

# Andrew Tolonen ([atolonen@gmail.com](mailto:atolonen@gmail.com))  
# avril 2013

## L2 Microbiologie TD7: Les besoins nutritifs des microbes

### Exercice 1

*Haemophilus influenzae* (Chimio-organotrophe auxotrophe) est une bactérie aérobie/anaérobie facultative, qui exige :

- **le facteur X** (hémine), indispensable au fonctionnement de la chaîne respiratoire (car il est un composant des cytochromes).
- **le facteur V** (NAD<sup>+</sup>), coenzyme de la chaîne respiratoire et des réactions de fermentation.

1. Représenter à l'aide de schémas légendés, l'aspect après incubation. Justifier.

Tube 1: une gélose VFensemencée avec cette bactérie

Tube 2: une gélose VF additionnée de facteur X, puisensemencée avec cette bactérie

Tube 3: une gélose VF additionnée de facteur V, puisensemencée avec cette bactérie

Tube 4: une gélose VF additionnée de facteurs V et X, puisensemencée avec cette bactérie

### Exercice 2

Le genre *Lactobacillus* est constitué de bacilles à Gram positif, non sporulants, et chimioorganotrophes.

1 Schématiser et légender la paroi des bactéries à Gram positif.

2 Donner l'aspect des *Lactobacillus* après coloration par la méthode de Gram. Justifier la couleur obtenue en détaillant les différentes étapes de cette coloration.

3 Ces bactéries sont non sporulantes. Donner une définition de la spore bactérienne.

4 Des expériences de culture des *Lactobacillus* sur deux milieux différents sont réalisées. La composition des milieux est donnée dans le document suivant:

**Composition des milieux**

Milieu MRS	Milieu TS glucosé
- Peptone trypsique de caséine - Macération de viande - Extrait de levure - Acétate de sodium - Citrate d'ammonium - Phosphate de potassium - Tween 80 - Sulfate de magnésium - Sulfate de manganèse - Glucose - Agar	- Peptone trypsique de caséine - Peptone papainique de soja - Chlorure de sodium - Glucose - Agar

Les résultats sont présentés ci-dessous

Conditions de culture	Milieu MRS	Milieu TS glucosé
Incubation 48 heures à 37°C en semi-anaérobiose	Culture	Absence de culture

4.1 Définir chaque terme de l'expression : peptone trypsique de caséine. Indiquer le principal constituant apporté par une peptone.

4.2 Indiquer le(s) rôles(s) de l'extrait de levure présent dans le milieu MRS.

4.3 Expliquer l'absence de culture sur le milieu TS glucosé.

4.4 Les *Lactobacillus* sont hetero-chimio-organotrophes. Donner la définition précise de ce terme.

5 Une espèce particulière, *Lactobacillus bulgaricus*, est utilisée en partenariat avec *Streptococcus thermophilus* dans l'élaboration des yaourts. Le yaourt est fabriqué à partir de lait traité à la chaleur (5 à 40 minutes à 75°C-95°C pour tuer les microbes indigènes). La matière sèche est augmentée par addition de poudre de lait. Le mélange est maintenu à une température de 43°C etensemencé avec les deux souches citées. Les bactéries réalisent une fermentation lactique par voie homofermentaire et/ou par voie hétérofermentaire.

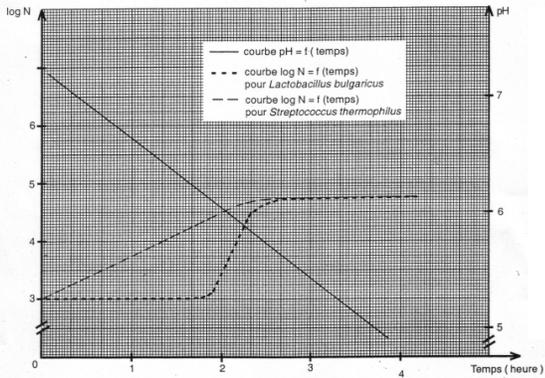
5.1 Définir le terme « fermentation » au sens métabolique du terme.

5.2 Citer le principal produit obtenu lors d'une fermentation lactique.

### 5.3 Différencier les termes « homofermentaire » et « hétérofermentaire ».

6 Lors de la fabrication d'un yaourt, la croissance bactérienne et l'évolution du pH ont été suivies en fonction du temps. Les résultats sont présentés dans le document suivant.

Suivi de la croissance bactérienne et évolution du pH en fonction du temps lors de la fabrication d'un yaourt



6.1 Analyser séparément les courbes de croissance et la courbe de pH, puis mettre en relation ces différentes courbes.

6.2 Sachant que *Lactobacillus bulgaricus* a plutôt un rôle dans l'élaboration des arômes du yaourt, déduire le rôle de *Streptococcus thermophilus* dans cette fabrication.

### **Exercice 3**

1 Etude du comportement nutritionnel de *Yersinia pestis*.

1.1 La culture de cette bactérie nécessite la présence de nicotinamide dans le milieu. Comment appelle-t-on une telle bactérie ?

2 Étude du pouvoir pathogène de *Yersinia pestis*.

2.1 On prélève à différents temps notés  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ , et  $t_4$ ,  $1 \text{ cm}^3$  d'une culture en milieu liquide de *Yersinia pestis*. Soit:

- $t_1$  en phase de latence
- $t_2$  en phase exponentielle
- $t_3$  en phase stationnaire
- $t_4$  en phase de déclin

2.1.1 Schématiser l'allure d'une courbe de croissance en milieu liquide non renouvelé, en précisant

les paramètres portés en abscisse et en ordonnée.

**2.1.2** Sur la courbe précédente, localiser les temps  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ , et  $t_4$ .

**2.1.3** Les courbes de croissance sont souvent visualisés avec une échelle logarithmique. Pourquoi?

**2.2** Le pouvoir pathogène de *Yersinia pestis* est dû en partie à 2 types de toxines mortelles :

- une toxine protéique (toxine pesteuse) à localisation cytoplasmique et non sécrétée par la bactérie,
- une toxine lipopolysaccharidique (LPS).

**2.2.1** Qu'est-ce qu'une toxine ?

**2.2.2** On procède aux expériences suivantes:

**a)** On prélève une partie de la culture au temps  $t_2$ . On filtre, et on injecte le filtrat à des rats.

**b)** On prélève une partie de la culture au temps  $t_2$ . On lyse les bactéries, on filtre, et on injecte le filtrat à un deuxième lot de rats.

**c)** On prélève une partie de la culture au temps  $t_2$ . On réalise un extrait de paroi purifié et on injecte cet extrait à un troisième lot de rats. Quel est le résultat obtenu pour chaque expérience ? Justifier.

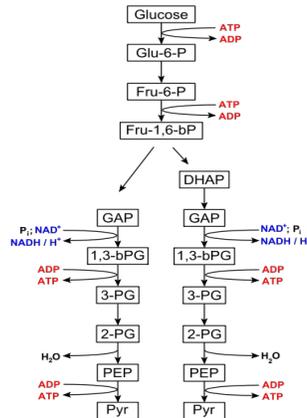
#####

## Informations supplémentaires

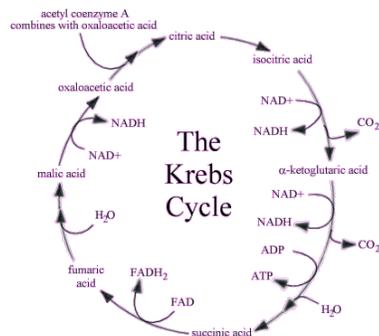
### Le métabolisme microbien:

présence d'oxygène: glycolyse->cycle de Krebs->chaîne respiratoire  
absence d'oxygène: glycolyse->fermentation

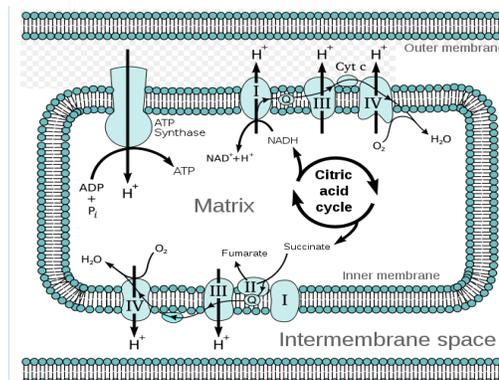
**Glycolyse:** oxidation de glucose en pyruvate.  $\text{glucose} + 2\text{ADP} + 2\text{NAD}^+ \rightarrow 2 \text{ pyruvate} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH}$



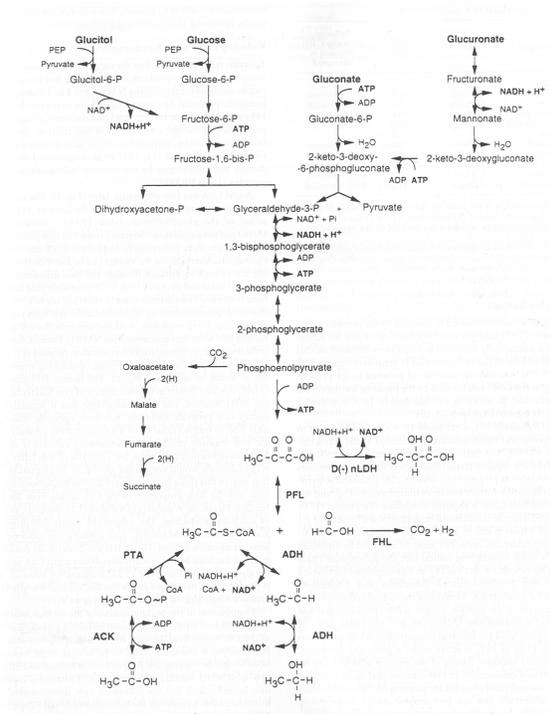
**Cycle de Krebs:** réaction cyclique pour production d'énergie à partir de l'oxidation d'acetyl-CoA.  
 $\text{acetyl-CoA} \rightarrow 2\text{CO}_2 + 3\text{NADH} + 1\text{ATP} + \text{FADH}_2$



**Chaîne respiratoire:** oxidation de NADH pour pomper les protons à travers de la membrane pour la création d'un gradient électrochimique qui est utilisé pour la production d'ATP par phosphorylation oxydative. Les électrons sont ceder à un accepteur final (molécule oxydée exogène).

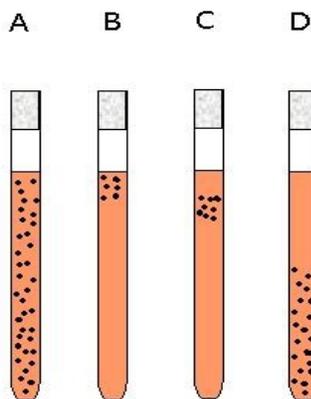


**Fermentation:** l'ATP est produit par la phosphorylation du substrat. L'accepteur d'électrons NAD<sup>+</sup> est régénéré à partir du NADH.

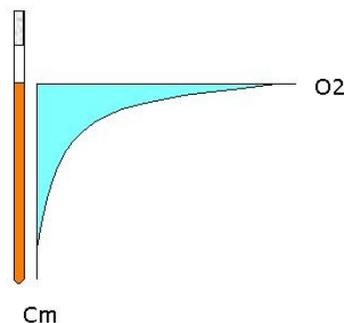


**Le milieu viande foie** (viande foie + glucose + agar): pour déterminer le type respiratoire des microorganismes. Images de [http://fr.wikipedia.org/wiki/Viande\\_foie](http://fr.wikipedia.org/wiki/Viande_foie).

**Croissances des microbes dans les tubes VF**

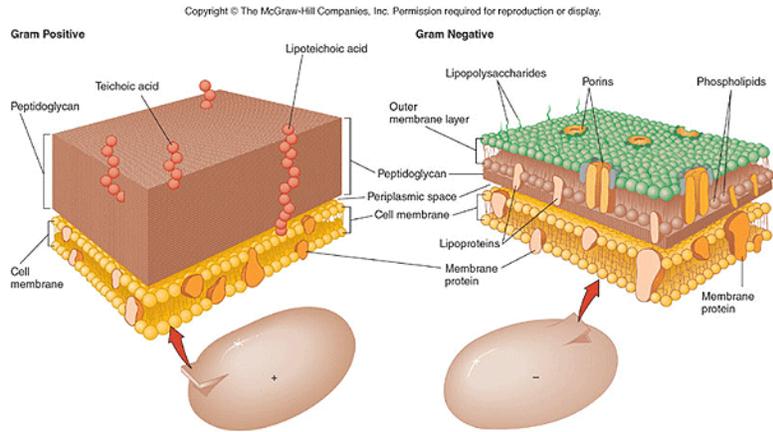
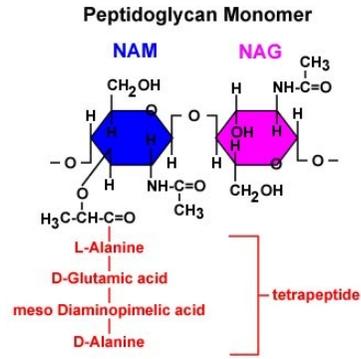


Quantité de O<sub>2</sub> en fonction de la profondeur dans un milieu Viande Foie Régénérer



- Tube A: aéro-anaérobie facultatif
- Tube B: aérobie stricte
- Tube C: micro-aérophile
- Tube D: anaérobie stricte

# Paroi bactérienne (revue)



# Coloration de Gram (revue)

