

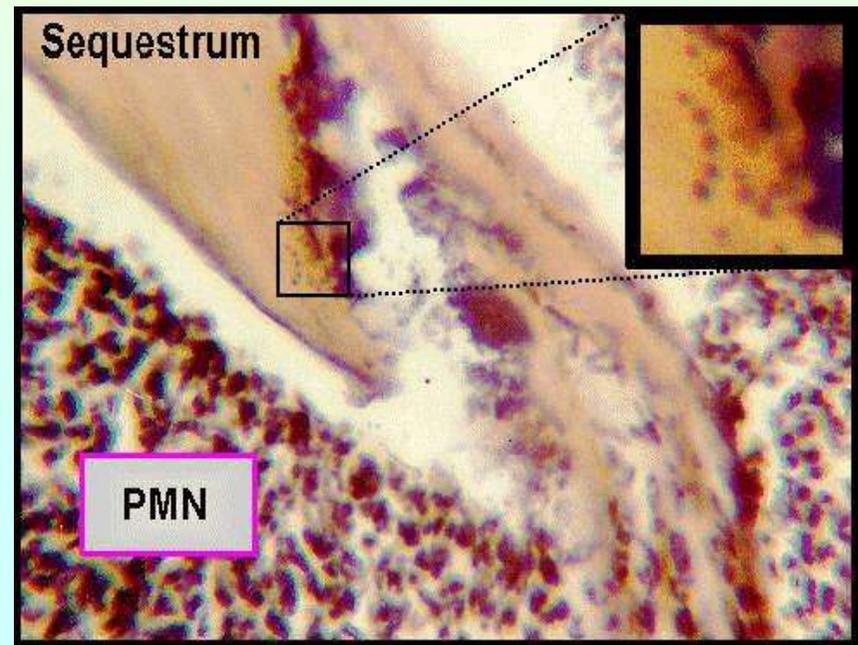
Nutrition et croissance bactérienne

Besoins

- Aliments constitutifs
- Aliments énergétiques

- ration de croissance (propre poids en 24 h)
- ration entretien (rester vivante)(1/500)

« sleeping bacteria »

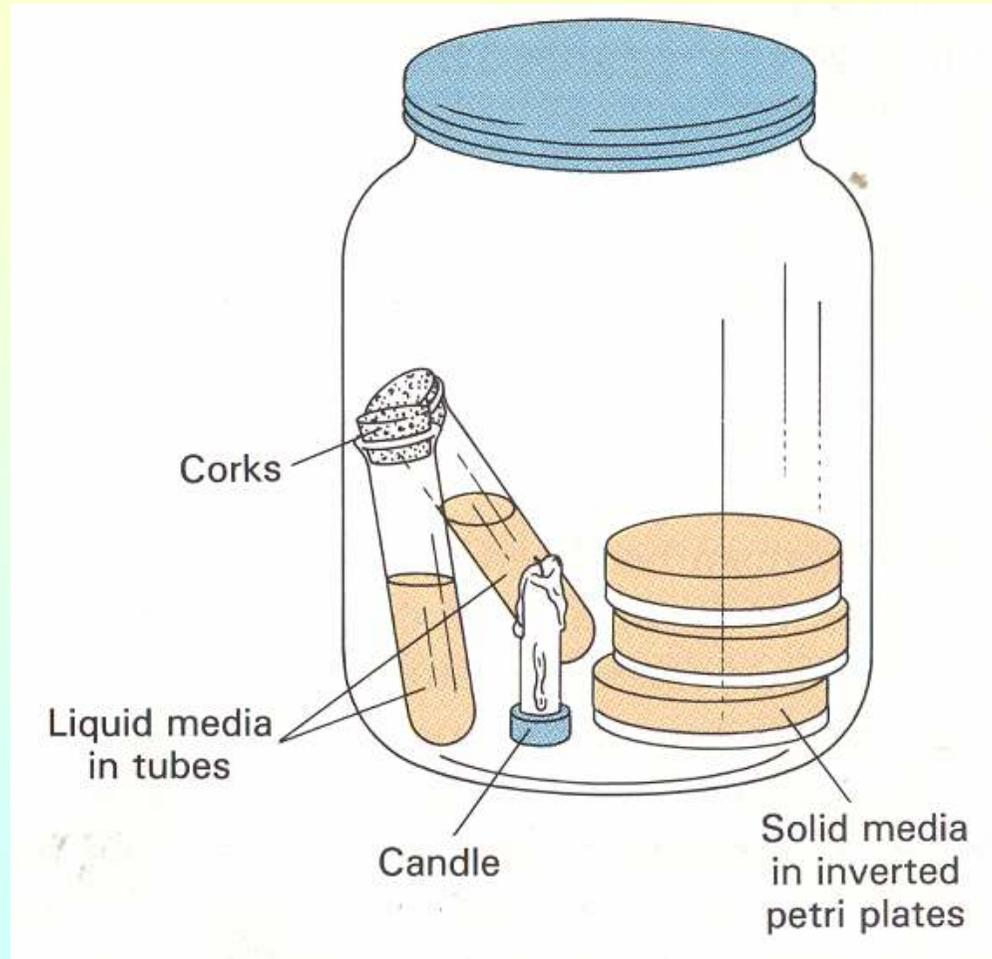


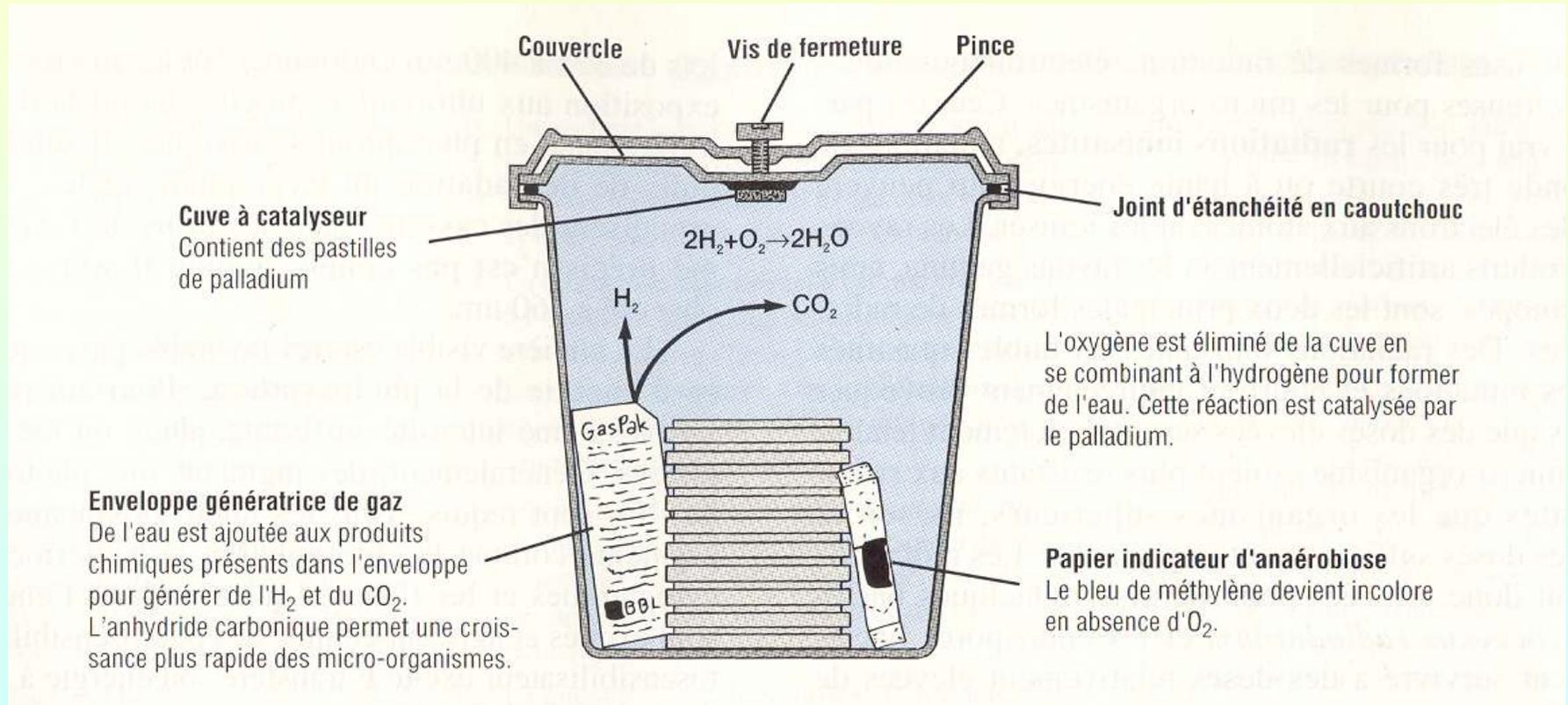
I - Nutrition

- **A – Besoins énergétiques et élémentaires**
- 1. Source d'énergie
 - bactéries chimiolithotrophes (minérale)
 - cycle de la matière vivante sols et eaux
 - bactéries oxydant l'ammoniaque (*Nitromonas*)
 - bactéries oxydant les nitrites (*Nitrobacter*)
 - bactéries chimioorganotrophes (organique)
 - bactéries d'intérêt médical

I - Nutrition

- **A – Besoins énergétiques et élémentaires**
- **2. Source de carbone**
 - bactéries autotrophes
 - CO₂ comme seule source de carbone
 - bactéries hétérotrophes
 - composés organiques
 - rôle du CO₂ (stimulant des cultures)
 - (*Brucella*, *Salmonella Typhi*, ...)





I - Nutrition

- **A – Besoins énergétiques et élémentaires**
- **3. Source d'azote**
 - protéines 10 % du poids sec
 - fixation azote moléculaire (*Rhizobium*)
 - nitrites (*Nitrobacter*)
 - source organique groupements aminés des composés organiques (R-NH₂)

I - Nutrition

- **A – Besoins énergétiques et élémentaires**
- 4. Soufre et phosphore
 - soufre : présent chez certains acides aminés
 - groupements thiols (-SH)
 - phosphore : composant des acides nucléiques et coenzymes de l'ATP

I - Nutrition

- **A – Besoins énergétiques et élémentaires**
- 5. Autres éléments minéraux
 - constituant d'enzyme et coenzyme
 - fer, magnésium
 - oligoéléments (cofacteurs ou activateurs enzymatiques)
 - calcium, cobalt, cuivre, manganèse, vanadium, ...

I - Nutrition

B – Besoins spécifiques-Facteurs de croissance

« substances organiques indispensables que la bactérie est incapable de synthétiser »

acides aminés,

bases puriques et pyrimidiques,

vitamines

I - Nutrition

B – Besoins spécifiques-Facteurs de croissance

bactéries prototrophes

– ne nécessitent pas de facteurs de croissance

- bactéries auxotrophes

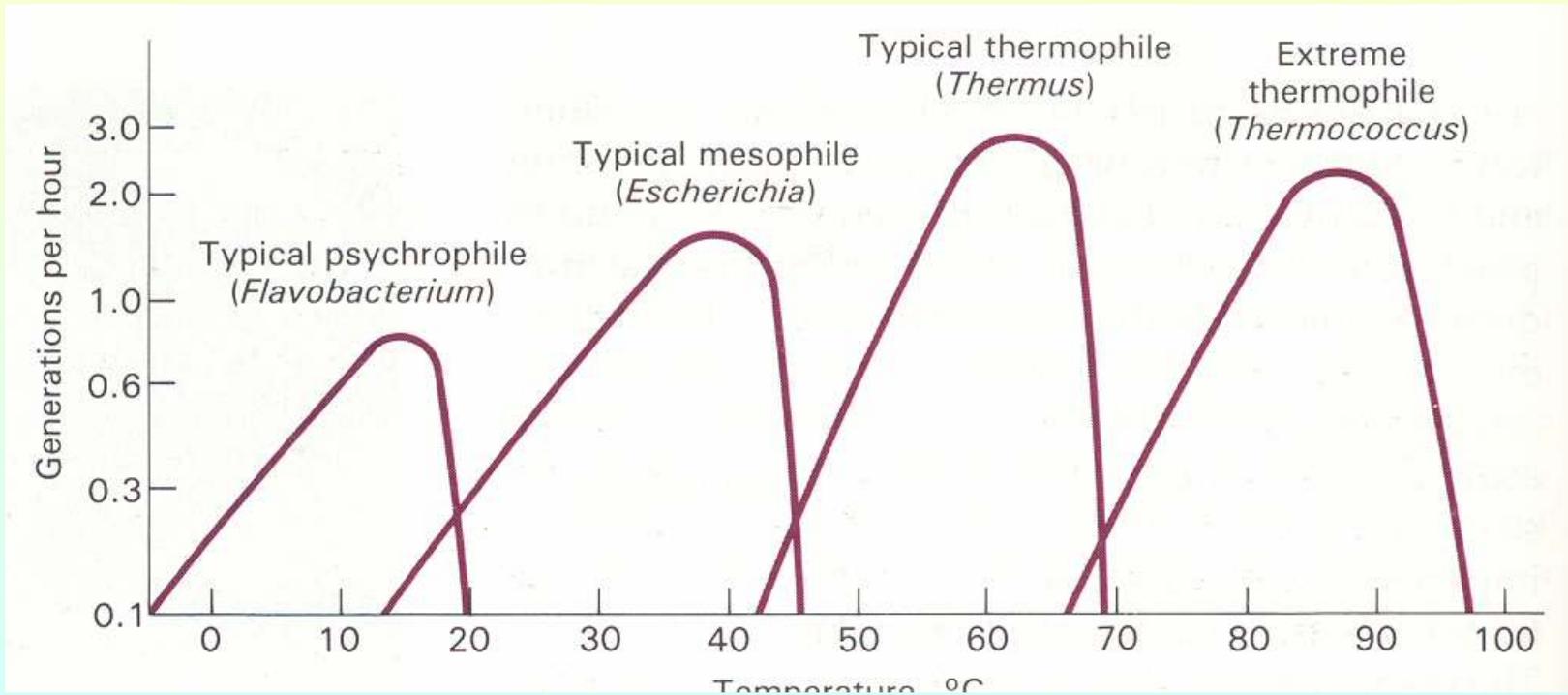
– nécessitent des facteurs de croissance

I - Nutrition

C – Facteurs physiques

1. Température

- bactéries mésophiles (20-40°C)
- bactéries psychrophiles (voisine 0°C)
- bactéries thermophiles (45-65°C)



I - Nutrition

C – Facteurs physiques

2. pH

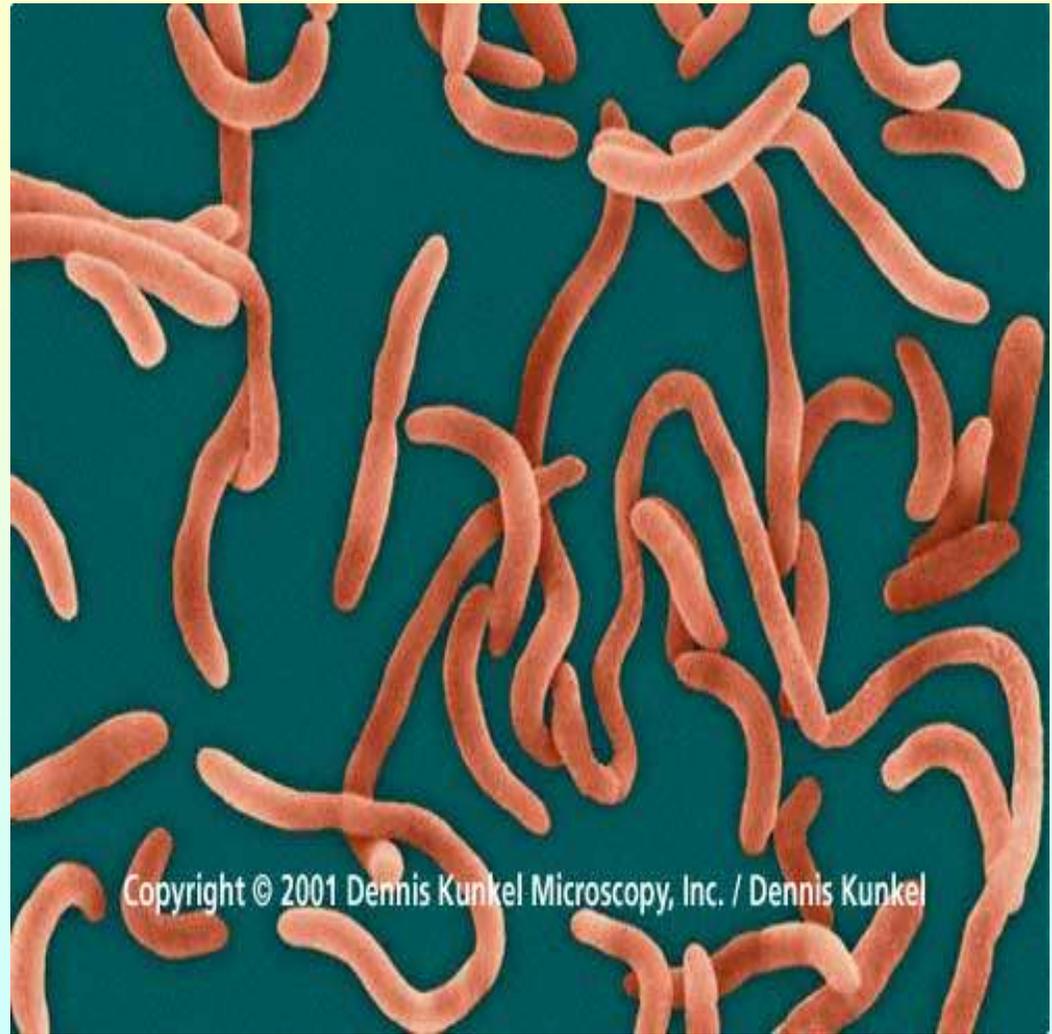
– 7 à 7,5

– bactéries acidophiles (*Lactobacillus* -pH 6)

– bactéries basophiles (*Vibrio*-pH 9)

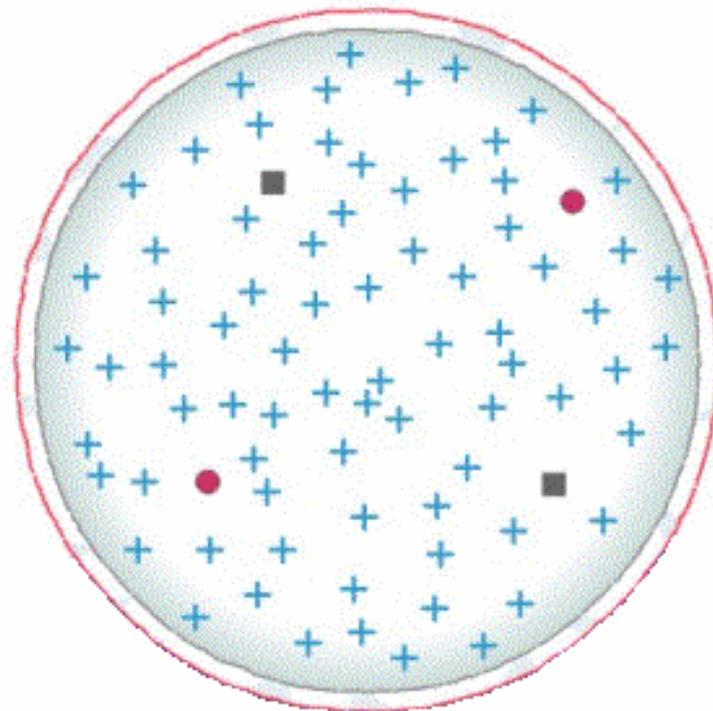


Lactobacillus



Vibrio

La flore vaginale « normale »



- + Lactobacille : 95%
- Gardnerella
- Bactéroïdes



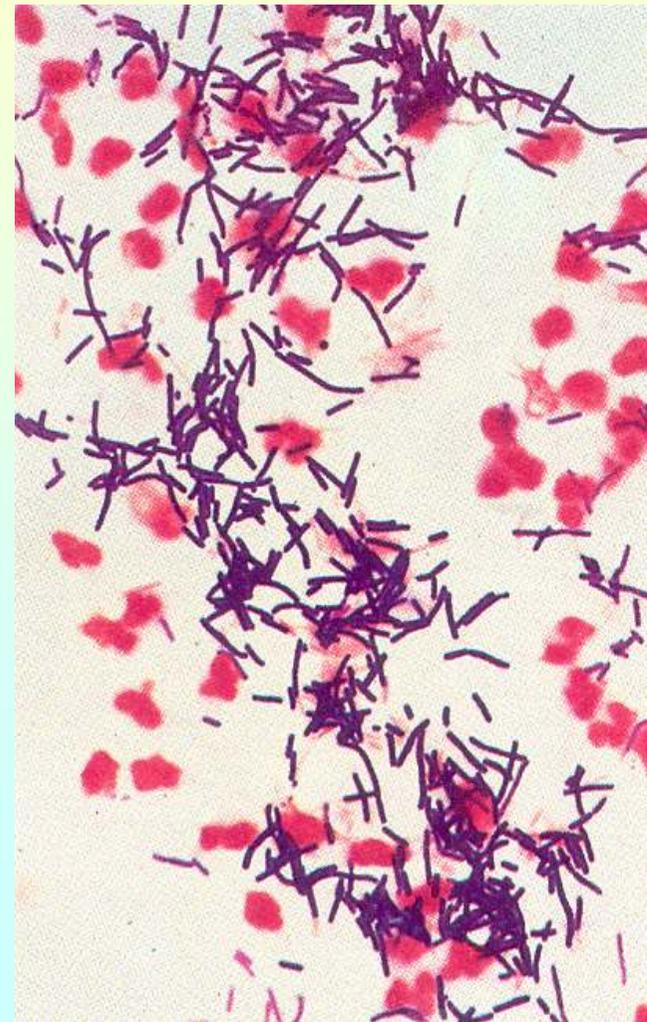
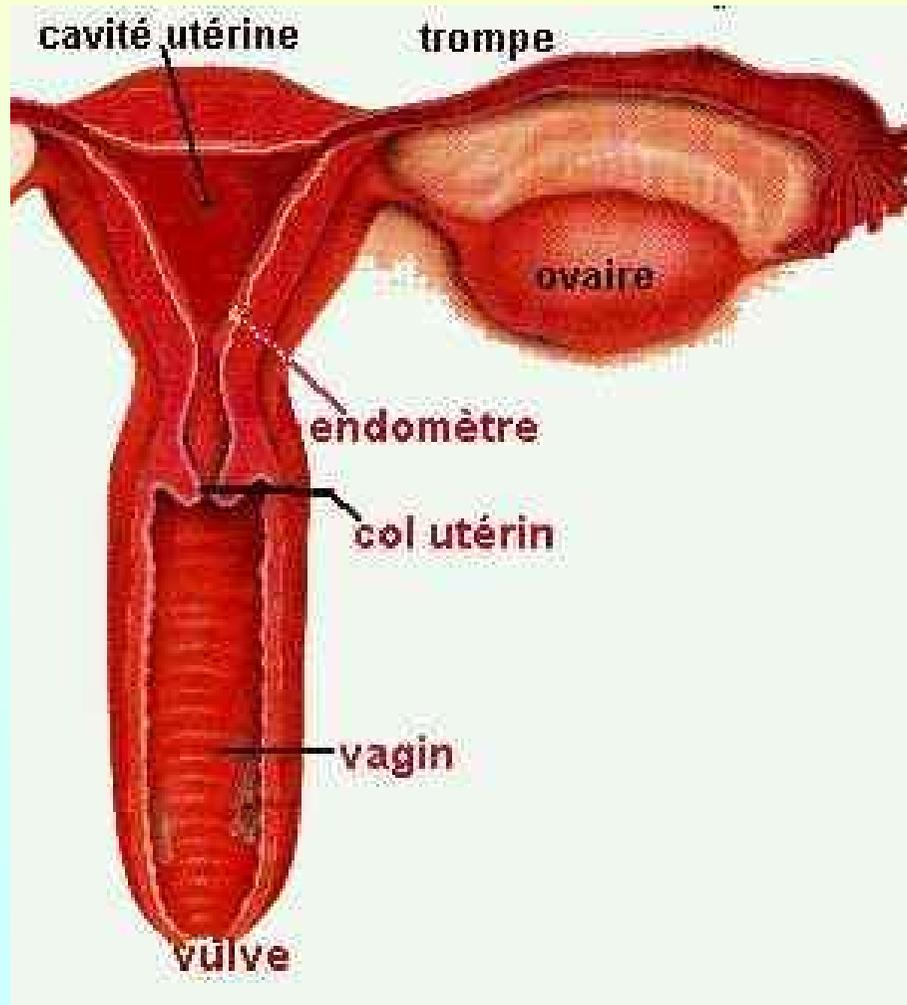
VAGINOSE BACTERIENNE:

DEFINITION

La vaginose bactérienne est caractérisée par :

- une **profonde modification de la flore commensale** du vagin
- avec la quasi disparition des *Lactobacilles*,
- ainsi qu'un développement anormal de trois types de micro-organismes: *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* et différents types d'anaérobies

Vaginoses



Vaginose

- La prévalence se situe en France entre 15 et 20 %
 - 16 - 29 % des femmes enceintes
 - 5 - 25 % des femmes âgées entre 17 et 25 ans
 - 20 - 60% des consultations d'IST



Lactobacillus



Vibrio



Illustration of a man eating at a table



The Year of 1850



Illustration of a man eating oysters at a table. The Year of 1850.

I - Nutrition

C – Facteurs physiques

2. pH

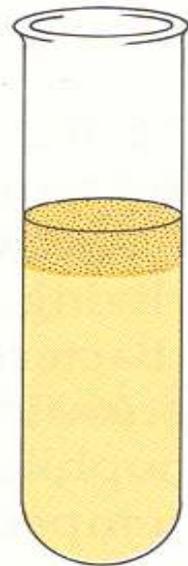
– solutions tampons

- phosphates (K_2HPO_4 , KH_2PO_4)

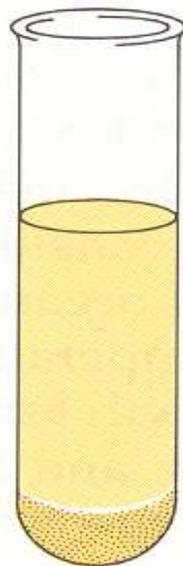
I - Nutrition

C – Facteurs physiques

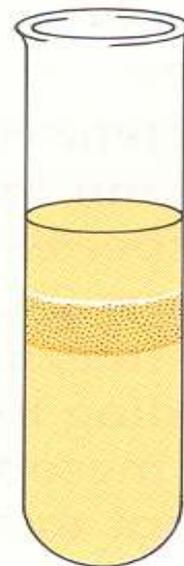
3. Exigences gazeuses



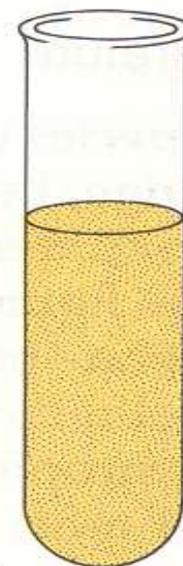
Obligate
aerobe



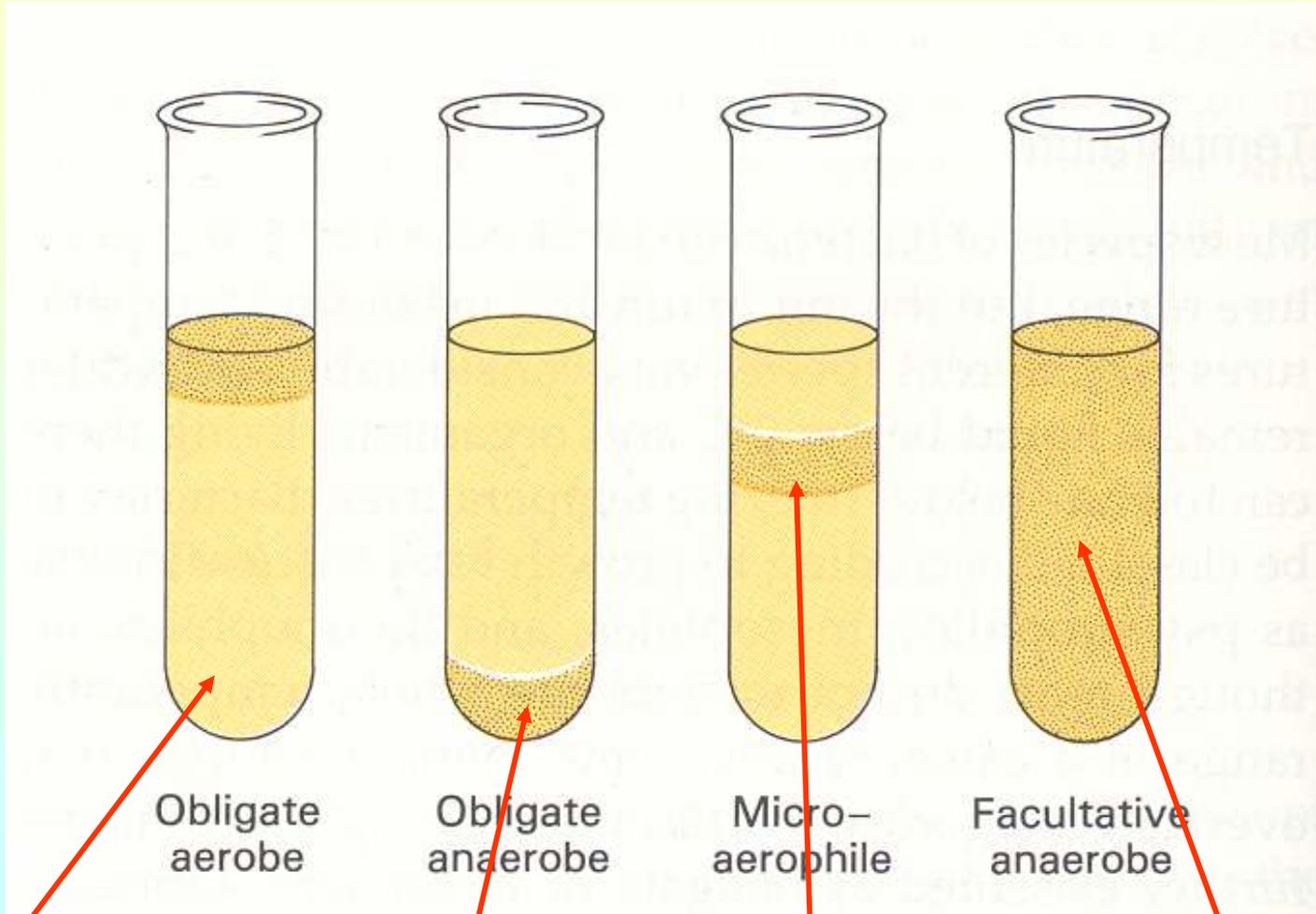
Obligate
anaerobe



Micro-
aerophile



Facultative
anaerobe



Obligate
aerobe

Obligate
anaerobe

Micro-
aerophile

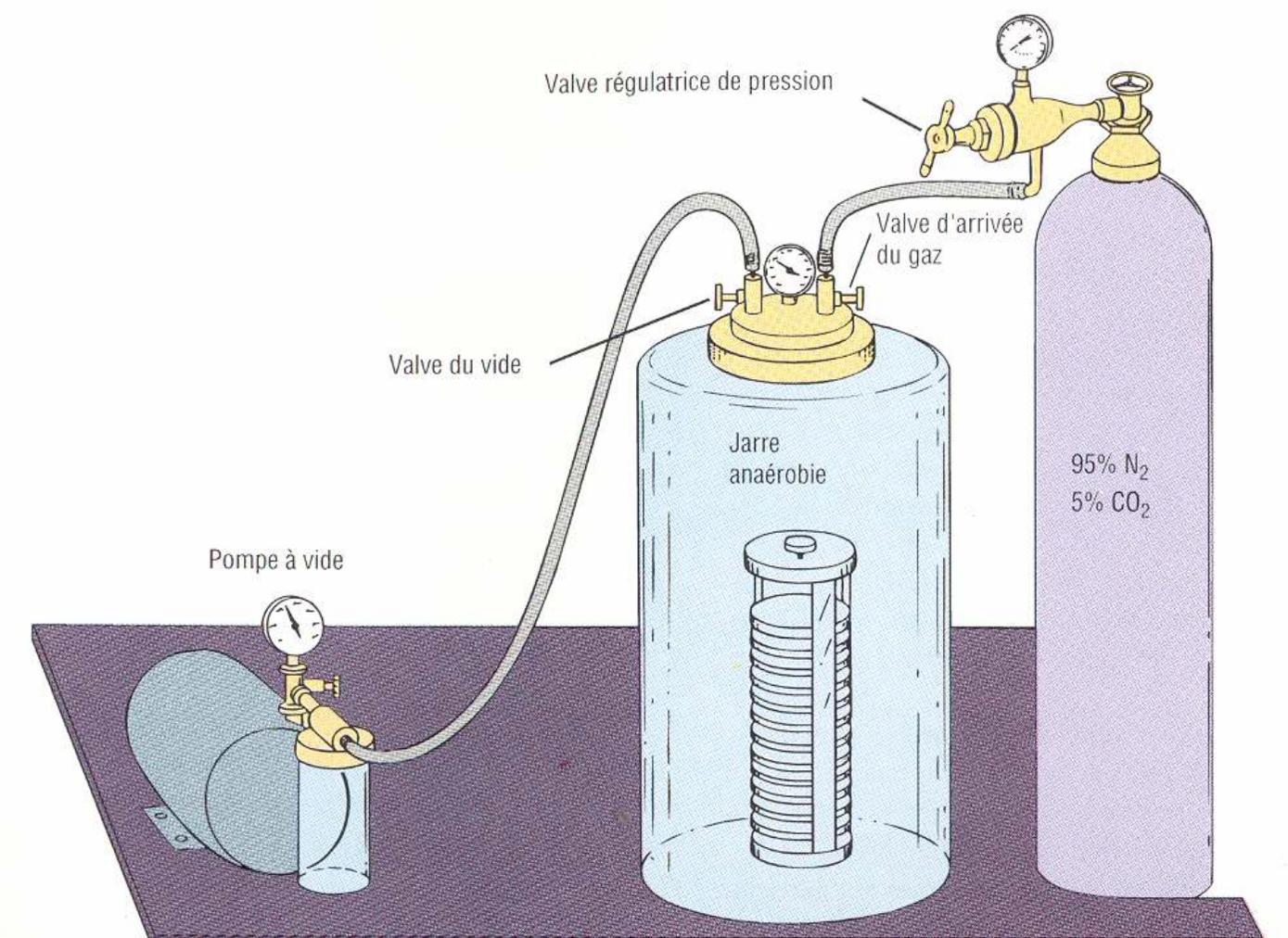
Facultative
anaerobe

Pseudomonas
Neisseria

Clostridium
Bacteroides

Campylobacter
Streptococcus

Entérobactéries
Staphylocoques

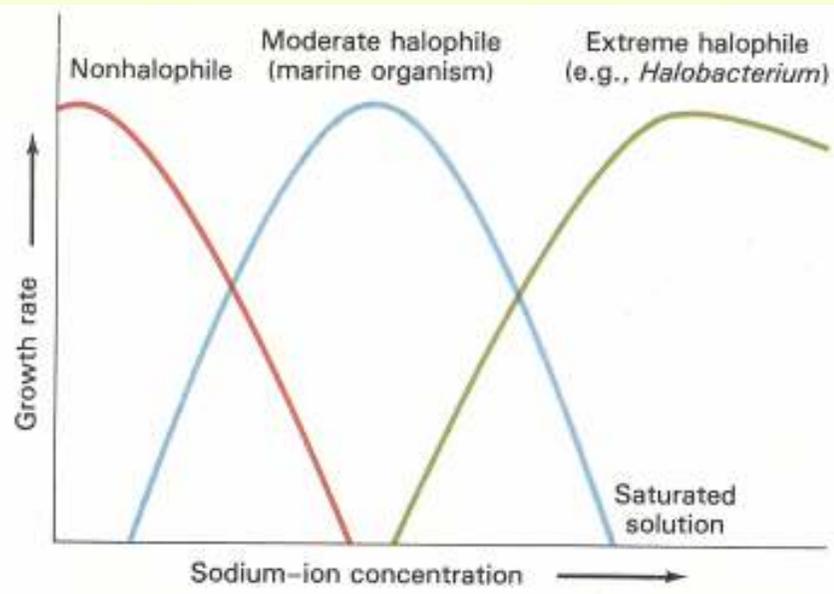


I - Nutrition

C – Facteurs physiques

4. La pression osmotique

- plupart des bactéries insensibles car paroi
- bactéries marines (35 g NaCl/l) : halophiles
 - bactéries des saumures (Vibrions halophiles)



(a)

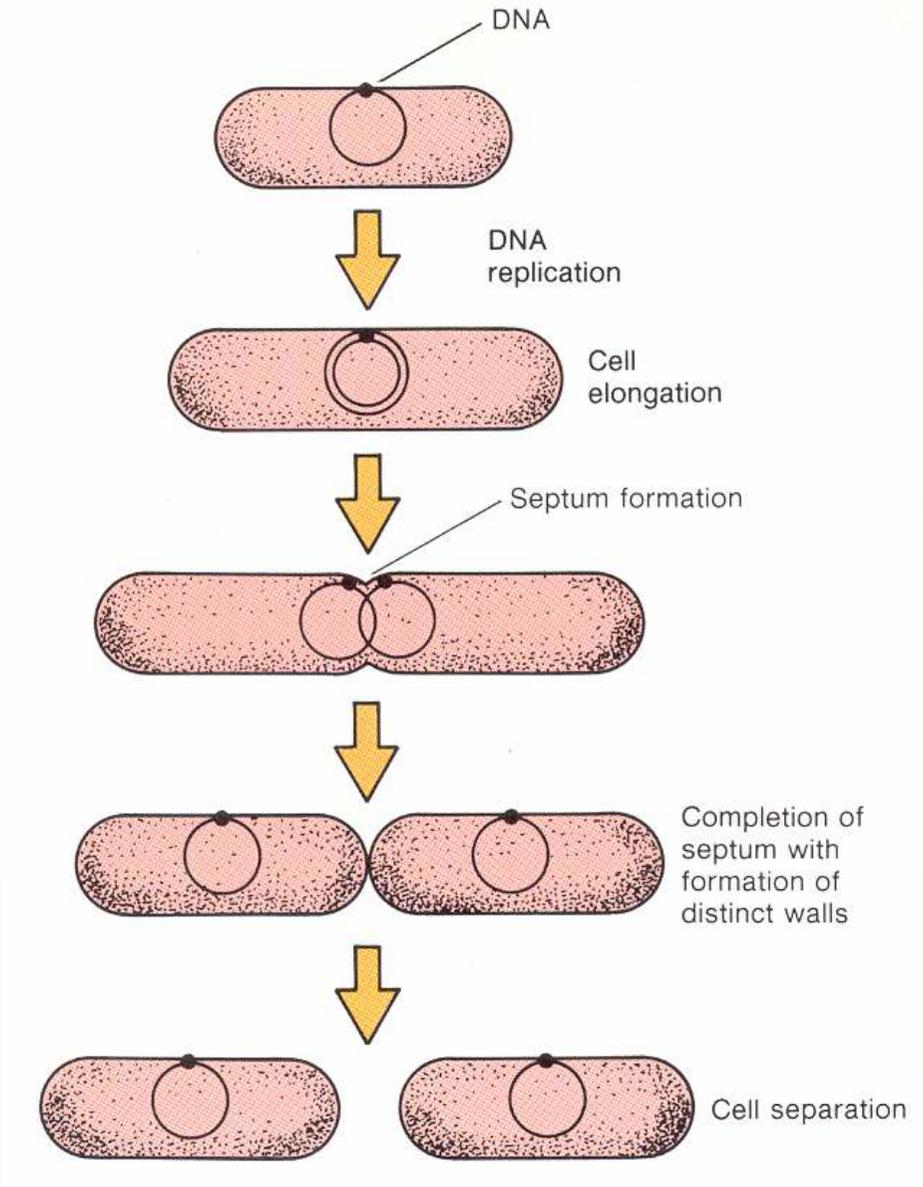


(b)

II - Croissance

« accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme »

- appauvrissement du milieu
- enrichissement en certains métabolites



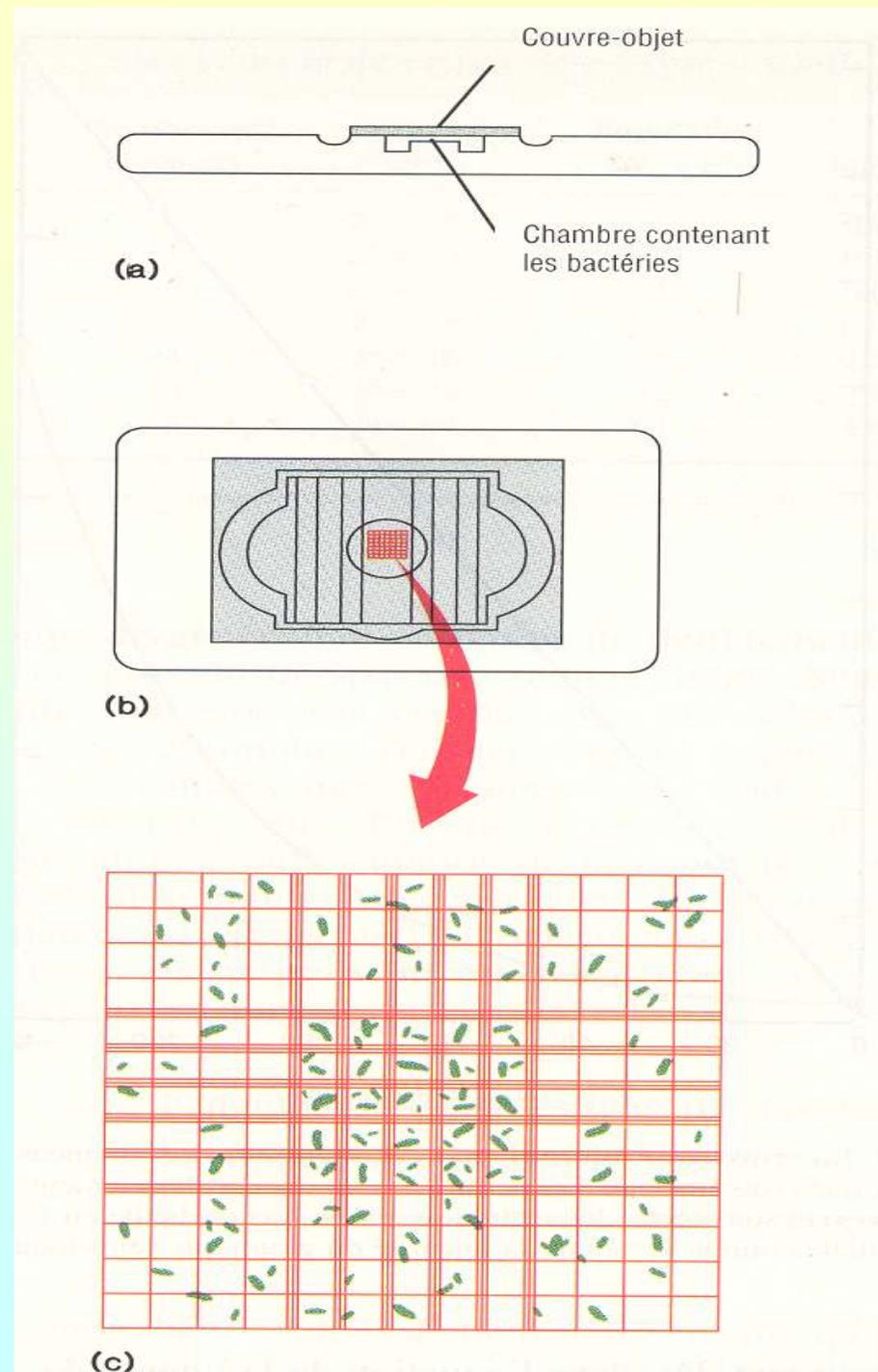
II - Croissance

A – Mesure de la croissance

1. Mesure du nombre

- a) Lecture au microscope
- hématimètre (cellule de Petroff-Hausser)
- rapide
- peu sensible
- pas de distinction cellules mortes et vivantes

Cellule de Petroff-Hausser



II - Croissance

A – Mesure de la croissance

1. Mesure du nombre

- b) Epifluorescence
- coloration par fluorochrome (acridine orange) fixation sur ADN
- peu sensible
- pas de distinction cellules mortes et vivantes

II - Croissance

A – Mesure de la croissance

1. Mesure du nombre

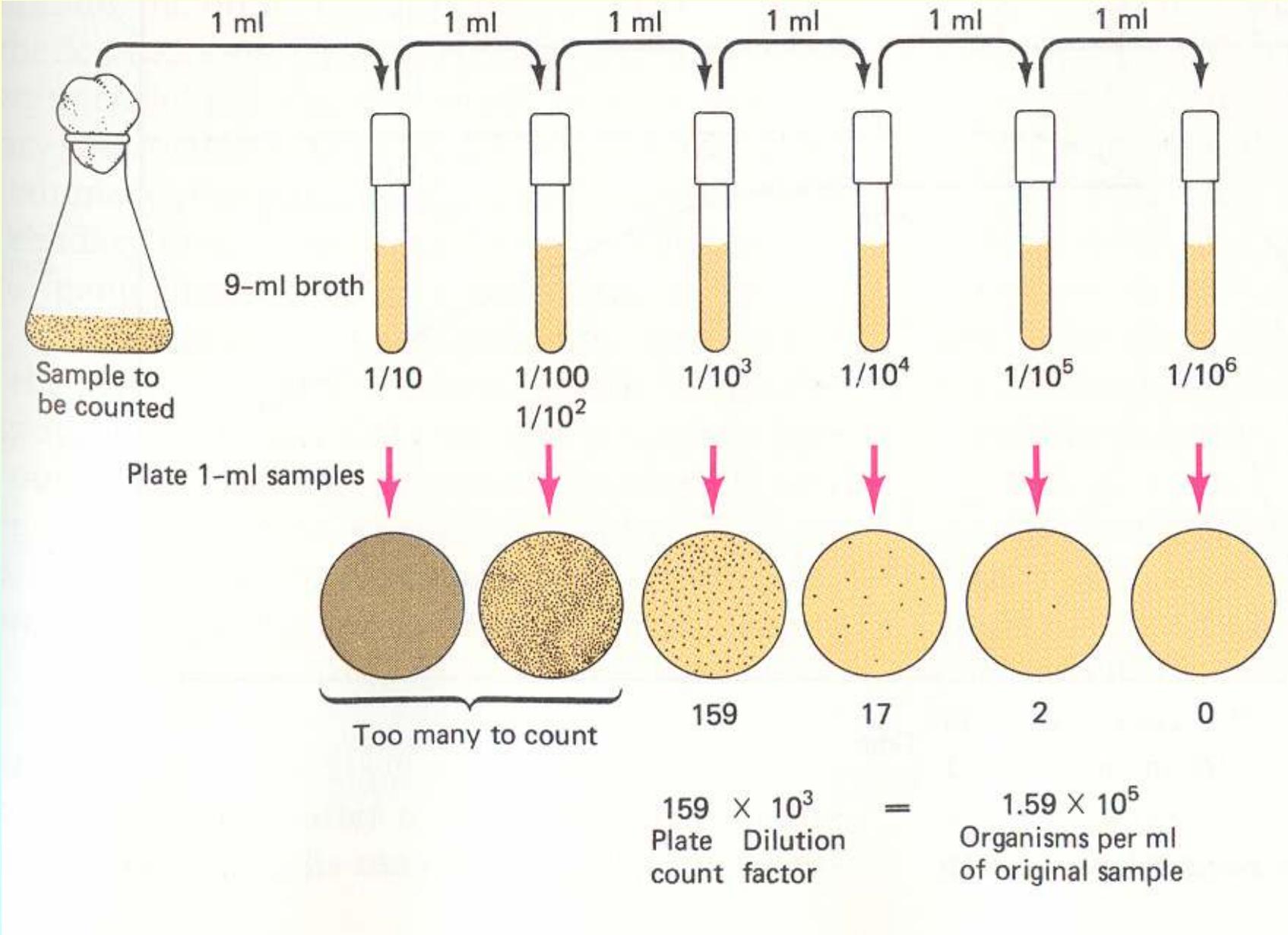
- c) Compteur de particules
- tube cylindrique : micro-orifice
- déplacement de volume de solution conductrice égal à son propre volume
- cellules de grande dimension (protozoaires, levures, algues)
- bactéries problèmes (particules inertes)
- pas de distinction cellules mortes ou vivantes

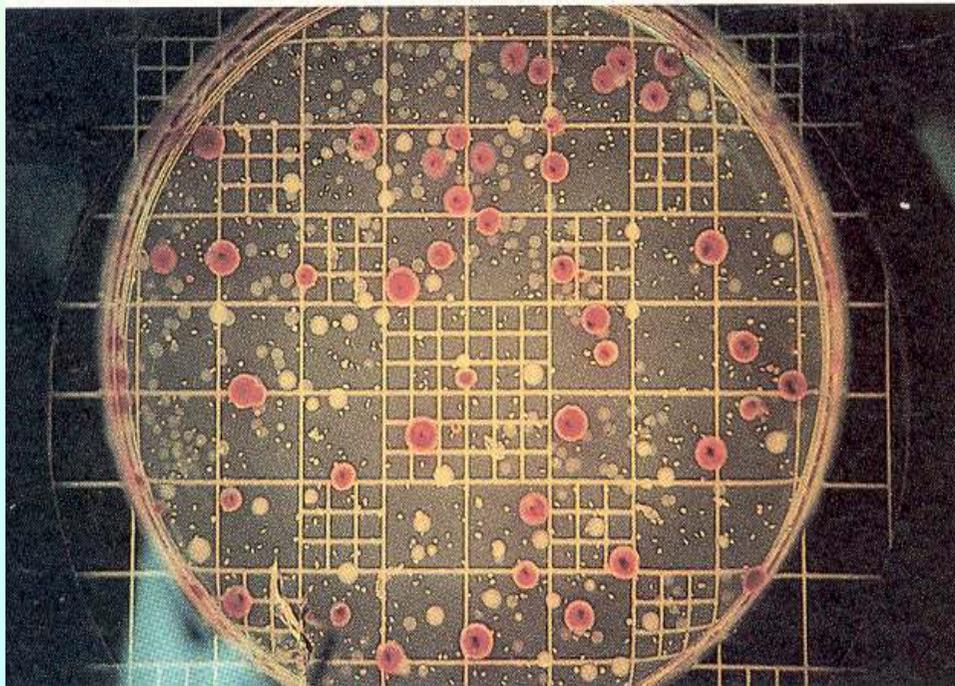
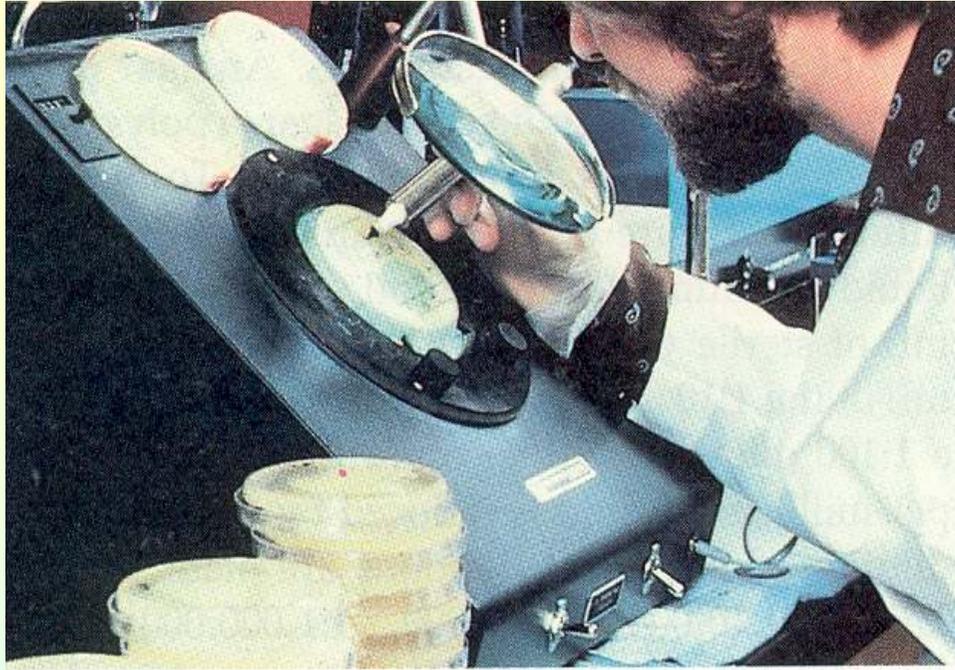
II - Croissance

A – **Mesure de la croissance**

1. Mesure du nombre

- d) Dénombrement après culture





II - Croissance

A – Mesure de la croissance

1. Mesure du nombre

– d) Dénombrement après culture

- expression en UFC (unités formant colonies)
- avantages : bactéries vivantes
- inconvénients : long

II - Croissance

A – Mesure de la croissance

2. Mesure de la masse

– a) Détermination du poids sec

- centrifugation ou filtration
- séchage à 100-110°C
- inconvénients :
 - peu précis
 - pas de distinction cellules mortes et vivantes



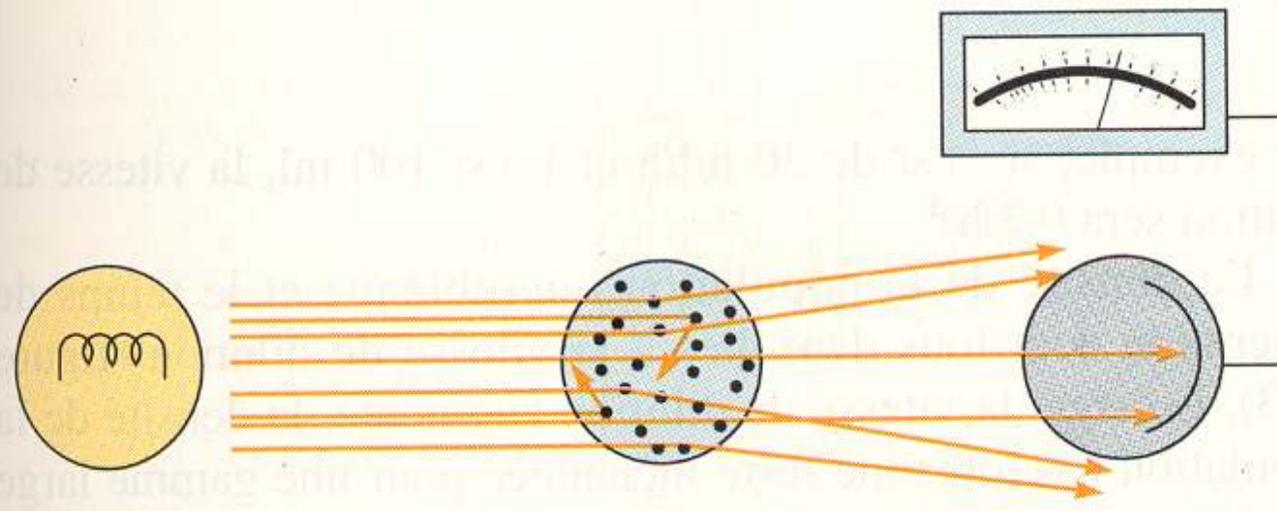
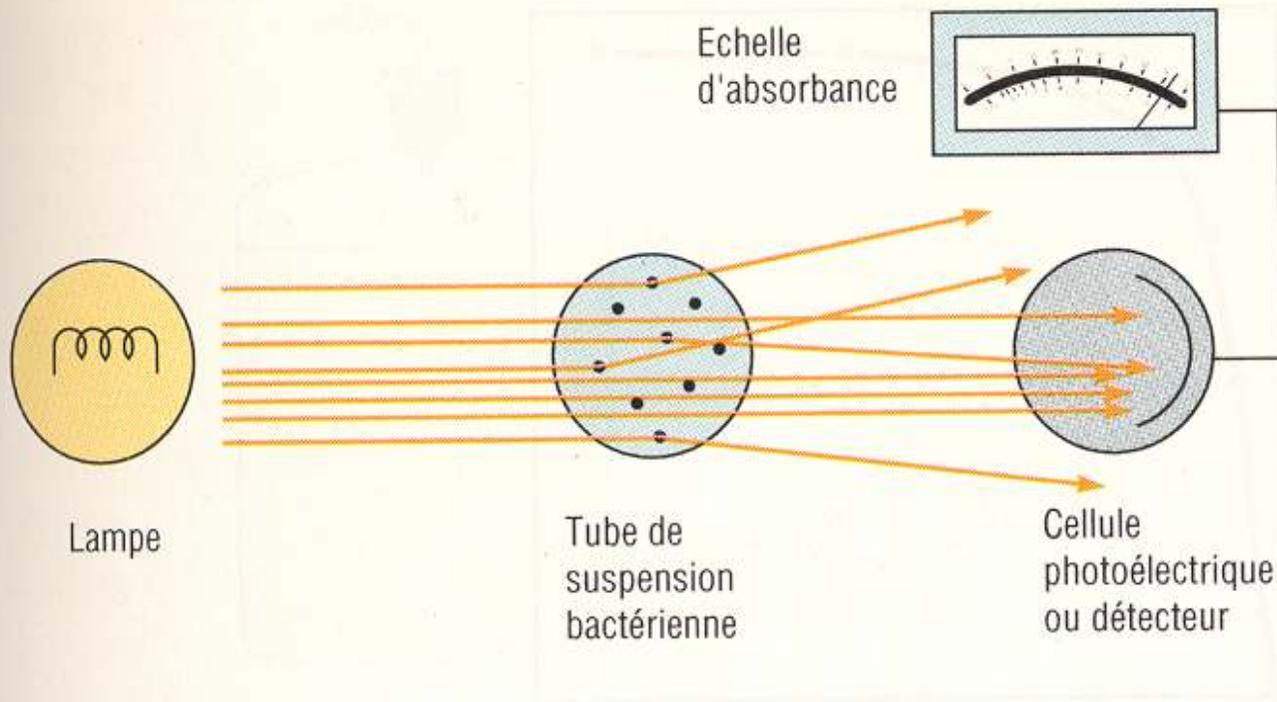
II - Croissance

A – Mesure de la croissance

2. Mesure de la masse

– b) Mesure du trouble





II - Croissance

A – Mesure de la croissance

2. Mesure de la masse

- b) Mesure du trouble

- 650 nm

- Absorbance (DO) = \log_{10} de $I_0/I_t = kC$

- k : coefficient d'absorption

II - Croissance

A – **Mesure de la croissance**

2. Mesure de la masse

– b) Mesure du trouble

– Problèmes

- milieux très colorés
- milieux très troubles
- pas de distinction cellules mortes

II - Croissance

A – Mesure de la croissance

3. Mesure de l'activité

- a) Mesure de la consommation de substrat
- Oxygène

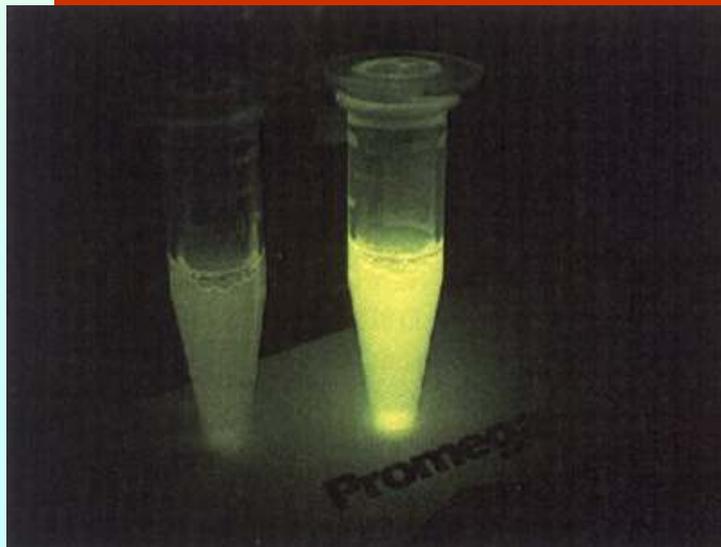
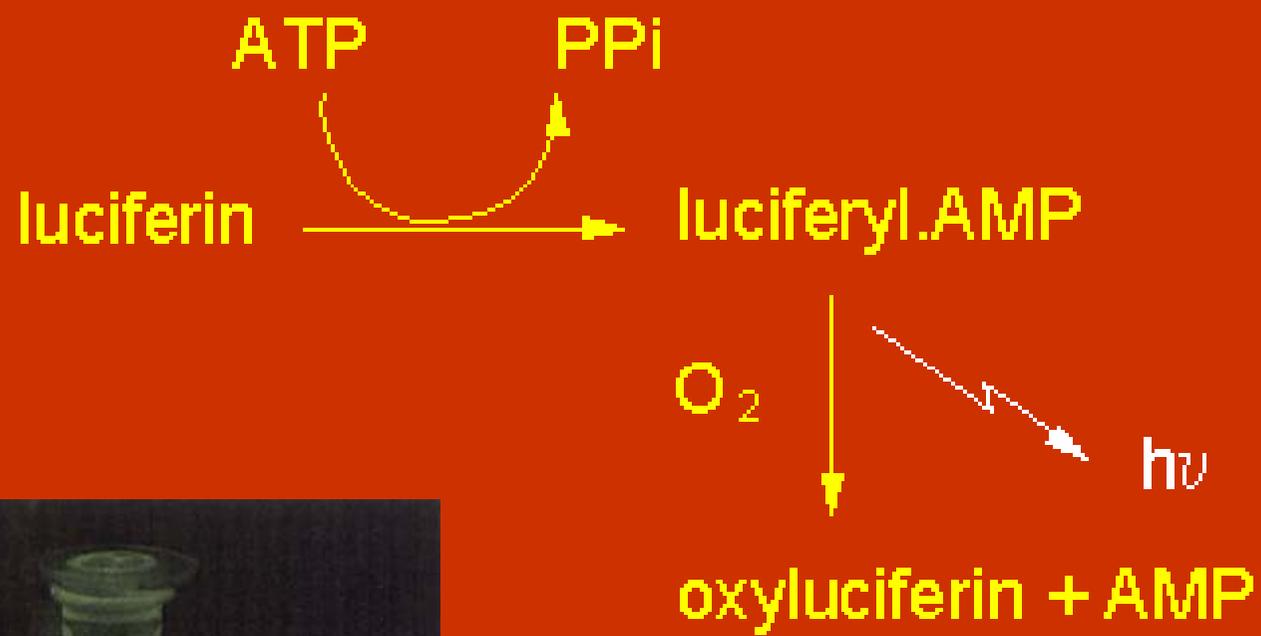
Manomètre de Warburg

II - Croissance

A – Mesure de la croissance

3. Mesure de l'activité

- b) Mesure des constituants cellulaires
- ATP (adénosine 5' triphosphate)
 - luciférase de luciole (*Photinus pyralis*) dépendante de l'ATP



II - Croissance

A – Mesure de la croissance

3. Mesure de l'activité

- b) Mesure des constituants cellulaires
- ATP (adénosine 5' triphosphate)

rapide

sensible

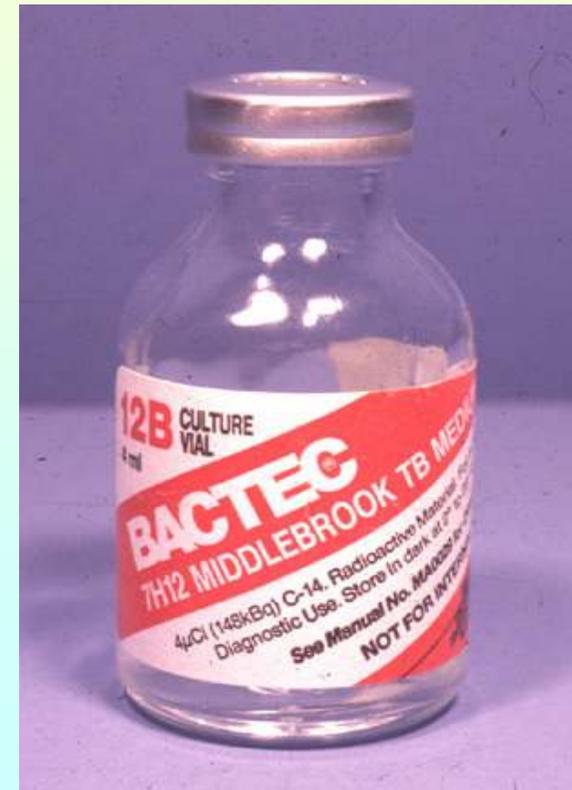
spécifique des microbes viables

II - Croissance

A – Mesure de la croissance

3. Mesure de l'activité

- c) Mesure des produits d'excrétion
- $^{14}\text{CO}_2$
- ex : système Bactec (Becton Dickinson)



II - Croissance

A – Mesure de la croissance

3. Mesure de l'activité

– d) Mesure des variations physico-chimiques du milieu

– Mesure du pH

- acidification au cours de la croissance
- apprécier qualité bactériologique du lait
- fermentation du lait (*Lactobacillus bulgaricus*)

II - Croissance

A – Mesure de la croissance

3. Mesure de l'activité

– d) Mesure des variations physico-chimiques du milieu

– **Mesure de l'impédance**

- résistance au flux d'un courant alternatif
- transformation de molécules neutres (glucose) en chargées (acides organiques)
- augmentation de la conductivité/diminution de l'impédance

II - Croissance

A – Mesure de la croissance

3. Mesure de l'activité

- d) Mesure des variations physico-chimiques du milieu
- **Mesure du potentiel d'oxydo-réduction**
 - baisse du potentiel redox pendant croissance
 - raréfaction en oxygène dissous
 - enrichissement en substances réductrices

II - Croissance

A – Mesure de la croissance

3. Mesure de l'activité

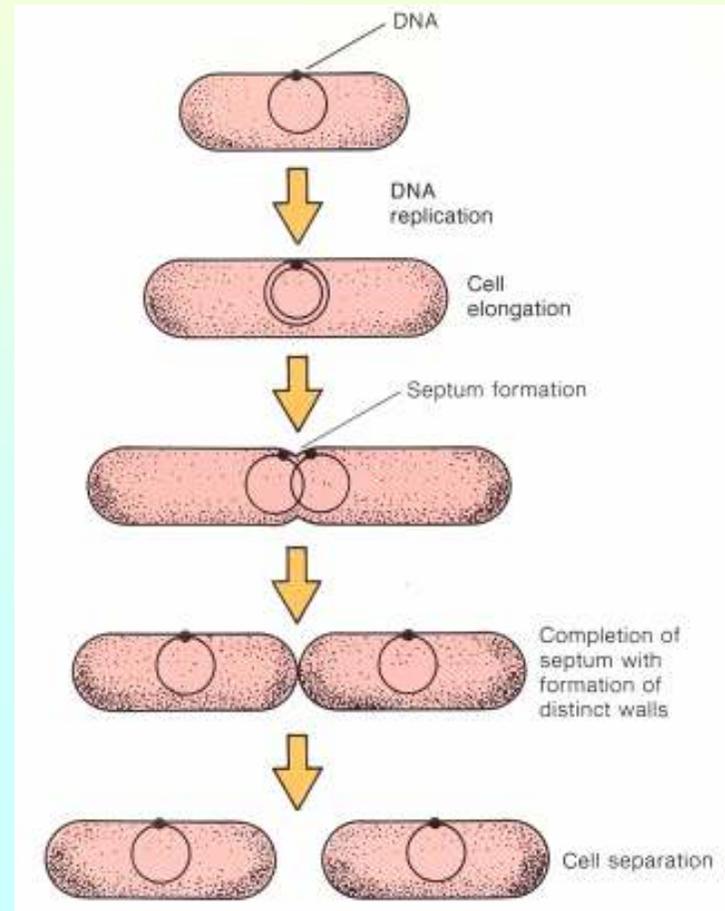
- d) Mesure des variations physico-chimiques du milieu
- Mesure de la production de chaleur
 - microcalorimétrie

II - Croissance

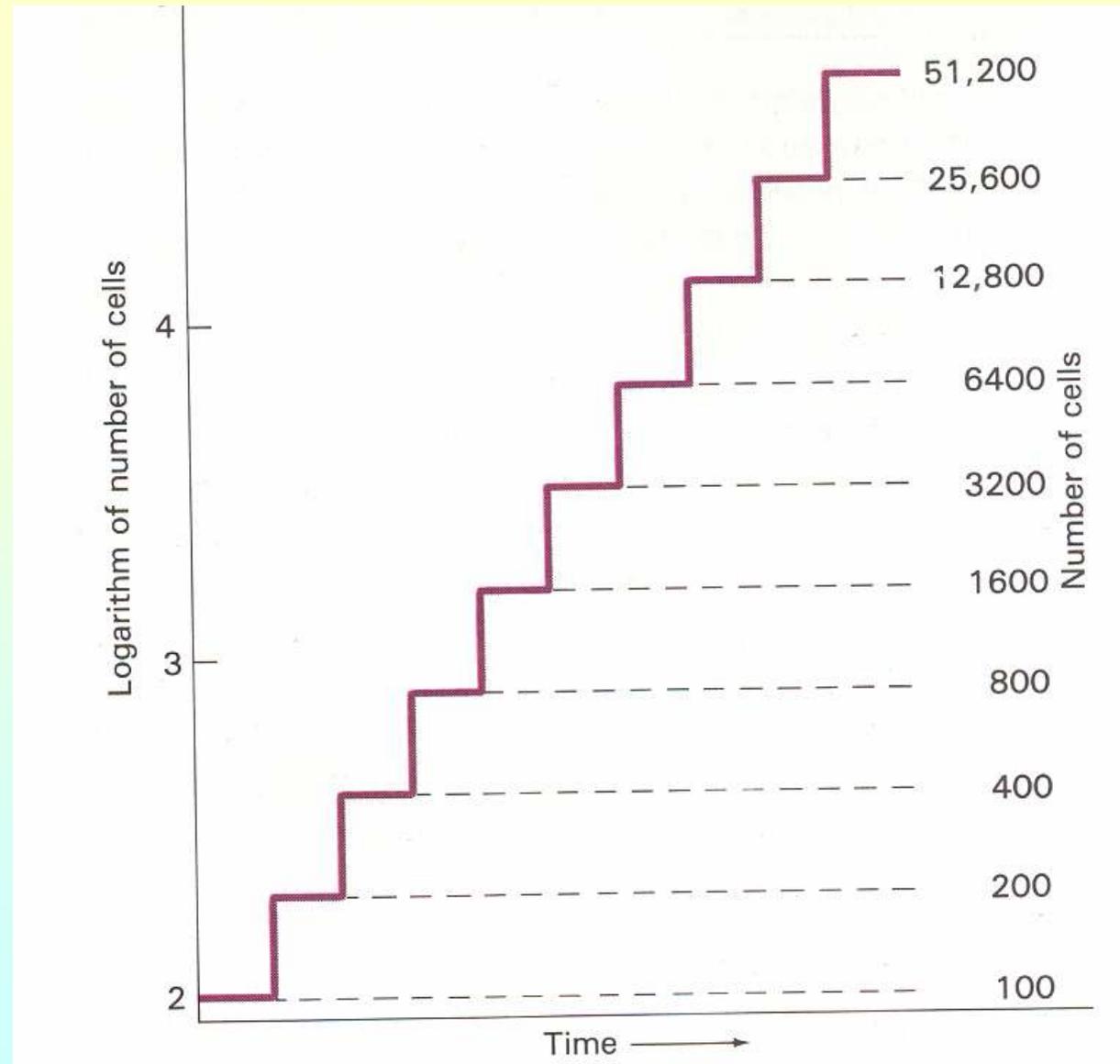
B – Constantes et expression de la croissance

1. Temps de génération (G)

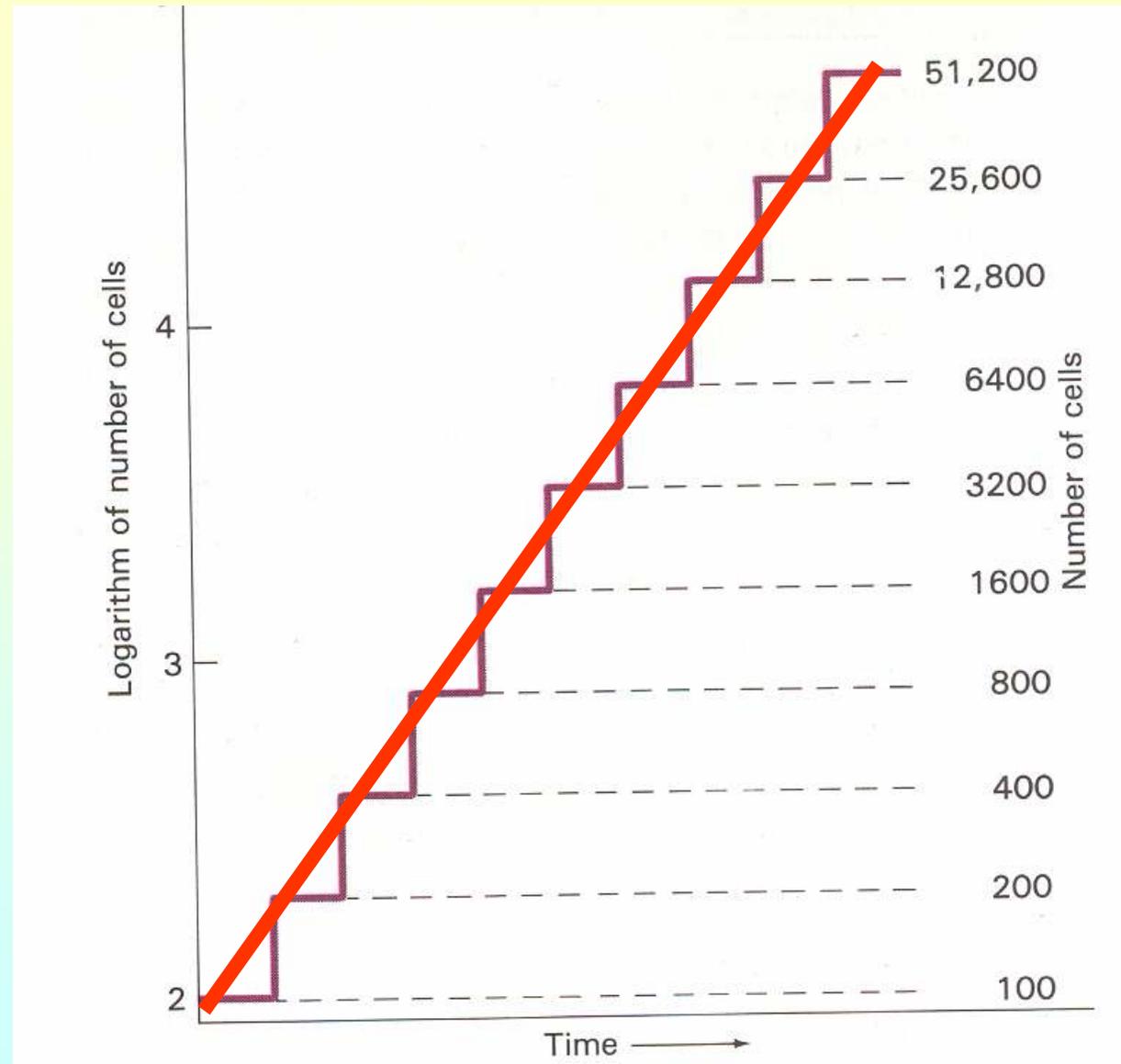
- Intervalle de temps entre deux divisions successives



En théorie



en réalité
pas de division des
cellules au même
rythme



II - Croissance

B – Constantes et expression de la croissance

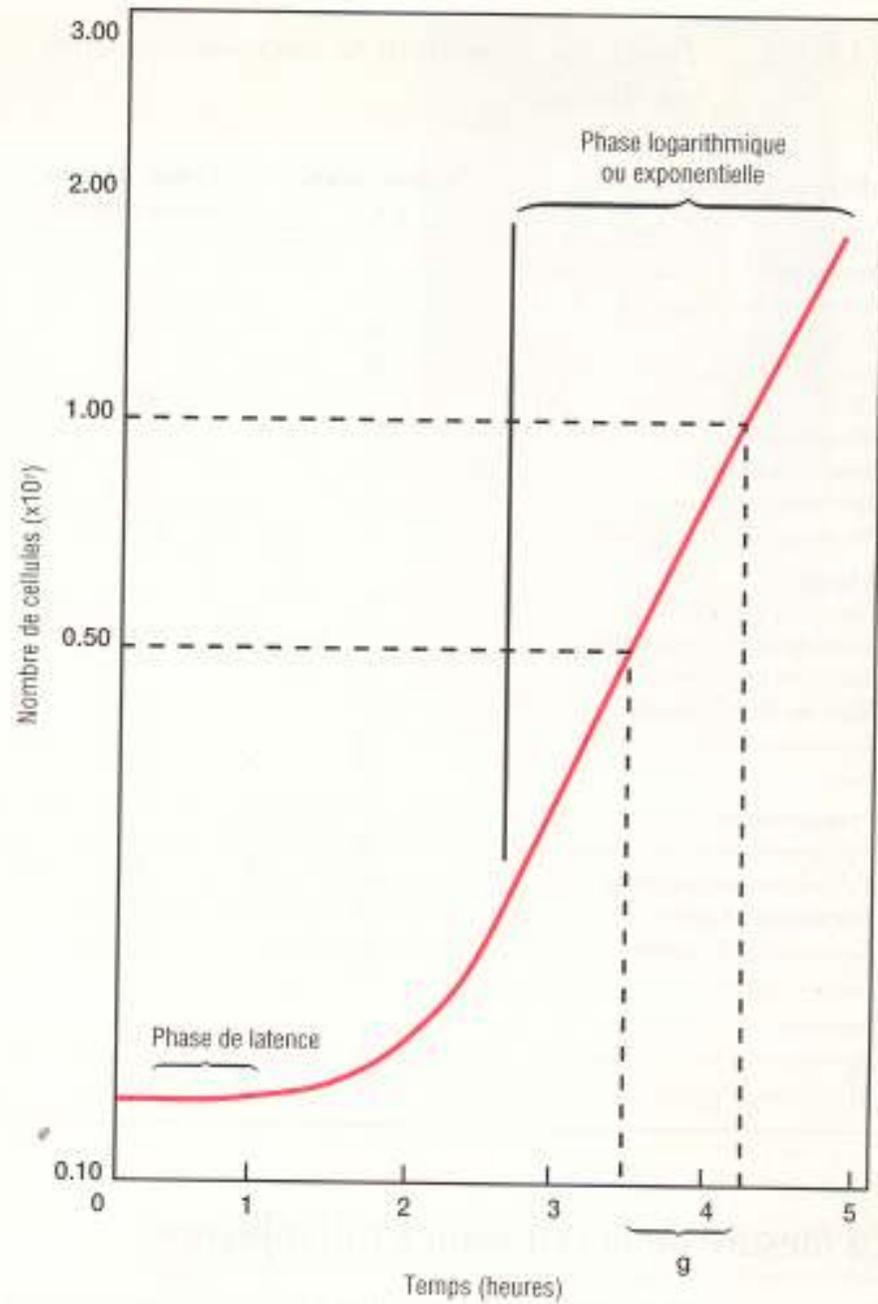
1. Temps de génération (G)

$$G = t/n$$

t : temps connu ; n : nombre de divisions

– *E. coli* : 20 minutes (60/3)

– *Mycobacterium tuberculosis* : 800 – 900 minutes



Temps de génération g

II - Croissance

B – Constantes et expression de la croissance

2. Taux de croissance (μ)

nombre de divisions par unité de temps

$$\mu = n/t$$

n = nombre de divisions ; t = temps connu

– *E. coli* : $\mu (3/1) = 3$

– *Mycobacterium tuberculosis* : 0,075

II - Croissance

B – Constantes et expression de la croissance

3. Expression mathématique de la croissance

$$\mathbf{\text{Log}_2 N_n/N_0 = \mu t}$$

N_0 population initiale

N_n population après n générations

➔ établir la courbe de croissance

II - Croissance

C – La courbe de croissance

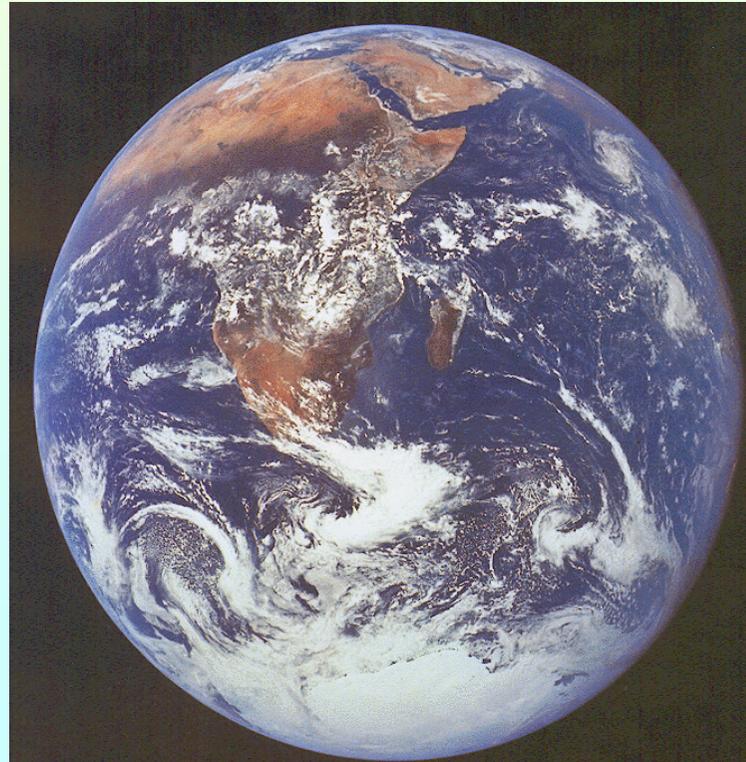
après 16 à 24 h de culture la croissance des bactéries s'arrête sinon :

II - Croissance

C – La courbe de croissance

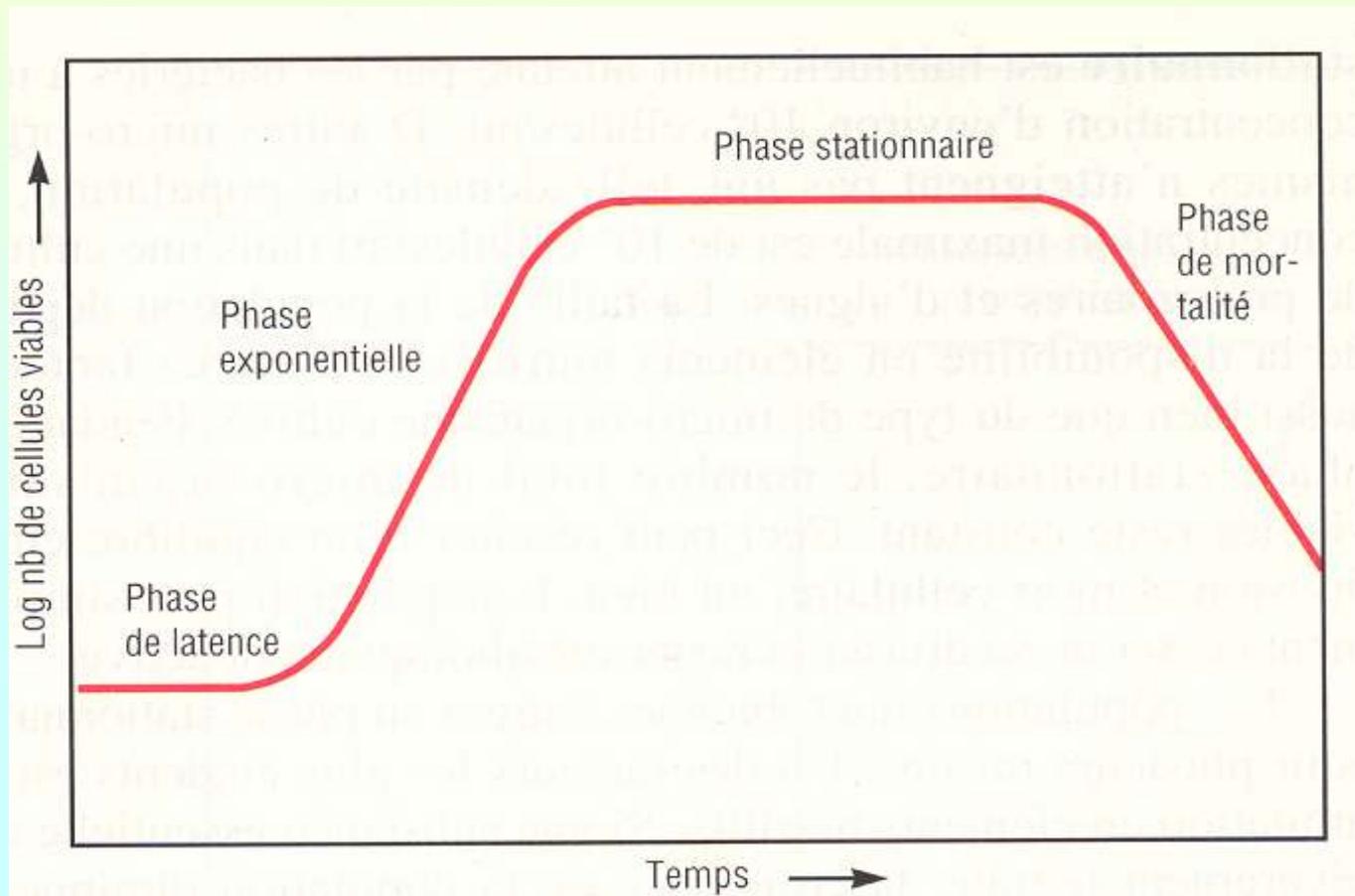
après 16 à 24 h de culture la croissance des bactéries s'arrête sinon :

en 48 heures, 4000 fois
le poids du globe terrestre



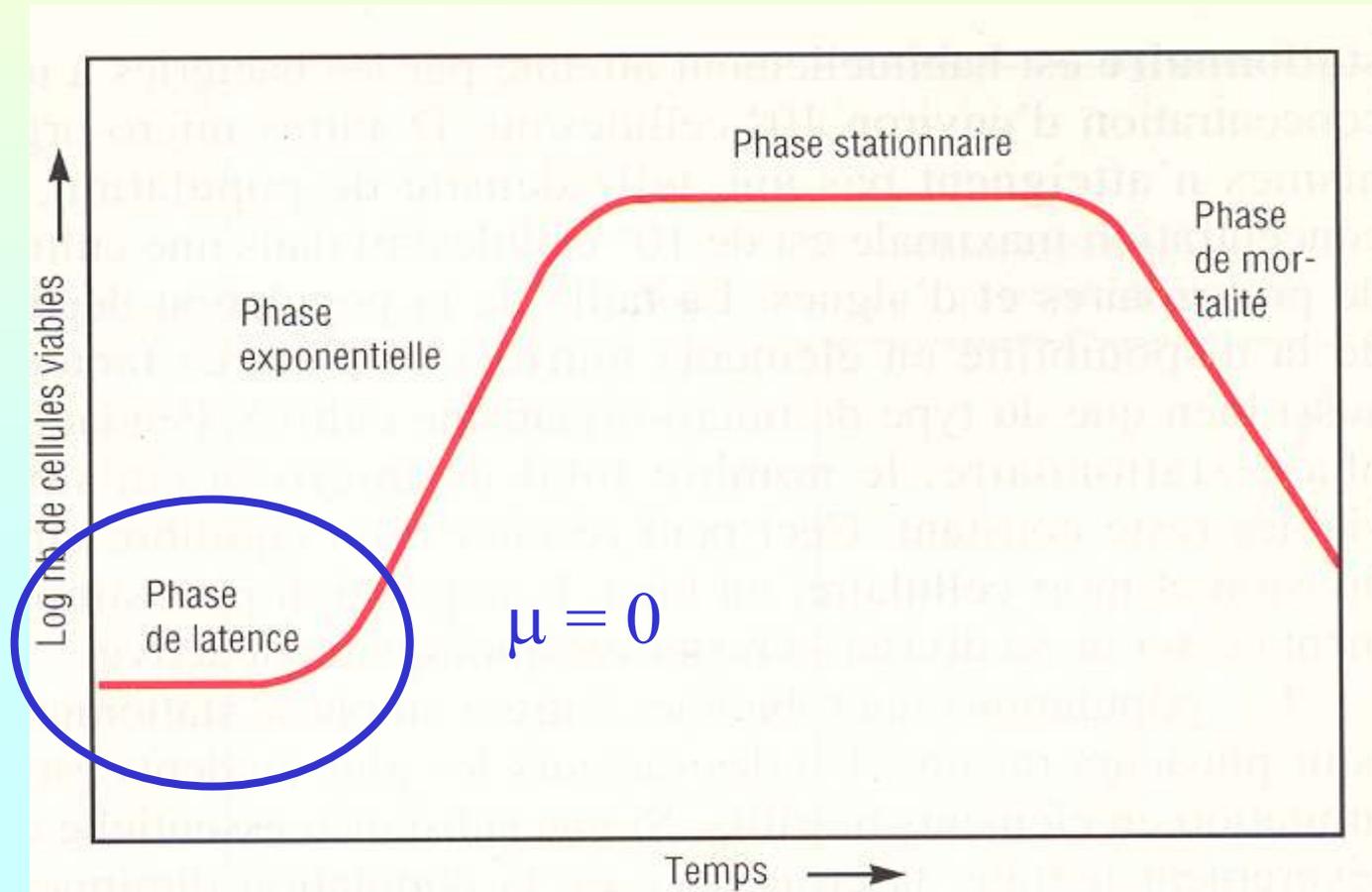
II - Croissance

C – La courbe de croissance (quatre phases)



II - Croissance

C – La courbe de croissance (quatre phases)



II - Croissance

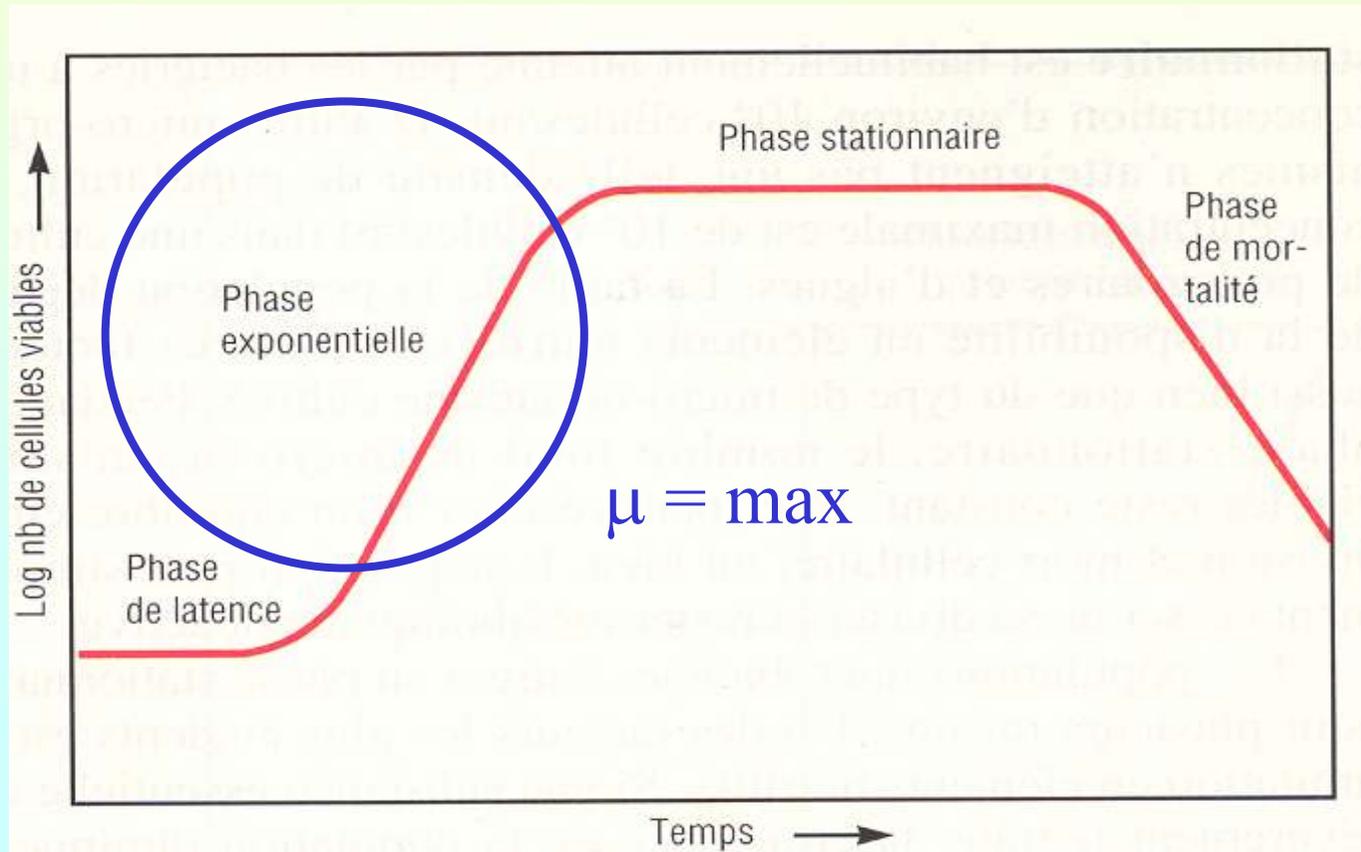
C – La courbe de croissance (quatre phases)

1 – Phase de latence (2-3 heures)

- âge des bactéries
- adaptation des bactéries (rôle du milieu)
- changement de milieu (facteurs de croissance ; cas des milieux synthétiques)

II - Croissance

C – La courbe de croissance (quatre phases)



II - Croissance

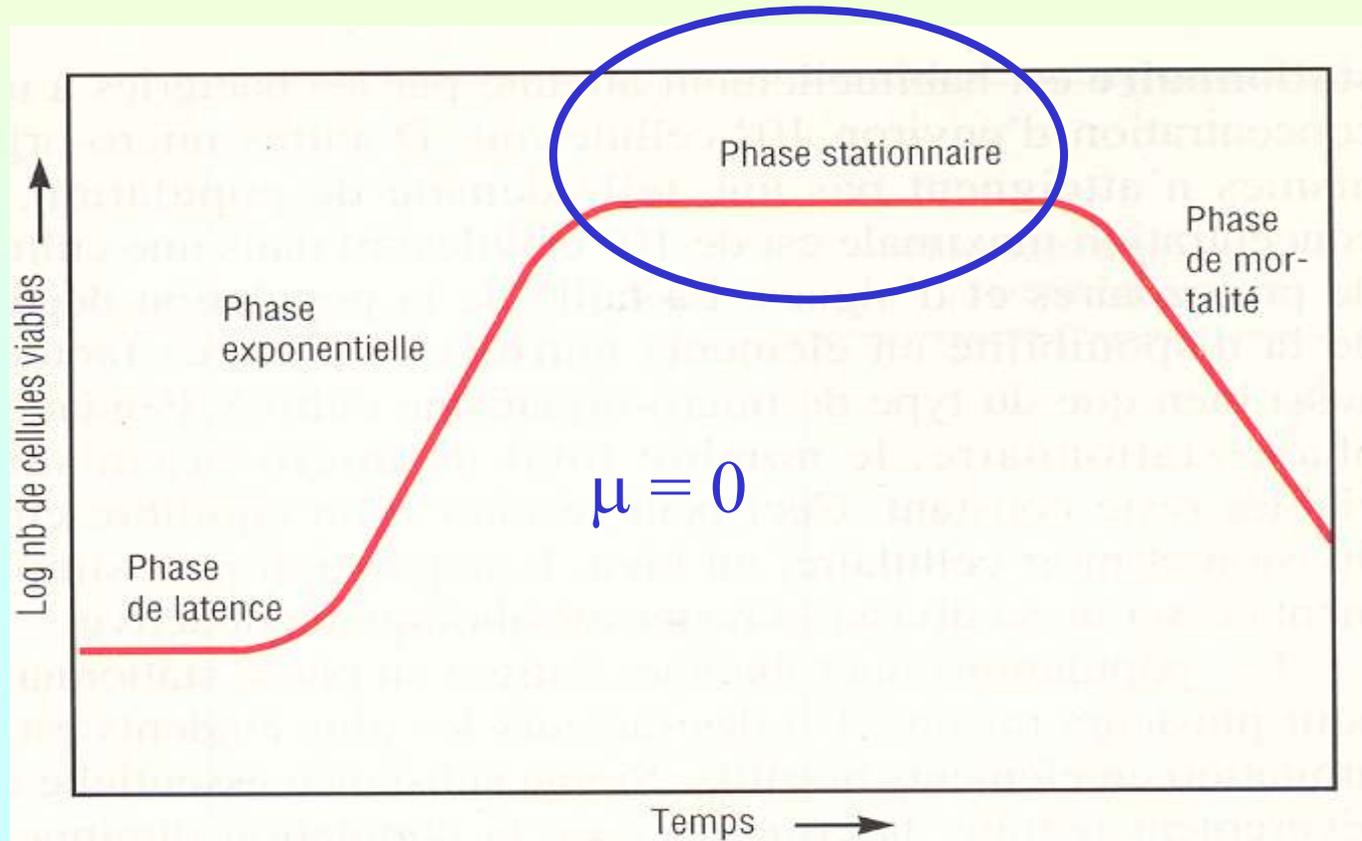
C – La courbe de croissance (quatre phases)

2 – Phase exponentielle

- μ maximal
- *E. coli* à 18°C : $\mu = 0,5$
- *E. coli* à 40°C : $\mu = 3,3$

II - Croissance

C – La courbe de croissance (quatre phases)



II - Croissance

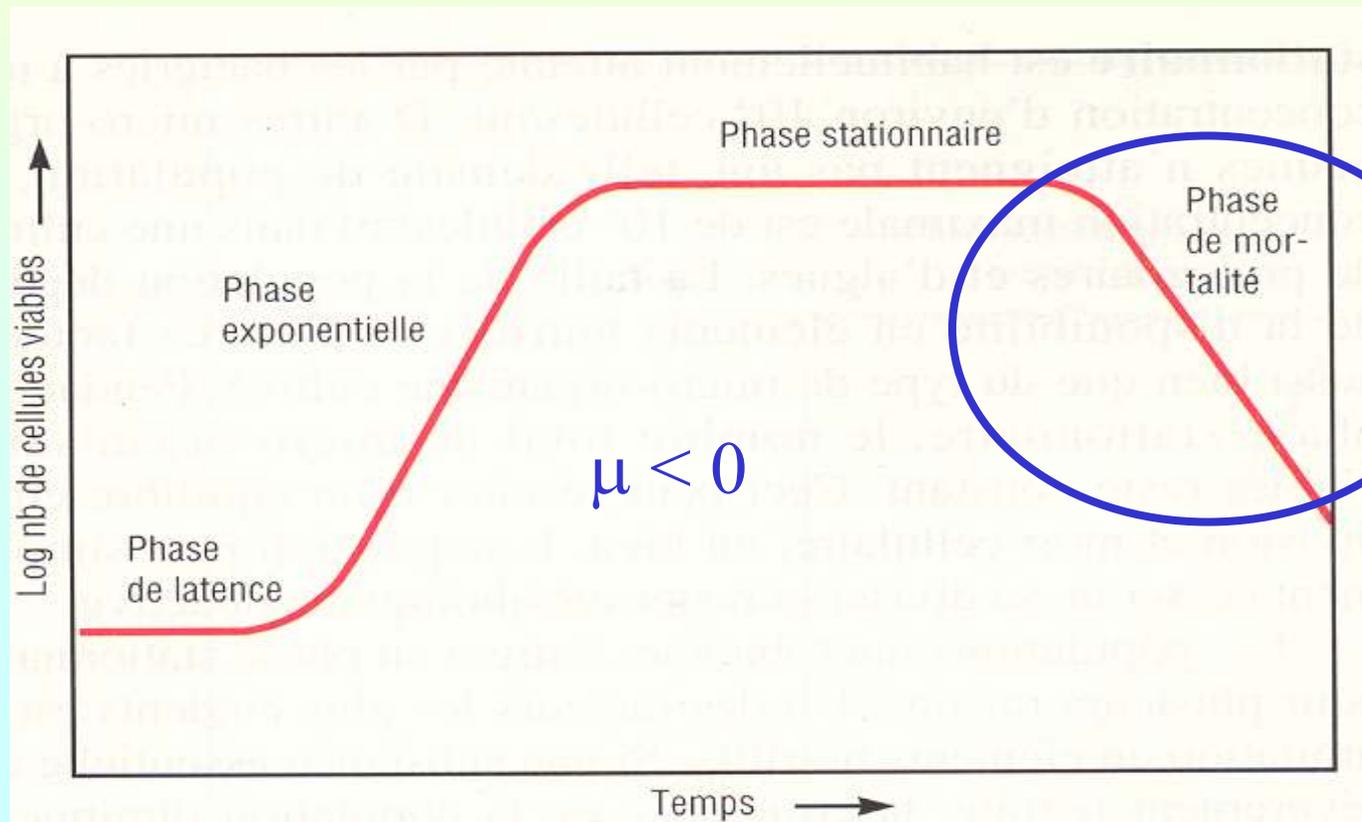
C – La courbe de croissance (quatre phases)

3 – Phase maximale stationnaire

- épuisement du milieu
- accumulation de déchets toxiques
- évolution défavorable de l'environnement physique (pH)

II - Croissance

C – La courbe de croissance (quatre phases)



II - Croissance

C – La courbe de croissance (quatre phases)

4 – Phase de déclin

- bactéries ne se divisent plus



II - Croissance

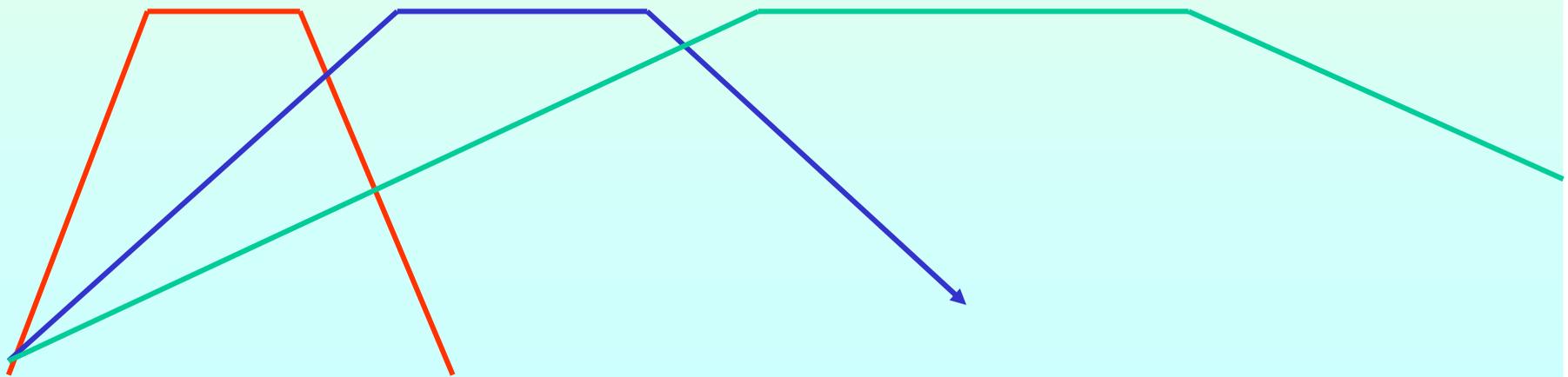
D – Facteurs influençant la croissance

1 – La température

Thermophiles

Mésophiles

Psychrophiles



II - Croissance

D – Facteurs influençant la croissance

2 – Le substrat

- *Bacillus subtilis* sur :

milieu synthétique $\mu = 0,3$

bouillon nutritif $\mu = 2$

II - Croissance

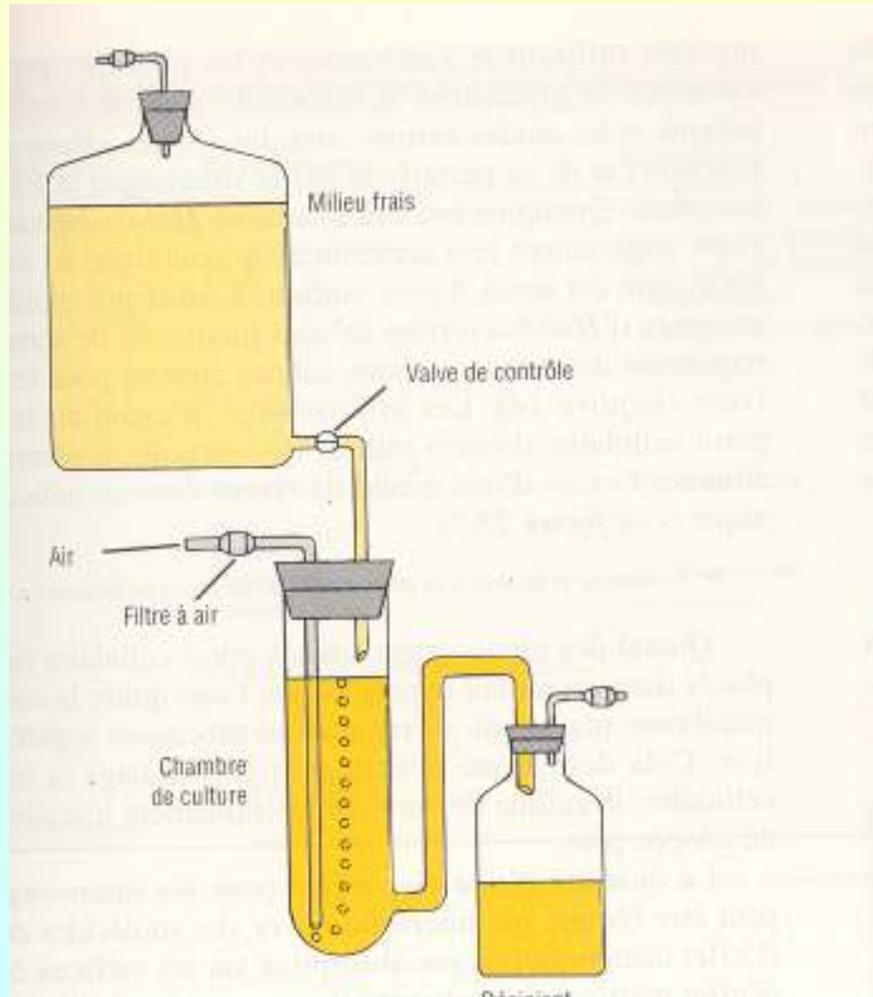
E – Croissance continue

prolonger la phase de croissance

renouveler le milieu

éliminer produits du métabolisme

➡ chemostat



III – Culture des bactéries

A – Les milieux de culture

1 – Milieux synthétiques/milieux empiriques

Bouillon nutritif :

Extrait de viande de bœuf ^a	5 g
Peptone tryptique ^b	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml

- ^aglucides : composés azotés, vitamines, sels minéraux
- ^bpeptones, digestion chimique ou enzymatique de matières protéiques (viande, caséine, gélatine) : polypeptides, dipeptides, acides aminés

TABLE 6.3 A defined synthetic medium for growing a fastidious bacterium, *Leuconostoc mesenteroides*.

WATER	1 L		
ENERGY SOURCE			
Glucose	25 g		
NITROGEN SOURCE			
NH ₄ Cl	3 g		
MINERALS			
KH ₂ PO ₄	600 mg	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg
K ₂ HPO ₄	600 mg	MnSO ₄ ·4H ₂ O	20 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg	NaCl	10 mg
ORGANIC ACID			
Sodium acetate	20 g		
AMINO ACIDS			
DL- α -Alanine	200 mg	L-Lysine-HCl	250 mg
L-Arginine	242 mg	DL-Methionine	100 mg
L-Asparagine	400 mg	DL-Phenylalanine	100 mg
L-Aspartic acid	100 mg	L-Proline	100 mg
L-Cysteine	50 mg	DL-Serine	50 mg
L-Glutamic acid	300 mg	DL-Threonine	200 mg
Glycine	100 mg	DL-Tryptophan	40 mg
L-Histidine-HCl	62 mg	L-Tyrosine	100 mg
DL-Isoleucine	250 mg	DL-Valine	250 mg
DL-Leucine	250 mg		
PURINES AND PYRIMIDINES			
Adenine sulfate-H ₂ O	10 mg	Uracil	10 mg
Guanine-HCl·2H ₂ O	10 mg	Xanthine-HCl	10 mg
VITAMINS			
Thiamine-HCl	0.5 mg	Riboflavin	0.5 mg
Pyridoxine-HCl	1.0 mg	Nicotinic acid	1.0 mg
Pyridoxamine-HCl	0.3 mg	p-Aminobenzoic acid	0.1 mg
Pyridoxal-HCl	0.3 mg	Biotin	0.001 mg
Calcium pantothenate	0.5 mg	Folic acid	0.01 mg

Tableau 3.3 Milieux synthétiques

<i>Haemophilus influenzae</i>		
L-valine.....	0,1371	g
L-leucine.....	0,1371	g
DL-iso-leucine.....	0,0762	g
Acide DL-aspartique.....	0,1371	g
Acide L-glutamique.....	0,2285	g
L-arginine.....	0,0457	g
DL-phénylalanine.....	0,06855	g
L-tyrosine.....	0,0762	g
L-tryptophane.....	0,0229	g
L-histidine.....	0,0567	g
L-cystéine.....	0,1189	g
Glutathion.....	0,0595	g
Adénine.....	0,0095	g
Guanine.....	0,00095	g
Uracile.....	0,00095	g
Pyridoxine.....	0,008	g
Thiamine.....	0,008	g
Pantothénate de sodium.....	0,008	g
Glutamine.....	0,300	g
Putrescine.....	0,00298	g
Hématine.....	0,0238	g
Coenzyme I.....	0,0029	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,00114	g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,0342	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,180	g
NaHCO ₃	0,225	g
KH ₂ PO ₄	0,940	g
K ₂ HPO ₄	3,300	g
Glucose.....	3,810	g
NaCl.....	8,000	g
Na oléate.....	0,0048	g
Na acétate.....	0,0419	g
<i>Escherichia coli</i>		
Glucose.....	5	g
NaCl.....	5	g
K ₂ H PO ₄	5	g
KH ₂ PO ₄	2	g
NH ₄ H ₂ PO ₄	2	g
SO ₄ 7H ₂ O.....	0,2	g
Mn SO ₄ 4H ₂ O.....	0,02	g
FeCl ₃	0,005	g
Eau distillée.....	1 000	ml
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>		
K ₂ H PO ₄	1	g
NH ₄ Cl.....	1	g
Ca SO ₄	1	g
Mg SO ₄	2	g
Eau distillée.....	1 000	ml

III – Culture des bactéries

A – Les milieux de culture

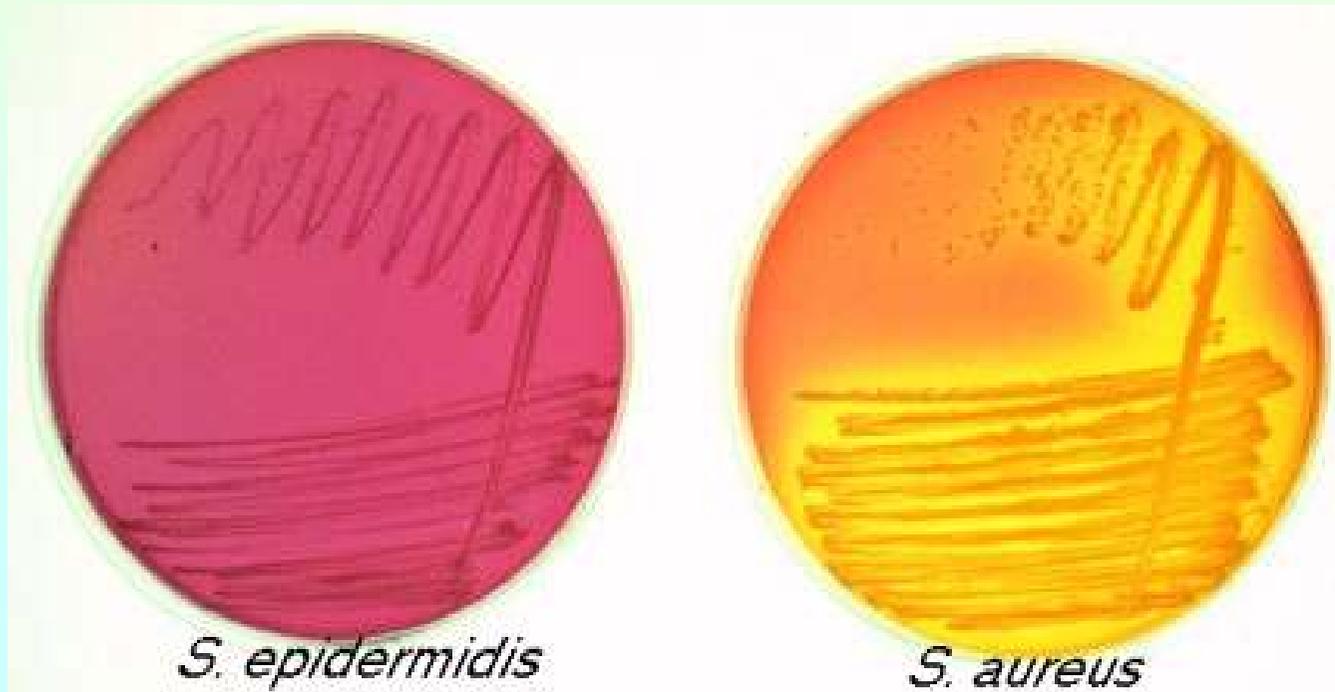
2 – Milieux sélectifs ou enrichissement

- *Salmonella* (milieu aux sels biliaries)
- *Staphylococcus aureus* (Chapman)



Staphylococcus aureus

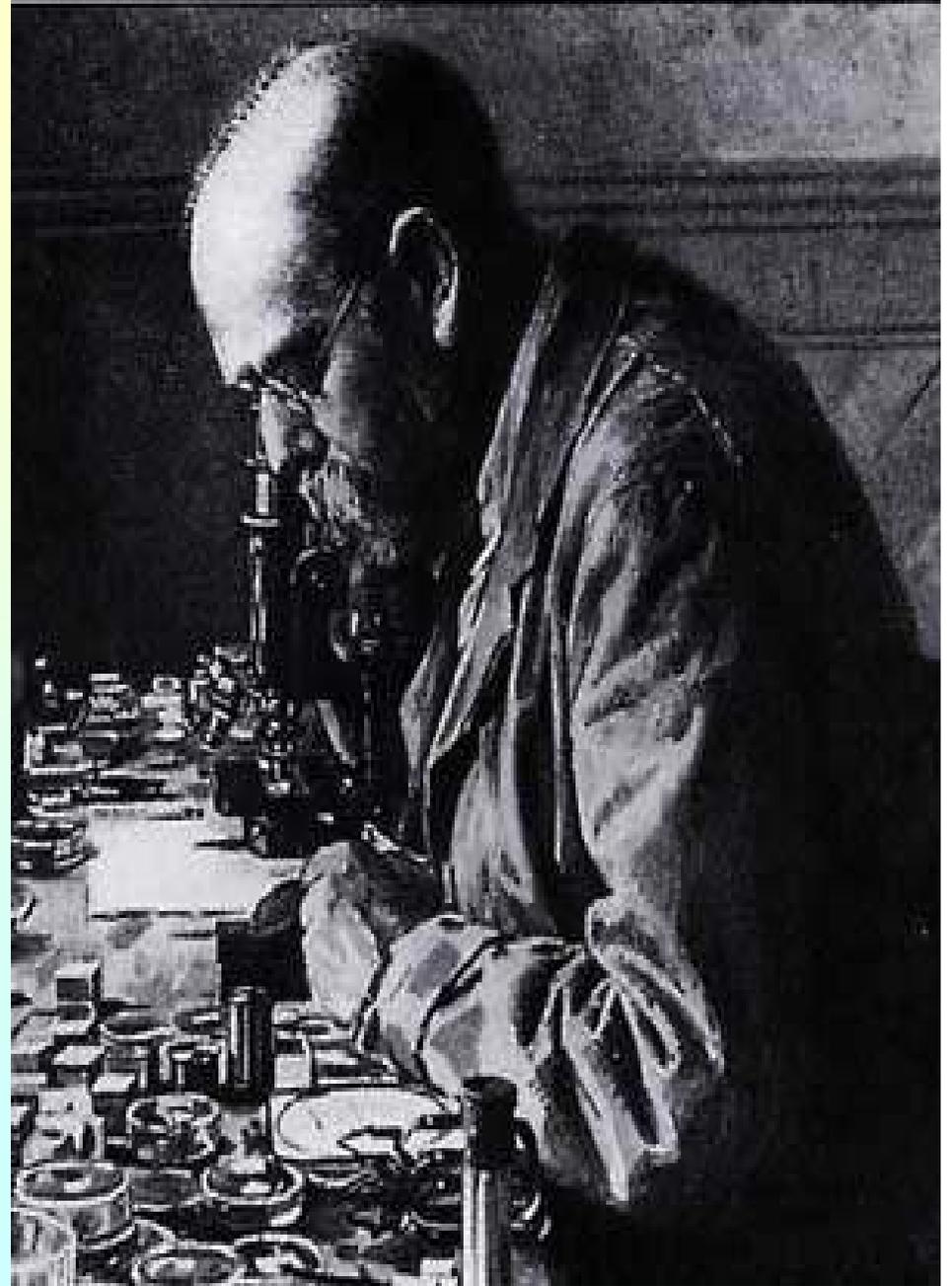
- Milieu de Chapman
– 75 g/l NaCl + mannitol



III – Culture des bactéries

A – Les milieux de culture

3 – Milieux d'isolement – milieux d'identification





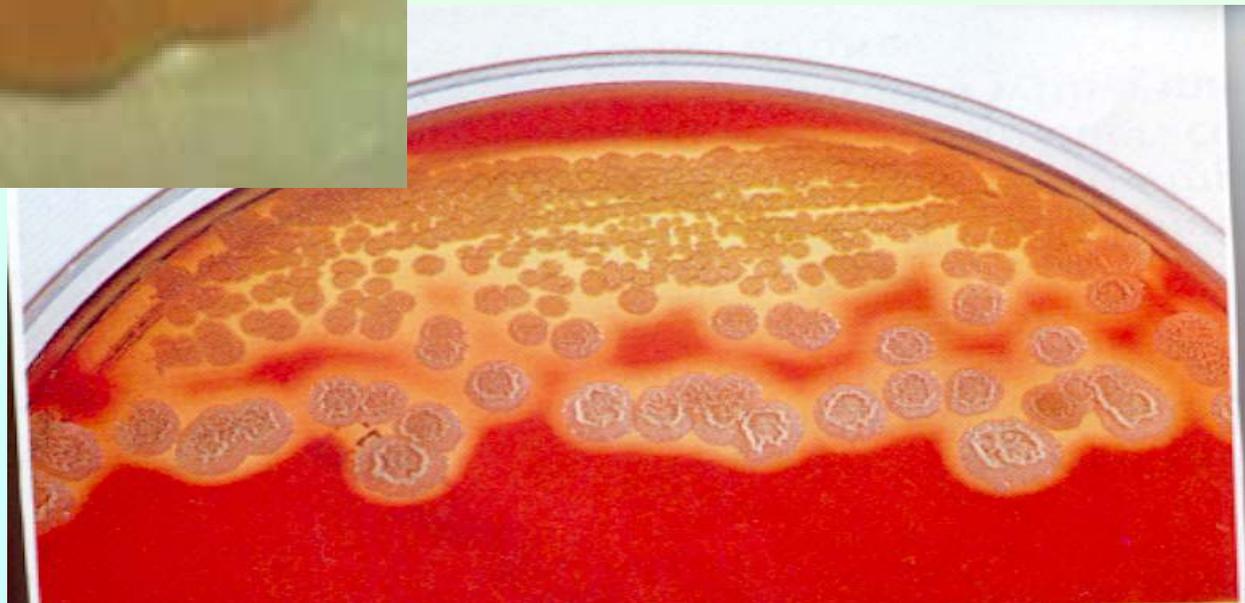
Frau Hesse & Herr Hesse



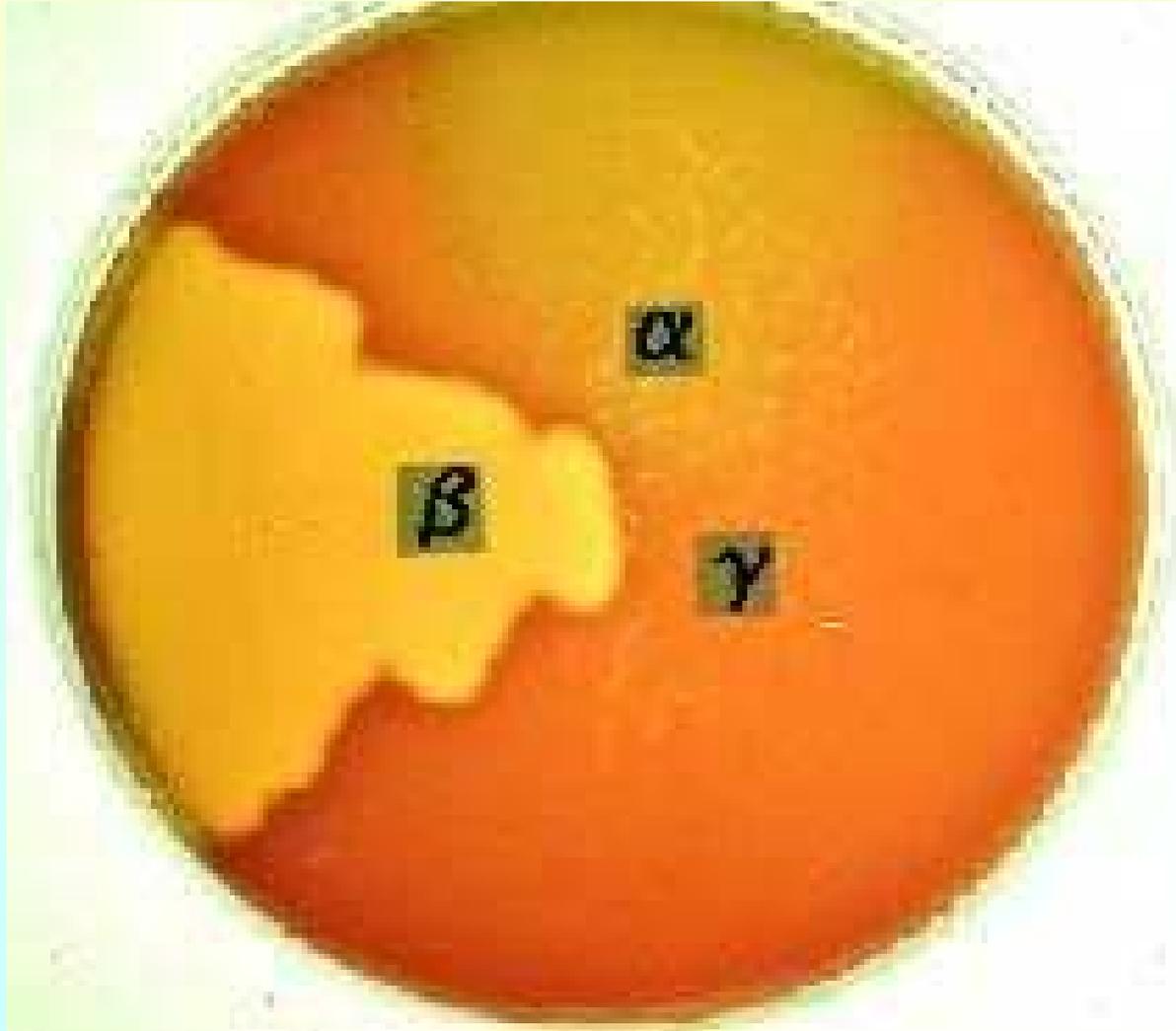


agar ou gélose capable de fixer
500 son volume en eau
soluble dans l'eau à 100°C
gélification à 40°C

3a) Milieux d'isolement



3b) Milieux d'identification



Ex : streptocoques
Sur gélose au sang

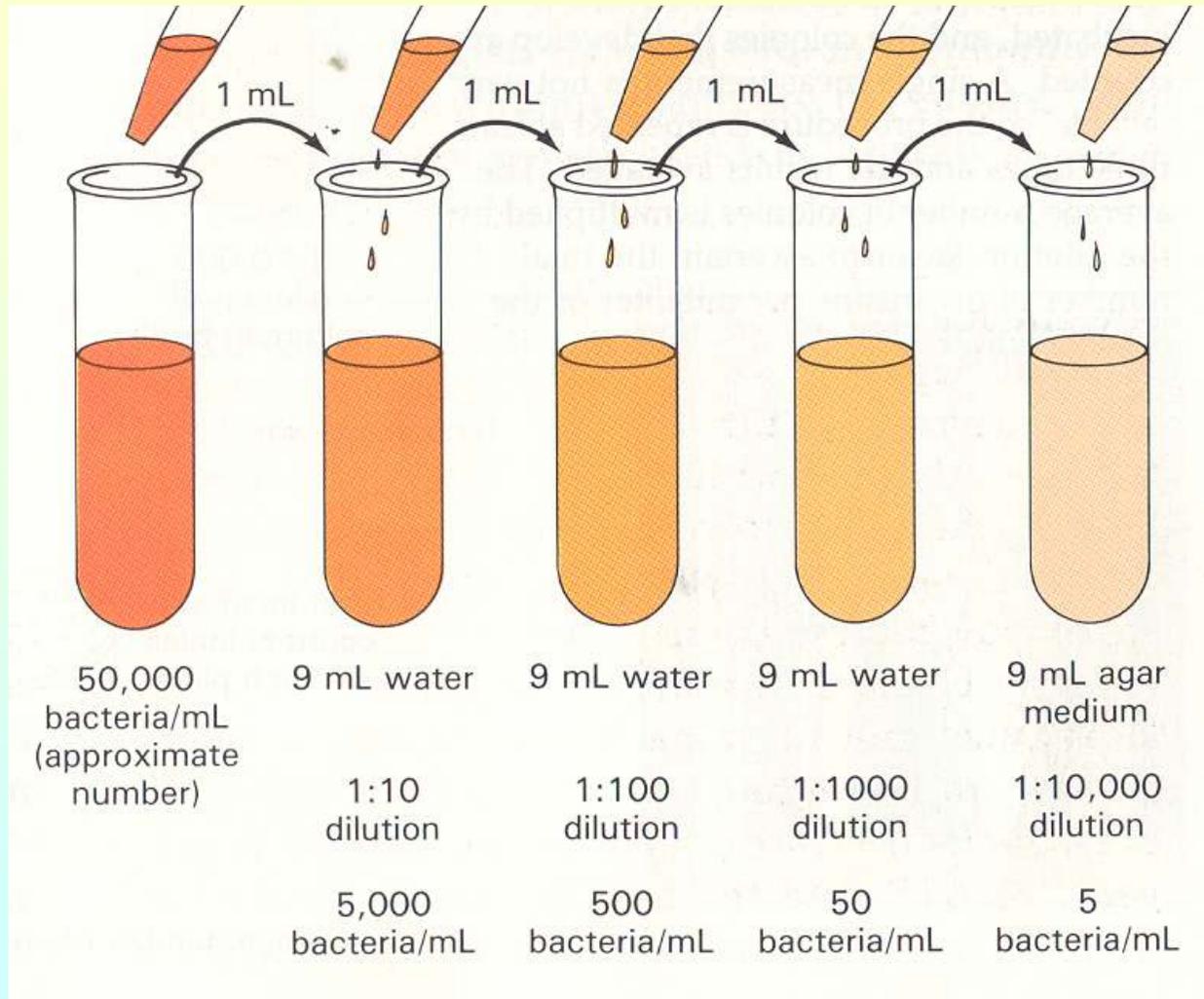
III – Culture des bactéries

B – Les cultures pures

1 – Méthodes de dilution en milieu liquide



Pasteur 1862

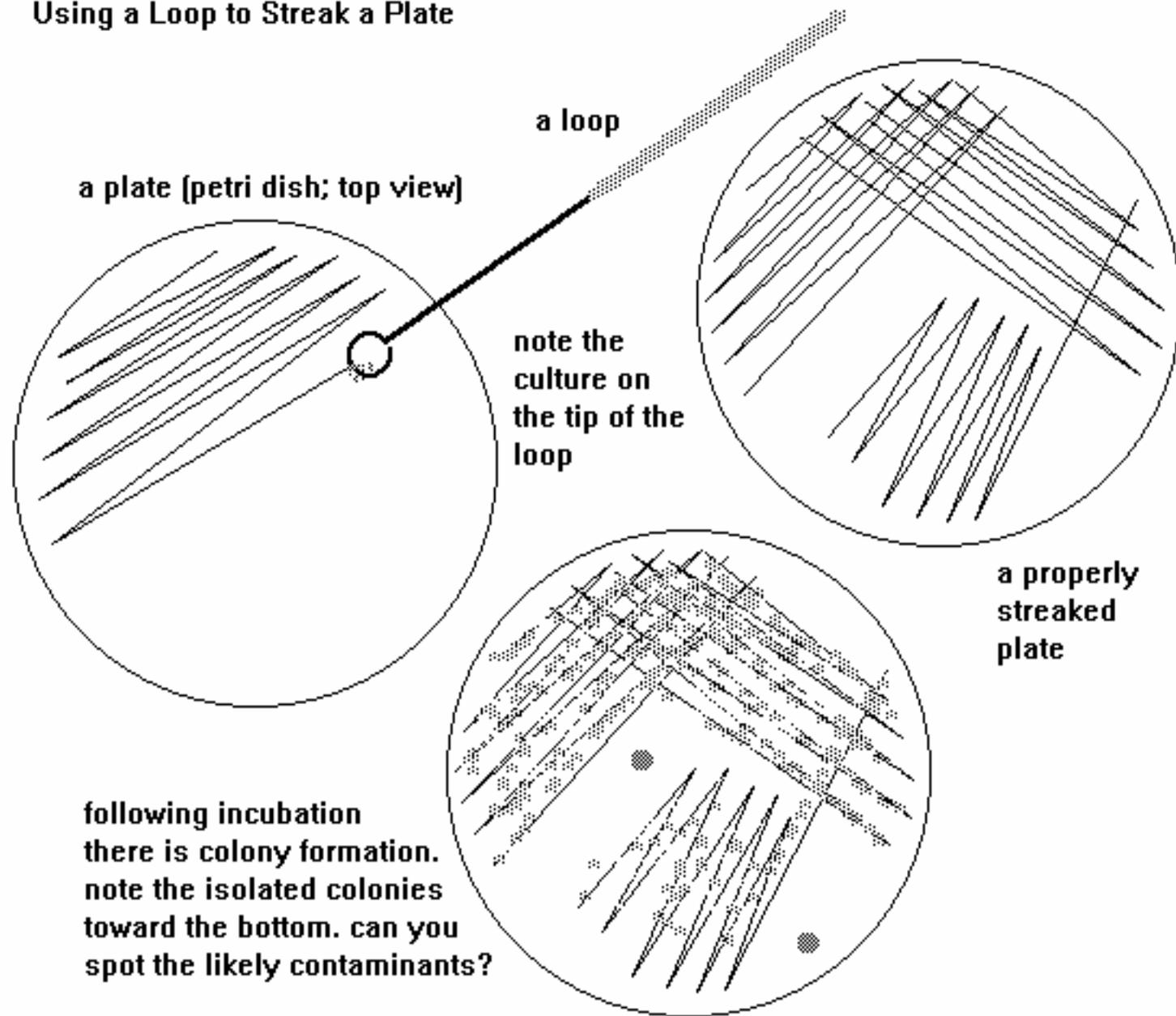


III – Culture des bactéries

B – Les cultures pures

2 – Méthodes des stries

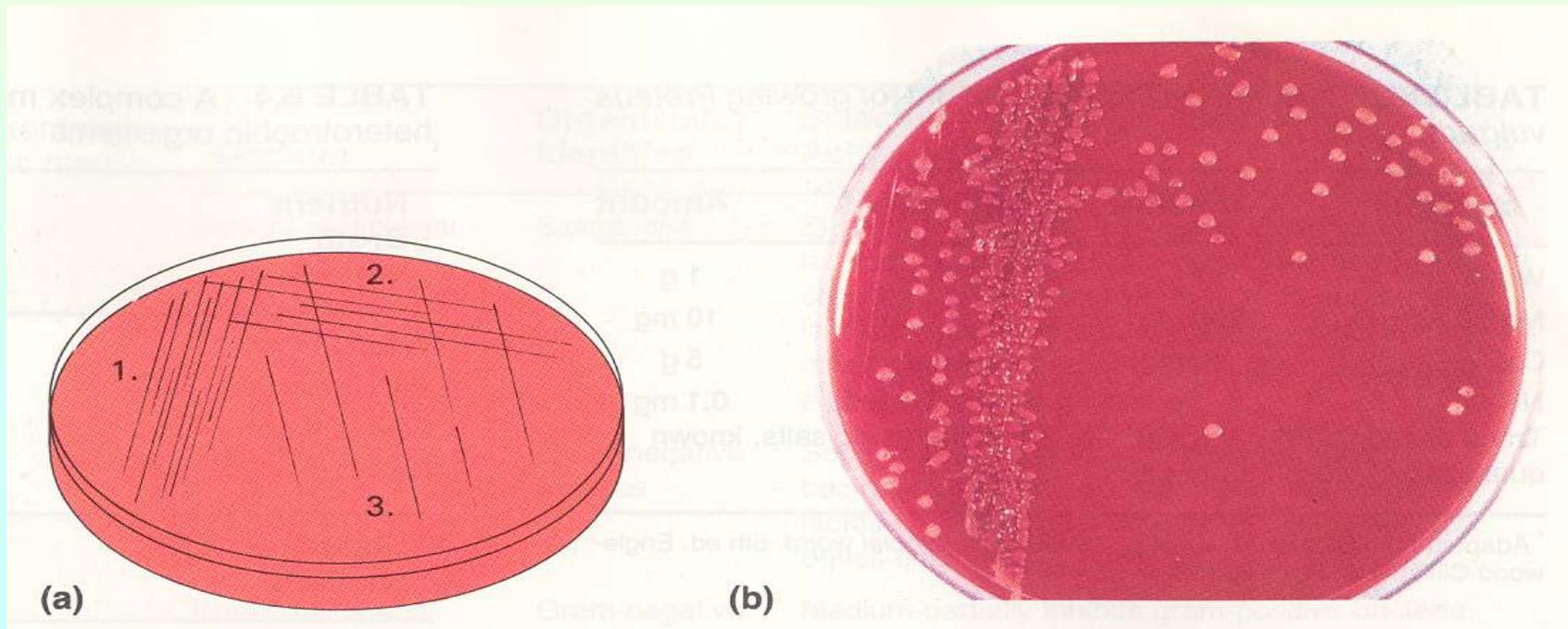
Using a Loop to Streak a Plate



III – Culture des bactéries

B – Les cultures pures

2 – Méthodes des stries



III – Culture des bactéries

C – Conservation des cultures pures

1 – Collections de souches

ATCC (American Type Culture Collection)

NCTC (National Collection of Type Culture)(UK)

CIP (Collection de l'Institut Pasteur)

CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes)

III – Culture des bactéries

C – Conservation des cultures pures

2 – Procédés

Conservation sur la pente de gélose

- température ambiante

- à 4°C

Lyophilisation

Congélation (-20°C, -80°C)