

TP 1 : Règles à suivre lors des séances de TP de Microbiologie

- Port de la blouse de rigueur. La blouse en coton doit être boutonnée ;
- Nouer les cheveux longs. S'asseoir pour manipuler et pour observer au microscope ;
- Se laver les mains. Désinfecter la paillasse;
- Éviter les courants d'air ; limiter les déplacements ; éviter de parler ;
- Aucun pipetage à la bouche ;
- Ne pas porter ses doigts ou tout objet à sa bouche. Ne pas manger, boire, fumer ;
- Eviter de mettre tout objet personnel en contact avec les bactéries ;
- Marquer soigneusement les lames, tubes, boîtes, etc... avec un feutre indélébile ;
- Les manipulations seront faites dans un rayon de 20 cm autour de la flamme du bec Bunsen ;
- Ne pas éteindre la flamme sans couper l'arrivée du gaz ;
- Ne pas laisser à proximité de la flamme des objets ou liquides inflammables (papiers, alcool, etc...).

La désinfection

- Paillasse : alcool 70° (ou eau de Javel à 3° chlorométriques) à l'aide d'un papier jetable ;
- Peau contaminée : savon et alcool 60° ;
- Aucun instrument (pipette, anse) ni objet contaminé ne doit être posé directement sur la paillasse ;
- Flambage des instruments et de l'orifice des tubes : sert à stériliser localement tout objet métallique ou en verre. Le flambage se fait dans le cône bleu de la flamme.
- Orifice des tubes : flamber 1 à 2 secondes. A faire après chaque ouverture et avant chaque fermeture de tube ;
- Anse de platine : tenir l'anse verticalement ; placer la boucle métallique dans la flamme ; attendre qu'elle devienne rouge. La maintenir 5 secondes. A faire avant et après chaque utilisation
- Pipette Pasteur : La pipette est utilisée soit boutonnée (fermée) pour prendre une colonie, soit ouverte pour prélever un liquide. Il faut l'ouvrir avant le flambage. Tenir la pipette horizontalement et passer lentement la partie effilée de la pipette 5 à 6 fois dans la flamme.
- Laisser refroidir anses et pipettes environ 10 secondes avant tout contact avec un liquide, une colonie bactérienne...
- Ne jamais passé du plastique ou la pince en bois dans la flamme.

TP 02 de Microbiologie générale
Coloration simple et Coloration de GRAM

La coloration des micro-organismes est souvent effectuée avant les observations au microscope, et ceci pour:

- Mieux observer la forme et les dimensions des cellules
- Identifier et différencier les microorganismes semblables
- Mettre en évidence des détails de la structure cellulaires (spores, capsules, cils..).

En microbiologie; on distingue deux types de colorations:

□ **La coloration simple** : Obtenue avec un seul colorant tel que le bleu de méthylène ou la fuchsine.

□ **La coloration différentielle** : qui nécessite l'application de plusieurs colorants et réactifs. Ce type de coloration permette la différenciation de groupes microbiens et l'observation des parties de la cellule (Exp: Coloration de GRAM, Coloration de Zielh Nielsen; Coloration de la capsule....).

I) Réalisation d'un frottis :

Cela consiste en:

- Un prélèvement d'une goutte de la suspension bactérienne et la déposer au centre de la lame
- Un étalement de la suspension bactérienne avec l'anse de platine sur la lame de façon à obtenir un étalement mince de 1 à 2cm.
- Un séchage et une fixation en portant la lame au-dessus de la flamme du bec bunsen (la lame est tenue avec la pince en bois).

II) Coloration au bleu de Méthylène :

Cette coloration consiste à:

- Recouvrir le frottis de quelques gouttes de la solution de Bleu de Méthylène
- Laisser agir pendant 1 mn
- Laver abondamment à l'eau distillée qui se trouve dans des pissettes
- Sécher délicatement entre deux feuilles de papier absorbant, sans frotter
- Mettre une goutte d'huile à immersion au centre du frottis coloré et séché
- Observer à l'objectif GX100 et dessiner

III) La coloration de GRAM:

C'est la base de toute taxonomie bactérienne; qui a permis de diviser les bactéries en deux groupes:

□ **Les bactéries à Gram positifs:** Ces bactéries gardent leur coloration violette (violet de gentiane) après une décoloration par l'alcool éthylique.

□ **Les bactéries à Gram négatifs:** Ces bactéries sont décolorées par l'alcool éthylique et seront teintées par un deuxième colorant : la fuschine. Elles apparaîtront en rose ou rouge.

Ceci est dû à une différence fondamentale de structure des parois bactériennes. Les Gram négatifs laissent pénétrer le solvant alors que les Gram positifs l'en empêchent.

La coloration de Gram se réalise en suivant les étapes ci-dessous :

- Déposer 1 à 2 gouttes de violet de gentiane sur le frottis préparé, laisser agir 30 s à 1mn.
- Appliquer le Lugol qui est un fixateur; laisser agir 20s
- Décolorer rapidement en versant l'alcool éthylique goutte à goutte sur la lame inclinée obliquement.
- Rincer avec l'eau distillée
- Recolorer en appliquant la fuschine ou la safranine, laissé agir 30 s à 1mn.
- Rincer et sécher en utilisant le papier absorbant.
- Observer au microscope à l'objectif à immersion (GX 100) (Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis coloré).

Les bactéries qui apparaissent colorées en violet sont des bactéries à Gram positifs. Celles qui sont colorées en rose, sont des bactéries à Gram négatifs.

TP 03 de Microbiologie générale
Milieux de Culture

Selon le type trophique des bactéries et leurs exigences, différents milieux de culture peuvent être utilisés:

Les milieux synthétiques

Des milieux de culture dont la composition chimique, qualitative et quantitative, est connue. Ils sont constitués chimiquement, de corps purs. Ils sont utilisés pour les bactéries autotrophes et pour la réalisation de tests bien précis.

Exemple : Milieu **urée – indole** (L-tryptophane (0,3 g), KH₂PO₄ (0,1 g), K₂HPO₄ (0,1 g), NaCl (0,5 g), urée (2 g), alcool à 95 (1 ml), rouge de phénol 1%, eau distillée (100 ml).

Les milieux complexes ou empiriques

Des milieux riches très nutritifs de composition indéfinie. Utilisés pour la culture de nombreux organismes. Employés pour la culture des chimiohétérotrophes.

Ils sont constitués d'extrait de soja, de viande, de levure, digérés par des enzymes. Ils fournissent une source de carbone, d'azote, vitamines B. Leur composition varie d'un lot à l'autre.

Exemple : bouillon nutritif (Peptone (5g), extrait de bœuf (3g), NaCl (8g), Eau distillée (1000 ml)).

Les milieux semi-synthétiques

Des milieux constitués d'**un mélange** de composés chimiques purs et de substances naturelles empiriques.

Exemple milieu Chapman, qui est également sélectif pour les Staphylocoques. Peptone (10 g), Extrait de viande de bœuf (1 g) Chlorure de sodium (75 g), Mannitol (10 g), Rouge de phénol (0,025 g), Agar (15 g), Eau distillée (qsp 1000 ml). pH = 7,4.

Les milieux sélectifs

Ces milieux inhibent la croissance de la majorité des micro-organismes et stimulent la croissance de bactéries qu'on cherche à isoler. On fait intervenir certains paramètres tel un pH acide, une concentration de sel élevée.

Les milieux différentiels

Contiennent un indicateur (colorant) qui permet de différencier deux types bactériens qui poussent sur le même milieu, mais ne dégradent pas tous les deux un substrat particulier. La gélose Hektoën, qui différencie la fermentation de 3 glucides (lactose, saccharose et salicine) ainsi que la production de sulfure d'hydrogène.

Les milieux enrichis

Ils 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 *exigeantes* et auxotrophes. Par exemple : les milieux au sang frais.

Les milieux d'identification

Utilisés pour la mise en évidence des caractères biochimiques des bactéries dans l'identification différentielle.

Les milieux de conservation

Se sont des milieux pauvres au sein desquels les bactéries survivent dans un état de vie ralentie.

Obtention et conservation des cultures pures :

Pour étudier et utiliser des micro-organismes on doit obtenir des souches pures (culture pure)
On peut utiliser pour cela deux techniques, par dilution en milieu liquide et par épuisement en milieu solide.

Conservation des souches pures

Les souches pures peuvent être conservées à température ambiante en tube **sur géloses inclinées**, par **lyophilisation** dans des ampoules scellées, ou par **congélation** en présence d'un cryoprotecteur tel le glycérol (40%).

TP 04 de Microbiologie générale

Techniques d'Ensemencement

I-Ensemencement :

Les méthodes d'ensemencement ont pour but de porter sur un milieu de culture, solide ou liquide, des microorganismes (bactéries et champignons).

Les milieux de culture contiennent des substances nutritives nécessaires à la croissance. Ils sont disposés dans des récipients de différentes formes : tubes, boîtes de Pétri, Erlenmeyer stérilisés.

Lorsque les bactéries poussent sur des milieux liquides, elles les troublent, ou forment des dépôts ou voiles superficiels.

Sur un milieu solide, elles peuvent former une masse confluyente sur la surface lorsqu'elles sont déposées en grande quantité; si les cellules sont isolées, elles formeront des colonies. L'aspect, les dimensions, les contours des colonies sont des critères précieux d'identification.

1-Ensemencement tube à tube :

- Amorcer l'enlèvement des bouchons. Passer le fil de platine de l'anse dans la flamme, attendez quelques instants qu'il refroidisse.
- Ouvrir le tube à prélèvement, flamber son extrémité dans la flamme, prélever à l'aide de l'anse de platine une goutte de culture bactérienne.
- Flamber l'extrémité du tube et reboucher.
- Ouvrir le tube à ensemencement, flamber l'ouverture du tube, introduire la goutte de la suspension bactérienne au fond du tube.

Dans le cas d'un ensemencement sur gélose, toucher la surface avec le fil de platine contenant la goutte et effectuer un trajet sinueux. Flamber l'extrémité du tube et reboucher.

2-Ensemencement et isolement sur boîte de Pétri :

- Tracer sur le fond de la boîte de Pétri 2 diamètres perpendiculaires en définissant ainsi 4 cadrans, si la surface de la gélose n'est pas sèche, faire sécher la boîte 15 minutes à l'étuve.
- Préparer une suspension bactérienne diluée dans l'eau stérile. Aspirer quelques gouttes de la suspension à l'aide d'une pipette Pasteur en se tenant près de la flamme.
- Déposer une goutte en un point périphérique à la surface en l'étalant sur 1 cm² environ.
- Fermer la boîte de Pétri et boutonner l'extrémité de la pipette Pasteur à l'aide de la flamme du bec Bunsen.
- La boîte de Pétri maintenue entrouverte en direction de la flamme avec la main gauche, avec la pipette boutonlée disséminer l'inoculum par une série de stries parallèles, très rapprochées sur une moitié de la boîte (cadrans 1 et 2).

- Fermer la boîte et stériliser la pipette, tourner la boîte au point de départ d'arrêt précédent et de la même façon.
 - Fermer la boîte et stériliser la pipette.
 - Tourner la boîte d'un quart de tour et ensemercer comme précédemment. Retourner la boîte après l'avoir fermée, indiquer aussitôt les renseignements concernant l'ensemencement.
 - Plonger la pipette dans la solution d'eau de javel.
- L'ensemencement peut être effectué en utilisant l'anse de platine.

3-Incubation et lecture :

- Porter les boîtes de Pétri ensemençées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.
- La lecture consiste selon le cas : à dénombrer ou à identifier.

Manipulations à réaliser :

- Ensemencement de milieu solide (tube ou boîte) à tube liquide,
- Isolement sur boîte de Pétri par la méthode des cadrans à partir d'une suspension bactérienne.

Remarque : l'étudiant doit ramener avec lui : Scotch, Marqueur, Allumettes et étiquettes

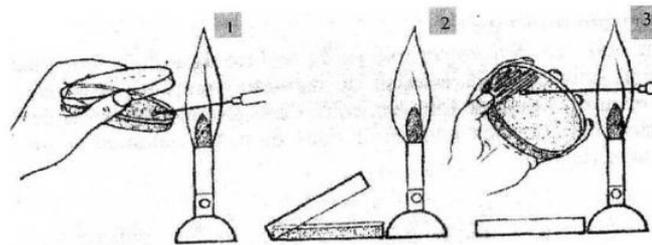


Figure Divers procédés d'ensemencement d'une boîte de Petri

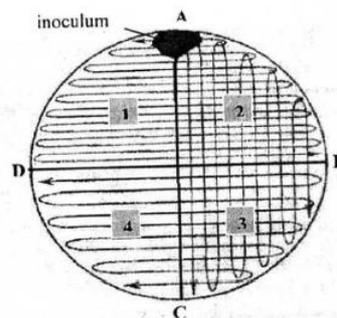


Figure Ensemencement en stries par épaissement sur quatre secteurs ou quadrants

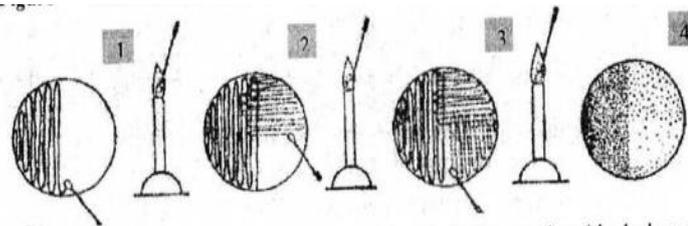


Figure Isolement en boîtes de Petri d'un produit pathologique par la méthode de quadrants 1, 2, et 3 ensemencements. 4 résultats

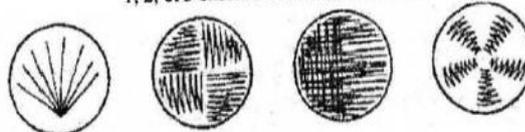
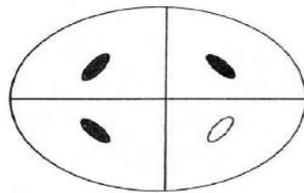


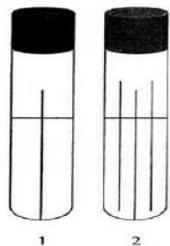
Figure Quelques exemples de techniques d'isolement sur gélose en boîtes de Petri

ENSEMENCEMENT EN TOUCHES OU EN SPOTS

SUR GELOSE EN BOÎTE DE PETRI



SUR GELOSE INCLINÉE EN TUBE À ESSAI



ENSEMENCEMENT PAR PIQURE CENTRALE (1) OU PAR PIQURES PÉRIHÉRIQUES (2) PROFONDES



ENSEMENCEMENT EN STRIES SUR GELOSE INCLINÉE

TP 5 : Antibiogramme

Les bactéries ne réagissent pas toutes de la même façon aux antibiotiques des différentes familles. Chaque antibiotique possède un spectre d'activité plus ou moins élargi et des résistances naturelles ou acquises peuvent se manifester chez les espèces bactériennes.

Il est important pour les cliniciens de bien connaître l'identité du microbe ainsi que l'antibiotique qui donnera les meilleurs résultats.

On peut évaluer la sensibilité d'un microorganisme aux antibiotiques et à d'autres agents chimiothérapeutiques par la technique de dilution en tube ou par l'antibiogramme.

La première méthode détermine la plus petite quantité d'agent nécessaire pour inhiber la croissance du microorganisme *in vitro* : C'est la concentration minimum inhibitrice ou CMI.

La méthode de l'antibiogramme est la technique la plus couramment utilisée pour évaluer la sensibilité des microorganismes aux agents chimiothérapeutiques. C'est une méthode analytique permettant de définir *in vitro*, l'antibiotique le plus actif sur un germe, celui qui a le plus de chance de guérir le malade infecté par le germe identifié.

En fonction des diamètres des zones d'inhibition, on peut classer les microorganismes en : Sensibles(S), résistants (R) ou intermédiaires(I) vis à vis d'un antibiotique donné. Combiné avec les techniques de dilution, l'antibiogramme en milieu solide peut servir à la détermination des CMI sur la base de courbes de concordances préétablies.

Manipulation à réaliser :

Couler une boîte de Pétri avec une gélose nutritive,

Université de Bordj Bou Arréridj
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers
2^{ème} Année Licence « Biologie »

- Prélever une goutte de la culture en bouillon, la transporter dans un tube contenant 10 ml d'eau distillée. Bien homogénéiser la suspension ;
- Inonder la surface de la boîte de Pétri avec 1 ml de la dilution de la souche bactérienne ;
- Incliner la boîte et aspirer l'excès, le rejeter dans l'eau de javel ;
- Laisser la boîte sécher 15 minutes à l'étuve,
- Déposer 3 disques d'antibiotiques différents sur la gélose, en appuyant légèrement pour faciliter l'adhérence ;
- Laisser la boîte renversée à la température du laboratoire pendant 3 heures puis la porter à l'étuve pendant 24 heures.

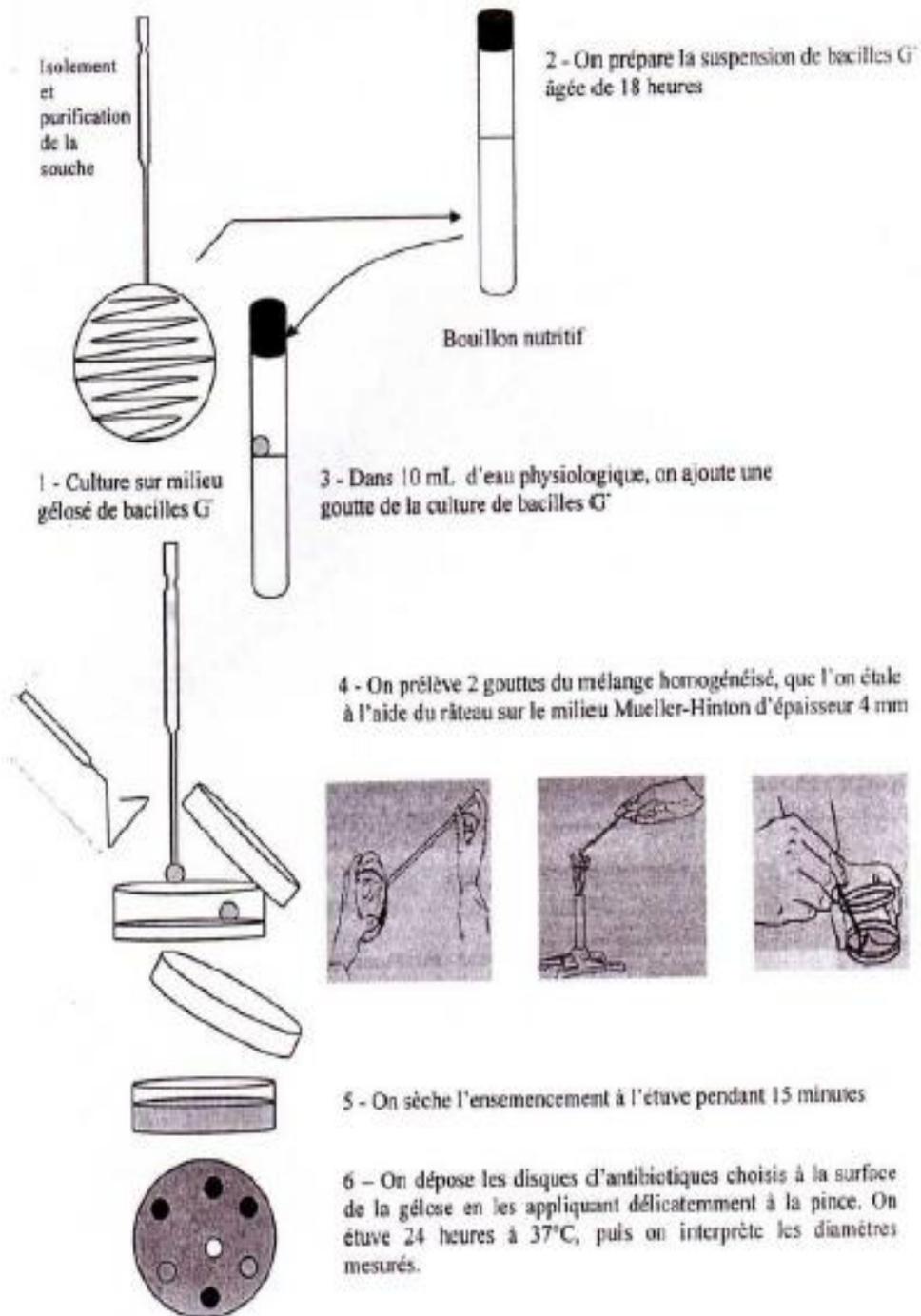


Figure Schéma d'ensemble d'un antibiogramme par la méthode des disques et par inondation

ecture :

Après l'incubation, constater la présence ou l'absence de zones d'inhibition autour des différents disques. Mesurer le diamètre de la zone d'inhibition et détecter l'antibiotique le plus actif sur la bactérie ensemencée.

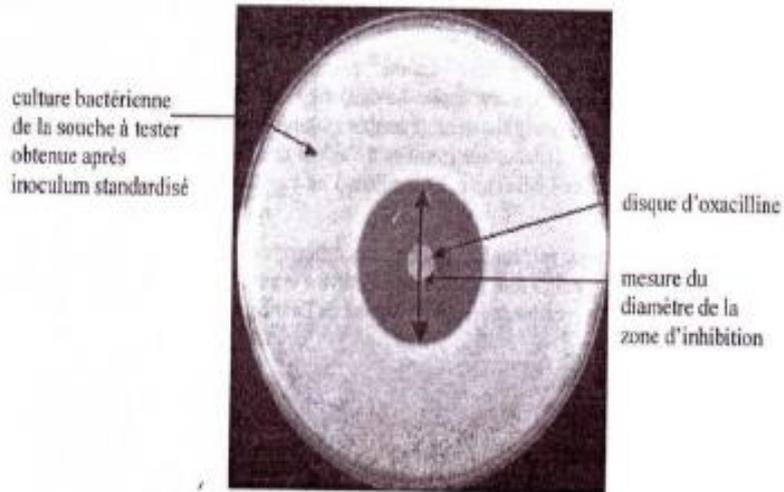


Figure Culture bactérienne de la souche à tester obtenue après ensemencement d'un inoculum standardisé (<http://www.microbes-edu.org/etudiant/antibic4.html>)

Plus la **zone d'inhibition** est grande, plus grande est la **sensibilité** de la souche bactérienne testée vis à vis de l'**antibiotique** étudié. Chaque zone peut être **mesurée** selon divers moyens : **règle, compas, pied à coulisse** etc. (photo ci-dessous)

