

# Ecologie microbienne des sols

## Intro

### CHAPITRE 1 : Micro-organismes et rôles dans les cycles de l'azote et du carbone

#### I Décomposition des matières organiques des sols

- 1 Cycle du carbone
- 2 Rôle des microorganismes du sol
- 3 Conditions environnementales

#### II Ammonification

- 1 Cycle de l'azote
- 2 Ammonification
- 3 Nitrification
  - a. Les étapes
  - b. Les bactéries nitrifiantes
  - c. Conditions environnementales

#### III Dénitrification

1. Les pertes d'azote dans le sol
2. Mécanismes de la dénitrification
3. Conditions environnementales
4. Conséquences pour l'environnement et pour la production

#### IV Fixation biologique de l'azote

1. Introduction
2. La fixation libre et associative (non symbiotiques)
3. La fixation symbiotique
  - a. Les symbioses à nodules chez les légumineuses
  - b. Les symbioses actinorhiziennes
4. Conséquences sur la production végétale

$\text{NH}_3$  ammoniac

$\text{NH}_4^+$  ammonium

nitrification = nitrification (par les nitroso) + nitratation (par les nitro)

## CHAPITRE 2 : Micro-organismes et fonctionnement des écosystèmes

### I Fonctionnement d'un agroécosystème : rôle des microorganismes du sol

#### II Le rôle des champignons du sol

1. Les champignons et la qualité du sol
2. Les mycorhizes

#### III Systèmes de culture et fonctionnement microbien du sol

1. Influence des pratiques culturales sur les micro-org
2. Les différents bio-agresseurs
3. Le piétin-échaudage : un modèle possible pour comprendre le fonctionnement microbiologique d'un sol cultivé.

### Conclusion

# Écologie microbienne des sols



↳ enseignant chercheur  
biologie, agric. bio, biocénose

## Écologie microbienne des sols

**Introduction: Le sol, un milieu vivant**

**Chapitre 1: Microorganismes et rôles dans les cycles de l'azote et du carbone**

- I. Décomposition des matières organiques des sols
- II. Ammonification et nitrification
- III. Dénitrification
- IV. Fixation biologique de l'azote

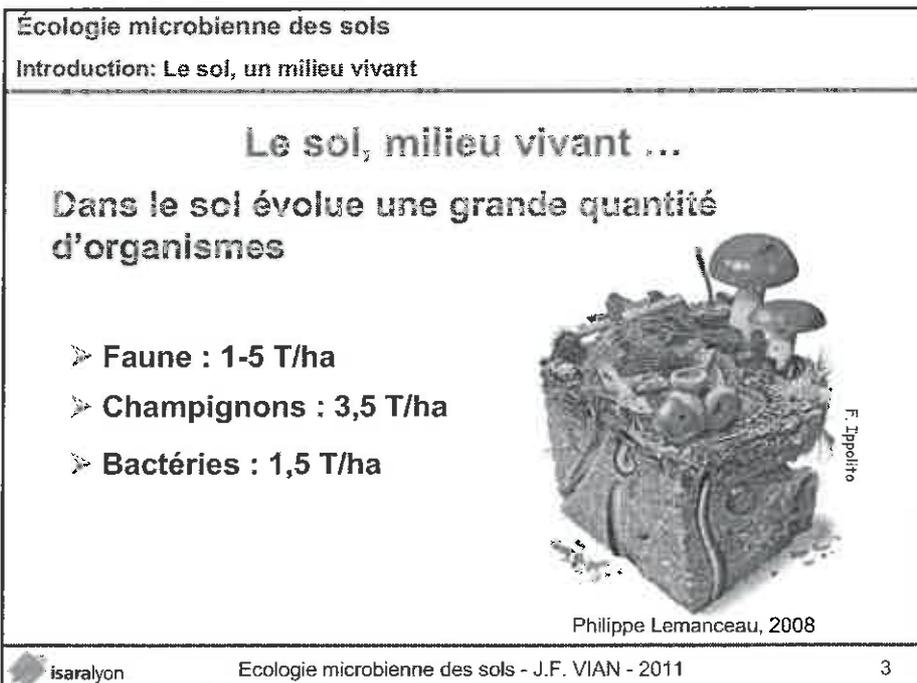
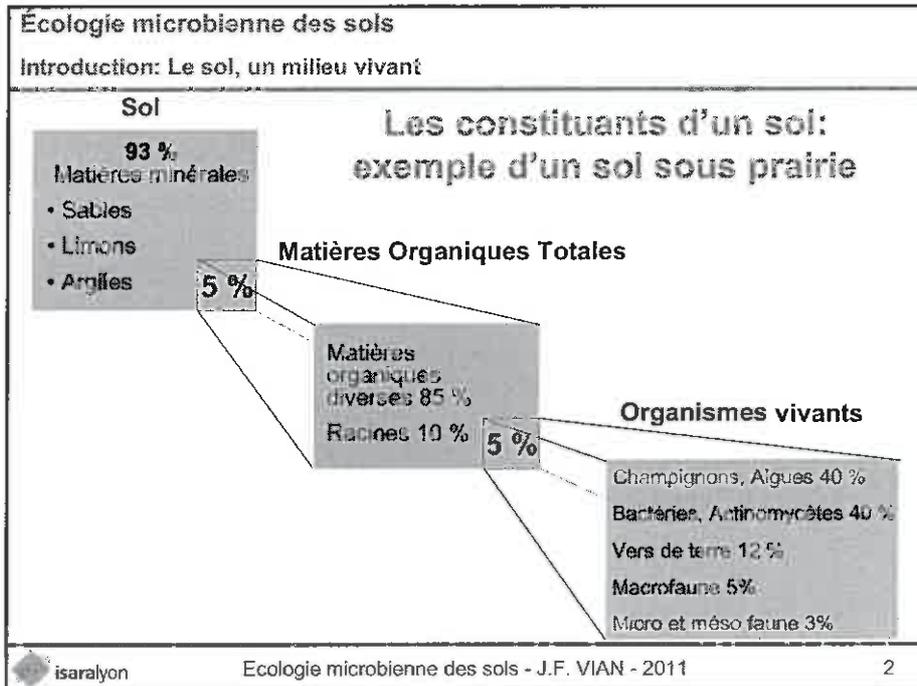
**Chapitre 2: Microorganismes et fonctionnement des écosystèmes**

**Chapitre 3: Appréhender le fonctionnement microbien des sols**

Sol

93% minéraux  
5% NO

↓  
dont 5% d'organismes vivants



### Quelques ordres de grandeur

organisme	Nombre / g sol
protozoaires	$10^4 - 10^6$
algues	$10^2 - 10^4$
bactéries	$10^8 - 10^9$
champignons	$10^4 - 10^6$

Dans une cuillère à café de terre!

☺ 50 à 250 mètres d'hyphes fongiques par g de sol



↑ une cuillère de terre

### A l'échelle de l'hectare

- >  $3 \cdot 10^{18}$  bactéries
- > 150 millions de km d'hyphes fongiques
- ⇒ de 100 à 1000 kg de C / ha
- ⇒ de 5 à plus de 50 t/ha de matière vivante !

**Biomasse bactérienne**  
 > Biomasse des autres êtres vivants  
 ≈ 1/2 biomasse terrestre

Bisson et al., 2007

hyphes = filaments mycéliens

### Le sol constitue un réservoir exceptionnel de biodiversité

➤ Jusqu'à un passé récent : accès uniquement aux microorganismes cultivables



→ Avant, avec méthodes pasteur, seuls 1% des org repérables

→ Now, c'est mieux

➤ Progrès méthodologiques  
⇒ maintenant accès à l'ADN microbien du sol

- ⇒  $10^4$  génotypes bactériens / g sol
- ⇒ abondance relative des différents génotypes



→ Finger print, empreinte (m) de

Écologie microbienne des sols  
Introduction: Le sol, un milieu vivant

**Les microorganismes du sol contribuent à la qualité du sol, de l'air et de l'eau**

Philippe Lemanceau, 2004  
Laurent Philippot

isaralyon Ecologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011 6

Rôles des org :

- minéralisent
- structure
- contre pathogènes
- cycle C
- cycle N
- biodegrad° des pesticides
- ↳ limite des méfaits humains sur la qualité de l'eau

FAIS

- produc° des gaz à effet de serre

ce qui revient à dire

↓

Écologie microbienne des sols  
Introduction: Le sol, un milieu vivant

**Des fonctions clés dans les cycles biogéochimiques: effets positifs** 😊

- Transformation des matières organiques (végétaux et animaux) et de la roche mère
- Contrôle des cycles des bioéléments (C, N, S, Fe...)  
⇒ nutrition végétale
- Protection des plantes contre certains pathogènes ou parasites
- Symbioses
- Dépollution des eaux, du sol

isaralyon Ecologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011 7

effets +

- + transfo MO
- + cycle éléments
- + protégent végé
- + symbioses
- + dépollution

## Des fonctions clés dans les cycles biogéochimiques: effets négatifs



- Maladies
- Pollution des eaux par les nitrates
- Emission de gaz à effet de serre ( $N_2O$ ,  $CH_4$ ...)

◆ Forte influence sur la nutrition et la productivité végétale d'un agro/écosystème

effets -  
- maladies  
- pollution  
- gaz à effets de serre

## Le sol un milieu vivant et dynamique caractéristique d'un écotone

Interface entre le monde minéral et organique le sol est un véritable écotone

◆ Diversité énorme, immense réservoir de gènes et donc de fonctions à l'origine de tâches aussi importantes que méconnues

→ beaucoup + riche en diversité que les mondes minéraux et végétaux

## Écologie microbienne des sols

### Chapitre 1: Microorganismes et rôles dans les cycles de l'azote et du carbone

#### I. Décomposition des matières organiques des sols

1. Cycle du carbone
2. Rôle des microorganismes du sol
3. Conditions environnementales

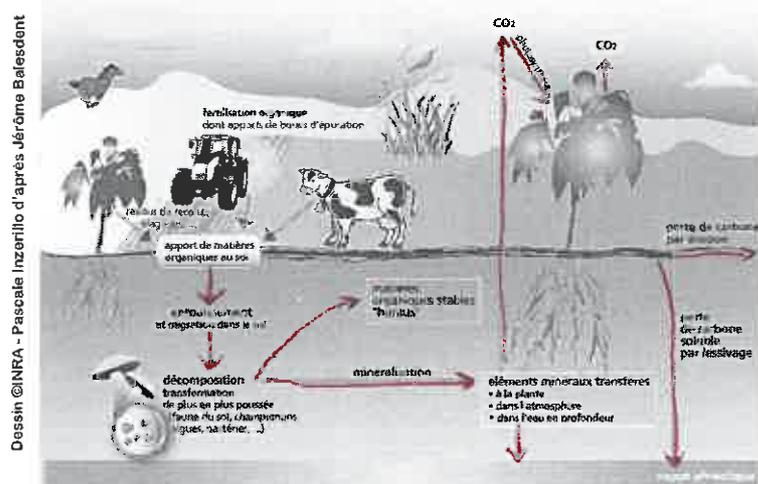
#### II. Actinomyces et «fortifiants»

#### III. Denitrification

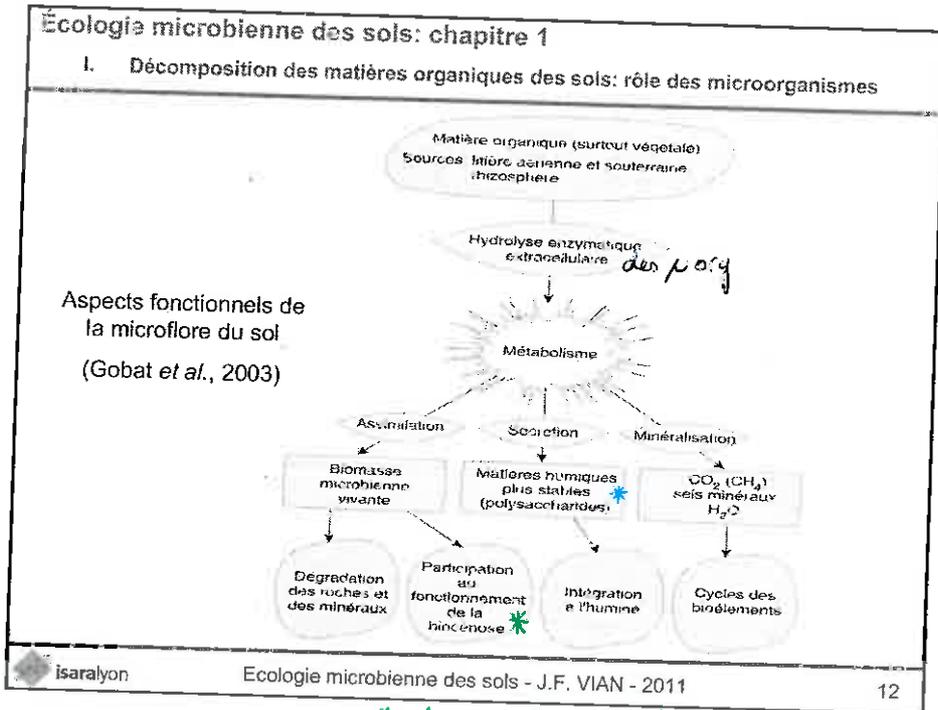
#### IV. Fixation biologique de l'azote

## Écologie microbienne des sols: chapitre 1

### I. Décomposition des matières organiques des sols: cycle du carbone



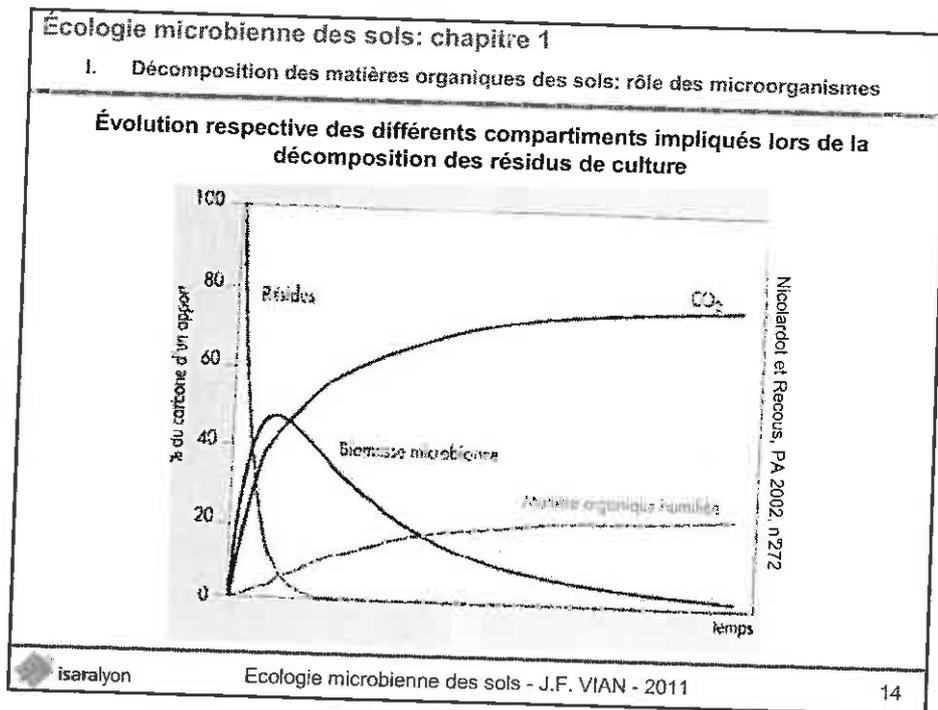
humus → stabilité structurale, ↑ CEC...



en anaérobiose, peu de minéralisation  
 ⇒ pas de minéraux pour les cultures

mouillages microbiens  
 → stabilité ~~est~~ complexe argilo-hu

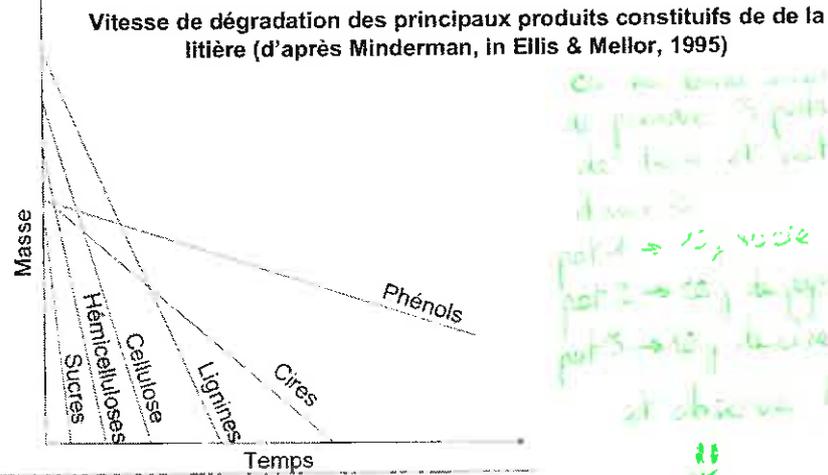
\* échanges de productions avec une plante! !!



CO<sub>2</sub>, le révélateur ultime!

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

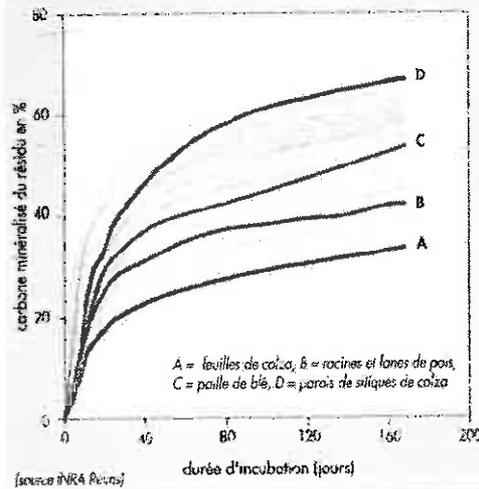
I. Décomposition des matières organiques des sols: rôle des microorganismes



Écologie microbienne des sols: chapitre 1

I. Décomposition des matières organiques des sols: rôle des microorganismes

Minéralisation du carbone de 47 différents résidus de culture mesurée par incubation de sol en conditions contrôlées



Nicardrot et Recous, PA 2002, n°272

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

I. Décomposition des matières organiques des sols: rôle des microorganismes

Rapport C/N de différentes matières organiques		
Urée		0,3
Jus d'extraction de jusse		2,9 - 3,3
Déchets d'abattoir soviés		1
Ung		1
Matières fécales animales		8 - 10
Matières végétales riches		1
Humus terre noire		10
Grain		10
Fientes de volailles		10
Déchets d'industries chimiques		25
Fientes de ferme après 3 mois de stockage		25
Fientes de lapins		32
Laitues		14 - 20
Fientes de nos porcs en paille		28
Déchets de cuisine		10-25
Compost soviés		24
Aiguilles de pin		20
Fientes de ferme fraîche avec ajout de paille abondant		30
Touche soviés		30
Feuilles d'arbres (à la chute)		20-30
Déchets secs de plantes		20-30
Touche blonde		50
Paille de céréales		9 - 150
Paille d'avoine		40
Paille de seigle		85
Terre		100-150
Paille de blé		150
Esquis		150
Sucres de bois (de sapin)		200
Sucres de bois (de hêtre) (grain) (soviés)		150 - 200

+  $\frac{C}{N}$  est grande  
+ la dégradation sera lente

car pas assez d'azote, pas de  $\mu$ org

l'azote = le carburant des microbes!

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

I. Décomposition des matières organiques des sols: conditions environnementales

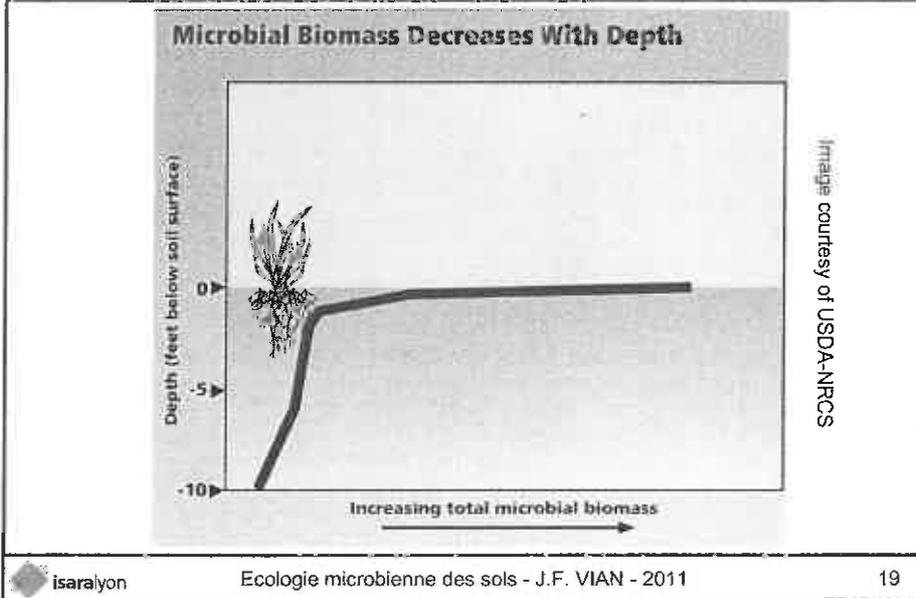
Les conditions environnementales modifient les vitesses de minéralisation des matières organiques des sols :

- ↳ dépend de :
- teneur en eau du sol (il leur faut de l'eau de l'air)
- aération (porosité)
- température
- teneurs en N minéral dans le sol (soit dans la matière C, soit dans le sol)
- protection physique des MOS (quand elles sont coincées dans des agrégats les MO)

Dans la rhizosphère,  
bcp de porq

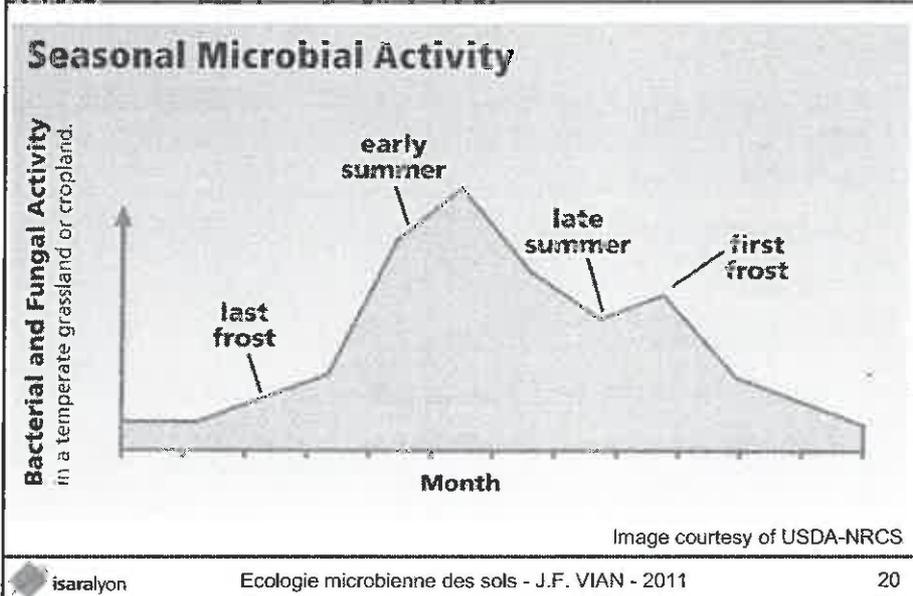
Écologie microbienne des sols: chapitre 1

I. Décomposition des matières organiques des sols: conditions environnementales



Écologie microbienne des sols: chapitre 1

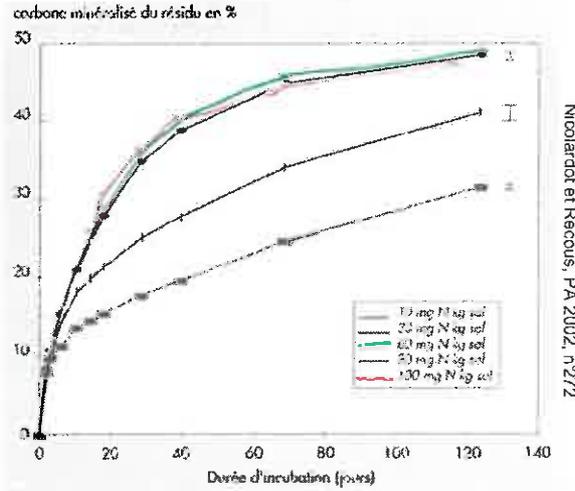
I. Décomposition des matières organiques des sols: conditions environnementales



Écologie microbienne des sols: chapitre 1

I. Décomposition des matières organiques des sols: conditions environnementales

Effet de la teneur en N minéral du sol sur la décomposition d'une paille blé mesurée en incubation

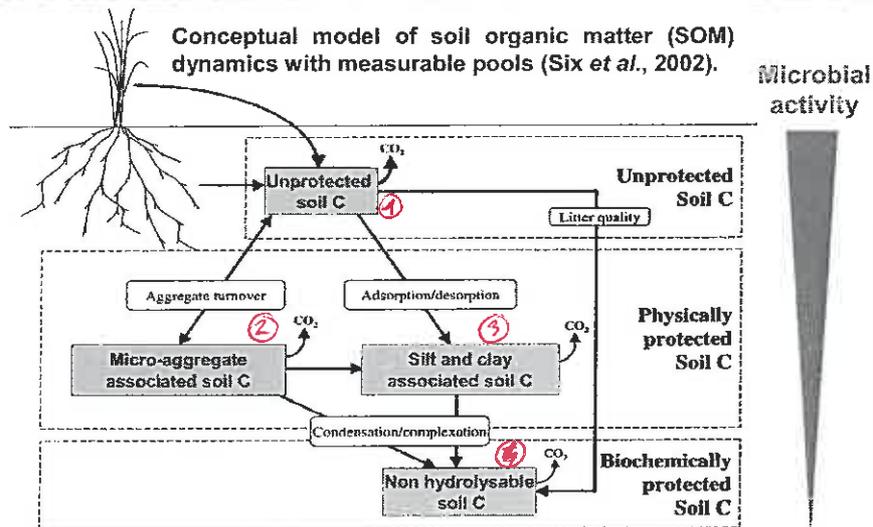


C'est la soeur la paille de blé!

Tant qu'y a de l'azote, y a de l'espoir!

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

I. Décomposition des matières organiques des sols: rôle des microorganismes



① NO relativement libre, facile d'accès pour les porg → bec CO<sub>2</sub> rejeté

②/③ associations de la NO, début de complexation de + en + petites, complexes à dégrader → moins de CO<sub>2</sub> rejeté

④ complexation de la NO, dur à dégrader pour les porg

→ Retenir que rôle des porg dans le cycle C (soit de la NO!) les conditions

## Écologie microbienne des sols

### Chapitre 1: Microorganismes et rôles dans les cycles de l'azote et du carbone

#### I. Décomposition des matières organiques des sols

#### II. Ammonification et nitrification

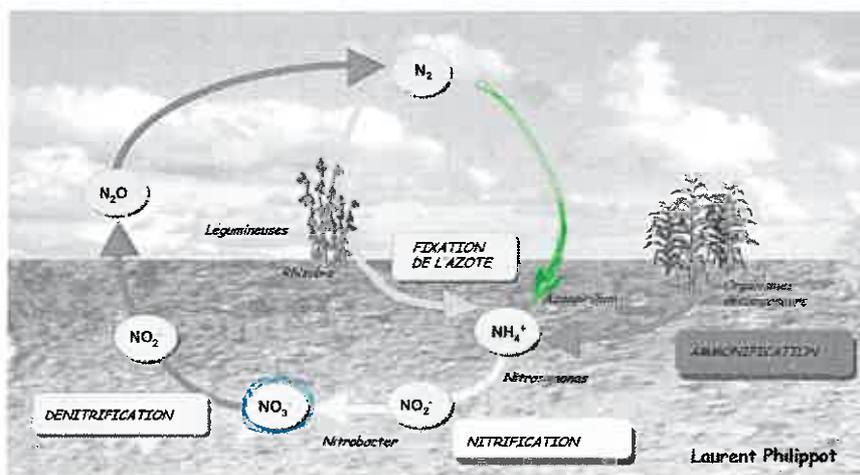
1. Cycle de l'azote
2. Ammonification
3. Nitrification
  - a. Les étapes
  - b. Les bactéries nitrifiantes
  - c. Conditions environnementales

#### III. Dénitrification

#### IV. Fixation microbienne de l'azote

## Écologie microbienne des sols: chapitre 1

### II. Ammonification et nitrification: cycle de l'azote

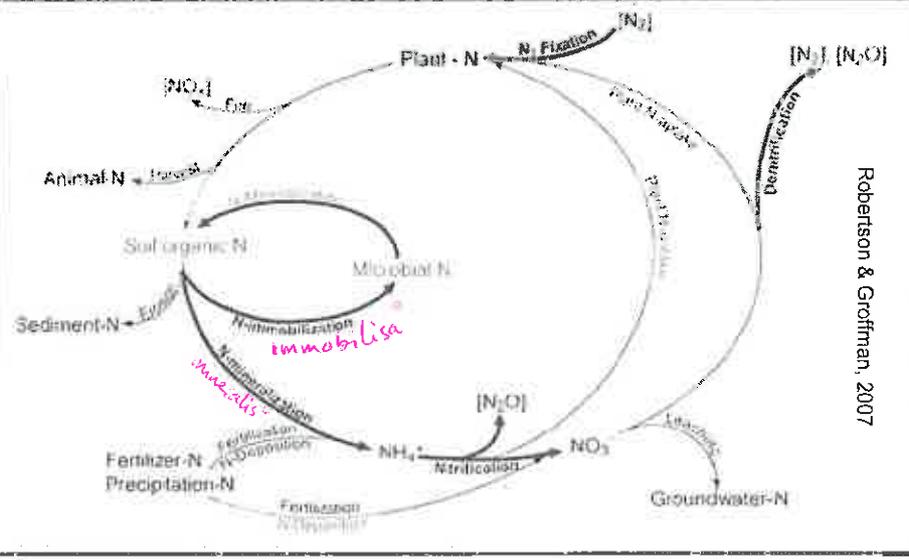


Philippe Lemanceau, 2008

$NO_3^-$  → idéal pour nourrir les plantes

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

II. Ammonification et nitrification: cycle de l'azote



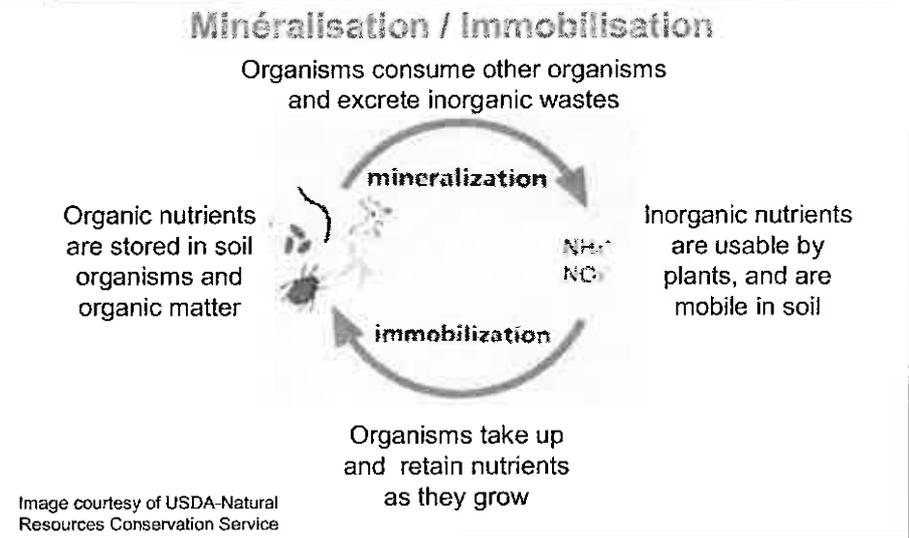
← super cycle à copier ds le mots en -vrac

Robertson & Groffman, 2007

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

II. Ammonification et nitrification: cycle de l'azote

ammonification:



Écologie microbienne des sols: chapitre 1

II. Ammonification et nitrification: ammonification

**Ammonification:** processus de transformation oxydative des formes azotées contenues dans la MO (acides aminés, protéines...) en ammoniac (NH<sub>3</sub>) ou ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)

⇒ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: source principale d'azote pour les microorganismes et les champignons

⇒ la plupart des plantes l'assimilent mal, \* elles ont besoin de nitrate qu'elles utilisent par le biais de la *réduction assimilative* et qui leur est fournit par les bactéries de la *nitrification*

⇒ sources organiques très diverses

⇒ Microorganismes très variés (*Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*...)

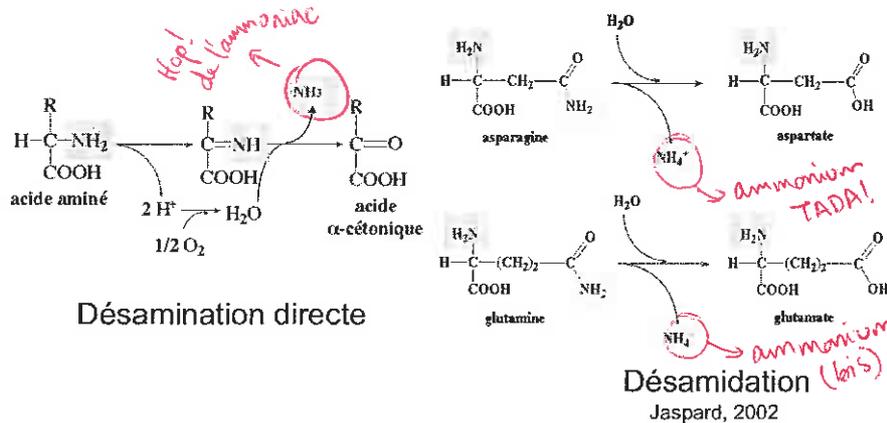
\* des plantes en Afrique par expt en sont capables

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

II. Ammonification et nitrification: ammonification

Les réactions

- Hydrolyse des polymères (protéases) en polypeptides et amino-acides
- Désaminations aérobie ou non



**Nitrification:** oxydation microbienne des formes réduites de l'azote dans le sol ( $\text{NH}_3$  et  $\text{NH}_4^+$ )

- ⇒ 2 étapes successives: nitritation / nitratisation
- ⇒ 2 groupes bactériens impliqués: bactéries nitreuses et bactéries nitriques
- ⇒ bactéries autotrophes et aérobies obligatoires
- ⇒ nitrification hétérotrophe peut être réalisée par les champignons (*Aspergillus flavus*) et certaines espèces bactériennes (*Arthrobacter globiformis*, *Streptomyces griseus*, divers *Pseudomonas spp.*)

**Nitrification:** 2 étapes successives réalisées par des bactéries différentes

1- La **nitritation** (Bactéries ou Archées bactériennes de type Nitroso...)



2- La **nitratisation** (Bactérie de type Nitro...)



Nitrification =

1. nitritation (par les Nitroso)
2. nitratisation (par les Nitro)

i → nitroso.  
a → nitro.



- I. *Dénitrification*
- II. *Ammonification et nitrification*
- III. **Dénitrification**
  - 1. Les pertes d'azote dans le sol
  - 2. Mécanismes de la dénitrification
  - 3. Conditions environnementales
  - 4. Conséquences environnementales et pour la production
- IV. *Fixation*

### Les pertes d'azote dans le sol

- Volatilisation de l'ammoniac
- Réduction chimique du nitrate et du nitrite
- Lixiviation du nitrate
  - ↳ *Lessivage des ions*
- Réduction biologique: Dénitrification
  - ⇒ Réduction biologique des nitrates en gaz azoté:  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  et  $\text{N}_2$
  - ⇒ Grande variété de bactéries hétérotrophes pour assurer cette dénitrification

Nar: nom du gène dont la fct est la nitrate réduc  
 Nir: nom du gène dont la fct est la nitrite réduc

Écologie microbienne des sols: chapitre 1  
 III. Dénitrification: mécanismes

### Mécanismes de la dénitrification

Produits gazeux

$$\text{NO}_3^- \xrightarrow{1} \text{NO}_2^- \xrightarrow{2} \text{NO} \xrightarrow{3} \text{N}_2\text{O} \xrightarrow{4} \text{N}_2$$

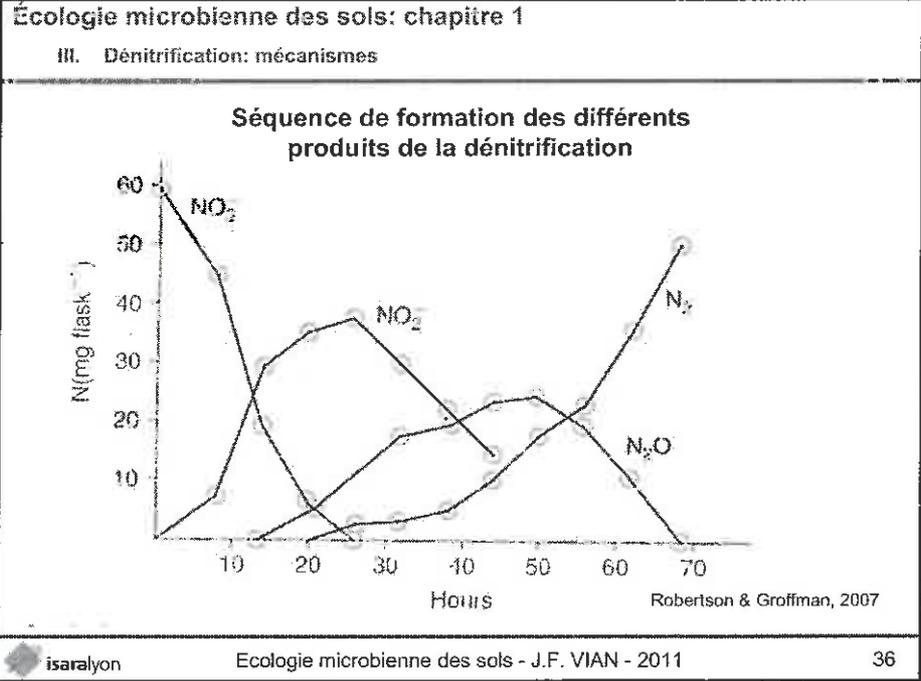
où chaque étape est catalysée par un système enzymatique:

- 1- nitrate réductase dissimilative (Nar),
- 2- nitrite réductase (Nir),
- 3- NO réductase (oxyde nitrique)(Nor)
- 4- N<sub>2</sub>O réductase (oxyde nitreux)(Nos)

Cours Ecologie microbienne, Frank Poly

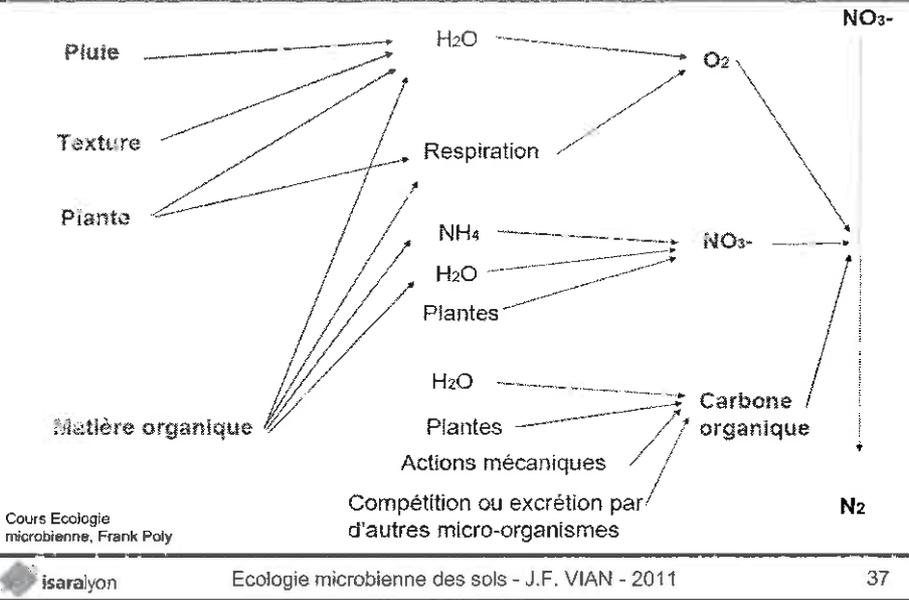
isaralyon Ecologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011 35

→ redondance fonctionnelle: quelque soient les changements de l'environnement, y a toujours de l'org qu'il y en aura toujours. pas s'adapter!



Écologie microbienne des sols: chapitre 1

III. Dénitrification: conditions environnementales

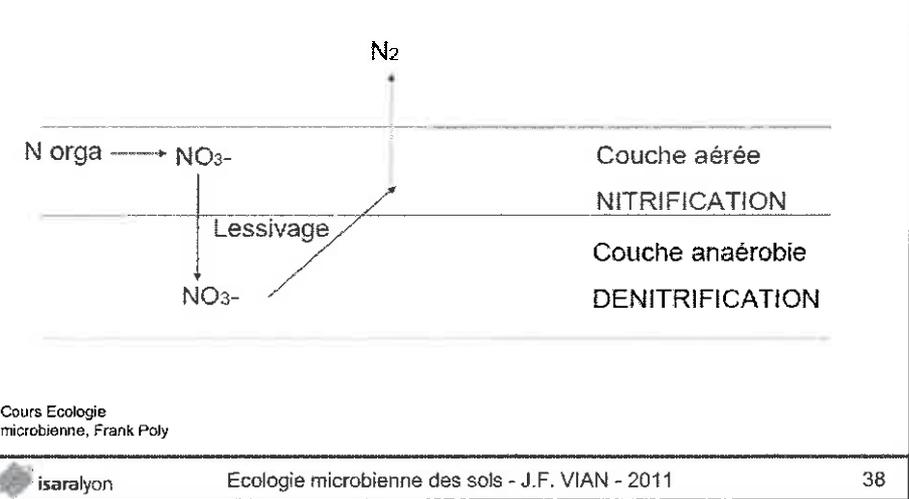


*l'oxygene baisse la dénitrification car O<sub>2</sub> meilleur accepteur d'e<sup>-</sup>*

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

III. Dénitrification: conditions environnementales

Cohabitation entre la nitrification et la dénitrification



Écologie microbienne des sols: chapitre 1

III. Dénitrification: conditions environnementales

Microsites de dénitrification dans les sols

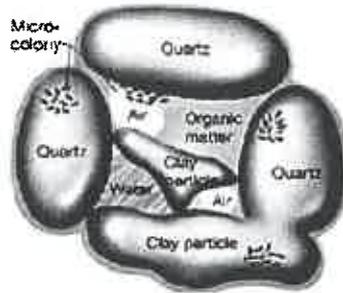
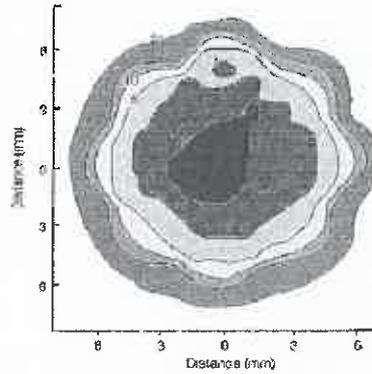


Schéma de la localisation de bactéries dans un agrégat de sol

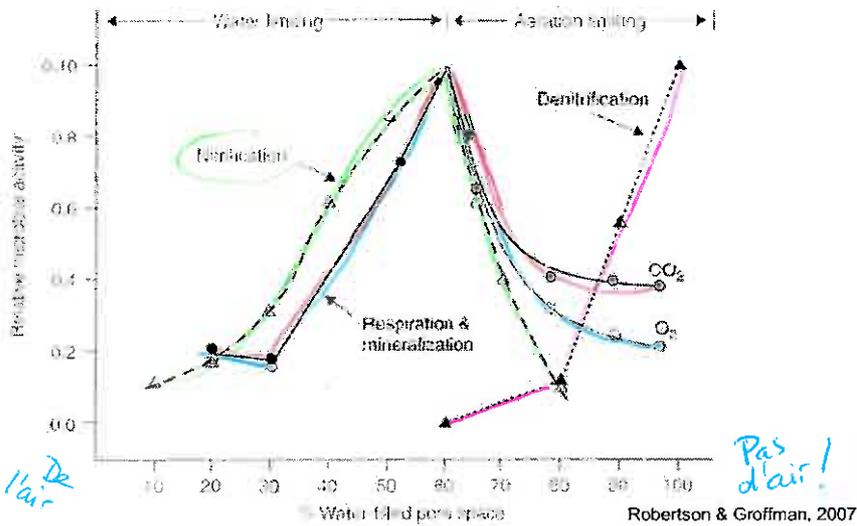


Diffusion de l'oxygène dans un agrégat de sol

Cours Ecologie microbienne, Frank Poly

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

III. Dénitrification: conséquences environnementales et pour la production

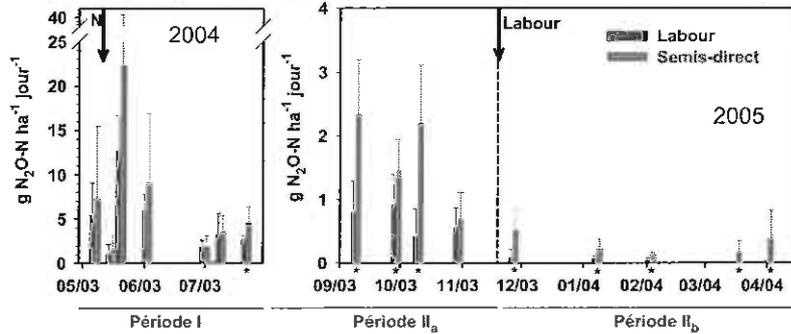


III. Dénitrification: conséquences environnementales et pour la production

- Compétition avec la plante pour les nitrates
- Elimination des nitrates dans le sol et les eaux
- Emissions d'oxydes d'azote dans l'atmosphère

*Semis direct  
↳ moins de porosité,  
Émission  
dénitrification ↑*

Effet du travail du sol sur la dénitrification des sols



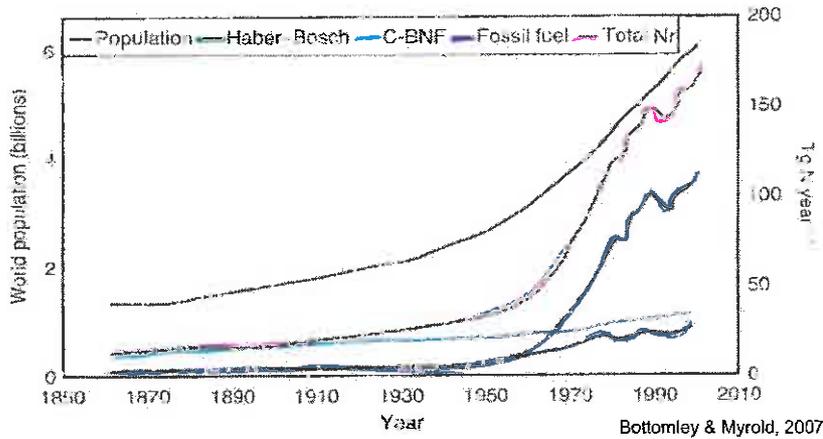
K. Oorts (2006, Boigneville)

Effet de serre : 1 kg N-N<sub>2</sub>O /ha/an = 300 kg C-CO<sub>2</sub> /ha/an

Chapitre 1: Microorganismes et rôles dans les cycles de l'azote et du carbone

- I. Décomposition des matières organiques des sols
- II. Ammonification et nitrification
- III. Dénitrification
- IV. Fixation biologique de l'azote
  1. Introduction
  2. La fixation libre et associative (non symbiotique)
  3. La fixation symbiotique
    - a. Les symbioses à nodules chez les légumineuses
    - b. Les symbioses actinorhiziennes
  4. Conséquences sur la production végétale

Évolution de la population mondiale et quantités d'azote créées



— Nitrate de synthèse (coûteux en pétrole!)  
 — Fix<sup>o</sup> de N par légumineuses cultivées (en symbiose avec bactérie)

Caractéristiques des principales espèces fixatrices d'azote

Energy source	Sensitivity of N <sub>2</sub> fixation to oxygen	Examples (genera)
Heterotrophic	Aerobic diazotrophs	<i>Azotobacter</i> , <i>Gluconacetobacter</i> ,
	Microaerophilic diazotrophs	<i>Azospirillum</i> , <i>Herbaspirillum</i> , <i>Methylococcus</i>
	Facultatively aerobic diazotrophs	<i>Klebsella</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Enterobacter</i>
	Obligately anaerobic diazotrophs	<i>Clostridium</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Methanosarcina</i>
Phototrophic	Aerobic diazotrophs *	<i>Anabanea</i> , <i>Nostoc</i>
	Microaerophilic diazotrophs	<i>Lyngbya</i> , <i>Oscillatoria</i>
	Facultatively aerobic diazotrophs	<i>Rhodobacter</i>
	Obligately anaerobic diazotrophs	<i>Chromatium</i>

\* diazotrophe → absorbent que le N atmosphérique  
 Bottomley & Myrold, 2007, adapted from Young (1992)

3 types fix<sup>o</sup> atmosph. → symbiotique  
 → associative  
 → atmosphérique

Écologie microbienne des sols: chapitre 1  
 IV. Fixation biologique de l'azote: introduction

Caractéristiques des principales espèces fixatrices d'azote

	Bactérie	Plante	# famille botanique	Efficacité (Kg/Ha/an)	% globale
Symbiotique	Cyanobact.	Azolla, Cycas Gunnera	>6	120	23
	Rhizobium Bradyrhizobium	Légumineuse Parasponia	2	350	60
	Frankia	Myricacées, Betulacées,	8	360	15
Associative	PGPR (Azospirillum, Pseudomonas,...)	Graminées, etc	nombreuses	5 à 30	3

Cours Ecologie microbienne, Frank Poly

isaralyon Ecologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011 45

→ On apporte en N, en agri. com V  
 ≈ 150 Kg/ha/an  
 des azote.  
 Des bactéries en apportent assez!

Écologie microbienne des sols: chapitre 1  
 IV. Fixation biologique de l'azote: introduction

La fixation de l'azote

Nitrogénase

$$\text{N}_2 + 8\text{e}^- + 8\text{H}^+ \longrightarrow 2\text{NH}_3 + \text{H}_2$$

Inerte Assimilable

Consommation de 16 ATP Cours Ecologie microbienne, Frank Poly

- o Couteux en énergie
- o Lent et peu efficace
- o Réduction de N<sub>2</sub> en NH<sub>3</sub> nécessite la mobilisation de 20 gènes, appelés *Nif* gènes

isaralyon Ecologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011 46

Nitrogénase = coûteuse en ATP (16ATP), lente et efficace  
 ⇒ peu concurrentielle

Si → oxygène, il faut refaire la nitrogénase

Sol trop fertilisé en N de synthèse  
 ↳ les bactéries ne se cassent pas la tête à en faire

Quantités de N<sub>2</sub> fixées en conditions de plein champ

Diazotrophic bacteria and their associations	N <sub>2</sub> fixed (kg.ha <sup>-1</sup> .year <sup>-1</sup> )
Free-living bacteria (associated with wood decay, straw decomposition)	< 1-10
Examples of plant-cyanobacterial associations	
Cryolitic crusts	10-80
<i>Azolla</i>	≤ 300
Examples of legume-rhizobial associations	
Soybean	60-115
Beans	50-100
Alfalfa	130-250
White clover	200
Examples of non legume- <i>Frankia</i> associations	
Alder	50-300
<i>Ceanothus</i>	50-60
<i>Hippophae</i>	10-60

Bottomley & Myrold, 2007, adapted from Evans and Barber (1977)

FIXATION LIBRE

Fixation libre de N<sub>2</sub>

- Bactéries libres fixatrices de N<sub>2</sub>
  - ⇒ Diazotrophes phototrophes
  - ⇒ Diazotrophes hétérotrophes
  
- Facteur limitant = demande en C/énergie
  - ⇒ Diazotrophes phototrophes fixent un quantité de N<sub>2</sub> plus importante que les hétérotrophes
  - ⇒ Fixation libre hétérotrophique nécessite des quantités importantes de C labile (rhizosphère, décomposition de MO fraîche...)

# FIXATION ASSOCIATIVE

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

IV. Fixation biologique de l'azote: la fixation libre et associative (non symbiotique)

## Fixation associative

Les bactéries libres fixatrices de N<sub>2</sub> dans la rhizosphère des graminées

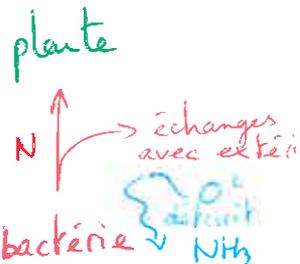
Dans la rhizosphère	Hors de la rhizosphère
10 <sup>5</sup> à 10 <sup>7</sup> bactéries fixatrices/g de sol	10 <sup>2</sup> à 10 <sup>5</sup> bactéries fixatrices/g de sol
(riz 10 <sup>6</sup> à 10 <sup>8</sup> b./g de sol)	

Sur le riz : gain de 3 à 50 kg N / ha récolté  
Généralement: gain de 5 à 30 kg N / ha récolté

Cours Ecologie microbienne, Frank Poly

isaralyon Ecologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011 49

→ les bactéries sont présentes mais ne déforment pas les racines. Ce n'est pas une symbiose.



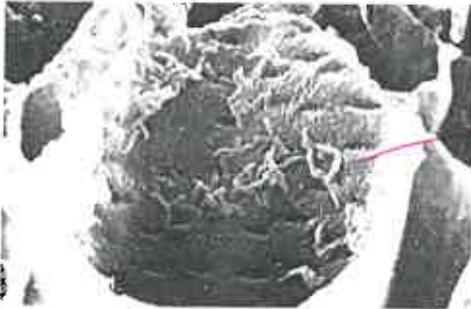
Écologie microbienne des sols: chapitre 1

IV. Fixation biologique de l'azote: la fixation libre et associative (non symbiotique)

## Le sol rhizosphérique



*Herbaspirillum seropedicae* within the metaxylem of a sugarcane stem



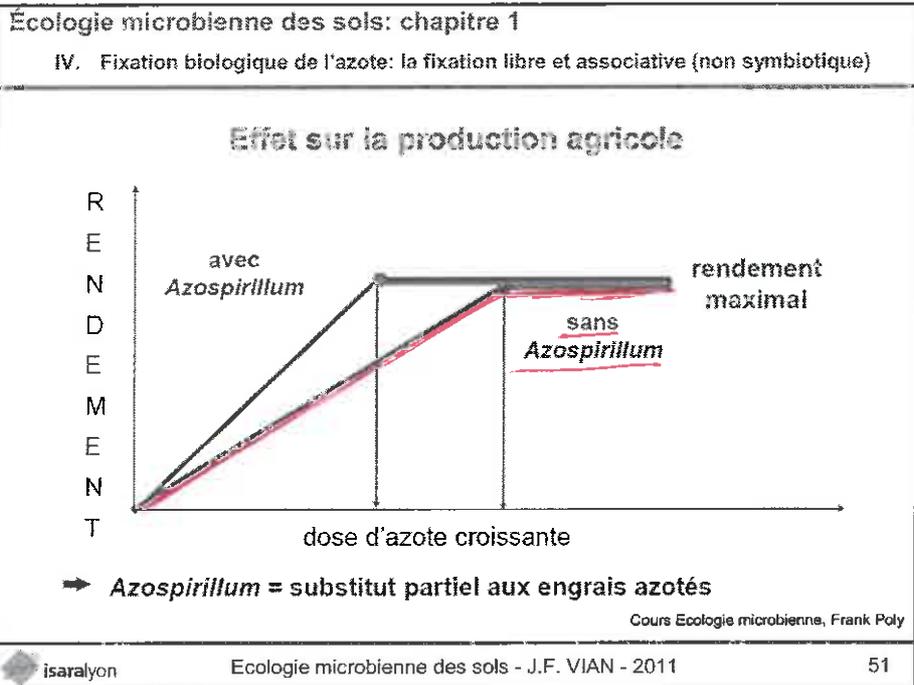
Courtesy of F. Olivares, in Bottomley & Mirrold, 2007

Photo : Programme ISCB/Lausan, Neuchâtel Suisse

isaralyon Ecologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011 50

sol rhizosphérique: sol restant "collé" aux racines lorsqu'on tire une plante

→ les bactéries vivent librement à la surface des plantes



(cette diapo a moyen sa place ici)

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

IV. Fixation biologique de l'azote: la fixation libre et associative (non symbiotique)

**Les bactéries PGPR:**  
Plant Growth Promoting Rhizobacteria

Bactéries de la rhizosphère qui exercent un rôle positif sur la croissance des plantes, leur vigueur et leur résistance aux parasites: Rhizobactéries Promotrices de la Croissance Végétale (Gobat *et al.*, 2003)

- ⇒ Modes d'action très variés
- ⇒ Une même population peut cumuler plusieurs propriétés :

Stimulation et régulation de la croissance racinaire	Amélioration de la nutrition des plantes	Protection des racines contre les parasites
--	--	---

*cf diapo suivante*

isaralyon Ecologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011 52

PGPR

ces bactéries ont plusieurs rôles

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

IV. Fixation biologique de l'azote: la fixation libre et associative (non symbiotique)

Les bactéries PGPR : modes d'action

**Stimulation et régulation de la croissance racinaire**

- ⇒ Production de phytohormones (AIA, éthylène, NO)
- ⇒ Régulation des concentrations hormonales de la plante (e.g. déamination de l'ACC précurseur de l'éthylène)

**Amélioration de la nutrition des plantes**

- ⇒ Concentration en éléments minéraux
- ⇒ Solubilisation du phosphate inorganique
- ⇒ Sécrétion de sidérophores
- ⇒ Fixation de N<sub>2</sub>
- ⇒ Mucilage favorisant les échanges d'ions et d'eau

**Protection des racines contre les parasites**

- ⇒ Production de composés inhibiteurs (phénazine, acide cyanhydrique...)
- ⇒ Compétition avec les parasites (e.g. le fer)
- ⇒ Stimulation (induction) des mécanismes de résistance des plantes

D'après Gobat et al., 2003

en gros : elles reproduisent les hormones des plantes pour qu'elles grandissent et donnent de l'énergie

aident à l'assimilation de minéraux, phosphate, sidérophores (fer rendu assimilable) fixent N<sub>2</sub> mais pas symbiotiques, mucilage

- produc<sup>o</sup> d'antibiotiques (phénazine & champignons pathogènes)
- compétition & path
- stimulent les réac<sup>o</sup> de défense des végétaux

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

IV. Fixation biologique de l'azote: la fixation libre et associative (non symbiotique)

L'inoculation de semences de maïs par la bactérie du sol *Azospirillum lipoferum* CRT1(B) provoque la prolifération des racines de la céréale



A B Cours Ecologie microbienne, Frank Poly

A - racines de maïs non inoculées par *A. lipoferum* CRT1  
 B - racines de maïs inoculées

photo René Bally<sup>1</sup>, Colette Jacoud<sup>1</sup> et Patrick Wadooz<sup>2</sup>  
 1 - Ecologie Microbienne, IPR-CNRS 2057, Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex.  
 2 - Méréx - Ligna Usine de Meyzieu, 12 av. De L'Éclair de Tassinay, 69330 Meyzieu

PGPR

Écologie microbienne des sols: chapitre 1  
 IV. Fixation biologique de l'azote: la fixation libre et associative (non symbiotique)

**Conséquences agronomiques**

- Meilleure nutrition minérale et hydrique des plantes
  - ⇒ augmentation de la quantité de MS totale
  - ⇒ augmentation de la teneur azoté dans les tiges et les grains
  - ⇒ augmentation du nombre d'épis et de grains/épis
  - ⇒ date de floraison avancée
  - ⇒ meilleure résistance aux stress hydriques
  - ⇒ meilleure résistance aux attaques de pathogènes

isaralyon      Ecologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011      55

## FIXATION SYMBIOTIQUE

Écologie microbienne des sols: chapitre 1  
 IV. Fixation biologique de l'azote: la fixation symbiotique

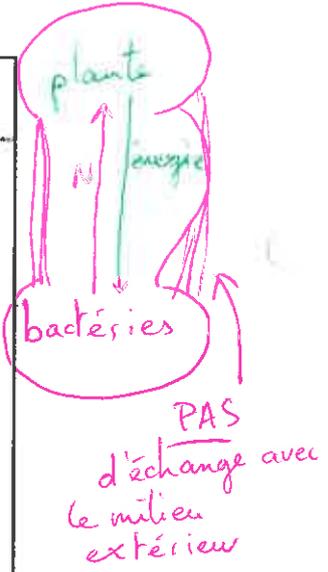
**La symbiose mutualiste**

**Union physique des partenaires: liaison sans partage. Les symbiotes échangent des nutriments ou des facteurs de croissance de manière exclusive sans que ceux-ci n'apparaissent dans le milieu extérieur (interfaces physiques d'échanges)**

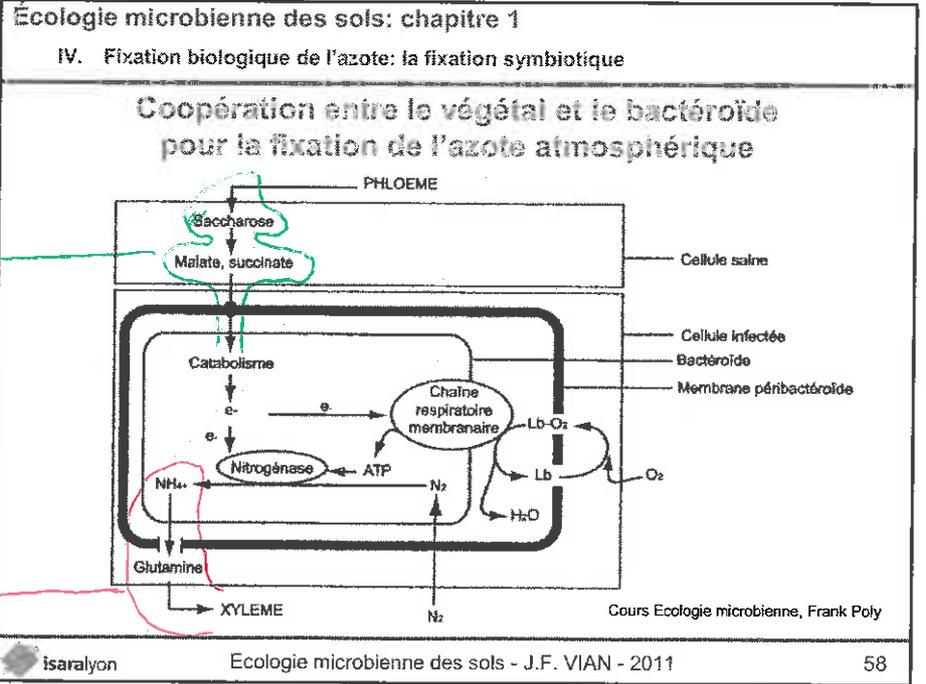
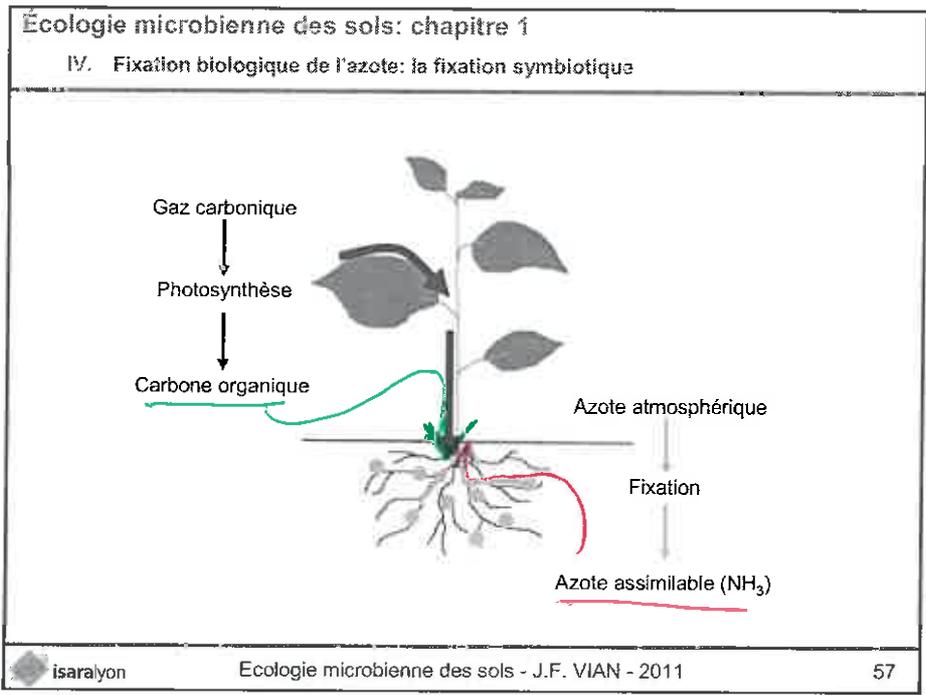
(Gobat et al., 2003)

- ⇒ coût énergétique de la fixation symbiotique avantageux
- ⇒ protection par rapport aux concentrations en O<sub>2</sub>
- ⇒ 2/3 de l'azote total fixé dans la biosphère (120 millions de t/an)
- ⇒ dans les sols, 2 grands types de symbioses
  - ⇒ entre les légumineuses et bactéries de la famille des Rhizobiacées
  - ⇒ plantes souvent ligneuses et bactéries filamenteuses du genre *Frankia*

isaralyon      Ecologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011      56



organe de la symbiose : nodosité  
 NB = la nodosité protège aussi de l'O<sub>2</sub>



## Les symbioses à nodules chez les légumineuses



Cours Ecologie microbienne, Frank Poly

## Taxonomie et diversité des bactéries symbiotiques à nodules

4 genres de bactéries, mobiles avec flagelles (Gram -) forment des symbioses avec les légumineuses (phylum des protéobactéries)

⇒ *Rhizobium* (ex. *R. leguminosarum*, *R. fredii*, genre *Agrobacterium*)

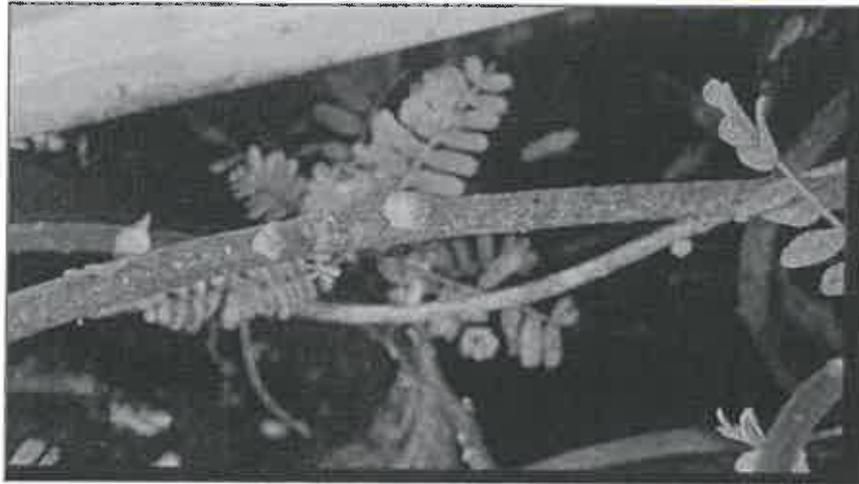
⇒ *Bradyrhizobium* (ex. *B. japonicum*)

⇒ *Mesorhizobium* (ex. *M. loti*, *M. ciceri*)

⇒ *Azorhizobium* (ex. *A. caulinodans*): forme des nodules épigés dans les tiges de *Sesbania* (Fabacées tropicale)

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

IV. Fixation biologique de l'azote: la fixation symbiotique à nodules



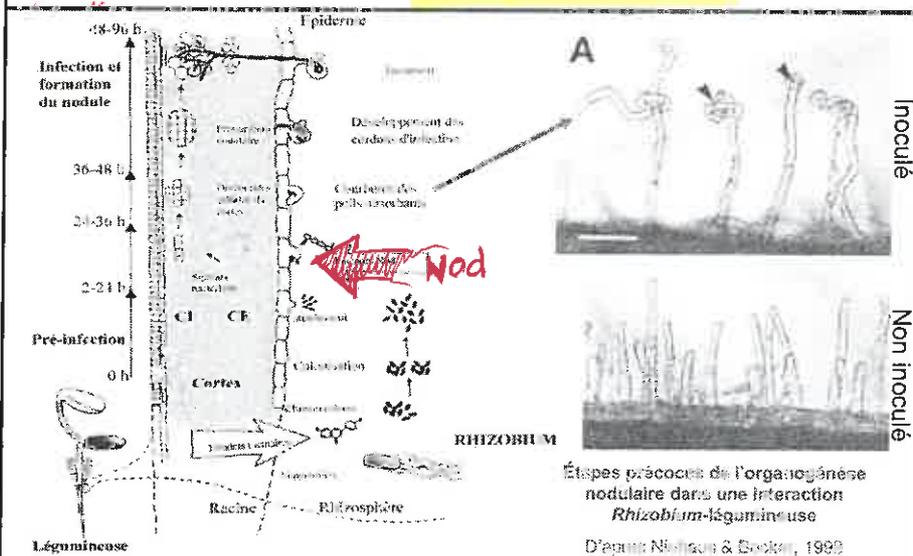
Cours Ecologie microbienne, Frank Poly

Cas particulier chez *Sesbania rostrata*

① → plante attire bactérie  
 ② → signaux (m), chimiotactis  
 ③ → facteur Nod de la bact  
 se fixe

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

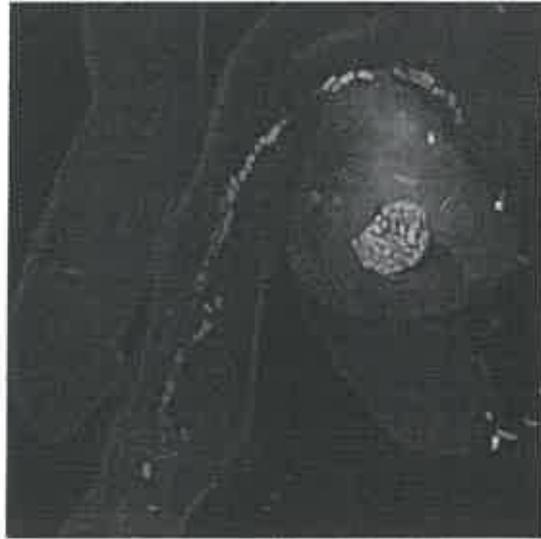
IV. Fixation biologique de l'azote: la fixation symbiotique à nodules



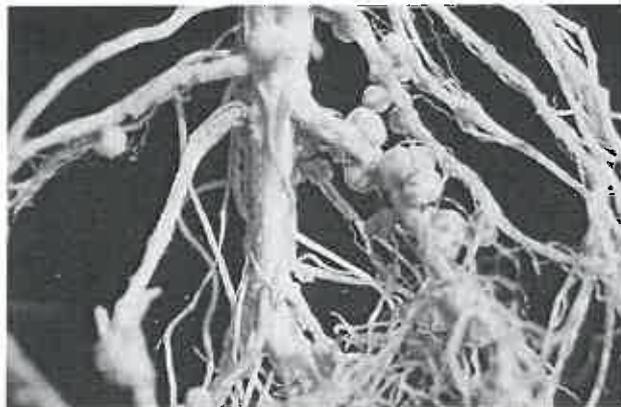
Étapes précoces de l'organogénèse nodulaire dans une interaction *Rhizobium*-légumineuse  
 D'après Nishida & Becker, 1999

*Medicago* root hair curling and infection thread invasion by rhizobia upon inoculation with *Sinorhizobium meliloti*.

Courtesy of Rene Geurts (Bottomley & Myrold, 2007)



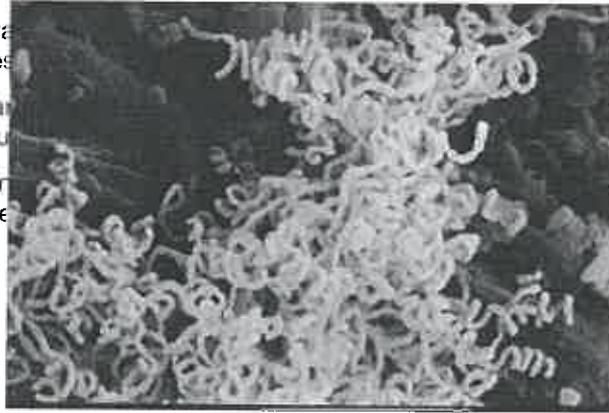
Nodules formed where *Rhizobium* bacteria infected soybean roots



Stephen Temple, University of Minnesota, St. Paul.

Symbioses que les actinomycètes du genre Frankia forment avec plusieurs genres de plantes non légumineuses

- ⇒ Gram
- litières
- ⇒ pla
- toujou
- ⇒ péné
- cellule
- hôte)



s et les  
es  
nais  
e les  
ante

-> Gram +, bact. filamenteuses  
Abondants ds sols et litières, de nb. Frankia produisent des antibiotiques  
-> plantes hôtes évoluent dans des écosystèmes différents mais très sur des sols pauvres en N  
-> pénétration de l'hôte par petits absorbant soit entre les φ de l'épiderme et

Nodule actinomycorhizien

Pièce de 17 mm  
(Gobat et al., 2003)

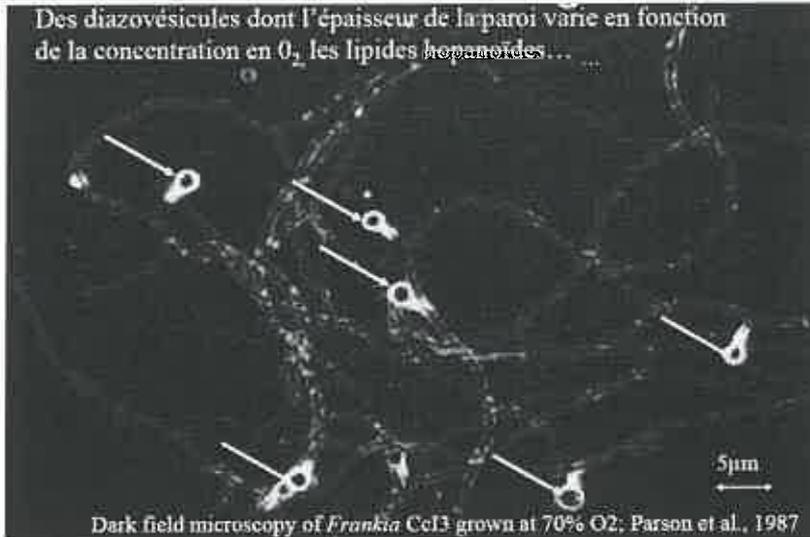


Réponse de l'hôte à l'infection, multiplication des cellules corticales pour former un pré-nodule que va pénétrer ensuite le symbiote

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

IV. Fixation biologique de l'azote: les symbioses actinorhizienne

Des diazovésicules dont l'épaisseur de la paroi varie en fonction de la concentration en  $O_2$ , les lipides...



Cours Ecologie microbienne, Frank Poly

+ ya d' $O_2$   
+ la paroi des diazovésicules est épaisse

Écologie microbienne des sols: chapitre 1

IV. Fixation biologique de l'azote: conséquences sur la production végétale

Quantité d'azote par hectare et par an et pourcentage d'azote transféré d'une plante fixatrice à une plante non fixatrice en cultures associées.

type d'association	N transféré % et $kg\ ha^{-1} an^{-1}$	Méthodes	Auteurs
<b>Plantes herbacées</b>			
graminée/ légumine	26-46% 5-28 kg	dilution isotopique	Raebly et al (1988)
maïs/ haricot	< 5%	dilution isotopique marquage foliaire	Giller et al (1991)
graminée/ céréale	50% 60-70 kg	dilution isotopique	Edgard (1991)
orge/ soja	20-55% 20-90kg	dilution isotopique	Olesen et al (1995)
arbolée/ vesce	5 kg 0 kg	dilution isotopique maslère org. marquée	Freyssinham und Danne (1991)
café/ brème/clim	16%	abondance isotopique microbelle	Snoeck (1995)
graminée/légumine	10%	$^{15}N_2$ , marquage foliaire dilution isotopique N in situ	Ta et al (1989)
<b>Plantes ligneuses</b>			
Chêne/ saule corré	32%	abondance isotopique naturelle	Burton et al (1990)
peuplier/ saule ghr. (1990)	13%	dilution isotopique	Kurdik et al
café/ Ficus/algia	6%	abondance isotopique naturelle	Snoeck (1995)
/ Lenc. diversifolia	15-22%	"	"
L. leucocephala	0%	"	"
A. leucodermis	0%	"	"
A. stratum	0%	"	"

Cours Ecologie microbienne, Frank Poly

→ alterner les cultures

Association de cultures

Exemples d'impact des arbres fixateurs sur la production des arbres qui leur sont associés

Associations	Pays/âge	Rendements	
		mono.	Associat.
<i>fixateur / non fixateur</i>			
<i>E. umbellata / Noyer</i>	USA / 14ans	H=3,4m	10m
<i>A. glutinosa / Noyer</i>	USA / 14ans	H=3,4m	10m
<i>Flemingia / caféier</i>	Cameroun / 4ans	kg ha <sup>-1</sup> an <sup>-1</sup> 76	172
<i>C. Equi/ cocotier</i>	Côte d'Ivoire/sans	noix "" 3500	6500
<i>A. mangium/ cocotier</i>	""	""	7400
<i>A. auriculiformis/ cocotier</i>	""	""	7800

Cours Ecologie microbienne, Frank Pody

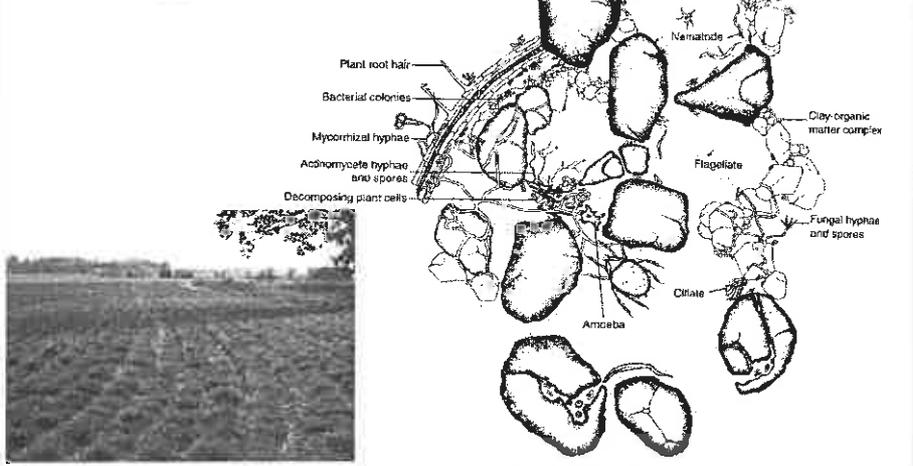
- I. Fonctionnement d'un agro-écosystème: rôle des microorganismes du sol
- II. Le rôle des champignons du sol
  1. Les champignons et la qualité du sol
  2. Les mycorhizes
- III. Systèmes de culture et fonctionnement microbien du sol
  1. Influence des pratiques culturales sur les microorganismes du sol
  2. Les différents bio-agresseurs
  3. Le piétin-échaudage: un modèle possible pour comprendre le fonctionnement microbiologique d'un sol cultivé

Conclusion

## Écologie microbienne des sols: chapitre 2

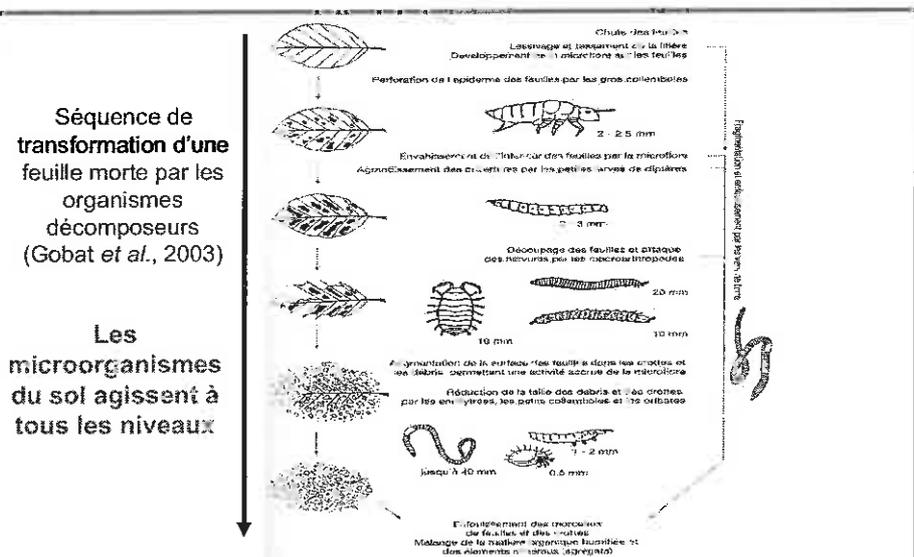
### I. Fonctionnement d'un agro-écosystème: rôle des microorganismes du sol

#### Soil Biology and the Landscape



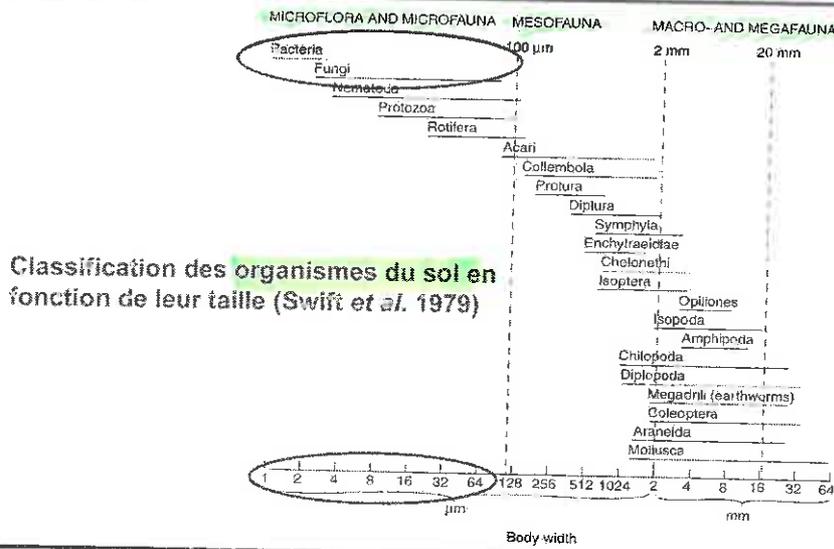
## Écologie microbienne des sols

### I. Fonctionnement d'un agro-écosystème: rôle des microorganismes du sol



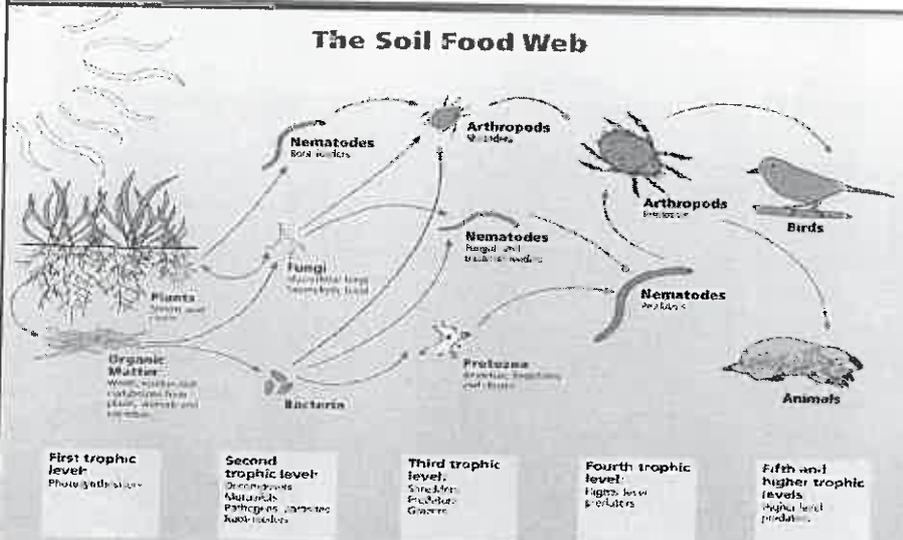
## Écologie microbienne des sols

### I. Fonctionnement d'un agro-écosystème: rôle des microorganismes du sol



## Écologie microbienne des sols

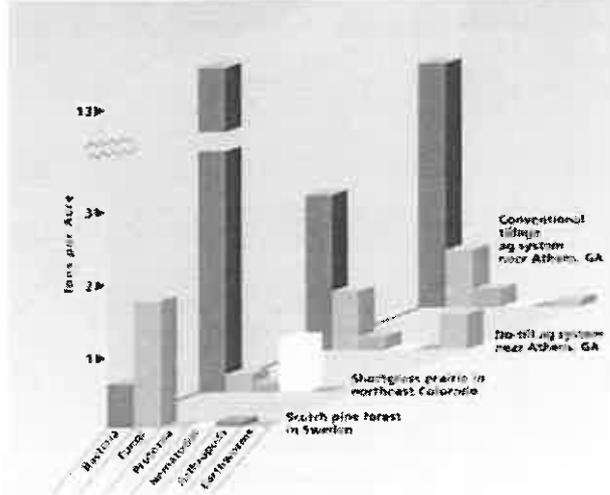
### I. Fonctionnement d'un agro-écosystème: rôle des microorganismes du sol



Écologie microbienne des sols

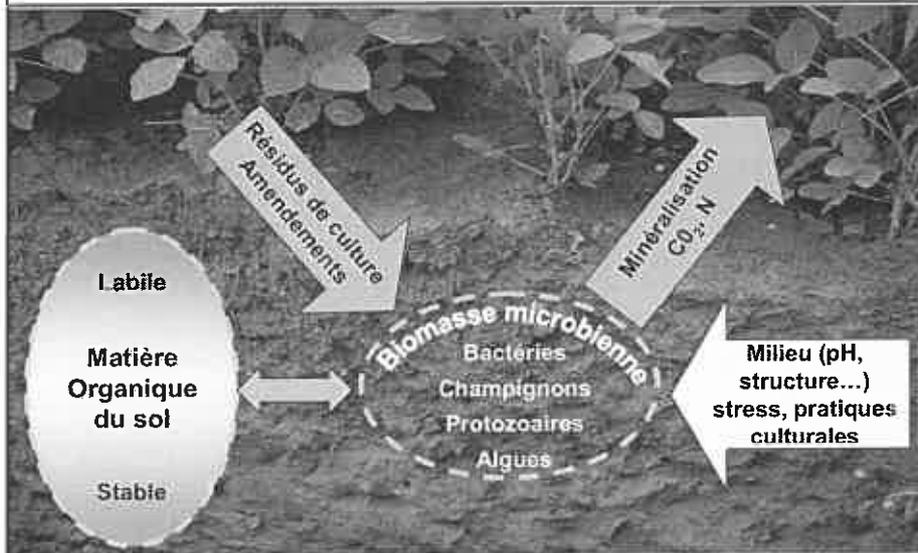
I. Fonctionnement d'un agro-écosystème: rôle des microorganismes du sol

Biomass of Soil Organisms in Four Ecosystems



Écologie microbienne des sols

I. Fonctionnement d'un agro-écosystème: rôle des microorganismes du sol

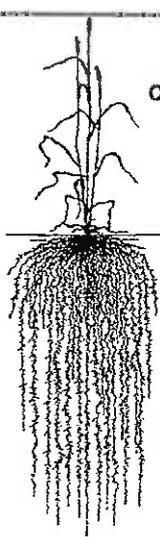


Écologie microbienne des sols

I. Fonctionnement d'un agro-écosystème: rôle des microorganismes du sol

**Facteurs inhibiteurs et stimulateurs des communautés microbiennes de la rhizosphère**

**Selective interactions in the rhizosphere**



**Stimulatory factors:**  
Carbon substances, vitamines, Complexing agents, specific substrates, hydrogen

**Inhibitory factors:**  
Volatile and soluble antimicrobials, QS-inhibitors

**Stimulatory feedback:**  
Solubilisation of minerals, enlarge rooting volume stimulation of pathogen resistance; growth regulators; biological control of pathogens; degradation of inhibitors

**Inhibitory feedback:**  
Competition for nutrients, phytotoxins, allelochemicals

Hartmann, A., et al., 2009. *Plant and Soil*

isaralyon Ecologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011 77

plante vers bact  
+ elle donne de l'énergie des vitamines, ...  
- elle envoie des anti-plasmes et anti-fongiques

bact vers plantes  
+ solubilise les minéraux, stimule les défenses.  
- compétition en nutriments

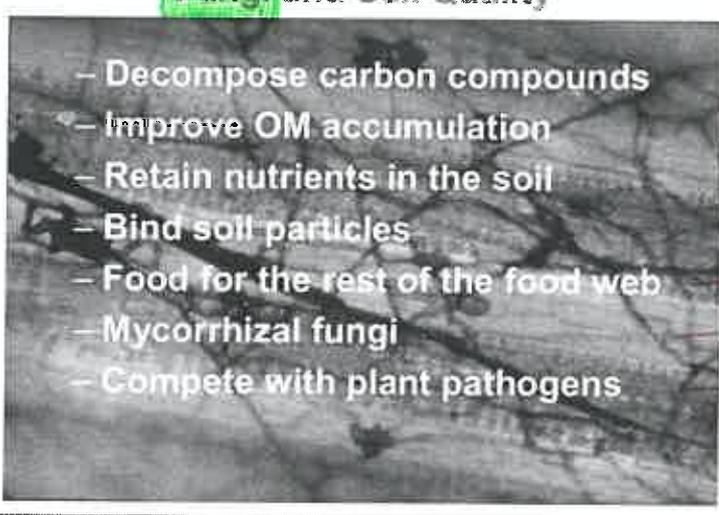
Diapo 78 e-campus  
① pr repousser les pathogènes  
③ pr nourrir attirer des organismes

II Champignons

Écologie microbienne des sols

II. Le rôle des champignons du sol: champignons et qualité du sol

**Fungi and Soil Quality**



- Decompose carbon compounds
- Improve OM accumulation
- Retain nutrients in the soil
- Bind soil particles
- Food for the rest of the food web
- Mycorrhizal fungi
- Compete with plant pathogens

isaralyon Ecologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011 78

→ servent de réserve trophique  
→ cf. diapo 79  
→ entre en compétition avec les pathogènes

### Les mycorhizes

*(tous les champignons qu'on mange, sauf celui de paris)*

- Association symbiotique entre un champignon et les racines d'un végétal
- La plupart des plantes cultivées sont mycotrophes (sauf : chénopodiacées et brassicacées)



*↳ betterave*

Le champignon est un collecteur de sels minéraux

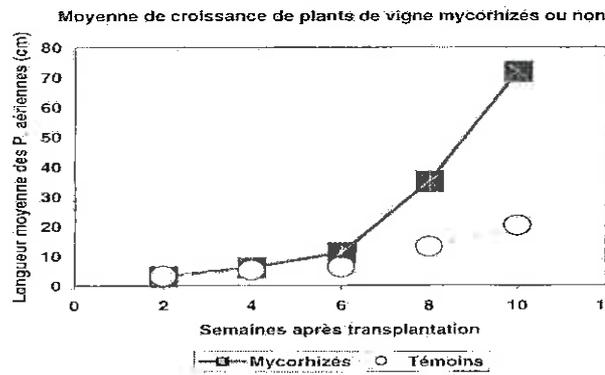
*→ capable de faire une symbiose mycorhysienne)*

**Translocation**

### Mycorhizes et croissance végétale

- Abondance des propagules : potentiel mycorrhizogène
- Diversité des populations endomycorhiziennes
- Efficacité de la symbiose  
la plupart des plantes cultivées sont mycotrophes (exceptions : chénopodiacées et brassicacées)

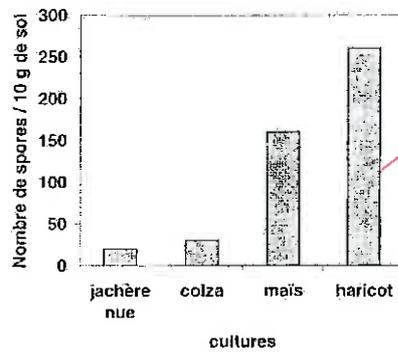
### Mycorhizes et croissance végétale



les mycorhizes participent au dulp des organes de nutrition des plantes.

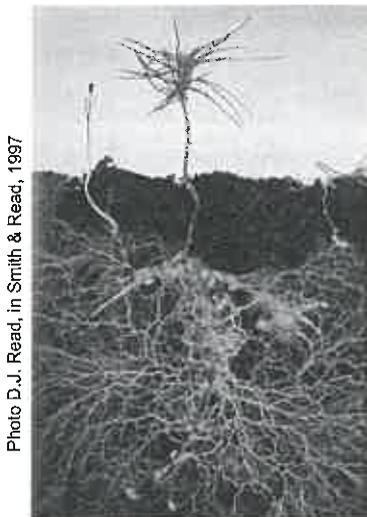
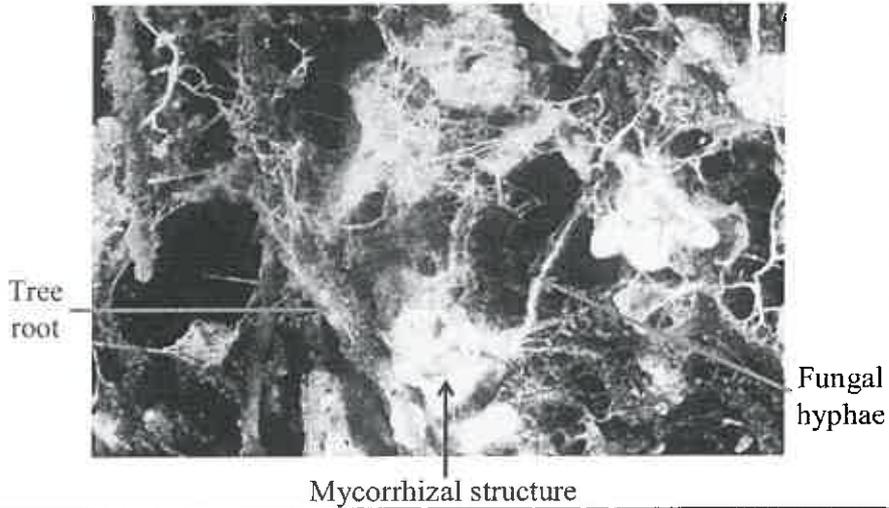
### Mycorhizes et croissance végétale

Effet du précédent cultural sur la densité des spores



Le haricot permet le dulp de mycorhizes

### Mycorrhizae



### Les mycorhizes : étude de la mycorrhizosphère !

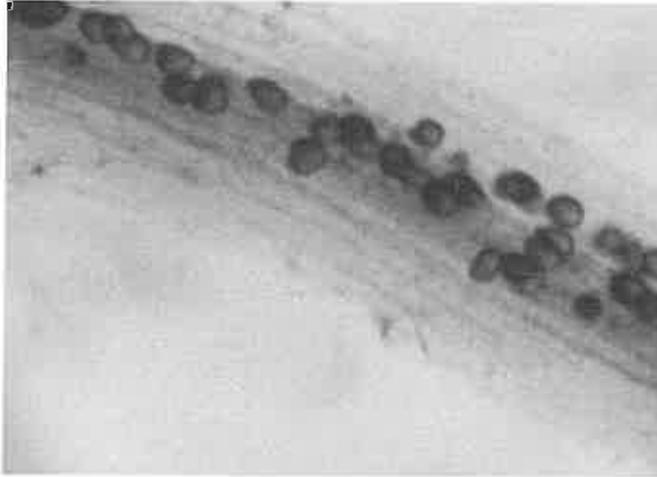
#### Les hyphes :

- jusqu'à 7 cm de la racine
- diamètre peut atteindre 20  $\mu\text{m}$
- 200 à 1000 m d'hyphes/cm de racines

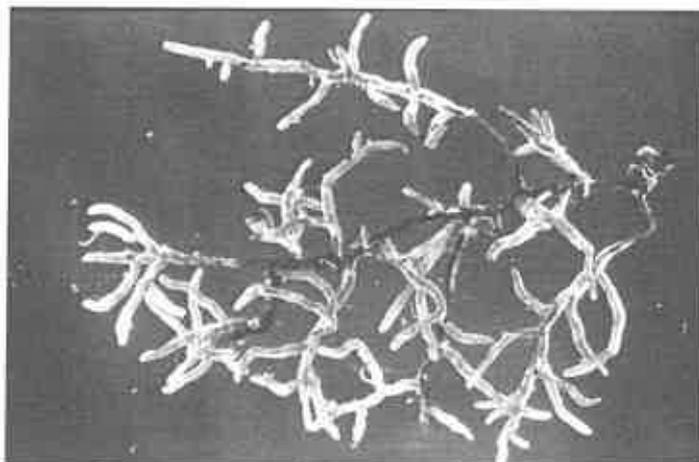
*1cm racine = 200 à 1000 m d'hyphes ! → protection de pathogènes par compétition.*

*↑  
pas mycorhizé*

### Arbuscular Mycorrhizae (AM)



### Ectomycorrhizae



Écologie microbienne des sols

II. Le rôle des champignons du sol: les mycorhizes

**Mycorrhizal Fungi bind soil particles to the root**

isaralyon Ecologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011 87

Écologie microbienne des sols

III. Systèmes de culture et fonctionnement microbien du sol: quelques exemples

**Système de culture et microorganismes**  
 Comparaison Biodynamie, AB et agriculture conventionnelle

**C Microbial**  
 Microbial biomass, Dehydrogenase, Protease, Phosphatase, Saccharase, Mycorrhiza

**D Faunal**  
 Earthworm biomass, Earthworm abundance, Spiders, Staphylinids, Carabids

**B Chemical**  
 pH, Organic Carbon, Phosphorus, Potassium, Calcium, Magnesium

Mäder *et al.*, 2002 in Science

Legend:  
 ◆ BIODYN    ○ CONFYM  
 □ BIOORG    △ CONMIN

*conventionnel fertilisé*  
*ss fertilization*

isaralyon Ecologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011 88

### Bio-agresseurs et système de culture : Les différents types de germes pathogènes

• Virus :

- parasites stricts, incapables de se reproduire (se font reproduire par l'organisme parasité)
- très petite taille (30 à 300 nm)

transmission : par le sol (débris végétaux)

vection par nématodes (court-noué...)

vection par champignons (rhizomanie betterave...)

• Bactéries :

- *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*...
- capables d'un développement saprophyte dans le sol
- spécificité d'hôte : pathovar

### Bio-agresseurs et système de culture : Les différents types de germes pathogènes

• Champignons :

- Myxomycètes (plasmodes, zoospores)
- Archimycètes (cellules, zoospores) vecteurs de virus
- Oomycètes (mycelium non cloisonné, oospores)  
ex : *Pythium*, *Phytophthora*, *Aphanomyces*
- Ascomycètes (mycélium cloisonné, conidies, sclérotés, ...)  
ex : *Fusarium*, *Verticillium*, ...
- Basidiomycètes (mycélium cloisonné, spores, sclérotés)  
ex : *Rhizoctonia*

3 types de maladies :

Fonte des semis / pourritures rainaires / trachéomycoses

Écologie microbienne des sols

III. Systèmes de culture et fonctionnement microbien du sol: étude du piétin-échaudage

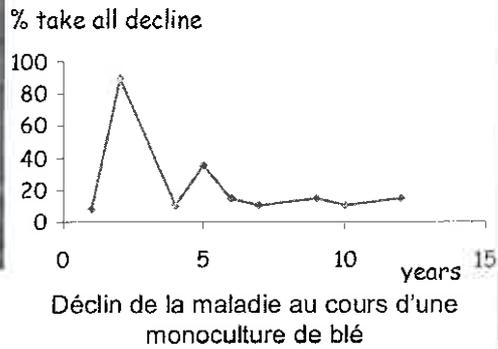
Bio-agresseurs et système de culture

Étude du piétin échaudage, *Gaeumannomyces graminis*, var tritici sur blé



Symptômes

Christian Steinberg, 2007



échaudage!  
maladie  
qui quoi?

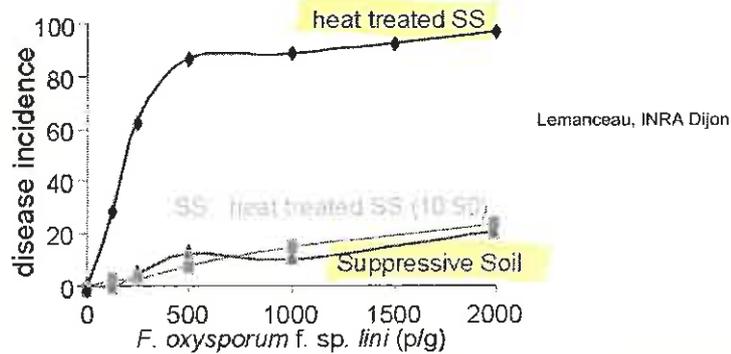
Écologie microbienne des sols

III. Systèmes de culture et fonctionnement microbien du sol: étude du piétin-échaudage

Bio-agresseurs et système de culture

Étude des sols résistants à la fusariose du lin: *Fusarium oxysporum* f. sp. lini

Mise en évidence du rôle microbien de la résistance de certains sols



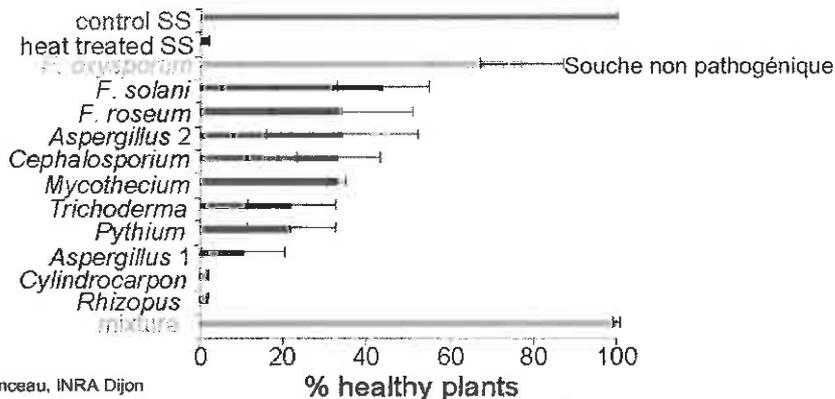
Écologie microbienne des sols

III. Systèmes de culture et fonctionnement microbien du sol: étude du piétin-échaudage

Bio-agresseurs et système de culture

Étude des sols résistants à la fusariose du lin: *Fusarium oxysporum f. sp. lini*

Mise en évidence du rôle microbien de la résistance de certains sols



Lemanceau, INRA Dijon



Écologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011

96

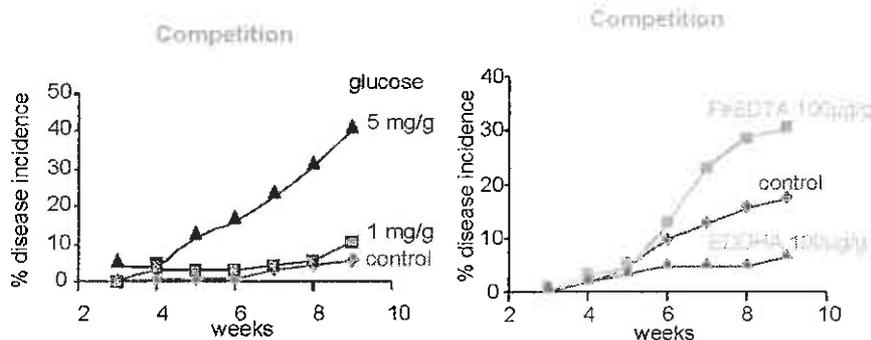
Écologie microbienne des sols

III. Systèmes de culture et fonctionnement microbien du sol: étude du piétin-échaudage

Bio-agresseurs et système de culture

Étude des sols résistants à la fusariose du lin: *Fusarium oxysporum f. sp. lini*

Mécanismes de la résistance de certains sols



Lemanceau, INRA Dijon



Écologie microbienne des sols - J.F. VIAN - 2011

98

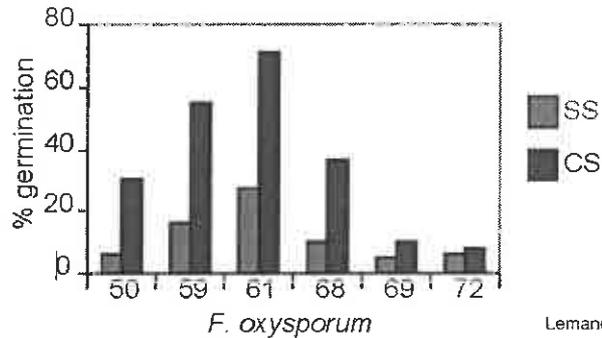
Écologie microbienne des sols

III. Systèmes de culture et fonctionnement microbien du sol: étude du piétin-échaudage

Bio-agresseurs et système de culture

Étude des sols résistants à la fusariose du lin: *Fusarium oxysporum f. sp. lini*

Mécanismes de la résistance de certains sols



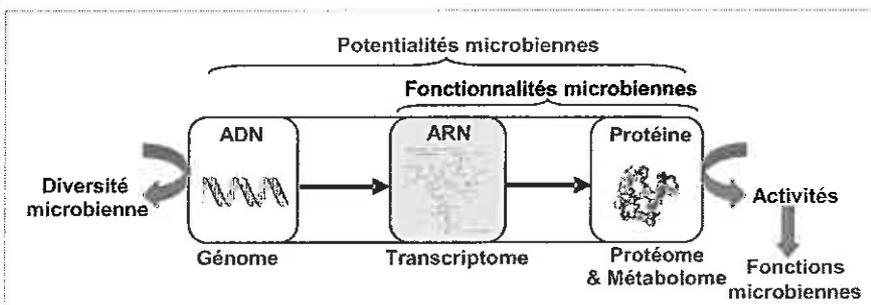
Lemanceau, INRA Dijon

In suppressive soils to fusarium-wilts, fungistasis is significantly stronger than in conducive soils

Écologie microbienne des sols

Conclusion

Comprendre le fonctionnement biologique des sols



- ↳ Relier diversité génétique-activités-fonctions microbiennes
- ↳ Identifier l'influence de l'environnement sur diversité-activités-fonctions
- ↳ Comprendre les interactions au sein de la biocénose du sol
- ↳ Approcher le concept de "soil food web"

# écosystème microbien

- Un écosyst comprend un milieu (biotope), les êtres vivants (biocénose) qui le composent et toutes les relat° pouvant exister et s'y d'ulper.
- macroécosyst et microécosyst
- écosyst microbien : terre, eau, homme.
- Dans un écosyst microb. on étudie -
  - type de microbes
  - nb de microbes
  - rôle/fct des microbes
  - comment survivent-ils
  - comment leur activité et abondance est-elle contrôlée
  - comment changent-ils chimiq<sup>nt</sup> et physiq<sup>nt</sup> l'environnt

Regardez les cellules procaryotes (procarotes)  
et les cellules eucaryotes (eucaryotes)

↳ procaryote : un ADN circulaire ds le cytoplasme, des ribosomes une mb cytoplasmique qui filtre...  
GRAM+ : fine couche de peptidoglycanes + 2 mb lipidiques (lipopolysaccharides)  
GRAM- : épaisse couche (ac. teichoïques)

La partie lipidique des lipopolysaccharide est toxique.

↳ eucaryotes :

↳ virus : parasite obligatoire. Attaque spécifique (un virus à bactérie ne peut attaquer l'homme). MAIS mutations (des virus animaux peuvent devenir nocifs pr l'H)

Facteurs influençant la croissance des m-o existant → T°, pH, O<sub>2</sub>, Aw (savoir le vocabulaire)

pH optimal : 7. pH stérilisant bcp : 4,5  
O<sub>2</sub> → aérobie (pseudomonas) → ou aéro-anaérobie  
↳ anaérobie

Aw activité de l'eau, qtt de l'eau libre.

(pour la m qtt d'eau (80%) en yaourt et confiture, on a :  
yaourt : aw = 0,95 et confiture : aw = 0,5)

Si Aw ≤ 0,85, peu de m-o peuvent se d'ulper

- 3 types de relation : commensalisme, mutualisme, parasitisme
- 2 types de flores : commensale, pathogène.

□ 10<sup>14</sup> bactéries par humain

→ 10x plus que d'eucaryotes

→ 10<sup>8</sup> ds chaque ml du rynopharynx

→ (ppt)



Milieux aquatiques et micro-organismes

- L'O<sub>2</sub> est + ou - concentré selon la profondeur
- le CO<sub>2</sub>

En aérobie, l'O<sub>2</sub> est accepteur final d'électron. Se produisent respi. et fermentations;

Dans l'eau

En anaérobie, l'accepteur final d'électron varie.

FNAR :

La présence d'E. coli témoigne d'une contamination fécale récente.

Streptococcus + ancienne  
Pour vérifier la désinfection, on recherche les bactéries les + résistantes

Bactériophages = - siphoviridae  
- myoviridae  
- polioviridae

≈ 140 espèces de virus pathogènes

Virus tempéré → reste à l'intérieur de la cellule hôte dans des virus lors des stress

virus → lytique ≠ tempéré

cycle → lytique ≠ lysogénique

Les bactériophages sont témoins de la présence des bactéries (normal).

Ils sont facilement détectables. Par contre, leur absence ne signifie pas que le milieu est indemne de virus.

Les étapes de l'analyse virologique = matrice, élimination, clarification, concentration, détection

élimination = récupérer les particules, les extraire de la matrice

clarification = on supprime au max ce dont on ne se sert pas

concentration = physique ou chimique

détection = plusieurs méthodes = - ELISA → détection faible

- culture (pas évident à mettre au point)

- PCR (la + appliquée)

Les virus présents dans l'eau potable

virus entériques → se dupl. dans le tube digestif.

L'entérovirus est un virus entérique.

Résistances  
brouillage  
camouflage  
blindage  
esquive

butyrivibrio fibrisolvens dégrade tout  
(cellulose, pectine, lipides)  
Prevotella ruminicola → protéines  
Anaerovibrio lipolytica → lipides

Trop de concentrés/céréales/amidon →  $T^{\circ} \downarrow$  et  $pH \downarrow$  (acidose) → amylolytique  $\downarrow$   
lacto bacilles  $\uparrow$   
streptococcus  $\uparrow$

Dans l'eau on cherche

- E. coli
- streptocoques fécaux

pisine ( - Staphylococcus aureus  
Pseudomonas aeruginosa  
Salmonella (eau de surface)

TP

↳ FTIR → coliformes totaux

↳ NPP (nb + probable) } colif thermotolérants

↳ filtration sur membrane

↳ microplaque e coli et son ezy bêta glucuronidase

↳ méthode double couche plaque de lyse

# Microbiologie des eaux

## Milieu aquatique

Dans l'eau, on trouve des bactéries simplement aquatiques bien sûr, mais aussi des bactéries terrestres ou alors d'origine animale.

Le type de micro-organismes dépend du type d'eau, de la profondeur (phototrophie..), de la ressource nutritionnelle du milieu..

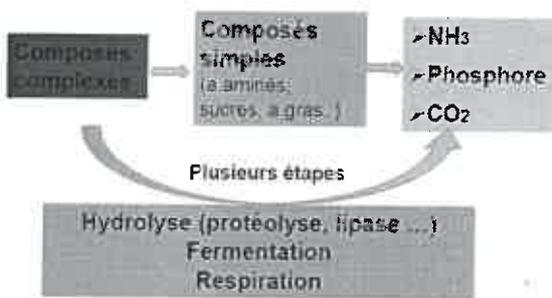
Milieux oligotrophes : l'eau douce (lac, fossé..) ou l'eau salée.

Milieu eutrophe : riche en éléments nutritifs (eaux usées ou eau de mares), dans lesquels on trouve :

- Nanobactéries
- Phototrophes/Chimiotrophes
- Hétérotrophes/Autotrophes

Note : Parmi les hétérotrophes, les cynobactéries sont des bactéries pathogènes.

## Activité aérobie



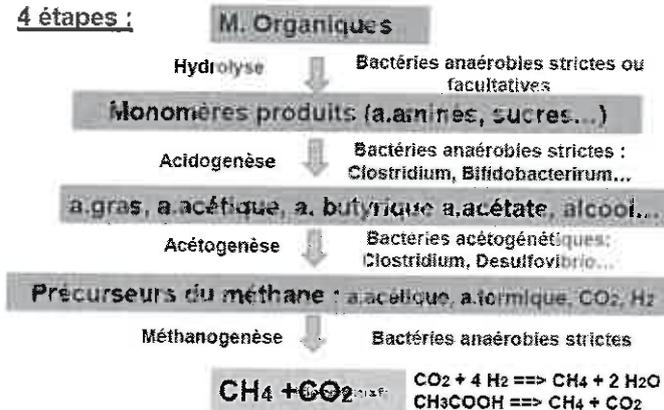
En activité aérobie, l'O<sub>2</sub> est accepteur final d'électrons

A partir de NH<sub>3</sub> :

- des bactéries nitrifiantes (Nitrosomonas) :  
 $4 \text{ NH}_3 + 7 \text{ O}_2 \text{ --- (Nitrosomonas) --- } 4 \text{ NO}_2^- + 6 \text{ H}_2\text{O}$
- des bactéries nitrifiantes (Nitrobacter) :  
 $2 \text{ NO}_2^- + \text{ O}_2 \text{ --- (Nitrobacter) --- } 2 \text{ NO}_3^-$

## Activité anaérobie

4 étapes :



En anaérobie, nombreux peuvent être les accepteurs d'électron.

A partir de méthane, les bactéries méthano-oxydantes (Methanomonas methanica) :  
 $5 \text{ CH}_4 + 8 \text{ O}_2 \Rightarrow 2 (\text{CH}_2\text{O}) + 3 \text{ CO}_2 + 8 \text{ H}_2\text{O}$

Pourquoi tant de bactéries dans l'eau ? A cause de matières fécales.

## Bactéries pathogènes

### Principales bactéries pathogènes transmises par l'eau

Point culture → Dans un gramme de caca, on trouve :

10<sup>11</sup> virus  
 10<sup>5</sup> à 10<sup>9</sup> bactéries

Et des petits parasites : 10 à 10<sup>4</sup> helminthes (oeufs)  
 10<sup>4</sup> à 10<sup>7</sup> protozoaires (kystes)



A part ça, dans l'eau, y a des bactéries pathogènes préoccupantes :

- |                         |                      |                        |
|-------------------------|----------------------|------------------------|
| • courantes :           | • émergentes :       | • occasionnelles :     |
| Salmonella              | Legionella           | Pseudomonas aeruginosa |
| Shigella                | Aeromonas hydrophila | Staphylococcus aureus  |
| E.coli entérotoxigènes  |                      |                        |
| Yersinia enterocolitica |                      |                        |
| Vibrio cholerae         |                      |                        |
| Campylobacter jejuni    |                      |                        |

### Entérocoques

Les entérocoques sont des Gram- oxydase – de forme batonnets.

- Salmonella : 7 espèces dont 2 pathogènes
- Salmonella typhi et Salmonella paratyphi
- Shigella : S. dysenteriae, tue 6000 personnes par an. Pathogène des pays tropicaux ;
- E.coli : Certaines souches d'E. coli sont pathogènes (provoquent diarrhées sanglantes, vomissements..). Infectieuse à faible concentration. (E. coli O157:H7)
- Yersinia : enterocolitica, pseudo-tuberculosis, pestis (responsable de la peste)

### Vibrio cholerae

- Bâtonnet à Gram négatif
- Non sporulant
- Anaérobie facultatif
- Oxydase-positif
- Producteur d'une entérotoxine thermolabile

### Campylobacter jejuni

- Morphologie : forme spiralée (0,2 à 0,5 µm de diamètre sur 0,5 à 8 µm) ou incurvée à Gram-négatif
- Agents responsables de diarrhées et d'avortements (campylobactérioses)
- T°optimale : 42°C

### Légionelles

Aérobie d'origine hydrique (lacs, rivières, pluies, sols..)

Gram - Croissance de 25 à 45°C ( optimum 36°C )

Forment des biofilms à la surface des tuyaux (radiateurs, systèmes de refroidissement).

- Classes
  - 50 espèces, 64 sérogroupes
  - L. pneumophila ⇒ 90% Légionelloses
  - L. pneumophila 1 ⇒ 80% des cas
- Mode de contamination
  - par voie aérienne : inhalation d'eau contaminée, diffusée par aérosols (+++), douches, jacuzzi, tours aérofrigorifères...
  - par ingestion et aspiration directe d'eau contaminée (+)
- Dose infectante : > 1000 UFC/litre selon l'OMS

### Bactéries plus occasionnelles

#### Aeromonas hydrophila

Caractéristiques identiques que entérobactéries mais oxydase +

Bactérie omniprésente dans l'environnement et souvent retrouvée dans les réseaux de distribution d'eau potable.

Maladies : gastro-entérites, colites, septicémies, méningites



### **Pseudomonas aeruginosa**

Germes habituels des sols, des eaux, des intestins des animaux et de l'homme.

Maladies :  
- Infections cutanées : otites, conjonctivites..  
- Infections digestives : entérites aiguës

### **Staphylococcus aureus**

Hôtes de l'épiderme des mammifères, des muqueuses et du tube digestif.

Ils colonisent l'environnement : air, eau, sol

Maladies :  
Otites, conjonctivites des baigneurs  
Infections digestives : diarrhées

## **Contrôle bactériologique des eaux**

### **Indicateur idéal de bactérie**

1. Spécifique d'une contamination
2. Coexistence avec les germes pathogènes
3. Inoffensif
4. Plus résistant aux agents désinfectants que les germes pathogènes
5. Taxonomie : il doit être parfaitement reconnu et classé
6. Techniquement : facile à détecter rapidement et à moindre coût
7. Distribution au hasard de l'échantillon et croissance non inhibée par d'autres germes.

### **Détection bactériologique : FMAR**

FMAR : flore mésophile aérobie revivifiable

2 catégories sur le plan de l'hygiène :

- germes saprophytes plutôt spécifiques de l'eau qui se développent vers 20°C
- germes provenant de l'homme et des animaux qui se développent vers 37°C

### **Détection fécale : présence de certaines bactéries**

- Les entérocoques permettent la détection de contaminations fécales anciennes et leur résistance aux agents désinfectants pourrait être comparable à celle des virus.

Par exemple : *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*

- E. Coli témoigne d'une contamination fécale récente donc de la possible présence d'organismes pathogènes.

Attention : l'absence d'E. coli ne signifie évidemment pas que l'eau est hygiénique.

(cf Tarzan : Es-tu sûre que cette eau est bien hygiénique ?)

### **Examen des eaux traitées en station**

Pour estimer la qualité du traitement, on étudie principalement :

- les coliformes en général (> coliformes fécaux > e.coli )
- des bactéries anaérobies sulfito-réductrices : leur présence indique une déficience de la filtration au cours du traitement de l'eau. Exemple : *Clostridium perfringens*



## Qualité de l'eau de distribution

1) Eau d'entrée	<b>Limites de qualité</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• Entérocoques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 / 100ml</li> <li>• 0 / 100ml</li> </ul>
	<b>Références de qualité</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• germes aérobies revivifiables à 22°C et 36°C</li> <li>• coliformes</li> <li>• Bactéries sulfite-réductrices</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 UFC/ml à 22°C</li> <li>• 10 UFC/ml à 36°C</li> <li>• 0 / 100ml</li> <li>• 0 / 100ml</li> </ul>
2) Eau aux points d'usage	<b>Indicateurs</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• germes aérobies revivifiables à 22°C et 37°C</li> <li>• coliformes</li> <li>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> </ul>	<b>Niveau cible</b> Pas de variation dans un rapport de 10 par rapport à la valeur habituelle de l'eau d'entrée <ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt; 1 UFC / 100ml</li> <li>• &lt; 1 UFC / 100ml</li> </ul>

## Eaux conditionnées

Paramètres microbiologiques	Niveaux exigés ou recommandés
<b>Limites de qualité</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• Entérocoques</li> <li>• Bactéries sulfite-réductrices</li> <li>• Germes aérobies revivifiables à 22°C*</li> <li>• Germes aérobies revivifiables à 36°C*</li> <li>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>**</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 / 250 ml</li> <li>• 0 / 250 ml</li> <li>• 0 / 50 ml</li> <li>• 100 / ml</li> <li>• 20 / ml</li> <li>• 0 / 250 ml</li> </ul>
* les analyses doivent être commencées dans les 12 heures suivant le conditionnement ** les analyses doivent être commencées au moins 3 jours après le conditionnement.	

## Eau chaude

Paramètres microbiologiques	Niveaux exigés ou recommandés
<b>Indicateur</b> <i>Legionella pneumophila</i>	<b>Niveau cible :</b> < 1000 UFC / l <b>Niveau d'alerte :</b> 1000 UFC / l <b>Niveau d'action :</b> 10 000 UFC / l

## Eau de piscine et de rééducation

Paramètres microbiologiques	Niveaux exigés ou recommandés
<b>Indicateurs</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• flore aérobie revivifiable à 36°C</li> <li>• coliformes totaux à 36°C</li> <li>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> </ul>	<b>Niveau cible :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt; 100 UFC / ml</li> <li>• ≤ 1 UFC / 100 ml</li> <li>• ≤ 1 UFC / 100 ml</li> <li>• ≤ 1 UFC / 100 ml</li> </ul>

## Eaux codifiées à usage pharmaceutique

### Eau purifiée

- flore aérobie revivifiable
- endotoxines

- Niveau exigé :**
- ≤ 100 UFC / ml
  - < 0,25 UI / ml

### Eau hautement purifiée

- flore aérobie revivifiable

- Niveau exigé :**
- ≤ 10 UFC / 100 ml

## Méthodes d'analyse

Micro-organismes recherchés	Méthode utilisée
Micro-organismes revivifiables	Incorporation en gélose
Coliformes et coliformes thermotolérants	Filtration sur membrane
Streptocoques fécaux	Filtration sur membrane
Spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices	Incorporation en gélose en tubes profonds
Clostridium sulfite-réducteurs	Filtration sur membrane
Salmonelle	Filtration sur membrane (0,45 µm de porosité)
Legionella	Filtration sur membrane (0,22 µm de porosité)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	Filtration sur membrane
Staphylocoques à coagulase +	Filtration sur membrane (0,45 µm de porosité)



## Virus pathogènes

### Abondance et Dynamique

$10^4$  virus/mL à  $10^8$  virus/mL (moyenne  $10^7$  virus/mL)

$10^7$  à  $10^{10}$  virus/g sec de sédiment

Dans l'océan =  $4 \times 10^{30}$  virus

=  $200 \times 10^6$  tonnes de carbone

=  $75 \times 10^6$  baleines

→ Virus de bactéries et de phytoplancton

→ Bactériophages (Phages) sont dominants

### Principaux virus transmis par l'eau

Principaux bactériophages

De l'ordre des Caudoviridea (Siphoviridae, Myoviridae et Polioviridae)

Avec ADN double brin

### Actions des virus dans l'eau

Agent de la mortalité microbienne → Responsable de 10% à 50 % de la mortalité bactérienne

Implication dans les cycles biogéochimiques → Conséquences de la lyse virale

Rôle dans la dynamique de la biodiversité microbienne → Transfert génétique

### Etapes de l'infection virale

Le virus est un parasite intracellulaire obligatoire.

Le processus de l'infection :

1. Attachement

2. introduction du génome dans la cellule

3. re-programmation de la cellule

4. auto-assemblage

5. sortie de la cellule

Note : Lytique ≠ Tempéré

Cycle lytique ≠ Cycle lysogénique

### Utilisation des virus

Les phages sont utilisés :

- en recherche génétique moléculaire

- en lutte contre ou en détection des bactéries infectieuses (phages = « antibiotiques intelligents »)

- en lutte contre ou en détection des bactéries pathogènes

- en phagothérapie appliquée aux organismes aquatiques (lutter contre les parasites bactériens de certains poissons, crevette, coraux : *Aeromonas* ou *Yersinia*...)

### Les pathogènes

Famille	Genre	Virus
<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepatovirus</i>	Hépatite A Hépatite E
<i>Caliciviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	Entérovirus
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i> <i>Sapovirus</i>	Norwalk virus
<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	Astrovirus
<i>Reoviridae</i>	<i>Rotavirus</i> <i>Reovirus</i>	Rotavirus
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	Adenovirus

Virus des hépatites et des gastro-entérites.

Ces virus sont :

- entériques, à transmission féco-orale

- sans enveloppe (nus)

- résistants

- excrétés en grande quantité (3 j à 3 sem)

dans les selles ( $10^6$  à  $10^{10}$  particules/g)

Note : Des eaux ou aliments bactériologiquement sains d'après les normes de contrôle en vigueur, n'excluent pas la présence de virus infectieux !



### Indicateur idéal de virus

1. Coexistence
2. Rapport
3. Résistance
4. Inoffensif
5. Facile à détecter
6. Moins couteux

Les indicateurs utilisés sont :

- Les Entérovirus : indicateur de la présence de virus entériques
- Le génome des virus entériques : présence de génome viral pourrait être considérée comme un témoin de contamination virale
- Les bactériophages (ceux à ARN F-spécifiques pourraient constituer de bons indicateurs de contamination fécale animale et humaine. Mais...)
- Les indicateurs bactériens : E.coli

### Méthodes de détection

1. On purifie et concentre : Elution, digestion, broyage, clarification, concentration..
2. On recherche par : microscopie, détection des antigènes (ELISA) ou du génome.

### Autres microorganismes transmis par l'eau (parasites)

Exemples : Cryptosporidium, Giardia, Entamoeba.

Ils peuvent être sous deux formes :

#### Forme de résistance

Le kyste ou l'oocyste

Résistance et survie véhiculés par l'eau

#### Forme végétative chez l'Homme

Contamine l'intestin

Formation secondaire (foie, poumons, cerveau)

### Cryptosporidium

Chez les cryptosporidium, il y a 10 espèces caractérisées. Une seule est pathogène pour un humain immunocompétent : parvum, responsable de la cryptosporidiose.

Cryptosporidium parvum a deux génotypes : l'oocyste (résistant) et le sporozoïte (hôte).

### Giardia

Parasite cosmopolite, fréquent à cause de diarrhées non-bactériennes.

Deux formes de vie : kyste (résistant) et trophozoïte (végétatif).

Genre divisé en 6 espèces :

intestinalis = mammifères

duodenalis = hommes

microti = rats musqués, campagnols

agilis = amphibiens

psittaci = oiseaux

ardeae = hérons

muris = rongeurs

### Entamoeba histolytica et Entamoeba dispar

Amibes à l'origine identiques, pathogènes parasites spécifiquement de l'espèce humaine, de forme kyste ou trophozoïte.

Son pouvoir pathogène varie selon :

- les régions (pathogène en zone tropicale)
- le degré de résistance de l'homme parasité
- l'état immunitaire
- la fréquence des souches à zymodème pathogène



## 12 cryptosporidium

(Fayer et al., 2000 cité dans Xiao et al., 2002)

Hôtes	Espèces
Mammifères	<i>Parvum</i>
Hamster	<i>Wrairi</i>
Chats	<i>Felis</i>
Chien	<i>Canis</i>
Rongeurs et ruminants	<i>Muris</i>
Bovins	<i>Andersoni</i>
Oiseaux	<i>Meleagridis</i>
Reptiles	<i>Baileyi</i>
Reptiles	<i>Serpentis</i>
Poissons	<i>Saurophilum</i>
Poissons	<i>Nasorum</i>
Poissons	<i>Molnar</i>

Corps humain

flores normales →

bactéries courantes →

opportunistes →

différence

antiseptique

désinfectant

antibiotique

Eau

Indicateur bactérien

idéal: citères →

exemples →

Virus entériques —

↳ moyen de détection →

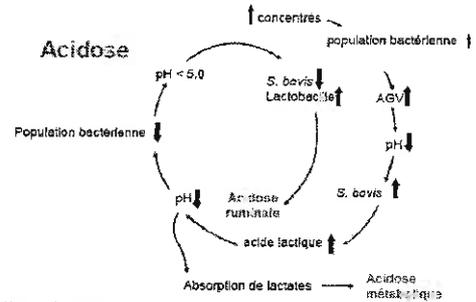
# Fiche microbiologie organisme

## Colon : exclusivement anaérobie

<p>☐ flore dominante (N&gt;10<sup>9</sup> UFC/g)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>Bacteroides</i>,</li> <li>○ <i>Bifidobacterium</i>,</li> <li>○ <i>Eubacterium</i>,</li> <li>○ <i>Peptostreptococcus</i>,</li> <li>○ <i>Ruminococcus</i>,</li> <li>○ <i>Clostridium</i>,</li> <li>○ <i>Propionibacterium</i>,</li> </ul>	<p>☐ flore sous dominante (10<sup>5</sup>&gt;N&gt;10<sup>8</sup> UFC/g) :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>Lactobacillus</i>,</li> <li>○ <i>Enterobacteriaceae</i> (surtout <i>E.coli</i>)</li> <li>○ <i>Streptococcus</i>,</li> <li>○ <i>Enterococcus</i>,</li> <li>○ <i>Fusobacterium</i>,</li> <li>○ <i>Methanobrevibacter</i></li> </ul>
--	---

☐ flore résiduelle (N<10<sup>6</sup> UFC/g) :

☐ flore fécale



Ci-dessus, les risque d'acidose en schéma !

## Bactéries - Digestion des glucides

### 1. Bactéries fibrolytiques

#### 1.1 Bactéries cellulolytiques

*Fibrobacter succinogenes*  
(*Bacteroides succinogenes*)  
*Butyrivibrio fibrisolvens*  
*Ruminococcus flavefaciens*  
*Ruminococcus albus*

Bacilles

Coques

#### 1.2 Bactéries hémicellulolytiques

*Butyrivibrio fibrisolvens*  
*Prevotella ruminicola*  
*Ruminococci*

#### 1.3 Bactéries pectinolytiques

*Butyrivibrio fibrisolvens*,  
*Prevotella ruminicola*,  
*Lachnospira multiparus*.

### Digestion des glucides

#### Formation de gaz : CO<sub>2</sub> et méthane (CH<sub>4</sub>)

- Production totale pouvant atteindre 600 L/J
- CO<sub>2</sub> vient majoritairement de la décarboxylation de l'acide pyruvique en acétate
- CH<sub>4</sub> :  
 $4H_2 + CO_2 = CH_4 + 2H_2O$   
*Methanobacterium formicum*,  
*Methanobacter ruminantium*

### Écosystème caecal

- Bactéries anaérobies strictes : *Bacteroides*
- Bactéries sous dominant :
  - *Bifidobacterium*,
  - *Clostridium*,
  - *Lactobacillus*,
  - *Streptococcus*
  - *Enterobacter*
- Bactéries fibrolytique :
  - *Fibrobacter succinogenes*,
  - *Ruminococcus albus*
  - *Ruminococcus flavefaciens*,
  - *Flavefaciens intestinalis*
- 40% reste non identifié

Absence de protozoaire

Présente des bactéries pathogènes

### 2. Les bactéries amylolytiques

Les espèces cellulolytiques :

*F. succinogenes*,  
*B. fibrisolvens*

Les espèces non cellulolytiques :

*Streptococcus bovis*,  
*Ruminobacter amylophilus*,  
*Prevotella ruminicola*,  
*Succinimonas amylolytica*  
*elenomonas ruminantium*

*Prevotella ruminicola* digère les protéines.

*Anaerovibrio lipolytica* et *Butyrivibrio fibrisolvens* digèrent les lipides.

## Fiche microorganismes de l'eau

### courantes

- Salmonella
- Shigella
- E. coli
- Vibrio cholerae
- Campylobacter jejuni

### émergentes

- Legionella
- Acanthamoeba hydrophila

### occasionnelles

- Pseudomonas aeruginosa
- Staphylococcus aureus

### bactéries fécales

- Enterococcus faecalis
- E. coli

Virus → surtout des Caudoviridea  
Hépatovirus  
Entérovirus  
Rota virus  
etc

Parasites → Cryptosporidium  
Giardia  
kyste / trophozoïte

Saprophytes

Méthode de FTIR  
→ on met l'origine de 3ml d'eau (dilution 1/100)  
NPP  
→ violet → lactose

**TRAVAUX PRATIQUES**  
**ANALYSE MICROBIOLOGIQUE**  
**DE L'EAU**

MODULE MICRO ORGANISMES

ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DE L'EAU

## Liste des bactéries à rechercher :

1. **Dénombrement mes micro-organismes revivifiables (FMAR) par méthode d'incorporation en gélose**
2. **Dénombrement des germes de contamination fécale : Coliformes par méthode NPP**
3. **Dénombrement des germes de contamination fécale : Coliformes par méthode de filtration sur membrane**
4. **Dénombrement *Escherichia coli* par microplaque**
5. **Recherche des bactériophages**

## 1. DENOMBREMENT MES MICRO-ORGANISMES REVIVIFIABLES (FMAR) PAR METHODE D'INCORPORATION EN GELOSE (ISO 6222 MAI 1999)

### PRINCIPE :

**Micro-organismes Revivifiabiles :** toute bactérie aérobie, levure ou moisissure capable de former des colonies après dilution dans la masse dans une gélose à l'extrait de levure incubée dans les conditions suivantes :

à 36°C en 24 heures (favorise plutôt les germes d'origine humaine ou animale)

à 22°C en 68 heures (favorise plutôt les flores saprophytes)

Remarques : Cependant, certains germes saprophytes comme Bacillus, certains Pseudomonas et Microcoques peuvent aussi se développer à 36°C.

### MILIEU : Gélose à l'extrait de levure :

- Tryptone : 6g
- Extrait de levure : 3g
- Agar agar : 10 à 15g
- Eau 1000 ml, pH = 7,2 après autoclavage à 121°C 15 mn

### J1 : ENSEMENCEMENTS FMAR 22°C ET 36°C

1. **Préparer les boîtes :** Couler environ 15 ml de milieu en surfusion à 45+/-1°C sur les boîtes de Pétri et laisser sécher sous la hotte ou à coté de flamme.

2. **Dilution 10-1 à 10-3 en tryptone -sel stérile (TS) :**

- 10<sup>-1</sup> : 1 ml d'eau à analyser dans 9 ml de diluant TS
- 10<sup>-2</sup> : 1 ml d'eau 10<sup>-1</sup> dans 9 ml de diluant
- 10<sup>-3</sup> : 1 ml d'eau 10<sup>-2</sup> dans 9 ml de diluant

*changez de pipette stérile pour chaque dilution*

3. **Ensemencement :**

- Ensemencer 1 ml de chaque dilution 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-3</sup> dans 6 boîtes de Pétri,
- Homogénéiser par rotation à plat puis solidifier la gélose à T ambiante

*Incuber les boîtes retournées*

- *2 boîtes de chaque dilution à l'étuve à 22°C +/-2°C pendant 68h +/-4h.*
- *2 boîtes de chaque dilution à 36°C +/-2°C pendant 44h +/-4h*

### J3 COMPTAGES FMAR 36°C et 22°C

- Compter les colonies dans chaque boîte. , rejeter les boites à colonies confluentes ou > 300 colonies si la dilution suivante donne R<300
- Exprimer le résultat en unités formant colonies : UFC / ml

## 2. DENOMBREMENT DES GERMES DE CONTAMINATION FECALE COLIFORMES PAR METHODE NPP (NF T 90-413 OCTOBRE 1985 )

### PRINCIPE :

- les **coliformes** sont des Entérobactéries : bacilles asporulés gram - oxydase-, aérobies-anaérobies facultatifs, se développant sur milieu bilié ou contenant des agents tensio actifs comme le lauryl sulfate, capables de fermenter le lactose avec production de gaz à 37°C +/-1°C en 48 heures.
- les **coliformes thermotolérants** ont les mêmes propriétés mais à 44°C +/-0,5°C en 48 heures (appelés aussi coliformes **fécaux**).
- **E. coli présumés** sont des coliformes thermotolérants produisant de l'indole à 44°C +/-0,5°C à partir du tryptophane (test de **Mackenzie**).
- **E. coli** est un E Coli présumé (Indole +), mais également Rouge de Méthyle+ acétoïne ou VP - citrate - (test **IMVEC**) actuellement, on lui préfère une galerie **API** avec utilisation d'une banque de données qui conduit à une identification avec le maximum de probabilités.

### MILIEUX :

- **Bouillon lactosé au bromocrésol pourpre (BLBCP)** avec cloche de Durham
  - o 3 tubes de 20x200mm contenant 10 ml de milieu double concentration
  - o 12 tubes de 16x160mm contiennent 10ml de milieu simple concentration
  - o (Ou Bouillon au lauryl sulfate de sodium avec cloche , simple et double concentration)
- **Milieux confirmatifs**
  - o X tubes de 10 ml de Bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB) avec cloche immergée
  - o (Ou milieu de Schubert au tryptophane avec cloche)

### TECHNIQUE :

#### J1 : Ensemencement des coliformes totaux sur milieu liquide

Enlever le gaz éventuel contenu dans chaque cloche puis ensemercer :

- 10 ml d'eau dans les 3 tubes de diamètre 20 mm de bouillon double concentration.
- 1 ml d'eau dans 3 tubes simple concentration.
- 1 ml de chaque dilution ( $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ ) dans 3 tubes simple concentration)
- Agiter et *incuber à 30°C. +/-1°C pendant 24 ou 48h*

#### J2 : Lecture des Coliformes totaux sur BLBCP (réalisée par la technicienne)

- Les tubes troubles ayant viré ou non au jaune et renfermant du gaz dans la cloche (au moins 1/10) renferment au moins un coliforme présumé (il peut y avoir des réactions faussement positives à cause de Clostridium).
- (Le bouillon Lauryl sulfate tryptose est plus sélectif car l'agent tensio actif inhibe les sporulés gazogènes.)

#### J2 : Confirmation des Coliformes totaux (réalisée par la technicienne)

- Repiquer avec une anse ou une pipette Pasteur chaque tube de bouillon BLBCP positif sur 1 tube de **BLBVB** (bouillon lactosé bilié au vert brillant) avec cloche
- **Incuber à 37°C +/- 1°C pendant 24h**

**J2 : Confirmation des Coliformes thermotolérants et d' E. coli présumé**

- Repiquer les tubes de bouillon de BLBCP positif sur 2 milieux :
- **1 tube de BLBVB** avec cloche,
- **1 tube de bouillon au tryptophane**
- **Incuber à 44°C +/- 0,5°C pendant 24 à 48h.**

**J3 : lecture des coliformes totaux**

- Un tube de BLBVB positif renferme des coliformes totaux s'il y a **un trouble et du gaz** dans la cloche
- Compter le nombre de tubes positifs pour chaque dilution et rechercher le NPP ou nombre le plus probable de germes dans la table de Mac Grady
- (voir ANNEXE 1)
- Ce nombre correspond au NPP dans 100 ml de la plus grande dilution dilution

N= NPP/Td ou Td est le taux de dilution

Ex: 3 tubes + à 10<sup>-1</sup>

2 tubes+ à 10<sup>-2</sup>

1 tube + à 10<sup>-3</sup>

n = 321 ,NPP = 15 , N = 15/10<sup>-3</sup> soit 1,5 · 10<sup>4</sup> coliformes dans 100 ml d'eau

**J3 : lecture des coliformes thermotolérants et d' E. coli présumés**

Un tube de **BLBVB positif** à 44°C renferme des coliformes thermotolérants s'il y a **un trouble et du gaz** dans la cloche :rechercher le NPPdans la table ANNEXE1

**E. coli est un coliforme thermotolérant qui produit de l'indole sur bouillon au tryptophane : coloration rouge avec le réactif de Kovacks**

Application :

### 3. DENOMBREMENT DES GERMES DE CONTAMINATION FCALE COLIFORMES PAR FILTRATION SUR MEMBRANE (NF EN ISO 9308-1 SEPTEMBRE 2000)

#### MILIEUX : gélose lactosée au TTC et tergitol 7

TTC (chlorure de Triphényl tétrazolium)

Tergitol 7 (heptadécylsulfate de sodium)

#### TECHNIQUE :

#### J1 Ensemencement des coliformes totaux ou thermotolérants sur milieu solide : voir ANNEXE 2

- Filtrer 100 ml d'eau à analyser sur une membrane stérile de 0,45 $\mu$  et éventuellement 100 ml de dilution  $10^{-1}$  et 100 ml de dilution  $10^{-2}$ . (*1 dilution par poste*)
- Avec une pince flambée appliquer la membrane à la surface du milieu gélosé sans emprisonner de bulle d'air; incuber à 36°C +/-2°C ou à 44°C +/- 0,5°C pendant 24 heures pour sélectionner les coliformes totaux ou les coliformes thermotolérants.

#### J2 lecture coliformes thermotolérants sur gélose au TTC et au Tergitol 7

- Le tergitol 7 est un agent tensio-actif inhibiteur de la flore secondaire.
- Indésirable des gram + et limite l'envahissement des Proteus
- Les coliformes donnent des **colonies jaunes ou orangées entourées d'un halo jaune** : il y a acidification par fermentation du lactose et virage du bleu de bromothymol à travers la membrane. Les autres bacilles gram - donnent des colonies rouge foncé (réduction du TTC) ou non, mais entourées d'un halo bleu.
- Retenir les membranes dont le nombre de colonies est inférieur à 100, et
- **compter les colonies jaunes ou oranges entourées d'un halo jaune lac +**
- E. Coli et Entérobacter → colonie jaune avec halo jaune
- Autres coliformes → colonie orange avec halo jaune
- Non coliforme → halo bleu, colonie rouge si réduction du TTC.
- **Confirmation** par repiquage de 5 à 10 colonies typiques sur **milieu TSA** (incuber à 36°C +/-2°C 21h +/-2h ) et sur **bouillon au tryptophane** , incuber à 44°C +/-0,5°C 21h +/-3h (*démonstration*)

#### J3 confirmation des coliformes et de E.coli

- Faire le test oxydase sur milieu TSA : si **oxydase -** confirmation de coliforme
- **Ramener à 100 ml d'eau en tenant compte du facteur de dilution**
- Rechercher l'indole avec le réactif de Kovacks sur bouillon au tryptophane : si **indole** + confirmation de E. coli
- **Ramener à 100 ml d'eau en tenant compte du facteur de dilution**

## 4. DENOMBREMENT D'ECOLI PAR TECHNIQUE SUR MICROPLAQUES (ISO 9308-3 ET 7899-1 1999)

### PRINCIPE :

- La microplaque comporte 96 cupules ou puits contenant un milieu déshydraté permettant la mise en évidence d'une enzyme spécifique d'E.coli : **la bêta-glucuronidase**, le substrat présent dans le milieu étant le 4 méthyl umbelliferyl-béta-D-glucuronide (**MUG**)
- Le produit d'hydrolyse est le 4 méthyl umbelliféron fluorescent sous UV
- Après incubation et dénombrement des puits fluorescents, une table statistique fournit le **NPP : nombre le plus probable de germes présents dans 100 ml d'eau**

### TECHNIQUE :

#### J1 : Préparation des dilutions et ensemencement des microplaques

- **4 Dilutions** : ( eaux douces superficielles) : plage = 40 à  $3,2 \cdot 10^6$  bactéries/100 ml  
Dilution  $\frac{1}{2}$  : 18 ml d'eau à analyser dans 18ml de diluant stérile  
Dilution  $\frac{1}{20}$  : 2 ml de dilution  $\frac{1}{2}$  dans 18 ml de diluant stérile  
Dilution  $\frac{1}{200}$  : 2ml de dilution  $\frac{1}{20}$  dans 18 ml de diluant stérile  
Dilution  $\frac{1}{2000}$  : 2 ml de dilution  $\frac{1}{200}$  dans 18ml de diluant stérile
- **Ensemencement** :  
Ensemencer 200  $\mu$ l de chaque dilution dans 24 puits  
Recouvrir la plaque d'un film adhésif stérile à usage unique
- **Incubation** : 44°C 36h à 72h

#### J3 : lecture :

- Placer chaque microplaque couverte de son film dans la chambre UV à 366nm  
Et Compter le nombre de puits positifs (fluorescence bleue) pour chaque dilution
- Déterminer le nombre caractéristique de 3 chiffres NC  
(le dernier devant être 0 si possible)
- Déterminer dans les tables statistiques le nombre le plus probable de bactéries **NPP** correspondant à chaque NC
- Exprimer le résultat pour 100 ml d'eau

$N = \text{NPP}/T_d \text{ ou } T_d \text{ est le taux de dilution}$
--

## 5. DETECTION ET DENOMBREMENT DES BACTERIOPHAGES ARN F SPECIFIQUES. ISO 10705-1:1995

### PRINCIPE :

La méthode double couche est une technique quantitative qui permet de connaître la concentration en phage dans un échantillon. Après incubations, des zones claires sont observables sur les boîtes. Ces zones sont appelées plages de lyse (cf photo 1). On considère qu'une plage correspond à une bactérie lysée par un phage. Ainsi en connaissant le nombre de plages, le volume inoculé ainsi que la dilution, il est facile de connaître le nombre de phages dans l'échantillon. Le résultat est exprimé en UFP/mL (unités formant plage).



### MILIEUX :

- milieu TYGB (Tryptone-extract Glucose Broth) pour culture de la bactérie hôte *E.coli*.
- milieu TYGA (Tryptone-extract Glucose Agar) (1,5 g/L d'agar) : 3 boîtes de Petrie
- milieu ssTYGA (semi-solide Tryptone-extract Glucose Agar) : bain marie

### TECHNIQUE :

#### J1 :

- Préparation des dilutions:  $10^0$  à  $10^{-2}$

- Pour chaque dilution :

Mettre 2,5 mL de milieu ssTYGA dans un tube d'hémolyse (*le milieu est dans bain marie, remettre immédiatement le milieu dans le bain marie*)

Dans ce tube, ajouter :

+ 100  $\mu$ L de culture de bactéries *E.coli*

+ 100  $\mu$ L d'échantillon (1 dilution de l'eau :  $10^0$  ;  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ )

Vortex rapidement

Verser sur la boîte de Pétrie de TYGA (milieu 1,5% d'agar)

Incuber à 37°C pendant 18h (une nuit)

#### J3 : lecture :

- Une plage de lyse = un phage
- Exprimer le résultat pour 100 ml d'eau

*Pour l'interprétation de l'ensemble des résultats  
se référer aux tableaux de l' ANNEXE 5*

**ANNEXE 1**

**Tables de Mac Grady pour 3 tubes**

NC	NPP	NC	NPP
000	<0,3	222	3,5
001	0,3	223	4
010	0,3	230	3
011	0,6	231	3,5
020	0,6	232	4
100	0,4	300	2,5
101	0,7	301	4
102	1,1	302	6,5
110	0,7	310	4,5
111	1,1	311	7,5
120	1,1	312	11,5
121	1,5	313	16
130	1,6	320	9,5
200	0,9	321	15
201	1,4	322	20
202	2	323	30
210	1,5	330	25
211	2	331	45
212	3	332	110
220	2	333	140
221	3		

**Le nombre le plus probable de germes (NPP) est une estimation statistique de la densité de micro-organismes supposé répondre à une distribution de Poisson dans les volumesensemencés.**

**TECHNIQUE DE FILTRATION SUR MEMBRANES POUR  
L'ANALYSE DE L'EAU**

**1 - PRINCIPE**

Certaines bactéries étant à une concentration très faible dans l'eau, on peut par filtration d'un volume important d'eau, arrêter sur le filtre toutes les bactéries présentes dans ce volume. Les pores du filtre doivent être de dimensions inférieures à celles des bactéries (0,22 à 0,45  $\mu\text{m}$ ).

Une fois les bactéries recueillies, toute analyse peut être réalisée en déposant le filtre sur un milieu sélectif ou non.

*Remarque : Cette technique ne permet pas d'obtenir un filtrat totalement stérile car les virus passent à travers les pores de la membrane.*

**2 - TECHNIQUE**



L'appareil est un système de filtration sous pression réduite (trompe à eau). Il contient un support filtre qui reçoit, sur une partie en inox fritté à larges pores, la membrane de filtration.

Le godet permet de recevoir l'eau à analyser. Les deux parties s'assemblent par une pince.

L'ensemble est stérilisable. (parties métalliques : four - caoutchouc : autoclave).

Les membranes utilisées (en ester de cellulose) sont quadrillées et les pores ont un diamètre de 0,45  $\mu\text{m}$  en général.

L'ensemble de l'appareillage doit être placé en zone de travail stérile près d'une flamme pour pouvoir stériliser le matériel.

**2.2 -Préparation**

- Flamber la base et le support filtre. Quand le support filtre est refroidi, poser stérilement la membrane stérile.

Flamber le godet. Une fois refroidi, le poser sur la base sans léser la membrane.

### 2.3-Filtration:

- Verser *doucement* le liquide (volume choisi) jusqu'à la graduation adéquate.
- Faire le vide.
- Rincer avec le tampon ou l'eau stérile l'ensemble de l'appareil et les bords internes du godet.
- Sécher la membrane en faisant le vide plusieurs fois.
- Débrancher le tuyau à vide

### 2.4 - Mise en culture

- Lever et flamber le godet.
- Retirer la membrane avec une pince flambée. La poser sur le milieu choisi, sans faire de bulles et sans la retourner. Le milieu doit avoir une épaisseur minimale de 5 mm et être sec.
- Incuber à la température choisie.

## **3 -ANALYSES REALISEES SUR L'EAU**

- **Colimétrie**
- **Streptocoques fécaux**
- **Staphylococcus aureus et Pseudomonas aeruginosa** sur l'eau de piscine uniquement.
- **Salmonella** pour les eaux de surface uniquement. On réalise une filtration de 100 à 500 ml de l'eau à analyser. Après la filtration, la membrane est ensuite reportée dans un bouillon au sélénite pour le préenrichissement. La recherche se poursuit par la même technique qu'en bactériologie alimentaire.

**CRITERES MICROBIOLOGIQUES DES EAUX**  
(décret du 3 janvier 1989 modifié par le décret du 5 avril 1995)

Les valeurs sont exprimées en nombre de germes par ml ou 100 ml

**EAUX DE BAIGNADE**

	Eau de piscine	Baignades aménagées	Cressionnière Thalasso-thérapie	Eau de mer (1)
<b>FAM 37°C 24h</b>	10 <sup>2</sup> /ml			
<b>Coliformes</b>	10/100 ml	10 <sup>4</sup> /100 ml		2 . 10 <sup>3</sup> /100 ml
<b>Coliformes Fécaux</b>	0/100 ml	2 . 10 <sup>3</sup> /100 ml	10/100 ml	10 <sup>2</sup> à 5 . 10 <sup>2</sup> / 100 ml
<b>Streptocoques fécaux</b>			10/100 ml	100/100 ml

**EAUX POTABLES A LA DISTRIBUTION**

**EAUX DESTINEES A LA CONSOMMATION HUMAINE**

Eau potable en France  
normes microbiologiques variables d'un pays à l'autre.

<b>Salmonella</b>	Absence dans 5 L
<b>Staphylocoques</b>	Absence dans 100 mL
<b>Bactériophages fécaux</b>	Absence dans 50 mL
<b>Entérovirus</b>	Absence dans 10 L
<b>Coliformes</b>	Absence dans 100 mL pour 95% des échantillons
<b>Coliformes thermotolérants</b>	Absence dans 100 mL
<b>Streptocoques fécaux</b>	Absence dans 100 mL
<b>Germes anaérobies sulfito-réducteurs</b>	Absence dans 100 mL

### EAUX CONDITIONNEES

<b>SALMONELLA</b>	Absence dans 5 L
<b>Staphylocoques</b>	Absence dans 100 mL
<b>Bactériophages fécaux</b>	Absence dans 50 mL
<b>Entérovirus</b>	Absence dans 10 L
<b>Coliformes thermotolérants</b>	Absence dans 100 mL
<b>Streptocoques fécaux</b>	Absence dans 100 mL
<b>Germes anaérobies sulfito-réducteurs</b>	Absence dans 100 mL
<b>Coliformes</b>	Absence dans 100 mL pour 95% des échantillons
<b>Flore aérobie mésophile revivifiable à 37° C</b>	20/mL (après 24 heures)
<b>Flore aérobie mésophile revivifiable à 22° C</b>	100/mL (après 72 heures)
<b>Pseudomonas aeruginosa</b>	Absence dans 100mL

### EAUX DESTINEES A LA PRODUCTION D'EAU

#### EAUX BRUTES

<b>Utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine</b>	
<b>Coliformes « fécaux »</b>	$2 \cdot 10^4$
<b>Streptocoques « fécaux »</b>	$10^4$

#### EAUX BRUTES SUPERFICIELLES

	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>
<b>Coliformes à 37°C dans 100 mL</b>	<b>50</b>	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4$
<b>Coliformes thermotolérants dans 100 mL</b>	<b>20</b>	$2 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^4$

<b>Streptocoques « fécaux » dans 100 mL</b>	<b>20</b>	<b>10<sup>3</sup></b>	<b>10<sup>4</sup></b>
<b>Salmonella dans 5 L (A1) ou 1 L (A2)</b>	<b>Absence</b>	<b>Absence</b>	
<b>FAM à 22° C</b>	100/mL (après 72 heures)		
<b>FAM à 37° C</b>	20/mL (après 24 heures)		

**EAUX MINÉRALES NATURELLES A L'ÉMERGENCE  
(décret du 6 juin 1989)**

<i>Micro-organismes pathogènes et toxines</i>	Absence
Escherichia coli	Absence dans 250 mL
Coliformes 37° C	Absence dans 250 mL
Coliformes 44,5° C	Absence dans 250 mL
Streptocoques « fécaux »	Absence dans 250 mL
Pseudomonas aeruginosa	Absence dans 250 mL
Germes anaérobies sulfite-réducteurs	Absence dans 50 ml

**EAUX INDUSTRIELLES**

**Eaux utilisées dans l'industrie lorsque l'eau est directement utilisée au contact de l'aliment :**

<b>FLORE TOTALE</b>	0 à 100 bactéries/mL	Eau très pure
	100 à 1 000 bactéries/mL	Eau pure
	1 000 à 10 000 bactéries/mL	Eau médiocre
	10 000 à 100 000 bactéries/mL	Eau impure
	Plus de 100 000 bactéries/mL	Eau très impure

**TRAVAUX PRATIQUES**  
**FICHE DE RESULTATS**

**MODULE MICRO ORGANISMES**  
**ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DE L'EAU**

## FICHE DE RESULTATS DE L'ANALYSE DE L'EAU

### I.1. FLORE AEROBIE MESOPHILE 22°C

Gélose glucosée à l'extrait de levure	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	Moyenne
Boîte 1	120	31	4	2 100/mL
Boîte 2	241	20	6	
Moyenne de 2 boîtes	180,5	25,5		
Résultat par ml	1805/mL	2550/mL	pas de comptage car < 10	

### I.2. FLORE AEROBIE MESOPHILE 36°C

Gélose glucosée à l'extrait de levure	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	Moyenne
Boîte 1	89	17	6	1015/mL
Boîte 2	137	21	1	
Moyenne de 2 boîtes	113	19	3,5	
Résultat par ml	11,3	0,19	pas de comptage car < 10-300	

## II. COLIFORMES TOTAUX PAR NNP

	3 tubes DC 10 <sup>0</sup>	3 tubes SC 10 <sup>0</sup>	3 tubes SC 10 <sup>-1</sup>	3 tubes SC 10 <sup>-2</sup>	3 tubes SC 10 <sup>-3</sup>	NC	NPP
Milieu BLBCP Nbre de tubes + : virage, trouble + gaz	4 + + +	1 1 +	1 + +	1 + -	- - -	370	3,5
Confirmation sur BLBVB trouble + gaz à 37°C	1 + + +	1 1 +	1 + +	1 + -	- - -	370	3,5
Confirmation sur BLBVB trouble + gaz à 44°C	1 + + +	1 + + +	1 + +	1 + -	- - -	370	3,5
Tryptophane à 44°C + indole	1 + + +	1 + + +	1 + +	- - -	- - -	370	3,5
Coliformes totaux par 100 ml :	= NPP de BLBVB à 37°C/Td = $\frac{3,5}{10^{-3}} = 3500/ml$						
Coliformes thermotolérants par 100 ml :	= NPP de BLBVB à 44°C/Td = $\frac{3,5}{10^{-3}} = 3500/ml$						
E.coli présumé par 100 ml :	= NPP de Tryptophane à 44°C + indole/Td = $\frac{3,5}{10^{-3}} = 3500$						

## III. COLIFORMES THERMOTOLERANTS OU FECAUX PAR FILTRATION

Milieu au TTC et tergitol 7 Filtration sur membrane	100 ml 10 <sup>0</sup>	100 ml 10 <sup>-1</sup>	100 ml 10 <sup>-2</sup>
Colonies jaunes -orangées avec halo jaune		288	
Repiquage sur gélose TSA et test oxydase		1 + + + 100%	
Repiquage sur bouillon Tryptophane et test indole		1 + + + + 100%	
Coliformes thermotolérants oxydase - /100 ml	880/ml		
E. COLI / 100 ml	880/ml		

## IV. E. COLI par microplaque

MICROPLAQUE Substrat MUG	24 puits 1/2	24 puits 1/20	24 puits 1/200	24 puits 1/2000
Nb. de puits + fluorescence bleue	18	2	0	0
NC	18/2 // 10			
NPP	13,62			
E. COLI / 100 ml	2622			

## V. BACTERIOPHAGES

Dilution	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	Moyenne bactériophages/50mL
Nombre de plage				
Bactériophages/50 mL				

**CONCLUSION :**