

# De l'activité lipolytique chez quelques bactéries à Gram négatif isolées du milieu marin

par

CAMILLE TYSSET, JEAN BRISOU et ALAIN CUDENNEC

*Service vétérinaire de l'Armée et École de médecine, Poitiers (France)*

Un grand nombre de bactéries sont dotées d'activité lipolytique, de sorte que cette propriété fait maintenant l'objet de recherches systématiques dans la routine d'identification des microbes. Nous avons appliqué les méthodes proposées par différents auteurs à l'étude des bactéries marines.

Il y a eu, au cours de ces dernières années, quelques discussions au sujet des techniques de dépistage des lipases. Les substrats naturels de ces enzymes sont les huiles et les graisses, c'est-à-dire des esters de glycérol et d'acides gras à longues chaînes de carbone. On réserve le terme de lipase aux enzymes capables d'hydrolyser de tels substrats et celui d'estérase à ceux qui attaquent les esters d'acides de faible poids moléculaire. On a fait toutefois remarquer que la différence entre lipases et estérases ne porte que sur la vitesse d'hydrolyse des substrats. Nous avons pu le vérifier avec les bactéries en comparant plusieurs techniques et en faisant appel à des substrats variés.

Depuis la commercialisation des Tweens, esters de sorbitol et d'acides gras à longues chaînes carbonées, on fait un large usage de ces produits hydrosolubles, faciles à incorporer aux milieux nutritifs en usage en microbiologie. COLOWICK et KAPLAN estiment qu'ils ont été les « bienvenus » en biochimie. Les bactériologistes ont le choix entre :

le tween 20 ester mono laurique
40 mono palmitique
60 mono stéarique
80 mono oléique

du sorbitol. On en étudie l'attaque soit par titrimétrie, soit par manométrie soit enfin grâce à la technique de SIERRA par culture directe en présence d'un sel de Ca.

## Technique

Le milieu de base est le suivant :

Peptone	10 g	Gélose	20 g
CaCl <sup>2</sup>	0,1 g	Eau de mer	1.000 ml

Le pH est ajustée à 7,6. On ajoute au milieu encore liquide une solution de tween (de préférence le type 80) pour une concentration finale de 1 p. 100. Le milieu est coulé dans des tubes de 20 ml stérilisé et après refroidissement conservé à + 4°. Pour l'usage il est de nouveau liquéfié au bain marie bouillant, coulé dans des boîtes de Petri de 10 cm de diamètre. On laisse solidifier et on sèche soigneusement à l'étuve à 37° avant d'ensemencer. Cette précaution est indispensable, car un milieu humide favorise la diffusion et l'étalement des cultures et rend les résultats illisibles.

Les ensemencements sont effectués en stries à raison de 8 par boîte (stries en rayons de roue). On laisse incubé soit à 20°, soit à 37° selon les germes étudiés. L'activité lipolytique se traduit par une opacification du milieu autour des stries. Cette opacité résulte de la précipitation du sel de calcium résultant de la mise en liberté de l'acide gras par l'enzyme spécifique. Certaines réactions sont très rapides. D'autres demandent 3 à 5 jours d'incubation.

### Résultats

Nos investigations intéressent 134 souches isolées de l'eau de mer, d'animaux marins ou de plancton. Les pourcentages de positivité se résument ainsi :

<i>Vibrio</i> :	92,6	p. 100
<i>Pseudomonas</i> :	89	p. 100
<i>Phytobacterium</i> :	83,8	p. 100
<i>Achromobacter</i> :	76	p. 100
<i>Serratia</i>	100	p. 100

Nous confirmons ainsi l'importance de la lipolyse chez les bactéries marines et la valeur indiscutable de la méthode de SIERRA pour la recherche des lipases microbiennes.

Nous avons fait un certain nombre d'essais comparés entre cette méthode et les techniques manométriques, colorimétriques en faisant appel à des substrats naturels incorporés aux milieux sous la forme d'émulsions ultrasonnées, à des substrats synthétiques tels que les esters de phénol, ou paranitrophénol (Phényl-acétate, p-nitrophényl-acétate). La méthode de SIERRA interroge des bactéries « proliférantes », les méthodes chimiques s'adressent soit à des enzymes libérés des cellules, soit à des purées microbiennes, non proliférantes. Malgré ces différences, les résultats n'offrent que des variations dans la vitesse des réactions, comme les classiques l'ont déjà observé.

Il existe d'autres variantes de la méthode proposée par SIERRA. Au lieu d'incorporer un sel de Ca au milieu, on peut y ajouter un indicateur de pH. La libération de l'acide gras entraîne une acidification de la gélose, ou du liquide de culture. Nous avons utilisé cette variante en microtechnique, en partant de purées microbiennes fraîches. L'essentiel est de préciser dans l'expression des résultats, à quelle méthode l'expérimentateur a fait appel.

### Références bibliographiques

- COLOWICK (S.P.) & KAPLAN (N.O.), 1955. — *Methods in enzymology*, **1**, pp. 627-642. — New York, Academic Press.
- SIERRA (G.), 1957. — *Antonie van Loeuwenhoek*, **23**, p. 15.