

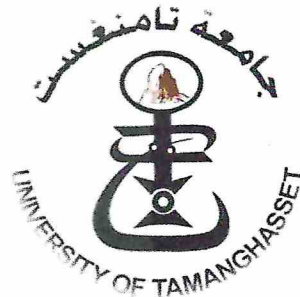
REPUBLICQUE DEMOCRATIQUE ALGERIENNE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Amine Elokhal El Hadj Moussa Eg Akhamouk Tamanrasset

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Biologie



POLYCOPIE DE COURS

DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEE ET ENVIRONNEMENTALE

1^{ème} Année Master Microbiologie Appliquée



Dr Asmaa BENAÏSSA
(Enseignante-chercheuse à
l'Université de Tamanrasset)

Avant-propos

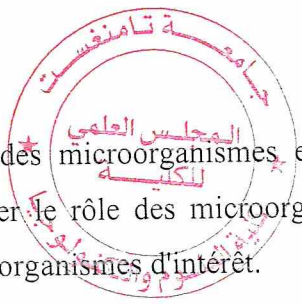


Les microorganismes sont une composante essentielle de tout écosystème. Ils occupent des micro-habitats spécifiques convenant à leurs besoins. Dans ces micro-habitats, les microorganismes ont établi différents types de relations entre eux et avec d'autres organismes : neutres, symbiotiques, pathogènes et antagonistes. De par ces relations, ils affectent ou non, positivement ou négativement, le développement des autres membres de la communauté biotique. Ils sont donc de véritables ouvriers nécessaires aux fonctionnements des écosystèmes telluriques et aquatiques, qui peuvent accomplir des tâches aussi importantes que méconnues indispensables au bon fonctionnement des cycles biogéochimiques de la matière, comme la transformation des déchets, l'oxydation, la réduction, la précipitation et la solubilisation des ions minéraux, la production des composés organiques, la fixation de l'azote moléculaire, l'altération de la roche mère, ...etc.

Dans l'environnement, les microorganismes jouent le rôle de producteurs ou de décomposeurs. Les microorganismes producteurs sont photolithotrophes ou chimiolithotrophes. Ils tirent leur énergie de la lumière ou des composés inorganiques et synthétisent des matières organiques, en raison de ces propriétés, ils constituent le point de départ de nombreuses chaînes alimentaires. Les microorganismes décomposeurs sont chimiolithotrophes. Par leurs activités métaboliques, ces derniers dégradent les matières organiques en matières minérales. Ce recyclage permanent entretient la vie en rendant les éléments nutritifs constamment disponibles bien qu'ils soient en quantités limitées dans l'environnement.

A partir de la microbiologie environnementale, les chercheurs ont développé des applications tendant à utiliser des microorganismes dans les différents domaines d'intérêt de l'homme : industrie agro-alimentaire, pharmacologie, agriculture, cosmétologie, bioremédiation, épuration des eaux usées...etc. C'est ce que nous allons développer dans ce document.

Dans ce manuscrit, nous allons d'abord comprendre les méthodes d'étude des microorganismes en passant par l'écologie des virus, puis comprendre l'état actuel des connaissances sur le cycle des matériaux dans l'environnement, les bioréacteurs et les biofilms



afin de montrer des exemples d'application des microorganismes environnementaux. Par conséquent, le but de ce travail est d'examiner le rôle des microorganismes dans le cycle biochimique, et de nommer et classer les microorganismes d'intérêt.

Cet ouvrage a été rédigé de telle manière concordante aux programmes de Master en microbiologie appliquée selon le canevas du ministère de l'enseignement supérieure algérien.

- Ce document ne dispense pas les étudiants de la responsabilité d'assister aux cours –

Auteure

Pour toutes suggestions, e-mail : benaisa.asmaa@yahoo.fr

Maître de conférences A au département des Sciences Biologiques, Université de Tamanrasset (UTAM) et rattachée au laboratoire de biologie et physiologie des organismes à l'Université des Sciences et Technologie Houari Boumediene (FSB/LBPO/USTHB), Alger.

TABLE DES MATIERES

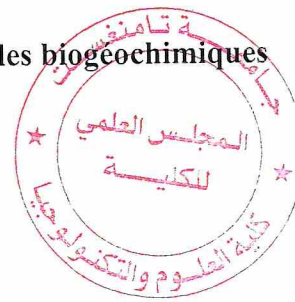


AVANT-PROPOS

Liste des tableaux et figures

Chapitre I : Méthodes d'étude et contrôle des microorganismes	1
1. Microorganismes bénéfiques et germes de contamination	1
2. Ciblage des points de contrôle	1
3. Pratiques de stérilisation	1
4. Echantillonnage	1
5. Méthodes d'étude des microorganismes	2
5.1. Croissance sous des conditions contrôlées	2
5.2. Isolement des cultures pures (purification)	2
5.3. Caractérisation phénotypique	3
5.4. Milieux de culture	3
5.5. Observation microscopique	3
5.6. Méthodes de dénombrement	4
Chapitre II : Ecologie virale	7
1. Définition	7
2. Historique	7
3. Structure générale des virus	8
4. Impacts	8
5. Ecologie virale en milieu aquatique	8
6. Métagénomés viraux	10
Chapitre III : Qualité et traitement des eaux	12
1. Introduction	12
2. Pollution de l'eau	13
3. Traitement des eaux usées	13
4. Station d'épuration	13
4.1. Prétraitement	14
4.1.1. Dégrillage	14
4.1.2. Déshuilage	15
4.1.3. Dessablage	15
4.2. Traitement primaire	15
4.3. Traitement biologique	15
Chapitre IV : Diversité des microorganismes et des métabolismes	17
1. Diversité des microorganismes	17
1.1. Diversité taxonomique	18
1.2. Diversité fonctionnelle	18
1.3. Non-cultivabilité des microorganismes de l'environnement : obstacle à l'étude de la diversité microbienne	19
2. Diversité métabolique	20

Chapitre V : Place des microorganismes dans les grands cycles biogéochimiques	24
1. Cycle du carbone	24
1.1. Formes du carbone	24
1.2. Etapes du cycle	25
2. Cycle de l'oxygène	28
2.1. Formes	28
2.2. Etapes du cycle	29
3. Cycle de l'azote	29
3.1. Formes	30
3.2. Fonctions	31
3.3. Etapes du cycle	31
3.4. Pompe de l'azote	32
3.5. Microorganismes fixateurs d'azote	33
4. Cycle du soufre	33
4.1. Formes	34
4.2. Etapes du cycle	35
5. Cycle du phosphore	35
5.1. Formes	35
5.2. Etapes du cycle	36
5.3. Phytodisponibilité	37
5.3.1. Bactéries solubilisatrices du phosphore	37
5.3.2. Mycorhize	37
Chapitre VI : Culture et croissance des microorganismes	40
1. Division bactérienne	40
2. Croissance bactérienne	41
3. Courbe de croissance	41
4. Facteurs environnementaux influençant la croissance	42
5. Culture bactérienne	42
6. Culture bactérienne	44
Chapitre VII : Technologies des bioréacteurs	46
1. Définition d'un bioréacteur	46
2. Processus énergétiques mis en jeu	48
3. Fonctionnement d'un bioréacteur	49
4. Types de réacteurs	49
4.1. Réacteur discontinu ou fermé	49
4.2. Réacteur continu ou ouvert	49
5. Principales familles de bioréacteurs	49
5.1. Bioréacteurs à membrane externes	49
5.2. Bioréacteurs à membrane immergées	50
Chapitre VIII : Biofilm	51
1. Historique	51
2. Définition	51
3. Structure	52





4. Propriétés	54
5. Formation	54
6. Applications	57
6.1. Traitement et contamination des eaux	57
6.2. Bio-indicateur de pollution	57
6.3. Pathogénèse	57
Chapitre IX : Bioremédiation	58
1. Introduction	58
2. Historique	58
3. Définition	58
4. Principe	58
5. Population microbienne	59
6. Concepts	61
6.1. Biodégradation	61
6.2. Bioaugmentation	62
6.3. Biostimulation	62
6.4. Bioventing	63
6.5. Biosparging	63
7. Influence de la microflore rhizosphérique sur la phytoremédiation	63
8. Avantages	64
CONCLUSION	65
Références bibliographiques	66

ABREVIATIONS ET ACRONYMES



Ni : Nickel
NO₂ : Nitrites
NO₃ : Nitrates
NPP : Nombre le Plus Probable
O : Oxygène
O₂ : Oxygène moléculaire
P : Phosphore
pH : potentiel d'Hydrogène
S : Soufre
SO₂ : Sulfite
SO₄²⁻ : Sulfate
SPE : Substance Polymère Extracellulaire
STEP : Station d'Épuration des Eaux
TCP : Tri-Calcium-Phosphate
UV : Ultra-Violet
V : Vanadium
W : Tungstène
Zn : Zinc

UNITES :

% : Pourcentage
g : Gramme
mL : Millilitre
UFC/gr : Unité Formant Colonie par
gramme

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES



LES FIGURES

Figure 1 :	Photographie d'un microscope optique à fond clair (Prescott <i>et al.</i> , 2003)	2
Figure 2 :	Protocole de recherche des coliformes dans l'eau	5
Figure 3 :	Structure générale d'un virus (Joubert, 2006)	8
Figure 4 :	Principales interactions entre virus et hôtes dans l'écosystème marin (Middelboe and Brussaard, 2017)	9
Figure 5 :	Représentation schématique d'une station d'épuration des eaux usées (Altmeyer <i>et al.</i> , 1990)	14
Figure 6 :	Schéma simplifié d'une STEP (Plagellat, 2004)	14
Figure 7 :	Stratification en deux zones (aérobie et anoxique) sur l'épaisseur du biofilm pour une nitrification et une dénitrification simultanée (Picard, 2011)	15
Figure 8 :	Arbre phylogénique du vivant d'après Woese (Stetter, 2006)	18
Figure 9 :	Organigramme montrant les différentes possibilités de caractériser un échantillon environnemental par analyse comparative des séquences d'ARNr. RT, transcriptase inverse (Amann <i>et al.</i> , 1995).	19
Figure 10 :	Fiche explicative des étapes de la fermentation et la respiration	21
Figure 11 :	Diversité des métabolismes chimiotrophes. La croissance des procaryotes en fonction des donneurs d'électrons organiques ou inorganiques est exprimée comme des pourcentages variables d'énergie totale et de carbone nécessaire (modifié par Byrne, 2008 d'après Karl, 1995).	22
Figure 12 :	Place de la biogéochimie (Pédro, 2007).	24
Figure 13 :	Cycle global du carbone organique terrestre (Gobat <i>et al.</i> , 2010)	25
Figure 14 :	Cycle biologique du carbone (Gobat <i>et al.</i> , 2010)	27
Figure 15 :	Tricycle biologique de l'oxygène (trois principaux cycle et réactions accessoires) (Gobat <i>et al.</i> , 2010)	29

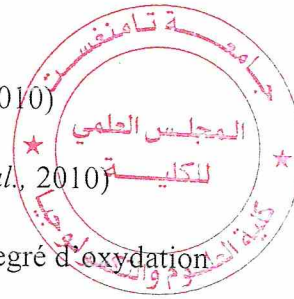
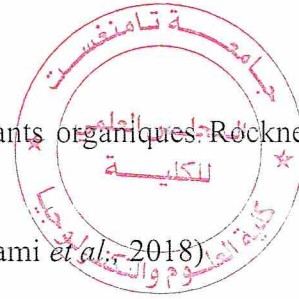


Figure 16 :	Cycle global de l'azote (Gobat <i>et al.</i> , 2010)	30
Figure 17 :	Cycle biologique de l'azote (Gobat <i>et al.</i> , 2010)	31
Figure 18 :	Les différentes formes de l'azote par degré d'oxydation	32
Figure 19 :	Représentation schématique des microorganismes fixateurs d'azote	33
Figure 20 :	Cycle du soufre (https://fertilisation-edu.fr/cycles-bio-geo-chimiques/le-cycle-du-soufre-s.html)	31
Figure 21 :	Cycle du phosphore (https://fertilisation-edu.fr/cycles-bio-geo-chimiques/le-cycle-du-phosphore-s.html)	33
Figure 22 :	Cycle du phosphore dans une zone humide (Fardeau, 2000)	33
Figure 23 :	Rôle de la mycorhization sur l'acquisition du phosphore par les végétaux (Furlan, 1990)	33
Figure 24 :	Plante mycorhizée typique présentant des hyphes extraradiques d'AMF, les filaments fongiques mycorhiziens dans le sol agissent comme des extensions du système racinaire (Roy-Bolduc and Hijri, 2011)	34
Figure 25 :	Division cellulaire chez les bactéries en forme de bâtonnet (Adams <i>et al.</i> , 2009).	40
Figure 26 :	Courbe de croissance bactérienne	41
Figure 27 :	Schéma simplifié d'un bioréacteur (Bacchin, 2006)	46
Figure 28 :	Les différentes utilisations de l'usine cellulaire (Bacchin, 2006)	47
Figure 29 :	Différentes échelles des bioréacteurs à travers le temps (Bacchin, 2006)	47
Figure 30 :	Principe de fonctionnement d'un bioréacteur (Bacchin, 2006)	48
Figure 31 :	Protocole des expérimentations en bioréacteur (Chastang, 2014)	48
Figure 32 :	Bioréacteurs à membranes externes	50
Figure 33 :	Bioréacteurs à membranes immergées	50
Figure 34 :	Etude microscopique des étapes de formation d'un biofilm par <i>Vibrio cholerae</i> (Watnick and Kolter, 2000)	54
Figure 35 :	Représentation schématique de la formation du biofilm (Kokare <i>et al.</i> , 2009, modifié)	55



- Figure 36 :** Processus général de dégradation des contaminants organiques (Rockne and Reddy, 2003) 61
- Figure 37 :** Principal diagramme de bioaugmentation (Goswami *et al.*, 2018) 62
- Figure 38 :** Principal diagramme de biostimulation (Goswami *et al.*, 2018). 63

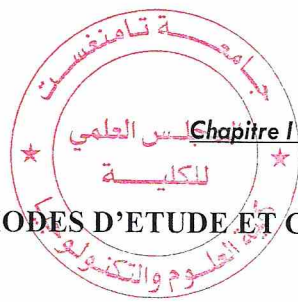
LES TABLEAUX

- Tableau 1 :** Principaux groupes et genres d'agents pathogènes responsables de maladies d'origine hydrique (Straub and Chandler, 2003). 12
- Tableau 2 :** Cultivabilité déterminée comme le pourcentage des bactéries cultivables par rapport aux cellules totales déterminées par comptage direct. (D'après Amann *et al.*, 1995) 20
- Tableau 3 :** Flux d'azote dans la biosphère (Ramade, 1974) 33
- Tableau 4 :** Réponses des microorganismes aux facteurs de l'environnement 44
- Tableau 5 :** Fonctions des substances polymériques extracellulaires dans les biofilms bactériens (Flemming and Wingender, 2010) 53
- Tableau 6 :** Quelques contaminants potentiellement adaptés à la biorémediation (Vidal, 2001) 60



CHAPITRE I : METHODES D'ETUDE ET CONTROLE DES MICROORGANISMES





CHAPITRE I : METHODES D'ETUDE ET CONTROLE DES MICROORGANISMES

1. Microorganismes bénéfiques et germes de contamination

Il existe de nombreux microorganismes bénéfiques pour l'homme, utilisés dans les différents domaines de la vie : l'agriculture, l'agro-alimentaire, la pharmacologie, la cosmétologie, l'environnement, ...etc. Cependant, leur usage excessif peut faire perdre le contrôle sur leur gestion. De ce fait, il est important de contrôler les microorganismes bénéfiques soient-ils ou les germes de contamination par des méthodes physico-chimiques entre autre pour éviter leur transmission.

Par ailleurs, les germes de contamination sont ceux qui ne sont pas censés se trouver dans un milieu dit et sont souvent pathogènes. Ces microorganismes créent des équilibres écologiques et peuvent produire des substances toxiques.

2. Ciblage des points de contrôle

La rigueur impose une surveillance microbiologique étroite de la chaîne de fabrication d'un produit impliquant l'usage des microorganismes bénéfiques pour les deux raisons suivantes :

- Gérer la quantité nécessaire des germes utilisés et éviter leur propagation ;
- Diagnostic d'hygiène, contrôle des surfaces en contact avec la matière ;
- Eviter la contamination de la matière première et des produits par les germes pathogènes.

3. Pratiques de stérilisation

En pratique microbiologique, la stérilisation est de rigueur pour éviter toutes formes de contamination et travailler dans des conditions d'asepsie complète. Elle est définie comme une technique de destruction de tous les microorganismes d'un matériau quelconque (verres, plastique, aliment, ...etc).

Le but de la stérilisation est de garantir que les microorganismes comptés ou identifiés proviennent réellement de l'échantillon analysé. A cet effet, il faut s'assurer des critères suivants :

- Désinfection des surfaces par des produits appropriés ;
- Mains désinfectées avec des produits hydroalcooliques ;
- Tous les récipients de prélèvement doivent être stériles.

4. Echantillonnage

L'échantillonnage est l'acte de prélever une certaine quantité de substances ou de matériaux pour l'analyser dans un laboratoire. Les échantillons peuvent être de différents types, de la

nourriture à l'eau en passant par l'environnement (sol, bois, plantes, etc.). Le prélèvement pour analyse microbiologique est réalisé dans les situations suivantes :

- Vérifier que le produit ou le procédé répond aux exigences de qualité.
- Évaluation, surveillance et vérification temporaires de la bonne application des bonnes pratiques d'hygiène dans des processus de fabrication spécifiques.
- Recherche analytique visant à explorer ou distinguer un ou plusieurs micro-organismes spécifiques dans tous les domaines de la recherche scientifique.

5. Méthodes d'étude des microorganismes

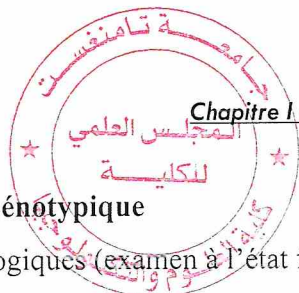
L'étude des micro-organismes utilise une variété de méthodes, qui peuvent mieux décrire les microorganismes en fonction du phénotype et des caractéristiques phylogénétiques. Ce dernier commence par des prélèvements, des observations et des expériences guidées. En effet, cette recherche commence par l'échantillonnage, qui permet de définir des outils microbiologiques dans l'espace et dans le temps. Ensuite, il faut continuer à mesurer la biomasse et l'activité métabolique, et isoler et caractériser les microorganismes. Toutes ces étapes conduisent à l'analyse du comportement et de la fonction des micro-organismes. Cependant, des difficultés peuvent être rencontrées, qui est la non-cultivabilité de la plupart des micro-organismes dans l'environnement.

5.1.Croissance sous des conditions contrôlées

La croissance est définie comme "l'augmentation ordonnée de tous les composants d'un organisme, et dans les micro-organismes, elle conduit à une augmentation du nombre de cellules. Pour cette raison, de nombreux nutriments doivent être présents dans le milieu. De plus, des facteurs physiques et chimiques peuvent favoriser ou inhiber cet apport en nutriments, contrôlant ainsi la croissance.

5.2.Isolement des cultures pures (purification)

Le but de cette opération est d'obtenir différentes colonies pour chaque micro-organisme différent. Lorsque tous les microorganismes qui composent une souche sont identiques, la souche est appelée souche pure : les colonies obtenues par étalement de la souche pure doivent toutes avoir les mêmes caractéristiques.



5.3. Caractérisation phénotypique

Les tests morphologiques (examen à l'état frais, coloration simple et/ou double) :
Permet de déterminer la taille, la forme, et l'arrangement des cellules.

- **Coloration de Gram (coloration différentielle)** permet de diviser les bactéries en deux groupes : Gram Négatives et Gram Positives. Cette coloration fait appel à la combinaison de deux colorants (Coloration primaire - Cristal violet Mauve / Coloration secondaire – Safranine Rouge). La paroi Gram positif permet de piéger le 1er colorant et la paroi Gram négatif ne permet pas de piéger le 1er colorant
- **Coloration au Vert de Malachite** des spores (structures résistantes utilisées pour la survie dans des conditions défavorables). Contre coloration à la safranine
- Tests biochimiques (métabolismes)
- Tests physiologiques (recherche des enzymes respiratoire : catalase, oxydase, nitrates réductases,.. etc).

5.4. Milieux de culture :

Ils peuvent être divisés en différentes classes selon la consistance, la composition et la fonction.

D'après la consistance, ils sont :

1. Liquides (bouillons)
 - Culture en suspension (trouble homogène ou hétérogène)
 - Distribution uniforme des éléments nutritifs
 - Croissance de grandes quantités
2. Solides (gélose)

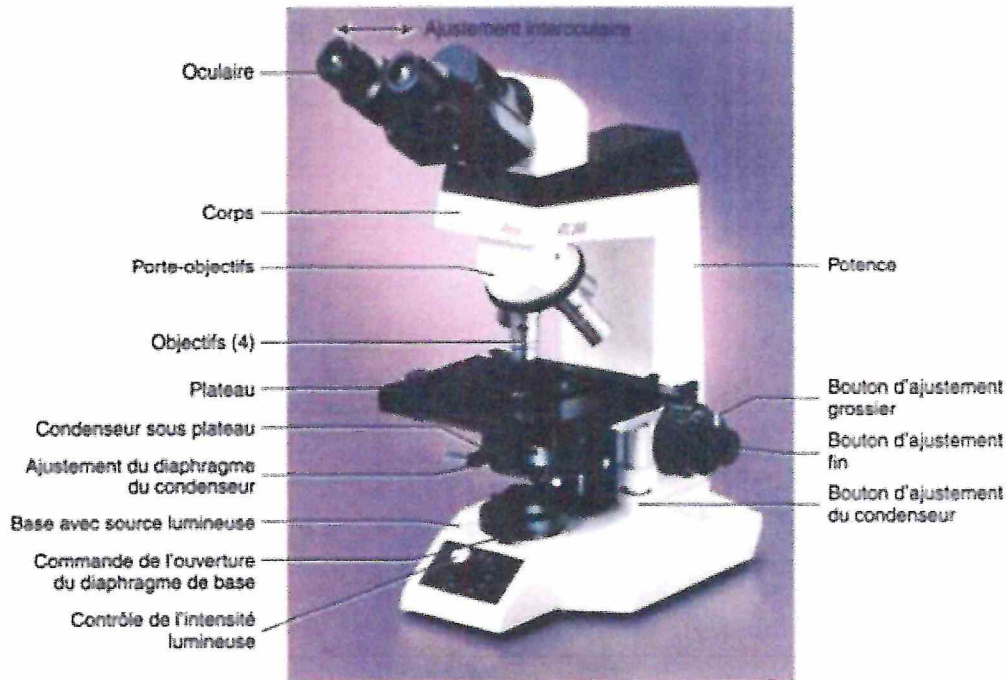
Les milieux solides sont de même composition des milieux liquides additionnés d'un agent de solidification (exemple : agar qui est un polysaccharide dérivé d'une algue). La gélose permet l'isolation de colonies distinctes et des cultures pures.

D'après la composition, ils peuvent être soit synthétique, complexe ou enrichis (voir chapitre VI)

5.5. Observation microscopique

La première observation des cellules microbiennes est souvent réalisée par un microscope optique à fond clair (ordinaire), qui est équipé de 3 à 4 objectifs allant d'un grossissement *4 jusqu'à *100. Cette observation permet d'étudier l'aspect morphologique des cellules d'une espèce microbienne. Elle comprend l'examen à l'état frais (entre lame et lamelle à G*40) et

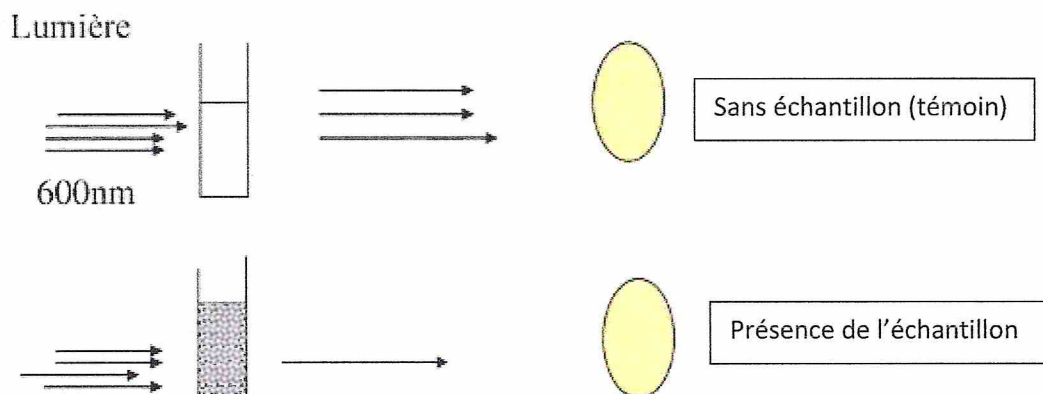
l'examen post-coloration (sur frottis séchés et fixés sans lamelle à G*100 plus une goutte d'huile d'immersion). Le but est donc de décrire la forme, le mode de groupement et la mobilité si visible à l'examen à l'état frais.



5.6.Méthodes de dénombrement

Le but du dénombrement est de déterminer la concentration de germes contenus dans l'échantillon initial. Pour cela, différentes techniques existent dont les plus utilisées :

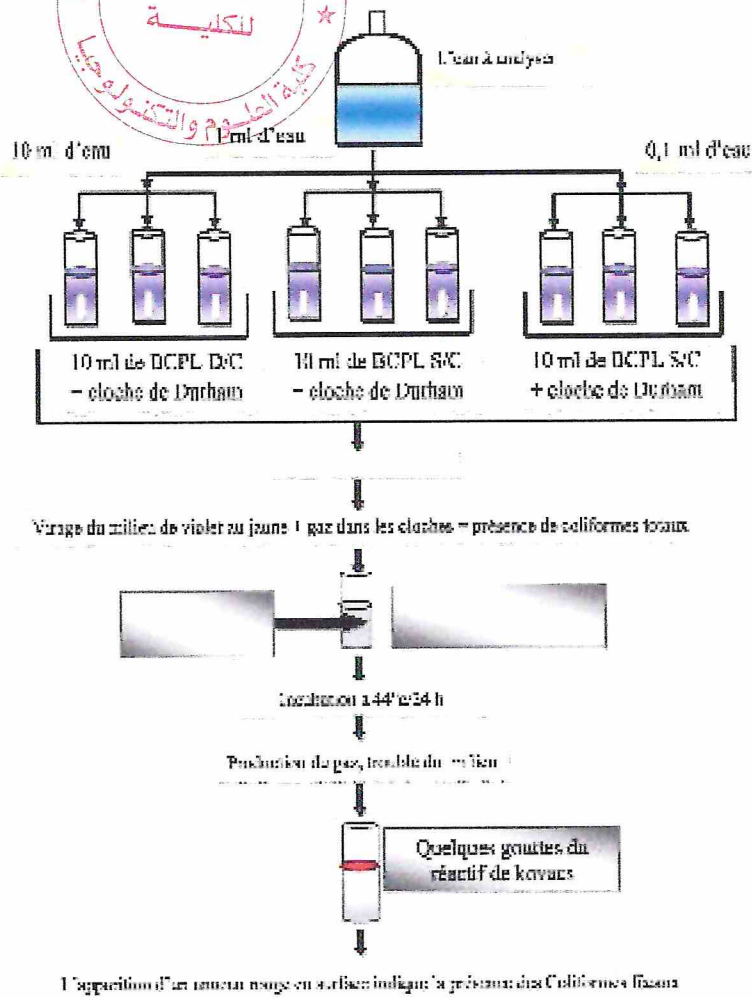
1. Mesure de la turbidité (trouble en suspension en densité optique) par spectrophotométrie à UV (quantité de lumière qui peut traverser un échantillon)



2. Dénombrement directe sur les lames (exemple : lame de Malassez)



3. Dénombrement des unités formant colonies (UFC) sur boîte gélosée
Un compte viable est fait en diluant l'échantillon initial
Étaler des échantillons des dilutions sur un milieu de culture approprié
Incuber sous les conditions appropriées pour permettre la croissance
Des colonies sont formées
Les colonies sont comptées et le nombre initial de cellules viables est déterminé en fonction de la dilution
4. Nombre le plus probable (NPP) : basé sur les statistiques de probabilités (table de Mac Grady). Technique réalisée en milieu liquide.
 - ✓ Commencer avec un bouillon qui permet de déceler les caractéristiques désirées (ex : BCPL bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol pour mettre en évidence la fermentation du lactose chez les coliformes) ;
 - ✓ Inoculer différentes dilutions de l'échantillon à être testé dans chacun de 3 tubes
Dilution 3 Tubes/Dilution 1 ml de chaque dilution dans chaque tube. Après une période d'incubation appropriée, enregistrer les TUBES POSITIFS (qui présentent une croissance et les caractéristiques désirées)
 - ✓ Après l'incubation, le nombre de tubes qui démontre les caractéristiques désirées sont enregistré.
 - ✓ Exemple de résultats pour une recherche des coliformes sur milieux BCPL (Figure 2)
 - Dilutions : Tubes positifs : Choisir la bonne suite : 321 et la retrouver dans la table de Mc Grady
 - Multiplier le résultat par le facteur de dilution central $150 \times 10^2 = 1.5 \times 10^4/\text{mL}$ Puisque vous avez 1g dans 10mL doit multiplier encore par $101.5 \times 10^5/\text{g}$



Dilutions	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Aspect des tubes (BLBVB + cloche)					
Résultats	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +

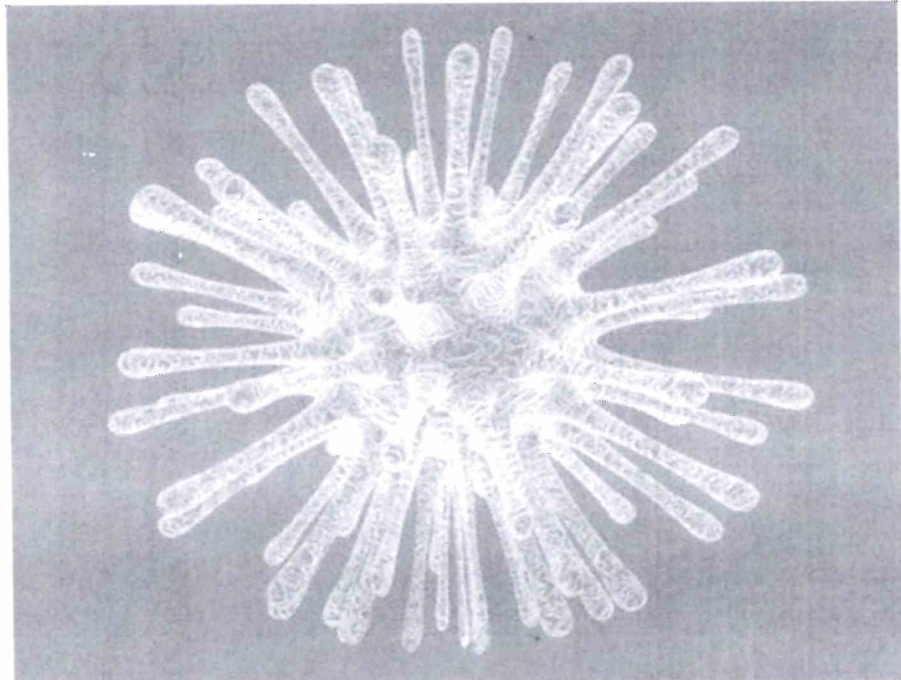
- choix de la dilution : 10⁻¹
- Détermination du NPP : regroupement choisi = 321 et dans la table de Mac Grady le NPP correspondant à 321 est 15.
- Calcul :

$$N = \frac{NPP}{V_{\text{ensemencé}}} \times Fd$$

$$N = \frac{15}{1} \times 10^1 = 150 = 1,5 \cdot 10^2 \text{ coliformes / mL}$$

Figure 2 : Protocole de recherche des coliformes dans l'eau

CHAPITRE II : ECOLOGIE VIRALE





CHAPITRE II : ECOLOGIE VIRALE

Les virus occupent une place importante dans les écosystèmes et les réseaux nutritionnels, en particulier ceux qui infectent les microorganismes procaryotes et eucaryotes. Ces microorganismes acellulaires sont fortement impliqués dans les grands cycles biogéochimiques et constituent une part majeure de la biomasse planétaire. Ils sont omniprésents dans la biosphère et peuvent infecter tous les êtres vivants. Ainsi, ils ont un impact sur la diversité des populations microbiennes dans l'écosystème, l'évolution génomique de ces populations et les cycles biogéochimiques majeurs principaux ou indirects (Roux, 2013).

1. Définition

Les virus sont des particules microscopiques infectieuses qui ne peuvent se répliquer qu'en pénétrant dans les cellules et en utilisant leur machinerie cellulaire. Les virus qui infectent les bactéries sont des bactériophages. En latin, ce mot résume en fait les concepts de «poison, venin, sécrétion, humour et infection» (Chastel, 1992).

2. Historique

La découverte du virus remonte au 19ème siècle et était l'œuvre d'Adolf Meyer (1892) est sur la feuille du tabac. Le scientifique allemand a découvert que cette maladie qui touchait les feuilles de tabac pouvait se propager d'une plante à l'autre. Le virus de la mosaïque du tabac (VMT) n'a été identifié qu'en 1935 par Wendell Stanley. Mais c'est les travaux de Dimitri Ivanovsky (1864-1920) qui ont permis une première description du virus. Plus tard, le microbiologiste Martinus Beijerinck (1851-1931) comprit que la particule infectieuse devait être bien plus petite qu'une bactérie et le nomma ce pathogène « virus » (Zaitlin, 1998).

Cependant, Robert Koch (1843-1910) et Fredriech Loeffler (1852-1915) sont les premiers auteurs à identifier le virus comme une plus petite particule que la bactérie car non retenue par les filtres de Chamberland qui normalement retiennent les bactéries (Mahy, 2005). D'autre part, Ernest Hanbury Hankin (1865-1939) fut le microbiologiste qui a noté le pouvoir antibactérien d'un virus contre *Vibrio cholera*, mais c'est les travaux de Frederick William Twort (1877-1950), qui ont mis à jour l'existence d'un virus infectant les bactéries, appelé « bactériophage » (Roux, 2013).

3. Structure générale des virus

Les virus sont des particules infectieuses dont les gènes (ADN ou ARN) sont enfermés dans une enveloppe protéique : la capside. Cette dernière est formée d'un ensemble de protéines regroupées en sous-unités appelées « capsomères ». Ils sont cependant incapables de se multiplier et croître de manière autonome (Roux, 2013). En dépit de la description morphologique (Figure 3), l'analyse génétique fut plus intéressante. Le premier virus séquencé est en fait un bactériophage, appelé Enterobacteria phage MS2 (Fiers *et al.*, 1976).

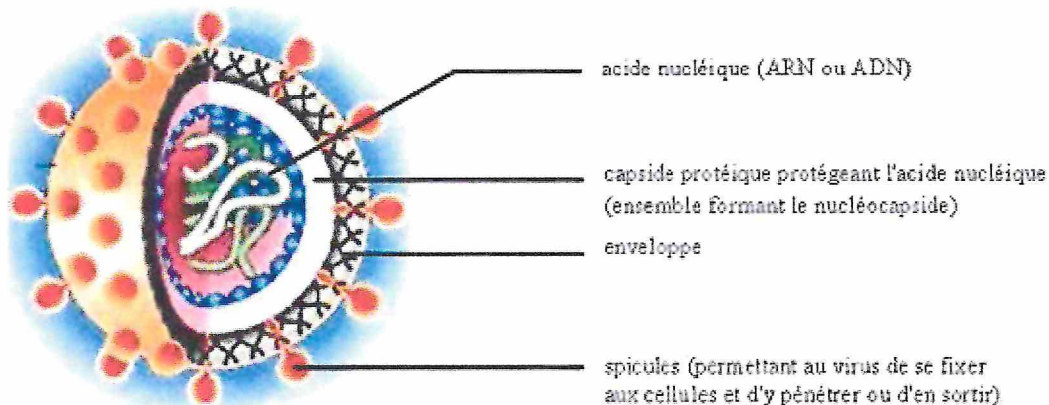


Figure 3 : structure générale d'un virus (Joubert, 2006)

4. Impacts

Les virus sont omniprésents dans la biosphère et peuvent infecter tous les êtres vivants. Au sein des écosystèmes, les virus ont un impact sur :

- La quantité et diversité de la population microbienne
- L'évolution des génomes de ces populations
- Les cycles biogéochimiques de la matière.

En effet, l'activité métabolique et l'abondance des microorganismes dans les écosystèmes sont affectées par les infections virales dont ils souffrent.

5. Ecologie virale en milieu aquatique

Le principal facteur biologique limitant la diversité et l'abondance des virus semble être l'abondance d'hôtes sensibles. La présence d'extensions ou de processus épineux (un polymorphisme) observés uniquement chez les virus aquatiques augmente la probabilité de rencontrer l'hôte, en particulier dans un environnement oligotrophique. Par conséquent, il est très probable que toutes les communautés aquatiques, procaryotes ou eucaryotes, soient infectées par des virus dans leur environnement. D'un point de vue quantitatif, les virus dont la

densité oscille généralement entre 10^4 et 10^8 mL⁻¹ forment une composante très dynamique des écosystèmes aquatiques, et ces virus sont principalement représentés par des particules virales récemment produites (Figure 4). Leur dynamique saisonnière dépend de facteurs non biologiques (température, rayonnement ultraviolet, réactifs chimiques, etc.) et biologiques (hôtes sensibles, charges organiques, etc.) (Amblard *et al.*, 1998). D'un point de vue fonctionnel, Suttle (1994) a estimé qu'en milieu marin, les virus sont responsables de plus de 30 % de la mortalité phytoplanctonique et de près de 10 % de la mortalité phytoplanctonique. Les principaux facteurs susceptibles de réguler l'abondance et la production de bactéries dans le milieu aquatique sont la température, les ressources, la prédation et la lyse du virus (Rivkin and Anderson, 1997).

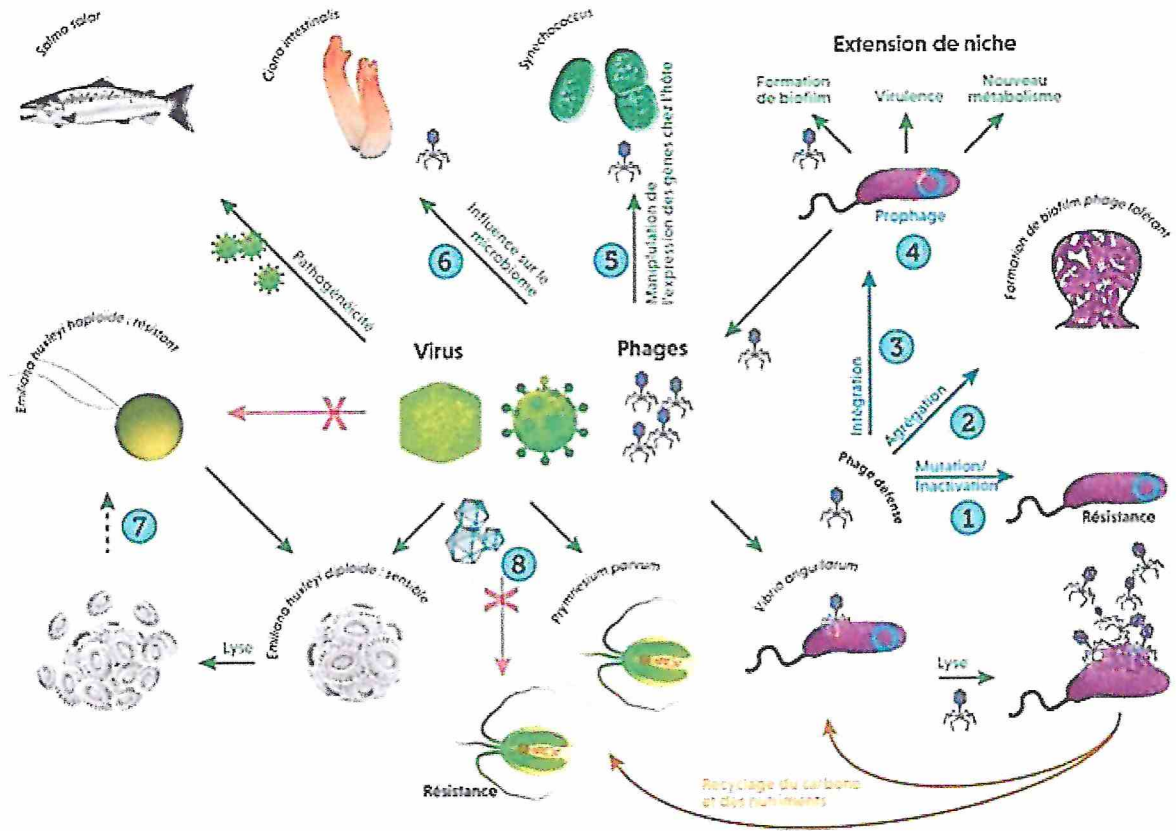


Figure 4 : Principales interactions entre virus et hôtes dans l'écosystème marin (Middelboe and Brussaard, 2017)

Même si la contribution des écosystèmes aquatiques à la dissémination des agents pathogènes viraux entériques est connue depuis des décennies, l'importance des virions sauvages qui instruisent les communautés aquatiques et les réseaux alimentaires n'a été mise en évidence que relativement récemment. Les preuves d'infections virales dans les deux domaines

de vie procaryotes et eucaryotes, ainsi que dans les bactéries hétérotrophes et le protozooplancton, ont amené les biologistes marins à s'interroger sur l'impact du viroplancton sur des processus tels que (1) la mortalité des microorganismes, (2) la nutrition des protistes hétérotrophes, (3) la promotion des échanges de matériel génétique entre les populations microbiennes, (4) le maintien de la diversité des espèces, (5) l'induction d'agrégats planctoniques, et (6) le cycle de la matière organique dans les écosystèmes aquatiques (Amblard *et al.*, 1984)

Les virus influencent sans aucun doute à des degrés divers les processus biologiques dans les écosystèmes aquatiques, bien que presque toutes les études sur l'écologie des virus pélagiques soient réalisées pendant une période limitée de l'année, principalement dans les zones marines et les eaux situées dans les zones tempérées.

Cela affecte directement le calcul du flux de carbone et la compréhension des pompes biologiques. En fait, au départ, la capture du dioxyde de carbone dans l'atmosphère était principalement réalisée par des organismes photosynthétiques, y compris des micro-organismes aquatiques. Par conséquent, le réchauffement climatique devrait être le résultat d'une augmentation des gaz à effet de serre, dont le plus important est le dioxyde de carbone.

6. Les métagénomomes viraux

La métagénomique, ou séquençage aléatoire à grande échelle de fragments nucléotidiques extraits d'échantillons, offre une perspective unique sur le génome viral. Par conséquent, ce genre d'approche récemment développée met en évidence la population exceptionnellement riche de virus environnementaux en termes de gènes et de génotypes (Roux, 2013).

- En établissant le serveur Web Metavir, qui est le premier serveur dédié à l'analyse des virions, une nouvelle méthode d'analyse adaptée à la spécificité du génome viral et du métagénome a été développée. Aujourd'hui, Metavir propose un ensemble d'outils cohérents pour différents types de virus. Metavir compte plus de 300 utilisateurs et peut analyser plus de 2 000 virus
- Le potentiel fonctionnel du génome viral peut être exploré par l'étude conjointe d'un groupe de virions. Après une analyse rigoureuse de la contamination potentielle, il a pu être démontré que le génome viral comprend un ensemble limité mais non négligeable de gènes liés au métabolisme cellulaire. Par conséquent, la plupart des virus agissent sans aucun doute directement sur le métabolisme des cellules hôtes lors de l'infection.
- En tant que facteur constituant la communauté virale aquatique, les paramètres environnementaux, en particulier la salinité, sont également dominants. La distance

géographique entre les échantillons semble n'avoir qu'un effet mineur, confirmant la remarquable capacité de dispersion de la capside virale. Cependant, il semble y avoir une adaptabilité locale dans certains cas, en particulier lorsqu'il y a une concurrence claire entre la résistance développée par l'hôte et la capacité d'infecter le virus.

• Enfin, différentes familles de petits virus à ADN simple brin ont été caractérisées par méta-analyse virale. Leur apparente simplicité révèle donc un mécanisme évolutif plus complexe que prévu, impliquant des capacités de circulation et de transfert de gènes. Jusqu'à présent, ils étaient considérés comme le privilège des virus à ADN double brin et s'interrogeaient sur la séparation acceptable entre eux. Différents groupes de virus sont divisés en fonction de la nature de leurs génomes. En permettant des études allant de la taille des communautés à des génotypes spécifiques, les virions sont l'outil de choix pour caractériser la diversité virale, comprendre les différents facteurs qui régulent ces communautés, et ainsi mieux comprendre la localisation des virus dans la biosphère. . De plus, ces études ont confirmé qu'il existe des interactions étroites entre virus et organismes cellulaires. Ces interactions semblent nombreuses et multiples de nature et de conséquences et traversent toute l'histoire des organismes. Par conséquent, ces nouvelles connaissances apportées par l'analyse des virosomes permettent de résoudre certaines questions fondamentales sur l'origine des innovations évolutives majeures ou la fonction globale des écosystèmes



CHAPITRE III : QUALITE ET TRAITEMENT DES EAUX





2. Pollution de l'eau

Divers produits d'érosion provoquent une pollution naturelle de l'eau mais elle est également causée par les pluies acides, les engrais agricoles et les micro-organismes libérés avec les matières fécales. Ces différents types de pollution déséquilibrent l'écosystème (acidification, eutrophisation) et y affectent les êtres vivants (destruction d'espèces animales, pollution). La pollution est un changement dans la qualité de l'eau. Les rejets d'eau domestique et diverses activités humaines, industrielles et agricoles sont les principales sources de pollution des eaux de surface.

3. Traitement des eaux usées

La station d'épuration traite les eaux usées collectées et produit des eaux traitées et des résidus d'épuration (boues), qui sont rejetés dans le milieu naturel. Les boues sont constituées d'eau, de matières organiques et de minéraux. La présence de substances nocives et de microorganismes pathogènes oblige à traiter l'eau avant consommation. Il existe une différence entre le traitement pour purifier l'eau avant consommation et le traitement pour purifier les eaux usées afin de restituer une eau de qualité acceptable à l'environnement.

En théorie, le traitement des eaux usées comprend trois traitements consécutifs :

- Traitement primaire, dont le but est d'éliminer la plupart des solides ;
- Traitement secondaire ou biologique, dont le but est de biodégrader les matières organiques par divers procédés impliquant des microorganismes ;
- Le troisième traitement va assurer l'élimination ultime des polluants et désinfecter l'eau.

4. Station d'épuration

La station d'épuration des eaux usées (STEP) est une installation destinée à épurer les eaux usées domestiques ou industrielles et les eaux de pluie avant leur rejet dans le milieu naturel. L'objectif du traitement est de séparer l'eau des substances indésirables présentes dans le milieu récepteur (Figure 5). Il peut utiliser plusieurs principes physiques, chimique et de biologique. Dans la plupart des cas, c'est le processus biologique qui est impliqué par l'usage des bactéries qui peuvent dégrader la matière organique. La station d'épuration est constituée d'une série d'équipements destinés à extraire les différents polluants contenus dans l'eau à différents stades. Les polluants laissés dans la station d'épuration sont transformés en boues (Figure 6). La continuité des équipements est calculée en fonction de la nature des eaux usées collectées sur le réseau et du type de pollution à traiter. La capacité d'une station d'épuration

est mesurée en équivalent habitants (E.H.). Cette unité représente la charge de pollution des eaux usées générées par habitant et par jour.

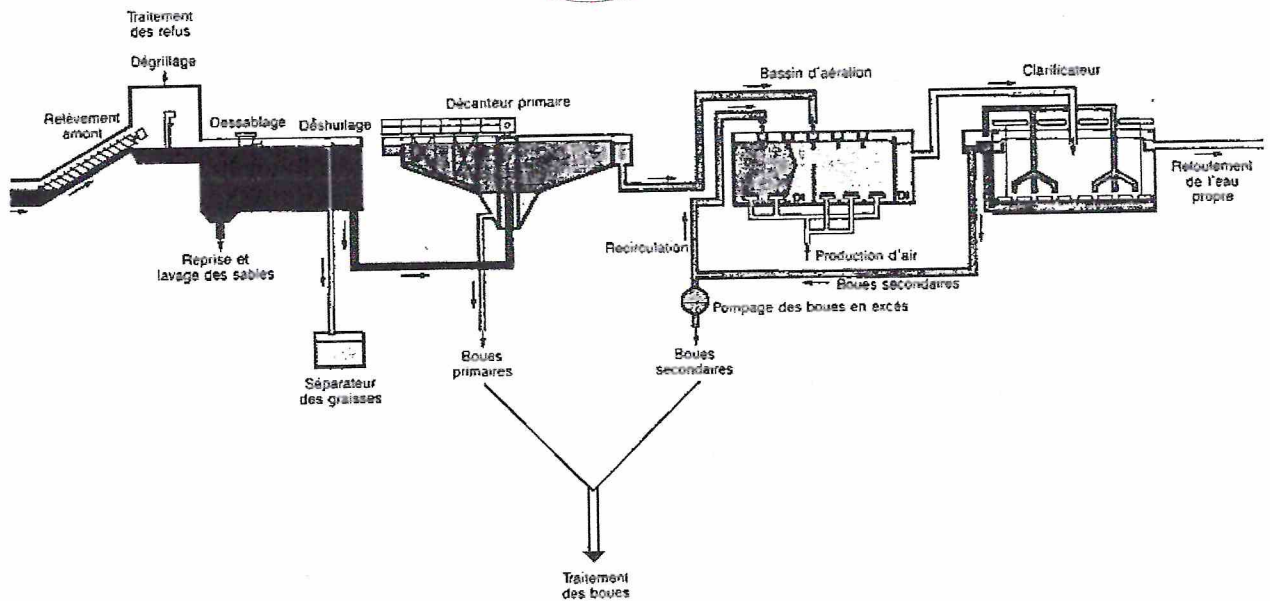


Figure 5 : Représentation schématique d'une station d'épuration des eaux usées (Altmeyer et al., 1990)

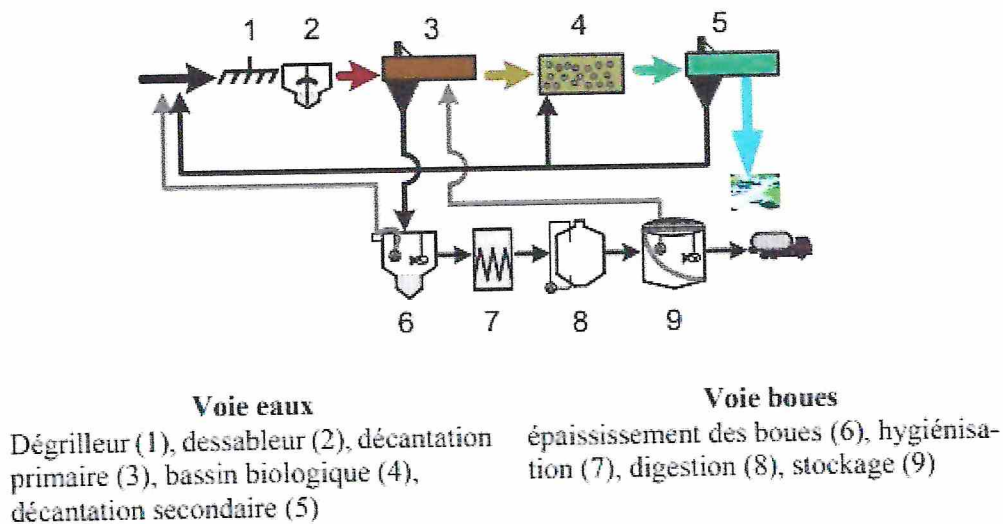
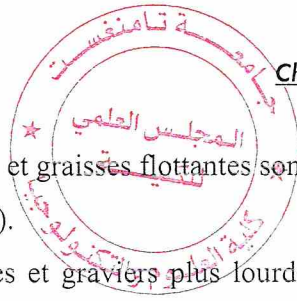


Figure 6 : Schéma simplifié d'une STEP (Plagellat, 2004)

4.1. Prétraitement

4.1.1. **Le dégrillage** : les eaux sales passent au travers de plusieurs grilles qui retiennent et enlèvent les plus gros déchets (coton-tige, morceaux de papier, de plastique, de bois...). Au terme de cette opération, les eaux sont toujours grises.



4.1.2. Le déshuilage : les huiles et graisses flottantes sont récupérées en surface (dans un ouvrage cylindro-conique).

4.1.3. Le dessablage : les sables et graviers plus lourds se déposent au fond de ce même ouvrage et puis sont envoyés à la décharge publique.

4.2. Traitement primaire : décantation des matières solides en suspension dans l'eau.

Dans certaines stations, les eaux peuvent reposer plus de deux heures dans un grand bassin appelé **décanteur primaire**.

Lentement, les eaux se débarrassent de leurs impuretés ; les fines particules en suspension se déposent dans le fond du bassin où elles sont raclées et évacuées. Cette masse de matière forme des boues. A ce stade, les eaux sont moins sales mais toujours chargées de pollution. Elles sont conduites vers d'autres bassins où s'effectue le traitement secondaire ou traitement biologique.

4.3. Traitement biologique

Parmi les technologies utilisées pour le traitement des eaux usées, l'efficacité des réacteurs à biofilm est reconnue. Ensuite, l'eau pénètre dans le bassin d'aération, également appelé bioréacteur. Par conséquent, le principe du traitement biologique repose sur la capacité des bactéries à dégrader les composés organiques nocifs dans l'eau. Une fois que ces bactéries aérobies sont stimulées par l'oxygène traversant l'étang, elles se nourrissent d'abord de pollution organique et continuent à purifier l'eau. Ces réacteurs sont généralement utilisés pour le traitement de l'eau afin d'éliminer la pollution due au carbone et à l'azote, aux hydrocarbures, aux pesticides ou aux composés médicinaux (Picard, 2011).

Les microorganismes purifiés sont des bactéries hétérotrophes, qui sont introduites sous forme libre en suspension (traitée avec des boues activées) ou sous forme fixe. Notant qu'il faut alimenter le réacteur en continu ou en semi-continu car les microorganismes se nourrissent de matière organique, et convertissant les polluants par adsorption ou absorption sur des floes bactériens, ou par conversion en cytoplasme, ou par oxydation en CO₂ et H₂O. La purification biologique peut être réalisée en aérobie ou anaérobie, mais la voie aérobie (processus plus rapide et plus complet) est couramment utilisée (Plagellat, 2004).

Dans le réacteur à membrane à biofilm utilisé dans les stations d'épuration des eaux usées, la membrane sépare deux phases, dont l'une est représentée par la formation d'eau ou de biofilm. C'est le cas de l'utilisation de bactéries méthanotrophes, qui peuvent être dégradées par le co-métabolisme des hydrocarbures aromatiques chlorés en présence d'oxygène et de méthane.



(Picard, 2011), ainsi que des bactéries hétérotrophes dénitrifiantes (Figure 7), qui réduisent le nitrite ou le nitrate en azote gazeux. Les eaux sont ensuite transférées dans le **bassin de décantation secondaire**. Les boues formées en éliminant la contamination bactérienne tombent au fond du bassin de sédimentation où elles sont concentrées. Les boues sont ensuite vidées et utilisées comme engrais agricole, sinon elles seront incinérées. Ils peuvent effectuer des traitements destinés à les sécher (pressage, essorage, etc.).

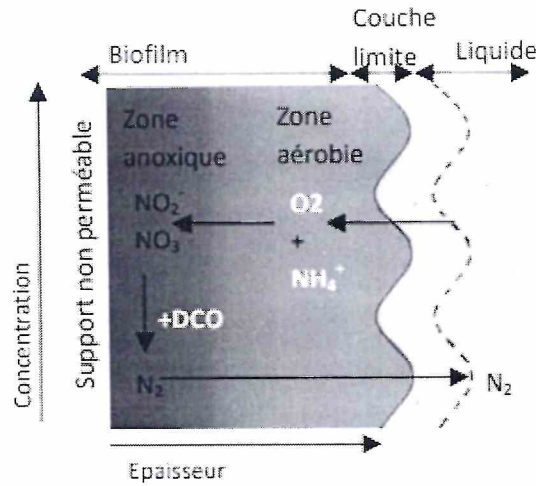
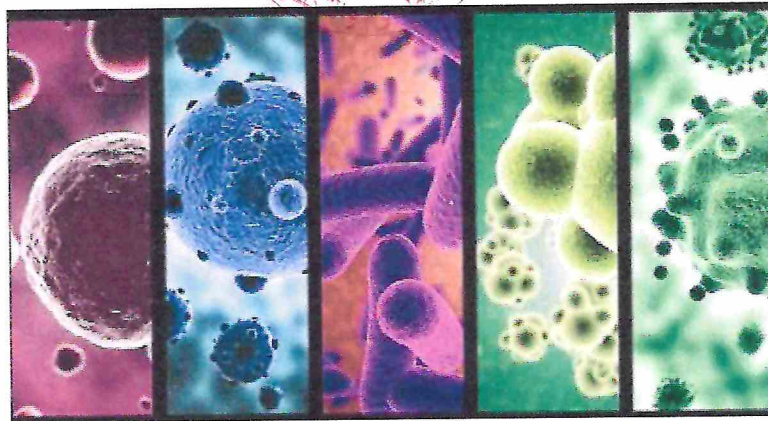


Figure 7 : Stratification en deux zones (aérobie et anoxique) sur l'épaisseur du biofilm pour une nitrification et une dénitrification simultanée (Picard, 2011)



CHAPITRE IV : DIVERSITE DES MICROORGANISMES ET DES METABOLISMES





CHAPITRE IV : DIVERSITE DES MICROORGANISMES ET DES METABOLISMES

1. Diversité des microorganismes

Il est désormais établi que les microorganismes dominent la biosphère. Ces derniers, peuvent prospérer dans les milieux extrêmes (froid, chaud, salé,...etc). Ainsi, grâce à leurs divers métabolismes, ils entretiennent entre autre les cycles biogéochimiques de la matière dans l'environnement (carbone, oxygène, azote, phosphore, soufre, etc) et y joueraient un rôle primordiale. On les retrouve partout où il y a la vie, aussi bien dans les environnements aquatiques, terrestres, souterrains ou aériens.

Dans un écosystème donné, les microorganismes constituent souvent les producteurs primaires, constituant le premier maillon de la chaîne alimentaire, ou encore jouer le rôle de décomposeurs, responsables de la minéralisation de la matière organique. Outre l'importance vitale des microorganismes dans la biosphère, ceux-ci ont parfois un impact majeur en bioprospection pour des applications dans des secteurs comme l'agro-alimentaire, l'agriculture, la pharmacologie, la cosmétologie et l'environnement.

1.1.Diversité taxonomique

La diversité taxonomique (diversité et distribution des taxons) des communautés microbiennes est étudiée séparément pour les 3 grands règnes : bactéries, champignons et archées (Lemmel, 2019, Figure 8).

La diversité microbienne n'est pas seulement la diversité du nombre d'espèces qui existent, mais aussi la diversité des caractéristiques des souches au sein d'une espèce, c'est-à-dire la diversité des sous-espèces (infra-spécifique). Cette dernière est visible à travers les diverses propriétés métaboliques, notamment lorsque l'on caractérise le génome lui-même : des techniques simples permettent de prouver cette diversité à une échelle très fine ; elles sont généralement issues de la PCR (Balandreau, 2000). Par conséquent, la diversité taxonomique des bactéries et des archées est obtenue par séquençage d'une partie du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), tandis que la diversité fongique peut être obtenue par l'ADNr 18S ou STI (espaceur transcrit interne ; c'est-à-dire une partie de la région située entre 18S) a été séquençé pour établir l'ADNr 5.8S et 28S (Bertrand *et al.*, 2011).

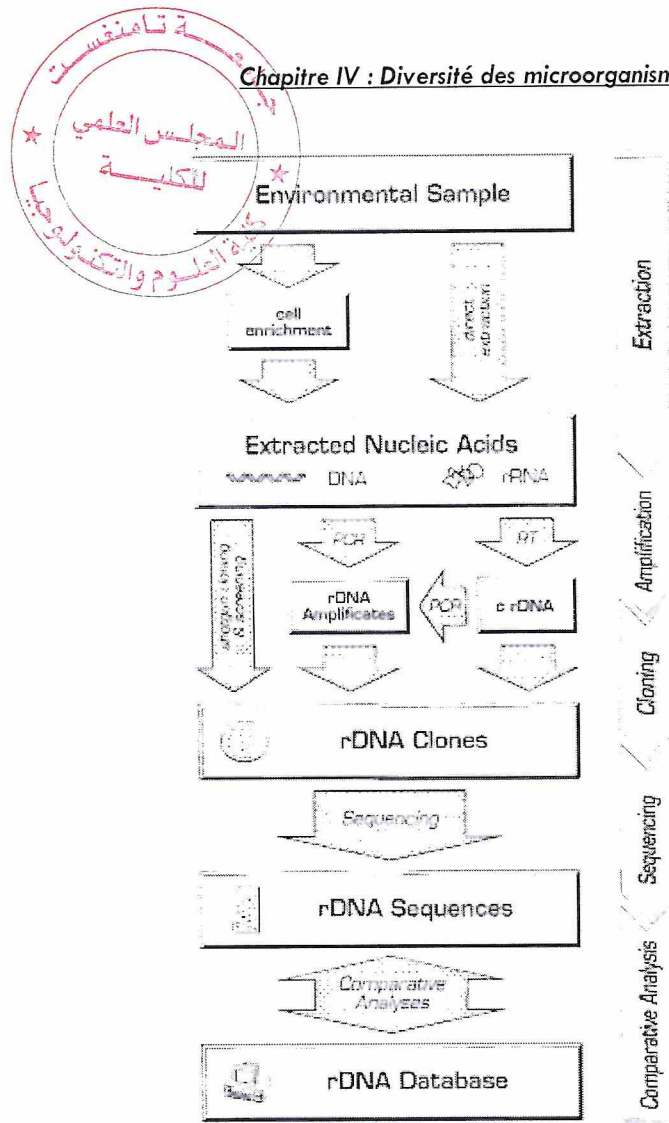


Figure 9 : Organigramme montrant les différentes possibilités de caractériser un échantillon environnemental par analyse comparative des séquences d'ARNr. RT, transcriptase inverse (Amann et al., 1995). Le clonage de l'ADNc transcrit à partir de l'ARNr 16S à l'aide de l'enzyme transcriptase inverse permet, comme dans le cas de la PCR, de récupérer sélectivement les informations utiles sur la séquence de l'ARNr.

1.3. Non-cultivabilité des microorganismes de l'environnement : obstacle à l'étude de la diversité microbienne

Il est quasi-difficile de cultiver la plupart des micro-organismes de l'environnement naturel (Tableau 2), en particulier les bactéries (Balandreau, 2000).

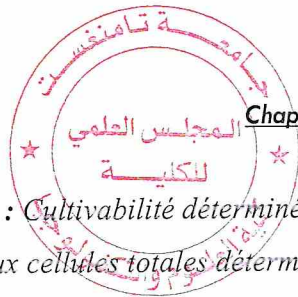


Tableau 2 : Cultivabilité déterminée comme le pourcentage des bactéries cultivables par rapport aux cellules totales déterminées par comptage direct. (Amann et al., 1995)

Habitat	Cultivabilité (%) ^a
Eau de mer	0,001-0,1
Eau douce	0,25
Lac mésotrophique	0,1-1
Eaux d'estuaires non polluées	0,1-3
Boues actives	1-15
Sédiments	0,25
Sol	0,3

^a Bactéries cultivables mesurées en tant qu'unités formant des colonies (UFC)

Ce pourcentage de cultivabilité très infime (tableau ci-dessus), peut être expliqué par les points suivants :

- Le support de croissance choisi ne peut pas être universel, et toutes les conditions environnementales ne peuvent pas être reproduites sur un même support, notamment pour les environnements à forts gradients physiques et chimiques. Certaines cellules en dehors de l'environnement peuvent entrer dans un état viable mais non cultivable. Cet état cellulaire correspond à l'adaptation aux conditions de stress, notamment nutritionnelles. Elle s'accompagne de modifications physiologiques et structurelles et ne peut être simplement restaurée sur des supports synthétiques.
- Cet état peut durer de quelques jours à plusieurs années. Des populations pauvres peuvent remplacer la plupart des populations qui ne sont pas bien adaptées au milieu de culture.
- Les populations riches en liquide peuvent ne pas se développer sur le milieu solide.
- La quantité d'inoculum choisie pour l'enrichissement influence le type de cellules enrichies. Des micro-organismes différents ayant des conditions de croissance similaires seront difficilement distinguables.

2. Diversité métabolique

Le métabolisme est un ensemble de réactions biochimiques qui se produisent dans les cellules. C'est un processus impliquant des processus de dégradation (catabolisme) et de synthèse organique (anabolisme).

On peut opposer les bactéries ayant un métabolisme fermentatif et celles ayant un métabolisme de type respiratoire (Figure 10).

1. Pour les bactéries à métabolisme fermentatif, la dégradation du glucose est incomplète et aboutit à la formation de divers composés organiques (acides organiques).
2. Pour les bactéries ayant un métabolisme de type respiratoire, la dégradation se fait par le cycle de Krebs. L'accepteur final d'électron est l'oxygène. Chez les bactéries le système de transport d'électrons est situé dans la membrane cytoplasmique.

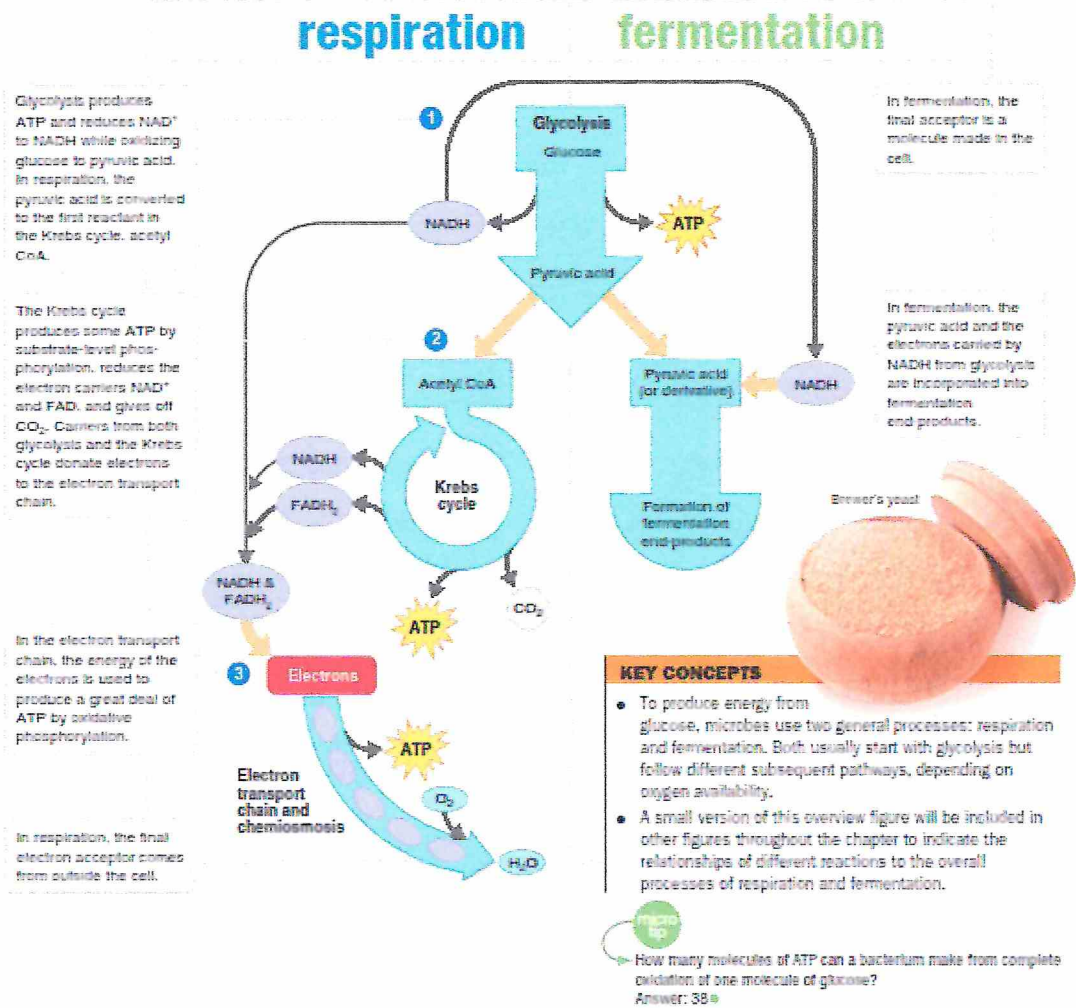
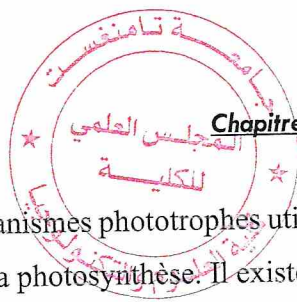


Figure 10 : Fiche explicative des étapes de la fermentation et la respiration

(<https://microbiologie-clinique.com/Physiologie-bact%C3%A9rienne2.html>)

Les microorganismes sont classés selon la manière dont ils se procurent de l'énergie et du carbone (Figure 11). Les deux voies de production d'énergie sont la phototrophie et la chimiotrophie.



- Les microorganismes phototrophes utilisent la lumière comme source d'énergie et sont donc capables de réaliser la photosynthèse. Il existe également des microorganismes photohétérotrophes qui utilisent des sources de carbone organique. En raison du phytochrome (chlorophylle) ou de la chlorophylle bactérienne, les microorganismes utilisent l'énergie lumineuse pour produire l'ATP (photosynthèse anoxygénique, les donneurs d'électrons sont des composés inorganiques autres que l' H_2O).

- Les microorganismes chimiotrophes utilisent une source d'énergie chimique. Nous distinguons les organismes chimiorganotrophes qui obtiennent de l'énergie par l'oxydation de composés organiques et les chimiolithotrophes qui tirent de leur énergie à partir oxydation de composés inorganiques réduits tels que le fer (Fe^{2+}), l'ammonium (NH_4^+), le dihydrogène (H_2) ou l'hydrogène sulfuré (H_2S). La chimiotrophie est le métabolisme le plus courant chez les microorganismes. Les chimiorganohétérotrophes utilisent généralement de l'oxygène (O_2) comme accepteur d'électrons terminal pour l'aérobie. Cependant, en l'absence d'oxygène, la croissance est possible par fermentation ou par l'utilisation d'un autre accepteur final d'électrons tels que la respiration nitrate (NO_3^- , NO_2^-).

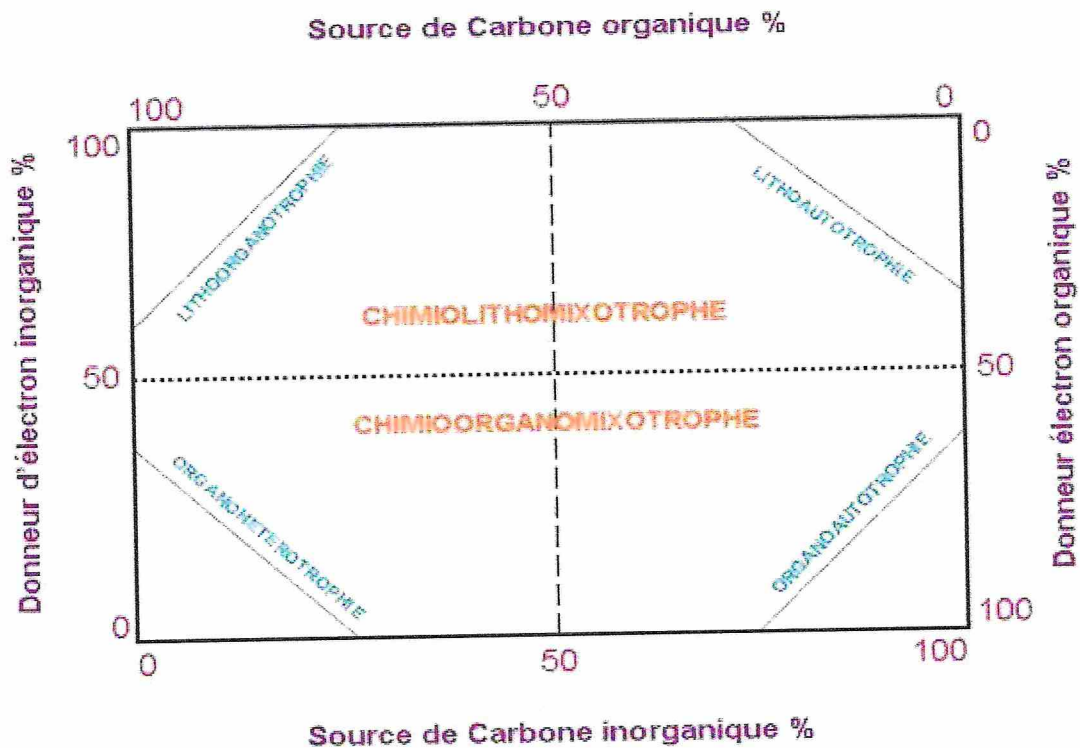


Figure 11 : Diversité des métabolismes chimiotrophes. La croissance des procaryotes en fonction des donneurs d'électrons organiques ou inorganiques est exprimée comme des pourcentages variables d'énergie totale et de carbone nécessaire (modifié par Byrne, 2008 d'après Karl, 1995).



Les microorganismes chimioorganohétérotrophes ont l'avantage d'utiliser une large gamme de composés organiques pour leur croissance contrairement à certains microorganismes ne peuvent utiliser qu'un ou deux composés organiques comme source d'énergie et de carbone (Smith and Hoare, 1977). Un autre avantage de ce métabolisme est que les organismes peuvent utiliser plus d'un substrat à la fois par diverses voies métaboliques. Certains procaryotes effectuent non seulement un métabolisme énergétique chimique des nutriments inorganiques, mais ont également la capacité d'effectuer un métabolisme chimique organique hétérotrophe et utilisent le dioxyde de carbone comme source de carbone (autotrophe). Nutrition chimique Les microorganismes de nutrition chimique utilisent des substances inorganiques comme sources d'énergie. Les organismes de nutrition chimique obligatoire doivent réduire les composés inorganiques en tant que sources d'énergie pour se développer. De nombreux micro-organismes nutritifs chimiques obligatoires peuvent utiliser le carbone inorganique (tel que le CO, le CO₂) comme seule source de carbone. De plus, à la place des composés inorganiques, d'autres procaryotes peuvent utiliser une variété de substances organiques. Les principaux donneurs d'électrons sont H₂, Fe²⁺, H₂S et S⁰.



**CHAPITRE V : PLACE DES MICROORGANISMES
DANS LES GRANDS CYCLES BIOGEOCHIMIQUES**





CHAPITRE V : PLACE DES MICROORGANISMES DANS LES GRANDS CYCLES BIOGEOCHIMIQUES

La structure des éléments biologiques ou de la matière biologique prête une attention particulière à l'interaction entre la géosphère, l'atmosphère et la biosphère (Figure 12). Il existe des éléments majeurs : C, H, O, N, S, P, K, Mg et Ca, et des oligo-éléments : Fe, Mn, Cu, Co, Ni, V, W, Zn, etc (Gobat *et al.*, 2010). Ces éléments sont sujets à des réactions d'oxydoréduction, y compris dans les systèmes biologiques, mais il ne reste pas seulement les réactions de précipitation et de solubilisation.

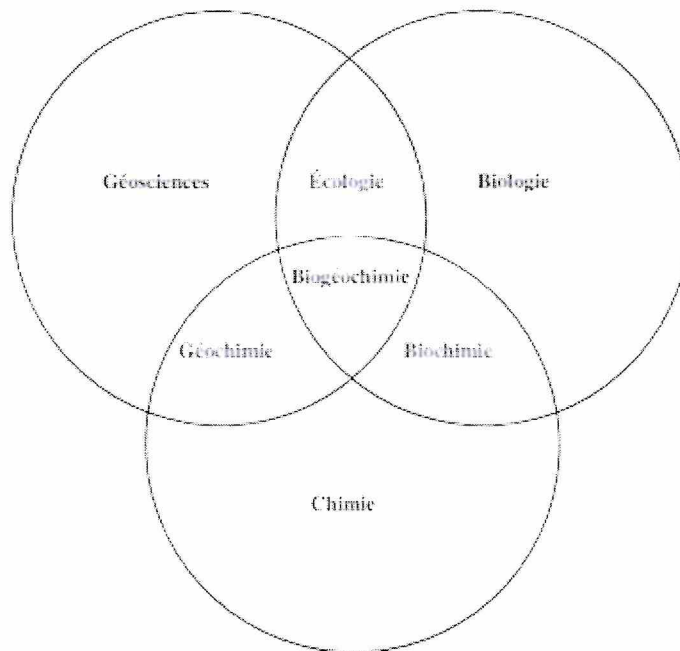
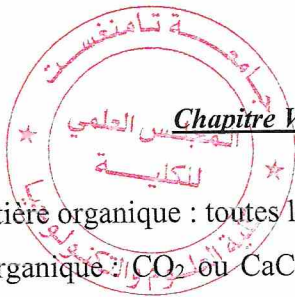


Figure 12 : place de la biogéochimie (Pédro, 2007).

1. Cycle du carbone

1.1. Formes du carbone

En termes d'abondance, le carbone est considéré comme le quatrième élément chimique après l'hydrogène, l'hélium et l'oxygène. En raison de l'activité volcanique, il existe principalement dans le manteau sous forme de roches sédimentaires carbonatées, principalement formées de carbonate et de calcium (calcite), et d'une petite quantité de carbonate mixte (dolomite) de calcium et de magnésium (Gobat *et al.*, 2010). C'est aussi l'élément de base de la matière vivante, et il a deux formes :



Chapitre V : Place des microorganismes dans les grands cycles biogéochimiques

- Matière organique : toutes les molécules qui composent les organismes vivants.
- Inorganique: CO_2 ou CaCO_2 dans l'atmosphère, la plupart du CO_2 et CH_4 produits par la respiration et la fermentation.

La photosynthèse est le principal flux d'entrée de C (réservoir de CO_2 dans l'atmosphère) et la respiration représente le mécanisme de reflux, ces deux réactions chimiques sont donc à la base du recyclage de C. D'autre part, le but de la fermentation est "d'utiliser du carbone non atmosphérique". Il faut également noter que le flux de carbone industriel généré par l'utilisation de l'énergie fossile est bien supérieur au flux naturel.

1.2.Etapes du cycle

Le cycle du carbone comprend trois étapes : la fixation, la minéralisation et la rétention (Figure 13). 1. La fixation est une étape synthétique qui combine le carbone dans le dioxyde de carbone en molécules organiques. 2. Au contraire, dans le processus de fixation, la minéralisation est l'étape où le carbone contenu dans le composé organique retourne dans l'environnement sous forme de minéral. 3. Le nouveau cycle recommence, sauf qu'une partie du carbone libéré passe par l'étape de rétention. Le carbone est piégé dans des composés insolubles et est difficile à dégrader ou temporairement difficile à dégrader.

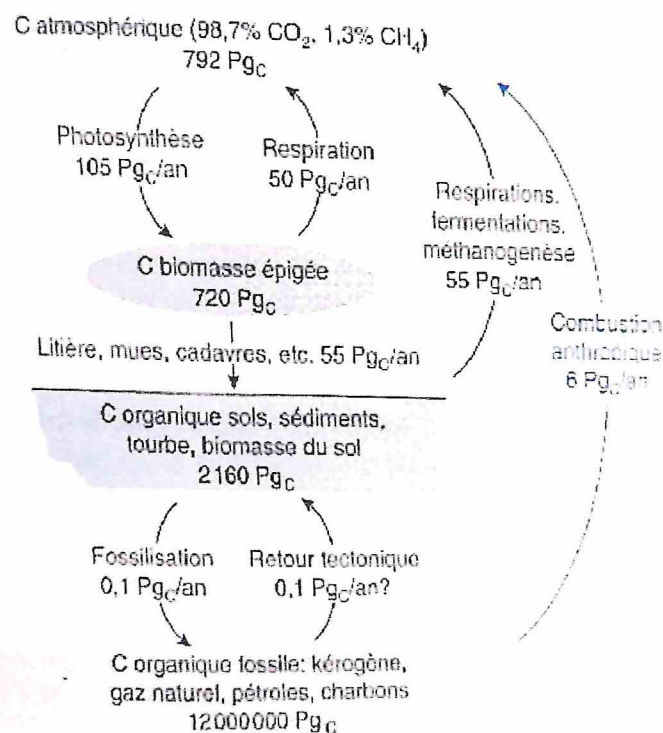


Figure 13 : Cycle global du carbone organique terrestre (Gobat et al., 2010)



1.3. Réservoirs du carbone

Dans le sol, la durée de stockage du carbone (matière organique) peut varier de quelques minutes à des centaines voire des milliers d'années. Le temps de séjour dépend de la stabilité de la matière organique et de la compétition entre le processus de dégradation. Cependant, la principale source d'enrichissement en carbone organique est l'apport de déchets et de portegreffe. L'exsudat est composé de plusieurs sources de carbone, qui induisent une augmentation de l'abondance et de l'activité des microorganismes (on dit effet rhizosphère). La compétition nutritionnelle entre les deux microorganismes dépend de leur dégradation des composés exsudés (Lemmel, 2019). En fait, la fonction de dégradation de la plupart des composés de bas poids moléculaire (en particulier les monosaccharides) semble être omniprésente dans la communauté microbienne (Macura and Kubátová, 1973). De plus, selon les recherches de Jones et al. (2003), les communautés microbiennes utilisent principalement le sucre et les acides aminés pour favoriser la croissance (assimilation), tandis que les acides organiques sont principalement utilisés pour la respiration (minéralisation).

1.4. Rôle des microorganismes

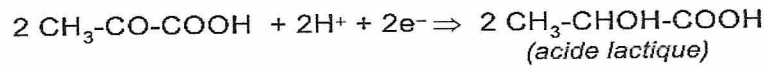
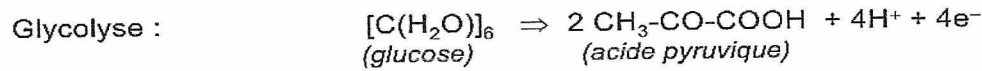
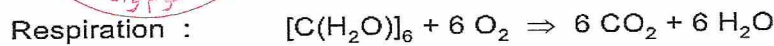
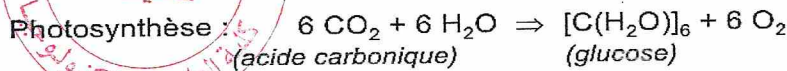
Les processus biologiques constituent l'ensemble des réactions microbiennes, conduisant à la dégradation des HAP et à la production de métabolites secondaires, voire à la minéralisation complète des HAP en carbone minéral (CO_2) (Cerniglia, 1992). Ces processus déterminent principalement le devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le sol. La dégradation peut être réalisée selon deux types de métabolisme : i) le métabolisme microbien (ou assimilation microbienne), en utilisant les HAP comme source de carbone ou d'énergie pour synthétiser la biomasse. ii) Co-métabolisme, qui correspond à la dégradation des HAP sans bénéfices nutritionnels et énergétiques pour les organismes apparentés, mais peut détoxifier le milieu de culture (Lemmel, 2019).

Dans des conditions hypoxiques (anoxiques), le méthane représente l'essentiel du carbone utilisé par les bactéries méthanogènes. Il sera minéralisé sous forme de méthane, mais l'effet de la méthanisation est différent. Ces bactéries favorisent efficacement la propagation du méthane dans l'atmosphère, réduisant ainsi l'effet de serre. Selon l'assimilation du carbone, deux groupes de micro-organismes sont considérés :

- Aérobies : décomposent les matières organiques en dégageant le CO_2 (respiration)
- Anaérobies : décomposent les matières organiques produisant le CO_2 et CH_4



Chapitre V : Place des microorganismes dans les grands cycles biogéochimiques



Réaction acido-basique :

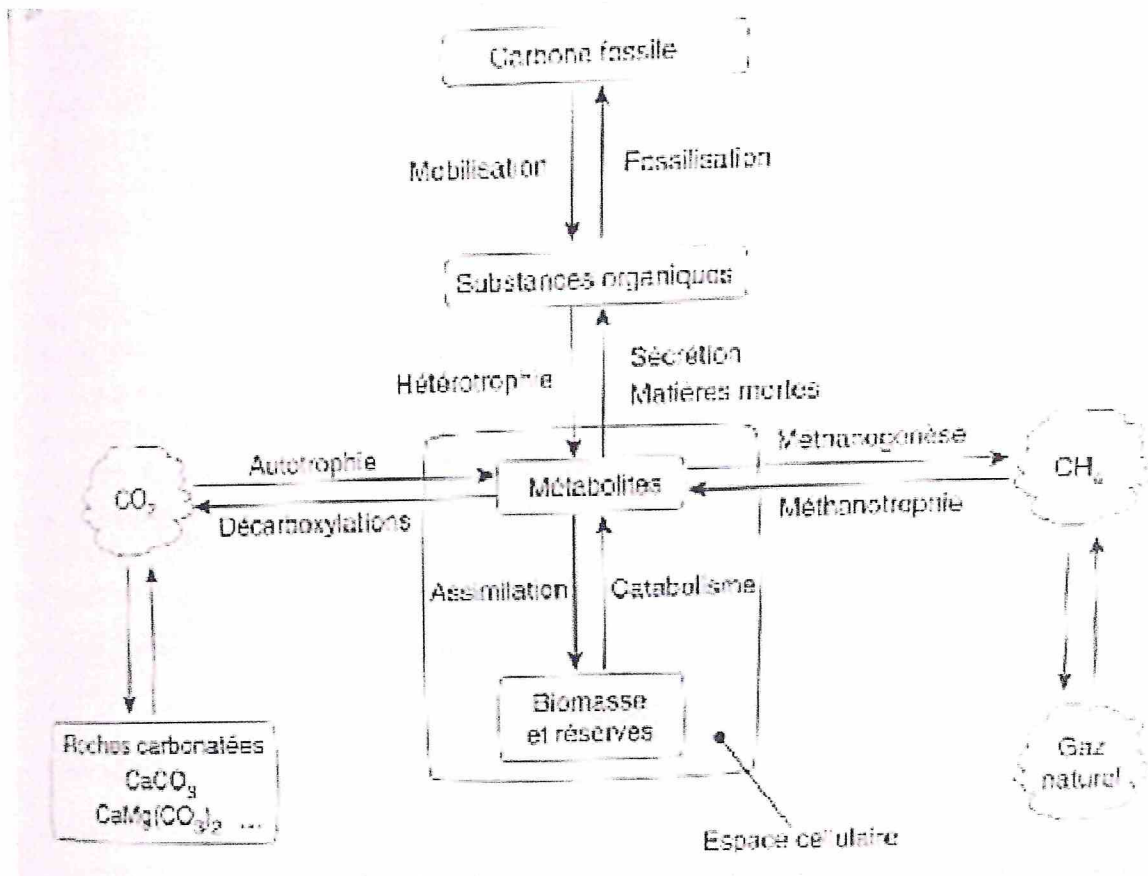
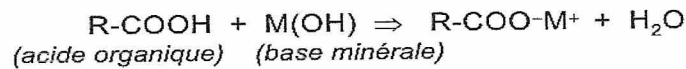


Figure 14 : Cycle biologique du carbone (Gobat et al., 2010)

A retenir :

- Le dioxyde de carbone dans l'atmosphère est principalement fixé par des organismes photosynthétiques autotrophes (tels que des micro-organismes synthétisés chimiquement) ;



- L'acte de mélanger des cellules microbiennes et des résidus végétaux dans le sol pour former de la matière organique ;
- Les micro-organismes décomposent le carbone organique en libérant une partie de la forme de CO₂, par exemple : *Altermonas sp* ;

2. Cycle de l'oxygène

Sur le plan de la biosphère, la majorité des organismes utilisent l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons final pendant la respiration, et ils sont produits en parallèle par la photosynthèse. Dans le sol, les réactions d'oxydoréduction aérobie dépendent fortement de la présence d'oxygène.

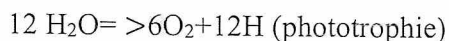
2.1. Formes

Dans l'environnement, l'oxygène échange directement avec la biosphère et est distribué dans cinq réservoirs (O₂ moléculaire, O₂ de l'eau, l'O₂ du gaz carbonique, l'O₂ des minéraux, carbonates et l'O₂ de la biomasse)

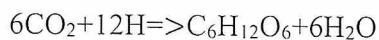
2.2. Etapes

L'oxygène est très impliqué dans une grande variété de réactions biologiques et redox, cependant, deux métabolismes principaux contrôlent les flux entre les réservoirs (Gobat *et al.*, 2010) ; à savoir :

- **La photosynthèse oxygénique** : ce type de métabolisme est caractéristique dans la majeure partie par les végétaux mais pas seulement, les bactéries photosynthétiques (ex : *Chlorobium*) et les cyanobactéries (ex : *Pleurocapsa*)



L'hydrogène produit va servir à fixer le CO₂ (autotrophie)



On constate donc à partir de ces deux réactions que l'oxygène dégagé par la phototrophie est issu de l'eau tandis que celui du CO₂ se retrouve en moitié dans la biomasse et l'eau à part égale

- **La respiration organotrophe aérobie** : pratiquement tous les eucaryotes et une fraction importante des procaryotes réalisent cette respiration. Elle inclut les réactions inverses de la photosynthèse oxygénique ce qui maintient une certaine stabilité de la concentration de l'oxygène dans l'atmosphère :

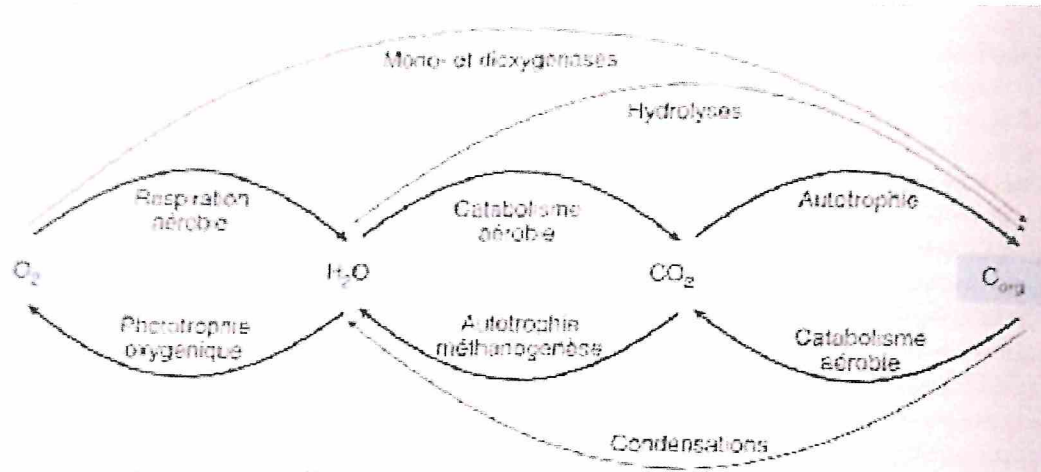
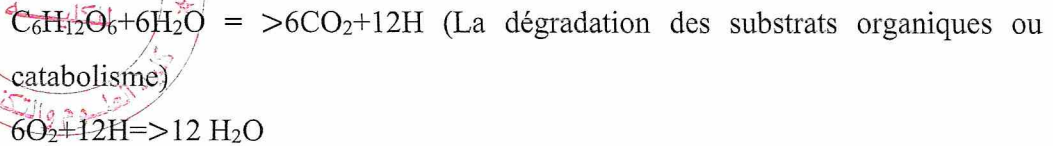
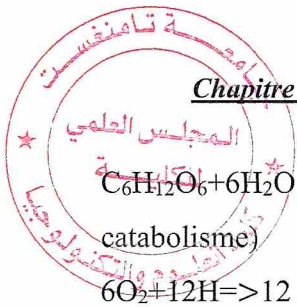


Figure 15 : Tricycle biologique de l’oxygène (trois principaux cycle et réactions accessoires) (Gobat et al., 2010)

3. Cycle de l’azote

L’azote est un composant omniprésent dans les molécules biologiques (protéines, acides nucléiques, vitamines, etc.) et est un composant essentiel pour la croissance et le développement de tous les êtres vivants. En termes de quantité, N est le 34^e élément du globe, il est donc considéré comme «rare». 98% de celui-ci se trouve dans les roches, il se propage par les émissions volcaniques, et les relais sont principalement captés par le monde microbien. Cependant, N est chimiquement très stable et nécessite une grande quantité d’énergie d’activation pour le faire réagir avec d’autres éléments (N réactif). Par exemple, dans l’atmosphère, le rayonnement solaire ou la foudre oxyderont l’azote N (phénomène de pluies acides).

3.1. Formes

D’autre part, Le N représente le 3^{ème} élément de biomasse après C et O chez les êtres vivants, tandis que le N organique est issu essentiellement de la biomasse morte. Le N inorganique est représenté par les ions : NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , dont une fraction importante se trouve dans l’hydrosphère car très solubles.

Les ions de N dépendent de la présence de l’oxygène, par exemple :

- En milieu oxygène (présence d’oxygène), les nitrites se transforment en nitrates
- En milieu inoxygène (absence d’oxygène), les nitrites se transforment en ammonium



3.2. Fonctions

La fixation, la nitrification, la dénitrification, l'assimilation et l'ammonification sont les cinq étapes du cycle de l'azote.

1. La fixation correspond à la transformation de l'azote atmosphérique en ammoniac puis en ions ammonium. Ce processus peut être d'ordre biologique ou industriel.
 - La fixation biologique au niveau de la lithosphère peut se faire grâce aux bactéries symbiotiques avec les racines des légumineuses (ex : *Rhizobium*) tandis que dans le milieu aquatique c'est les cyanobactéries qui prennent le relais (ex : *Trichodesmium*)
 - La fixation industrielle est surtout représentée par la fabrication de produits à base d'azotes tels que les engrais chimiques
2. L'ammonium est ensuite converti en nitrites puis en nitrates au cours de la nitrification ces deux premières étapes ne sont réalisées que par quelques rares espèces bactériennes.

Les nitrates produits peuvent :

- Subir une dénitrification et retourner dans l'atmosphère ;
- Être assimilés et servir à la synthèse de composés organiques azotés;
- Être décomposés lors de l'ammonification et de la dénitrification avant d'entreprendre un nouveau cycle.

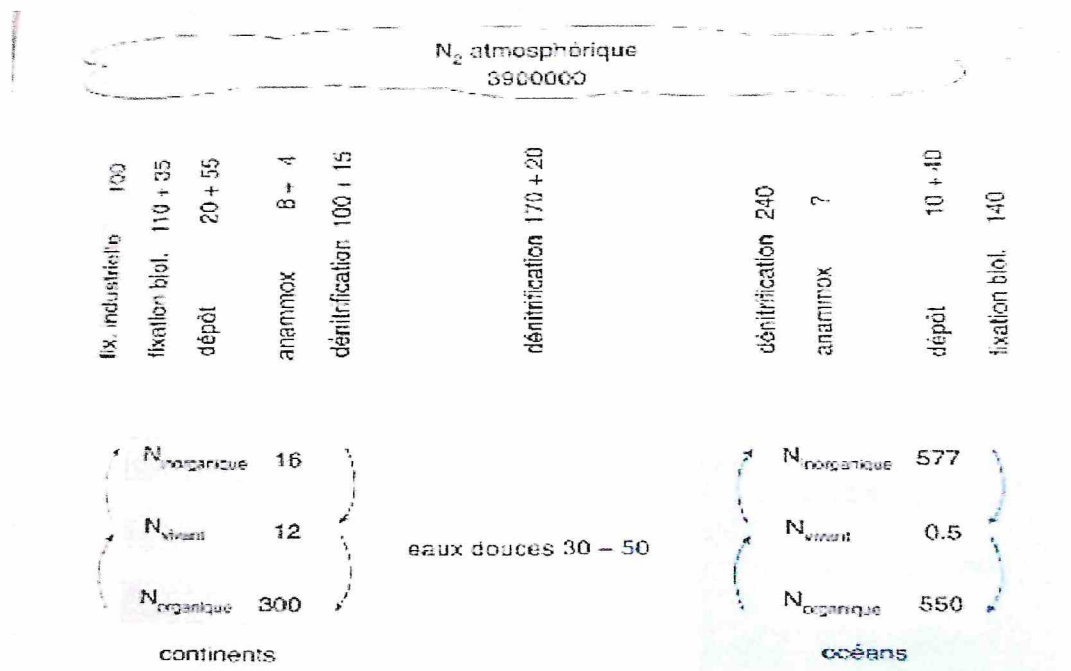


Figure 16 : Cycle global de l'azote (Gobat et al., 2010)

3.3. Etapes du cycle

Le cycle de l'azote se base essentiellement sur six étapes (Figure 17) :

Fixation : transformation de l'azote moléculaire de l'air en ammoniac et en ions ammonium

Nitrification : transformation de l'ammonium en nitrites puis en nitrates

Dénitrification : transformation des nitrates en azote moléculaire

Assimilation/Minéralisation : incorporation de l'azote des nitrates dans les acides aminés et les autres composés organiques azotés (nutrition minérale azotée)

Ammonification : transformation de l'azote organique en azote ammoniacal par les microorganismes hétérotrophes

Nitro-ammonification : transformation des nitrites en ammonium

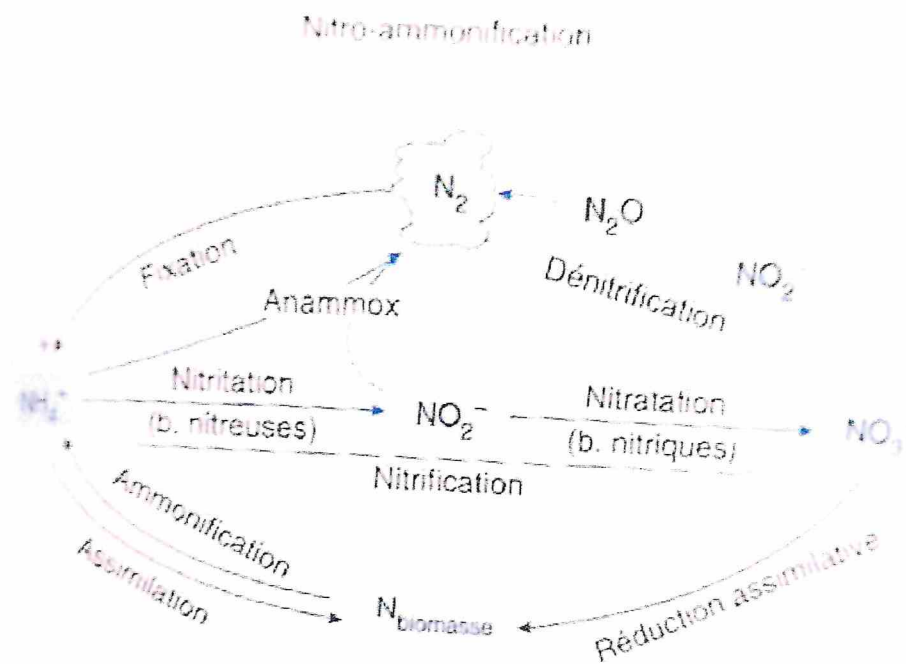


Figure 17 : Cycle biologique de l'azote (Gobat et al., 2010)

Le cycle d'oxydoréduction de l'azote inclue les réactions suivantes :

- Nitrification (oxydation) : NH_3^+ en NO_3^- , cette réaction inclut deux étapes :
Nitrification (NH_3^+ en NO_2^-) ex : *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*
Nitrataion (NO_2^- en NO_3^-) ex : *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*
- Nitro-ammonification (réduction) : NO_2^- en NH_3^+



- Nitro-fermentation (1 : oxydation bactéries aérobies, 2 : réduction bactéries anaérobies) : $\text{NH}_3^+ + 2\text{O}_2 = \text{NO}_3^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$, ce phénomène représente la respiration anaérobie
- Dénitrification (réduction) : elle est considérée comme une roue de secours en cas de carence en O_2 .

espèce	degré d'oxydation	nom de l'ion ou molécule
NO_3^-	+5	nitrate
NO_2^-	+3	nitrite
NO	+2	oxyde nitrique
N_2O	+1	oxyde nitreux
N_2	0	diazote
$\text{NH}_3 (\text{NH}_4^+)$	-3	ammoniac / ammonium

Figure 18 : Les différentes formes de l'azote le degré d'oxydation

3.4.Pompe de l'azote

Le principe de la pompe à azote lui permet de traverser les continents, les niveaux des eaux souterraines et les océans (Gobat *et al.*, 2010).

1. Au niveau continental (sol : milieu aérobie), la matière organique est convertie en ammoniac par ammonification, puis convertie en nitrate par nitrification
2. Au niveau souterrain et des océans, les nitrates dissous en excès seront converti en azote moléculaire par dénitrification, sinon il sera absorbé et incorporé à de la matière organique.

3.5.Les microorganismes fixateurs d'azote

Il y a une grande quantité d'azote dans l'atmosphère sous forme de minéraux. Cependant, la capacité de fixer l'azote atmosphérique par le complexe enzymatique nitrogénase est limitée à quelques bactéries (Figure 19).

Les légumineuses peuvent établir des interactions symbiotiques avec des rhizobactéries appelées *Rhizobia*. Cette interaction implique deux processus strictement contrôlés par les plantes : l'infection bactérienne et la formation de nouveaux organes : les nodules, dans lesquelles l'azote atmosphérique est réduit. Fait intéressant, seules des bactéries différenciées (bactéroïdes) peuvent fixer l'azote. En culture libre, les bactéries n'expriment pas de nitrogénase (Kneip *et al.*, 2007). Parmi tous les systèmes de liaison du N_2 atmosphérique, la relation symbiotique est la plus importante. Ces facteurs conduisent à une réduction de 120 millions de tonnes d'azote dans l'atmosphère chaque année (Freiberg *et al.*, 1997).



Tableau 3 : Flux d'azote dans la biosphère (Ramade, 1974)

Apports d'azote de l'hydrosphère aux sols	Quantité en 10^6 t/an	en $g\ an^{-1}\ m^{-2}$
Fixation biologique		
Fixation par les microorganismes terrestres	14	0.03
Fixation par les algues bleues et les bactéries nitrifiantes marines	10	0.02
Lessivage des sédiments nitrés	30	0.06
Fixation atmosphérique	7,6	0.015
Volcanisme	<u>0,2</u>	
	62	0.12
Pertes d'azote		
Dénitrification terrestre	43	
Dénitrification marine	40	
Sédimentation	<u>0,2</u>	
Total	83	

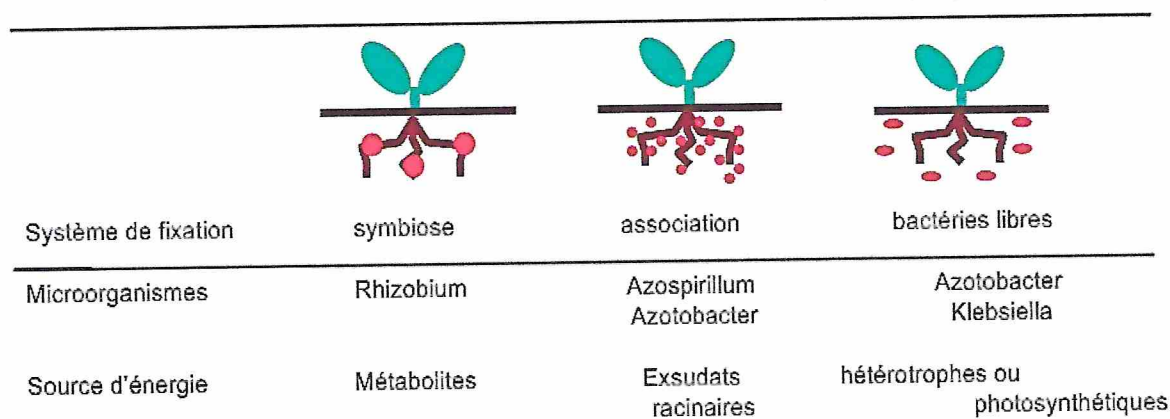


Figure 19 : Représentation schématique des microorganismes fixateurs d'azote

4. Cycle du soufre

Le soufre est considéré comme un élément constitutif de la matière vivante et un élément redox tout comme l'oxygène, l'azote et le fer (Gobat *et al.*, 2010).

4.1. Formes

Au niveau de la biosphère, l'échange de soufre provient principalement de deux gisements minéraux :

1. Sulfure métallique tel que : pyrite (FeS_2) qui subira par la suite une oxydation
2. Sulfate des évaporites tel que : gypse ($CaSO_4$) qui subira par la suite une réduction

En biologie, le soufre existe dans deux acides aminés : la méthionine et la cystéine, ainsi que la vitamine B (thiamine).



Au niveau du sol, les microorganismes transforment le soufre en diverses formes solubles et gazeuses, dont la plus importante est SO_4^{2-} : forme sulfate dominante dans les sols bien drainés. C'est la forme disponible pour les plantes (ions sulfates). Elle est également facilement lessivable comme le nitrate.

4.2. Etapes du cycle

Quatre étapes principales résument le cycle du soufre (Figure 20) :

1. Sulfato-réduction : cette étape nécessite une source minérale de soufre oxydé pour ainsi être réduit en sulfure d'hydrogène (H_2S), pyrrhotine (FeS) ou pyrrite (FeS_2)
2. Sulfoxydation : c'est l'étape inverse de la précédente qui va reproduire le sulfate (SO_4)
3. Précipitation du gypse : le soufre n'est pas impliqué dans une réaction redox, il s'agit d'une dissolution du sulfate à partir du gypse (CaSO_4).
4. Réduction assimilative : la plante assimile le sulfate pour sa nutrition et le monde microbien l'utilise comme accepteur final d'électron dans le processus respiratoire

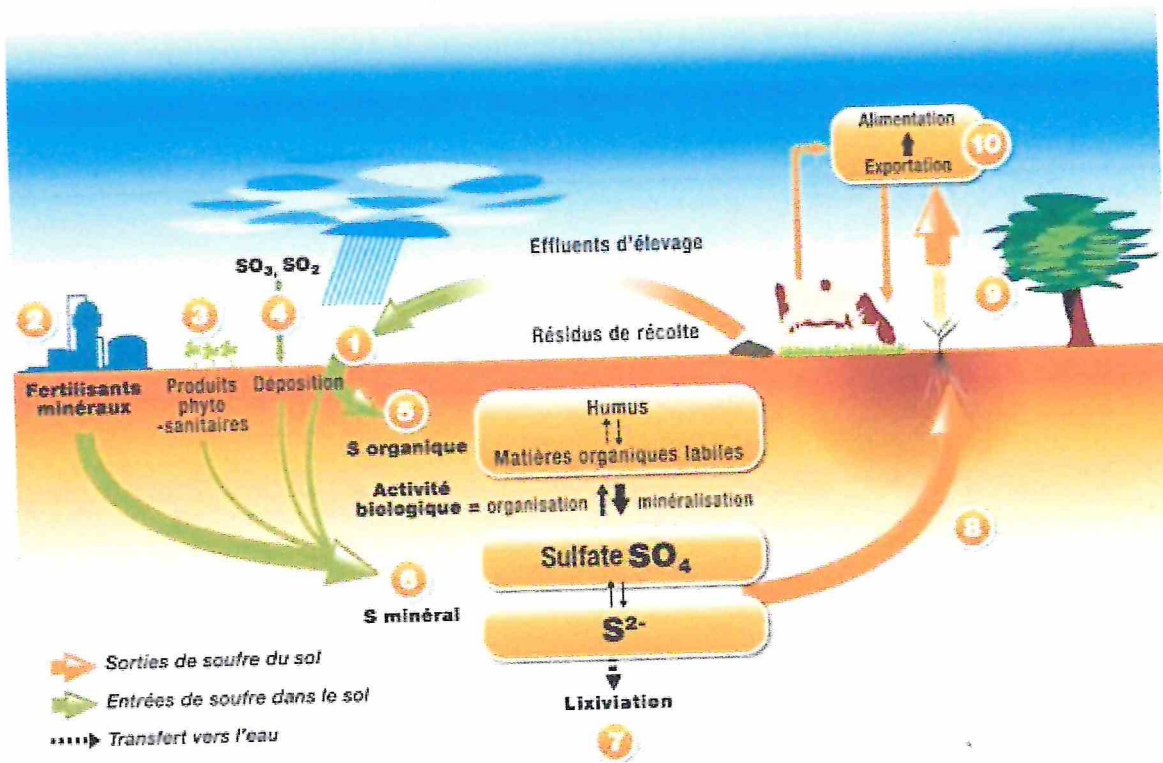


Figure 20 : Cycle du soufre (<https://fertilisation-edu.fr/cycles-bio-geo-chimiques/le-cycle-du-soufre-s.html>)



4.3. Bactéries sulfato-réductrices (BSR)

Le soufre est l'accepteur d'électrons des bactéries sulfato-réductrices à travers le cycle redox (du SO_4 au SO_2), comme *Desulfovibrio*. Notez que contrairement aux bactéries dénitrifiantes, la BSR n'est pas nécessairement anaérobie. Les bactéries réductrices de sulfates effectuent un processus de respiration spécifique, conduisant à l'accumulation d'une grande quantité de sulfure d'hydrogène (Gall, 1975)

5. Cycle du phosphore

Le phosphore est un élément mineur de la croûte terrestre mais majeur de la biomasse, il participe à la composition de multiples composants, tels que les acides nucléiques, les cofacteurs (NADPH) et les lipides. Le phosphore est l'élément le plus important de la nutrition des plantes après l'azote. C'est une partie importante de tous les processus métaboliques majeurs des plantes, tels que le transfert d'énergie, la photosynthèse, la transduction du signal et la respiration (Khan *et al.*, 2010).

6.1. Formes du phosphore

Le phosphore inorganique se trouve dans le sol, principalement dans des complexes minéraux insolubles, tels que le phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), le phosphate de fer (FePO_4) et le phosphate d'aluminium (AlPO_4) (Khan *et al.*, 2014) qui peuvent apparaître après application répétée d'engrais chimiques. Les plantes n'ont pas la capacité d'absorber ces formes insolubles, de plus, seulement 0,1% du phosphore total se trouve sous forme soluble (Chen *et al.*, 2006), il peut donc être utilisé pour la nutrition des plantes. Par conséquent, dans la plupart des sols agricoles, le niveau effectif de phosphore doit être complété par l'ajout d'engrais phosphatés chimiques. L'application fréquente et imprudente d'engrais phosphatés chimiques peut interférer avec les populations microbiennes, entraînant une baisse de la fertilité des sols, réduisant ainsi les rendements des cultures (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

6.2. Etapes du cycle

La disponibilité du phosphore dépend de l'altération de la roche phosphatée (Figure 21), et donc le cycle du phosphore est considéré comme un cycle « lent » (Gobat *et al.*, 2010).

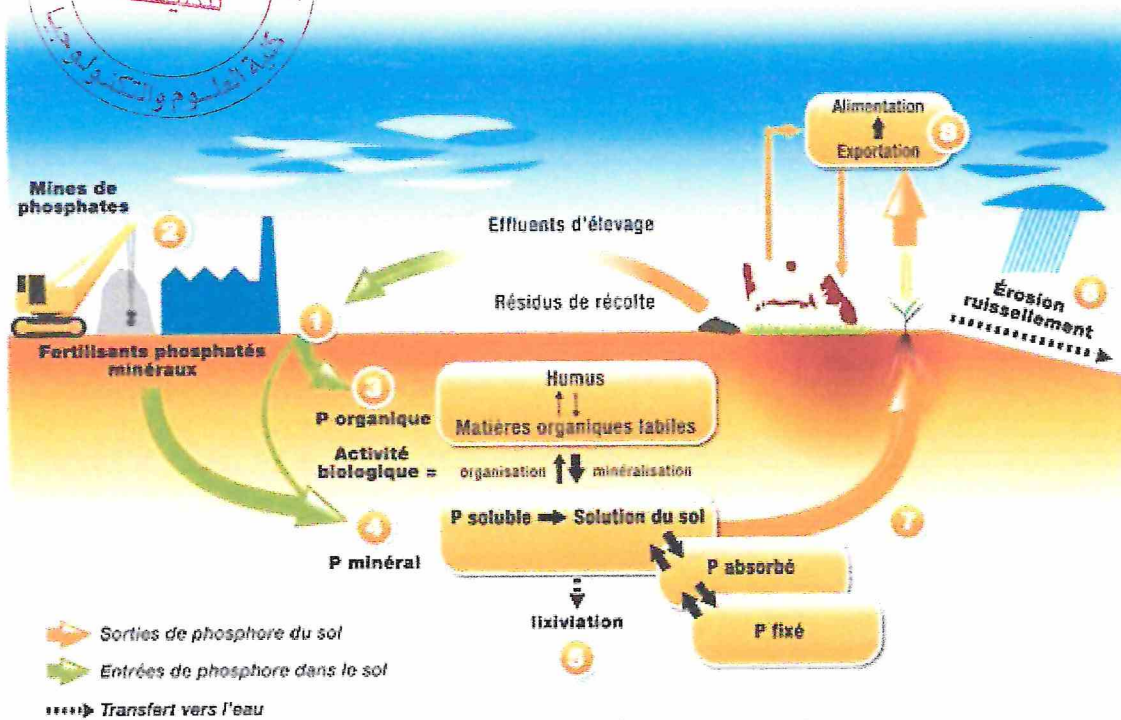


Figure 21 : Cycle du phosphore (<https://fertilisation-edu.fr/cycles-bio-geo-chimiques/le-cycle-du-phosphore-s.html>)

6.3. Phyto-disponibilité du phosphore

Seulement 1% du phosphore total est fourni aux plantes sous forme d'ions orthophosphate (HPO_4^- , H_2PO_4^-). Sa forme dépend du pH du milieu, en pH acide : il s'associe au fer, à l'aluminium et au manganèse, et en pH alcalin : sel de calcium. Afin de rendre les plantes utilisables, c'est-à-dire utilisables, le monde microbien s'est emparé des plantes (Figure 22).

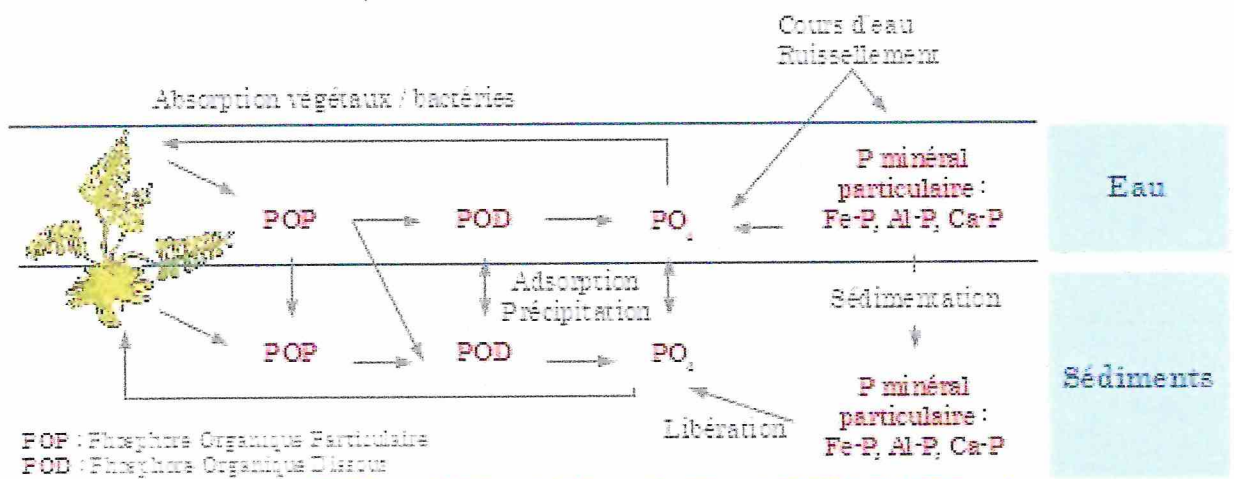
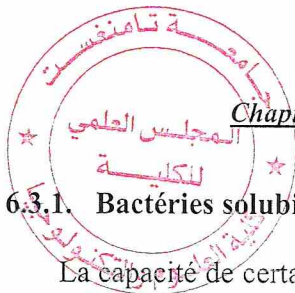


Figure 22 : Cycle du phosphore dans une zone humide (Fardeau, 2000)



6.3.1. Bactéries solubilisants le phosphate (BSP)

La capacité de certaines bactéries à convertir le phosphate insoluble en phosphate soluble (biodisponible pour le végétal) est la meilleure méthode de traitement biologique et une alternative écologique aux engrais phosphatés chimiques, qui peuvent améliorer la fertilité des sols et favoriser la croissance des plantes (Vessey, 2003; Rodriguez *et al.*, 2006; Zaidi *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014) par des processus de solubilisation et de minéralisation (Behera *et al.*, 2017). De nombreuses recherches se sont concentrées sur les bactéries solubilisant les phosphates (BSP), qui colonisent la rhizosphère de nombreuses espèces végétales et ont prouvé ses effets bénéfiques sur la croissance, le rendement et la productivité des plantes, et son rôle dans la réduction de l'utilisation industrielle ou chimique (Pande *et al.*, 2017). Ces BSP peuvent favoriser la croissance des plantes grâce à différents mécanismes, tels que la libération d'ions H^+ , la production d'acides organiques et de substances chélatantes. Par conséquent, les micro-organismes peuvent produire des acides organiques de faible poids moléculaire comme principal mécanisme de solubilisation du phosphate (Khan *et al.*, 2014 ; Pande *et al.*, 2017). Les plantes absorbent principalement les ions phosphate sous forme de $H_2PO_4^-$ et HPO_4^{2-} . Ensuite, plusieurs études ont lié la diminution du pH moyen (acidification) à l'activité solubilisante du phosphate (Khan *et al.*, 2010 ; Vyas and Gulati, 2009), qui est due à la libération de P du minéral P par substitution H^+ causé par des ions. Dans le cas du TCP, il s'agit du Ca_2^+ (Goldstein, 1994 ; Mullen, 2005; Trivedi and Sa, 2008). En revanche, Lin et al (2006) supposent que la modification du pH et le potentiel de réduction qui en résulte sont responsables de la dissolution du TCP dans le milieu.

6.3.2. Mycorhize

Les plantes vasculaires terrestres peuvent établir des relations symbiotiques avec de nombreux micro-organismes. En termes de racines, les plantes peuvent se combiner avec des champignons mycorhiziens pour former des mycorhizas. Les trois principaux types d'association mycorhizienne sont : l'ectomycorhize, l'endomycorhize et l'ectomycorhize (Figure 23). Les enzymes symbiotiques mycorhiziennes favorisent de manière significative la nutrition des plantes, en particulier l'absorption du phosphore (Smith and Read, 2008 ; Smith *et al.*, 2011). Afin de pénétrer dans le pool de phosphore du sol auquel les plantes n'ont pas accès, le CMA pourra hydrolyser le phosphore organique de la manière suivante (Figure 24) : le phosphore inorganique lui permet d'être absorbé par les plantes dans le sol ou directement transféré à l'hôte (Feng *et al.*, 2002) pour échanger des glucides végétaux, et par l'interface mycorhizienne la transfère à CMA (Pamiske, 2008 ; Bucking and Shachar-Hill, 2005).

Figure 24 : plante mycorhizée typique présentant des hyphes extraradicales d'AMF, les filaments fongiques mycorhiziens dans le sol agissent comme des extensions du système racinaire (Roy-Balduc & Hyjn, 2011)

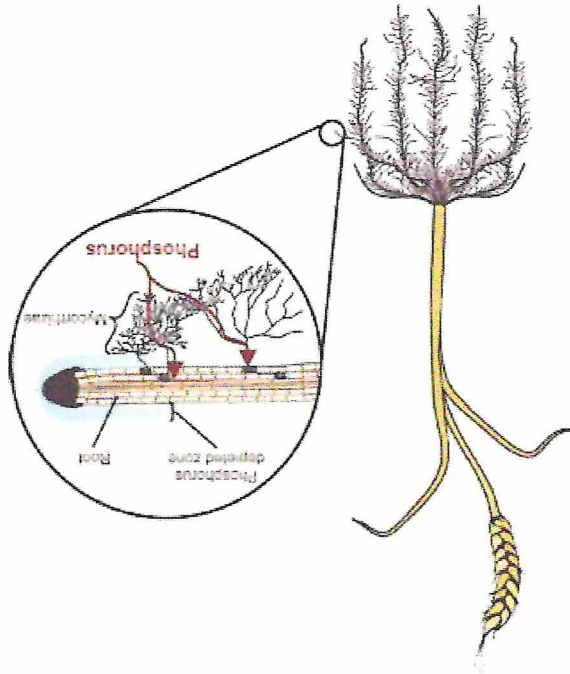
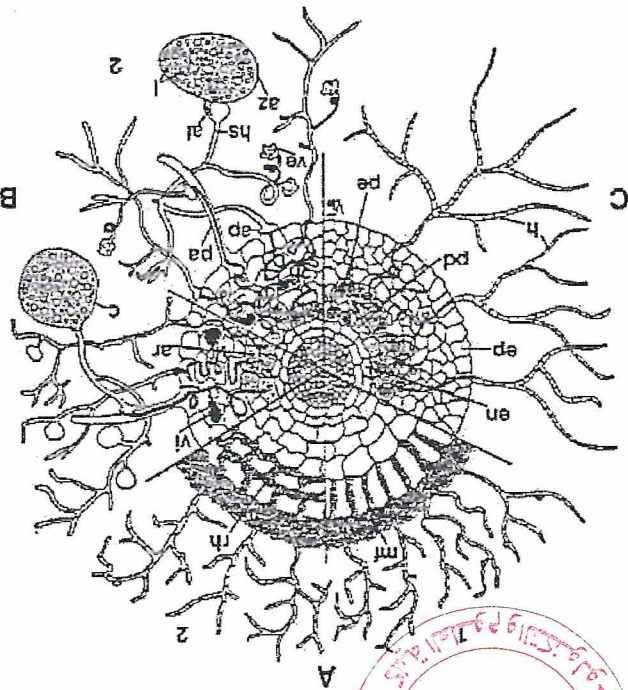


Figure 23 : Rôle de la mycorhization sur l'acquisition du phosphore par les végétaux (Furlan, 1990)

- 1 : Gomocytes typiques
- mt : matras fongique
- pa : poil absorbant
- pd : peloton fongique digestif
- pc : peloton fongique
- th : tige de Harzig
- ve : vésicule osseuse ou cellule auxiliaire
- al : appendice latéral
- ap : apressorium
- ar : arbuscule
- az : arylsporone
- c : chlamydozore
- en : endoderme
- ep : épiderme
- h : hypha
- A : ectomycorrhizes: typhes des Brinacées (1) et des Plantes (?)
- B : endomycorrhizes à vésicules et arbuscules (VA): formes chlamydozore (1) et arylsporone (?)
- C : endomycorrhizas des Orchidées





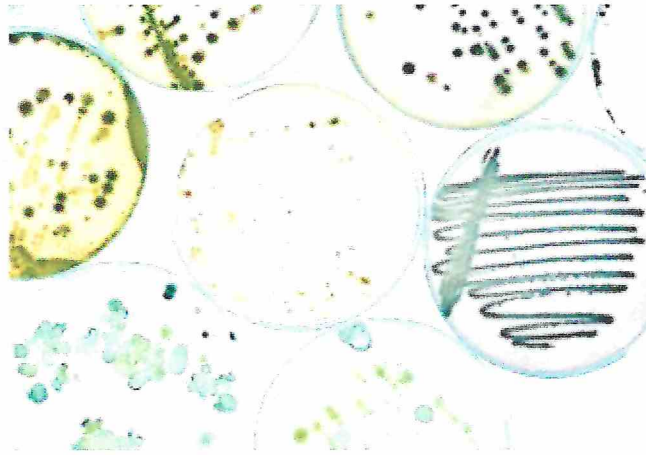
A retenir de ce chapitre :

Les rôles des microorganismes dans les cycles biogéochimiques sont les suivants :

1. Minéralisation de la matière organique
2. Oxydation des composés inorganiques réduits
3. Réduction anaérobie des composés inorganiques oxydés
4. Solubilisation ou précipitation des minéraux
5. Les cycles biologiques du soufre et de l'azote dans le sol sont très comparables à. Tous les deux sont stockés à l'état organique et sont ensuite libérés sous une forme assimilable par la plante par un processus analogue (la minéralisation microbienne ou l'hydrolyse



CHAPITRE VI : CULTURE ET CROISSANCE DES MICROORGANISMES



CHAPITRE VI : CULTURE ET CROISSANCE DES MICROORGANISMES

1. Division bactérienne

Les bactéries se reproduisent par fission binaire : les bactéries se développent puis se divisent en deux cellules filles, séparées par une cloison formée par la paroi cellulaire (Figure 25). Au cours du processus de division, l'ADN se réplique avec d'autres composants. Divers systèmes de synthèse et de dégradation enzymatiques sont impliqués dans la division cellulaire.

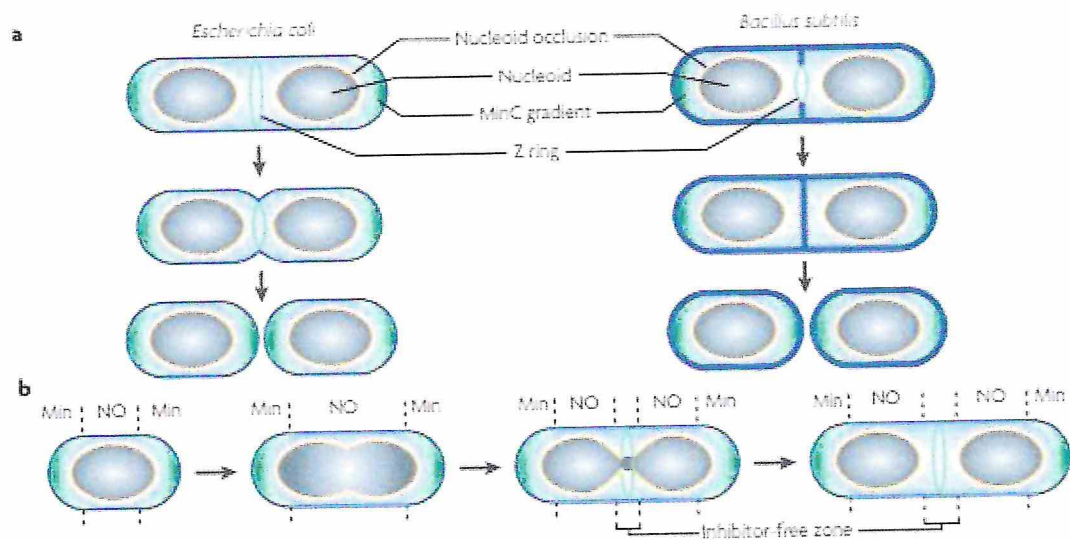


Figure 25 : Division cellulaire chez les bactéries en forme de bâtonnet (Adams et al., 2009). **a** | Deux modes de division différents. Après la réplique des chromosomes et la ségrégation en nucléoïdes, l'anneau Z s'assemble au milieu de la cellule. L'anneau se contracte ensuite pour provoquer la division. La synthèse de la paroi cellulaire suit l'anneau vers l'intérieur. Chez *Escherichia coli*, la synthèse du septum de division est accompagnée d'une constriction de la membrane externe. Chez *Bacillus subtilis*, une paroi transversale de peptidoglycane divise initialement la cellule avant d'être dégradée et remodelée pour former la nouvelle cellule. et remodelée pour former les nouveaux pôles cellulaires hémisphériques. **b** | La régulation spatiale de l'assemblage de l'anneau Z. L'occlusion des nucléoïdes (NO), qui est médiée par Noc (chez *B.subtilis*) ou *SlmA* (chez *E. coli*), inhibe l'assemblage de l'anneau Z à proximité du nucléoïde. Le système Min agit pour empêcher l'assemblage de l'anneau Z aux pôles de la cellule (pour simplifier, la dynamique de Min dans *E. coli* a été omise). De gauche à droite : dans les cellules 'nouveau-nées', les deux systèmes inhibent initialement l'assemblage de l'anneau Z dans toute la cellule ; après l'élongation cellulaire et la réplique des chromosomes, le NO maintient l'inhibition dans la partie cylindrique de la cellule ; et enfin, la progression de la ségrégation des chromosomes révèle une région sans inhibiteur au milieu de la cellule, permettant à l'anneau Z de s'assembler.



2. Croissance bactérienne

La croissance bactérienne est la croissance ordonnée de tous les composants des bactéries. Cela entraîne une augmentation du nombre de bactéries. Au cours du processus de croissance, d'une part, les nutriments du milieu sont épuisés, d'autre part, des sous-produits métaboliques deviennent éventuellement toxiques pour la multiplication.

3. Courbe de croissance

Il existe 6 phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance (Figure 26) :

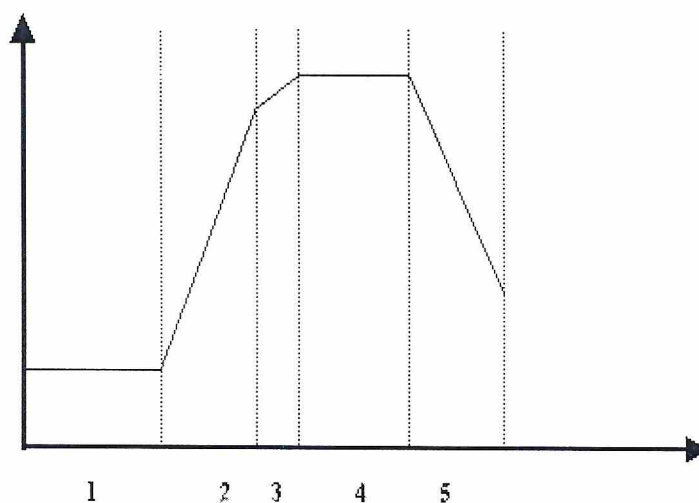
3.1. Phase de latence : le taux de croissance est nul, ça correspond au temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées pour catalyser les substrats présents dans son nouveau milieu.

3.2. Phase d'accélération : le taux de croissance est accéléré.

3.3. Phase exponentielle : le taux de croissance atteint un maximum et reste constant, ça correspond à un temps de doublement des bactéries plus court et le taux de mortalité est nul.

3.4. Phase stationnaire : le taux de croissance est égal au taux de mortalité. Les bactéries synthétisent des protéines de manque qui rendent la cellule plus résistante à la toxicité des sous-produits métaboliques ;

3.5. Phase de déclin : le taux de croissance est négatif. Tous les nutriments dans le milieu sont épuisés (épuisement du milieu de culture). Il y a donc accumulation de métabolites toxiques. Il existe un début d'autolyse des bactéries (croissance cryptique), sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes.



- 1 : phase de latence,
- 2 : phase de croissance exponentielle,
- 3 : phase de ralentissement,
- 4 : phase stationnaire,
- 5 : phase de déclin.

Figure 26 : courbe de croissance bactérienne



4. Conditions de croissance

4.1. Sources d'énergie

Les bactéries doivent trouver dans leur environnement les substances nécessaires à leur énergie et à leurs synthèses cellulaires. Les bactéries **phototrophes** utilisent la lumière comme source d'énergie pour la photosynthèse, à partir d'une source d'électron organique (bactérie photoorganotrophe) ou d'une source d'électron minérale (bactérie photolithotrophe)

La bactérie **chimiotrophe** tire son énergie à partir de composés minéraux (bactérie chimiolithotrophe) ou organiques (bactérie chimioorganotrophe).

4.2. Sources de carbone

Le carbone est l'un des éléments les plus abondants chez la bactérie car il a le caractère constitutif. Le plus simple des composés carbonique est le dioxyde de carbone (CO₂), si c'est la seule source de C pour la bactérie, elle est dite « **autotrophe** ». Au contraire, les bactéries dites « **hétérotrophes** » utilisent facultativement le CO₂ mais peuvent dégrader une grande quantité de substances hydrocarbonées (alcool, acide acétique, acide lactique, polysaccharides, sucres divers).

4.3. Sources d'azote et de soufre

Les bactéries ont besoin de substances azotées pour synthétiser les protéines et les acides nucléiques. Certaines bactéries peuvent fixer directement l'azote moléculaire à partir de l'atmosphère, elles sont appelées « bactéries fixatrices d'azotes », qui jouent un rôle très important dans la biofertilisation des sols et la nutrition végétale. D'autre part, les bactéries peuvent incorporer des composés azotés par des réactions de désamination et de transamination.

Le soufre est incorporé par les bactéries sous forme de sulfate ou de composés soufrés organiques (voir chapitre V).

4.4. Autres

D'autres éléments jouent un rôle dans le métabolisme bactérien (sodium, potassium, magnésium, chlore) et dans les réactions enzymatiques (phosphore, calcium, fer, magnésium, manganèse, nickel, sélénium, cuivre, cobalt, vitamines).

5. Facteurs environnementaux influençant la croissance

L'environnement des microorganismes peut influencer son développement et sa prolifération à travers différents facteurs (Tableau 4), énumérés ci-dessous.



5.1. Oxygène

Selon leur relation avec l'oxygène, il existe plusieurs types de bactéries. Les bactéries strictement aérobies (AS) ne peuvent prospérer qu'en présence d'air. Leur principale source d'énergie est la **respiration aérobie**. L'oxygène moléculaire final (accepteur d'électrons) est réduit en eau (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Neisseria*). Lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à la pression partielle d'air, les bactéries microaérophiles (*Campylobacter spp.*, *Mycobacterium*) se multiplient le mieux ou uniquement celle-ci. Les aero-anaérobies facultatifs (ANAF) peuvent prospérer indépendamment de la présence d'air. Les bactéries strictement anaérobies (ANS) ne peuvent prospérer qu'en l'absence d'oxygène, qui est généralement toxique. Elles ont un **métabolisme fermentaire** ou réalisent une respiration dont l'accepteur final n'est pas l'oxygène, c'est la **respiration anaérobie**.

5.2. Température

Les bactéries peuvent être classées selon leur température optimale de croissance en quatre types :

- Bactéries **mésophiles** : la température de croissance varie entre 20 et 40°C, ex : *Escherichia coli*
- Bactéries **thermophiles** : la température de croissance varie entre 42°C et 70°C, ex : *Thermus aquaticus*
- Bactéries **hyper-thermophiles** : la température de croissance est supérieure à 80°C, ex : *Thermococcus*
- Bactéries **psychrophiles** : la températures de croissance varie entre 0 et 10°C, ex : *Listeria monocytogenes*
- Bactéries **psychrotrophes** : la température de croissance est proche de 0°C avec optimum de croissance proche des bactéries mésophiles

5.3. pH

Selon que ce soit un pH neutre, basique ou acide, on distingue trois classes de bactéries :

- Les bactéries **neutrophiles** qui se développent à des pH compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7.
- Les bactéries **alcalophiles** préfèrent les pH alcalins ou basiques, ex : *Pseudomonas*, *Vibrio*.
- Les bactéries **acidophiles** qui se multiplient de façon optimale dans des milieux acides, ex : *Lactobacillus*.



5.4. Pression osmotique et eau libre

L'eau joue un rôle prépondérant dans la solubilisation et le transport des nutriments, elle est le siège des réactions métaboliques. L'activité de l'eau (activity of water : a_w) est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un composé. Ainsi, elle est affectée par la présence plus ou moins importante de sels ou de sucres dissous dans l'eau.

- Les bactéries **halophiles** nécessitent du sel (NaCl) pour leur croissance. Cette concentration peut varier de 1-6% pour les faiblement halophiles jusque 15-30% pour les bactéries halophiles extrêmes (ex : *Halobacterium*).
- Les bactéries **halotolérantes** tolèrent comme leur nom l'indique des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance (ex. : *Staphylococcus aureus*).
- Les bactéries **osmophiles** nécessitent pour leur croissance la présence des sucres dans le milieu.
- Les bactéries **osmotolérantes** tolèrent des concentrations modérées de sucres mais non obligatoires pour leur croissance.
- Les bactéries **xérophiles** peuvent se multiplier en l'absence d'eau dans leur environnement

Tableau 4: Réponses des microorganismes aux facteurs de l'environnement

Épithète descriptif	Définition	Micro-organismes représentatifs
Solutés et activité de l'eau		
Osmotolérant	Se développe dans une large gamme d'activité de l'eau ou de concentration osmotique	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Saccharomyces rouxii</i>
Halophile	Exige pour pousser des concentrations élevées en chlorure de sodium souvent au dessus de 0.2 M	<i>Halobacterium</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Ectothiorhodospira</i>
pH		
Acidophile	Croissance optimale aux pH de 0,0 à 5,5	<i>Sulfolobus</i> , <i>Picrophilus</i> , <i>Ferroplasma</i> , <i>Acontium</i> , <i>Cyanidium caldarium</i>
Neutrophile	Croissance optimale aux pH de 5,5 à 8,0	<i>Escherichia</i> , <i>Euglena</i> , <i>Paramecium</i>
Alcalophile	Croissance optimale aux pH de 8,5 à 11,5	<i>Bacillus alcalophilus</i> , <i>Natronobacterium</i>
Température		
Psychrophile	Se développe bien à 0°C, température optimale de croissance de 15°C ou moins	<i>Bacillus psychrophilus</i> , <i>Chlamydomonas nivulix</i>
Psychrotrophe	Peut se développer à 0-7°C; température optimale de croissance entre 20 et 30°C et maximale voisine de 35°C	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Mésophile	Température optimale entre 20 et 45°C	<i>Escherichia coli</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i>
Thermophile	Peut se développer à 55°C et même plus; température optimale souvent entre 55°C et 65°C	<i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Thermus aquaticus</i> , <i>Cyanidium caldarium</i> , <i>Chaetomium thermophile</i>
Hyperthermophile	Température optimale de croissance de 80° à environ 113°C	<i>Sulfolobus</i> , <i>Pyrococcus</i> , <i>Pyrodictum</i>
Concentration en oxygène		
Aérobic obligatoire	Croissance dépendant entièrement de l'O ₂ atmosphérique.	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Mycobacterium</i> ; la plupart des algues, mycètes, et protozoaires
Anaérobie facultatif	O ₂ n'est pas nécessaire à la croissance, mais celle-ci est meilleure en présence d'O ₂ .	<i>Escherichia</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Anaérobie aérotoleérant	Se développe aussi bien en présence et en absence d'O ₂ .	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Anaérobie obligatoire	Ne tolère pas l'O ₂ - meurt en présence d'O ₂ .	<i>Clostridium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Methanobacterium</i> , <i>Trepomonas agilis</i>
Microaérophile	Demande une concentration en O ₂ en dessous de 2-10% pour sa croissance, est endommagé par l'O ₂ atmosphérique (20%).	<i>Campylobacter</i> , <i>Spirillum volutans</i> , <i>Treponema pallidum</i>
Pression		
Barophile	Croissance plus rapide sous une haute pression hydrostatique.	<i>Photobacterium profundum</i> , <i>Shewanella benthica</i> , <i>Methanococcus jannaschii</i>



6. Culture bactérienne

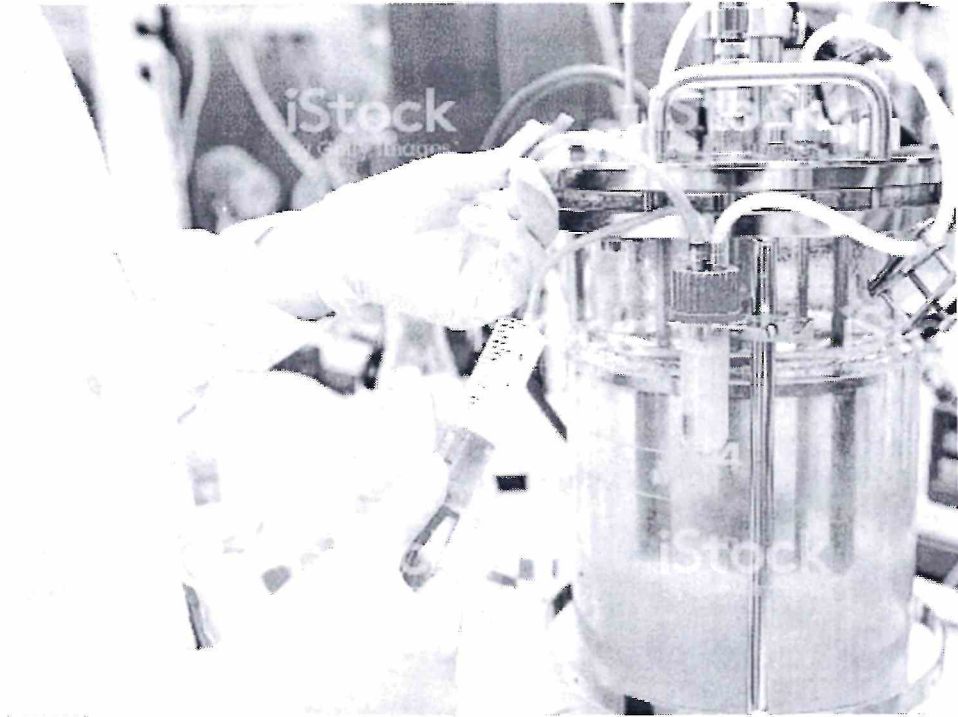
L'observation microscopique des bactéries doit être complétée par d'autres tests sur milieu de culture pour pouvoir les caractériser et les identifier, c'est la culture bactérienne. Cette dernière nécessite la connaissance des milieux de culture qui vont servir pour l'ensemencement de l'échantillon microbien à analyser mais aussi l'interprétation des résultats de culture.

6.1. Types de milieux de culture

Le milieu de culture est un support de croissance des microorganismes, il doit contenir des éléments nutritifs et énergétiques nécessaires pour leur multiplication. Il existe différents types de milieux de culture selon la composition et l'utilisation.

- **Milieu synthétique** : sa composition est connue exactement de manière quantitative et qualitative.
- **Milieu complexe** : sa composition est connue de manière partielle car il contient des matières premières plus ou moins complexes telles que : sérum, sang, peptone, foie, viande, soja et caséine.
- **Milieu enrichi** : c'est un milieu riche en nutriments qui permet la croissance des germes exigeants. Il est donc additionné de suspensions riches en molécules organiques (sang, sérum, extrait globulaire,...etc).
- **Milieu sélectif** : c'est un milieu qui va favoriser la croissance des microorganismes désirés cultivés en dépit d'autres microorganismes indésirables. Il contient donc des molécules qui inhibitrices et des molécules stimulatrices.
- **Milieu différentiel** : c'est un milieu facilitant la distinction entre les colonies des microorganismes visés et les colonies des autres germes présentes sur le même milieu. La plupart des milieux contiennent des éléments permettant de mettre en évidence des caractères biochimiques.
- **Milieux d'enrichissement** : c'est un milieu utilisé pour accélérer la croissance d'un germe exigeant ou de croissance lente.

CHAPITRE VII : TECHNOLOGIES DES BIOREACTEURS





CHAPITRE VII : TECHNOLOGIES DES BIOREACTEURS

1. Définition du bioréacteur

Le bioréacteur est un système de production à grande échelle de « produits cibles » qui utilise les micro-organismes comme de véritables usines de production de métabolites ou de substrats de dégradation (Figure 28), une réaction (bio)-chimique se produit (Figure 27). Le terme bioréacteur comprend les cuves de fermentation (ancien terme) et les incubateurs cellulaires (équipement biotechnique utilisé pour la culture bactérienne, qui peut maintenir un environnement constant pour la culture cellulaire).

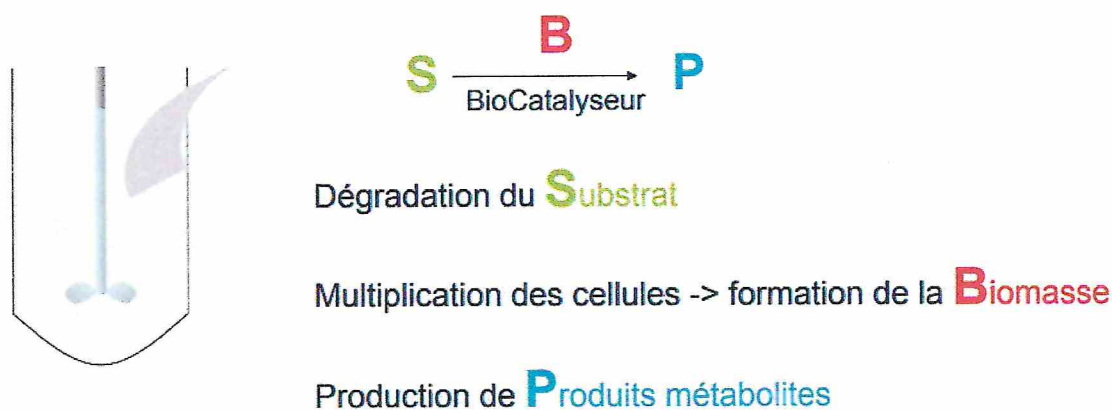
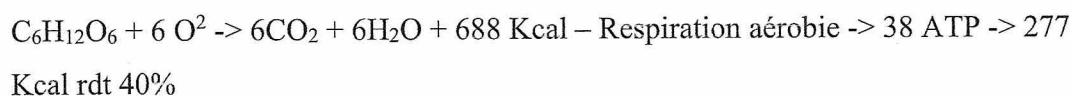


Figure 27 : schéma simplifié d'un bioréacteur (Bacchin, 2006)

2. Processus énergétiques mis en jeu

Métabolisme respiratoire : dégradation complète du substrat

- l'oxydation du glucose :



- Fermentation alcoolique (levure)



- Fermentation lactique (bactérie)



- Respiration anaérobie – $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 12 \text{KNO}_3 \rightarrow 6 \text{CO}_2 + 6 \text{H}_2\text{O} + \text{KNO}_2 + 429 \text{ Kcal} - 25 \text{ ATP} \rightarrow \text{Rdt}$

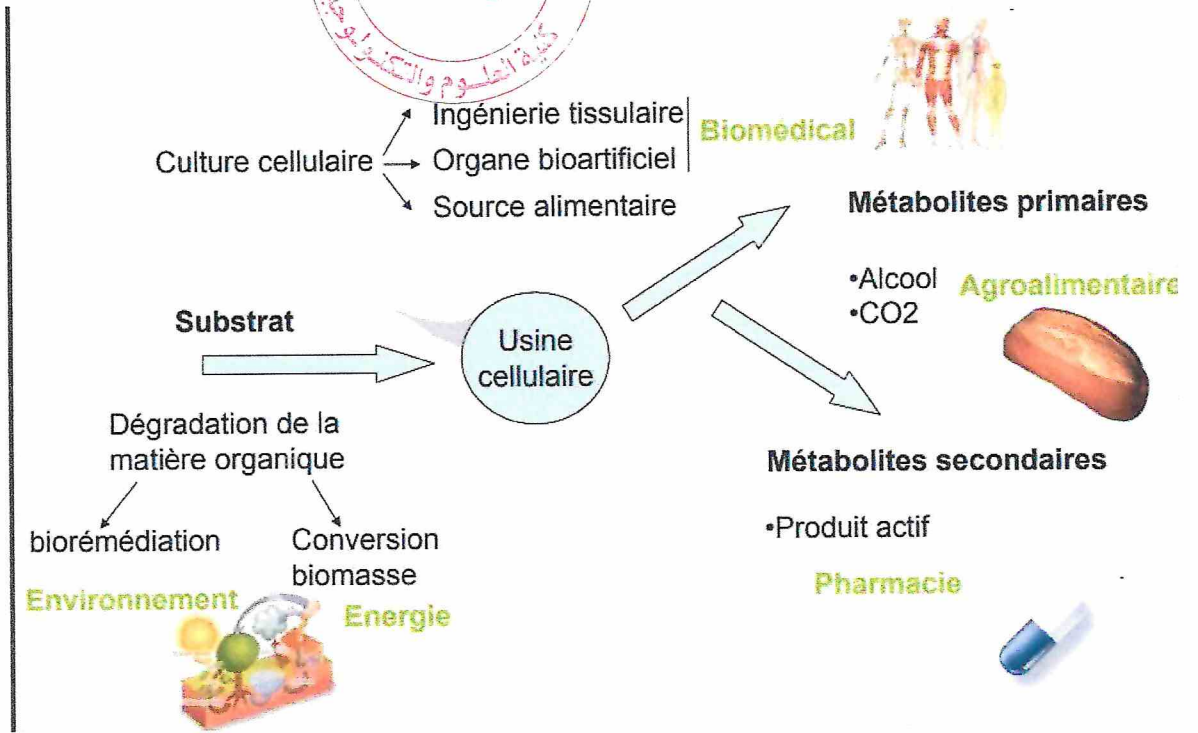


Figure 28 : Les différentes utilisations de l'usine cellulaire (Bacchin, 2006)

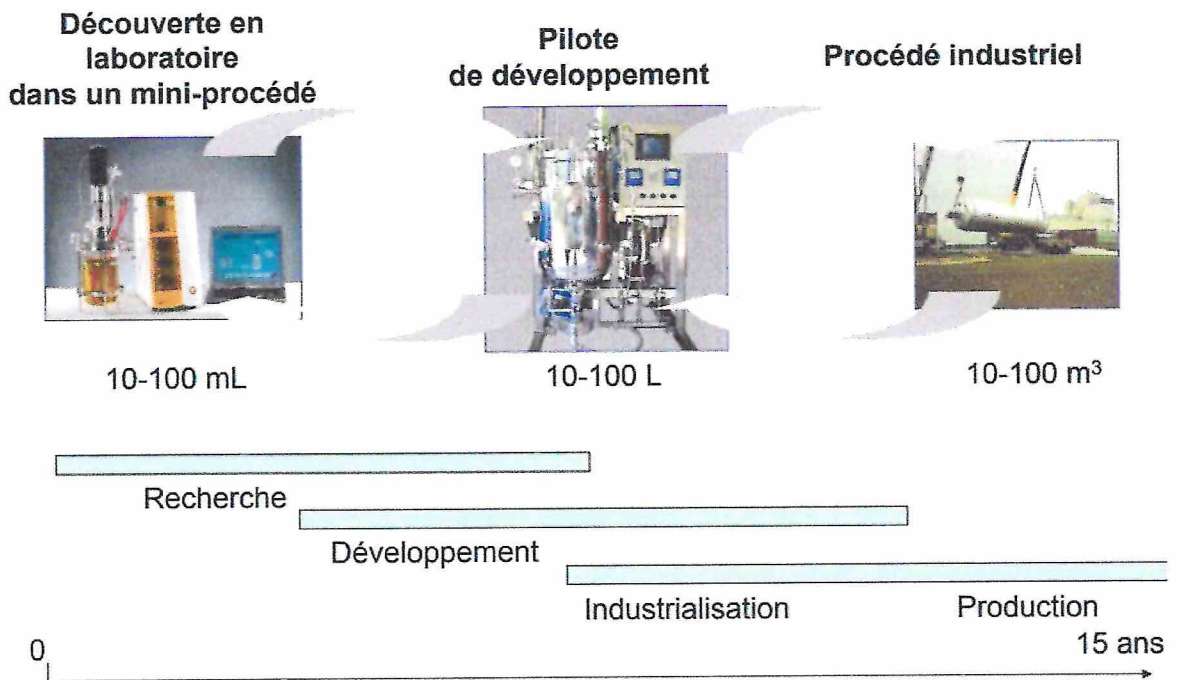


Figure 29 : Différentes échelles des bioréacteurs à travers le temps (Bacchin, 2006)

3. Fonctionnement d'un bioréacteur

La cuve du bioréacteur doit contenir un milieu de culture adéquat pour ensemercer les cellules vivantes sélectionnées (Figure 30). Après une première phase de croissance (quelques jours), un premier rempotage est effectué. Lorsque la biomasse atteint à nouveau une concentration suffisante, un deuxième ajout de milieu est effectué pour que le réservoir de stockage atteigne sa capacité maximale. Les cellules vont alors se multiplier pendant une troisième et dernière phase de croissance à l'issue de laquelle la suspension est élicitée.

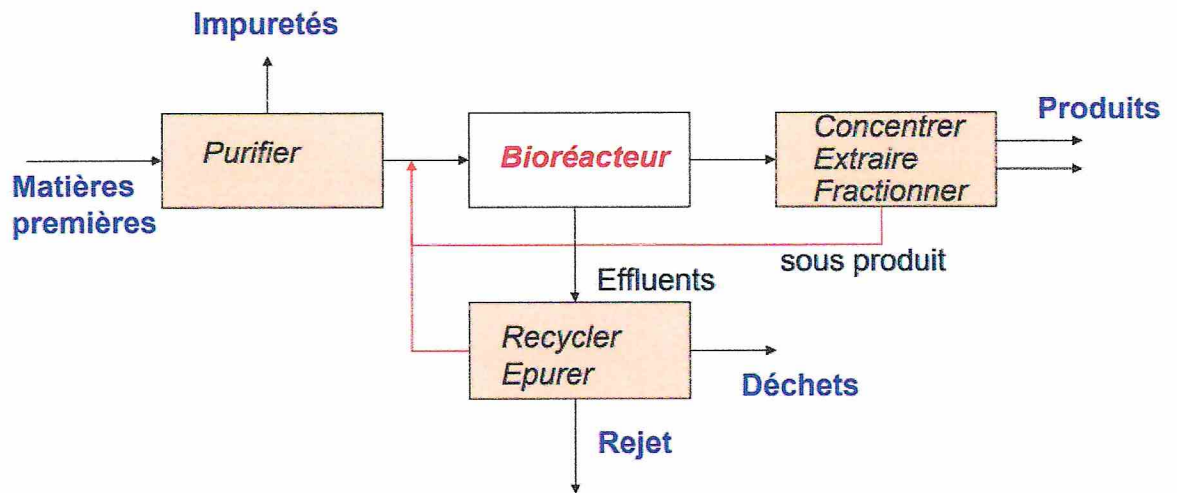


Figure 30 : Principe de fonctionnement d'un bioréacteur (Bacchin, 2006)

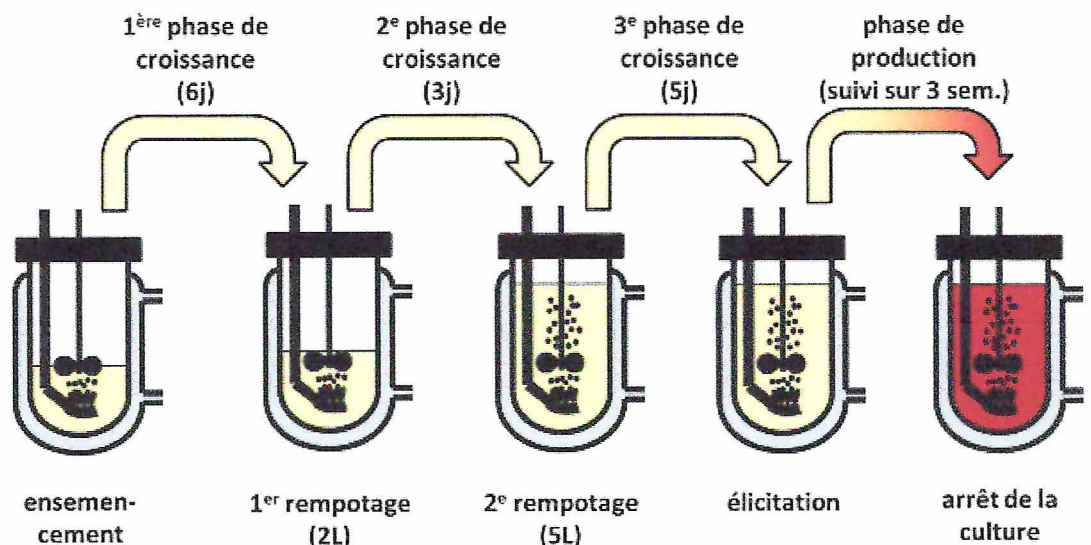
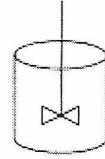


Figure 31 : Protocole des expérimentations en bioréacteur (Chastang, 2014)

4. Types de réacteurs

4.1. Réacteur Discontinu ou Fermé

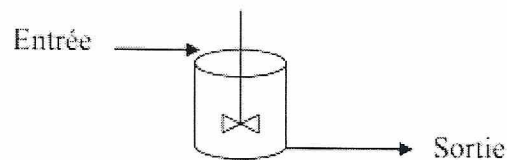
Ce sont des réacteurs qui ne possèdent ni entrée (non alimenté) ni sortie (pas de soutirage)



Réacteur Agité

4.2. Réacteur Continu ou Ouvert

Ce sont des réacteurs qui possèdent une entrée (alimenté) et une sortie (soutirage). On distingue dans cette catégorie deux types de réacteur : Réacteur parfaitement agité ou mélangé et réacteur non agité (aucun mélange) ou réacteur piston.



Réacteur Continu Parfaitement Agité (RCPA)



Réacteur Piston (RP)

Les réacteurs possédant une entrée ou une sortie sont appelés réacteur semi-fermé ou fedbatch, en général on les classe dans la catégorie des réacteurs fermés.

5. Principales familles de bioréacteurs à membranes

On peut distinguer deux grandes familles de bioréacteurs à membranes :

5.1. Bioréacteurs à membranes externes

Les membranes sont placées dans un carter. Les carters peuvent être montés en série et/ou en parallèle. Il s'agit de membranes tubulaires ou planes, organiques ou minérales dites à peau interne (la filtration s'effectue de l'intérieur de la membrane vers l'extérieur).

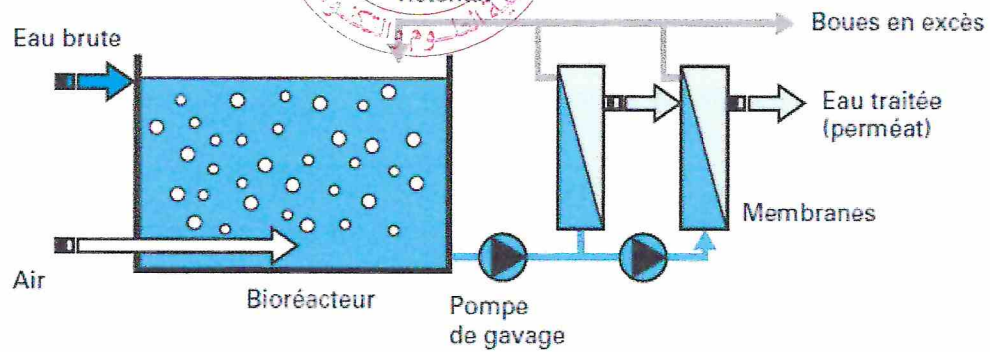


Figure 32 : Bioréacteurs à membranes externes (<https://www.suezwaterhandbook.fr/eau-et-generalites/processus-elementaires-du-genie-biologique-en-traitement-de-l-eau/utilisation-des-membranes-de-clarification-en-traitement-biologique-d-eaux-residuaires/les-principales-familles-de-bioreacteurs-a-membranes>)

5.2. Bioréacteurs à membranes immergées

Les membranes sont placées directement dans la boue activée. Il s'agit de membranes fibres creuses ou planes, organiques dites à peau externe (la filtration s'effectue de l'extérieur de la membrane vers l'intérieur). La filtration est assurée par une pression hydrostatique ou par dépression. Le contrôle de l'accumulation de matières à la surface des membranes est assuré par une aération dédiée complétée par des phases automatiques de nettoyage (rétrolavage, arrêt filtration).

Une partie de l'aération peut venir en déduction des besoins d'oxygénation de la biomasse. Lorsque les membranes sont placées dans un bassin dédié, une recirculation de ce bassin vers le bassin d'aération est nécessaire. Si les membranes sont placées directement dans le bassin d'aération, le besoin de recirculation dépend de la configuration (chenal, mélange intégral, piston).

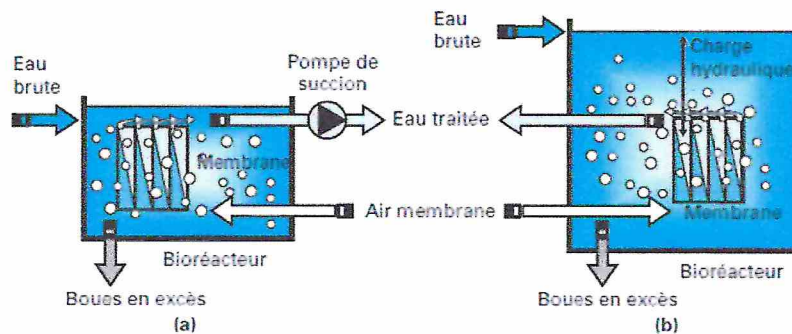
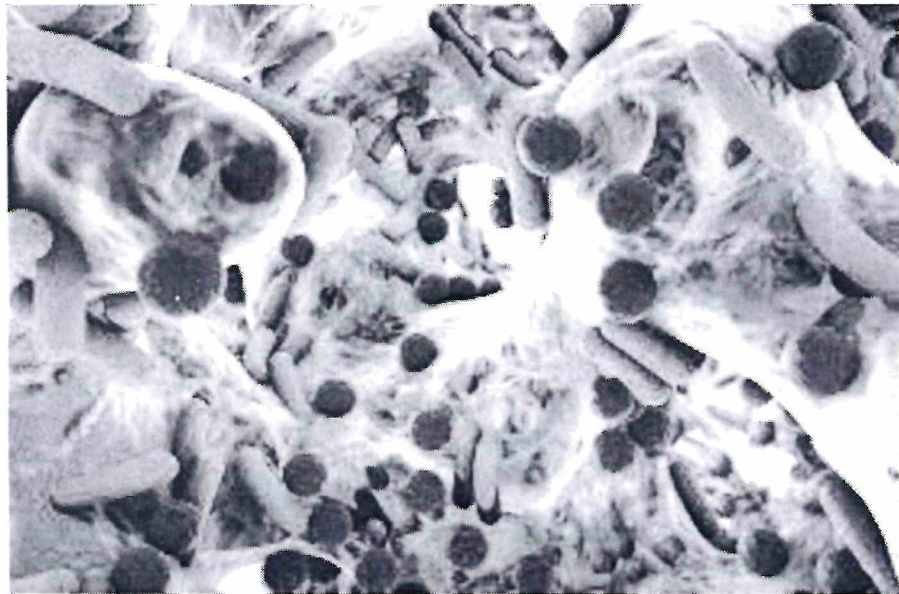


Figure 33 : Bioréacteurs à membranes immergées (<https://www.suezwaterhandbook.fr/eau-et-generalites/processus-elementaires-du-genie-biologique-en-traitement-de-l-eau/utilisation-des-membranes-de-clarification-en-traitement-biologique-d-eaux-residuaires/les-principales-familles-de-bioreacteurs-a-membranes>)

جامعة تانغستان
المجلس العلمي
الكلية
فنية العلوم والتكنولوجيا

CHAPITRE VIII : BIOFILM





CHAPITRE VIII : BIOFILM

Dans la plupart des environnements naturels, l'association avec des surfaces dans des structures appelées biofilms est le principal mode de vie des micro-organismes. S'associer à la surface est un moyen efficace de se promener dans un microenvironnement favorable au lieu d'être emporté par le courant (Watnick and Kolter, 2000). Les biofilms existent dans presque tous les systèmes où existent des micro-organismes (Van Loosdrecht *et al.*, 1995).

1. Historique

Depuis plus de 150 ans, chaque fois que les microbiologistes utilisent des méthodes directes pour examiner les populations naturelles de ces organismes qui se développent dans de vrais écosystèmes, l'idée que les bactéries se développent préférentiellement en surface a émergé. Le savant néerlandais Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) a utilisé son microscope primitif mais efficace pour décrire les agrégats d'«animacules» qu'il a grattés à la surface des dents humaines. Environ deux siècles après, Claude Zobell (1904-1989) a examiné les populations marines naturelles au microscope direct et a conclu que ces bactéries étaient attirées par des surfaces parfois attachées, formant des populations sessiles. Entre 1935 et 1978, des microbiologistes du Forsyth Dental Center, dont Ron Gibbons et Van Hoot, ont observé les biofilms microbiens qui composent la plaque dentaire et forment des écailles macroscopiques à la surface de la dent. Par ailleurs, Ralph Mitchell et Kevin Marshall (1964) ont étudié les premiers stades de la formation de biofilm bactérien en culture pure et ont distingué l'adsorption réversible et subséquente des bactéries à la surface comme première étape de la formation de biofilms (Costerton, 1999).

2. Définition

Les biofilms sont définis comme des communautés microbiennes complexes, caractérisées par des cellules qui se fixent à la matrice et les unes aux autres par l'intermédiaire d'une matrice de substances polymères extracellulaires autoproduites (SPE) (Wingender *et al.*, 1999 ; Donlan and Costerton, 2002). Les amas de cellules microbiennes peuvent appartenir à la même espèce et donc de nature homogène ou d'espèces différents et donc de nature hétérogène (Donlan, 2002). La surface d'adhésion peut être de nature biotique (muqueuse, peau, plante...etc) ou abiotique (bois, eau,..etc.). Autrement définis par Declerck (2010) comme étant des assemblages complexes et naturels de micro-organismes qui impliquent une multitude d'interactions trophiques.



Les microorganismes présents dans les biofilms vivent dans une matrice autogène de substances polymères extracellulaires hydratées (SPE), qui forme leur environnement immédiat. Les SPE peuvent être de différentes natures, principalement des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques et des lipides. Ces substances assurent la stabilité mécanique du biofilm, favorisent son adhésion à la surface et forment un réseau polymère tridimensionnel cohésif qui interconnecte et immobilise temporairement les cellules du biofilm. De plus, la matrice de biofilm agit comme un système digestif externe en rapprochant les enzymes extracellulaires des cellules, leur permettant de métaboliser les biopolymères colloïdaux et solides dissous (Flemming and Wingender, 2010).

3. Structure

La structure du biofilm sera affectée par la charge du substrat à la surface du biofilm, les conditions hydrodynamiques (y compris la contrainte de cisaillement sur le biofilm et le type d'organisme ou de groupe physiologique) (Van Loosdrecht *et al.*, 1995). L'eau représente 97% de la masse de la plupart des biofilms (Sutherland, 2001).

Les cellules du biofilm sont entourées de polymères extracellulaires (EPS), qui constituent l'environnement immédiat de ces cellules. Certains EPS, en particulier ceux qui forment des capsules, sont plus étroitement liés à la surface cellulaire avec d'autres EPS. La morphologie du biofilm résultant peut être lisse et plate, rugueuse, duveteuse ou filamenteuse, et la porosité du biofilm peut également varier, avec de grandes colonies en forme de champignon entourées de vides remplis d'eau (Tableau 5). Toutes ces formes permettent de fixer temporairement les cellules du biofilm, et à la micro-combinaison des espèces mixtes et coexister pendant longtemps. Cela fournit un habitat très diversifié dans une petite zone et favorise la biodiversité (Flemming and Wingender, 2010).

Les biofilms sont constitués d'agrégats séparés par un fluide interstitiel, qui transporte les nutriments vers les déchets produits par les cellules et les bactéries. Ces agrégats contiennent des cellules bactériennes, qui sont divisées en une matrice polymère externe composée principalement de polysaccharides et de protéines (De Beer *et al.*, 1994 ; Stewart, 2003). En fait, les polysaccharides extracellulaires constituent la partie principale de la matrice SPE (Wingender *et al.*, 2001). Dans un véritable écosystème, les souches bactériennes sauvages sont couvertes d'une couche de polysaccharide extracellulaire (EPS), à travers laquelle de longues fimbriae existent pour former une partie efficace de la surface cellulaire (Costerton, 1999). Cependant, dans les biofilms hybrides, la présence de substances produisant des EPS peut



conduire à l'intégration d'autres substances qui ne synthétisent pas les polymères matriciels (Sutherland, 2001).

Tableau 5 : Fonctions des substances polymériques extracellulaires dans les biofilms bactériens (Flemming and Wingender, 2010).

Table 1 Functions of extracellular polymeric substances in bacterial biofilms		
Function	Relevance for biofilms	EPS components involved
Adhesion	Allows the initial steps in the colonization of abiotic and biotic surfaces by planktonic cells, and the long-term attachment of whole biofilms to surfaces	Polysaccharides, proteins, DNA and amphiphilic molecules
Aggregation of bacterial cells	Enables bridging between cells, the temporary immobilization of bacterial populations, the development of high cell densities and cell-cell recognition	Polysaccharides, proteins and DNA
Cohesion of biofilms	Forms a hydrated polymer network (the biofilm matrix), mediating the mechanical stability of biofilms (often in conjunction with multivalent cations) and, through the EPS structure (capsule, slime or sheath), determining biofilm architecture, as well as allowing cell-cell communication	Neutral and charged polysaccharides, proteins (such as amyloids and lectins), and DNA
Retention of water	Maintains a highly hydrated microenvironment around biofilm organisms, leading to their tolerance of desiccation in water-deficient environments	Hydrophilic polysaccharides and, possibly, proteins
Protective barrier	Confers resistance to nonspecific and specific host defences during infection, and confers tolerance to various antimicrobial agents (for example, disinfectants and antibiotics), as well as protecting cyanobacterial nitrogenase from the harmful effects of oxygen and protecting against some grazing protozoa	Polysaccharides and proteins
Sorption of organic compounds	Allows the accumulation of nutrients from the environment and the sorption of xenobiotics (thus contributing to environmental detoxification)	Charged or hydrophobic polysaccharides and proteins
Sorption of inorganic ions	Promotes polysaccharide gel formation, ion exchange, mineral formation and the accumulation of toxic metal ions (thus contributing to environmental detoxification)	Charged polysaccharides and proteins, including inorganic substituents such as phosphate and sulphate
Enzymatic activity	Enables the digestion of exogenous macromolecules for nutrient acquisition and the degradation of structural EPS, allowing the release of cells from biofilms	Proteins
Nutrient source	Provides a source of carbon-, nitrogen- and phosphorus-containing compounds for utilization by the biofilm community	Potentially all EPS components
Exchange of genetic information	Facilitates horizontal gene transfer between biofilm cells	DNA
Electron donor or acceptor	Permits redox activity in the biofilm matrix	Proteins (for example, those forming pili and nanowires) and, possibly, humic substances
Export of cell components	Releases cellular material as a result of metabolic turnover	Membrane vesicles containing nucleic acids, enzymes, lipopolysaccharides and phospholipids
Sink for excess energy	Stores excess carbon under unbalanced carbon to nitrogen ratios	Polysaccharides
Binding of enzymes	Results in the accumulation, retention and stabilization of enzymes through their interaction with polysaccharides	Polysaccharides and enzymes

LPS, extracellular polymeric substances.



4. Propriétés

Le rôle de la matrice à conférer des avantages écologiques à toutes les cellules du biofilm, en particulier celles les plus éloignées de la surface (Flemming and Wingender, 2010). La simulation de la concurrence des biofilms montre que les producteurs de polymères ont un fort avantage évolutif au détriment des non-producteurs, peut-être parce que le polymère rapproche les cellules filles des producteurs de polymères d'un environnement riche en oxygène (Xavier *et al.*, 2007).

Le biofilm est doté de plusieurs propriétés caractéristiques, à savoir :

- Les micro-organismes formant les biofilms subiront des modifications phénotypiques, correspondant à des changements de comportement ;
- La matrice formée fournit une barrière physique protectrice contre les conditions externes et les agents pathogènes. La matrice SPE a la capacité d'agir comme un échangeur d'anions, ce qui peut empêcher physiquement certains agents antibactériens de pénétrer dans le biofilm (Kokare *et al.*, 2009).
- L'activité métabolique des micro-organismes est faible, car ils sont moins exposés au danger et au contact global avec l'environnement extérieur ;
- Les micro-organismes doivent échanger des gènes, ils doivent donc acquérir de nouvelles caractéristiques. L'un des avantages des biofilms vivants est la capacité d'acquérir des éléments génétiques transmissibles à un rythme plus rapide. De nombreux rapports rapportent que le taux de liaison des biofilms bactériens a augmenté (Angles *et al.*, 1993 ; Hausner and Wuertz. 1999). Cela indique que l'évolution par transfert horizontal de matériel génétique peut se produire rapidement dans les biofilms, ce qui en fait un milieu idéal pour l'émergence de nouveaux agents pathogènes en acquérant des facteurs de résistance aux antibiotiques et de virulence et de capacité de viabilité dans l'environnement (Watnick and Kolter, 2000).
- Le substrat d'adhésion peut être dégradé ou minéralisé par les microorganismes composant le biofilm.

5. Formation

Généralement, il existe trois étapes différentes dans le «cycle de vie du biofilm» des bactéries : (i) la liaison des bactéries au substrat, (ii) la maturation du biofilm, et (iii) la séparation et la libération du biofilm. Puis se propager dans l'environnement (Donlan, 2002). La formation du biofilm bactérien doit commencer par une petite quantité de cellules

bactériennes adhérant à la surface, mais afin de faire réagir les bactéries avec la surface. En effet, les cellules bactériennes planctoniques libèrent des protéines et des molécules de signalisation lorsqu'elles traversent le fluide (Costerton, 1999). Les bactéries peuvent alors former une association transitoire avec la surface et / ou d'autres microorganismes préalablement fixés à la surface. Cette brève connexion lui a permis de trouver un logement. Lorsqu'une bactérie forme une connexion stable en tant que membre d'une petite colonie, elle choisit le voisin où elle vivra. Enfin, les bâtiments s'élèvent avec la formation de biofilms tridimensionnels. Parfois, les bactéries associées aux biofilms sont éliminées de la matrice du biofilm. Des photomicrographies de ces étapes du biofilm formé par une seule espèce bactérienne sont illustrées à la figure 34. Bien que ces microphotographies soient des vues statiques des différentes étapes de la formation du biofilm, les biofilms ne sont pas une masse de cellules fixes (Watnick and Kolter, 2000).

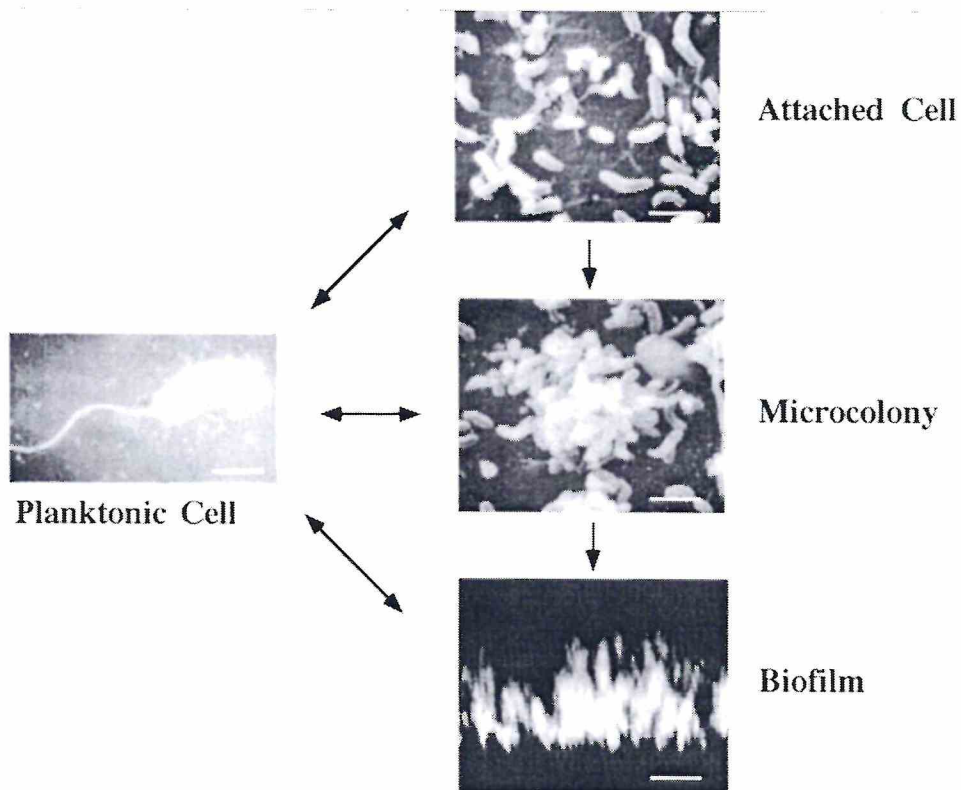


Figure 34 : Etude microscopique des étapes de formation d'un biofilm par *Vibrio cholerae* (Watnick and Kolter, 2000).

En résumé, pour que le biofilm se forme, cinq étapes simples doivent se produire (Figure 35) :

- 1) Adhésion du premier lot d'agents colonisateurs au substrat (réaction réversible). En conséquence, la physiologie bactérienne s'est développée vers un phénotype «biofilm», qui se caractérise par la surproduction de polymères étrangers, qui «lie» le complexe bactérien (Jouenne, 2008).
- 2) Attachement à d'autres individus en se rassemblant pour former des micro-colonies (réaction irréversible). La phase de colonisation implique une accumulation plus ou moins dense et rapide par division cellulaire de bactéries adhérentes ou recrutement continu de bactéries (Picard, 2011). Il a été récemment démontré que la transduction du signal entre les cellules (quorum sensing) joue un rôle dans l'attachement cellulaire (Kokare *et al.*, 2009).
- 3) Maturation primaire correspondant à la formation de plusieurs microcolonies. Le stade de maturité des biofilms est caractérisé par une taille de structure accrue par prolifération cellulaire et synthèse de polysaccharides extracellulaires (Picard, 2011).
- 4) Maturation secondaire qui correspond à l'aspect final du biofilm
- 5) Détachement lors d'une carence en nutriments ou un vieillissement du biofilm causée par une nutrition insuffisante ou des facteurs non biologiques (comme le stress ou biologiques) provoquent la chute ou la dispersion des cellules. Lorsque les conditions dans le biofilm changent, ces interactions peuvent déterminer quelles cellules survivent et quelles cellules meurent (Watnick and Kolter, 2000).

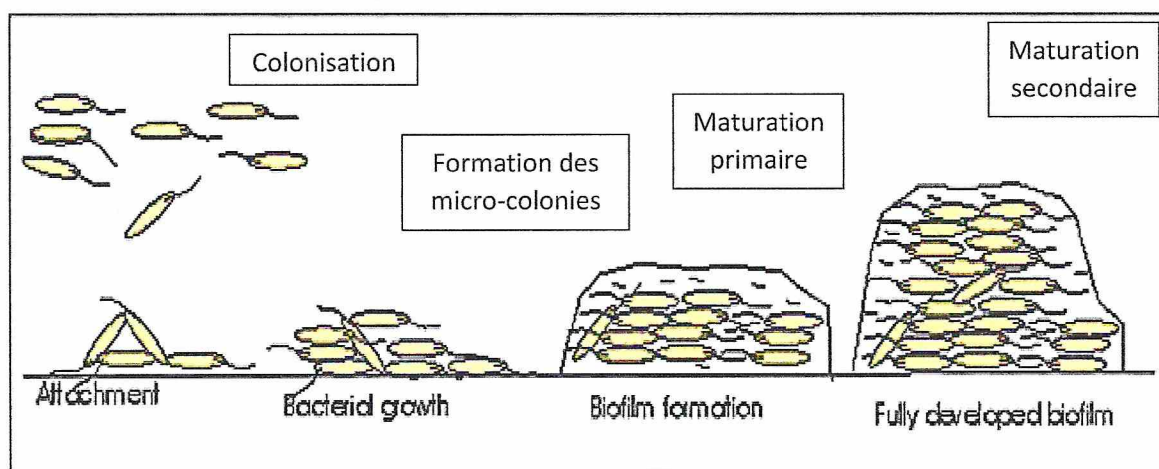


Figure 35 : Représentation schématique de la formation du biofilm (Kokare *et al.*, 2009 modifié).



6. Applications

6.1. Traitement et contamination des eaux

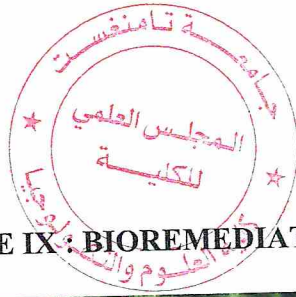
Le biofilm jouerait un double rôle dans l'eau. Au niveau des canalisations, la formation du biofilm peut infecter la potabilité de l'eau malgré la présence de désinfectant à cause de leur inefficacité ou la résistance développée par les germes. En revanche, des biofilms hétérogènes sont volontairement utilisés dans les boues d'épuration des eaux usées municipales, ce qui permet de digérer la matière organique de la suspension, contribuant ainsi à l'épuration (traitement biologique).

6.2. Bio-indicateur de pollution

Le biofilm dans les eaux de surface est principalement composé de microorganismes hétérologues. Dans des conditions contaminées, les bactéries fécales peuvent interagir avec ces biofilms, ce qui suggère que ces derniers peuvent servir de réservoir pour les bactéries pathogènes dans les rivières contaminées (Balzer *et al.*, 2010). D'autre part, Rocher et ses collègues (2003) ont étudié la structure des biofilms d'égouts et la teneur et la distribution des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques dans les biofilms du bassin versant du Marais (Paris, France). Ils ont constaté que le carbone dans les biofilms et autres sédiments Les composés d'hydrogène sont différents, donc le biofilm peut être utilisé comme indicateur de contamination par les hydrocarbures aliphatiques dans la couche organique.

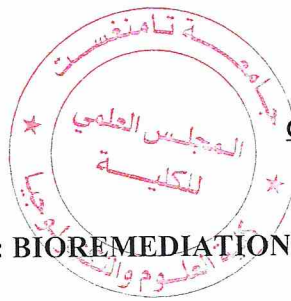
6.3. Pathogénèse

Les biofilms présents sur les appareils cliniques peuvent être composés de bactéries Gram-positives et Gram-négatives, qui peuvent avoir diverses origines : la peau des patients ou du personnel médical, de l'eau du robinet ou d'autres sources environnementales. De plus, le rôle des biofilms dans les infections des implants a été établi dans de nombreux systèmes humains. Par exemple, les genres bactériens *Staphylococcus* et *Streptococcus* peuvent former des biofilms sur les tissus des valves cardiaques en provoquant des pathologies (Kokare *et al.*, 2009).



CHAPITRE IX : BIOREMEDIATION





CHAPITRE IX : BIOREMEDIATION

1. Introduction

Ces dernières années, le développement de techniques efficaces pour la décontamination des sites pollués est devenu indispensable. L'une d'elles, la bioremédiation qui exploite les propriétés de certains organismes vivants à extraire les polluants et restaurer les milieux contaminés.

Les techniques conventionnelles utilisées pour l'assainissement et la restauration des sites consistent à extraire la partie contaminée et à l'évacuer vers une décharge. Ces méthodes présentent certains inconvénients. La première méthode ne fait que déplacer la contamination ailleurs et peut créer des risques importants liés à l'excavation, à la manipulation et au transport de matières dangereuses. En outre, il est très difficile et de plus en plus coûteux de trouver de nouveaux sites d'enfouissement pour l'élimination finale des matériaux (Vidal, 2001).

Contrairement aux techniques physiques ou chimiques, la bioremédiation est la méthode économiquement viable et harmonieuse de l'environnement. D'autre part, la bioremédiation fait appel le plus souvent aux plantes (phyto-remédiation) ou aux microorganismes ou aux deux organismes ensemble. En effet, une stimulation microbienne dans la rhizosphère peut augmenter les performances des plantes dans la dépollution.

Dans ce chapitre, l'aspect microbien sera le plus développé car concordance avec le cours en question ; à savoir la microbiologie.

2. Historique

L'utilisation de microbes dans la biorémédiation moderne est attribuée, en partie, à George Robinson (US Microbics, 2003). Il a utilisé des microbes pour consommer une marée noire le long de la côte de Santa Barbara, en Californie, à la fin des années 1960. Depuis les années 1980, la biorémédiation des déversements d'hydrocarbures et d'autres déchets dangereux a été davantage prise en considération (Shannon and Unterman, 1993).

3. Définition

Le mot « bioremédiation » est composé de « bio » = être vivant et « remedium » = rétablissement de l'équilibre.

De manière générale, la biorémédiation est définie comme le processus par lequel les déchets organiques sont biologiquement dégradés dans des conditions contrôlées jusqu'à un état inoffensif ou à des niveaux inférieurs aux limites de concentration établies par les autorités réglementaires



(Mueller *et al.*, 1996). C'est un mécanisme qui utilise les potentiels naturels des microorganismes et leurs produits pour éliminer les contaminants du sol (USEPA 2000, 2012 ; Leung 2004).

La technologie de la biorémédiation vise à transformer en contaminants bénins les contaminants présents dans les sols, les sédiments, l'eau et l'air (Shanahan, 2004).

4. Principes

La biorémédiation utilise les réactions métaboliques microbiennes dans de conditions environnementales optimales et de nutriments suffisants pour décomposer les contaminants (Adams *et al.*, 2015). Pour que la biorémédiation soit efficace, les micro-organismes doivent attaquer les polluants par voie enzymatique et les transformer en produits inoffensifs (Vidal, 2001).

5. Population microbienne

L'étude des microbes dans les systèmes de biorémédiation permet de sélectionner des microorganismes ayant un potentiel pour la dégradation et la production de composés ayant des applications biotechnologiques dans l'industrie pétrolière et pétrochimique (Adams *et al.*, 2015)

La dégradation des composés organiques toxiques, nécessite le contact des bactéries et les contaminants. Certaines bactéries sont mobiles et présentent une réponse chimiotactique, détectant le contaminant et se déplaçant vers lui. D'autres microbes, comme les champignons, se développent sous forme filamenteuse vers le contaminant (Vidal, 2001).

En particulier, les microorganismes indigènes du sol jouent un rôle clé dans la biorémédiation du sol en tant qu'agents biogéochimiques pour minéraliser les composés organiques complexes en composés inorganiques simples ou en leurs éléments constitutifs (Tableau 6). En général, les particules du sol ont une charge négative, et le sol et les bactéries peuvent se tenir ensemble par une liaison ionique impliquant des cations polyvalents (Killham, 1994 *in* Adams *et al.*, 2015).

D'autre part, de nombreuses techniques sont utilisées pour sélectionner des microorganismes utiles pour la bioaugmentation. Dans cette perspective, les bactéries peuvent être isolées du sol contaminé donné, et après culture en laboratoire, les souches bactériennes pures pré-adaptées sont remises dans le même sol. Cette méthode est appelée réinoculation du sol avec des microorganismes naturels. La deuxième possibilité consiste à sélectionner des micro-organismes appropriés à partir d'emplacements où des polluants similaires existent dans le sol, qui sont soumis à l'élimination par ces micro-organismes sélectionnés.



Les microorganismes sont subdivisés en groupes suivants (Vidal, 2001) :

- En présence d'oxygène (aérobie), exemples : *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* et *Mycobacterium*. Ces microbes ont souvent été signalés comme dégradant les pesticides et les hydrocarbures, tant les alcanes que les composés polyaromatiques. Beaucoup de ces bactéries utilisent le contaminant comme unique source de carbone et d'énergie.
- En l'absence d'oxygène (anaérobie), exemple : *Phanaerochaete chrysosporium* est un champignon qui a la capacité de dégrader une gamme extrêmement variée de polluants environnementaux persistants ou toxiques.

Tableau 6 : Quelques contaminants potentiellement adaptés à la biorémédiation (Vidal, 2001).

Class of contaminants	Specific examples	Aerobic	Anaerobic	More potential sources
Chlorinated solvents	Trichloroethylene Perchloroethylene		+	Drycleaners Chemical manufacture
Polychlorinated biphenyls	4-Chlorobiphenyl 4,4-Dichlorobiphenyl		+	Electrical manufacturing Power station Railway yards
Chlorinated phenol	Pentachlorophenol		+	Timber treatment Landfills
"BTEX"	Benzene Toluene Ethylbenzene Xylene	+	+	Oil production and storage Gas work sites Airports Paint manufacture Port facilities Railway yards Chemical manufacture
Polyaromatic hydrocarbons (PAHs)	Naphthalene Anthracene Fluorene Pyrene Benzo(a)pyrene	+		Oil production and storage Gas work sites Coke plants Engine works Landfills Tar production and storage Boiler ash dump sites Power stations
Pesticides	Atrazine Carbaryl Carbofuran Coumpos Diazinon Glycophosphate Parathion Propham 2,4-D	+	+	Agriculture Timber treatment plants Pesticide manufacture Recreational areas Landfills

6. Concepts

En bioremédiation, les microorganismes utilisés peuvent être originaires à la zone contaminée ou isolés d'ailleurs et transportés vers le site contaminé. Par ailleurs, il existe cinq principaux concepts qui sont développés dans les paragraphes qui suivent.

6.1. La biodégradation ; c'est l'action de plusieurs organismes pour stimuler les capacités naturelles des microorganismes à décomposer les polluants organiques (Figure 36). Elle peut être utilisée pour le sol et les eaux souterraines. De manière générale, cette technique implique l'infiltration de nutriments contenant de l'eau et de l'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons (Vidal, 2001).

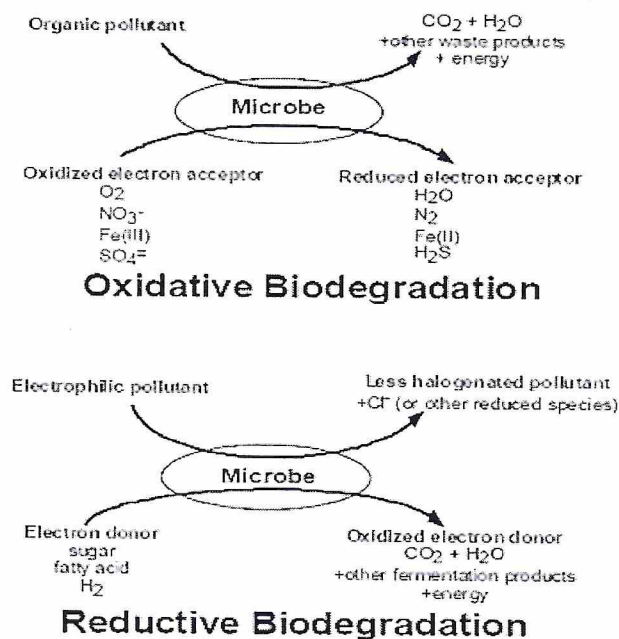


Figure 36: Processus général de dégradation des contaminants organiques (Rockne and Reddy, 2003)

6.2. La bioaugmentation : c'est un processus qui implique l'introduction des micro-organismes dans un site contaminé pour améliorer la vitesse de dégradation par l'ajout de substances chimiques, ou le taux de dégradation des polluants complexes par l'ajout de microorganismes efficaces (Leahy and Colwell, 1990 ; Adams *et al.*, 2015). L'amélioration du microbiote d'un site contaminé permettra aussi d'augmenter la capacité génétique du site souhaité (Goswami *et al.*, 2018). Deux facteurs limitent l'utilisation de cultures microbiennes ajoutées aux stations d'épuration. Unités de traitement des sols : 1) Les cultures non indigènes sont rarement compétitives avec la population locale pour développer et maintenir un niveau de population

utile et 2) le sol le plus exposé à long terme à des déchets biodégradables contient des microorganismes indigènes qui dégradent efficacement les polluants organiques (Vidal, 2001).

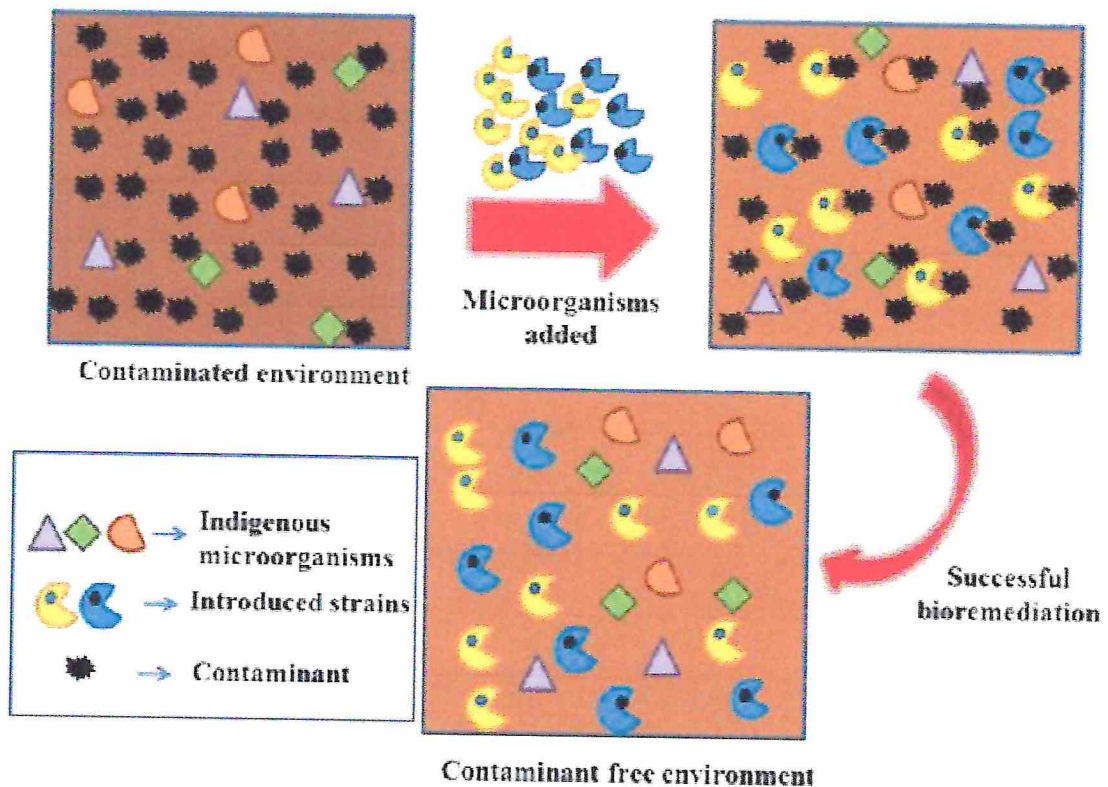


Figure 37 : Principal diagramme de bioaugmentation (Goswami *et al.*, 2018).

6.3. Biostimulation : Elle est considérée comme la méthode la plus efficace de dépollution des hydrocarbures (Adams *et al.*, 2015). C'est une technologie d'assainissement très efficace, rentable et respectueuse de l'environnement (Goswami *et al.*, 2018). Elle consiste à ajouter des nutriments limitant la croissance tels que le phosphore, l'azote, l'oxygène et les donneurs d'électrons à des sites fortement pollués pour stimuler les bactéries existantes à dégrader les polluants dangereux et toxiques (Rhykerd, 1999 ; Tyagi *et al.*, 2011 ; Figure 38)

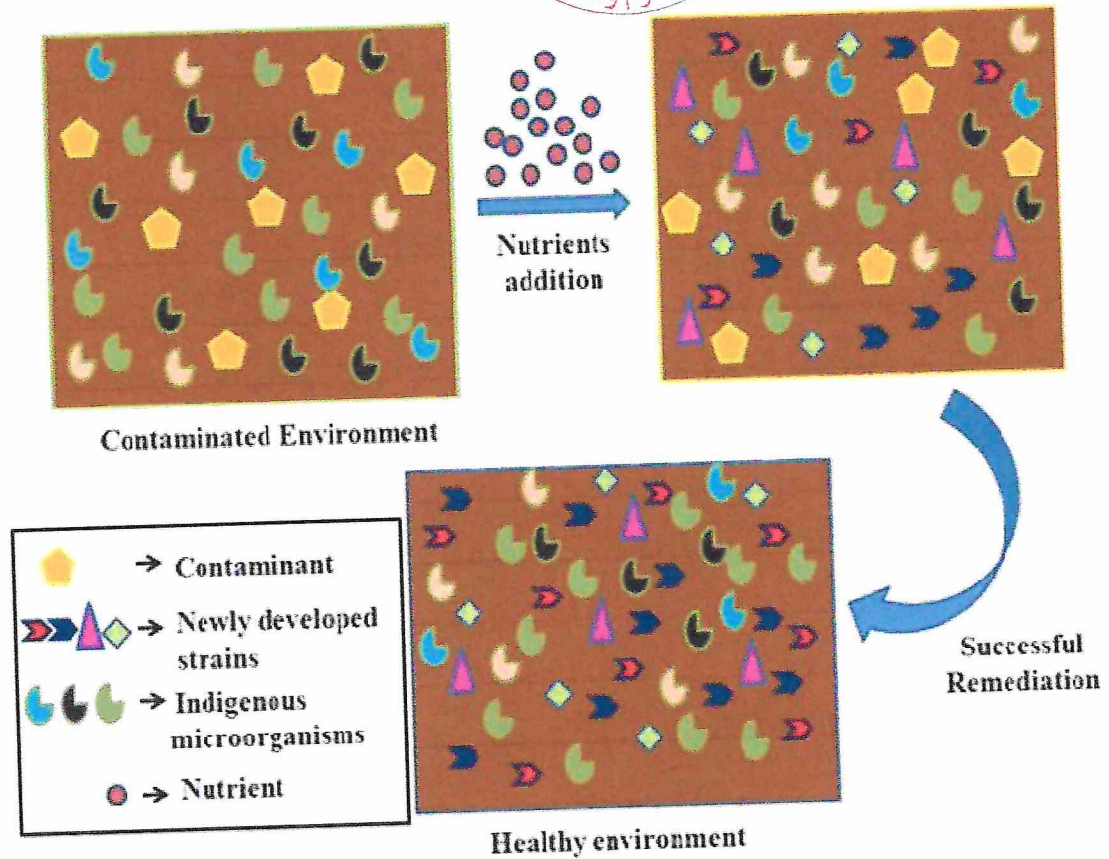


Figure 38 : Principal diagramme de biostimulation (Goswami et al., 2018).

6.4. Le bioventing (bioventilation) : c'est le traitement in situ le plus courant, il consiste à transporter de l'air et des nutriments vers le sol contaminé à travers des puits pour stimuler le métabolisme naturel des bactéries. Autrement dit, la ventilation biologique utilise un faible débit d'air et ne fournit que la quantité d'oxygène nécessaire à la biodégradation tout en minimisant la volatilisation et le rejet des contaminants dans l'atmosphère (Vidal, 2001).

6.5. Le biosparging consiste à injecter de l'air sous pression en dessous du niveau de la nappe phréatique pour augmenter la concentration d'oxygène dans la nappe phréatique et augmenter le taux de biodégradation des polluants par les bactéries présentes dans la nature. Ce processus augmente le mélange dans la zone de saturation, renforçant ainsi le contact entre le sol et les eaux souterraines (Vidal, 2001).

7. Influence de la microflore rhizosphérique sur la phytoremédiation

Les composantes du microbiote de la rhizosphère peuvent améliorer le potentiel phytoremédiateur de la plante par une action directe ou indirecte (Glick et al., 1998). L'aspect



indirect se produit lorsque les microorganismes stimulent la résistance des plantes face aux phytopathogènes et aide la plante à rester saine en s'attaquant aux phytopathogènes. L'aspect direct est synthétisé par le pouvoir biofertilisateur des microorganismes dans le sol.

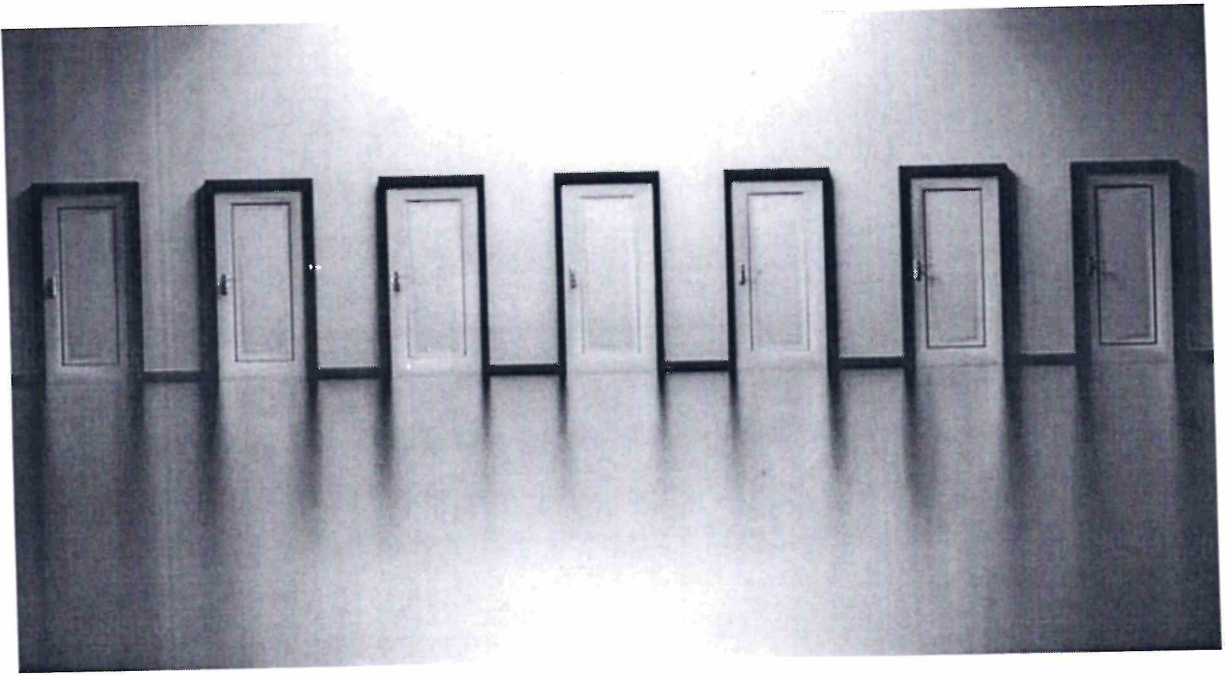
En résumé, le rôle des microorganismes dans la phytoremédiation est très important et peut être exprimé dans les points suivants :

- La détoxification de certains polluants pour mieux permettre leur assimilation par la plante ;
- L'augmentation des activités cataboliques entre le sol et la plante afin de promouvoir la croissance de cette dernière ;
- La stabilisation des polluants dans la rhizosphère pour augmenter leur phytodisponibilité.

8. Avantages

La bioremédiation est une option qui offre la possibilité d'utiliser des activités biologiques naturelles pour détruire ou rendre inoffensifs divers polluants. Par conséquent, il utilise des technologies relativement bon marché et de faible technologie qui sont généralement acceptées par le public et peuvent généralement être mises en œuvre sur site. Cependant, il n'est pas toujours approprié, car la gamme des contaminants sur lesquels elle est efficace est limitée, les délais sont relativement longs, et les niveaux de contaminants résiduels pouvant être atteints ne sont pas toujours appropriés (Vidal, 2001).

- La bioremédiation est un processus naturel, elle est donc en harmonie avec l'environnement. Lorsque les polluants se dégradent, la population biodégradable diminue. Les résidus d'élimination sont généralement inoffensifs et comprennent le dioxyde de carbone, l'eau et la biomasse cellulaire ;
- La bioremédiation peut être utilisée pour détruire complètement divers polluants. De nombreux composés légalement considérés comme dangereux peuvent être transformés en produits inoffensifs ;
- Pas besoin de transférer des polluants d'un milieu environnemental à un autre, vous pouvez complètement détruire le polluant cible in situ ;
- La bioremédiation est économiquement plus intéressante que les autres technologies utilisées pour nettoyer les déchets dangereux.





Conclusion

Le domaine de la microbiologie appliquée comprend l'étude des micro-organismes liés à la biotechnologie dans tous les domaines des activités humaines, tels que la science alimentaire, l'agriculture, l'évaluation de la biomasse, la technologie de contrôle de la pollution et de bioremédiation et la pharmacologie.

De plus, il existe un lien naturel entre la microbiologie appliquée et la microbiologie environnementale. La recherche sur la manière dont les microorganismes interagissent dans l'environnement peut être transformée en domaines d'application pratiques, tels que l'amélioration de la biorestauration, la bioremédiation ou la découverte de métabolites microbiens d'intérêt.

La microbiologie appliquée peut aider à apporter des solutions à certains problèmes environnementaux, tels que :

- Énergie alternative (biocarburant) ;
- Remédiation de la pollution industrielle ;
- Découvrir de nouvelles molécules d'antibiotiques ;
- Créer de nouveaux produits biologiques (par exemple : les bioplastiques) ;
- Etudier l'impact du changement climatique sur l'environnement et notamment sur les micro-organismes car ils jouent un rôle vital dans les cycles biogéochimiques de la matière.



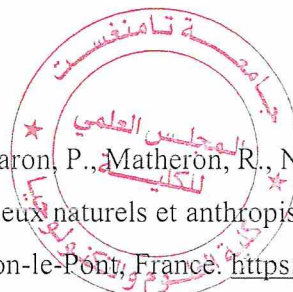
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



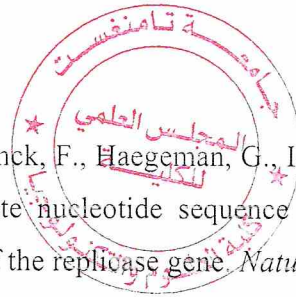


REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Adams, D. W., & Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 642-653.
- [2] Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., & Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), 28-39.
- [3] Altmeyer, N., Abadia, G., Schmitt, S., & Leprince, A. (1990). Risques microbiologiques et travail dans les stations d'épuration des eaux usées. *Documents pour le Médecin du Travail*, 44(34), 373-387
- [4] Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
- [5] Amblard, C., Boisson, J., Bourdier, G., Fontvieille, D., Gayte, X., & Sime-Ngando, T. (1998). Ecologie microbienne en milieu aquatique : des virus aux protozoaires. *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, 11, 145-162.
- [6] Angles, M. L., K. C. Marshall, and A. E. Goodman. 1993. Plasmid transfer between marine bacteria in the aqueous phase and biofilms in reactor microcosms. *Applied Environment Microbiology*, 59, 843-850.
- [7] Bacchin, P. (2006). Cours de biotechnologies et bioprocédés. Procédés de séparation et membranes. Université Paul Sébatier. Toulouse. France. <http://www.patricebacchin.fr/images/doc/teach/bioprocède.pdf>
- [8] Balandreau, J. (2000). La diversité microbienne. *Aménagement et Nature*. DRI CNRS, Ecologie Microbienne, UMR 5557 Centre Nationale de Recherche Scientifique-Université Lyon I. France
- [9] Balzer, M., Witt, N., Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). Faecal indicator bacteria in river biofilms. *Water Science and Technology*, 61(5), 1105-1111.
- [10] Behera, B. C., Yadav, H., Singh, S. K., Mishra, R. R., Sethi, B. K., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia sp.* isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 169-178.



- [11] Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P. (2011). *Écologie Microbienne : Microbiologie des milieux naturels et anthropisés* ; Presses universitaires de Pau et des Pays de l'Adour : Charenton-le-Pont, France. <https://hal.inrae.fr/hal-02810226>
- [12] Bucking, H. & Shachar-Hill, Y. (2005). Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. *New phytologist*, 165, 899-912.
- [13] Byrne, N. (2008). *Etude de la diversité métabolique des micro-organismes des sources hydrothermales* (Doctoral dissertation, Université de Bretagne Occidentale, France). pp205
- [14] Cerniglia, C. E. (1992). The environment, microbes and bioremediation: microbial activities modulated by the environment. *Biodegradation*, 3, 351-357.
- [15] Chastang, T. (2014). *Etude de la synthèse du resvératrol et de ses dérivés (viniférines) par des suspensions de cellules de vigne et optimisation de la production en bioréacteur* (Doctoral dissertation, Châtenay-Malabry, Ecole centrale de Paris, France).p65
- [16] Chastel, C. (1992). History of viruses from smallpox to AIDS. *History of viruses from smallpox to AIDS*. Éditions Boubée, France. 413pp
- [17] Chen, G., Song, X., & Richardson, T. J. (2006). Electron microscopy study of the LiFePO₄ to FePO₄ phase transition. *Electrochemical and Solid State Letters*, 9(6), A295.
- [18] Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 11(3-4), 217-221.
- [19] De Beer D., Stoodley P., Lewandowski Z. (1994) Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*,44, 636-641.
- [20] Declerck, P. (2010). Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology*, 12(3), 557-566.
- [21] Donlan, RM. (2002). Biofilms : Microbial lifes on surfaces, *Emergence Infection Diseases*, 8, 881-890
- [22] Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Review*, 15, 167-193
- [23] Dudkowski, A. (2000). L'épandage agricole des boues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines. *Courrier de l'environnement de l'INRA*, 41, 134-135.
- [24] Feng, G., Zhang, X., Li, X., Tian, C., Tang, C. & Rengel, Z. (2002). Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza*, 12, 185-190.



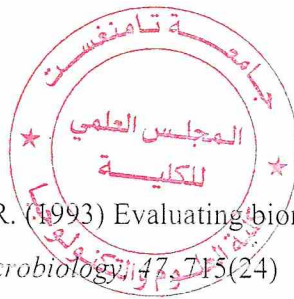
- [25] Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., ... & Volckaert, G. (1976). Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature*, 260(5551), 500-507.
- [26] Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.
- [27] Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A., & Perret, X. (1997). Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*, 387(6631), 394-401.
- [28] Furlan, V. (1990). *International directory of mycorrhizologists*. Station de recherches, Agriculture Canada. 4^{ème} Edition, pp166.
- [29] Goldstein, A.H. (1994). Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. In: Torriani-Gorini A, Yagil E, Silver S (eds) Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, DC, pp 197-203
- [30] Goswami, M., Chakraborty, P., Mukherjee, K., Mitra, G., Bhattacharyya, P., Dey, S., & Tribedi, P. (2018). Bioaugmentation and biostimulation: a potential strategy for environmental remediation. *Journal Microbiology Experiences*, 6(5), 223-231.
- [31] Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B., & Tewari, R. (2012). Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiological research*, 167(6), 358-363.
- [32] Gyaneshwar PG, Nareshkumar G, Parekh LJ, Poole PS (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*, 245:83-93.
- [33] Hausner, M. & Wuertz S. (1999). High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3710-3713.
- [34] Jones, D.L., Farrar, J., Giller, K.E. (2003). Associative Nitrogen Fixation and Root Exudation - What is Theoretically Possible in the Rhizosphere? *Symbiosis*, 35, 19-38.
- [35] Joubert, N. (2006). *Synthèse et évaluation de nouveaux nucléosides ciblant l'hépatite C dans un système réplicon* (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).pp23
- [36] Jouenne T. (2008). Biofilms bactériens. Techniques de l'ingénieur, Bioprocédés, BIO600. <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=21714839>
- [37] Killhm, K. (1994). Soil Ecology. Cambridge University Press. U.K. 231pp



- [38] Khan MS, Zaidi A, Ahemad M, Oves M, Wani PA (2010) Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi-current perspective. *Archives in Agronomy Soil Sciences*, 56, 73–98
- [39] Khan, M. S., Zaidi, A., & Ahmad, E. (2014). Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In *Phosphate solubilizing microorganisms* (pp. 31-62). Springer, Cham
- [40] Kneip, C., Lockhart, P., Voß, C., & Maier, U. G. (2007). Nitrogen fixation in eukaryotes–new models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 55.
- [41] Kokare, C.R., Chakraborty, S., Khopade, A.N. and Mahadik, K.R. (2009) Biofilm: Importance and Applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 159-168.
- [42] Leahy, J.G., & Colwell, R.R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological reviews*, 54(3), 305-315.
- [43] Leung, M. (2004). Bioremediation: techniques for cleaning up a mess. *Journal of Biotechnology*, 2, 18-22.
- [44] Le Gall, J. (1975). Bactéries sulfato-réductrices : enzymologie de la reduction dissimilative des sulfates. *Plant and Soil*, 43(1-3), 115-124.
- [45] Lemmel, F. (2019). Diversités taxonomique et fonctionnelle des communautés microbiennes en lien avec le cycle du carbone dans un gradient de sols multi-contaminés (Doctoral dissertation, Université de Lorraine). pp256.
- [46] Lin, T.F., Huang, H.I., Shen, F.T., & Young, C.C. (2006). The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. *Bioresource Technology*, 97(7), 957-960.
- [47] Macura, J., Kubátová, Z. (1973). Control of carbohydrate utilization by soil microflora. *Soil Biology and Biochemistry*, 5, 193–204.
- [48] Mahy, B. W. (2005). Introduction and history of foot-and-mouth disease virus. In *Foot-and-Mouth Disease Virus*. Springer, Berlin, Heidelberg. Pp1-8.
- [49] Middelboe, M., & Brussaard, C. P. (2017). Marine viruses: key players in marine ecosystems. *Viruses*, 9(10), 302.
- [50] Mueller J.G., Cerniglia C.E., Pritchard P.H. (1996). Bioremediation of Environments Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In *Bioremediation: Principles and Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 125–194.
- [51] Mullen, M.D. (2005) Phosphorus in soils: biological interactions. In: Hillel D (ed) *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier, Oxford, pp 210–215



- [52] Pamiske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews: Microbiology*, 6, 763-775.
- [53] Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., & Kaushik, S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 379-391.
- [54] Pédro, G. (2007). Cycles biogéochimiques et écosystèmes continentaux. EDP sciences. Numéro 27 de Rapport sur la science et la technologie, pp427.
- [55] Picard, C. (2011). *Transfert de matière dans un biofilm aéré sur membrane* (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III). pp203.
- [56] Plagellat, C. (2004). Origines et flux de biocides et de filtres uv dans les stations d'épuration des eaux usées (Thèse de doctorat). Lausanne, EPFL, France. pp244
- [57] Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., Bacq-Calberg, C. M., & Dusart, J. (2003). Microbiologie, 2ème édition française. *Éditions De Boeck Université, Bruxelles, Belgique*. Pp1163.
- [58] Rhykerd, R. L., Crews, B., McInnes, K. J., & Weaver, R. W. (1999). Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil. *Bioresource Technology*, 67(3), 279-285.
- [59] Rivkin, R.B., Anderson, R. (1997). Inorganic nutrient limitation of oceanic bacterioplankton; *Limnology Oceanography* 42(4), 730- 740.
- [60] Rockne, K., & Reddy. K. (2003) Bioremediation of Contaminated Sites. University of Illinois at Chicago. Invited Theme Paper, International e-Conference on Modern Trends in Foundation Engineering: Geotechnical Challenges and Solutions, Indian Institute of Technology, Madras, India, pp22
- [61] Rodriguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil*, 287,15–21
- [62] Roux S. (2013). Diversité, évolution et écologie virale : des communautés aux génotypes. Analyse bioinformatique de métagénomés viraux. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal
- [63] Roy-Bolduc, A., & Hijri, M. (2011). The use of mycorrhizae to enhance phosphorus uptake: a way out the phosphorus crisis. *Journal of Biofertilizers and Biopesticides*, 2(104), 1-5.
- [64] Shanahan P. (2004). Bioremediation. Waste Containment and Remediation Technology, Spring 2004, Massachusetts Institute of Technology, MIT OpenCourseWare.



- [65] Shannon, M.J. and Unterman, R. (1993) Evaluating bioremediation: distinguishing fact from fiction. *Annual Review of Microbiology*, 47, 715(24)
- [66] Smith S.E., Jakobsen I., Gnilund M. & Smith F.A. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant physiology*, 156, 1050-1057.
- [67] Smith SE, Read DJAP (2008) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London.
- [68] Stetter, K.O. (2006). History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles*, 10, 357-362.
- [69] Stewart P.S. (2003). Diffusion in biofilms. *Journal of bacteriology*, 185 (5), 1485-1491.
- [70] Straub, T. M., & Chandler, D. P. (2003). Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 53(2), 185-197.
- [71] Sutherland I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3-9.
- [72] Sutherland, I.W. (2001). The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9, 222-227
- [73] Suttle C.A., 1994. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microbial Ecology*, 28, 237-243.
- [74] USMicrobics. (2003) Annual Report FY-2003. https://www.annualreports.com/HostedData/AnnualReportArchive/g/NYSE_GPS_2003.pdf
- [75] USEPA Mine Waste Technology Program. (2002). Activity III, Project 12: sulfatereducing bacteria reactive wall demonstration. Final Report. <http://www.epa.gov/ORD/NRMRL/std/mtb/mtbdocs/actiiiproj12.pdf>; 2002.
- [76] Trivedi P, Sa T (2008). *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. *Curr Microbiol* 56:140–144.
- [77] Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231-241.
- [78] Van Loosdrecht, M. C. M., Eikelboom, D., Gjaltema, A., Mulder, A., Tjihuis, L., & Heijnen, J. J. (1995). Biofilm structures. *Water Science and Technology*, 32(8), 35.
- [79] Vessey J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil.*, 255(2): 571-586.



- [80] Vidali, M. (2001). Bioremediation. an overview. *Pure and applied chemistry*, 73(7), 1163-1172.
- [81] Violle, C., Navas, M. L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., & Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be functional!. *Oikos*, 116(5), 882-892.
- [82] Vyas P, Gulati A (2009). Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiol*, 9:174
- [83] Watnick, P., & Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of bacteriology*, 182(10), 2675-2679.
- [84] Wingender, J., Neu, T. & Flemming, H.-C. (1999). in Microbial Extracellular Polymeric Substances (eds Wingender, J., Neu, T. & Flemming, H.-C.) pp1-19, Springer, Heidelberg.
- [85] Wingender, J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A. & Flemming, H.-C. Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Enzymology*. 336, 302-314 (2001).
- [86] Xavier, J. B. & Foster, K. R. (2007). Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proc. National Academy of Sciences USA*, 104, 876-881.
- [87] Zaidi, A., Khan, M., Ahemad, M., & Oves, M. (2009). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 56(3), 263-284.
- [88] Zaitlin, M. (1998). The discovery of the causal agent of the tobacco mosaic disease. In *Discoveries In Plant Biology*, 1, 105-110.
- [89] Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., & Chen, Q. (2014). Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiological research*, 169(1), 76-82.