

Relation des micro-organismes au dioxygène

Le métabolisme énergétique permet aux cellules de régénérer l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate. Chez les chimiotrophes, on rencontre plusieurs types de métabolisme énergétique : respiration avec le dioxygène comme accepteur terminal des électrons, respiration avec accepteur terminal autre que le dioxygène (nitrate, sulfate ...), fermentations, méthanogénèse...

Le dioxygène exerce des effets toxiques puissants. Les bactéries qui respirent avec le dioxygène comme accepteur terminal des électrons disposent de moyens efficaces de lutte contre les effets toxiques du dioxygène les micro-organismes qui n'utilisent pas le dioxygène ont des capacités à supporter sa présence très variées.

Voici un tableau qualifiant les « plus classiques » des métabolismes énergétiques rencontrés chez les bactéries chimiorganotrophes et les relations de ces micro-organismes au dioxygène.

Nature du métabolisme énergétique	Relation au dioxygène	Appellation ^(*)	
Respiratoire obligatoire, O ₂ accepteur terminal des électrons. (Avec parfois l'éventuelle possibilité d'une respiration avec NO ₃ ⁻ et ou NO ₂ ⁻ comme accepteur terminal, en anaérobiose uniquement)	Nécessité de la présence de dioxygène en milieu dépourvu de nitrates et nitrites. Souches adaptées à la pression partielle en dioxygène de l'atmosphère terrestre.	Aérobie strict (Aérobie obligatoire)	
Respiratoire obligatoire, O ₂ accepteur terminal des électrons.	Nécessité de la présence de dioxygène en milieu dépourvu de nitrates et nitrites. Souches inadaptées aux pressions partielles en dioxygène aussi élevées que celles de l'atmosphère.	Micro-aérophile	
Respiratoire, O ₂ accepteur terminal des électrons (en présence de dioxygène) ou fermentaire (en absence de dioxygène). (Avec parfois, en anaérobiose, l'éventuelle possibilité d'une respiration avec NO ₃ ⁻ et ou NO ₂ ⁻ comme accepteur terminal, uniquement)	Culture possible en présence ou en absence de dioxygène.	Aérobie-anaérobie facultatif (Aéro-anaérobie facultatif)	
Fermentaire (uniquement).	Le dioxygène est bien toléré.	Anaérobie-aérotolérant	Il un continuum de tolérances au dioxygène depuis très bien toléré à vraiment très mal toléré ...
Fermentaire (uniquement)	La culture exige l'absence de dioxygène.	Anaérobie strict	
Métabolismes énergétiques respiratoires à composés soufrés inorganiques accepteurs terminaux des électrons (respirations sulfates ...)	La culture exige l'absence de dioxygène.	Anaérobie strict	

(*) : Les appellations sont malheureusement peu figées et divergent parfois selon les auteurs. Voici quelques possibilités.

- Aéro-anaérobie facultatif = aérobie facultatif = anaérobie facultatif (ce qui ne pose pas de problème).
- Chez certains l'appellation aéro-anaérobie = aéro-anaérobie facultatif mais chez d'autres auteurs l'appellation aéro-anaérobie = aéro-anaérobie facultatif ou anaérobie aérotolérant. Conclusion : le terme aéro-anaérobie peut être très ambigu.
- Pour de nombreux auteurs, est aérobie tout microorganisme capable de se développer en présence de dioxygène atmosphérique. Ainsi les aérobies stricts, les aéro-anaérobie facultatifs et les anaérobies aérotolérants sont des aérobies. Mais certains auteurs restreignent le terme aux aérobies stricts et aux aéro-anaérobie facultatifs. D'autres auteurs utilisent aérobie et aérobie strict comme synonymes. Conclusion : le terme aérobie peut être ambigu.
- Pour de nombreux auteurs, est anaérobie tout microorganisme capable de se développer en absence de dioxygène atmosphérique. Ainsi les aéro-anaérobie facultatifs et les anaérobies aérotolérants et les anaérobies stricts sont des anaérobies. Mais certains auteurs restreignent le terme aux anaérobies aérotolérants et aux anaérobies stricts. Conclusion : le terme anaérobie peut être ambigu.

Deux tests simples de bactériologie, le test dit des « types respiratoires » et le test dit de la catalase permettent de caractériser les relations des bactéries chimiorganotrophes au dioxygène et de qualifier leur métabolisme énergétique.

1. Matériel, réactifs et souches disponibles

1.1 Par étudiant

- Deux souches pures présentées sur boîte en milieu trypticase soja (TCS) et clairement identifiées ;
- Quatre boîtes TCS stériles ;
- Deux milieux Vf en surfusion à 45°C ;
- Matériel usuel de laboratoire de microbiologie ;

1.2 En commun

- 5 postes de mesure de la consommation de dioxygène (voir annexe 1) ;
- Des cultures en bouillon nutritif glucosé des souches pures disponibles.

2. Travail à réaliser

2.1) Analyse de risques et de sécurité

Vérifier que les souches proposées sont utilisables dans le cadre des conditions proposées. Justifier dans le compte-rendu.

2.2) Tests sur chacune des deux souches

- Observation d'un frottis coloré « au Gram ».
- Deux isollements en milieu TCS. Une des boîtes sera incubée à 30° en présence d'air ambiant (milieu aérobie), la seconde sera incubée à 30°C en jarre anaérobie (milieu sans O₂) (voir annexe 2).
- Un test dit des « types respiratoires » en milieu Vf en tube étroit. Fiche technique en annexe 3.
- Un test catalase. Fiche technique en annexe 4.

2.3) Mesure de consommation de l' O₂ sur l'une des deux souches

Le montage permet de mesurer une éventuelle consommation de dioxygène (O₂). Les résultats seront mis en relation avec ceux obtenus sur milieu Vf en tube étroit, les incubations après isollements et le test catalase. Les mesures sont effectuées à l'aide d'un capteur de Clark. Dans la salle, cinq postes de mesure seront montés (Cf. annexe 1). Tester l'une des deux souches qui vous ont été proposées.

3. Analyse et interprétation des résultats

- Présenter les résultats obtenus sur les deux souches testées (y compris le « Gram »).
- Construire un tableau récapitulatif des résultats obtenus pour les différentes souches testées par le groupe d'étudiants (=> mise en commun des résultats).
- Rédiger les conclusions conformes quant au type respiratoire et énergétique des souches étudiées.

4. Bibliographie

- Prescott, Harley, Klein ; Microbiologie ; 2^e édition française De Boeck, 2003
- Madigan, Martingo ; Brock Biologie des micro-organismes, 11 édition, traduction française, Pearson Education, 2006
- Euzéby, Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale sur <http://www.bacteriologie.net/generale/nutritioncroissance.html>
- Donald B. et al. ; Proc. Nati. Acad. Sci. USA Vol.87, pp.8227-8231, November1990
- Y Fortin et al. ;1990, J. Bacteriol. 172(11):6607

Annexe 1 : le montage pour les mesures de consommation de dioxygène

Préalable : savoir utiliser une électrode de Clark et le réactif dithionite (nocif) (cf document tp-utilferm-clark.odt). 0% de dioxygène sur du milieu + dithionite ou du milieu désoxygéné par gazage au diazote. 100% de dioxygène sur le bouillon nutritif glucosé (Bng) sous bullage d'air.

Pour un test de souche.
Placer un « pot de prélèvement » contenant 30 mL de Bng saturé en dioxygène sous agitation. Placer l'électrode de Clark et démarrer l'acquisition des données (dioxygène stable à 100%). Introduire 3 mL de culture à tester. Poursuivre les mesures quelques minutes.

On pourra aussi réaliser des manipulations en testant l'effet de l'azide de sodium (danger ! Voir aussi ci-dessous !). L'azide est connu comme inhibiteur de chaînes respiratoires, inhibiteur d'ATPases, inhibiteur de protéines du système ATPasique de sécrétion des protéines, perturbateur du métabolisme de l'ADN et de l'ARN. Ajouter 5 mL de solution d'azide à un instant pertinent d'une manipulation.

Gérer tous les déchets contaminés de façon conforme. Gérer tout renversements éventuels de liquides contaminés de façon conforme. Entre 2 manipulations, la sonde Clark et le barreau aimanté sont rincés à l'éthanol à 40% puis à l'eau.

L'azide (azoture de sodium) est un produit très toxique et dangereux pour l'environnement (Toxicité aiguë orale (Catégorie 2), toxicité aiguë pour le milieu aquatique (Catégorie 1), toxicité chronique pour le milieu aquatique (Catégorie 1), Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique, voir fiche MSDS. C'est un produit non volatil. Il est proposé ici sous forme d'un flacon de 10 mL de solution à 0,75 % (soit 75 mg par flacon, équivalent à la dose d'azide dans 300 mL de milieu « bile-esculine-azide »). la DL50 par voie orale (rats) = 27 mg/kg.

8 hours limit recommended exposition TWA (time-weighted average) = 0,1 mg/m³ (from European Commission).

Extrait de « Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits » 2009, European Commission : most human acute toxicity data are coming from poisonings caused by accidental or intentional ingestion of sodium azide. The symptoms - sweating, headache, increased pulse rate, decreased blood pressure, blurred vision, faintness – were rapidly reversible after ingestion of 5 to 10 mg sodium azide (0.09 to 0.18 mg/kg) in one case, while in another case, the parameters reached normal levels again after 1 h of ingestion of 50-60 mg sodium azide. (Richardson et al., 1975).

Annexe 2. Test dit des « types respiratoires », en milieu Vf (viande foie) en tube étroit

Le milieu Vf est un milieu riche gélosé conditionné en tube étroit puis stérilisé par autoclavage. Avant d'être utilisé, il est régénéré au bain-marie bouillant pendant vingt minutes. Le passage à 100°C permet d'éliminer l'O₂. Lors de l'incubation, l'aération du tube liée dévissage partiel du bouchon permet la solubilisation et la diffusion progressive de l'O₂. La solubilisation du dioxygène est lente et sa diffusion est freinée par en milieu gélifié. Ainsi, un gradient d'O₂ est créé.

Instructions opératoires.

Régénération pendant environ 20 minutes en bain bouillant d'eau puis passage en surfusion à 45°C. Ensemencement à l'aide d'une pipette Pasteur fermée et chargée en remontant en spirale le tube Vf sur toute sa longueur. Solidification puis incubation à 30°C.

Annexe 3. Le test de la catalase

Le dioxygène possède des effets toxiques sur toutes les cellules vivantes : apparition d'anions superoxyde (O_2^-) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (qui cogènèrent le très toxique radical OH^\bullet). La détoxification est liée aux enzymes superoxyde dismutase, catalase et peroxydase. (Voir aussi le cours sur les effets toxiques du dioxygène).

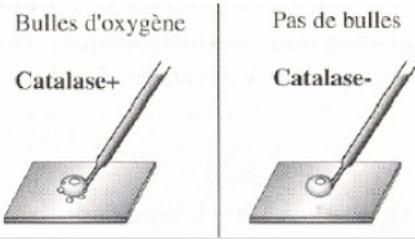
La catalase catalyse la réaction $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$

En s'intéressant à la seule catalase on constate que :

Tous les êtres vivants qui peuvent respirer en utilisant le dioxygène comme accepteur terminal des électrons présentent une activité catalase importante.

Les cellules qui n'utilisent pas le dioxygène mais supportent les ambiances aérées (fermentaires obligatoires anaérobies aérotolestants) sont presque toujours négatives à la détection de catalase. Il en est de même pour les organismes anaérobies stricts, qui ne supportent pas le dioxygène.

Type énergétique et/ou relation au dioxygène	Superoxyde dismutase (SOD)	Catalase
Peut respirer en utilisant O_2 (les aérobies stricts ou les aéro-anaérobies facultatifs)	+	+
Fermentaires obligatoires aérotolestants (anaérobies aérotolestants)	+	Presque toujours -
Anaérobies stricts	-	Presque toujours -

<p>Test catalase. Instructions opératoires.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Déposer une goutte de peroxyde d'hydrogène à 10% sur lame de microscope. • A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever une colonie sur milieu solide ; • Mettre en suspension dans la goutte d' H_2O_2 ; • Lire immédiatement. <p>(Attention, certains milieux comme les milieux au sang détruisent rapidement H_2O_2 et peuvent conduire à des faux positifs.)</p>		<p>Image de JN Joffin et G Gueyral, <i>Microbiologie technique, dictionnaire des techniques</i>, 3^{ème} édition, 2001, CNDP</p>
---	--	--

(La SOD n'est pas de mise en évidence simple et rapide, c'est pourquoi elle n'est pas testée dans le cadre du travail proposé)

Annexe 4 : Atmosphère anaérobie et « jarre anaérobie »

L'utilisation d'une enceinte close associée à un système d'élimination du dioxygène permet de cultiver les anaérobies strictes.

Les enceintes closes de microbiologie (jattes) présentent un couvercle assurant la fermeture hermétique grâce à un système de serrage et à un joint étanche.

L'atmosphère anaérobie est obtenue grâce à des systèmes réactifs commerciaux qui, après hydratation vont réduire le dioxygène en eau et provoquer un dégagement de CO_2 (hydrogénocarbonate et acide citrique le plus souvent). La réalisation et le maintien de l'anaérobiose sont contrôlés par un papier indicateur : il est imprégné de bleu de méthylène. Lorsque l'anaérobiose est créée, l'indicateur passe du bleu à l'incolore. Avec de tels systèmes, la réalisation de l'anaérobiose est lente et ils ne permettent de cultiver que les anaérobies stricts qui supportent une ambiance oxygénée pendant au moins la durée nécessaire à l'établissement de l'anaérobiose.

Instructions opératoires : selon les indications des différents « sachets d'anaérobiose » proposés par les fabricants.