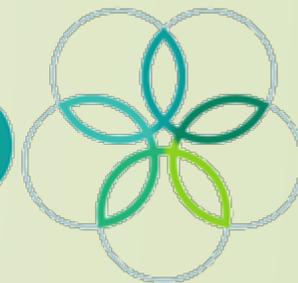


Olympiades  
Françaises de  
Biologie

INTERNATIONAL  
BIOLOGY  
OLYMPIAD e. V.

IBO



# Analyse Microbiologique

1

Réalisé par : Marie-Line DAVERAN-MINGOT  
Université Toulouse III - Paul Sabatier  
Laboratoire: Toulouse Biotechnology Institute (TBI)

Document de préparation à la sélection française  
aux Olympiades Internationales de Biologie



## Analyse Microbiologique de 2 écosystèmes

Recherche de d'une famille de microorganismes

- **Isolement**

**Actinomycètes**

Diversité microbienne

Détection de métabolismes particuliers

**Collaboration**

**Agro**nutrition



Qualité bactériologique d'une eau

- **Isolement** et **identification**
  - ✓ de germes pathogènes
  - ✓ de germes indicateurs
    - Potabilité d'une eau?

## → Les différents types de milieu

<http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/milieux.html>

### MILIEU SYNTHETIQUE

- Milieu qui doit fournir une source d'énergie et des éléments tels que le carbone, l'azote, le soufre, le phosphore et des facteurs de croissance.
- La composition chimique de ce milieu est connue.

Milieu acide humique

### MILIEU COMPLEXE

- Aussi appelés milieux empiriques.
- Contiennent des ingrédients dont la composition chimique est indéterminée.

Milieu PCA

Milieu CPS

### MILIEU SELECTIF

- Inhibe la croissance des bactéries indésirables et stimule celle des microbes recherchés
- Contiennent des agents inhibiteurs ( Ab, sel, colorant)

Milieu Chapman

Milieu Baird-Parker

Milieu Tergitol-TTC

Milieu Acide Humique



### MILIEU DIFFERENTIEL

- Facilite la distinction entre les colonies de la bactérie recherchée et les autres colonies présentes sur le même milieu.

Milieu Baird-Parker

Milieu Chapman

Milieu Tergitol-TTC



Milieux chromogènes

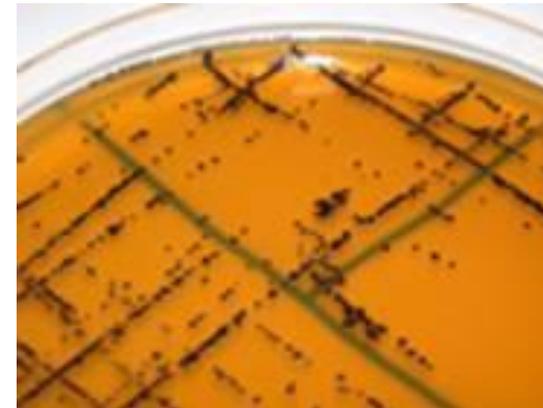
## MILIEU ACIDE HUMIQUE (synthétique sélectif)

ac.humique	1g
KCl	1.7g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5g
FeSO <sub>4</sub>	10mg
CaCO <sub>3</sub>	20mg
Oligo-éléments	1ml
H <sub>2</sub> O qsp 1L	
Gélose	18g



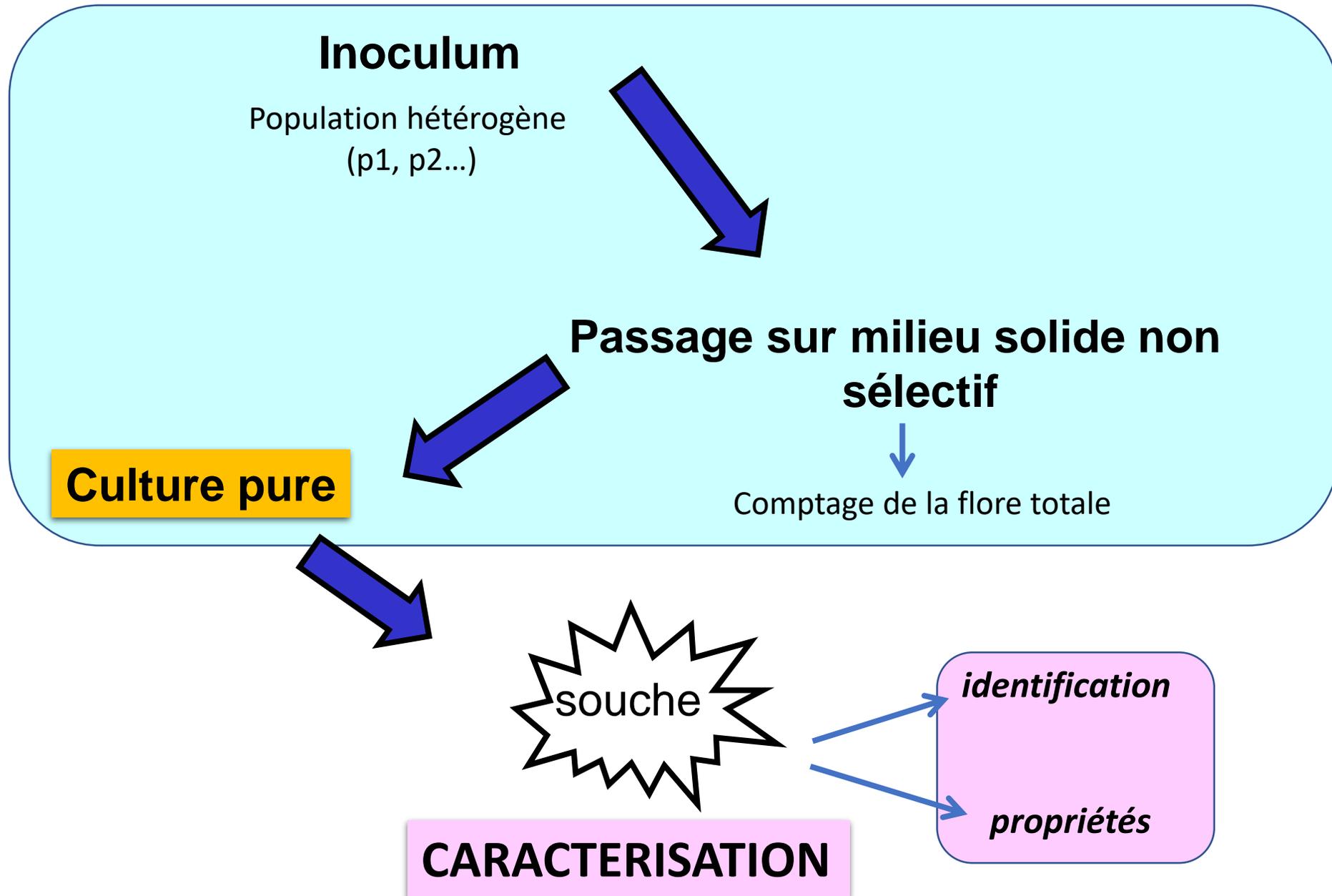
## MILIEU BAIRD-PARKER (complexe , sélectif et différentiel)

Tryptone	10g
Extrait de viande	5g
Extrait de levure	1g
Pyruvate de Na	10g
Glycine	12g
LiCl	5g
Emulsion de jaune d'œuf	47ml
Tellurite de K (à 2,5%)	2ml
H <sub>2</sub> O qsp 1L	
Gélose	18g

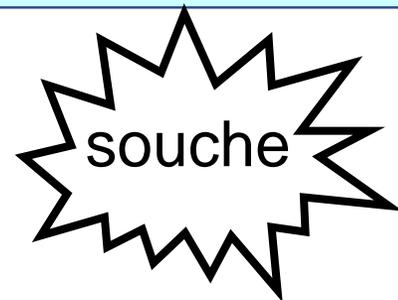
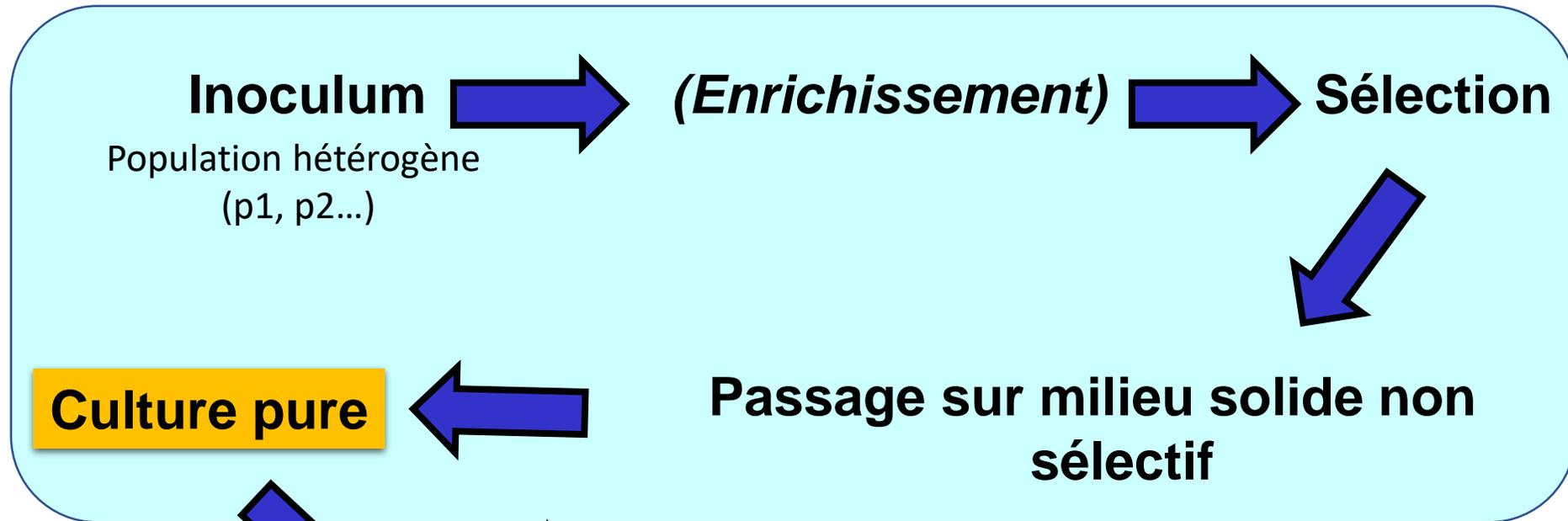


# ISOLEMENT

Culture pure



ISOLEMENT



CARACTERISATION

## Critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les eaux de consommation

### Flore autochtone



Milieu non sélectif, 22°C, 72h



### Flore allochtone



37°C, 24h

Recherche directe  
de pathogènes

- ✓ *Staphylococcus aureus*
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa*
- ✓ *Salmonella*
- ✓ *Clostridium sulfito-réducteurs*

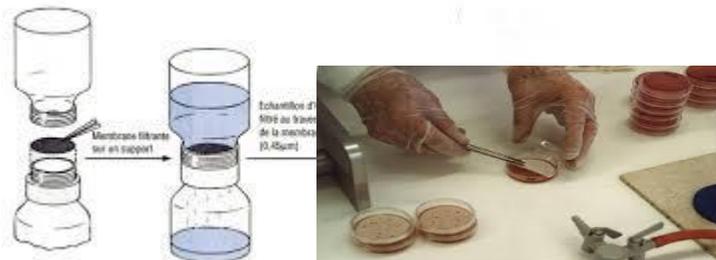
Recherche de  
germes indicateurs:

- ✓ **coliformes totaux,**
- ✓ **coliformes fécaux**
- ✓ streptocoques fécaux

## Critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les eaux de consommation

	Microorg aérobies totaux (37°C , 24h)	Microorg aérobies totaux (22°C , 72h)	Coliformes	Coliformes fécaux	<i>Staph aureus</i>	<i>Clostridium</i> sulfito- réducteurs	<i>Salmonella</i>
Eaux en bouteille	20/ml	100/ml	0/250ml	0/250ml	0/100ml	0/50ml	0/5L
Eaux de baignade			10 <sup>4</sup> /100ml	2.10 <sup>3</sup> /100ml			0/1L
Eau de piscine	100/ml		10/100ml	0/100ml			

## Recherche de Staphylocoques



### Autres tests

Catalase, mobilité, présence de spores

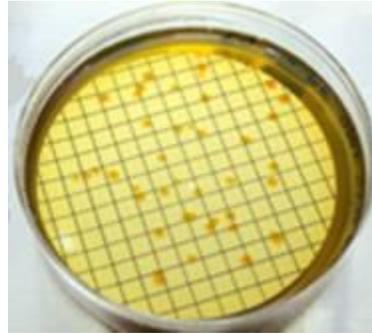
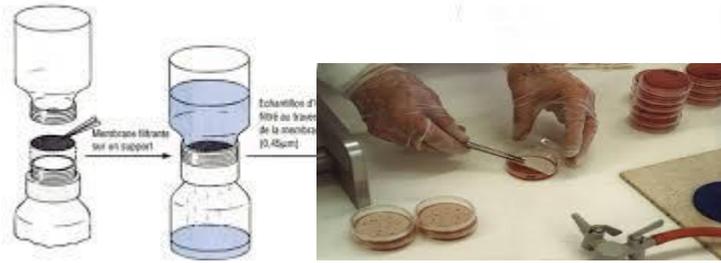


**Milieu Chapman**  
Staphylocoques et  
suspicion de *S. aureus* (auréole jaune)



**Milieu Baird-Parker**  
Confirmation de *S. aureus*  
(colonies noires)

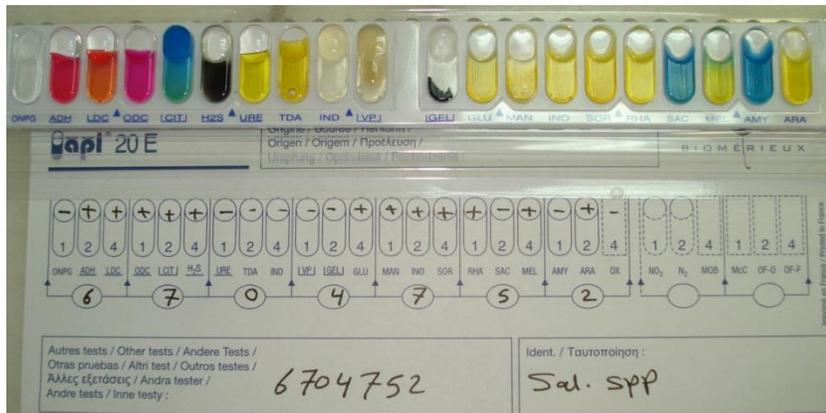
## Recherche de coliformes

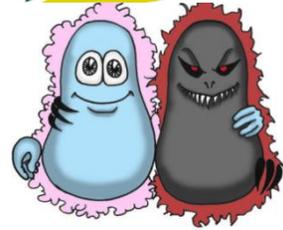


**Milieu TTC-Tergitol**  
suspicion de *E. coli*  
(colonie et halo jaune)

**Oxydase -**  
(**Enterobacterias**  
*Xanthomonas...*)

**Oxydase +**  
(*Vibrio, Pseudomonas,*  
*Aeromonas...*)



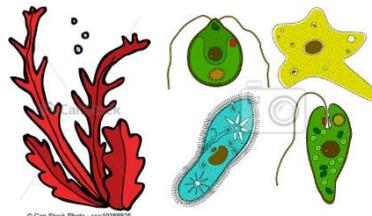


**$10^9$  cfu de bactéries / g de rhizosphère et jusqu'à  $10^7$  cfu d'Actinomycètes (*Streptomyces, Micromonospora, Microbispora, Frankia ...*) et quelques cyanobactéries ?**

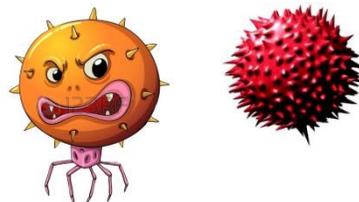


**$10^5$  cfu de champignons / g**

**1 g de terre**

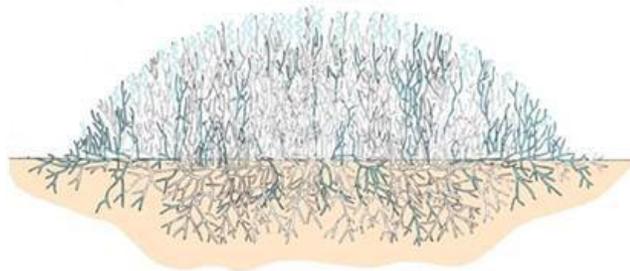


**$10^4$  cfu d'algues, protozoaires, virus... / g**

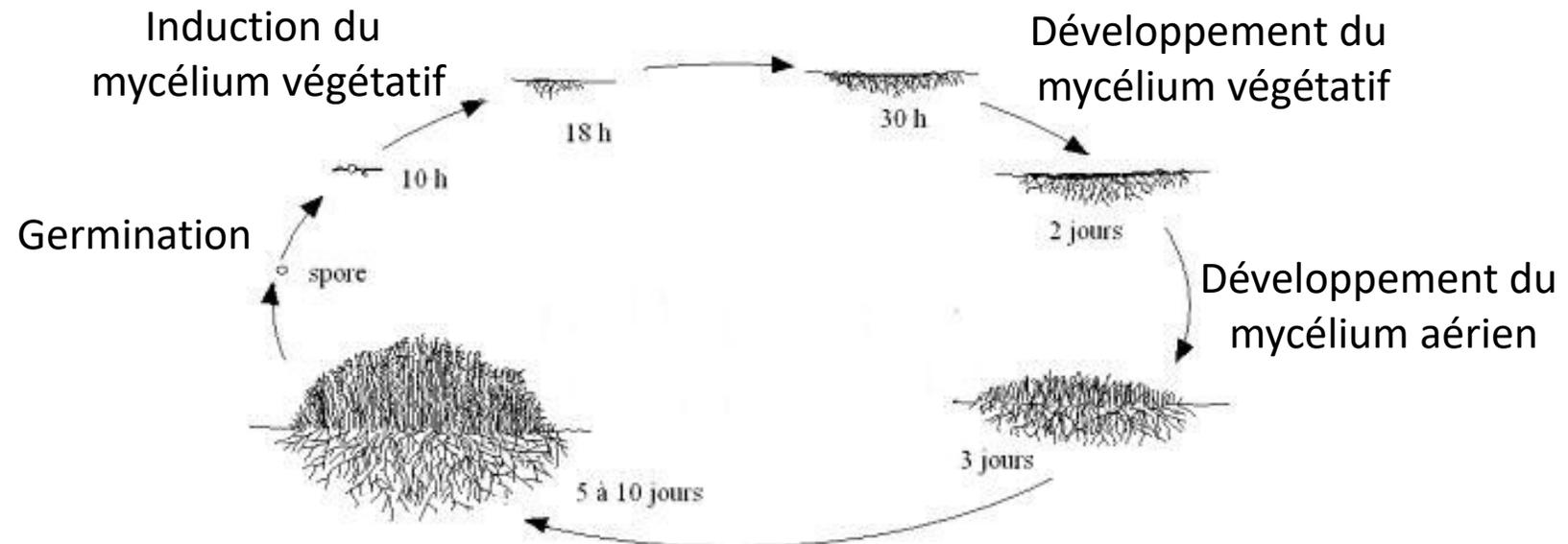


## Morphologie et cycle de reproduction des Actinomycètes

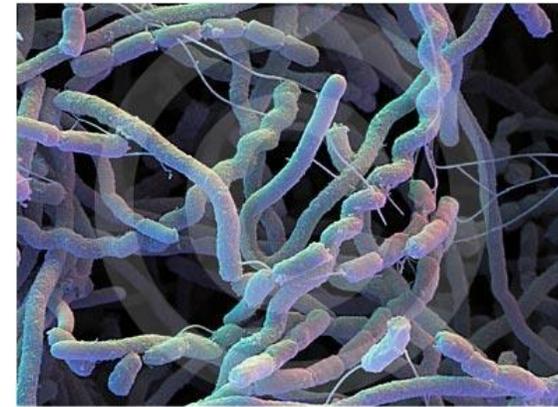
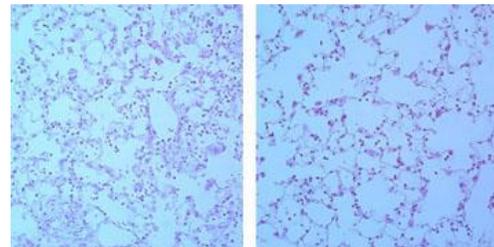
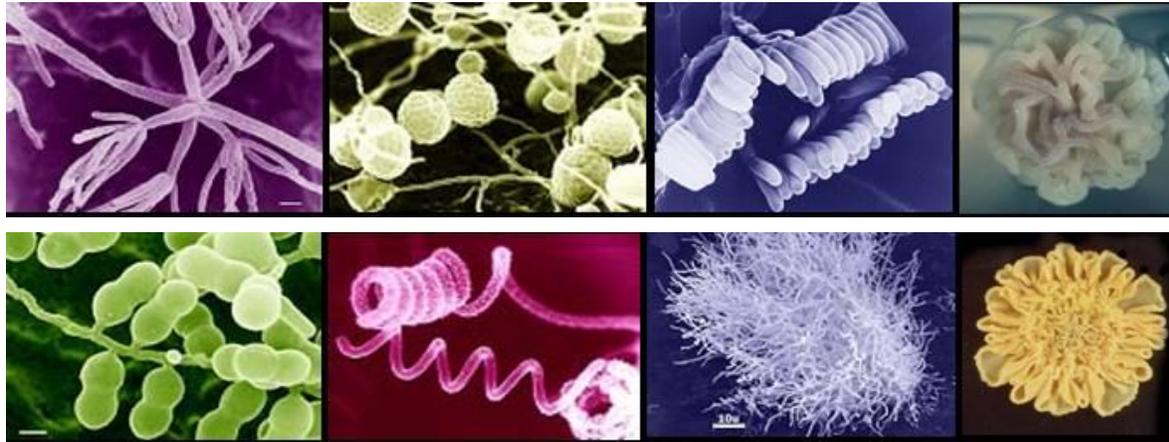
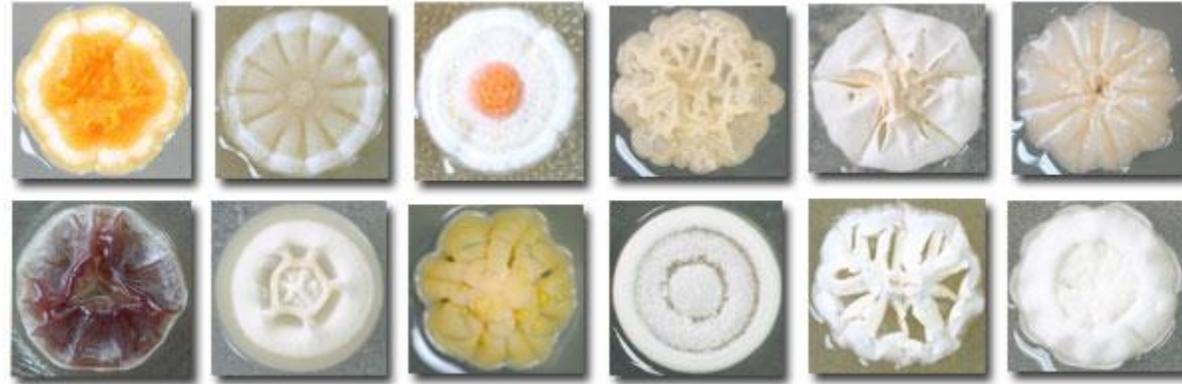
### Caractéristiques



- Bactéries
- Gram +
- Structure végétative très souvent mycélienne et capable de sporuler
- GC % > 55%
- Hétérotrophe, croissance lente , 27°C , aérobie

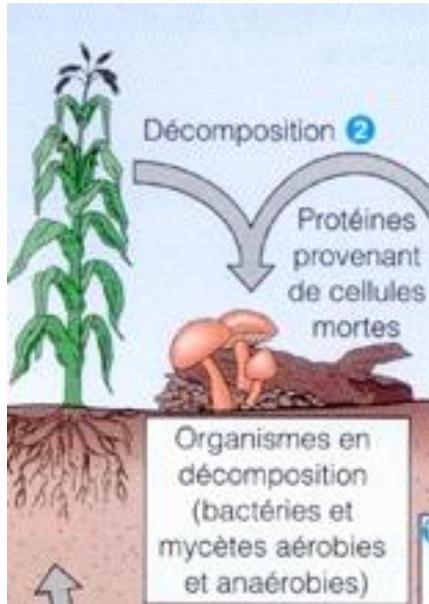


## Grande diversité morphologique





## Rôle écologique des Actinomycètes



**Décomposeurs**

MO morte → CO<sub>2</sub> + ac humiques

**Actinomycètes**

CO<sub>2</sub>

## Fréquence des différents genres d'Actinomycètes dans le sol

Genres	Pourcentage (%)
<i>Streptomyces</i>	95,34
<i>Nocardia</i>	1,98
<i>Micromonospora</i>	1,40
<i>Thermomonospora</i>	0,22
<i>Actinoplanes</i>	0,20
<i>Microbispora</i>	0,18
<i>Mycobacterium</i>	0,14
<i>Streptosporagium</i>	0,10
<i>Actinomadura</i>	0,10
<i>Microspolyspora</i>	0,10
<i>Pseudonocardia</i>	0,06
<i>Microellbosporia</i>	0,04

## Intérêt industriel des Actinomycètes

Microorganismes	Antibiotique
<b>Bactéries</b>	
<i>Streptomyces</i> sp.	Chloramphénicol Erythromycine Kanamycine Néomycine Nystatine Rifampycine Streptomycine Tétracycline
<i>Micronospora</i> sp	Gentamycine
<i>Bacillus</i> sp.	Bacitracine Polymyxines
<b>Mycètes</b>	
<i>Penicillium</i> sp.	Griséofulvine Pénicilline
<i>Cephalosporum</i> sp.	Céphalosporines

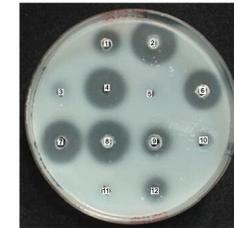
Mais aussi de nombreuses molécules à activités variées:  
PGPR, enzymes vitamines, acides aminés...

A partir d'une collection de souches d'Actinomycètes



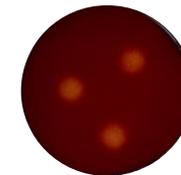
## Recherches d'enzymes

*Protéases*



*Cellulase*

Dégradation de carboxy-méthyl cellulose



## A partir d'une collection de souches d'Actinomycètes

**Recherches d'activités phytostimulatrices**  
« Plant Growth Promoting Rhizobacteria » ou PGPR

### biodisponibilité de certains nutriments

- ✓ solubilisation du phosphate
  - Pinorganique → prod d'acide

- ✓ solubilisation de la silice

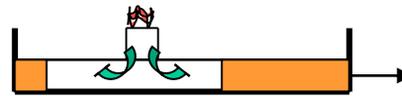
#### **Silicate solubilizing bacteria (SiSB)**

- Silice → acide orthosilicique



A partir d'une collection de souches d'Actinomycètes

Recherches de **métabolites secondaires**  
**Antibiotiques, antifongiques**



Milieu ensemencé dans la masse avec  
une souche indicatrice





## A partir d'une collection de souches d'Actinomycètes

***Inhibition ou activation de croissance:  
Compétition ou synergie entre souches***



Souches indicatrices et actinomycètes seront ensemencées  
en même temps

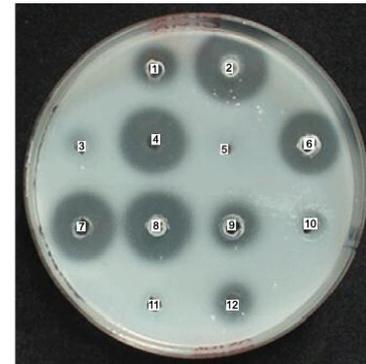






TABLEAU 1

PRELEVEMENT	
Noms et Prénoms du binôme	
Groupe et lettre affectée au Binôme	
Région du prélèvement de la terre	
Coordonnées GPS	
Type de terre (jardin particulier, champs cultivé...)	
Nature du sol (argileux, calcaire....)	
date du prélèvement	
Observations utiles (endroit avec animaux, végétation abondante...)	
pH de la terre	
Richesse en actinomycètes	- Dilution comptable = - Concentration en cfc/g de terre =





## Feuille de résultats

## Agro nutrition

### TABLEAU 3

<b>Nom Binôme:</b>		<b>Lettre Binôme</b>			
<b>Groupe:</b>					
	<b>Tests enzymatiques</b>	<b>Antibiogramme (méthode des carottes)</b> $\phi$ d'inhibition (mm)			
<b>Souche</b>	<b>Test Protéase</b> + à +++	<b>E coli</b>	<b>Bacillus subtilis</b>	<b>Micrococcus luteus</b>	<b>Mucor</b>

### TABLEAU 4

<b>Nom Binôme:</b>					<b>Lettre Binôme</b>
<b>Groupe:</b>					
		<b>Test d' activation ou de synergie de croissance</b> $\phi$ d'inhibition (mm) ou $\phi$ d'activation (mm)			
<b>Souche</b>	<b>Inhibition</b> ou <b>Synergie</b>	<b>E coli</b>	<b>Bacillus subtilis</b>	<b>Micrococcus luteus</b>	<b>Mucor</b>