

TD N°02 de Microbiologie générale

Exercice 01 :

I- On centrifuge 25ml d'une culture de *Bacillus megaterium* prélevés en fin de phase exponentielle de croissance. Le culot de centrifugation est remis en suspension dans 20 ml de tampon phosphate 0.04 mol/L, pH 7.2 de façon à laver les cellules bactériennes. Après avoir de nouveau centrifugé, décanté et recommencer deux fois le lavage, on remet le culot de cellules bactériennes en suspension dans 2.5 ml de tampon phosphate pH 7.2.

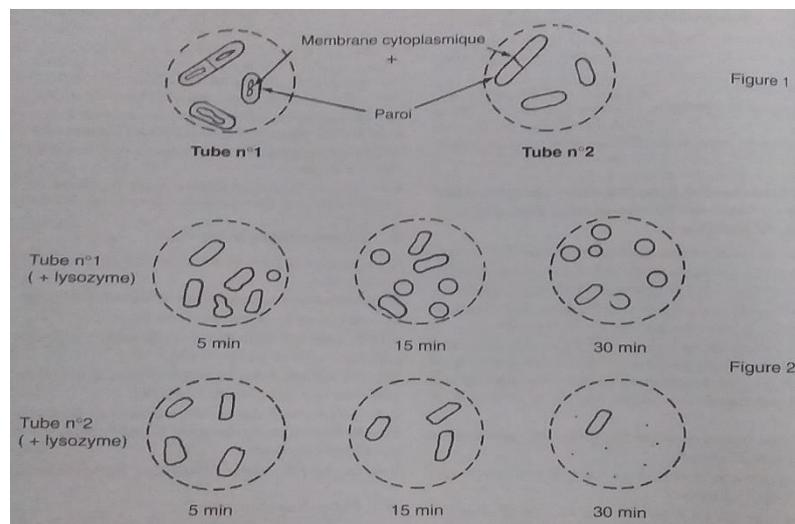
A 1 ml de la suspension cellulaire, on ajoute 1 ml de solution de saccharose à 2 mol/L : tube n° 1.

A 1 ml de la suspension cellulaire, on ajoute 1 ml d'eau distillée : tube n°2.

Après homogénéisation, les deux tubes sont mis à incuber pendant 2 minutes à 37°C. Les états frais réalisés sur les deux tubes sont schématisés sur la figure 1.

1. Comparer les résultats des deux observations microscopiques.

2. Les justifier par les conditions expérimentales.



II- On ajoute dans les deux suspensions précédentes (tube n° 1 et n° 2) 0.2 ml de lysozyme. On examine au microscope optique avec l'objectif à immersion les deux suspensions après 5, 15 et 30 minutes d'incubation à 37°C.

Les observations microscopiques sont schématisées sur la figure 2.

1. Que deviennent les cellules bactériennes dans les tubes n° 1 et 2 ?

2. Préciser le rôle du lysozyme.

3. Interpréter les observations microscopiques en fonction des conditions expérimentales imposées aux tubes n° 1 et 2.

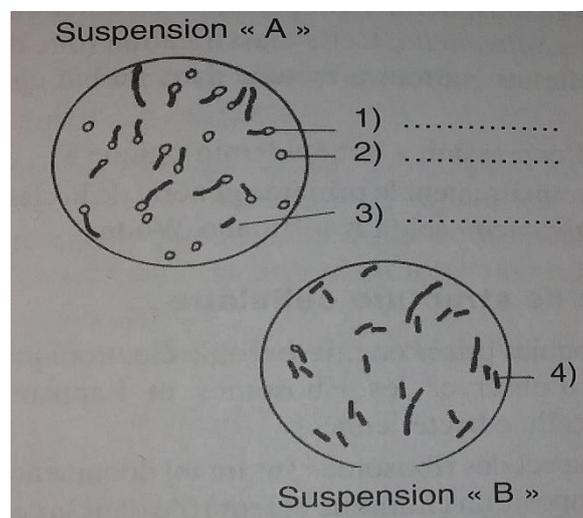
4. Les mycoplasmes ne sont sensibles aux lysozymes, pourquoi ?

Exercice 2 :

Une suspension de *Cl. tetani* est laissée 15 jours à température du laboratoire : on l'appelle suspension A. Une suspension B est préparée à partir d'une culture jeune de 24 h.

1. On effectue une coloration de Gram respectivement sur les suspensions A et B. On obtient les résultats de la figure ci-dessous.

a)- Annoter les schémas de la figure.



b)- Quel phénomène biologique a eu lieu dans la suspension A ? En dégager les différentes étapes.

2. On chauffe à 80°C pendant 10 minutes les suspensions A et B. On ensemence ensuite 0.1 ml de chaque suspension chauffée sur un milieu d'isolement approprié.

Après incubation, on observe de très nombreuses colonies sur l'isolement fait à partir de A et une colonie sur l'isolement fait à partir de B.

a)- D'après ces résultats, que pouvez vous déduire comme propriété des formes bactériennes apparues dans la suspension A ? à quelles caractéristiques est liée cette propriété.

b)- quel phénomène s'est-il produit lorsque la suspension A a été ensemencée dans le milieu d'isolement.

TD N°03 de Microbiologie générale
Nutrition et milieux de culture

Exercice 01 :

Les résultats des différents tests de croissance de 3 espèces bactériennes sont donnés dans le tableau suivant :

Espèce/milieu de culture	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3
Espèce A	-	+	+
Espèce B	-	-	-
Espèce D	-	-	+

Composition des différents milieux

Milieu 1 :

KH ₂ PO ₄	13,6 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g/L
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,5 mg/L
CaCl ₂	0,02 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g/L
ajusté à pH 7,0 avec NaOH	

Milieu 2 :

glucose	10g/L
KH ₂ PO ₄	13,6 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g/L
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,5 mg/L
CaCl ₂	0,02 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g/L
ajusté à pH 7,0 avec NaOH	

Milieu 3 :

glucose	10g/L
KH ₂ PO ₄	13,6 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g/L
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,5 mg/L
CaCl ₂	0,02 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g/L
Tryptophane	0.01g/L
ajusté à pH 7,0 avec NaOH	

Questions :

- 1- Comment qualifier les milieux de cultures présentés ci-dessus ?
- 2- Quel est le rôle du : glucose, (NH₄)₂SO₄ , Tryptophane dans le milieu de culture ?
- 3- Expliquer chaque cas.
- 4- Dans quel milieu peut-on espérer une croissance pour la souche B.

Exercice 02 : Analyse des types trophiques de souches bactériennes

Analyse des types trophiques des souches I et II à l'aide des milieux de culture A, B et C (la composition des milieux est donnée en g/L).

Milieu A	
Phosphate d'ammonium	0.2
Phosphate monopotassique	1
Sulfate de magnésium	0.2
Chlorure de calcium	0.1
Chlorure de sodium	5
Milieu B	
Milieu A + Citrate trisodique	2
Milieu C	
Milieu A + les additifs suivants :	
Biotine	10 ⁻⁶
Histidine	10 ⁻⁵
Méthionine	2.10 ⁻⁵
Thiamine	10 ⁻⁶
Pyridoxine	10 ⁻⁶
Acide nicotinique	10 ⁻⁶
Tryptophane	2.10 ⁻⁵
Pantothénate de calcium	10 ⁻⁵
+ Oligoéléments	
+ glucose	5

Après ensemencement et incubation on obtient les résultats suivants :

Souche pure	Milieux*		
	A	B	C
I	-	+	+
II	-	-	+

* + : culture / - : absence de culture

1.1- Comment qualifier le milieu A ?

1.2- Certaines bactéries pourraient se développer dans le milieu A à la condition de les incuber en atmosphère enrichie en CO₂. Expliquer pourquoi et donner leur type trophique vis-à-vis du carbone.

2.1- Quel le type trophique « vis-à-vis du carbone et des besoins nutritionnels spécifiques » de la souche I ?

2.2- Quelle est sa source d'azote ?

2.3- Il est recommandé de ne pas ensemencer le milieu B à partir d'un bouillon ou d'une eau peptonée mais à partir d'une colonie sur milieu gélosé. Expliquer pourquoi. Quel milieu gélosé de même composition que B connaissez-vous ?

3.1- Qu'apporte le glucose dans le milieu C ?

3.2- Quel est le type trophique vis-à-vis du carbone et par rapport au métabolisme énergétique ?

3.3- Définir et expliquer la présence des oligoéléments.

3.4- Quel oligoélément est indispensable pour que *Corynebacterium diphtheriae* puisse produire sa toxine ?

3.5- Les composants additifs du milieu C appartiennent à deux groupes chimiques distincts. Lesquels ?

3.6- A quelle catégorie appartiennent ces composants ? Donner une définition.

TD N°04 de Microbiologie générale

La croissance bactérienne

Exercice 01 : Croissance et métabolisme glucidique

1. On suit la croissance d'*E. coli* sur un milieu synthétique non renouvelé en évaluant la population bactérienne au spectrophotomètre. La figure 1 ci-dessous montre la croissance de cette bactérie sur milieu synthétique contenant soit du glucose, soit du xylose, l'inoculum provenant d'une culture en phase exponentielle prélevée sur milieu contenant du glucose. Commenter l'allure des courbes.

Fig. 1

2. A partir de la culture en phase exponentielle en milieu synthétique glucosé, on inocule le milieu synthétique additionné de glucose et de xylose. La croissance s'effectue selon la courbe de la figure 2. Commenter l'allure de cette courbe.

Fig. 2

Exercice 2 : Etude de la croissance en milieu liquide de *Salmonella anatum*

1. On étudie la croissance de *S. anatum* en bouillon nutritif ordinaire. On obtient les résultats suivants (N est le nombre de bactéries par millilitre de milieu) :

t(heure)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LnN	4.60	4.60	4.60	4.80	5.60	6.70	7.70	8.75	9.80	10.80	11.85	12.90

t(heure)	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
LnN	13.95	14.95	16.00	16.90	17.26	17.26	17.26	17.26	17.26	17.15	16.35	15.10	14.05

1.1. Tracer la courbe $\text{LnN} = f(t)$. Echelle : 1 cm = 1U Ln et 1cm = 1h.

1.2. Dégager les différentes phases de la croissance, leur durée et leur signification physiologique.

1.3. Calculer μ_{expo} et le temps de génération (G) de la bactérie.

2. Cette bactérie est cultivée aux mêmes conditions que précédemment mais en bouillon Trypticase-soja.

2.1. Expliquer comment varient alors μ_{expo} et G par rapport à leurs valeurs précédentes.

2.2. Proposer, sur le même graphique, un tracé de la courbe de croissance dans ce cas et justifier son allure générale.

Exercice 3 : Etude de la croissance d'*E. coli* en milieu non renouvelé

La croissance d'*E. coli* en milieu non renouvelé est étudiée sur un milieu adéquat et dans des conditions favorables.

1. Le nombre de cellules par millilitre de milieu est obtenu après dilution de la suspension initiale et inoculation d'un milieu nutritif solide en boîte Pétri.

On obtient :

Dilution	Volume inoculé (mL)	Nombre de colonies obtenues
10^{-5}	0.1	10^2

Calculer le nombre de bactéries par millilitre dans la suspension initiale.

2. Des mesures effectuées à des intervalles de temps réguliers ont permis de construire la courbe de croissance ci-dessous.

Fig.

2.1. Nommer les différentes phases dans l'ordre chronologique et donner leur durée.

2.2. Expliquer comment varie la vitesse spécifique de croissance en fonction du temps pour les différentes phases. Tracer la courbe $\mu_x = f(t)$.

2.3. Des mesures effectuées aux temps t_1 et t_2 ont donné les résultats suivants :

$$t_1 = 2\text{h} \quad \ln N = 15.85 \quad / \quad t_2 = 3\text{h} \quad \ln N = 17.95$$

Définir et calculer N_x expo. Justifier le choix des deux temps t_1 et t_2 . En déduire le temps de génération (on prendra $\ln 2 = 0.7$).

TD N° 05 de Microbiologie générale

Les agents antimicrobiens

Exercice 01 :

1) Détermination de CMI et CMB vis à vis de la kanamycine.

1-1) Préparation de la gamme et résultats pour une souche bactérienne.

Tube	1	2	3	4	5	Témoin
Kanamycine 100mg/ml	400 µl	300 µl	200 µl	100 µl	50 µl	0 µl
Muller – Hinton liq.	600 µl	700 µl	800 µl	900 µl	950 µl	1ml
Suspension bactérienne	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
Aspect après 24 heures	Limpide	limpide	limpide	limpide	trouble	trouble
UFC dans 25µL après 24H de culture sur TS	1	2	6	30		

1-1) Calculer la CMI de cette souche et l'exprimer en mg/L.

1-2) Comment peut-on qualifier cette souche bactérienne?

1-3) Préparation du dénombrement du Tube témoin : 900 µl d'eau stérile sont distribués dans 6 tubes.

Combien de ml de tube témoin pur faut-il rajouter pour réaliser le tube 10^{-1} ?

1-4) Dénombrement du témoin.

25 µL des dilutions 10^{-1} à 10^{-6} sontensemencés sur gélose TS.

Combien y aura-t-il de colonies pour 25 µL de chaque dilution après culture sachant que le tube témoin contient $3 \cdot 10^6$ bactéries/ml ?

Exprimer les 6 résultats en UFC dans un tableau.

1-5) Calculer la CMB de la souche en vous aidant du tableau du 1-1)

1-6) Comment peut-on qualifier l'action de cet antibiotique ?

Exercice 2 :

Vous étudiez 2 souches d'*E. coli* (souches S1 et S2) qui ont été obtenues par traitement aux rayons ultraviolets d'une souche sauvage S0. Vous réalisez trois étalements sur gélose avec ou sans streptomycine et les résultats sont présentés après 24h d'incubation.

Streptomycine	Souche S0	Souche S1	Souche S2	Souche S1+S2
+	Colonies bleues	Colonies blanches	Colonies bleues	Colonies bleues et blanches
-	vide	vide	Colonies bleues	Colonies bleues et blanches

1. Quel est le rôle de la streptomycine ?
2. Quelle est l'action des rayons ultraviolets sur la souche sauvage S0?
3. Préciser sur quelle molécule biochimique des cellules bactériennes les rayons ultraviolets ont réagi.