

# **TRAVAUX PRATIQUE DE METABOLISME ET ECOLOGIE MICROBIENNE BIOS 367**

## **PARTIE : ECOLOGIE MICROBIENNE**

**Proposition du Laboratoire de Microbiologie des Sols (Novembre 2019)  
(Responsable : NWAGA Dieudonné)**

### **SOMMAIRE**

**TP n°1 : Facteurs abiotiques et interactions plantes-microorganismes du sol**

**TP n°2 : Facteurs biotiques et interactions plantes-microorganismes du sol**

**TP n°3 : Mise en évidence et observation des microorganismes (endophytes, bactéries fixatrices d'azote et champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA))**

**TP n°4 : Isolement et caractérisation des microorganismes bénéfiques des plantes**

**TP n°5 : Caractérisation générale des isolats de microorganismes du sol et des plantes**

## **TP N°1 :**

### **FACTEURS ABIOTIQUES ET INTERACTIONS PLANTES-MICROORGANISMES DU SOL**

#### **OBJECTIFS :**

S'initier à l'analyse des facteurs abiotiques qui peuvent influencer les interactions plantes-microorganismes du sol.

#### **Consignes de travail et de sécurité :**

- Se munir d'une tenue de champ,
- Porter des bottes,
- Apporter des lames, flacons 20-50 ml) avec bouchon,
- Un appareil photo

#### **Mise en évidence des facteurs abiotiques :**

- Types de sol, couleur des sols
- Texture des sols : sableuse, argileuse, limoneuse
- Structure des sols : en agrégats, meubles, grumeleuses
- Acidité du sol
- Prélèvement des sols
- Carences minérales et effets du déficit en eau

#### **Résultats attendus :**

- Savoir prélever un échantillon d'un sol pour l'écologie microbienne
- Savoir déterminer la structure, la texture et la couleur d'un sol
- Savoir déterminer certains facteurs écologiques du sol (pH, nutriments, microbiome).

## **TP N°2 :**

### **FACTEURS BIOTIQUES ET INTERACTIONS**

#### **PLANTES-MICROORGANISMES DU SOL**

##### **OBJECTIFS :**

S'initier à l'analyse des facteurs biotiques qui peuvent influencer les interactions plantes-microorganismes du sol.

##### **Mise en évidence des facteurs biotiques :**

- Interactions bénéfiques: rhizosphère, endophytes, symbioses fixatrices d'azote (légumineuse-rhizobia), symbioses mycorhiziennes (plante-champignons mycorhiziens) ;
- Interactions délétères : maladies des plantes (observation des symptômes ou des carences)
- Effet des microorganismes bénéfiques sur les plantes ou le sol

##### **Activités :**

Prélever des nodosités racinaires de légumineuses (au moins 4 à 12), après une coupe observer la présence de leghémoglobine (présence de bactéries fixatrice d'azote) et conserver ces nodules pour l'isolement sur milieu nutritif en boîte de Pétri. Prélever au moins 30-60 fragments de racines fines et conserver dans un flacon contenant de l'alcool 60° pour coloration et observation microscopique des champignons (pathogènes ou symbiotiques).

##### **Résultats attendus :**

- apprendre à reconnaître une symbiose ;
- apprendre à reconnaître certaines maladies causées par les microorganismes délétères ;
- apprécier l'effet des microorganismes bénéfiques sur le développement des plantes.

## **TP N°3 :**

### **MISE EN EVIDENCE ET OBSERVATION DES MICROORGANISMES (ENDOPHYTES, BACTERIES FIXATRICES D'AZOTE ET CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS ARBUSCULAIRES (CMA))**

#### **OBJECTIFS :**

Se familiariser avec l'isolement et l'observation microscopique des microorganismes des racines ou nodosités des plantes après colorations (Gram pour les bactéries fixatrices d'azote, fuchsine acide ou bleu pour les champignons mycorhiziens).

#### **Matériels et réactifs :**

Racines de 1 à 2 cm; tube à essais ; KOH 10% ; HCl 1% ; fuchsine acide 0,05 % ; acide lactique (acétique)- glycérol-eau (4-1-1); tamis ; microscopes

#### **Modes opératoires :**

##### **1-Colonisation racinaire des CMA:**

- découper les racines récoltées puis lavées à l'eau de robinet,
- éclaircir les racines dans le KOH 10 % pendant 30 mn à 90 °C au bain-marie;
- laver les racines 3 fois à l'eau de robinet à intervalles de 1 min;
- acidifier les racines dans du HCl à 1% pendant 1h min à température ambiante ;
- ajouter le colorant (fuchsine acide 0,05 %), puis mettre au bain marie 30 min à 90°C ;
- décolorer avec la solution d'acide lactique-glycérol-eau (4-1-1) pendant 24h au moins ;
- observer au microscope au grossissement 100 à 400.

##### **2-Coloration des bactéroïdes localisés dans les nodosités racinaires :**

- laver les nodosités à l'eau du robinet, puis les découper en deux parties
- broyer ces nodules dans une goutte d'eau stérile et
- étaler ce broyat sur une lame propre, puis sécher cette préparation
- ensuite faire une coloration de Gram
- observer cette préparation au microscope au grossissement 400 à 1000 à l'aide de l'huile à immersion

## TP N°4 :

### ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES MICROORGANISMES BENEFIQUES DES PLANTES

#### OBJECTIFS :

Se familiariser avec les méthodes d'isolement des microorganismes bénéfiques des plantes

#### Matériels et réactifs :

Nodules frais, boîtes de Pétri, anse de platine, incubateur, pilon, mortier, eau distillée, pH mètre, tube à essais, micropipettes, milieu Yeast extract Mannitol Agar (YMA) (Vincent, 1970); milieu Potato Dextrose Agar (PDA), eau distillée stérile, chlorure de mercure (0,1%), l'hypochlorite de sodium de 0,8-1,6%Cl (4-8%) (eau de javel), Alcool 70-90°.

#### Collecte des nodules et des racines :

- creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm de profondeur dans le sol afin de récupérer tout l'appareil racinaire et extraire la plante sans l'abimer ;
- retirer ensuite délicatement le sol entourant les racines avec les mains sans endommager les nodules ;
- placer les nodules dans des sachets en plastique
- répéter l'opération plusieurs fois sur plusieurs pieds pour avoir le maximum de nodules ;
- les transporter immédiatement au laboratoire

#### Désinfection des nodules

Les nodosités racinaires récoltées sont lavées à l'eau du robinet, puis :

**Protocole 1)**-rincées dans du chlorure de mercure 0,1% 30 s, ensuite rincées abondamment dans 10 fois dans de l'eau distillée stérile avant de les broyer dans une goutte d'eau distillée stérile,

**Protocole 2)**-rincées dans l'hypochlorite de sodium dilué (4-8%) pendant 5-10 min puis dans l'éthanol à 70°, 5 min. Enfin, les nodosités sont rincées 10 fois à l'eau distillée stérile, avant de les broyer dans une goutte d'eau distillée stérile.

## **Modes opératoires :**

### **Isolement des rhizobia par écrasement des nodosités (Vincent 1970):**

- écraser les nodules stériles individuellement dans une goutte d'eau distillée dans le milieu de culture stérile YMA en boîte de Pétri. L'opération est réalisée dans les conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince flambée,).
- à l'aide d'une anse de platine stérile, le jus de nodule est étalé sur boîte de Pétri contenant le milieu YMA.
- l'ensemencement est réalisé selon la technique des stries ou quatre cadrans ;
- incuber les boîtes de Pétri pendant 2 à 7 jours à 28°C à l'obscurité. Des isolats purifiés de bactéries nodulant les légumineuses sont obtenus après plusieurs repiquages.

### **Isolement des endophytes (Refaz et *al.*, 2015) :**

- rincer les racines plusieurs fois sous l'eau courante du robinet pour enlever les débris de végétaux et les particules non désirées, découper en petits segments (0,5 à 1 cm) ;
- rincer séquentiellement le matériel végétal avec de l'éthanol à 80°, 3 mn, puis avec de l'hypochlorite de sodium de 4% (eau de javel), 2-3 mn, rincer à l'eau distillée stérile et traiter avec de l'alcool de 70° 1 mn, suivi de 8-10 rinçages successifs avec de l'eau distillée stérile (opérations de désinfection de surface) ;
- sécher les racines entre les plis des papiers filtres stériles ;
- placer les racines découpées dans de boîtes de Pétri contenant les milieux de culture YMA et PDA ;
- incuber les boîtes à 28°C± 2°C pendant 2-4 jours pour les bactéries et 6-8 jours pour les champignons.
- contrôler les boîtes de Pétri régulièrement pour détecter toute croissance microbienne ;
- prélever les colonies d'endophytes entourant la section tissulaire et repiquer sur milieu nutritif YMA pour les bactéries endophytes et PDA pour les champignons endophytes.

### **Résultats attendus**

- Savoir collecter les nodules et les racines de plantes pour des analyses ;
- Savoir désinfecter les nodules et les racines pour isoler les rhizobia et endophytes;

- Savoir isoler les bactéries fixatrices d'azote et les endophytes des plantes.

### **TP N°5 :**

## **CARACTERISATION GENERALE DES ISOLATS DE MICROORGANISMES DU SOL ET DES PLANTES**

### **OBJECTIFS :**

Se familiariser avec les méthodes d'isolement, d'observation et de caractérisation des microorganismes bénéfiques des plantes

### **Matériels et réactifs :**

Microscope, lames, lamelles, anses de platine, violet de Gentiane (cristal violet), lugol, fuchsine basique (safranine), alcool à 95°, eau distillée, bleu de méthylène, bleu Trypan, eau oxygénée,

### **Caractérisation morpho-culturale :**

Taille, forme, diamètre, couleur, aspect, transparence, bordures et élévation, organes de reproduction, type de croissance.

### **Caractérisation microscopique :**

#### **Coloration des bactéries et levures au Gram :**

- déposer une goutte d'eau distillée stérile sur la lame ainsi qu'une colonie et étaler ;
- fixer la préparation à l'aide d'une source de chaleur puis sécher à l'air libre ;
- recouvrir la lame de cristal violet pendant 1 minute, puis rincer à l'eau ;
- recouvrir la lame de lugol pendant 1 minute, puis rincer à l'eau ;
- recouvrir la lame d'alcool 95° pendant 30 secondes, puis rincer à l'eau ;
- recouvrir la lame de fuchsine basique pendant 1 minute, puis rincer à l'eau et sécher ;
- observer au microscope avec l'objectif à immersion à pleine lumière.

Les bactéries dites à Gram négatif sont roses et les bactéries dites à Gram positif sont colorées en violet.

#### **Coloration des champignons au bleu de Méthylène ou au bleu Coton**

- laver, nettoyer les lames au savon, à l'eau distillée stérile, à l'alcool éthylique et au bleu de méthylène,
- déposer une goutte de bleu de méthylène sur la lame ;
- étaler la colonie sur la lame à l'aide d'une anse ;
- recouvrir la lame avec la lamelle et observer au microscopique.

#### **Test de la catalase**

Placer une culture fraîche d'endophyte sera sur une lame; additionner une goutte d'eau oxygénée (3%)

#### **Analyse de la biodiversité basée sur les morphotypes**

-Sur la base des observations morpho-culturelles, structurales (Gram) et organes de reproduction, une tentative de détermination du nombre d'espèces probables est estimée pour les bactéries et pour les champignons microscopiques. Cet exercice est réalisé pour un même écosystème (ex sol de forêt, sol de champ, sol de jachère).

-Cela, pour tenter de répondre aux questions telles que : quel est la diversité (nombre de microorganismes différents) des endophytes isolés de ce sol ?

### **Résultat attendu**

- Savoir caractériser les microorganismes associés au sol ou aux plantes
- Savoir décrire des microorganismes après observations microscopiques
- S'entraîner à l'évaluation de la biodiversité par la systématique microbienne
- S'initier à la découverte des interactions entre plantes à travers l'écologie microbienne