

Andrew Tolonen (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⁺), 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

Tube 1-2: aucune croissance. Les voies classiques du catabolisme énergétique conduisant à la production d'ATP nécessitent l'apport de facteur V ou NAD⁺.

Tube 3: une pousse sur toute la hauteur du tube. Avec le seul facteur V, la bactérie peut développer d'un métabolisme fermentaire à partir du glucose.

Tube 4: une pousse sur toute la hauteur tube sera observée après incubation.

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.

Infos supplémentaires

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.

Infos supplémentaires

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

L'endospore est une structure dure, et non reproductif produite par certaines bactéries. Elles permettent aux bactéries de rester quiescent pendant des périodes prolongées. Lorsque l'environnement devient plus favorable, les endospores peuvent se réactiver à l'état végétatif.

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 tryptique 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 tryptique 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 tryptique de caséine. Indiquer le principal constituant apporté par une peptone.

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

tryptique: digérée par la protéase, trypsin

caséine: une substance protéique (protéine) qui constitue la majeure partie des composants azotés du lait. C

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

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.

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

L'absence de croissance sur TS pourrait être due à un manque des vitamines qui sont fournies par l'extrait de levure dans le milieu MRS.

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

La source de carbone :

autotrophe:

heterotrophe: 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

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.

La fermentation transforme une source de carbone réduit, comme le glucose, en l'acide ou alcool. La fermentation emploie la phosphorylation du substrat pour produire l'ATP. L'accepteur d'électrons NAD⁺ est régénéré à partir du NADH.

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

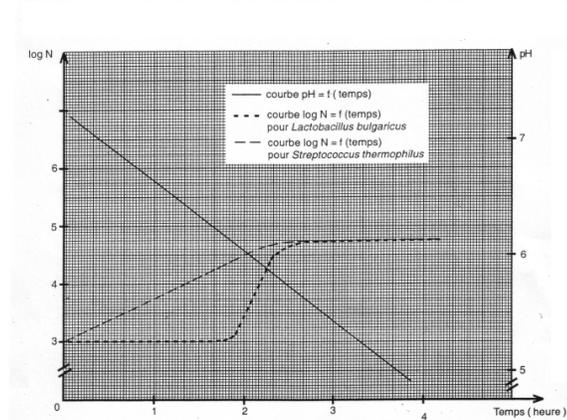
Le produit principal est l'acide lactique.

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

La homo-fermentation produit un seul produit; hétérofermentation produit plusieurs produits.

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.

On voit une réduction de pH et une croissance des deux souches des bactéries. La baisse de pH cause la coagulation des protéines, qui donne l'épaisseur au yaourt.

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.

L. bulgaricus fermente le lactose en l'acide lactique et acetaldehyde (arome).
S. thermophilus fermente le lactose en l'acide lactique.

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 ?

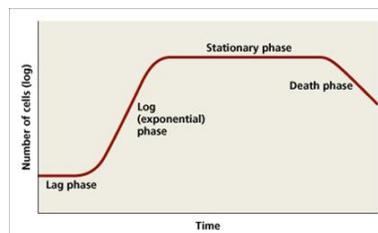
Elle est auxotrophe pour le nicotinamide.

2 Étude du pouvoir pathogène de *Yersinia pestis*.

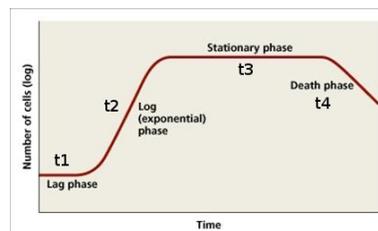
2.1 On prélève à différents temps notés t1, t2, t3, et t4, 1 cm³ d'une culture en milieu liquide de *Yersinia pestis*. Soit:

- t1 en phase de latence
- t2 en phase exponentielle
- t3 en phase stationnaire
- t4 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 t1, t2, t3, et t4.



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

La croissance bactérienne est logarithmique. Si on la visualise sur une échelle logarithmique, la courbe devient linéaire.

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 ?

Une toxine est une substance toxique élaborée par un organisme vivant (bactérie, champignon vénéneux, insecte ou serpent venimeux), auquel elle confère son pouvoir pathogène.

2.2.2 On procède aux expériences suivantes:

a) On prélève une partie de la culture au temps t2. On filtre, et on injecte le filtrat à des rats.

Parce que la toxine pesteuse est cytoplasmique et la toxine LPS fait partie de la paroi, ce filtrat ne provoque aucune réponse.

b) On prélève une partie de la culture au temps t2. On lyse les bactéries, on filtre, et on injecte le filtrat à un deuxième lot de rats.

La lyse des cellules libère la toxine pesteuse (cytoplasmique). Le filtrat tue les rats.

c) On prélève une partie de la culture au temps t2. 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.

L'extraction de la paroi purifie le LPS, qui est toxique aux rats (mais moins toxique que la toxine pesteuse).

#####

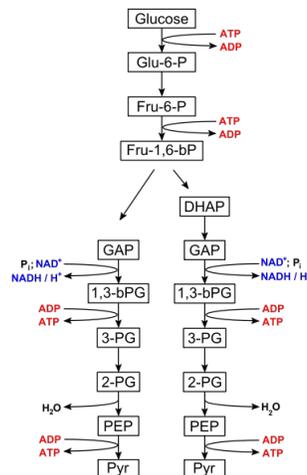
Informations supplémentaires

Le métabolisme microbien:

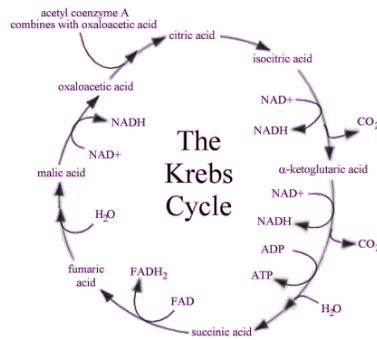
présence d'oxygène: glycolyse->cycle de Krebs->chaîne respiratoire

absence d'oxygène: glycolyse->fermentation

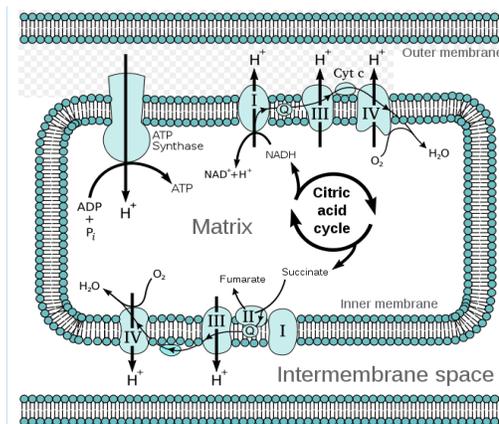
Glycolyse: oxydation de glucose en pyruvate. $\text{glucose} + 2\text{ADP} + 2\text{NAD}^+ \rightarrow 2 \text{pyruvate} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH}$



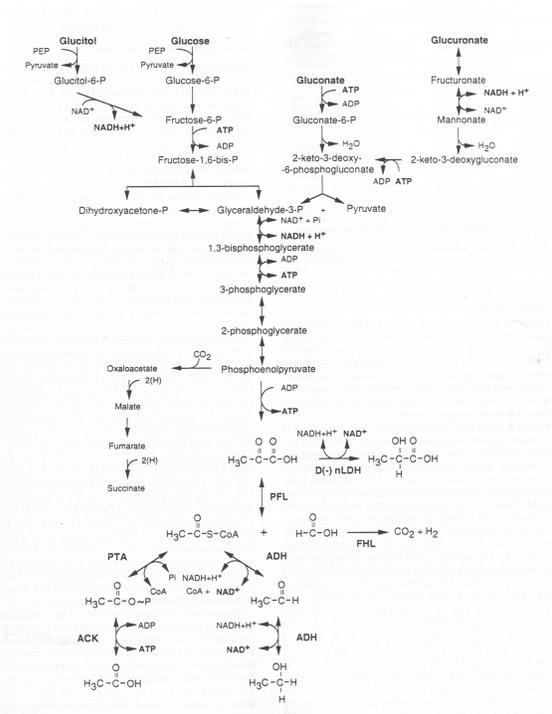
Cycle de Krebs: réaction cyclique pour production d'énergie à partir de l'oxydation d'acetyl-CoA.
 $\text{acetyl-CoA} \rightarrow 2\text{CO}_2 + 3\text{NADH} + 1\text{ATP} + \text{FADH}_2$



Chaîne respiratoire: oxydation 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).

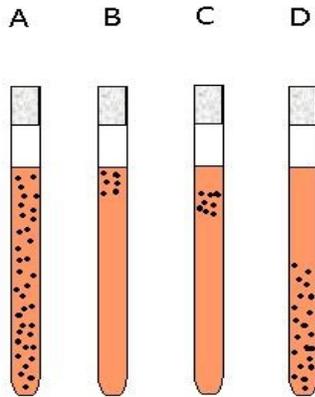


Fermentation: l'ATP est produit par la phosphorylation du substrat. L'accepteur d'électrons NAD⁺ est régénéré à partir du NADH.

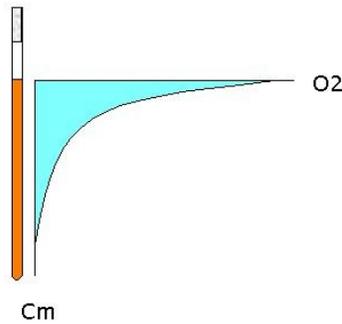


Le milieu viande foie (viande foie + glucose + agar): pour déterminer le type respiratoire des microorganismes. Images de http://fr.wikipedia.org/wiki/Viande_foie.

Croissances des microbes dans les tubes VF

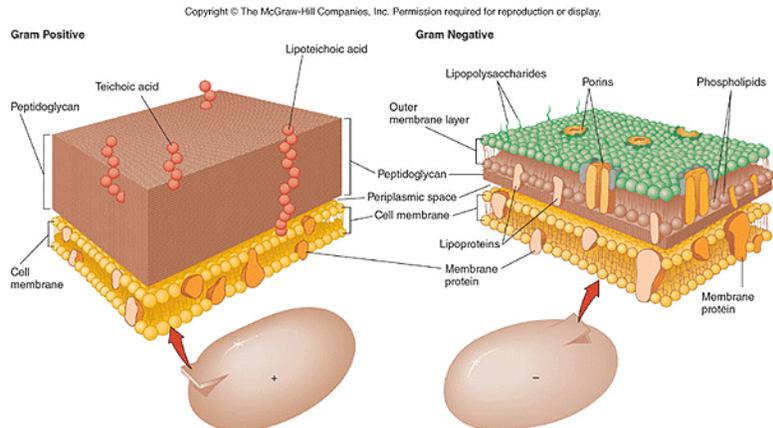
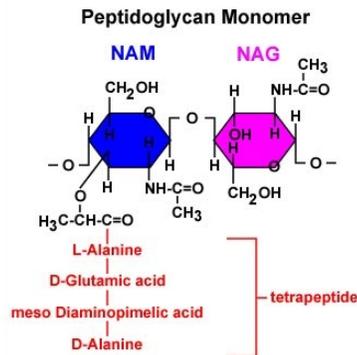


Quantité de O₂ en fonction de la profondeur dans un milieu Viande Foie Régénérer



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

Paroi bactérienne (revue)



Coloration de Gram (revue)

