

Zeitschrift: Saussurea : journal de la Société botanique de Genève
Herausgeber: Société botanique de Genève
Band: 3 (1972)

Artikel: Évaluation quantitative par spectrophotométrie en réflexion diffuse de l'acide 2-céto-gluconique produit à partir de l'acide gluconique chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomas fluorescens*
Autor: Lucas, Georgette / Künzler, Walter / Schorer, Elisabeth
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1099316>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 17.04.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Evaluation quantitative par spectrophotométrie en réflexion diffuse de l'acide 2-céto-gluconique produit à partir de l'acide gluconique chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*

GEORGETTE LUCAS, WALTER KÜNZLER,
ELISABETH SCHORER & SYLVIE DERSI

RÉSUMÉ

La formation de l'acide 2-céto-gluconique, à partir d'acide gluconique offert comme seule source de carbone, à *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*, a été évaluée quantitativement au cours du temps. Cette estimation a été effectuée par spectrophotométrie en réflexion diffuse.

SUMMARY

The production of 2-keto-gluconic acid, from gluconic acid supplied as the sole source of carbon to *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*, has been appraised quantitatively. This appreciation has been carried out by means of a spectrophotometer in diffused reflection.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Produktion von 2-Keto-Glukonsäure durch *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas fluorescens* wurde quantitativ untersucht, wobei Glukonsäure als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung stand. Die quantitative Erfassung geschah durch Chromatogramm-Spektrophotometrie.

Introduction

En l'absence de la voie glycolytique habituelle d'Embden-Meyerhof, les Pseudomonadacées possèdent, en plus de la voie des hexoses mono-phosphates, une voie d'oxydation directe des hydrates de carbone: la voie d'Entner-Doudoroff. Cette voie peut être induite en fournissant aux germes de l'acide gluconique comme seule source de carbone (de Ley 1960; Wang & al. 1959; Whistler & Wolfrom 1963).

Du point de vue biochimique, cette voie d'Entner-Doudoroff est d'importance, car elle n'a été décelée jusqu'à présent que chez un certain nombre de micro-organismes, gram négatif et aérobies, tels que les Pseudomonadacées et *Streptococcus faecalis*, *Xanthomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter*.

Les enzymes catalysant les étapes qui interviennent au cours de l'utilisation de l'acide gluconique semblent être localisés dans des particules liées à la membrane cytoplasmique des germes et dénommées oxydosomes par les Anglo-Saxons. Selon Entner & Stanier (1951), les quatre-vingt-deux pour cent de l'acide gluconique seraient capturés par ces oxydosomes, et transformés en acide 2-céto-gluconique.

Il a paru intéressant de comparer, chez *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens*, le métabolisme de l'acide gluconique au cours du temps.

En fournissant à ces bactéries un milieu de culture synthétique liquide, avec comme seule source de carbone de l'acide gluconique sous forme de sel de potassium, l'apparition et la disparition de l'acide 2-céto-gluconique ont été évaluées à l'aide de la spectrophotométrie en réflexion diffuse.

La comparaison de l'évolution des cultures fait apparaître un comportement très semblable des deux germes: apparition de l'acide 2-céto-gluconique dès 9 heures d'incubation environ, puis sa disparition à partir de 22 à 24 heures par scission en pyruvate et glycéraldéhyde-phosphate.

Un dosage par colorimétrie, selon la méthode de Lanning & Cohen (1951), a été effectué parallèlement au spectrophotomètre. Nous n'avons cependant pas retenu cette méthode pour une évaluation quantitative de l'acide 2-céto-gluconique, car elle ne s'est pas révélée suffisamment spécifique. En effet, l'ortho-phénylène-diamine, recommandée comme réactif, réagit également, quoique dans une moindre mesure, avec le ribose, l'acide alpha-céto-glutarique, l'acide pyruvique et le glycéraldéhyde-phosphate, produits qui seraient susceptibles de se trouver dans les prélèvements que nous avons faits.

Matériel et méthodes

Germes

- *Pseudomonas aeruginosa*, souche PS 21, Colindale Institute, Londres.
- *Pseudomonas fluorescens*, souche B 52 de la collection du Département de biologie végétale, laboratoire de bactériologie, Genève.

Milieu de culture

| | |
|--|------------|
| Sulfate de magnésium | 0.3 g |
| Phosphate de potassium bibasique | 0.3 g |
| Nitrate d'ammonium | 2.0 g |
| Gluconate de potassium | 1.0 g |
| Eau distillée | ad 1000 ml |

Le pH est fixé à 7.0. La stérilisation se fait à l'autoclave 20 minutes à 120°C.

Mode de culture

Le milieu est réparti dans des erlenmeyers de 150 ml à raison de 40 ml par erlen. Pour *Ps. aeruginosa*, la culture se fait dans une étuve réglée à 37°C, et pour *Ps. fluorescens*, sur un plateau secoueur, dans une étuve réglée à 25°C.

Inoculum et prélèvements

A partir de cultures de *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens* sur bouillon de viande Difco agarisé, maintenues à +4°C au réfrigérateur, une préculture en milieu synthétique liquide est faite dans les conditions qui viennent d'être décrites. Après 24 h d'incubation aux températures indiquées, une série d'erlenmeyers est inoculée à partir de ces précultures, à raison de 0.25 ml pour 40 ml de milieu. Cela correspond à un nombre initial de germes de 4.6×10^6 /ml pour *Ps. aeruginosa* et 1.4×10^7 /ml pour *Ps. fluorescens* dans les cultures.

Au cours du temps, des prélèvements aliquotes sont effectués. Mis à bouillir pendant 10 minutes au bain-marie à 100°C pour arrêter les réactions enzymatiques, ces prélèvements sont alors filtrés sur millipore et conservés au froid.

Chromatographie en couche mince

- Phase solide: gel de silice sur film Eastman N° 6061.
- Prétraitement: 1 minute dans une solution de 1.6 g d'acétate de sodium, 10 ml d'eau distillée et 190 ml d'éthanol 95%.
- Activation du film: 30 minutes à 100°C.
- Dépôt: 0.1 ml de chacun des prélèvements correspondant aux heures d'incubation choisies, ainsi que 50 µg de la substance de référence, le 2-céto-gluconate de calcium (Nutritional Biochemicals, Cleveland, E. U.).
- Phase mobile: acide chlorhydrique Merck 37%, éthanol Merck 95%, 2:98 (v:v).
- Migration: 10 cm à 25°C.
- Révélation: phtalate d'aniline (spray Merck) ou ortho-phénylène-diamine, préparée selon De Ley (1955).

Spectrophotométrie en réflexion diffuse

Ce genre de spectrophotométrie permet l'identification et le dosage de substances séparées par chromatographie en couche mince, soit sans révélation (dans l'ultra-violet et dans le visible si le produit est coloré), soit après révélation (dans le visible).

Le principe de cette spectrophotométrie consiste à mesurer la réflexion de la lumière par une surface en fonction de la partie du chromatogramme examinée. La lumière incidente tombe perpendiculairement sur la surface; seuls les rayons réfléchis sous un angle de 45° (réflexion diffuse) sont mesurés par un photodétecteur et enregistrés sur papier sous forme de pics, en pour cent de la réflexion. Les surfaces enregistrées sont découpées et pesées. Les poids sont

multipliés par la surface qui correspond à l'unité de poids (1 mg de papier). Ces surfaces sont élevées au carré (instructions du Manuel de Zeiss). Les carrés des surfaces sont une fonction linéaire des quantités de substances examinées.

Le spectrophotomètre utilisé est un appareil PMQ II Zeiss; les conditions expérimentales adoptées sont les suivantes: longueur d'ondes 420 nm, filtre 380-520 nm, R_{abs} 97.5%, étalon interne 51% (correspondant à 97.5% de réémission absolue), fente rectangulaire de 12 mm, vitesse du papier 120 mm/min, vitesse de la table mobile sur position 3, sensibilité I/10/10, distance plaque-tête lectrice 4.5 mm. Les chromatogrammes sont examinés une heure après révélation.

Résultats

Identification de l'acide 2-céto-gluconique

Selon les données de la littérature, deux esters phosphoriques, le 2-céto-gluconate-6-phosphate et le 2-céto-3-desoxy-gluconate-6-phosphate, ont été également décelés, comme intermédiaires possibles du métabolisme de l'acide gluconique à côté de l'acide 2-céto-gluconique.

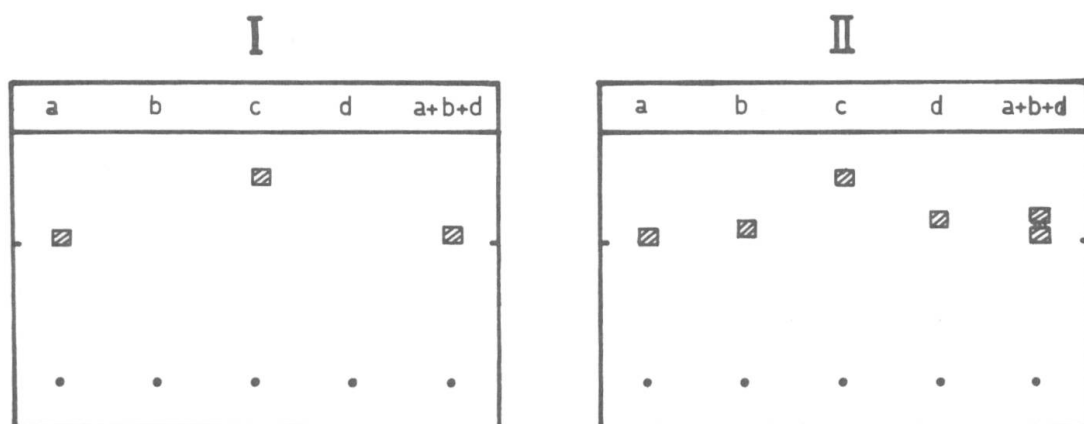
Nous avons voulu nous assurer que le produit détecté dans le milieu de culture de *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens* était de l'acide 2-céto-gluconique. Nous avons, pour ce faire, suivi la méthode préconisée par de Ley (1955) pour séparer ces différents métabolites par chromatographie, en comparant la substance de référence et le produit décelé dans les cultures des deux germes. Les résultats obtenus ont montré qu'il s'agissait bien de l'acide 2-céto-gluconique.

Choix du révélateur chromatographique

La séquence métabolique de l'acide 2-céto-gluconique fait apparaître, par scission enzymatique, du glycéraldéhyde-phosphate et de l'acide pyruvique, susceptibles d'intervenir comme substances parasites, de même que l'acide alpha-céto-glutarique, lors de la révélation. En effet, d'après la littérature (référence citée par de Ley 1955) ce dernier acide pourrait être produit, en même temps que l'acide 2-céto-gluconique, à partir de l'acide gluconique.

Nous avons donc testé la spécificité des révélateurs utilisés et préparé deux chromatogrammes selon le processus décrit plus haut. Le premier chromatogramme comporte du 2-céto-gluconate de Ca, de l'acide alpha-céto-glutarique, de l'acide pyruvique, un mélange de ces trois produits dont les R_f sont voisins ainsi que du glycéraldéhyde, quoique son R_f soit très différent. Ce chromatogramme est révélé avec du phtalate d'aniline. Le deuxième, sur lequel sont déposées les mêmes substances, est révélé avec de l'ortho-phénylène-diamine.

Les quantités qui ont été déposées pour toutes les substances, à l'exception du 2-céto-gluconate de Ca, sont bien supérieures à celles que l'on pourrait éventuellement déceler dans le milieu de culture.



a = 50 µg 2-céto-gluconate
 b = 50 µg alpha-céto-glutarate
 c = 50 µg glycéraldéhyde
 d = 50 µg pyruvate

a+b+d = 25 µg 2-céto-gluconate
 + 25 µg alpha-céto-glutarate
 + 25 µg pyruvate

Fig. 1. — Comparaison de chromatogrammes de substances de référence révélées par phthalate d'aniline (I) et par orthophénylène-diamine (II).

Nous voyons que, dans les conditions expérimentales choisies, les résultats obtenus démontrent la spécificité du phthalate d'aniline pour révéler exclusivement l'acide 2-céto-gluconique. Nous l'avons donc adopté comme révélateur.

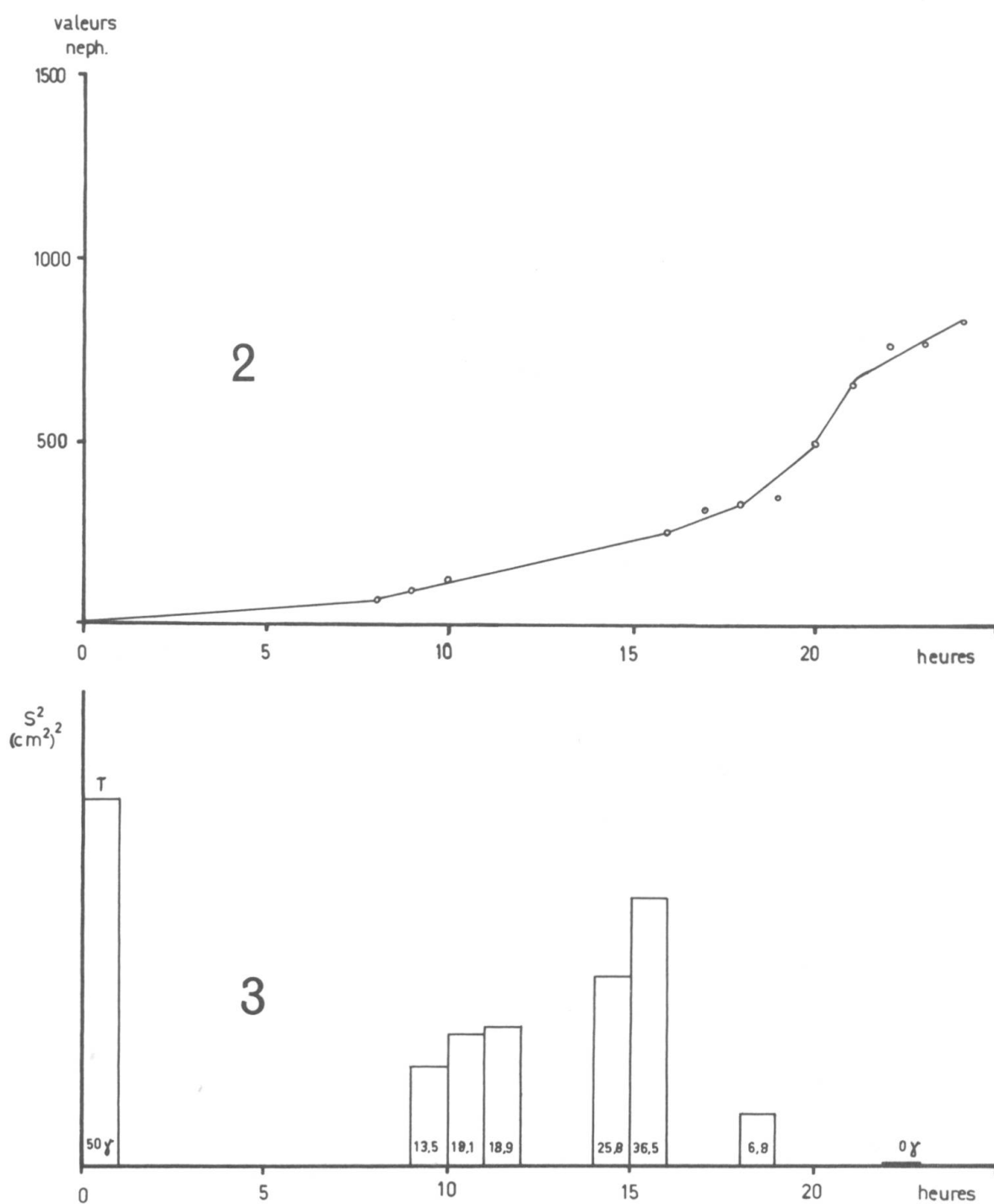
Estimations quantitatives de l'acide 2-céto-gluconique

Nous avons cherché à savoir s'il existait une relation linéaire (Philippe 1967) entre surfaces au carré et quantités d'acide 2-céto-gluconique. Plusieurs essais ont permis de déterminer qu'il existe effectivement une relation linéaire, pour des valeurs comprises entre 10 et 50 µg, entre surfaces élevées au carré et quantités d'acide. Cette droite de régression ne peut cependant servir d'étalon, en raison du manque de reproductibilité d'un film à l'autre. Mais cette linéarité permet d'exprimer les résultats obtenus pour les cultures en pourcentage d'un témoin de 50 µg qui migre sur le même film et dont la surface est arbitrairement fixée à 10 cm² pour la représentation graphique.

Résultats quantitatifs

Les graphiques suivants (fig. 3 et 5) rassemblent les résultats obtenus par spectrophotométrie en réflexion diffuse, sur la base de chromatogrammes préparés selon la méthode décrite plus haut.

Il est donné en complément pour chaque germe une courbe de croissance obtenue dans les mêmes conditions expérimentales. Ces courbes (fig. 2 et 4) résultent de l'examen des cultures au néphélomètre de Pulfrich. Les lectures correspondent à la période durant laquelle les prélèvements pour la chromatographie ont été effectués.



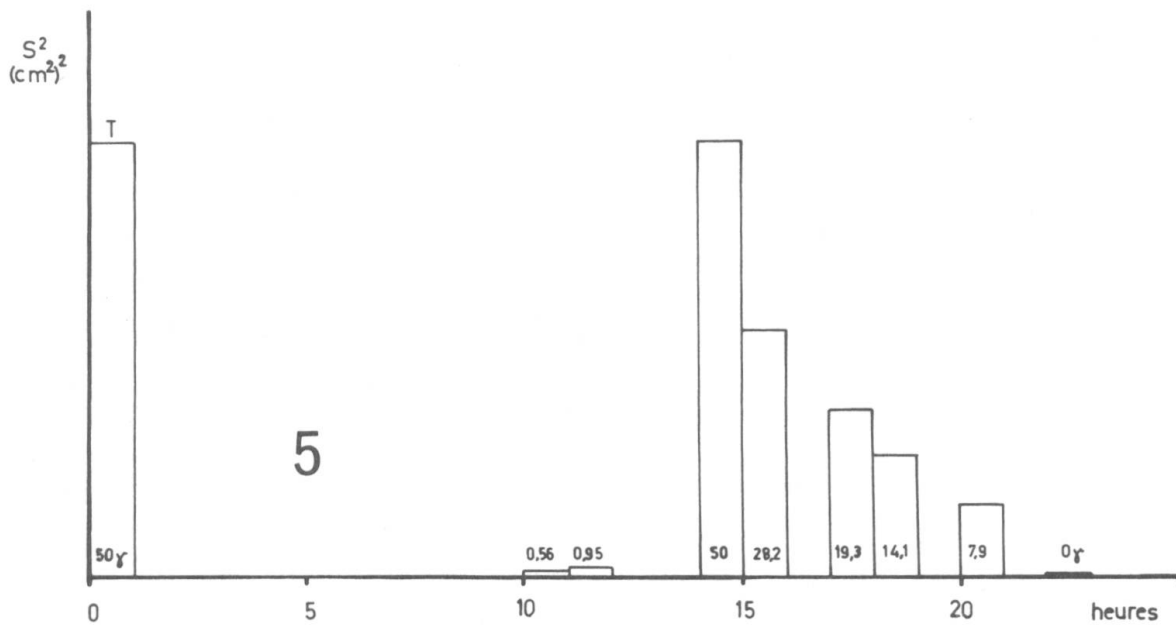
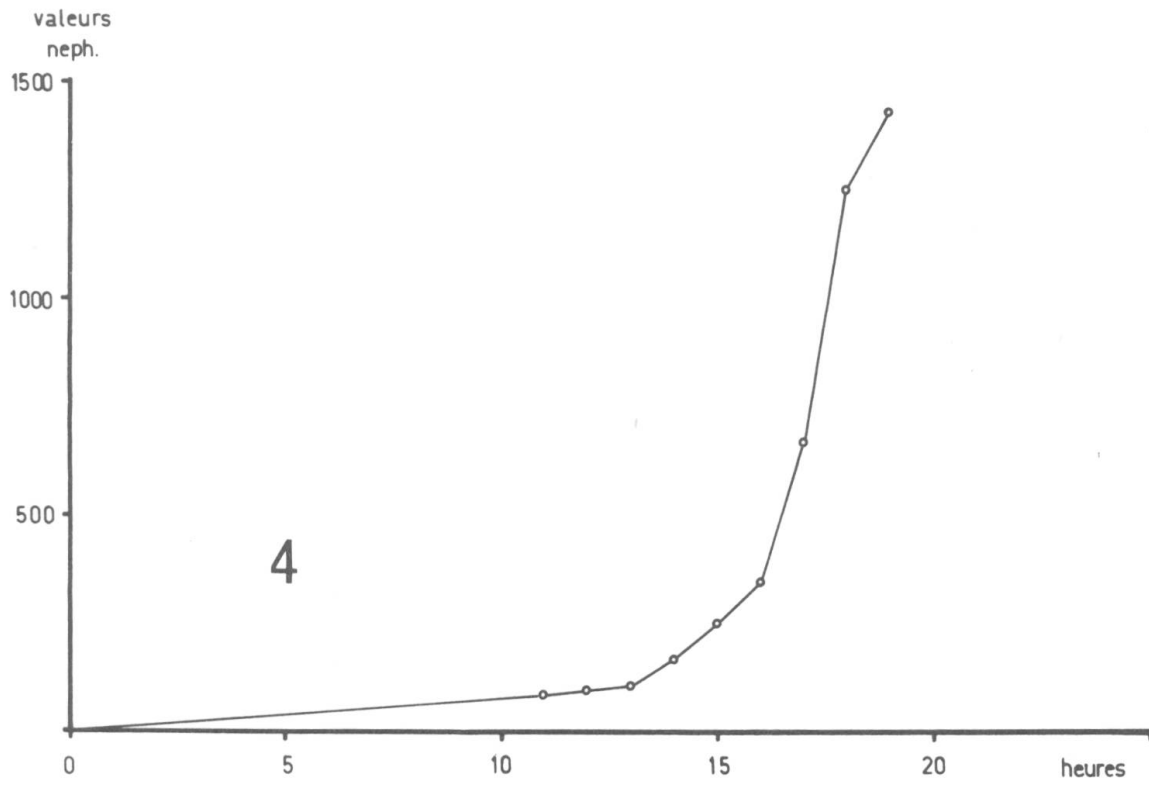


Fig. 4. – Courbe de croissance de *Pseudomonas fluorescens*.

Fig. 5. – Utilisation du 2-céto-gluconate élaboré par *Pseudomonas fluorescens* à partir de l'acide gluconique, en fonction du temps.

Il ressort de la comparaison de ces graphiques que:

- a) l'acide 2-céto-gluconique apparaît dès la fin de la phase de latence;
- b) le maximum de production correspond au début de la phase exponentielle de croissance, soit vers 15 heures pour les deux germes;
- c) l'acide gluconique ne sert pas en tant que tel à la multiplication bactérienne; par contre, l'apparition en quantité suffisante de l'acide 2-céto-gluconique permet aux germes d'entrer dans la phase exponentielle.

Si cette apparition est brusque pour *Ps. fluorescens*, elle est par contre plus étalée dans le temps pour *Ps. aeruginosa*; ce décalage se vérifie également dans le cas des courbes de croissance.

Nous avons noté que la disparition de l'acide 2-céto-gluconique dans les cultures s'accompagnait d'une importante production de pigment.

Discussion

Les quantités d'acide 2-céto-gluconique que nous avons évaluées ne sauraient cependant être considérées comme des données absolues. Il est en effet très difficile d'obtenir des conditions de parfaite reproductibilité car des paramètres variables tels que migration, aspersion du révélateur, hétérogénéité de la population bactérienne interviennent. On peut toutefois constater que la production de l'acide 2-céto-gluconique par *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens* évolue dans le temps à un rythme comparable.

Les résultats que nous avons obtenus par spectrophotométrie en réflexion diffuse montrent que, par rapport à la quantité d'acide gluconique initialement fournie, il n'a pas été possible de déceler plus de 50% d'acide 2-céto-gluconique dans le milieu de culture. Si l'on compare ces données avec celles de la littérature (Entner & Stanier 1951), selon lesquelles 80% environ de l'acide gluconique seraient capturés par les oxydosomes et transformés en acide 2-céto-gluconique, nous pouvons en inférer que l'acide 2-céto-gluconique est continuellement réutilisé par les germes. Il donne, après scission par une aldolase, de l'acide pyruvique et du glycéraldéhyde.

A l'aide de la méthode de Warburg, nous avons en effet déterminé que l'acide 2-céto-gluconique représentait une source de carbone utilisable par les germes étudiés et qu'il n'était pas un produit terminal du métabolisme de l'acide gluconique. Ces essais montrent que le glucose, l'acide gluconique, l'acide 2-céto-gluconique constituent d'excellents substrats, alors que les valeurs relevées pour l'utilisation de l'acide alpha-céto-glutarique et du ribose ne diffèrent que très peu de celles de la respiration endogène.

Le spectrophotomètre en réflexion diffuse que nous avons pu utiliser pour l'estimation quantitative de l'acide 2-céto-gluconique est de conception fort récente. Il ouvre à ce genre de recherches un champ d'utilisations très prometteur. Nous voudrions ici remercier vivement le Professeur A. Mirimanoff, Directeur de l'Institut de pharmacognosie et de pharmacie galénique de l'Université de Genève, qui a bien voulu mettre à notre disposition ce spectrophotomètre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Entner, N. & R. Y. Stanier (1951) Studies on the oxidation of glucose by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 62: 181.
- Lanning, M. C. & S. S. Cohen (1951) The detection and estimation of 2-keto-hexonic acids. *J. Biol. Chem.* 189: 109-114.
- de Ley, J. (1955) Paper chromatographic detection and separation of 2-keto-gluconate-phosphoric esters. *Naturwissenschaften* 42: 96.
- (1960) Comparative carbohydrate metabolism and localization of enzymes in *Pseudomonas* and related microorganisms. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 400-441.
- Philippe, J. (1967) *Les méthodes statistiques en pharmacie et en chimie*. Masson & Cie, Paris.
- Wang, C. H., I. J. Stern & C. M. Gilmour (1959) The catabolism of glucose and gluconate in *Pseudomonas* species. *Arch. Biochem. Biophys.* 81: 489-492.
- Whistler, R. & M. L. Wolfrom (1963) *Methods in carbohydrates chemistry*. Vol. 2: 51-53. Academic Press, London.

