SVI – Module M33

TD 1 : TECHNIQUES D'ETUDE DE LA DIVERSITE BACTERIENNE

Tableau 1 : Méthodes de culture d'enrichissement de bactéries phototrophes.

Conditions	Organismes enrichis	Inoculum
Milieu aérobie ; Source d'azote N_2	Cyanobactéries	Eau d'un étang ou d'un lac ; boues riches en sulfures ; eaux stagnantes ; effluents bruts ; végétation humide en décomposition ; sol humide exposé à la lumière
Milieu aérobie ; Source d'azote NO_3^- ; 55°C	Cyanobactéries thermophiles	Tapis microbien de source chaude
Milieu anaérobie ; Source d'azote N_2 ; H_2 ou acide organique	Bactéries pourpres non sulfureuses ; Héliobactéries	Tapis microbien de source chaude ; eau d'un lac hypolimétique ; sol pasteurisé (héliobactéries)
Milieu anaérobie ; H_2S donneur d'électrons	Bactéries pourpres et vertes sulfureuses ;	

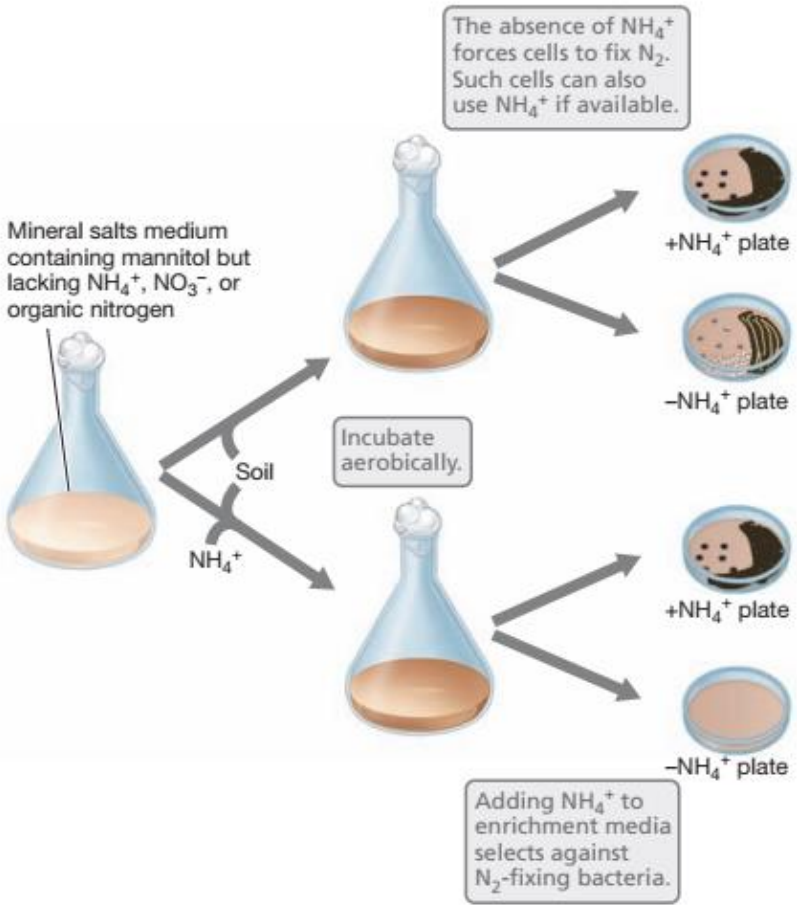


Fig. 1 : Isolement d'azotobacter par enrichissement.

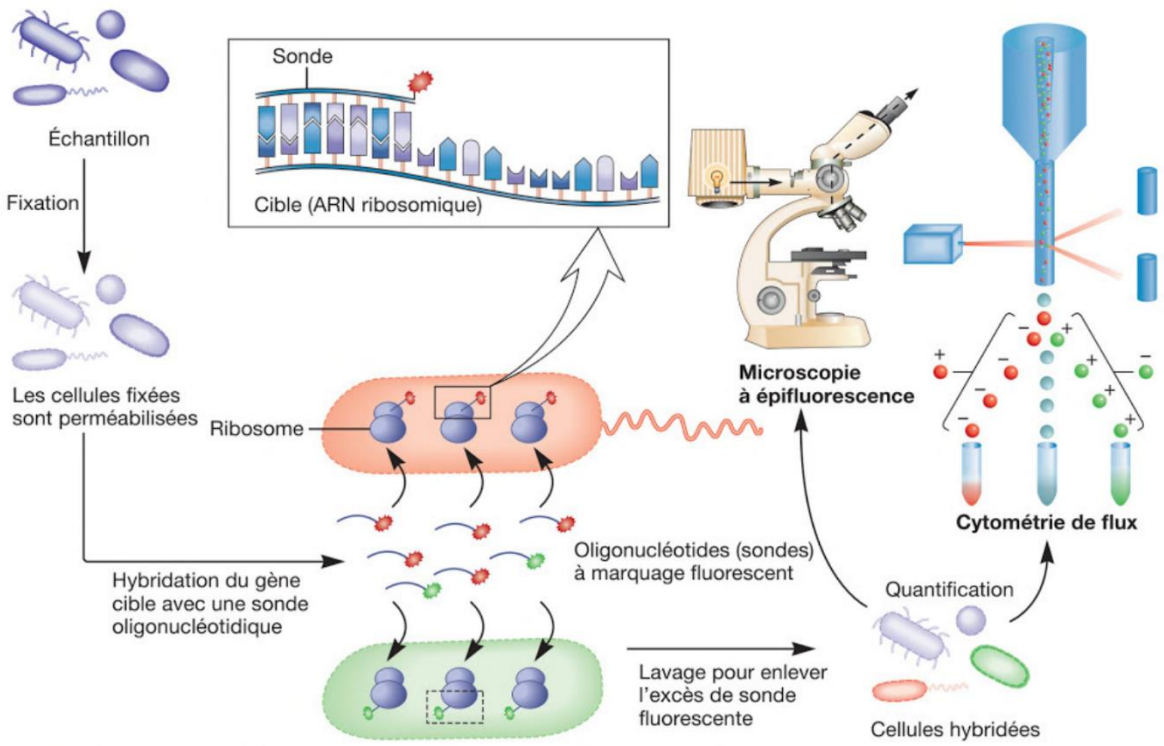


Fig. 6 : Hybridation in situ en fluorescence (FISH).

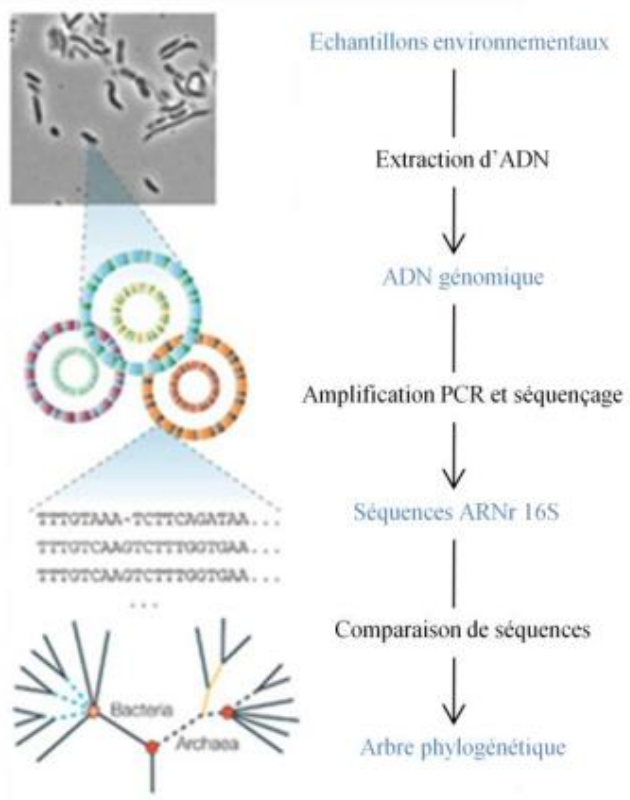


Figure 8 : Stratégie utilisée pour l'analyse moléculaire de la diversité bactérienne.

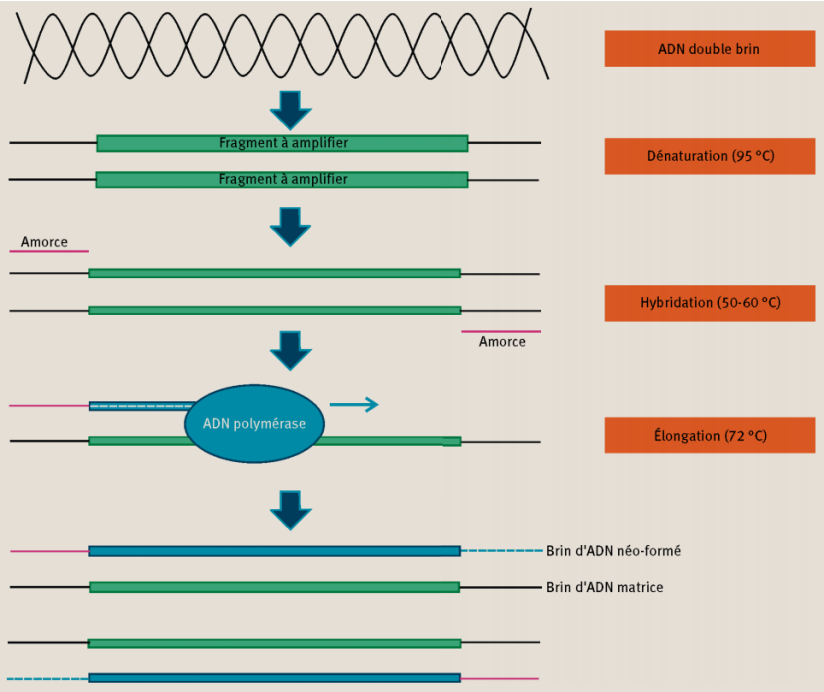


Figure 9 : Principe de la PCR.

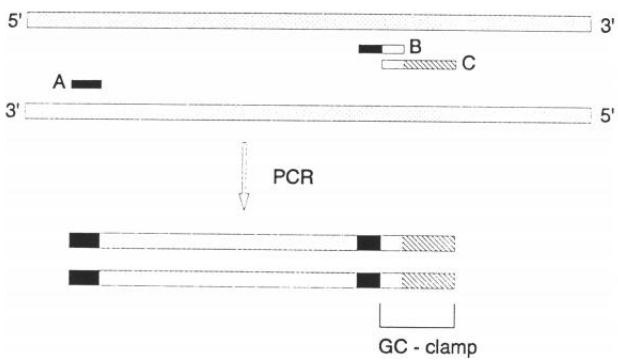


Figure 10 : La stratégie utilisée pour ajouter d'une GC-clamp à un fragment d'ADN amplifié par PCR.

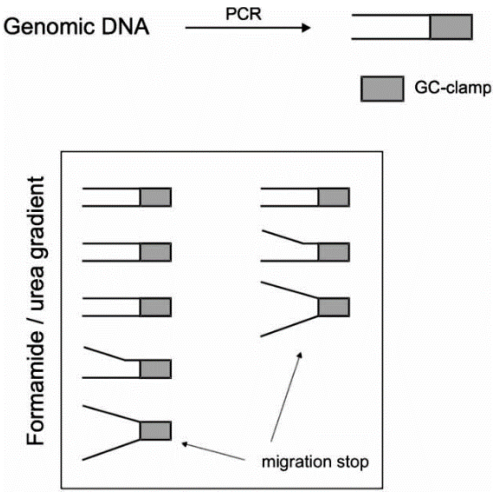


Figure 11 : Principe de la DGGE.

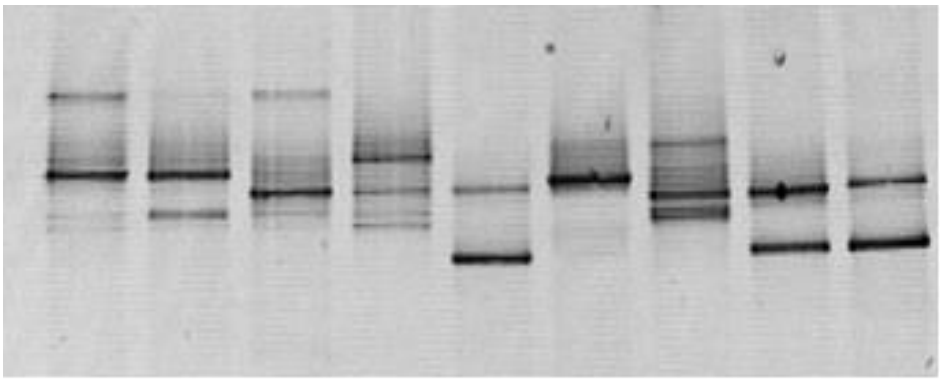


Figure 12 : Exemple d'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE).

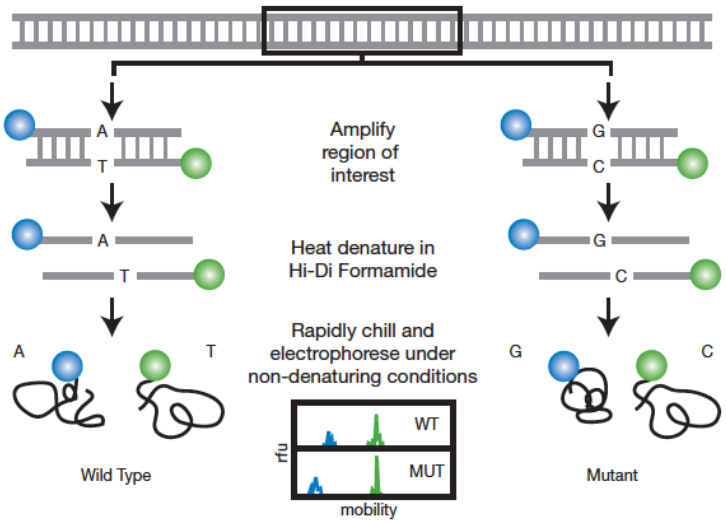
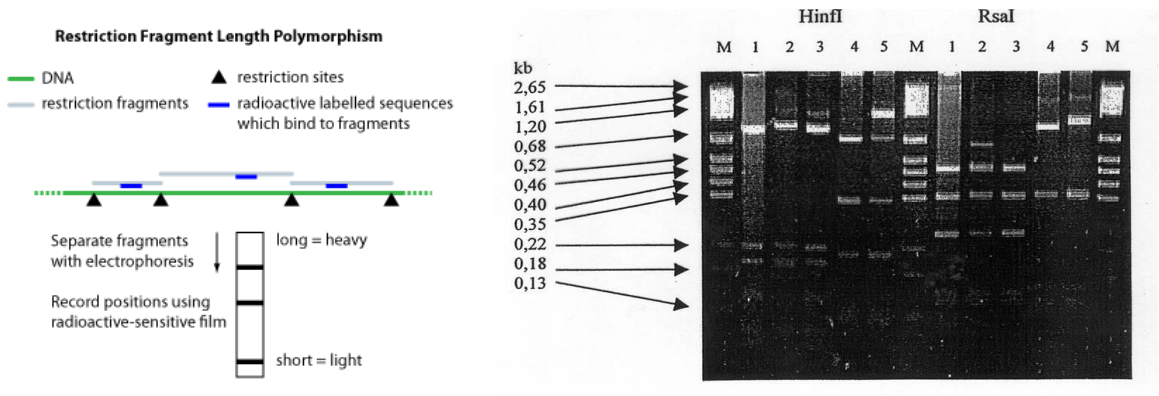


Figure 13 : Principe de la SSCP.



(a) (b)

Figure 14 : La RFLP ; (a) : Principe de la méthode, (b) : Exemple de gel d'agarose btenue après des gènes d'ARN ribosomal de cinq isolats (1-5) avec les enzymes HinfI et RsaI.

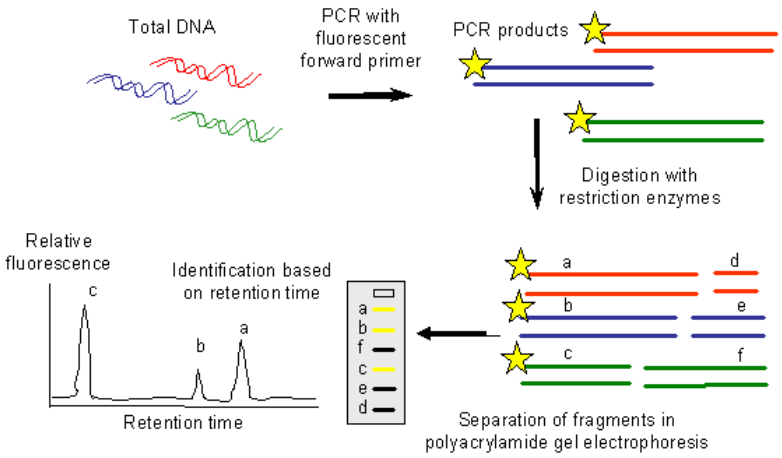


Figure 15 : Principe de la T-RFLP.

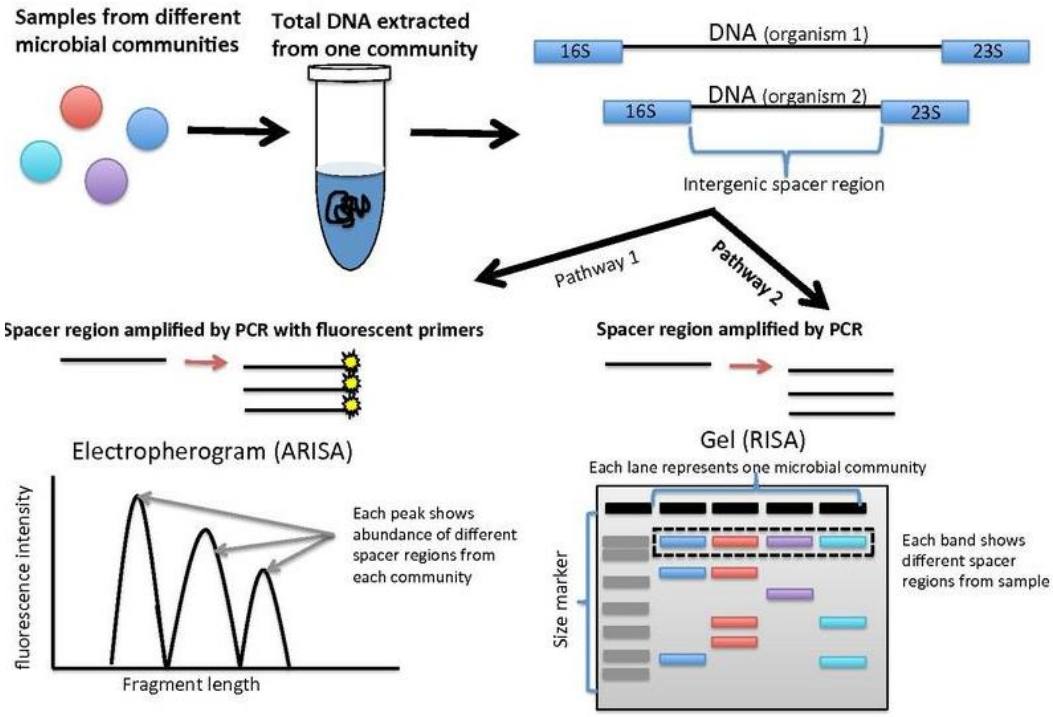


Figure 16 : Principe de RISA / ARISA.

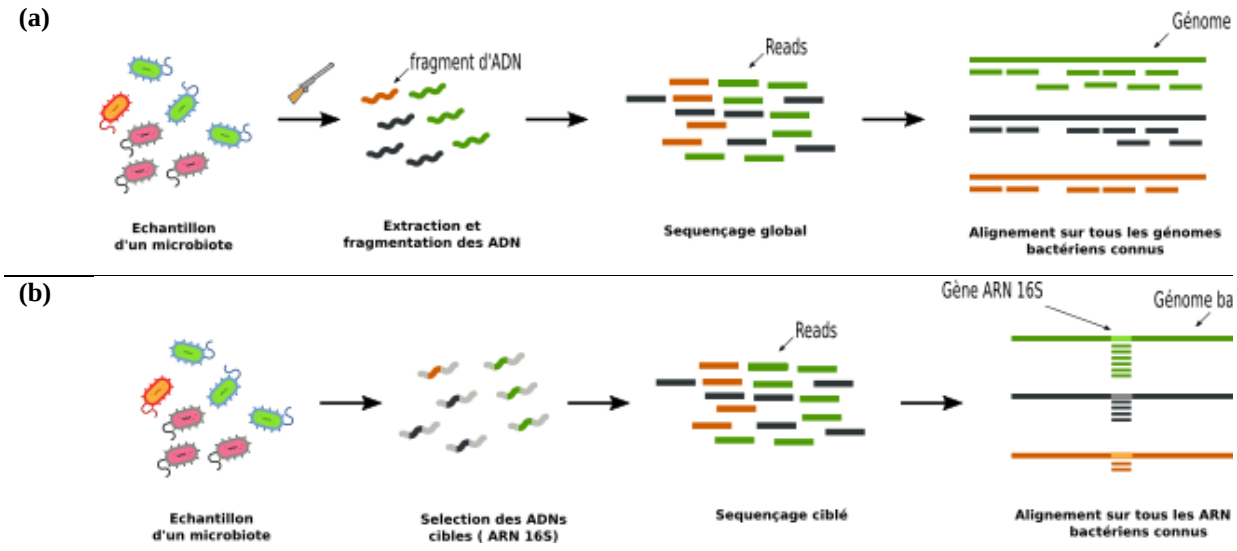


Fig. 17 : Stratégie en métagénomique ; (a) : métagénomique globale, (b) : métagénomique ciblée

SVI – Module M33
TD 2 : LES INTERACTIONS MICROBIENNES

Exercice 1 :

La culture discontinue de deux microorganismes *Proteus vulgaris* (souche VPI n° 3) et *Bacillus polymyxa* (souche VPl n ° 1) a été effectuée sur le milieu minimum I de Nurmikko sans ajout de purines, de pyrimidines et de vitamines à l'exception de la thiamine. Aucune croissance n'a été observée après culture individuelle des deux microorganismes (Yeoh *et al*., 1968).

1- Donner une hypothèse pour expliquer ce résultat ?

Les auteurs ont remarqué également que *P. vulgaris* et *B. polymyxa* sont capable de se développer d'une façon indépendante lorsque l'acide nicotinique et la biotine étaient ajouté respectivement au milieu de culture.

2- Comment peut-on qualifier ces deux microorganismes ?

La culture discontinue mixte de ces deux microorganismes montre une turbidité élevée après 24 h.

3- Qu'elle est la relation entre ces deux populations bactériennes ?

Le résultat d'une culture continue mixte est représenté sur la figure 1. La distinction entre les deux espèces n'était pas possible par comptage électronique. Cependant, le comptage par utilisation de la chambre de comptage Petroff-Hausser a montré que la population était formée d'environ 60 % de *P. vulgaris*.

4- *Donner une hypothèse pour expliquer ce résultat ?*

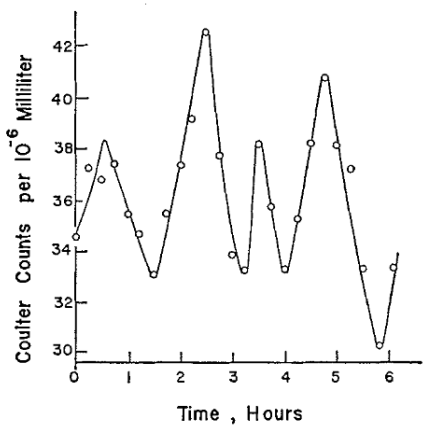


Figure 1 : Dénombrement de *P. vulgaris* et *B. polymyxa* en culture continue.

Les surnageants stériles provenant de cultures en phase stationnaire de chaque espèce cultivée sur un bouillon nutritif ont été examinés. Les auteurs ont constaté que *P. vulgaris* se développe dans les surnageants frais de *B. polymyxa*, mais ce dernier était incapable de se multiplier dans les surnageants frais de *P. vulgaris*.

5- Quelles conclusions peut-on tirer ?

Yeoh T.H., Bungay H. R. & Krieg N. R., 1968. Canadian Journal of Microbiology, 14, 491-492.

SVI – Module M33
TD 2 : LES INTERACTIONS MICROBIENNES

Exercice 2 :

Deux Bactéries *Escherichia coli* et *Azotobacter vinelandii* ont été cultivées ensemble dans un chémostat où le glucose est le facteur limitant (Jost *et al*., 1973). Les résultats sont présentés sur la figure 2.

1- Commenter les résultats obtenus ?

2- Qu'elle est la nature de la relation entre ces deux populations bactériennes ?

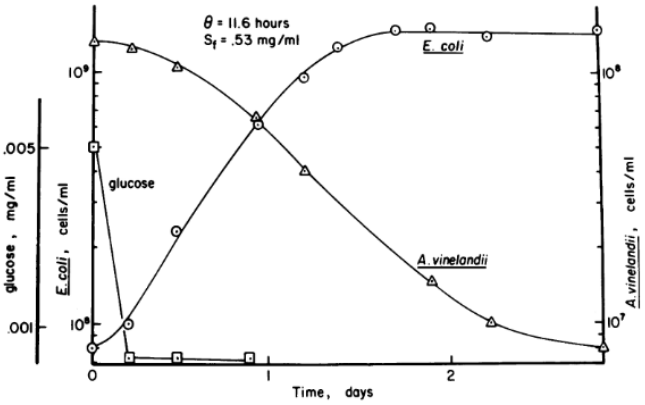


Figure 2 : Évolution des populations d'*A. vinelandii* et *E. coli* en culture continue.

Les auteurs ont ajouté dans le chémostat un protozoaire, *Tetrahymena pyriformis*. Les résultats sont présentés sur la figure 3.

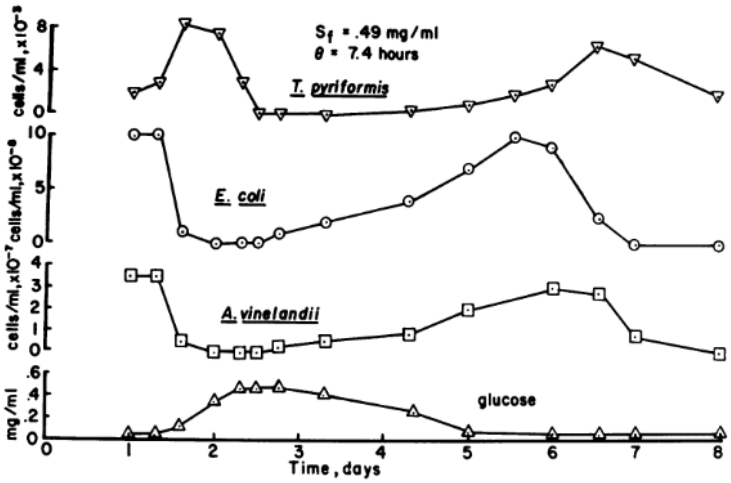


Figure 3 : Évolution des populations d'*A. vinelandii*, *E. coli* et *T. pyrifomis* en culture continue.

3- Qu'elle est le résultat de l'introduction de T. pyrifomis sur les deux autres populations ?

4- Quelle est la relation entre le protozoaire et les deux bactéries étudiées ?

5- Quelle conclusion peut-on tirer ?

Jost J.L., Drake J.F., Fredrickson A.G. & Tsuchiya H. M., 1973. Interactions of *Tetrahymena pyriformis*, *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and Glucose in a Minimal Medium. Journal of bacteriology, 113(2): 834-384.

SVI – Module M33
TD 2 : LES INTERACTIONS MICROBIENNES

Exercice 3 :

Afin d'étudié les interactions entre deux population de *Pseudomonas aeruginosa* (Ps) et *Bdellovibrio bacteriovorus* (Bd), Iebba *et al.* (2014) ont cultivé les deux souches dans un chémostat contenant un milieu de culture favorable pour le développement de ces dernières. Les auteurs n'ont détecté aucune molécule antagoniste produite par les deux souches. Les résultats sont présentés sur la figure 4.

1. Commenter les résultats obtenus.
2. Qu'elle est la nature de la relation entre ces deux populations bactériennes, justifié.

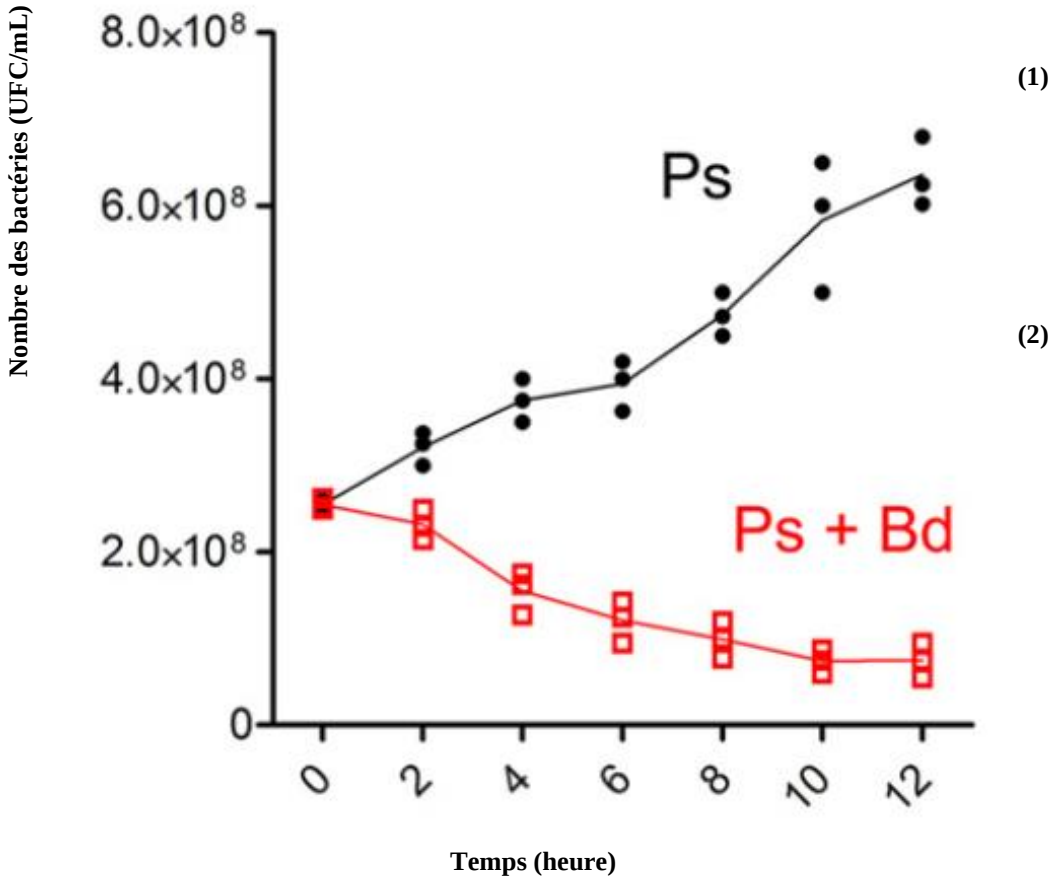


Figure 4 : Cinétique de croissance bactérienne. (1) : culture de *P. aeruginosa* ; (2) : culture mixte de *P. aeruginosa* et *B. bacteriovorus*.

SVI – Module M33
TD 3 : LE COMPOSTAGE

EXERCICE 1

Le compostage aérobie de 100 kg de fruits, de légumes et de déchets verts (papier inclus) a été effectué dans un bac de compostage pendant 12 semaines (Ryckeboer *et al.*, 2003). Plusieurs paramètres physiques ont été mesurés pendant le processus de compostage (Fig. 1).

1- Commenter les résultats obtenus.

2- Déterminer les différentes phases de compostage.

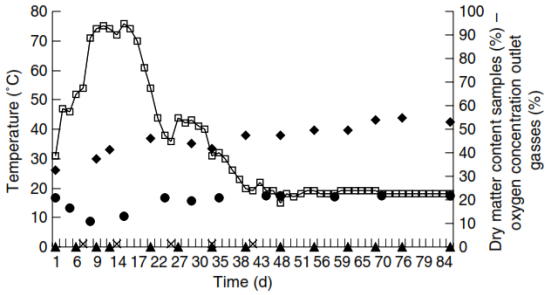


Fig. 1 Physical parameters measured during the composting process. Parameters: □, Temperature (°C; centre of the vessel); ▲, sampling days; ◆, dry matter content of the composting material (%); ×, turning frequencies; ●, oxygen concentration of the outlet gases (%)

Le tableau 1 montre les microorganismes dominant au cours des différentes phases de compostage.

Table 1 Species diversity of the dominant microorganisms isolated during different composting phases

	Species isolated at		
	25°C		55°C
Isolation days: composting phase	Prokaryotes (no. of strains)*	Fungi (no. of strains)*	Prokaryotes (no. of strains)*
Day 0: starting material	*Bacillus amyloliquefaciens* (1) *Bacillus cereus* (1) *Bacillus licheniformis* (1) *Bacillus pumilus* (11) *Bacillus subtilis* (4) *Paenibacillus lentimorbus* (1)		*Bacillus pumilus* (5) *Bacillus sphaericus* (1) *Geobacillus stearothermophilus* (1) *Bacillus subtilis* (2) *Geobacillus thermoglucosidasius* (1) unidentified bacilli (14)
Day 13: thermophilic phase	*Bacillus badius* (1) *Bacillus licheniformis* (4) *Bacillus sphaericus* (1) *Brevibacillus agri* (1) *Paenibacillus macerans* (1) *Paenibacillus pabuli* (2)		*Bacillus sphaericus* (1) unidentified bacilli (12)
Days 27–48: cooling phase	*Bacillus cereus* (2) *Bacillus licheniformis* (1) *Bacillus sphaericus* (1) *Cellulomonas cellulans* (4) *Pseudomonas alcaligenes* (3) *Rhodococcus rhodochrous* (1) unidentified bacilli (1) other unidentified bacteria (4) streptomycetes (6)	*Aspergillus candidus* (2) *Aspergillus* sp. (3) *Dactylaria* sp. (1) *Mucor* sp. (5) *Scopulariopsis* sp. (1) *Trichothecium* sp. (1) *Verticillium* sp. (1) unidentified (4)	*Paenibacillus lentimorbus* (1) unidentified bacilli (9)
Days 55–85: maturation phase	*Bacillus licheniformis* (1) *Bacillus oleronius* (1) *Bacillus sphaericus* (4) *Brevundimonas diminuta* (1) *Cellulomonas cellulans* (5) *Flavobacterium mizutaii* (2) *Paenibacillus polymyxa* (2) *Paracoccus denitrificans* (8) *Pseudomonas alcaligenes* (1) *Rhodococcus rhodochrous* (4) unidentified bacilli (1) unidentified bacteria (18) streptomycetes (13)	*Acremonium* sp. (1) *Aspergillus* sp. (7) *Cephaliophora* sp. (1) *Geotrichum candidum* (2) *Gliocladium roseum* (1) *Mucor* sp. (7) *Scopulariopsis brevicaulis* (2) *Trichothecium* sp. (4) *Verticillium* sp. (1) unidentified (14)	*Bacillus badius* (1) *Bacillus pumilus* (3) *Bacillus smithii* (1) *Geobacillus stearothermophilus* (3) *Geobacillus thermoglucosidasius* (3) *Paenibacillus macerans* (2) unidentified bacilli (19) other unidentified bacteria (2)

*Bacteria were isolated on days 0, 13, 34, 62 and 85; streptomycetes on days 34, 42, 62 and 85; fungi on days 27, 34, 41, 48, 55, 62, 69 and 85.

3- Commenter l'évolution des populations des Bactéries, Actinobactéries (Streptomyces) et champignons.

SVI – Module M33
TD 3 : LE COMPOSTAGE

Exercice 2 :

Lorsqu'on dispose de plusieurs matières premières à composter, on utilise les deux formules suivantes pour calculer le rapport C/N et l'humidité du mélange :

$$\left(\frac{\mathbf{C}}{\mathbf{N}}\right)\textbf{mélange} = \frac{\mathrm{M1(C1x(1-H1)+M2(C2\,x\,(1-H2)+M3(C3x(1-H3)+\cdots}}{\mathrm{M1\ (N1\,x\,(1-\ H1)\ +\ M2(N2x(1-H2)+M3(N3x(1-H3)+\cdots}}$$

Où :

(C/N) mélange : Le rapport C/N du mélange de matières à composter,
Mi : masse de la matière i (masse fraîche),
Hi : Humidité de la matière Mi,
Ci : Teneur en carbone de la matière Mi,
Ni : Teneur en azote de la matière Mi.

$$\textbf{Humidité du mélange} = \frac{\mathrm{(M1\,x\,H1)+\ (M2\,x\,H2)+\ (M3\,x\,H3)+\cdots}}{\mathrm{M1\ +\ M2\ +\ M3\ \ldots}}$$

Supposons que nous avons à composter du fumier avec des déchets de tomates (feuilles et tiges). Pour cela, on donne, dans le tableau 1, la composition indicative de ces matières premières :

Tableau 1 : Composition des déchets de tomates et du fumier.

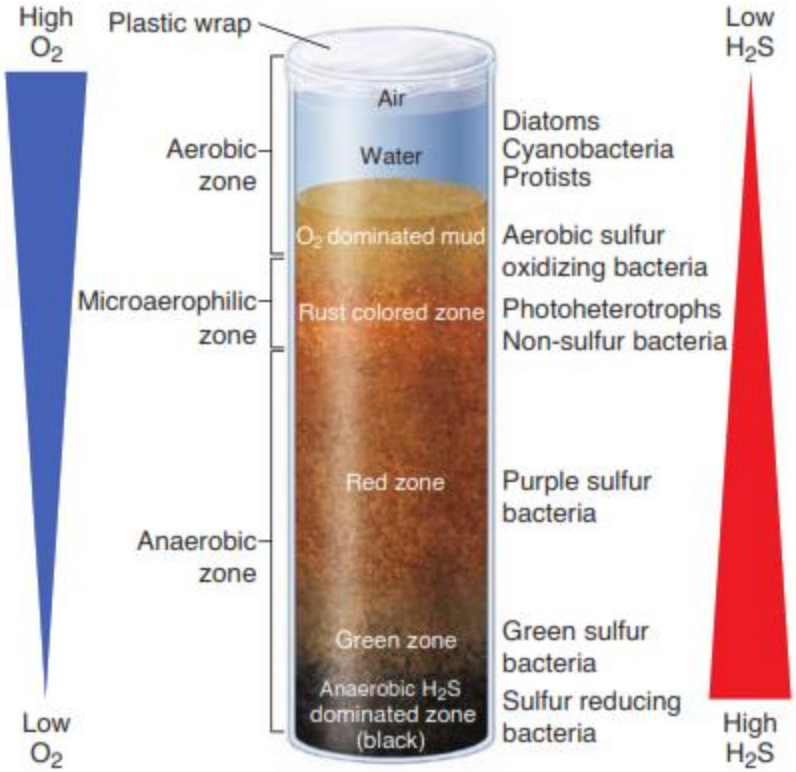
Déchets	Humidité (%)	Carbone (%)	Azote (%)	C/N
		(sur base du poids sec)		
Feuilles et tiges de tomate légèrement séchées	55	12	0,3	40
Fumier	40	30	1,5	20

1- Calculer le rapport C/N et l'humidité d'un mélange de fumier et des déchets de tomate en proportion (1:1).
2- Refaire le même calcule avec un ratio 4:1 (4 parts de déchets de tomate et 1 part de fumier).
3- Quelle le mélange recommandé ? Expliquer.
4- Calculer, avec les données de l'exemple ci-dessus, la quantité de fumier à ajouter à 120 tonnes de déchets de tomate pour obtenir un rapport C/N = 30.

TD4
LA COLONNE DE WINOGRADSKY

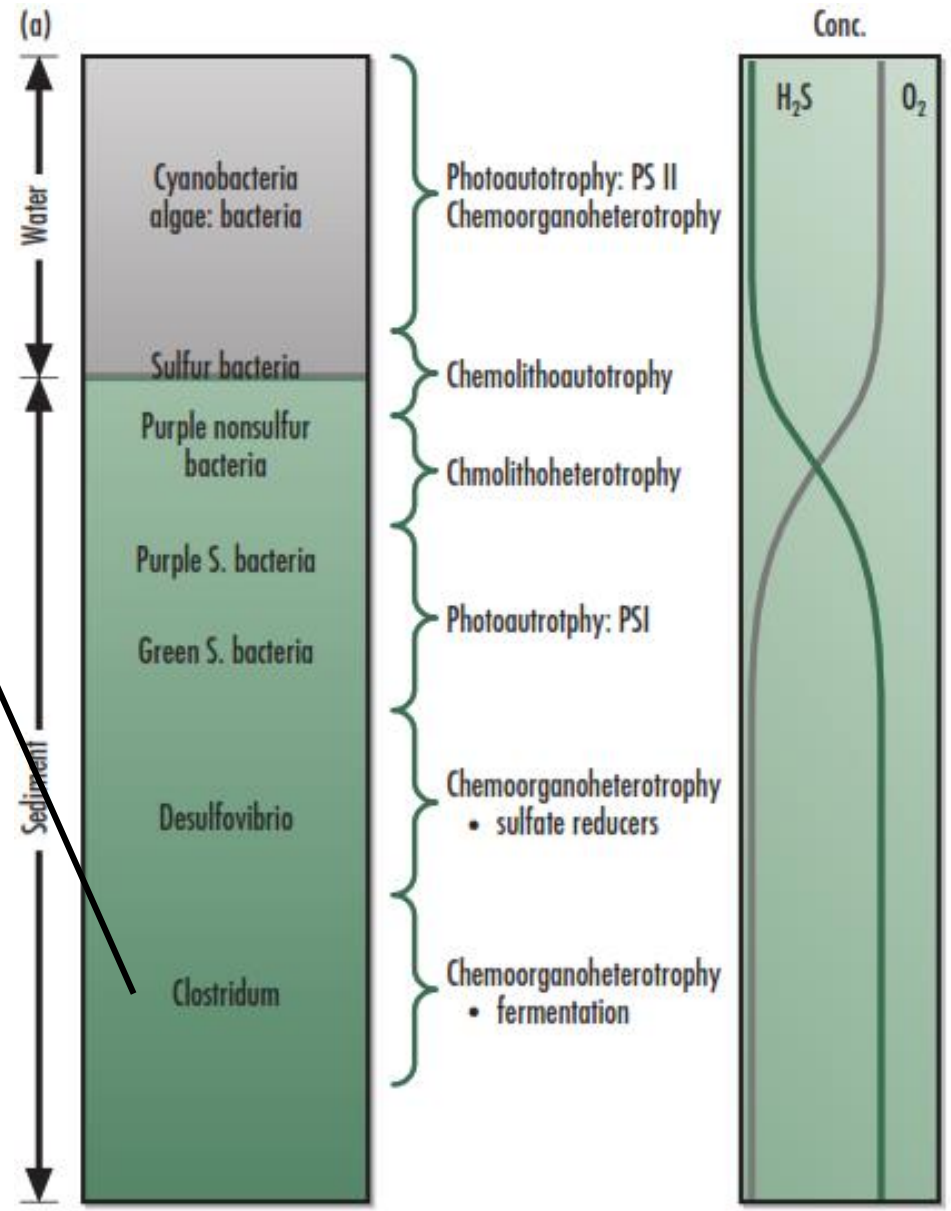
Figure 2.12 Sergei Winogradsky
Sergei Winogradsky (1856–1953), a Russian-born microbiologist. Winogradsky was the father of autotrophy. He lived from the days of Pasteur and Koch to the modern era of microbiology. From *Sergei N. Winogradsky: His Life and Work*, by S. A. Waksman, © 1953 by the Trustees of Rutgers College. Reprinted by permission of Rugers University Press.

"le fonctionnement de la microflore ne devait pas être envisagé comme la somme des activités individuelles, mais comme le travail d'un collectif autoréglable"


High O_2
Low O_2
Plastic wrap
Air
Water
O_2 dominated mud
Rust colored zone
Red zone
Green zone
Anaerobic H_2S dominated zone (black)
Aerobic zone
Microaerophilic zone
Anaerobic zone
Diatoms
Cyanobacteria
Protists
Aerobic sulfur oxidizing bacteria
Photoheterotrophs
Non-sulfur bacteria
Purple sulfur bacteria
Green sulfur bacteria
Sulfur reducing bacteria
Low H_2S
High H_2S

Les bactéries **hétérotrophes anaérobies** se développent les premières, elles dégradent la cellulose et fermentent les sucres en : Acétate, Alchool, Acide organisque, Hydrogène…

Exp : *Clostridium* sp.

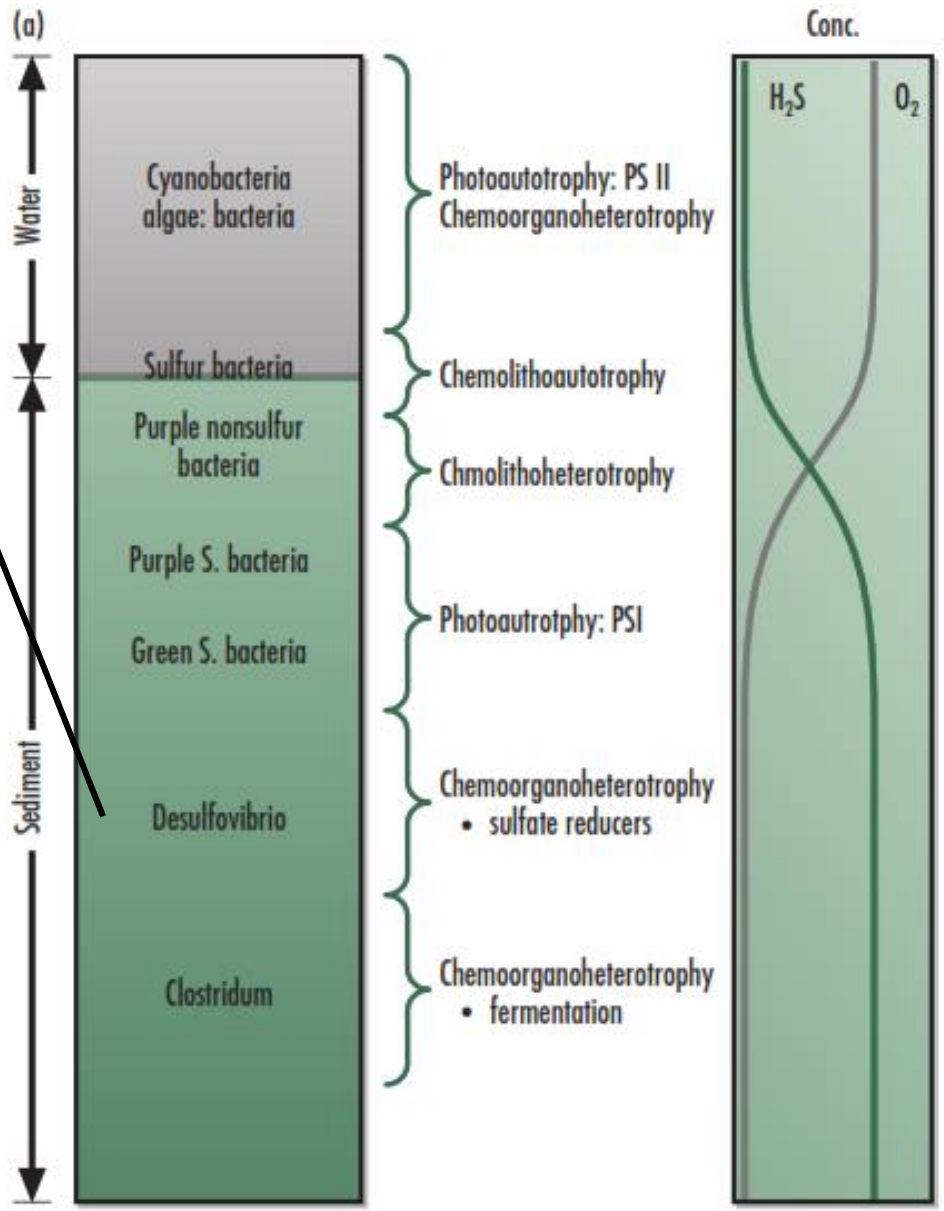


Winogradsky column
Microenvironments generated by chemical gradients

Les **bactéries sulfato-réductrices** vont réduire les sulfates en sulfures, puis en hydrogène sulfuré en utilisant comme source de carbone composés organiques produits par les fermenteurs.

Exp : *Desulfovibrio* sp.

Initiation du cycle de soufre dans la colonne

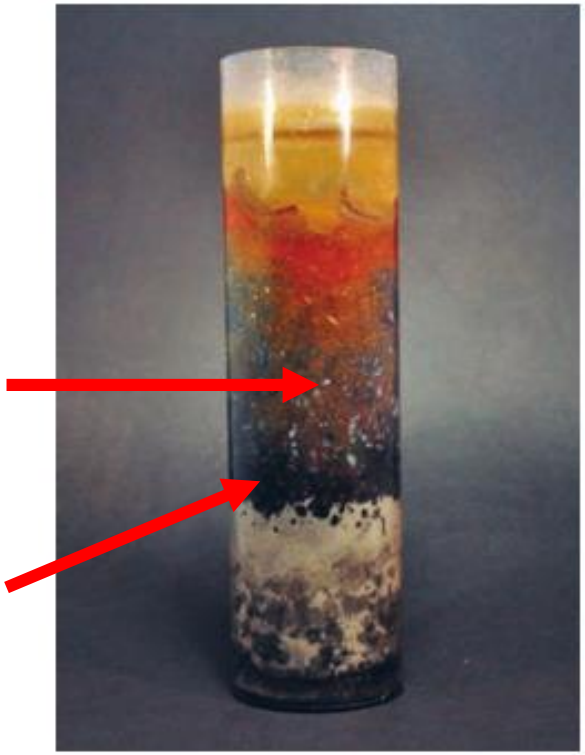


Winogradsky column
Microenvironments generated by chemical gradients

Le développement des **bactéries sulfureuses photosynthétiques anaérobies** concrétise le démarrage du cycle du soufre. Il y a deux catégories principales de ces bactéries, les vertes et les pourpres :

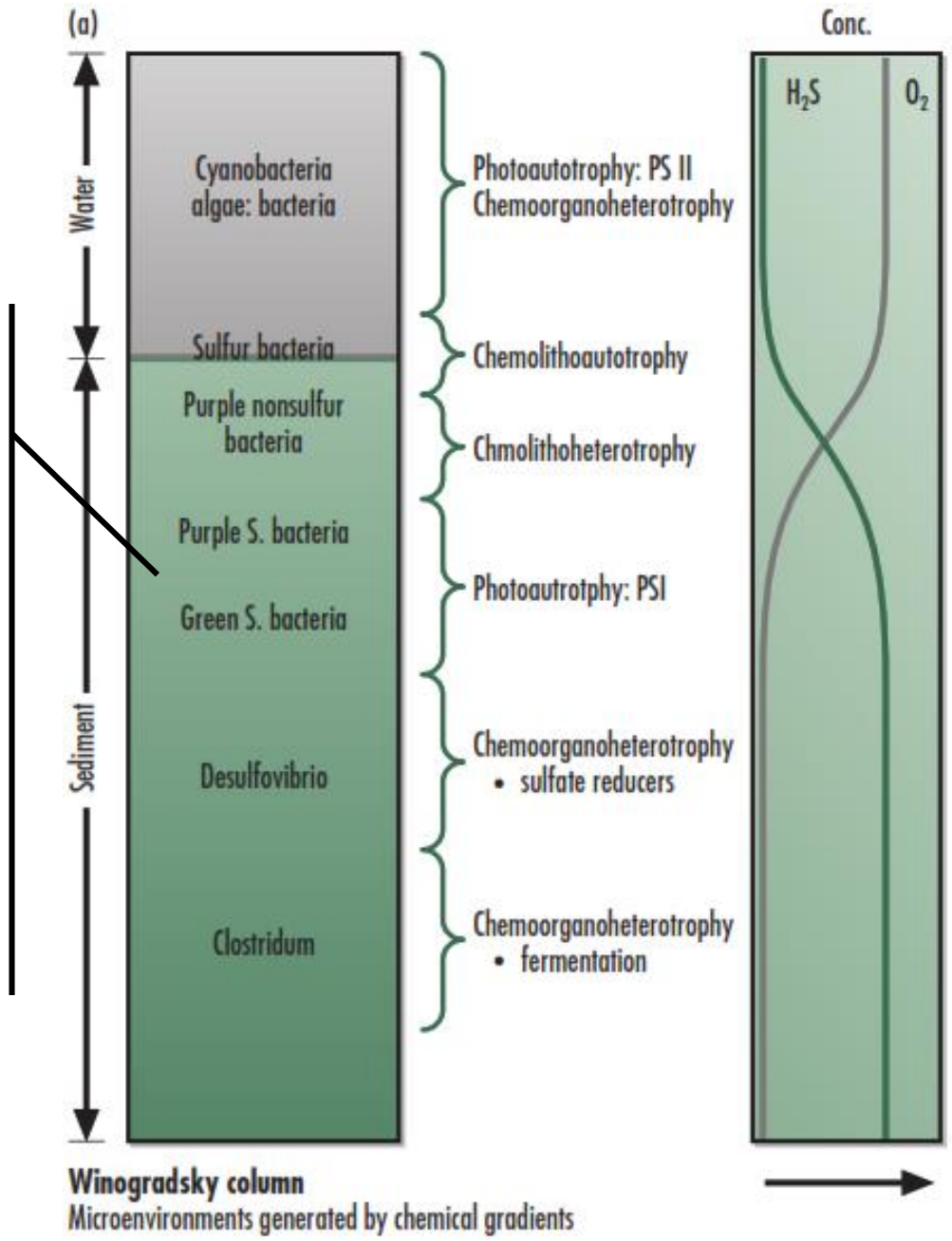
- **Les bactéries pourpres** (*Chromatium*) forment des taches pourpres et violettes plus haut dans la colonne car elles sont moins tolérantes au sulfure d'hydrogène.

- **Les bactéries vertes** (*Chlorobium*) sont plus résistantes aux effets toxiques du sulfure d'hydrogène et se développent donc à des niveaux plus profonds de la colonne. On les reconnaît par les taches vertes qu'elles font à la surface de la boue.

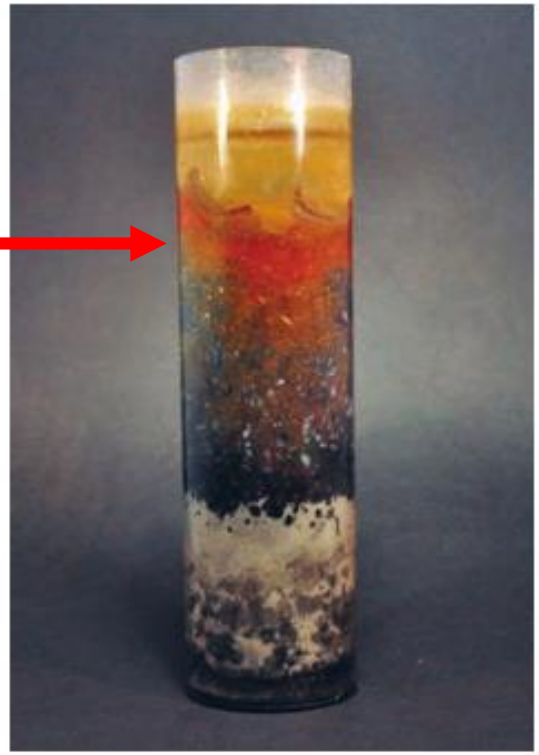


Les **bactéries sulfureuses pourpres et vertes** utilisent la lumière et le H_2S comme accepteur d'électrons (PS I) (photoautotrophes) pour produire la matière organique et du soufre insoluble qui s'accumule à l'extérieur des bactéries.

Exp : *Chlorobium, Chromatium*



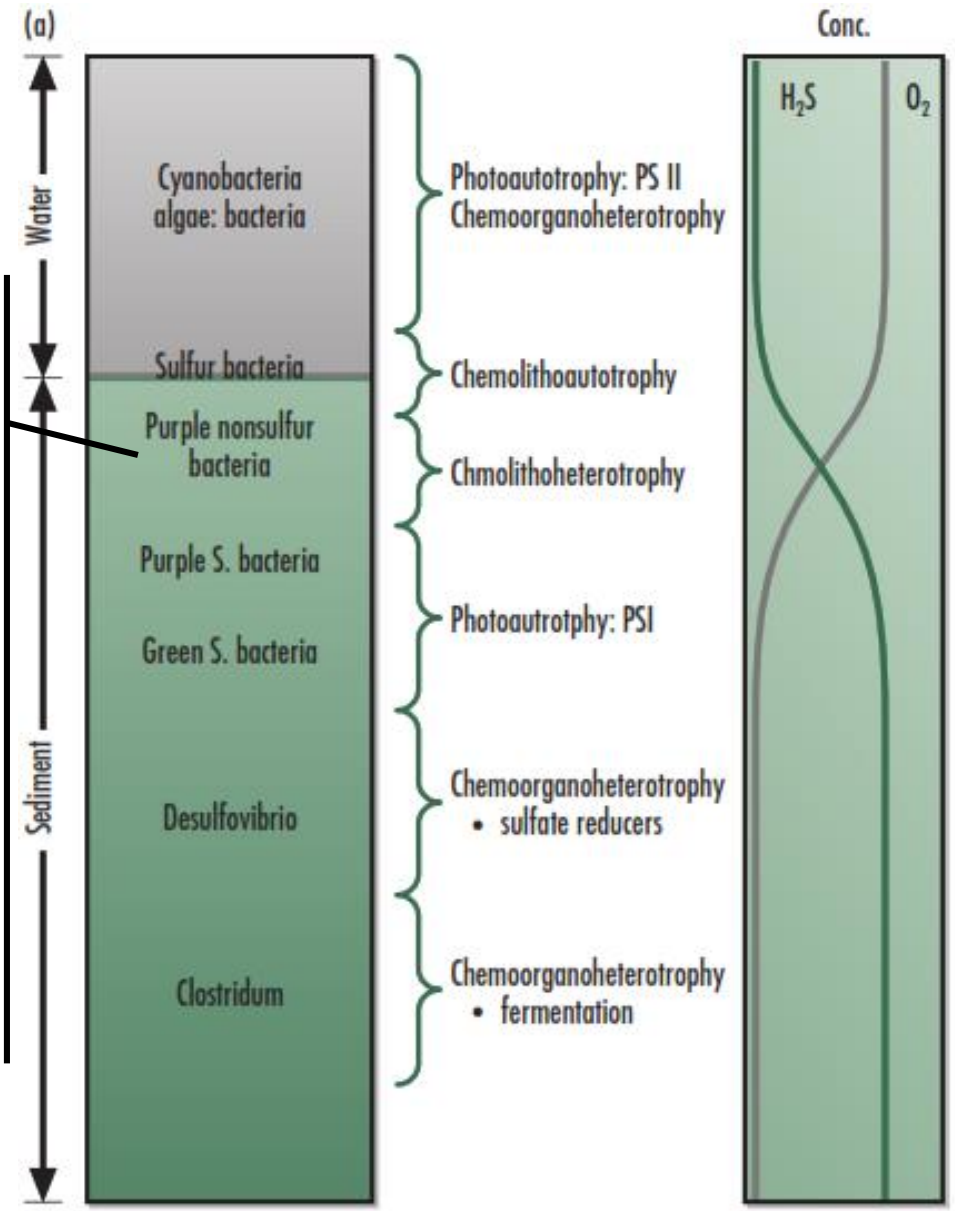
Les **bactéries pourpres non sulfureuses** forment des taches rouge-pourpre ou rouille.



Les **bactéries pourpres non sulfureuses** sont des anaérobies photoorganotrophes, leur développement dépend de :

- Source de carbone organique,
- Quantité de sulfure d'hydrogène (inhibées par H_2S)

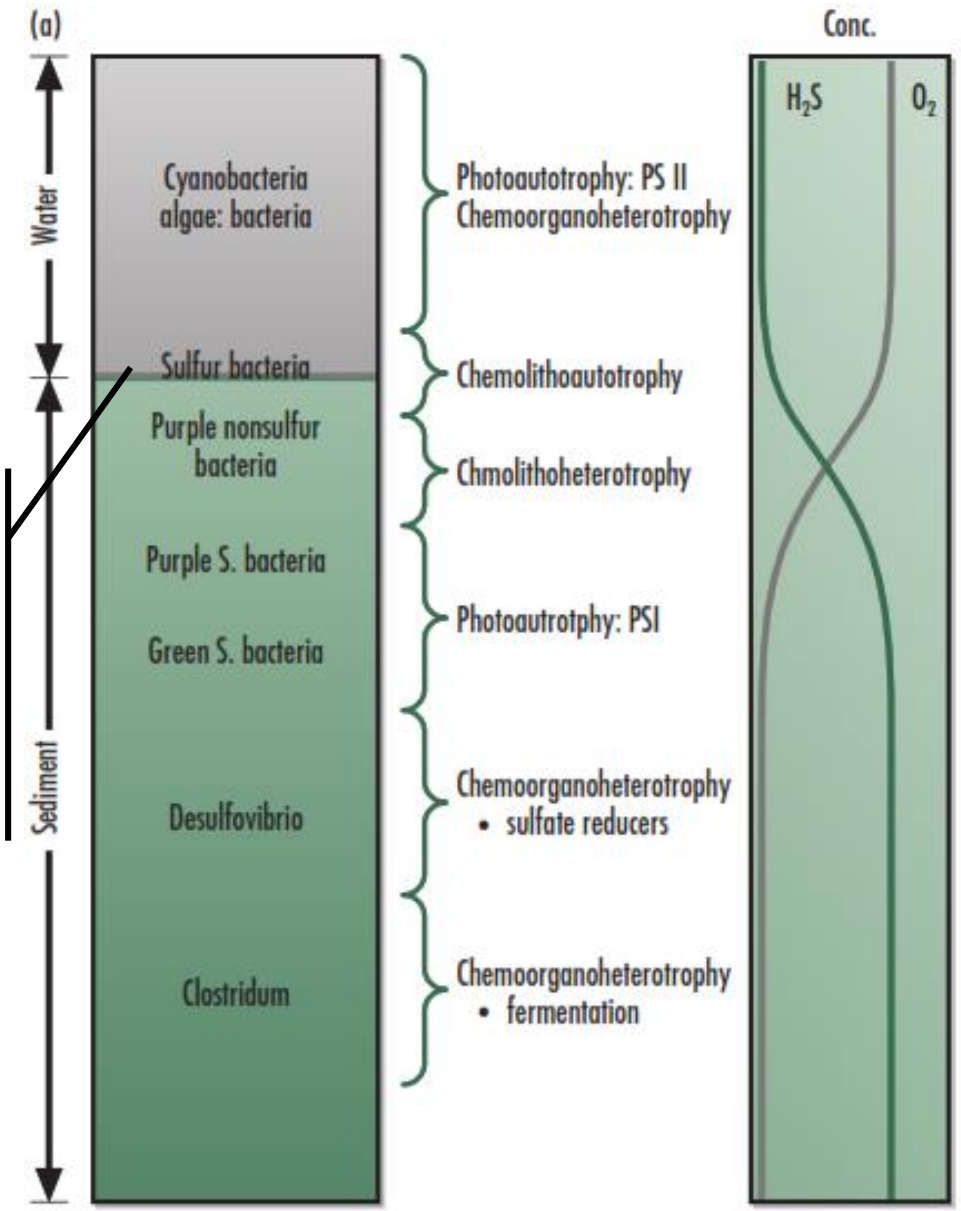
Exp : *Rhodospirillium, Rhodopseudomonas*



Winogradsky column
Microenvironments generated by chemical gradients

Les **bactéries sulfureuses** sont des autotrophes, Elles assimilent le carbone du CO_2 tout en oxydant H_2S

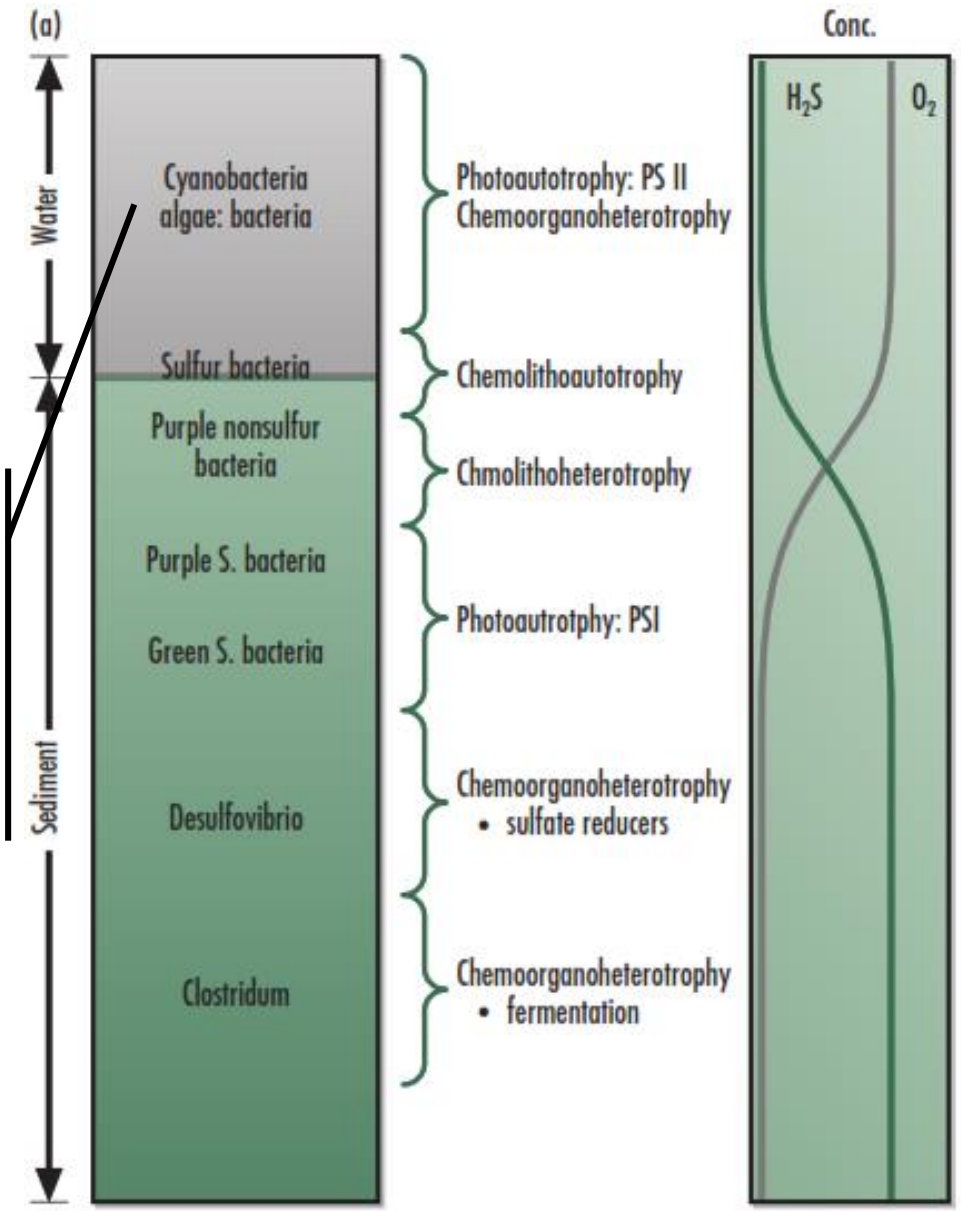
Exp : *Beggiatoa, Thiobacillus*



Winogradsky column
Microenvironments generated by chemical gradients

Les **bactéries photosynthétiques aérobie** se développer plus tardivement dans la zone aérobie de la colonne.

Exp : Cyanobactéries, Diatomées



Winogradsky column
Microenvironments generated by chemical gradients

Other possible microbes

Aerobic Environments

Hydrogen

- Hydrogne oxidizers: $H_2 + {}^1/_2O_2 \rightarrow H_2O$ (both chemolithoheterotrophs and chemolithoautotrophs). However, it is unlikely that H_2 will make it to the aerobic interface (it will be used in the anaerobic environment first)
  - Example, *Ralstonia eutrophus*

Iron

- Iron oxidizers: $Fe^{2+} + H^+ + {}^1/_4O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^1/_2H_2O$ (chemolithoautotrophs)
  Occurs only at low pH (~2)
  - Example: *Thiobacillus ferrooxidans*

Ammonium

- Nitrifiers:

$$NH_3 + 1{}^1/_2O_2 \rightarrow NO_2^- + H^+ + H_2O$$
$$NO_2^- + {}^1/_2O_2 \rightarrow NO_3^-$$

  - Example: *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*, respectively. Both chemolithoautotrophs

Other possible microbes

Anaerobic Environments

Nitrate

- Denitrifiers: $NO_3^- + 6H^+ + 5e^- \rightarrow {}^1/_2N_2 + 3H_2O$
  - Reaction combined with oxidation of organic matter.

Iron

- Iron reducers: Many organisms can utilize Fe^{3+} as electron acceptor.