

# TD Microbiologie L2

**Exercice 1 :** Pour étudier les différents types trophiques, 2 souches A et B ont été ensemencés dans 3 milieux de culture I, II et III. Les résultats obtenus sont indiqués sur le tableau ci-dessous en g/l:

Milieu I		Milieu II	Milieu III
Phosphate d'ammonium	0,2	Milieu I + Citrate trisodique	Biotine ( $10^{-8}$ ), Histidine ( $10^{-5}$ ), Méthionine ( $2.10^{-5}$ ), Thiamine ( $10^{-6}$ ), Pyridoxine ( $10^{-6}$ ), Acide nicotinique ( $10^{-6}$ ), Tryptophane ( $2.10^{-5}$ ), Panthothénate de calcium ( $10^{-5}$ ), Oligoéléments et glucose (5)
Phosphate monopotassique	1		
Sulfate de magnésium	0,2		
Chlorure de calcium	0,1		
Chlorure de sodium	5		

Souches/milieux	I	II	III
Souche pure A	-	+	+
Souche pure B	-	-	+

- Comment qualifier le milieu I ?
- 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.
- Quel est le type trophique vis-à-vis du carbone et des besoins nutritionnels spécifiques de la souche I ?
- Quelle est sa source d'azote ?
- Pour comparer la croissance sur les milieux I et II, il est recommandé de ne pas ensemencer le milieu II à partir d'un bouillon ou d'une eau peptonée, mais d'une colonie sur milieu gélosée : expliquer pourquoi ?
- Qu'apporte le glucose dans le milieu III ?
- Quel est le type trophique de la souche B vis-à-vis du carbone et par rapport au métabolisme énergétique ?
- Définir et expliquer la présence d'oligoéléments ?
- Les composants additifs du milieu III appartiennent à deux groupes chimiques distincts. Lesquels ?

**Exercice 2 :** On étudie les caractéristiques physiologiques de trois souches bactériennes A, B et C. Les 3 souches sont ensemencées dans les milieux ci-dessous :

## Milieu 1 = milieu minimum

Composants	Quantité
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
NO <sub>3</sub> K	0,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,2g
CaCl <sub>2</sub>	0,1g
NaCl	0,1g
Eau distillée	1 litre

**Milieu 2 = Milieu 1 + 4g d'hydrolysate de caséine**

**Milieu 3 = Milieu 2 + 2g d'extrait de levure**

Après incubation, les résultats sont les suivants :

	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3
Souche A	+	+	+
Souche B	-	+	+
Souche C	-	-	+

- Déterminer le rôle des constituants des milieux 1, 2 et 3.
- Déduire des résultats, les besoins nutritionnels des 3 souches A, B et C.
- Une vitamine peut être dosée par son effet sur la croissance d'une bactérie.
  - Que représente la vitamine pour la bactérie ?
  - Quelle caractéristique la bactérie utilisée doit-elle posséder ?
  - Donner le principe du dosage.
  - Dans quel intérêt procède-t-on à un tel dosage

**Exercice 3 :** On contamine 5 ml d'un milieu de culture avec  $10^6$  *Staphylocoques* et  $10^2$  de *Pseudomonas*.

- Quel est le nombre par ml de bactéries de chaque souche au temps 0 ?
- Après 6h d'incubation sans phase de latence, on dénombre séparément  $8 \times 10^8$  *Staphylocoques/ml* et  $3.10^3$  de *Pseudomonas/ml*. Calculer les temps de génération des deux germes.
- Interprétez ce résultat
- Comment peut-on qualifier le phénomène observé ?
- Comment ce phénomène pourrait-il se manifester sur milieu gélosé ?

**Exercice 4 :** On ensemence un milieu de culture contenant tous les éléments nécessaires à la croissance avec 400mg de levures. La culture démarre immédiatement de façon exponentielle avec un temps de génération de 57,5 min. Au bout de combien de temps aura-t-on 200g de levures ?

Calculer le nombre de divisions cellulaires qui se sont produites et déterminer le taux horaire de croissance.

**Exercice 5 :** On ensemence un milieu de culture avec 0,1g de bactéries. La culture est arrêtée pendant la phase exponentielle de croissance au bout de 5h30min. La masse bactérienne est alors égale à 1,5g. Sachant que la phase de latence a duré 55min, calculer le temps de division cellulaire.

**Exercice 6 :** Un étudiant veut déterminer les caractéristiques des yaourts vendus par la société YAKO. Après dispersion d'un gramme de yaourt (équivalent à 1 ml) dans neuf millilitres d'eau stérile, il effectue une galerie de dilutions au dixième, ensemence des boîtes de Pétri avec 0,2 ml de chaque dilution et obtient les résultats suivants :

Dilution	-1, -2, -3	-4	-5	-6
Nombre de colonies par boîte	Non comptable	770 1140 1080	85 120 95	8 9 11

1 - A l'aide de ces résultats, calculez la concentration bactérienne par gramme de yaourt. Par comptage à la cellule de Thoma de la suspension cellulaire contenue dans le tube -2, l'étudiant obtient en moyenne une valeur de 8 cellules par ensemble de 16 petits carrés.

2- A l'aide de ce résultat, calculez la concentration cellulaire du yaourt. (Le côté d'un petit carré fait 0,05 mm et la profondeur de la cellule de Thoma est de 0,1 mm).

3- Que suggère la comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes de dénombrement ? Calculez les proportions des différents types de cellules présents dans cette population microbienne.

4 - Comment vous y prendriez-vous pour démontrer que les bactéries du yaourt sont Gram-positives (donnez au moins deux méthodes différentes) ?

**Exercice 7 :** On se propose de suivre la croissance d'une souche bactérienne cultivée en milieu non renouvelé, en utilisant la méthode de numération par mise en culture en boîtes de Pétri. A différents temps d'incubation, des échantillons sont prélevés et dilués pour analyse. Pour chaque dilution, deux boîtes sont ensemencées par 0,1 ml ; les nombres de colonies obtenues sur les différentes boîtes sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	Boîtes -2	Boîtes -3	Boîtes -4
T <sub>0</sub>	611	69	6
	635	53	4
T <sub>0</sub> + 1h	625	65	7
	575	55	9
T <sub>0</sub> + 3h	790	95	18
	810	105	12
T <sub>0</sub> + 4h	1500	161	21
	1800	139	19
T <sub>0</sub> + 5h	2200	234	23
	2100	225	26
T <sub>0</sub> + 6h	2700	345	34
	2500	355	36
T <sub>0</sub> + 7h	Non comptable	568	57
		556	49
T <sub>0</sub> + 8h	Non comptable	650	72
		750	68

a- Calculez la concentration cellulaire aux différents temps : détaillez et justifiez le calcul pour T<sub>0</sub> ; donnez directement le résultat final pour les autres temps d'incubation.

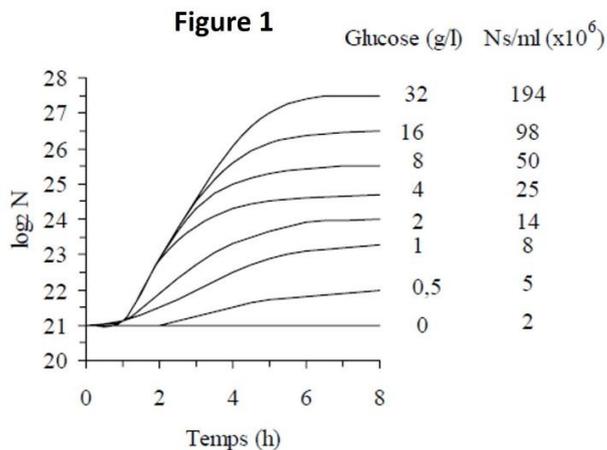
b- Représentez la courbe de croissance sur une page de papier semi-Log au verso. Décrivez brièvement les différentes phases que vous observez sur cette courbe.

c- Calculez G<sub>min</sub> et K<sub>max</sub> dans les conditions de l'expérience.

Par comptage à la cellule de Thoma de la suspension cellulaire contenue dans le tube direct au temps initial (T0), l'étudiant obtient en moyenne une valeur de 6 cellules par ensemble de 16 petits carrés.

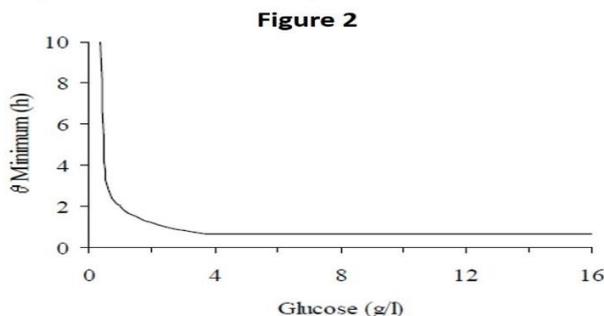
d- A l'aide de ce résultat, calculez la concentration cellulaire initiale.

**Exercice 8 :** On étudie la croissance bactérienne sur un milieu de culture optimum, mais en présence de différentes concentrations de glucose. Les différentes courbes de croissance sont représentées sur le même graphe dans la figure 1.



Comparer la croissance totale et le taux de croissance  $\mu$  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 G minimum en fonction de la concentration initiale en glucose dans le milieu (figure 2).



2) Quelle est la relation entre  $\mu$  max et G min ?

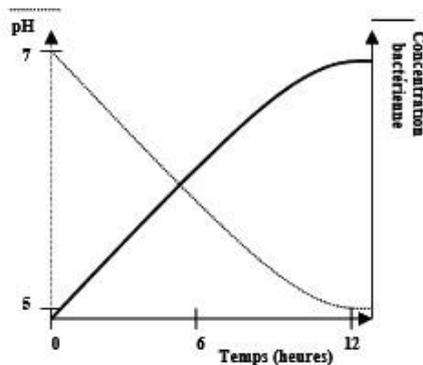
3) Pour quelle valeur "seuil" le glucose est considéré comme facteur limitant ?

**Exercice 9 :**

La fabrication du yaourt repose sur l'action de bactéries produisant de l'acide lactique à partir du lactose du lait, ce qui acidifie le lait et favorise la précipitation des protéines et le caillage du lait.

On considère la croissance, sur milieu de culture constitué par du lait, d'une souche de *Lactococcus lactis*.

Parallèlement on mesure le pH du milieu. On obtient la figure ci-après :



Expliquez ces courbes et le métabolisme sous-jacent. Décrivez en particulier l'utilisation du lactose par ces bactéries, le métabolisme énergétique impliqué et les conséquences sur les bactéries du rejet d'acide lactique.