

Comptage par épifluorescence des bactéries du rumen, cultivées *in vitro*. Estimation de leur état physiologique

S. PRÉVOT, M. SENHAJI, J. BOHATIER, J. SÉNAUD

*Groupe de Zoologie et Protistologie, UA CNRS 138,
Complexe scientifique des Cézéaux, B.P. 45, 63170 Aubière, France.*

Summary. Acridine orange dye molecule used for direct count of fluorescent bacteria gave an estimate of microflora biomass and physiological state.

Dans le but d'étudier les variations quantitatives de la microflore de la phase liquide d'un fermenteur artificiel (Rusitec), nous avons adapté une technique, démontrée fiable, couramment utilisée dans d'autres domaines (voir revue dans Delattre, 1986) mais nouvelle pour le biotope Rumen, consistant à marquer les bactéries par un fluorochrome, l'acridine orange (AO), et à les dénombrer directement en microscopie à fluorescence. Les complexes acide nucléique-AO fluorescent de façon différente suivant leur nature (simplex = fluorescence rouge, duplex = fluorescence verte) (Löber, 1981). Afin de préciser la signification physiologique de cette différence, nous avons contrôlé la fluorescence des bactéries au cours des différentes phases de développement d'une culture et couplé cette observation avec le dosage des nucléotides adényliques présents, indicateurs de l'état énergétique des cellules.

Matériel et méthodes. L'inoculum est prélevé 1 h après le repas sur un Mouton fistulé à flore conventionnelle, recevant une ration journalière de 1,1 kg de dactyle jeune et 200 g de luzerne déshydratée, paille et maïs agglomérés. Des dilutions croissantes sont effectuées en anaérobiose dans du milieu de Bryant et Burkey (1953) contenant du glucose, du cellbiose et de l'amidon comme substrats énergétiques (*). Les tubes de dilution 10^{-5} sont incubés à 39 °C et leur DO est lue à 620 nm. Aux temps choisis, des prélèvements sont effectués pour le comptage sur filtre des bactéries colorées (1 ml de solution d'AO à 2 % + 1 ml d'échantillon à une dilution appropriée, l'échantillon se composant de 1 volume de la culture bactérienne pour 1 volume de formol à 4 %) (Jones, 1974), et pour le dosage des nucléotides adényliques par bioluminescence, après extraction au DMSO (Strehler et Totter, 1952).

Résultats et discussion. Le nombre de bactéries comptées par épifluorescence, qui correspond à un dénombrement de la microflore totale et non aux seuls germes viables, augmente naturellement en fonction du temps comme la DO (fig. 1). Cependant, les populations rouge et verte évoluent de manière différente (fig. 2). En phase stationnaire (16-20 h), les bactéries vertes sont dominantes (90 % de l'effectif total) et ce phénomène correspond aux maximum d'AMP, au minimum d'ATP et à une charge énergétique $CE = (ATP + 1/2 ADP) / \Sigma AXP$ (Atkinson, 1968) très faible (fig. 3). Par opposition, en fin de phase exponentielle (11-14 h), la dominance de la population rouge est très nette (85 % de l'effectif total) et on a simultanément un maximum d'ATP et une CE élevée. Il est logique d'en déduire que les bactéries rouges sont celles qui ont une activité métabolique importante et que leur coloration est due à une forte accumulation d'acides nucléiques simplex (principalement ARNm et r), masquant

(*) Nous remercions pour son aide G. Fonty (Microbiologie, I.N.R.A., Theix).

la fluorescence verte du complexe ADN-AO. Celle-ci n'apparaît que dans les bactéries « au repos », pauvres en ARN. Les deux principaux types morphologiques bactériens suivent une évolution identique, les coques étant toujours plus nombreux que les bacilles (fig. 4).

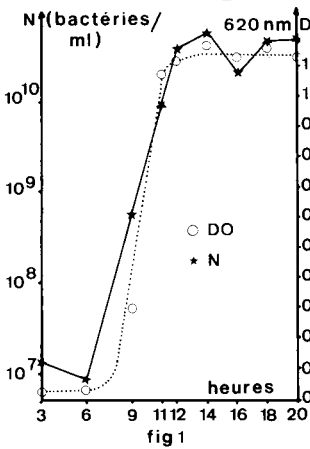


fig 1

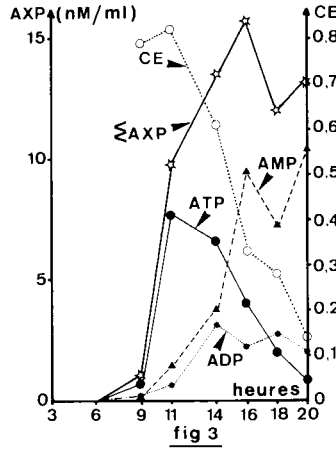


fig 2

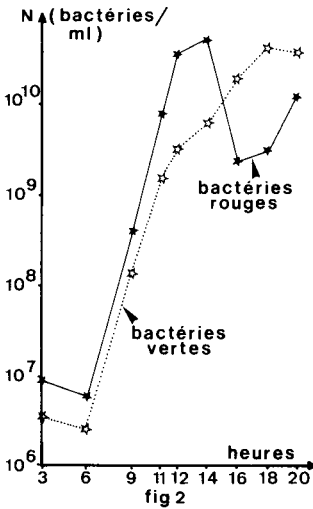


fig 3

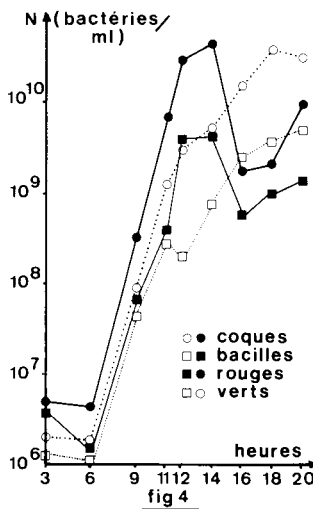


fig 4

Evolution au cours du temps des différents paramètres étudiés : comparaison entre DO à 620 nm et somme totale N des bactéries comptées (FIG. 1) ; distribution des populations rouge et verte (FIG. 2) ; dosage des différents nucléotides adényliques (FIG. 3) ; types morphologiques dominant (FIG. 4).

Conclusion. La technique de comptage par épifluorescence se révèle une bonne méthode pour l'étude quantitative *in vitro* des bactéries du Rumen. Elle permet non seulement l'observation des variations de ces populations au cours du temps, mais encore une estimation de leur état physiologique suivant la coloration dominante (rouge ou verte). D'une pratique aisée, elle paraît de ce fait intéressante en expérimentation de routine dans des écosystèmes relativement homogènes, comme la phase liquide du fermenteur Rusitec.

- Atkinson D. E., 1968. *Biochemistry*, **7**, 4030-4034.
 Bryant M. P., Burkey L. A., 1953. *J. Dairy Sci.*, **36**, 205-217.
 Delattre J. M., 1986. *J. fr. Hydrobiol.*, **17**, 59-70.
 Jones G., 1974. *Limnol. Océanog.*, **19**, 540-543.
 Löber G., 1981. *J. Luminescence*, **22**, 221-265.
 Strehler B. L., Totter J. R., 1952. *Arch. Bioch. Bioph.*, **40**, 28-41.