

TP N1 : Isolement des bactéries phytopathogènes

L'isolement des bactéries phytopathogènes sur des milieux de culture gélosés constitue souvent l'étape fondamentale pour le diagnostic des maladies bactériennes. Ensuite, diverses techniques sont employées pour identifier les bactéries isolées.

L'objectif

Matériel

- Plantes malades (feuilles, tiges, racines)
- Boucles de platine
- Boîtes de Pétri
- Milieux de culture (GN)
- Lampe à alcool
- Pipettes
- Microscopes
- Colorants de Gram, bleue de méthylène
- Eau distillée stérile
- Étuves

Protocole d'isolement des Bactéries Phytopathogènes

1. Préparation du Matériel

1. Préparer les milieux de culture selon les instructions du fabricant et les verser dans des boîtes de Pétri stériles.

2. Préparation des Échantillons

1. Sélectionner des échantillons de plantes présentant des symptômes de maladies (taches, nécroses, flétrissement).
2. Découper des fragments de tissus malades (1 cm² environ) avec des ciseaux stériles.

3. Isolement des Bactéries

1. Prendre le tissu végétal symptomatique, ensuite prélever des pièces du tissu infecté et les laver à l'eau du robinet - Sectionner les pièces en deux et les mettre dans de l'eau physiologique stérile (NaCl 0,85%)
2. Laisser tremper de 20min à 2 heures selon le microbe recherché.
3. À l'aide d'une anse à inoculer stérile, ensemercer par épuisement des milieux de culture gélosés (GN) afin d'obtenir des cultures.
4. À la suite d'une incubation de 24 à 48 heures à 28° C, vérifier la croissance microbienne.
5. Noter s'il y a présence de colonies caractéristiques et indiquer toutes les caractéristiques des microbes obtenus.

4. Sélection et Purification des Colonies

1. Observer les boîtes de Pétri et sélectionner des colonies présentant des morphologies différentes.
2. Prélever les colonies sélectionnées avec une boucle de platine stérile et les ensemercer sur de nouvelles boîtes de Pétri pour obtenir des cultures pures.
3. Incuber à nouveau à 28°C pendant 24-48 heures.

5. Identification des Bactéries

1. Réaliser une coloration de Gram pour déterminer la morphologie et la nature (Gram positif ou Gram négatif) des bactéries.
2. Réaliser des tests biochimiques pour compléter l'identification :
 - **Test de catalase** : Appliquer une goutte de peroxyde d'hydrogène sur une colonie et observer la formation de bulles.
 - **Test d'oxydase** : Appliquer un disque d'oxydase sur une colonie et observer le changement de couleur.
 - **Test de production d'acide** : Ensemencer des bactéries sur des milieux contenant différents sucres et observer la production d'acide par changement de couleur.

Conclusion

L'isolement et l'identification des bactéries phytopathogènes sont des étapes cruciales pour comprendre les maladies des plantes et développer des stratégies de lutte efficaces. Ce TP permet d'acquérir des compétences pratiques en microbiologie et en phytopathologie.