

Andrew Tolonen (atolonen@genoscope.cns.fr)
avril 2014

L2 Microbiologie, TD06
Nutrition et croissance des bactéries

Exercice 1 : les phrases suivantes sont-elles vraies ou fausses ?

- A- le terme **auxotrophe** désigne les microorganismes capables de se développer avec du CO₂ comme seule source de carbone.

- B- Le terme **facteur de croissance** désigne une substance qui doit entrer impérativement dans la composition d'un milieu de culture destiné à étudier la croissance des microorganismes.

- C- Un **milieu d'enrichissement** est un milieu liquide destiné à favoriser la croissance d'un microorganisme au détriment de celle des autres, en agissant sur la vitesse spécifique de croissance.

Exercice 2: Afin d'étudier les besoins nutritionnels de 3 souches A, B et C, on les ensemence sur les 3 milieux suivants.

Milieu 1 = milieu de base

Composants	Quantité
K ₂ HPO ₄	1g
NO ₃ K	0,5g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2g
CaCl ₂	0,1g
NaCl	0,1g
Eau distillée	1 litre

On ajoute à ce milieu de base stérilisé à l'autoclave, 1g de glucose stérile.

Milieu 2 : Milieu 1 + 4g d'hydrolysate de caséine

Milieu 3 : Milieu 1 + 4g d'hydrolysate de caséine + 2g d'extrait de levure

Les résultats obtenus après incubation sont les suivants :

	Milieu 1	Milieu 2	Milieu3
Souche A	+	+	+
Souche B	-	+	+
Souche C	-	-	+

"-" représente absence de croissance

"+" représente présence de croissance

- 1- Indiquer le rôle des constituants des milieux 1, 2 et 3.

- 2- Dédurre des résultats, les besoins nutritionnels des 3 souches A, B et C.
- 3- Dans certains cas, une vitamine peut être dosée par son effet sur la croissance d'une bactérie.
- a- Quelle caractéristique la bactérie utilisée doit-elle posséder ?
- b- Donner le principe du dosage.
- c- Quel est l'intérêt d'un tel dosage ?

Exercice 3 :

Analyse des types trophiques des souches I et II à l'aide des milieux de culture A, B et C.
Composition des milieux donnée en g/L

Milieu A

Phosphate d'ammonium	0,2
Phosphate monopotassique	1
Sulfate de magnésium	0,2
Chlorure de calcium	0,1
Chlorure de sodium	5

Milieu B

Milieu A + citrate trisodique	2
-------------------------------	---

Milieu C

Milieu A + les additifs suivants :

Biotine (10^{-8}), Histidine (10^{-5}), Méthionine ($2 \cdot 10^{-5}$), Thiamine (10^{-6}), Pyridoxine (10^{-6}), Acide nicotinique (10^{-6}), Tryptophane ($2 \cdot 10^{-5}$), Panthothénate de calcium (10^{-5}), oligoéléments et glucose (5)

On obtient les résultats suivants après ensemencement et incubation.

Souches/milieux	A	B	C
Souche pure n°I	-	+	+
Souche pure n°II	-	-	+

- a- Comment qualifier le milieu A?
- b- milieu A à la condition de les incuber en atmosphère enrichie en CO₂. Expliquer pourquoi, et donner leur type trophique vis-à-vis du carbone.

c- Quel est le type trophique vis-à-vis du carbone et des besoins nutritionnels spécifiques de la souche I ?

d- Quelle est sa source d'azote ?

e- Pour comparer la croissance sur les milieux B et C, il est recommandé de ne pasensemencer le milieu B à partir d'un bouillon ou d'une eau peptonée, mais d'une colonie sur milieu gélosée : expliquer pourquoi?

f- Qu'apporte le glucose dans le milieu C ?

g- Quel est le type trophique de la souche II vis-à-vis du carbone et par rapport au métabolisme énergétique ?

h- Définir et expliquer la présence d'oligoéléments ?

i- Les composants additifs du milieu C appartiennent à deux groupes chimiques distincts. Lesquels ?

On contamine 5 ml de milieu B avec 10^6 *Staphylocoques* et 10^2 bactéries appelées souche n°II dans l'expérience précédente.

a- Quel est le nombre par ml de bactéries de chaque souche au temps 0 ?

Après 6h d'incubation sans phase de latence, on dénombre séparément 8×10^8 *Staphylocoques*/ml et $3 \cdot 10^3$ souches II/ml.

b- Calculer le temps de génération des deux germes.

- c- Comment expliquez-vous ce résultat ?

- d- Comment s'appelle ce phénomène ?

- e- Comment se manifeste-t-il sur milieu gélosé ?

Exercice 4 :

Lors de l'examen de l'abdomen d'un insecte, vous découvrez un microorganisme de 100 µm de longueur et de 8 µm de largeur. Il n'est pas photosynthétique, ne possède pas de mitochondrie, ni de noyau, ni de membrane nucléaire.

- f- Que pourrait-il être ? Expliquer votre réponse.

Cet organisme croit dans l'air ambiant sur des boîtes de Pétri contenant de l'agar et une solution de sels minéraux (une source de N, P, S, K, Mg, Fe et autres oligoéléments). Certains minéraux sont sous forme oxydée, tandis que d'autres, comme le Fe, sont sous forme réduite. Si tous les éléments sont fournis sous forme oxydée, l'organisme ne croit pas. A l'aide de ces informations, répondez aux questions suivantes :

- g- Quelle est sa source de carbone la plus probable ?

- h- Quelle est sa source d'énergie la plus probable ?

Exercice 5 :

36 colonies bactériennes ont poussé sur un milieu de culture solideensemencé à partir de 0,1 ml prélevé à partir d'une dilution de 10^{-3} d'un échantillon de contenu intestinal. Combien de cellules par ml estime-t-on dans la culture d'origine ?

- A- 360 B- 3 600 C- 360 000 D- 1 800 000 E- 3 600 000

Exercice 6 :

En utilisant la formule $N_t = N_0 \times 2^n$, calculer le nombre de bactérie dans une mayonnaise contaminée après inoculation de 4 cellules de *Staphylococcus aureus* et incubation à température ambiante pendant 24 heures. Le temps de génération de *S. aureus* dans ces conditions est d'une heure.

- A- $4 \times 2 \times 24$ B- $2^4 \times 24$ C- 4^{24} d- 4×2^{24} (67,108,864)

Exercice 7 :

Une suspension de bactéries de concentration 4×10^8 bactéries/ml est diluée au 2×10^{-5} . 0,1 ml de la solution diluée est étalée sur une boîte de Pétri et incubée une nuit à 37°C.

D- Combien de colonies apparaitront sur la boîte ?

On ensemence 4 ml de la solution diluée dans un volume total de 500 ml de milieu de croissance contenant de l'ampicilline. Le milieu contient combien de cellules?

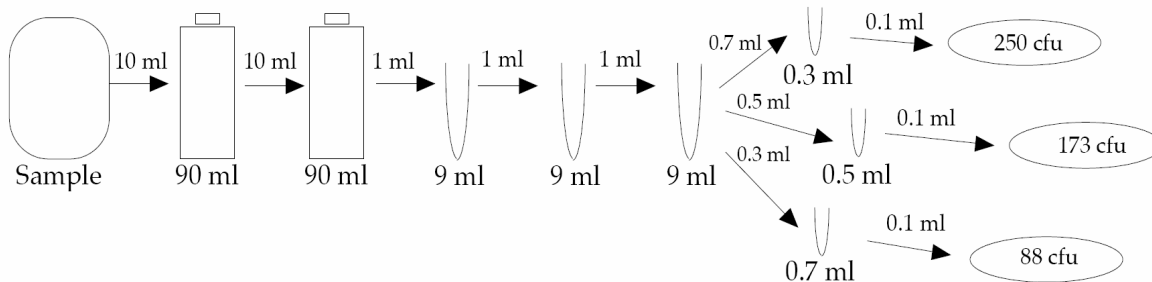
E- Cette culture est incubée à 37°C pendant 10h. Quelles caractéristiques doivent posséder les bactéries pour croître dans ces conditions ?

F- Quelle est la concentration de la culture avant incubation à 37°C ?

G- Si le temps de génération de cette culture est de 30 min, quelle sera la concentration de cette culture (cellules par ml) au bout des 10h d'incubation à 37°C ?

Exercice 8 :

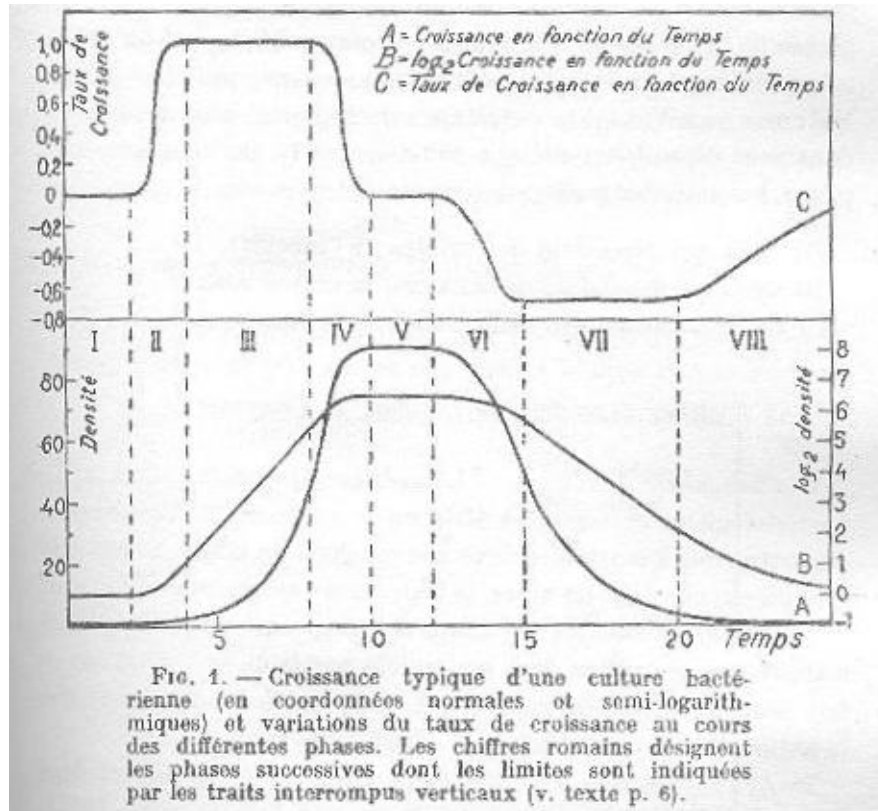
Déterminez (moyenne), à partir du nombre de colonies dénombrées dans les 3 boîtes (milieux gélosés) et du schéma de dilution ci-dessous, le nombre de cellules bactériennes (UFC) présentes dans 500 ml de l'échantillon (détaillez vos calculs).



#####

Informations Supplémentaires

Les phases de croissance



J Monod, *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann, Paris, 1958.

A Croissance: phase exponentielle is $N(t) = N(0) \cdot 2^n$

$N(t)$ = cellules, temps=t

$N(0)$ = cellules, temps=0

n=nombre de générations

temps de génération = temps(h)/ nombre de générations

B Croissance log: $\log_2(Nt) = n + \log_2(N0)$

C Taux de croissance

Classification des microbes par leurs métabolismes:

La source de carbone :

autotrophe: la capacité de certains organismes vivants à produire de la matière organique en procédant à la réduction de matière inorganique, par exemple le carbone (sous forme de CO₂).

hétérotrophe: a nécessité pour un organisme vivant de se nourrir de constituants organiques préexistants.

La source des électrons

organique = organotrophe
non-organique = lithotrophe (ie l'eau)

La source d'énergie pour récupérer les électrons (oxydation)

la lumière = phototrophe
les chimies = chimiotrophe

Auxotrophie: incapacité d'un organisme vivant de synthétiser un composé organique nécessaire à son développement.

Prototrophie: capacité de proliférer dans un milieu de base (milieu minimum) sans nécessiter la présence de facteurs de croissance particuliers.

Hydrolysat de caséine: une substance protéique (protéine) qui constitue la majeure partie des composants azotés du lait. Caséine fournit des acides aminés, les glucides, et deux éléments inorganiques, le calcium et le phosphore.

Tryptone: un mélange des peptides provenant de la digestion de la caséine par la protéase trypsin.

Extrait de levure: levure autolysée. Extrait de levure est un mélange d'acides aminés, des peptides, des vitamines et des hydrates de carbone solubles dans l'eau et peut être utilisé comme additif pour les milieux de culture.

Peptone: un mélange de peptides et d'acides aminés formée par l'hydrolyse d'une protéine.

Dosage d'un nutriment pour déterminer son effet sur la croissance. On quantifie la croissance des cellules en fonction de la quantité d'un nutriment pour calculer le besoin de la cellule.

