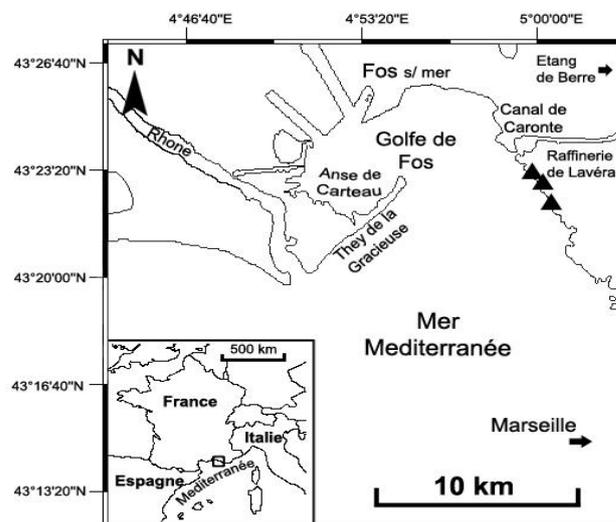


Ce TP a pour but l'exploration de la communauté bactérienne d'un sédiment marin ainsi que l'acquisition de différentes techniques nécessaires dans un laboratoire d'écologie microbienne. Une partie est basée sur le dénombrement des bactéries aérobies et anaérobies cultivables sur milieu liquide avec la visualisation de l'effet de la température sur le nombre de bactérie aérobie, et une autre partie est basée sur la biologie moléculaire, avec l'extraction d'ADN chromosomique bactérien, amplification d'un fragment de gène (qui code pour l'ARN 16s) et visualisation de ces fragments sur gels d'agarose et d'acrylamide. L'étude a été réalisée à partir de sédiments marins prélevés au niveau du Golf de Fos, Anse de carton en novembre 2005, et qui ont été placés en colonne de Winogradsky.

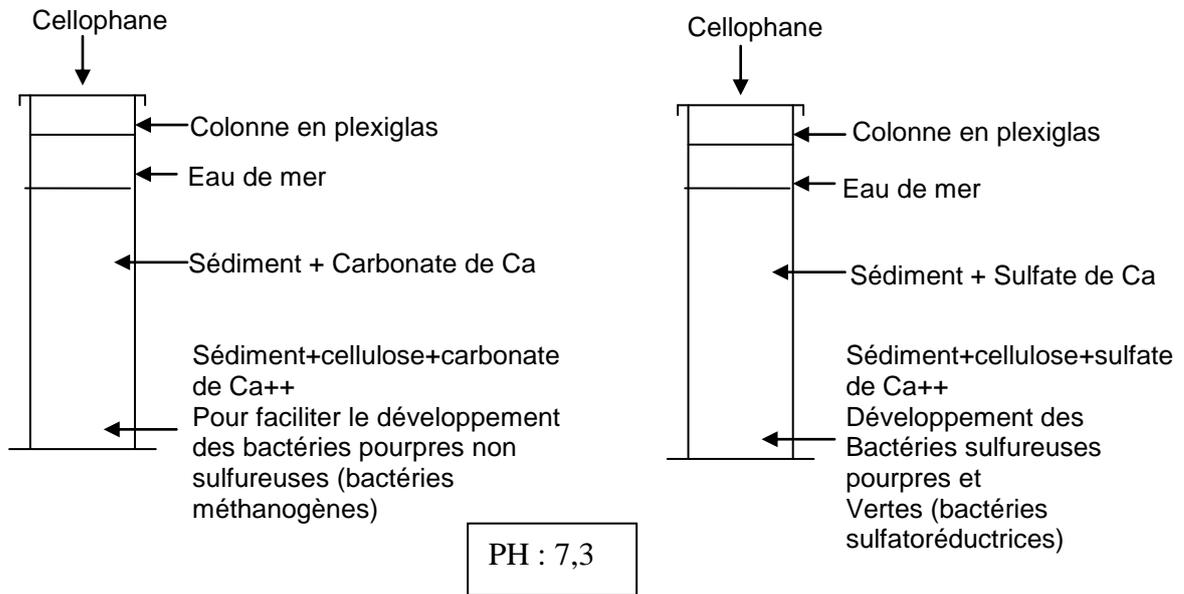


I Matériels et méthodes

1) Colonne de Winogradsky

Cette colonne permet la culture de divers microorganismes simultanément en raison de leur interdépendance dans la nature. Dans chaque colonne, il y a création d'un « mini écosystème » centré sur le cycle du soufre.

Schématisation de la colonne de Winogradsky



2) Préparation des milieux de culture

→ Préparation du milieu

Dans 500 ml d'eau distillée, plusieurs sels sont ajoutés, à des quantités bien définies. Puis après dissolution de ces derniers, le volume est complété qsp 600 ml avec de l'eau distillée.

→ Répartition du milieu

Le milieu liquide est réparti en 7 séries de 9 tubes de 9 ml. Chaque tube étant notés par la lettre du binôme.

→ Stérilisation

Tous les tubes sont passés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes. Une fois l'autoclave terminée, il faut veiller à garder les tubes bien droit de manière à ne pas contaminer le milieu de culture stérile par le bouchon qui lui n est pas stérile.

3) Echantillonnage de la colonne de Winogradsky

Retrait de l'eau de surface : Présence d'un biofilm bactérien car l'eau est stagnante (mais nous n'en tenons pas compte). Le sédiment est ensuite coupé en tranche, en différents horizons. Chacun d'eux est attribué à un binôme :

Groupe A : Colonne avec Carbonate de Ca, couche de surface

..... B :milieu

.....C :fond

.....D :Sulfate de Ca,surface

.....E :milieu

.....F :fond

.....G :surface

.....H :milieu

.....I :fond

.....J :Carbonate de Ca,surface

.....K :milieu avec zone oxygène plus claire
(présence d'un fragment de tapis microbien).

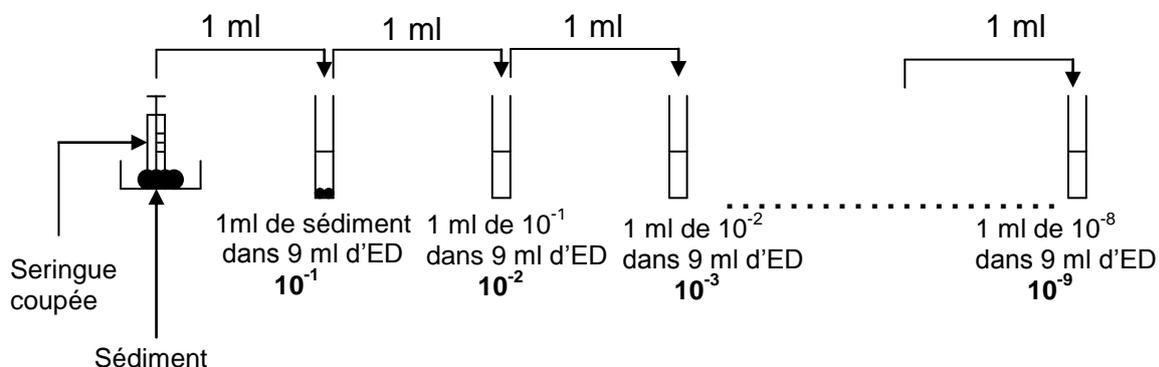
Remarques :

Lors du découpage, présence d'une odeur forte traduisant une forte activité hétérotrophe : les bactéries sulfatoréductrices produisent du soufre lors de la dégradation de la matière organique.

L'odeur est plus forte dans les colonnes avec le sulfate de Calcium car il y a beaucoup plus de sulfatoréduction mais il y a également production de soufre dans les colonnes à Carbonate de Calcium car des sulfates sont naturellement présents dans le sédiment.

Après découpage des différents horizons, dilution stérile de l'échantillon, puis réalisation d'une gamme de dilution. Toute cette manipulation est faite en zone stérile.

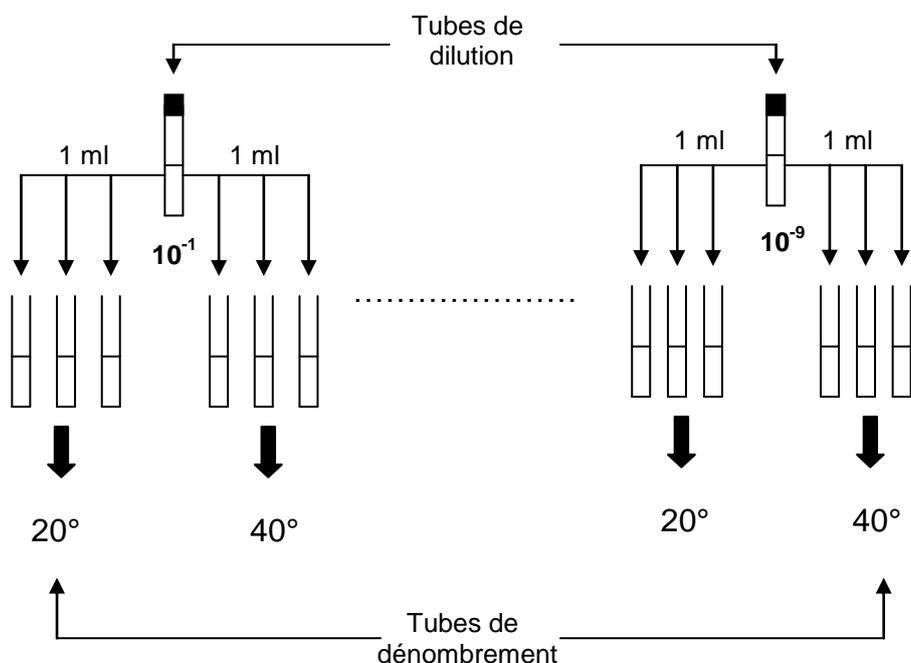
Schématisation de la dilution en cascade



Remarque : Attention à bien changer de pipette à chaque dilution et bien homogénéiser.

4) Ensemencement des milieux liquides

Ensemencement pour le dénombrement des microorganismes anaérobies s'effectue dans 3 tubes Venoject par dilution. Et l'ensemencement pour le dénombrement des microorganismes aérobies consiste à ensemercer 1 ml de chacune des dilutions (de 10^{-1} à 10^{-9}) stérilement dans 9 ml du milieu de culture. Six tubes pour chaque dilution, trois seront incubés à 20°C et trois autres à 40°C .



Remarque : Utilisation d'une seule pipette pour tous les ensemencements en commençant par la dilution 10^{-9} .

5) Extraction de l'ADN total de l'échantillon de sédiment

L'extraction de l'ADN total de l'échantillon de sédiment a été réalisée avec un kit du commerce, l'UltracleanTM soil DNA Isolation kit (Mobio laboratoire, Inc.)

Le protocole à suivre se trouve dans le poly du TP.

Afin de réaliser l'extraction, une quantité connue de sédiment a été pesé, et plusieurs solutions du kit ayant une fonction particulière pour chaque étape de l'extraction, ont été mises en présence :

- Sédiment pesé : 0,35g
- Solution S1 et IRS : servent à décrocher les bactéries des particules de sédiment, ceci étant également aidé par la solution et les microbilles contenues dans le tube à capuchon à vis. Lors de l'agitation, les bactéries sont décochées du sédiment.
- Etape de centrifugation, permettant de retirer le sédiment présent (culot).
- Solution S2 : Permet de lyser les cellules bactériennes. Le contenu cellulaire est alors libéré dans le milieu.
- Centrifugation, puis retrait du culot de déchet cellulaire.
- Solution S3 : sert à précipiter l'ADN. Cette étape est réalisée avec un tube « spinfilter » : l'ADN précipite et reste collé sur le filtre.
- Centrifugation permettant de filtrer le reste du liquide (récupération de tout l'ADN sur le filtre).
- Solution S4 : Permet d'éliminer, de « laver » du filtre tout ce qui n'est pas de l'ADN. Le filtre contenant l'ADN est placé dans un nouveau tube, avant l'ajout de la dernière solution.
- Solution S5 : cette solution permet de dissoudre l'ADN. Centrifugation.

Le filtrat obtenu contient l'ADN bactérien en solution dans 50µl de S5.

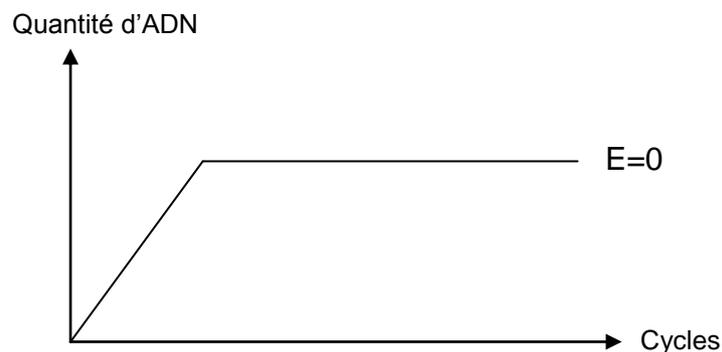
6) Quantification de l'ADN

Analyse spectrophotométrique :

Dans un premier temps lecture du blanc, 55 μ l d'eau distillée dans une cuve, puis ajout de 5 μ l d'ADN extrait (brut), et l'appareil lit les absorbances aux longueurs d'onde de 260 et 280 nm. Il calcule ensuite le rapport 260/280, donne la concentration avec 1UA=50 ng. μ l⁻¹ d'ADN, et prise en compte d'une correction sur absorbance à 320nm.

7) Amplification par PCR

Son but est d'amplifier de l'ADN, à chaque étape on multiplie par deux la quantité d'ADN présent en réaction. L'efficacité de la PCR diminue à chaque cycle car il y a diminution de la quantité de dNTPs, de primers, et d'enzymes (qui diminue du fait des variations de température et de pH).



Les réactifs doivent être ajoutés dans l'ordre indiqué dans le protocole.

Expression en concentration finale des réactifs de la PCR :

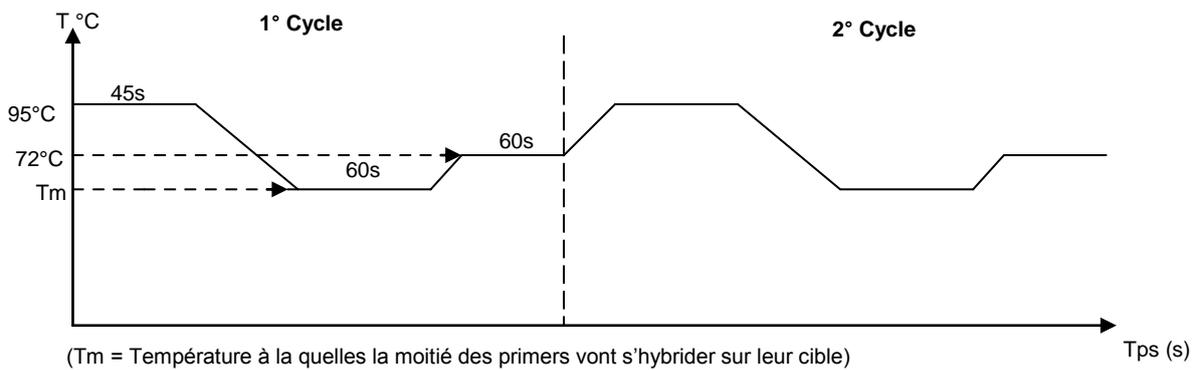
- Tampon de polymérase : Concentration initiale = 10X
4 μ l dans 40 μ l, donc dilution au 1/10°
Concentration finale = **1X**
- dNTP : Concentration initiale = 1mM
4 μ l dans 40 μ l, donc dilution au 1/10°
Concentration finale = **0,1 mM**

- MgCL2 : Concentration initiale = 25 mM
2,4µl dans 40µl, donc dilution au 1/16°
Concentration finale = 1,5mM
- Amorce DGGE : Concentration initiale = 25 pmol/µl
= 50 pmol pour 2µl, dans 40µl
Concentration finale = 1,25 pmol/µl
- Amorce 907R : Concentration initiale = 25 pmol/µl
= 50 pmol pour 2µl, dans 40µl
Concentration finale = 1,25 pmol/µl

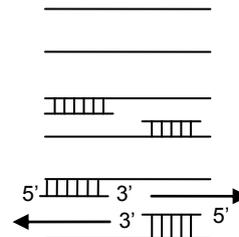
Attention : la Taq doit rester dans la glace car c'est une enzyme thermotolérante active à 72°C, donc on la met dans la glace pour l'inactiver ; d'une part, elle ne « se fatigue » pas pour rien dans le tube, puis elle ne commence pas à complémentariser l'ADN.

Remarque : Il faut porter des gants tout le long de la manipulation afin de ne pas contaminer les tubes avec les DNAses présentes sur notre peau.

Schématisation des cycles de la PCR :



- 95°C = Dénaturation, liaisons Hydrogène de l'ADN sont rompues
- 55°C = Hybridation des amorces délimitant les zones à amplifier
- 72°C = Elongation, synthèses du brin complémentaire



8) Electrophorèse

• Electrophorèse sur gel d'agarose :

Cette électrophorèse permet de visualiser les fragments d'ADN, qui chargés négativement vont migrer à travers les mailles du gel d'agarose, vers l'anode lorsqu'ils sont placés dans un champ électrique. Leur déplacement à travers le gel est fonction de leur masse moléculaire. Un fragment de petite taille migrera plus vite et donc plus loin de son point de départ qu'un fragment de masse moléculaire plus importante.

Deux gels ont été réalisés, avec deux concentrations d'agarose différentes :

- un gel à 1,2% d'agarose, où ont été déposés les fragments d'ADN amplifiés,
- un gel à 0,8% d'agarose, où a été déposé l'ADN brut.

L'ADN produit de PCR contient des fragments d'environ 600 bp, donc très petits par rapport à l'ADN brut. C'est pour cela qu'ils sont déposés sur un gel plus concentré en agarose (donc mailles plus petites) afin qu'ils ne sortent pas du gel lors de la migration.

• Electrophorèse sur Acrylamide avec gradient de dénaturation : DGGE

Ici même principe que pour le gel d'agarose, migration de l'ADN vers l'anode mais le gel contient un gradient de dénaturation. Les liaisons Hydrogènes sont rompues par ce DGGE sauf au niveau du primer de Cytosines et Guanines (C et G sur une 40aine de bases) car présence de trop de liaisons H donc trop robustes. Le fragment est donc ouvert tout au long de sa progression dans le gel, et est stoppé une fois qu'il est complètement ouvert. Dans ce cas les fragments sont donc séparés en fonction de leur séquence et de leur pourcentage en C et G, et non pas en fonction de leur masse moléculaire. En effet un fragment contenant plus de A et de T (liaisons plus faibles) va s'ouvrir plus vite et donc va être stoppé plus tôt dans le gel.

9) Dénombrement des bactéries cultivables en milieu liquides

La méthode du nombre le plus probable (NPP) dérive des études de Mac Grady, et consiste à interpréter les résultats en comparant les trois essais par dilution et leurs résultats. Il s'agit d'une interprétation probabiliste.

Après inoculation et incubation des tubes, il faut compter pour chaque dilution le nombre de tubes positifs impliquant une culture ; il est admis que la présence d'un germe viable dans l'inoculum est nécessaire et suffisante pour qu'il y ait développement dans le tube.

La détermination du nombre le plus probable de microorganismes est ensuite déduite du nombre de tubes positifs trouvés pour quelques dilutions consécutives et significatives.

II Résultats

1) Colonne de Winogradsky

Observation d'une stratification du sédiment :

- En surface du sédiment et dans l'eau : dépôt vert
- Surface et subsurface : couche plus claire
- Au milieu : sédiment gris
- Au fond : sédiment noir
- Non homogène : zones noires en surface et claires en profondeur
- Présence d'une bulle de gaz : le gaz a été prélevé et mis en contact avec une flamme, rien ne s'est passé.
- Dans certaines colonnes la subsurface est orangée

2) Dénombrement en milieu liquide

◆ Bactéries aérobies à 20°C

Dilution	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Positivité	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	--
Nombre caractéristique						3	0	0	↑

Nombre caractéristique : 300

NPP de microorganismes : 2,5.10⁶ bactérie /ml

Limite de confiance : 0,75 - 16

Observation de dépôt de sel présent en excès dans le milieu

◆ Bactéries aérobies à 40°C

Dilution	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Positivité	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	--
Nombre caractéristique						3	0	0	

Nombre caractéristique : 300

NPP de microorganismes : 2,5.10⁶ bactérie /ml

Limite de confiance : 0,75 - 16

◆ Bactéries anaérobies à 20°C

Dilution	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Positivité	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+-	---
Nombre caractéristique							3	1	0

Nombre caractéristique : 310

NPP de microorganismes : 4,5.10⁷ bactérie /ml

Limite de confiance : 0,96 – 2

Tableau général des résultats du dénombrement :

		Microorganismes/ml		
Binômes	horizons	20°C avec O2	40°C avec O2	20°C sans O2
A	S	140.10 ⁷ (30-660)	45.10 ⁷ (7,6-200)	2,5.10 ⁷ (0,53-12)
B	M	0,7.10 ⁷ (0,15-3,3)	2,5.10 ⁷ (5,5-120)	11.10 ⁸ (24-520)
C	F	2,5.10 ⁶ (0,75-16)	2,5.10 ⁶ (0,75-16)	4,5.10 ⁷ (0,96-21)
D	S	25.10 ³ (5,3-120)	1,1.10 ⁶ (0,25-5,2)	25.10 ³ (53-120)
E	M	25.10 ⁵ (5,3-120)	25.10 ⁴ (5,3-120)	4,5.10 ⁶ (0,96-21)
F	F	25.10 ⁵ (5,3-120)	25.10 ⁵ (5,3-120)	4,5.10 ⁶ (0,96-21)
G	S	9,5.10 ⁶ (2-44)	4,5.10 ⁶ (0,96-21)	4,5.10 ⁶ (0,96-21)
H	M	9,5.10 ⁶ (2-44)	1,6.10 ⁷ (0,4-7,5)	4,5.10 ⁶ (0,96-21)
I	F	45.10 ⁷ (7,6-200)	15.10 ⁷ (2,2-70)	25.10 ⁶ (5,3-120)
J	S	4,5.10 ⁶ (0,96-21)	2,5.10 ⁶ (0,53-12)	2,5.10 ⁷ (0,53-12)
K	M	2.10 ⁷ (0,43-9,4)	2,5.10 ⁶ (0,53-12)	9,5.10 ⁶ (2-44)

S = Surface
M = Milieu
F = Fond

(...) = Limite de confiance

3) Extraction d'ADN

Expression du rendement d'extraction :

Concentration donnée par le spectrophotomètre : 1,73 ng/μl ceci représente la quantité d'ADN présent dans le tube. Cette quantité est diluée 12 fois (5μl dans 55μl, facteur 12).

Donc : $1,73 \times 12 = 20,76 \text{ ng}/\mu\text{l}$ = concentration d'ADN extrait total

Cette concentration était en présence de 50μl de solution S5

Donc : $20,76 \times 50 = 1038 \text{ ng}$ = Quantité d'ADN présent dans 350 mg de sédiment

Donc : $1038 / 350 = \mathbf{2,96 \text{ ng/mg} = \text{Quantité d'ADN présent pour 1 mg de sédiment}}$

Tableau général des résultats d'extraction :

Binômes	[ADN] extrait total ng.µl ⁻¹	[ADN] dans sédiment ng.mg ⁻¹
A	19,8	3,19
B	11,64	1,66
C	20,76	2,96
D	8,76	1,46
E	9,879	1,54
F	11,64	1,66
G	52,8	7,54
H	20,64	3,22
I	30,48	3,9
J	34,56	5,08
K	25,92	4,05

4) Quantification

Le spectrophotomètre donne différents résultats :

Concentration d'ADN = 1,73µg/ml

A₂₆₀ = 0,043

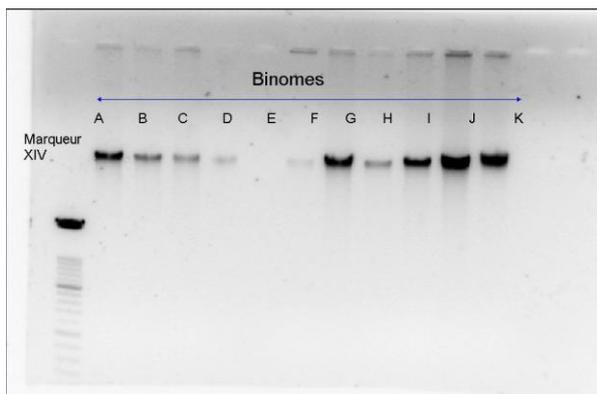
A₂₈₀ = 0,026

Rapport A₂₆₀ / A₂₈₀ = **1,97**

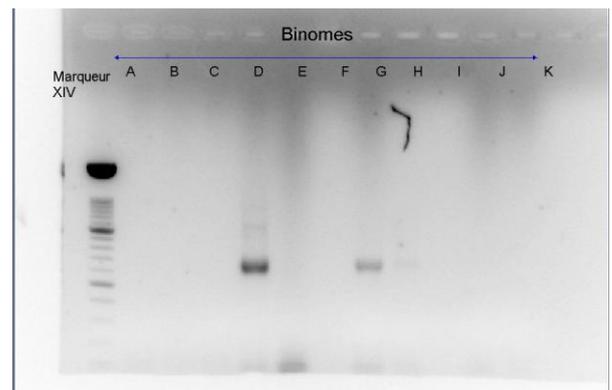
5) Electrophorèse

Gel d'agarose

0,8 %



1,2%



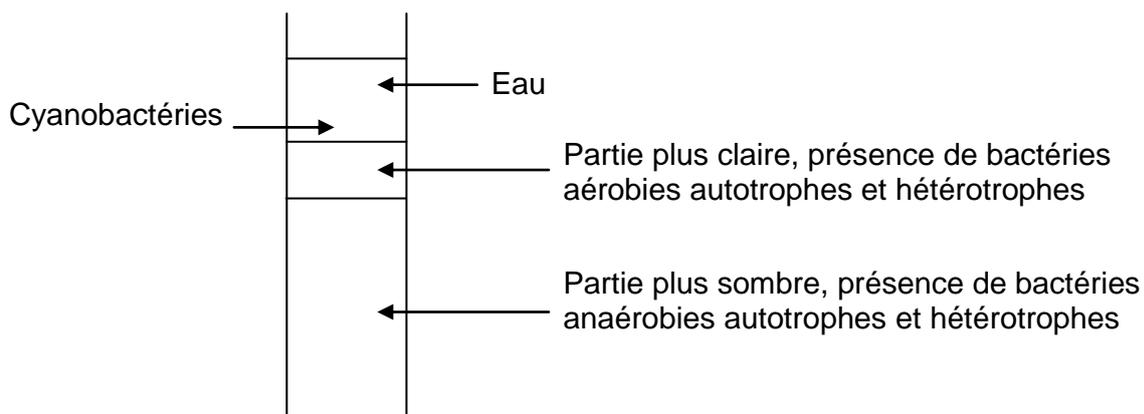
Au milieu, le sédiment est gris, cela correspond à du sédiment réduit, et non oxydé car il n'y a pas d'oxygène.

Au fond, le sédiment est noir : dégradation de la matière organique par des processus anaérobies.

Il y a également une zone claire en profondeur avec du vert, se qui caractérise la présence de bactéries photosynthétiques qui produisent de l' O_2 , d'où l'oxydation du sédiment.

Présence d'une bulle de gaz : suspicion de méthane, mais qui a priori n'en est pas car aucune réaction ne s'est produite au contact de la flamme. Cependant, il se peut que ça n'ait pas réagit car le mélange contenait plus d'air (au départ présent dans la seringue). Il est également possible de dire que ce gaz n'est pas de l' H_2S , car aucune odeur caractéristique n'a été remarquée. Donc, ce gaz était probablement du méthane produit par des bactéries méthanogènes.

La couche de subsurface de couleur orangée correspond à la présence d'un autre type de bactéries.



2) Dénombrement en milieu liquide

Notre échantillon est un prélèvement de fond de colonne (avec sulfate de calcium), donc anoxique, on s'attend donc à avoir une grande majorité de bactéries anaérobies.

La présence de développement dans les tubes placés à l' O_2 (à $20^\circ C$ et $40^\circ C$) s'explique par le fait que se doit être des bactéries anaérobies facultatives.

Il n'y a aucune différence de concentration entre les tubes placés à 20°C ou à 40°C, les bactéries supportent donc une large gamme de température. Ce sont des organismes mésophiles (gamme de tolérance de 15°C à 45°C).

La quantité de bactéries anaérobies est significativement plus importante, ceci concorde bien à l'horizon anoxique du fond de la colonne.

Globalement (tableau général), on peut voir qu'il y a une quantité de bactéries légèrement plus importante dans les colonnes contenant du Carbonate ($21 \cdot 10^7$ contre $3,8 \cdot 10^7$ bactéries/ml avec le sulfate). La communauté bactérienne semble donc « dominée » par des bactéries non sulfureuses.

Les résultats obtenus dans ce tableau sont très variés et peuvent difficilement être interprétés dans leur globalité.

Cependant il est possible de faire des remarques ponctuelles :

Binôme A : Nette dominance des bactéries aérobies 20°C (corrélation couche oxygène)

Binôme B : Horizon de milieu de colonne dominé par des bactéries anaérobies, dominance également observée sur l'horizon de fond (corrélation couche anoxique), et pas de préférence significative au niveau des températures.

Binôme D : Nette dominance des bactéries se développant à 40°C, qui ne se poursuit pas pour les échantillons de milieu et de fond (binômes E et F), mais ces deux derniers présentent une dominance de bactéries anaérobies, ce qui semble logique.

Binôme I : On observe une dominance de bactéries aérobies, ce qui au premier abord ne semble pas évident puisque l'on se trouve dans un horizon de fond et donc anoxique. Cependant une fois prélevé, le sédiment a été au contact de l'air durant toute la matinée, il y a donc eu oxygénation et de même lors des dilutions, puisque les tubes ont été homogénéisés au vortex.

Au final, les bactéries anaérobies strictes sont toutes mortes. Ce sont donc des bactéries aérobies facultatives qui sont présentes qui se développent mieux en présence d'O₂ mais peuvent se développer également en milieu anaérobie.

Binôme J : Ici c'est l'inverse, on a une dominance de bactéries anaérobies alors que l'on se trouve dans un horizon de surface ; plusieurs explications sont possibles :

- soit ce sont des bactéries anaérobies facultatives qui se développent mieux en absence d'O₂, mais qui le peuvent également en présence d'O₂ ;

- soit présence de micro chambres anaérobies en zone oxique. Ces micros chambres sont formées par consommation de l'oxygène par une quantité importante de bactéries aérobies ; se sont en fait des milieux devenus localement anaérobies.

De plus le fait que cette dominance de bactéries anaérobies ne se poursuit pas en zone de milieu peut s'expliquer car elles doivent trouver en surface un milieu qui leur est plus favorable (par exemple elles peuvent se nourrir des substances produites par des bactéries de surface).

Cependant, toutes ces remarques ne sont pas très fiables pour plusieurs raisons :

- Tout d'abord la technique du NPP est une technique statistique probabiliste qui ne donne qu'un ordre d'idée quant à la concentration réelle de bactéries. Ceci est confirmé par les « énormes » limites de confiance qui sont données. Par exemple, pour l'incubation à 40°C en aérobies, la limite de confiance va de 7,6 à 200 pour une valeur de 45. Donc très peu des variables commentées sont significatives.

- Il est également important de prendre en compte l'hétérogénéité des échantillons. Les échantillons correspondant à un même horizon ne peuvent être comparés, car même pour deux colonnes de sulfate, la communauté bactérienne ne sera pas la même. En effet même si le sédiment a été homogénéisé au départ, deux colonnes différentes vont évoluer différemment en fonction des interactions biotiques et abiotiques qui s'y déroulent.

- Pour les mêmes raisons il y a l'hétérogénéité au sein d'un même échantillon. Lors du prélèvement des 1 ml de sédiment, si on avait pris 2 ml à deux endroits différents du même horizon, on n'aurait pas eu les mêmes résultats.

- Et enfin il y a l'hétérogénéité des manipulations à travers les différents manipulateurs. En effet, de nombreuses contaminations ont été observées (tubes ouverts en dehors de la zone stérile, pipettes plastiques coupées non stériles...), ainsi qu'il y a pu avoir des erreurs de manipulation (problème de pipetage, de dilutions, d'interprétation...).

Donc, les résultats ne sont pas réellement interprétables.

3) Extraction d'ADN

Ceci permet de savoir quelle quantité d'ADN est présente par ml de sédiment, ce qui traduit indirectement la quantité de bactéries.

On peut voir que les quantités sont variables, sûrement du à l'hétérogénéité du sédiment.

Cependant les concentrations les plus importantes ne correspondent pas au nombre de microorganismes le plus importants déterminé par le NPP.

Ici encore une hétérogénéité de manipulation peut expliquer ces variations de résultats, d'autant plus qu'il s'agit d'une manipulation minutieuse. La moindre petite erreur de pipetage peut être multipliées tout au long des étapes et comme il s'agit d'infimes quantités l'erreur qui se répercute est importante.

A cela, il faut ajouter l'imprécision de la balance de l'ordre du centigramme.

Enfin lors du calcul on prend en compte le poids du sédiment mesuré comme si au final on avait la quantité d'ADN total de ce sédiment ; alors qu'après l'incubation on a 700µl et on en prend que 450µl. Il y a donc une perte d'ADN. La concentration obtenue n'est donc pas réelle, elle est sous-estimée, et il suffit que les 700µl d'ADN ne soient pas répartis de manière homogène, pour que les résultats soient faussés.

4) Quantification

L'appareil effectue différents calculs :

Sachant qu'une unité d'absorbance correspond à 50 ng d'acides nucléiques /µl, on devrait obtenir :

$$\begin{array}{l} 1 \longrightarrow 50\text{ng}/\mu\text{l} \\ 0,043 \longrightarrow X ? \quad X = 2,15\text{ng}/\mu\text{l} \end{array}$$

Nous, nous avons obtenu, 1,73µg/L, car le spectrophotomètre effectue une correction grâce à l'absorbance à 320 nm pour la turbidité de l'échantillon.

Pureté de l'échantillon :

Ceci s'effectue grâce à l'absorbance à 280 nm, et le rapport A280/A260, correspond à l'indice de la pureté.

Il nous est indiqué que si ce rapport est :

- Compris entre 1,8 et 2, l'échantillon est pur en acides nucléiques
- Inférieure à 1,8, l'échantillon est certainement contaminé par des protéines ou des composés aromatiques
- Supérieure à 2, il y a présence de trop d'ARN, car l'amorce se fixe sur l'ADN

Notre rapport est de **1,97** : **notre échantillon était donc pur en acides nucléiques** et ne présentait aucunes contaminations quelconques.

5) Electrophorèse

→ Sur gel d agarose :

• À 0.8% : dépôt d'ADN brut :

On peut voir sur ce gel que tous les fragments ont migré au même niveau dans le gel. Cela signifie que tous les fragments font environ la même taille : ils ont approximativement la même masse moléculaire.

Cependant on ne devrait pas avoir nos bandes au même endroit car c'est l'ADN total que l'on dépose ici, et on a pas la même quantité d'ADN total dans les différents horizons.

En réalité, nos fragments n'ont pas la même masse moléculaire. Ici, on a l'ADN de toutes nos bactéries, plus celui des eucaryotes éventuellement présents, et ceci forme une grosse masse qui a du mal à progresser dans le gel. Et comme on a tous utilisé le même kit, les fragments se stoppent tous au même endroit.

De plus on peut remarquer que l'épaisseur des bandes est proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans le puits et donc proportionnelle à la concentration d'ADN dans le sédiment.

En effet on peut voir que les bandes les plus épaisses correspondent à des concentrations d'ADN élevées dans le sédiment.

Ex : J=5,08 ng/mg de sédiment et donne une bande épaisse.

Mais ceci est approximatif car il y a aussi l'ADN des autres organismes présents (eucaryotes, etc.).

Enfin, le marqueur de taille ne nous aide pas pour déterminer la taille de nos fragments, il n'est pas adapté (trop petits fragments donc n'englobe pas la gamme de taille des notre)

Tout ce que l'on peut dire c'est que nos fragments ont une taille supérieure à 2642 bp car ils sont restés bloqués plus tôt dans les mailles du gel que le plus gros fragment du marqueur à 2642 bp.

Remarque : on n'observe pas de bande sur E car le binôme n'avait plus d'ADN.

• À 1,2% : dépôt d'ADN produit de la PCR.

Lors de la PCR on a amplifié une partie d'un gène codant pour l'ARNr 16S de nos bactéries. Ce gène fait environ 1500bp. On sait qu'une des amorces s'hybride à 907 bp, l'autre s'hybride à environ 300bp. Les fragments amplifiés feront donc environ 600 bp.

C'est cet ADN que l'on met dans le gel à 1,2% et étant plus petit, les fragments migrent plus loin dans le gel (ici on ne peut pas comparer les distances de migration entre les deux gels car ils n'ont pas la même concentration en agarose).

Seulement deux des dépôts ont marché, il en est de même pour le gel DGGE car dans les deux cas on a utilisé les produits de PCR.

Les bandes de migration observés (deux nettes (DG) et une peu visible (H)) ont toutes migrées au même niveau, ce qui est normal car les fragments ont la même taille (environ 600bp). Ici le marqueur de taille est approprié et on peut lire la taille des fragments : les bandes sont larges et se situent entre 600 et 700 bp. Notre estimation était de 600 bp et si on rajoute la taille des amorces (quarantaine de bp) fixées aux fragments on arrive bien dans cette gamme de taille.

Les bandes observées en sortie de gel sont les amorces qui ne se sont pas hybridées à l'ADN et comme elles sont très petites elles ont migré très vite vers la sortie du gel. Pour E on voit bien les amorces car ayant peu d'ADN (1,59ng/mg de sédiment) très peu se sont fixées.

→ Sur gel d'acrylamide :

Ici les fragments migrent en fonction de leur séquence et de leur pourcentage en cytosine et guanine.

Nous n'avons encore que des résultats pour les binômes D et G.

Le gel d'agarose sépare les fragments en fonction de leur taille et comme les fragments du gène 16S amplifiés de différentes bactéries ont la même taille on ne peut pas distinguer si on a une ou plusieurs types de bactéries (car nous ne voyons qu'une seule bande).

Cependant ces fragments même si ils ont la même taille, ils ont une séquence différente selon les espèces de bactéries, donc on va pouvoir visualiser ces différents types sur le gel avec DGGE.

D : On observe deux bandes : une qui s'est stoppée tôt sur le gel, ce qui signifie que ce fragment a un faible pourcentage de C et de G car il s'est ouvert très vite. On observe la même bande sur le puits G ; cela signifie que ce fragment a un pourcentage similaire en C et en G que celui du puits D car ils se sont ouverts à la même vitesse. Mais ce n'est pas tout à fait sûr car des processus thermodynamiques font que si la séquence comporte par exemple beaucoup de A et de T d'affilé elle va s'ouvrir plus vite qu'une séquence qui a plus de A et de T mais qui sont intercalés entre des C et des G. Donc, on peut supposer que ces deux bandes correspondent à une même espèce bactérienne, ce qui serait cohérent car on part du même sédiment homogénéisé, mais un séquençage est nécessaire pour en être sûr.

La deuxième bande du puits D est assez épaisse et l'on peut supposer qu'il y a deux types de fragments différents donc la séquence serait assez proche avec une plus forte proportion en C et en G que la première bande ; deux types bactériens différents ?

Enfin sur le puits G, on distingue deux autres faibles bandes qui sont celles qui ont migré le plus loin, donc celles qui se sont ouvertes le moins vite et qui ont donc le pourcentage de C et de G le plus fort.

Puits G : correspond à trois espèces bactériennes différentes.

Puits D : correspond à deux ou trois espèces bactériennes différentes.

Les souches servent de témoin de migration (ici elles ne sont pas très adaptées car elles ont toute migrées loin dans le gel au lieu de se répartir). Elles servent aussi d'échelle de comparaison quand on veut comparer deux gels différents.

Exemple de gel interprétable :

Dans un premier temps on peut voir que les souches utilisées sont plus adaptées car leur fragments sont bien séparés et placés au même niveau dans le gel que les fragments à analyser.

On peut voir que ce gel est bien réussi car on observe de nombreux fragments qui traduisent la diversité des espèces présentes dans la communauté.

Pour l'horizon de surface, on distingue approximativement (problèmes de lecture sur le gel : bandes réellement présentes ou traces ?) 16 espèces différentes déterminées par les 16 fragments de séquences différentes (la séquence du gène 16s est caractéristique à chaque espèces bactérienne).

Pour l'horizon de fond on distingue 13 espèces. On peut émettre l'hypothèse que certaines espèces sont communes aux deux horizons, leurs fragments se trouvant exactement au même niveau dans le gel. Enfin d'autres espèces sont spécifiques à chaque horizon.

On a deux communautés bactériennes différentes alors que l'on part d'un même sédiment homogénéisé. Ceci car les interactions biotiques et abiotiques régnant dans chaque horizon ont fait évoluer différemment les communautés.

Cependant au vu des processus thermodynamiques qui ont lieu (vu précédemment) on ne peut pas vraiment conclure quant à la similitude ou à la différence des espèces d'après la position des fragments.

→ Problèmes de manipulation :

Le fait que l'électrophorèse n'ait marché que pour deux puits (D et G qui ont le même profil : horizons de surface dans des colonnes à sulfate de calcium) indique qu'il n'y avait pas assez d'ADN, et donc que la PCR n'a pas fonctionné.

Plusieurs hypothèses sont possibles :

- L'ADN n'a pas été mis au départ
- Problème au niveau de l'ajout des amorces, car si absence d'amorce, absence d'amplification.
- Ca ne peut pas être un problème au niveau des cycles de la PCR car sinon rien n'aurait marché.
- En horizon profond, il y a formation de substance unique (molécules de dégradation), qui empêchent les enzymes de fonctionner comme la Taq par exemple, donc s'il n'y a pas de polymérase, il n'y a pas d'amplification. D'où le fait que cela marche pour les horizons de surface. L'hypothèse est peu probable.

Conclusion

Les résultats ont bien montrés qu'il y avait différentes communautés bactériennes au sein d'un même sédiment homogénéisé. En effet, selon l'horizon de sédiment considéré, la composition bactérienne change. Ce sont les conditions environnementales et les interactions biotiques et abiotiques qui définissent les populations bactériennes et qui peuvent expliquer l'hétérogénéité de la répartition spatiale des microorganismes.

A travers les différentes analyses effectuées, certaines caractéristiques particulières des microorganismes peuvent être soulevées. En effet il est possible de dire que les communautés bactériennes trouvées dans le sédiment, présentent une large gamme de tolérance vis-à-vis de la température. Il y a également leurs caractéristiques métaboliques qui ont été observés lors des analyses.

Il aurait pu être intéressant d'effectuer d'autre manipulation, afin de permettre l'identification des bactéries trouvées au sein du sédiment, et ainsi pouvoir établir une comparaison autre de celle déjà effectuée entre différents écosystèmes.

