

50376
1964
26

50376
1964
26

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DES SCIENCES

Mémoire présenté en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ÉTUDES SUPÉRIEURES
DE SCIENCES NATURELLES



Numération des bactéries

par les méthodes classiques de microbiologie
dans les tubercules de pomme de terre

Soutenu à Lille, en Février 1964

par Francine VERDIÈRE

L'une des premières questions qui vient à l'esprit, lorsque l'on considère la présence de bactéries dans les tubercules de pomme de terre, est d'ordre quantitatif. Les micro-organismes sont-ils nombreux à l'intérieur des cellules ? Existe-t-il sous ce rapport des différences importantes entre les tubercules ?

Les indications quantitatives que nous avons avant de commencer ce travail avaient été obtenues, rappelons le brièvement en plongeant un fragment d'organe dans un tube contenant un milieu de culture liquide. Des bactéries se développent dans un certain nombre d'entre eux, ce qui permettait d'en tirer des indications sur l'importance relative du peuplement bactérien. Cette méthode utilisée jusqu'ici au laboratoire n'est pas suffisamment précise, c'est pourquoi il nous a été proposé d'adapter à ces problèmes, les méthodes classiques de la bactériologie.

.../...

Ce travail, mené à bien après de nombreuses mises au point, nous donnait une méthode précise grâce à laquelle nous pouvions envisager de reprendre en partie les études précédentes (1), (2).

C'est ainsi qu'après avoir précisé les variations individuelles (d'un tubercule à l'autre), nous avons étudié des tubercules placés dans des conditions variables naturelles (apparition du bourgeonnement) ou artificielles (séjour sous vide, dans l'oxygène ; immersion dans un liquide ; influence du froid, d'un inhibiteur de germination).

Ces résultats nous permettront à la fin de ce mémoire, d'une part de comparer la valeur des deux méthodes de numération et, d'autre part, de tirer les conclusions sur les relations entre le comportement des bactéries et le métabolisme de l'hôte.

I) PRINCIPE

Les bactéries à dénombrer sont ensemencées stérilement dans un milieu de culture gélosé encore liquide. Après refroidissement et incubation à l'étuve chaque micro-organisme a donné naissance au sein de la gélose à une colonie facilement visible.

II) MISE AU POINT

La méthode de numération sur milieu solide est une méthode classique de la bactériologie, notre travail a consisté à la mettre au point dans différents domaines.

a) réipient

Ayant rencontré quelques déboires en essayant de cultiver les colonies en surface, nous avons tenté les cultures en tube. L'épaisseur du milieu étant de 12 centimètres, chaque bactérie pouvait trouver la profondeur qui lui permettait un développement optimum. En effet, les colonies sont apparues nettement, non pas à la surface du milieu, mais à l'intérieur de celui-ci sur une épaisseur d'environ 1 cm. Aucun développement bactérien n'a été constaté en profondeur du tube, ce qui s'explique par le fait que les bactéries identifiées sont pour la plupart aérobies. La culture en tube apparaissait donc comme plus favorable au développement des micro-organismes mais les colonies se trouvaient rassemblées sur un espace beaucoup trop restreint pour être dénombrées avec certitude. En vue d'obtenir une population bactérienne moins dense, nous avons repris l'ensemencement en boîte de Pétri, mais en y modifiant l'épaisseur du milieu de culture.

b) volume du milieu

Nous venons de voir qu'il était nécessaire de recréer dans les boîtes cette zone favorable de 1 cm d'épaisseur. On y parvient en utilisant 70 cm³ de milieu.

Des expériences complémentaires ont été réalisées pour confirmer ce résultat : des bactéries provenant du même tubercule ont été ensemencées dans des milieux d'épaisseur différente. Pour les très faibles épaisseurs (inférieures à 3 mm), le développement des bactéries n'a pas été satisfaisant. Un volume de milieu de 70 cm³ est donc apparu comme optimum.

c) milieu de culture

Des bactéries provenant du même tubercule ont été cultivées simultanément sur 2 milieux gélosés.

- Le milieu oxoid MC 67 que l'on trouve préparé dans le commerce et dont la composition est la suivante :

- . Extrait de viande 20 g
- . Peptone bactériologique 10 g
- . Cl Na 5 g
- . Eau distillée 1 000 ml

Nous ajoutons du glucose à raison de 2%.

- le milieu tryptose préparé au laboratoire. Sa composition est la suivante :

- . Extrait de levure 3 g
- . Tryptose (Difco) 20 g
- . Glucose 1 g

- . Cl Na 5 g
- . PO4 K2H 1 g
- . Eau distillé 1 000 ml

Les colonies sont apparues plus rapidement dans le milieu tryptose, elles étaient également beaucoup plus développées. Le milieu tryptose a donc été retenu. Il est, avant l'emploi, stérilisé par passage à l'autoclave (20 minutes à 120°).

d) quantité de gélose

Un milieu trop fortement gélosé (par exemple 17 g de Bacto-agar pour 1 000 ml de milieu tryptose) inhibe le développement des colonies bactériennes, celles-ci sont peu nombreuses et peu étendues dans ce milieu trop solide.

La concentration de 10 pour 1 000 donne plus de viscosité au milieu, elle apparaît comme la plus adéquate.

e) température du milieu gélosé

Les bactéries à dénombrer sont ensemencées au milieu gélosé liquide qui se solidifie ensuite en refroidissant. Avant l'emploi le milieu tryptose gélosé, solide, est mis au bain-marie (100°) ; au bout de 15 minutes le milieu s'est liquéfié, on le laisse refroidir et, dès qu'il a atteint une température de 50° on peut y ensemencer des bactéries. L'expérience nous a montré qu'une température d'utilisation supérieure à 50° réduit le nombre de colonies observées dans chaque boîte.

III) MATERIEL

6

Nous avons utilisé des pommes de terre de la variété Binjje. Nous précisons avant chaque expérience les conditions ou les traitements subis par les tubercules. mais, quels que soient nos travaux, les organes sont toujours lavés à l'eau puis immergés pendant une demi-heure dans une solution antiseptique (Chlorure mercurique : 2 g, eau 1 000 ml) ; ceci avant chaque numération.

IV) MODE OPERATOIRE

Toutes les opérations se font près d'une flamme dans une salle stérilisée par les rayons ultra-violetts (2 heures d'illumination). Les instruments sont stérilisés à la flamme et laissés à refroidir avant l'utilisation.

La manipulation se déroule de la façon suivante :

- couper transversalement en deux le tubercule choisi, stérilisé comme ci-dessus.
- flamber la face de coupe d'une des deux moitiés jusqu'à carbonisation de la surface.
- Chauffer un trocart dans la flamme d'un bec bunsen, refroidir par passage dans l'alcool.
- Prélever avec ce trocart un explantat, perpendiculairement à la surface flambée, au centre de celle-ci.
- Déposer le fragment prélevé sur le mors d'une pince spéciale (schéma p 8) puis écraser.
- Recueillir le jus obtenu dans une boîte de Pétri (stérilisée au four Pasteur : 20 minutes à 170°), verser 70 ml de milieu tryptose gélosé rendu liquide par chauffage au bain-marie à l'ébullition et refroidissement jusqu'à 50°.

.../...

7

- Agiter pour qu'il y ait répartition homogène du jus de pomme de terre dans le milieu.

- Dès que le milieu tryptose s'est solidifié, recouvrir d'eau gélosée (10 g de Bacto-agar pour 1 000 ml d'eau distillé) dite "gélose blanche", préalablement stérilisée, liquéfiée et refroidie à 60°.

- Mettre les boîtes de Pétri à l'étuve (30°) pendant 72 heures.

- Eliminer la pellicule de gélose blanche, par l'action d'un courant d'eau.

Les colonies apparaissent alors sous forme de lentilles biconvexes, de 2 à 4 mm de diamètre, plus ou moins transparentes et plus réfringentes que le milieu. Elles sont disposées dans tous les plans de l'espace. Il arrive même que des colonies de plans différents s'accolent, ce qui donne une sorte de rosette.

- Pour effectuer la numération la boîte est éclairée par le dessous, ce qui rend les colonies plus facilement décelables.

Le nombre de colonies trouvées correspond donc à celui des bactéries qui étaient hébergées par l'explantat. Pour donner à nos résultats une valeur comparative nous précisons que, pour chaque numération nous partons toujours de la même quantité de tissus (petit cylindre de 0,5 cm de diamètre et de 1,5 cm de long) soit 700 mm³ environ. Ce volume est relativement constant et correspond à un poids frais de 0,7 g et à un poids sec de 0,15 g.

.../...



PINCE SPECIALE UTILISEE POUR ECRASER LES TISSUS VEGETAUX

Nous avons donc considéré que cette méthode, telle qu'elle vient d'être exposée pouvait être appliquée à l'étude des variations du nombre de bactéries hébergées dans les cellules. Nous avons entrepris, dans ce sens, un certain nombre de numérations qui ont été effectuées sur des tubercules :

- 1 placés dans le vide ou l'oxygène
- 2 immergés dans le sublimé et la kanamycine
- 3 placés dans diverses conditions, empêchant ou favorisant la germination.

11) INFLUENCE DU VIDE ET DE L'OXYGENE

A) Action du vide

Expériences :

Un lot de tubercules est enfermé dans un récipient en verre, à fermeture étanche et dont le couvercle est muni d'un robinet sur lequel on adapte une pompe à vide ; un manomètre permet d'évaluer la pression atteinte. Nous vérifions chaque jour la pression qui règne dans le récipient.

Dans 3 récipients différents, où nous avons placé des tubercules nous amenons le vide à différentes valeurs : la première a une pression de 30 cm de mercure, la seconde à 50 cm et la troisième à 70 cm de mercure. Un lot témoin est placé dans un vase clos mais à l'intérieur duquel nous ne faisons pas le vide.

Résultats :

Nous avons effectué des numérations après 15 et 30 jours de ce traitement. Les résultats, qui correspondent, rappelons-le à la valeur moyenne des numérations effectuées à partir de 6 tubercules, sont rassemblés dans le tableau (2) ci-dessous.

Durée de l'expérience	Nombre de colonies par boîte	
	15 jours	30 jours
Témoin	28	35
Vide 30	24	61
Vide 50	11	47
Vide 70	59	192

Tableau (2)

11

Les résultats qui nous semblent vraiment significatifs sont ceux que nous avons obtenus pour les tubercules qui ont séjourné sous le vide le plus poussé (70 cm de Hg).

Nous pouvons interpréter ce résultat en disant que les tubercules placés sous ce vide sont pratiquement sans atmosphère gazeuse, ils s'asphyxient donc lentement et les tissus végétaux deviennent le centre de décompositions chimiques. Des molécules plus simples, comme les sucres prennent naissance, ce milieu devient alors extrêmement favorable à la multiplication des micro-organismes.

Nous pouvons également penser que les colonies observées sont dues à la multiplication de bactéries à tendance anaérobie, qui trouvent, sous un vide poussé des conditions favorables à leur développement.

B) Action de l'oxygène

Expérience :

Des tubercules sont enfermés dans un récipient en verre, clos hermétiquement. On fait passer un courant, lent mais continu, d'oxygène pendant un temps déterminé, à l'intérieur de ce récipient. Parallèlement des tubercules identiques (de même âge, de même grosseur) sont laissés en atmosphère normale et constituent le lot témoin.

Au bout d'un certain temps les deux lots ne présentent plus le même aspect. Les tubercules du lot témoin ont subi un début de germination, on observe des germes de 3 à 4 mm. On ne note aucun développement de bourgeons pour les tubercules placés en atmosphère

enrichie en oxygène.

Nos prélèvements sont réalisés à deux reprises : après 17 jours et 24 jours d'expérience. Ils aboutissent aux résultats présents dans le tableau (3).

Résultats

Durée de l'expérience		17 jours	24 jours
Nombre de colonies par boîte	Lot témoin	98	III
	Lot sous Oxygène	14	9

Tableau (3)

Ces résultats montrent nettement le rôle inhibiteur de l'oxygène : une atmosphère enrichie en oxygène provoque une diminution de la population bactérienne des tubercules.

Par conséquent, nous avons montré clairement que le vide et l'oxygène provoquent, sur le plan de la teneur en bactéries, des modifications contraires. La raréfaction de l'air favorise la multiplication des micro-organismes, l'atmosphère d'oxygène, au contraire, leur est défavorable.

III) IMMERSION DANS LE SUBLIME ET LA KANAMYCINE

A) Immersion dans le sublimé

Des expériences d'immersion dans le sublimé ont déjà été réalisées au laboratoire (2), nous les avons reprises en utilisant notre méthode de numération, pour apporter des précisions d'ordre quantitatif aux résultats déjà obtenus.

Expérience :

Les tubercules de la variété binjto, après la période de dormance, sont répartis en deux lots :

- 1 lot témoin ou normal, conservé à la température du laboratoire (25°).
- 1 lot qui, après lavage, est immergé dans du sublimé à 0,2 %.

Des prélèvements sont effectués le même jour à partir du lot témoin et du lot immergé, et ceci à différentes reprises.

Résultats :

Les numérations ont conduit aux résultats du tableau

4.

.../...

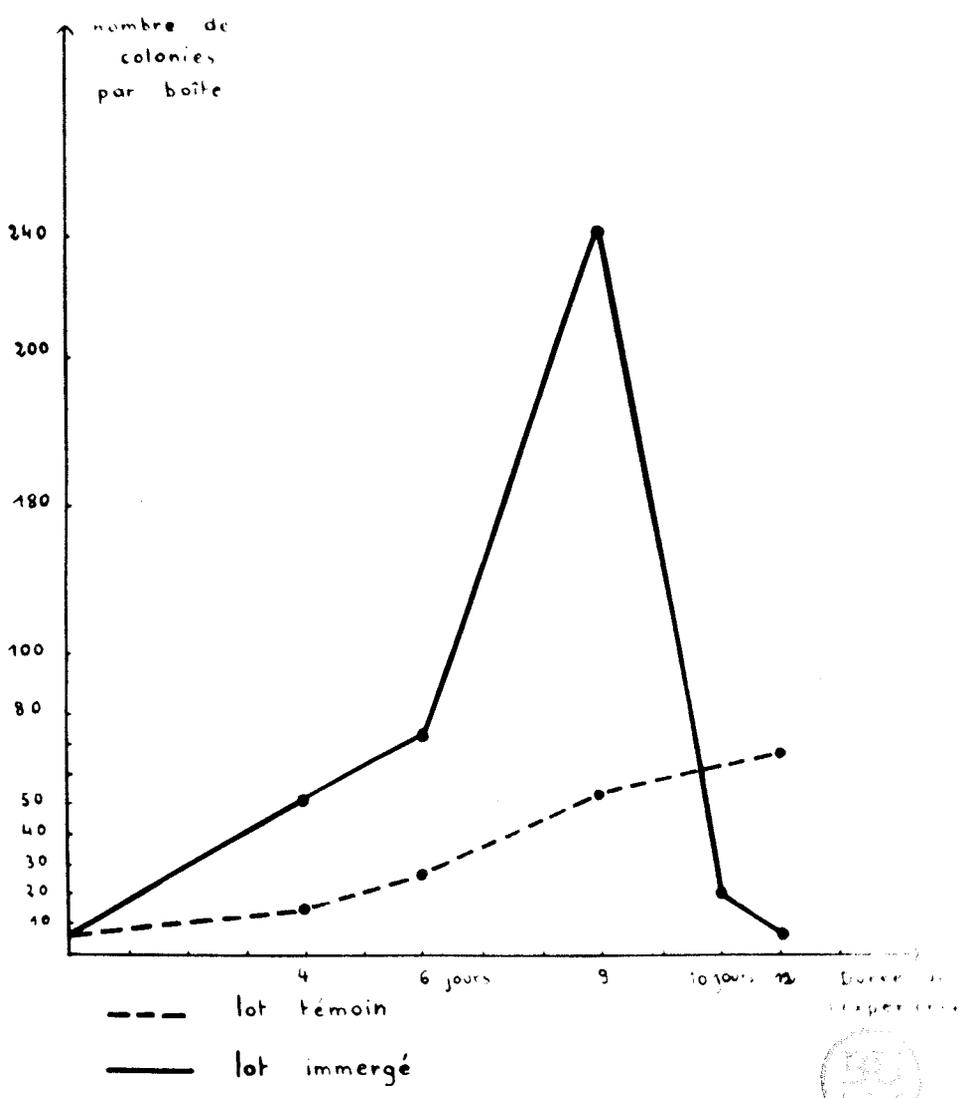
Durée de l'expérience en jours	0	4	6	9	11	12
Normales	6	15	27	53	64	67
Immergés		53	72	240	20	7

Tableau (4)

Ces différentes valeurs nous permettent de tracer les courbes de la page 15

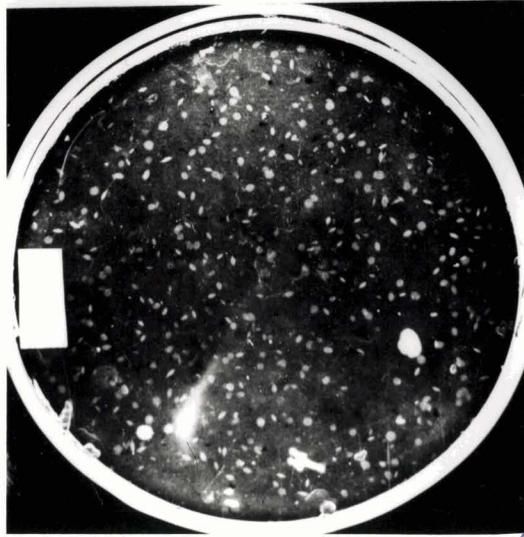
Pour les tubercules normaux, nous constatons une évolution de la population bactérienne, celle-ci passe de la valeur 6 (au début de l'expérience) à la valeur 67 (au douzième jour). Nous reprendrons d'ailleurs, dans la troisième partie de notre travail, l'étude des variations de la teneur en bactéries, constatées chez ces tubercules.

Chez les organes immergés la teneur en micro-organismes augmente lentement jusqu'au sixième jour puis elle s'élève rapidement pour atteindre une moyenne de 240, le 9^e jour. C'est là une valeur maximum qui se rencontre vers le neuvième ou dixième jour. A cette période les boîtes de Pétri, comme l'indique la photo p. 16 montre une remarquable densité des colonies. Mais cette grande teneur en micro-organismes est éphémère, à partir du onzième jour d'immersion la population bactérienne baisse considérablement, et elle n'est plus que de 20 pour tomber à 7 après 12 jours de traitement par le sublimé.

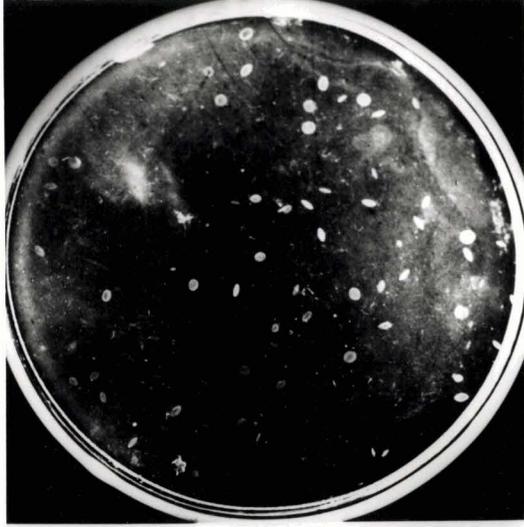


EVOLUTION DE LA POPULATION BACTERIENNE LORS DE L'IMMERSION DANS UN SUBLIME (8.1.27)





I



II

BU
LILLE

BU
LILLE

Colonies bactériennes provenant d'un même volume de :

I Tubercule immergé dans le sublimé

II Tubercule témoin, non immergé

Nous pouvons donc affirmer que l'immersion dans le sublimé, conduit au bout de quelques jours à une multiplication intense des micro-organismes.

Les résultats que nous avons obtenus en reprenant les travaux d'immersion de tubercules dans le sublimé, apparaissent intéressants à plusieurs titres :

- ils mettent en évidence, une nouvelle fois, la présence de bactéries dans les tubercules sans de pomme de terre. Les colonies bactériennes qui se développent ne peuvent provenir que des organes immergés, le milieu d'immersion étant rigoureusement stérile.

- nos résultats confirment, comme nous le montrerons ultérieurement, p 34 les conclusions obtenues dans un travail précédent (2).

- les expériences réalisées avec le sublimé seront mises en parallèle avec celles effectuées à partir de la kanamycine. Cette comparaison nous permettra d'interpréter les variations de population bactérienne, constatées chez les tubercules immergés.

B) Immersion dans la kanamycine

La solution "kanamycine" vendue dans le commerce correspond au sulfate de kanamycine isolé à partir d'une culture de streptomyces kanamycetus. Elle possède un large spectre antibactérien qui comprend la plupart des germes gram + et gram - : ce qui la rendait particulièrement propice pour nos travaux. Mais il fallait également s'assurer de sa pénétration dans les tubercules.

L'expérience que nous allons décrire a été réalisée en vue d'établir cette propriété.

Des tubercules sont immergés dans une solution de kanamycine. On prélève, à des intervalles de temps déterminés, un fragment d'organe. Celui-ci est déposé au centre d'une boîte de Pétri où se développe une culture bactérienne. On voit bientôt se former, autour des tissus végétaux prélevés, une zone d'inhibition dont l'extension varie avec le temps d'immersion. La kanamycine a donc pénétré à l'intérieur des organes végétaux et c'est elle qui, en diffusant dans la boîte de Pétri, détruit les bactéries qui s'y développaient normalement. Cette expérience permet donc d'établir :

- 1°) que la kanamycine pénètre à l'intérieur des tubercules.
- 2°) que cette pénétration est rapide.

Expérience :

Afin de connaître la teneur, en bactéries des tubercules qui vont être utilisés, on effectue des numérations à partir de 6 d'entre eux. Les autres sont immergés dans une solution de kanamycine à 0,02 %. La "Kanamycine" du commerce est présentée en flacon de 4 ml contenant l'équivalent de 1g de kanamycine-base. Ce volume est amené à 10 ml par addition d'eau distillé, 4 ml sont prélevés et ajoutés aux 2 litres d'eau distillé qui ont reçu les tubercules.

La teneur en bactéries de ces derniers est ensuite évaluée par des numérations qui seront faites à différents intervalles de temps. Celles-ci sont effectuées suivant la technique exposée, à la

différence que les tissus végétaux ne sont pas broyés immédiatement. Dès son prélèvement chaque explantat est introduit dans un tube contenant 70 cm³ d'eau distillée stérile. Il y séjourne 24 heures en étuve à 20°. Ce traitement a pour but d'éliminer la kanamycine qui imprègne les tissus et qui nuirait au développement des colonies en milieu solide. La méthode se déroule, ensuite, suivant la méthode classique.

Résultats :

Ils sont indiqués dans le tableau (5) et le graphique

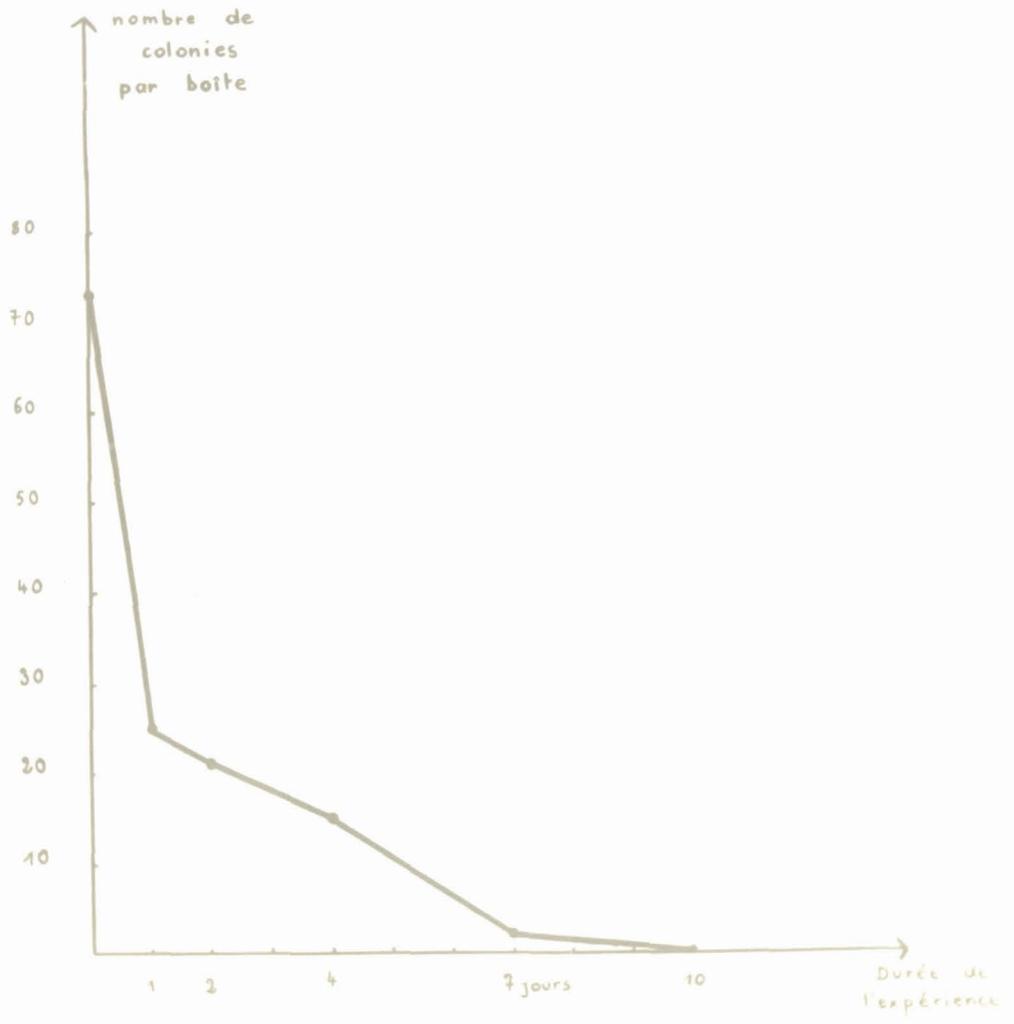
p. 20

Temps d'im- mersion	Nombre de colonies par boîte
0 jour (témoin)	74
1	26
2	21
4	15
7	2
10	0



Tableau (5)

La courbe obtenue est décroissante. Dès le premier jour d'immersion, les 2/3 des bactéries sont pratiquement détruites. Les trois jours suivants la teneur en micro-organismes paraît se



EVOLUTION DE LA POPULATION BACTERIENNE LORS DE L'IMMERSION DANS LA KANAMYCINE (à 0,02%)



stabiliser mais elle diminue à nouveau et s'annule vers le 10^e jour. Après ce temps d'immersion, il semble donc qu'il n'y ait plus aucune bactérie vivante dans les tubercules traités par la kanamycine.

En conclusion, nous pouvons retenir que la kanamycine ne favorise à aucun moment le développement des micro-organismes mais qu'elle provoque, au contraire, leur disparition rapide. Ces expériences d'immersion dans la kanamycine, réalisées pour la première fois au laboratoire permettent de mieux interpréter les résultats obtenus avec le sublimé.

C) Comparaison des résultats obtenus par immersion dans le sublimé et la kanamycine

Lors de ces deux expériences les tubercules sont placés dans un milieu liquide, leur respiration ne s'effectue plus normalement. Cette anaérobiose favorise l'hydrolyse de l'amidon et par suite la formation de glucides simples. Les tissus végétaux, riches en sucres, deviennent extrêmement favorables à la multiplication des micro-organismes. Cette interprétation est illustrée par l'augmentation du taux bactérien qui caractérise les dix premiers jours d'immersion dans le sublimé. Mais pourquoi ces résultats ne se retrouvent-ils pas dans l'expérience faite avec la kanamycine ? Nous savons que cette antibiotique pénètre efficacement et rapidement dans les tissus végétaux. Il faut donc admettre que la kanamycine a détruit un grand nombre de souches bactériennes, dès le premier jour d'immersion, sans leur laisser le temps de profiter de la richesse en sucres qui allait être celle des tubercules. Les bactéries qui survivent à 4 jours

de traitement appartiennent probablement à des souches plus résistantes.

Quoi qu'il en soit, après 10 jours d'immersion la teneur en bactéries des tubercules est pratiquement nulle. Avec le sublimé nous parvenons à cette disparition presque complète des micro-organismes, mais le phénomène se manifeste après un temps d'immersion plus long. Nous pouvons interpréter nos résultats relatifs au sublimé en disant que cet antiseptique ne pénètre que fort lentement à l'intérieur des cellules végétales : les micro-organismes restent vivants et profitent des conditions de vie extrêmement favorables qui règnent à l'intérieur des tubercules dès que leur asphyxie commence. La première partie de l'expérience rend compte de cette multiplication intense et rapide des bactéries. Dès que le sublimé gagne l'intérieur de l'organe, son pouvoir antiseptique se manifeste et nous retrouvons la même évolution que lors de l'immersion dans la kanamycine : le taux des bactéries baisse considérablement et tend à s'annuler.

La différence d'action entre le sublimé et la kanamycine s'expliquerait donc, avant tout, par leur vitesse de pénétration.

IV) RELATIONS ENTRE L'ÉVOLUTION DE LA POPULATION
BACTÉRIENNE ET LA GERMINATION DES TUBERCULES

Un travail précédent (1) fait état des relations existant entre l'évolution de la population bactérienne et le bourgeonnement (souvent appelé germination) des tubercules. lorsque nous avons retrouvé ce résultat, nous y avons fait allusion (p 14 : la teneur en bactéries d'un lot de tubercules placés dans des conditions normales n'est pas constante.

Nous avons repris ce problème par les méthodes que nous avons exposées, dans le but de préciser et éventuellement de confirmer les résultats acquis. Pour cette étude, nous avons choisi des tubercules de la variété Bintje. Ils proviennent d'un même lieu de culture, ils sont de taille homogène et correspondent ainsi à des âges physiologiques comparables. Au moment où nous avons commencé notre travail, ces organes n'étaient plus en état de dormance (qui est d'environ 40 jours pour cette variété).

Les tubercules ont été divisés en 4 lots :

- Lot I : lot témoin conservé à une température de 15°, n'ayant subi aucun traitement.

- Lot II : lot qui a reçu un inhibiteur de germination. Il est également conservé à 15°.

- Lot III : lot conservé à basse température soit 4° dans un réfrigérateur.

- Lot IV : lot conservé à basse température soit 4° et placé ensuite à une température normale de 15°. .../...

Nous prélevons toutes les semaines 6 tubercules à chaque lot, pour les soumettre à notre technique de numération. Nous allons étudier les résultats obtenus pour chacun des lots.

Lot 1 : Témoin :

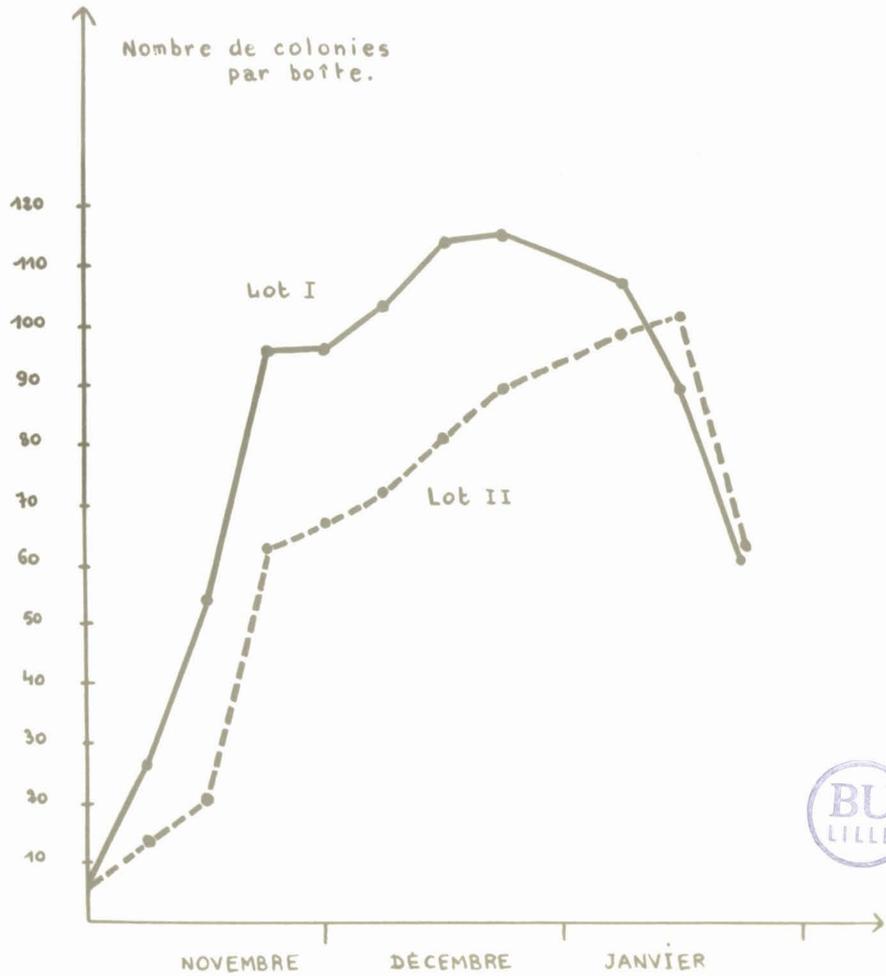
Dans ce cas les tubercules se développent dans des conditions normales de germination. En effet, dès la mi-novembre, ces organes donnent naissance à des bourgeons qui atteindront entre 3 et 4 cm au mois de Janvier. Nos expériences se placent pendant la période d'émission et de développement des bourgeons.

Les résultats des numérations effectuées du 30 Octobre au 20 Janvier, sont rassemblés dans le tableau suivant et sur le graphique de la page 25

Date des prélèvements	Nbre de colonies par boîte
30 Octobre	6
2 au 9 Novembre	26
9 au 16 Novembre	54
16 au 23 Novembre	96
23 au 30 Novembre	95
30 au 7 Décembre	103
7 au 14 Décembre	114
14 au 21 Décembre	115
28 au 6 Janvier	107
6 au 13 Janvier	89
13 au 20 Janvier	60

Tableau (6)

RELATIONS ENTRE L'ÉVOLUTION DES BACTÉRIES
HÉBERGÉES ET LA GERMINATION DES TUBERCULES



— Lot I : lot témoin, germination normale.
- - - Lot II : lot avec inhibiteur de germination.



Nous constatons que le nombre des bactéries s'accroît d'une façon importante, il passe de 6 à 95 pendant le mois de Novembre, pour atteindre un maximum de 115 en Décembre, cette valeur se conserve à peu près pendant tout ce mois. Mais, lors des derniers jours de Décembre, la densité des micro-organismes commence à décroître, ce phénomène se poursuit d'ailleurs en Janvier.

Il est donc démontré une seconde fois, et par une technique différente que c'est au mois de Décembre que, dans nos expériences, les tubercules sont les plus riches en bactéries. Cette conclusion est importante à différents points de vue. Elle peut être utilisée en micro-biologie alimentaire (fabrication de poudre de pomme de terre déshydratée) et surtout en physiologie végétale. Y a-t-il une corrélation entre cette évolution des bactéries et la germination des tubercules qui les hébergent ? Pour ce lot 1 les germes apparaissent vers la mi-novembre, tandis que le taux de bactéries ne se trouve multiplié par 20 qu'au début de décembre.

La multiplication des bactéries est donc un phénomène légèrement postérieur au bourgeonnement des tubercules.

En fin janvier certains bourgeons acquièrent de petites radicules, les organes tubérisés commencent à se flétrir, toutefois la germination est encore active. Parallèlement les numérations nous indiquent que la teneur en bactéries diminue progressivement. Elle n'est plus à cette époque que de 60.

La seule étude du lot 1 ne nous permet pas de préciser nettement les relations qui existeraient entre la germination des

tubercules et le taux de bactéries hébergées, cependant nous pouvons conclure que, de toute évidence, les micro-organismes ont réagi aux conditions physiologiques différents qu'ils ont trouvées successivement pendant ces trois mois, dans les organes qui les hébergeaient.

Lot 11 - Bourgeonnement inhibé chimiquement :

Ce lot est constitué par des tubercules traités le 5 Novembre et le 25 Novembre par un inhibiteur de germination : l'isopropyl phényl carbamate. Les tubercules ayant subi entre ces deux traitements un début de germination sont éliminés.

Les résultats des numérations sont indiqués dans le tableau (7) et le graphique page 25.

Date des prélèvements	Nbre de colonies par boîte
30 Octobre	6
2 au 9 Novembre	14
9 au 16 Novembre	21
16 au 23 Novembre	63
23 au 30 Novembre	67
30 au 7 Décembre	72
7 au 14 Décembre	81
14 au 21 Décembre	89
28 au 6 Janvier	97
6 au 13 Janvier	101
13 au 20 Janvier	62

tableau (7)

La teneur en bactéries, à partir d'une valeur initiale faible (6) au début de novembre s'élève à la valeur 101 au début de Janvier. Ici encore la population bactérienne a évolué dans le sens d'une augmentation. Cet accroissement est presque aussi important que pour le lot 1, il est toutefois plus étalé dans le temps, ce qui correspond à une vitesse de multiplication plus faible.

Cependant l'importance du peuplement bactérien ne peut être mise en parallèle avec l'émission des bourgeons puisque ceux-ci n'apparaissent pas. De plus le nombre de bactéries décroît comme dans le cas précédent, à partir de Janvier.

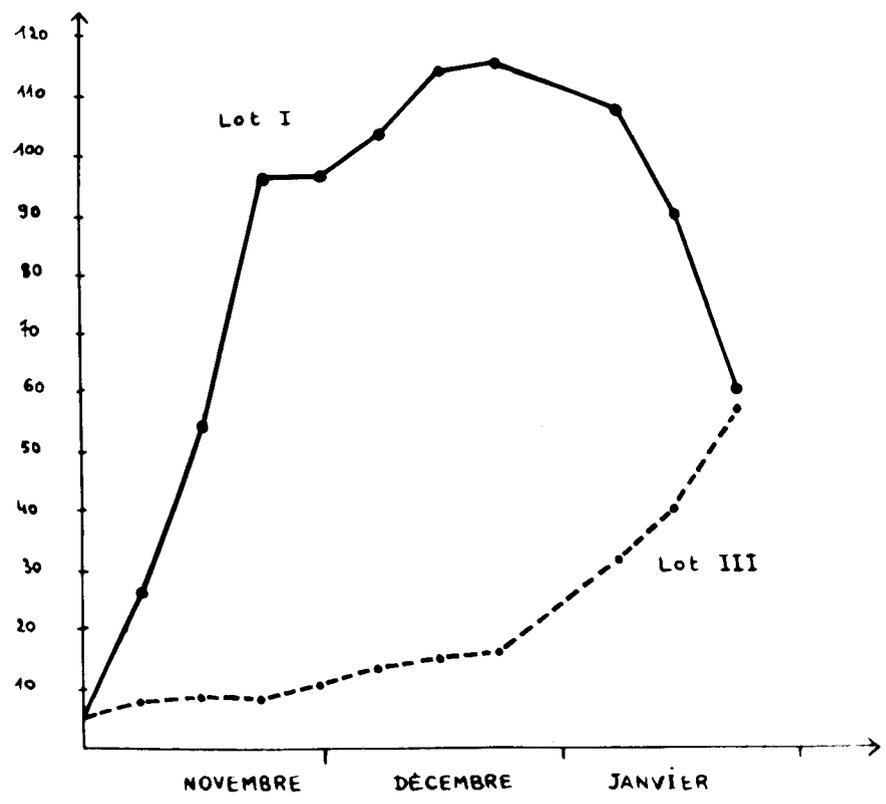
L'évolution des micro-organismes hébergés n'est donc pas en relation uniquement avec la "sortie" des bourgeons.

Lot III - Conservation continue au froid :

Les tubercules de ce lot sont conservés à 4° dans un réfrigérateur, pendant toute la durée de l'expérience. A basse température l'activité des cellules vivantes est réduite, le bourgeonnement ne se produit à aucun moment de nos expériences. Le tableau (8) ainsi que le graphique page 29 donnent les résultats des numérations.

RELATIONS ENTRE L'EVOLUTION DES BACTERIES
HEBERGEES ET LA GERMINATION DES TUBERCULES

Nombre de colonies
par boîte.



— Lot I : lot témoin, germination normale.
- - - Lot III : lot conservé à 4°.



Date des prélèvements	Nbre de colonies par boîte
30 Octobre	6
2 au 9 Novembre	5
9 au 16 Novembre	9
16 au 23 Novembre	8
23 au 30 Novembre	11
30 au 7 Décembre	14
7 au 14 Décembre	15
14 au 21 Décembre	16
28 au 6 Janvier	32
6 au 13 Janvier	41
13 au 20 Janvier	57

Tableau (8)

L'étude des résultats nous montre que le nombre de bactéries augmente très lentement au début, puis un peu plus rapidement pour se trouver multipliée par 10 (par rapport à la population initiale) au mois de Janvier.

Le froid n'a donc pas empêché l'apparition du phénomène que nous avons déjà constaté. La sortie des bourgeons ne s'observe pas cependant, l'évolution des bactéries a lieu avec une amplitude moins grande et un certain retard.

Lot IV - Germination retardée par le froid :

Comme le lot III, il est conservé à basse température (4°) ; les bactéries évoluent donc de la même façon jusqu'au 3 Janvier, date à laquelle le lot IV est ramené dans un local où la température est de 15°. Les tubercules se trouvent donc alors dans des conditions

normales de germination, et ceci avec un retard de 8 semaines par rapport au lot témoin. L'évolution de ces organes est spectaculaire : le bourgeonnement est intensif. Au bout d'une semaine du séjour à 15°, les germes atteignent déjà 5 ou 6 mm de longueur. Les numérations nous donnent les résultats suivants :

Date des prélèvements	Nbre de bactéries par boîte
30 Octobre	6
2 au 9 Novembre	5
9 au 16 Novembre	9
16 au 23 Novembre	8
23 au 30 Novembre	11
30 au 7 Décembre	14
7 au 14 Décembre	15
14 au 21 Décembre	16
28 au 6 Janvier	32
6 au 13 Janvier	110
13 au 20 Janvier	76

Tableau (9)



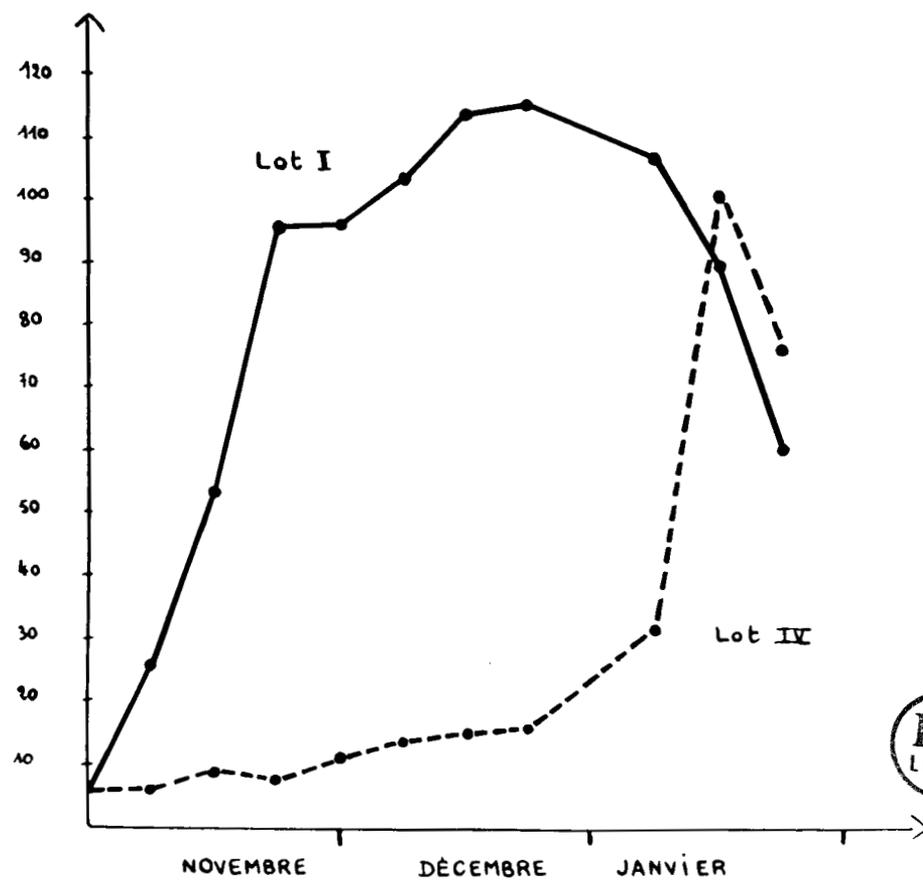
Ces chiffres sont reportés sur le graphique page 32

Nous constatons que la sortie du réfrigérateur provoque chez les tubercules, en même temps que le développement des germes, une augmentation très rapide de la population bactérienne. En une semaine celle-ci passe de 32 à 110, elle se trouve donc multipliée par 3,5. Le lot III resté à 4° a une population de 41 à la même époque. L'importante densité bactérienne relevée pour le lot IV ne dure pas et elle décroît brusquement lors de la 2^eme semaine qui suit la sortie du réfrigérateur, elle s'abaisse jusque 76.

La portion de courbe qui se traduit par une montée et une descente brusques, est donc équivalente à l'ensemble de la courbe

RELATIONS ENTRE L'ÉVOLUTION DES BACTÉRIES
HÉBERGÉES ET LA GERMINATION DES TUBERCULES

Nombre de colonies
par boîte.



— Lot I : lot témoin, germination normale.
- - - Lot IV : lot à germination retardée.



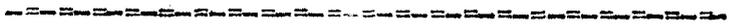
obtenue pour le lot I, l'évolution numérique des bactéries est identique dans les deux cas, mais elle s'effectue en 10 semaines pour le lot I et seulement en 15 jours pour le lot II.

Dans cette expérience de germination retardée, l'augmentation du nombre des bactéries hébergées s'effectue en même temps que la germination.

Il nous reste maintenant à coordonner les différents résultats : il faut noter d'ailleurs dès maintenant, à ce sujet, qu'ils confirment entièrement ceux qui ont été établis avant nous (1) par une autre méthode.

En considérant seulement l'étude des tubercules placés dans des conditions normales de germination nous constatons qu'il existe, au moins dans le temps, une relation entre le développement des bourgeons et l'accroissement du nombre des micro-organismes. Mais l'examen des résultats en germination inhibée (lot II et III) indique que l'évolution des bactéries n'est pas liée directement à la manifestation morphologique du bourgeonnement puisqu'elle s'effectue quand même dans les organes qui ne bourgeonnent pas. La germination des tubercules est la résultante d'un équilibre entre de nombreux facteurs, la multiplication des bactéries pourrait être l'un d'entre eux, qui permettrait ensuite le déclenchement d'un mécanisme comportant évidemment plusieurs phases. Parmi celles-ci l'une serait bloquée par l'isopropyl phényl carbamate et l'émission de bourgeons ne se produirait donc pas.

V - COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS PAR LA
METHODE DES TUBES POLLUES ET LA METHODE DE
NUMERATION EN MILIEU SOLIDE



Notre travail ayant été entrepris, en partie pour reprendre et préciser certaines conclusions déjà obtenues par une autre technique, il était indispensable de comparer les résultats acquis par l'une et l'autre de ces deux méthodes. Nous l'avons fait dans deux cas précis :

- expériences d'immersion dans le sublimé.
- germination des tubercules placés dans des conditions normales.

Bien sûr une comparaison rigoureuse ne saurait se comprendre puisque les expériences se sont faites à un an ou plus d'intervalle et que, dans ces conditions les tubercules mis en parallèle ne sont semblables ni par leur âge, ni par leur état physiologique.

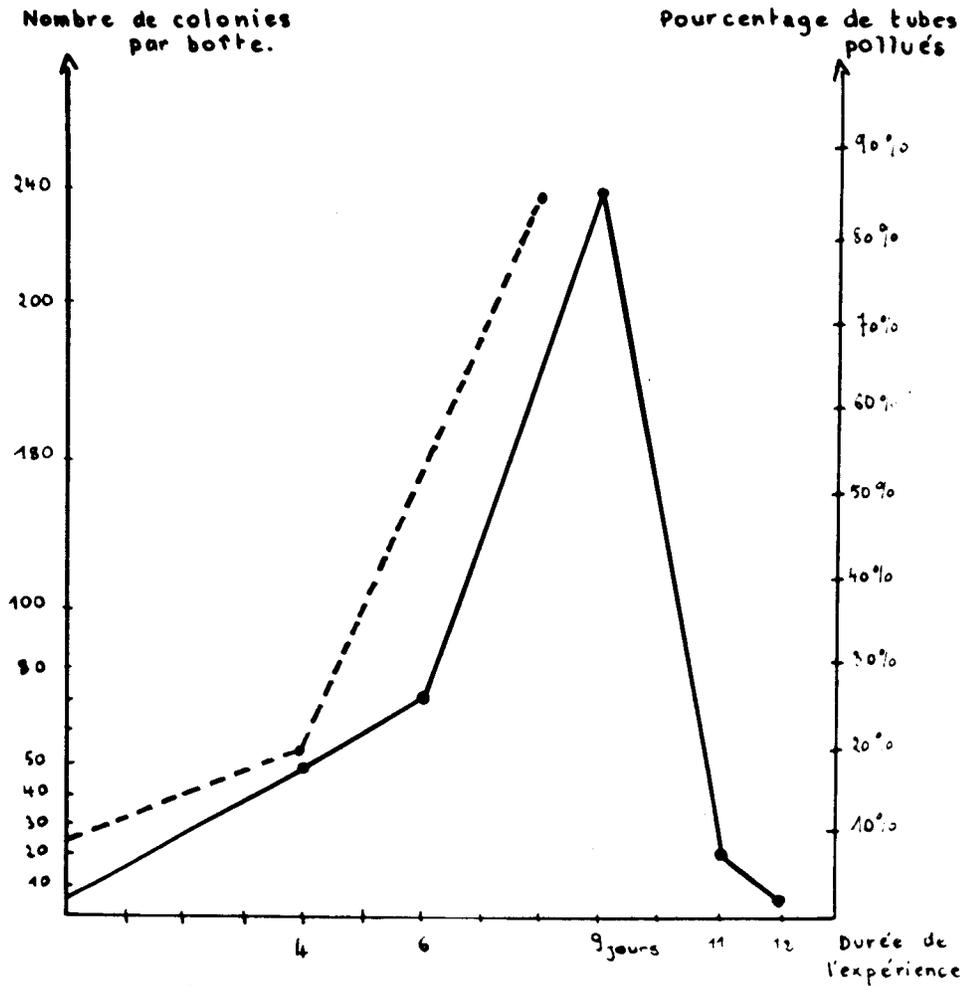
Les facteurs externes (en particulier la température ambiante) ne sont pas les mêmes non plus.

I - Expérience d'immersion dans le sublimé

Les graphiques comparatifs figurent page 35

Nous avons choisi les échelles d'ordonnée de telle façon que les valeurs maximales obtenues par les 2 méthodes se correspondent. Nous constatons, dans les deux cas, que le nombre de bactéries augmente lentement lors des

COMPARAISON GRAPHIQUE DES RÉSULTATS DONNÉS PAR LA
METHODE DES TUBES POLLUÉS ET LA NUMÉRATION DES
COLONIES EN MILIEU SOLIDE



--- Méthode des tubes pollués.
— Numération des colonies en milieu solide.

ÉVOLUTION DE LA POPULATION BACTÉRIENNE LORS DE
L'IMMERSION DANS LE SUBLIMÉ (à 0,2%)



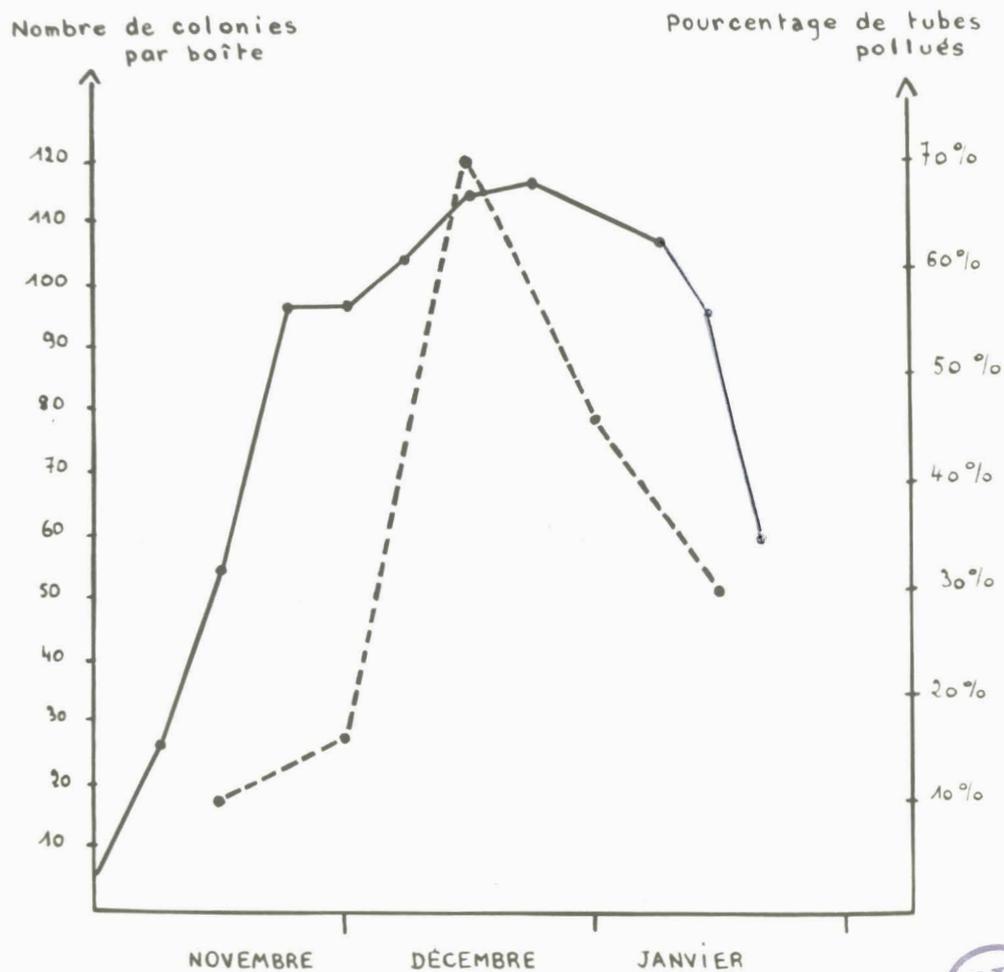
premiers jours d'immersion et qu'il s'élève brusquement pour atteindre un maximum vers le 8ème ou 9ème jour. Sur le graphique nous avons volontairement fait coïncider ces valeurs maximales : nous constatons, dans ces conditions, que les 2 courbes sont très voisines pendant toute la première partie des expériences (augmentation de la teneur en bactéries). Nous ne possédons pas de valeurs comparatives montrant la diminution de la population bactérienne, par la méthode des tubes pollués. Nous pouvons toutefois, nous semble-t-il conclure que les résultats acquis par cette méthode se trouvent confirmés par l'emploi de notre technique de numération.

II - Germination des tubercules placés dans des conditions normales

Nous avons utilisé les mêmes procédés graphiques (page 37 que précédemment c'est-à-dire que les échellés ont été choisies de telle sorte que les valeurs maximales coïncident. Cette remarque étant faite, nous constatons que l'allure générale des 2 courbes est identique. Il existe même une correspondance assez précise puisque, au début et surtout en fin d'expérience, les 2 courbes sont très voisines l'une de l'autre.

En conclusion, les résultats acquis par la méthode des tubes pollués se trouvent pleinement vérifiés par ceux obtenus par notre technique de numération des

COMPARAISON GRAPHIQUE DES RESULTATS DONNES PAR LA
METHODE DES TUBES POLLUES ET LA NUMERATION DES
COLONIES EN MILIEU SOLIDE.



EVOLUTION DES BACTÉRIES HÉBERGÉES PAR LES
TUBERCULES EN GERMINATION NORMALE.

----- Méthode des tubes pollués.
———— Numération des colonies en milieu solide



bactéries en milieu solide. Cette concordance des résultats est importante puisqu'elle permet de donner de la valeur à tous les résultats acquis précédemment par la méthode des tubes pollués (comparaison des variétés, tubercules d'origine différentes, culture de variétés différentes dans un même sol).

C O N C L U S I O N S

La méthode de numération des bactéries en milieu solide que nous avons exposée et mise au point permet de tirer les conclusions suivantes :

- 1) La population bactérienne s'accroît chez les tubercules ayant séjourné sous un vide poussé (70 cm de Hg)
- 2) L'atmosphère enrichie en oxygène (courant lent mais continu) inhibe le développement des micro-organismes.
- 3) L'immersion dans le sublimé (chlorure mercurique à 0,2%) favorise le développement bactérien jusqu'au dixième jour, au delà les micro-organismes sont détruits.
- 4) L'immersion dans la kanamycine provoque la disparition rapide des bactéries à l'intérieur des tubercules immergés.
- 5) Le bourgeonnement des tubercules se produit en même temps que l'augmentation de la population bactérienne, celle-ci ne dépend pas de la sortie des bourgeons puisqu'elle a encore lieu, mais avec un certain retard, lorsque la germination est inhibée artificiellement (par le froid ou par l'isopropyl-phényl carbamate).
- 6) Nos résultats permettent de considérer comme valable la méthode de numération par comptage des tubes pollués (utilisée dans des travaux antérieurs).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- I) BLONDEAU R. Contribution à l'étude des bactéries présentes dans les tubercules sains de pomme de terre.
D.E.S LILLE 1963
- 2) DUBOIS J. Activité, répartition et évolution des bactéries présentes dans les tubercules sains de pomme de terre.
D.E.S LILLE 1962

PLAN DU MEMOIRE

Introduction	P.1
Technique de numération	P.3
Influence du vide et de l'oxygène	P.10
Immersion dans le sublimé	P. 13
— dans la kanamycine	P. 17
Relations entre l'évolution de la population bactérienne et la germination des tubercules	P.23
Comparaison de nos résultats et des résultats obtenus antérieurement	P.34
Conclusions	P. 39
Références bibliographiques	P. 40

