

## BESOINS NUTRITIONNELS DES MICRO-ORGANISMES

### EXERCICES D'APPLICATION

#### EXERCICE N°1 : Besoins nutritionnels d'une bactérie

Afin d'étudier les besoins nutritionnels de trois souches A, B, C, on les ensemence sur les trois milieux suivants :

- Milieu 1 : milieu de base :

Constituants	Quantités (pour 1 L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
NO <sub>3</sub> K	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
NaCl	0,1 g
FeCl <sub>3</sub>	0,01 g
Eau distillée	qsp 1 litre
Autoclavage	
Glucose	1 g

- Milieu 2 : milieu 1 + 4 g d'hydrolysate de caséine.
- Milieu 3 : milieu 2 + 2 g d'extrait de levure.

Les résultats obtenus après incubation, sont les suivants :

	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3
<b>Souche A</b>	+	+	+
<b>Souche B</b>	-	+	+
<b>Souche C</b>	-	-	+

+ = culture      - = absence de culture

- Q1.** À quelle catégorie de milieu appartient le milieu 1 ?
- Q2.** Indiquer le rôle de chacun des constituants des milieux 1, 2 et 3.
- Q3.** Déduire des résultats, les besoins nutritionnels des trois souches A, B et C.

Dans certains cas, une vitamine peut être dosée par son effet sur la croissance d'une bactérie.

- Q4.** Quelle caractéristique doit posséder la souche utilisée ?
- Q5.** Donner le principe du dosage ?
- Q6.** Quel est l'intérêt d'un tel dosage ?

**EXERCICE N°2 : Analyse des types trophiques de souches bactériennes**

L'analyse des types trophiques des souches I et II se fait à l'aide des milieux de culture A, B, et C.

– Milieu A :

Phosphate d'ammonium	0,2 g.L <sup>-1</sup>
Phosphate monopotassique	1 g.L <sup>-1</sup>
Sulfate de magnésium	0,2 g.L <sup>-1</sup>
Chlorure de calcium	0,1 g.L <sup>-1</sup>
Chlorure de sodium	5 g.L <sup>-1</sup>

– Milieu B : Milieu A + citrate sodique 2 g.L<sup>-1</sup>.

– Milieu C : Milieu A + les additifs suivants :

Biotine	10 <sup>-8</sup> g.L <sup>-1</sup>
Histidine	10 <sup>-5</sup> g.L <sup>-1</sup>
Méthionine	2.10 <sup>-5</sup> g.L <sup>-1</sup>
Thiamine	10 <sup>-6</sup> g.L <sup>-1</sup>
Pyridoxine	10 <sup>-6</sup> g.L <sup>-1</sup>
Acide nicotinique	10 <sup>-6</sup> g.L <sup>-1</sup>
Tryptophane	2.10 <sup>-5</sup> g.L <sup>-1</sup>
Panthoténate de calcium	10 <sup>-5</sup> g.L <sup>-1</sup>
Oligoéléments	
Glucose	5 g.L <sup>-1</sup>

On obtient les résultats suivants après ensemencement et incubation :

	Milieu A	Milieu B	Milieu C
<b>Souche pure I</b>	-	+	+
<b>Souche pure II</b>	-	-	+

**Q1.** Comment qualifier le milieu A ?

**Q2.** Certaines bactéries pourraient se développer dans le milieu A à la condition de les incuber en atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>. Expliquer pourquoi, et donner leur type trophique vis à vis du carbone.

**Q3.** Quels sont les types trophiques vis-à-vis du carbone et des besoins spécifiques de la souche I ?

**Q4.** Quelle est la source d'azote de la souche I ?

Il est recommandé de ne pas ensemencer le milieu B à partir d'un bouillon ou d'une eau peptonée, mais d'une colonie sur milieu gélosé : Pourquoi ?

**Q5.** Qu'apporte le glucose dans le milieu C ?

**Q6.** Quel est le type trophique vis-à-vis métabolisme énergétique des souches I et II ?

**Q7.** Les composants additifs du milieu C (oligoéléments et glucose exceptés) appartiennent à deux groupes chimiques différents. Lesquels ?

**EXERCICE N°3 : Étude de la gélose Mac Conkey**

Le milieu de Mac Conkey a la composition suivante (pour 1 L de milieu) :

Peptone	20 g
Lactose	10 g
Sels biliaries	1,5 g
Cristal violet	0,001 g
Rouge neutre	0,05 g
NaCl	5 g
Agar	15 g

- Q1.** Indiquer le rôle de chacun des constituants du milieu.  
**Q2.** Indiquer, en justifiant, la consistance du milieu.  
**Q3.** Ce milieu est-il empirique ou synthétique ? **Justifier.**  
**Q4.** Ce milieu est-il ordinaire ou sélectif ? **Justifier.**  
**Q5.** Indiquer le(s) caractère(s) biochimique(s) mis en évidence par ce milieu.  
**Q6.** Que conclure si l'on observe des colonies rouges ?

**EXERCICE N°4 : Intérêts des milieux sélectifs et différentiels**

On dispose d'un mélange de 3 souches pures dont les propriétés sont les suivantes :

- *Salmonella enterica*: bacille gram -, lactose -, mannitol +, saccharose -, H<sub>2</sub>S +
- *Staphylococcus* : coque Gram + halotolérant, lactose +, mannitol +, saccharose +
- *Escherichia coli* : bacille gram -, lactose +, mannitol +, saccharose +, H<sub>2</sub>S –

Donnée : l'H<sub>2</sub>S (hydrogène sulfuré) est produit par certaines bactéries par réduction d'un substrat soufré oxydé tel le thiosulfate. L'H<sub>2</sub>S donne avec le Fe III un précipité noir de sulfure de fer.

Des isolements à partir du mélange sont réalisés sur les milieux suivants :

BCP	Désoxycholate lactose (DL)	Chapman	SS
Peptone	Peptone	Peptone	Peptone
Extrait de viande	Citrate	Extrait de viande	Extrait de viande
Lactose	Lactose	NaCl à 75 g/L	Lactose
Bromocrésol pourpre	Rouge neutre	Mannitol	Citrate de sodium
Agar	Désoxycholate de sodium	Rouge de phénol	Citrate de fer III
	NaCl 5g/L	Agar	Sels biliaries
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		Vert brillant
	Agar		Rouge neutre
			Thiosulfate de sodium
			Agar

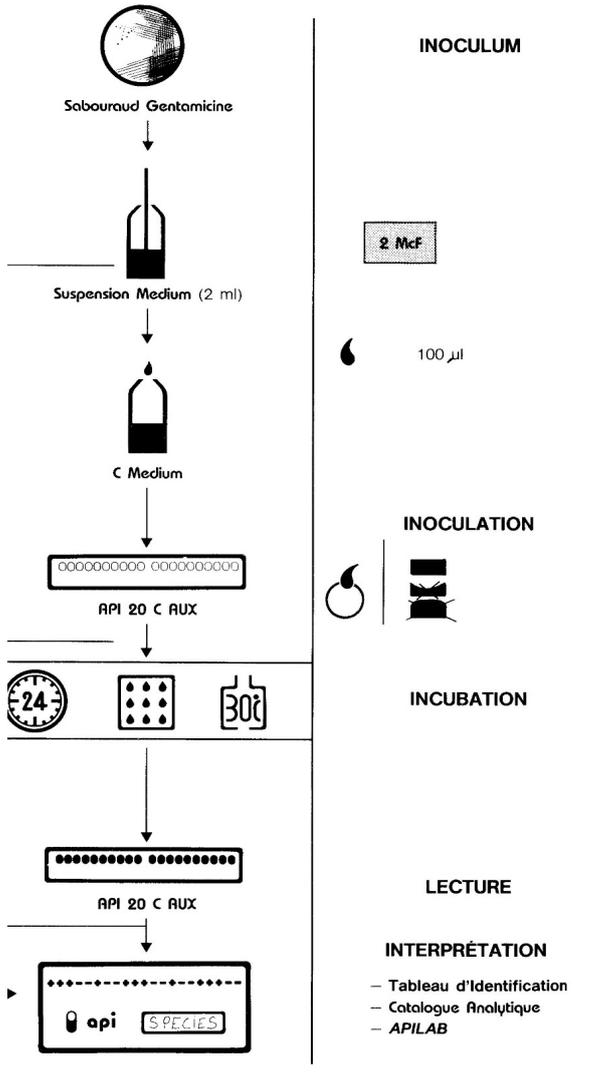
**Q1.** Compléter le tableau suivant :

	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Aspect sur gélose BCP</b>			
<b>Aspect sur gélose DL</b>			
<b>Aspect sur gélose Chapman</b>			
<b>Aspect sur gélose SS</b>			

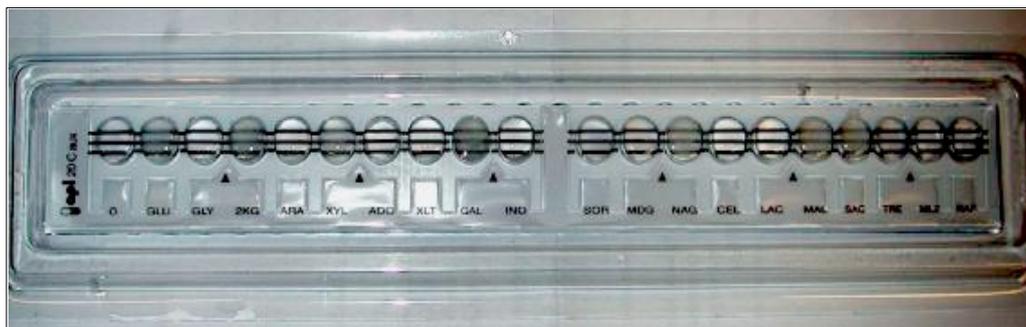
**Q2.** Indiquer la nature de chacun de milieux utilisés.

### EXERCICE N°5 : Identification de levures par microgalerie API 20 C AUX

En vous appuyant sur les documents suivants, définir l'auxanogramme et en expliquer le principe de lecture.



Suspension Medium	Eau distillée	
C Medium	sulfate d'ammonium	5g
	phosphate monopotassique	0,31g
	phosphate dipotassique	0,45g
	phosphate disodique	0,92g
	chlorure de sodium	0,1g
	chlorure de calcium	0,05g
	sulfate de magnésium	0,2g
	histidine	0,005g
	tryptophane	0,02g
	méthionine	0,02g
	gélose	0,5g
	solution de vitamines	1 mL
solution d'oligo-éléments	10 mL	
eau distillée qsp 1000 mL		
pH final : 6,5-6,7		

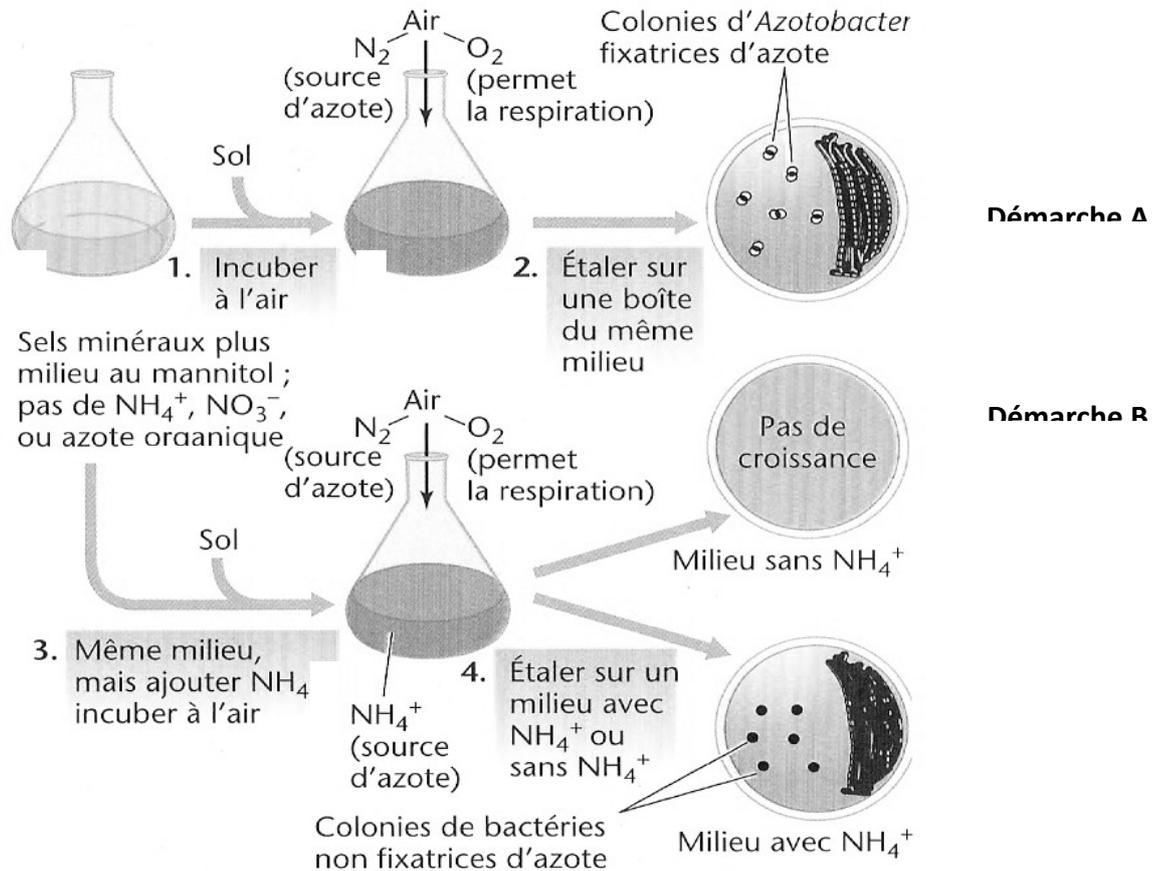


Contenu des cupules (substrat déshydraté) :

- |     |                    |     |                        |
|-----|--------------------|-----|------------------------|
| GLU | GLUcose            | SOR | SORbitol               |
| GLY | GLYcérol           | MDG | x-Methyl-D-Glucoside   |
| 2KG | 2-Keto-D-Gluconate | NAG | N-Acetyl-D-Glucosamine |
| ARA | L-ARAbinose        | CEL | CELlobiose             |
| XYL | D-XYLose           | LAC | LACTose                |
| ADO | ADOnitol           | MAL | MALTose                |
| XLT | XyLiTol            | SAC | SACcharose             |
| GAL | GALactose          | TRE | TREhalose              |
| INO | INOsitol           | MLZ | MeLelitose             |
|     |                    | RAF | RAFFinose              |

**EXERCICE N°6 : Isolement d'*Azotobacter***

*Azotobacter* est une bactérie fixatrice d'azote. Elle a pu être isolée par Beijerinck grâce à la démarche présentée ci-dessous (démarche A).



Expliquer pourquoi la démarche B ne conduit pas à l'isolement de bactéries du genre *Azotobacter*.

**EXERCICE N°7 : Enrichissement, sélection et identification des salmonelles**

Les salmonelles sont des bactéries pathogènes pouvant être responsable de gastro-entérites.

En cas d'infection, elles ne sont présentes dans les selles qu'en très petite quantité et on ne les retrouve pas toujours à l'isolement direct (mise en culture des selles).

La recherche de salmonelles dans une selle peut débuter par l'ensemencement d'un bouillon Muller-Kauffmann dont la composition, pour 1 L, est la suivante :

Tryptone	7 g
Peptone de soja	2,3 g
Bile de bœuf	4,8 g
NaCl	2,3 g
Thiosulfate	41 g
Carbonate de calcium	25 g

**Q1.** Indiquer le type de ce milieu. Donner son intérêt.

Après incubation 24 h à 37°C, un isolement est réalisé sur gélose VB-RP dont la composition est la suivante :

Peptones	10
Extrait de viande	5
Extrait de levure	1
Lactose	10
Saccharose	12
Hydrogénophosphate de sodium	1
Dihydrogénophosphate de potassium	0,6
Vert brillant	0,005
Rouge de phénol	0,090
Agar	15
pH	= 6,9

**Q2.** Quel serait l'aspect de colonies de *Salmonella* sur un tel milieu?  
Une confusion est-elle possible avec d'autres bactéries intestinales ?

Donnée : Caractères de quelques entérobactéries.

	Lactose	Arabinose	Saccharose	Uréase	H <sub>2</sub> S
<i>Salmonella</i>	-	+	-	-	+/-
<i>Morganella</i>	-	-	-	+	-
<i>Klebsiella</i>	+	+	+	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-

On prélève une colonie suspecte pour ensemencer un milieu urée tryptophane (composition ci-dessous) dans le but de rechercher la présence d'une uréase.

Composition qualitative du milieu Urée-Tryptophane :

- Urée
- Tryptophane
- Éthanol
- Rouge de phénol
- NaCl
- Mono et dihydrogénophosphate de K

**Q3.** Donner la réaction d'hydrolyse catalysée par l'uréase (formule de l'urée :  $(\text{NH}_2)_2\text{C}=\text{O}$ ).

Expliquer le principe de recherche de l'uréase.

**Q4.** À quel résultat s'attend t-on après quelques heures si la colonie prélevée est effectivement une colonie de *Salmonella* ? Et dans le cas contraire?

L'étude des caractères biochimiques avec une galerie confirme l'identification du genre *Salmonella*. Il existe en fait plusieurs milliers de sérotypes (2500 environ) se différenciant par leurs antigènes. Le sérotypage consiste donc à déterminer la nature des antigènes présents pour identifier le sérotype. On recherche l'antigène O de paroi et l'antigène H de flagelle et l'antigène Vi de micro-capsule.

**Q5.** Schématiser l'organisation des antigènes recherchés.

**Q6.** Expliquer le principe du sérotypage.

**EXERCICE N°8 : gélose Mossel**

La gélose de Mossel est utilisée pour le dénombrement de *Bacillus cereus* dans les produits alimentaires.

Sa composition, pour 1 L, est la suivante :

Peptone	10 g
Extrait de viande	1 g
Mannitol	10 g
Jaune d'œuf	10%
Polymyxine B	0,01 g
Rouge de phénol	0,025 g
Chlorure de sodium	10 g
Agar	14 g

- Q1.** Pourquoi cherche-t-on à dénombrer *Bacillus cereus* dans les produits alimentaires ?
- Q2.** Quels qualificatifs peut-on attribuer à ce milieu (au moins 3). Justifier.
- Q3.** Indiquer le rôle de chacun des constituants.
- Q4.** Quels caractères biochimiques peut-on lire sur ce milieu ? Pour chaque caractère, expliquer le principe de la lecture.