

DS n°8
Type Examen
calculatrice autorisée

Quelques aspects concernant le Genre *Pseudomonas*

1. Taxonomie du genre *Pseudomonas*

Au départ, le genre *Pseudomonas* a accueilli un très grand nombre d'espèces (294 espèces sont citées dans la huitième édition du "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology") présentant des caractères phénotypiques communs.

La taxonomie moléculaire, avec l'étude des caractéristiques du génome et notamment l'étude du % GC a conduit au remaniement de ce genre et au reclassement d'un certain nombre d'espèces dans d'autres genres. Les *Pseudomonas* ont un % GC compris entre 58 et 70.

1. Qu'est ce qu'un caractère phénotypique ? Exemples
2. Quelle est la définition générale d'une espèce (règne animal, végétal) ? Comment est définie une espèce bactérienne donc procaryote ?
3. Etablir une comparaison entre les cellules procaryotes et eucaryotes.
4. Etude du % GC d'une espèce est réalisés de la façon suivante : L'ADN bactérien est extrait, mis en solution puis soumis à un chauffage progressif ; le document 1 montre l'évolution de l'absorbance de la solution au cours du temps.
 - 4.1. Expliquer le principe de cette technique ; justifier l'augmentation de l'absorbance et préciser la longueur d'onde utilisée.
 - 4.2. Déterminer le Tm (melting température ou température de fusion).

En déduire le % GC sachant que % GC est directement proportionnel au Tm et que l'équation de la droite est $\%GC = 2,44Tm - 169$. Conclure.

4. Quelles sont les autres techniques de taxonomie moléculaire utilisées ? (à exposer en quelques lignes).

2. Identification des bactéries du genre *Pseudomonas*

L'identification d'une bactérie présumée du genre *Pseudomonas* est conduite de la façon suivante :

- réalisation d'un gram, d'un état frais
 - test oxydase
 - ensemencement d'une gélose Vf
 - ensemencement d'une galerie API 20NE
1. Quels seront les résultats confirmant le genre *Pseudomonas* ? (sauf pour la galerie API 20NE).
 2. Définir exactement le type respiratoire de ce genre.
 3. De façon générale, le test oxydase doit être réalisé sur un milieu dépourvu de glucides ; pourquoi ?
 4. Les *Pseudomonas* possèdent tous une catalase ; quelle est le rôle exact de cette enzyme chez une bactérie ?
 5. La galerie API20NE est prévue pour l'identification en microméthode des « bacilles gram - non entérobactéries (NE) et non fastidieux » . Un extrait de la fiche technique est présenté sur le document 2.
 - 5.1. Quelle est la nature biochimique des composés GLU à PAC ? comment s'appelle ce test ?
 - 5.2. Observer la composition du milieu AUX médium. Comment peut-on qualifier ce milieu ? Discuter sa composition ; en déduire la lecture et la signification des tests positifs.
 - 5.3. Justifier le mode d'ensemencement des cupules correspondant aux tests d'assimilation (inoculum, milieu) .
 - 5.4. La galerie API 20NE comporte finalement 2 test « GLU ». Un test noté GLU et un noté |GLU| Comparer la signification de ces deux tests.
 - 5.5. Expliquer le principe de la lecture du test ADH .
 - 5.6. La cupule NO₃ permet d'étudier l'action d'une souche sur les ions nitrates.
- Indiquer le rôle des réactifs de lecture de cette cupule et la signification exacte des couleurs observées.

5.7. Un certain nombre de *Pseudomonas* sont capables de réduire les nitrates en diazote.

Quel est le rôle des ions nitrates et la signification de ce phénomène?

5.8. Quel est le type trophique du genre *Pseudomonas* vis-à-vis de la source d'énergie ? Donner sa définition.

3. Etude de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa présente un rôle pathogène avéré : la recherche de cette bactérie est fréquemment réalisée en milieu hospitalier, dans les eaux, sur les surfaces. En effet, c'est une bactérie pathogène opportuniste à l'origine d'infections npsocomiales. Cette espèce possède de nombreux facteurs de virulence et produit au moins quatre protéases qui provoquent des hémorragies et des nécroses tissulaires.

Pseudomonas aeruginosa se caractérise par la production de pigments, mis en évidence par l'utilisation de milieux tels les milieux de King A et King B, ou la gélose au cétrimide.

1. Expliciter les deux termes soulignés.

Quels autres germes présentent le même type de pouvoir pathogène ?

2. Quelles types d'infections sont dues à *Pseudomonas aeruginosa*?

3. Donner des exemples d'éléments de structures bactériennes que l'on peut qualifier de « facteurs de virulence »

4. Quels sont les pigments produits par l'espèce *aeruginosa* ? Dans quelles conditions sont produits ces pigments et quel est leur rôle pour la bactérie ?

4. Dénombrement des *Pseudomonas* dans un aliment

Le dénombrement des *Pseudomonas* n'est pas systématique en microbiologie alimentaire, mais peut-être réalisé sur des produits carnés. En effet, cette bactérie est à l'origine de certaines altérations des carcasses de viande.

1. Quelles types altérations peuvent se produire lors de la conservation des viandes ? envisager le cas de viandes conservées au froid.

2. Le dénombrement de *Pseudomonas* est réalisé comme indiqué dans le document 3.

Voici les résultats obtenus :

Dilution de la solution mère SM	10 ⁻⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²
Colonies	>300	254	42
	>300	198	37

La confirmation est réalisée sur 5 colonies et donne un résultat positif 1 seule fois.

Donner le résultat du dénombrement *en Pseudomonas* par cm² de surface de viande.

5. Utilisation industrielle des bactéries du genre *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* et assimilés ont une la capacité d'utiliser comme seul substrat énergétique des molécules très variées, notamment des hydrocarbures.

Ainsi, une espèce assimilée au genre *Pseudomonas*, *Thalassolituus oleivorans*, isolée de l'eau de mer, halophile, utilise les hydrocarbures aliphatiques (en C7 - C20) et leurs dérivés oxydés comme unique source de carbone et d'énergie. De ce fait, elle pourrait être utilisée pour la biodégradation des hydrocarbures marins.

1. Dans quelles conditions de culture peut-on sélectionner cette souche ?

2. L'obtention d'une biomasse suffisante de la souche est conduite en fermenteur pilote de 2L.

Le document 4 présente le schéma d'un tel fermenteur. Compléter les annotations 1 à 8 du schéma

3. Exposer les composants d'une boucle de régulation de la pO₂?

4. L'inoculum de la souche pure de *Thalassolituus* est introduit dans un fermenteur, sous agitation maximale et régulé en température.

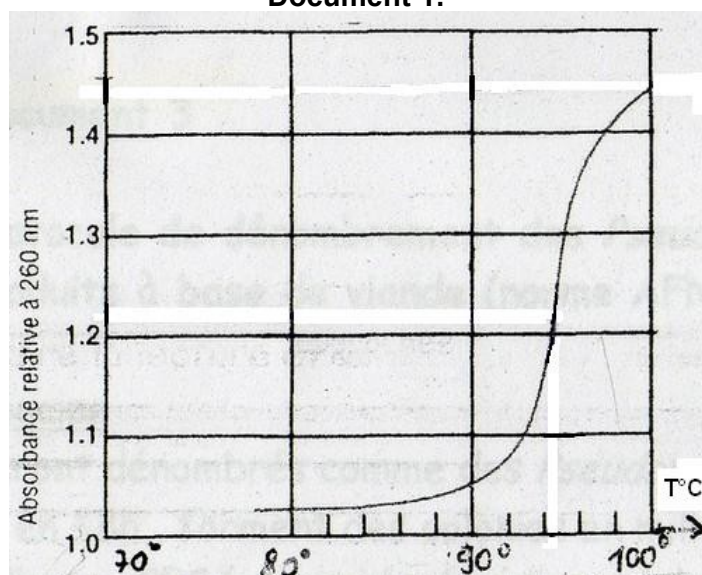
Le milieu comporte un hydrocarbure en C14, une source d'azote minérale et les autres minéraux nécessaires.

On suppose la mortalité nulle pendant la production.

	hydrocarbure en g/L	Biomasse sèche X en g/L	Azote en g/L	LnX	valeur approchée de μ_x
0	40	0,1	4,	-2,30	
2	39.83	0,18	3,99	-1,71	0,295
4	39.50	0,315	3,97	-1,13	0,295
6	38.97	0,581	3,94	-0,54	0,275
8	38	1,04	3,88	0,03	0,29
10	36.20	1,87	3,78	0,62	0,295
12	32.90	3.35	3,59	1,2	0,295
14	27.20	6	3,24	1,79	0,295
16	17.10	10,7	2,57	2,37	0,275
18	1.11	17,9	1,50	2,88	0,132
20	0	18.3	325	2,9	

- 4.1. Analyser l'ensemble de ces résultats. Qui du l'hydrocarbure ou de la source d'azote parait limitant de la croissance exponentielle ?
- 4.2. Comment peut-on qualifier la souche cultivée quand ses besoins spécifiques ?
- 4.3. Comment sont calculées les valeurs de μ_x approchées données dans le tableau ?
- 4.4. Déterminer le taux de croissance horaire et le temps de génération G.
- 4.5. Calculer le rendement de conversion de la source carbonée en biomasse.

Document 1:



Document 2:

API 20 NE

SYSTÈME D'IDENTIFICATION DES BACILLES
GRAM NÉGATIF NON-ENTEROBACTERIES

Notice technique
Version H

API 20 NE est un système standardisé combinant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation, pour l'identification des bacilles Gram négatif n'appartenant pas à la famille des entérobactéries, mais principalement aux genres suivants : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc

Composition des milieux et réactifs

- **AUX Medium** (inclus dans le coffret)

Sulfate d'ammonium	2.0 g
Agar	1.5 g
Base minérale	82.8 mg
Amino-acides	250.0 mg
Vitamines et substances nutritives	35.9 mg
Tampon phosphate 0.04 M pH 7.1	qsp 1000 ml
pH final : 7.0 - 7.2	
- **NaCl 0.85 % Medium**, 2 ml

Chlorure de sodium	8.5 g
eau distillée	1000 ml
- Réactifs de Griess pour les nitrites :
 - NIT 1**

acide sulfanilique	0.8 g
acide acétique 5 N	100 ml
 - NIT 2**

N-N-diméthyl-1-naphtylamine	0.6 g
acide acétique 5 N	100 ml
- Réactif **JAMES** pour la recherche de l'indole

Composant J 2183	0.5 g
HCl N qsp	100 ml
- réactif **OX** pour la recherche de l'oxydase :

tetraméthyl-p-phénylènediamine	1 g
alcool isoamylique	100 ml

Mode opératoire

1. Sélection des colonies

API 20 NE est réservée aux bacilles Gram négatif non enterobactéries. Il convient donc de repérer sur la boîte d'isolement quelques colonies identiques et de rechercher l'oxydase sur l'une d'elles, comme suit :

- déposer un morceau de papier filtre sur une lame de verre
- humidifier avec une goutte d'eau distillée stérile
- étaler la colonie choisie avec un applicateur de verre ou de bois
- ajouter une goutte du réactif **OX**
une couleur **VIOLETTE** apparaissant en 1-2 minutes indique une **REACTION POSITIVE**

Cette réaction doit être notée sur la **fiche de résultats** car elle constitue le 21^e test de l'identification.

NOTE : certaines espèces de bacilles Gram négatif non enterobactéries qui sont oxydase-négatif (*Ps. maltophilia*, *Acinetobacter*...) sont parfaitement identifiées avec **API 20 NE**. On s'aidera du contexte clinique ou bactériologique pour utiliser cette galerie.

2. Préparation de la galerie

- réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide
- inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- retirer la galerie de son emballage individuel, la déposer dans la boîte d'incubation et jeter le dessiccant.

3. Préparation de l'inoculum

- ouvrir une ampoule de **NaCl 0.85 % Medium** (= 2006) ou utiliser un tube contenant 2 ml de la même solution, sans additif.
- réaliser une suspension bactérienne de turbidité égale à celle de l'**étalon 0.5 de McFarland**, prélever pour cela 1 à 4 colonies à l'aide d'une pipette, par aspirations ou par touches successives.

4. Inoculation de la galerie

- remplir les tubes (et non les cupules) des tests **NO₃**, à **PNPG** avec la suspension précédente et avec la pipette ayant servi au prélèvement. Éviter la formation de bulles en posant l'extrémité de la pipette sur le côté de la cupule.
- ouvrir une ampoule de **RUX Medium** et y transférer 200 µl, soit 4 à 8 gouttes de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- remplir tubes et cupules des tests **GLU** à **PAC** en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (**GLU**, **ADH**, **URE**) pour former un ménisque convexe.
- refermer la boîte d'incubation et incubé à 30° C pendant 18-24 h.

Tableau de Résultats

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
NO ₃	nitrate de potassium	réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
		réduction des nitrates en azote	Zn / 5 min	
TRP	tryptophane	formation d'indole	JAMES / immédiat	
			incolore vert pâle / jaune	rose
GLU	glucose	fermentation	bleu à vert	jaune
ADH	arginine	arginine dihydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	uréase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine	hydrolyse (β -glucosidase)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (à l'encre de chine)	hydrolyse (protéase)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitrophényl- β -D- galactopyranoside	β -galactosidase	incolore	jaune
[GLU]	glucose	assimilation		
[ARA]	arabinose	assimilation		
[MNE]	mannose	assimilation		
[MAN]	mannitol	assimilation		
[NAG]	N-acétyl-glucosamine	assimilation		
[MAL]	maltose	assimilation		
[GNT]	gluconate	assimilation		
[CAP]	caprate	assimilation		
[ADI]	adipate	assimilation		
[MLT]	malate	assimilation		
[CIT]	citrate	assimilation		
[PAC]	phényl-acétate	assimilation		
OX	tétraméthyl-p- phénylène diamine	cytochrome-oxydase	OX / 1-2 min	
			incolore	violet

Document 3

Protocole de dénombrement des *Pseudomonas* sur les viandes et produits à base de viande (norme AFNOR NF V 04-504)

Principe

Seront dénombrés comme des *Pseudomonas* les bactéries qui, à 22°C et en 48h, forment des colonies en milieu sélectif de Mead et Adams, milieu au CFC (cétrimide, fucidine, céphalosporine), sont oxydase + et cultivent en aérobiose sur milieu de Kligler.

Préparation de l'échantillon

Prélever une pièce superficielle de la viande, de 2 à 3 mm d'épaisseur, sur une surface de 5 x 5cm. Homogénéiser dans 100ml d'eau peptonée tamponnée : ceci constitue la suspension mère.

Dilutions et ensemencement

Réaliser les dilutions décimales de la suspension mère en eau physiologique stérile.

Transférer 1mL des dilutions testées dans des boîtes de pétri stériles, en double essai. Couler 15mL de milieu gélose CFC. Incuber 48h à 22°C. Dénombrer les colonies (utiliser la norme AFNOR 1996)

Confirmation

Isoler 5 colonies prélevées au hasard sur chacune des boîtes contenant entre 15 et 300 colonies. Réaliser un test oxydase et ensemencer un milieu de Kligler à partir de la culture pure. Sont confirmées comme étant du genre *Pseudomonas* les colonies oxydase positive et ne se développant que sur la pente du milieu de Kligler.

Norme AFNOR 7218 19961 : Calcul standard après simple comptage

Le calcul de la concentration en micro-organismes [N] présents dans l'échantillon essai est une moyenne pondérée à partir des résultats de 2 dilutions successives.

Pour que le calcul soit valable, il est nécessaire de compter sur au moins une boîte contenant au moins 15 colonies. Soit n_1 la somme de toutes les colonies comptées sur toutes les boîtes retenues (et tel que au moins une des boîtes comptées contenait au moins 15 colonies).

Soit V le volume inoculum appliqué à chaque boîte (en général exprimé en mL).

Soit n_1 le nombre de boîtes retenues à la première dilution (en général 2).

Soit n_2 le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution (en général 2).

Soit d le taux de dilution de la première dilution retenue pour les comptages sur boîte.

$$[N] = \sum c / (n_1 + 0,1 n_2) \cdot dV$$

Arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs.

Calcul lorsque le comptage est suivi d'une identification.

Lorsque la méthode utilisée nécessite une identification, un nombre déterminé α (en général 5) de colonies sont repiquées à partir de chacune des boîtes retenues pour le comptage des colonies. Après identification, on calcule, pour chacune des boîtes, le nombre probable A de micro-organismes identifiés par la formule :

$$A = (\beta / \alpha) \cdot c$$

où β est le nombre de colonies répondant aux critères d'identification

et c le nombre total de colonies dénombrées sur la boîte. A est arrondi au nombre entier le plus proche.

On calcule alors $[N_{\text{ident}}]$, la concentration en micro-organismes identifiés présents dans l'échantillon essai, à l'aide de l'équation :

$$[N_{\text{ident}}] = \sum A / (n_1 + 0,1 n_2) \cdot dV$$

Arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs.

Document 4 :

