

TD 03

Besoins nutritionnels (Généralités) et Milieux de cultures

NUTRIMENTS

Les différents milieux naturels de croissance des bactéries sont de composition très variée généralement classés en milieux :

- *Oligotrophe* (matière organique dissoute < 15mg/l)
- *Mésotrophes* (matière organique dissoutes comprise entre 15 et 30mg/l)
- *Eutrophes* (matière organique dissoute > 30mg/l)

Les nutriments en solution sont absorbés par les bactéries à partir de leur milieu de croissance. Leur intégration dans le métabolisme général bactérien permet à la fois (la biosynthèse du matériel cellulaire, la production de l'énergie nécessaire et la réalisation des activités vitales annexes (transport de substrat...)).

1. Éléments majeurs (Macroéléments)

Parmi les éléments du tableau périodique, seuls 11 éléments sont considérés comme éléments majeurs, et sont en général requis par les bactéries en concentration relativement élevée ($>10^{-4}$ M).

Pour les bactéries comme pour les autres organismes vivants : *le carbone (C), l'oxygène (O), l'hydrogène (H), et l'azote* constituent les **composants principaux** de la matière organique cellulaire (formation de la totalité du matériel cellulaire).

Les autres éléments majeurs sont tout aussi essentiels et sont impliqués dans diverses structures et activités cellulaires.

Tab. Éléments chimiques majeurs requis par les bactéries

Éléments	Source	Fonctions
C	Organique (Sucres, alcool, acides organiques...) Inorganique (CO, CO ₂)	
O	Organique (différents substrats organiques...) Inorganique (O ₂)	<i>Composants majeurs</i> et essentiels du matériel cellulaire
H	Organique (Sucres, alcool, acides organiques...) Inorganique (H ₂)	Squelette de la matière organique
N	Organique (Protéines, acides aminés) Inorganique (N ₂ , Nitrate, Nitrite, Ammoniac, sel d'ammonium)	(glucide, lipides, protéines, ADN....)
S	Organique (Acides aminés soufrés <i>méthionine, cystéine</i>) Inorganique (S élémentaire, H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻)	<i>Composant</i> (Acides aminés soufrés, vitamines (biotine), <i>coenzymes</i> (Coenzyme A)
P	Organique (nucléotides, ...) Inorganique (phosphate inorganique H ₃ PO ₄)	<i>Composant</i> (Acides nucléique, phospholipides, nucléotides ATP, NADP...)
K	Inorganique (sels de K) (KCl..)	<i>Cation inorganique cellulaire, cofacteur enzymatique</i>
Mg	Inorganique (sels de Mg) (MgSO ₄ ...)	<i>Composant</i> (paroi, membrane, ribosome) (<i>Stabilisateur</i>), <i>cofacteur enzymatique</i>
Ca	Inorganique (sels de Ca) (CaCl..)	<i>Composant</i> (Endospore, chromosome, paroi) (<i>Stabilisateur</i>), enzymes
Fe	Inorganique (hydroxyde ferreux FeOOH)	<i>Composant</i> (cytochrome, protéine Fe-S), cofacteur enzymatique
Na	Inorganique (sels de Na) (NaCl...)	Éléments de transport cellulaire

2. Oligoéléments (Microéléments)

En plus des éléments majeurs, la nutrition bactérienne exige également la présence de certains éléments minéraux dont quelques métaux requis en très faible concentration appelés (oligoéléments ou micronutriments).

Présent dans le milieu sous forme de sel e sont absorbés sous la forme ionique 'anions ou cations'. Ils participent au maintien de la structure des protéines, composition des enzymes, et comme cofacteurs enzymatique *exp.* Zinc (Zn²⁺), Manganèse (Mn²⁺), Cuivre (Cu), Cobalt (Co), et le Molybdène (Mo)

Les éléments suivants sont par contre toujours toxiques (As, Cr, Ti, Hg, Bi, Pb, Ag, U et le Rd)

3. Facteurs de croissance (Besoins spécifiques)

En Complément des éléments de base certaines bactéries exigent pour leur croissance des substances organiques qu'elles sont incapables de les synthétiser. Ils appartiennent principalement à trois catégories de composés : les acides aminés, les bases azotés et les vitamines.

Les facteurs de croissance ont un rôle essentiel dans la croissance soit parce qu'ils constituent des éléments de structure cellulaire (AA, base azotés), soit parce qu'ils sont essentiels à l'action enzymatique (vitamines).

- L'apport quantitatif en facteur de croissance est limité : les besoins sont estimés à environ 10-25mg/l pour les éléments du premier groupe (les acides aminés, les bases azotés) et moins de 1mg/l pour les vitamines.
- Les facteurs de croissance les plus communément exigés sont les vitamines (biotine, acide p-Aminobenzoïque, thiamine, acide nicotinique, vitamine B12...

4. Eau

En plus de son rôle de constituant cellulaire fondamental et de son rôle métabolique, l'eau est vitale pour les bactéries par sa fonction de solvant des nutriments du milieu (état dissous).

Les besoins bactériens sont exprimés en humidité relative du milieu, évaluée par le paramètre **A_w** (Water activity) qui correspond au rapport de la pression de vapeur eau du milieu considéré sur la pression de l'eau à l'état pure à la même température.

- Les besoins microbiens varient sur l'échelle suivante (0.6<A_w<0.998).
- Pour la grande majorité des bactéries, une activité de l'ordre de 0.98 est indispensable.

MILIEUX DE CULTURE

La croissance bactérienne peut être obtenue au laboratoire (*in-vitro*) sur des milieux de culture. Un milieu de culture est une préparation aqueuse (un support) au sein de laquelle des bactéries ou microorganismes peuvent se multiplier, il doit donc satisfaire aux exigences nutritives (source de C, N, oligoéléments, facteur de croissance...) du microorganisme étudié.

Il existe différentes type de milieux de culture classés selon plusieurs critères :

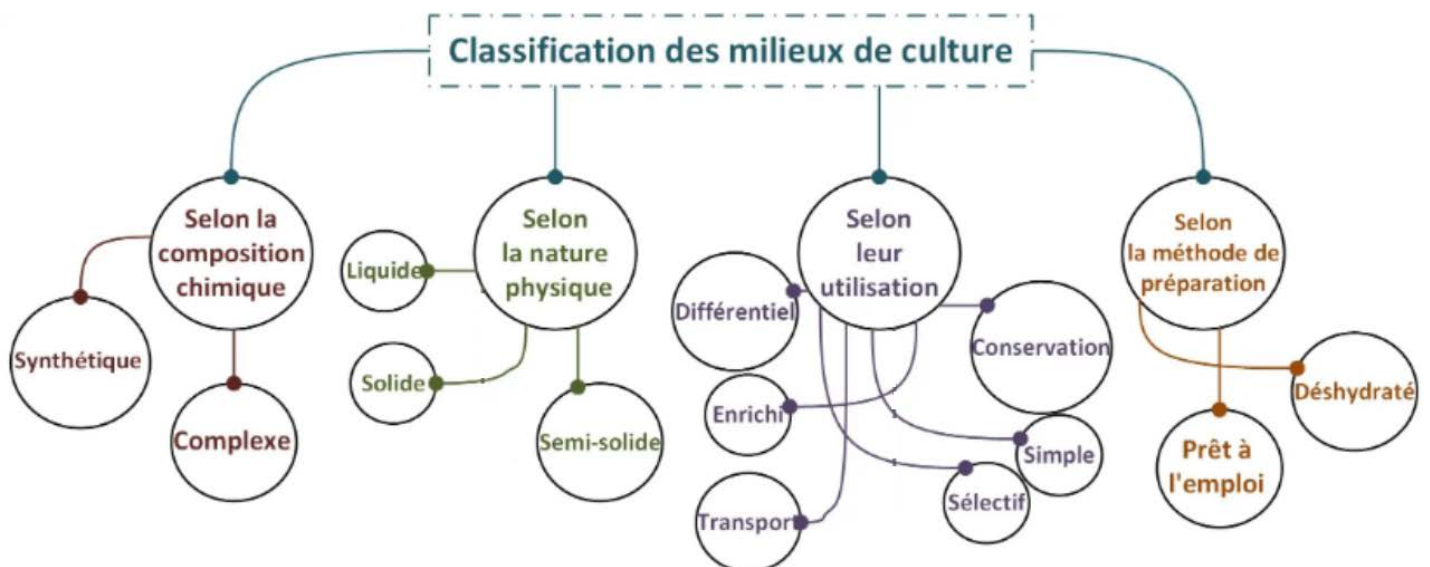


Fig. classification des milieux de culture

1. Nature physique du milieu (Texture)

Il existe différents types de milieux de culture à l'aspect liquide ou gélosé

- **Milieux liquides** : les milieux peuvent être préparés sous forme de milieux liquide ne contenant pas l'**agar agar** (substance gélifiante) par exp : bouillon nutritif, la croissance se traduit par un trouble ou des dépôts et des voiles superficiels.

Exemple : bouillon nutritif BN, Bouillon trypticase soja (TSB)...



Fig. milieu liquide en tube

- **Milieux solide** : les milieux liquides peuvent être convertis en milieu solide (milieux gélosés) par l'incorporation dans le milieu liquide d'une substance gélifiante (Agar) ajoutée à 1.5 à 2% (15 à 20g/l). Ces milieux sont utilisés dans des récipients plats (Boite de Petri) où ils sont coulés à l'état fondu. La croissance se traduit par un amas cellulaire dite colonie bactérienne visible à l'œil nu (En théorie une colonie provient d'une cellule mère).

- **Milieux semi-solide** : milieux contenant de 0.5-1% de l'agar-agar.

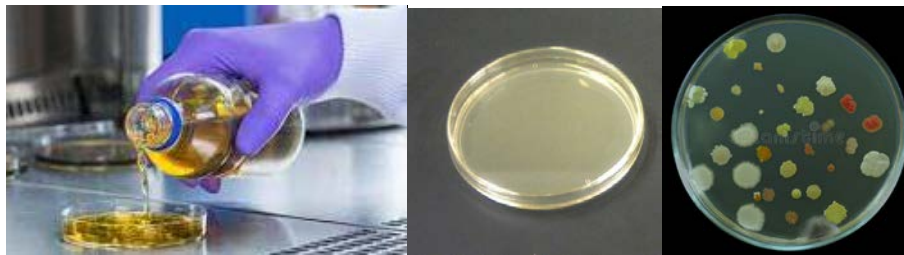


Fig. Coulage d'un milieu de culture solide sur boite de Pétri (à gauche) colonies bactériennes (à droite).

L'AGAR-AGAR, un polysaccharide complexe extrait d'algue rouge marine appartenant aux familles des Gelidiacées (Gelidium). Les caractéristiques suivantes ont fait de l'AGAR-AGAR l'agent solidifiant idéal pour la croissance de microbes :

- Non-toxique pour la plupart des microbes et/ou autres formes de vie.
- Fond seulement à (90°-100°C), mais solidifie à 45°C (température à laquelle la plupart des microbes survivent).
- Stable aux températures de stérilisation.
- Physiologiquement inerte puisque très peu de bactéries possèdent les enzymes pour le digérer.

2. Composition du milieu

- **Milieux complexes ou empiriques** : De composition chimique complexe indéterminé, car obtenus par l'hydrolyse globale de tissu ou de cellules de diverses origines dont les hydrolyses sont séchés puis broyés ils peuvent être : Origine animale (lait, sérum, bouillon et gélose gélatine, ou d'origine végétale (peptone de soja, pomme de terre...).

- **Milieux synthétiques** : dans lesquels tous les composants sont connus qualitativement et quantitativement. Ces milieux sont formés d'eau distillée, ajouté de composés chimique hautement purifiés et en quantité définies. **Citrate de Simons, Citrate de Christensen, Urée-Tryptophane.**

- **Milieux semi-synthétiques** : Composés d'une fraction complexe et autre synthétique bien définie.

3. UTILISATION DU MILIEU

- **Milieu de base (Minimum)** : Un milieu minimum ou milieu défini est un milieu comportant les éléments chimiques *strictement* nécessaires à la croissance bactérienne, sous une forme utilisable par des bactéries n'ayant pas d'exigence particulière.

Composition d'un milieu minimum :

- une source de carbone et d'énergie, généralement le **glucose** ;
- une source de potassium et de phosphore : K_2HPO_4 ;
- une source d'azote et de soufre : $(NH_4)_2SO_4$;
- une source de magnésium : $MgCl_2$;
- une source de calcium : $CaCl_2$;
- une source de fer : on emploie le citrate de fer (le citrate a pour rôle de maintenir le fer en solution) ;
- une source d'oligo-éléments : sels de Cu, Zn, Co, Ni,
- une source **d'eau** (eau distillée) ;
- un tampon pH : il permet de maintenir un pH correct voire optimum : KH_2PO_4 par exemple.

- **Milieux simple** : appelés aussi milieux usuels non sélectifs, on regroupe sous ce vocable tous les milieux ne contenant aucune molécule inhibitrice. Ils sont en général de préparation assez simple et généralement peu coûteuse, ces milieux contiennent une base nutritive constituée de molécules azotées (acides aminés, molécules organiques diverses...) provenant de l'hydrolyse de produit d'origine vivante (animale, végétale, mycélienne) comme les peptones, les extraits de viande ou de levure exemple **gélose et Bouillon nutritif, gélose et Bouillon Muller-Hinton**.

- **Milieux sélectif** : destinés à favoriser la croissance d'une ou plusieurs espèces bactériennes particulières en empêchant la culture d'autres micro-organismes. Pour cela on ajoute des éléments qui *inhibent* la croissance des micro-organismes indésirables comme le **chlorure de sodium** à forte concentration, le **thiosulfate de sodium**, le **crystal violet** ou **certaines antibiotiques**, etc. Les éléments ajoutés sont sélectionnés selon les caractéristiques du micro-organisme recherché. Ces milieux sont utilisés pour l'analyse d'un prélèvement **polybactérien**. Exemple. **Gelose S-S, Gelose chapaman...**

- **Milieux d'enrichissement** : Les milieux de culture enrichis contiennent, outre les composants de base, des composants indispensables aux bactéries, que celles-ci ne peuvent pas synthétiser. Ce sont des milieux utilisés pour l'obtention des bactéries dites « *exigeantes* ». Par exemple : **les milieux au sang frais** (le sang est riche en nutriments divers comme le fer, principal facteur de croissance des bactéries) : **gélose au sang frais ou cuit**.

- **Milieux différentiels** : Le milieu de culture dit « **différentiel** » ou « **indicateur** » permet de distinguer deux types de microorganismes se développant dans un même milieu...Ce type de milieu met en évidence certaines caractéristiques biochimiques des microorganismes (principalement l'aptitude à dégrader un substrat) en présence d'indicateur(s) de la réaction chimique : des indicateurs colorés de pH ou d'oxydoréduction (tels que le rouge neutre, rouge de phénol, l'éosine ou le bleu de méthylène).



Fig. Quelques milieux de culture