

Réévaluation de l'effet de certains paramètres sur la survie de *Neisseria gonorrhoeae*

Reevaluation of the effect of certain parameters on the survival of *Neisseria gonorrhoeae*

S.A. Saheb, J.-G. Bisaillon et R. Baudet¹

Centre de recherche en bactériologie, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, C.P. 100, Laval-des-Rapides, Laval (Québec, Canada, H7N 4Z3) 31 juillet 1978

Summary. Lysis and survival of 4 gonococcal strains were studied under different conditions in the presence of divalent cations and glycerol. The mechanical stability and the viability of the gonococcal cells were not enhanced by any of these compounds.

La gonorrhée représente une des infections humaines les plus courantes. Parmi les problèmes auxquels doivent faire face les laboratoires de diagnostic on retrouve la fragilité de *Neisseria gonorrhoeae* qui est rattachée, entre autres facteurs, à son pouvoir autolytique². Il a été démontré que les gonocoques en suspension dans du tampon à pH alcalin s'autolysent rapidement³ mais que cette autolyse peut être circonvenue, d'une part, par l'addition d'ions bivalents ou d'agents agissant comme stabilisateurs osmotiques^{4,5}. Toutefois, il est à noter que ces conditions ne semblent pas avoir été étudiées en fonction de plusieurs souches de *N. gonorrhoeae*. D'autre part, parmi les techniques couramment utilisées dans les laboratoires de diagnostic pour conserver les souches de *N. gonorrhoeae* on retrouve la congélation à -60° ou -76°C de suspensions de gonocoques en bouillons nutritifs additionnés de 15 à 20% de glycérol^{6,7}. On a décrit que dans ces conditions les bactéries sont stables après plusieurs congélations et décongélation⁶. Ceci a eu pour effet l'utilisation systématique de telles suspensions pour la mise en évidence de l'inhibition in vitro de la croissance du gonocoque par des micro-organismes isolés de la flore urogénitale humaine qui nécessite l'utilisation de titres connus. Dans le cadre d'une étude semblable à celle décrite précédemment sur l'interférence du gonocoque mais portant sur un grand nombre de souches de *N. gonorrhoeae* nous avons tenté de reproduire ces effets stabilisants des cations bivalents et du glycérol avec 4 souches de gonocoque. Devant la diversité des réponses obtenues et de ses implications pratiques nous rapportons les résultats de cette étude.

Matériel et méthodes. Les 4 souches de *N. gonorrhoeae* (G₁, G₂, G₃, G₄) utilisées dans ce travail ont été isolées sur le milieu sélectif Thayer-Martin (Disco) à partir de prélèvements urogénitaux. L'identification a été effectuée à partir de la coloration de Gram, du test de l'oxydase et de la

fermentation du glucose mais non du maltose ni du lactose ou du saccharose. Pour les fins d'expérience les souches ont été maintenues par repiquages quotidiens sur le milieu GC (Disco) enrichi de 0,1% d'isovitalex (BBL) et de 1,5% de sang de cheval hémolysé, et incubation à 37°C en présence de 6% de CO₂ et 70% d'humidité. Les études sur la survie du gonocoque ont été effectuées sur des suspensions préparées à partir de cultures confluentes de 16 à 18 h sur le milieu GC enrichi. Toutes les suspensions ont été ajustées de manière à obtenir une densité optique d'environ 0,2 à 0,4 à 540 nm, soit 2 × 10⁸ à 2 × 10⁹ unités viables par ml. A intervalles réguliers les mesures de viabilité ont été effectuées par l'étalement de volumes appropriés, des dilutions convenables, sur du milieu GC enrichi et comptage des colonies après 48 h d'incubation dans les conditions décrites plus haut. Toutes les dilutions ont été effectuées dans les milieux correspondants aux milieux de suspension. L'effet des ions bivalents a été étudié à 22°C, sur des suspensions en milieu PBS (tampon phosphate 50 mM, pH 7,0; NaCl 140 mM) contenant du MgSO₄ 2 mM et du CaCl₂ 2 mM. L'effet du glycérol sur la survie du gonocoque après congélation et décongélation a été étudié sur des suspensions, préparées aux concentrations décrites plus haut, dans du milieu GC liquide enrichi contenant 15% de glycérol. Les suspensions ont été congelées et conservées à -75°C, alors que leur décongélation a été effectuée à la température ambiante.

Résultats et discussion. Comme on peut le voir au tableau 1, l'addition des cations Ca²⁺ et Mg²⁺ à une concentration totale de 4 mM n'exerce aucun effet sur la stabilité mécanique, comme le démontrent les chutes de densité optique, et sur la viabilité d'au moins 3 des 4 souches de gonocoque dans nos conditions expérimentales. En fait, la présence de ces cations bivalents semble favoriser la perte de viabilité des 3 souches, G₁, G₂, G₃, alors que la survie de la souche

Tableau 1. Effet de cations bivalents sur la stabilité mécanique et la viabilité de *N. gonorrhoeae*

Souches	Temps (h)	Milieux de suspension		PBS (Ca ²⁺ 2 mM + Mg ²⁺ 2 mM)	
		PBS Unités viables/ml	D.O. 540 nm	Unités viables/ml	D.O. 540 nm
G ₁	0	1,60 × 10 ⁹ (100%)	0,235 (100%)	4,52 × 10 ⁹ (100%)	0,279 (100%)
	2	1,55 × 10 ⁹ (97%)	-	3,80 × 10 ⁹ (84%)	-
	4	0,85 × 10 ⁹ (53%)	-	1,40 × 10 ⁹ (31%)	-
	6	0,40 × 10 ⁹ (25%)	0,148 (63%)	0,63 × 10 ⁹ (14%)	0,178 (64%)
G ₂	0	0,32 × 10 ⁹ (100%)	0,097 (100%)	0,86 × 10 ⁹ (100%)	0,143 (100%)
	2	0,22 × 10 ⁹ (69%)	-	0,38 × 10 ⁹ (44%)	-
	4	0,24 × 10 ⁹ (75%)	-	0,11 × 10 ⁹ (13%)	-
	6	0,18 × 10 ⁹ (56%)	0,083 (86%)	0,80 × 10 ⁸ (9%)	0,075 (52%)
G ₃	0	0,76 × 10 ⁹ (100%)	0,265 (100%)	0,88 × 10 ⁹ (100%)	0,223 (100%)
	2	0,39 × 10 ⁹ (51%)	-	0,58 × 10 ⁹ (66%)	-
	4	0,26 × 10 ⁹ (34%)	-	0,18 × 10 ⁹ (66%)	-
	6	0,26 × 10 ⁹ (34%)	0,172 (65%)	0,14 × 10 ⁸ (16%)	0,161 (72%)
G ₄	0	1,49 × 10 ⁹ (100%)	0,352 (100%)	2,10 × 10 ⁹ (100%)	0,320 (100%)
	2	0,24 × 10 ⁹ (16%)	-	0,85 × 10 ⁹ (41%)	-
	4	0,60 × 10 ⁸ (4%)	-	0,16 × 10 ⁹ (8%)	-
	6	0,20 × 10 ⁸ (1%)	0,181 (51%)	0,60 × 10 ⁸ (3%)	0,165 (52%)

Tableau 2. Effet de congélations et décongélations répétées en présence de glycérol sur la survie de *N. gonorrhoeae*

Souches	Survie (unités viables/ml)			
	Nombre de congélation-décongélation			
	0	1	2	3
G ₁	2,6 × 10 ⁸ (100%)	2,4 × 10 ⁸ (92%)	2,8 × 10 ⁸ (100%)	2,4 × 10 ⁸ (92%)
G ₂	0,2 × 10 ⁸ (100%)	0,2 × 10 ⁶ (1%)	≤ 2 × 10 ⁴ (-)	≤ 2 × 10 ⁴ (-)
G ₃	3,0 × 10 ⁸ (100%)	2,8 × 10 ⁸ (93%)	1,8 × 10 ⁸ (60%)	1,2 × 10 ⁸ (40%)
G ₄	5,8 × 10 ⁸ (100%)	5,6 × 10 ⁸ (97%)	5,0 × 10 ⁸ (86%)	5,2 × 10 ⁸ (90%)

Tableau 3. Effect de la durée de congélation en présence de glycérol sur la survie de *N. gonorrhoeae*

Souches	Survie (unités viables/ml)	
	Avant congélation	Après congélation 8 jours
G ₁	0,98 × 10 ⁸ (100%)	0,34 × 10 ⁸ (35%)
G ₂	0,51 × 10 ⁸ (100%)	0,22 × 10 ⁷ (4%)
G ₃	0,15 × 10 ⁹ (100%)	0,10 × 10 ⁸ (7%)
G ₄	0,11 × 10 ⁹ (100%)	0,10 × 10 ⁸ (10%)

G₄ semble légèrement accrue. Ces résultats diffèrent de ceux d'Elmros et collaborateurs^{4,5} qui décrivent une inhibition de la lyse (augmentation de la stabilité mécanique) et une survie accrue dans des conditions expérimentales sensiblement identiques aux nôtres. Ces différences entre les résultats indiquent donc clairement que le maintien de la stabilité mécanique et de la viabilité du gonocoque par ces cations bivalents n'est pas un phénomène général mais dépendrait de certains paramètres qu'il reste à déterminer, et parmi lesquels on retrouve la nature des souches utilisées. Lorsqu'on examine l'effet de la congélation et de la décongélation, répétées, à 2 h d'intervalle, sur la survie de suspensions de gonocoques des 4 souches (tableau 2), on note que celles-ci varient dans leur sensibilité à ce traitement. Ainsi les souches G₁ et G₄ apparaissent relativement résistantes, alors que la perte de viabilité pour la souche G₃ est de l'ordre de 60% après la troisième décongélation et que cette perte est de 99% pour la souche G₂ après la première décongélation. Ces résultats démontrent clairement qu'il ne peut être pris pour acquis que des suspensions de gonocoques préparées dans les mêmes conditions que les nôtres, ne subissent aucune fluctuation du nombre de leurs unités viables comme l'ont décrit La Scolea et Young⁶. La sensibilité différentielle de ces souches de

gonocoques se reflète de même par leur survie lorsque congelées en présence de glycérol durant 8 jours (tableau 3). Pour les 4 souches on note en général une baisse de viabilité dont l'amplitude décroît pour les souches dans l'ordre suivant: G₂, G₃, G₄ et G₁. Il appert que si le glycérol est un agent largement utilisé pour la conservation des suspensions de gonocoques, l'utilisation systématique de celles-ci pour la mise en évidence d'une inhibition de la croissance du gonocoque par des espèces bactériennes de la flore urogénitale par la méthode décrite par Kay et Levison⁷ est sujette à caution. En effet, dans cette méthode des inocula à partir de suspensions de gonocoques, en bouillon nutritif additionné de glycérol, conservées congelées, sont utilisées pour ensemencer toute la surface de géloses nutritives sur lesquelles des souches, productrices éventuelles d'inhibiteur(s), sont inoculées par la suite. Le nombre d'unités viables des suspensions de gonocoque variant en fonction de la durée de la congélation et des souches le nombre de cellules cibles variera entraînant une variation du rapport inhibiteur(s)/cellules cibles, pouvant mener à une interprétation erronée des résultats.

- 1 Nous remercions Mles D. Lemire et C. Bouvier pour leur collaboration technique.
- 2 F.E. Young, B.H. Hebel et W. Wong, dans: *The Gonococcus*, p. 197 John Wiley and Sons, New York 1977.
- 3 B.H. Hebel et F.E. Young, J. Bact. 122, 385 (1975).
- 4 T. Elmros, L.G. Burman et G.D. Bloom, J. Bact. 126, 969 (1976).
- 5 T. Elmros, G. Sandström et L. Burman, Br. J. vener. Dis. 52, 246 (1976).
- 6 L.J. La Scolea, Jr. et F.E. Young, Appl. Microbiol. 28, 70 (1974).
- 7 D. Kaye et M.E. Levison, Sex. Transm. Dis. 4, 1 (1977).

Experimental alteration of biomagnetic interactions among bean seeds

F.A. Brown, Jr¹

Department of Biological Sciences, Northwestern University, Evanston (Illinois 60201, USA), 7 August 1978

Summary. Interactional patterns among bean-seed (*Phaseolus vulgaris*) clusters distributed on a table differed statistically significantly between when in clockwise rotating fields (table or magnetic) and when in counterclockwise fields or as nonrotating controls. It is postulated that clockwise rotation shortens the range of interactions.

The generation of electromagnetic fields by organisms and their reception of these fields has been described between sharks and their prey², among electric fishes^{3,4}, and among bean seeds absorbing water in adjacent vessels⁵. Sharks which use these fields in the capture of prey have been demonstrated to be capable of sensing electric fields as weak as 0.01 µV/cm. The electric fishes employ their fields for exploration of the physical environment, communicating their location and socially integrating the local population. These latter fishes are able to alter characteristics of the oscillating fields they produce. The field effecting

interactions between groups of bean seeds is not obviously affected by placing each group in a separate Faraday cage⁶, and even by adding a mumetal lining, and hence is postulated to be both biomagnetic and dynamic⁷. The present study was designed to learn whether uniform rotation would affect the bean interactions.

Materials and methods. The relative rates of water-absorption by bean seeds distributed as 4 pairs of samples around the periphery of circular wooden tables (figure 1) were determined. The tables differed slightly in size and the distances among the samples exhibited the range described