

Chap 1 - Nutrition des micro-organismes

I) Besoins nutritionnels

Tous les microorganismes ont besoin : **eau**, source d'énergie, source de C (squelette), source de N (protéines, ADN, ARN) et d'éléments minéraux (K, P, S)

Prototrophe => minimum vital pour la survie de la bactérie.

- Bactérie : 95-97% d'enzymes

Certains nécessitent un facteur de Croissance : **auxotrophes** => ils ont un besoin d'apports d'a.a pour continuer à vivre car ils ne peuvent pas les synthétiser.

1) Macroéléments (macronutriments)

a) Source de C

Bactéries :

- autotrophe : capable de trouver la source de C sur un support minéral (CO₂) ex: *cyanobactérie*
- hétérotrophe : auront besoin de trouver sur des substrats organiques ou minéraux (autre que le CO₂), la source de C (dégradation de la MO)

b) Source d'Azote

Minéral : nitrates, ammoniac

c) Source de S et P

Source minérale ou organique

cystéine ou méthionine

Phosphore avec phosphore inorganique et peuvent être puisé dans les substrats qui leur sont fournis

2) Oligoéléments = micro-éléments

Na, K, Ca, Mg, Cl₂, Fe, Mn (en très petites quantités)

Ces oligoéléments : 2 fonctions : osmorégulation et aux échanges transmembranaires et au fonctionnement des enzymes

Le maintien de l'homéostasie : maintien du pH intracellulaire

3) Source d'énergie

Sources :

- phototrophe (lumière) :
 - photo-lithotrophe : nécessitent une substance minérale (mange du soleil et du CO₂)
 - photo-organotrophe : accepteur final d'e⁻ de la chlorophylle organique
- chimiotrophe (composées minéraux ou organiques) (mange composés organique et CO₂):
 - chimio-lithotrophe : nécessite une substance minérale
 - chimio-organotrophe : nécessitent une substance organique => **fermentation**

4 sources d'énergie :

- EMP : cycle de Krebs
- voies métaboliques secondaires : voie de dégradation de l'arginine
- FPM (force proto-motrice)

Exemple de chimiorganotrophe

Substrat => Polysaccharide, protéines et peptides, a.a, Monosaccharides => fermentation bactérienne ==> (produits du métabolismes) ==> convertie de H₂S, CH₄, H₂, CO₂, SCFA, Lactate, Succinate, Ethanol, NH₃, Amines, Phenols.

4) Facteur de croissance

Protrophes : Métabolisme essentiel Auxotrophes : Facteurs de croissance :

- a.a (dépendance dépend des organismes) (entre 8 à 12 a.a essentiel : doit les trouver dans le milieu extérieur)
- Bases puriques et pyrimidines : entre dans la composition de l'ADN et de l'ARN.
- Vitamines : composés nutritionnels (cofacteurs des enzymes, intermédiaires réactionnels dans la production d'énergie)

Croissance microbienne : source de C, N ; macroéléments (P, S, K), oligoéléments (Fe, ...) et les facteurs de croissance

II) Entrée des nutriments

1) Diffusion simple (passive)

Passage transmembranaire sans aide, concerne 3 types de molécules : CO_2 , O_2 et H_2O .

Y'a pas de phénomène de saturation car il n'y a pas de transporteur spécifiques.

2) Diffusion facilitée

Passe par les perméases

Utilise des canaux déformables : accès privilégiés pour la molécule.

Si y'a trop de molécules, elles ne pourront pas toutes passer

3) Transport actif

Perméases qui utilise de l'énergie tel que l'ATP pour faire rentrer la molécule qui intéresse.

Symport : passe dans le même sens : passage simultanés de 2 composés (ion + sucre)

Antiport : passe dans le sens contraire : passage simultanés de 2 composés (ion + sucre)

4) Translocation de groupes

Modification chimique : le plus connu est la phosphotransférase

$\text{PEP} + \text{sucre (extérieur)} \rightarrow \text{pyruvate} + \text{sucre (intérieur)} - \text{P}$

E coli :

- diffusion facilitée : glycérol
- transport actif : maltose
- symport

III) Milieu de culture des bactéries

Milieu de culture : généralités

- Leurs caractéristiques varient de même que leur composition.

- Utilisés pour l'isolement et la conservation de cultures pures mais aussi pour l'identification.

- Recherche, diagnostic, fermentation industrielle

Composition d'un milieu minimum :

- source de C et d'Energie, généralement le glucose
- source de P et K : K_2HPO_4 : sel qui sert de tampon au pH
- source de N et de S : $(NH_4)_2SO_4$
- source de Mg : $MgCl_2$
- source de Ca : $CaCl_2$
- source de Fe : on emploie le citrate de fer
- source d'oligoéléments : Cu, Zn, Co, Ni, B, Ti
- source d' H_2O : en excès (stérile)

Le répresser catabolique : le microorganisme va d'abord utiliser le glucose puis les autres sucres et va privilégier la voie catabolique la moins énergivore (et va donc ralentir sa croissance s'il a d'autres composés autres que le glucose)

Stérilisation par autoclavage : $121^\circ C$ pendant 15-20 mins

On classe

- selon la composition : - selon la consistance : - selon l'utilisation :

1 Classification : milieux synthétiques, naturel et semi-synthétiques

Les milieux naturels (ou complexe) : composition pas exactement connue à contrario des milieux **synthétiques** (tout les intrants sont volontairement ajoutés) et entre les deux, on a le milieu **semi-synthétique** (on rajoute des composés que l'on ne maîtrise pas (extraits de levure, de viande), on rajoute des apports spécifiques : sucre, K_2HPO_4 , ...)

a) Milieux naturels ou complexes

Peptones

Extraits de viande

Extraits de levures

b) Milieux synthétiques

On les utilisent pour la croissance des bactéries exigeantes

c) Milieux semi-synthétiques

Avoir un milieu +/- sélectif en fonction des populations de bactéries que l'on veut

2 Classification : en fonction de la consistance

Selon la consistance : **liquide** (bouillon => quand autoclavage : dégazage du milieu en O₂, quand refroidissement, gradient de regazage d'O₂), **solide** (milieux gélosés), **semi-solide**

- Travail en tube : prolongation ou test
- Travail en flacon : production de biomasse

Turbidité : opacification progressive du milieu : utilisation de densité optique

Milieu gélosé en boîte de pétri : milieu piégé dans de l'agar-agar (agarose), de liquéfié à haute T° et se solidifie en refroidissement, le gel est fait de 1.2-1.5% d'agar-agar.

Milieu semi-solide : contient entre 0.5-0.7% d'agar-agar: on obtient une gélose molle : recherche de la mobilité microbienne.

Milieu de culture : classification :
-selon l'utilisation

Il existe donc les milieux sélectifs, électifs et non-sélectifs

3 Classification en fonction de l'utilisation

a) Milieux sélectifs

sélectif : Objectif : sélectionne un porga que l'on désire dénombrer au détriment de tout les autres. On rajoute une substance ou des substances pour ne garder ce que l'on veut.

Il contient des substances microbiennes, des antibiotiques, des métaux lourds, autres produits ...

La sélectivité reste cependant relative car certains porgas peuvent résister à chaque substance. il peut aussi y avoir des porgas qui sont mutants et donc résiste.

électif : On sélectionne une population produit positif et donc on adapte le milieu de culture en fonction de ce que l'on veut.

non-sélectif : Extrêmement riche : multiplication du maximum de porganismes.

Milieu de Chapman : test des mains ([NaCl] élevé, mannitol, rouge de phénol (indicateur))

Milieu MacConkey agar

b) Milieux d'enrichissement

Milieu liquide.

milieu non sélectif qui a pour but de favoriser la production de biomasse et la multiplication de μ orgas

Milieu de Muller-Kauffman : cultivation des μ organismes spéciale mais on ne peut pas le dénombrer.

c) Milieux différentiels

L'objectif est de plus ou moins sélectionner les μ orgas en mettant en évidence les spécificités chimiques.

Galleries api : des tubes qui contiennent chacun un produit pour sélectionner le μ orga

Géloser à l'amidon : on peut révéler les μ orgas grâce à l'amidon et un 'colorant'

4) Milieux d'isolement et d'identification

Permet de réaliser la purification des μ orgas et d'isoler certaines colonies pour pouvoir les récupérer.

On peut réaliser du dénombrement sur boîte de pétri, et on peut approcher le nb de μ orags qui sont présents dans un milieu.

Technique utilisées pour l'isolment et l'énumération = dénombrement des bactéries.

Milieu d'isolement solide : permet de savoir le type de colonie : Morphotype : type R-rugueuse, type S-lisse, type M-mucqueuse (fils)

Technique d'isolement et de dénombrement :

Si tube trouble : quantité de bactéries : $9 \log (\text{quantité_ml}) = 10^9 \text{ ml (?)}$

On récupère un échantillon de chaque colonie et on isole puis on remet dans un autre tube, et on recommence jusqu'à avoir des colonies séparées.

Chap 2 - Croissance bactérienne

I Courbe de croissance

scissiparité : si on parle d'une cellule mère, on arrive à 2 cellules filles.

Pour se séparer, il y a une sorte de bourgeonnement de la cellule, la division est semi-conservative (chaque cellule fille va avoir une partie de l'ADN de la

mère) mais il va y avoir des erreurs non réparées qui vont donc modifier le profil génétique de la cellule fille.

Arrêt de division de cellule mère au bout de 15-20 divisions

Division cellulaire en 2 temps :

- Duplication : polymérase : 700 nvx nucléotides / secondes (40 mins)
- Séparation/Ségrégation : entre les 2 matériels génétiques de la cellule mère. Apparition d'un anneau central qui va former un septum et puis après séparation des 2 cellules. (20 mins)

Le taux horaire de croissance est le nombre de génération par heure est de 3.

Il y a division asynchrone.

Il y a départ de duplication avant la séparation/ségrégation, il y a plusieurs fourches de réplifications. cependant, le μ orga est plus fragile car on est dans une période de croissance exponentielle.

En quelques heures, on peut obtenir énormément de bactéries.

En 24h de développement, on peut arriver à 2000 fois le poids de la terre.

On peut faire de la μ bio prévisionnel en utilisant les maths pour prévoir.

Bactérie : - *Escherichia Coli* : in vitro : 20-40min et in vivo 5h - *staphylococcus aureus* : in vitro 40 min et 3-5h in vivo

cinétique de croissance en milieu liquide non renouvelé (culture batch = discontinuité)

- Phase de latence : le μ orga va sentir son environnement et donc voir ce qu'il va trouver dans son milieu. Il va y avoir activation de gènes (*E-Coli* : lactose => B-galactosidase ($C \times 1000$)), cette phase sera plus ou moins allongée en fonction du milieu et de la température
- Phase d'accélération : vitesse augmente : $\mu \Rightarrow$ cellules/heures, $\log(\text{cellules/heures})$
- Phase exponentielle : croissance exponentielle., le μ orga reste fragile car il se multiplie très vite
- Phase stationnaire : sorte de sinuséide où certaines bactéries mangent les autres mortes pour se développer donc il y a toujours ces sortes de vaguelettes. Le μ orga est extrêmement résistant de cette phase, on a un comportement plutôt agressif.
- Phase de déclin : le μ orga va mourir lentement et donc va être vulnérable

II méthode de mesure de la croissance

1 Nombre de cellules

a) Dénombrement au microscope

1) la lecture au microscope

lames qui sont très finement grillagées et on compte au microscope, on pose une quantité de liquide connue.

Il faut un substrat coloré pour compter.

1) Épifluorescence

On marque les porgas avec des marqueurs fluorescents. La molécule se loge dans l'ADN.

Il y a changement de couleurs si la cellule est vivante ou morte. On peut donc compter celle qui sont seulement vivante. Quand on compte, on peut surévaluer le risque.

Coloration au Napi

b) Dénombrement après culture (classique)

1) repiquage par dilution successive

On dilue l'échantillon de départ à chaque fois dix fois.

Si il y a trop de bactéries, il y a inhibition de croissance par contact d'une bactérie sur sa voisine.

La difficulté va être d'estimer le nb de porgas pour essayer de faire la bonne dilution.

La colonie va être visualisable s'il y a 1 à 10 millions de bactéries.

Pour remonter à la concentration initiale, il faut multiplier par le facteur de dilution.

UFC : Unité Formant Colonie

On ne dénombre que les porgas qui acceptent de se développer sur un support gélosé.

Il existe des Bactéries Cultivables : VBNC (viable non Cultivable) => bactérie qui ne poussent pas mais qui vont peut être, un jour pousser sur des boîtes de pétri.

2) Technique du nombre le plus probable (NPP)

On vaensemencer plusieurs tubes (avec 1ml, d'autres avec 1/10 ml et enfin 1/100ml) avec un milieu de culture avec des concentrations différentes de produit dans chaque tube et on incube. Après incubation, on va savoir ceux qui ont réagit.

Si il y a 3/5 tubes à 1ml, 2/5 tubes à 1/10ml et 0/5 tubes à 1/100ml, on a un code du type 320.

On est extrêmement peu précis car on est à plus ou moins 1 log => erreur très importante et donc une incertitude.

3) Technique de filtration sur membrane et incubation sur gélose

Une membrane va retenir les organismes et on les cultive sur une boîte de pétri. (filtration par vide d'air)

S'il y a trop de Mo ou de porgas, on peut se retrouver avec un tapis microbien ou un colmatage.

2 Mesure de la masse

a) Détermination du poids sec

On récupère les cellules à un temps $t + t_0$ et on pèse le poids sec des cellules.

b) Mesure du trouble

$\log(I/I_0)$ représente l'absorbance (A) en fonction de la turbidité du milieu avec un spectrophotomètre

$$\log(I_0/I) = kCL$$

L = trajet optique, épaisseur de la cuve,

C = concentration ou biomasse

k = constante ou coeff d'absorption

D.O600 : densité optique

La D.O peut correspondre au nombre de cellule, la taille des bactéries

Pour une cuve de 1cm de trajet optique.

$$\log(I_0/I) = k \cdot C$$

Croissance bactérienne = trouble de bouillon

III) Mesure de l'activité

mesure de consommation de substrat

Mesure des produits d'excrétion

Acide lactique

Mesure des constituants cellulaires

On peut aussi mesurer l'ATP dans la bactérie => + il y a d'ATP, + il y a de croissance (presque vrai)

Mesure des variations physico-chimiques du milieu

Mesure du pH, T°

Influence de l'environnement sur la croissance microbienne

- Substrat
- **Température**
- **pH**
- **Aw** : activité de l'eau
- O₂
- Pression
- Radiation

a) Culture continue : Chémostat et Turbisostat

Chémostat

b) Le pH

Les bactéries peuvent être (pH) neutrophile, acidophiles, alcalinophile.

c) Le substrat

Prolonger la phase de croissance

Renouveler le milieu

Éliminer les produits du métabolisme

d) La température T°

Résistance à T° :

Gram+ (sporulant végétatifs) < Gram- < Gram+ < spores

Pour la température, on a une courbe avec Tmin, T_{opt} et Tmax de type

e) L'eau (Aw)

L'activation par l'eau traduit la biodisponibilité de l'eau et la rétention de l'eau se fait par les composants de support (substrat)

Il faut de l'eau libre (mais pas trop) (0.93 et 1 d'eau libre) et peu d'eau liée.

/! contresens : Moisissure (0.6-1)

f) l'O₂

On peut donner le besoin d'Oxygène par le potentiel Rédox (élevé = aérobie; faible = anaérobie)

Type d'aérobie : Anaéro-Aéro-facul (AAF)

Cela traduit la tolérance du μ orga à l'O₂

Les UV (200nm) sont utilisés pour la stérilisation car ça endommage l'ADN des bactéries et elles ne peuvent pas réparer ces erreurs. Au départ, il y a le bactériostatisme (le temps de réparer les erreurs, 1.5Mrad) puis si on continue, on va à la bactéricide (tue, 3 Mrad)

Les radiations ionisantes font la même chose.

III Agents antimicrobien

a) Agents physiques

Stérilisation

Chaleur humide et sous-pression : autoclave entre 115°C et 130°C pendant 10-30 min (traitement de 121°C/15min) cependant 130/30 pour les supports inertes et 110/10 pour le reste

Chaleur sèche : four

Filtration sur membrane

Forcer le liquide à passer sur des membranes ; pour éviter d'exposer le produit à 1 traitement T°, membrane entre 0.45µm et 0.22µm

Pour traiter un produit, il vaut mieux utiliser un acide faible.

b) Agents chimiques

Les désinfectants, les antiseptiques => les biocides les antibiotiques : caractéristique du mode d'action et du spectre d'hôtes. Ça peut aller sur l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne, inhibition de la synthèse de la membrane cytoplasmique;

Activité antibactérienne :

Méthode des disques ou de diffusion (petit disques qui contiennent l'élément et on place le tout sur une boîte de pétri et on observe les disques qui se forment (ou pas) autour du disque.

Chap 3 - Le métabolisme

I Fonctionnement et multiplication

Comment se développent les microorganismes ?

Tout microorganisme finissent par mourir.

1) Alimentation

Objectif de croissance, pour la multiplication (fabrication des membranes, ...) flux sortant entraîne le flux sortant.

Les enzymes vivent très peu longtemps et donc elles s'inactivent toute seule au bout d'un certain temps

Les aliments simples sont absorbés à travers la membrane. Ils sont directement utilisables : eau, sels minéraux, sucres simples, ... Les aliments complexes doivent être préalablement digérés par les enzymes : sucres complexes, protéines, ...

Il y a donc une digestion externe (par les enzymes) de la molécule complexe en molécules simples (**catabolisme**) et il y a assimilation par la bactérie pour en faire des chaînes pour la bactérie (**anabolisme**).

a) Les enzymes sont des machines-outils du micro-organismes.

Catabolisme des sucres

Source de sucre : polysaccharides (avec hydrolase puis isomérase), dérivés des sucres (hydrolases), diholosides (hydrolases puis isomérase) ==> **Glucose ou autres sucres**

Si on a autre chose que le glucose, il va y avoir des enzymes qui vont modifier le sucre et l'incorporer dans une voie métabolique.

Glucose \rightarrow **pyr** \rightarrow Ac lactique (homofermentaire) ou autrement $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ (oxydatif) \rightarrow Cycle de Krebs ou autrement chaines respiratoires (au niveau de la mb cytoplasmique des bactéries et accepteur terminal : H_2O) \rightarrow cytochrome oxydase C (peut être évalué si ici ou pas)

Voie des pentoses phosphates \rightarrow **pyr** ou acide acétique ($\rightarrow \text{CO}_2$) - - \rightarrow éthanol (hétérofermentaire)

Les lactobacilles peuvent produire des L-lactate ou des D-lactate en fonction de ce qu'on a besoin.

Catabolisme des protéines

Protéines (protéase) \rightarrow a.a

Protéolyse :

- primaire : génération de macropeptides \rightarrow endopeptidases
- secondaire : a.a libres et (\downarrow)petits peptides \rightarrow exopeptidases (carboxipeptidases et aminopeptidases)
- tertiaires : décarboxylation (amines et CO_2) ou désamination (simple ou oxydatives) \rightarrow acide alpha-cétonique ou AGs (production de NH_3)

Désamination oxydative en milieu basique aérobie

- Désamination oxydative à FAD : 1 seule réaction
- Déshydrogénase à NAD : 2 réactions possibles
- Désamination réductives
- Désamination par déshydratation

Les acides alpha-cétonique vont permettre la génération de a.a ou de protéines pour la membrane.

L'ammoniac (NH_3) permet de réguler les effets du pH autour de la cellule pour rester proche de la neutralité.

Il existe des réactions particulières

- Production d'indole en présence de tryptophanase
- Production d' H_2S à partir d'acides aminés soufrés
- Arginine dihydrolase : ADH (génération d'ammoniac, d'urée et d'ATP)

Catabolisme de l'urée

Urée $\rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$ (uréase)

Métabolisme lipidique

Apport lipidique facultatif !

Processus extra-cellulaires)

Phospholipides \rightarrow acide phosphatidique + choline (lécithinases)

Triglycérides \rightarrow AG + glycérol (lipases)

Ester d'AG \rightarrow acide gras + alcool (estérases)

Dégradation des lipides \Rightarrow produits des valeurs aromatiques

b) Les microbes produisent de l'énergie

Pour fonctionner, un microbe a besoin d'énergie.

cette énergie est produite sous deux formes :

- Chaleur
- Énergie chimique \rightarrow ATP pour le fonctionnement des enzymes.

Les microbes qui ne savent faire **que** la respiration sont des "aérobies strictes".

Les microbes qui ne savent faire **que** la fermentation sont dits "anaérobies strictes".

Les autres sont dits aérobies facultatifs (AAF) si ils peuvent faire les deux.

Type respiratoire \leftrightarrow type fermentaire

- aérobies : obligatoirement oxydatif ; pas fermentaire
- AAF : oxydatif : ça dépend mais aussi fermentaire
- anaérobies : pas oxydatif donc fermentaire, cependant il existe des cas à part qui sont oxydatifs (avec du SO_4 ou NO_3)

c) Les microbes rejettent des déchets

- respiration : H_2O , CO_2
- fermentation : alcool, acides, gazs
- digestion : ammoniac (NH_3), sulfure d'hydrogène (HSO_4)

d) Mobilité des microbes

Mobilité \rightarrow état frais

VF : déplacements flagellaires

Défense passive \rightarrow paroi et glycocalyx (recherche de capsules)

Défense actives \rightarrow production antimicrobienne (toxines) : prod antibiotique ou bactériocides

Défense par adaptation -> mutants adaptés au changement de conditions environnementale

Caractérisation != indentification

- identification : recherche quel est le nom du porga dans la nomenclature internationale : position taxinomique (genre et espèce)
- caractérisation : recher des caractéristiques du porga (sur de la biochimie, sur de la morphologie, sérologie, déterminants génétiques)

Arbre de décision : (réalisation de différents tests)

en premier

- Gram (via la coloration de gram) : gram +/-, forme (bacille, coques, autres), arrangement (coque, diplo, chainette), spores
 - gram + :
 - * bacilles
 - * coques
 - gram - :
 - * bacilles
 - * coques

On fait :

second

- la recherche de la catalase

troisième

- recherche de la mobilité

- présence de capsules

- présence de spores

quatrième

- type respiratoire

- type métabolique → tests biochimiques (galeries api)

2) Respiration

Produire de l'énergie pour le déplacement

3) Production de déchets

Ammoniac peut permettre l'homéostasie

4) Déplacement

capacité du porganisme à se mouvoir (par la nage ou la reptation)

5) Défense contre les agressions

Défense par adaptation (capacité à évoluer dans un milieu changeant)

6) Reproduction

Transfert génétique de mère <-> fille : transfert vertical

transfert à côté dans une autre cellule : transfert horizontal par conjugaison, transformation et transduction

Chap 4 - Taxinomie

Approche systématique

Arbre de classification orienté de deux manières :

- filiation entre les différentes évolutions : noeds = ancêtre commun
- sur l'ensemble des caractères qui caractérise le porga

A chaque étpe, le degrès de parenté va s'accroître

Nom latin en deux parties

1ere partie : nom en *italique* débutant par une majuscule

2eme partie : nom en *italique* en minuscule

Ex : *Shigella dysenteriae*

Nom générique et épithète

On connaît plusieurs milliers d'espèces identifiées.

Espèce :

- ensemble de porga présentant tous des traits communs et différents d'un autre groupe de porgas
- deux bactéries sont de la même espèce si leur G/C % soient identiques (ADN) et le taux d'hybridation d'ADN soit > 70 %

Souche :

- identifié comme un individu, bactérie qui présente un certains nombre de caractéristiques (réservé qu'à un porga connu) → souche type (1er porga qui a été isolé)

Biovar :

- activité du porga +/- des autres espèces

Morphovar :

- morphologie différente

Sérovar : - identification de marqueurs sérogénétique (*antigène* => O : sommatique, H : flagellaire, K : capsule)