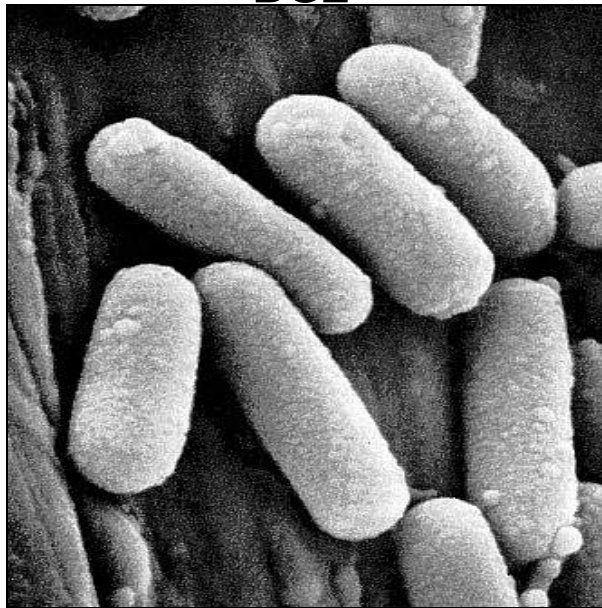


UNIVERSITE DE NOUAKCHOTT
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MANUEL DE TRAVAUX PRATIQUES
DE MICROBIOLOGIE

BG2



Par

Aminetou Bent Mohamed

Aicha mint Sidi Baba

2007 - 2008

SOMMAIRE

**TP. N° 1 - RÈGLES À SUIVRE DURANT LES TRAVAUX PRATIQUES DE
MICROBIOLOGIE**

TP. N° 2 - LA STÉRILISATION

TP. N°3 - UTILISATION DES MILIEUX DE CULTURE

TP. N° 4 - EXAMEN MACROSCOPIQUE DES CULTURES

TP. N° 5 - ISOLEMENT DE COLONIES PURES

TP. N°6 - L'EXAMEN MICROSCOPIQUE DES BACTÉRIES

TP. N°7 - EXAMEN APRÈS COLORATION

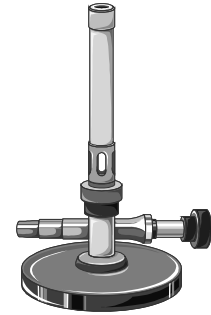
T P. N° 8 - COLORATION DIFFERENTIELLE DE GRAM

**TP. N° 9 - INFLUENCE DE LA VARIATION DE CERTAINS FACTEURS
PHYSIQUES SUR LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES**

TP N° 10 - ETUDE DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES



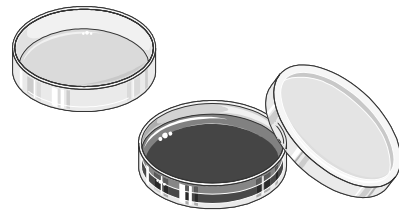
écouvillon



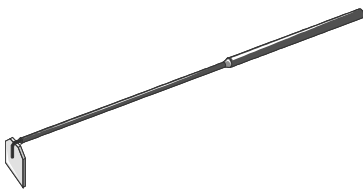
Bec Bunsen



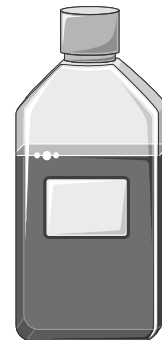
Autoclave



Boîtes de Pétri



grattoir



**Flacon pour milieu
de culture**



Etuve

TP. N° 1. RÈGLES À SUIVRE DURANT LES TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

OBJECTIFS :

Se familiariser avec un laboratoire de microbiologie, son équipement et son fonctionnement

1. Visite des locaux :

- Structure
- Présentation des gros matériels (étuves, autoclave, ...)

2. Présentation d'un poste de travail :

- Matériels (bec bunsen, pipettes, verres, béchers anse, pincés lame,...),
- Produits (eau, alcool, colorants divers,...)

3. Les consignes de sécurité :

- Procéder à un lavage minutieux des mains, avec brossage des ongles avant et après les manipulations, et avant toute sortie même momentanée de la salle de TP.

- Éviter les ouvertures des fenêtres pendant les manipulations

- Ouvrir avec précaution les récipients contenant des cultures microbiennes, afin d'éviter toute projection.

- Flamber, avant et après manipulations, les anses métalliques utilisées pour les prélèvements, en commençant par chauffer la partie moyenne de l'instrument afin de dessécher les restes de culture avant de porter l'extrémité dans la flamme, ceci pour éviter toute projection.

- Prévenir immédiatement le responsable de TP en cas de bris d'un récipient contenant une culture en cas de contamination accidentelle d'un manipulateur ou tout incident dispersant le matériel microbien.

-Interdiction formelle de boire, manger et fumer pendant les TP

-Stériliser tout le matériel septique à la fin de la manipulation

-Prendre toutes dispositions indispensables pour la mise à l'abri des souches microbiennes ainsi que leur destruction afin d'éviter toute contamination.

4. Mise en évidence de la présence de micro-organismes au laboratoire

1. **Matériel :** milieux gélosés en boîte de Pétri, écouvillon, eau de robinet, cheveu, bec Bunsen, pièce de monnaie.

2. Mode opératoire :

Prendre 3 milieux gélosés en boîte de Pétri :

- diviser la boîte n°1 en 2 secteurs : déposer un cheveu sur le premier et quelques gouttes d'eau du robinet sur le second.

- diviser la boîte n°2 en 4 secteurs : appliquer une trace de doigt sur le premier, refaire l'opération sur le second après s'être lavé les mains, déposer une pièce de monnaie sur le troisième, frotter un écouvillon sur la paillasse et appliquer celui-ci sur le dernier secteur.

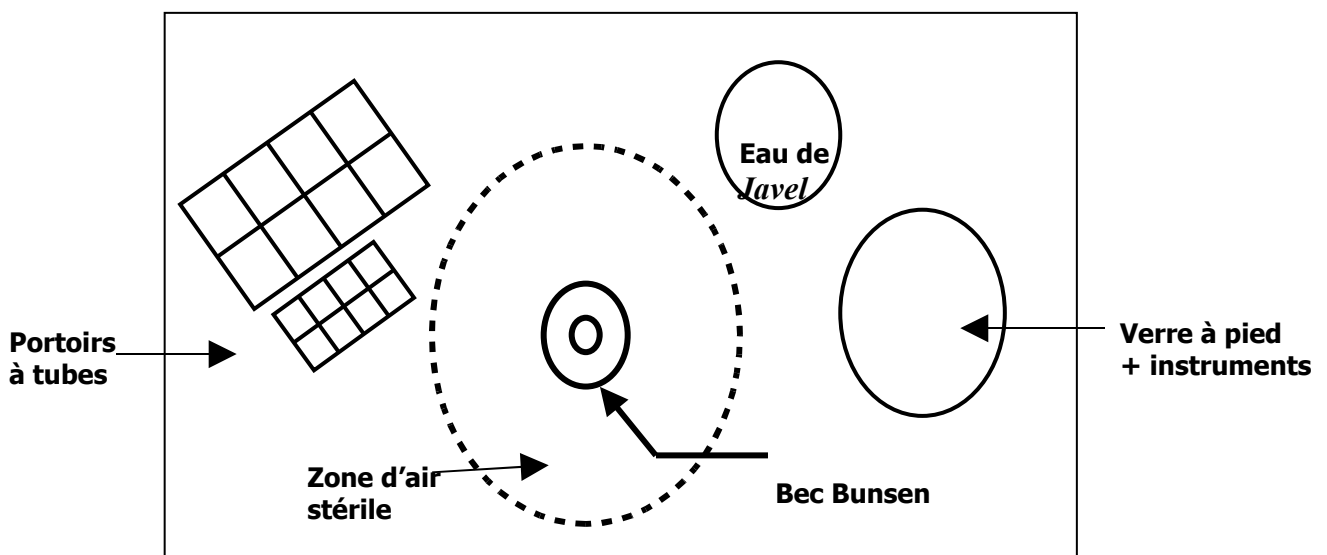
-laisser la troisième boîte ouverte au dessus de la paillasse (environ 10 min).

Remarque : une série de 5 boîtes de Pétri de 8cm de diamètre est laissée ouverte sur une paillasse près d'un bec Bunsen allumé.

A la fin de la manipulation, regrouper les différentes boîtes de Pétri et les placer à l'étuve à 37°C / 24 heures.

Remarque : pour éviter que l'eau de condensation dans les boîtes de Pétri perturbe la surface du milieu gélosé, on place les boîtes en position retournée dans l'étuve.

Poste de travail



TP. N : 2 - LA STÉRILISATION

La stérilisation est l'opération qui consiste à éliminer les micro-organismes d'un objet, et ce de manière durable. En microbiologie, le but de la stérilisation est d'une part de maîtriser les micro-organismes introduits dans le milieu d'étude, et d'autre part d'éviter la contamination du milieu extérieur et des personnes. Il existe deux grands moyens de Stérilisation :

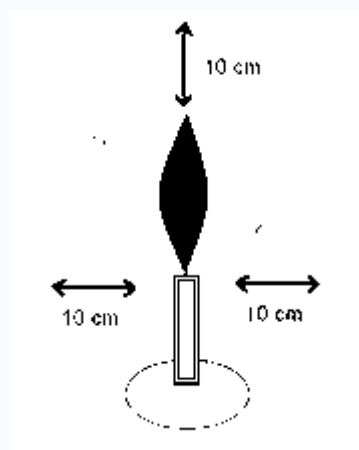
1. La chaleur
2. La filtration

I. La stérilisation par la chaleur

La chaleur détruit les bactéries et les spores. On distingue les procédés à chaleur « sèche » ou « humide ».

1. Chaleur sèche :

a. Flambage : Le passage dans la flamme (bec BUNSEN) de la surface de matériel non inflammable assure une parfaite stérilisation. On stérilise de cette façon les fils de platine et les pipettes Pasteur.



Zone de stérilité d'un bec bunsen

a. B. Four pasteur : C'est un four-étuve à air chaud et sec. Il est utilisé à 180°C pendant 90 minutes. Cet appareil n'est utilisé que pour la stérilisation de la verrerie préalablement nettoyée et séchée ou de matériels métalliques (instruments de dissection) pouvant tolérer de très hautes températures.

Le matériel ainsi stérilisé sera laissé dans l'étuve jusqu'à son refroidissement complet, puis stocké à l'abri des poussières

2. Chaleur humide

La stérilisation par la chaleur humide, reconnaît trois modalités

- la stérilisation à l'autoclave

- La Pasteurisation,

- La Tyndallisation

a. Autoclave : c'est un appareil indispensable dans un laboratoire de microbiologie. Le chauffage a lieu sous pression de vapeur d'eau, à une température de 120°C pendant une durée qui varie en fonction du milieu, de la température utilisée et du volume des récipients. Ce procédé tue toutes les cellules végétatives et les endospores.

b. Pasteurisation : la pasteurisation est un traitement à chaud de liquides, tuant des pathogènes mais pas forcément toutes les bactéries. Les températures de la pasteurisation se situent entre 75 à 80°C.

c. Tyndallisation : La tyndallisation est une série de 3 chauffages bref à des températures de 70°C à intervalles réguliers, ceci afin de laisser aux formes résistantes la possibilité de germer pour les tuer au chauffage suivant. Par exemple la destruction des pathogènes du lait se fait par un cycle de 63°C pendant 30 minutes suivie de 73°C pendant 15 minutes

II. La filtration

La filtration est une technique qui consiste à faire passer un liquide à travers un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,2 µm. Les micro-organismes sont trop gros et sont donc retenus par le filtre.

Cette technique est intéressante lors d'utilisation de produits thermolabiles comme certains acides aminés aromatiques, vitamines, hormones de croissance, acides nucléiques et une bonne partie des antibiotiques.

III. Autres procédés de stérilisation

Certaines matières (Plastiques, Caoutchous ...) ne tolèrent pas l'autoclave ou se détériorent rapidement après des expositions répétées à la chaleur.

1. Radiations :

La stérilisation par les U.V. est utilisée au laboratoire pour la décontamination de l'air et des paillasse situées sous la hotte de protection. Le rayonnement n'agit que de façon directe et sa pénétration est faible. D'autres radiations (rayons X), peuvent servir pour la stérilisation industrielle des boites de Pétri en matière plastique et de produit pharmaceutiques.

2. Agents chimiques :

Ils sont utilisés en général pour la désinfection des salles de travail et pour la destruction des germes portés par des instruments souillés. Ce mode de stérilisation doit être systématiquement pratiqué dans le laboratoire pour les lames et pour la verrerie qui ne passe pas en autoclave.

TP. N°3 - UTILISATION DES MILIEUX DE CULTURE

Les micro-organismes exigent pour leur croissance des aliments. Ces aliments leur sont fournis au laboratoire par des milieux nutritifs ou milieux de culture. Pour permettre le développement des microbes le milieu doit :

*contenir tous les aliments nécessaires en quantité suffisante et en proportion relative convenable : le milieu doit être nutritif et équilibré.

*avoir un pH, une pression osmotique, une viscosité des caractéristiques physico-chimiques compatibles avec la vie microbienne. Comme les besoins nutritionnels des micro-organismes et les conditions de leurs développements sont très variés il n'existe évidemment aucun milieu universel sur lequel tous les microbes soient capables de se multiplier. Toutefois, certains milieux conviennent au développement d'une grande variété de germes microbiens ; le choix de tels milieux repose sur la connaissance de l'habitat naturel et de la physiologie alimentaire du groupe de germes que l'on désire cultiver. D'une manière très générale, on peut distinguer :

1. Milieux synthétiques :

Préparés exclusivement avec des produits chimiques purs. Le milieu synthétique de composition bien définie, constitue le milieu de culture idéal. Ce type de milieu permet d'obtenir des résultats comparables et de déceler avec précision les modifications qu'il subit au cours du développement microbien. Il n'en est généralement pas de même avec les milieux non synthétiques qui sont constitués par des éléments complexes de composition variable. Les milieux synthétiques conviennent surtout aux moisissures (champignons microscopiques) mais fort peu aux bactéries.

2. Milieux complexes :

milieu dont on ne connaît que partiellement la composition. Ces milieux de culture peuvent contenir des extraits de levure (cellule de levure déshydratée et lysées) qui fournissent une source d'acide aminé de vitamine et d'azote, des extraits de malt apportant une source de carbone, des peptones (protéine animale, de poisson, de caséine de lait) source d'azote organique qui intéresse les individus hétérotrophes. (Ex. bouillon nutritif, bouillon au soja.).

Parmi ces 2 types de milieu, il existe **des milieux sélectifs** : qui vont permettre de sélectionner le type de bactéries qui pourront cultiver dessus, alors que tous les autres micro-

organismes présents sont inhibés.

Un milieu de culture est rendu sélectif pour une espèce microbienne lorsque sont seules satisfaites les exigences nutritives et les conditions de développement particulières à cette espèce. Les principaux facteurs de sélection microbienne utilisés seuls ou en association sont :

*la température d'incubation

*Le pH du milieu

*La faculté d'utiliser une source nutritive déterminée (carbone, azote).

*La résistance à l'action bactéricide d'un antiseptique ou d'un antibiotique.

Les milieux sont soit **liquides**, soit **solides**. On utilise fréquemment la gélose ou agar-agar un polymère de sucre tiré d'une algue rouge. Elle ne constitue qu'un support du milieu de culture. Capable d'absorber 200 à 250 fois son poids d'eau, la gélose forme une gelée qui se liquéfie à 65-70° en refroidissant, cette gelée demeure en surfusion jusqu'à 40-45° et prend une masse aux températures inférieures. La gélose est généralement incorporée aux milieux liquides à la dose de 15 à 20%.

Les milieux solides présentent un grand intérêt en Microbiologie. Ils permettent, lorsque la technique d'ensemencement est convenable, le développement des germes en colonies apparentes, isolées les unes des autres, provenant en principe, de la multiplication d'un seul germe (clone) et à partir desquelles peuvent être obtenues des cultures pures.

Mode opératoire

Matériels :

- 2 béchers de 500 ml, thermomètre, agitateur, bec bunsen, trépied et sa grille, boîtes de pétri, des tubes à vis ou cotonnés stériles, pince en bois ou gants

Produits :

- Bouillons nutritif (BN) et Gélose Nutritive (GN), en poudre,
- Eau distillée,

Protocole :

- Peser la masse nécessaire de poudre GN pour 250 ml d'eau distillée.
- Dissoudre la poudre dans le diluant à l'aide de l'agitateur.
- Chauffer au bec bunsen jusqu'à l'ébullition
- Laisser refroidir la préparation dans le cône stérile du bec bunsen
- Lorsque la préparation a atteint une température inférieure à 60°C couler dans des boîtes de pétri et des tubes à vis stériles

TP. N° 4 - EXAMEN MACROSCOPIQUE DES CULTURES

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et de la température de l'incubation.

Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées : les colonies sont d'autant plus petites qu'elles sont rapprochées.

La colonie peut apparaître à la surface du milieu de culture pour les germes aérobies, ou être en profondeur pour les germes anaérobies

1. Aspect de colonies en surface sur milieu solide

1.1. La taille

Elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies. Il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible pour mesurer la taille des petites colonies en utilisant de micromètres oculaires..

1.2. La forme

- ✓ Allure de contours : lisse, dentelés, déchiquetés, irréguliers
- ✓ Relief : surface bombée, demi-bombée, plate.
- ✓ Centre : parfois surélevé, parfois ombiliquée (en creux)

1.3. L'aspect de la surface

La surface d'une colonie bactérienne peut être lisse, rugueux, renvoyer la lumière de façon à leur donner un reflet métallique ou un aspect irisé.

1.4. L'opacité

Les colonies sont décrites comme :

- Opaques (ne laissent pas passer la lumière)
- Translucides (laissent passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers, comme le verre dépoli)
- Transparentes (laissent passer la lumière et voir les formes au travers, comme le verre, on parle de gouttes de rosée"

1.5. La consistance

Au moment du prélèvement il est possible d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses (on obtient facilement des suspensions homogènes), sèches ou encore muqueuses (on obtient difficilement des suspensions homogènes).

1.6. La couleur et/ou pigment

Plusieurs colonies n'ont pas une couleur bien définie (blanc, gris). Par contre, certaines bactéries produisent un pigment insoluble qui donnent un aspect bien caractéristique à la colonie (rose, jaune, rouge ...), tandis que d'autres produisent un pigment soluble qui diffuse et colore le milieu

2. Aspect des colonies en profondeur :

1. Colonies régulières en formes de lentilles,
2. Colonies irrégulières de formes diffuses et floues.

3. Aspect des colonies en surface sur gélose linéaire

1. filiformes
2. légèrement envahissantes avec bords ondulés
3. légèrement envahissantes avec bord érodé
4. envahissante

II. Aspect de la pousse en milieu liquide

Les bouillons nutritifs sont aussi utilisés pour cultiver les bactéries. Dans un bouillon la croissance microbienne se traduit par l'apparition d'un trouble ou opalescence mais l'aspect varie selon les espèces.

III. Mode opératoire :

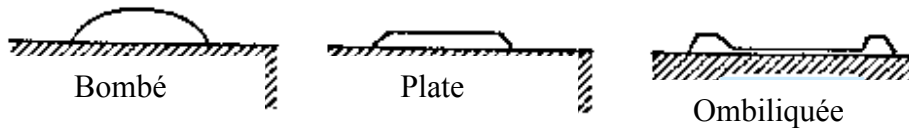
a. Milieu solide :

- Repiquer différentes aspects et formes de colonies sur des tubes de gélose linéaire
- Incuber à 37°C pendant 24 h
- Observer) les différents aspects.

b. Milieu liquide :

- Repiquer à l'aide d'une anse de platine des colonies différentes dans des tubes de bouillon nutritifs
- Flamber l'anse après chaque repiquage
- Incuber à 37 °C pendant 24 à 48h
- Observer les différents aspects de pousse en milieu liquide

Elévation :



Forme :



TP. N°5 - ISOLEMENT DE COLONIES PURES

Les germes se trouvent souvent dans la nature sous forme de mélange de plusieurs espèces.

Isoler c'est séparer les divers micro-organismes contenus dans le prélèvement initial. Un isolement peut être envisagé pour :

- Séparer des micro-organismes différents au sein d'un mélange (prélèvement par exemple)
- Purifier une souche contaminée ou contrôler sa pureté.

L'isolement peut être réalisé par épuisement de la semence en étalant le produit initial à la surface d'un milieu solide approprié. Pendant l'incubation, chaque micro-organisme déposé se multiplie pour donner un clone de cellules identiques. Lorsque les micro-organismes déposés sont suffisamment éloignés, le clone se développe abondamment pour produire une colonie (amas de cellules identiques). L'objectif de l'isolement est donc d'obtenir pour chaque micro-organisme différent des colonies distinctes.

Les colonies obtenues, en étalant une souche pure, doivent toutes présenter les mêmes caractères. A l'opposé, l'isolement d'un mélange donnera autant de colonies différentes que de micro-organismes différents contenus dans ce mélange.

Notez : deux colonies de même aspect et de mêmes caractères ne contiennent pas forcément des micro-organismes identiques

Rappel : les boîtes doivent être placées couvercle en bas

1. Matériel par groupe

- Eau physiologique (tube de 9ml)
- Anse de platine
- Gélose nutritive
- Boîte de pétri

2. Principe

Diluer dans de l'eau physiologique une fraction du mélange de germe jusqu'à obtention d'une suspension opalescente,

Prélever ensuite une fraction de cette échantillon dilué puis étaler sur la plus grande surface possible de milieu nutritif à l'aide d'un instrument d'isolement (anse de platine, pipette pasteur boutonnées etc....).

Le nombre de germe restant sur l'instrument sera de plus en plus faible, ce qui va permettre d'obtenir des colonies distantes les une des autres.

3. Mode opératoire (Technique utilisant la boîte de pétri) :

a. Méthode de nevt

- Prélever à l'aide de l'anse de platine une fraction de l'inoculum
- Ensemencer par stries fines et très serrées le premier demi- cercle
- Flamber l'anse de platine, laisser refroidir
- Ensemencer le deuxième demi- cercle
- Flamber l'anse de platine
- Ensemencer le troisième demi-cercle

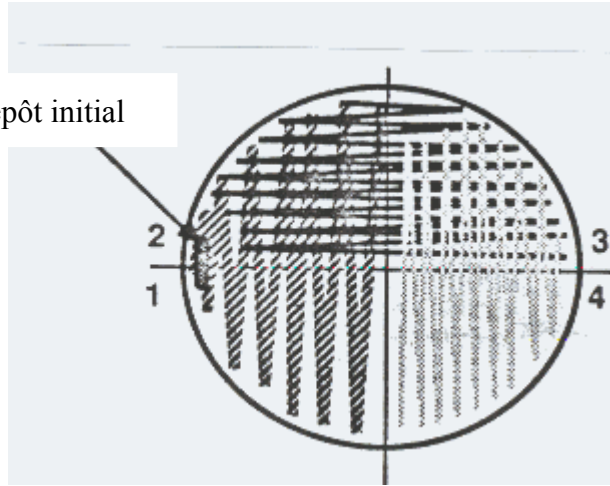
b. Technique des 4 séries de stries

- Tracer sur le fond extérieur de la boîte de pétri deux diamètres perpendiculaires séparant la boîte en quatre secteurs.
- Prélever à l'anse (stérile) la suspension ou le bouillon dans le cône stérile.
- Avec la main gauche maintenir entrouverte la boîte dans le cône stérile et étaler le prélèvement par stries très serrées dans une moitié de quadrant (quadrants 1 et 2 - Flamber l'anse et laisser refroidir
- Etaler à nouveau le prélèvement par stries serrées dans la moitié correspondante aux quadrants 2 et 3.
- Flamber l'anse et laisser refroidir.
- Répéter une dernière fois l'étalement en stries serrées dans la moitié correspondante aux quadrants 3 et 4

c. technique de butiaux :

On se sert d'une pipette pasteur boutonnée; la petite boule est plongée dans l'inoculum, ensuite on balaye toute la surface de la gélose.

Dépôt initial



TP. N°6 - L'EXAMEN MICROSCOPIQUE DES BACTÉRIES

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce bactérienne. Elle comprend :

I. Examen à l'état frais

C'est l'examen microscopique de bactéries vivantes, en milieu liquide. Il permet d'apprécier leur mobilité (ou immobilité) et leur morphologie.

➤ Préparation :

1. A partir d'une culture en milieu liquide :

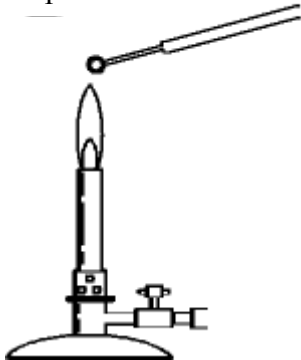
Déposer sur une lame propre soit le contenu d'une « anse de platine » soit « une petite goutte » à l'aide d'une pipette Pasteur. Recouvrir la goutte d'une lamelle.

2. A partir d'une culture sur milieu solide :

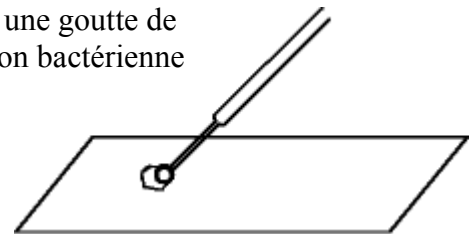
Déposer une gouttelette de liquide (milieu liquide ou eau) sur la lame. Prélever une trace de culture à l'anse de platine et l'émulsionner dans le liquide.

Recouvrir d'une lamelle.

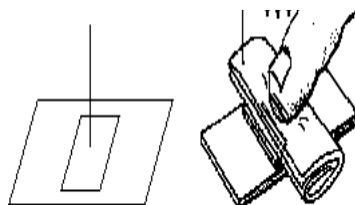
1. Flamber l'anse de platine



2. Déposer une goutte de la suspension bactérienne



3. Recouvrir d'une lamelle



© Georges Ducloux

TP. N°7 - EXAMEN APRÈS COLORATION

L'examen après coloration permet d'observer des bactéries tuées fixées sur une lame et ayant subi l'action d'un ou plusieurs colorants. Les colorations, réalisées sur des frottis sèches et fixes, sont classées en :

- Coloration simple (un seul colorant)
- Coloration différentielle type Gram
- Colorations spéciales des structures bactériennes (capsules, spors...).

Remarque :

La réalisation de frottis de bonne qualité est une condition préalable à toute coloration.

1. Réalisation des frottis :

Les frottis doivent être étalés en couche mince et régulière, puis séchés et fixés.

1. Etalement sur lame de verre :

1. Notez la référence de l'échantillon sur une lame parfaitement propres et dégraissées, 2. Prélevez stérilement à l'aide d'une anse de platine une goutte de culture bactérienne et étalez un film mince,

2. Séchage :

Le séchage est effectué à l'aire libre jusqu'à ce que le frottis présente un aspect mat.

3. Fixation du frottis sec :

Cette étape consiste à tuer les bactéries et les coller sur la lame, sans en altérer la structure. La fixation s'effectue par la chaleur :

La lame, tenue par une pince (frottis situé sur le dessus) est passée 3 ou 4 fois dans la flamme du bec Bunsen. Laisser refroidir avant d'entreprendre une coloration.

1. Identifier la lame

2. Déposer une goutte d'eau

3. Flamber l'anse
d'une

4. Prélever une partie
colonie isolée

5. Mélanger les bactéries avec la goutte d'eau

l'air

6. Laisser sécher
l'étalement à

7. Fixé le frottis en passant délicatement et rapidement la lame 2-3 fois au dessus de la
flamme

I. COLORATIONS SIMPLES : (Coloration au bleu de Méthylène)

La coloration au bleu de méthylène peut apporter des informations concernant la morphologie des germes.

Mode opératoire :

Sur le frottis fixé et refroidi :

- Faire couler la solution de bleu de méthylène phéniqué jusqu'à ce que toute la lame soit recouverte.

- Laisser agir 1 minute.

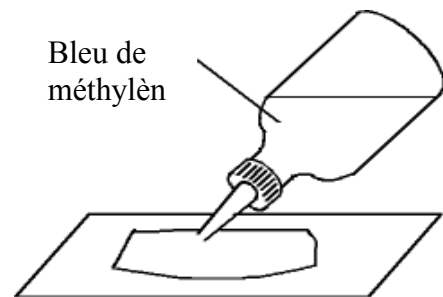
- Rincer abondamment la lame avec le jet d'une pissette d'eau distillée, ou à l'eau du robinet jusqu'à élimination des colorants en excès.

- Sécher à l'air ou sur une platine chauffante, ou encore sécher délicatement entre deux feuilles de papier filtre fin (ou buvard), sans frotter.

- Examiner au microscope, objectif à immersion.

Résultats

Les bactéries sont colorées en bleu sombre. Cette coloration est intéressante pour l'observation rapide des frottis mais elle permet seulement l'étude de la morphologie des bactéries.



1. Réaliser un étalement sur lame

2. Coloration au bleu de méthylène

3. Elimination du bleu de méthylène

TP. N° 8 - COLORATION DIFFERENTIELLE DE GRAM

C'est la coloration de base en bactériologie qui permet de distinguer les bactéries en Gram positif et en Gram négatif, cette distinction est fondamentale pour leur identification.

En effet, le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool (ou le mélange alcool + acétone) qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

Réactifs :

- Violet de gentiane phénique
- Lugol (iodo-iodure de potassium)
- Alcool à 95% (ou mélange alcool absolu+ 1/5^{ème} d'acétone)
- Safranine (ou Fuchsine phéniquée de ziehl)

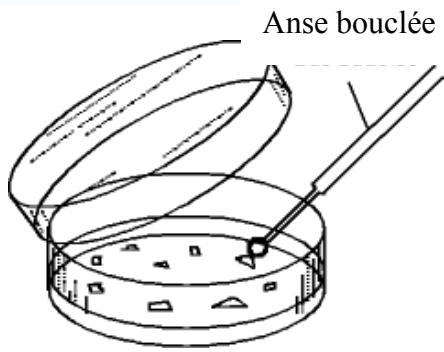
Mode opératoire :

1. Réaliser un frottis et le fixer à la flamme
2. Verser le Violet de Gentiane sur la lame ; laisser en contact 1 minute
3. Jeter le colorant et finir de la chasser par la solution de Lugol ; laisser agir le Lugol environ 1 min
4. Jeter le Lugol et faire couler de l'alcool sur la préparation ; rincer immédiatement à l'eau
5. Recouvrir la préparation de Safranine, laisser agir environ 1 min. laver abondamment.
6. Sécher au dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

Résultats :

A l'issue de cette coloration, on peut distinguer :

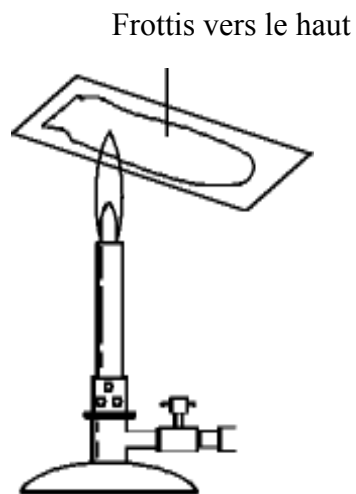
- Des bactéries colorées en violet foncé ; elles ont gardé le violet, 'le gram' elle sont dites 'Gram positif' ;
- Des bactéries colorées en rose ou rouge pâle ; elles ont perdu le violet, 'le Gram' elles sont dites 'gram négatif'.



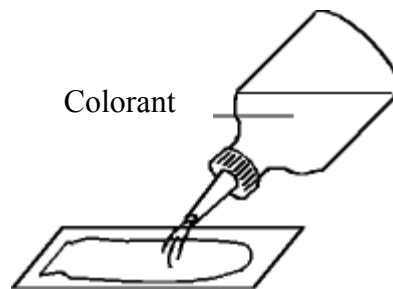
1. Prélever une partie d'une colonie isolée



2. Réaliser un étalement sur lame



3. Fixer à la chaleur



4. Réaliser les étapes de coloration

TP. N° 9 - INFLUENCE DE LA VARIATION DE CERTAINS FACTEURS PHYSIQUES SUR LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES

Un certain nombre de facteurs physiques externes peuvent intervenir dans le développement des microorganismes.

La variation de certains d'entre eux (pH du milieu, la température, la pression osmotique etc...) peut accélérer, retarder, ou arrêter la croissance microbienne. Nous étudions dans cette séance l'influence de la variation de température.

Variation de la température

Pour chaque microorganisme, on définit une température optimale de croissance pour laquelle le développement est maximal, une température minimale en deçà de laquelle il n'y a plus de croissance et une température maximale au delà de laquelle le développement est stoppé.

1. But de l'expérience

Il s'agit d'apprécier les valeurs limites de la température et la valeur optimale de croissance d'un germe donné (germe mésophile)

2. Matériel par groupe

- 5 tubes de bouillons nutritifs (contenant 5 ml de milieu)
- Anse de platine
- Boîtes ensemencées par le germe à étudier

3. Mode opératoire

- Marquer chaque tube de la température correspondante : + 4°C, 20°C, 37°C, 44°C et 55°C.
- Ensemencer les cinq tubes avec la souche microbienne à étudier
- Incuber immédiatement chaque tube à la température indiquée. La durée d'incubation est de 24 h, mais elle peut être prolongée jusqu'à 48 h (pour 20°C) ; voir une semaine (pour + 4°C)

4. Lecture des résultats

On note par le système des croix le développement des germes dans les tubes

- (-) : absence de pousse
- (+) : léger trouble douteux
- (+) : légère turbidité, visible
- (++) : développement assez important
- (+++) : trouble maximale

Remarque : Pour plus de précision, il est préférable de déterminer la densité optique des tubes avec un turbidimètre.

TP N° 10 - ETUDE DE LA SENSIBILITÉ AU ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont des composés chimiques, élaborés par un micro-organisme ou produit par synthèse et dont l'activité spécifique se manifeste à dose faible sur les micro-organismes.

La détermination de la sensibilité d'une bactérie à divers antibiotiques est d'une grande importance en microbiologie. Elle permet l'élaboration des milieux d'isolement sélectifs, le contrôle d'une infection par chimiothérapeutique et enfin elle peut être utilisée comme approche dans la caractérisation et l'identification bactérienne. L'antibiogramme d'une souche peut être déterminé en milieu liquide par la méthode de la CMI (concentration minimale inhibitrice) ou par la technique des disques.

1. Matériel par groupe

- Disques de celluloses imprégnées d'antibiotique
- Boite de pétri + de gélose
- Culture microbienne en suspension
- Râteau

2. Mode opératoire

- Couler la gélose dans une boite de pétri
- Laisser prendre en masse
- Prélever 2 ou 3 gouttes de la suspension bactérienne, les déposer à la surface de la gélose les étaler avec un râteau
- S'assurer que la surface de la gélose est bien séchée, et y déposer les disques de celluloses imprégnées d'antibiotique
- Placer la boite de pétri à basse température +4°C pendant 15 à 30mn afin de permettre aux antibiotiques de diffuser dans la gélose avant que les bactéries ne commencent à se multiplier
- Retirer la boîtes du réfrigérateur et la placer dans l'incubateur, à la température optimale de croissance du germe à étudier(37 °C) pendant 24 h

Rappel : les boîtes doivent être placées couvercle en bas

3. Lectures des résultats

L'activité de chaque antibiotique sera appréciée, par le diamètre de l'auréole d'inhibition provoqué autour du disque

Remarque : Cette méthode est une application de la diffusion en gélose .Le diamètre de l'auréole dépend de la vitesse de diffusion de l'antibiotique dans la gélose.

