

50376
1963
51

50376
1963
51

UNIVERSITE DE LILLE
FACULTÉ DES SCIENCES

Mémoire présenté en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ÉTUDES SUPÉRIEURES
DE SCIENCES NATURELLES

Recherche de Bactéries

dans les

racines de carotte



Soutenu à Lille, en Mai 1963

par Colette SOOTS

Les cellules des racines tubérisées d'un certain nombre de végétaux hébergent des bactéries : Un travail précédent (4) en a rendu compte. Les isollements bactériologiques, réalisés en particulier à partir de la racine de carotte ont abouti à caractériser huit espèces bactériennes (*Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas*, *Paracoli aérogénoides*, *Bacillus megathérium* et trois espèces non déterminées).

Des recherches cytologiques menées sur la betterave (3) et sur la pomme de terre (1,7) ont permis de préciser la situation et, dans une certaine mesure, l'évolution des micro-organismes dans les cellules au cours de la vie de la plante.

Le travail qui nous a été proposé consistait tout d'abord à localiser par les méthodes habituelles de la cytologie, les bactéries au sein des cellules et des tissus des racines tubérisées de carotte.

Il était tout à fait naturel, pour entreprendre ces observations, de s'adresser aux techniques existantes mises au point pour déceler les bactéries au sein des tissus et nous avons retenu celles qui sont exposées dans une note de Milovidev

intitulée : "Méthodes permettant la différenciation histologique des bactéries symbiotes et des chondriosomes" (5) et employée pour mettre en évidence des bactéries symbiotes dans les tubercules radicaux des Légumineuses.

D'autre part en vue de rendre plus commode l'observation des microorganismes nous avons eu recours aux techniques d'immersion qui, dans de précédents travaux (2,6) avaient permis d'augmenter fortement le nombre des microorganismes.

Enfin dans la dernière partie de ce mémoire, pour compléter les observations cytologiques, nous rendrons compte de l'étude de l'évolution du nombre de bactéries contenues dans les racines de carotte à mesure que se prolonge l'immersion dans le sublimé.

PLAN DU MEMOIRE

	<u>Pages</u>
- Introduction.....	1
I. Techniques cytologiques..... (inclusion - coloration)	4
II. Technique d'immersion.....	6
III. Observations cytologiques.....	8
IV. Technique de numération des bactéries.....	12
V. Résultats des numérations.....	14
VI. Conclusions générales.....	21
VII. Références bibliographiques.....	22

I. TECHNIQUES CYTOLOGIQUES.

Nous avons retenu la méthode de Mlowidov qui commence par la fixation dans le mélange suivant :

acide chromique à 1X	50 parties
Bichromate de potassium à 1X	50 parties
Formol neutre	0 parties

Le fixateur préparé immédiatement avant l'usage, pénétrera lentement dans les tissus et nécessite deux bains consécutifs de 24 heures chacun. Un lavage à l'eau courante durant 24 heures précède la déshydratation et l'inclusion dans la paraffine. Les coupes sont réalisées au microtome à l'épaisseur de 7,5 microns.

La coloration consiste en :

1°) Rubine acide à 20X dans l'eau aillinée pendant cinq minutes sur le platine chauffante.

2°) Lavage à l'eau.

3°) Différenciation à l'aurantia à 0,5X dans l'alcool à 70°

4°) Lavage à l'eau.

5°) Traitement par le mélange suivant :

Acide phosphomolybdique	1g
Soude caustique normale	10 cm ³
Eau distillée	90 cm ³

6°) Lavage à l'eau.

7°) Coloration pendant 10 à 15 minutes par :

Bleu de Volkonsky de composition suivante :

Violet de méthylène	0,4g
Azur II	0,1g
CO_3K_2	0,1g
Eau distillée	50 cm ³
Glycérine	50 cm ³

ou par le Bleu de Unna dans les proportions indiquées ci-dessous :

Eau distillée	1/3
Glycérine	1/3
Bleu de Unna	1/3

8°) Lavage à l'eau.

9°) Différenciation au tanin orange de Unna.

10°) Lavage à l'eau

11°) Passage dans les alcools et montage.

Après quelques tâtonnements, nous avons adapté cette méthode à notre matériel en précisant la durée de certains traitements notamment : après fixation, nous avons lavé les prélèvements pendant 48 heures. Quant à la coloration :

1°) Rubine acide à 5% dans l'eau aniliné pendant 6 minutes sur la platine chauffante.

2°) Lavage à l'eau.

3°) Différenciation de l'aurantia à 0,5% dans l'alcool à 70° 3 minutes.

4°) Lavage à l'eau.

5°) Traitement par le mélange phosphomolybdique
3 minutes.

6°) Lavage à l'eau.

7°) Coloration pendant 22 minutes au bleu de Unna.

8°) Lavage à l'eau.

9°) Différenciation au carlin orange de Unna 30 secondes.

10°) Lavage à l'eau.

11°) Passage dans les alcools et montage au Xam.

Dans ces conditions, la coloration est bleue pour les membranes, rouge pour le nucléole; la coloration des bactéries varie du rouge au violet.

II. TECHNIQUE D'IMMERSION.

Traitements subis par le matériel à inclure.

1°) Stérilisation de surface :

Les racines tubérisées de carotte sont plongées dans le sublimé à 0,2X pendant 2 heures. Au sortir de ce bain elles sont rincées à l'alcool et passées à la flamme.

2°) Immersion :

La surface des carottes ayant été stérilisée,

elles sont, chacune, introduites en prenant les précautions habituelles d'asepsie dans un flacon d'Erlenmeyer de 700 cm³ contenant un bouillon nutritif stérile dont voici la composition :

Lab Lence (viande bactériologique)	5g
Peptone pancréatique	5g
Chlorure de sodium	2,5g
Glucose	20g
Eau	1 litre

Ce milieu de culture permet d'abord de se rendre compte si la stérilisation de surface a été efficace : dans la négative, il y a dès le premier jour de séjour à l'étuve, apparition d'un trouble dû au développement des bactéries dans le bouillon : nous éliminons aussitôt ces récipients. Seuls les Erlenmeyer qui restent stériles nous intéressent : ils demeurent à l'étuve à 30° pendant 7,9 ou 13 jours.

Nous avons remarqué que dans certains cas le milieu de culture ne se troublait qu'assez tardivement : parfois des récipients sont restés stériles jusqu'au huitième ou neuvième jour et c'est alors seulement que le développement bactérien se manifeste.

Quoi qu'il en soit, nous ne gardons pour les études cytologiques que les carottes contenues dans des milieux de culture restés stériles.

Ce traitement d'immersion, par l'asphyxie qu'il provoque, doit s'accompagner de modifications importantes du métabolisme marquées principalement par la dégradation des polysaccharides. Des expériences identiques effectuées sur des tubercules de pomme de terre ont montré que l'on pouvait, par ce procédé, augmenter considérablement le nombre des bactéries à l'intérieur des tissus. Nous l'avons donc, dans le même but, repris pour nos travaux sur la carotte.

III. OBSERVATIONS CYTOLOGIQUES.

A. ZONES DE PRELEVEMENTS.

Pour nous permettre de réaliser les observations cytologiques dans les différentes régions des racines tubérisées les prélèvements ont été effectués:

- d'une part, dans les divers tissus dont on trouvera la situation sur le schéma 1 (p.23)
 - la première zone de prélèvement correspond au parenchyme pericyclique.
 - la seconde, à la zone cambiale ou cribrovasculaire.
 - la troisième, au parenchyme médullaire.
- d'autre part, à différents niveaux : pour cela, chacun des trois prélèvements précédemment localisé, est réalisé à trois niveaux différents de la racine:
 - Région supérieure à proximité du collet.
 - Région moyenne.
 - Région inférieure.

B. DESCRIPTION DE LA STRUCTURE HISTOLOGIQUE.

La coupe transversale de la racine de carotte nous montre (Schéma 1 p.23 et dessin 2 p.24) de la périphérie au centre :

- Une zone superficielle péridermique dont les parois des cellules de la couche externe sont légèrement subérisées. Son origine est une zone génératrice péridermique qui fonctionne au niveau du péricycle transformé en zone péricy-

clique. Les tissus qui en dérivent, entraînent l'exfoliation des tissus externes, à savoir l'endoderme, le parenchyme cortical et l'assise superficielle.

- En dessous, le parenchyme péri-cyclique : le péricycle est le tissu tubérisé de la racine; ses cellules énormes renferment de multiples inclusions, les chromoplastes, source de carotène et d'amidon.

- le phloème secondaire se présente en massifs de cellules bien discernables; elles sont petites mais ne sont régulières qu'au voisinage du cambium. Ces faisceaux de liber sont séparés par de larges rayons libériens dont les cellules sont plus grandes.

- La zone génératrice libéro-ligneuse comprend de nombreuses assises de cellules disposées régulièrement en files radiales. Elle n'a pas la même épaisseur selon les files considérées.

- Les faisceaux de xylème secondaire produits sur la face interne de l'assise cambiale sont irrégulièrement lignifiés; les vaisseaux sont disposés en files radiales plus ou moins longues; ils sont inclus dans un parenchyme secondaire. La disposition de ces faisceaux secondaires est superposée au liber secondaire et la différenciation est centrifuge. Les rayons vasculaires séparant les faisceaux ont de grandes cellules à contours irréguliers.

- Dans la région centrale, on observe encore des cellules de grand calibre; c'est la région médullaire dans

laquelle on discerne quelquefois des faisceaux vasculaires primaires à différenciation centripète.

C. OBSERVATIONS DES BACTERIES.

L'examen des coupes transversales de la région supérieure proche du collet permet de constater que dans certains cas la lumière des vaisseaux du bois est complètement obstruée par des amas très denses, de coloration violette, constitués par la juxtaposition d'un très grand nombre de bactéries.

Ceci est particulièrement visible sur les dessins réunis à la fin de ce mémoire.

Le dessin 3 (p.25) montre une file radiaire de vaisseaux de bois secondaire envahie par les microorganismes. On voit très nettement la membrane épaissie des vaisseaux et les bactéries en amas importants.

Le dessin 4 (p.26) pris dans la même région montre là encore des amas un peu plus volumineux. Ces derniers peuvent d'ailleurs prendre une telle importance que les parois du vaisseau éclatent (dessin 5 p.27) et l'on peut voir une quantité considérable de microorganismes serrés les uns contre les autres.

Parfois ce n'est pas seulement la lumière des vaisseaux qui est obstruée mais aussi les cellules parenchymateuses des rayons vasculaires. Ceci est visible sur le dessin 6 (p.28).

Il faut noter également que dans cette région nous avons constaté que les néats qui subsistent entre les cellules

du parenchyme vasculaire hébergent aussi bon nombre de micro-organismes au point d'être parfois fortement dilatés (dessin 7 p.29 et dessin 8 p.30).

Nous avons noté quelquefois aussi des files de cocci dans les cellules parenchymateuses intercalées entre les vaisseaux (dessin 9 p.31).

Les coupes effectuées dans les prélèvements correspondant à la partie périphérique (parenchyme périeyclique) et à la zone centrale (parenchyme médullaire) n'ont pas permis de déceler la présence de bactéries dans ces tissus quelle que soit la durée de l'immersion (7 jours, 9 jours ou 13 jours). Nous n'en avons pas non plus observées au niveau du liber secondaire et des rayons liberiens.

Si nous considérons maintenant les résultats des observations réalisées aux différents niveaux, nous constatons que le nombre de cellules infestées de bactéries diminue progressivement au fur et à mesure que l'on s'éloigne du collet pour aller vers le méristème.

En coupe longitudinale, nous retrouvons les résultats ci-dessus exposés; le dessin 10 (p.32) montre des vaisseaux complètement remplis de bactéries.

Les amas dont nous avons parlé renferment des formes allongées : des bacilles et également des formes rondes : les cocci. Bacilles et cocci sont vus en coupe transversale : Dessin 11 (p.33). Il est fréquent de rencontrer dans ces amas des zones de striation qui doivent selon nous cor-

resoudre à la décompression subite qui se produit au moment de la coupe.

Ces observations permettent donc d'affirmer, compte tenu du processus expérimental que nous avons décrit, que les nombreuses bactéries mises en évidence, principalement dans les vaisseaux, résultent de la multiplication, à la faveur de l'immersion, de bactéries qui préexisteraient dans les cellules.

IV. TECHNIQUE DE NUMERATION DES BACTERIES.

Pour parvenir à dénombrer les microorganismes présents dans un milieu naturel donné, on répartit un certain volume de ce milieu de dilution connue et convenable dans des boîtes de Petri stériles, on verse ensuite dans ces récipients un volume déterminé d'un milieu de culture gélosé chaud : avant que la gélose ne soit solidifiée, on agite pour bien répartir les bactéries à dénombrer. On laisse refroidir puis on porte à l'étuve à 30° pendant 3 à 4 jours. Si la dilution est convenable, chaque bactérie a donné naissance au sein de la gélose à une colonie facilement décelable.

Evidemment toutes les manipulations, les outils, les milieux doivent être stériles et nous nous plaçons dans les conditions classiques : travail à la chambre stérilisée par rayons ultra-violet; stérilisation des outils par l'alcool et flambage, des milieux de culture et des boîtes de Petri et des petits flacons à l'autoclave.

La manipulation complète comprend :

- Stérilisation des carottes par le sublimé à 0,2% pendant une durée variable selon l'expérience.
- Prélèvement à l'emporte pièce de fragments cylindriques.
- Ecrasement de ces explantats dans les pinces du type utilisé en sérologie par les sélectionneurs de pomme de terre, ce qui aboutit à un faible volume de jus.
- Réception du jus dans les petits flacons.
- Dilution par puissance de 10 par les méthodes classiques avec de l'eau stérile. Si l'on pose que le jus est à la dilution x , 1 cm^3 de jus additionné de 9 cm^3 d'eau est à la dilution x^{-1} . 1 cm^3 de cette dilution est complété à 9 cm^3 d'eau : dilution x^{-2} et ainsi de suite.
- Dépôt d' 1 cm^3 de liquide à étudier dans les boîtes de Petri.
- Addition à ce liquide d'un volume constant (20 cm^3) d'un milieu de culture gélosé et chaud (55°) de composition suivante :

Extrait de levure	3g
Tryptose	20g
Glucose	1g
Cl Na	5g
$\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$	1g
Bacte agar	17g
Eau distillée	1 litre

- Agitation sérieuse pour bien mélanger les deux liquides.
- Après refroidissement et solidification du milieu gélosé, on verse une couche de gélose blanche (eau 100 cm^3 , gélose 1,25g)

- Séjour des boîtes à l'étuve pendant 72 heures.
- Numération sur un papier quadrillé : les colonies sont développées dans différents plans perpendiculaires, parallèles ou obliques par rapport à la surface du milieu.

V. RESULTATS DES NUMERATIONS.

Nous avons d'abord étudié la variation du nombre de bactéries hébergées par des carottes différentes mais toutes normales ; ceci en vue de connaître les limites de variations significatives.

Pour cela nous avons, selon la technique indiquée ci-dessus, fait des explantats et procédé aux numérations correspondant d'une part à la partie supérieure des racines et d'autre part à la partie inférieure de 6 carottes différentes.

Les résultats sont donnés dans le tableau suivant pour la dilution de 1/10^{ème} c'est-à-dire que pour connaître le nombre de bactéries contenues dans 1 cm³ de jus de carotte normale, il faut multiplier par 10 les chiffres indiqués.

TABLEAU I

		Nombre de colonies bactériennes dans les boîtes correspondant aux différentes carottes					
Partie supérieure	8	5	4	18	8	8	
Partie inférieure	5	15	5	3	12	16	

On constate à la lecture de ces chiffres que les variations individuelles d'une carotte à une autre n'excède pas 15 et que l'on peut par conséquent considérer toute variation de l'ordre de 30 colonies comme significative.

Les observations cytologiques ont montré qu'il était possible d'accroître considérablement le nombre de bactéries par racine de carotte en les immergeant. Le milieu que nous avons choisi pour réaliser cette opération était jusqu'ici un bouillon de culture dont nous avons antérieurement donné la composition. Nous avons également présenté les raisons qui nous avaient déterminées dans ce choix. Il nous a paru intéressant d'essayer d'obtenir cette multiplication du nombre de microorganismes de façon différente et à l'apprécier par une autre technique que l'observation cytologique.

C'est pourquoi nous avons immergé des racines de carotte dans un antiseptique : le chlorure mercurique ou sublimé à 0,2% pendant des durées variant de 1 à 28 jours. Pour chacune d'elles, nous avons effectué des numérations bactériennes d'une part

- Dans la partie supérieure de la carotte

- Dans la partie inférieure

et d'autre part

à 4 dilutions différentes : jus d'extraction dilué au 1/10^{ème}, 1/100^{ème}, 1/1 000^{ème} et au 1/10 000^{ème}

Nous n'avons retenu pour cet exposé que les chiffres obtenus pour la dilution de 1/10^{ème}. Les résultats sont donnés dans le tableau II.

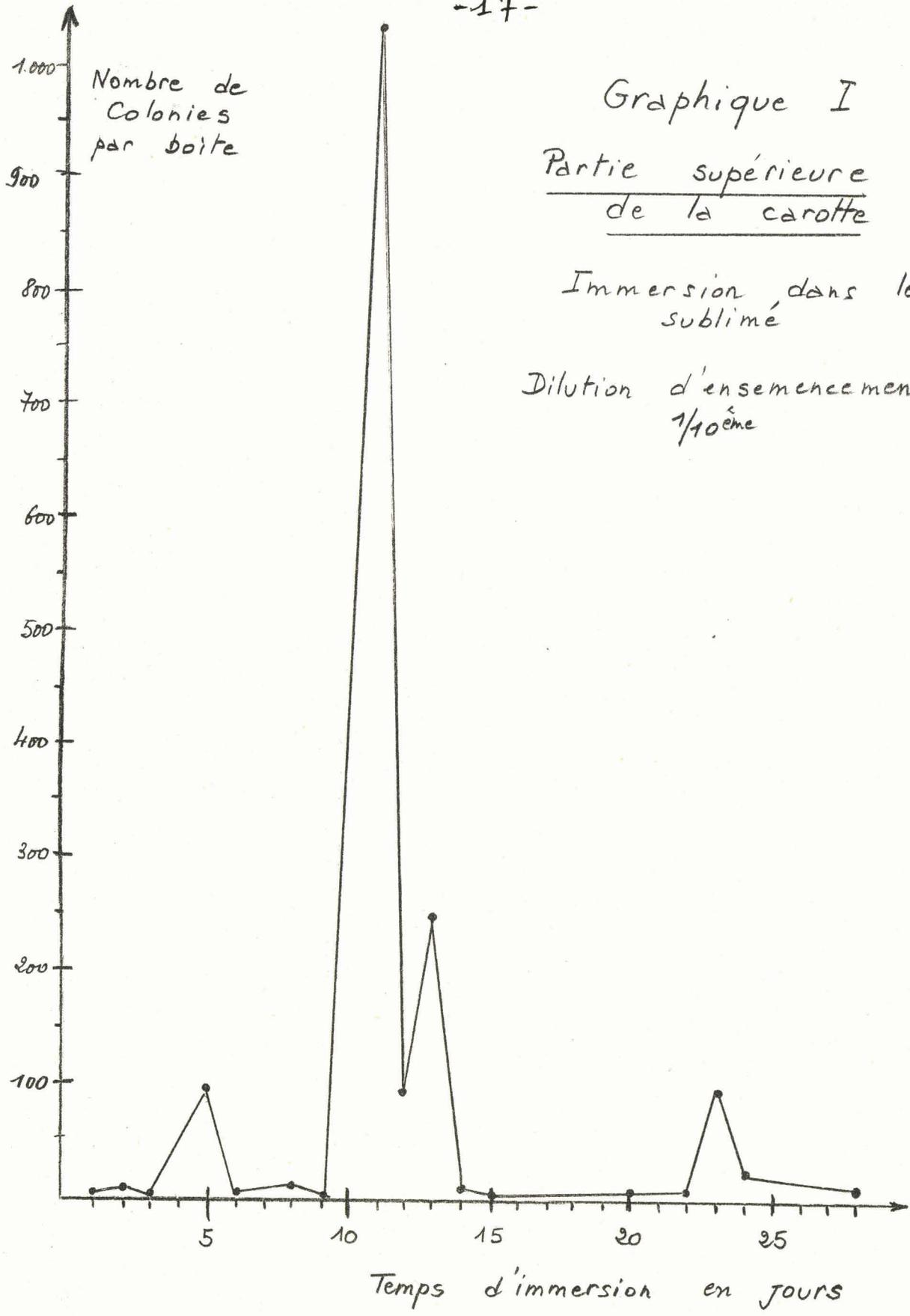
TABLEAU DE CHIFFRES

Indiquant en fonction de la durée de l'immersion le nombre de colonies comptées dans chaque boîte pour la dilution de 10⁻³ après 72 heures d'étuve à 30°
 Pour connaître le nombre de bactéries contenues dans 1 cm³ Jus, il convient donc de multiplier les chiffres par 10.

Jours : Partie supérieure ; Partie inférieure ; de la carotte ; de la carotte

1	0	0
2	1	5
3	0	4
5	95	56
6	0	6
7	2	2
8	8	16
9	0	2
11	1 069	825
12	94	224
13	254	252
14	7	1
15	0	1
22	6	30
23	100	100
24	16	8
27		4
28	11	66





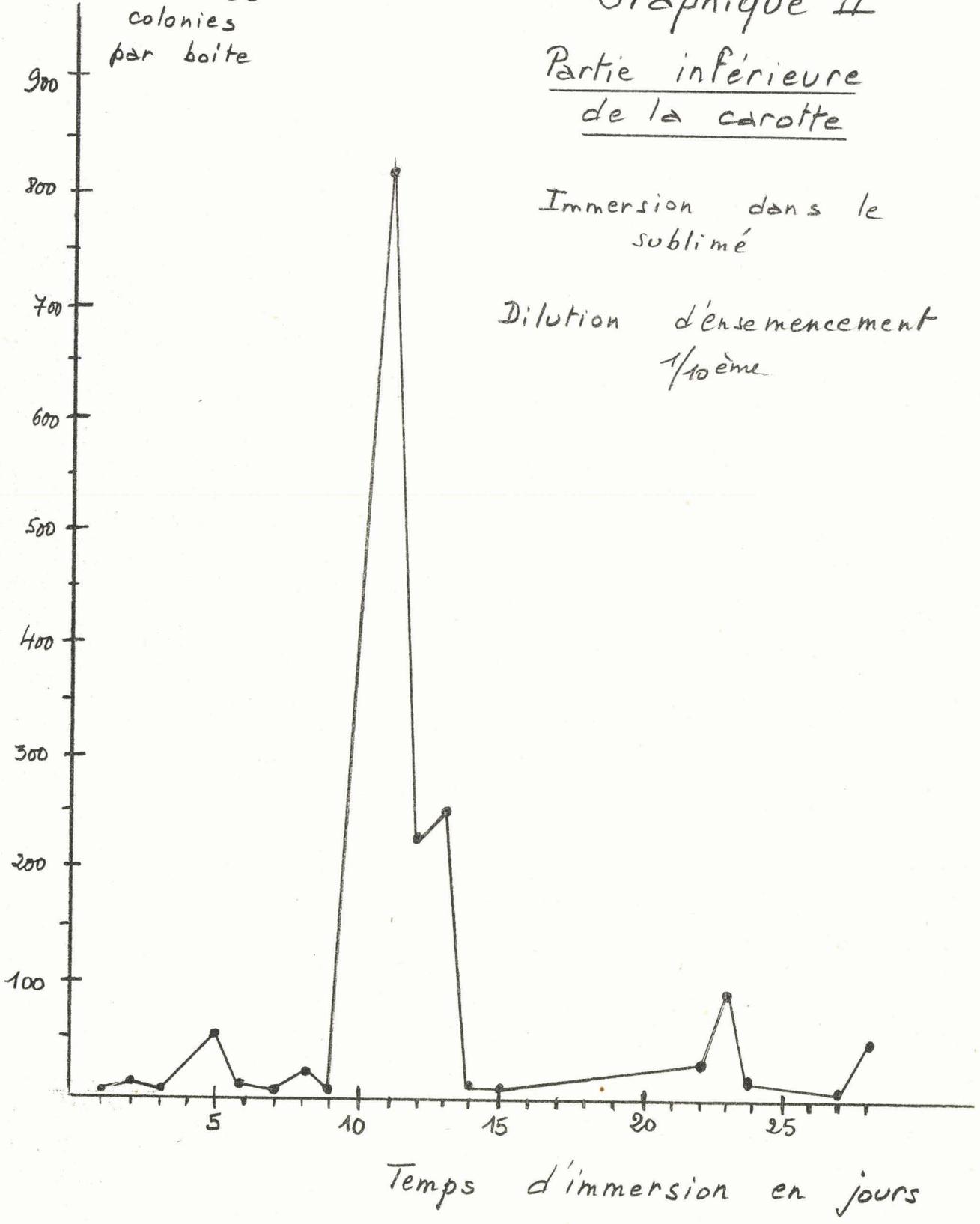
Nombre de colonies par boîte

Graphique II

Partie inférieure de la carotte

Immersion dans le sublimé

Dilution d'ensemencement $\frac{1}{10}$ ème



L'examen du tableau de chiffre II (p. 16) et des graphiques qui leur correspondent (graphique 1 p. 17 et graphique 2 p. 18) montre qu'il existe une durée assez précise d'immersion (10 à 14 jours) pour laquelle l'augmentation du nombre de bactéries est considérable :

- 1 069 colonies par boîte pour la durée de 11 jours et pour la partie supérieure
- 825 colonies par boîte pour la durée de 11 jours et pour la partie inférieure.

Rappelons que, dans les mêmes conditions, des carottes normales non immergées avaient donné des chiffres variant de 3 à 18 colonies par boîte.

Les graphiques permettent d'autre part de constater que cette augmentation de la population bactérienne

- 1°) est subite (11ème jour)
- 2°) ne dure pas longtemps (11ème au 13ème jour)
- 3°) est suivie d'une diminution également considérable.

Cette étude apporte donc pleine confirmation aux observations cytologiques dont nous avons rendu compte plus haut. La solution de sublimé permet, elle aussi d'obtenir l'augmentation du nombre de microorganismes. Il est donc possible de penser que ce n'est pas la nature du milieu d'immersion qui est importante mais seulement les conditions physiques et chimiques d'asphyxie consécutives à ce traitement.

Cette partie de notre travail, d'autre part, est à rapprocher des résultats obtenus de la même façon pour la pomme de terre (2). Notons cependant que dans ce dernier cas,

l'appréciation de l'augmentation de la population bactérienne reposait sur la technique des explantats et le comptage du nombre de tubes pollués; nous avons utilisé, pour la carotte, une technique très différente et beaucoup plus précise mais qui, réalisée pour la première fois au laboratoire, nous a demandé une longue mise au point.

Pour interpréter cette brusque augmentation suivie d'une rapide et forte diminution de la population bactérienne lorsque la durée d'immersion dans le sublimé se prolonge, nous pouvons imaginer que deux phénomènes antagonistes entrent en jeu :

- Le premier résultant de l'asphyxie et provoquant notamment l'accroissement du taux de glucides libres augmenterait régulièrement la possibilité du développement bactérien.

- Le second résultant de la lente pénétration du sublimé à l'intérieur des tissus s'opposerait par ses propriétés antiseptiques à la prolifération des microorganismes et même, au bout d'un certain temps, les éliminerait.

Le point d'équilibre entre ces deux forces antagonistes correspondrait à la forte augmentation constatée entre le 11^{ème} et le 13^{ème} jour.

VI. CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

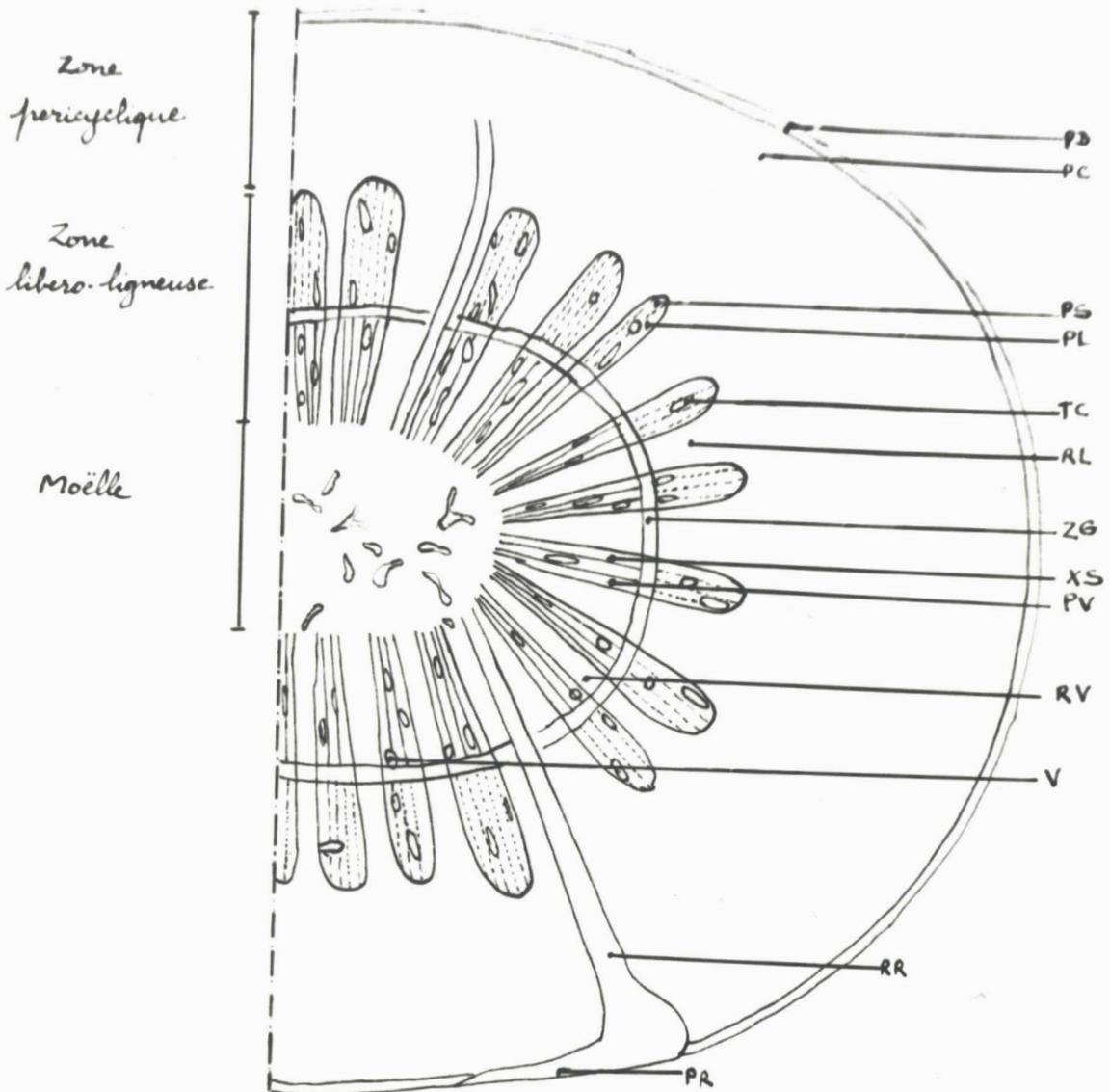
De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons tirer les conclusions suivantes.

- 1) Nos observations cytologiques confirment pleinement les résultats des travaux d'isolement de bactéries à partir de racine de carotte
- 2) Les bactéries semblent presque uniquement localisées dans la zone cambiale et plus particulièrement dans les vaisseaux du bois. On les rencontre aussi fréquemment dans les méats.
- 3) Ces bactéries semblent être légèrement plus nombreuses dans la partie supérieure de la racine, voisine du collet.
- 4) Les techniques d'immersion dans un milieu de culture ou même dans le sublimé permettent d'augmenter considérablement le nombre des microorganismes.
- 5) On peut estimer, d'après les techniques de numération que nous avons mises au point, qu'1 cm³ de jus de carotte normale et saine renferme environ 90 bactéries.

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

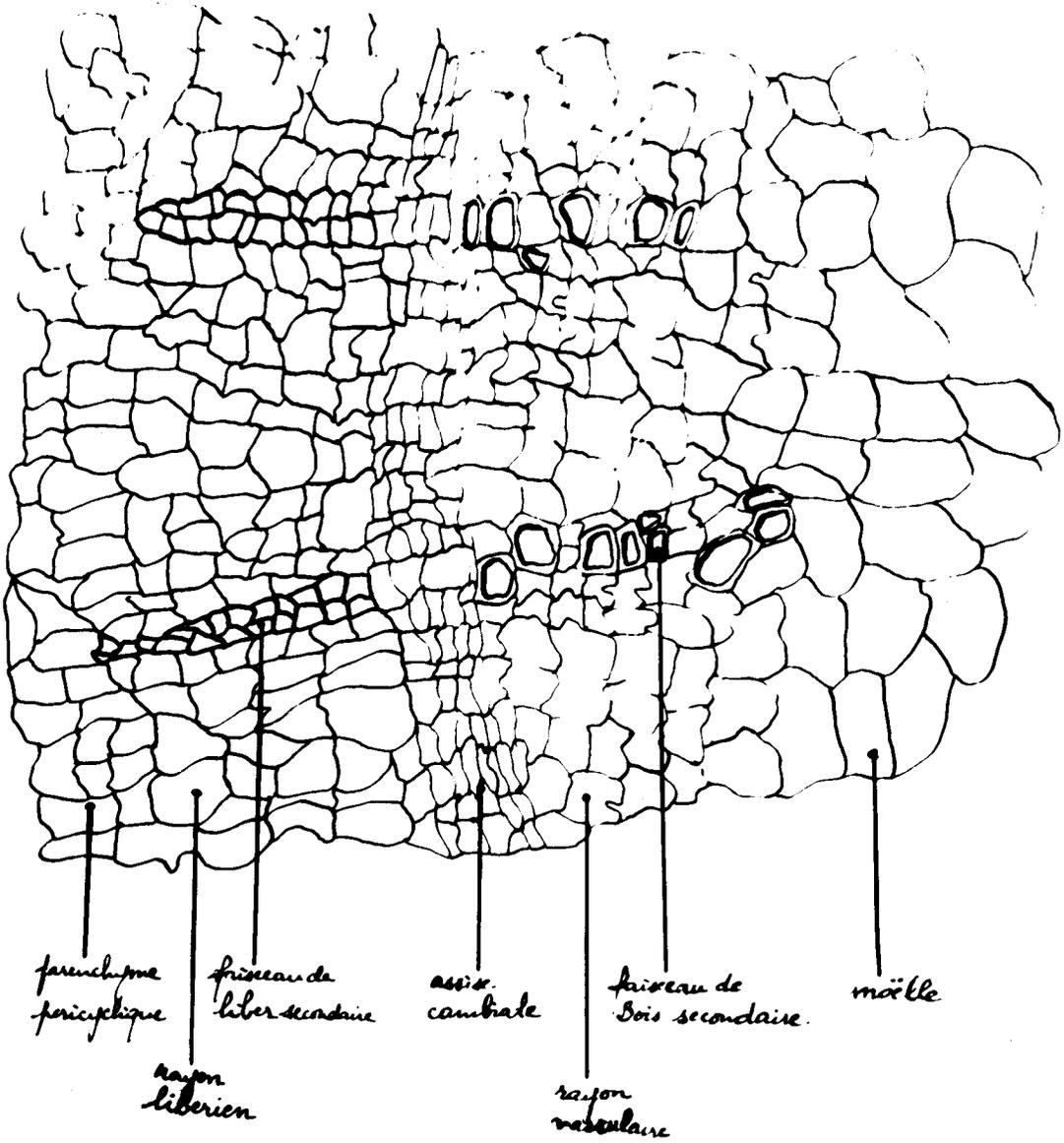
- (1) CROUZET, D : Quelques preuves cytologiques de la présence de bactéries dans les tubercules de pomme de terre.
D.E.S. LILLE Mai 1961
- (2) DUBOIS, J : Activité, répartition et évolution des bactéries présentes dans les tubercules sains de pomme de terre.
D.E.S. LILLE Février 1962
- (3) NIVET, M : Recherches cytologiques de bactéries dans les racines de betteraves saines
D.E.S. LILLE Février 1962
- (4) LAPERE, G : Isolement, caractères et détermination des bactéries vivant dans les organes végétaux.
D.E.S. LILLE Janvier 1963
- (5) MILOVIDOV, P.F : Méthodes permettant la différenciation histologique des bactéries symbiotes et des chondriosomes.
Bull. Hist. Appl. (1928) 5 p. 382-391
- (6) MONTUELLE, B : Présence de bactéries dans la carotte
Bull. Soc. Bot. du Nord de la France (1960) 13 p. 13 à 15
- (7) YOUNG, J : Localisation et évolution des bactéries présentes dans les tissus de la pomme de terre à différents stades de son développement.
D.E.S. LILLE Mai 1962

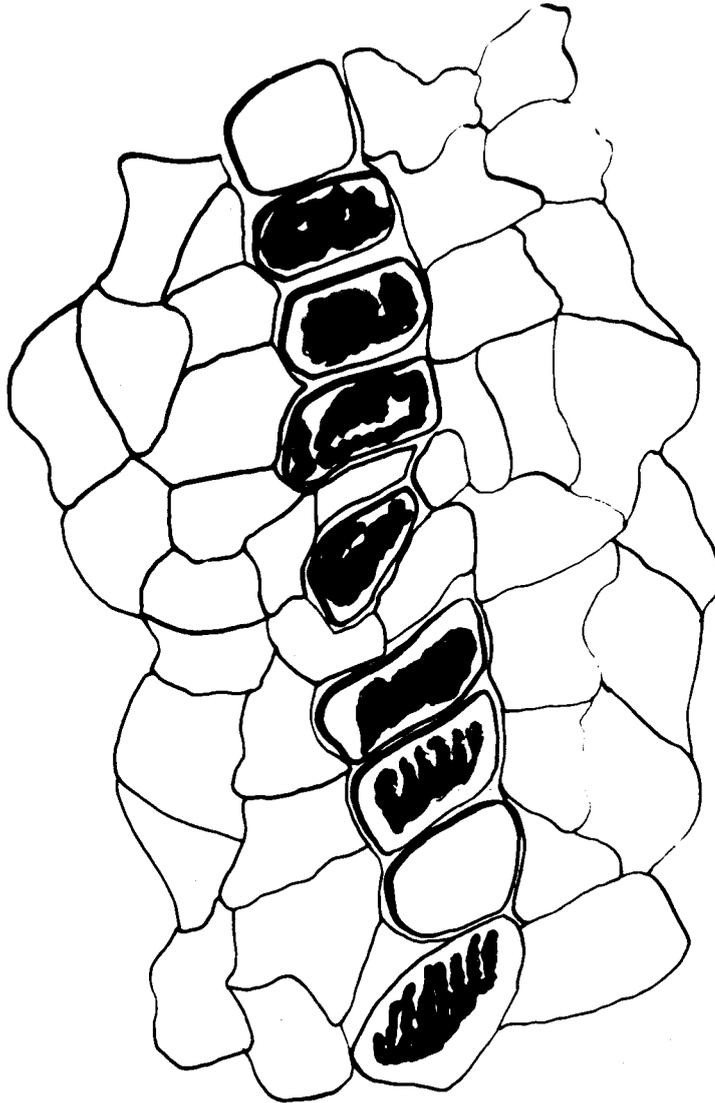
Coupe transversale de carotte
Schéma d'ensemble.



PD: zone péridermique; PC: zone périscylique; PS: phloème secondaire,
PL: parenchyme libérien; TC: tubes criblés; AL: rayon libérien;
ZG: zone génératrice libero-ligneuse; XS: xylème secondaire;
PV: parenchyme vasculaire; RV: rayon vasculaire; V: vaisseau
RR: rayon rhizogène; PR: plage rhizogène.

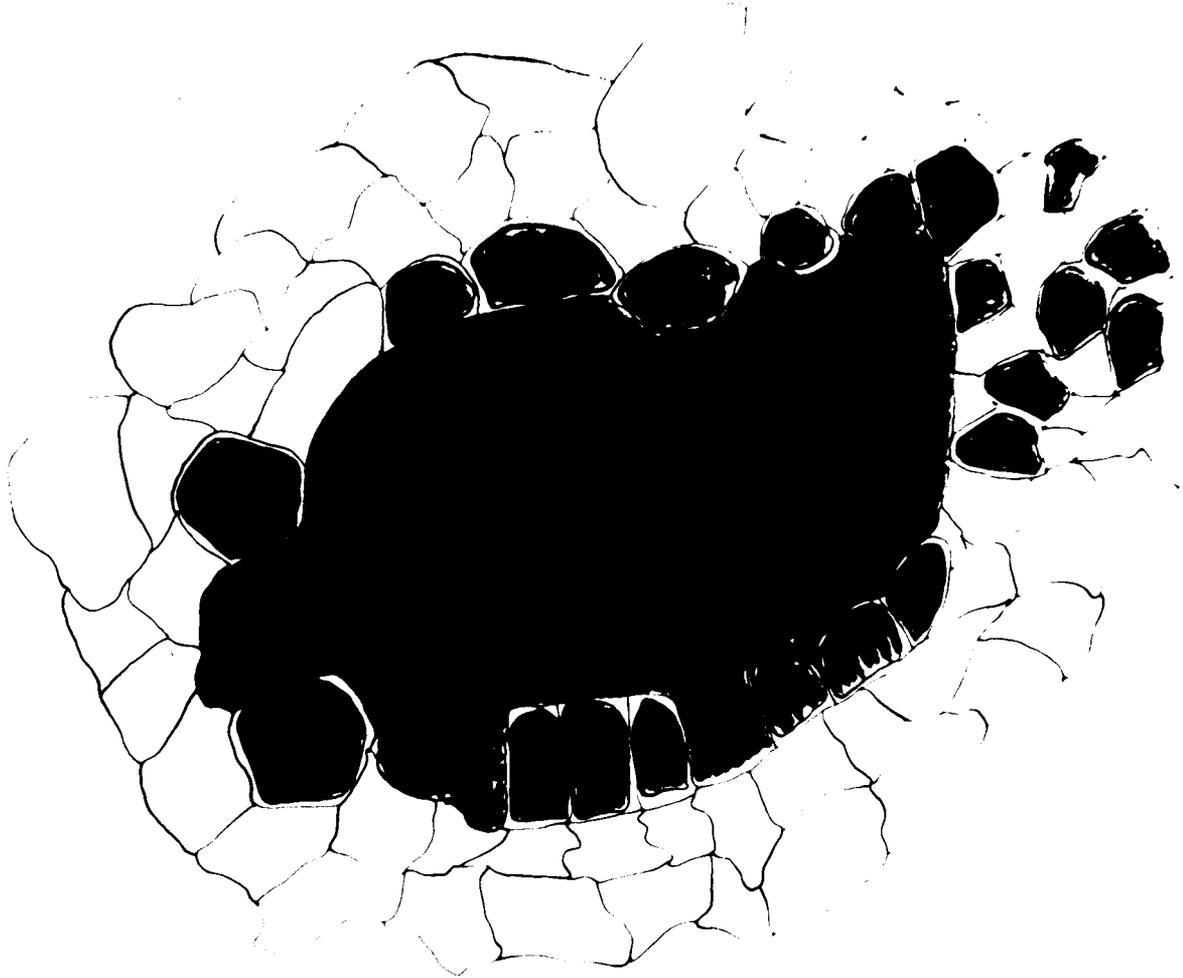
Coupe transversale
Lame libéro ligneuse

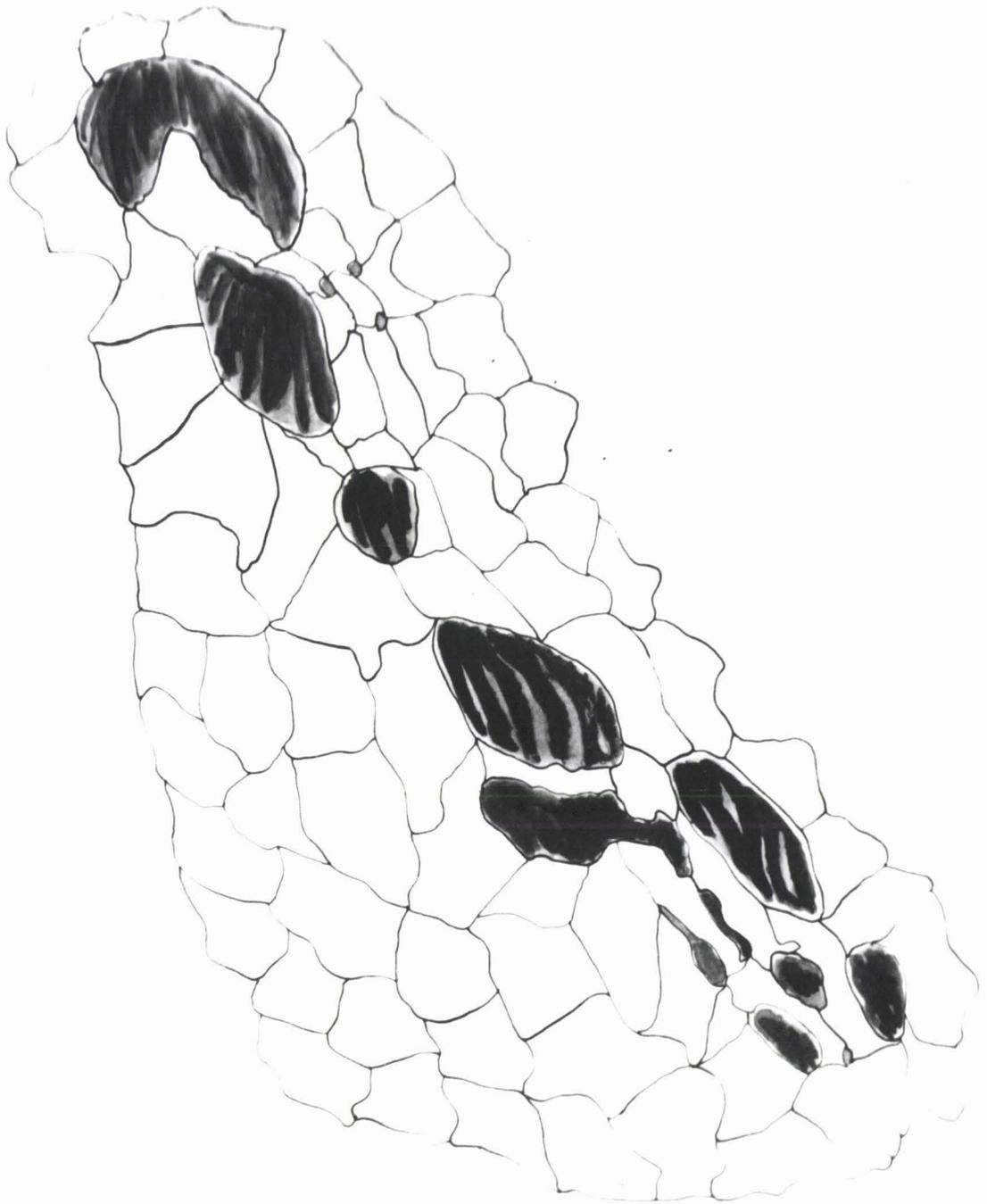




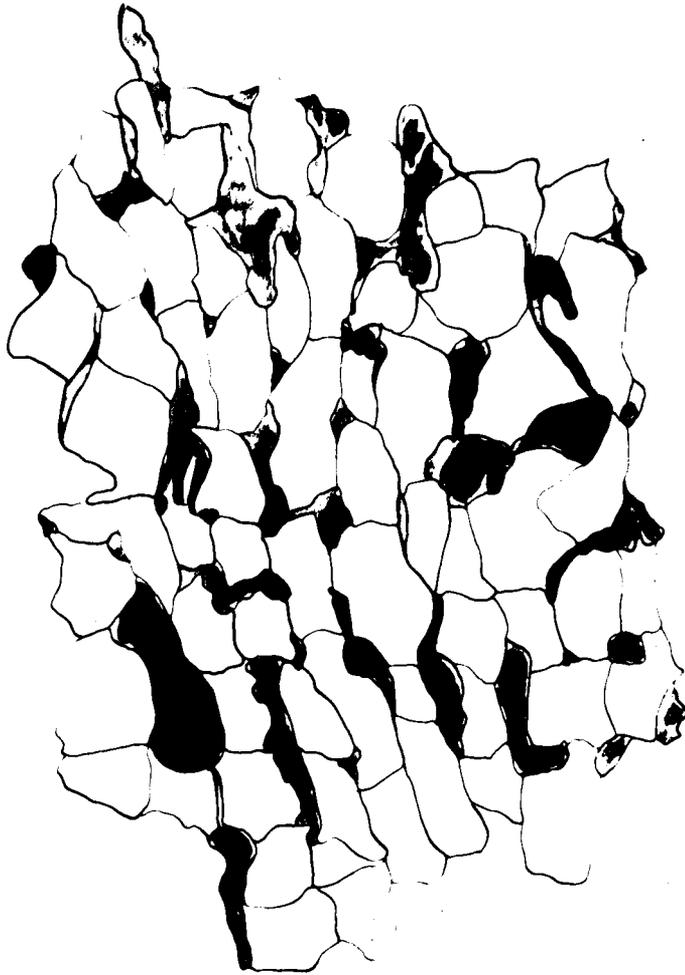
3

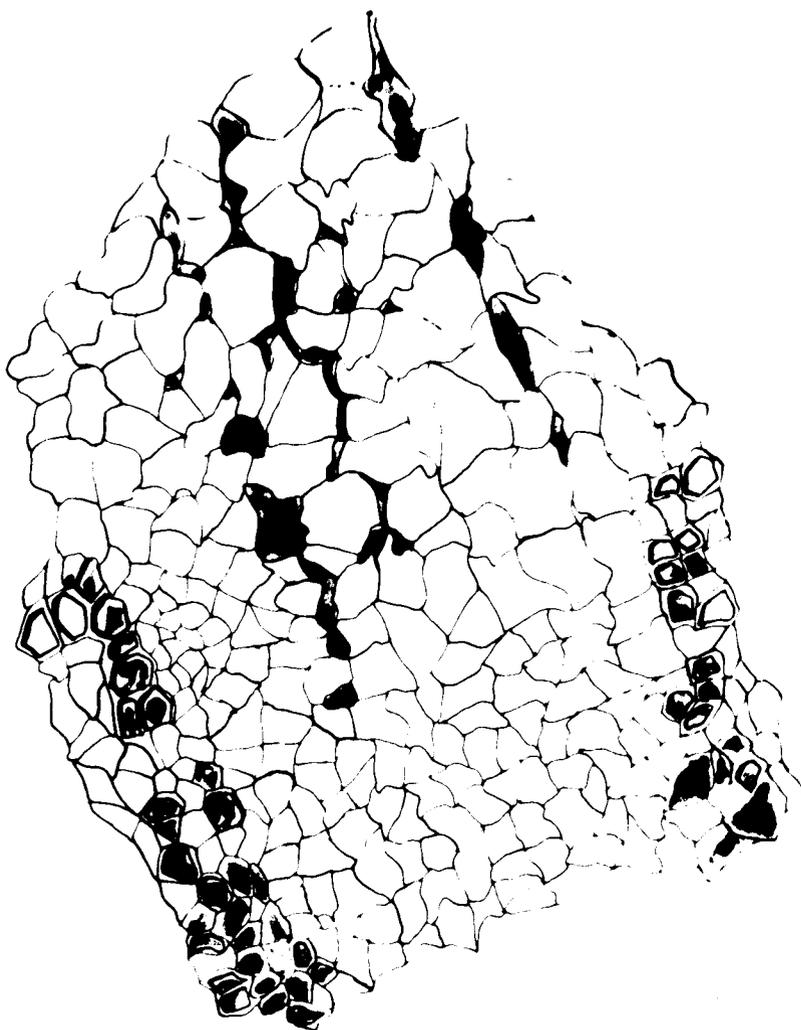


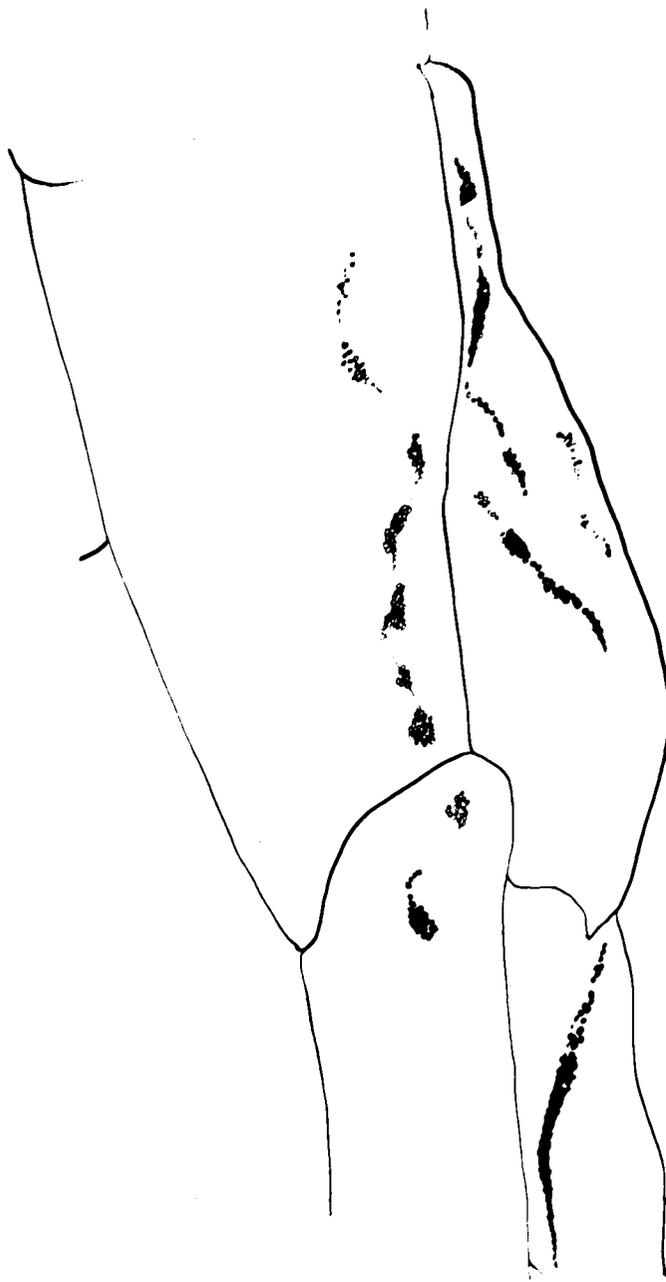




6







9

