

Département de SNV

Module Microbiologie de l'environnement

Charger de TP : Madame Djouamaa Manel

TP N° 03 ; TP N° 04 et TP N° 05 :

Isolement des Bactéries nodulant la légumineuse *Genista saharae*

Durée de réalisations 03 séances de TP

Introduction

I. Présentation de la région d'étude

Le genre *Genista* est largement distribué dans le bassin méditerranéen, en Europe et en Afrique du nord (Libye, Tunisie, Algérie, Maroc et Égypte). En Algérie, il est localisé dans la région Est et Sud Est et au grand Sahara (Mekkiou, 2005).

Les nodules objet de notre étude sont collectés à partir des racines de l'espèce *Genista saharae* Coss et Dur qui pousse au niveau de la région de Bouchagroun, wilaya de Biskra. La zone d'étude est localisée dans la commune de Bouchagroun (latitude 5°28'0''E et longitude 34°44'0''N), située à 20 km du chef lieu de la wilaya de Biskra (fig. 09).



: Localisation géographique du site d'échantillonnage : la région de Bouchagroun, wilaya de Biskra (C.R.S.T.R.A).

1^{TP03} : Collecte des nodules

La sélection et l'échantillonnage des nodules doit être réalisé durant une période bien précise, où la plante est en pleine activité. La collecte doit être effectuée durant le mois d'Avril quand la terre est sèche. A cette période de l'année les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines et d'une couleur rougeâtre qui peuvent indiquer la présence de la légghémoglobine et la fixation active de l'azote (Chabbi, 2010).



La légumineuse *Genista saharae* Coss et Dur
(Bouchagroun, wilaya de Biskra) (Originale).

La collecte est réalisée suivant la méthode de (Vincent, 1970 et Beck et *al.*, 1993) . Il s'agit de :

- Creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm de profondeur afin d'extraire tout l'appareil racinaire (fig. 11) ;
- Se débarrasser de la terre manuellement au niveau des racines sans endommager les nodules ;
- Récupérer la plante et la mettre dans un sachet en plastique ;

Au laboratoire, on enlève la partie aérienne, et on lave la partie racinaire soigneusement à l'eau courante, à l'aide d'un couteau, on coupe les nodules à 2 mm du site d'attache et on les sèche avec du papier absorbant avant leur conservation (Benselama, 2015).

(Sortie sur terrain)



Collecte des nodules (Originale).

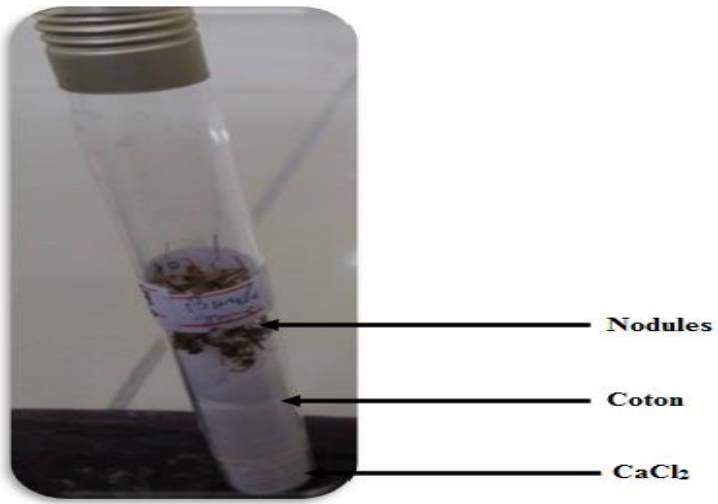
2.2. Conservation des nodules

Pour une courte conservation et pour une utilisation immédiate, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48 heures (ne jamais les congeler afin d'éviter la destruction des nodules par les cristaux de glace).

Pour une conservation de longue durée il est recommandé d'utiliser un dessiccateur spécial: le chlorure de calcium (CaCl_2) anhydre qui permet une longue conservation (6 à 12 mois) (Vincent, 1970).

La dessiccation est réalisée dans des flacons en verre; chacun est rempli au $\frac{3}{4}$ de son volume, par du CaCl_2 anhydre recouvert d'une couche de coton et identifié par une étiquette (fig. 12) de façon à mettre en évidence:

- Le nom de la légumineuse (genre et espèce) ;
- Le lieu du prélèvement ;
- La date du prélèvement (Maougal, 2004).



Conservation des nodules sous CaCl₂ (Originale).

TP04 : Isolement des souches à partir des nodules

Les nodules fraîchement lavés sont utilisés directement, alors que ceux qui sont conservés par dessiccation sont réhydratés en les plaçant dans l'eau pendant 24 heures au réfrigérateur à 4°C, puis pendant 1 heure à la température ambiante.



Figure 13: Réhydratation des nodules (Originale).

2.3.1. Stérilisation de nodules

Sous la hotte à flux laminaire, les nodules intacts sont transférés dans un tube stérile et immergés dans l'éthanol 95% pendant 5 à 10 secondes, puis transférés rapidement dans l'eau de Javel 3% pendant 3 minutes.

On effectue ensuite un rinçage des nodules 10 fois dans l'eau distillée stérile et on laisse gonfler après le 10^{ème} rinçage (**Annexe 3**).

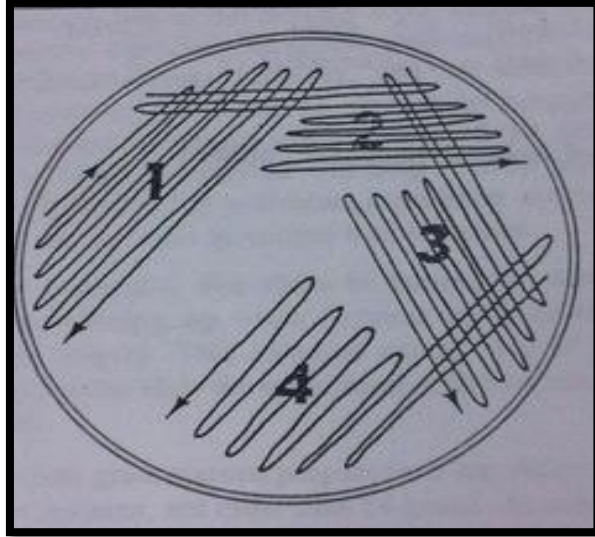
Cette stérilisation superficielle des nodules a pour but de limiter la contamination des milieux de culture par d'autres microorganismes externes ou liés intimement aux tissus superficiels de ces nodules (Chabbi, 2010).

2.3.2. Ecrasement des nodules

Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans des tubes Eppendorf, avec une pince stérilisée par flambage au bec Bunsen et immersion dans l'éthanol (Vincent, 1970) (**Annexe 3**).

2.3.3. Isolement des souches

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble, a l'aide d'une anse de platine, on prélève la suspension du nodule et on l'étale selon la technique des quatre quadrants (Vincent, 1970) (fig. 14) sur gélose coulée en boîte (YMA), puis on incube à 28°C pendant 48 à 72 heures.



Ensemencement par la technique des quatre quadrants (Gharzouli, 2006).

III. Vérification de la pureté des souches

3.1. Milieux de culture utilisés (préparation de milieu de culture)

Les caractères morphologiques des isolats sont mis en évidence à partir de colonies développées d'une culture de 24 à 72 heures à 28°C sur le milieu YMA. On s'intéresse à l'observation de la taille, la couleur, la forme et l'élévation des colonies.

Le milieu de culture doit contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants (Annexe 1):

- Milieu liquide : YMB (Yeast Manitol Broth)
- Milieux solides : YMA (Yeast Manitol Agar)

L'autoclavage des milieux se fait à 120°C pendant 20 minutes.

TP 05 : Purification des isolats

Après caractérisations morphologiques des isolats par culture sur milieu YMA Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994); des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes sont nécessaires pour leur purification.

L'ensemencement se fait sur le milieu YMA selon la technique des quatre quadrants de manière à avoir des colonies bien isolées. Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant 48 à 72 heures.

3.3. Coloration de Gram et observation microscopiques

3.3.1. Coloration de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de classer les bactéries en deux grands groupes : bactéries dites Gram positif et bactéries dites Gram négatif (**Annexe 2**).

3.4. Conservation des souches

Avant de conserver les isolats elles sont ensemencées dans des tubes contenant 5 ml de bouillon YMB dans le but d'enrichir la culture pendant 48 heures dans une étuve à une température de 28°C.

Il existe plusieurs techniques de conservation. Dans notre travail, deux méthodes sont utilisées :

La première est la conservation sur YMA additionné de 1 à 3g/l de CaCO₃ comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes inclinés. Après l'ensemencement des tubes avec des cultures bactériennes en phase de croissance exponentielle. Les isolats sont incubés à 28°C pendant 3 jours puis conservés au réfrigérateur à 4°C. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).


La deuxième méthode est la conservation des isolats dans des tubes Eppendorf contenant 500 µl de glycérol 60% additionnée de 500 µl de suspension bactérienne en phase exponentielle. Le mélange est homogénéisé et conservé à -20°C.

Annexe

Milieux de culture:


❖ Milieu YMB (Yeast-Mannitol-Broth) en g/l (Vincent, 1970)

Mannitol	10.0 g/l
K ₂ HPO ₄	0.5 g/l
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.2 g/l
NaCl	0.1 g/l
Extrait de levure	0.5 g/l
L'eau distillée	1l



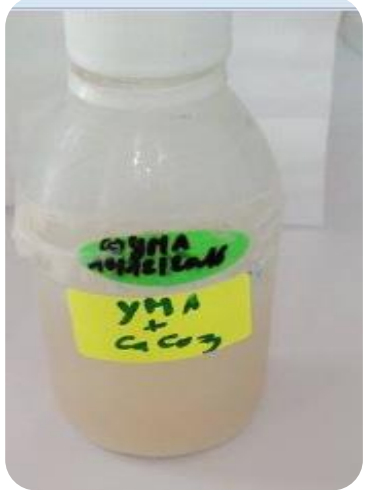
Le pH ajusté à 6.8 et la stérilisation est réalisée à 120° C pendant 20 mn.

❖ Milieu YMA (Yeast-Mannitol-Agar) en g/l (Vincent, 1970)

YMB	1.01	
Agar	15 g/l	

Le pH ajusté à 6.8 et la stérilisation est réalisée à 120° C pendant 20 mn.

❖ Milieu de conservation : (YMA+ CaCO₃)

YMA	1.01	
CaCO ₃	3g/l	

Le pH ajusté à 6.8 et la stérilisation est réalisée à 120° C pendant 20 mn.

Références :

BENSELAMA A. 2015, Réhabilitation de la culture du *Lablab purpureus* L. ex Sweet et études de son partenaire symbiotique, Thèse de Doctorat en biotechnologie, Option : interaction plantes-Microorganismes, Univ. D'Oren Es-Senia, Département de Biotechnologie, 52p.

CHABBI R. 2010, Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien, mémoire de Magister en Biotechnologie végétale, Univ. Mentouri Constantine, Faculté des sciences de la nature et de la vie, 49-51pp.

VINCENT J. M. 1970, The manual for the practical study of nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford. United Kingdom.

MEKKIOU R. 2005, Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista* (Fabaceae) : *G. saharae*, *G. ferox*, Thèse de Doctorat en Chimie Organique, Option : Phytochimie, Univ. Mentouri – Constantine, Département de chimie, 19-31pp

BECK D P. MATERON L A. AFANDI F. 1993, Pratical Rhizobium-legume. Technical manual N° 19.

MAOUGAL R. 2004, Techniques de production d'inoculum Rhizobial. Etude de cas pois chiche (*Cicer arietinum.L*): Inoculation et nodulation, mémoire de magister en biotechnologies végétales, Univ. Mentouri Constantine, Faculté des sciences, Département des Sciences de la Nature et de la Vie, 53p.

SAMASEGARAN P. HOBEN H. J. 1994, Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York Inc. 450pp.