

### Mise en situation et recherche à mener

L'introduction de légumineuses dans les systèmes de cultures associées est un pas important vers la mise en œuvre de pratiques agricoles durables. Les légumineuses contribuent naturellement à l'enrichissement des sols et à l'accroissement du rendement des cultures. Ceci réduit par conséquent l'apport d'engrais azotés, ce qui diminue le risque de pollution du sol et de l'eau.

**On cherche à expliquer pourquoi on peut limiter l'apport d'intrants (engrais azotés) en introduisant les légumineuses dans les systèmes de culture.**

### Ressources

#### Informations :

- Il existe des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique, libres ou en association avec des organismes plus complexes (animaux, végétaux). Certaines, du genre *Rhizobium* vivent librement dans les sols où les légumineuses ont été cultivées mais ne fixent l'azote atmosphérique qu'une fois associée à la légumineuse avec laquelle elle est compatible.
- Particularités observables au niveau des racines des légumineuses : les nodosités.
- Dans un sol enrichi en azote, les légumineuses ne fabriquent pas de nodosités.
- Cultivées dans un sol stérilisé, les légumineuses ne fabriquent pas de nodosités.



#### Matériel disponible :

- plant d'ail dépourvu de nodosités
- légumineuse utilisée dans la *culture associée* en agriculture (trèfle)
- Lames et lamelles, microscope, vidéomicroscopie, fiche technique utilisation du microscope
- Bleu de méthylène permettant de colorer des bactéries

### Etape A : Concevoir une stratégie et mettre en œuvre un protocole de résolution pour résoudre une situation problème

**Proposer une stratégie de résolution réaliste** permettant de vérifier que les légumineuses sont capables de s'associer avec des bactéries du sol pour prélever de l'azote atmosphérique.

*Dire ce que je veux expliquer, ce que je fais, comment je le fais et quels sont les résultats que je devrais obtenir.*

## Protocole

**Mettre en œuvre le protocole** fourni afin de vérifier que les racines de légumineuses sont associées à des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique : chaque élève du binôme réalise une préparation (niveau 1 ou 3, et niveau 2)

### Niveau 1 : observer au microscope un frottis de nodosité de trèfle :

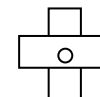
- Observer au microscope : faire le premier réglage au grossissement 40 en utilisant la vis macrométrique, puis changer progressivement les objectifs jusqu'à x400 en ajustant la netteté avec la vis micrométrique pour chaque objectif et l'éclairage.

### Niveau 2 : Préparation microscopique à partir de racine d'ail :

- Prélever avec une pince un morceau d'1 cm de racine d'ail, le déposer dans un verre de montre et ajouter du bleu de méthylène ; laisser agir 3 minutes
- Déposer le morceau de racine coloré au bleu de méthylène sur une lame dans de l'eau distillée, recouvrir d'une lamelle et essuyer l'eau en excès avec un petit morceau de sopalin
- Observer au microscope : faire le premier réglage au grossissement 40 en utilisant la vis macrométrique, puis changer progressivement les objectifs jusqu'à x400 en ajustant la netteté avec la vis micrométrique pour chaque objectif et l'éclairage.

### Niveau 3 : Préparation microscopique à partir de racine de trèfle :

- Prélever avec une pince un morceau de racine de trèfle avec une nodosité.
- Couper la nodosité en deux avec la lame de rasoir, déposer un morceau sur une lame de verre puis l'écraser avec une autre lame placée dessus perpendiculairement
- Enlever les plus gros morceaux avec une pince puis laisser sécher le morceau de nodosité (frottis) quelques minutes
- Fixer le frottis en versant de l'alcool à 100° dessus (poser la lame sur un verre de montre) ; attendre 5 minutes puis égoutter la lame et laisser l'alcool s'évaporer
- Ajouter du bleu de méthylène et attendre 3 minutes
- Rincer à l'eau distillée, laisser sécher et observer au microscope : faire le premier réglage au grossissement 40 en utilisant la vis macrométrique, puis changer progressivement les objectifs jusqu'à x400 en ajustant la netteté avec la vis micrométrique pour chaque objectif et l'éclairage



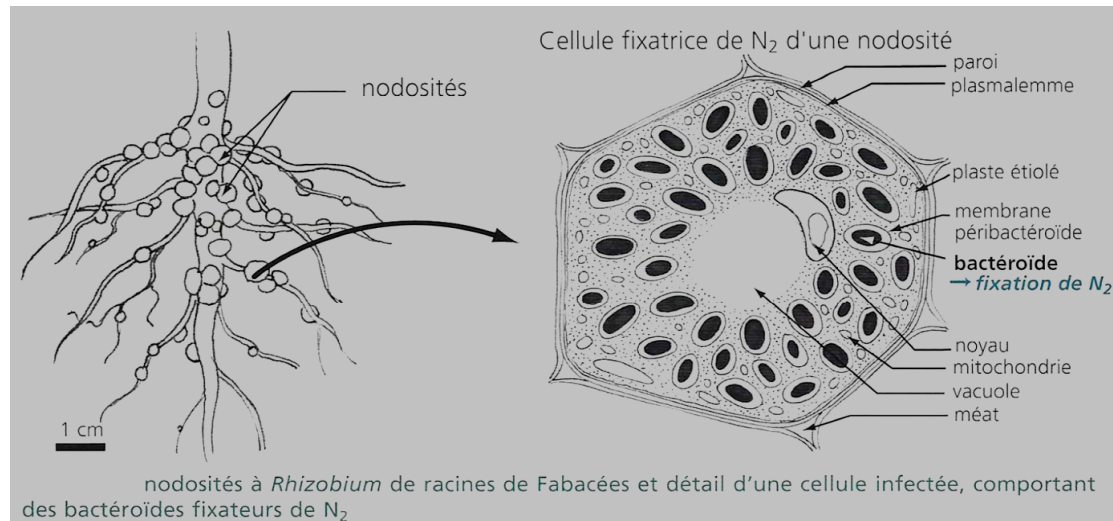
**Etape B: Présenter les résultats pour les communiquer et les exploiter pour répondre au problème**

**Présenter et traiter les données brutes pour qu'elles apportent les informations nécessaires à la résolution du problème :**

Pour réaliser une photo de la préparation microscopique : utiliser la fiche technique du logiciel de vidéomicroscopie  
réaliser un imprim écran et coller l'image sur un fichier Word vierge. titrer et légender les photos (préciser l'objectif de grossissement utilisé)

**Exploiter les résultats obtenus et les ressources documentaires complémentaires pour expliquer** comment les légumineuses associées à des bactéries au niveau de nodosités racinaires sont capables de prélever plus d'azote qu'une plante classique sans nodosité et permettent d'améliorer le rendement d'une culture sans utiliser d'engrais azoté.

Ressources documentaires complémentaires :



D'après MEYER et al.

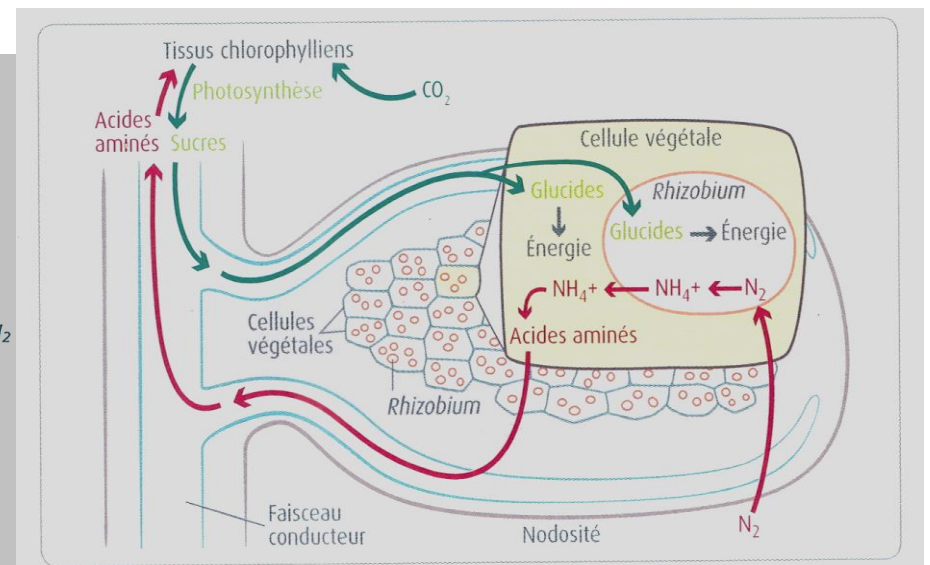


Schéma simplifié du mécanisme de fixation de  $N_2$  lors de la symbiose légumineuse et bactérie *Rhizobium*

MATERIEL LABO :

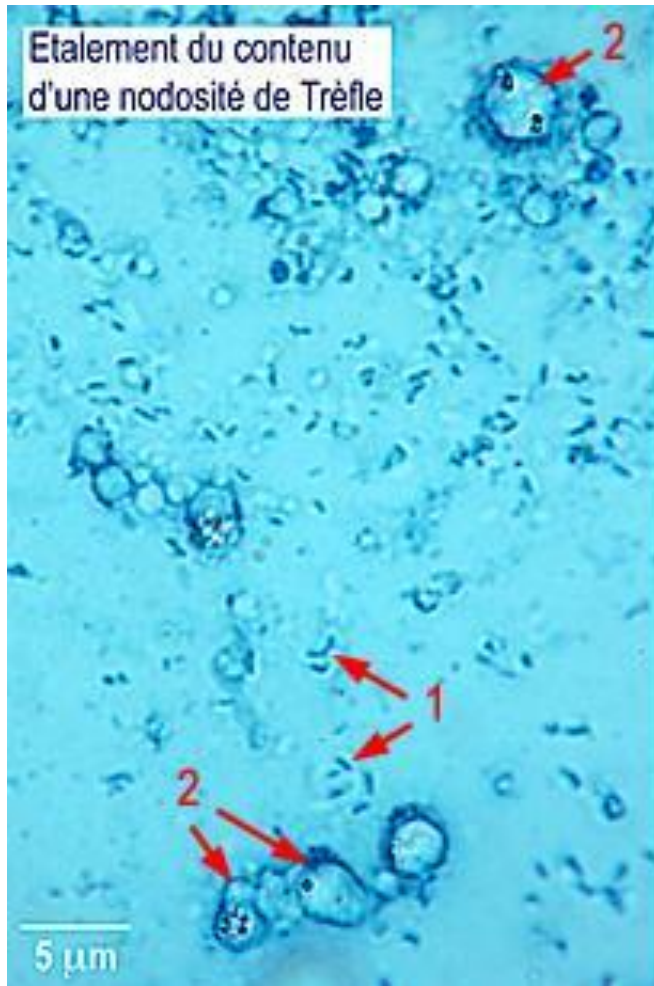
- Faire germer de l'ail 8 jours minimum avant la séance pour obtenir de grandes racines, ramasser du trèfle en prélevant bien l'appareil racinaire (bactéroïdes ronds dans nodosités)

Par binôme :

- Bleu de méthylène, alcool **100°**, eau distillée
- Quatre lames, 2 lamelles, un papier absorbant, deux verres de montre
- Lame de rasoir, 2 pinces fines

**Document de secours étape B :**

Observation de nodosités avec bactéries au microscope optique,  
après dissociation et étalement du contenu de la nodosité



- 1 : bactéroïde (bactérie modifiée par la vie intra cellulaire)  
2 : grain d'amidon