

# 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 CO<sub>2</sub> comme seule source de carbone.

Fausse: **auxotrophie** est l'incapacité d'un organisme vivant de synthétiser un composé organique nécessaire à son développement.

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.

Fausse: Cette substance est indispensable qu'à un certain types de microorganismes, es auxotrophes.

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.

Vrai.

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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
NO <sub>3</sub> K	0,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,2g
CaCl <sub>2</sub>	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.

**éléments majeurs:** C (glucose), N (potassium nitrate), P (potassium phosphate), S (magnesium sulfate)

**sels:** calcium, sodium

2- Déduire des résultats, les besoins nutritionnels des 3 souches A, B et C.

**Souche A:** Prototrophe vis à vis des minéraux et hétérotrophe vis à vis du carbone (glucose).

**Souche B:** auxotrophe vis à vis des acides aminés.

**Souche C:** auxotrophe vis à vis des acides aminés et vitamines apportés par les extraits de levures.

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 ?

La bactérie doit être auxotrophe par rapport à cette vitamine

b- Donner le principe du dosage.

La bactérie est cultivée en présence de différentes concentrations de la vitamine et on détermine la biomasse obtenue en phase stationnaire de manière à construire la courbe  $N_f = F([\text{vitamine}])$ .

c- Quel est l'intérêt d'un tel dosage ?

Détermination du besoin cellulaire pour un nutriment et quantification des vitamines dans les produits alimentaires.

### 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?

Milieu A: milieu de base, aucune source de carbone.

b- Certaines bactéries pourraient se développer dans le milieu A à la condition de les incuber en atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>. Expliquer pourquoi, et donner leur type trophique vis-à-vis du carbone.

Cette bactérie est un autotrophe qui fixe le CO<sub>2</sub> en matière organique.

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

La souche I cultivée sur milieu type A plus citrate trisodique qui lui apporte le carbone organique. C'est une souche hétérotrophe vis à vis du carbone. C'est une souche prototrophe vis à vis des autres composés, tous minéraux et chimiotrophes.

d- Quelle est sa source d'azote ?

Milieu A: Phosphate d'ammonium

Milieu B: Phosphate d'ammonium

Milieu C: Phosphate d'ammonium et acides aminés

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

On ensemence le milieu B à partir d'une colonie par ce qu'on apporterait par les peptones des éléments carbonés et vitaminiques qui masquerait le fait que pour se développer la souche I ne nécessite que du citrate comme apport du C.

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

Le glucose est une source de carbone et d'énergie.

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

Chimioorganotrophe et hétérotrophe.

h- Définir et expliquer la présence d'oligoéléments ?

Eléments minéraux présents en faible quantité apportent les éléments minéraux nécessaires pour les cofacteurs des enzymes: Mn, Zn, Co, Cu, Ni.

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

les acides aminés (construction des protéines) et les vitamines sont les cofacteurs enzymatiques et ils font les transformations métaboliques. Par exemple, la thiamine (B1) enlève les groupes CO<sub>2</sub> des métabolites.

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

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

Staphylocoques 10<sup>6</sup> cellules/5 = 2x10<sup>5</sup> bact/ml

Souche II 10<sup>2</sup> cellules/5 = 20 bact/ml

Après 6h d'incubation sans phase de latence, on dénombre séparément 8x10<sup>8</sup> Staphylocoques/ml et 3.10<sup>3</sup> souches II/ml.

b- Calculer le temps de génération des deux germes.

Staphylococques:

$$N_t = N_0 * 2^n$$

$$8e8 = 2e5 * 2^n. n = \text{nombre des générations} = 11.9. \text{ Temps de génération} = 30 \text{ min.}$$

Souche II:

$$N_t = N_0 * 2^n$$

$$3e3 = 2e1 * 2^n. \text{ Nombre des générations} = 7.22. \text{ Temps de génération} = 50 \text{ min.}$$

c- Comment expliquez-vous ce résultat ?

D'habitude la souche II ne pousse pas dans le milieu B. Donc, elle bénéficie de l'apport nutritif apporté par les staphylocoques.

d- Comment s'appelle ce phénomène ?

Phénomène de syntrophie se manifeste par l'apparition d'un satellite. Si le Staphylococque reçoit une bénéfice aussi, cela pourrait être un symbiose.

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

Les colonies de la souche II forment les satellites autour des colonies Staphylococques.

#### 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.

#### **Pas de noyau, pas de mitochondrie, donc Procaryote (Archaea ou bactérie)**

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 ? **CO<sub>2</sub>**

h- Quelle est sa source d'énergie la plus probable ? **Oxydation des composés minéraux comme le Fer**

#### Exercice 5 :

36 colonies bactériennes ont poussé sur un milieu de culture solide ensemencé 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-  $4 \times 2^{24}$  (67,108,864)**

#### Exercice 7 :

Une suspension de bactéries de concentration  $4 \times 10^8$  bactéries/ml est diluée au  $2 \times 10^{-5}$ . 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 apparaîtront sur la boîte ? **800 colonies**

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?

**4 mL contiendrait 800X4 = 32,000 bactéries**

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

**Résistance à l'ampicilline**

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

**32,000/500 = 64 bactéries/ml**

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 ?

**$N_0 = 64$  cellules par ml**

**$N_t = ?$**

**$G = t/n$      $t = 600$  min**

**$n = t/G$**

**$n = 600/30$**

**$n = 20$**

**$N_t = N_0 \times 2^n$      $N_t$**

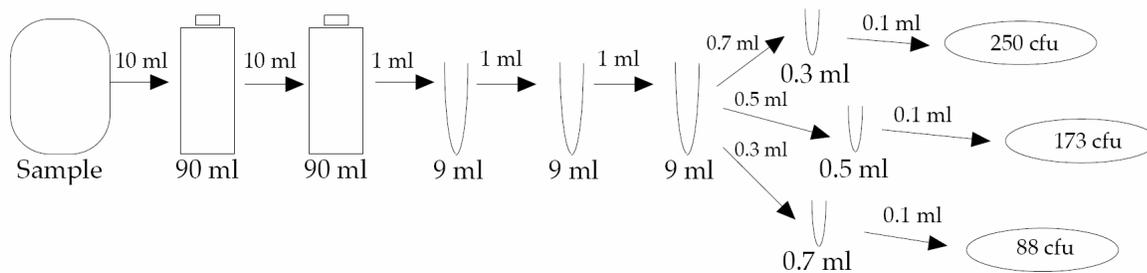
**$N_t = 16 \times 2^{20}$**

**Soit : 67,108,864 cellules/ml**

**$N_t = 1.7 \cdot 10^7$**

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).



**Nombre de bactéries = Nombre de colonies X (1/Fd)**

**Nombre de colonies = nombre de bactéries X Fd**

**$Fd1 = 7 \times 10^{-7}$**

**$Fd2 = 5 \times 10^{-7}$**

**$Fd3 = 3 \times 10^{-7}$**

**A partir de 250 CFU     $250 \times (1/Fd1) \times 500$**

**$1,78 \times 10^{11}$  CFU/500mL**

**A partir de 173 CFU     $173 \times (1/Fd2) \times 500$**

**$1,73 \times 10^{11}$  CFU/500mL**

**A partir de 88 CFU     $88 \times (1/Fd1) \times 500$**

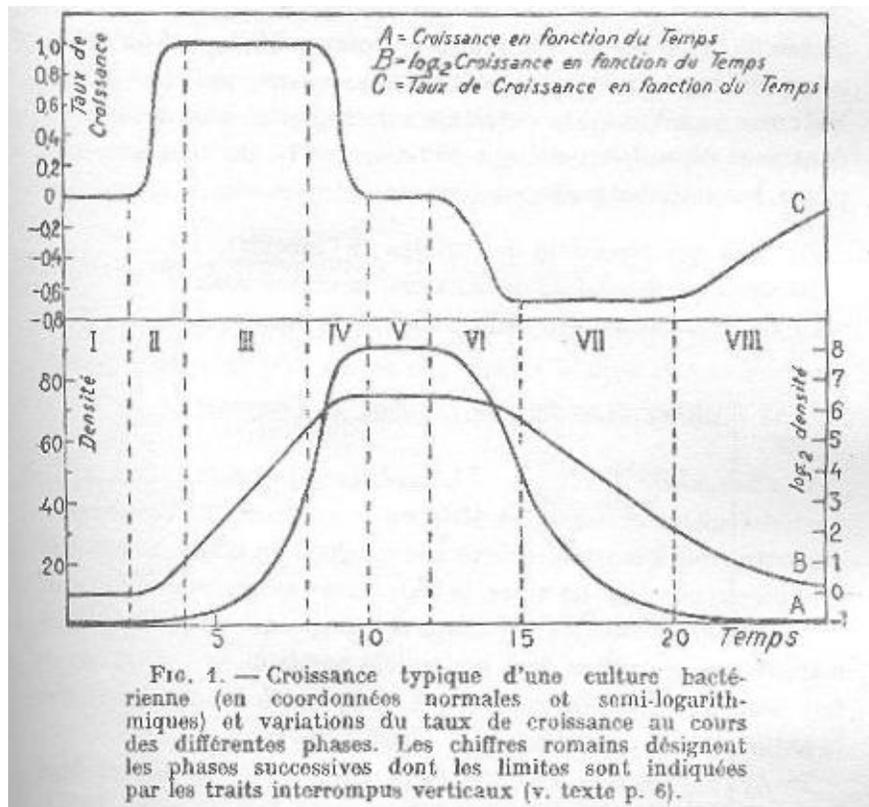
**$1,46 \times 10^{11}$  CFU/500mL**

**Moyenne :  $1,66 \times 10^{11}$  CFU/500mL**

#####

## 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 CO<sub>2</sub>).

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 determiner 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.

