Cellule de Malassez

MT13287
MT13288

Description du Produit

1. Introduction

Cette technique permet d'évaluer la concentration cellulaire d'une suspension de levure à un instant donné : elle va permettre de suivre l'évolution d'une population d'une souche de levure en fonction de différents paramètres définis par l'expérimentateur. On aborde ainsi les problèmes de la croissance des populations.

Composition :

- cellule de Malassez simple (MT13287) ou double (MT13288)
- lamelles carrées rodées

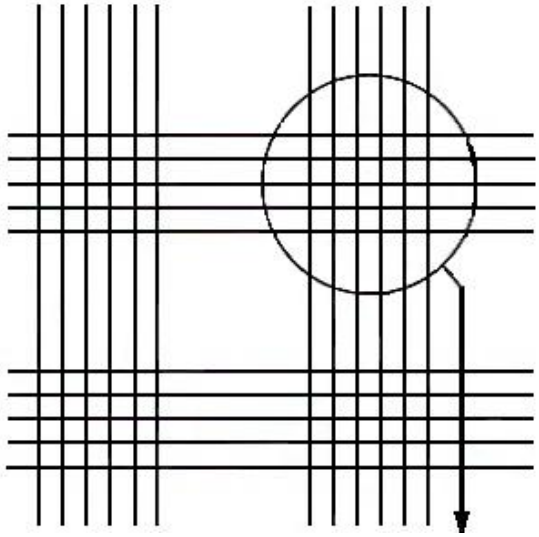
Environnement nécessaire :

- microscope (grossissement 500x nécessaire)
- pipettes de 1 et 10 ml
- plusieurs tubes à essai

2. Utilisation de la Cellule de Malassez

2.1 Description

La cellule possède 25 rectangles composés chacun de 20 carrés :



1 rectangle

1 1 carré	2	3	4	5
6	7	8	9	10
11	12	13	14	15
16	17	18	19	20

2.2 Description

Chaque carré élémentaire a 1/20 mm de côté, soit une surface de 1/400 mm². Chaque rectangle correspond à 1/20 mm². L'écartement entre la lamelle et la lame est de 1/5 mm par construction (profondeur).

- profondeur — 1/5 mm
- surface d'un carré — 1/20 x 1/20 = 1/4000 mm²
- volume du parallélépipède — 1/5 x 1/400 = 1/2000 mm^3
- 1 rectangle — 4 x 5 = 20 carrés
- volume du parallélépipède correspondant — 20 x 1/2000 = 1/100 mm^3
- volume de la cellule — 25 x 1/1000 = 0,25 mm^3

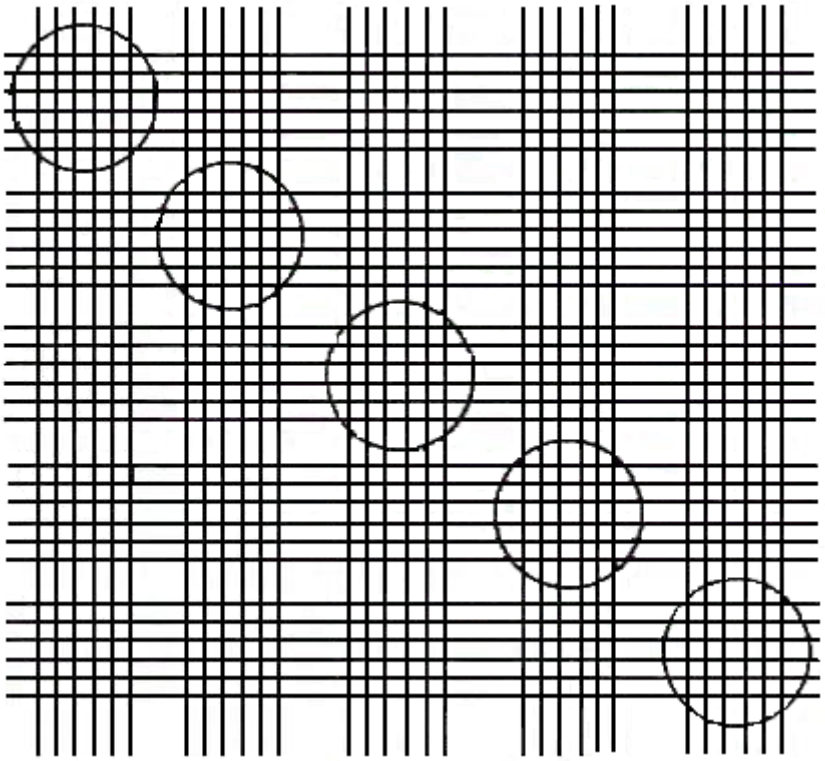
2.3 Mode opératoire

- Agiter la suspension de levures pour la rendre plus homogène
- Prélever à la pipette 1 ml de suspension et déposer rapidement (afin d'éviter toute sédimentation) une goutte sur la cellule de Malassez
- Recouvrir d'une lamelle rigide que l'on pose fermement contre les deux zones de support de la cellule

La combinaison oculaire - objectif doit réaliser un grossissement d'environ 500 fois, de sorte que l'on voit entièrement dans le champ un rectangle de cellule composé de 20 carré pour la cellule de Malassez.

Amener dans le champ microscopique un rectangle composé de 20 carrés et compter les cellules qui s'y trouvent.

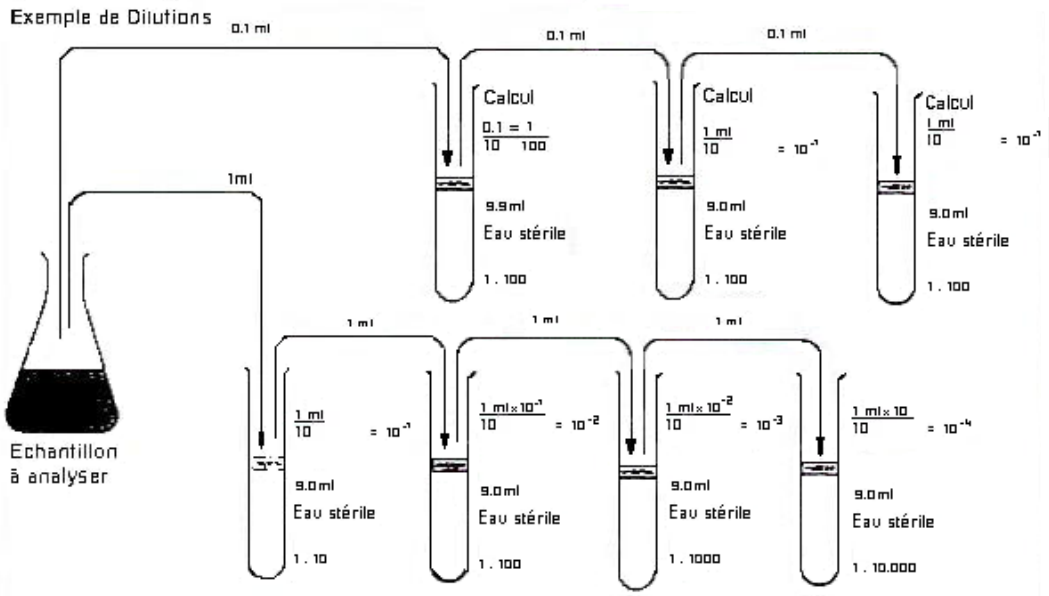
Opérer ainsi pour 5 rectangles disposés en diagonale dans la cellule de Malassez, et prendre la moyenne des résultats.



Exemple :
Nombre de cellules comptées : 234

Résultats :
Nombre de cellules / mm^3 (234/5) x 100 = 4860
Nombre de cellules par ml : $4,7 . 10^6$

Remarque :
Si la concentration en levures est trop élevée (plus de 200 cellules par champ), on fera au préalable une dilution au 1/10 ou au 1/100 si nécessaire en prenant soin d'éviter les erreurs dues à la sédimentation.



3. Utilisation Pédagogique

3.1 Coloration au bleu de méthylène

La méthode a pour but de fournir une estimation du pourcentage de cellules vivantes présentes dans un échantillon de levure.

Principe de la méthode :
Les cellules viables contiennent des enzymes qui sont capables de réduire le bleu de méthylène en un composé sans couleur. Lorsque les cellules sont immergées dans le bleu de méthylène qui pénètre à l'intérieur des cellules, les enzymes des cellules vivantes décolorent le bleu de méthylène. Les cellules mortes, dans lesquelles les enzymes sont inactivés ne le décolorent pas et ainsi se colorent en bleu. Le pourcentage de cellules non colorées est ainsi une mesure de viabilité.

Mode opératoire :
Mélanger la solution colorée avec un volume égal de suspension de l'échantillon de levure sur la lame du microscope. La concentration cellulaire sera telle que l'on ait 40 à 60 cellules par champ de microscope.

Expression des résultats :
Exprimer la viabilité comme le pourcentage de cellules non colorées.

Remarque :
Cette manipulation simple met en évidence, que dans un cube de levure fraîche, on peut avoir jusqu'à 50% de cellules mortes. En conséquence, le prélèvement des levures dans un cube, doit se faire par petits prélèvements effectués à des endroits différents…

3.2 Étude de la croissance

3.2.1 Le temps de génération

C'est l'intervalle de temps entre deux divisions successives ou celui nécessaire au doublement de population

$G = t/n$
t = temps connu
n = nombre de divisions

Il est possible de déterminer le temps de génération de façon graphique :
* soit sur une courbe $y = f(t)$
* soit sur une courbe $\text{Log } y = f(t)$ en coordonnées semi-logarithmiques

3.2.2 Le taux de croissance

C'est le nombre de divisions par unité de temps, c'est l'inverse du temps de génération

$T = n/t$
n = nombre de divisons
t = temps

3.2.3 construction d'une courbe de croissance

Un milieu de culture est inoculé par une pré culture sur le même milieu dans le rapport 1/10 ou 1/20. Immédiatement, un prélèvement est effectué et le comptage est effectué.
Le temps $t = 0$ est noté. Des prélèvements sont ensuite réalisés toutes les 1 ou 2 heures selon la rapidité du développement. Les comptages sont effectués. Penser à diluer lorsque le nombre de cellules devient trop important.

Il est intéressant d'étudier la croissance en milieu synthétique + sucre.
Les courbes nombre de cellules en fonction du temps peuvent être tracées : les paramètres de la croissance G et T peuvent alors être déterminés ainsi qu'il l'a été indiqué.
Lorsque l'examen de la courbe de croissance montre que la phase stationnaire est atteinte, il est possible de calculer les rendements de croissance. Le nombre maximal de cellules obtenu permet alors de calculer la production cellulaire en fin de croissance et de calculer les rendements par rapport à la quantité de sucre fournie (à condition que le sucre soit le seul facteur limitant de la croissance).

R = nombre de cellules / mg de sucre

3.2.4 Calcul précis des rendements de croissance

Ils sont déterminés de la façon suivante :
Une série d'erlens contenant 10 ml de milieu synthétique avec une concentration croissante de sucre (0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1,0 ; 1,25 ; 1,50 ; 1,75 ; 2,0 ; 2,5 % en concentration finale) sont préparés et ensemencés par 0,1 ml de pré culture sur le même milieu. Après une culture dans les conditions les plus favorables, une mesure de croissance est réalisée par comptage, une deuxième mesure est réalisée 12 heures après, de façon à contrôler que la croissance est terminée.

La courbe comptage = f (c) est tracée (c = concentration en sucre)

Elle permet de déterminer la concentration à partir de laquelle le sucre devient facteur limitant (zone à partir de laquelle il n'y a plus proportionnalité entre croissance et concentration).
La pente de la partie proportionnelle donne le rendement de la croissance.

Remarque :
La mesure de la densité optique de la solution est une autre technique d'évaluation…

3.2.5 Analyse d'une courbe de croissance

En milieu non renouvelé, une culture microbienne à une courbe de croissance caractérisée par 4 phases essentielles :

1. La phase de latence

Après ensemencement, le développement n'est pas immédiat. Il faut attendre quelques heures avant le début de la croissance. Cela traduit l'application des micro-organismes au milieu. Si les conditions psysico-chimiques ne conviennent pas, il n'y a pas de développement. Par contre, plus ces conditions sont proches des conditions optimales de développement d'un micro-organisme donné, plus la croissance démarrera rapidement. L'âge, l'état physiologique des micro-organismes joue aussi sur cette phase de latence.

2. La phase exponentielle

C'est la phase de multiplication des micro-organismes. Le taux de croissance est au maximum et constant. Cette phase dure quelques heures.

3. La phase stationnaire

Il y a accumulation de déchets, les substances nutritives diminuent et il suffit qu'un élément essentiel pour le développement des micro-organismes soit épuisé, pour que la croissance cesse. Le nombre de cellules viables reste constant.

4. La phase de déclin

C'est la phase de mortalité des cellules. Beaucoup sont autolysées par les enzymes qu'elles libèrent. Quelquefois, des cellules peuvent recommencer à se développer en utilisant les réserves nutritives libérées par les cellules détruites.
Ces différentes phases sont variables selon les espèces microbiennes, et selon les conditions physico-chimiques du milieu.

DIDACTIK - PIERRON Éducation - CS 80609 RÉMELFING - **57206 SARREGUEMINES CEDEX**
Tél. : 03 87 95 14 77 **Fax** : 03 87 98 45 91 E-mail : **education-france@pierron.fr** - http://**www.pierron.com**