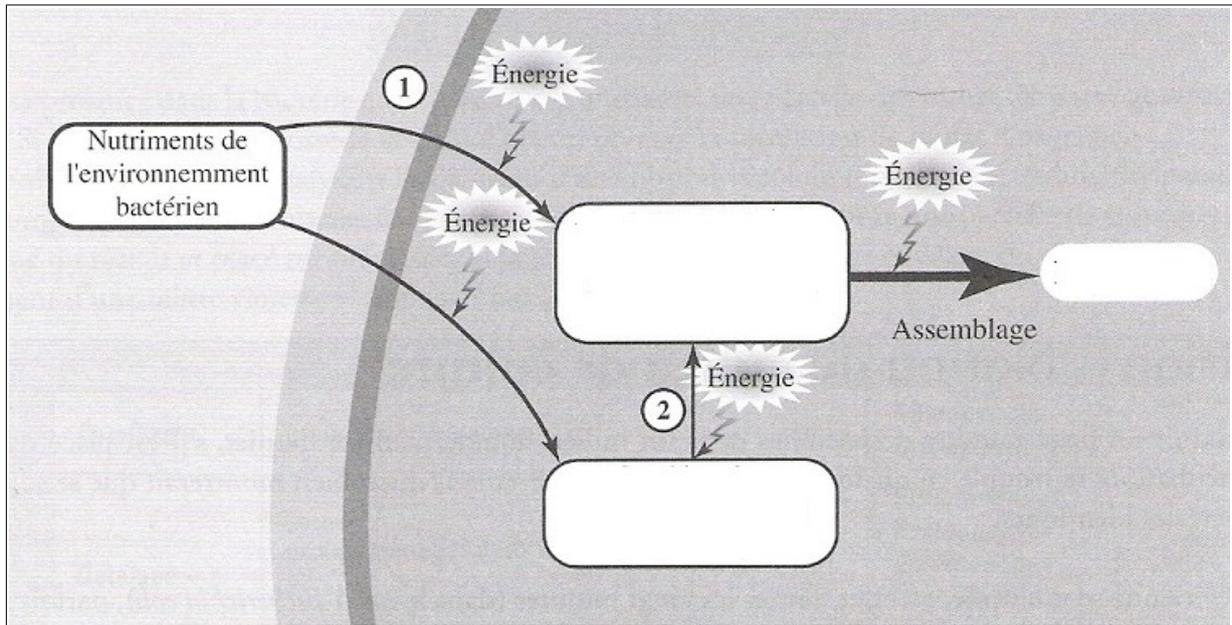


BESOINS NUTRITIONNELS DES MICROORGANISMES

Document n°1 : utilisation des nutriments par les microorganismes



.....
.....
.....

Si une brique élémentaire (acide aminé, ose, base azotée ...) est naturellement présente a l'état préformé dans le milieu, elle sera en général assimilée et utilisée directement et réprimera la voie de sa biosynthèse (②) =
.....

1. SOURCE D'ÉNERGIE

.....
.....

Les micro-organismes peuvent être **classés en fonction de la source d'énergie** qu'ils utilisent :

2. BESOINS ÉLÉMENTAIRES NÉCESSAIRES À LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES

Document n°2 : composition chimique d'une bactérie : *Escherichia coli*

Constituants	% du poids sec	Nombre de molécules par cellule	Nombre de molécules différentes
Protéines	55	$2,36 \cdot 10^6$	1 050
ARN	20,5	$6,4 \cdot 10^4$	463
Brin d'ADN	3,1	2	1
Lipides	9,1	$2,2 \cdot 10^7$	4 (nombreuses variétés)
Lipopolyosides	3,4	$1,2 \cdot 10^6$	1
Peptidoglycane	2,5	1	1
Glycogène	2,5	4 300	1
TOTAL Polymères Organiques	96,1		
Substances organiques solubles = « pool » cytoplasmique	2,9	$3 \cdot 10^8$	900
Ions minéraux	1,0	$2 \cdot 10^8$	20

Document n°3 : composition élémentaire d'une cellule bactérienne

Éléments	Pourcentage du poids de matière riche
C	50
H	20
O	14
N	8
P	3
S	1
Na	1
K	1
Ca	0,5
Mg	0,5
Fe	0,2
Cu, Zn, Mo, Bo, Se, Cl, Ni, Cr, Co, Wo	0,2

Parmi les éléments indispensables à la croissances des micro-organismes, on distingue :

- _____ :
-
-

- _____ :
-
-
-

- Source du soufre (S) :

.....

.....

.....

.....

.....

.....

- Source du phosphore (P) :

.....

.....

.....

.....

- Éléments minéraux :

.....

Document n°5 : importance biologique de quelques cations (macronutriments)

Éléments	Fonction
Potassium (K ⁺)	
Sodium (Na ⁺)	
Magnésium (Mg ²⁺)	
Fer (Fe ²⁺)	

2.1.2. COUVERTURE DES BESOINS EN MICRONUTRIMENTS

.....

Les **besoins en oligo-éléments étant infimes**, il est souvent inutile d'en ajouter dans les milieux de culture, car présents en quantité suffisante à l'état d'impuretés (dans l'eau, adhérents au verre, autres produits, etc...).

2.2. SOURCES DE CARBONE

La masse sèche d'une cellule contient 50 % de carbone en moyenne, et le **carbone est l'élément majeur** de toutes les macromolécules.

Selon la source de carbone on distingue les bactéries :

– _____ :

.....

– _____ :

.....

Une **grande majorité des bactéries est hétérotrophe**. Selon l'espèce bactérienne considérée, les substrats carbonés peuvent être très variés : CH₄, alcoolse, acide acétique, acides aminés, glucides, acides gras, bases azotées, substances organiques de synthèse... Une variété intéressante dans les processus de dépollutions biologiques.

Les **chimolithotrophes** et la **plupart des bactéries phototrophes** sont **autotrophes**.

Document n°6 : tableau récapitulatif des différents types trophiques des micro-organismes

2.3. BESOINS SPÉCIFIQUES CHEZ LES HÉTÉROTROPHES

2.3.1. NOTION DE MILIEU MINIMUM

.....
.....

Document n°7 : exemple de milieu minimum pour *Escherichia coli*

Constituants	Concentration massique
Glucose	1 g·L ⁻¹
KHPO ₄	10,5 g·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	3,5 g·L ⁻¹
NH ₄ Cl	0,5 g·L ⁻¹
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,05 g·L ⁻¹
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0,005 g·L ⁻¹
NaCl	0,05 g·L ⁻¹
MnCl ₂ , 4 H ₂ O	0,05 g·L ⁻¹

Escherichia coli synthétise tous ses composés carbonés à partir du glucose

.....
.....

Proteus vulgaris est incapable de croître sur le milieu minimum d'*Escherichia coli* car il ne peut pas synthétiser tous ses constituants carbonés à partir du glucose. Sa culture devient possible si on ajoute de l'acide nicotinique.

.....
.....
.....
.....

Ils incluent les **vitamines** (1 à 24 µg/L), les **acides aminés** (25 mg/L), les **bases azotées** (puriques et pyrimidiques : 10 mg/L).

.....
.....
.....
.....
.....

2.3.2. DOSAGE MICROBIOLOGIQUE

La croissance d'un micro-organisme auxotrophe pour un facteur de croissance donné est proportionnelle à la concentration de ce facteur de croissance dans une certaine gamme de concentration.

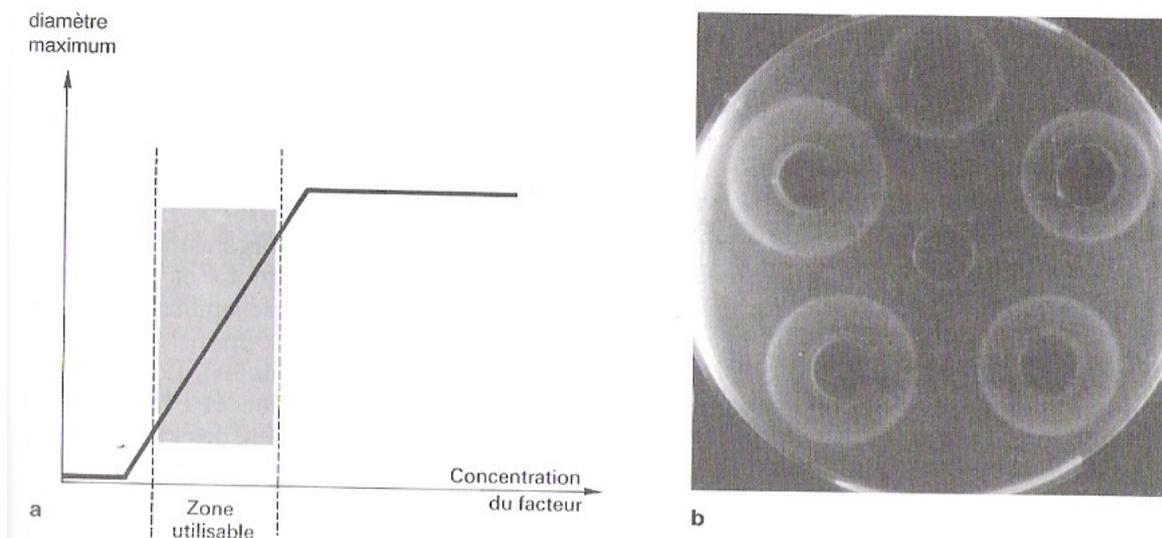
Document n°8 : facteurs de croissance et dosage microbiologique

On ensemence un **micro-organisme auxotrophe** vis-à-vis du facteur de croissance à doser sur un **milieu de culture totalement exempt de ce facteur**.

On apporte le facteur de croissance sous forme d'une **gamme de concentrations connues**, ce qui permet d'établir une courbe de croissance en fonction de la concentration du facteur.

On repère ainsi la **zone de proportionnalité, seule utilisable pour le dosage**.

Parallèlement des **essais sont réalisés dans les mêmes conditions**. Il suffit alors de reporter sur la courbe de référence la croissance des essais pour connaître leur concentration en facteur de croissance.



Le dosage peut se faire :

– sur milieu solide :

On utilise des disques imprégnés du facteur de croissance dans des concentrations connues et constantes. Ces disques sont déposés sur milieu minimum ensemencé en nappe par une souche auxotrophe. On évalue la croissance de la souche en mesurant le diamètre de la culture autour du disque. On dépose parallèlement, un ou plusieurs disques imprégnés de la solution à doser.

– en milieu liquide :

Des tubes de bouillon minimum contiennent des concentrations croissantes de facteur de croissance et sont ensemencés par une souche auxotrophes. On analyse la croissance de la souche par turbidimétrie (analyse de l'intensité du trouble).

2.3.3. NOTION DE SYNTROPHIE

Les deux espèces sont souvent présentes ensemble et lors de leur isolement sur gélose, le phénomène est illustré par la présence de **colonies satellites** qui se développent au voisinage de la colonie productrice du facteur de croissance.

3. APPLICATION À LA CONCEPTION ET À L'UTILISATION DE MILIEUX DE CULTURE

3.1. FABRICATION DE MILIEUX DE CULTURE DE BASE

.....
.....

3.1.1. MILIEUX EMPIRIQUES ET MILIEUX SYNTHÉTIQUES

- **Milieus empiriques (ou naturels, ou complexes) :**

.....
.....
.....

- **Milieus synthétiques (ou définis) :**

.....
.....
.....

- **Milieus semi-synthétiques :**

.....
.....
.....

3.1.2. CONSTITUANTS D'UN MILIEU ORDINAIRE

.....
.....
.....

Un milieu de base contient en général les éléments suivants :

- **Extrait de viande ou de levure :**

.....
.....

– **Peptones :**

.....
.....

– :

Polyosides (polymère glucidique) extrait d'algues.

L'agar a la propriété de former avec l'eau un gel solide à température inférieure à 50°C tout en étant liquéfiable par ébullition. **Possibilité de maintien en surfusion (liquide)** jusqu'aux environs de 45°C.

Il n'est pas dégradé par les bactéries et permet la solidification des milieux de culture :

- **milieu liquide : sans agar.**
- **milieu semi-solide : 2 à 6 g·L⁻¹ d'agar.**
- **milieu solide : + de 10 g·L⁻¹ d'agar.**

Sur un milieu solide, on peut réaliser un **isolement** : Les bactéries sont disséminées à la surface de la gélose et forment autant de colonies qu'il y avait initialement de cellules (1 colonie = 1 clone).

– **Eau.**

– **Minéraux :**

.....
.....
.....

Remarque :

En industrie, on utilise aussi des sous produits ou des résidus des industries agro-alimentaires comme la mélasse (betterave ou canne à sucre), la farine de soja, de poisson, de son, de maïs, de sirop de maltose...

Intérêt = moindre coût (0,15 €·kg⁻¹ contre 12 €·kg⁻¹ pour les peptones).

Certaines bactéries dites **exigeantes** ne peuvent pas croître sur un milieu ordinaire.

.....
.....

Exemples : gélose au sang, gélose chocolat (sang cuit).

3.2. NOTION DE MILIEU SÉLECTIF

.....
.....
.....
.....

Les inhibiteurs peuvent être :

- des substances, qui, par leur nature chimique, freinent ou stoppent la multiplication de certaines espèces : **inhibiteurs par nature**.

Ils agissent à faible dose.

Exemples : colorants, bile et ses constituants, sels minéraux particuliers, antibiotiques.

- des substances inhibitrices uniquement à forte concentration : **inhibiteurs par concentration**.

Exemple : concentration en NaCl à 75 g.L⁻¹ dans la gélose Chapman.

- des modifications de facteurs physico-chimiques du milieu de culture, ou d'incubation : **conditions sélectives d'incubation**.

Exemples : pH alcalin ou acide, température et atmosphère d'incubation.

Document n°9 : principales molécules inhibitrices utilisées dans les milieux sélectifs

Inhibiteurs	Micro-organismes non inhibés	Micro-organismes inhibés
Acriflavine, Cycloheximide, Acide nalidixique	<i>Listeria</i>	... ⁽¹⁾
Actidione (cycloheximide)	Dermatophytes, <i>Histoplasma</i> , <i>Blastomyces</i> , <i>Sporotrichum</i> , la plupart des <i>Candida</i>	Certains <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Monosporium</i>
ANC (Acide nalidixique-Colimycine)	Bactéries Gram+, Bacilles Gram-, résistants à ANC	Bacilles Gram- sensibles
Azide	<i>Streptococcaceae</i>	...
Bacitracine à 50 UI. cm ⁻³	<i>Haemophilus</i>
Bleu de méthylène	Gram-	Gram+
Cétrimide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> et apparentés	...
Chloramphénicol	Champignons	Bactéries (sensibles)
Chlorure de sodium haute concentration	<i>Staphylococcus</i> <i>Micrococcus</i> , <i>Corynébactéries</i> , <i>Enterococcus</i>	Gram-, <i>Streptococcus</i>
Cristal violet	Gram-	Gram+
Désoxycholate (sels biliaires)	Gram-, <i>Enterococcus</i>	Gram+
Éosine	Gram-	Gram+
Gentamicine	Champignons	Bactéries (sensibles)
Lauryl-sulfate	<i>Vibrio cholerae</i>	...
Vert malachite Chlorure de benzalkonium	Mycobactéries	...
Polymyxine B	<i>Brucella</i> , <i>Bacillus cereus</i>	...
Sélénite	Gram-	Gram +
Tellurite	<i>Staphylococcus</i> , <i>Corynébactéries</i> , <i>Listeria</i> .	Nombreux Gram-
VCN (Vancomycine-Colistine-Nistatine)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> et <i>meningitidis</i> , et quelques <i>Neisseria</i> commensales	...
Vert brillant	Gram-	Gram+

(1) ... indique que la liste n'est pas vraiment définie.

Document n°10 : les principaux microorganismes et leur inhibiteurs

Micro-organismes	Inhibiteurs utilisés	Milieux
Bacilles Gram –	Vert brillant, désoxycholate, cristal-violet, sélénite, bleu de méthylène-éosine...	Drigalski, SS, Hektoen, Mac Conkey, EMB
<i>Bacillus cereus</i>	Polymyxine	Gélose de Mossel
<i>Bacteroides</i> ⁽¹⁾	Vancomycine, Kanamycine	Gélose Columbia au sang + Vancomycine + Kanamycine
<i>Brucella</i>	Bacitracine + Polymyxine B	
Champignons	Chloramphénicol, Gentamicine	Gélose Sabouraud + antibiotique(s)
Champignons pathogènes (la plupart)	Actidione	Gélose Sabouraud + actidione
<i>Clostridium</i> ⁽¹⁾	Néomycine	Milieux de Willis, TSN
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Tellurite	Gélose de Tinsdale
<i>Enterococcus</i>	Azide + désoxycholate	Gélose Cocosel : BEAA
<i>Erysipelothrix</i>	Azide + haute concentration de cristal-violet	
<i>Listeria</i>	Acide nalidixique + dérivé de l'acridine Cycloheximide, chlorure de lithium	Gélose Oxford Gélose Mac Bride modifiée
Mycobactéries	Vert malachite	Lowenstein-Jensen, Coletsos
Mycoplasmes	Pénicilline + Acétate de thallium	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>	Mélange VCAT (Vancomycine, Colistine, Amphotéricine, Triméthopine)	Gélose chocolat + VCAT (milieu de Thayer et Martin)
<i>Pseudomonas</i>	Cétrimide + acide nalidixique	Gélose au cétrimide
<i>Staphylococcus</i>	Chlorure de sodium concentré Tellurite	Gélose de Chapman Gélose Baird Parker
<i>Streptococcus</i> β-hémolytiques	Mélange ANC (Acide Nalidixique Colimycine)	Gélose au sang + ANC
<i>Vibrio cholerae</i>	Lauryl-sulfate en pH alcalin	Gélose TCBS

(1) Incubation en anaérobiose. Les bactéries aéro-anaérobies résistantes aux antibiotiques cités cultiveront.

Il peut s'agir :

–
Exemples : Milieu de Chapman, Drigalski, Sabouraud + chloramphénicol.

–
 Ils contiennent des agents sélectifs qui permettent à une espèce bactérienne de se développer plus rapidement que les autres. Ils sont utilisés lorsque l'espèce recherchée est présente en très faible quantité dans le milieu initial.

Exemple : Le bouillon Rappaport permet un enrichissement en *Salmonella* du fait de la présence de vert de malachite, de $MgCl_2$ à $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, et pH 5,5 (éléments inhibiteurs de la plupart des entérobactéries).

Document n°11 : exemples de milieux sélectifs

Gélose Chapman	Gélose Drigalski	Bouillon Rappaport	Gélose Sabouraud + Chloramphénicol
Peptones : $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Extrait de viande : $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl : $75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Mannitol : $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Rouge de phénol : $0,025 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Agar : $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Eau : qsp 1 L	Peptones : $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Extrait de viande : $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Extrait de levure : $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Lactose : $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Désoxycholate : $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cristal violet : $0,005 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ BBT : $0,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Thiosulfate de Na : $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Agar : $11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Eau : qsp 1 L	Peptones : $4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Vert de malachite : $36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl : $7,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 : $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $MgCl_2$: $37,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Eau : qsp 1 L $pH = 5,2$	Peptones : $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glucose : $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Chloramphénicol : $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Agar : $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Eau : qsp 1 L $pH = 6$

3.3. NOTION DE MILIEU D'IDENTIFICATION

.....

Ils contiennent en principe :

-
-

.....

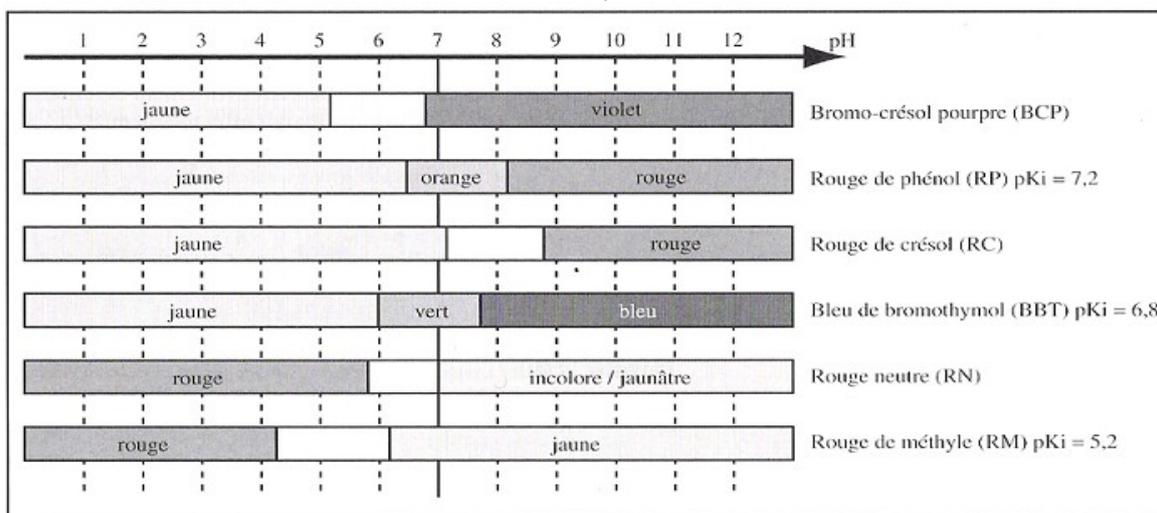
3.3.1. INDICATEURS COLORÉS DE pH

.....

Ils sont caractérisés par leur **zone de virage et les couleurs associées**.

Une teinte intermédiaire est parfois visible dans la zone où les deux formes de l'indicateur de pH coexistent.

Document n°12 : indicateurs colorés de pH utilisés dans les milieux de culture



.....

3.3.2. INDICATEURS D'OXYDORÉDUCTION

.....
.....

Ils mettent en jeu un couple oxydant/réducteur :

Exemple :

Des bandelettes imprégnées de **bleu de méthylène** permettent de vérifier l'anaérobiose dans une jarre :

- la forme oxydée du bleu de méthylène est bleue.
- la forme réduite du bleu de méthylène est incolore.

Ces indicateurs ont un intérêt plus limité pour l'étude des bactéries aérobies.

3.3.3. INDICATEURS DE SULFURES

Certaines bactéries produisent des **sulfures**. Cette production peut être un élément de l'identification bactérienne.

.....
.....

3.3.4. AUTRES INDICATEURS

Actuellement, d'autres indicateurs sont fréquemment ajoutés, comme le Fer III, pour la mise en évidence de l'hydrolyse de l'esculine dans le milieu BEA (Bile-Esculine-Azide) :

Aujourd'hui, de nombreux milieux utilisés en bactériologie médicale font intervenir différents indicateurs afin de déterminer les espèces bactériennes en fonction des couleurs. Ce sont des **milieux chromogènes**.