

## TP02 : Isolement et identification de quelques moisissures isolées des aliments de bétails.

### INTRODUCTION

L'isolement permet :

- d'isoler une ou plusieurs souches contenues dans un mélange : il y aura autant de colonies différentes que de souches différentes.
- de vérifier la pureté d'une souche étudiée : une souche pure ne donnera qu'un type de colonie.

#### Objectifs:

- Cultiver, isoler, visualiser, identifier les formes fongiques existantes.
- Apprendre les manipulations stériles,
- Apprendre les techniques et les démarches nécessaires aux déterminations de différents types de champignons, en étudiant en même temps, la complexité des comportements fongiques.

#### 1. MATERIEL VEGETAL : Aliment de bétails.

##### 1.2. Les milieux de cultures

Le milieu de culture utilisé pour les isolements et l'identification morphologique des principaux genres et espèces fongiques est le PDA (Potato, Dextrose, Agar). Est un milieu nutritif classiquement utilisé pour la culture la plupart des champignons microscopiques.

Extrait de pomme de terre ..... 100L  
Glucose .....20g  
Agar .....20g  
pH .....5  
Eau distillée .....1L

##### 1.3. MATERIEL UTILISES :

- Agitateur magnétique
- Autoclave
- Balance
- Bec benzen
- Etuve
- Microscope optique
- Boîtes de Pétri
- Erlenmeyers
- Béchers
- Pipettes
- Les gants de laboratoire
- Les bavettes.
- lame porte objet pour microscopie et Lamelles couvre objets pour microscopie.
- Solution bleu coton : cette solution est utilisée pour l'observation microscopique des structures fongiques.

## 2. Isolements et dénombrement de la flore fongique :

L'isolement et le dénombrement de la flore fongique associée a été réalisé par deux techniques d'isolement :

**2.1. La méthode de dilution (indirecte)** Les isolements des moisissures dans les échantillons ont été réalisés selon la technique des suspension-dilutions et ensemencement sur milieu gélosé.

5g de l'échantillon broyé sont additionnés à 45 ml d'eau physiologique, Ensuite, 1 ml de cette dernière est ajouté à 9ml d'eau physiologique stérile pour avoir la dilution  $10^{-1}$ , (Fig 01)

Des boites Pétri contenant le milieu PDA, sont ensemencées avec 0.1ml des dilutions et l'incubation dure 5 à 7jours à 28 °C à l'obscurité. (Fig 02).

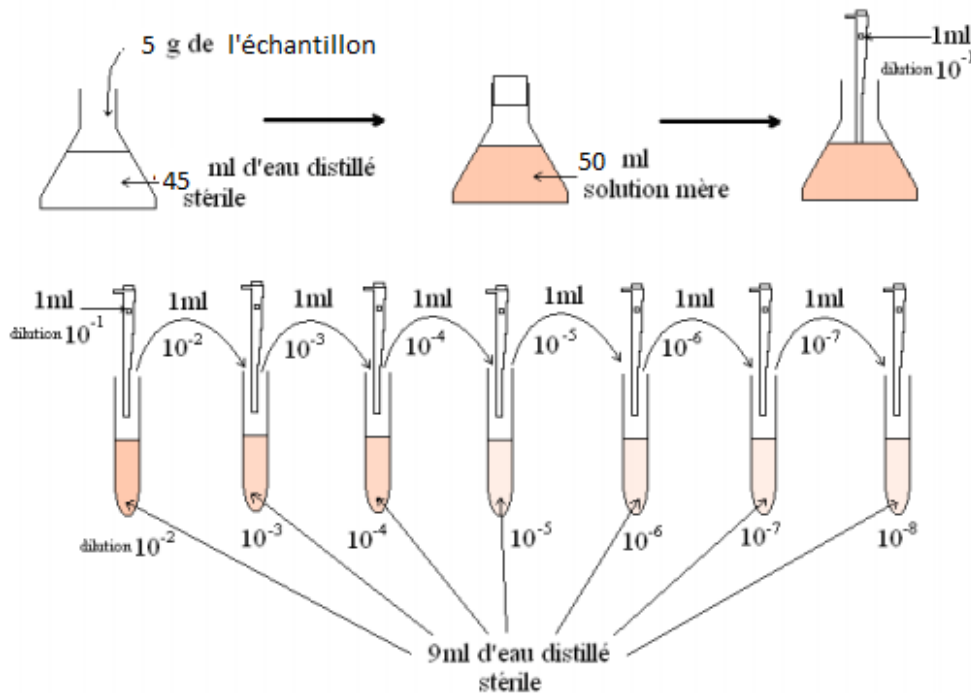


Figure 1 : Procédé de dilution de l'échantillon.

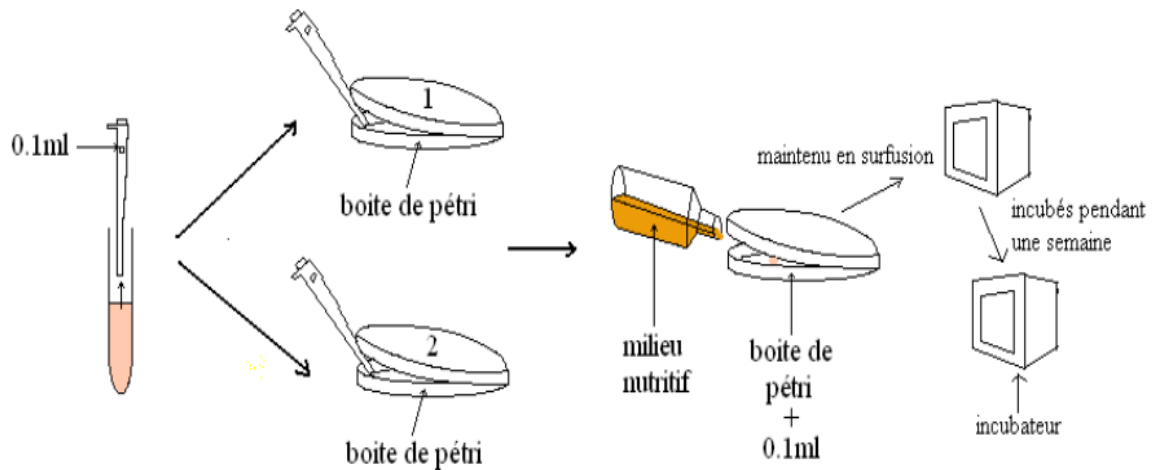


Figure 2 : Procédé d'ensemencement

## 2.2. Méthode directe (Direct Plating=méthode directe d'ulster) :

Elle consiste à ensemercer les grains ou l'aliment directement sur le milieu d'isolement.

## 3. Identification morphologique des isolats fongiques :

**3.1. Identification macroscopique** : Pour l'observation macroscopique des moisissures, il est nécessaire de caractériser ces isolats sur le milieu (PDA) par :

✓ **L'aspect des colonies** : qui représente un critère clef d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses.

✓ **La couleur des colonies** : c'est un élément très important d'identification. Les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, crème, jaune, orange, brun allant jusqu'au noir. les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*).

L'observation des colonies des champignons qui se sont développés se fait tout d'abord à l'œil nu, puis à la loupe binoculaire dans le but de déterminer s'il s'agit d'un *Aspergillus*, d'un *Penicillium*, ou d'un autre genre en fonction des caractères morphologiques du mycélium.

**Remarque :** Parmi les champignons en croissance, les moisissures de genre *Aspergillus* sont repérées visuellement à la surface de la gélose par leur forme et leur couleur caractéristiques.

**3.2. Identification microscopique :** L'observation microscopique se base sur le mode de groupement des conidies (spores) et l'ornementation, cela se fait par deux méthodes :

**3.2.1. Préparation microscopique ordinaire :** On utilise une aiguille d'inoculation pour récupérer une petite partie de la colonie comportant les structures conidiogènes. L'échantillon est prélevé sur la bordure de la colonie car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif. Puis déposées sur une lame « mouillées » avec une goutte d'eau puis on pose une lamelle de couverture. On procède ensuite à l'examen au microscope photonique (X40 et X100).

**L'étude microscopique comprend :**

- ❖ Le type de mycélium
- ❖ La forme des conidies (ovales, en aiguille ...)
- ❖ La Couleur des conidies

**3.2.2. Préparation microscopique à l'aide d'un ruban adhésif transparent :** Une technique astucieuse peut parfois être utilisée. Elle consiste à effectuer le prélèvement à l'aide d'un morceau de ruban adhésif transparent que l'on plaque légèrement à la surface de la culture et au bord de la colonie, puis que l'on colle sur une lame de microscope, l'observation microscopique se fait au grossissement (X40 et X100). Les moisissures sont identifiées d'après leurs caractères morphologiques, l'aspect des colonies, leur couleur ainsi que les renseignements retenus lors de l'observation au microscope photonique.

### **Travail à faire**

**1/ Dessinez les types de mycéliums observés à l'aide du microscope ?**

**2/ Observez sous microscope et dessinez les différentes formes de moisissures ?**

**2/Identifiez les genres trouvez ?**