

LES MICRO-ORGANISMES

www.hattemer.fr/vie_du_cours/micro-organismes.doc

I. Introduction

Ce dossier se propose d'étudier les micro-organismes. Ils sont définis en biologie comme étant des organismes vivants microscopiques. Dès l'Antiquité, on croyait à l'existence de ces « animalcules », invisibles jusqu'à l'invention du microscope.

Les caractéristiques de chacun des deux grands groupes de micro-organismes sont abordées : les eucaryotes possédant un noyau et les procaryotes qui n'en ont pas. Les procaryotes se subdivisent en archéobactéries, bactéries primitives et eubactéries, bactéries vraies. Les eucaryotes sont regroupés selon leur affinité : animale, végétale ou fongique.

Ensuite, la taille et les besoins des micro-organismes sont décrits.

Un chapitre est consacré en particulier aux bactéries. De tous les organismes vivants, les bactéries sont en effet les plus répandues et celles dont la présence est la plus ancienne sur Terre. Elles sont présentes partout : sol, eau, air, dans les systèmes digestifs et peuvent survivre à des environnements extrêmes très agressifs. Elles sont également très variées. Les bactéries sont classées selon leur forme, leur métabolisme et leur besoin en oxygène.

Peu de micro-organismes sont pathogènes, surtout depuis les règles de base de l'asepsie définies par Louis Pasteur. Leur activité est même essentielle à la vie sur Terre : quelques actions des bactéries sont exposées.

II. Définition

Les micro-organismes sont des êtres vivants microscopiques, invisibles à l'œil nu : ils doivent être observés au microscope. On appelle microbiologie, la science qui étudie les micro-organismes.

III. Historique

Dès l'Antiquité, on croyait à l'existence d'agents infectieux transmissibles, invisibles à l'œil nu. Les micro-organismes seront observés pour la première fois en 1677 par Antoine van Leeuwenhoek et son microscope.

A partir de 1857, Louis Pasteur met en évidence le rôle des micro-organismes dans les fermentations lactique et alcoolique. En 1884, Hans Christian Gram développe une technique de coloration (nommée « coloration de Gram ») qui permet la classification des bactéries.

Il faudra attendre 1928 pour qu'Alexander Fleming découvre les propriétés antibactériennes de la pénicilline ; puis 1997 pour que le premier génome bactérien (celui d'*Escherichia coli*) soit séquencé.

A. Antoine van Leeuwenhoek (1632-1723)

Antoine van Leeuwenhoek a amélioré le microscope en 1677, en polissant des lentilles à la main. Cet outil qui grossissait 300 fois a ainsi permis la découverte des bactéries. C'est le premier à avoir étudié les micro-organismes et la biologie cellulaire.

B. Louis Pasteur (1822-1895)

A partir de 1854, Pasteur étudie les processus de fermentation. Ses recherches s'étaleront sur 15 ans. Il constate, grâce au microscope, que toutes les fermentations sont l'œuvre de micro-organismes : les ferments.

En 1862, grâce à l'expérience du ballon « à col de cygne », il démontre qu'un liquide reste inaltéré en prenant la précaution de le mettre à l'abri des micro-organismes. En revanche, si ce liquide est laissé à l'air libre, de nombreux microbes s'y développent. (C'est la découverte de la notion de stérilité d'un milieu).

Louis Pasteur isolera 3 germes entre 1878 et 1880 : le streptocoque, le staphylocoque et le pneumocoque. En affirmant que chaque maladie a son microbe et que celui-ci vient de l'extérieur dehors, Pasteur établit les règles de bases de l'asepsie.

En 1880, Pasteur travaille sur le choléra des poules. Il découvre que les animaux ne meurent pas si on leur injecte la culture d'un microbe vieilli. De plus, ces mêmes poules inoculées quelques jours plus tard avec une culture très virulente, demeurent en parfaite santé : elles sont vaccinées. Louis Pasteur réussit à affaiblir le virus de la rage en suspendant une moelle contaminée dans un bocal dont l'air est asséché. Il applique pour la première fois, avec succès, son vaccin antirabique à un jeune garçon, Joseph Meister, le 6 juillet 1885.

Il recherchera ensuite les causes possibles des altérations du vin. Il démontre que les responsables sont des germes bactériens parasites au processus de fermentation naturel. Il apprend alors aux industriels à ne travailler qu'avec des germes purs et leur montre comment des instruments mal lavés deviennent rapidement le refuge de germes parasites. Il invente une technique appelée pasteurisation. Elle consiste à chauffer le liquide quelques minutes à une température située entre 55 et 60°C afin d'éliminer les germes indésirables du milieu.

IV. Classification et caractéristiques

On distingue les micro-organismes procaryotes qui ne possèdent pas de noyau, comme les bactéries et les Archéa, et les micro-organismes eucaryotes qui possèdent un noyau, comme les champignons, les levures, les algues et les protozoaires.

A. Les procaryotes (voir quelques exemples en annexe 2)

1. Les archéobactéries

Les archéobactéries sont des bactéries primitives qui se distinguent des eubactéries (bactéries « vraies ») par certains caractères biochimiques comme la constitution de la membrane cellulaire ou le mécanisme de réplication de leur ADN (Acide DésoxyriboNucléique).

Le groupe des archéobactéries ou Archaea ne comprend essentiellement que des espèces anaérobies, c'est-à-dire n'ayant pas besoin d'oxygène.

Elles sont très diversifiées. Certaines sont connues pour leur capacité à vivre dans des milieux extrêmes et occupent des niches écologiques qu'elles sont souvent seules à occuper comme les milieux très acides, très salés ou très chauds. Par exemple, *Acidophilus thermophilus* s'est adaptée aux conditions (acides et brûlantes) de vie dans les geysers. D'autres vivent dans des milieux plus courants comme le sol, la mer ou l'intestin des animaux.

2. Les eubactéries

On retrouve les bactéries dans notre quotidien, sol, nourriture...

Les bactéries sont traitées au chapitre VII.

B. Les eucaryotes

Les eucaryotes ont un système membranaire interne enfermant des organites comme le noyau, les mitochondries ou les vacuoles. Le noyau contient le matériel génétique de la cellule. Les mitochondries libèrent l'énergie fournie par les aliments : ce sont les centrales énergétiques de la cellule. Les vacuoles sont de petites cavités membranaires chargées d'une multitude de fonction dont la décomposition de substances absorbées par la cellule (digestion).

Ils présentent un cytosquelette interne constitué de tubules et de filaments qui peuvent se contracter. Ils sont essentiels pour les mouvements internes et la division (mitose) de la cellule.

Les protistes regroupent les êtres vivants mobiles et unicellulaires. Le règne des protistes se divise principalement en trois groupes : les protozoaires à affinités animales, les protophytes à affinités végétales et les myxomycètes à affinité fongique.

Voir quelques exemples en annexe 1.

1. Les protozoaires

Ils se trouvent dans le sol, l'eau douce, l'eau de mer, mais aussi comme parasites des animaux et des Hommes.

Les protozoaires ne possèdent pas de paroi cellulaire. Ils se nourrissent par endocytose : le protozoaire émet dans la direction de sa proie des protubérances cytoplasmiques (pseudopodes) qui l'enveloppent, puis les pseudopodes se rejoignent, et la proie est alors enfermée dans une vésicule dans le cytoplasme-même. Elle sera digérée grâce à l'intervention d'enzymes digestives.

Remarque : selon la taille du matériel absorbé, on distingue la pinocytose (ingestion de fluides ou de macromolécules) et la phagocytose (absorption de grosses particules voire de cellules).

Parmi les protozoaires, on peut citer les amibes avec leurs pseudopodes, les ciliés qui possèdent deux noyaux (macro et micronucléus) et les sporozoaires qui sont des parasites.

2. Les algues

Contrairement aux champignons et aux protozoaires, les algues ont des pigments chlorophylliens. Ce sont des êtres vivants capables de photosynthèse dont le cycle de vie se déroule généralement en milieu aquatique.

Les algues sont présentes dans le sol, les plantes, l'eau douce et l'eau de mer.

Elles sont autotrophes, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de produire de la matière organique en procédant à la réduction du carbone minéral (dioxyde de carbone). Cela s'accompagne d'un prélèvement de sels minéraux dans le milieu.

La majorité des protophytes constitue le phytoplancton.

3. Les champignons

Les champignons sont présents dans le sol, les plantes, les débris végétaux, le lichen. Ils peuvent être parasites de l'Homme, des animaux et des plantes.

Les champignons sont absorbotrophes (ils se nourrissent par absorption). Ils secrètent des enzymes qui digèrent des polymères dans le milieu extérieur : ce mécanisme chimique transforme par exemple les glucides en petites molécules qui sont ainsi absorbées.

Parmi les champignons on peut citer les levures. Ce sont des champignons unicellulaires qui provoquent la fermentation de matières organiques animales ou végétales. Elles sont employées pour fabriquer le pain, la bière, le vin (dans ce dernier cas, *Saccharomyces cerevisiae* intervient – cf Annexe 1).

4. Les lichens (association champignon-algue)

Un lichen est une association entre un champignon hétérotrophe (ascomycète) et une algue verte (cyanobactérie). Cette symbiose est durable et reproductible: elle donne naissance à de nouveaux individus.

Le champignon fournit le support, les sels minéraux et la réserve d'humidité, tandis que l'algue apporte les nutriments issus de la synthèse chlorophyllienne.

V. Taille des micro-organismes

Un microscope optique peut distinguer les objets de moins d'un micromètre tandis qu'un microscope électronique peut détailler ceux inférieurs à 0,1 nanomètre (milliardième de mètre).

La taille moyenne des cellules bactériennes est de 0,5 à 1 micromètre (millionième de mètre). (Certaines bactéries ont une taille de plus de 50 micromètres. On connaît même une exception : *Thiomargarita namibiensis*, découverte en 1999, pouvant atteindre 1 mm de diamètre, visible à l'œil nu).

Les cellules eucaryotes ont un diamètre allant de 5 à 30 micromètres. Une bactérie mesure environ le dixième de la taille d'une cellule animale ou végétale.

La principale raison de cette taille réduite est le rapport entre la surface et le volume : si la cellule devient trop grosse, il lui devient impossible d'effectuer les échanges de nutriments et de déchets. Dans une cellule, les nutriments sont dirigés là où ils sont nécessaires mais il n'y a ni veines, ni artères pour leur transport : les molécules diffusent à l'intérieur de la cellule. Un tel système de transport ne peut plus fonctionner lorsque la cellule atteint une trop grande taille : un réseau de membranes internes existe alors.

VI. Besoin des micro-organismes

A. Lieux de vie

Comme nous l'avons vu au IV, les micro-organismes sont rencontrés dans tous les types d'environnements présents dans la nature, c'est-à-dire dans tous les écosystèmes. On les trouve dans le sol, les eaux douces, les mers, l'air. Certaines archéobactéries appelées « extrêmophiles » vivent dans des milieux très hostiles comme les pôles, les déserts, les geysers, au fond de l'océan.

Selon le principe de la sélection naturelle par le milieu de Charles Darwin les conditions physico-chimiques de l'environnement sélectionnent les micro-organismes. (Voir annexe 4).

B. Association

De nombreux micro-organismes sont associés aux plantes et aux animaux avec lesquels ils entretiennent des relations de symbiose, de commensalisme ou de parasitisme.

La symbiose est une association durable entre deux êtres vivants et dont chacun tire bénéfice. Ils s'aident mutuellement à se nourrir, se protéger ou se reproduire. (Par exemple, *Azospirillum lipoferum* et les plants de maïs vivent en symbiose dans les sols).

Le commensalisme est un type d'association naturelle entre deux êtres vivants dans laquelle l'hôte fournit une partie de sa propre nourriture au commensal : il n'obtient en revanche aucune contrepartie évidente de ce dernier (la relation est à bénéfice non-réciproque).

On peut considérer le parasitisme comme un cas particulier de la prédation : le parasite se nourrit aux dépens de son hôte sans le tuer.

Certains micro-organismes sont pathogènes : ils peuvent donner des maladies aux plantes ou aux animaux. Par exemple, *Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie du sol responsable de l'apparition sur de nombreuses espèces végétales, de la galle du collet (crown gall).

VII. Les bactéries

Les bactéries sont communément appelées microbes. Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires procaryotes, caractérisés par une absence de noyau et d'organites. L'ADN d'une bactérie est contenu dans un seul chromosome. Certaines bactéries n'ont aucune division interne, tout leur métabolisme s'effectue dans le cytoplasme ou sur la membrane cellulaire. Les ribosomes, petites structures nécessaires à la synthèse des protéines, sont dispersés dans le cytoplasme ou fixés à l'intérieur de la membrane plasmique.

A. Identification des bactéries

Coloration de Gram

Les bactéries sont généralement entourées d'une paroi cellulaire. Celle-ci permet l'identification de nombreux types de bactéries. La coloration de Gram est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie médicale pour la classification des bactéries. On distingue :

- Les bactéries à Gram positif (colorées en violet ou mauve avec la coloration de Gram) ;
- Les bactéries à Gram négatif (colorées en rose par la technique de Gram).

Le résultat du test permet de choisir un antibiotique efficace en cas d'infection.

1. Les formes

Les bactéries se présentent sous des formes diverses :

- les cocci (ou coques) de forme ronde (ex. Streptococcus) ;
- les bacilles, bâtonnets allongés aux extrémités arrondies (ex. Lactobacillus) ;
- les formes intermédiaires ou coccobacilles (ex. les bactéries du genre Brucella) ;
- les spirilles de forme plus ou moins spiralée (ex. Azospirillum).

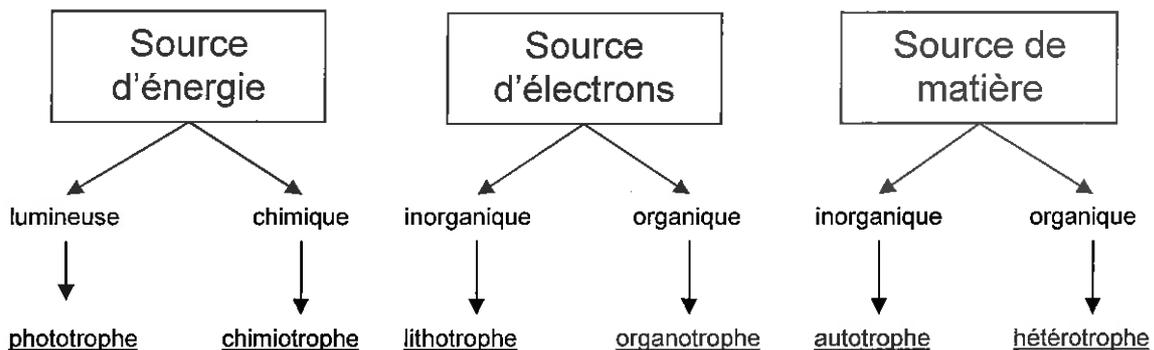
B. Mode de vie

Les eubactéries constituent en nombre de cellules, et en masse, la plus grande partie du vivant. On trouve des eubactéries dans presque tous les milieux où la vie se révèle possible.

1. Métabolisme

Toute vie a besoin d'énergie et de matières premières pour se développer, s'entretenir et se reproduire. Ce processus s'appelle le métabolisme.

Selon leurs sources de carbone, d'électron et d'énergie, on distingue différents types trophiques :



Les types les plus courants sont : les photolithoautotrophes, photoorganohétérotrophes, chimioorganohétérotrophes et chimioorganohétérotrophes.

Quelques exemples :

- Les **phototrophes** tirent leur énergie de la lumière. Les cyanobactéries se servent de chlorophylle pour capter l'énergie solaire et fabriquer du glucose à partir du dioxyde de carbone et de l'eau. Par exemple, les sulfobactéries utilisent l'énergie solaire, le dioxyde de carbone et l'acide sulfurique pour élaborer des glucides et du soufre.
- Les **chimiotrophes** trouvent leur énergie d'éléments chimiques non organiques. Les bactéries vivant près des cheminées volcaniques au fond des mers tirent leur énergie de l'acide sulfhydrique.
- Les **hétérotrophes** trouvent leur énergie dans la matière organique, qu'elle soit vivante (parasitisme) ou morte. Les bactéries hétérotrophes consomment les composés du carbone élaborés par d'autres organismes ; elles décomposent et recyclent la matière organique grâce à des enzymes. C'est le groupe le plus important.
- Les **lithotrophes** utilisent comme donneur d'électrons un substrat minéral dans leur métabolisme énergétique : ils « mangent » des minéraux.

2. Respiration

Selon leur type énergétique, on sépare les bactéries en plusieurs groupes :

- les aérobies strictes : elles vivent uniquement en présence d'oxygène ;
- les aérobies facultatives, qui peuvent utiliser toutes les voies énergétiques ;
- les anaérobies strictes : elles ne vivent qu'en l'absence d'oxygène ;
- les anaérobies facultatives, qui ne peuvent utiliser que les fermentations ;
- les microaérophiles, rares, vivant uniquement sous pression réduite d'O₂ ;

C. Mobilité des bactéries

La plupart des bactéries n'ont pas leur propre moyen de locomotion : elles flottent librement dans l'eau ou l'air ou sont transportées par les animaux qu'elles ont infectés.

Certaines bactéries, au contraire, sont mobiles et se déplacent à l'aide d'un ou plusieurs **flagelles**. Le flagelle ressemble à un fouet allongé : c'est un fin prolongement de membrane cellulaire.

Certaines bactéries comporte un seul flagelle polaire : on parle de ciliature **monotriche**. Lorsque l'on trouve plusieurs flagelles polaires, la ciliature est dite **lophotriche**. Parfois, on n'observe que deux flagelles, situés à chaque pôle de la cellule : il s'agit d'une ciliature **amphitriche**. Enfin, lorsque les flagelles entourent la bactérie, sa ciliature est **péritriche**.

D'autres bactéries se déplacent par glissement.

Les bactéries mobiles peuvent réagir à des stimuli, être attirées par des substances nutritives comme les sucres, l'oxygène ou être repoussées par des substances qui leur sont nuisibles. Ce comportement est nommé « **chimiotactisme** ».

D. Développement et reproduction

1. Cycle de vie

Dans des conditions idéales, les bactéries se reproduisent et doublent leur nombre toutes les vingt minutes environ.

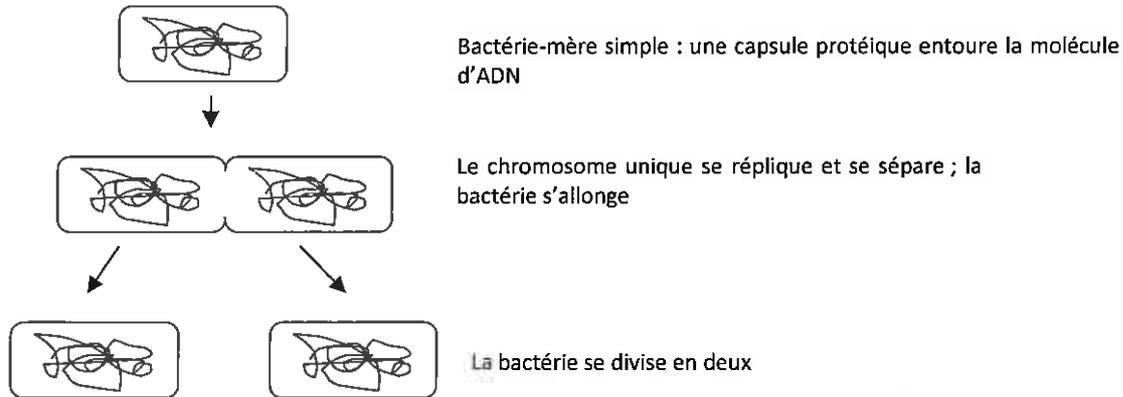
Dans des conditions ordinaires, du fait des réserves nutritives limitées dans leur milieu de vie, les bactéries ne se divisent qu'au bout de quelques jours.

Dans des conditions défavorables, certaines bactéries forment une endospore avec une paroi épaisse autour de leur ADN et de leur cytoplasme. L'endospore résiste à la chaleur, la sécheresse, aux radiations et aux désinfectants. Elle peut rester au repos pendant de longues années jusqu'à ce que les conditions du milieu s'améliorent : l'endospore redevient alors active et se transforme en une nouvelle bactérie.

2. Reproduction

Les bactéries sont des organismes asexués, la reproduction s'effectue par division cellulaire. Une cellule mère va donner naissance à deux cellules filles identiques. La division cellulaire bactérienne se produit par scission binaire.

Division cellulaire de la bactérie (schéma simplifié)



Remarque : les deux cellules obtenues peuvent se séparer ou rester attachées pour former une chaîne de bactéries.

E. Quelques exemples d'actions des bactéries

Historiquement, les bactéries sont associées aux maladies. En effet, de nombreux parasites sont des bactéries. L'étude des bactéries a longtemps été dominée par la pathologie qui est l'étude des maladies et des effets qu'elles provoquent. L'activité des bactéries est pourtant essentielle à la vie.

1. Un exemple : la transformation de l'azote en ammoniac

Les bactéries du sol transforment l'azote de l'air en un composé assimilable (azote ammoniacal) par les plantes. L'azote est un composé indispensable à la vie. L'air est composé à 78% d'azote. Les animaux et la plupart des plantes ne peuvent pas l'utiliser directement. Sa transformation par les bactéries est donc indispensable.

2. La digestion

Dans nos intestins, certaines réactions biochimiques réalisées par des bactéries permettent d'éliminer les déchets de l'organisme. Dans le gros intestin, on trouve en effet environ 10^{12} bactéries par gramme de contenu, avec 50 genres (par ex. Lactobacillus, Bifidobacterium) et plusieurs centaines d'espèces

Autre exemple : les vaches se nourrissent exclusivement de matières cellulosiques mais elles ne possèdent pas d'enzyme capable de les digérer. Ce sont les bactéries présentes dans leur estomac qui vont réaliser la première dégradation de la cellulose.

3. Minéralisation des matières organiques

Ce sont également les micro-organismes qui transforment toutes les matières organiques mortes (plantes et animaux) ou les déchets en matières minérales. Sans cette minéralisation des matières organiques par les micro-organismes, il n'y aurait plus de possibilité de vie sur terre.

Voir Annexe 3

VIII. Conclusion

Les micro-organismes inspirent souvent la méfiance. Ils sont invisibles et parfois responsables de maladies, voire d'épidémies. On peut considérer les eubactéries comme le groupe le plus important du vivant. Des scientifiques ont estimé que le poids total des micro-organismes est de 25 fois le poids de toutes les formes animales. Les bactéries que nous transportons sont dix fois plus nombreuses que les cellules qui constituent notre corps. Cependant, sur cette immense quantité, seule une toute petite proportion est pathogène.

Les plus anciens fossiles connus, les stromatolites, sont d'origine bactérienne et sont datés de 3.5 milliards d'années. En 2000, une équipe internationale de chercheurs découvrit de longues chaînes de cristaux de magnétite incrustés dans une météorite venant de Mars. Ces cristaux ressemblent à ceux formés par les bactéries magnétotactiques (sensibles au champ magnétique) terrestres. Ces chaînes pourraient avoir été formées par d'anciens organismes vivants.

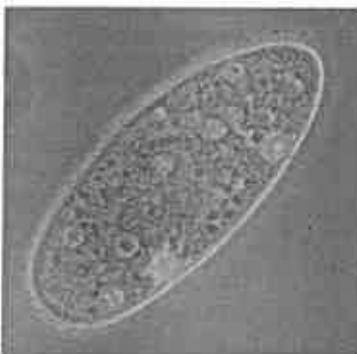
L'activité des micro-organismes est essentielle à la vie sur Terre. De plus, l'Homme sait utiliser le travail des micro-organismes. Les biotechnologies qui sont l'ensemble des méthodes et des techniques qui utilisent comme outils des organismes vivants (cellules, bactéries, levures...ou une partie de ceux-ci (enzymes, par ex.)) sont utilisées dans de multiples domaines : alimentation, agriculture, pharmacie, médecine... . On peut citer, par exemple, la fabrication du pain, de la bière, du vin, des fromages, de la lessive (« enzymes gloutons ») et la dépollution des sites industriels....

Pour cela, des organismes modifiés sont de plus en plus utilisés. Mais l'Homme ne prend-il pas le risque de détruire les équilibres écologiques ?

IX. Annexes

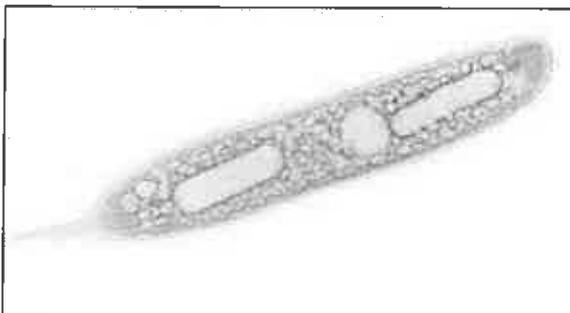
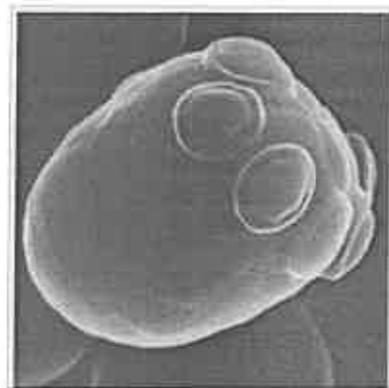
A. Annexe 1 : eucaryotes

Quelques exemples de micro-organismes eucaryotes



Exemple de protozoaire cilié : la paramécie utilise des cils pour se déplacer et se nourrir.

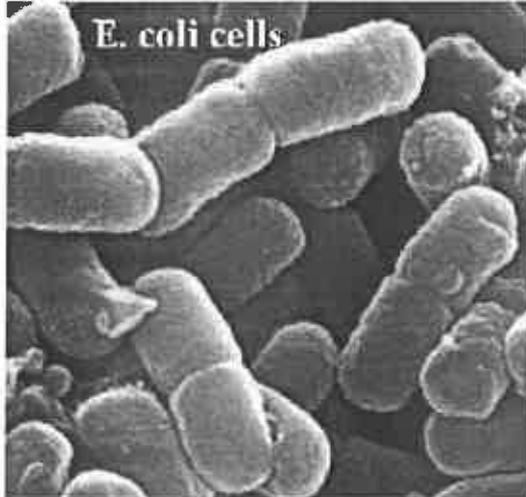
Exemple de levure : *Saccharomyces cerevisiae*
Elle est utilisée dans la fabrication du pain, du vin et de la bière



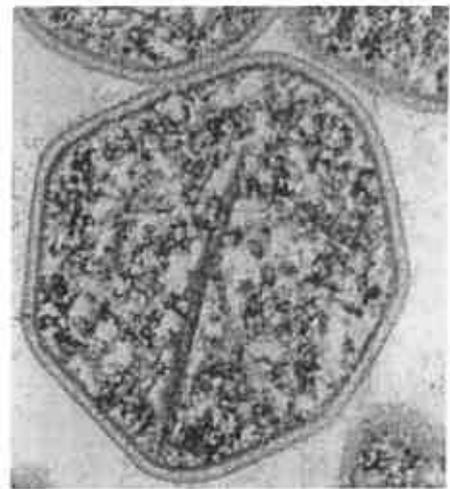
Exemple d'algues : l'euglène

B. Annexe 2 : procaryotes

Quelques exemples de micro-organismes procaryotes



Exemple de procaryote : une bactérie fréquente du tube digestif de l'Homme : *Escherichia coli* vue en microscopie électronique, (Photo F. Sauvager / Université Rennes).



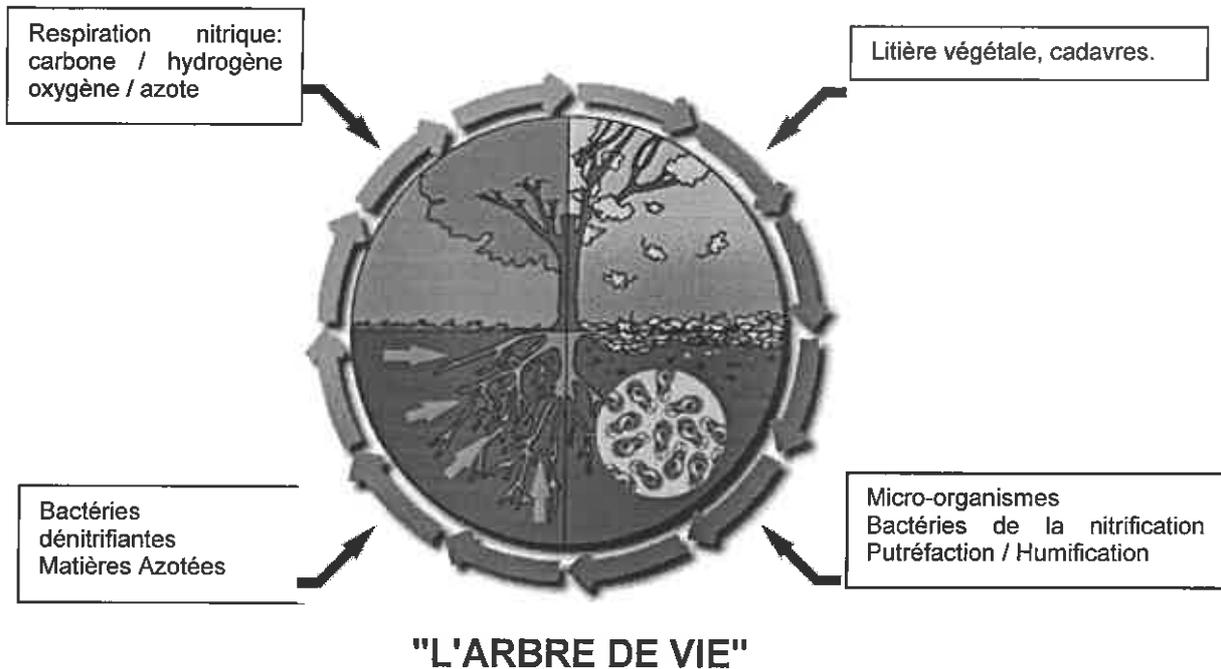
Exemple de procaryote : archéobactérie thermoacidophile (milieu chaud et fortement acide) *Acidianus ambivalens*

C. Annexe 3 : cycle de l'azote

La minéralisation correspond à la dégradation des molécules complexes en produits simples tels que H_2O , CO_2 , CH_4 , N_2 , O_2 , qui retournent à l'atmosphère et seront utilisés par les êtres vivants pour former de nouvelles molécules organiques. C'est ce que l'on appelle le cycle de la matière.

La biodégradation correspond à l'élimination complète d'un composé complexe en produits simples.

LE CYCLE DE L'AZOTE

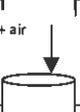


D. Annexe 4 : effet du milieu

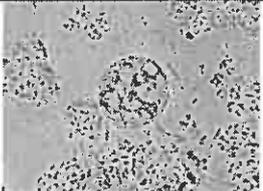
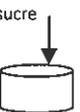
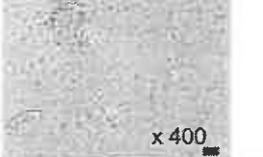
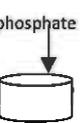
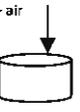
Effet du milieu sur les micro-organismes

(description de l'expérience faite par les élèves du lycée Galilée)

La source de micro-organisme provient d'herbe coupée mise à macérer dans de l'eau. On dispose ce mélange dans quatre récipients.

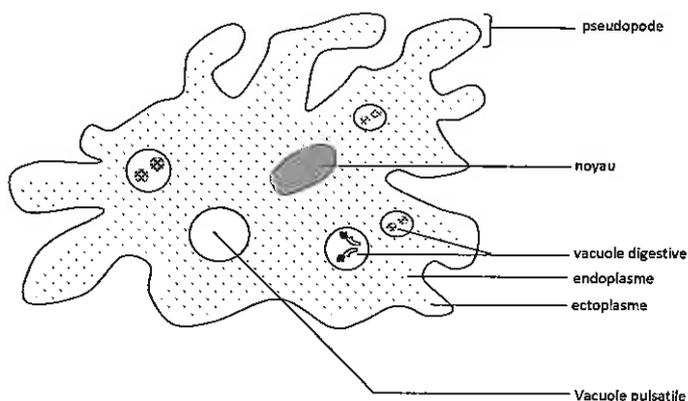
	Récipient sans ajout : c'est le témoin Ce mélange s'apparente à l'eau de mare.
	On ajoute du sucre. Ce mélange s'apparente à de l'eau polluée avec des déchets organiques
	On ajoute du phosphate. Ce mélange s'apparente à une eau polluée avec des engrais.
	On oxygène ce récipient avec un bulleur d'aquarium. Ce mélange s'apparente à l'eau de rivière

Deux semaines plus tard, on observe les mélanges à l'œil nu et au microscope.

Mélange	Œil nu	Microscope	
	Le mélange est terne, on observe un film en surface.		La flore est riche et variée. On observe de nombreuses bactéries, amibes, volvox...
	Le mélange mousse, on observe un dégagement gazeux, il y a fermentation.		On observe de nombreuses bactéries. Quelques eucaryotes, de petits flagellés et des amibes.
	L'aspect est verdâtre		On observe des algues unicellulaires microscopiques comme les euglènes flagellées.
	Le liquide est plus clair que les autres mélanges et sans odeur (pas de fermentation)		Ce mélange est pauvre en bactéries, on note la présence de protistes et de protozoaires : amibes avec pseudopodes, rotifères, philodina, vers, nématodes.

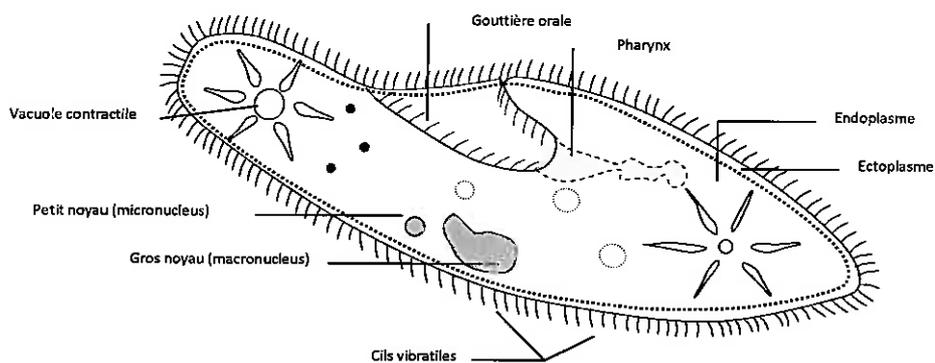
Bilan de l'expérience : les milieux ont sélectionné les micro-organismes.

Annexe 4 (suite : schéma de quelques micro-organismes observés)



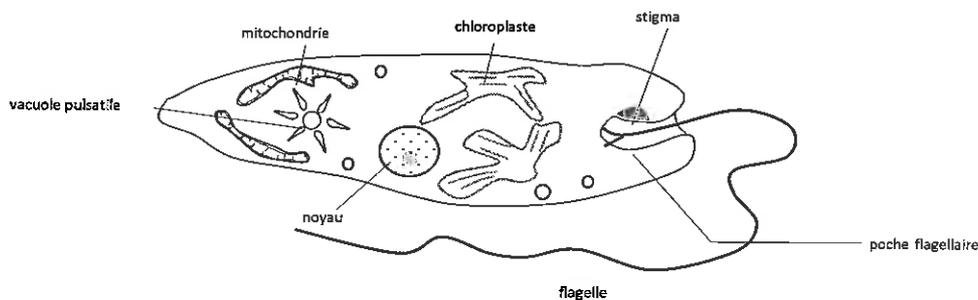
Amibe

Animal unicellulaire, vivant dans l'eau douce ou salée, se déplaçant à l'aide de ses pseudopodes
 Taille de 200 μm à 500 μm
 (extrêmes : de 20 μm à 1 mm de longueur)



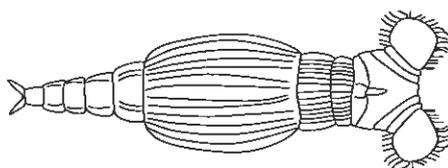
Paramécie

Protozoaire cilié vivant en eau douce se déplaçant en battant de façon synchronisée ses cils.
 Taille de 50 μm à 300 μm selon les espèces



Euglène

Protiste flagellé de forme cylindrique ou ovale souvent présent dans l'eau riche en nutriments.
 Sa couleur vert clair provient des nombreux chloroplastes.
 Taille de 20 à 300 μm



Pied adhésif à deux orteils

Double couronne de cils tournant en sens contraire pour attirer la nourriture

Rotifère Philodina

Invertébré aquatique microscopique dont le corps porte une couronne de cils autour de l'orifice buccal.
 Taille de 0,5 à 2 mm

Microbiologie

1. Microbiologie générale
2. Nutrition bactéries
3. Croissance bactérienne
4. Métabolismes
5. Taxinomie

1. Microbiologie générale
cf. cours de l'année dernière.

2. Nutrition des micro-organismes

I Besoins des nutritionnels

Tous les microorganismes ont besoin: d'eau, d'une source d'énergie, carbone, azote et minéraux...

Certains ont aussi besoin d'un facteur de croissance. Ils sont **auxotrophes** prototrophes

Les structures tertiaires et quaternaires des micro sont liés par des interactions faibles → besoin de renouveler ces structures.

Les bactéries se dupliquent → besoin de matière.

Les bactéries ont besoin d'énergie pour se déplacer, ou transporter

Composants: carbone, azote, hydrogène, oxygène, soufre, phosphore et autres oligoéléments et minéraux.

Besoin aussi de vitamines.

A Macroéléments

* Le carbone sert-à la constitution (squelette)
- en tant que source d' e^- (potentiel réducteur) du métabolisme

• Les bactéries autotrophes trouvent elles-même leurs C, souvent par photosynthèse (telles que les cyanobactéries).

• Les bactéries hétérotrophes ont besoin de trouver leurs C dans le milieu extérieur (Escherichia coli)

* L'azote est constituant important de l'ADN

Son origine est soit minérale (ammoniac, gaz...) soit organique (peptides et protéines).

* Soufre et Phosphore sont souvent utilisés dans leur forme minérale.
Trop de Phosphore nuit à l'organisme bactérien (not^{mt} milieux aquatiques)
La cystéine est réductrice, la méthionine
Le soufre compose vitamines, aa et autres @ organiques.

B Oligoéléments: Na, K, Mg, Cl₂ mais aussi Fe, Mn, ... M
Ils participent à l'homéostasie (maintient du pH) et à la régulat°
des échanges transmb.
De nbx ions (surt^t cations) rentrent dans la régulat° enzymatique
Le Fer doit être fonctionnalisé pour être utilisé.
Le pseudomonas

C Source d'énergie (annexe)

Besoins spécifiques, facteurs de croissance

On a distingué prototrophes et auxotrophes.

En facteur de croissance, on en a 3 types:

- aa: l'H a besoin de ≈ 20 aa, les bactéries en ont besoin de moins (Lactococcus)
- bases constituant des acides nucléiques
- vitamines. enterococcus possède une d'au moins 8 vitamines.

On peut utiliser des bactéries pour synthétiser des vitamines.

métabolite essentiel \neq facteur de croissance
(ex: pyruvate)

II Entrée des nutriments

La paroi a un rôle purement mécanique alors que la mb cytoplasmique à structure bicouche est un genre de portail des nutriments.

3 types de transport:

- diffusion facilitée n'utilise pas d'énergie
 - transport actif utilise de l'énergie
 - translocation de groupes
- } (annexe)

Une même @ peut être transportée de différentes façon.

E. coli transporte la glucose de 3 façons différentes,
et le galactose de 5 — — —

III Culture de bactéries

en milieux de cultures...

... leurs caractéristiques varient de m que leur composition.

... ils sont utilisés pour l'isolement de bact., la conservation de cultures pures

... recherches, industries, diagnostiques industrielles.

Dans un milieu de culture, il faut les éléments utiles à la bactérie, de l'eau, un tampon?!

On classe les milieux selon la composition, la consistance, et l'utilisation.
Dans la mesure du possible, on reconstitue son milieu naturel.

composition → naturel ou synthétique

consistance → liquide, semi-solide, solide

utilisation → non sélectif (ou "base"), électif (ou "différenciel"), sélectif

Selon consistance

a. Milieux naturels ou complexes

Ils sont riches et peuvent être des

On leur donne des digesta, tels que des peptones, des extraits de viandes et de levure
ex. (annexe)

b. Milieux synthétiques

Ou "chimiquement définis" sont utilisés par des bact. exigeantes, ou pour mettre en évidence des caractéristiques

c. Milieux semi-synthétiques

Les plus fréquemment utilisés

a. Selon la consistance

Les milieux liquides sont ++ pour le devlp des bactéries, sa culture, ou pour des études spécifiques. → boîtes de pétri

Les milieux solides sont en fait gélatineux, à base d'agar agar.
(qui fond à +90°C et resolidifie à +45°C)

Milieu liquide + $\leq 1,5\%$ agar → milieu gélosé ou solide

Utilisé pour le dénombre^{nt}, l'identif^o et purif^o et on a des colonies UFC ou CFC

pétri → une centaine de ce genre

Selon l'utilisation

Composition comprenant un élément(s) sélectif(s) éliminant les m.o. non souhaités.
Cet élément peut-être un antibiotique, métal lourd...

Il faut bien gérer pour éviter la propagation des bactéries résistantes!

→ milieux sélectifs

→ milieux non sélectifs - d'enrichissement
- de différenciation
- d'isolement
- électifs

a. Milieux sélectifs

Exemples: xMilieu de Chapman pour le staphylococcus

xMilieu MacConkey agar

xMilieu de Muller-Kauffmann

Ces milieux sont riches et destinés aux milieux

Milieux différentiels
Comme la gélose à l'amidon.

Milieux d'isolement et d'identification

Utilisé pour l'isolement → dénomb^{re} des bactéries.

Morphotype des colonies (formes, couleurs...)

Trop de bactéries en pétri forment un tapis (colonies "fusionnées", indiscernables)
Le nb de colonies est "valable" si les colonies sont entre 30 et 300.

UFC: Unité Formant Colonie

Une colonie peut être constituée entre 1 et un amas de m.org.

Si y a trop de bactéries, elles peuvent s'entre-inhiber → résultats faussés.

On ne compte que la dilution dénombrable.

on reçoit
chaque
1/2 ADN!



3 Croissance bactérienne

I Courbe de croissance

La croissance microbienne est asexuée et se fait par scissiparité

x augment^{er} d'effectif

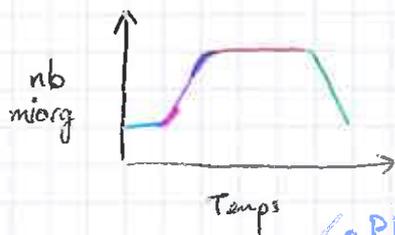
x augment^{er} de masse ϕ

x $\frac{1}{2}$ de l'effectif et de la ϕ masse

La div. ϕ est semi-conservative et suit 2 phases: 1. répliq^{ue} ADN

2. cytokinèse (ac form^{er} septum)

Cinétiques de croissance en milieu liquide non renouvelé (culture batch → discontinue)



1. Phase de latence (lag phase, notée λ)

→ renouv^{er} du matériel génétique, prépar^{er}, adapta^{er} au milieu

1. Phase d'accélération (très courte)

1. Phase de croissance exponentielle, peut être assimilée à une droite, mais ϕ est une sigmoïde, intéressante pour obtenir le matos génétique.

1. Phase de ralentissement (carence en élément nutritifs, accumul^{er} d'éléments toxiques (déchets ϕ))

1. Phase stationnaire

→ émission de particules de disette

→ cette phase peut être courte ou longue

1. Phase de déclin

en g^{21} , pas d'apoptose, mais plutôt autolyse (product^{er} autolysine)

Variantes: on peut avoir une croissance (par consomm^{er} des cadavres de bact. par les bact. survivantes), ce qui peut donner des croissances
on peut avoir une croissance polyphasique (ex. ac E. coli) qui a consommé d'abord le lacto glucose
- biphasiques, triphasiques...
(= diauxie, triauxie...)

La croissance des bact. s'arrête après 16/24h.
en 48h on avait 4000 fois le poids du globe!

cryptique?

En bouteille, on stagnat^{er} à 10^{10} log ufc/ml (diminué/min) 10^3

Paramètres mathématiques de la croissance

G = tps de générat° = tps nécessaire à une pop. pour doubler
 μ = taux horaire de croissance
 $G = \frac{1}{\mu}$

Expression math. de la croissance

$$N_n = 2^n N_0 = 2^{\mu t} N_0$$

N_0 → nb bactéries à t_0
 N_n → à n générations

(pareil) → $\log \frac{N_n}{N_0} = \mu t \log 2$

Le tps de génération varie selon des paramètres (T° , pH...)
record du monde de taux de croissance: *Vibrio cholerae* (choléra) → 10min

II Méthodes de mesure de la croissance

Dans une pop, une bact. a 50000 à 1million de clones.

On peut mesurer la croiss. e. → comptant, évaluant la masse ϕ , dosant l'activité ϕ

1.1. Dénombrement au microscope

* Les ϕ de Thoma sont les cases d'un quadrillage pour compter les ϕ .

Mais c'est long, chiant, on voit mal les ϕ , on a envie de tout casser, les flagellées gigotent, si ça se trouve elles sont superposées, on sait même pas si elles sont vivantes.

Ça ne sert à rien, c'est useless et out

* Epi fluorescence

Avec un fluorochrome, (acridine orange, Dapi), on colore les bact.

Les mortes sont d'une couleur ≠ des vivantes.

N'empêche qu'on distingue pas des bact. viables et cultivables de celles qui ne le sont pas.

(certaines ϕ ne se divisent pas statut DDNC) ou VVNC VVLC?

Et il faut doubler le prix du microscope pollette (pour la lumière)

1.2 Dénombrement après culture

On met très peu de bactéries, chacune, en théorie, va former une colonie, donc on compte les colonies et c'est facile!

Il n'y a pas de 0 UFC... si on en trouve pas, c'est qu'on s'est loupé.

Les résultats peuvent être faussés par des VVLC? ou des ϕ blessés etc.

Il faut établir un seuil de détection.

ex: si 0 UFC, et qu'on a cherché à une dilut° 10^7 , on dit pas 0 UFC mais $< 0,5$

1.3 Dénombrement après filtration sur mb

Après un filtre gélose, des colonies se développent sur un pétri

2 Mesure de la masse

a. Par récupération du poids sec (on centrifuge, retire le milieu de culture)
(c'est bien avec les levures et champignons)

b. Spectrophotométrie

Avec l'absorbance $\log \left(\frac{I_0}{I} \right) = K \cdot \epsilon \cdot L$ K constante d'absorption

On observe l'augmentation des ϕ (sans distinguer grosses ou nombreuses), mais aussi des produits qui opacifient la solution et faussent les résultats.

Le trouble du bouillon témoigne de la croissance bactérienne

On peut, pour mesurer l'activité, mesurer: - la consommation de substrat
- les productions d'excrétion
- les constituants cellulaires (ADN, ATP...)
- les variat° physico-chimiques du milieu (potentiel d'oxydo-réduction, pH...*)

→ la mesure de l'ATP ne renseigne pas forcément sur le nb d'individus.
Cependant, la connaissance de l'ATP ne renseigne pas forcément sur le nb d'individus.

* le pH baisse qd la pop. bactérienne augmente

En culture continue, on utilise chimostat et turbidostat.
(on retire à chaque fois des bactéries et rajoute des nutriments)

III Influence de l'environnement sur la croissance bactérienne

Qlq facteurs: substrat, T°, pH, Aw, O₂, pression, radiation...

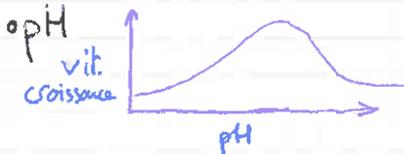
• substrat
exemple:



• température



À faible T°, les micro. ne meurent pas trop. En T° optimum c'est cool.
En T° un peu trop haute ça craint.
Cette courbe reflète en fait l'intensité d'activité globale.
thermophiles (min optimum max)
mesophiles et aussi thermotolérants (thermotrophes)
cryophiles



E. coli à pH mini → 4,4
opti → 6,5 à 7
maxi → 9

les micro peuvent être
acidophiles
neutrophiles
alcalophiles

levures entre 2 et 10 de pH
moisissures entre 2 et 12 pH
Standard entre 4 et 9

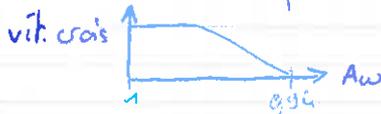
les levures et moisissures ont une protection extérieure résistante

salmonella est mésophile
Bacillus stearothermophilus est thermophile
Clostridium perfringens est thermotrophe
Pseudomonas / sont psychrotrophes
et Listeria
↳ dans le bac à légumes

• Eau

Aw = disponibilité en eau d'un milieu

$$Aw = \frac{\text{eau libre}}{\text{eau libre} + \text{eau liée}}$$



Au-dessus de 0,94 Aw, les micro en g^{al} ne grandissent pas.
On saumure ou bien on sucre pour sécher.

utilisable par les bactéries

• Oxygène on observe le trouble dans l'eau.

aérobie obligatoire → voile bactérien
anaérobie obligatoire → culot bactérien
micro aérophile → anneau bactérien
aérobie facultative
anaérobie aérotolérant

Pour
Dans le métabolisme, l'énergie nécessaire aux réactions est apportée par l'ATP.

L'ATP vient de la réaction ...

ou des chaînes d'oxydoreduction des chaînes respiratoires



Les oxydatifs utilisent la voie respiratoire
Les fermentaires obtiennent leur énergie exclusivement par voie chimique.

Les anaérobies sont soit fermentaires, mais parfois oxydatives (respirant du nitrate).
Les aérobies sont oxydatives

Les ezy, ont pour rôle d'abaisser l'énergie d'activation.

Le métabolisme est un flux de matière et d'énergie.

Le glucose devient pyruvate • soit par Glycolyse (ETP)
• soit par voie pentoses phosphates
• soit par voie Entées-Doudoroff

Lui-même dégradé • soit par voie Krebs
• soit par fermentation (alcoolique ou lactique)

Enterococcus, bactérie résistante à la chaleur, utilise la voie Entées Doudoroff

Fermentat° de l'emental (propionique)
ac. lactique → propionique + acétique + CO₂

Fermentat° butyrique
ac. lactique → butyrique + CO₂ + H₂

- Pas de mitochondries chez des procaryotes: la respirat° se fait direct^{nt} sur la mb f.
- Rend^{nt} respi >> rend^{nt} Fermentaire

• La cytochrome oxydase c renseigne sur une bactérie: elle donne un résultat + si respiration (Δ un résultat - ne veut pas dire pas de respi, mais pas de respiration).
exemple: pseudomonas et liberia donnent un résultat +.

Quelles bactéries respirent nitrate et sulfate

CATABOLISME des

GLUCOSEI

Des glucoses: monosaccharides, disaccharides, polysaccharides (cellulose, amidons ou glycogène)
Les bactéries ne peuvent pas digérer des polysaccharides: il faut l'intervention d'enzymes (amylase...)

Le cycle des citrates produit du diacétyle (arôme typique des beurres et fromages)
Les entérobactéries (salmonelles...) sont capables de dégrader le citrate et on les reconnaît parfois grâce à ça.

1. Presque tout passe par le glucose
2. Il existe des voies annexes qui produisent des arômes.

Les bactéries à pouvoir dégrader les lipides sont rares.

La beurre est plutôt photo-oxidé par exemple.

On s'intéresse aux TG car leur dégradé produit des acides gras responsables d'arômes désagréables dans les produits.

Les ezy pour dégrader les TG sont les lipases et les estérases.

Pseudomonas produit un extrait des lipases?

En générant des AAs, les bactéries participent à l'arômes d'aliments.

Elles peuvent aussi dégrader des produits putrescents.

CATABOLISME des PROTÉINES et AA

- La protéolyse I est la dégradation des protéines en macro-peptides. Cette réaction se fait avec des ezy exocytés qui vont couper ces liaisons à l'intérieur de la protéine avec les ezy endopeptidases.
- La protéolyse II correspond à la dégradation des macro-peptides en constituants élémentaires (aa, petits peptides) grâce aux ezy exopeptidases.
La bactérie peut ensuite absorber ces aa et peptides pour reconstruire des protéines ou pour la protéolyse III.
- La protéolyse III peut déaminer ou transaminer

5. Taxinomie bactérienne

ou taxonomie : science de la classification des bactéries
Elle suppose l'identification des microorg et une nomenclature.

La phylogénie est la science de l'évolution, elle suppose des liens de descendance filiation.

La classificat° phénétique compare des caractères communs ou discordants entre 2 organismes (c'est la caractérisation.)

Identifier un microorg c'est positionner sur une base de caractères. Ça revient à lui donner un nom de genre et d'espèce (classificat° binomiale).

Rang taxinomiques: Règne > Embranchement (phylum), Classe > Ordre > Famille > Genre > Espèce

Une espèce est le groupe de base en taxonomie microbienne

La sous-espèce est une catégorie particulière du groupe de base par un ou plusieurs caractères.

La souche est une colonie microbienne descendant d'un organisme unique.

Communauté = ensemble de populations

Population = ensemble de cellules

Strain

Le mot strain nous renvoie à un ensemble de caractéristiques morphologiques et génétiques.

La souche type est l'ensemble de cellules d'une pop microbienne espèce type.

Lactococcus lactis subsp. *lactis*

souche: V61125

biovar: diacetylactis

ss espèce: *lactis*

espèce: *lactis*

genre: *Lactococcus*

Lactococcus peut s'abréger en *Escherichia* — — — — —

Le nom de genre : 1^{er} majuscule + latine

espèces minoritaires italiques et puis tout italique écrit

Il est question de tirer les microorg sur une base universelle pour le partage d'infos.

Le nom donne aussi des renseignements sur le microorg (caractéristiques)

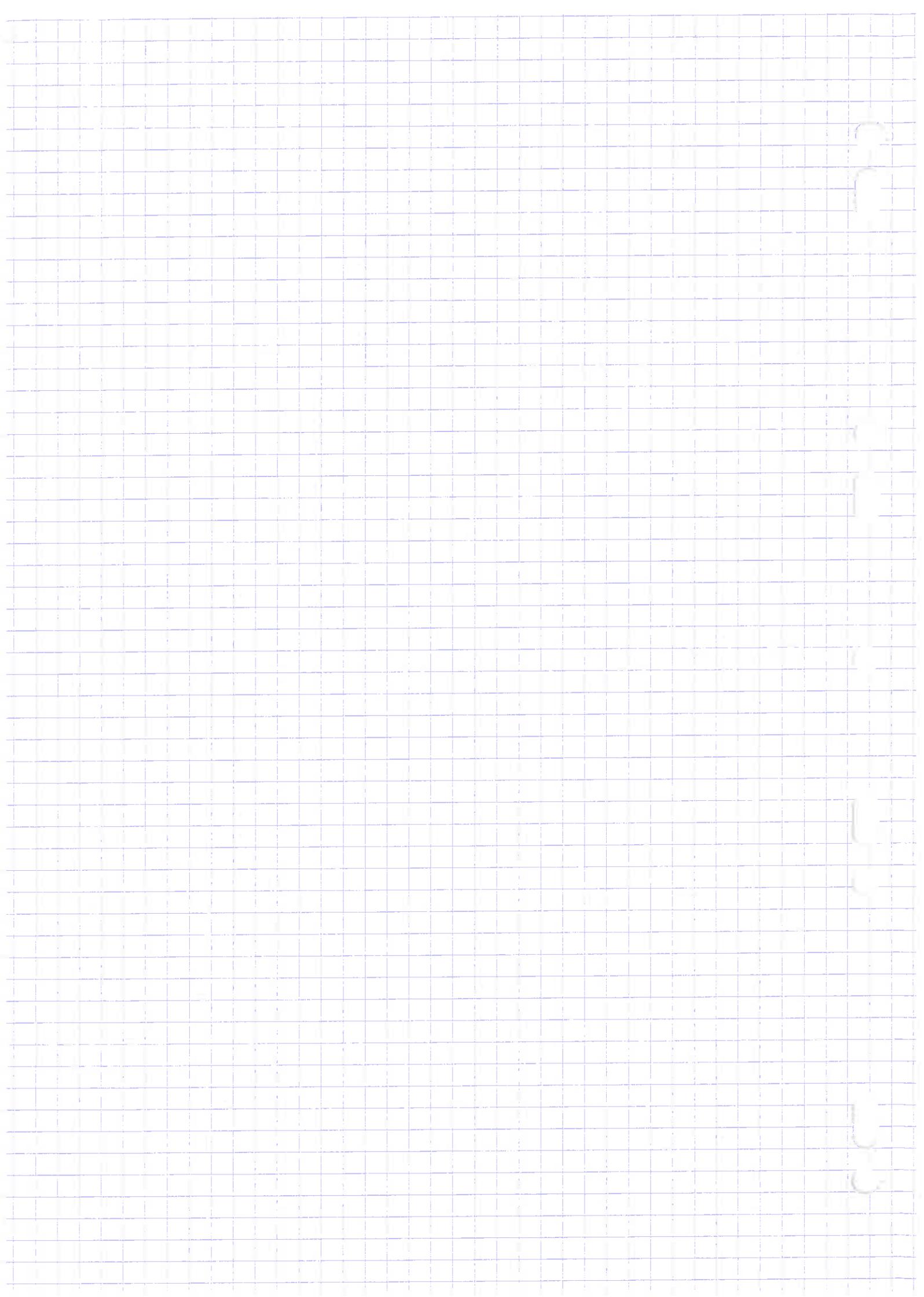
Evident, y a tjs des inclassables et des bactéries qui résistent.

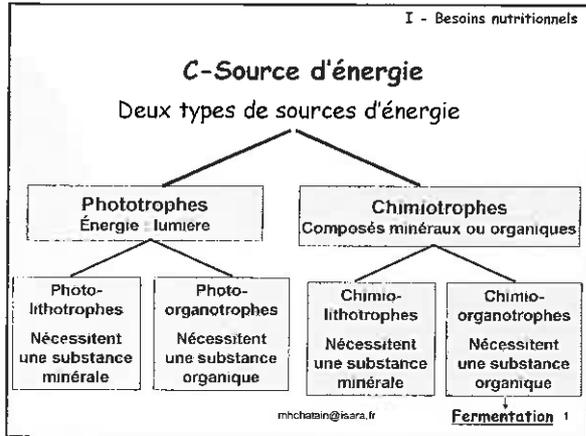
Taxinomie phénotypique
nomenclature

Taxonomie phénotypique

d'abord → caractéristiques de formes peu connues si c'est du -
avant de former

parfois la couleur est ambiguë des uns par rapport aux autres





Les phototrophes sont capables de photosynthèse et tire leur énergie de la lumière

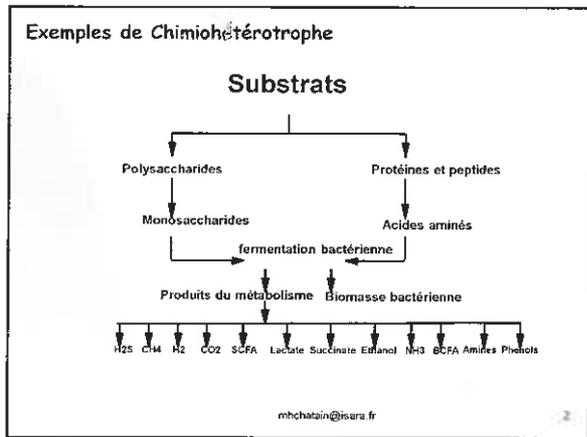
Les chimiotrophes trouvent leur énergie ds le milieu ^{organique}

Les 2 ont besoin d'électrons, du coup

Les organotrophes trouvent les e⁻ ds milieu ext. ^{organique}

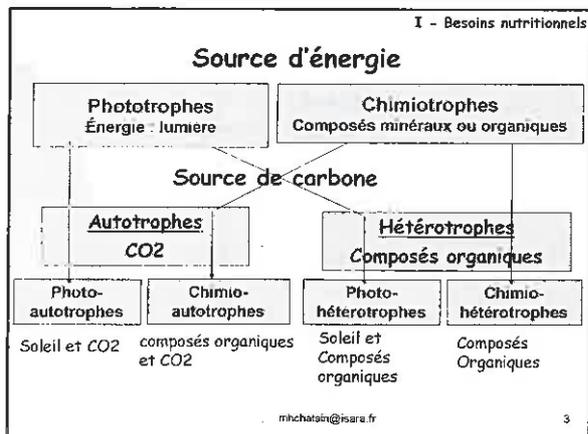
Les lithotrophes trouvent les e⁻ ds les minéraux

Les Fermentat^o proviennent de transformat^o anaérob^e



Les substrats, relativ^{nt} gros, subissent des dégradations cataboliques.

biomasse → matériel ≠



Si on croise la source d'énergie avec l'origine du nutritionnel,

Les autotrophes ont besoin de CO₂.

Les hétérotrophes utilisent un support organique

bactéries pourpres, sulfureuses, vertes

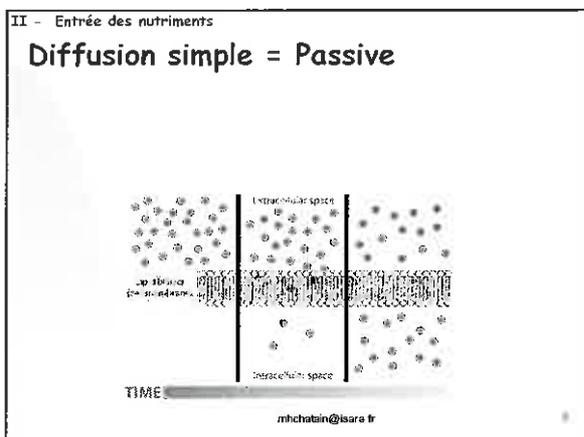
I - Besoins Élémentaires

La diversité métabolique

Type	Source d'énergie	Source de carbone
Photoautotrophes	Soleil	CO ₂
Chimioautotrophes	Matière inorganique	CO ₂
Photohétérotrophes	Soleil	Composés organiques
Chimiohétérotrophes	Composés organiques	Composés organiques

michatain@isara.fr 4

bah... voici un récapitulatif



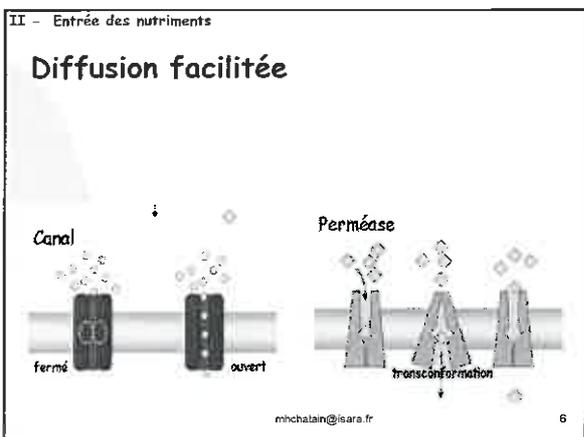
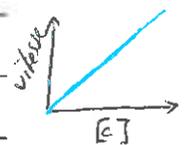
→ suivie du gradient de concentrat°

→ la glycérol diffuse naturellement et peut stresser l'acid?

→ on peut la contrôler en salant le milieu, sucrant

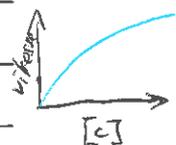
→ + la concentration augmente, + la vitesse de diffusion augmente.

→ on observe que sous la forme non dissociée (R-COOH) la H^+ entre + facilement ds la mb. Une fois entrée, elle se dissocie ($\text{R-COO}^- + \text{H}^+$) ce qui augmente la concentrat° en H^+ → c'est pk le vinaigre tue les bactéries



→ présence de transporteurs

→ suivie d'un gradient de concentration



II - Entrée des nutriments

Exemple : Les transports chez *E.coli*

diffusion facilitée	transport actif sensible au choc osmotique	symport à proton	symport à sodium	translocation de groupe
glycérol	maltose	lactose	mélibiose	glucose

mhchatain@teara.fr

Milieux de culture : Classification selon la composition

a- Milieux naturels ou complexes

Exemple :

Bouillon nutritif (g/l)	
Peptone	5
Extrait de bœuf	3
Bouillon de soja	
Tryptone (Peptone de caséine)	17
Peptone	3
Glucose	2,5
NaCl	5
K ₂ HPO ₄	2,5

mhchatain@teara.fr 11

Milieux de culture : Classification selon la composition

b- Milieux Synthétiques = milieux chimiquement définis

Exemple :

Component	Amount	Function of component
NH ₄ Cl	0.52 g	N source
KH ₂ PO ₄	0.28 g	P and K source
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.25 g	S and Mg ⁺⁺ source
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.07 g	Ca ⁺⁺ source
soufre minérale	1.56 g	Energy source
CO ₂	5%*	C source
Water	1000 ml	
pH	3.0	

* Aerate medium intermittently with air containing 5% CO₂. mhchatain@teara.fr 12

Milieux de culture : Classification selon la composition

c- Milieux semi-synthétiques

Ex : la gélose EMB (milieu de Teague-Levine)

C'est un milieu qui est à la fois **sélectif et différentiel** utilisé pour isoler les Gram -, entériques.

Peptone	10g
Phosphate dipotassique	2g
Lactose	10g
Eosine	0,4g
Bleu de méthylène	0,065g
Agar-agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

mhchatain@isara.fr 13

a- Milieux sélectifs : exemples

Ex1 : Milieu de Chapman : *Staphylococcus*

Peptone	10g
Extrait de viande	1g
Mannitol	10g
NaCl	75g
Rouge de phénol	0,025g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml



L'agent inhibiteur est le NaCl à concentration de 75% qui permet principalement la culture de *Staphylococcus*.

Rouge de Phénol = indicateur de pH.

- Si le milieu reste rouge : pas de dégradation de mannitol
- Si le milieu devient jaune, acidification donc, dégradation du mannitol.

mhchatain@isara.fr 14

a- Milieux sélectifs

Exemples : Milieu MacConkey agar

Agents sélectifs: Sels biliaires, le cristal violet: Inhibent la croissance des Gram plus.

Lactose and un indicateur de pH: le rouge neutre qui devient rose après acidification du milieu par fermentation du lactose



Milieu avant utilisation



Milieu après utilisation

- *E. coli* and *E. aerogenes* fermentent le lactose coliforms deviennent rose
- *S. typhimurium* and *P. mirabilis*, restent translucide par absence de fermentation du lactose.

mhchatain@isara.fr 15

b- Milieux d'enrichissement

Exemple : Milieu de Muller-Kauffmann

Bouillon de viande	900ml
Carbonate de Ca (tampon)	0,5g
Thiosulfate de Na à 50%	100ml
Solution iodo-iodurée	20ml
Vert brillant	0,01g
Bile	50ml

Ce milieu est destiné à rechercher *Salmonella* par coproculture.

Il permet d'enrichir en *Salmonella* et inhiber et retarder la croissance des autres espèces fécales à Gram positif et à Gram négatif.

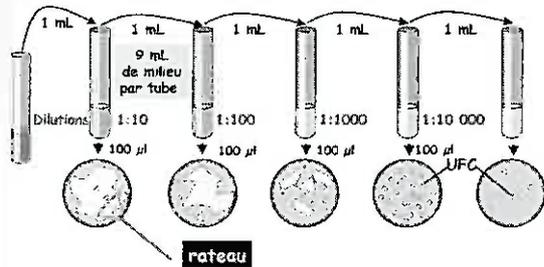
- La bile inhibe les Gram + et certains bacilles Gram- principalement *E. coli*.

mhchatain@isara.fr

16

d- Milieux d'isolement et d'identification

Milieux d'isolement liquide



mhchatain@isara.fr

17

Résumé

- Besoins nutritifs
- Facteurs de croissance
- Comment les micro-organismes transportent des nutriments
- Décrire des différents types de milieux de culture

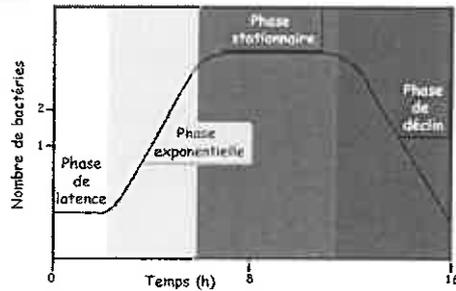
mhchatain@isara.fr

18

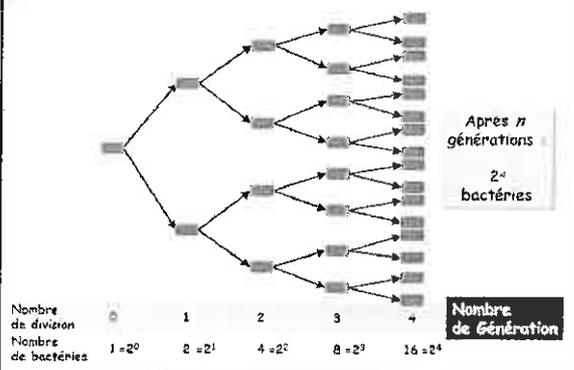


Cinétiques de croissance en milieu liquide non renouvelé (culture batch = discontinue)

4 phases

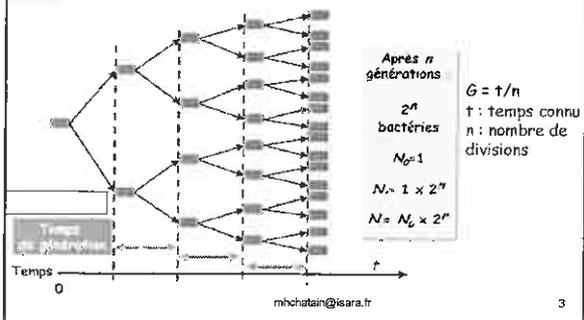


Paramètres mathématiques de la croissance



Paramètres mathématiques de la croissance

Temps de génération $G =$ Temps pour une population doublée



Temps de génération

- Temps de division et délais de croissance dépendent :
 - de la bactérie
 - des conditions du milieu extérieur (favorables/défavorables)

Temps de génération de quelques espèces bactériennes

Bactérie	In vitro (min)	In vivo (h)
<i>Escherichia coli</i>	20-40	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	40	3-5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	4
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	120-240	24-48

mhchatain@isara.fr

1.1 - Dénombrement au Microscope Epifluorescence

1-lampe à arc
2-filtre d'excitation
3-miroir dichroïque
4-objectif
5-préparation
6-filtre d'émission
7-oculaire

- coloration par fluorochrome (Dapi) fixation sur ADN
- peu sensible
- pas de distinction cellules mortes et vivantes

mhchatain@isara.fr

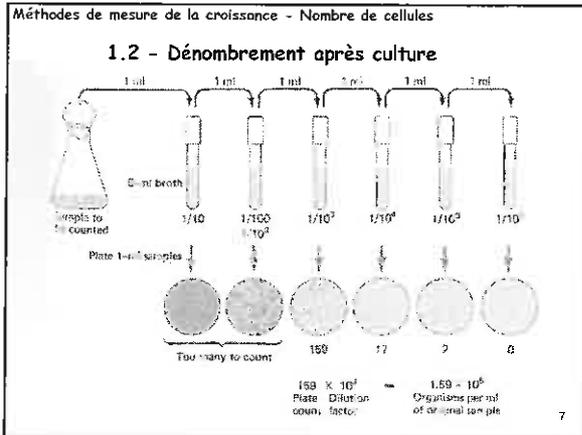
1.1 - Dénombrement au Microscope Epifluorescence

Fluorescence verte (SYTO 9)

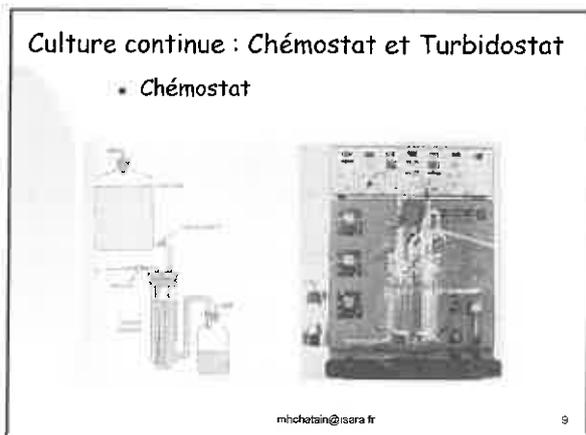
Fluorescence rouge (IP)

IP + SYTO 9

mhchatain@isara.fr







Culture continue

- Turbidostat

michatain@isera.fr 10

Influence du substrat

Facteurs influençant la croissance

Le substrat

- Prolonger la phase de croissance.
- Renouveler le milieu.
- Éliminer produits du métabolisme

estimation de la population bactérienne (par mesure de l'absorbance)

11

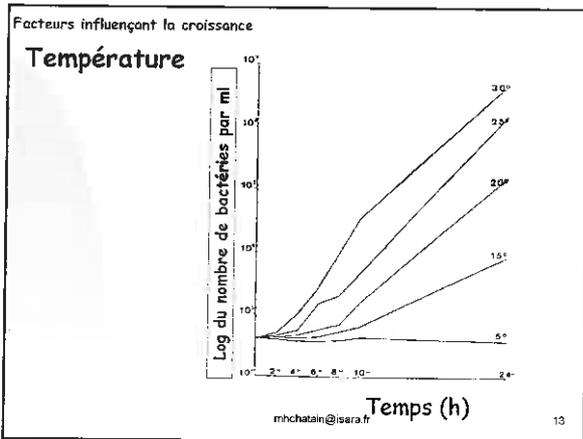
Influence de la température

Facteurs influençant la croissance

Température

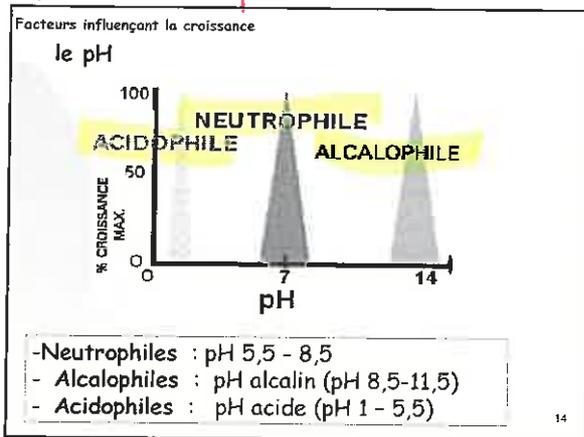
- bactéries mésophiles (20-45°C)
- bactéries psychrophiles (voisine 0°C)
- bactéries thermophiles (45-65°C)

12

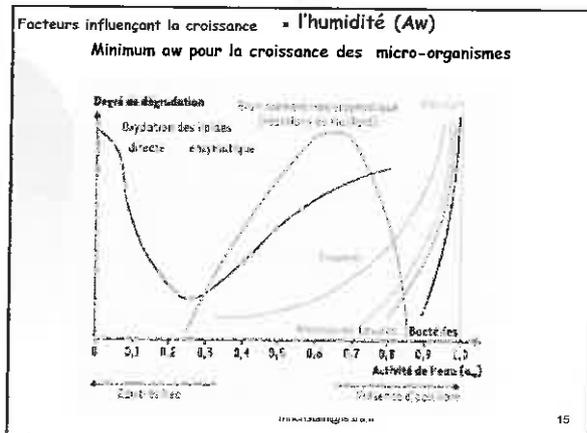


on voit qu'à 5° SHE DOESN'T DIE! 😊

Influence du pH



Influence de l'eau



Influence de la pression

Facteurs influençant la croissance

La pression osmotique

Les non-halophiles : NaCl < 0,2M
 Les halophiles : 0,2 à 5,2 M NaCl
 Les halophiles extrêmes nécessitent 6,2M

The graph plots 'Growth rate' on the y-axis against 'Sodium ion concentration' on the x-axis. Three bell-shaped curves represent different organism types: 'Nonhalophile' (peaks at low concentration), 'Moderate halophile (marine organism)' (peaks at intermediate concentration), and 'Extreme halophile (e.g., Halobacterium)' (peaks at high concentration). A vertical line marks the 'Saturated solution' point at approximately 6.2M NaCl.

16

Filtration sur membrane

The diagram shows a size scale from 0.2 μm to 1000 μm. Above the scale are categories: Colloides, Bactéries, Virus, Sels dissous, and Molécules organiques. Below the scale are filtration types: MF (Microfiltration), UF (Ultrafiltration), NF (Nanofiltration), and OI (Osmose inverse).

MF = microfiltration
 UF = ultrafiltration
 NF = nanofiltration
 OI = osmose inverse

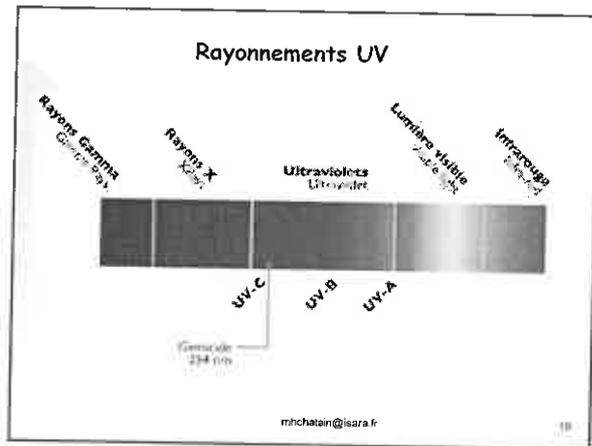
mhchatin@sara.fr 17

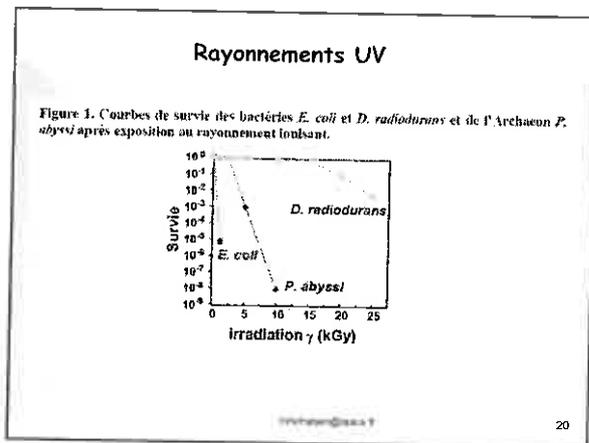
Filtration sur membrane

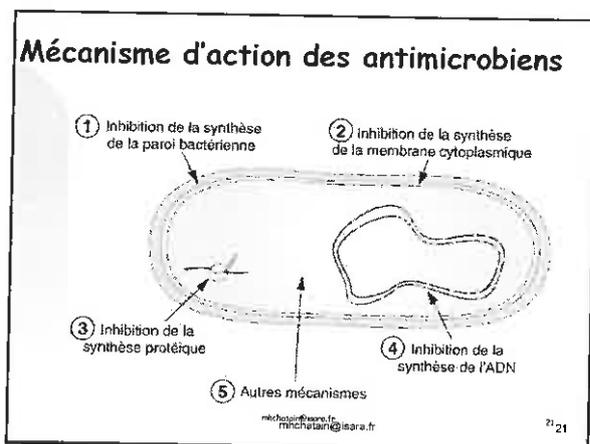
The diagram shows two vertical membranes. The left one is labeled 'Microfiltration 0.1 μm' and allows 'EAU', 'LACTOSE', and 'WHEY' to pass while retaining 'CASEINE' and 'BACTÉRIES'. The right one is labeled 'Ultrafiltration >4 nm' and allows 'EAU' and 'LACTOSE' to pass while retaining 'WHEY', 'CASEINE', and 'BACTÉRIES'.

Filtration sur Membranes

mhchatin@sara.fr 18







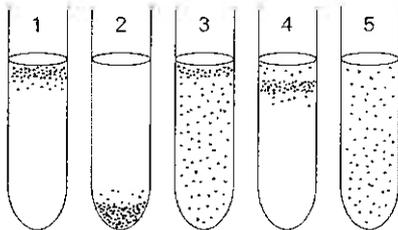
Activité antibactérienne

méthode des disques ou diffusion (pratique)



michatain@isara.fr

22



Les bactéries du type aérobie et anaérobie peuvent être identifiées en effectuant une culture en milieu aqueux

1. Les bactéries à aérobie obligatoire se rassemblent au niveau supérieur de l'éprouvette pour maximiser l'accès en oxygène.
2. Celles à anaérobie obligatoire se tassent au fond de l'éprouvette pour éviter tout contact avec l'oxygène.
3. Pour celles du type aérobie facultative se rassemblent le plus souvent au bout supérieur de l'éprouvette, là où la respiration aérobie est la plus favorisée; mais comme l'absence d'oxygène ne les affectent pas, on peut observer aussi leurs présences tout au long de l'éprouvette.
4. Les bactéries microaérophiles se regroupent dans la partie supérieure de l'éprouvette, à l'exception de l'extrémité car elles n'ont besoin que d'une concentration minime en oxygène pour vivre.
5. Les bactéries anaérobies aérotoleérantes se distribuent de manière homogène dans l'éprouvette, puisque l'oxygène n'a aucun effet sur eux.

Ⓜ d'énergie: ATP
NADPH
FAD

Introduction au métabolisme

ATP (Adénosine triphosphate) = monnaie énergétique

hydrolyse

Adénosine triphosphate (ATP)

Adénosine diphosphate (ADP)

Groupements phosphate

Cours 4 : Métabolisme partie 2 mchatain@sara.fr 1

Introduction au métabolisme

L'hydrolyse des liaisons phosphate de l'ATP libère de l'énergie.

Adénosine triphosphate (ATP) + H₂O → Adénosine diphosphate (ADP) + Pi

Hydrolyse de l'ATP

Phosphorylation

l'addition d'un groupe phosphate (-PO₄) à une protéine

Cours 4 : Métabolisme partie 2 mchatain@sara.fr 2

ATP = adénosine (adénine + ribose) + group^{ent} phosphate

Introduction au métabolisme

Réactions d'oxydation-réduction :
un substrat perd des électrons (oxydation)
un substrat gagne des électrons (réduction)

Réduction

Oxydation

A B A oxydé B réduit

Cours 4 : Métabolisme partie 2 mchatain@sara.fr 3

Introduction au métabolisme

Réactions d'oxydation-réduction :

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

(a) Oxidized: NAD⁺ Réduced: NADH

Nicotinamide

Ribose 2P

Adenosine

Nicotinamide

Ribose 2P

Adenosine

$NAD^+ + H^+ + 2e^- \rightleftharpoons NADH$

Oxydo-réduction : Déshydrogénation

Cours 4 : Métabolisme partie 2 mchatain@sara.fr 4

Introduction au métabolisme

Réactions d'oxydation-réduction :

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

(b) Oxidized: FAD Réduced: FADH₂

Flavine

Ribitol 2P

Adenosine

Flavine

Ribitol 2P

Adenosine

$FAD + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons FADH_2$

Cours 4 : Métabolisme partie 2 mchatain@sara.fr 5

Introduction au métabolisme

Métabolites complexes

Dégradation catabolisme

fournisseur

Produits simples

Biosynthèse anabolisme

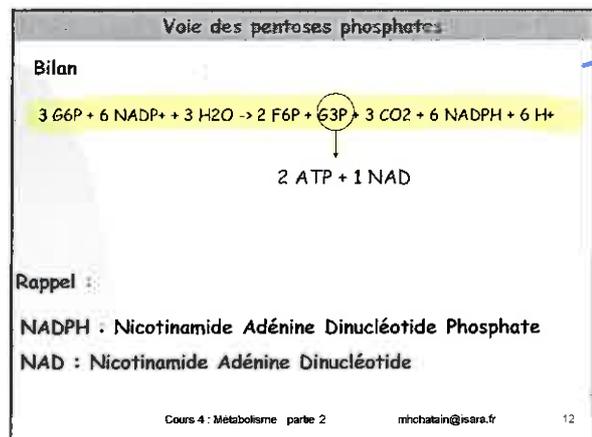
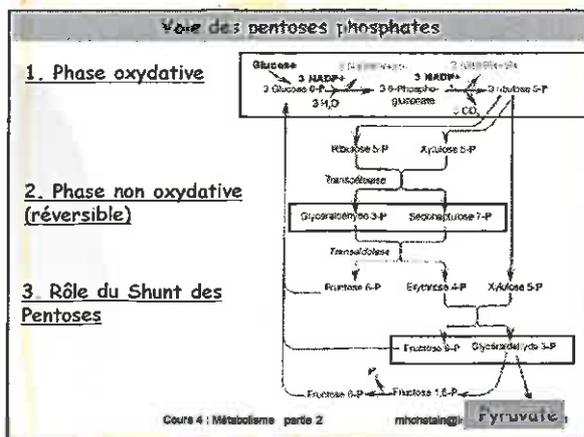
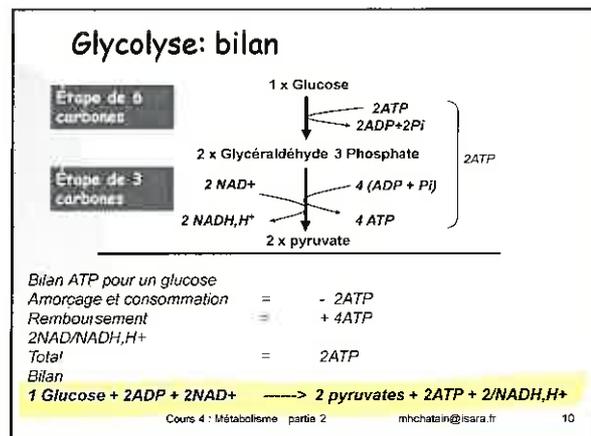
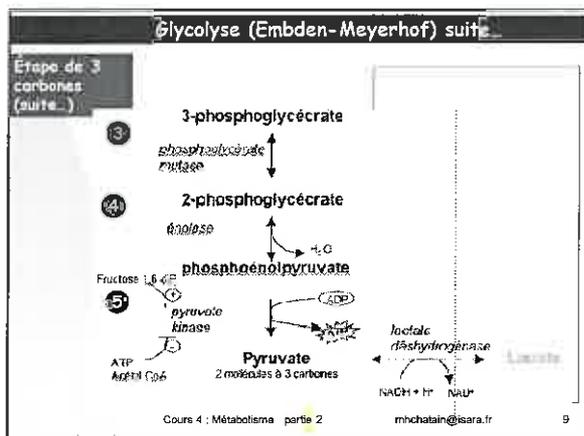
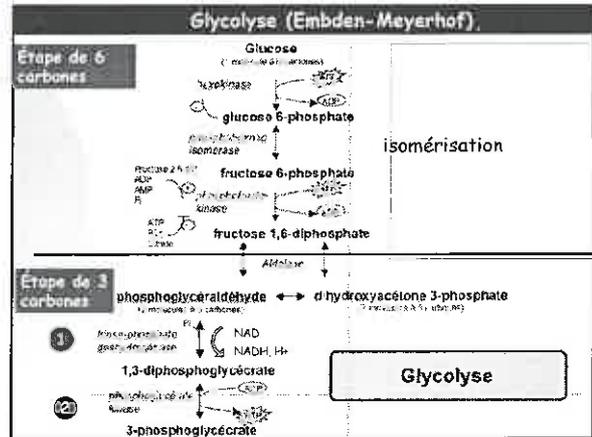
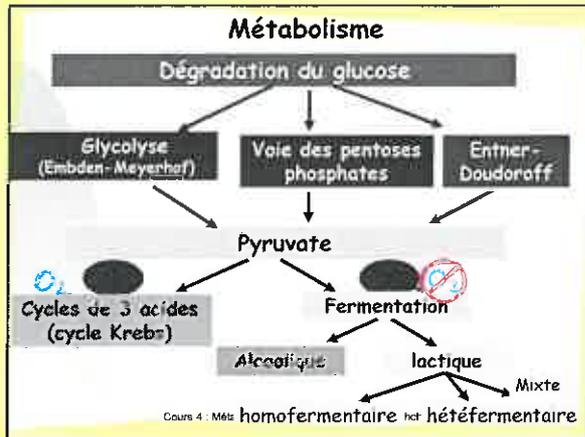
consommateur

NAD⁺ / ADP + Pi

ATP

NADH, H⁺

Cours 4 : Métabolisme partie 2 mchatain@sara.fr 6



↳ on peut brancher des voix secondaires
 → NADPH, H⁺
 → glycolyse
 → composés comme Ribulose par la synthèse de protéiques

Voie Entner-Doudoroff

1. Phosphorylation du glucose
2. Oxydation du glucose-6-phosphate
3. Hydratation du 6-phosphogluconolactone
4. Déshydratation du 6-phosphogluconate
5. Synthèse du premier pyruvate
6. Synthèse du second pyruvate

Cours 4 : Métabolisme par

Bilan Voie Entner-Doudoroff

1 glucose consommé } 1 pyruvate + 1 G-3-P + 1 NAD(P)H
 1 ATP consommé }
 ↓ Potentiel
 1 pyruvate + 2 ATP + 1 NADH

1 glucose consommé → 2 pyruvate + 1 ATP + 2 NAD(P)H

Cours 4 : Métabolisme partie 2 mitchat@isara.fr 14

Le devenir du pyruvate

Glucose → Pyruvate

En absence d'O₂

- 1 Fermentation Anaérobie
 - Fermentation Alcoolique → 2 x éthanol + 2 CO₂
 - Fermentation Lactique → Homofermentaire / Hétérofermentaire
- 2 Fermentation Anaérobie

En Présence d'O₂

- 3 Respiration
 - 2 x Acétyl CoA → Décarboxylation Oxydative → 6CO₂ + 6 H₂O

Fermentation mixte

Cours 4 : Métabolisme partie 2 mitchat@isara.fr 15

Le devenir du pyruvate : En absence d'O₂

1 Fermentation alcoolique

La levure et d'autres micro-organismes convertissent

- Conversion l'acide pyruvique en éthanol et CO₂
- Régénération de 2NAD⁺ et production de 2ATP

2 éthanol

Glucose → 2ADP + 2Pi → 2ATP

2NAD⁺ → 2NADH, H⁺

CH₃-CO-COOH → CH₃-CHO + CO₂ (2 acétaldéhydes)

CH₃-CHO → CH₃-CH₂-OH (l'alcool déshydrogénase)

Bilan: Glucose + 2ADP + 2Pi → 2 éthanol + 2CO₂ + 2ATP

Cours 4 : Métabolisme partie 2 mitchat@isara.fr 16

Le devenir du pyruvate : En absence d'O₂

2 Fermentation lactique **homofermentaire**

- Conversion de l'acide pyruvique en acide lactique
- Régénération de 2NAD⁺ et production de 2ATP

Glucose → 2ADP + 2Pi → 2ATP

2NAD⁺ → 2NADH, H⁺

CH₃-CO-COOH → CH₃-CHOH-COOH (Lactate)

Bilan: Glucose + 2ADP + 2Pi → 2 Lactates + 2ATP

Cours 4 : Métabolisme partie 2 mitchat@isara.fr 17

le C central est asymétrique on peut obtenir un L-lactate, un D-lactate ou les deux!

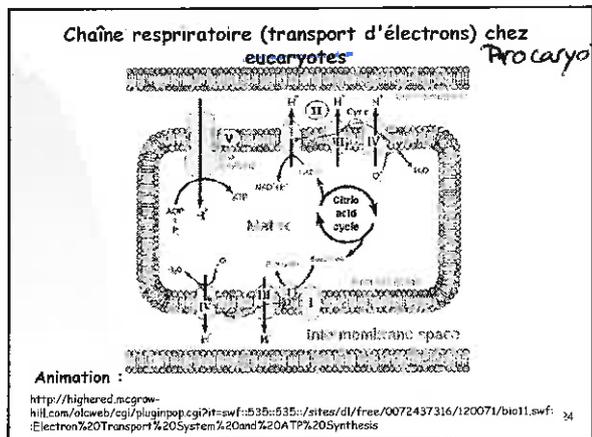
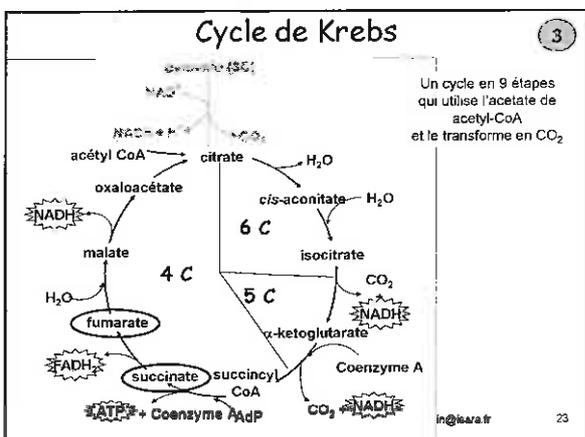
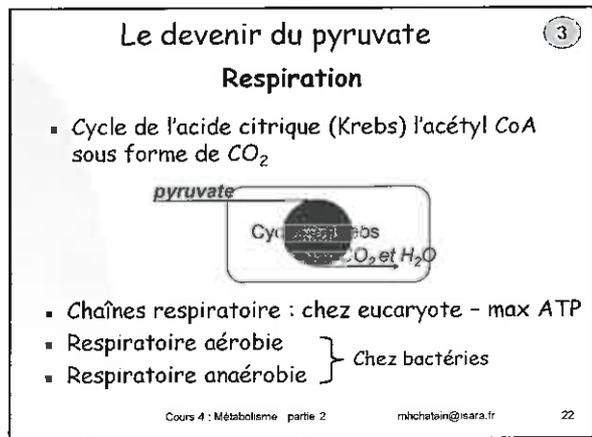
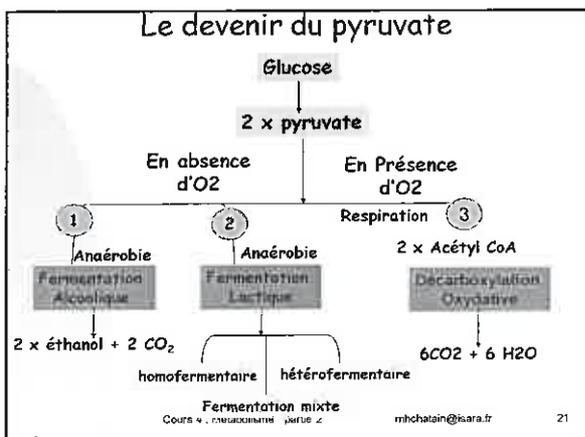
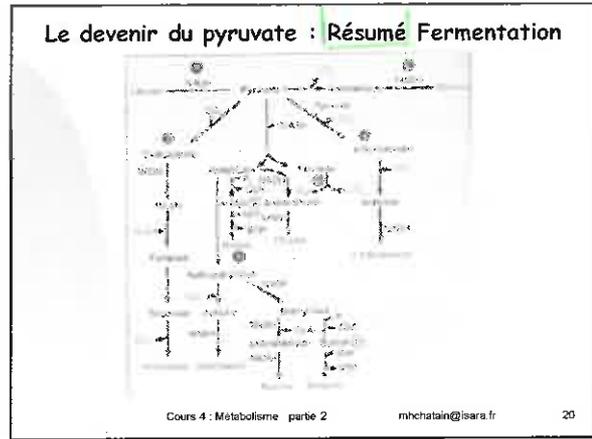
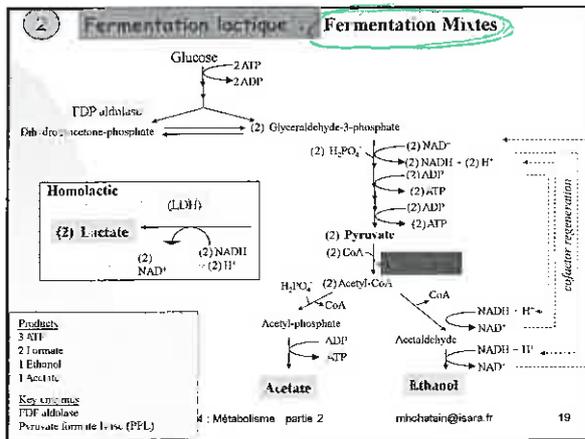
2 Fermentation lactique : **Hétérofermentaire**

Glucose → Glucose-6-phosphate → 6-phosphogluconate → Ribulose-5-phosphate → Xylulose-5-phosphate → Phosphoenolpyruvate (PEP) → Pyruvate → Lactate

Glucose → Glucose-6-phosphate → 6-phosphogluconate → Ribulose-5-phosphate → Xylulose-5-phosphate → Phosphoenolpyruvate (PEP) → Pyruvate → Ethanol

Produits: 1-ATP, 1-CO₂, 1-Lactate, 1-Ethanol

Cours 4 : Métabolisme partie 2 mitchat@isara.fr



Bilan ATP complet du catabolisme d'un glucose

1 glucose > 2 pyruvates			
Consommation		- 2 ATP	
Production		+ 4 ATP	
	2 NADH,H+	+ 6 ATP	+ 8 ATP
2 pyruvates > 2 acétylCoA			
Production	2 x NADH,H+	+ 6 ATP	+ 6 ATP
2 acétylCoA > 2 Oxaloacétates			
Production	2 x GTP	+ 2 ATP	
	2 x 3NADH,H+	+ 18 ATP	
	2 x FADH2	+ 4 ATP	+ 22 ATP
Bilan global			+ 38 ATP

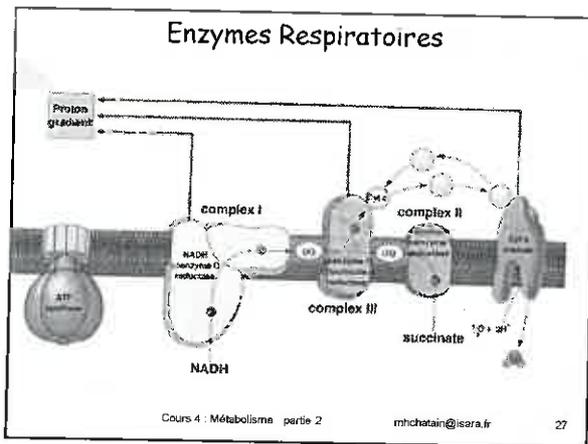
Cours 4 : Métabolisme partie 2 mhchatain@isara.fr 25

Respiration chez Procaryotes (bactéries)

Chaînes respiratoires : séquences d'enzymes

- Localisation chez les bactéries : enzymes pour la plupart fixées sur la membrane cytoplasmique
- Composition différente selon :
 - le nombre et la nature des enzymes et coenzymes
 - l'accepteur final d'électrons : oxygène ou autre oxydant
- 4 chaînes principales chez les bactéries
 - 1 chaîne aérobie avec cyt. O
 - 1 chaîne aérobie avec cyt c + cyt aa₃
 - 1 chaîne anaérobie avec nitrate réductase A
 - 1 chaîne anaérobie avec sulfate réductase

Cours 4 : Métabolisme partie 2 mhchatain@isara.fr 26



Respiration aérobie chez bactéries

1^{er} cas: **Coenzymes : FAD/CoQ/cyt b/cyt o**

$$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{FAD} \xrightarrow{\text{CoQ}} \text{FADH}_2 + \text{Q} \xrightarrow{\text{Cyt b}} 2 \text{Fe}^{2+} \xrightarrow{\text{Cyt o}} 2 \text{Fe}^{3+} + \frac{1}{2} \text{O}_2$$

O₂ accepteur final d'électrons $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$

2^{ème} cas: **Coenzymes FAD/CoQ/cyt b/ cyt c / cyt aa₃**

$$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{FAD} \xrightarrow{\text{CoQ}} \text{FADH}_2 + \text{Q} \xrightarrow{\text{Cyt b}} 2 \text{Fe}^{2+} \xrightarrow{\text{Cyt c}} 2 \text{Fe}^{3+} \xrightarrow{\text{Cyt aa}_3} 2 \text{Fe}^{3+} + \frac{1}{2} \text{O}_2$$

O₂ accepteur final d'électrons $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$

Cours 4 : Métabolisme partie 2 mhchatain@isara.fr 28

Objectif de la respiration: $\text{NADH}^+ \rightarrow \text{NAD}^+$

Respiration anaérobie chez bactéries

- Respiration nitrate :**

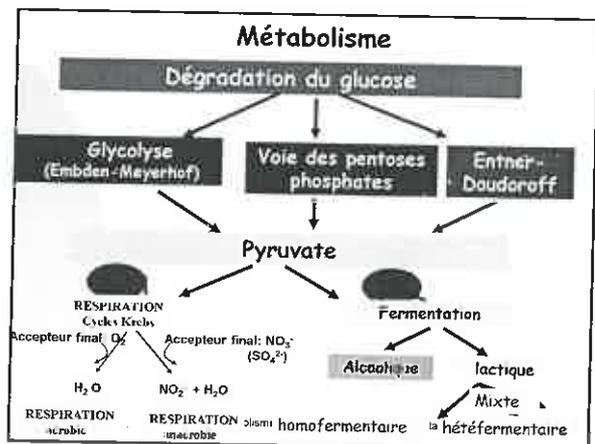
Coenzymes : FAD/CoQ/cyt b/Nitrate réductase

$$\text{NO}_3^- + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{N}^2$$
- Respiration sulfate :**

Coenzymes : FAD/CoQ/cyt b/Sulfate réductase

$$\text{SO}_4^{2-} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{S} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$$

Cours 4 : Métabolisme partie 2 mhchatain@isara.fr 29



LES POLYSACCHARIDE (GLUCIDES)

Monosaccharides

	Trioses	Pentoses	Hexoses	
Aldoses	<chem>C(C(CO)O)O</chem>	<chem>C(C(C(CO)O)O)O</chem>	<chem>C(C(C(C(CO)O)O)O)O</chem>	<chem>C(C(C(C(C(CO)O)O)O)O)O</chem>
Cétooses	<chem>C(C(C=O)O)O</chem>	<chem>C(C(C(C=O)O)O)O</chem>	<chem>C(C(C(C(C=O)O)O)O)O</chem>	<chem>C(C(C(C(C(C=O)O)O)O)O)O</chem>
Cellulose	<chem>C(C(C(CO)O)O)O</chem>	<chem>C(C(C(C(CO)O)O)O)O</chem>	<chem>C(C(C(C(C(CO)O)O)O)O)O</chem>	<chem>C(C(C(C(C(C(CO)O)O)O)O)O)O</chem>

glycémie anémie diabète Fructose 31

LES POLYSACCHARIDE (GLUCIDES)

Disaccharides

Glucose + Glucose → Maltose + H₂O

Glucose + Fructose → Saccharose + H₂O

Galactose + Glucose → Lactose + H₂O

32

↳ Monosaccharides : -aldoses : ribose, glucose, galactose
 -cétooses : ribulose, Fructose

↳ Disaccharides : maltose (Glc+Glc), saccharose (Glc+Fru), lactose (Glc+Galactose)

Exemples de disaccharides

1. Maltose
C(C(C(C(CO)O)O)O)O + C(C(C(C(CO)O)O)O)O → C(C(C(C(C(CO)O)O)O)O)O + H₂O

2. Lactose
C(C(C(C(CO)O)O)O)O + C(C(C(C(CO)O)O)O)O → C(C(C(C(C(CO)O)O)O)O)O + H₂O

3. Saccharose
C(C(C(C(CO)O)O)O)O + C(C(C(C(CO)O)O)O)O → C(C(C(C(C(CO)O)O)O)O)O + H₂O

Cours 4 : Métabolisme partie 2 michelain@isara.fr 33

LES POLYSACCHARIDE (GLUCIDES)

Polysaccharides de réserve

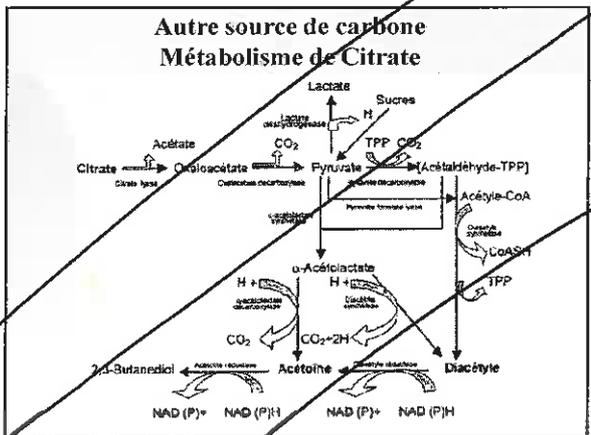
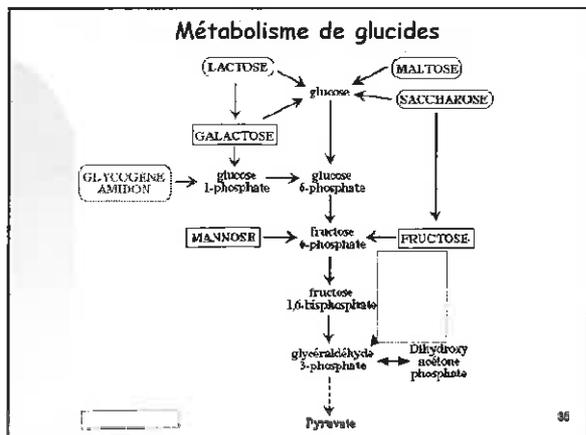
Ils sont hydrolysés en fonction des besoins de la cellule en monosaccharides.

Amidon **Glycogène**

Amidon Amylopectine Glycogène

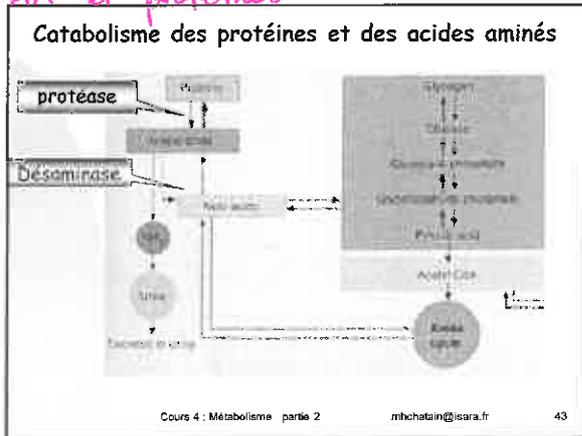
Cours 4 : Métabolisme partie 2 michelain@isara.fr 34

↳ Polysaccharides de réserve : amidon, glycogène

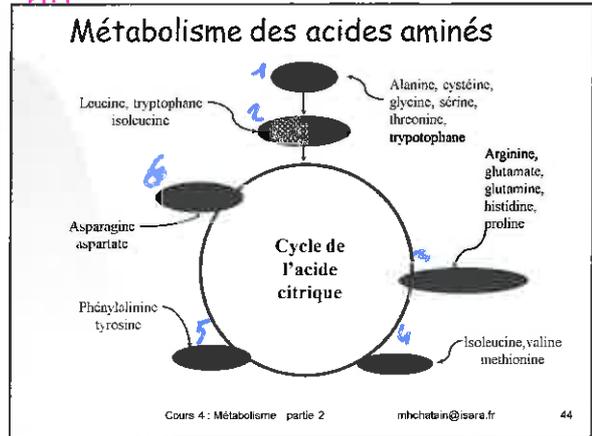


Je déclare cette diapo trop illisible!

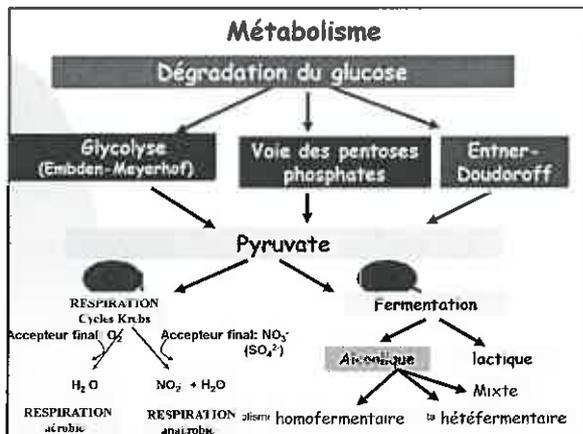
AA et protéines



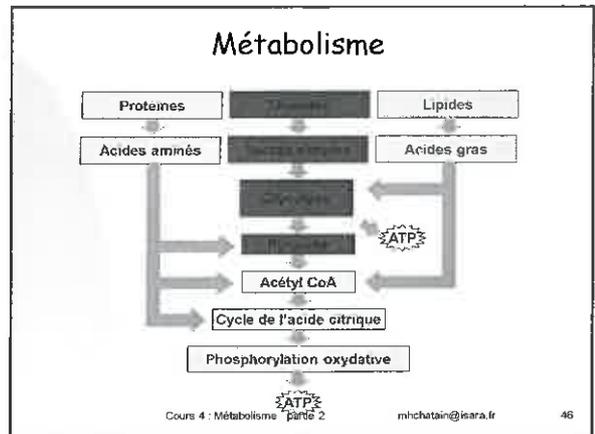
AA



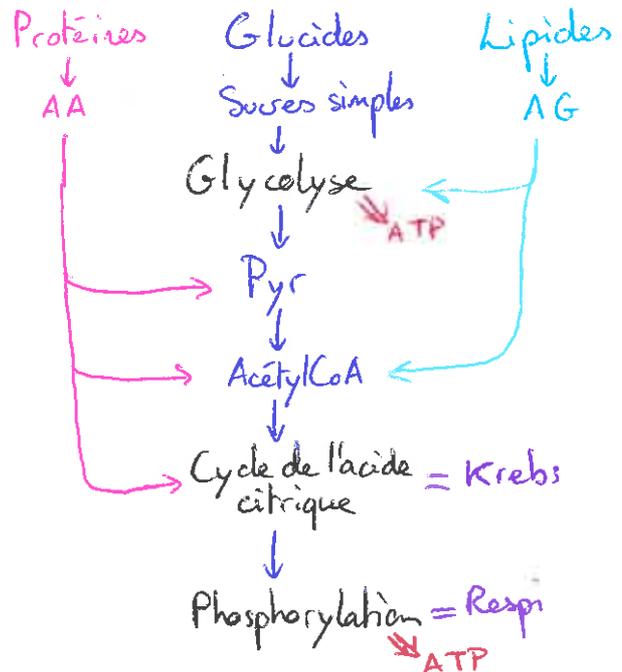
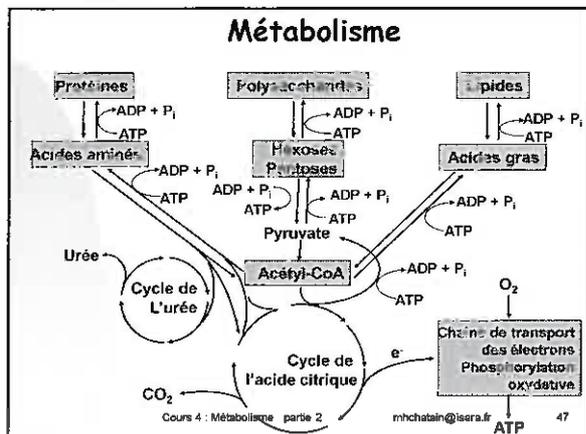
1 Pyr
2 AcétylCoA
3 α Ketoglutarate
4 Succinate
5 Fumarate
6 Oxalo



Cette diapo est A PEINE en double



je refais!



Simple, tu vois!

TP DE MICROBIOLOGIE – 2^{ème} ANNEE de l'ISARA-LYON

Le programme se compose 4 TP pour les objectifs suivants :

- Acquérir l'expérience du travail aseptique, différents type de milieux et des techniques de dénombrement des bactéries
- Identifier les bactéries par l'étude des caractères phénotypiques :
 - Morphologiques : observation microscopique et macroscopique
 - Type respiratoire ou fermentaire
 - Biochimiques : Métabolisme du carbone, de l'azote et des lipides
 - Technique de la galerie d'API

TP 1 : Initiale de microbiologie

1. Présentation du laboratoire de microbiologie et consignes de travail
2. Techniques d'ensemencement
3. Technique de coloration de Gram
4. Observation microscopique et macroscopique, Gram
5. Facteurs de croissances l'O₂ et (pH, T°, pression osmotique, désinfectants) (une condition/binôme)

TP 2 : Métabolisme énergétique

6. Mise en évidence du type de respiratoire
7. Recherche des enzymes respiratoires (oxydase, catalase et nitrate réductase)
8. Métabolisme de carbon
 - 8.1. Test fermentaire ou Oxydatif (3 bactéries dont Staphylococcus)
 - 8.1.1. Fermentation les différents sucres : Maltose (avec la cloche) et lactose sur le milieu Kligler
 - 8.2. Fermentation mixte
 - 8.3. Utilisation une source de carbone autre que glucide

TP 3 : Métabolisme de protéines et de lipides

9. Métabolisme de protéines :
 - 9.1. Test de protéolyse (gélatine et caséines)
 - 9.2. Dégradation des acides aminés
 - 9.3. Dégradation du tryptophane et de l'urée
10. Métabolisme de lipides :
 - 10.1. recherche l'enzyme : estérase (Sierra),
 - 10.2. recherche l'enzyme : lipase (tributyryne)
 - 10.3. recherche l'enzyme lécithinase/lipase (Baird Parker)

TP 4 : Synthèse de plusieurs testes par la galerie

**11. Identification les bactéries par la galerie d'API et les tests de confirmation
(recherche l'enzyme de coagulasse libre et liée, l'ADNase et antibiogramme)**

REDACTION DU COMPTE-RENDU ET NOTATION :

La note obtenue tiendra compte la manipulation pendant les TP et des résultats obtenus et de la démarche suivie pendant la partie pratique ainsi que de la qualité du compte-rendu : précision, présentation, qualité de rédaction, orthographe ; les résultats seront regroupés et interprétés, les conclusions seront soulignées.

Ensemenceurs :

1. Pipettes graduées stériles en polystyrène à usage unique sous emballage individuel : pour prélever des volumes précis de liquide et faire des *dénombrements de germes* : 1 ml, 2 ml ; 5 ml, 10 ml.
2. Pipettes Pasteur en verre à extrémité effilée et boutonnée, pour *repiquage* à partir d'un milieu liquide (prélèvement de petite quantité mais sans précision de volume).
3. Ensemenceur Pasteur : composé d'un manche, d'un mandrin et d'un fil métallique en Nickel/Chrome amovible dont l'extrémité peut être :
 - droite : fil droit pour ensemencement par piqûre
 - bouclée : anse ou œse pour repiquage
 - triangulaire : étaloir pour étaler un dépôt de liquide à la surface d'un milieu en boîte de Pétri.

◆ **MATERIEL D'OBSERVATION**

Loupe binoculaire :

Elle permet d'observer des objets ou des cultures avec un grossissement x10. L'éclairage peut se faire par dessus ou par dessous l'objet.

Un appareil photo polaroïd (Microcam.) peut s'adapter sur l'oculaire.

Microscope :

Il permet d'observer des préparations microscopiques à l'état frais (entre lame et lamelle) ou des colorations de frottis fixé sur lame.

Il possède : - 2 oculaires de grossissement x10

et 4 objectifs de grossissements x 4 x 10 x 60 et x 100.

L'objectif x 100 doit être utilisé avec de l'huile à immersion (1 goutte entre lame et objectif).

Le grossissement total est égal au produit $\square \times$ oculaire \times objectif \square .

Un appareil photo polaroïd (Microcam) peut s'adapter sur l'oculaire.

Compteurs de colonies :

Ils permettent le comptage des colonies en boîtes de Pétri.

2 types de compteurs :

◆ **compteur semi-automatique** : avec éclairage par dessous, loupe grossissante et crayon électronique. Le nombre de colonies s'affiche automatiquement à l'écran après chaque pression du crayon.

◆ **Compteur automatique** : Une caméra vidéo analyse l'image de la boîte de Pétri et affiche à l'écran le nombre de colonies visionnées.

◆ PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

Définition : Milieux liquides ou solides renfermant l'eau et les éléments nutritifs nécessaires à la croissance et à la multiplication des germes.

Composition :

Tous les milieux renferment les substances de base :

- eau
- source d'N et de C organique
- ions minéraux

Les milieux solides sont obtenus par ajout de 10 à 15 g d'agar (polysaccharide extrait d'algues). Ces milieux sont dits « gélosés ».

Certains milieux renferment en plus d'autres substances :

- soit parce que les germes recherchés sont plus exigeants,
- soit parce qu'on veut mettre en évidence un *caractère biochimique* particulier,
- soit parce qu'on désire rendre le *milieu sélectif* pour un seul type de germe.

1. Source particulière de carbone organique : glucides, acides organiques (germes exigeants ou mise en évidence d'un caractère biochimique).

2. Indicateur de pH : pour mettre en évidence l'acidification ou l'alcalinisation du milieu dû à un métabolisme fermentaire (1^{er} cas) ou à une réaction de désamination (2^{ème} cas).

3. Des substances inhibitrices : pour rendre le milieu sélectif. Ces substances inhibent le développement de la plupart des germes, sauf celui que l'on veut favoriser.

Commercialisation des milieux de culture :

- la plupart des milieux sont conditionnés en tubes, boîtes de Pétri ou flacons prêts à l'emploi mais ils existent également sous forme déshydratée.

- dans le cas de milieux déshydratés, il faut peser le milieu sec et rajouter le volume d'eau nécessaire.

Pour les milieux gélosés, il faut porter à ébullition pour dissoudre l'agar. La solution homogène est ensuite répartie en tubes ou en flacons bouchés.

- Ces milieux liquides ou gélosés sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 120°C sous une pression de 1 Bar pendant 20 mm. La durée de conservation dépend de la température et de la composition du milieu.

POSTE DE TRAVAIL DU MICROBIOLOGISTE

© CONDITIONS DE TRAVAIL ASEPTIQUE

Avant manipulation :

- ◆ L'opérateur doit désinfecter le plan de travail (eau de Javel ou alcool), il doit porter une blouse propre, se laver soigneusement les mains puis les désinfecter (alcool ou mercryl laurylé).
- ◆ Tout le matériel nécessaire doit être à proximité de l'opérateur dans un arc de cercle entourant le bec Bunsen. Il est préférable de marquer ou étiqueter les tubes et boîtes avant manipulation.
- ◆ Les milieux à ensemercer étant stériles, il faudra travailler aseptiquement pour éviter toute contamination.

Pendant les manipulations :

- ◆ Le bactériologiste travaille assis, le bec bunsen allumé créant un cylindre d'air stérile (il existe des hottes à flux laminaire qui permettent de filtrer l'air en continu et le rendre stérile).
- ◆ les récipients sont ouverts à proximité de la flamme :
 - ✓ l'orifice des *tubes* est flambé avant ensemencement, le bouchon étant maintenu par le petit doigt de la main qui tient l'ensemenceur .
 - ✓ *les boîtes de Pétri* sont ouvertes près de la flamme le temps de couler le milieu ou de faire l'ensemencement en surface.
- ◆ Les ensemenceurs doivent être stériles :
 - ✓ le fil métallique des ensemenceurs est chauffé au rouge dans la flamme plusieurs dizaines de secondes et la tige supérieure est flambée pour détruire les germes ambiants. Le fil est ensuite refroidi non loin de la flamme avant le prélèvement.
 - ✓ les pipettes graduées sont débarrassées de leur emballage stérile et utilisées telles quelles (sans passage dans la flamme).

✓ les pipettes Pasteur sont flambées rapidement avant ouverture. On casse l'extrémité boutonnée avec une pince métallique flambée.

Après manipulation :

- les orifices des tubes sont flambés avant bouchage,
- les boîtes de Pétri sont refermées près de la flamme ;
- les ensemenceurs métalliques sont chauffés au rouge pour détruire les germes restants,
- les pipettes à usage unique sont désinfectées dans un récipient haut renfermant de l'eau de Javel, pendant plusieurs heures avant élimination.
- Les milieux étant mis à incuber à l'étuve, la paille est débarrassée, puis désinfectée à nouveau par flambage.
- Lorsque les analyses sont terminées, tous les récipients renfermant des micro-organismes (tubes, boîtes, flacons, etc...) doivent être stérilisés à l'autoclave avant d'être vidés, lavés ou jetés.

© LES CONSIGNES DE SECURITE

La manipulation des souches bactérienne et le dénombrement des micro-organismes divers, présente des risques pour le manipulateur et son entourage, ainsi que des risques pour l'environnement en cas de dissémination.

Un bonne prévention de ces risques repose sur :

1. la formation et l'information des manipulateurs,
2. la connaissance des risques,
3. le respect des bonnes pratiques de laboratoire des consignes de sécurité et particulièrement au niveau de la protection individuelle (port de blouse, gant...)

1 – La formation et l'information des manipulateurs :

Les manipulateurs sont formés pour obtenir de bonnes bases en microbiologie et manipuler avec les bonnes règles de sécurité.

2 - Connaissances des risques :

On se trouve en présence de microorganismes présentant un risque modéré pour le manipulateur, limité et faible pour la communauté.

3 – Le respect des bonnes pratiques de laboratoire, des consignes de sécurité :

Les bonnes pratiques de laboratoire doivent être connues de tous et les consignes générales affichées dans la salle de T.P.

MESURES PREVENTIVES POUR EVITER LES CONTAMINATIONS

1 – Tenue vestimentaire :

- ⇒ habits de ville laissés sur les portes manteaux (sas ou vestiaire),
- port de la blouse (obligatoirement fermée et propre)
- ⇒ port de la charlotte,
- ⇒ ongles coupés,
- cheveux attachés,
- bijoux enlevés.

2 – Hygiène des mains avant et après manipulation :

- lavage des mains avec du savon liquide antiseptique,
- essuyage des mains avec du papier usage unique.

3 – Nettoyage des paillasses avant et après manipulation :

- nettoyage des paillasses à l'aide de papier imprégné de javel (pissette jaune), jeter le papier dans les corbeilles prévues sous les paillasses et sécher avec du papier.

4 – Désinfection en cas de contamination :

- en cas de casse ou de projection de culture bactérienne, prévenir le responsable du laboratoire qui procédera à la désinfection (voir procédure : « personnel du laboratoire).

Il est important de surveiller les opérations de nettoyage et de désinfection pour prévenir les risques pour les manipulateurs

LES INTERDITS PENDANT LA MANIPULATION

Interdiction :

- **de toucher les objets personnels** pendant les manipulations
- **de porter ses mains à la bouche**
- **de manger, boire, fumer, se maquiller, de stocker des aliments et des boissons**
- **de pipeter à la bouche** (utilisation de pipette automatique)
- **d'ouvrir les fenêtres** (courants d'air)
- **de jeter les cultures bactériennes** dans les éviers et la poubelles.
 - ◆ Le *matériel usage unique* (pipette plastique, pipette pasteur), ayant contenu une culture microbienne sera jeté dans un bocal ou bécher rempli d'eau de javel
 - ◆ Les *boîtes de Pétri de culture microbienne* non utilisées après manipulations sont jetées dans des sacs d'autoclave marqués du sigle international du risque biologique. Ceux-ci sont placés à chaque extrémité de paillasse pour éviter les déplacements.
 - ◆ Les *pipettes* placées dans le bécher rempli d'eau de javel doivent être enlevées avant la séance. Ces pipettes ont été placées 24 H dans l'eau de javel donc les germes sont détruits.
- **de mettre des papiers dans les bécchers d'eau de javel.**

TP n°1 : 1^{ère} séance

2. TECHNIQUES D'ENSEMENCEMENT

Définitions :

L'isolement permet l'obtention de colonies à la surface d'un milieu solide par ensemencement à partir d'un produit alimentaire ou d'un prélèvement biologique ou par repiquage à partir d'un milieu de culture solide ou d'un milieu liquide d'enrichissement.

Le milieu d'isolement peut être non sélectif (flore totale) ou sélectif. (flore particulière)

Le repiquage peut se faire à partir d'une colonie prélevée sur milieu solide et ensemencement sur milieu solide ou sur milieu liquide pour obtenir une **culture pure**. Une culture pure ne renferme qu'une seule espèce bactérienne (**souche**)

Ces techniques sont appliquées pour ensemer pour l'**observation microscopique et coloration de Gram (partie 3 et 4)**

3 souches bactériennes en cultures pures sur boîte de **gélose nutritive (GN)**

- ***Staphylococcus epidermidis* : SE**
- ***Bacillus subtilis* : BS**
- ***Escherichia coli* : EC**

On prélève aseptiquement un fragment de colonie avec **l'öse ou anse Pasteur** et on enseme un milieu neuf. :

1) en milieu liquide en tube: l'öse chargée de germes est agitée dans le **bouillon nutritif BN** de façon à les remettre en suspension. Après incubation à 37°C à l'étuve leur développement se traduit par l'apparition d'un trouble plus ou moins important.

2) sur milieu solide :

Préparer des boîtes : le milieu GN en surfusion est coulé en boîte de Pétri (environ 15 ml) , après refroidissement et solidification à plat la boîte est retournée et ouverte dans l'étuve pour sécher la surface du milieu (quelques minutes)

On pratique un isolement à partir de colonies isolée sur un milieu solide, plusieurs méthodes sont utilisées, dont celle des cadrans : une pipette Pasteur boutonnée est déchargée progressivement de ses germes par application à la surface du milieu selon un mouvement en « zig zag ». Le dépôt est très important au départ, mais à la fin, il n'y aura plus que quelques bactéries qui donneront des colonies bien isolées.

Les boîtes sont incubées dans l'étuve à 37°C (à l'envers couvercle en bas pour éviter la condensation sur le milieu)

TP n°1 : 1^{ère} séance

5. FACTEURS DE CROISSANCE (SEANCE D'ENSEMENCEMENT)

1- Influence de la température sur E. coli

Ensemencer une goutte de suspension d'E. coli sur quatre tubes de bouillon nutritif.

Incuber à quatre températures différentes :

- 1 tube à 5°C (réfrigérateur),
- 1 tube à 20°C (laboratoire),
- 1 tube à 37°C (étuve),
- 1 tube à 55°C (étuve).

Après 48 heures, observer l'importance du trouble s'il y a eu développement, ou noter l'absence de développement.

2- Influence du pH sur E.coli

Ensemencer une goutte de suspension d'E. coli sur cinq tubes de bouillon nutritif de pH variable, pH2,6, pH3,6, pH6,8, pH8,6, pH10.

Incuber tous les tubes à 37°C pendant 48 heures.

Observer l'importance du trouble ou l'absence de développement.

3- Influence de la pression osmotique sur E. coli

Ensemencer une goutte de suspension d' E. coli sur trois tubes de bouillon nutritif de concentration croissante en chlorure de sodium (le témoin sera un tube de bouillon nutritif incubé à 37° C renfermant 0,5 % de Nacl).

- Bouillon 5 (0,5 % + 5 % Na cl)
- Bouillon 10 (0,5 % + 10 % Na cl)
- Bouillon 20 (0,5 % + 20 % Na cl)

Incuber à 37°C pendant 48 heures.

Observer l'importance du trouble ou l'absence de développement.

4- Influence de l'oxygène Sur Pseudomonas, E. coli, Clostridium.

Ensemencer en stries à l'anse Pasteur chaque souche sur deux boîtes de Pétri (gélose nutritive pour E. coli et Pseudomonas, gélose viande Foie solide pour Clostridium).

Incuber une boîte de chaque souche à 37°C en aérobiose et les trois autres boîtes à 37°C dans une jarre à anaérobiose après avoir mis une double couche de milieu.

Comparer le développement de chaque souche dans les deux conditions d'aération (aérobiose et anaérobiose)

3. TECHNIQUE DE COLORATION DE GRAM

Principe :

La coloration de GRAM est la coloration de base de la bactériologie. C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries, non seulement d'après leur forme mais également d'après leur affinité pour les colorants. Ce procédé de coloration différentielle divise les bactéries en deux classes : **GRAM - ou GRAM +**

Matériel :

- lames pour microscope
- bec bunsen
- oese
- microscope avec objectif à immersion et huile
- colorants pour GRAM
- support pour lame

Technique :

- Effectuer un **frottis** sur lame à partir de cultures de 18 à 24 heures. A l'aide d'une anse ou d'une pipette Pasteur, faire un dépôt en évitant de trop étaler sur toute la lame. Laisser sécher pour que le frottis adhère à la lame.
- **Fixer** le frottis à l'aide de quelques gouttes d'alcool, flamber et laisser refroidir.
- Couvrir de colorant (**crystal violet** pour Gram) le frottis fixé et laisser en contact pendant **1 minute**.
- **Laver** à l'eau.
- Recouvrir la lame de mordant (**lugol** pour Gram) et laisser en contact pendant **1 minute**.
- **Laver** à l'eau.
- **Décolorer** à l'aide **d'alcool/acétone** ou avec le décolorant pour Gram jusqu'à ce que le solvant n'entraîne plus de colorant (**30-60 secondes**, solvant incolore).
- **Laver** à l'eau
- **Couvrir** la lame de colorant de contraste (**safranine** pour Gram ou **fuschine** basique) et laisser agir pendant 30-60 secondes.
- **Laver** à l'eau
- **Sécher** à l'air.
- **Observer à l'objectif 100** en mettant une goutte d'huile à immersion (entre lame et objectif, monter le condensateur, ouvrir le diaphragme).

Résultats : Observer la forme l'arrangement et le gram

- Coloration **violette** : gram +
- Coloration **rose** : gram -

TP n°1 : 2^{ème} séance

4. OBSERVATIONS MICROSCOPIQUE ET MACROSCOPIQUE DES CULTURES EN MILIEU LIQUIDE ET SOLIDE

Groupe :

Noms :

Caractères macroscopiques et microscopiques des 3 souches :

Souche	Aspect des colonies sur milieu solide en boîte de Pétri GN	Aspect du développement en milieu liquide BN	Coloration de gram	Examen microscopique Forme et arrangement des bactéries
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Type 1 → lisse	suspension homogène	Gram +	• Coques en amas • plan
<i>Bacillus subtilis</i>	Type 2 → Rugueuse	suspension hétérogène, type floconneux trouble en surface	Gram +	Long bacilles à extrémités arrondies
<i>Escherichia coli</i>	Type 1 → lisse	suspension homogène	Gram -	Coccobacilles

	Bords	Surface	Consistance
Type 1 = colonies lisses "smooth"	réguliers, svt semi-dentelés	Lisse	Crémeuse
Type 2 = colonies rugueuses "rough"	svt réguliers	Rugueuse	Bombée lisse brillante
Type 3 = colonies moqueuses "M"	lisses, réguliers	bombée, lisse et brillante	Filante

5. FACTEURS DE CROISSANCES

1- Influence de la température

Température d'incubation	5°C	20°C	37°C	55°C
Développement d'E. coli	-	++	+++	-

Conclusion : Température optimum de croissance à 37°C
mais se développe entre 15°C et 45°C
E. coli est une bactérie mésophile préférant une température entre 20°C et 40°C

2- Influence du pH

Influence du pH	2,6	3,6	6,8	8,6	10
Développement d'E. coli	-	-	+++	-	-

Conclusion :
pH optimum à 7,5
E. coli se multiplie à partir de pH 4,4 jusqu'à 8.
Bactérie neutrophile.

3- Influence de la pression osmotique

Pression osmotique	Témoin BN	BN +5 % de NaCl	BN +10 % de NaCl	BN +20 % de NaCl
Développement d'E. coli		+	-	-

Conclusion : *E. coli* est une bactérie non halophile.

4- Influence de l'O₂

Développement de colonies	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Clostridium</i>
En aérobiose	++	+	-
En anaérobiose	+	-	+

Conclusion :

E. coli est une bactérie aéro-anaérobie facultative (AAF)
Pseudomonas est une bactérie aérobie stricte.
Clostridium est une bactérie anaérobie stricte.

TP n°2 : Métabolisme énergétique et de carbone

TP n°2 : 1^{ère} séance

6- MISE EN EVIDENCE DU TYPE RESPIRATOIRE : affinité vis-à-vis de l'oxygène.

Trois souches seront testées à partir de cultures sur bouillon : *E. coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*.

Composition du milieu de culture : la gélose viande levure à 6 g de gélose par litre (VL 6 ‰) est un milieu semi solide, renfermant 5 g/l de glucose comme source d'énergie, de la peptone, de l'extrait de levure et de l'extrait de viande comme source de facteurs de croissance. Il ne renferme ni nitrate, ni nitrite, ni sulfite, ni thiosulfate.

Régénération des milieux : Porter les trois milieux à 100°C pendant 30 mn pour chasser l'O₂ dissout (Créer un gradient de rH). Refroidir à 48°C (température de surfusion).

Ensemencement du milieu :

- Stériliser l'effilure d'une pipette Pasteur boutonnée par passage dans la flamme
- Refroidir quelques secondes à côté de la flamme
- Tremper dans le bouillon de culture et ensemercer le milieu VL en surfusion de bas en haut selon un mouvement de vrille.

Refroidir le milieu sous l'eau froide pour le solidifier.

Incubation : Dévisser légèrement les bouchons pour laisser les milieux en aérobiose en surface pendant l'incubation à l'étuve à 37°C pendant 48 heures.

Noter la zone de développement des colonies et en déduire le type respiratoire.

7- RECHERCHE DES ENZYMES RESPIRATOIRES (OXYDASE, CATALASE ET NITRATE REDUCTASE)

Trois souches seront testées à partir de cultures sur bouillon : *E. coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*

➤ **Préparation pour la recherche de l'oxydase et de la catalase**

- Couler trois boîtes de gélose nutritive et laisser solidifier.
- Ensemencer en stries serrées à l'anse Pasteur une boîte de gélose nutritive avec chaque souche à tester (méthode des cadrans).
- Incuber à 37°C pendant 48 heures.

➤ **Préparation pour la recherche de la nitrate réductase**

- Ensemencer une goutte de chaque suspension bactérienne sur bouillon nutritif nitraté (1 g/l de KNO₃).
- Incuber à 37°C pendant 48 heures.

1. Test au VL
2. test respi
3. test glc

4. test catalase
5. test catalase
6. test glc fermentation

8. METABOLISME DU CARBONE

8.1. Test Oxydative ou Fermentaire vis à vis du glucose

Quatre souches seront testées : **E.Coli, Staphylococcus, Bacillus, Pseudomonas** (culture liquide).

1 – Milieux d'étude

- Milieu de Hugh et Leifson (milieu semi solide renfermant du glucose et un indicateur de pH) et milieu MEVAG staphylocoque.
 - * Faire fondre et régénérer 6 tubes de milieu de Hugh et Leifson au bain marie, à 100°C pendant 20 mn pour enlever l'oxygène dissout.
 - * Refroidir les milieux à 50°C (surfusion).
 - * Ajouter dans chaque tube de milieu 7 gouttes de solution stérile de glucose à 30 % pour avoir une concentration finale de 1 % (10g/l).
 - * Homogénéiser sans incorporer d'air.
- Dans le milieu ⇒ Mevag pour staphylocoque : ne rien ajouter ; le glucose est déjà dans le milieu.
 - * Solidifier sous l'eau. Les milieux sont prêts à ensemenecer.

2 – Ensemencement

- * Avec chaque souche à tester, ensemenecer 2 tubes de milieu par piqûre centrale au fil droit.
- * Couvrir l'un des milieux avec 1 cm d'huile de paraffine stérile (tube en anaérobiose).

3 – Incubation à 37°C pendant 48 heures.

Laisser les bouchons dévissés pour permettre l'arrivée d'O₂ dans le tube sans paraffine (tube en aérobiose).

4 – Lecture (voir fiche technique - 2 ème séance)

Le virage de l'indicateur du vert ou violet au jaune traduit l'acidification du milieu donc l'utilisation du glucose.

Selon la zone de virage dans le tube en aérobiose (surface ou profondeur), on visualise le type métabolique, le résultat étant confirmé par le tube en anaérobiose.

Il était vert, il devient jaune

8.2. Fermentation les différents sucres : Maltose et Lactose

a) Maltose :

Milieu liquide : eau peptonée au rouge de phénol avec cloche

Deux souches et deux sucres seront testés : **E.coli et Proteus vulgaris, Fructose et maltose** (culture liquide).

* Milieux : quatre tubes de milieu de base liquide renfermant un indicateur de pH et une cloche renversée.

Ajouter à deux tubes d'eau peptonée, 1 ml de solution stérile de fructose à 10 % et à deux autres tubes 1 ml de maltose à 10% pour que la concentration finale en sucre soit de 1 % (10g/l).

Homogénéiser et vérifier que la cloche ne renferme pas de bulle d'air.

* Ensemencement : déposer avec une pipette Pasteur une goutte de suspension d'E.coli ou de Proteus vulgaris sur chaque milieu sucré. Agiter.

* Incubation : à 37°C pendant 48 heures.

* Lecture : le virage au jaune de l'indicateur et le gaz dans la cloche traduit la fermentation du sucre avec production de gaz.

b) Lactose :

Deux souches seront testées sur milieu de Kligler : **E.coli et Proteus vulgaris** (culture liquide)

1 – Milieu : deux tubes de milieu de Kligler, solide en tube incliné (culot + tranche) renfermant du glucose, du lactose et un indicateur de pH.

2 – Ensemencement : ensemencer chaque souche dans le culot par piqûre centrale au fil droit et sur la tranche en stries serrées avec l'anse Pasteur.

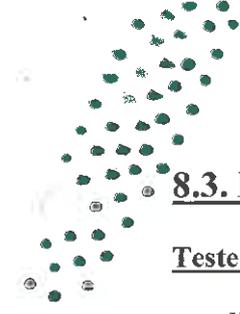
3 – Incubation : à 37°C pendant 48 heures bouchon dévissé

4 – Lecture (voir fiche technique)

La β galactosidase est un endoenzyme qui hydrolyse le lactose en galactose + glucose. Elle est fabriquée par certaines bactéries en présence de lactose.

Le réactif est l'ortonitrophényl galactoside (ONPG) qui est hydrolysé par la β galactosidase en orthonitrophénol jaune.

Remarque : sur le même milieu, on lit directement la fermentation du glucose (culot jaune) et l'utilisation du lactose (tranche jaune).



8.3. Mise en évidence de la fermentation mixte

Teste la dégradation le glucose par les entérobactéries

Il y a deux voies possibles mises en évidence sur le milieu de CLARK et LUBS : la voie acide mixte et la voie butylène glycolique.

On testera deux souches E.coli et Entérobacter (culture liquide)

- 1 – Milieu : deux tubes de milieu liquide de CLARK et LUBS renfermant du glucose.
- 2 – Ensemencement : ensemencer chaque milieu avec une goutte de suspension bactérienne à tester (E.coli et Entérobacter).
- 3 – Incubation à 37°C pendant 48 heures.
- 4 – Lecture (*voir fiche technique*)
Après incubation, on met en évidence la voie acide mixte par la réaction au rouge de méthyle (RM) et la voie butylène glycolique par la réaction de Vosges Proskauer (VP).

Les entérobactéries se classent en deux catégories :

- * RM + VP- (**Voie acide mixte**),
- * RM - VP+ (**Voie butyléneglycolique**).

8.4 Mise en évidence de l'utilisation une source de carbone autre que glucide.

Utilisation du **citrate de sodium**.

On testera deux souches : **E.coli et Salmonella** (culture en milieu solide).

1 – Milieu : deux tubes de milieu de Simmons (milieu solide incliné) contenant du citrate de sodium comme seule source de carbone et un indicateur de pH.

2 – Ensemencement : ensemercer chaque milieu à l'obèse avec une seule strie longitudinale sur la tranche à partir d'une colonie prélevée sur un milieu solide.

3 – Incubation à 37°C pendant 48 heures bouchon dévissé

4 – Lecture (*voir fiche technique*)

L'utilisation de citrate se traduit par un développement et par le virage au bleu de la tranche.

TP N° 2 - 2^{ème} séance : Lecture

NOM/Prénom :

Groupe :

6 - - MISE EN EVIDENCE DU TYPE RESPIRATOIRE

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
Zone de développement	Partout	Surface	Partout
Type respiratoire	Aérobic facult	Aérobic stricte	Aérobic facult

7 – RECHERCHE DES ENZYMES RESPIRATOIRES (après incubation)

a) Recherche de l'oxydase : présence du cytochrome C

Sur une plaque contenant quatre supports imprégnés de réactif oxalate de N dimethyl paraphénylène diamine, déposer et étaler à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, un fragment de colonie.

Coloration violet foncé : Oxydase +

Pas de coloration ou coloration rose ou mauve : Oxydase -

(Ne pas utiliser l'anse Pasteur)

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
Observation après dépôt d'une colonie sur la plaque	Pas de coloration	Violet foncé	Pas de coloration
Résultat de l'oxydase	oxydase -	oxydase +	oxydase -

b) Recherche de la catalase

Catalase : Déposer une goutte d'H₂O₂ à 10 volumes sur une colonie.

Dégagement de gaz : Catalase +

Pas de bulles de gaz : Catalase -

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
Observation après dépôt d'une goutte d'H ₂ O ₂ sur une colonie	gaz	gaz	gaz
Résultat de la catalase	+	+	+

c) Recherche de la nitrate réductase :

- Ajouter dans le milieu une goutte de réactif 1 et une goutte de réactif 2.

Ces deux réactifs constituent le réactif de Griess.

1 : Acide parasulfanylique en milieu acétique.

2 : α naphtylamine en milieu acétique.

Ce réactif donne une coloration rose en présence de nitrites.

— Si coloration rose : présence de nitrites dans le milieu donc
 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ nitrate réductase +.

— Si pas de coloration rose : absence de nitrites, recherche des nitrates par addition de poudre de zinc. (Réducteur)
 $\text{NO}_3^- + \text{Zn} \rightarrow \text{NO}_2^-$

— Si la coloration rose apparaît par action de la poudre de Zn, le milieu après incubation contenait toujours des nitrates.
 NO_3^- Nitrate réductase -

- Si la coloration rose n'apparaît pas par action de la poudre de Zn, le milieu, après incubation ne contenait ni nitrates, ni nitrites. Ceux-ci ont été réduits en ammoniac ou azote.

$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$ ou N_2

Nitrate réductase +

Nitrate réductase

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
Observation après ajout du réactif de Griess	Rose claire	Vert	Rose soutenu
Observation après ajout de zinc		Pas de rose	
Résultat de la Nitrate réductase	Nitrate réductase ↓		

Conclusion :

Pour chacune de ces trois souches, précisez les voies utilisées pour produire de l'énergie en aérobiose et en anaérobiose sur milieu non nitraté et sur milieu nitraté.

– *E. coli* :

– *Pseudomonas* :

– *Staphylococcus* :

8. METABOLISME DU CARBONE

8.1. Test Fermentaire ou Oxydatif : milieu de Hugh et Leifson

	E.coli	Staphylocoque sur milieu MEVAG	Bacillus	Pseudomonas
Aspect des cultures sur milieu de Hugh et Leifson <i>couleur</i>	Jaune	Jaune	jaune en haut du tube O_2	vert
Type métabolique <i>oxy. (jaune) no ferment.</i>	Fermentation aéro mixte	Fermentation mixte	oxydatives (besoin de O_2 pour oxygène <i>pour décomposer</i>)	Inerte

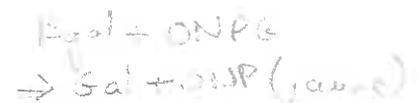
8.2 – Fermentation les différents sucres : Maltose et Lactose

a) Maltose: eau peptonée au rouge de phénol avec cloche

	Maltose	
	Milieu	Résultat
E.coli	<i>gaz jaune</i>	Ferment + $CO_2 + H_2$
Proteus vulgaris	<i>un peu gaz jaune</i>	

b) Maltose: milieu de Kligler – Recherche l'enzyme (β galactosidase)

	Aspect du milieu de Kligler	Utilisation du lactose et du glucose	Test à l'ONPG (β galactosidase)
E.coli	<i>gel jaunâtre à prod. gaz gel jaune</i>	<i>lac = glu =</i>	jaune +
Proteus vulgaris	<i>gaz -> ferment au colot</i>	<i>lac = glu =</i>	incolor =



oxydatif : produit CO_2 et peu d'acides
fermentaire : produit acides

8.3. Mise en évidence de la fermentation mixte : milieu de Clark et Lubs

a) Test au rouge de méthyle : voie acide mixte.

	Couleur du mélange milieu CL + rouge de méthyle	Test RM
E.coli	Rouge soutenu	RM+
Entérobacter aérogènes	Rouge orangé	RM-

b) Test de Vosges Proskauer : voie butylène glycolique.

	Couleur du mélange milieu CL + réactifs VP ₁ et VP ₂	Test de Vosges Proskauer
E.coli	pas de modification	VP-
Entérobacter aérogènes	coloration rouge	VP+

8.4 Mise en évidence de l'utilisation d'une source de carbone autre que glucide : milieu du Simmons

	Développement	Couleur de la tranche	Utilisation du citrate de sodium
E.coli	H ⁻	Vert	non
Salmonella arizonae	H ⁺	Bleu	oui

→ alcalinité du milieu

Conclusion :
Métabolisme du carbone pour les souches testées ?

TP n°3 : Métabolisme de protéines et de lipides

TP n°3 – 1^{ère} Séance

9. METABOLISME DE PROTEINES

9.1. Test de protéolyse (gélatine et caséines)

a) Hydrolyse de la gélatine : Méthode de Köhn.

Deux souches seront testées : (*Pseudomonas aeruginosa* et *Hafnia alvei* en culture solide) pour mettre en évidence la gélatinase.

- * Milieu d'étude : dans deux tubes d'eau peptonée, introduire avec une pince flambée, un disque de gélatine au charbon ou un film recouvert de gélatine imprégnée de sel d'argent.
- * Ensemencement : ensemer chaque milieu à partir d'une culture en milieu solide (suspension dense).
- * Incubation : 37°C de 48 heures à 5 jours.
- * Lecture (*Voir fiche technique*) : l'utilisation de la gélatine provoque la libération de particules noires de charbon ou de sel d'argent qui se déposent au fond du tube.

b) Hydrolyse de la caséine :

Sur un milieu liquide ou solide contenant du lait écrémé.

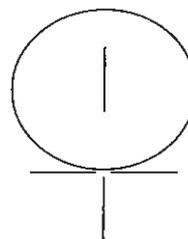
Deux souches seront testées (*Pseudomonas* et *Hafnia alvei* en culture solide) pour mettre en évidence une protéase.

* Milieus d'étude :

- Deux tubes de lait écrémé au tournesol stérile : ajouter 3 gouttes de solution de tournesol dans 10 ml de lait stérile (pipette Pasteur).
- Deux boîtes de Pétri renfermant du lait gélosé (10 ml d'eau gélosée à 3 % d'agar + 10 ml de lait écrémé stérile à mélanger à chaud en tube et à couler en boîte de Pétri).

* Ensemencement :

- lait écrémé : Ensemencer avec une colonie de la souche bactérienne à tester.
- lait gélosé : ensemer une colonie de chaque souche à tester en stries rayonnantes avec l'anse Pasteur.



* Incubation : à 37°C de 48 heures à 5 jours.

* Lecture :

- lait écrémé au tournesol : on peut observer quatre phénomènes.

** coagulation du lait : acidification par fermentation du lactose et virage au rose du tournesol.

** protéolyse de la caséine :

. éclaircissement du lait non coagulé, partiel ou total.

. ou digestion partielle ou totale du caillot qui devient spongieux.

** décoloration du tournesol due à la présence d'une réductase

** Alcalinisation du lait et virage au bleu par production d'ammoniaque ou d'acides aminés alcalins.

- lait gélosé : La digestion de la caséine se traduit par un éclaircissement du milieu autour de la strie.

9.2. Dégradation des acides aminés

a) Dégradation de la lysine :

Deux enzymes sont recherchées : LDC (lysine décarboxylase) et LDA (lysine désaminase).

Deux souches seront testées : *Proteus vulgaris* et *Hafnia alvei* en culture solide.

* Milieux utilisés : trois sortes de milieux peuvent être utilisés pour la recherche de la LDC (Milieu de Kligler et Milieu Lysine Fer), dont un seul permettant la recherche simultanée de LDC et LDA (Lysine-fer).

* Ensemencements :

- Ensemencer deux tubes de milieu de Kligler en stries sur la tranche et en piqûre centrale dans le culot avec chaque souche à étudier. Ne pas visser les bouchons.

- Ensemencer deux tubes de milieu Lysine Fer en stries serrées sur la tranche et en piqûre dans le culot avec chaque souche à étudier. Ne pas visser les bouchons.

- Ensemencer deux tubes de bouillon LDC avec une colonie de chaque souche à tester. Couvrir d'huile de paraffine (anaérobiose).

* Incubations : à 37°C pendant 48 heures.

* Lecture (voir fiches techniques correspondantes) :

- Milieu de Kligler : la LDC libère de la cadavérine à partir de la lysine. La lecture n'est pas directe. Après extraction de la cadavérine par le chloroforme en milieu alcalin, on la révèle par une réaction colorée (violette) à la ninhydrine.

- **Milieu Lysine-Fer** : la lecture est directe car le milieu contient du pourpre de bromocrésol. La LDC se lit dans le culot, la LDA sur la tranche (activité maximum en aérobiose car c'est une désamination oxydative).

LDC : le culot s'acidifie d'abord (culot jaune) par fermentation du glucose puis s'alcalinise par production de cadavérine (culot violet).

LDA : la tranche vire au rouge par formation d'un complexe entre le fer ferrique du milieu et l'acide cétonique résultant de la désamination de la lysine.

Remarque : Une coloration noire du culot sur milieux LDC et Kligler traduit la présence d' H_2S (Complexe noir de sulfure de fer par réaction entre H_2S et le citrate ferrique du milieu).

b) **Acides aminés soufrés** : Cystéine, Cystine et Méthionine.

Leur catabolisme produit un dégagement d' H_2S . Si le milieu de culture renferme du fer, il se formera du sulfure de fer.

Mais la production d' H_2S peut aussi être due à la réduction des sulfites ou des thiosulfates.

* **Milieux pour la mise en évidence d' H_2S**

- **Milieu de Kligler** (ensemencé précédemment) renfermant du citrate ferrique ensemencé par piqûre centrale.

- **Milieu Lysine-Fer** (ensemencé précédemment) renfermant du citrate ferrique, ensemencé par piqûre centrale.

* **Lectures** : (voir fiches techniques après incubation à $37^\circ C$ pendant 48 heures).

La production d' H_2S se traduit par le noircissement du culot des milieux Lysine Fer et Kligler.



9.3- Dégradation du tryptophane et de l'urée

a) **Dégradation du tryptophane**

On recherche deux voies de dégradation possibles :

- la désamination oxydative par la **TDA** (tryptophane désaminase) conduisant à la production d'acide indole pyruvique.
- la production d'indole et d'acide pyruvique par la **Tryptophanase**.

Deux souches seront testées : ***Proteus vulgaris*** et ***Hafnia alvei*** en culture solide.

* Milieux :

- Deux milieux urée indole (1 ml en tube à hémolyse) : pour la recherche de la TDA, de l'uréase et de la Tryptophanase.

- Deux milieux eau peptonée pour la recherche de la tryptophanase (indole).

* Ensemencement : faire une suspension épaisse dans les deux milieux uréeindole et eau peptonée.

* Incubation : à 37°C pendant 48 heures.

* Lecture (*Voir fiches techniques*)

- Tryptophane désaminase : sur milieu urée indole l'acide indole pyruvique provenant de la désamination par la TDA réagit avec le perchlorure de fer pour donner un complexe brun-rouge.

- Tryptophanase : la production d'indole sur milieu urée indole et sur eau peptonée est mise en évidence par une réaction colorée avec le réactif de Kovacks ou de James.

b) **Dégradation de l'urée**

L'urée est un produit de dégradation des acides aminés. Elle est utilisée par les bactéries possédant une uréase.

* Milieu : Les milieux urée-indole précédemment ensemencés avec ***Proteus vulgaris*** et ***Hafnia alvei*** servent à la recherche simultanée de l'uréase, TDA et indole.

* Lecture : (*voir fiche technique après incubation à 37°C pendant 48 heures*).

On lit d'abord directement l'uréase (virage au rose par alcalinisation du milieu) avant d'ajouter le réactif de la TDA (perchlorure de fer) puis le réactif de l'indole. (Kovacks)

10. METABOLISME DES LIPIDES

Les bactéries lipolytiques appartiennent entre autres, aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Serratia*. Il existe plusieurs sortes d'activités lipolytiques.

10.1. Recherche l'enzyme : estérase

C'est une exoenzyme qui hydrolyse un ester en acide gras et alcool. On testera trois souches : *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas* et *Serratia*.

* **Milieu** : on utilise le milieu de Sierra renfermant entre autres du Tween 80 (monooléate de sorbitol) et du CaCl_2 .

- Faire fondre 100 ml de milieu de base.
- Ajouter 1 ml de Tween 80 au milieu en surfusion. Homogénéiser.
- Couler un peu de milieu dans trois boîtes de Pétri. Laisser solidifier. Sécher à l'étuve.

Le milieu est translucide car le monooléate est soluble dans l'eau.

* **Ensemencement** : ensemencer chaque souche par une seule strie à la surface du milieu et incubé pendant 48 heures à 37°C .

* **Lecture** (*voir fiche technique*) : l'hydrolyse de l'ester libre de l'acide oléique qui précipite en présence de CaCl_2 sous forme d'oléate de calcium insoluble autour de la strie.

10.2. Recherche l'enzyme : lipase

C'est une exoenzyme qui hydrolyse les trois liaisons ester de la tributyrine. On testera trois souches : *Pseudomonas*, *Staphylococcus epidermidis* et *Serratia*.

* **Milieu** : gélose à la tributyrine et au rouge de phénol.

- Faire fondre 100 ml de milieu de base.
- Ajouter 1 ml de tributyrine au milieu en surfusion. Homogénéiser.
- Couler un peu de milieu dans trois boîtes de Pétri. Laisser solidifier. Sécher. Le milieu est rouge et opaque à cause de la tributyrine en émulsion.



* **Ensemencement** : ensemercer chaque souche par une strie médiane à la surface du milieu et incuber à 37°C pendant 48 heures.

* **Lecture** (voir fiche technique) : l'hydrolyse de la tributyrine entraîne un virage au jaune du milieu autour de la strie.

10.3. Recherche l'enzyme : lécithinase et de la lipoprotéinase

Ce sont deux exoenzymes. La lécithinase hydrolyse les liaisons esters ou ester phosphorique de la lécithine du jaune d'oeuf. La lipoprotéinase hydrolyse la lipoprotéine du jaune d'oeuf. On testera deux souches :

- *Staphylococcus aureus*.

- *Staphylococcus epidermidis*.

* **Milieu** : le milieu de Baird Parker est un milieu complexe peu sélectif renfermant entre autres du jaune d'oeuf et du tellurite de potassium.

- Faire fondre 100 ml de milieu de base.

- Ajouter 5 ml de jaune d'oeuf au tellurite de potassium et 2,5 ml de sulfaméthazine (inhibiteur de Proteus).

- Couler un peu de milieu dans deux boîtes de Pétri. Laisser solidifier. Sécher. Le milieu est opaque à cause du jaune d'oeuf.

* **Ensemencement** : ensemercer chaque souche par une strie médiane à la surface d'une boîte et incuber à 37°C pendant 48 heures.

* **Lecture** (voir fiche technique) :

- La lipoprotéinase provoque un éclaircissement du milieu autour de la strie (digestion de la lipoprotéine du jaune d'oeuf) qui apparaît après 24 heures.

- La lécithinase provoque une précipitation des acides gras autour de la strie qui apparaît après 48 heures.

Les germes qui peuvent se développer sur ce milieu sont : Staphylococcus, Micrococcus, Bacillus, Levures.

Pour rechercher ces enzymes, on peut aussi utiliser un milieu non sélectif comme la gélose à l'oeuf.

TP n°3 : Métabolisme de protéines et de lipides

TP N° 3 - 2^{ème} séance - Lecture

Fiche de lecture et d'interprétation des résultats

NOM/Prénom :MORISAVOIR.....Alexia.....

Groupe :1.....

9. METABOLISME DE PROTEINES

9.1 – Protéolyse

a) Hydrolyse de la gélatine : film noir et blanc en Bouillon nutritif

	<i>Pseudomonas</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Aspect du film de gélatine	transparent	pas de changement
Gélatinase	+	-

b) Hydrolyse de la caséine :

- lait écrémé au tournesol

	<i>Pseudomonas</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Aspect du milieu	base au dessus jaunissement coagulation de lait	milieu couleur rose
Fermentation du lactose	oui	P
Réductase	+	+
Protéolyse de la caséine	oui	oui non

- lait gélosé

	<i>Pseudomonas</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Aspect du milieu	blanc opaque et translucide au top	blanc opaque
Protéolyse de la caséine	oui	non

9.2 – Dégradation des acides aminés

a) Dégradation de la lysine

- Milieu de Kligler

	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Coloration à la ninhydrine après extraction chloroformique		
L.D.C.		

- Milieu Lysine-Fer

	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Couleur du culot	jaune	noir - se devint blanc
L.D.C.	-	+
Couleur de la tranche	rouge	noir
L.D.A.	+	-

b) Acides aminés soufrés : (à combiner avec LDC)

- Milieu de Kligler

	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Couleur du culot	jaune noir	jaune
H ₂ S	+	-

- Milieu Lysine-fer

	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Couleur du culot	jaune	noir + noir cassant

H₂S

9.3. Dégradation du tryphophane et de l'urée

a) Dégradation du tryphophane et de l'urée

- Milieu urée indole

	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Coloration du milieu avec le perchlorure de fer		
T.D.A.		
Coloration après addition du réactif de James ou Kovacks		
Indole		

- Eau peptonée

	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Couleur de l'anneau après addition du réactif de Kovacks	rouge	jaune
Indole	+	-

b) Dégradation de l'urée

- Milieu urée indole

	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Couleur du milieu urée indole	rose	jaune
Uréase	+	-

Conclusion sur le métabolisme de l'azote :

10. METABOLISME DES LIPIDES

10. 1. Mise en évidence de l'estérase

	Staphylococcus epidermidis	Pseudomonas	Serratia
Aspect du milieu de Sierra	milieu sans précipité	peu de précipité	très peu de précipité
Estérase	—	—	—

10. 2. Mise en évidence de la lipase :

	Staphylococcus epidermidis	Pseudomonas	Serratia
Aspect du milieu à la tributyrine	virage jaune au sur le milieu	virage de virage	pas de virage notable
Lipase	—	—	—

10. 3. Mise en évidence de la lécithinase

	Staphylococcus aureus	Staphylococcus epidermidis
Aspect des colonies sur milieu de Baird Parker	noir très dense et homogène autour	noir
Lipoprotéinase	+	—
Lécithinase	+	+

Conclusion sur le métabolisme de lipides :

milieu opaque autour puis précipité au milieu

TP n°4 : Identification bactérienne par la galerie d'API

TP n°4- séance 1

IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES ET DES ENTEROBACTERIES PAR GALERIES API (voir fiches)I

Ensemencer deux galeries API.

- une galerie API STAPH ou ID 32 STAPH avec une souche de staphylocoque (souche 1).

- une galerie API 20 E avec une souche d'entérobactérie (souche 2).

Exemple : comment on ensemence une galerie API

A - MATÉRIEL

☞ Galerie API 20 E (réf. 20 100) + boîte + couvercle, tableau de détermination.

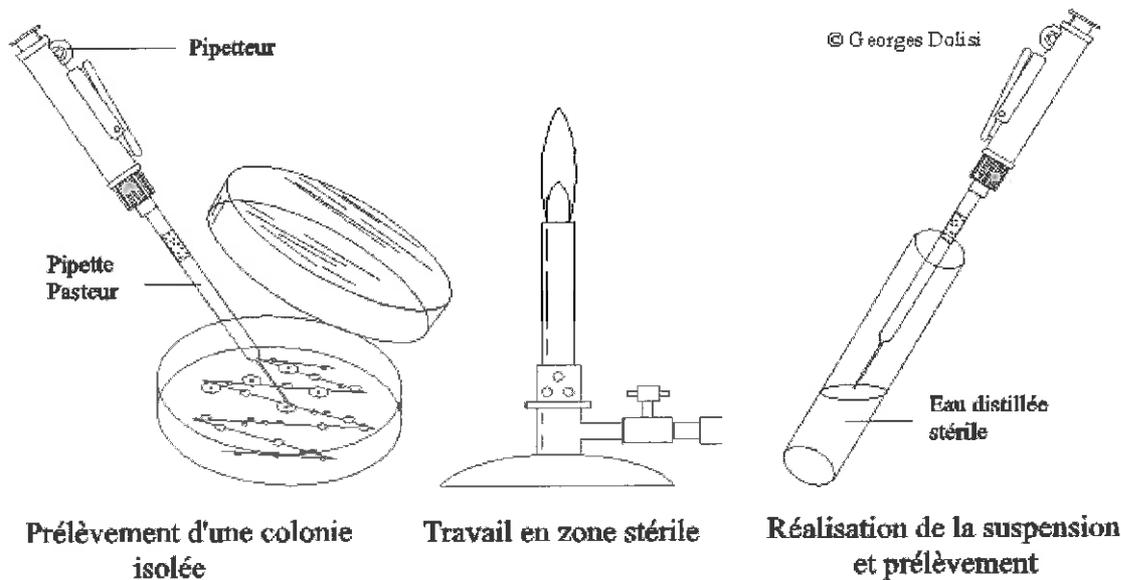
☞ Bec Bunsen, galerie avec un tube à vis stérile, marker, pipettes Pasteur, pipetteur, une pipette graduée 0 à 10 ml, huile de paraffine, eau distillée stérile (ou « Suspension Medium » 5 mL - Réf. bioMérieux 20 110).

B - PRÉPARATION DE LA GALERIE API

- o Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 mL d'eau dans les alvéoles (avec pipette graduée et pipetteur) pour créer une atmosphère humide.
- o Inscrire les références de la souche bactérienne sur la languette latérale de la boîte (+ date et initiales de l'opérateur).
- o Déposer la galerie dans la boîte d'incubation.

C - PRÉPARATION DE L' INOCULUM

ATTENTION : il faut préalablement avoir développé une bactérie en colonies isolées dans une boîte de Pétri.



1. Ouvrir une ampoule de « Suspension Medium » ou introduire quelques ml d'eau distillée stérile (avec une pipette Pasteur) dans un tube à vis stérile.
 2. Avec la pipette Pasteur, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé.
 3. Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.
- Vérifier la densité

D - INOCULATION DE LA GALERIE API 20 E

1. Avec la suspension bactérienne et la pipette ayant servi au prélèvement, **remplir tubes et cupules** des tests

CTI **VP** **GEL**

Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.

2. Créer une anaérobiose dans les tests ADH, LCD, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
3. Refermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 35 - 37° C pendant 18 à 24 heures.

* **Principe** : des particules de polymère monodispersées de 3 µm, enduites de façon covalente avec du fibrinogène humain purifié et des IgG agglutineront en présence de coagulase cellulaire et/ou de protéine A, produites par S. Aureus. Il y a fixation spécifique de la coagulase cellulaire au fibrinogène et de la protéine A au fragment Fc de l'immunoglobuline G.

Afin d'obtenir une fiabilité maximum, le kit Monostaph comprend un contrôle négatif contenant des particules monodispersées recouvertes d'albumine bovine.

3) **Recherche de l'ADNase** : Tester Staph. Aureus et Staph.epidermidis.

C'est une exoenzyme qui catalyse la réaction :



* **Principe** : Staphylococcus aureus hydrolyse l'ADN en 24 heures à 37°C. La présence ou l'absence d'ADN est mise en évidence par l'addition d'un réactif, le bleu de toluidine.

* **Technique** : faire une strie à la surface d'une gélose à l'ADN. Incuber à 37°C de 24 à 48 heures.

* **Lecture** : verser un peu de réactif sur la strie (bleu de toluidine).

-> le bleu de toluidine vire au rose en présence de nucléotides, mais reste bleu en présence d'ADN.

TP 4 : IDENTIFICATION BACTERIENNE PAR LA GALERIE D'API

Fiche de lecture et d'interprétation des résultats

NOM/Prénom :

Groupe :

TEST DE CONFIRMATION DE L'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

1. Coagulase libre

	Staphylococcus aureus	Staphylococcus epidermidis
Temps de coagulation du plasma de lapin		
Coagulase	+	-

2. Coagulase liée : "clumping factor"

	Staphylococcus aureus	Staphylococcus epidermidis
Aspect du mélange suspension de latex + suspension bactérienne	précipité	pas de précipité
Récepteur du fibrinogène ou protéine A	+	-

3. ADNase :

	Staphylococcus aureus	Staphylococcus epidermidis
Aspect de la gélose à l'ADN après addition de bleu de toluidine	rose autour de la colonie	violet
ADNase	+	-

**GALERIES EFFECTUEES SUR UN STAPHYLOCOQUE ET UNE
ENTEROBACTERIE**

Coller les bulletins d'interprétation sans oublier de mentionner les numéros d'identification des souches et les noms des espèces.

Mwahaha: www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/index.html

Control du TP : Identification des espèces bactériennes

Consignes

Généralités

L'identification porte sur une famille bactérienne, nommées F1. Pour cette famille, il y a **plusieurs espèces à identifier**

Les fichiers à utiliser sont disponibles dans la rubrique « TD Ident Bact S3 », dossier « Famille F1 »

Procédure :

1. Allez sur : « **e-campus/S3-BIOAP Micro-organismes/Document et liens/TD_Ident_Bact-S3/Famille F1** ». Imprimer la fiche d'identification des familles *FicheFamille.pdf*
2. Pour compléter cette fiche et identifier la famille et éventuellement le genre, **dérouler les diaporamas *FamilleF1.pps***
En cas de nécessité des liens peuvent être activés pour réviser certaines notions ou tests
Consulter si nécessaire les fiches techniques « composition et lecture des milieux de culture », accessibles grâce au lien présent sur la page d'accueil.
3. Allez sur : « **TD_Ident_Bact-S3/Document/ systématique bactérienne** », cliquez sur gram+ ou gram- pour afficher les arbres de détermination des familles et genres .Une fois la famille ou le genre identifié passez au test ci-dessous
4. Revenez au « **TD_Ident_Bact-S3/Famille F1** et lancer le test correspondant : *TestFamilleF1.htm* et répondez correctement aux questions pour connaître le mot de passe. Notez-le.
5. Utilisez le mot de passe pour ouvrir le document d'identification des espèces correspondant « **FicheEspècesF1.pdf** »
6. Imprimer ce document « galerie » en autant d'exemplaires que nécessaire et les remplir grâce aux diaporamas « *EspeciesF1.pps* » au « **TD_Ident_Bact-S3/Famille F1**.
Activer si nécessaire les liens pour accéder aux diaporamas d'aide à la lecture des galeries
Consulter si nécessaire les fiches techniques « composition et lecture des milieux de culture »
7. Utiliser le logiciel de calcul de probabilité pour l'identification : « Taxonomie » qui est dans rubrique « TD_Ident_Bact-S3/Documents/ Bactériologie Systématique/TaxonomieSaisissez vos résultats « + » et « - » . . Cliquez sur « lancez le calcul des probabilités »
Imprimer le résultat donné par le logiciel.

Documents à rendre en fin de séance

Regrouper dans une chemise portant votre nom et n° de groupe :

- *La fiche familles*
- *Les fiches galeries correspondant à chaque espèce*
- *Les identifications données par le logiciel*

Interprétez les résultats obtenus :

- *Expliquez le choix de l'espèce identifiée*
- *Fiabilité de la méthode*
- *Autres méthodes ou autres testes à envisager*

...

Une fiche synthèse bibliographique sur chaque famille : habitat, pouvoir pathogène ... (facultatif – bonus)

TP N° 2 - 2^{ème} séance : Lecture

NOM/Prénom : ..MONSAVOIR Alexia
Groupe :1.....

6 - - MISE EN EVIDENCE DU TYPE RESPIRATOIRE

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
Zone de développement	Dans tout le tube	En surface	Dans tout le tube
Type respiratoire	Aéro-anaérobie facultative	Aérobie stricte	Aéro-anaérobie facultative

7 - RECHERCHE DES ENZYMES RESPIRATOIRES (après incubation)

a) Recherche de l'oxydase : présence du cytochrome C

Sur une plaque contenant quatre supports imprégnés de réactif oxalate de N dimethyl paraphénylène diamine, déposer et étaler à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, un fragment de colonie.

Coloration violet foncé : Oxydase +

Pas de coloration ou coloration rose ou mauve : Oxydase -

(Ne pas utiliser l'anse Pasteur)

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
Observation après dépôt d'une colonie sur la plaque	Pas de coloration	Violet foncé	Pas de coloration
Résultat de l'oxydase	oxydase -	oxydase +	oxydase -

b) Recherche de la catalase

Catalase : Déposer une goutte d'H₂O₂ à 10 volumes sur une colonie.

Dégagement de gaz : Catalase +

Pas de bulles de gaz : Catalase -

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
Observation après dépôt d'une goutte d'H ₂ O ₂ sur une colonie	dégagement de gaz	dégagement de gaz	dégagement de gaz
Résultat de la catalase	catalase +	catalase +	catalase +

c) Recherche de la nitrate réductase :

- Ajouter dans le milieu une goutte de réactif 1 et une goutte de réactif 2.

Ces deux réactifs constituent le réactif de Griess.

1 : Acide parasulfanylique en milieu acétique.

2 : α naphtylamine en milieu acétique.

Ce réactif donne une coloration rose en présence de nitrites.

- Si coloration rose : présence de nitrites dans le milieu donc
 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ nitrate réductase +.

- Si pas de coloration rose : absence de nitrites, recherche des nitrates par addition de poudre de zinc. (Réducteur)
 $\text{NO}_3^- + \text{Zn} \rightarrow \text{NO}_2^-$

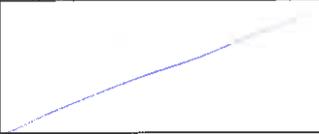
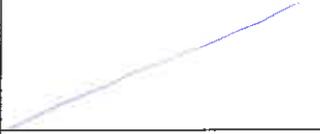
- Si la coloration rose apparaît par action de la poudre de Zn, le milieu après incubation contenait toujours des nitrates.
 NO_3^- Nitrate réductase -

- Si la coloration rose n'apparaît pas par action de la poudre de Zn, le milieu, après incubation ne contenait ni nitrates, ni nitrites. Ceux-ci ont été réduits en ammoniac ou azote.

$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$ ou N_2

Nitrate réductase +

Nitrate réductase

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
Observation après ajout du réactif de Griess	Rose	Vert	Rose soutenu
Observation après ajout		Pas de rose	
Résultat de la Nitrate réductase	Nitrate réductase+	Nitrate réductase+	Nitrate réductase+

Conclusion : Les trois souches peuvent être anaérobies oxydatives puisqu'elles respirent le nitrate

Pour chacune de ces trois souches, précisez les voies utilisées pour produire de l'énergie en aérobie et en anaérobie, sur milieu non nitraté et sur milieu nitraté.

= *E. coli* : a) L'expérience du cytochrome c donne un résultat négatif : nous ne pouvons pas conclure quant à la respiration.
 b) Le résultat positif de la catalase témoigne du fait que la bactérie peut vivre en aérobie.
 c) La présence de la nitrate réductase traduit une respiration du nitrate.

- *Pseudomonas* : a) La présence révélée du cytochrome c témoigne du fait que la bactérie respire.

b) }
 c) } comme *E. coli*

= *Staphylococcus* : a) L'expérience du cytochrome c donne un résultat négatif : nous ne pouvons pas conclure quant à la respiration.

b) }
 c) } comme *E. coli*

8. METABOLISME DU CARBONE

8.1. Test Fermentaire ou Oxydatif : milieu de Hugh et Leifson

	E.coli	Staphylocoque sur milieu MEVAG	Bacillus	Pseudomonas
Aspect des cultures sur milieu de Hugh et Leifson	Jaune	Jaune	Vert	Jaune en haut du tube "O ₂ "
Type métabolique	Fermentaire mixte	Fermentaire mixte	Inerte	Oxydative (besoin de pour dégrader le glucose)

8.2 – Fermentation les différents sucres : Maltose et Lactose

a) Maltose: eau peptonée au rouge de phénol avec cloche

	Maltose		Fructose	
	Milieu	Résultat	Milieu	Résultat
E.coli	Présence de gaz Couleur jaune	Fermentat° + CO ₂ + H ₂	Gaz jaune	Fermenta CO ₂ H ₂
Proteus vulgaris	Présence de peu de gaz Couleur jaune	Fermentat° + CO ₂ + H ₂	Pro. de gaz orange	Respirato

b) Maltose: milieu de Kligler -- Recherche l'enzyme (β galactosidase)

	Aspect du milieu de Kligler	Utilisation du lactose et du glucose	Test à l'ONPG (β galactosidase)	
E.coli	Gel fragmenté par le gaz	Lac + Glu +	Jaune (+)	
Proteus vulgaris	Gaz au colot	Lac - Glu -	Incolore (-)	

8.3. Mise en évidence de la fermentation mixte : milieu de Clark et Lubs

a) Test au rouge de méthyle : voie acide mixte.

	Couleur du mélange milieu CL + rouge de méthyle	Test RM
E.coli	Rouge soutenu	RM +
Entérobacter aérogènes	Rouge orange	RM -

b) Test de Voges Proskauer : voie butylène glycolique.

	Couleur du mélange milieu CL + réactifs VP ₁ et VP ₂	Test de Voges Proskauer
E.coli	Pas de modification	VP -
Entérobacter aérogènes	Coloration rouge	VP +

8.4 Mise en évidence de l'utilisation une source de carbone autre que glucose : milieu du Simmons

	Développement	Couleur de la tranche	Utilisation du citrate de sodium
E.coli	-	Vert	non
Salmonella arizonae	+ +	Bleu	oui

Conclusion :

Métabolisme du carbone pour les souches testées ?

E. coli est fermentaire mixte. Elle dégrade le maltose et le Fructose (par Fermentation) et aussi le lactose et le glucose. Elle utilise la voie des acides mixtes mais pas celle des butylène glycolique. Elle n'utilise pas le citrate de sodium.

Proteus vulgaris dégrade le maltose (fermentation) et le Fructose (respiration), mais ni le lactose ni le glucose.

Enterobacter aerogenes = utilise la voie butylène glycolique et pas celle des acides mixtes.
Salmonella arizonae : utilise le citrate de sodium

Staphylococcus utilise la voie fermentaire mixte

Bacillus est inerte en milieu de Hugh et Leifson

Pseudomonas : utilise l' O_2 pour dégrader le glucose.

Ecologie, écosystèmes microbiens

Nous étudierons - Flux d'énergie et de matière (réseaux trophiques)
- les grands cycles biogéochimiques
- Evolution des écosystèmes.

Dans un écosystème en état de marche, il y a :

- un flux d'énergie
- une circulation cyclique des éléments nutritifs : recyclage de la matière
- des interrelations entre les organismes

FLUX D'ENERGIE

Les organismes dépendent de $\begin{cases} \text{énergie} \\ \text{eau} \\ \text{minéraux.} \end{cases}$

La circulation de l'énergie est régie par la thermodynamique :

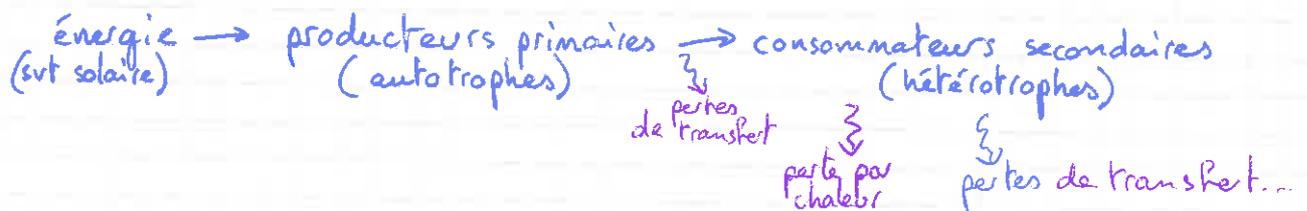
loi 1 : l'énergie ne peut être créée ni détruite, elle ne peut qu'être transformée d'une forme à une autre.

loi 2 : l'énergie est dégradée (entropie)

Transfert : algue au plancton, coquerre à buse...

Energie entrante = énergie sortante.

Donc, dans l'écosystème :



Notions de rendement :

Production $\begin{cases} \text{primaire brute} \\ \text{nette} \\ \text{secondaire} \end{cases}$

+ autres, cf diapo

Le premier transfert: de l'énergie solaire au sol.

pertes = 32% en réflexion
13% de réchauffement atmosphérique
5% de stratosphère
reste = 50% au sol

Le second transfert: vers la plante
sur les 50%

pertes = 47 à 49% dépensés dans la photosynthèse
reste = 1 à 3% de l'énergie solaire (production primaire brute)
dont 70 à 90% sont respirés

⇒ Sur l'énergie solaire, 0,1 à 0,5% sont transformés en matière végétale utilisable par un herbivore (production primaire nette)

1% de l'énergie absorbée par la chlorophylle est utilisée pour mal être

Bilan

Production primaire brute \leftarrow Respi: végétale
Tissus végétaux (prod. primaire nette)

prod. primaire brute =
prod. primaire nette = taux de conversion de l'énergie solaire en énergie chimique
(en g de poids sec / m² / an ou en Joules / m² / an)

Le phosphore est un facteur limitant de la chlorophylle. T° optimale de photosynthèse
Plus il y a d'eau, mieux sera la PS. $\rightarrow 30^{\circ}\text{C}$

Il y a aussi une intensité lumineuse optimale

RESEAUX TROPHIQUES

Charles Elton, écologiste de 1921, anglais

exemple intéressant: producteurs primaire → le Niébé, une légumineuse
consom. primaire → *Callosobruchus maculatus*, phytophage
secondaire →
tertiaire →

Chaîne détritique qui recycle l'eau, les nutriments, le CO_2

détritivores: ingèrent la M.O. morte, laissée par les producteurs ou les consommateurs
(saprophages, nécrophages, coprophages...)
décomposeurs: transforment la M.O. en matière minérale.
(champignons, protozoaires, bactéries).

10/01/22 Efficacité énergétique

Le rapport de la production nette entre deux espèces de la chaîne est de 10%.

Du coup, la chaîne ne peut s'éterniser.
≈ 5/6 maillons maximum.

Bilan

Les flux d'énergie et de matière sont liés.
Ils peuvent être représentés par:

- des pyramides des nombres
- des pyramides de biomasse (ex. g/m^2)
la pyramide, dans de rares cas, peut être inversée:
sur 15j. on peut avoir une proportion de 21 zooplancton
pour 1 le phytoplancton.
- des pyramides d'énergie (ex. cal/m^2)

Problématique des végétariens.

- Les consommateurs de viande (consom. secondaires) ont indirectement besoin de 10x plus de ressources végétales à cause de la perte de 10% des consom. primaire.

Le rendement écologique est globale^{nt} faible ($\frac{\text{prod. primaire nette}}{\text{prod. secondaire nette}}$)

Pyramides de bioaccumulation

Des polluants (datant des années 70) dans l'environ^{nt}
sont SUPER transférés et s'accumulent. (→ pyramide inversée)

Un poisson dans une eau polluée ^{concentre} rassemble rapid^{nt} 300 à 400 fois plus de polluants que la concentration de l'eau.

exemple du DDT, dichlorodiphényltrichloroéthane
du zooplancton au balbuzera

exemple des PCB, polychlorobiphényles
du phytoplancton à la truite

Nowadays on fait gaffe à la bioaccumulation.

LES GRANDS CYCLES BIOGEOCHIMIQUES

- Ils sont planétaires
- Les ressources sont finies et circulent (souvent en continu)

CARBONE : Forme inorganique (à peu près omniprésente) : CO_2 atmosphérique, carbonates de l'eau et du sol, sédimentaire.)
Forme organique puis fossile (charbon, pétrole...)

Le carbone ne peut entrer en forme organique que via la photosynthèse.

Le recyclage de l'organique en minéral se fait par érosion et combustion.

Eau : substance chimique la + mobile
• grand régulateur climatique
• nécessaire à la vie

C'est sa saponification et diapo

Les fonctions essentielles de l'eau

D'un point de vue socio-économique :

Besoins en eau $\left\{ \begin{array}{l} \rightarrow 69\% \text{ agricole} \\ \rightarrow 23\% \text{ industrie} \\ \rightarrow 6\% \text{ domestique} \end{array} \right.$

ppm \rightarrow mg/L

on estime des besoins multipliés par 1,5 pour 2025

Briève histoire de l'effet de serre.

OXYGENE • surtout produit avec la photosynthèse et (action UV sur H_2O ,
• consommé avec la respi
→ cycle court

→ Difficultés ds le syst. aquatique
• pollution pétrolière: couche imperméable entre atm et eau.
→ destruction de la couche d'ozon.

AZOTE • dans les acides nucléiques (azy, protéines...)
• les êtres vivants la récupèrent surtout par minéraux.
* diapoooo *

PHOSPHORE • les importants réservoirs de phosphore sont ds le sol
• Certains pays en ont bcp et exportent phosphore et potasse

SOUFFRE • cycle basé sur un réservoir dans le ss - sol (souffre ds les roches)
• souffre ds l'atm par volcanisme (événement)
• H_2S est léger et peut se retrouver ds l'air (marécages)
→ la souffre est un composant majeur des pluies acides
• souffre ds l'atm par activité anthropique
→ la pollution par le soufre est majoritairement atmosphérique.

On pourrait + ou - étudier d'autres cycles

Bilan: source ou puits?

puits: stocke, séquestre durablement l'élément. → stockage pas trop libération
→ le réservoir augmente
ex: jeune forêt → puits de carbone.

source: met à disposition l'élément, est à l'origine du cycle chimique de l'élément.
→ le réservoir diminue.
ex: la végétation est source de carbone, dans la prod animale.

Je trouve que les propos du prof sont biden.
Tout est puits, tout est source dans l'absolu, puisque la vie est cycle.
Si on veut définir puits ou source, il faut se placer sur une portion du cycle, ou sur un intervalle temps.

L'écosystème est en constante évolution, avec :

le temps

l'action des organismes qui transforment le milieu
↳ s'adaptent
↳ évoluent

* Différents niveaux de dynamique selon l'échelle temps

année → périodicité des conditions climatiques
↳ cycle biologique des espèces

années → rythmicités dans le d'ulp d'espèces (ex: el Niño)

décennie à siècle → successions écologiques : changement de la composition spécifique et des communautés en un point

* Successions ou séries écologiques

successions → progressives, tendant vers le climax
↳ régressives, qui s'en éloignent (dégradations, perturbations)

↳ progressive primaire → à partir de roches nues

↳ progressive secondaire → reconstitution de la végétation après une destruction (post régression)

↳ régressive → retour à un stade moins mature par dégradation secondaire (incendie...) ou progressive (surpâturage...)

(diapos exemples) Tout est sur les diapos...

Dans le vieillissement d'un écosystème, la biomasse totale des biocénoses augmente jusqu'au maximum du climax, et la prod. nette augmente pelt les stades juvéniles et diminuent à la maturité.

- les pertes énergétiques tendent à diminuer à l'approche du climax.
- le recyclage des minéraux est de + en + efficace.
- la diversité spécifique atteint son optimum au climax.
- Les réseaux trophiques du stade climax sont très complexes.

Dans un aquarium, la dernière pop. à se mettre en place est celle des bactéries détritivores.