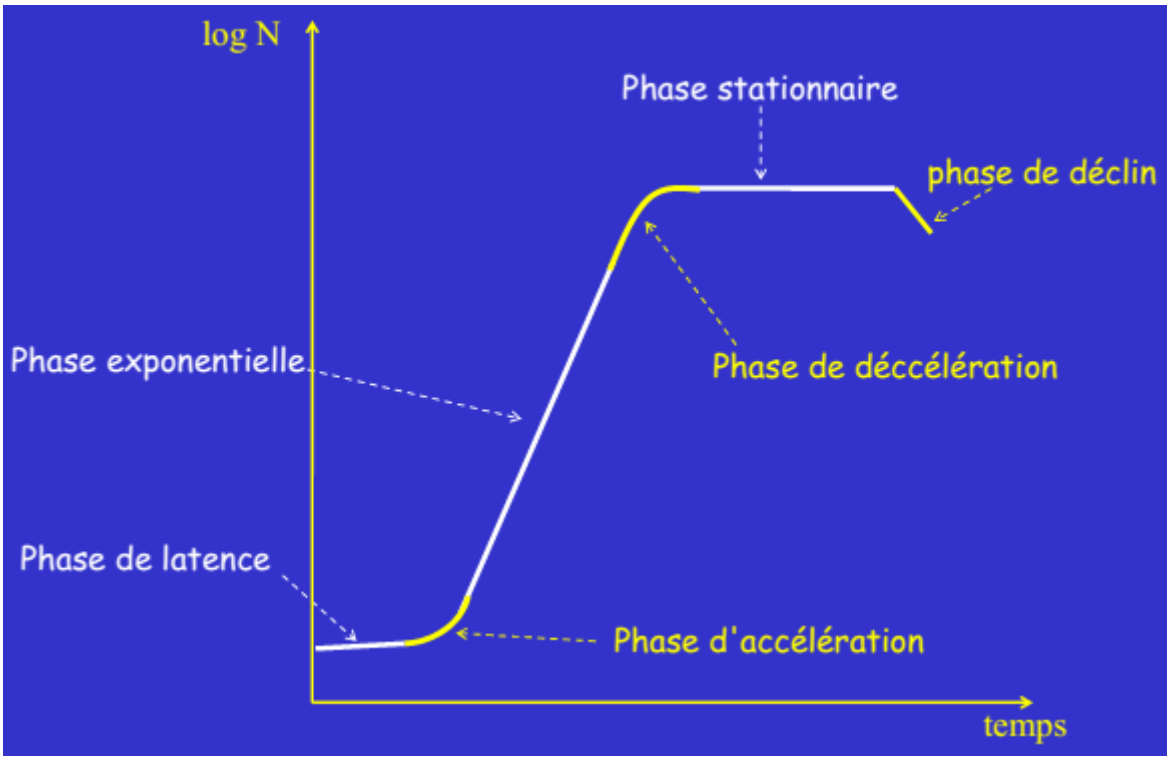
Travaux dirigés SV3

« Module de Microbiologie Générale »

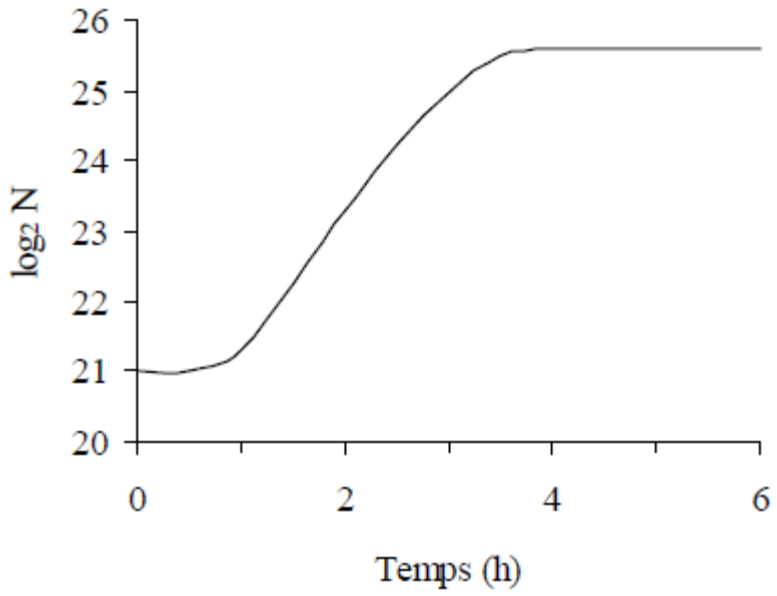


A- CROISSANCE BACTERIENNE

Exercice 1 :

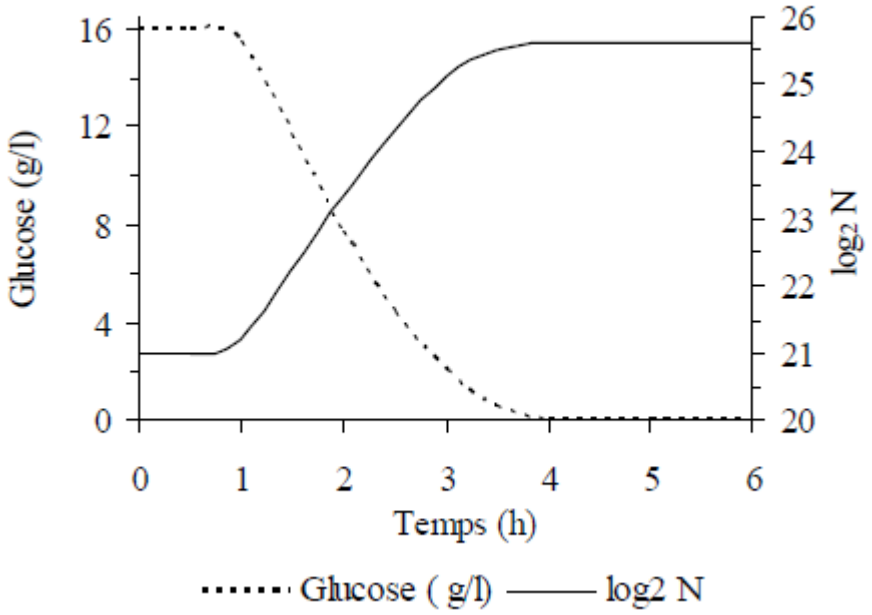
I) Une souche de *Pseudomonas* isolée à partir du sol est capable de se développer sur le milieu suivant:
Glucose: 16g/l ; (NH4)2 SO4: 1g/l ; K2HPO4: 7g/l ; KH2PO4: 3g/l ; MgSO4,7H2O: 0,1g/l .
Pour étudier la croissance bactérienne de cette souche, ce milieu a été ensemencé à partir d'une culture de 24 h de cette souche sur gélose nutritive puis incubé dans les conditions optimales de température et de pH. L'évolution du nombre de bactéries en fonction du temps est schématisée sur la figure 1.

Figure 1



1) Délimiter sur le graphe ci-dessus les différentes phases de croissance; interprétez et qualifiez chacune d'elles.
2) Déterminez la valeur numérique de trois paramètres nécessaires et suffisants pour caractériser cette croissance.
3) D'après les conditions expérimentales, de quoi dépend la 1ère phase de la courbe ?
4) Expliquez la troisième phase de la courbe à partir de la corrélation entre la croissance bactérienne et la consommation du glucose (figure 2).

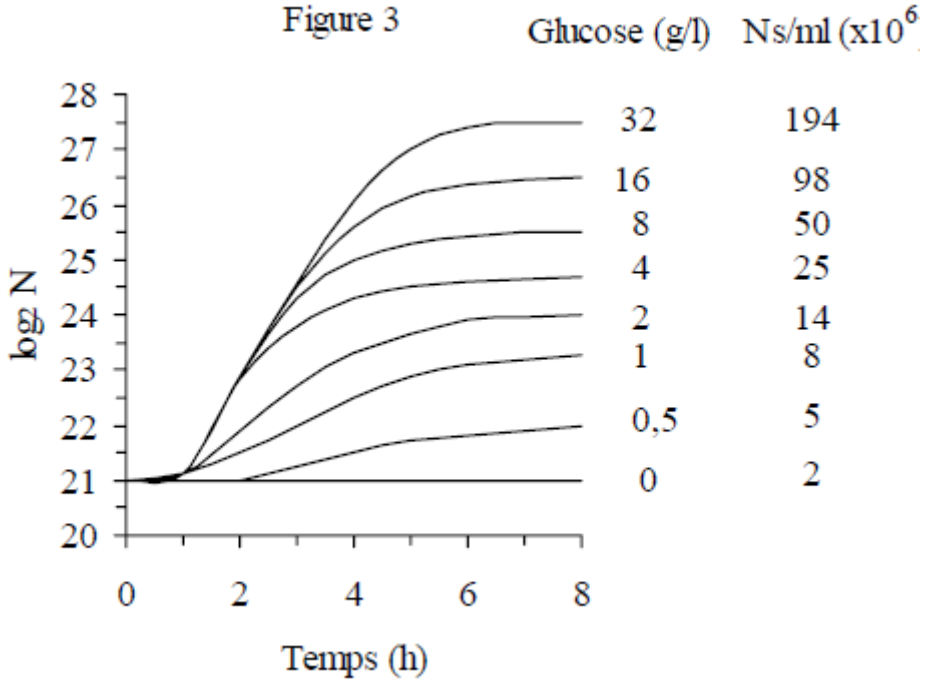
Figure 2



II) On répète la même expérience de croissance avec la même souche et sur le même milieu de culture, mais en présence de différentes concentrations de glucose.

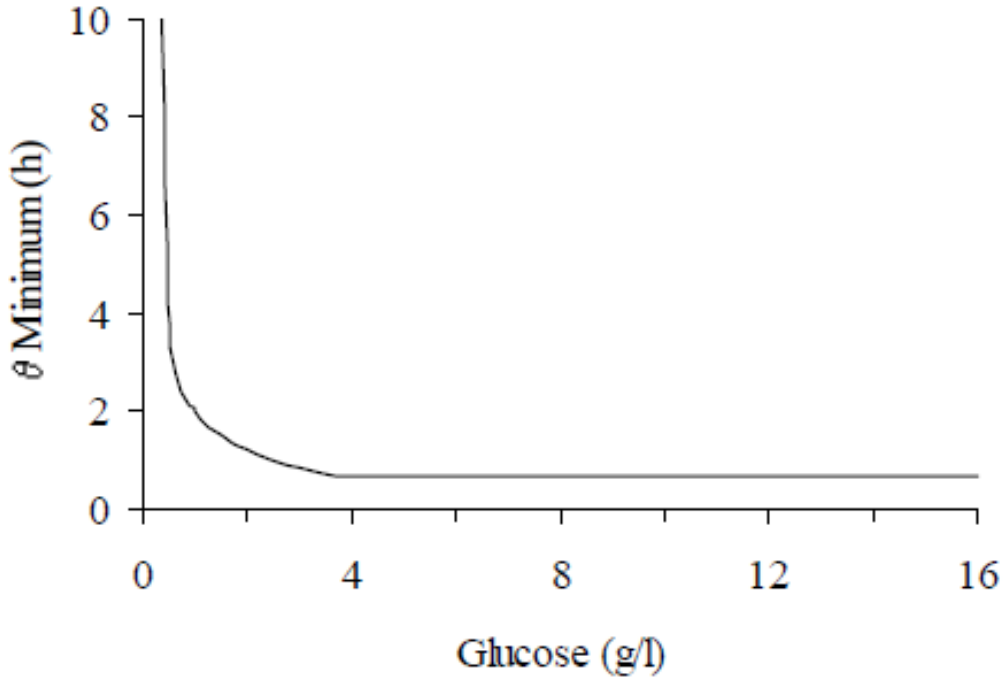
Les différentes courbes de croissance sont représentées sur le même graphe dans la figure 3.

Figure 3



1) Comparer la croissance totale (Ns - No) et le taux de croissance μ max pour les concentrations 32 , 4 et 0,5 mg/ml.
A partir des mêmes données expérimentales, on trace une courbe donnant la variation du temps de génération θ minimum en fonction de la concentration initiale en glucose dans le milieu (figure 4).

Figure 4



2) Quelle est la relation entre μ max et θ min ?
3) Pour quelle valeur ‘‘seuil’’ le glucose est considéré comme facteur limitant ?
III) La souche est cultivée sur milieu synthétique contenant une source d’azote minérale, des sels minéraux et le glucose à faible concentration. On mesure la densité optique à intervalles de temps réguliers.
1) Au temps 12 h, on ajoute du glucose et on poursuit les mesures. On obtient la courbe de croissance ci-dessous (figure 5a). Interprétez les résultats obtenus.
2) Quelle serait l'allure de la courbe (complétez la figure 5b) si au temps 12 h on avait ajouté du lactose à la place du glucose, sachant que la souche est capable d’utiliser le lactose ?

Figure 5a

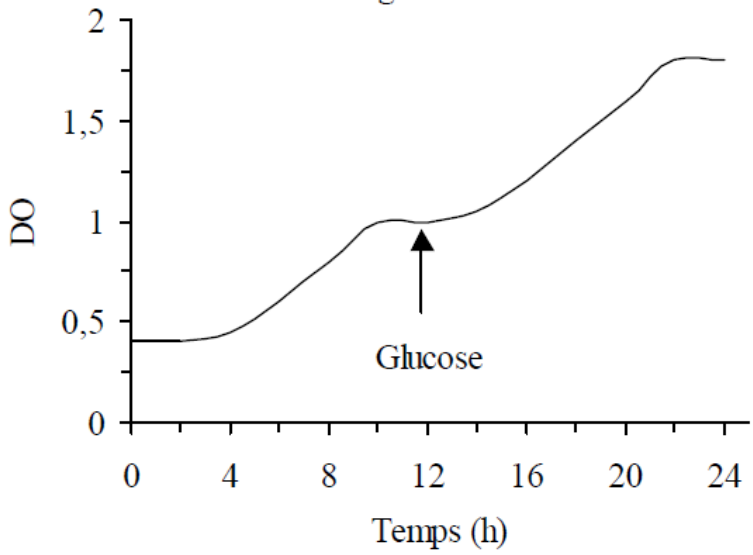
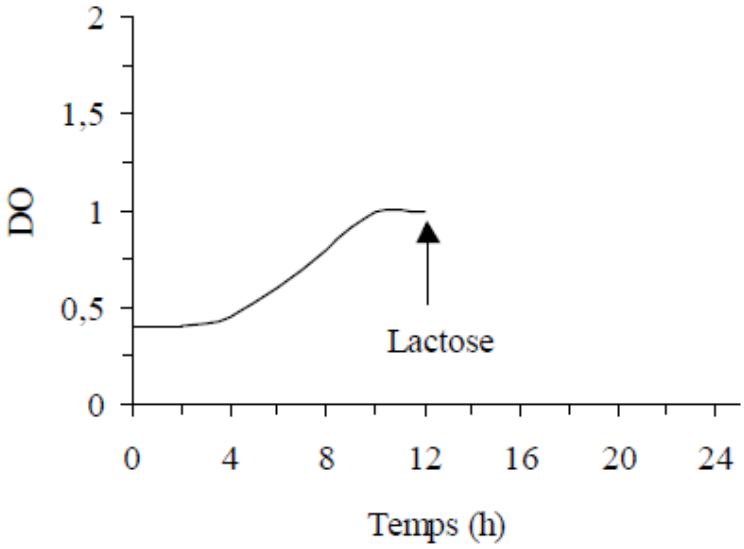


Figure 5b



Exercice 2 :

On veut déterminer le nombre de bactéries vivantes dans l'urine d'un malade atteint d'une infection bactérienne et suivant un traitement antibiotique. Les dénombrements avant le traitement ont montré que l'urine du patient contient une concentration de 10^6cellules bactériennes vivantes par ml d'urine. Après un jour de traitement au Bactrim (trimethoprim + sulphamethoxazol), le pharmacien biologiste dépose un volume de 0,01 ml à la surface d'une cellule de Thoma. Après 30 minutes de repos permettant la décantation des cellules, la lame est examinée au microscope, au fort grossissement.

Calculer la concentration des cellules par ml dans cette urine sachant qu'on a compté 350 cellules dans 10 petits carrés dans une solution 10 fois plus concentrée de l'urine originale.

Après coloration au bleu de méthylène, le pourcentage de cellules bleues était de 80 %. Quel est la signification de ce résultat pour le comptage des cellules ?

Quel est la signification de ce résultat pour le malade ? Le traitement est-il efficace ?

Rappel : La cellule de Thoma est une lame creuse au centre avec un quadrillage d'environ 400 petits carrés. Chaque petit carré a une surface de 1/400 mm^2. La distance entre la grille et la lamelle est de 1/10 mm.

Exercice 3

L'analyse bactériologique d'une urine infectée donne le tableau de résultats suivant, sachant que l'on a ensemencé 0,1 ml de chaque dilution par boite de milieu de culture.

Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Essai 1	inc	490	95	2
Essai 2	inc	501	110	0
Essai 3	inc	520	120	5

inc : incomptable

a) Définissez une colonie.

b) Quelle dilution doit-on utiliser pour réaliser le dénombrement ?

c) Déterminez le nombre de bactéries par ml d'urine.

d) Le dénombrement bactérien sur le même échantillon d'urine, par la méthode directe au microscope optique, a donné 15.10^5 bactéries /ml, comparer les deux résultats et interpréter.

Le dénombrement des bactéries ammonifiantes dans des suspensions de trois sols différents a été réalisé par la méthode du MPN.

A partir de chaque sol une suspension de 1g de sol broyé dans 10 ml d'eau physiologique stérile a été préparée. Des séries de dilutions de 10^{-2} à 10^{-7} ont été préparées dans l'eau physiologique à partir de chaque suspension de sol. Ensuite, 1 ml de chaque dilution préparée (10^{-1} à 10^{-7}) a été ensemencé dans un milieu de culture spécifique, à raison de trois répétitions pour chaque dilution. Après incubation à 28°c pendant 15 jours, les tubes positifs sont détectés par une coloration orange, après addition du réactif de Nessler. Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous :

Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Sol 1	+++	+++	+++	+++	++-	+--	---
Sol 2	+++	+++	++-	---	---	---	---
Sol 3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

1) Calculez pour chaque type de sol, le nombre de germes par gramme de sol.

2) quel serait le résultat si le volume ensemencé était de 0,1 ml.

Tableau de Mc Crady (3 tubes par dilution)

Nombre caracté-ristique	MPN	Nombre caracté-ristique	MPN	Nombre caracté-ristique	MPN
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,5	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		

Exercice 4

Vous étudiez l'effet protecteur de la microflore intestinale de l'homme contre l'invasion par des contaminants pathogènes d'origine alimentaire. Vous infectez des rats avec un micro-organisme pathogène X. Vous mesurez le taux de croissance de ce micro-organisme. Un autre groupe de rats est traité avec des antibiotiques pour détruire leur microflore normale puis vous les infectez avec le même pathogène. Les résultats du dénombrement bactérien sont les suivants :

	Rats non traités aux antibiotiques	Rats traités avec l'antibiotique.
- Quantité introduite au départ	10^4 cells/ml	10^4 cells/ml
- Nombre de bactéries dénombrées près 8h d'incubations	6×10^6 cells/ml	3×10^8 cells/ml

a. On assume que les cellules sont en phase exponentielle. Calculer le temps de génération de la bactérie X chez les 2 lots de rat (traités et non traités à l'antibiotique).

b. Donner les voies possibles d'inhibition de la croissance de la bactérie X dans l'intestin ?

B- Le Métabolisme microbien

I- Faire correspondre les formes suivantes du métabolisme du soufre avec la bonne équation (écrire une lettre appropriée dans l'espace):

respiration du soufre A. $S + H_2 \text{---> } H_2S$

oxydation du soufre B. SO_4 + organiques ---> CO2 + H2 S

réduction du soufre C. $CO_2 + 2H_2S \text{-----> } (CH_2O)n + 2S + H_2O$

II- Comment pouvez-vous classer les organismes suivants:

a. Le micro-organisme # 1 ne peut pas utiliser l'oxygène dans son métabolisme, mais produit la peroxydase et SOD (SOD est une enzyme pour éliminer superoxide, une forme d'oxygène toxique. Il peut utiliser le CO2 comme source de carbone mais ne peut pas obtenir de l'énergie de la lumière.

b. Le micro-organisme # 2 requiert une forte concentration en sel, réalise la photosynthèse, et peut pousser sur un milieu minimal avec du glucose, mais pas un milieu minimal sans sucre.

II- Ecrire une réaction d'oxydoréduction équilibrée pour les donneurs et les accepteurs d'électrons suivantes. Pour chaque réaction, identifier les éléments d'oxydoréduction et indiquer quel élément est oxydé et qui est réduit.

Electron donor	Electron acceptor
a. glucose/CO_2	O_2/H_2O
b. glucose/CO_2	NO_3^-/N_2
c. CH_3OH/CO_2	SO_4^{2-}/H_2S
d. S/H_2SO_4	O_2/H_2O

III- Décrire ce qui se passerait si vous avez pris une cellule d'une bactérie halophile extrême *Halobacterium salinarum* de son milieu de croissance (contenant 25% de NaCl) et vous l'avez placé dans l'eau distillée. Chez Halobacterium, la concentration intracellulaire en sel est normalement la même que l'autre cote de la membrane. En outre, prévoir ce que *Escherichia coli*, une non halophile typique, si vous feriez l'expérience inverse (eau distillée à 25% de NaCl).

IV-Vous étudiez une communauté bactérienne des sédiments d'une zone marécageuse dans une forêt locale préservée. Vous avez isolé trois types différents de bactéries et acquis des informations sur chacun d'eux. Voici ce que vous savez à ce jour:
Le micro-organisme A peut se développer sur un milieu minimum sans source de carbone, mais seulement s'il y a de la lumière. Il peut être trouvé depuis la surface et jusqu' à 2m en profondeur dans les sédiments.
Le micro-organisme B se trouve de 1 à 4 m de profondeur dans les sédiments, mais jamais à la surface.
Les micro-organismes A et B peuvent être trouvées ensemble à une même profondeur. Ils peuvent être cultivés en laboratoire si on leur fournie à la fois une source de carbone organique et de fortes concentrations de MgSO4 ou K2SO4.
Le micro-organisme C peut être trouvé dans toutes les profondeurs des sédiments. Il peut croître dans un milieu minimal supplémenté avec une source de carbone organique comme le glucose. Les cultures ont une odeur assez fétide parce que les bactéries produisent de l'acide butyrique.

1. Comment classeriez-vous le micro-organisme B en fonction de ses besoins en oxygène ?
2. Pourquoi le micro-organisme B nécessite le MgSO4 ou K2SO4 dans son milieu de croissance ? Soyez aussi précis que possible sur la façon dont ces molécules sont utilisées dans son métabolisme.
3. Pourquoi le micro-organisme A pousse sans source de carbone dans le milieu ? Soyez aussi précis que possible sur le genre de processus métabolique qu'il utilise.
4. De quelle façon le micro-organisme A dépend du micro-organisme B ?
5. Quel type de métabolisme énergétique pensez-vous le micro-organisme C utilise ? Pourquoi ?
6. Comment le micro-organisme C pourrait bénéficier l'un ou l'autre ou des deux autres organismes dans la communauté ?
7. Pourquoi le glucose est-il considéré comme le nutriment combustible privilégié pour les cellules, y compris les cellules microbiennes ?
8. Expliquez dans vos propres mots le rôle de l'ATP. Pourquoi l'ATP est-elle un intermédiaire clé du métabolisme ?
9. La voie des pentoses phosphates produit seulement une molécule d'ATP. Nommez deux avantages de cette voie pour la cellule
10. Nommez quatre composés qui peuvent être produits à partir de l'acide pyruvique par les organismes qui utilisent seulement la fermentation

C-GÉNÉTIQUE BACTÉRIENNE

Soit une culture d'E.coli, sensible à la streptomycine, dont la dilution 10-7, étalée à raison de 0,1 ml sur un milieu gélosé en boîte de Pétri, donne aprèsincubation, 10 colonies.

1) 0,1 ml de cette culture est étalé sur un milieu gélosé additionné d'un antibiotique, la streptomycine,à une dose supérieure à la CMI. Après incubation, la boîte de Pétri montre 4 colonies.

Quel est le taux de mutation des résistants à la streptomycine?

2) La culture initiale est traitée par un agent mutagène, la nitrosoguanidine, puis étalée comme précédemment à raison de 0,1 ml sur le même milieu gélosé à la streptomycine (GN + Stp). Après incubation, la boîte de Pétri montre 40 colonies.

Calculez le taux de mutation (Tm2) des résistants. Comparez cette valeur à celle trouvée précédemment et conclure.