois substrats étudiés

Microorganisme	Poudre de muscle	Caséine	Gélatine
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-
<i>Klebsiella</i> sp.	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+
<i>Proteus morganii</i>	-	-	-
<i>Micrococcus</i> sp. 1	+	-	+
<i>Micrococcus</i> sp. 2	+	+	+
<i>Micrococcus luteus</i>	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+
<i>Aeromonas</i> sp.	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+
<i>Bacillus licheniformis</i>	+	-	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+
<i>Bacillus polymyxa</i>	-	-	+
<i>Bacillus brevis</i>	+	+	+
<i>Sporobolomyces roseus</i>	+	+	+
<i>Hansenula anomala</i>	-	-	-
<i>Debaryomyces subglobosus</i>	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+
<i>Cladosporium herbarum</i>	-	+	+

Les Entérobactéries, *Bacillus* et les Micrococcaceae sont incubés à 30°C pendant 3 jours, *Pseudomonas* et *Aeromonas*, à 20°C, pendant 5 jours. Les champignons sont incubés à 20°C pendant 7 jours.



Numération de bactéries protéolytiques. Certaines colonies (positives) sont entourées d'un halo transparent représentant la disparition de la suspension de poudre de muscle. Culture de 72 h.

Matériel et méthodes. Préparation de la poudre de muscle. La poudre acétonique de viande de bœuf est obtenue par homogénéisation, à l'aide d'un mixeur à lames, d'une masse de 100 g de muscle de bœuf débarrassé de ses enveloppes, avec 300 ml d'acétone à 0°C. Le broyat est filtré sur papier et lavé deux fois avec 300 ml d'acétone à 0°C puis trois fois avec 300 ml d'éther éthylique à 0°C. On obtient ainsi une poudre grossière qui est séchée puis broyée à sec dans un broyeur à billes d'acier. La poudre est alors tamisée sur un tamis métallique à mailles de 0,2 mm afin d'éliminer les parties non finement broyées. Cette préparation est reprise pour un dégraissage complet, à l'aide d'éther éthylique, dans un appareil de Soxhlet, pendant 10 h. Après séchage, on tamise une nouvelle fois sur tissu polyester à mailles de 75 µm. C'est la poudre obtenue par ce tamisage qui est utilisée pour la confection des milieux de culture.

Milieux de culture pour les bactéries. Le milieu de culture à base de poudre de muscle, que nous proposons pour les bactéries est une gélose nutritive dans laquelle la peptone est remplacée par la poudre ci-dessus. 1 g de poudre est stérilisé à l'oxyde d'éthylène pendant 90 min (Procédé Stérivit) dans une fiole d'Erlenmeyer contenant aussi un barreau aimanté d'agitateur magnétique. Dans une deuxième fiole, on stérilise à l'autoclave (120°C, 20 min) le mélange suivant: 0,5 g d'extrait de viande de bœuf, 0,5 g de chlorure de sodium, 50 ml d'eau distillée. Une troisième fiole sert à la préparation d'une gélose double: 1,5 g d'agar, 50 ml d'eau distillée, stérilisée à 120°C pendant 20 min. Au moment de l'emploi, le contenu de la deuxième fiole, amené à la température de 45-50°C est ajouté aseptiquement à la poudre sous agitation continue à l'aide d'un agitateur magnétique. La gélose double est alors ajoutée à 45-50°C. Le milieu ainsi homogénéisé est réparti immédiatement en boîtes de Pétri. Son pH final est de 7.

Le milieu classique à base de gélatine est une gélose nutritive à laquelle on ajoute 4% de gélatine. Après culture, la révélation de l'activité gélatinolytique se fait en recouvrant complètement la plaque de gélose du mélange dont la composition est la suivante: HgCl₂, 15 g; HCl concentré, 20 ml; eau distillée, 100 ml. La gélatine non hydrolysée donne un précipité blanc. Les colonies gélatinase positive sont alors entourées d'une auréole transparente. Le milieu pour caséinolytiques est constitué par du lait écrémé gélifié. L'hydrolyse est caractérisée par l'apparition d'une zone claire autour des colonies.

Milieux de culture pour champignons. Le milieu que nous proposons pour les champignons est le milieu de Czapek-Dox additionné de 1% de poudre de muscle. La même technique de fabrication que celle du milieu pour bactéries est utilisée. La deuxième fiole contient alors le mélange suivant: saccharose, 3 g; NO₃Na, 0,3 g; K₂HPO₄, 0,1 g; MgSO₄, 7H₂O, 0,05 g; KCl, 0,05 g; FeSO₄, 7H₂O, 0,001 g; eau distillée, 50 ml. Après mélange du contenu de cette fiole avec 1 g de poudre et homogénéisation, on ajoute 50 ml de gélose double stérile. Le pH du milieu est de 6.

Pour mettre en évidence la gélatinolyse par les champignons, le milieu de Czapek-Dox gélifié est additionné de 4% de gélatine. La révélation se fait de la même manière qu'indiqué ci-dessus pour les bactéries. Le milieu utilisé pour les bactéries est également employé pour la mise en évidence de l'activité caséolytique chez les

¹ F. G. MARTLEY, S. R. JAYASHANKAR et R. C. LAWRENCE, J. appl. Bact. 33, 363 (1970).
² D. G. AHEARN, S. P. MEYERS et R. A. NICHOLS, Appl. Microbiol. 16, 1370 (1968).

champignons. Tous les milieux ci-dessus sont répartis à raison de 20 ml par boîte de Pétri de 10 cm de diamètre.

Résultats et discussion. La poursuite de nos recherches sur la protéolyse des viandes nécessitait la mise au point de milieux plus adaptés à ce substrat. L'arrangement particulier et la composition des protéines de la fibre musculaire laisse en effet supposer des modalités d'attaque par les microorganismes différentes de celles de la gélatine et de la caséine.

Le tableau ci-joint contient les résultats obtenus avec les trois substrats utilisés. Il nous montre que l'hydrolyse d'un substrat n'entraîne pas nécessairement celle des deux autres. D'autre part, tous les microorganismes actifs sur la poudre de muscle attaquent également la gélatine, cette dernière propriété étant très répandue, mais l'inverse n'est pas vrai. Cette observation n'est pas surprenante, la poudre de muscle étant un substrat plus complexe que la gélatine.

La recherche de milieux adaptés pour la mise en évidence des propriétés protéolytiques de microorganismes vis à vis de substrats naturels particuliers a été peu développée. Cependant, GROSSBARD et HALL³ ont proposé un milieu à base de protéines de plantes et, plus récemment, TOM et CRISAN⁴ un milieu à l'extrait de poisson. L'utilisation de ce type de milieux pour la mise

en évidence et la numération des microorganismes impliqués dans la détérioration de protéines de différentes origines semble préférable à celle des milieux classiques afin d'utiliser le substrat en accord avec celui rencontré par les microorganismes dans les conditions naturelles.

Deux avantages principaux peuvent donc être accordés aux milieux que nous proposons. Ils permettent la numération des microorganismes protéolytiques tout en ayant la possibilité de récupérer ceux-ci. Ceci n'est pas possible avec les milieux classiques à base de gélatine, étant donné que dans ce cas, le révélateur de la gélatinolyse tue les microorganismes. En second lieu, ils permettent la mise en évidence des microorganismes possédant à eux seuls l'équipement enzymatique nécessaire à la dégradation du substrat complexe qu'est la poudre de muscle.

L'emploi de la poudre de viande nous permet de préciser les possibilités enzymatiques des différentes souches testées et par conséquent leur aptitude à dégrader les protéines musculaires.

³ E. GROSSBARD et D. M. HALL, *Nature* 4859, 1119 (1962).
⁴ R. A. TOM et E. V. CRISAN, *Appl. Microbiol.* 29, 205 (1975).

Heterozygous Effects on Cell Yield and Generation Time in *Saccharomyces cerevisiae*

E. LUCCHETTI, F. RESTIVO and P. P. PUGLISI

Institute of Genetics, University of Parma, Borgo Carissimi 10, I-43100 Parma (Italy), 15 June 1976.

Summary. The data obtained analyzing generation time, cell yield and their variability in different culture media in diploid strains of *Saccharomyces cerevisiae* demonstrate the existence of a biochemically determined heterotic effect, that could be of some relevance for the study of yeast population genetics, as well as for the improvement of microbial fermentation processes.

In *Saccharomyces cerevisiae*, generation time and cell yield depend on its genetic complement and on the chemical composition of the culture media; the variability of these parameters increases with heterosis at least under strong selection pressure^{1,2}.

The experimental condition in which heterosis has been observed does not permit an interpretation of the effect at a biochemical level, since the genes put in heterozygous condition are unidentified in terms of the

molecular nature of the mutant allele and of the gene product involved.

In order to analyze heterosis in yeast at a biochemical level, we have started to study generation time, cell yield, and their variability in different culture media, of a series of isogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae*, which are made heterozygous for a single biochemical marker whose gene product and molecular origin (insertion/deletion; nonsense and missense mutation) are known.

In this note we report the data obtained analyzing generation time, cell yield and their variability in diploid strains of *Saccharomyces cerevisiae* which carry different combinations of the gene TRP₅, coding for the enzyme tryptophan synthetase (L-serine hydro-lyase, adding indole, EC 4.2.1.20) and of its allele trp₅₋₂, which appears to be due to a nonsense mutation^{3,4}.

Materials and methods. The media employed were 1. Medium Max (yeast extract, 1%; peptone, 2%; glucose, 2% w/v)⁵ and 2 'stress media': 2. medium Max with glucose reduced to 0.02%, and 3. medium Max with 5% ethanol².

Medium	Strains	Generation time ^a	F ^b	Cell yield ^a	F ^b
1. Max	TRP ₅ /TRP ₅	2 h 18'		1.0 × 10 ⁸	
	TRP ₅ /trp ₅₋₂	1 h 48'		5.9 × 10 ⁸	
	trp ₅₋₂ /trp ₅₋₂	1 h 54'	6.2*	2.4 × 10 ⁸	81.5**
	TRP ₅ /trp ₅₋₂	1 h 48'		5.9 × 10 ⁸	
	TRP ₅ /trp ₅₋₂ SR-I	1 h 44'	0.1	3.9 × 10 ⁸	4.1*
	TRP ₅ /TRP ₅	2 h 18'		1.0 × 10 ⁸	
	TRP ₅ /trp ₅₋₂ SR-I	1 h 44'		3.9 × 10 ⁸	
	trp ₅₋₂ /trp ₅₋₂	1 h 54'	6.0*	2.4 × 10 ⁸	65.0**
2. Max	TRP ₅ /TRP ₅	1 h 59'		2.64 × 10 ⁷	
	TRP ₅ /trp ₅₋₂	1 h 47'		4.18 × 10 ⁷	
	trp ₅₋₂ /trp ₅₋₂	2 h	22.3**	3.38 × 10 ⁷	91.4**

^aGeneration time and cell yield are the mean values obtained from six independent cultures. ^bSignificance of F at the 5% and 1% level is indicated by * and **, respectively.

¹ E. I. KIVI and A. JAMES, *Hereditas* 48, 247 (1962).
² C. WILLS, *Science* 160, 549 (1968).
³ O. CIPERRI, S. SORA and O. TIBONI, *Genetics* 61, 567 (1969).
⁴ T. R. MANNEY, *Genetics* 50, 109 (1964).
⁵ G. E. MAGNI and R. C. VON BORSTEL, *Genetics* 47, 1097 (1962).