



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université d'Oran des Sciences et de la Technologie Mohamed Boudiaf USTO-MB



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département du Vivant et de L'environnement

Polycopié de Travaux Pratiques du module **« Ecologie des microorganismes »**

Destiné aux étudiants de Master 1 Microbiologie Appliquée

Réalisé par : Dr. CHAMEKH Rajaa

Année universitaire

2024/2025

Préambule

Ce polycopié a été élaboré dans le cadre du module "Écologie des Microorganismes" et accompagne les travaux pratiques destinés à approfondir la compréhension des interactions et fonctions écologiques des microorganismes dans divers environnements. Les expériences proposées visent à donner aux étudiants une vision concrète et pratique des rôles multiples que jouent les microorganismes dans les écosystèmes. À travers ces séances, ils découvriront également des techniques essentielles pour l'étude de la microbiologie environnementale, en se familiarisant avec des modèles expérimentaux et des méthodes d'analyse de pointe.

TP 1 : La colonne de Winogradsky

La colonne de Winogradsky est un modèle écologique classique utilisé pour simuler et observer la stratification des communautés microbiennes en fonction des gradients de lumière, d'oxygène et de nutriments. Ce premier TP permettra aux étudiants d'explorer de manière pratique les différents cycles biogéochimiques, en particulier ceux du soufre et du carbone, en observant les interactions complexes entre microorganismes autotrophes, hétérotrophes et photosynthétiques. Ce TP leur fournira une compréhension approfondie de la manière dont les conditions environnementales influencent la distribution et l'activité des microorganismes dans les milieux naturels.

Les étudiants seront amenés à construire une colonne de Winogradsky et à suivre son évolution sur plusieurs semaines, ce qui leur permettra d'observer les différentes zones de croissance microbienne et d'interpréter les phénomènes à l'œuvre.

TP 2 : Effet antagoniste de *Trichoderma*

Ce TP met en lumière les capacités de biocontrôle des champignons du genre *Trichoderma*, connus pour leur action antagoniste contre des phytopathogènes tels que *Fusarium* et *Botrytis*. À travers des tests pratiques, les étudiants seront amenés à observer la compétition pour les nutriments et l'espace, ainsi que la production de substances antifongiques par *Trichoderma*. Ce TP fournira une illustration concrète des applications potentielles de *Trichoderma* en agriculture durable comme alternative aux produits chimiques.

Les étudiants réaliseront des expériences d'antagonisme en milieu de culture, où ils évalueront la capacité de *Trichoderma* à inhiber la croissance d'agents phytopathogènes par divers mécanismes, tels que la confrontation directe et la sécrétion de substances volatiles ou diffusibles.

TP 3 : Isolement et identification des bactéries de différents écosystèmes

Dans ce TP, les étudiants découvriront les techniques fondamentales d'isolement et d'identification des bactéries issues de différents environnements. Ils se familiariseront avec des milieux de culture sélectifs, des méthodes de coloration comme la coloration de Gram, et des tests biochimiques pour différencier les genres bactériens. L'objectif est de comparer la diversité microbienne entre différents écosystèmes, d'analyser les facteurs qui influencent cette diversité, et de discuter de l'importance des bactéries isolées dans leurs rôles écologiques.

Ce TP permettra également aux étudiants de comprendre les applications de l'étude des microorganismes dans le domaine environnemental, et de réfléchir à l'impact des communautés bactériennes sur la santé des écosystèmes.

TP 4 : Étude de l'activité enzymatique des microorganismes

L'étude des activités enzymatiques des microorganismes est essentielle pour comprendre leur rôle dans la décomposition de la matière organique et le recyclage des nutriments. Dans ce TP, les étudiants exploreront la production de cellulases, protéases, amylases et lipases par des bactéries isolées lors des séances précédentes. Ces enzymes permettent aux microorganismes de dégrader des composés complexes en molécules plus simples, facilitant ainsi leur intégration dans les cycles biogéochimiques.

Les étudiants réaliseront des tests enzymatiques en milieu solide et apprendront à mesurer les zones d'hydrolyse autour des colonies, afin de quantifier l'activité enzymatique. Ce TP leur permettra de comprendre l'importance écologique des enzymes microbiennes, ainsi que leurs applications biotechnologiques, notamment dans les industries de la fermentation, du traitement des déchets et de la production de biocarburants.

Ce polycopié a pour objectif d'encourager les étudiants à développer un esprit critique et analytique face aux processus microbiens, tout en renforçant leurs compétences pratiques et méthodologiques. Les compétences acquises à travers ces travaux pratiques contribueront à une meilleure compréhension du rôle des microorganismes dans la nature, ainsi que de leur potentiel dans diverses applications biotechnologiques et environnementales.

Sommaire

TP 1 : La colonne de Winogradsky	1
TP 2 : Effet antagoniste de <i>Trichoderma</i>	4
• Test d'antagonisme par confrontation directe.....	5
• Sécrétion des substances volatiles.....	5
• Sécrétion des substances diffusibles.....	6
• Mesure de l'activité antagoniste.....	6
TP 3 : Isolement et identification des bactéries de différents écosystèmes	7
• Isolement et identification des bacilles Gram négatif.....	8
• Isolement et identification des <i>Pseudomonas</i>	12
• Isolement et identification des <i>Bacillus</i>	16
TP 4 : Étude de l'activité enzymatique des microorganismes	18
• Test de production d'amylase.....	18
• Test de production de cellulase.....	19
• Test de production de protéase.....	19
• Test de production de lipase.....	20
• Calcul de l'index enzymatique.....	20
Références bibliographiques	21

TP 1: La colonne de Winogradsky

La colonne de Winogradsky est un modèle simple mais puissant qui permet d'étudier la diversité des microorganismes et les processus écologiques qu'ils régulent dans un environnement aquatique stratifié. Créée par le microbiologiste Sergei Winogradsky, cette colonne simule un micro-écosystème où se développent diverses communautés microbiennes en fonction des gradients de lumière, d'oxygène, et de nutriments. Elle offre une représentation des interactions complexes entre les microorganismes, incluant les cycles du soufre et du carbone. Ce modèle permet également d'observer comment les conditions environnementales influencent la croissance et l'activité des différents types de microorganismes, notamment les bactéries photosynthétiques, les décomposeurs, et les bactéries sulfato-réductrices.

Ce TP vise à offrir une expérience pratique des interactions microbiennes complexes dans un écosystème contrôlé, favorisant une meilleure compréhension des processus écologiques à l'échelle microscopique.

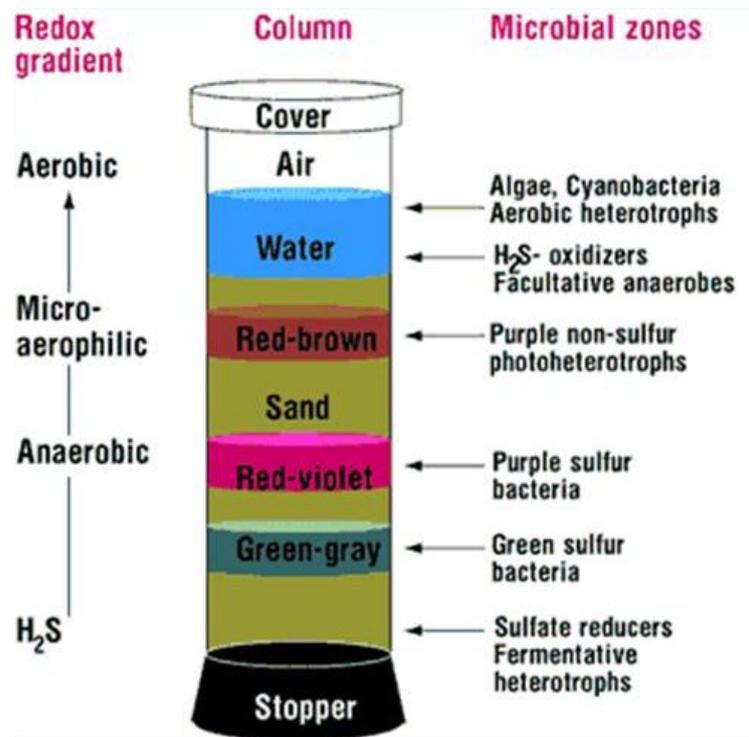


Figure 1 : La colonne de Winogradsky

Objectifs du TP

- Comprendre les principes de base de la colonne de Winogradsky en tant que modèle d'étude des écosystèmes microbiens.
- Observer la stratification des communautés microbiennes et identifier les principaux groupes fonctionnels présents.
- Analyser les gradients chimiques (oxygène, soufre, etc.) et leur rôle dans la distribution des microorganismes.
- Étudier les processus biogéochimiques, tels que la photosynthèse oxygénique et anoxygénique et la dégradation de la matière organique, à travers l'évolution des différents compartiments de la colonne.

Matériel et produits

- Eprouvette graduée ou bouteille de soda transparente de 1L
- Poudre de cellulose
- Sulfate de calcium, carbonate de calcium, phosphate dipotassique
- Boue d'eau douce ou marine
- Eau douce ou marine
- Feuille d'aluminium

Procédure

1. Mélanger 5g de cellulose dans une petite quantité d'eau.
2. Remplissez la bouteille avec le mélange de cellulose jusqu'à ce qu'il soit plein au 1/3.
3. À 200 g de boue, ajoutez 1,64 g de sulfate de calcium et 1,3 g chacun de carbonate de calcium et de phosphate dipotassique.
4. Ajoutez un peu d'eau au mélange de boue et de produits chimiques et mélangez bien les ingrédients.
5. Versez le mélange de boue dans la bouteille au-dessus du mélange de cellulose.

6. Mélangez délicatement le contenu de la bouteille. Ajouter de l'eau pour amener le niveau aux deux tiers. Assurez-vous que toutes les bulles d'air emprisonnées sont libérées.
7. Ajouter de l'eau jusqu'à ce que la bouteille soit pleine à 90 %.
8. Enveloppez complètement les côtés de la bouteille avec du papier d'aluminium pour exclure la lumière.
9. Incuber le cylindre à température ambiante pendant deux semaines.
10. Deux semaines plus tard, retirez la feuille d'aluminium et notez la couleur de la boue, particulièrement au fond.
11. Enregistrez les différences de couleur des différentes couches et l'apparence générale de l'ensemble du milieu.
12. Continuez à incuber la bouteille exposée à la lumière.
13. Examinez périodiquement le milieu à la recherche des changements de couleur qui pourraient survenir.

TP 2: Effet antagoniste de *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* regroupe des champignons filamenteux largement présents dans les sols et réputés pour leurs capacités antagonistes contre divers pathogènes végétaux. Ces champignons sont fréquemment utilisés en agriculture comme agents de biocontrôle, offrant une alternative naturelle et écologique aux pesticides chimiques. Leur mécanisme d'action repose sur plusieurs stratégies, notamment la compétition pour les nutriments et l'espace, la production de composés antifongiques, et le parasitisme direct des agents pathogènes.

Objectifs du TP

- **Observer et comprendre l'effet antagoniste de *Trichoderma* sur d'autres micro-organismes pathogènes** : Étudier la capacité de *Trichoderma* à inhiber la croissance de champignons phytopathogènes tels que *Fusarium* et *Botrytis*.
- **Analyser les mécanismes d'action de *Trichoderma*** : Identifier les différentes stratégies utilisées par *Trichoderma* pour contrôler les pathogènes, en mettant l'accent sur la compétition, l'hyperparasitisme et la production de métabolites secondaires.
- **Évaluer l'efficacité du biocontrôle par *Trichoderma*** : Comparer les résultats obtenus avec d'autres méthodes de contrôle des pathogènes et discuter les avantages et les limites de l'utilisation de *Trichoderma* en tant qu'agent de biocontrôle.

Matériel et produits

- Milieu PDA
- Culture de *Trichoderma*
- Culture d'un champignon phytopathogène
- Boîtes de Pétri

1- Test d'antagonisme par confrontation direct

- La technique est effectuée en déposant deux explants de 8 mm de diamètre constitués par l'inoculum du pathogène et celui de l'antagoniste dans une boîte de Petri contenant le milieu PDA.
- Les deux explants sont séparés de 4 cm l'un de l'autre.
- Le témoin est représenté par un repiquage du pathogène à la périphérie de la boîte.

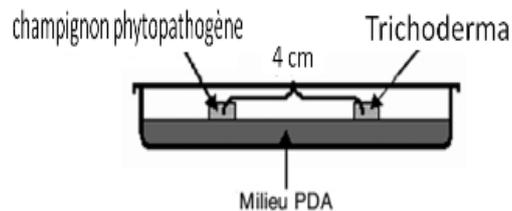


Figure 2 : Antagonisme par confrontation direct

2- Sécrétion des substances volatiles

- Un explant de 8mm de diamètre du pathogène et un autre de l'antagoniste sont repiqués chacun au centre d'une boîte de Petri contenant le milieu PDA.
- Les couvercles sont ensuite enlevés aseptiquement et les deux fonds des boîtes sont rassemblés et entourés avec une bande de parafilm en plaçant le fond contenant le pathogène en dessus de celui contenant l'antagoniste.
- De cette manière, le pathogène est exposé aux gaz émis par l'antagoniste.
- Les cultures témoins ne sont pas confrontées aux antagonistes.

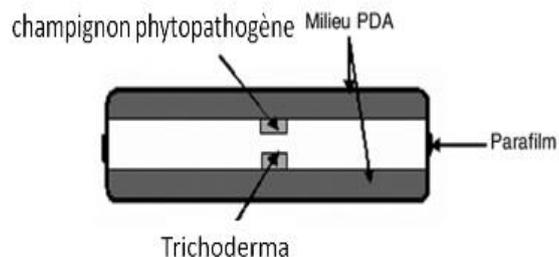


Figure 3 : Sécrétion des substances volatiles

3- Sécrétion des substances diffusibles

- Dans chaque boîte de Petri contenant du milieu PDA, une rondelle de cellophane stérile est déposée sur la surface du milieu.
- Après 24 heures, un disque de 8 mm de diamètre d'une culture jeune de Trichoderma est déposé au centre de la boîte de Petri.
- Après 48 heures d'incubation, la colonie de l'antagoniste et la rondelle de cellophane sont enlevées et un disque mycélien du pathogène est placé au centre de la boîte.
- Après 8 jours d'incubation à l'obscurité à 25°C, le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène a été calculé par rapport au témoin.

4- Mesure de l'activité antagoniste

- L'activité antagoniste est évaluée après cinq jours d'incubation à l'obscurité à 25°C.
- Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène par Trichoderma est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

D1 : est le diamètre des colonies témoin

D2 : est le diamètre des colonies en présence de l'antagoniste

TP 3 : Isolement et identification des bactéries de différents écosystèmes

Les microorganismes jouent des rôles essentiels dans divers écosystèmes, allant des sols et des eaux à l'intérieur des organismes vivants. L'isolement et l'identification des microorganismes dans différents environnements permettent de comprendre leur diversité, leur fonction écologique et leurs interactions avec d'autres organismes. Ce TP vise à exposer les étudiants aux techniques fondamentales d'isolement et d'identification des champignons et des bactéries, tout en explorant les caractéristiques uniques des communautés microbiennes dans divers habitats.

Objectifs du TP

- Apprendre les techniques d'isolement et d'identification des bactéries
- Analyse de la diversité microbienne : Comparer la diversité microbienne entre différents échantillons et discuter des facteurs environnementaux pouvant influencer cette diversité.
- Application écologique : Discuter les rôles écologiques des microorganismes identifiés dans leurs écosystèmes respectifs et leur importance pour la santé de l'environnement.

Matériel et produits

- échantillons de différents écosystèmes
- milieux de culture
- boîtes de Pétri, tubes à essai
- eau physiologique stérile
- colorants pour la coloration de Gram
- galerie de tests biochimiques

Première séance : Isolement et identification des bacilles Gram négatif

1- Isolement sélectif des bacilles Gram négatif

Les milieux les plus utilisés pour l'isolement des Entérobactéries, les Pseudomonas, Acinetobacter, Vibrionaceae sont les suivants :

- Milieu Drigalski
- Milieu Mac Conkey
- Gélose à l'Eosine et au Bleu de méthylène (EMB)
- Milieu VRBL (au cristal Violet, Rouge neutre, Bile, Lactose)

Tableau 1 : Aspect des colonies sur les milieux de cultures sélectifs

	EMB	Drigalski	Mac Conkey	VRBL
glucides	Lactose	Lactose	Lactose	Lactose
Indicateur de pH	(1)	BBT	RN	RN
Colonies	Centre foncé, aspect métallique : Lac+ Colonies incolores : Lac-	Colonies jaunes : Lac+ Colonies vertes ou bleues : Lac-	Colonies rouges : Lac+ Colonies incolores : Lac-	Colonies rouges : Lac+ Colonies incolores : Lac-

(1): l'éosine et le bleu de méthylène sont des indicateurs redox donnant l'aspect métallique aux colonies de bactéries lactose positif.

L'aspect des colonies est assez caractéristique : l'éclat métallique signe *E.coli*, le centre foncé *Klebsiella*.

Les milieux utilisés pour l'isolement de *Salmonella-Shigella* sont :

- **La gélose SS (Salmonella-Shigella) et la gélose DCL (Désoxycholate Citrate Lactose) :** Ces milieux permettent la lecture de l'utilisation du lactose (indicateur de pH : rouge neutre) et de la production d'H₂S.

Tableau 2 : Aspect des colonies sur la gélose SS (Salmonella-Shigella)

Colonies rouges	Colonies rouges à centre noir	Colonies incolores	Colonies incolores à centre noir
Bactéries lact+ E.coli, Klebsiella, Enterobacter	Bactéries lact+, H ₂ S+ Citrobacter	Salmonella H ₂ S- Shigella	Salmonella H ₂ S+ Proteus mirabilis Proteus vulgaris

- **Gélose Hektoen :** cette gélose contient trois glucides (lactose, saccharose et salicine), BBT comme indicateur de pH, la fushine et des ions de fer.

Les bactéries catabolisant un glucide ou plus donnent des colonies saumon, coloration due à l'interférence entre le BBT et la fuchsine. Les bactéries ne catabolisant aucun des glucides donnent des colonies vertes ou bleues.

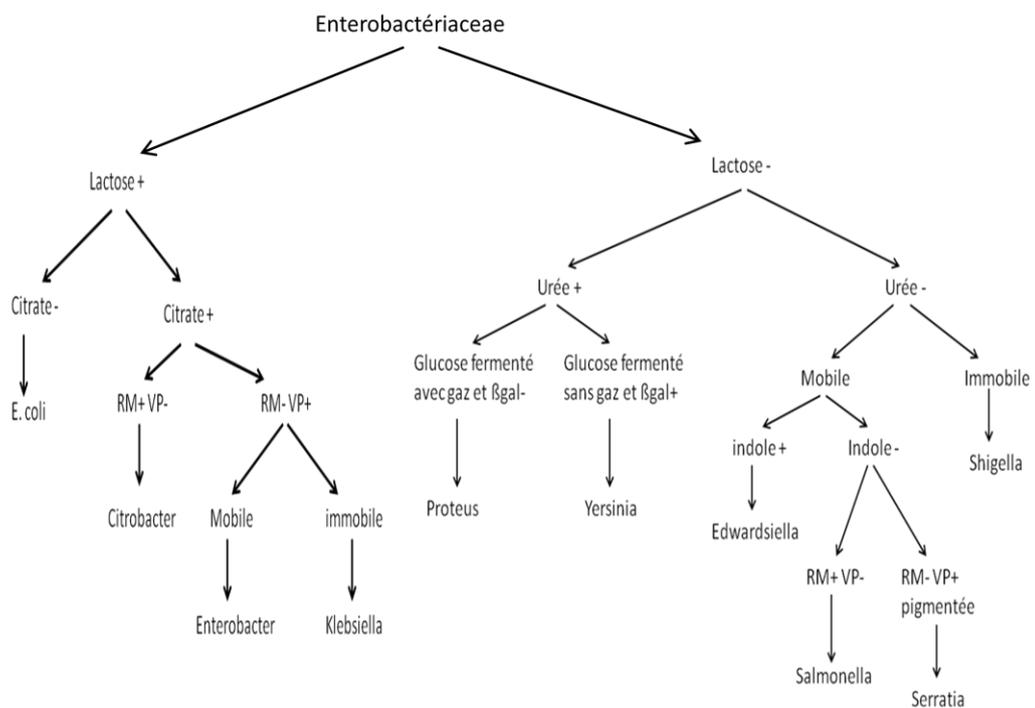
Tableau 3 : Aspect des colonies sur le milieu Hektoen

Colonies saumon	Colonies saumon à centre noir	Colonies vert-bleues	Colonies vert-bleues à centre noir
E.coli, Klebsiella, Enterobacter Yersinia	Citrobacter Proteus vulgaris	Salmonella H ₂ S- Shigella Pseudomonas	Salmonella H ₂ S+ Proteus mirabilis

2- Caractères généraux de la famille des Entérobactéries

- Coccobacilles Gram négatif
- Non exigeants
- Oxydase –
- Nitrate réductase +
- Aéro-anaérobies facultatifs
- Voie fermentaire de dégradation du glucose (avec ou sans production de gaz)

3- Clé d'identification des genres des Entérobactéries:



Manipulation



Souche X



Réaliser une suspension bactérienne



Isoler sur milieu sélectif des bacilles Gram-:
Milieu Drigalski



Etude microscopique :
Coloration de Gram



Recherche de l'enzyme respiratoire :
Oxydase

Ensemencement des milieux de la galerie de famille



- VF
- Hugh et Leifson
- Bouillon nitraté
- Gélose nutritive ordinaire

Ensemencement des milieux de la galerie du genre



- Kligler-Hajna
- Clarks et Lubs
- Urée Indole
- Mannitol-Mobilité
- Citrate de Simmons

Deuxième séance : Isolement et identification des *Pseudomonas*

1- Caractères généraux des *Pseudomonas*

- Bacilles à Gram négatif, oxydase + ;
- Aérobie stricts
- Dégradant le glucose par respiration aérobie ou inerte vis-à-vis du glucose. Ils n'attaquent pas les sucres ou les attaquent par voie oxydative et non fermentative ;
- Généralement mobiles par ciliature polaire (monotriche ou lophotriche);
- Peu exigeantes,
- Colonies souvent pigmentées :
 - La pyocyanine, pigment bleu - vert spécifique de *P. aeruginosa*.
 - La pyoverdine, vert fluorescent synthétisé par les *Pseudomonas* du groupe fluorescent.

2- Isolement sélectif des *Pseudomonas aeruginosa*

❖ Gélose au cétrimide

La gélose au cétrimide est un milieu permettant l'isolement sélectif de *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, *Serratia*, *Klebsiella* et *Acinetobacter* peuvent y cultiver. Après ensemencement, le milieu est incubé à 41°C pendant 24h avant d'être examiné, ce qui permet d'améliorer l'isolement sélectif de *Pseudomonas aeruginosa*.

Composition

- peptone de gélatine.....16,0 g
- peptone de caséine.....10,0 g
- cétrimide.....0,2 g
- acide nalidixique.....15,0 mg
- sulfate de potassium:.....10,0 g
- chlorure de magnésium.....1,4 g
- agar:.....10,0 g

Principe

- Le cétrimide agit comme inhibiteur d'une grande variété de germes, y compris les espèces de *Pseudomonas* autres que *Pseudomonas aeruginosa*.
- La production de pyocyanine (pigment bleu, non fluorescent) est stimulée en présence de chlorure de magnésium et de sulfate de potassium.
- Le milieu favorise également la production de pigments fluorescents (pyoverdines) par certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*.
- L'acide nalidixique bloque la réplication de l'ADN des germes sensibles à cet agent antibactérien.

Lecture

Les colonies produisant une pigmentation bleu vert (pyocyanine) seront considérées comme *Pseudomonas aeruginosa* confirmés. Les colonies ne produisant pas de pyocyanine, mais présentant une fluorescence sous rayonnement ultraviolet, seront considérées comme *Pseudomonas aeruginosa* présumés.

Les colonies montrant une pigmentation brun rougeâtre sans présenter de fluorescence seront également considérées comme *Pseudomonas aeruginosa* présumés.

Les colonies présumées être des *Pseudomonas aeruginosa* devront être soumises à des tests de confirmation.

❖ Milieu King A

Mise en évidence de la pyocyanine de *P. aeruginosa*. La pyocyanine bleuit le milieu.

❖ Milieu King B

Mise en évidence de la pyoverdine des *Pseudomonas* du groupe fluorescent. La pyoverdine jaunit le milieu. Les principales espèces des *Pseudomonas* groupe fluorescent :

P. aeruginosa, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, *P. chlororaphis*, *P. monteilii*, *P. simiae*.

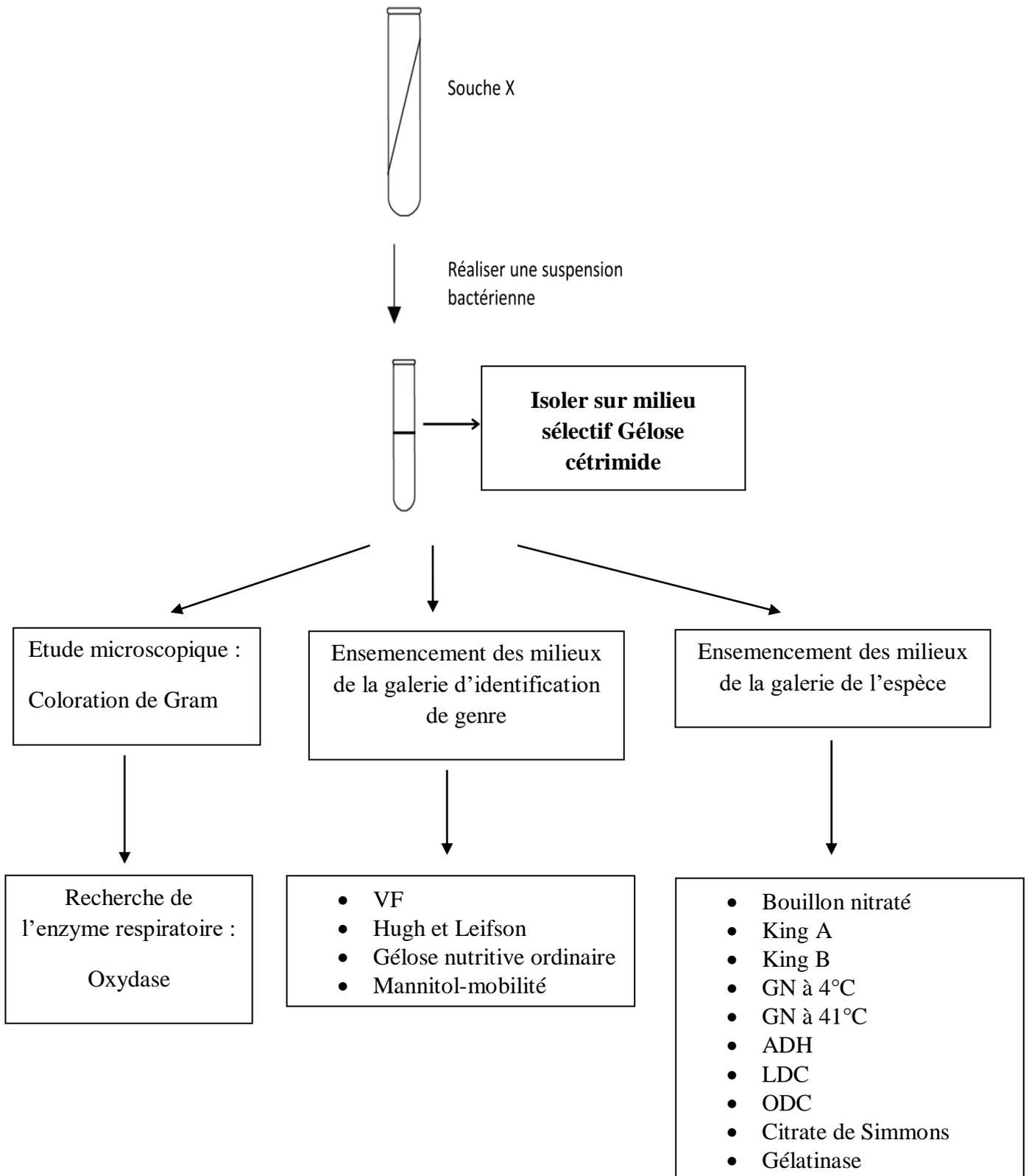
3- Caractères biochimiques de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. putida*

Les caractères biochimiques qui permettent la différenciation entre les trois espèces *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. putida* sont résumés dans le tableau suivant

Tableau 4 : Caractères biochimiques de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. putida*

Tests biochimiques	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>
Nitrate réductase	+	v	-
Croissance à 4°C	-	+	v
Croissance à 41°C	+	-	-
Pyocyanine	+	-	-
Pyoverdine	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	+
LDC	-	-	-
ODC	-	-	-
Citrate de simmons	+	+	+
Gélatinase	+	+	-

Manipulation



Troisième séance : Isolement et identification de Bacillus

1- Milieu d'isolement

Les bactéries du genre *Bacillus* cultivent bien sur milieux ordinaires dans de larges limites de température (12-45°C) et de pH (6-8,5). La plupart se développent plus vite à 30°C qu'à 37°C. Leur culture est abondante en 24h, en bouillon comme en gélose.

2- Caractères généraux de Bacillus

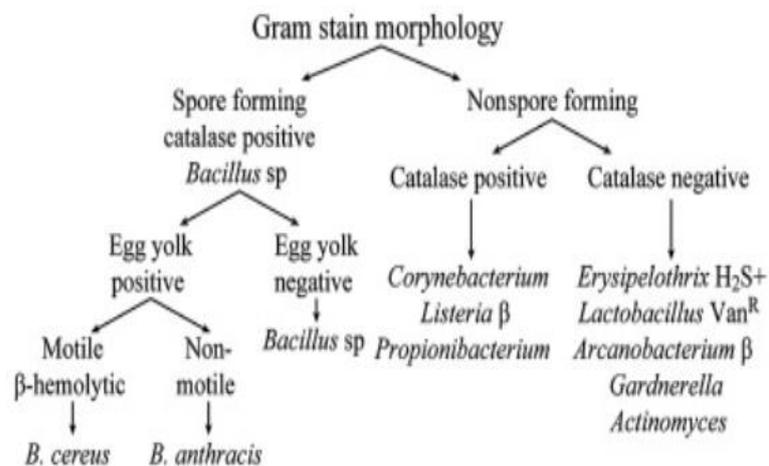
Les *Bacillus* correspondent à des grands bacilles :

- Gram +
- sporogènes
- faciles à cultiver
- aérobies stricts ou facultatifs ;
- possédant une catalase.
- Ils hydrolysent des macromolécules organiques dont la nature varie suivant leur équipement enzymatique : gélatinase, amylase, lécithinase.

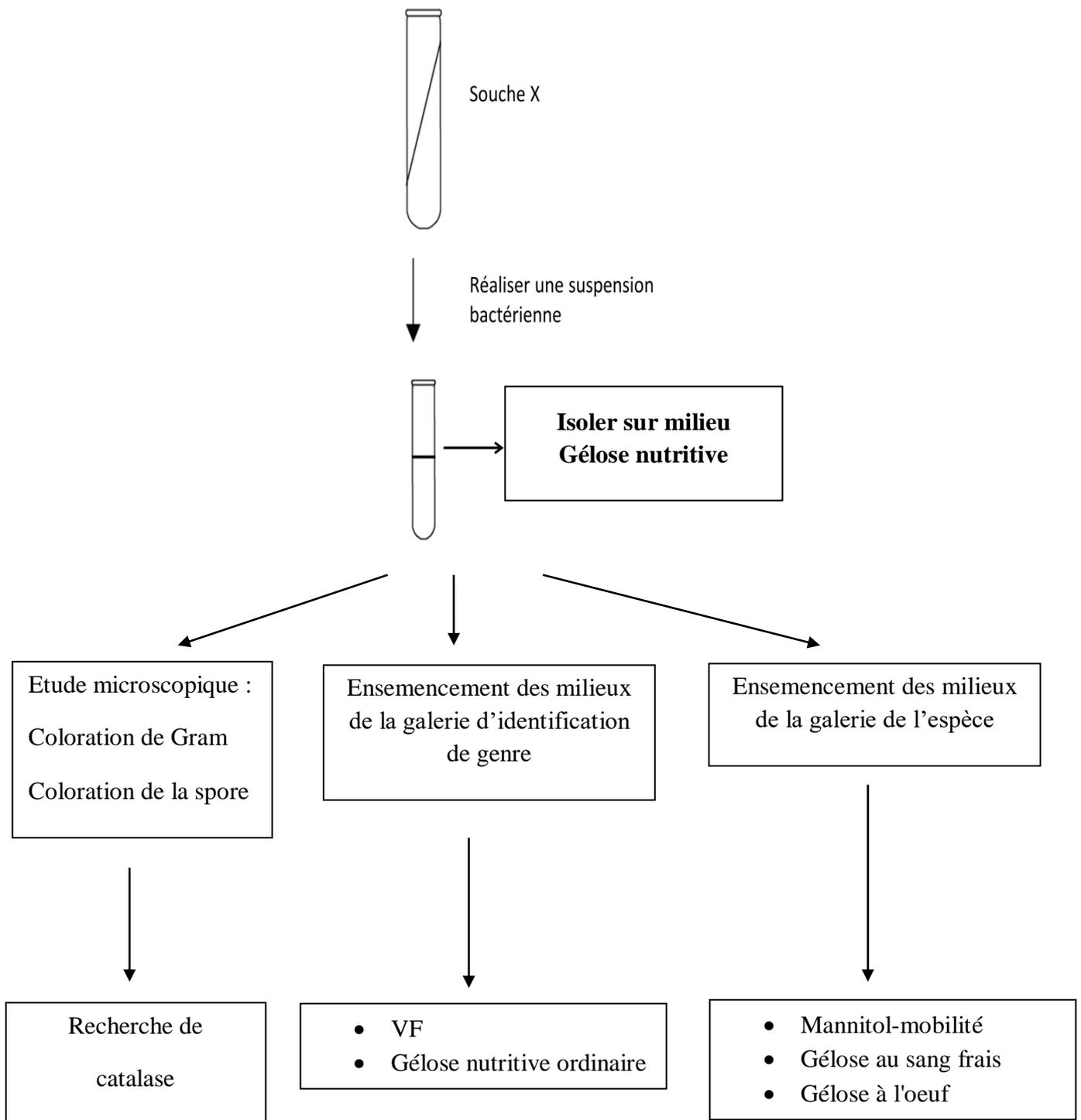
3- Clé d'identification du genre

L'obtention sur milieux ordinaires de colonies volumineuses (4 à 5mm de diamètre) formées de grands bacilles Gram +, voire variable, permet d'évoquer *Bacillus*.

La confirmation de ce genre est apportée par la mise en évidence du caractère sporogène de ces bacilles et la présence d'une catalase.



Manipulation



TP 4 : Etude de l'activité enzymatique des microorganismes

Les microorganismes jouent un rôle clé dans de nombreux processus écologiques, notamment la décomposition de la matière organique et le recyclage des nutriments. Leur capacité à produire des enzymes extracellulaires comme les cellulases, protéases, amylases et lipases leur permet de dégrader divers composés complexes en molécules plus simples, facilitant ainsi leur utilisation dans les cycles biogéochimiques. Ces enzymes sont également d'une grande importance dans des applications biotechnologiques, allant du traitement des déchets à la production industrielle de biocarburants et d'aliments. Ce TP vise à explorer l'activité enzymatique des microorganismes en mettant l'accent sur quatre enzymes majeures : cellulase, protéase, amylase et lipase.

Objectifs

1. Mettre en évidence l'activité enzymatique des bactéries isolées durant les séances précédentes.
2. Mesurer et comparer les zones d'hydrolyse pour chaque enzyme afin de quantifier leur activité.
3. Comprendre le rôle écologique des enzymes microbiennes dans la dégradation des biomolécules et leur impact sur les cycles biogéochimiques.

Procédure

L'étude préliminaire de la production des enzymes extracellulaire par les microorganismes est généralement évaluée sur milieu solide. Cette étude est basée sur l'ajout d'un substrat spécifique à chaque enzyme au milieu de culture comme source de carbone. Après inoculation et incubation des cultures, l'apparition d'un halo clair ou d'une précipitation autour des colonies indique la production d'enzyme.

1- Amylase

La production d'amylase a été étudiée sur milieu gélose nutritive additionnée de 2 g/L d'amidon soluble. Après incubation, les cultures sont inondées par une solution d'iode pour la détection d'amidon dans le milieu. L'apparition d'une zone claire autour de la colonie révèle la présence d'amylase.

- **Composition du milieu de culture**

Extrait de levure.....3g
Peptone.....5g
Amidon.....2g
Agar.....15 g
Eau distillée (qsp).....1000 ml.
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. pH 6

2- Cellulase

L'activité cellulolytique est étudiée sur milieu de culture à 1% cellulose. A la fin de la période d'incubation, les cultures sont inondées par 5ml d'iode puis rincées à l'eau distillée pour visualiser la zone d'hydrolyse.

- **Composition du milieu de culture**

KH_2PO_47g
 K_2HPO_42g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0.1g
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$1g
Extrait de levure.....0.6g
Microcrystalline cellulose.....10g
Agar.....15g
Eau distillée (qsp).....1000 ml.
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. pH 5.5

3- Protéase

L'enzyme protéase est détecté sur milieu gélose au lait contenant 30% de lait écrémé. Après incubation, la dégradation de la caséine par l'enzyme se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des colonies.

- **Composition du milieu de culture**

Lait écrémé.....300ml

Agar.....20g

Eau distillée (qsp).....1000 ml.

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

4- Lipase

L'activité lipolytique est déterminée en utilisant un milieu de culture contenant le tween 20 comme substrat lipidique. Le tween 20 est stérilisé séparément et ajoutés au milieu stérile.

Après incubation, les cultures sont mises à 4°C pendant 12h pour mieux visualiser l'apparition d'une précipitation opaque autour des colonies.

- **Composition du milieu de culture**

Peptone.....10g

NaCl.....5g

CaCl₂·2H₂O.....0.1g

Agar.....17g

Tween 20.....10 ml

Eau distillée (qsp).....1000 ml.

Autoclavage à 120°C pendant 15 minutes. pH 6. Le tween 20 est stérilisé séparément et ajoutés au milieu stérile.

5- Calcul de l'index enzymatique

L'activité enzymatique est déterminée par un index enzymatique (IE) où $IE = R/r$.

R est le diamètre de l'halo et r est le diamètre de la colonie.

Les souches qui présentent un IE égal ou supérieur à 2 sont considérées comme des bons producteurs de l'enzyme étudié.

Références bibliographiques

- Camporota, P. (1985) *In vitro* Antagonism of *Trichoderma spp.* against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomie* 5 (7): 613-620.
- Dennis C, Webster J. (1971a) Antagonism properties of species of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 57 (1) : 41-48.
- Dennis C, Webster J. (1971b) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1) : 25–39.
- Hankin L, Anagnostakis SL. (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. 67:597-607.
- Harold J. Benson H.J. (2001). *Microbiological Applications : A laboratory manual in general microbiology* (8th ed). McGraw Hill, New York, 496 pages
- Pepper I.L. et Gerba C.P. (2004). *Environmental Microbiology: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Elsevier Academic Press. 226 pages.
- Sarath G, De La Motte RS, Wagner FW. (1989) Protease assay methods. In: Beynon RJ, BondeJS, editors. *Proteolytics Enzymes: A Pratical Approach*. Oxford, UK: University Press. 1989.p. 25-54
- Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., et Whitman W. B. (Eds.). (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Vol. 3). New York: Springer.
- Whitman W. B. (Ed.). (2015). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc.