

Chapitre 1 : La microbiologie environnementale

1. Introduction à la microbiologie de l'environnement

La microbiologie de l'environnement est une branche de la microbiologie qui étudie les micro-organismes présents dans les différents milieux naturels tels que l'eau, le sol, l'air, et même les organismes vivants. Ces micro-organismes comprennent les bactéries, les virus, les champignons et les protozoaires, entre autres. Elle vise à comprendre le rôle des micro-organismes au sein des différents écosystèmes ainsi que de leur incidence sur la santé humaine, animale et environnementale. Elle met l'accent sur la participation des microorganismes aux cycles biogéochimiques des éléments tels que le carbone, l'azote, le phosphore et le soufre. De plus, elle s'intéresse activement à la bioremédiation en examinant les mécanismes de dégradation des contaminants environnementaux tels que les hydrocarbures et les métaux lourds.

I.1. Notions générales

L'écologie : dérivée des mots grecs "oïkos" (habitat) et "logos" (science), est la discipline qui étudie les organismes vivants et leurs interactions avec leur environnement.

Un écosystème : est défini comme un système dynamique composé d'un grand nombre d'individus vivant dans un même milieu, et qui se maintient et se régule grâce à de nombreuses relations entre ses composants. Il comprend une communauté d'organismes ainsi que leur environnement. Parmi ses composantes, on distingue deux aspects indissociables :

La biocénose : qui représente la composante **biotique** de l'écosystème, incluant les êtres vivants tels que les animaux, les végétaux et les micro-organismes. Cette biocénose se divise généralement en trois catégories fonctionnelles : les producteurs (qui produisent de la matière organique par photosynthèse), les consommateurs (qui se nourrissent des producteurs ou d'autres consommateurs) et les décomposeurs (qui dégradent la matière organique morte en éléments minéraux).

Le biotope : qui représente la composante **abiotique** de l'écosystème, constitué par le milieu physique et chimique avec ses caractéristiques spécifiques telles que la température, l'humidité et le climat.

Les micro-organismes : sont des organismes vivants microscopiques, invisibles à l'œil nu, qui incluent des bactéries, des champignons (comme les levures), des protistes (comme les amibes) et parfois des virus, existent sur la terre depuis des milliards d'années. Ils constituent un ensemble important et diversifié d'organismes microscopiques existant en tant que cellule seule ou en groupe. Les micro-organismes fonctionnent en tant que populations ou assemblages d'organismes similaires. Les micro-organismes sont répartis selon les caractéristiques de leur cellule, de la même façon que

les plantes et les animaux. Il y a deux types de micro-organismes : **les eucaryotes (protistes)** et les **procaryotes**. La plupart des organismes sont des **eucaryotes**, ce qui signifie que leur cellule contient un **noyau** entouré par une **membranes**. Les cellules procaryotes sont aussi entourées d'une **membrane** mais elles **n'ont pas** de noyau.

II-Morphologie et anatomie fonctionnelle des bactéries

❖ Définition :

Le terme bactérie est un nom **vernaculaire** qui désigne certains micro-organismes vivants **unicellulaires** microscopiques et **procaryotes** présents dans tous les milieux.

Elles font partie des **premières formes** de vie connues sur Terre. Il en existe des **millions** de types différents, et elles vivent dans tous les **environnements** possibles, partout dans le monde. Elles vivent dans la **terre**, dans la **mer** et dans les **profondeurs** de la **croûte terrestre**. On a même rapporté que certaines bactéries vivaient dans des déchets radioactifs. De nombreuses bactéries vivent sur et dans le corps de **l'homme** et des **animaux** (au niveau de la **peau** et dans les **voies respiratoires**, la **bouche**, le **tube digestif**, les voies **génito-urinaires**) sans causer de **préjudices**. De telles bactéries sont appelées **flore résidente**. Il existe au moins autant de bactéries dans la flore résidente qu'il existe de cellules dans l'organisme. La plupart des bactéries de la flore résidente sont en fait utiles à l'homme, par exemple, en aidant à la digestion des aliments ou en empêchant la croissance d'autres micro-organismes plus dangereux.

Les personnes en bonne santé vivent en harmonie avec la plupart des micro-organismes qui se fixent sur ou dans (colonisent) les sites non stériles du corps, comme la peau, le nez, la bouche, la gorge, le gros intestin et le vagin. Les micro-organismes qui colonisent habituellement un site particulier du corps humain sont appelés la flore résidente.

La taille d'une bactérie varie entre **1 à 10 µm**. Le poids d'une bactérie est d'environ **10-12 g**. Elle contient **70%** d'eau. Rapporté au poids sec, une bactérie est constituée de protéines (**55%**), de lipides (**10%**), de lipopolysaccharides (**3%**), de peptidoglycane (**3%**), de ribosomes (**40%**), d'ARN (**20%**) et d'ADN (**3%**).

❖ Morphologie bactérienne :

La morphologie bactérienne décrit la forme, la taille et l'arrangement des bactéries,

➤ La taille des bactéries :

La taille d'une bactérie varie entre **1 à 10 µm**. Le poids d'une bactérie est d'environ **10-12 g**. Elle contient **70%** d'eau. Rapporté au poids sec, une bactérie est constituée de protéines (**55%**), de lipides

(10%), de lipopolysaccharides (3%), de peptidoglycane (3%), de ribosomes (40%), d'ARN (20%) et d'ADN (3%).

➤ **La forme des bactéries :**

Les bactéries peuvent être regroupées en trois principaux ensembles en fonction de leur forme. Il s'agit notamment des bactéries sphériques (les coques ou cocci), en forme de bâtonnets (les bacilles), et spiralées ou autres.

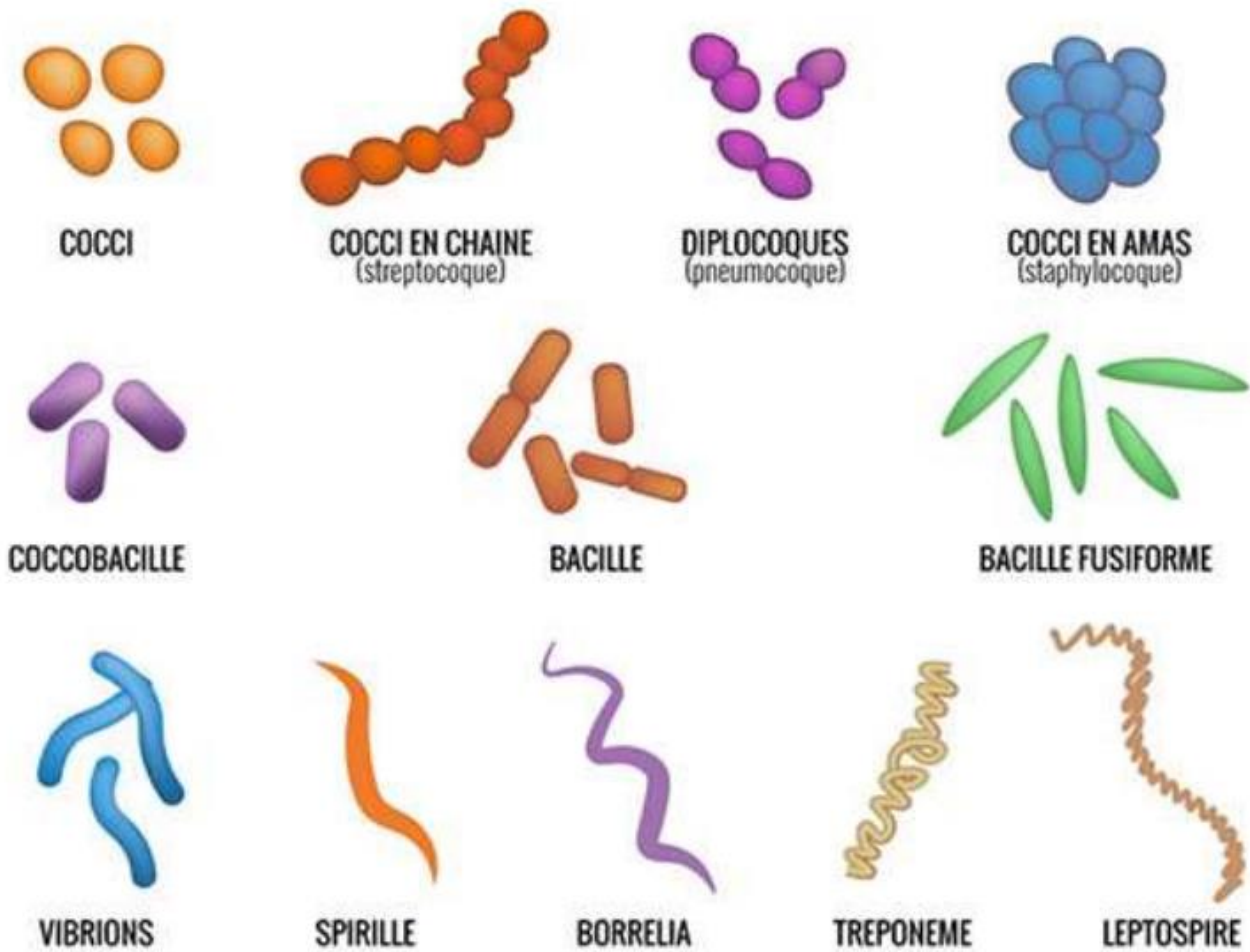


Figure 1. Forme des bactéries.

➤ **Arrangements des bactéries**

Les arrangements des bactéries correspondent à la manière dont les cellules bactériennes s'associent entre elles après leur division. Cet agencement dépend principalement du plan de division et de la cohésion des cellules filles.

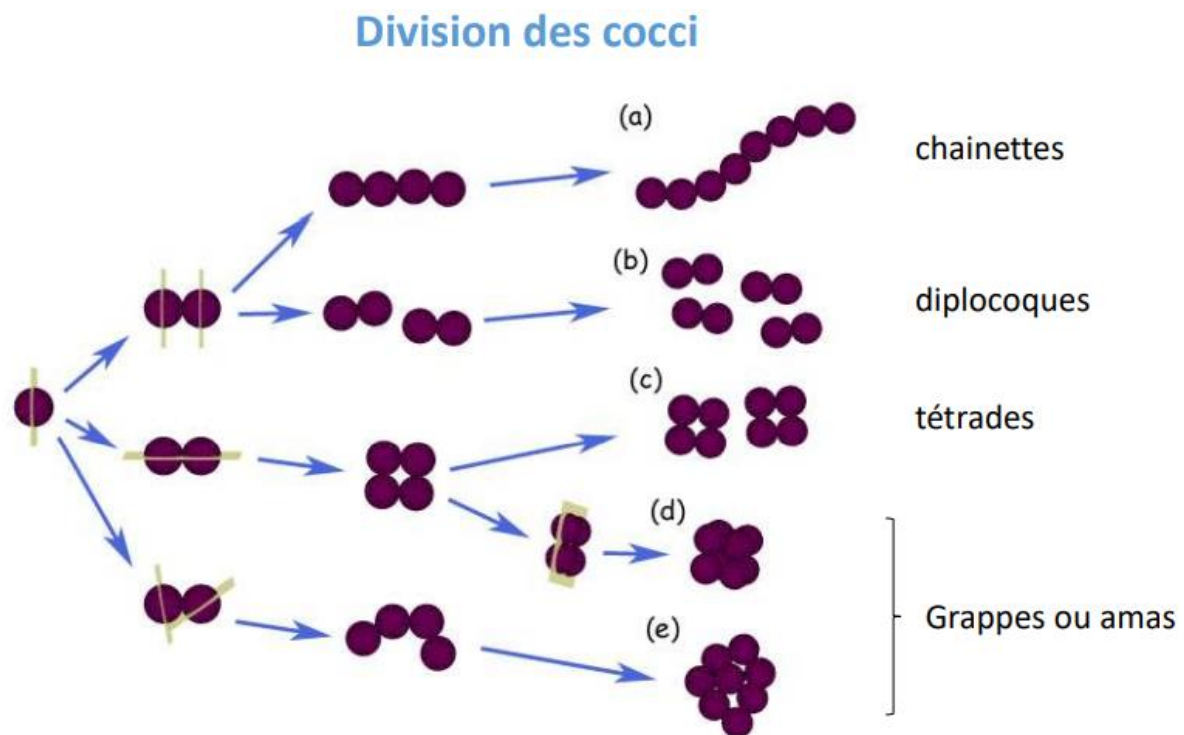


Figure 2. Division bactérienne.

❖ **Anatomie des bactéries**

L'anatomie des bactéries correspond à l'étude de leur structure interne et externe. Contrairement aux cellules eucaryotes, les bactéries sont des procaryotes : elles n'ont pas de noyau vrai ni d'organites membranaires. Leur organisation est cependant très efficace et adaptée à leur mode de vie.

➤ **La cellule bactérienne**

Une cellule bactérienne est composée **d'éléments constants** qu'on retrouve chez la quasi majorité des bactéries. Ces éléments de nombre cinq (5), sont de l'intérieure à l'extérieure, Cependant, d'autres éléments de structure peuvent être retrouvés chez certaines bactéries mais pas chez d'autres, appelés **éléments inconstants** (fig.3).

• **Éléments constants :**

- Chromosome d'ADN circulaire sans noyau.
- Cytoplasme (cytosol).
- Membrane cytoplasmique.
- Ribosomes.
- Paroi.

- **Éléments inconstants :**
 - Plasmide.
 - Spore.
 - Capsule, glycocalyx.
 - Flagelle et pili

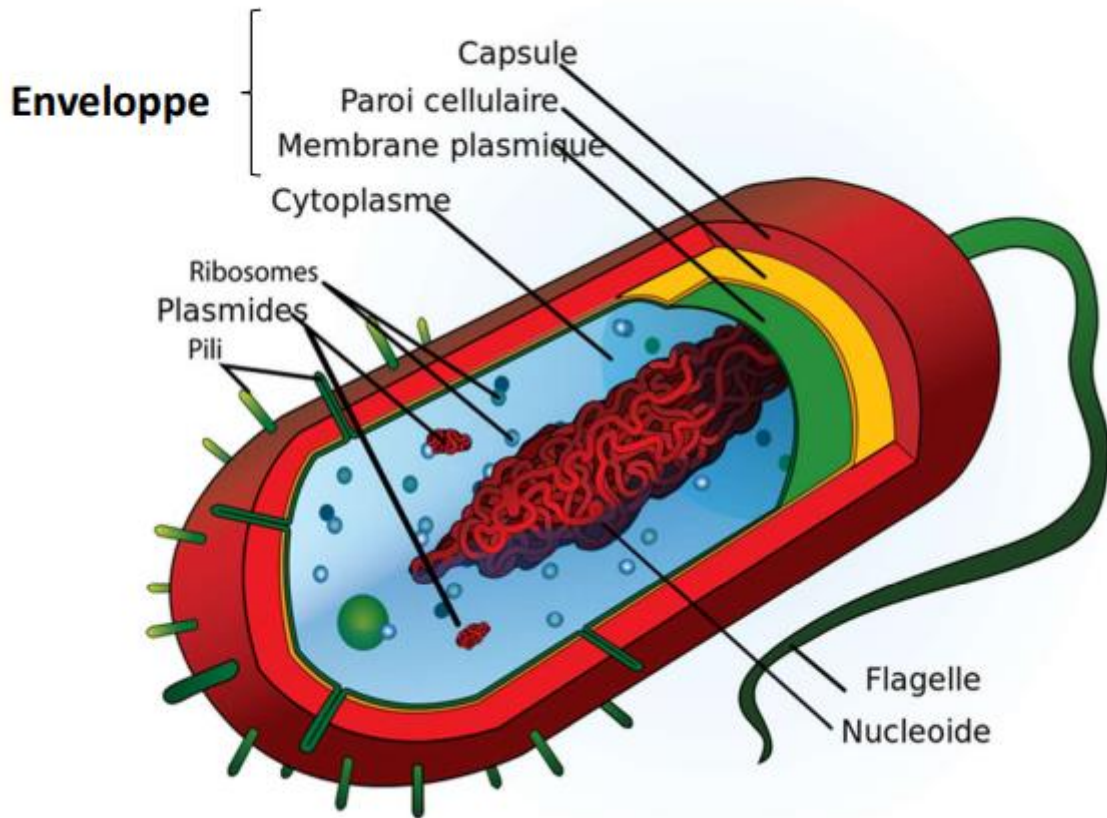


Figure 3 : Schéma simplifié d'une cellule bactérienne.

❖ Classification des bactéries

Les bactéries sont classées de différentes manières :

- **Noms scientifiques :** Les bactéries tout comme les autres êtres vivants, sont classées par genre (en se basant sur la présence d'une ou plusieurs caractéristiques identiques) et, à l'intérieur du genre, en espèces. Le nom scientifique est composé du genre suivi par l'espèce (par exemple, *Clostridium botulinum*). À l'intérieur d'une espèce, il peut exister différents types appelés des souches. Les souches diffèrent au niveau de leur matériel génétique et des composants chimiques. Quelquefois, certains médicaments et vaccins sont actifs uniquement contre certaines souches.

- **Coloration** : Les bactéries peuvent être classées selon la coloration qu'elles prennent après traitement par certaines substances chimiques (colorants), qui sont utilisées pour préparer les bactéries à être examinées et identifiées au microscope. La coloration de Gram est un processus de coloration couramment utilisé. Certaines bactéries sont colorées en bleu. Elles sont dites **Gram positives**. D'autres sont colorées en rouge. Elles sont dites **Gram négatives**. La différence de coloration entre des bactéries Gram positives et des bactéries Gram négatives est due à des différences au niveau de leurs parois cellulaires. Elles sont également responsables de différents types d'infection, et sont sensibles à différents types d'antibiotiques. Il existe de nombreuses autres colorations en plus de la coloration de Gram.

Bactéries à Gram positifs présente une paroi épaisse constituée principalement de peptidoglycane (jusqu'à 80 nm).

Bactéries à Gram négatives présente une mince couche de peptidoglycane.

- **Formes** : Il existe trois formes de base permettant de classer les bactéries : forme sphérique (coques), forme de bâtonnets (bacilles) et forme de spirale ou d'hélice (spirochètes).
- **Besoin en oxygène** : La classification des bactéries est faite également suivant leurs besoins en oxygène pour vivre et se multiplier. Celles qui ont besoin d'oxygène sont dites **aérobies**. Celles qui n'ont pas besoin d'oxygène et qui ont du mal à vivre ou qui ne peuvent pas se multiplier en présence d'oxygène, sont dites **anaérobies**. Certaines bactéries appelées bactéries **aéro-anaérobies** facultatives peuvent vivre et se multiplier avec ou sans oxygène.
- **Caractéristiques génétiques** : Des examens spécialisés peuvent permettre de déterminer les différences au niveau des caractéristiques génétiques (génotype) des bactéries.

III-Physiologie bactérienne :

La physiologie bactérienne est l'étude des fonctions et processus vitaux des bactéries, incluant leur métabolisme, leur nutrition, et leur croissance, qui sont régis par des facteurs physico-chimiques comme la température et le pH. Elle comprend également l'étude de la reproduction (fission binaire), de la mobilité (flagelles, glissement), et de la relation entre les aptitudes métaboliques et leur environnement.

❖ Nutrition :

C'est les besoins élémentaires et énergétiques nécessaires à la croissance de la bactérie, ainsi que des facteurs physico-chimiques susceptibles d'influencer cette croissance.

La cellule bactérienne, grâce à son système enzymatique très développé, va donner naissance en peu de temps (20 mn en moy pour la majorité des bactéries de l'environnement), à 2 bactéries filles : on parle de croissance bactérienne. (Différence avec les organismes supérieurs : homme, animal, plante).

Une bactérie se forme, se développe, vit et se reproduit puis dépérit et meurt.

➤ **Les besoins élémentaires :**

Ce sont les éléments nécessaires à la bactérie pour fabriquer ses constituants :

- C,H,O,N,P,S en quantité importante.
- Fe ,Ca ,Mg et K en quantité moindre.
- et d'autres métaux à l'état de trace (oligo-éléments): Co, Cu, Zn, Mn.

➤ **Besoins énergétiques :**

Les besoins énergétiques des bactéries couvrent leurs dépenses pour la biosynthèse. Elles tirent leur énergie soit de la lumière (bactéries phototrophes), soit de réactions d'oxydoréduction (bactéries chimiotrophes). Les phototrophes utilisent des composés minéraux (photolithotrophes) ou organiques (photoorganotrophes) comme source d'électrons. Les chimiotrophes utilisent aussi des composés minéraux (chimiolithotrophes) ou organiques (chimioorganotrophes) comme donneurs ou accepteurs d'électrons.

➤ **Conditions physico-chimiques de la croissance :**

1- La température:

Selon leur comportement vis à vis de la température, on distingue:

- **Les bactéries mésophiles** : dont la température optimale de croissance se situe entre 20°C et 40°C. On retrouve dans ce groupe la majorité des bactéries de l'environnement et d'intérêt médical (ex: Entérobactéries).
- **Les bactéries thermophiles** : la température optimale est ici de 40°C. Ce sont les bactéries des sources thermales, (ex.: Pseudomonas).
- **Les bactéries psychrophiles** : température optimale située entre 4°C et 20°C: Ces bactéries peuvent contaminer les produits alimentaires conservés au réfrigérateur (ex: Listeria).
- **Les bactéries cryophiles** : vivent à moins de 4°C, ce sont les bactéries des eaux de mer et des glaces.

Les températures trop élevées sont nuisibles pour les bactéries. Ainsi, la stérilisation par la chaleur se fait à une température de 180°C au poupinel (chaleur sèche) pendant 30 minutes ou à 120°C à l'autoclave (chaleur humide) pendant 20 minutes.

2- Le pH:

La plupart des bactéries se développent de préférence dans des milieux neutres ou légèrement alcalins. Néanmoins, certaines espèces pathogènes, tel *Vibrio cholerae*, cultivent mieux en milieu nettement alcalin (pH:8,5).

A l'opposé, les Lactobacilles (flore vaginale de Doderlein) se développent à pH acide (6,3 à 6,5)

➤ Facteurs inhibant la croissance :

- Radiations : les bactéries sont sensibles aux rayons X et UV (soleil), rayons Gamma.
- Substances antibactériennes : Les ATS et les ATB s'opposent à la croissance des bactéries et sont utilisés pour leur destruction.

Certaines substances sont des inhibiteurs sélectifs de certaines bactéries. Elles sont ajoutées dans les milieux pour favoriser sélectivement la multiplication des bactéries résistantes: c'est le principe des milieux sélectifs.

❖ Croissance bactérienne :

1- Définitions :

La croissance bactérienne est le **dédoulement** à intervalle régulier du nombre de cellules et de la masse cellulaire d'une culture bactérienne. Le temps requis pour un dédoublement (ou une division cellulaire) est appelé temps de **génération**. Il varie d'une espèce à l'autre (ex. 20 minutes pour *Escherichia coli*, 20 heures pour *Mycobacterium tuberculosis*, plusieurs jours pour *M. leprae*).

2- Moyens d'étude :

Plusieurs techniques permettent d'évaluer la croissance.

- ✓ **Détermination du poids sec**: les bactéries sont tuées, lavées, séchées au four à 105°C puis pesées avec précision. Évaluation chimique : on dose les différents constituants chimiques des bactéries (protéines, DNA, RNA etc.).
- ✓ **Evaluation de la densité optique** : En utilisant la loi de BEERLAMBERT qui définit les relations existantes entre l'intensité d'un faisceau lumineux avant et après la traversée d'une culture bactérienne, on peut évaluer la croissance bactérienne en déterminant la Densité Optique (DO) de la culture bactérienne entre un temps T0 et un temps Tx > T0. La mesure de

la DO. se fait à une longueur d'onde allant de 450 à 550 nm . Les DO évoluent linéairement à la concentration cellulaire.

✓ Numération cellulaire Elle peut être:

- Totale, par comptage de toutes les bactéries vivantes ou mortes présentes dans la culture bactérienne, en utilisant une cellule hématimétrique;
- Ne concerne que les cellules viables : on compte les bactéries vivantes par le nombre d'unités formant colonies (U.F.C.) ayant cultivé au sein d'une gélose dans laquelle a été au préalable ajoutée une dilution appropriée de la culture bactérienne à étudier.

3- Cinétique de la croissance :

L'étude de la croissance bactérienne dans le temps ou cinétique de la croissance peut être représentée sur un graphique en portant.

- En ordonnée, les valeurs des log de la D.O du milieu de culture;
- En abscisse, le temps.

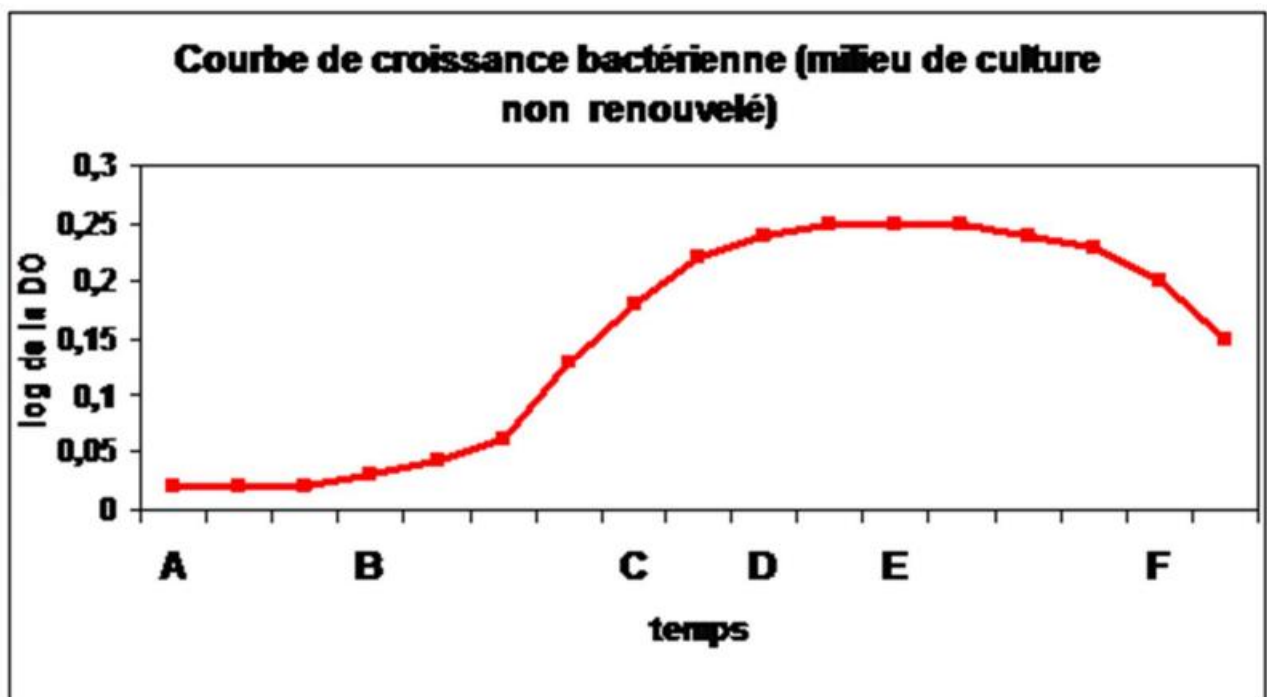


Figure 4 : Courbe de croissance des bactéries.

La courbe de croissance obtenue montre alors 6 phases (selon le schéma)

Phase A : Phase de latence : C'est la phase d'adaptation des bactéries à leur milieu de culture, pas de multiplication bactérienne pendant cette phase → la mise en route des systèmes enzymatiques de la bactérie.

Phase B : Phase d'accélération pendant laquelle le temps de génération se raccourcit pour atteindre la valeur caractéristique de l'espèce bactérienne étudiée.

Phase C : Phase de croissance exponentielle : le taux de croissance atteint la valeur maximale. Il y a dédoublement de la population à des intervalles de temps réguliers (toutes les 20 minutes / *E.coli*).

Phase D : Phase de ralentissement : le taux de croissance baisse progressivement, le temps de génération s'allonge.

Phase E : Phase stationnaire : la masse bactérienne est maximale. Les nouvelles générations équilibrent les vieilles bactéries qui se lysent.

Phase F : Phase de déclin : la masse bactérienne décroît du fait de la lyse accélérée des bactéries. Ceci est lié à un épuisement des nutriments, à une réduction de l'oxygène, à une accumulation des déchets. Le temps de génération est de plus en plus long, créant un déséquilibre entre les nouvelles générations de bactéries (de plus en plus rares) et les vieilles bactéries qui meurent en plus grand nombre.

IV-Rôle des micro-organismes dans le cycle des bioéléments

a) Caractéristiques des écosystèmes microbiens

➤ Définition :

Un écosystème microbien est un ensemble d'organismes microscopiques (bactéries, champignons, algues, protozoaires, virus) vivant dans un environnement donné et interagissant entre eux et avec leur milieu. Ces interactions déterminent la structure, la fonction et la dynamique de l'écosystème.

Les microorganismes jouent un rôle fondamental dans : le recyclage de la matière organique, la production primaire (fixation du carbone), la décomposition et la minéralisation, les cycles biogéochimiques (C, N, S, P, etc.).

➤ Composition d'un écosystème microbien :

Un écosystème microbien comprend trois composantes essentielles :

1. **Les producteurs (autotrophes) :** des organismes capables de produire leur propre matière organique à partir de sources inorganiques.

Exemples :

Photoautotrophes : cyanobactéries, algues, bactéries photosynthétiques.

Chimioautotrophes : bactéries nitrifiantes, sulfureuses, ferreuses.

2. Les consommateurs (hétérotrophes): Utilisent la matière organique produite par d'autres organismes.

Exemples : bactéries hétérotrophes, protozoaires, champignons microscopiques.

3. Les décomposeurs (saprophytes): Dégradent la matière organique morte pour libérer des éléments nutritifs (CO_2 , NH_4^+ , PO_4^{3-} ...).

Exemples : bactéries du sol (Bacillus, Pseudomonas), champignons filamenteux.

➤ Les habitats microbiens

Les microorganismes colonisent pratiquement tous les milieux :

1. Milieux aquatiques : eau douce, eau marine, zones thermales, glaces polaires.
2. Milieux terrestres : sols, roches, sédiments.
3. Milieux extrêmes : environnements acides, salins, chauds, froids, anaérobies.
4. Milieux biologiques : flore intestinale, cutanée, buccale, etc.

Facteurs influençant la répartition microbienne : Température, pH, Teneur en oxygène, Disponibilité en nutriments, Pression osmotique, Lumière.

➤ Structure d'un écosystème microbien

1. Diversité microbienne : Elle se mesure à plusieurs niveaux :

- Richesse spécifique : nombre d'espèces présentes.
- Abondance relative : proportion de chaque espèce.
- Diversité fonctionnelle : variété des rôles métaboliques.

2. Organisation spatiale : Les microorganismes forment souvent des biofilms, communautés organisées adhérant à des surfaces, entourées d'une matrice polymérique. Ces biofilms protègent les microbes contre les stress (désinfectants, antibiotiques).

3. Interactions microbiennes :

Tableau 1 : Interactions microbiennes.

Type d'interactions	Description	Exemples
compétition	Lutte pour les nutriments	Bacillus vs pseudomonas
Synergie/cooperation	Bénéfice mutuel sans dépendance	Production de métabolites complémentaires
Mutualisme	Relation obligatoire bénéfique pour les deux	Rhizobium-plante légumineuse

Commensalisme	Un profite, l'autre indifférent	Microflore intestinale
Parasitisme/predation	Un profite au détriment de l'autre	Virus – bactérie (phage)

➤ **Fonctions écologiques des écosystèmes microbiens**

Les microorganismes sont les moteurs des cycles biogéochimiques :

1. Cycle du carbone (C) :

- Fixation du CO₂ : cyanobactéries, algues.
- Décomposition de la matière organique : bactéries hétérotrophes.
- Méthanogenèse : archées méthanogènes (CH₄).

2. Cycle de l'azote :

- Fixation de l'azote : Rhizobium, Azotobacter.
- Nitrification : Nitrosomonas, Nitrobacter.
- Dénitrification : Pseudomonas denitrificans.

3. Cycle du soufre (S) :

- Oxydation du soufre : Thiobacillus.
- Réduction du sulfate : bactéries sulfatoréductrices (Desulfovibrio).

4. Cycle du phosphore (P) :

- Libération du phosphate à partir de la matière organique.

➤ **Dynamique et équilibre :**

Les écosystèmes microbiens sont dynamiques :

Les populations varient selon la disponibilité des nutriments, la température, le pH, etc.

Un équilibre se maintient grâce à :

- La résilience (capacité à se rétablir après perturbation).
- La succession écologique microbienne (remplacement progressif d'espèces).

➤ **Importance écologique et biotechnologique :**

1- Rôle écologique :

- Recyclage des éléments nutritifs.
- Formation de sols et stabilisation des écosystèmes.
- Dégradation des polluants (biorémédiation).

2- Rôle biotechnologique :

- Production de biomasse, enzymes, antibiotiques.

- Traitement des eaux usées.
- Fermentations alimentaires (yaourt, pain, vin, etc.).

➤ **Méthodes d'étude des écosystèmes microbiens :**

1. Méthodes classiques :

- Isolement et culture sur milieux nutritifs.
- Observation microscopique.

2. Méthodes moléculaires modernes :

- PCR, séquençage du gène 16S rRNA.
- Métagénomique, métatranscriptomique, métabolomique.

b) Microbiologie du sol

➤ **Définitions :**

La microbiologie du sol est l'étude scientifique des **micro-organismes présents** dans le sol, de leurs **différences**, de leur **rôle** et de leurs **interactions** avec le sol et les plantes.

Le sol est composé de particules provenant de la décomposition de la **couche superficielle** de la croûte terrestre sous l'influence de divers facteurs physico-chimiques et biologique.

D'une manière générale, on peut considérer que le sol est composé de cinq éléments:

- **Les minéraux**, qui proviennent de la dégradation de la roche mère sous l'influence des différents facteurs physiques, chimiques et biologiques.
- **La matière organique** formant l'humus et provenant des microorganismes morts, des cadavres des animaux et des débris des végétaux en décomposition.
- **Les organismes vivants.**
- **Les résidus organiques** plus au moins dégradables.
- **L'eau**

L'eau et l'air forment environ la moitié du volume du sol, la fraction minérale forme près de l'autre moitié, le reste étant constitué de matières organiques (3à 6%) et d'organismes vivants (environ 1%)

➤ **Le profil du sol :**

Une coupe verticale dans un sol révèle la superposition de plusieurs couches distinctes, appelées horizons, qui caractérisent le profil du sol (figure 5). Chaque horizon possède des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques particulières qui reflètent les processus de formation du sol.

On distingue :

❖ **Horizon O (organique)** : Cet horizon se trouve à la surface du sol. Il est riche en matière organique provenant des feuilles mortes, racines et débris végétaux en décomposition. C'est une zone d'activité biologique intense où les micro-organismes transforment la matière organique en humus. Il est souvent sombre à cause de sa richesse en carbone.

❖ **Horizon A (horizon humifère)** : Situé sous l'horizon O, c'est la couche où se mélangent matière organique et minéraux. On y trouve les racines des plantes et beaucoup de microfaune du sol. Cet horizon est souvent de couleur brune ou noire, signe de fertilité élevée. C'est la partie la plus productive du sol.

❖ **Horizon B (horizon d'accumulation)** : Cet horizon reçoit les éléments lessivés (argiles, fer, aluminium, etc.) des couches supérieures. Il contient moins de matière organique, mais plus de minéraux accumulés. Sa couleur varie du brun au rougeâtre. C'est une zone de concentration des éléments et de formation de structures plus compactes.

❖ **Horizon C (horizon d'altération)** : L'horizon C correspond à la roche mère altérée. Il est formé de fragments de roche en cours de désagrégation sous l'effet du climat, de l'eau et des racines. Il contient peu de matière organique et marque la transition entre le sol véritable et la roche en dessous.

❖ **Horizon R (roche mère)** : C'est la couche la plus profonde du profil. Elle est constituée de roche solide non altérée. Cette roche est à l'origine du sol : par altération physique et chimique, elle donnera naissance aux horizons supérieurs au fil du temps.

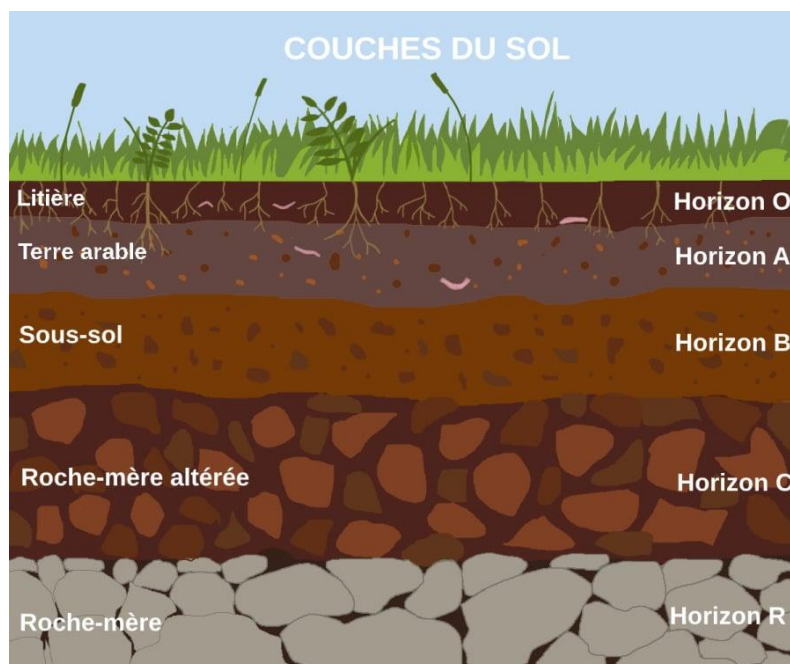


Figure 5 : Profil du sol.

➤ Les microorganismes du sol

Les microorganismes du sol se répartissent principalement en cinq groupes : **les virus, les bactéries, les actinobactéries, les champignons** et les **algues**.

Parmi ceux-ci, les **bactéries**, les **actinobactéries** et les **champignons** forment la majeure partie de la **biomasse microbienne** du sol. Certains de ces microorganismes jouent un rôle clé dans la santé et la croissance des plantes, en particulier à travers des symbioses bien étudiées telles que celles des rhizobias et des mycorhizes. Par ailleurs, la composante microbienne est profondément impliquée dans les cycles biogéochimiques essentiels comme ceux du soufre, du phosphore, du fer et de l'azote. Leur contribution est aussi cruciale au cycle du carbone, car la majorité des microorganismes du sol sont hétérotrophes et participent activement à la décomposition de la matière organique.

➤ Importances des microorganismes dans le sol

Les microorganismes ont un effet bénéfique sur la fertilité du sol, la croissance des végétaux et l'abondance des récoltes, par :

- ❖ Certaines espèces microbiennes (bactéries et champignons) mettent à la disposition des plantes des substances qu'elles ne peuvent pas synthétiser eux-mêmes ou les rendent plus accessibles. Par exemple par la libération des éléments nutritifs à partir de la matière organique et des minéraux du sol, les bactéries (*Bacillus mucilaginosus*) consomment du C et de l'azote pour vivre et solubilisent le P et le S et les oligoéléments. Ou par exemple l'oxydation de l'ammonium en nitrate, certaines bactéries (*Rhizobium*, *Azotobacter*) fournissent des nitrates contre du sucre.

- ❖ Ils produisent de l'humus par suite de la décomposition des cadavres d'animaux et des débris végétaux.

- ❖ Les végétaux établissent des relations symbiotiques avec des mycètes formant des mycorhizes (ectomycorhize : développement du mycète à l'extérieur des racines et les endomycorhize : développement du mycète à l'intérieur des racines entre les cellules), qui permettent l'absorption par les racines de plus grandes quantités de minéraux et contrôlent les échanges, sans eux la croissance serait plus lente, les végétaux seraient plus petits et plus sensibles aux maladies.

- ❖ D'autres microorganismes en particulier les bactéries produisent des hormones de croissance qui favorisent le développement racinaire ex de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) *Bacillus subtilis* ou des espèces de *Pseudomonas*.

- ❖ D'autres microorganismes entrent en compétition avec des microorganismes pathogènes limitant ainsi les risques de maladies, c'est la lutte biologique. La dégradation de polluants (bioremédiation) et fournissent des composés d'intérêt (antibiotiques, antiviraux, enzymes...).

En revanche les microorganismes peuvent aussi avoir un effet néfaste, quelques bactéries, mycètes, virus et viroïdes peuvent infecter certaines plantes et causer des dommages importants aux racines, aux feuilles et aux fleurs. Ex : la rouille des haricots (*Pseudomonas phaseolicola*), le mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*), la mosaïque du tabac (virus de la mosaïque), pour les lesquelles il existe des agents phytosanitaires (insecticides et pesticides) mais difficilement biodégradables.

c) Microbiologie des milieux aquatiques

L'eau représente un écosystème dynamique et très complexe considéré comme l'un des principaux réservoirs de la diversité biologique, il est estimé que les eaux contiennent des organismes vivants très diversifiés. Il a une capacité intrinsèque lui permettant à la fois de soutenir la vie terrestre et de fournir un habitat pour l'existence et l'évolution interdépendantes des organismes aquatiques.

La classification des eaux diffère d'une référence à une autre, quelques-unes les classifient suivant l'origine ; quelques auteurs parlent même des eaux de pluies, certains autres s'intéressent à l'utilisation des eaux :

1- Les eaux naturelles :

Les réserves disponibles d'eaux naturelles sont constituées des eaux souterraines (infiltration, nappes), des eaux de surface stagnantes (lacs, retenues de barrages) ou en écoulement (rivières, fleuves) et des eaux de mer :

1.1.Eaux souterraines :

De point de vue hydrogéologique les couches aquifères se divisent en :

Nappes phréatiques ou alluviales : Peu profondes et alimentées directement par les précipitations pluvieuses ou les écoulements d'eau en dessus.

Nappes captives : Plus profondes que les premières et séparées de la surface par une couche imperméable, l'alimentation de ces nappes est assurée par l'infiltration sur leurs bordures.

La nature du terrain sous lequel se trouvent ces eaux est un déterminant de leurs compositions chimiques, cependant elles sont appelées aussi les eaux propres car ils répondent 'en général' aux normes de potabilité.

1.2.Eaux de surface :

Ce type des eaux englobe toutes les eaux circulantes ou stockées à la surface des continents (rivières, lacs, étangs, barrages,...). La composition chimique des eaux de surface dépend de la nature des

terrains traversés par ces eaux durant leurs parcours dans l'ensemble des bassins versants. Ces eaux sont le siège, dans la plupart des cas, d'un développement d'une vie microbienne à cause des déchets rejetés dedans et de l'importante surface de contact avec le milieu extérieur. C'est à cause de ça que ces eaux sont rarement potables sans aucun traitement.

1.3.Eaux des mers et océans :

Les mers et les océans constituent des énormes réservoirs d'eau, elles représentent près de 97.4% du volume d'eau existant actuellement sur notre planète, le reste est la part des eaux continentales (eaux souterraines et superficielles). Les eaux de mers sont caractérisées par une grande salinité, elles sont dénommées aussi « eaux saumâtres », ce qui rend leur utilisation difficile, notamment leur coût très élevé pour leur traitement.

2- Eaux de consommation :

Ce sont les eaux destinées à la consommation domestique, elles ont connues une énorme croissance suite au développement démographique et à l'amélioration des conditions de vie des populations. La consommation domestique en eau varie de quelques litres par jour dans les pays sans adduction publique et à faible confort ménager jusqu'à plusieurs centaines de litres dans les pays très développés. Même si ce n'est qu'une petite quantité qui va être bu, jamais ces eaux ne sont distribuées qu'après traitement, trois facteurs déterminent le choix d'un traitement :

La quantité : La source doit couvrir la demande, en toute circonstance.

La qualité : La qualité de l'eau brute dont on dispose doit être compatible avec la législation en vigueur.

L'économie : Le coût d'investissement et de fonctionnement du procédé de traitement relatif à chacune des ressources disponibles est déterminant lors de la prise d'une décision.

Il faut signaler que les eaux destinées à la consommation doivent être en conformité avec certains paramètres (**Tableau 2, pour les autres paramètres voir Journal officiel N° 18 du 23 Mars 2011**).

Tableau 2 : Tableau 1. Paramètres microbiologiques de qualité de l'eau de consommation humaine.

Bactéries	Unités	Valeurs limites
Escherichia coli	Nb/100 mL	0
Entérocoques	Nb/100 mL	0
Sulfitoréductrices y compris les spores	Nb/20 mL	0

3. Eaux industrielles :

La qualité et la quantité des eaux utilisées dans l'industrie sont très variables, elles dépendent du type de l'entreprise productrice et de sa taille (tableau 3). Une eau qui va entrer dans un cycle de refroidissement d'une chaudière est moins exigeante que l'eau utilisée dans l'industrie électronique.

Tableau.3 : Principales utilisations industrielles de l'eau et sources d'eau possibles.

Sources d'eau après traitement adéquat	Utilisation
Eau moyennement minéralisée	Agroalimentaire
Eau potable	Pharmacie
Eaux de forage	Papiers blancs
Eaux de surface peu polluées	Teintureries Textiles Chimie
Eaux de forage	Pharmacie
Eaux de surface peu polluées	- Chaudières - Préparation des bains divers - Rinçages en galvanoplastie - Eau ultra pure - Dessalement par osmose inverse

3- Eaux usées :

L'utilisation des eaux engendre un nouveau produit appelé effluent ou eau usée. Les problèmes liés aux eaux usées sont aussi anciens que ces eaux elles même et ils s'aggravent suivant la croissance démographique, l'amélioration de la qualité de vie des populations et le développement des activités industrielles.

➤ Les Micro-organismes des milieux aquatiques

L'eau est un milieu qui permet la survie et le développement d'une grande variété d'organismes, les photoautotrophes, les photohétérotrophes, les chimiohétérotrophes et les chimiolithoautotrophes. La diversité microbienne dépend des nutriments disponibles, de leurs diverses concentrations (allant de niveaux extrêmement bas jusqu'à des niveaux très élevés), des transitions de zones aérobies à zones anaérobies, et du mélange des oxydants et des réducteurs dans cet environnement dynamique. De plus, la pénétration de la lumière dans de nombreuses zones anaérobies crée des milieux favorables à certains types de micro-organismes photosynthétiques.

- **Les bactéries** : Le nombre de bactéries dans l'eau dépend principalement de la teneur en matière organique. Dans les eaux propres, elles sont présentes en faible nombre alors que les eaux polluées contiennent jusqu'à plusieurs millions de cellules par 1 ml.
- **Les Virus** : Les milieux aquatiques abritent aussi de grandes populations de virus. Ceux-ci sont présents à des concentrations 10 fois supérieures à celle des bactéries. Il s'agit pour la plus part de bactériophages. Ce virioplancton constitue une partie importante de la communauté microbienne aquatique. Il peut influencer le fonctionnement de la boucle microbienne, intervenir dans le transfert horizontal de gènes entre procaryotes, et contrôler la diversité de la communauté microbienne.

Boucle microbienne : c'est une chaîne alimentaire invisible où les bactéries décomposent la matière organique dissoute, puis sont mangées par de petits organismes (comme protozoaires), qui nourrissent à leur tour les organismes plus grands du milieu.

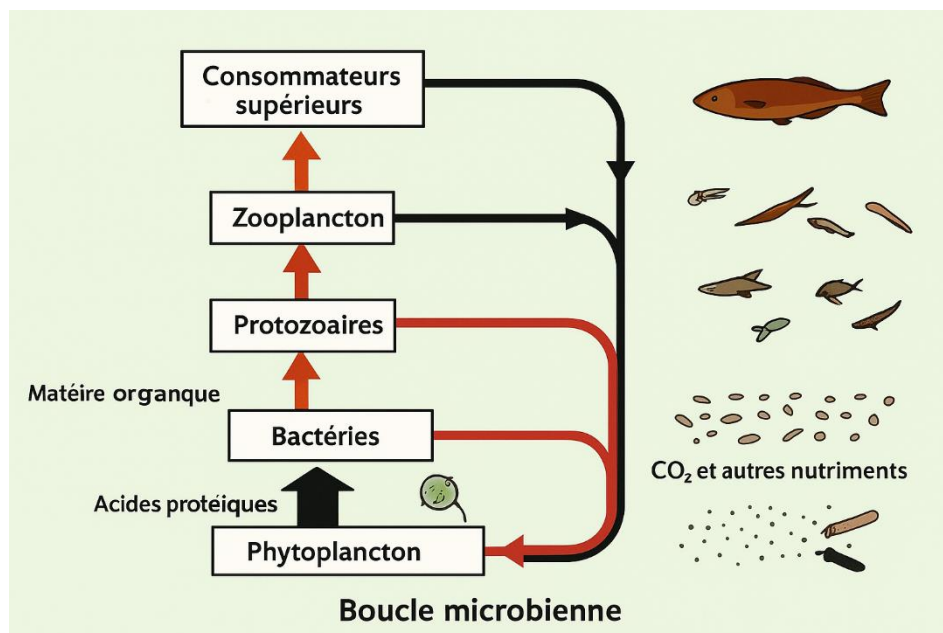


Figure.6 : La boucle microbienne.

- **Les mycètes** : Les mycètes microscopiques, se développent aussi dans les milieux d'eaux douces et marines. Contrairement aux bactéries qui poussent le mieux dans les eaux dont le pH est compris entre 6 et 8. Les champignons n'apparaissent que dans les eaux inférieures à 6,0. Ils se produisent généralement dans les eaux peu profondes, directement sur ou juste sous la surface, ce qui est étroitement lié au fait que les organismes ont besoin de quantités importantes d'oxygène. Les champignons n'apparaissent généralement pas dans les eaux propres. Ils poussent en abondance au fond des eaux polluées par les eaux usées.

- **Les algues** : Les algues sont les eucaryotes autotrophes les plus simples qui incorporent plus de 20 000 espèces. Les algues sont présentes dans les eaux douces et marines. Ce sont des producteurs importants de matière organique et d'oxygène. Les algues vivent sous la forme de cellules uniques ou créent un corps pluricellulaire. La composition de la communauté d'algues change considérablement en termes de qualité et de quantité, en fonction de la teneur en sels minéraux d'un réservoir donné ainsi que des caractéristiques des substances qui constituent le principal polluant. On peut y trouver des diatomées, des dinophytes et des spirogyres.
- **Les protozoaires** : Les protozoaires vivent dans tous les types d'eaux, des petites flaques d'eau aux eaux intérieures, en passant par les mers. Ce sont des hétérotrophes qui se nourrissent en absorbant les composés organiques dissous ou sur les bactéries. Ils sont les plus nombreux dans les eaux fortement polluées. Lorsque le niveau de pollution n'est pas trop élevé, les ciliés deviennent prédominants.

➤ **Distribution des micro-organismes dans les milieux aquatiques**

La distribution et la densité des micro-organismes dans les milieux aquatiques sont largement influencées par divers facteurs abiotiques tels que la disponibilité des éléments minéraux nécessaires au développement des espèces chimiolithotrophes et photolithotrophes, ainsi que l'abondance de matière organique indispensable à la croissance des chimioorganotrophes. D'autres paramètres comme la température, la luminosité, la concentration en oxygène et le pH jouent également un rôle clé dans leur répartition. Les plus grandes populations microbiennes se rencontrent principalement aux interfaces air/eau et sol/eau.

1. À l'interface **air/eau**, on trouve majoritairement des micro-organismes aérobies, notamment le plancton formé par des bactéries, des cyanobactéries, des protozoaires et de petits animaux. Les algues et végétaux constituent le phytoplancton, et les organismes photosynthétiques marins assurent entre 80 et 90% de la photosynthèse globale, en étant de ce fait les principaux producteurs d'oxygène de la planète. La forte concentration d'algues peut parfois teinter l'eau en jaune verdâtre, brun ou rouge. Cette zone abrite aussi le zooplancton, composé de ciliés, flagellés, foraminifères et radiolaires, qui sont organotrophes se nourrissant du phytoplancton, de bactéries et de matière organique.
2. À l'interface **eau/sol**, zone riche en matière organique et en débris végétaux et animaux morts, se trouvent des micro-organismes benthiques anaérobies facultatifs. Ces derniers jouent un rôle important de décomposeurs, transformant la matière organique en substances minérales disponibles pour les producteurs primaires.

➤ **Pollution de l'eau**

On appelle pollution de l'eau, toute modification chimique (nitrates/la maladie bleue) physique (pollution radioactive) ou biologique (*Escherichia coli*/infection urinaire, méningite...) de la qualité de l'eau qui a un effet nocif sur les êtres vivants la consommant.

1- Pollution domestique et urbaine : ce sont les eaux qui proviennent généralement des habitations (eaux ménagères et eaux vannes) qui sont présentées comme un mélange de matières non dissoutes dans une solution aqueuse de matières organiques et minérales, la pollution domestique se caractérise par des germes fécaux, de fortes teneurs en matières organiques, des sels minéraux et des détergents.

2- Pollution chimique d'origine agricole : elle constitue une cause majeure de pollution des eaux souterraines, et importante pour les eaux de surface, causée essentiellement par l'utilisation irrationnelle des engrais chimiques et des pesticides. La pollution agricole se caractérise par la présence de fortes teneurs en sels minéraux (azote, phosphore potassium) provenant des engrais, des élevages et de produits chimiques (pesticides, herbicides). L'enrichissement de l'eau en éléments nutritifs "eutrophisation" notamment par les engrais azotés et phosphatés conduit à la prolifération d'algues et de végétaux et à la dégradation des caractéristiques de l'eau (acidité, goût, odeur).

3- Pollution industrielle : autre source de pollution provenant des usines, rejetant des matières organiques et graisses hydrocarbure (raffineries), des matières radioactives (centrales nucléaires, traitement des déchets radioactifs) et des métaux (métallurgie).

4- Pollution par précipitation (la formation des pluies acides) : dans l'atmosphère, une série de réactions chimiques se déroulent dont, les atomes d'oxygène libre réagissent avec l'eau de l'atmosphère et produisent des radicaux hydroxyles (OH) intervenant dans la formation de l'acide sulfurique et l'acide nitrique.

5- Pollution microbiologique : la pollution microbiologique est la présence en quantité excessive de germes, bactéries et virus, parmi lesquels certains sont pathogènes pour l'homme et les animaux. Il est fréquent de rencontrer dans les eaux douces des microorganismes qui vivent naturellement dans l'intestin des animaux et de l'homme, c'est le cas des streptocoques fécaux et de nombreuses entérobactéries comme *Proteus vulgaris*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*...

➤ Traitement des eaux usées

Les principales étapes sont :

1)- Les prétraitements (physiques) : permettant le Dégrillage, Dessablage et le Déshuilage.

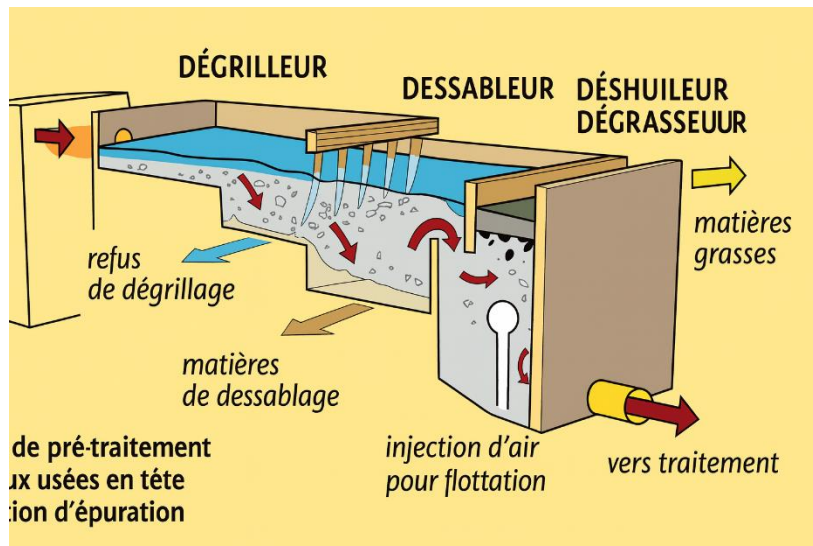


Figure.7 : Les prétraitements des eaux usées.

2)- Traitement primaire (Décantation primaire)

L'eau s'écoule à faible vitesse dans un grand bassin (décanteur), au fond duquel se déposent les matières en suspension sous forme de boues dites "boues primaires". Ces boues déposées sont récupérées par raclage permanent et pompage.

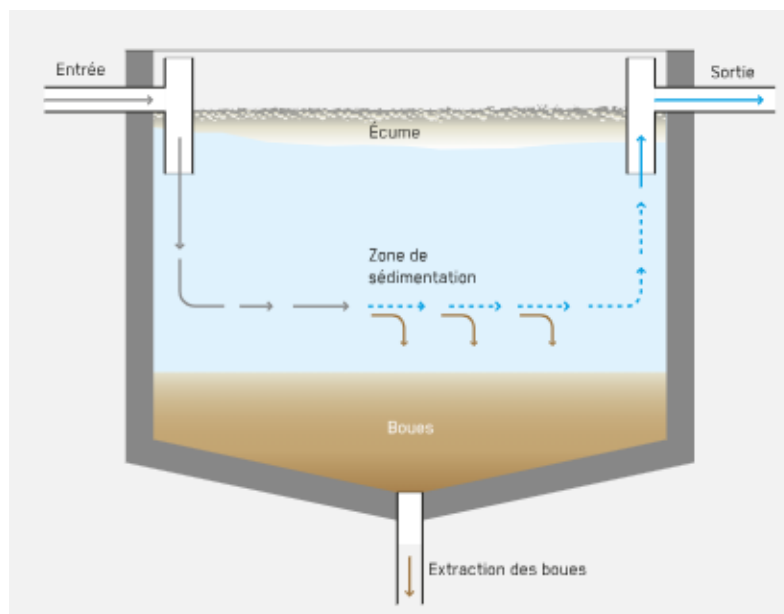


Figure.8 : Traitement primaire des eaux usées.

3)- Traitement secondaire (traitement biologique) :

Consiste à mettre la matière organique contenue dans les eaux usées au contact d'une masse bactérienne hétérotrophes (*Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Escherichia coli*.) en présence d'oxygène.

Les principaux procédés biologiques sont :

❖ Culture bactérienne libre :

- **Boues activées** : Il comprend un bassin d'aération (Les microorganismes y flottent librement) aéré (agitation et alimentation en oxygène), il contient les boues activées et c'est l'endroit où les polluants sont dégradés, Un clarificateur vient ensuite servant à séparer les boues de l'eau épurée.

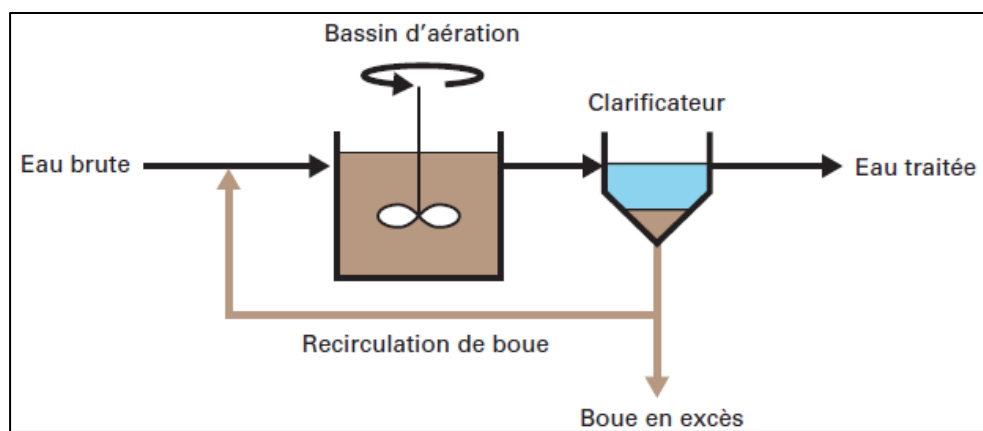


Figure.9 : Traitement secondaire des eaux usées (Boues activées).

- **Lagunage** : C'est un lent écoulement de l'eau dans plusieurs bassins successifs (généralement 3), de grande taille et peu profonds (moins de 1,50 m), l'aération se fait par échange avec l'atmosphère ou par photosynthèse des algues de surface, et peut être complété par des aérateurs. L'épuration se fait de façon naturelle, grâce à la prolifération de bactéries et d'algues microscopiques, qui produisent par photosynthèse l'oxygène nécessaire pour ces bactéries.

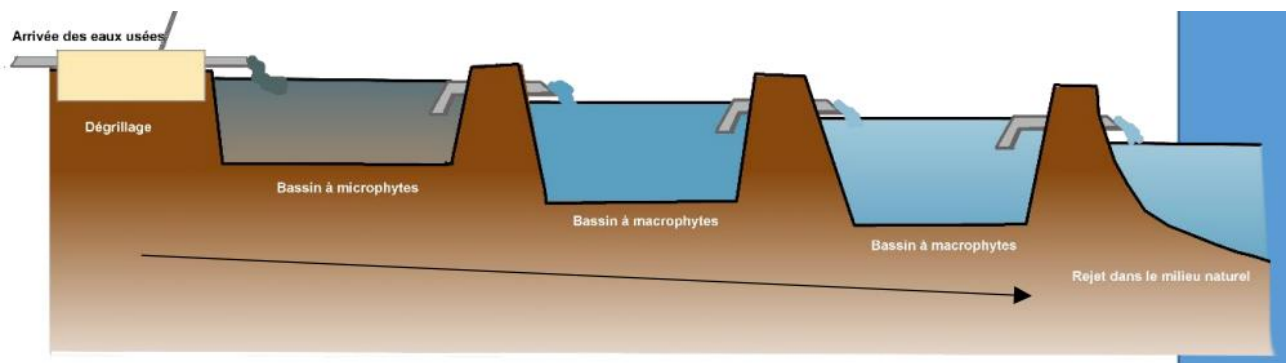


Figure.10 : Traitement secondaire des eaux usées (Lagunage).

❖ **Culture bactérienne fixée :**

- **Disques biologiques :** Dans ce procédé les bactéries sont fixées sur des disques (2 à 3 m de diamètre) fixés et reliés à un moteur assurant leur rotation. Ils passent alternativement dans l'eau usée et dans l'air afin de favoriser le développement bactérien. Les résidus de boues qui tombent des disques sont entraînés vers un décanteur secondaire, permettant leur séparation des eaux épurées.

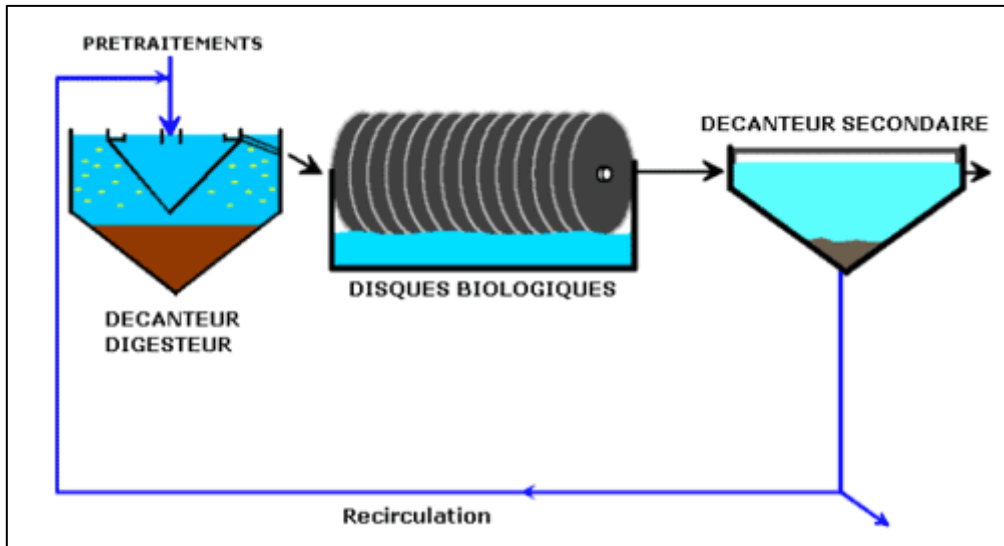


Figure.11 : Traitement secondaire des eaux usées (Disques biologiques).

- **Lits bactériens :** Les bactéries épuratrices sont fixées sur un support constitué de roche ou plastique poreux inerte (garnissage). Ce dernier est arrosé en continu avec l'eau à traiter introduite par le haut du lit à l'aide d'un bras d'arrosage rotatif (sprinkler), et l'oxygénation est apportée par ventilation naturelle de bas en haut (ouïes d'aération).

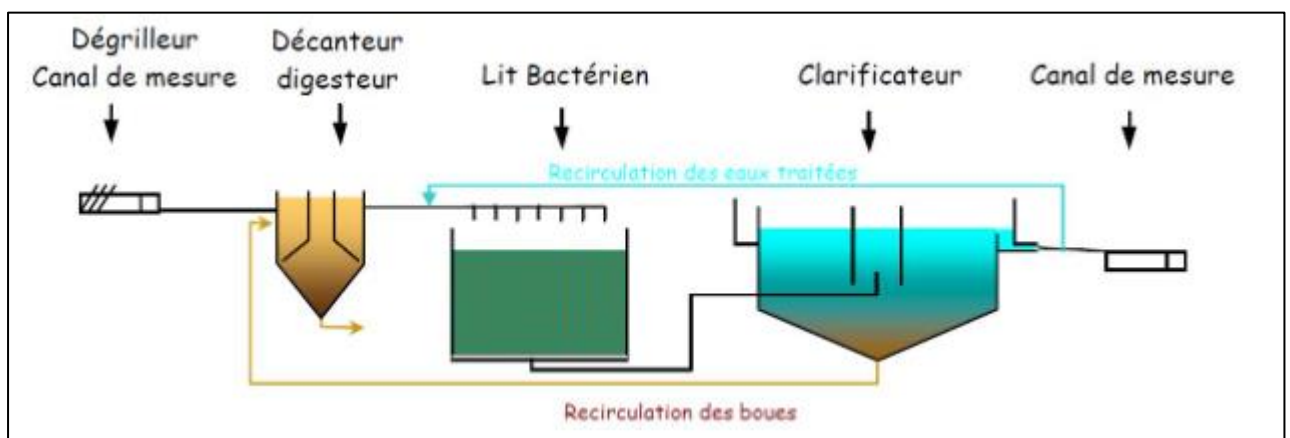


Figure.12 : Traitement secondaire des eaux usées (Lits bactériens).

- **Lits granulaires (Biofiltres)** : Ce procédé utilise un support granulaire (minéral ou organique) immergé dans un bassin périodiquement lavé pour éliminer les matières en suspension (MES) et la biomasse fixée sur le support. La respiration des bactéries est assurée par un système d'aération (air comprimé) aménagé en-dessous du matériau à lit fixe.

4)- Traitement tertiaire :

Il s'agit de procédés utilisés sur un effluent épuré afin d'améliorer la qualité du rejet. Ce dernier traitement n'est pas toujours mis en place. Il englobe :

- **L'élimination du phosphore** : Elle se fait par un procédé biologique qui se fait par des bactéries aérobies strictes (*Acinetobacter* sp.), qui sous l'action du stress anaérobie dans le milieu ; relarguent leur propre phosphate intracellulaire. Dès que ces mêmes germes sont à nouveau aérés, ils réabsorbent non seulement leurs phosphates mais aussi 50 à 60 % de celui apporté par les eaux usées.

- **Traitement par voie physico-chimique** : Cette étape permet de réduire le nombre de bactéries et des germes pathogènes présents dans l'eau traitée par rayonnement UV ou par le chlore et une neutralisation des métaux en solution.

d) La microbiologie de l'air

- Définition :

L'air est un mélange de gaz qui constitue l'atmosphère terrestre. Il est principalement composé d'azote (environ 78%), d'oxygène (environ 21%), d'argon, de dioxyde de carbone et d'autres gaz en très petites quantités. L'air est essentiel à la vie car il permet la respiration des êtres vivants et joue un rôle crucial dans les phénomènes météorologiques et climatiques. La composition de l'air peut varier légèrement selon le lieu, le temps et l'altitude, et contient aussi de la vapeur d'eau en quantité variable. L'air est invisible, inodore et indispensable à la survie sur Terre.

Pour les microorganismes, l'air constitue plutôt un véhicule qu'un habitat, ces microorganismes sont véhiculés par des vecteurs. Telle que :

Les poussières atmosphériques : ces particules véhiculent des spores de champignons et des microorganismes (bactéries, virus, etc.).

Les gouttelettes d'expectoration : ce sont des fines gouttelettes (1-2 mm) porteuses de germes comme : *Mycobacterium tuberculosis*. Ces gouttelettes ont une vitesse de chute (2mètres/seconde).

Les noyaux de condensation : qui sont produits par le processus d'évaporation des gouttelettes d'expectoration (2 microns), leur vitesse de chute est très lente (1mm/min). Ils représentent des

éléments contaminateurs par excellence, car transportables à distance et capable de pénétrer en profondeur dans l'appareil respiratoire.

1. La diversité de la flore microbienne de l'air :

1.1. Les microorganismes de l'air extérieur ou libre :

Le nombre de microorganismes varie selon les conditions de l'environnement, ils sont plus nombreux pendant les mois d'été qu'en hiver, dans les villes que les campagnes, autour des terres fertiles et rares au-dessus des terrains pauvres. La persistance des microorganismes dans l'air libre dépend des facteurs climatiques (vent, humidité...), et de la taille des microgouttelettes.

- **La flore saprophyte :** Cette flore de base est constituée par les germes de l'environnement, composés de : **Bactéries**, Ce sont des bactéries à Gram positif (généralement les plus résistantes dans le milieu extérieur): *Micrococcus* ou les bacilles sporulés comme les *Bacillus*. **Flore mycélienne**, elle est très diversifiée et plus abondante en été et en automne (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Botrytis*). **Levures** appartenant aux genres *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kloeckera*.
- **Flore accidentelle d'origine humaine, animale ou hydro-tellurique :** Cette flore vient surcontaminer la flore de base, elle est constituée de :
Microorganismes d'origine humaine ou animale qui peuvent se diviser en deux groupes : Ceux dont la durée de vie est limitée dans le milieu extérieur et qui sont rarement retrouvés dans les prélèvements (virus et bactéries fragiles) et ceux capables de survivre pendant un temps plus ou moins prolongé dans le milieu extérieur et qui seront les indicateurs d'une contamination d'origine fécale (*E. coli*, *Enterococcus*...), rhinopharyngée ou cutanée (*Staphylococcus*, *Neisseria*, *Corynebacterium*).
Microorganismes d'origine hydro-tellurique qui peuvent être soit des bactéries telles que *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter* ou des champignons microscopiques et leurs spores. Ils ont une vie indépendante de la présence humaine.

1.2. Les microorganismes de l'air confiné :

Le nombre de microorganismes peut varier de quelques milliers dans un appartement à quelques millions dans des locaux d'aéroport. Ces microorganismes proviennent surtout des voies respiratoires de l'homme à travers les gouttelettes de la salive et les noyaux de condensation qui en résultent.

2. Analyses microbiologiques de l'air :

L'analyse microbiologique de l'air est basée sur deux études, l'étude quantitative, réalisée par numération des colonies sur des boîtes gélosées et la charge microbienne est exprimée en UFC. Et

l'étude qualitative qui a pour but l'identification des espèces microbiennes de l'air. Les principales techniques qui nous permettent de collecter ou mettre en culture les microorganismes de l'air sont :

- ❖ **Technique des écouvillons** : Le prélèvement se fait à l'aide d'un écouvillon sur les surfaces (paillasse, tables, etc.), suivie d'un ensemencement sur une gélose ---> incubation.
- ❖ **La sédimentation** : Des boîtes gélosées sont ouvertes et exposées à l'air pendant quelque minute afin que les microorganismes se déposent sur la gélose ---> incubation.
- ❖ **Le Biocollecteur** : Cet appareil aspire l'air par des ventilateurs. L'air est ensuite dirigé directement vers les surfaces gélosées, à un débit donné et constant. Cette opération ne doit pas dépasser les 10 minutes en raison du risque d'assèchement des surfaces gélosées.

V. Etude de la biodiversité microbienne

1. Échantillonnage :

L'échantillonnage est l'étape fondamentale pour obtenir des microorganismes représentatifs d'un environnement donné (sol, eau, air, aliments, surfaces, etc.).

Les techniques d'échantillonnage varient en fonction du type de milieu étudié, car chaque environnement présente des caractéristiques particulières.

a. Échantillonnage de l'eau

L'échantillonnage de l'eau vise à collecter un échantillon représentatif de la microflore présente dans les milieux aquatiques tels que les eaux potables, naturelles ou usées. Il se réalise à l'aide de flacons stériles en verre ou en plastique, parfois préalablement dosés en thiosulfate de sodium lorsqu'il s'agit d'eaux chlorées afin de neutraliser le chlore. Le prélèvement peut être effectué en surface en immergeant le flacon à quelques centimètres sous l'eau pour éviter l'écume, ou en profondeur grâce à une bouteille Niskin utilisée dans les lacs ou milieux marins. Les flacons doivent être manipulés avec soin pour éviter les contaminations, étiquetés immédiatement, et conservés à une température appropriée afin de préserver la viabilité microbienne jusqu'à l'analyse.

b. Échantillonnage du sol

L'échantillonnage du sol consiste à prélever une portion de terre qui reflète la diversité microbienne d'une zone définie. Le sol étant très hétérogène, les prélèvements se font généralement à l'aide d'un carottier, d'une sonde ou d'ustensiles stériles, à différentes profondeurs selon l'objectif de l'étude. Plusieurs prélèvements sont souvent combinés pour former un échantillon composite, ce qui permet de réduire les variations liées à l'environnement immédiat. Le sol collecté doit être placé dans un sac stérile hermétique, tenu à l'abri de la chaleur et analysé rapidement pour éviter des modifications dans la composition microbienne due à l'activité biologique ou aux conditions physico-chimiques.

c. Échantillonnage de l'air

L'échantillonnage de l'air permet de détecter et de quantifier les microorganismes aéroportés tels que les spores, levures et bactéries. Plusieurs techniques sont utilisées, dont l'impaction, qui consiste à faire passer un volume d'air à travers un impacteur pour déposer les particules sur une gélose ; la filtration, où l'air est aspiré à travers un filtre retenant les microorganismes ; et la sédimentation passive, méthode qualitative reposant sur l'ouverture de boîtes de Pétri dans l'environnement pendant une durée déterminée. Le choix de la méthode dépend du niveau de précision recherché, de l'environnement étudié et de la sensibilité attendue. Ces techniques doivent être réalisées dans des conditions contrôlées pour garantir la fiabilité des résultats.

d. Échantillonnage des surfaces

L'échantillonnage des surfaces concerne l'analyse microbiologique de plans de travail, d'équipements industriels, de mains ou de matériaux divers. Il peut être réalisé à l'aide d'écouvillons stériles préalablement humidifiés avec une solution saline tamponnée, permettant de recueillir efficacement les microorganismes présents même dans les zones irrégulières. Pour les surfaces planes, les plaques de contact RODAC sont fréquemment utilisées : elles comportent une gélose bombée directement appliquée sur la surface, offrant une mesure rapide de la contamination par unité de surface. Ces méthodes nécessitent une manipulation aseptique et une traçabilité rigoureuse afin d'éviter les erreurs lors de l'interprétation.

➤ Conservation des échantillons

Une fois les échantillons collectés, leur conservation est essentielle pour maintenir l'intégrité microbiologique jusqu'à l'analyse. La plupart des échantillons sont conservés à 4 °C pour ralentir le métabolisme microbien sans altérer la viabilité. Le transport doit se faire dans des glacières ou dispositifs isothermes afin de limiter les variations de température. Pour un stockage plus long, notamment dans les études nécessitant des analyses ultérieures, les échantillons peuvent être cryoconservés à -20 °C ou -80 °C avec l'ajout de cryoprotecteurs tels que le glycérol ou le DMSO. Le respect des délais d'analyse est crucial, car toute modification des conditions environnementales peut entraîner une évolution non désirée de la flore microbienne initiale.

2. Microscopie

La microscopie représente l'une des premières approches utilisées pour étudier la biodiversité microbienne, car elle permet d'observer directement les cellules et d'obtenir une estimation qualitative ou semi-quantitative de la diversité microbienne d'un échantillon. À l'aide de la microscopie optique, les microorganismes peuvent être distingués selon leurs formes, leurs arrangements et certaines caractéristiques structurales mises en évidence par des colorations

spécifiques, comme la coloration de Gram ou les colorations fluorescentes utilisant des fluorochromes tels que le DAPI. La microscopie à fluorescence, plus avancée, permet de visualiser des populations vivantes ou mortes grâce à des marqueurs spécifiques et de détecter certaines espèces grâce à des sondes fluorescentes. Enfin, la microscopie électronique offre une résolution très élevée permettant d'observer des structures fines comme les flagelles, les pili ou les spores. Ces différentes formes de microscopie constituent des outils indispensables pour caractériser la morphologie, l'abondance relative et parfois l'activité de communautés microbiennes complexes.

3. Cytométrie de flux

La cytométrie de flux est une technique moderne permettant d'analyser rapidement des milliers de cellules microbiennes individuellement, en mesurant leurs propriétés physiques et chimiques lorsqu'elles traversent un faisceau laser. Cette méthode fournit des informations sur la taille des cellules, leur granularité interne et leur fluorescence lorsqu'elles sont marquées avec des colorants ou sondes spécifiques ciblant l'ADN, l'ARN ou des protéines particulières. La cytométrie de flux offre l'avantage majeur de ne pas dépendre de la culture, ce qui la rend particulièrement utile pour étudier des communautés comprenant des microorganismes non cultivables. Elle permet également de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes, d'identifier des sous-populations, de quantifier précisément la biomasse microbienne ou même de trier des cellules d'intérêt grâce à la technique associée du FACS. Cette technologie est devenue un outil essentiel pour l'étude quantitative et fonctionnelle de la biodiversité microbienne.

4. Sélection et isolement

La sélection et l'isolement des microorganismes constituent une étape clé pour étudier de manière approfondie des espèces ou souches spécifiques au sein d'une communauté microbienne complexe. Grâce à l'utilisation de milieux sélectifs ou différentiels, il devient possible de favoriser la croissance de certains groupes microbiens tout en inhibant les autres. L'isolement se réalise généralement sur des milieux solides à travers des techniques telles que les stries d'épuisement ou l'ensemencement après dilution, permettant l'obtention de colonies pures issues d'une seule cellule. Une fois isolées, les colonies peuvent être caractérisées par des tests biochimiques, morphologiques, enzymatiques ou physiologiques afin d'identifier les microorganismes présents. Ces techniques sont fondamentales pour déterminer les propriétés d'espèces spécifiques, pour isoler des souches d'intérêt industriel ou médical, et pour comprendre les rôles individuels des membres d'une communauté microbienne.

5. Méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires occupent une place centrale dans l'étude moderne de la biodiversité microbienne car elles permettent d'identifier, de caractériser et parfois de quantifier les microorganismes sans nécessiter leur culture. Parmi ces techniques, la PCR et la qPCR permettent la détection rapide de gènes spécifiques, tels que les gènes codant pour l'ARN ribosomal (16S, 18S ou ITS), fournissant ainsi des informations sur la composition d'une communauté. Le séquençage haut débit (NGS) a révolutionné ce domaine en permettant d'analyser simultanément des millions de séquences, offrant une vision globale de la diversité, de l'abondance relative et des relations entre microorganismes. Les méthodes de génotypage, comme le PFGE, le MLST ou l'AFLP, permettent de distinguer finement différentes souches au sein d'une même espèce, ce qui est essentiel pour la traçabilité en microbiologie clinique ou alimentaire. Enfin, des techniques comme la FISH, la métagénomique, la métatranscriptomique et la métaprotéomique permettent non seulement d'identifier les microorganismes présents, mais aussi d'étudier leur activité et leurs fonctions dans l'écosystème.

6. Autres méthodes

En complément des méthodes traditionnelles, d'autres approches permettent une compréhension plus approfondie de la biodiversité microbienne. Parmi celles-ci, on trouve les cultures à haut débit utilisant des microplaques et des milieux multiples, qui facilitent l'exploration de la fraction cultivable de la communauté microbienne. Les méthodes biochimiques, telles que la mesure de l'activité enzymatique ou de la respiration microbienne, aident à évaluer la fonctionnalité de la communauté. La spectrométrie de masse MALDI-TOF est devenue un outil de référence pour l'identification rapide des bactéries et levures grâce à leur empreinte protéique. D'autres approches, comme la métabolomique, permettent d'étudier les métabolites produits par une communauté et d'en déduire les interactions, les voies métaboliques et les dynamiques écologiques. Enfin, des analyses écologiques avancées peuvent être utilisées pour étudier les réseaux d'interactions entre microorganismes et déterminer les espèces dominantes ou les espèces clés dans un écosystème.