



MANUEL DE TRAVAUX PRATIQUES

**Utilisation des micro-organismes du Sol
pour accroître la productivité agricole**

Utilisation des microorganismes du sol pour accroître la productivité agricole

MANUEL DE TRAVAUX PRATIQUES

AGBODJATO Nadège, Assistante

BABA-MOUSSA Lamine Saïd, Professeur Titulaire des Universités

BALOGOUN Ibouräïman, Assistant

DOUGNON Victorien, Assistant

NOUMAVO Pacôme, Assistant

SAÏDOU Aliou, Professeur Titulaire des Universités

SINA OROU Abdel Haziz, Maître-Assistant

TOUKOUROU Fatiou, Professeur Titulaire des Universités

Comité d'édition

ADJANOHOUN Adolphe, Directeur de Recherche
ADÉGBOLA Ygué Patrice, Maître de Recherche
AHOYO ADJOVI Nestor, Maître de Recherche
DJINADOU IGUE Kouboura Alice, Chargée de Recherche
DOSSOU Romuald A.

Diffusion : où trouver ce document ?

Centre National de Spécialisation sur le Maïs (CNS-Maïs) de l'Institut National des Recherches Agricoles du Bénin (INRAB) - 01 BP 884 Recette Principale, Cotonou 01, République du Bénin - Tél. : (+229) 21 30 02 64, Email : inrabdg1@yahoo.fr

Comment citer ce document ?

Agbodjato N., L. Baba-Moussa, I. Balogoun, V. Dougnon, P. Noumavo, A. Saïdou A., A.H. Sina Orou, F. Toukourou. 2017. Utilisation des microorganismes du sol pour accroître la productivité agricole : Manuel de travaux pratiques. CNS-Maïs/INRAB/SNRA. 38 p. Dépôt légal N° 9668 du 5 octobre 2017, Bibliothèque Nationale (BN) du Bénin, 4^{ème} trimestre, ISBN : 978-99919-819-2-5

Réalisation et impression de l'ouvrage

Imprimerie COCO NEW TECH Cotonou, Bénin
Tél. +229 97 68 24 24 • Email : cocomensah@yahoo.fr

Droits d'utilisation

Cette création est mise à disposition selon le Contrat Creative Commons Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Partage des Conditions Initiales à l'Identique 2.0 France disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/fr/> ou par courrier postal à Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California 94105, USA.

- Paternité (BY) : vous devez citer les noms de l'auteur original de la manière indiquée par l'auteur de l'œuvre ou le titulaire des droits qui vous confère cette autorisation.
- Pas d'utilisation commerciale (NC) : vous n'avez pas le droit d'utiliser cette création à des fins commerciales.
- Partage des conditions initiales à l'identique (SA) : si vous modifiez, transformez ou adaptez cette création, vous n'avez le droit de distribuer la création qui en résulte que sous un contrat identique à celui-ci.

Paternité
Pas d'Utilisation Commerciale
Partage des Conditions Initiales à l'Identique



Première édition

Dépôt légal N° 9668 du 5 octobre 2017, Bibliothèque Nationale (BN) du Bénin, 4^{ème} trimestre
ISBN : 978-99919-819-2-5

Table des matières

Remerciements	5
Travaux pratiques n° 1 : Exploration des techniques de manipulation aseptiques	6
Chapitre 1 : Procédures de manipulation correcte de microorganismes au laboratoire	6
Exercice 1 : Transfert de culture en bouillon à un autre bouillon.....	7
Chapitre 2 : Matériel de laboratoire	9
Chapitre 3 : Techniques d'asepsie	11
Chapitre 4 : Ensemencement d'une gélose.....	13
Travaux pratiques n° 2 : Identification des bactéries, actinomycètes et champignons	15
Chapitre 1 : Identification des microorganismes	15
Isolement des microorganismes du sol.....	15
Calculs des concentrations microbiennes.....	17
Echantillon 1	17
Echantillon 2	18
Chapitre 2 : Identification des actinomycètes	19
Description du genre <i>Streptomyces</i>	19
Techniques d'enrichissement et d'isolement	20
Traitement du sol avant isolement.....	21
Isolement sur milieux de culture :	21
Isolement à partir de l'eau	22
Méthodes de conservation des souches de Streptomycètes et protocole d'isolement à partir d'un sol.....	23
Production de mélanine.....	23
Recherche d'une activité antimicrobienne	24
Milieux d'isolement des Actinomycètes	24
Chapitre 3 : Identification des champignons.....	26
Isolement des champignons sur milieu PDA	26
Travaux pratiques n° 3 : Evaluation au laboratoire de l'effet des PGPR sur le développement des racines de plantules de maïs	28
Travaux pratiques N° 4 : Coloration et quantification des racines colonisées par des champignons endomycorhiziens	31
Chapitre 1 : Eclaircissement avec la solution de KOH.....	31
Chapitre 2 : Coloration (Staining) des racines avec Chlorazol black E ou bleu de Trypan.....	32
Chapitre 3 : Quantification des racines mycorhizées	33

Travaux pratiques N° 5 : Dénombrement des spores des champignons mycorhiziens du sol.....	36
Références bibliographiques	38

Remerciements

Les auteurs remercient toutes les personnes physiques et morales qui ont contribué à la réalisation du présent ouvrage. Il s'agit, notamment, du Conseil Ouest et Centre Africain pour la Recherche et le Développement Agricoles (CORAF/WECARD) et du Projet de Productivité Agricole en Afrique de l'Ouest (PPAAO) pour avoir apporté leur appui financier, de l'Institut National des Recherches Agricoles du Bénin (INRAB) et en particulier son Directeur Général, pour la sollicitude permanente, des personnes ci-après : Madame AKANDO MIKINHOUESSE Marthe Assiba et Dr Ir. SOSSOU Comlan Hervé pour l'appui logistique.

TRAVAUX PRATIQUES N° 1 :

Exploration des techniques de manipulation aseptiques

Chapitre 1 : Procédures de manipulation correcte de microorganismes au laboratoire

La manipulation correcte de milieux stériles dans les tubes de culture et de boîtes de Pétri nécessite des attitudes, des aptitudes et des compétences spéciales. C'est ce qui justifie le présent manuel de travaux pratiques qui vise à garantir un environnement aseptique lors de la manipulation des cultures de microorganismes, à travers l'acquisition des bonnes attitudes, aptitudes et compétences.

Le transfert aseptique d'une culture d'un contenant à un autre ne réussit que si aucun microorganisme contaminant n'y est introduit lors du processus. Un transfert peut impliquer le transfert d'organismes d'une colonie isolée à un bouillon ou l'inoculation de divers milieux (solides ou liquides) à partir d'une culture de bouillon pour différents types de tests. La procédure générale est la suivante :

- désinfection de la zone de travail : la zone de travail est d'abord traitée avec un désinfectant pour éliminer tous les microorganismes qui y sont présents. Cette étape détruit les cellules végétales des microorganismes et les virus. Toutefois, les endospores ne sont pas détruits avec cette brève application de désinfectant ;
- anses et aiguilles : le transport des organismes sera effectué avec des anses ou des aiguilles. Pour stériliser l'oeuse de l'anse ou l'aiguille avant de prélever les microorganismes, il faut y appliquer une chaleur. Pour ce faire, la flamme du brûleur Bunsen est utilisée ;
- flambage du tube contenant les cultures : avant d'insérer l'oeuse ou l'aiguille refroidie dans un tube de culture, le couvercle du tube est retiré et l'embouchure du tube de culture passée à la flamme. Une fois que le prélèvement a été réalisé à l'intérieur du tube, l'embouchure du tube de culture est à nouveau passée à la flamme, avant la fermeture par le couvercle ;
- inoculation de milieu de culture liquide : si un milieu liquide en tube doit être inoculé, l'embouchure du tube est passée à la flamme avant l'insertion de l'anse. Il est important de secouer légèrement la base du tube afin de garantir une bonne dispersion des microorganismes inoculés ;
- flambage final : une fois l'inoculation terminée, l'aiguille ou l'anse est retirée du tube, passée à la flamme comme précédemment et retournée dans un réceptacle. L'encolure du tube inoculé est également enflammée avant d'y placer le capuchon. Ces outils ne doivent jamais être placés sur la table ;
- inoculation de plaques de Pétri : lorsque la surface de la gélose estensemencée, le couvercle est maintenu en diagonale sur le fond de la plaque pour éviter la contamination par l'air du milieu. Aucune chaleur n'est appliquée sur la plaque de Pétri pour l'inoculation. Une anse est utilisée pour le transfert ;

- désinfection finale : lorsque tout le travail est terminé, la zone de travail est traitée avec un désinfectant pour s'assurer que tout microorganisme déposé au cours de l'une des procédures est éliminé.

Dans la pratique, il existe les trois types de transferts aseptiques simples de cultures bactériennes suivants : (i) la culture en bouillon au bouillon, (ii) la culture en pente à une gélose en pente et (iii) la gélose solide en boîtes de Pétri à une gélose coulée en pente. Le présent manuel propose la manipulation en vue du transfert de culture en bouillon à un autre bouillon (exercice 1).

Exercice 1 : Transfert de culture en bouillon à un autre bouillon

Réalisez une inoculation de bouillon à partir d'une culture en bouillon selon la technique à suivre. La figure 1 illustre la procédure pour prélever des microorganismes et la figure 2 montre comment inoculer un tube de bouillon stérile.

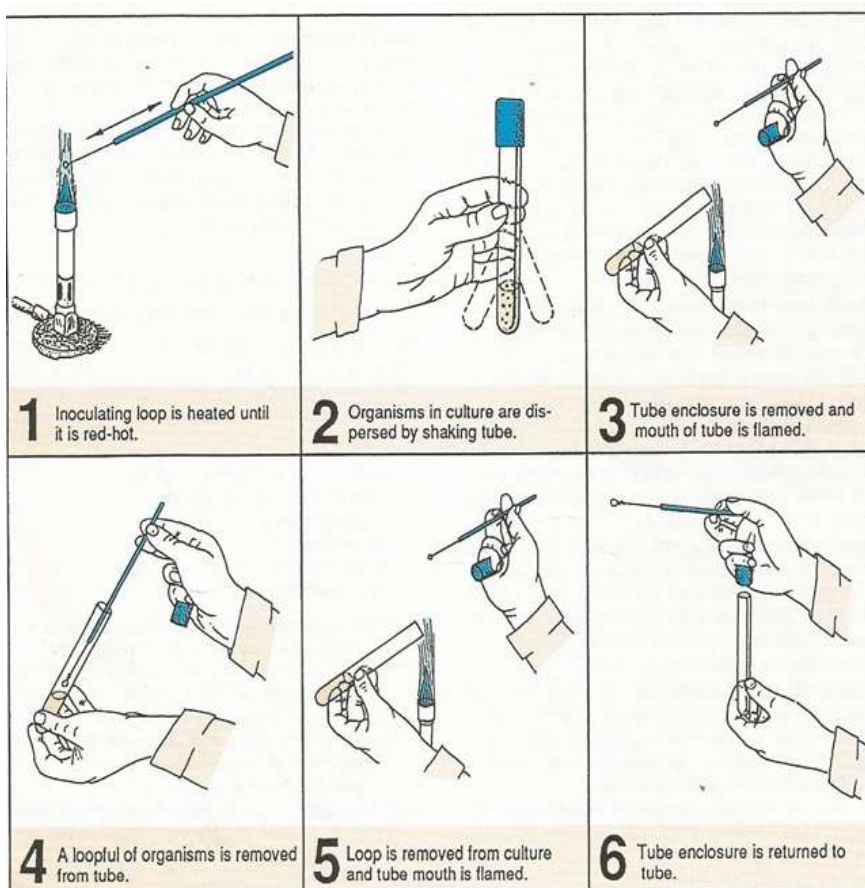


Figure 1 : Procédure pour le prélèvement des microorganismes
Source. www.mhhe.com

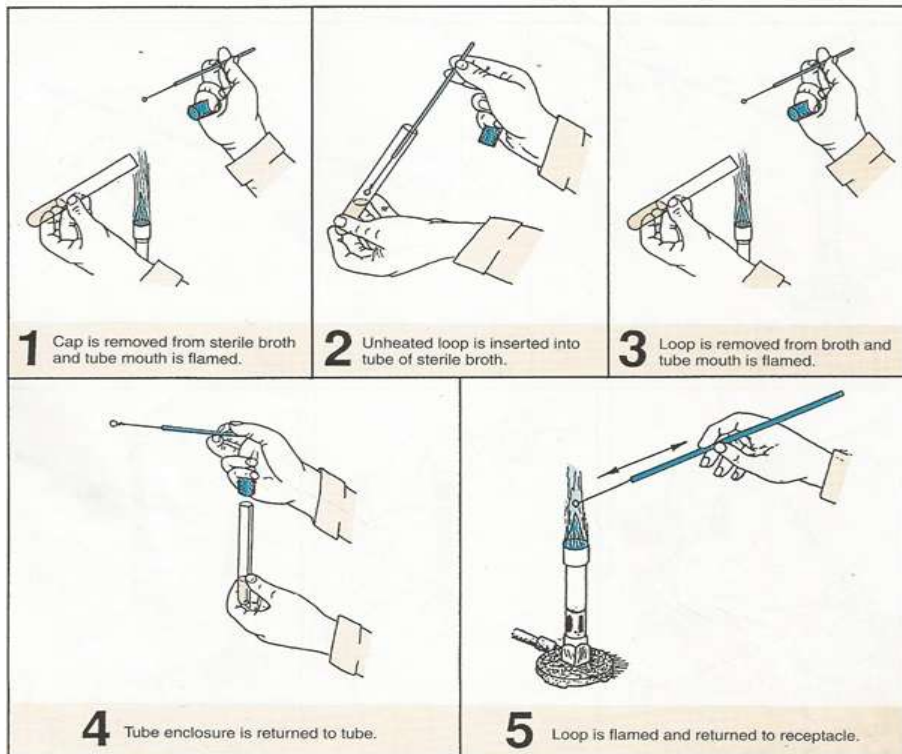


Figure 2 : Procédure de transfert des microorganismes
Source. www.mhhe.com

Il y a souvent la présence de fortes concentrations de microorganismes au laboratoire de microbiologie et en milieu hospitalier. Ces microorganismes doivent être considérés comme potentiellement dangereux. Ainsi, afin d'éviter les risques de contaminations, il faut suivre rigoureusement les règles de sécurité ci-après :

- nettoyer les surfaces de travail avec un désinfectant adéquat avant et après toutes manipulations ;
- se laver les mains avant et après toutes manipulations ;
- ne placer sur l'aire de travail que le matériel nécessaire ;
- disposer le matériel sur l'aire de travail de manière à être le plus à l'aise possible pour manipuler ;
- bien connaître l'ensemble des étapes avant de commencer les manipulations ;
- porter un sarrau boutonné ou blouse afin d'éviter de contaminer les vêtements ;
- ne jamais manger ou boire ;
- nettoyer et désinfecter rapidement tout dégât sur l'aire de travail.

Ces règles doivent être appliquées à toutes les séances de laboratoire.

Chapitre 2 : Matériel de laboratoire

Dans les laboratoires de microbiologie, divers instruments sont utilisés pour observer et manipuler les microorganismes d'une façon sécuritaire. Les petites tailles de ces organismes vivants ainsi que leur capacité pathogène potentielle, pour certaines espèces, expliquent l'utilisation de matériel spécialisé (microscope, anse de platine, écouvillon, désinfectant, autoclave, étuve, etc.).

Pour isoler, identifier ou conserver les bactéries, il est nécessaire de les faire croître et reproduire dans des conditions optimales. Les milieux de culture contiennent tous les éléments qui permettent une croissance normale des bactéries. Ces éléments sont des métabolites énergétiques, des facteurs de croissance, des facteurs de départ et des ions minéraux essentiels.

Les milieux de culture peuvent être liquides (sous forme de bouillon) ou solides (sous forme de gélose). Le milieu de culture liquide de base contient des extraits de viande de bœuf dénommé bouillon de bœuf. Pour les milieux solides, on ajoute au milieu liquide une gélatine extraite d'une algue. Ce milieu est dénommé agar. Divers éléments peuvent être ajoutés à ces deux milieux. Certains éléments permettront de cultiver des espèces ou groupes de bactéries ayant des exigences différentes. D'autres éléments permettront de sélectionner et/ou d'identifier des espèces précises de bactéries.

Il est important de savoir que lorsqu'on ensemence des bactéries sur un milieu solide (une gélose), celles-ci vont se multiplier et former une petite masse visible qui porte le nom de colonie bactérienne. Une colonie bactérienne est donc constituée d'un nombre très élevé de bactéries. C'est une population homogène de même nature.

Exercice 1 :

Ordonnez dans le tableau 1 chaque matériel et sa fonction.

Tableau 1 : Identification de matériel de laboratoire

Matériel	Fonctions
Microscope	Produit chimique antimicrobien utilisé pour le nettoyage des objets ou des surfaces
Autoclave	Instrument servant à ensemencer des microorganismes sur un milieu de culture
Anse de platine	Contenant servant à recevoir un milieu de culture solide à base d'agar (gélose)
Culture en bouillon	Appareil servant à la stérilisation des milieux de culture et des instruments
Désinfectant	Milieu liquide servant au développement des microorganismes.
Écouvillon	Instrument servant à prélever des échantillons
Gélose en Pétri	Appareil servant à la croissance des cultures à des températures adéquates
Étuve	Boîte contenant un milieu solide permettant le développement des microorganismes
Boîte de Pétri	Appareil d'optique permettant l'observation des microorganismes

Chapitre 3 : Techniques d'asepsie

Au laboratoire de microbiologie, l'application des règles d'asepsie est très importante. Par une mauvaise technique aseptique, on risque de se contaminer et de contaminer toutes personnes avec qui on a un contact. Il est donc important de toujours être conscient que les bactéries sont présentes partout au niveau de notre environnement (air, objet, peau, etc.) et qu'elles risquent de contaminer l'espace de travail à tout moment.

Exercice 2 :

Associez le terme à la définition appropriée dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Identification de concepts de laboratoire

Matériel	Fonctions
Désinfection	C'est l'absence de bactéries vivantes. La technique aseptique consiste à éviter la contamination du malade et des objets
Stérilisation	C'est une méthode pour inhiber la croissance et la multiplication des bactéries
Antiseptie	C'est une méthode pour tuer les microbes pathogènes sur des objets
Asepsie	C'est une méthode pour détruire tous les microbes pathogènes et non pathogènes, végétatifs et sporulés

Les différentes techniques d'asepsie sur les instruments et les surfaces sont les suivantes :

- autoclave : on utilise l'autoclave pour la stérilisation afin de rendre aseptiques tous les objets résistants à la température élevée et à l'humidité. Les objets stérilisés sont placés dans un système fermé. En utilisant la pression de vapeur, la température peut être d'environ 120°C. Le temps de stérilisation dure généralement entre 15 et 20 minutes. Dans ce cas, tous les microorganismes sont considérés comme éliminés ;
- ébullition : l'ébullition dans l'eau à 100°C pendant 5 à 10 minutes, peut aussi être utilisée pour stériliser. Toutefois, elle possède des limites car certains microorganismes, notamment les bactéries sporulées, ne sont pas détruits par cette méthode ;

- incinération : il est aussi possible, en cas d'urgence, d'utiliser l'incinération pour les instruments métallique ;
- rayons ultraviolets : les rayons ultraviolets peuvent être utilisés pour les instruments ou surface qui ne peuvent être soumis à la chaleur ou au liquide. Ces rayons peuvent réduire de la flore microbienne ;
- produits chimiques : l'alcool et des dérivés iodés sont des agents antiseptiques utilisés pour certaines surfaces ou instruments. Pour l'alcool, l'éthanol et l'isopropanol sont les plus actifs. L'alcool absolu est peu actif, ce qui explique qu'il est utilisé à 70%. Les dérivés iodés utilisés sont la teinture d'iode, l'alcool iodé, le lugol ou les composés iodophores. La teinture d'iode à 5% et l'alcool iodé à 1% sont des solutions alcooliques, alors que le lugol est une solution aqueuse d'iode. Les composés appelés iodophores n'ont pas les inconvénients des solutions aqueuses ou alcooliques. Ils ne brûlent pas et ne tachent pas, ils demandent cependant un temps d'application d'environ 5 minutes pour être efficaces, contrairement à la solution alcoolique ou aqueuse.

Exercice 3 :

Réalisez les manipulations suivantes qui sont une première série sans technique aseptique et une seconde série en utilisant la technique aseptique :

Technique non aseptique

- 1- identifier la gélose sur la portion contenant le milieu de culture ;
- 2- placer la gélose, couvercle en haut, sur la surface de travail ;
- 3- prendre un écouvillon non stérile et le mouiller avec la solution saline non stérile ;
- 4- ouvrir la boîte de Pétri ;
- 5- déposer l'écouvillon sur la gélose et faire un mouvement de va et vient ;
- 6- fermer la boîte de Pétri.

Technique aseptique

- 1- laver les mains ;
- 2- laver la surface de travail avec un désinfectant ;
- 3- identifier la gélose sur la portion contenant le milieu de culture ;
- 4- placer la gélose, couvercle en haut, sur la surface de travail ;
- 5- prendre un écouvillon stérile et le mouiller avec la solution saline stérile ;
- 6- entrouvrir la boîte de Pétri ;
- 7- déposer l'écouvillon sur la gélose et faire un mouvement de va et vient ;
- 8- fermer la boîte de Pétri ;
- 9- laver la surface de travail avec un désinfectant.

Après ces deux différentes manipulations, vérifier dans chaque cas, la présence de bactéries. L'absence de croissance des bactéries indique que la technique utilisée parmi les deux est la technique aseptique. Par conséquent, elle est la technique recommandée.

Chapitre 4 : Ensemencement d'une gélose

La technique d'ensemencement est utilisée pour faire l'étude des bactéries. Elle consiste à étaler des bactéries sur un milieu de culture solide (gélose) afin de les faire croître. On peut appliquer cette technique avec des échantillons variés (bouillon, plaie, etc.). La technique aseptique d'ensemencement s'applique de la façon suivante :

- 1- laver les mains et la surface de travail avec le désinfectant ;
- 2- disposer sur l'aire de travail tout le matériel nécessaire en prenant soin d'être à l'aise pour travailler ;
- 3- allumer le brûleur ;
- 4- identifier la gélose sur la portion contenant le milieu de culture ;
- 5- placer la gélose, couvercle en haut, sur la surface de travail ;
- 6- prendre l'anse de platine et la stériliser en la passant dans la flamme ;
- 7- ouvrir le tube de bouillon placé dans la main opposée, avec le petit doigt de la main qui tient l'anse ;
- 8- stériliser l'ouverture du tube à la flamme ;

- 9- insérer l'anse de platine dans le tube (il n'est pas nécessaire de voir du liquide dans l'orifice) ;
- 10- stériliser de nouveau l'ouverture du tube à la flamme et le refermer ;
- 11- entrouvrir la gélose et y introduire jusqu'à l'opposé de l'ouverture, l'anse de platine, sans toucher au bord de la boîte ;
- 12- déposer l'anse sur la gélose et faire un mouvement de va et vient ;
- 13- retirer l'anse et refermer la boîte de Pétri ;
- 14- tourner d'un quart de tour la boîte de Pétri ;
- 15- entrouvrir la boîte de Pétri de nouveau et y introduire l'anse de platine sans toucher au bord de la boîte ;
- 16- déposer l'anse sur l'extrémité de l'étalement précédent et refaire un mouvement de va et vient ;
- 17- retirer l'anse et refermer la boîte de Pétri ;
- 18- répéter deux autres fois et terminer le mouvement de va et vient plus large vers le centre de la gélose ;
- 19- retirer l'anse et refermer la boîte de Pétri ;
- 20- retourner la boîte de Pétri, couvercle sur la table ;
- 21- placer la boîte de Pétri dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour permettre le développement des microorganismes ;
- 22- placer ensuite les boîtes de Pétri dans le réfrigérateur pour ralentir le développement des microorganismes jusqu'à la prochaine séance de travaux pratiques.

Après ces différentes manipulations, vérifier la croissance des bactéries. Un bon ensemencement à partir d'une gélose stérile et d'un bouillon de culture pur donne un étalement ne contenant qu'une seule forme, couleur et grosseur de colonies bactériennes.

Avez-vous fait un bon ensemencement selon la technique aseptique?

TRAVAUX PRATIQUES N° 2 : **Identification des bactéries, actinomycètes et champignons**

Chapitre 1 : Identification des microorganismes

On regroupe sous le nom de microorganismes les êtres vivants constitués d'une seule cellule et, dans la majorité des cas, invisibles à l'œil nu. Au sens strict, cette définition rassemble les bactéries, les algues, les champignons unicellulaires et les protozoaires (animaux unicellulaires). Par extension, on y ajoute les virus qui, incapables de se reproduire seuls (sans parasiter une cellule vivante), ne font pas partie du monde vivant au sens strict du terme.

Isolement des microorganismes du sol

L'isolement des microorganismes du sol consiste à réaliser, à partir d'un échantillon, des suspensions dilution du sol. Ces dernières sont ensemencées sur milieu de culture solide. Au terme de l'incubation, les germes contenus dans le sol se développent. Chaque germe est à l'origine d'une colonie. Le comptage des colonies permet, par des méthodes de calcul simple, d'estimer la quantité de germes contenue dans le sol étudié.

L'isolement des microorganismes du sol se fait en prenant les précautions suivantes :

- stériliser tous les objets à utilisés et utilisés ;
- se laver les mains à l'alcool ;
- laver la paillasse à l'eau de javel ;
- effectuer le travail dans la zone de protection du bec benzène, à l'abri des courants d'air ;
- flamber les goulots des tubes et flacons après leur ouverture et avant leur fermeture ;
- maintenir le couvercle à l'oblique, avec ouverture du côté de la flamme, des boîtes de Pétri ;

Après les précautions ci-dessus énumérées, il faut prendre deux (2) échantillons différents de sol : le premier est du sol cultivé (E1) et le second du sol nu (E2) puis faire pour tous les deux échantillons de sol, les deux manipulations suivantes :

- Dilution : la dilution facilite le comptage des microorganismes qui se trouvent généralement en grand nombre dans le sol car plus la dilution augmente et plus le pourcentage de colonies présentes dans la solution diminue. Le procédé est le suivant (figure 3) :
 1. tamiser et peser 10 g de sol ;
 2. mélanger les 10 g de sol pesés à 90 ml d'eau distillée (la dilution 10^{-1} est ainsi réalisée) ;
 3. prélever 1 ml de cette dilution ;
 4. mélanger cette solution à 9 ml d'eau distillé stérile (la dilution 10^{-2} est ainsi réalisée) ;
 5. continuer cette manipulation jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-8} .

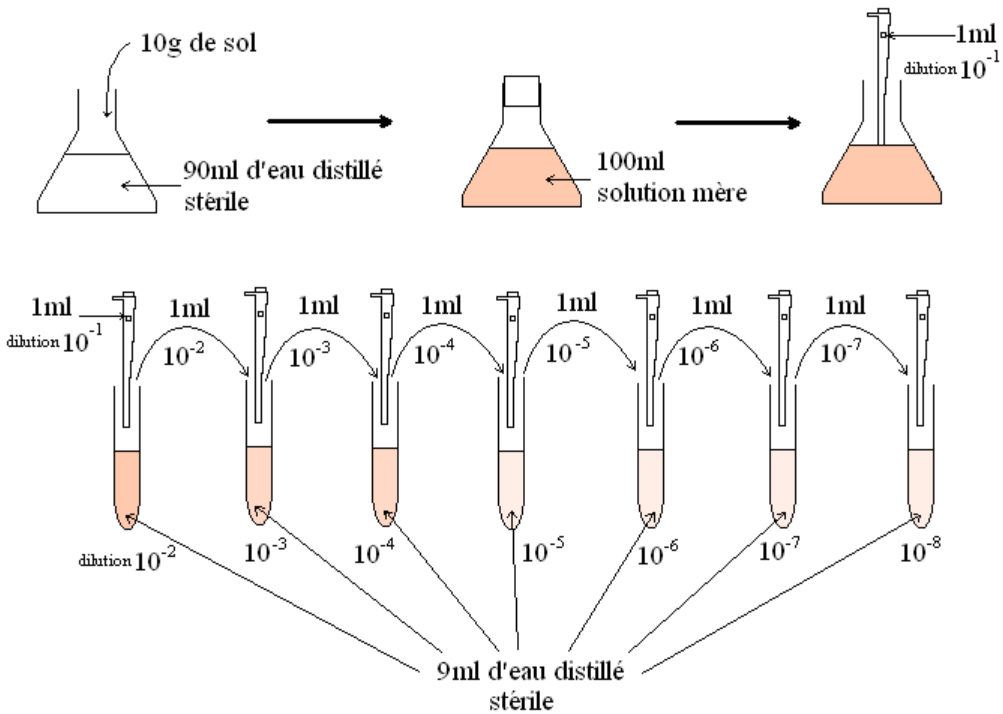


Figure 3 : Procédé de dilution de la solution du sol

- Ensemencement : l'ensemencement à 0,1 ml de chaque dilution de 10^{-1} ; 10^{-4} et 10^{-8} est prélevé à l'aide d'une pipette et déposée dans une boîte de Pétri. Le milieu de culture, maintenu en surfusion à l'état liquide à 70°C , est refroidi et coulé dans la boîte de Pétri. Après la solidification du milieu, les boîtes sont retournées et mises à incuber à 27°C pendant une semaine. Pour chaque tube, on fait deux répétitions (figure 4).

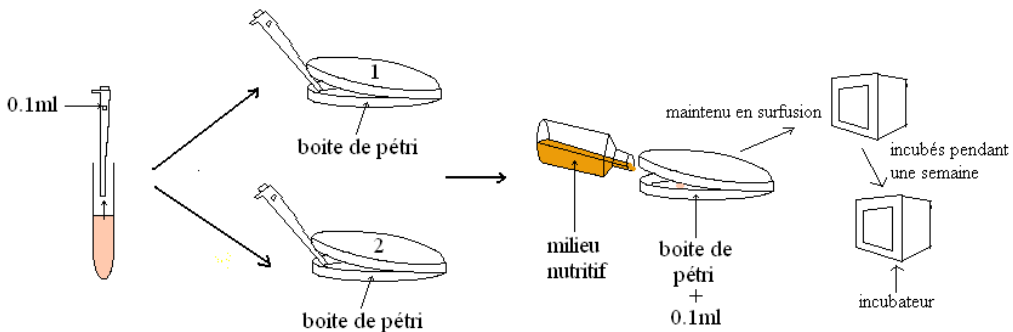


Figure 4 : Procédé d'ensemencement

Calculs des concentrations microbiennes

Après les manipulations décrites dans le chapitre 1, il est nécessaire de déterminer avec précision la concentration du sol en microorganismes. Pour le comptage des microorganismes, la norme internationale est présentée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Norme internationale pour le comptage des microorganismes du sol

Dilution	Echantillon 1	Echantillon 2
10^{-1}	164 colonies	>300 éliminé
10^{-2}	<30 éliminé	>300 éliminé
10^{-3}	<30 éliminé	>300 éliminé
10^{-4}	<30 éliminé	>300 éliminé
10^{-5}	<30 éliminé	>300 éliminé
10^{-6}	<30 éliminé	>300 éliminé
10^{-7}	<30 éliminé	>300 éliminé
10^{-8}	<30 éliminé	262 colonies

Le calcul de la concentration des microorganismes du sol se fait selon la formule suivante :

Echantillon 1

0,1 ml \longrightarrow 164 colonies

10 ml \longrightarrow X1 colonies

$$X1 = \frac{10 \times 164}{0,1} = 16.400 \text{ colonies dans la dilution } 10^{-1}$$

Il y a 16.400 colonies dans 1g de sol.

$$16\,400 \times 10^6 = 164 \times 10^8 \text{ germes dans 1 g de sol.}$$

Donc il y a 164×10^8 germes dans 1 g de sol (164×10^8 germes/1 g de sol).

Echantillon 2

0,1 ml → 262 colonies

10 ml → X2 colonies

$$X2 = \frac{10 \times 262}{0.1} = 26.200 \text{ colonies dans la dilution } 10^{-8}$$

26.200 colonies → 10^{-8}

Y colonies → 10^{-1}

$$Y = \frac{10^{-1} \times 26200}{10^{-8}} = 262 \times 10^9 \text{ colonies}$$

Il y a 262×10^9 colonies dans 1 g de sol.

$262 \times 10^9 \times 10^6 = 262 \times 10^{15}$ germes dans 1 g de sol.

Donc il y a 262×10^{15} germes dans 1 g de sol (262×10^{15} germes/1 g de sol).

La description macromorphologique des microorganismes se fait conformément au tableau 4.

Tableau 4 : Description macromorphologique des microorganismes

Colonie	Critères				
	Couleur	Forme	Aspect	Taille	Élévation
N° 01	Blanc cassé	Circulaire	Lisse	0,65 cm	convexe
N° 02	Jaune clair	Irrégulière	A centre plissée	0,9 cm	Plate
N° 03	Blanc cassé	En dents de scies	A bord plissé	1 cm	Crates forme
N° 04	Verdâtre	Irrégulière	Plissé	0,2 cm	Crates forme

Chapitre 2 : Identification des actinomycètes

Description du genre *Streptomyces*

Les colonies de *Streptomyces* présentent des formes rondes. Elles sont poudreuses et légèrement enfoncées dans la gélose. Elles présentent le plus souvent colorations très variées qui s'expliquent par la présence de pigments de natures très différentes. La pigmentation est le plus souvent différente entre le mycélium substrat et les spores. De ce fait, la coloration est rarement homogène au niveau de la colonie. Mieux, des pigments diffusibles, dont la couleur est sensible au pH ou non, peuvent être présents. Ils peuvent être solubles dans le milieu ou précipités dans le voisinage de la colonie.

Selon la couleur des spores, on définit les sept (7) séries suivantes : **gris** (de gris à brun) ; **blanc** ; **rouge** (bronze, rose et rose pâle) ; **jaune** (jaunâtre à jaune-verdâtre), **bleu** (bleuâtre à bleu-grisâtre pâle) ; **vert** (verdâtre à gris-verdâtre pâle) ; **violet**. Les espèces de *Streptomyces* sont classées en fonction de la couleur de leurs spores comme l'indiquent les tableaux 5 et 6.

Tableau 5 : Classification des espèces de *Streptomyces* en fonction de la couleur du mycélium substrat

Couleur du mycélium substrat	Espèces représentatives
Orange à rouge foncé (surtout endo-pigment)	<i>S. aurantiacus</i> , <i>S. cinnabarinus</i> , <i>S. griseoruber</i> , <i>S. longispororuber</i>
Rouge à bleu/violet (surtout endo-pigment)	<i>S. californicus</i> , <i>S. cinereoruber</i> <i>S. purpurascens</i> , <i>S. violaceus</i>
Rouge-violet à bleu (endo et/ou exo-pigment)	<i>S. coelicolor</i> , <i>S. cyaneus</i> , <i>S. lateritius</i> <i>S. violaceoruber</i> .
Jaune-orange/jaune verdâtre (endo et exo-pigment)	<i>S. atroolivaceus</i> , <i>S. canarius</i> , <i>S. galbus</i> <i>S. flavogriseus</i> , <i>S. parvus</i> , <i>S. tendae</i>
Vert à gris-olive (surtout endo-pigment)	<i>S. flavoviridis</i> , <i>S. olivoviridis</i> <i>S. nigrifasciens</i> , <i>S. viridochromogenes</i>
Vert (endopigment)	<i>S. malachiticus</i> , <i>S. malachitorectus</i>
Rouge-brun à brun foncé (endo et exo-pigment)	<i>S. badius</i> , <i>S. eurythermus</i> , <i>S. ramulosus</i> <i>S. griseorubiginosus</i> , <i>S.</i> <i>phaeochromogenes</i>
Gris-brun à noir (surtout endo-pigment)	<i>S. alboniger</i> , <i>S. hygrosopicus</i> , <i>S.</i> <i>mirabilis</i> <i>S. purpureofuscus</i> , <i>S. violaceoniger</i>

Tableau 6 : Classification des espèces de *Streptomyces* en fonction de la couleur du mycélium aérien

Couleur du mycélium aérien	Espèces représentatives
Jaune-gris "griseus"	<i>S. griseus</i> , <i>S. niveus</i>
Rose/violet clair	<i>S. fradiae</i> , <i>S. toxytricini</i>
Gris-rose/lavande "cinnamomeus"	<i>S. lavendulae</i> , <i>S. flavotricini</i>
Brun (+ gris ou rouge)	<i>S. eurythermus</i> , <i>S. fragilis</i>
Bleu "azureus"	<i>S. viridochromogenes</i> , <i>S. cyaneus</i>
Bleu-vert "glaucus"	<i>S. glaucescens</i>
Vert "prasinus"	<i>S. prasinus</i> , <i>S. hirsutus</i>
Gris "cinereus"	<i>S. violaceoruber</i> , <i>S. echinatus</i>
Blanc "niveus"	<i>S. albus</i> , <i>S. longisporus</i>
Non définissable : blanc + couleurs pâles variées	<i>S. alboniger</i> , <i>S. rimosus</i>

Un grand nombre de souches de *Streptomycètes* produisent des antibiotiques. Celles-ci sont des plus variées. La plupart des espèces de *Streptomycètes* répandent des odeurs le plus souvent terreuses ou de moisi et parfois fruitées. Ces odeurs sont surtout présentes chez les espèces à mycélium végétatif abondant et poudreux. Il pourrait s'agir d'amines organiques (solubles dans l'éther) et leur formation serait plus abondante dans les milieux contenant du glycérol. Les *Streptomycètes* sont abondants dans les sols riches en matière organique en décomposition, avec un pH entre 6,5 et 8,5. La température optimum du sol pour le développement de la plupart des espèces est comprise entre 25 et 35°C. La résistance des spores des *Streptomycètes* est de plus de 10 ans en terre desséchée ou sur les graines.

Techniques d'enrichissement et d'isolement

L'enrichissement des *Streptomycètes* dans le sol se fait par l'addition du carbonate de calcium (CaCO_3) et par l'addition de chitine ou de kératine.

- par addition de CaCO_3 : on mélange 1 g d'un échantillon de sol séché à l'air avec 0,1 g de CaCO_3 . Le mélange est incubé à 26°C pendant 7 à 9 jours dans une atmosphère saturée d'humidité. Le nombre de colonies de *Streptomycètes* obtenues est 100 fois supérieur au nombre de colonies de *Streptomycètes* dans un échantillon témoin (non traité) ;
- par addition de chitine ou de kératine : l'addition de chitine ou de kératine conduit également à une augmentation de colonies des *Streptomycètes*.

L'addition du carbonate de calcium affecte négativement la flore fongique et élimine la plupart

des bactéries par le séchage de l'échantillon. L'addition de chitine ou de kératine affecte positivement le nombre de bactéries. L'incubation en condition humide conduit à une augmentation jusqu'à 1.000 fois le nombre de colonies de *Streptomycètes*.

Traitement du sol avant isolement

Le traitement du sol avant l'isolement des *Streptomycètes* se fait à travers les méthodes suivantes : le séchage, le stockage et le chauffage ; le traitement par le phénol ; la centrifugation différentielle de l'échantillon.

- Séchage, stockage et chauffage : ces techniques utilisent la grande résistance des arthrospores vis à vis des conditions de sécheresse et de température. Le séchage de l'échantillon et son stockage prolongés à température ambiante pour les mésophiles ou à températures entre 50 et 56°C pour les thermophiles, induisent une augmentation sensible du nombre de colonies de *Streptomycètes* dans le sol. Le traitement par la chaleur de la surface de plaquesensemencées (10 minutes à 110°C) facilite l'isolement sélectif des *Streptomycètes* pectinolytiques du sol. Le chauffage du sol à températures entre 40 et 45°C pendant 2 à 16 heures réduit considérablement le nombre de bactéries sans affecter celui des *Streptomycètes*. On utilise également le chauffage du sol à 55°C ou à 100°C pendant 1 heure.
- Traitement des échantillons de sol par le phénol avant isolement : on ajoute 0,1 ml d'une suspension dense de sol à 10 ml de phénol à 1,4%. Après 10 minutes, on dilue la suspension et on l'étale sur la plaque. On observe l'élimination plus ou moins importante des bactéries et des champignons sans trop abîmer les *Streptomycètes*. Les avis sont partagés à propos de cette technique dont les résultats sont aléatoires.
- Centrifugation différentielle de l'échantillon avant isolement : on broie 1 g de sol avec un peu d'eau dans un mortier. Puis on le dilue dans 100 ml d'eau. La suspension ainsi obtenue est centrifugée à 1.600 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant contient les spores de *Streptomycètes* alors que le culot contient les bactéries et les spores des champignons. Cette technique est utilisée plutôt comme complément pour récupérer des spores.

Isolement sur milieux de culture :

L'isolement sur milieu de culture se fait dans : milieu à la chitine ; milieux avec amidon, caséine et nitrates ; agar à la paraffine ; milieux avec du glycérol et de l'arginine ; milieux avec des composants sélectifs et/ou indicateurs. On utilise également des agents sélectifs.

- Milieu à la chitine : l'addition de chitine dans un milieu pauvre améliore la pousse des *Streptomycètes* et l'ajout de sels permet l'isolement d'actinomycètes de l'eau (*Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*) ;
- Milieux avec amidon, caséine et nitrates : comme la chitine, l'amidon est dégradé par la plupart des *Streptomycètes*. La combinaison de l'amidon et du nitrate est particulièrement favorable à l'isolement de ces organismes. Les meilleurs milieux d'isolement sont ceux qui

contiennent de l'amidon ou du glycérol comme principale source carbonée et de la caséine, de l'arginine ou du nitrate comme source d'azote ;

- Agar à la paraffine : la paraffine est bien connue pour être dégradée par *Nocardia*, mais peu de renseignements sont disponibles sur son usage par les *Streptomycètes* ; ce qui n'empêche pas leur isolement sur un tel milieu ;
- Milieux avec du glycérol et de l'arginine : ce sont les milieux les plus performants pour l'isolement des *Streptomycètes* ;
- Milieux avec des composants sélectifs et/ou indicateurs : à l'exception de la chitine qui a été très employée pour l'isolement sélectif des *Streptomycètes*, de nombreux autres nutriments ont été utilisés. Plusieurs d'entre eux permettent une identification sur plaque. Les colonies de *Streptomycètes* capables de dégrader les composés ci-après produisent des zones visibles d'éclaircissement ou d'autres modifications du milieu. Il s'agit de pectines, poly- β -hydroxybutyrate, caoutchouc, cholestérol et soufre élémentaire. Alors que les trois dernières substances nécessitent des souches spécialisées, la pectine et le poly- β -hydroxybutyrate sont utilisés par de nombreux *Streptomycètes* ;
- Utilisation d'agents sélectifs : les antifongiques, qui inhibent sélectivement la croissance des champignons, sont largement utilisés comme le cycloheximide à des concentrations entre 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$ et les polyènes pimaricine et nystatine, chacun à des concentrations entre 10 et 50 $\mu\text{g/ml}$. Des antibiotiques comme la polymixine à 5 $\mu\text{g/ml}$ et la pénicilline à 1 $\mu\text{g/ml}$ peuvent être utilisés ; toutefois, ces deux molécules inhibent aussi des *Streptomycètes*. D'autres substances peuvent également être utilisées. Il s'agit notamment du propionate de sodium à 4 g/l et du rose bengale à 35 mg/l qui colore les colonies de *Streptomycètes* en rose intense.

Isolement à partir de l'eau

Les milieux décrits précédemment peuvent être utilisés pour isoler les *Streptomycètes* à partir de l'eau. On peut concentrer les germes par filtration sur membrane et placer cette dernière, face contre la gélose, sur le milieu chitine-gélosée + cycloheximide à 50 $\mu\text{g/ml}$ puis mettre à incuber pendant 4 heures à des températures entre 22 et 30°C. On enlève la membrane et on incube à nouveau pendant 1 à 8 semaines. Si on utilise une membrane de porosité 0,3 μm , il n'est pas nécessaire d'ôter le filtre car les filaments de *Actinomycètes* peuvent le traverser.

Pour les germes aquatiques particulièrement résistants, on peut appliquer les protocoles suivants :

- ajouter 0,2 ml de chlorure d'ammonium (à 0,38% stérile) à 100 ml d'échantillon d'eau à température ambiante ;
- ajouter 1 ml d'hypochlorite à 200 mg/l de chlore efficace ;
- laisser agir pendant 10 minutes et neutraliser par 0,05 ml d'une solution stérile de thiosulfate de sodium ;

- filtrer l'échantillon comme pour la procédure normale ;
- agiter l'échantillon filtré après l'ajout de phénol à 7 mg/ml, pendant 10 minutes ;
- filtrer le mélange à travers une membrane ;
- récupérer les spores des Actinomycètes en agitant la membrane avec des billes de verre dans une solution saline ;
- étaler sur une plaque.

Méthodes de conservation des souches de Streptomycètes et protocole d'isolement à partir d'un sol

- Conservation des souches de Streptomycètes : Il est possible de conserver les souches à 4°C en cultures inclinées, en suspension dans de l'agar mou, ou à -20°C en suspension avec 10% de glycérol. Cette conservation est de courte durée. La conservation sur une durée plus longue se fait à travers le placement des géloses pentes à -20°C, la culture des germes sur un sol stérile, la lyophilisation ou le stockage dans l'azote liquide.
- Protocole d'isolement par suspensions-dilutions
 1. Prélever un échantillon de sol à une profondeur d'environ 10 cm ;
 2. Laisser le sol se déshydrater à l'abri de la poussière, à température ambiante pendant quelques jours ou quelques mois (les spores sont très résistantes à l'assèchement) ;
 3. Transférer 10 grammes de sol déshydraté dans un tube stérile puis boucher le tube ;
 4. Incuber dans un bain-marie à 50°C pendant 1 heure ;
 5. Broyer dans un mortier 1 g de cet échantillon ;
 6. Suspender l'échantillon broyé dans 10 ml d'eau physiologique stérile ;
 7. Agiter et laisser décanter ou centrifuger pendant 5 minutes à 1.500 rpm. Cette suspension constitue la dilution 10^{-1} ;
 8. Faire des dilutions au 1/10 jusqu'à 10^{-4} ;
 9. Étaler 100 µl des dilutions 10^{-2} à 10^{-4} sur milieu de Kuster-glycérol en boîtes de Pétri de 90 mm ;
 10. Incuber pendant au moins une semaine à l'étuve à 30°C.

Au bout de quelques jours, des colonies colorées et typiques des *Streptomycètes* vont apparaître.

Production de mélanine

La production de mélanine est déterminée qualitativement après 4 jours d'incubation sur un milieu gélosé peptone-extrait de levure-fer et/ou sur un milieu gélosé à la tyrosine dont la composition est donnée plus loin. Ces milieux sont coulés en pentes. La formation de

mélanine est mise en évidence par la coloration gris-noir à bleu-noir du milieu après 1 à 2 jours. Le résultat est clairement positif ou négatif.

Il est important de signaler que la composition du milieu à la tyrosine risque de changer prochainement car il semble que la tyrosinase soit induite par certains acides-aminés comme la L-méthionine ou la L-norleucine au lieu de son propre substrat.

Recherche d'une activité antimicrobienne

Au bout de 7 à 15 jours d'incubation à 30°C, on étale 20 ml de milieu de Muller-Hinton refroidi à 45°C en surcouche sur les boîtes présentant des colonies suffisamment isolées. On peut aussi repiquer les colonies en spots sur un nouveau milieu et au bout de 5 jours de culture, on retourne la boîte au-dessus de 1,5 ml de chloroforme pendant 40 minutes pour tuer les *Streptomycètes*. On élimine l'excès de chloroforme et on coule la surcouche sur ce milieu.

Lorsque l'agar est solidifié, on étale 100 µl d'une suspension diluée de germe test ($A_{650} = 0,2$). La production d'antibiotique est caractérisée par une zone d'inhibition de la souche test au voisinage de la colonie de *Streptomycète*. Il est aussi possible de rechercher une activité antimicrobienne en ensemençant directement le milieu de surcouche (Muller-Hinton ou 5 ml de gélose nutritive à 0,7%) par une suspension limpide du germe test. Il est possible de définir 12 profils antimicrobiens.

Les souches généralement utilisées sont *Aspergillus niger*, (ou *Mucor ramannianus*) *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* (ou *C. tropicalis*), *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* (ou *Sarcina lutea*), *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae* (ou *S. pasteurianus*) et *Streptomyces murinus*.

Milieux d'isolement des Actinomycètes

Les milieux d'isolement des *Actinomycètes* sont les suivants : Milieu gélosé Agly ; Milieu de Bennett ; Milieu de Kuster amidon ou glycérol ; Milieu à la tyrosine pour test de la mélanine. Ces différents milieux sont décrits ci-dessous :

- Milieu gélosé AGly (pH=7)

Phosphate bi-potassique	1 g
Asparaginate de sodium	1 g
Glycérol	10 g
Solution d'oligo-éléments	1 ml
Gélose	15 g
Eau distillée	1000 ml

Solution d'oligo-éléments :

<i>Molybdate de potassium ou sodium</i>	0,05 g
---	--------

<i>Borate de sodium</i>	<i>0,05 g</i>
<i>Nitrate de cobalt</i>	<i>0,05 g</i>
<i>Sulfate de cadmium</i>	<i>0,05 g</i>
<i>Sulfate de cuivre</i>	<i>0,05 g</i>
<i>Sulfate de zinc</i>	<i>0,05 g</i>
<i>Sulfate de manganèse</i>	<i>0,05 g</i>
<i>Perchlorure de fer</i>	<i>01 goutte</i>
<i>Eau distillée qsp.</i>	<i>1000 ml</i>

- Milieu de Bennett :

Glucose	10 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	2 g
Extrait de viande	1 g
Agar	20 g
Eau distillée	1.000 ml
pH	7,3

- Milieu de Kuster amidon ou glycérol :

Amidon	5 g
(ou glycérol)	10 g
Caséine (ou sa peptone)	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Oligo-éléments	1 ml
Agar	18 g

avec comme solution d'oligo-éléments :

Sulfate de magnésium	5 g
Carbonate de calcium	2 g

Sulfate ferreux	1 g
Eau distillée qsp	100 ml

- Milieu à la tyrosine pour test de la mélanine :

Glycérol	15 g
L-Tyrosine	0,5 g
L-Asparagine	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,01 g
Oligo-éléments	1 ml
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,2 - 7,4

avec les oligo-éléments suivants :

FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
Eau distillée	100 ml

Chapitre 3 : Identification des champignons

Les moisissures sont des champignons filamenteux hétérotrophes. Certains vivent en symbiose avec des végétaux. D'autres sont des parasites des animaux ou des végétaux. D'autres encore sont des saprophytes qui se développent sur des déchets organiques ou contaminant les produits alimentaires. Ils sont souvent dotés de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, pectinolytiques, protéolytiques, lipolytiques, etc.) qui en font des agents de dégradation dangereux mais aussi parfois des alliés utiles (affinage des fromages et production d'enzymes).

Isolement des champignons sur milieu PDA

L'isolement des champignons sur milieu PDA se réalise ainsi qu'il suit :

- on divise en deux (2) parties une boîte de Pétrie contenant un milieu PDA ;
- on prélève des champignons d'une tomate et d'une orange à l'aide de l'anse à ensemercer ;
- on dépose les champignons issus de l'orange sur la première partie de la boîte de Pétrie, et les champignons issus de tomate sur la seconde partie ;
- on incube à température entre 38 et 39°C dans un four Pasteur pendant une semaine au minimum.

Après une semaine d'incubation, il y a l'apparition de moisissures de couleurs noire et blanche. Pour l'observation des champignons au microscopique, il faut suivre les étapes suivantes :

- 1- stériliser la lame en utilisant l'alcool ;
- 2- essuyer la lame et la flamber ;
- 3- verser une goutte d'eau distillée sur la lame ;
- 4- prélever une colonie de champignons à l'aide de l'anse à ensemercer ;
- 5- étaler sur la goutte d'eau distillée préalablement versée ;
- 6- observer sous microscope photonique.

On observe des filaments qui sont cloisonnées et des spores qui sont mobiles.

TRAVAUX PRATIQUES N° 3 :

Evaluation au laboratoire de l'effet des PGPR sur le développement des racines de plantules de maïs

Des souches de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) pour "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" (*Azospirillum lipoferum*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens*) isolées de la rhizosphère du maïs de différentes zones agroécologiques du Bénin et conservées à -20°C au Laboratoire dans du bouillon Muller Hinton additionné de glycérol (10%) ont été utilisées pour évaluer l'effet des PGPR sur le développement des racines de plantules de maïs au laboratoire. Pour ce faire, les souches de PGPR sont revivifiées par repiquage sur gélose nutritive.

Les inocula bactériens sont obtenus par culture en milieu nutritif liquide (Muller Hinton) pendant 24 heures à 30 °C pour les *Pseudomonas* et à 37°C pour *Azospirillum lipoferum*. Les cultures ainsi obtenues sont ajustées à une concentration microbienne d'environ 1×10^8 UFC/ml (DO 0,45 à 610 nm) avec le spectrophotomètre (BioMATE 3S, Thermo scientific).

Des semences de maïs de la variété EVDT 97 STR C1 de cycle 120 jours ont été inoculées avec les PGPR citées ci-dessus, conformément aux traitements suivants : (i) contrôle (sans bactérie) ; (ii) *A. lipoferum* ; (iii) *P. putida* ; (iv) *P. fluorescens* ; (v) *P. putida-P. fluorescens* ; (vi) *A. lipoferum-P. putida-P. fluorescens*. L'inoculation des semences de maïs se fait ainsi qu'il suit :

- 1- tremper les semences de maïs pendant deux (2) minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,024% ;
- 2- rincer cinq (5) fois les semences de maïs à l'eau distillée stérile sous agitation au vortex ;
- 3- transférer les semences ainsi traitées dans les différents inocula de PGPR, conformément aux traitements définis ci-dessus, pendant trente (30) minutes (figure 5) ;
- 4- disposer de façon équidistante les semences de maïs inoculées, à l'aide d'une pince stérile, dans une boîte de Pétri carrée stérile de 11,8 cm de côté, tapisée de papier torchon stérile préalablement imbibé de 10 ml d'eau distillée stérile (figure 6) ;
- 5- recouvrir les semences de maïs avec du papier torchon imbibé de 10 ml d'eau distillée stérile ;
- 6- fermer la boîte de Pétri à l'aide d'un élastique ;
- 7- incuber à 30°C pendant sept (7) jours.

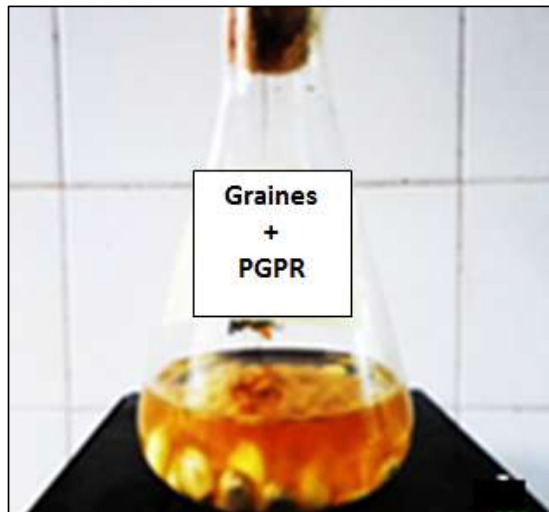
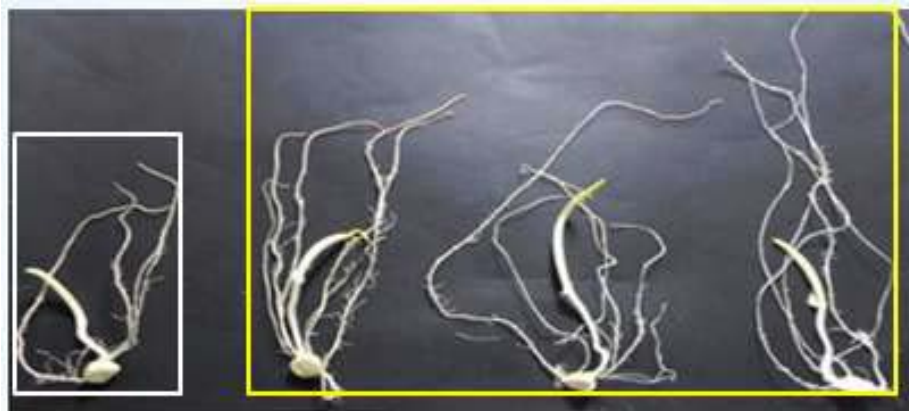


Figure 5 : Photo montrant les semences de maïs immergées dans l'inoculum bactérien



Figure 6 : Photo montrant le dispositif de germination des graines de maïs

A l'issue des sept (7) jours de germination, des données relatives à différents paramètres germinatifs (pourcentage de germination, longueur et poids des racines, indice de vigueur des graines, etc.) seront collectées afin d'évaluer l'effet de ces PGPR sur les processus biochimiques et physiologiques gouvernant la germination des graines de maïs (figure 7).



Graines sans bactéries

Graines avec bactéries

Figure 7 : Photo montrant la morphologie des graines germées

TRAVAUX PRATIQUES N° 4 :

Coloration et quantification des racines colonisées par des champignons endomycorhiziens

Le processus d'éclaircissement et de coloration nécessite des échantillons de racines lavées et dépouillées des mottes de terre. Ainsi, les racines les plus fines sont les plus mycorhizées. Pour cela, il faut éviter de tirer les racines ou d'arracher les plantes du sol, il est donc recommandé d'extraire une motte puis dégager les racines sous l'eau. Il est impératif que les volumes de la solution d'hydroxyde de potassium et de stain soient suffisants pour la quantité de racines échantillonnées. Il est également recommandé de s'assurer que les racines ne forment pas d'agrégats qui pourront empêcher le contact uniforme des racines avec les solutions. Il est souvent mieux de couper les racines à une longueur entre 2 et 4 cm avant de les laver.

Chapitre 1 : Eclaircissement avec la solution de KOH

La solution d'hydroxyde de potassium (KOH 10%) est utilisée pour éclaircir les racines. La procédure d'éclaircissement des racines nécessite des échantillons de racines de poids compris entre 1 et 2 g. Des recherches sur les champignons endomycorhiziens ont montré que la baisse de température, le temps court ou la grosseur des échantillons sont les raisons qui expliquent le fait que les racines ne sont pas suffisamment éclaircies. L'éclaircissement des racines avec la solution de KOH consiste à :

- mettre dans un tube à essai avec KOH 10% ;
- chauffer au bain-marie à 90°C durant 30 minutes. On peut optimiser ce temps, parfois 10 à 15 minutes suffisent si les racines sont fragiles. Cette opération détruit le contenu des cellules végétales et décolore les tanins des racines ligneuses. La solution devient alors brun-rouge ;
- capturer les racines éclaircies dans un tamis après le bain-marie ;
- filtrer et rincer avec de l'eau ou de l'acide dilué plusieurs fois ;
- ajouter 10 ml de H₂O₂ (10%) puis laissés agir pendant 10 mn (figure 8) ;
- rincer à nouveau avec de l'eau de robinet ;
- transférer dans la solution de stain.

Nota bene: Une heure d'éclaircissement à 60°C au bain-marie (water bath) est approximativement équivalente à 5 min à l'autoclave à 60°C.

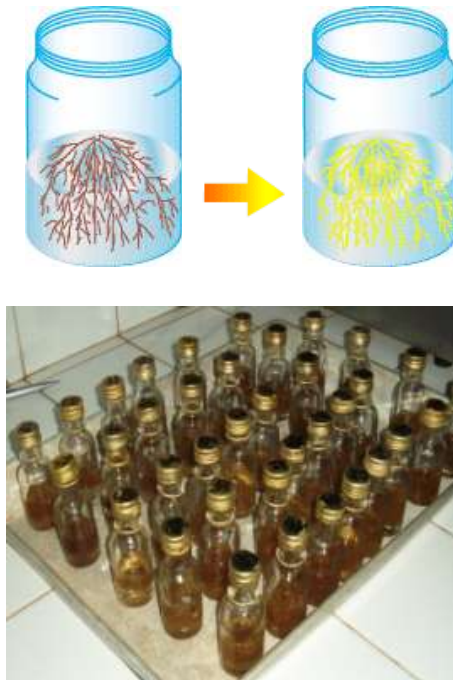


Figure 8 : Racines + H₂O₂ (10%)

Chapitre 2 : Coloration (Staining) des racines avec Chlorazol black E ou bleu de Trypan

Pour une observation détaillée au microscope, les racines éclaircies peuvent être colorées avec Chlorazol black E (CBE) dans une solution de lactoglycérol (Brundrett *et al.*, 1984). La meilleure concentration dans la plupart des cas est 0,03%. Toutefois, il est aussi bon d'essayer plusieurs concentrations (0,1% ; 0,03% ; 0,01%) lorsque la même méthode est utilisée pour de nouveaux types de racines, ou quand il s'agit d'une nouvelle source de racine. La coloration des racines se fait de la manière suivante :

- ajouter 10 ml de la solution de Stain (1 g de chlorazol black dans un rapport 1 : 1 : 1 de glycérol : acide lactique : eau distillée) aux racines rincées après éclaircissement ;
- laisser les racines rincées séjournées au moins 7 jours dans la solution de Stain, ceci favorise une coloration complète des racines (figure 9).

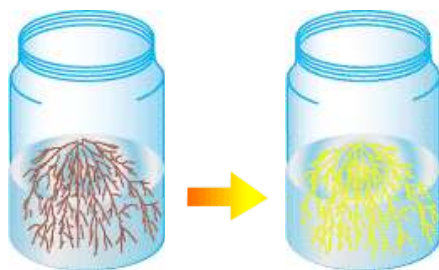


Figure 9 : Vue des racines colorées

Les racines peuvent être aussi colorées avec du bleu de Trypan (Bevege 1968, Phillips & Hayman 1970, Kormanik & McGraw 1982). Dans ce cas, une concentration de 0,05% dans du lactoglycérol est souvent utilisée pour colorer les racines ayant été éclaircies comme décrit ci-dessus. Les images du bleu de Trypan ont un contraste plus faible que celles obtenues à partir de Chlorazol black E (Brundrett et al. 1984). Cependant, la coloration avec le bleu de Trypan est adéquate pour l'estimation du niveau de colonisation où la couleur du contraste pourrait être bénéfique (figure 10).

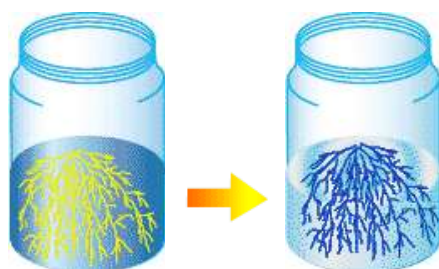


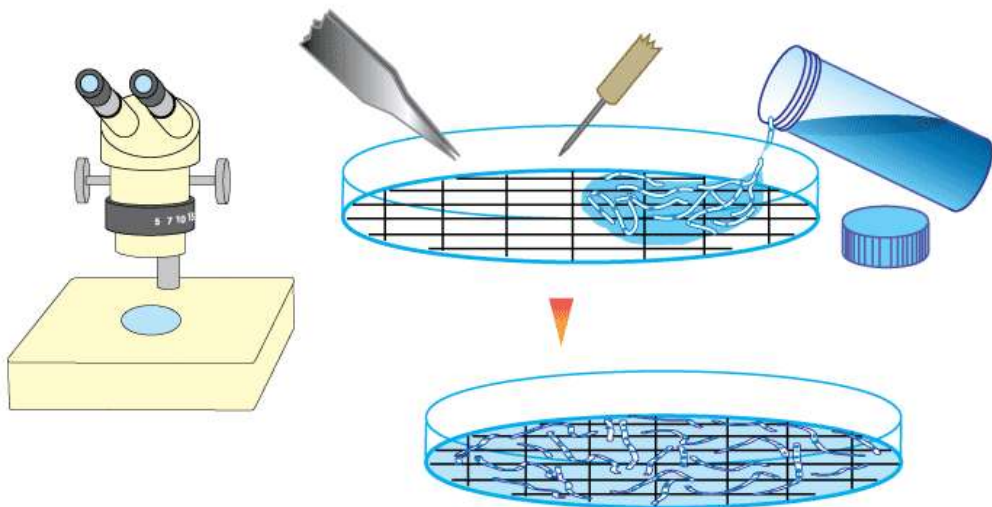
Figure 10 : Vue des racines colorées avec du bleu de Trypan

Chapitre 3 : Quantification des racines mycorhizées

La technique de comptage utilisée est celle décrite par Brundrett *et al.* (1996). Le comptage est fait à l'aide d'un stéréo-microscope (Stemi DRC Zeiss) et les résultats sont exprimés en pourcentage de longueur de racines colonisées.

Les études sur les mycorhizes nécessitent souvent l'estimation de la proportion des racines dans un échantillon contenant la structure des mycorhizes. Après l'éclaircissement et la coloration des racines, la longueur de ces racines peuvent être mesurée simultanément avec la colonisation par les mycorhizes à l'aide de la procédure d'intersection des lignes du quadrillage (Giovannetti & Mosse, 1980) ou séparément par observation à l'aide d'un microscope (McGonigle *et al.*, 1990).

Les données relatives à la longueur des racines peuvent être utilisées pour calculer le taux de production (croissance) des racines, la densité des racines (dans un volume de sol) et la longueur spécifique des racines qui fournit d'importantes informations par rapport à la capacité des racines à obtenir de l'eau ou de nutriments du sol et leur habilité à former des associations symbiotiques avec les mycorhizes. La lecture se fait suivant les lignes horizontales en comptant le nombre de racines ayant un point coloré se situant sur la ligne et le nombre de racines ayant coupé la ligne en question (par exemple pour la ligne horizontale après Start, il y a 3 racines ayant de points colorés qui se situent sur la ligne contre 7 racines qui coupent la ligne d'où 3/7). On le répète cette fois ci sur les lignes verticales. Enfin, on fait la somme du nombre de racines ayant un point coloré se situant sur les lignes sur la somme du nombre de racines ayant coupé les lignes pour trouver la longueur des racines colonisées (figure 11).



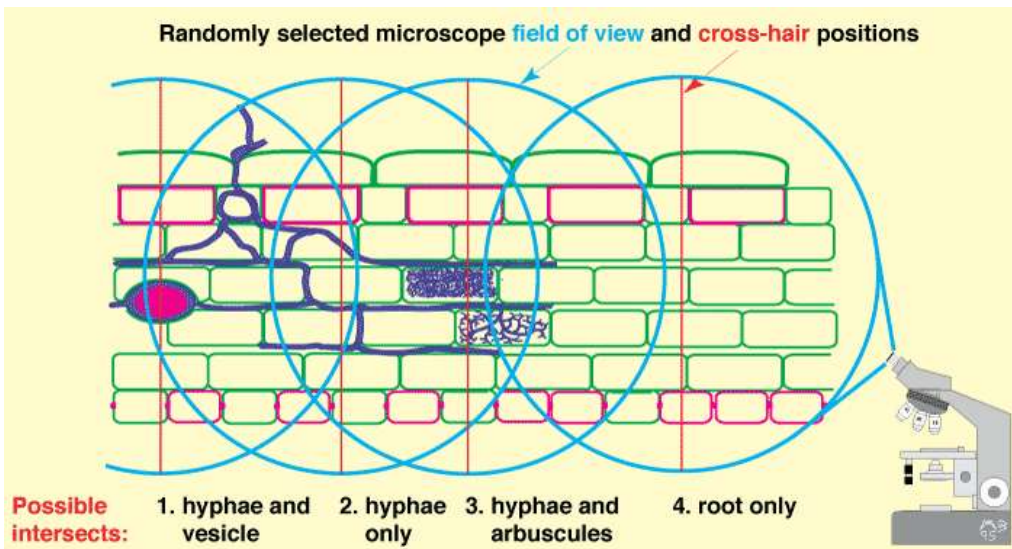
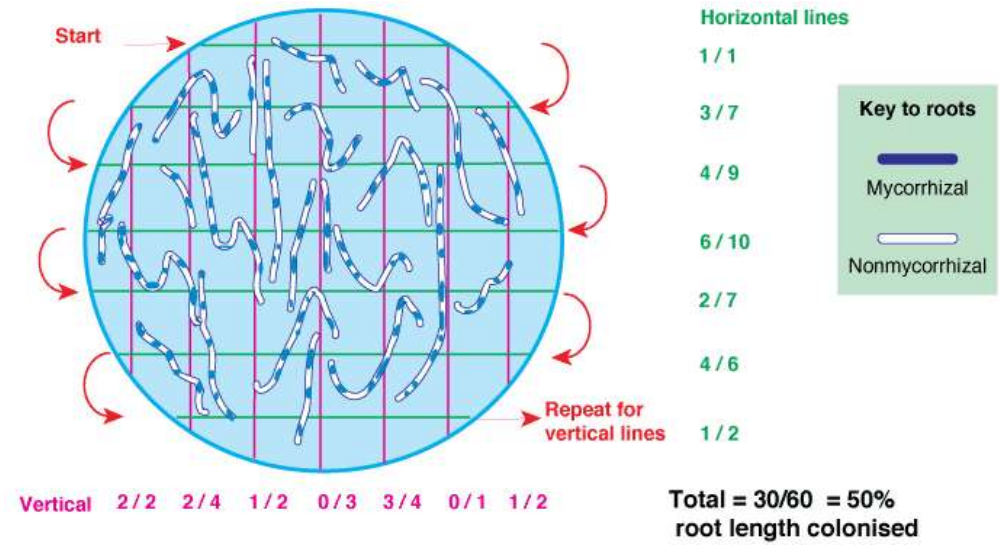


Figure 11 : Schéma descriptif de la quantification des racines mycorhizées

Pour chaque échantillon, le nombre de racines infectées est identifié et le taux de colonisation des racines par les spores des champignons endomycorhiziens est évalué par la méthode décrite par Brundrett *et al.* (1996).

TRAVAUX PRATIQUES N° 5 :

Dénombrement des spores des champignons mycorhiziens du sol

Les spores sont, avec les hyphes externes des racines, les structures des champignons mycorhiziens qui vont permettre l'infection des nouvelles racines. Ces spores sont très grosses (une centaine de microns), car bourrées de réserves qui assureront une germination et une colonisation précoce de la racine en autonomie trophique. Elles peuvent donc être récupérées par tamisage, puis observées à la loupe binoculaire (Helme-Guizon *et al.*, 2010). Le dénombrement des spores des champignons micorhiziens du sol se fait à travers le prélèvement des échantillons de sol, le séchage et la préparation des échantillons de sol à dénombrer, la suspension et la collecte des spores, l'observation et le dénombrement des spores puis l'identification des spores.

Le matériel utilisé se compose de ce qui suit : sol non traité (ni engrais, ni pesticides) ; tamis à mailles fines de 400, 300, 125, et 32 μm ; boîtes de Pétri ; microscope (loupe binoculaire).

- **Prélèvement des échantillons de sol** : pour le dénombrement des spores de mycorhizes, il est indispensable de prélever des échantillons de sol et ce, à différentes profondeurs (0-20 cm ; 20-40 cm ; 40-60 cm) suivant les quatre points cardinaux afin de constituer des échantillons composites ;
- **Séchage et préparation des échantillons de sol à dénombrer** : les échantillons de sol collectés sont séchés à l'air ambiant, réduits et tamisés à l'aide de tamis à 2 mm de mailles en vue d'éliminer les éléments grossiers pour n'avoir que de sol à particules fines à suspendre dans l'eau. Ensuite, des échantillons de 100 g par horizon sont constitués avec au moins trois (3) répétitions ;
- **Suspension et collecte des spores** : pour cette opération, plusieurs tâches sont accomplies. Il s'agit de :
 - 1- mise en suspension dans 900 ml d'eau des échantillons de 100 g de sol après le séchage à l'air ambiant ;
 - 2- tamisage du surnageant à travers quatre (4) tamis superposés (425 μm ; 300 μm ; 125 μm ; 32 μm) après agitation vigoureuse et décantation ;
 - 3- répétition de l'opération (environ 4 fois), jusqu'à l'obtention d'un surnageant transparent de façon à collecter toutes les spores contenues dans les 100 g de sol ;
 - 4- recueil du contenu des tamis de 125 μm et de 32 μm dans un godet et centrifugation à 2.000 rpm pendant 5 minutes ;
 - 5- versement du premier surnageant et d'une solution de sucrose à 50% sur le dépôt dans le godet ;
 - 6- agitation vigoureusement et centrifugée à 2.000 rpm pendant 1 minute ;

- 7- versement du surnageant du godet dans le tamis de 32 µm ;
 - 8- rinçage avec abondamment d'eau ;
 - 9- collecte des spores dans une boîte de Pétri.
- **Observation et dénombrement des spores** : après le rinçage abondant à l'eau de robinet, les boîtes de Pétri sont déposées sur du papier millimétré quadrillé pour faciliter le comptage des spores. La densité des spores est estimée suivant la méthode de grille (Giovanneti et Mosse, 1980) sous un stéréo-microscope (Stemi DRC Zeiss) au grossissement ×40. Seules les spores actives (racines présentant des noyaux) et dont la taille est comprise entre 32 et 125 µm sont prises en compte. Le nombre moyen de spores est exprimé pour 100 g de sol sec. L'abondance relative des spores (ARS) par morphotype est déterminée par la formule de Johnson *et al.* (1991).

$$ARS = \frac{\text{Nombre total de spores observées pour une espèce}}{\text{Nombre total de spores observées pour toutes les espèces}}$$

- **Identification des spores** : c'est une étape très importante de la caractérisation des champignons. Pour ce faire, les spores sont séparées selon leur couleur et leur forme. L'identification et la description des espèces répertoriées sont faites en utilisant la clé d'identification de l'International Culture Collection of Vesicular and arbuscular Mycorrhizal fungi (INVAM, <http://www.invam.caf.wdu.edu>). De façon précise, la nouvelle classification proposée par Schüßler *et al.* (2001) est utilisée.

Références bibliographiques

- Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 4, Stanley T. Williams, Williams & Wilkins, 1989
- Bevege D.I., 1968. A rapid technique for clearing tannins and staining intact roots for detection of mycorrhizas caused by *Endogone* spp. and some records of infection in Australasian plants. *Transactions of the British Mycological Society* 51 : 808-810.
- S. Prinzis, Isolement et caractérisation de souches d'actinomycétales. Purification et étude structurale de leurs métabolites antifongiques, Thèse UCBL LYON I, 1990.
- Brundrett M.C., Piché Y., Peterson R.L., 1984. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* 62 : 2128-2134.
- Brundrett M., Bougher N., Dell B., Grove T. and Malajczuk N., 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research, Monograph 32, Canberra, Australia, 374 p.
- Giovannetti M., Mosse B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84: 489-500.
- Giovannetti M., Mosse B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84: 489-500.
- Girard et Rougieux, Techniques de microbiologie agricole, DUNOD, 1967
- Johnson N.C., Zak D.R., Tilman D., Pfleger F.L., 1991. Dynamics of vesicular arbuscular mycorrhizae during old field succession. *Oecologia*, 86: 349-358.
- Kormanik P.P., McGraw A.C., 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In : Schenck N.C. (ed.), *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society, St Paul, 37-45.
- McGonigle T.P., Miller M.H., Evans D.G., Fairchild G.L., Swan J.A., 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115 : 495-501.
- Phillips J.M., Hayman D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55 : 158-160.
- The Prokaryotes, vol II, Mortimer P. Starr, Springer-Verlag, 1986, chap 156.
- Schubler A., Schwarzott D. and Walker C., 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycotaphylogeny and evolution. *The British Mycological Society*, 105 (12):1413-1421.



CORAF

**Leader de l'innovation agricole
en Afrique de l'Ouest et du Centre**

*7, Avenue Bourguiba
B.P.48 Dakar RP - CP 18523
Tél. (221) 33 869 96 18
E-mail : secoraf@coraf.org
www.coraf.org*