

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat ABBAS Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE BASE « TRONC COMMUN »

2<sup>ème</sup> Année « Biologie, Agronomie, Ecologie, Biotechnologie »

## TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE GÉNÉRALE

Réalisé par :

HAICHOOR NORA

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

## Travaux pratiques de microbiologie générale

### 1. Précautions générales

- Pour diminuer les risques de pollution et par mesure de sécurité personnelle l'étudiant(e) doit éviter de parler et de fumer au laboratoire.
- Il doit porter une blouse fermée, suffisamment longue pour protéger tous ses vêtements.
- Pour éviter tout brassage d'air, l'étudiant(e) doit éviter de se déplacer en cours de travail, il doit travailler assis(e), sans geste brusque.
- Tous les prélèvements, transferts et ensemencements doivent s'effectuer dans des conditions d'asepsie rigoureuse.
- Tous les instruments utilisés doivent être stériles. Ils sont le plus souvent stérilisés par passage dans la flamme d'un bec bunsen immédiatement avant leur utilisation et maintenus dans la zone aseptique de travail.
- En effet, toutes les manipulations sont effectuées dans un espace restreint délimité par un rayon de 15cm autour de la flamme d'un bec Bunsen réglé en intensité moyenne.
- Les tubes ou les flacons ne sont jamais tenus verticalement mais obliquement, leur ouverture dirigée vers la flamme. Les pipettes, pipettes Pasteur ou pipettes graduées doivent être maintenues en position oblique, leurs pointes dirigées vers le bas.
- D'une façon générale la main droite, qui maintient dans la zone aseptique l'anse de platine ou la pipette Pasteur, ne doit pas se déplacer. Tout le matériel nécessaire : tubes de milieux de cultures, tubes de liquide de dilutions, tubes stériles ou lames, doit être porté par la main gauche vers la main droite.

### 2. Organisation du poste de travail

#### 2.1. Poste de travail destiné aux préparations microscopiques

Il doit comprendre un bac à coloration surmonté d'un porte-lame, une batterie de colorants, une pissette d'eau distillée et une réserve de lames et de lamelles.

#### 2.2. Poste de travail destiné aux manipulations stériles

Il doit être organisé de la façon suivante :

- Un bec bunsen, destiné à assurer les conditions de stérilité locale indispensables, est placé sensiblement au centre du poste de travail à 25cm du bord de la paillasse.
  - Le matériel, sur lequel le travail doit être effectué, doit être disposé à gauche du bec bunsen : produits à étudier, milieux de culture, liquides de dilutions.
  - Les instruments nécessaires au travail sont placés à droite du bec bunsen : pipettes Pasteur entreposées, pointes en haut, dans un récipient en verre à large ouverture ; ensemencateurs métalliques et pinces à coton disposés sur un portoir.
- A la partie arrière de la paillasse doivent également être prévus :
- Un second bec bunsen muni d'un trépied, destiné à chauffer les bains-marie dans lesquels les milieux de culture sont portés à ébullition ou maintenus en surfusion.
  - Et à droite un récipient en verre ou en matière plastique rempli d'une solution antiseptique (eau de javel par exemple) dans lequel seront déposées les pipettes Pasteur après leur utilisation.
  - Tout le matériel doit être accessible sans que l'étudiant(e) ait à se déplacer. IL doit être manipulé sans que rien ne s'interpose entre lui et la flamme.

## Travaux pratiques de microbiologie générale

### «Les milieux de culture»

La plupart des techniques bactériologiques exigent l'utilisation de milieux de culture. Ceux-ci contiennent les substances nutritives indispensables à la croissance des microorganismes. Ils sont disposés dans des récipients en verre de différentes formes (tubes, erlenmeyer, boîtes de pétri) préalablement stérilisés.

Les milieux de culture sont liquides ou solides. Les microbes, au cours de leur développement, troublent uniformément les milieux liquides ou encore forment des agglomérats, des dépôts, des voiles superficiels. Sur les milieux solides, ils peuvent former une nappe confluyente lorsque les germes ont été déposés en grand nombre à sa surface. Si les cellules bactériennes sont isolées, leurs descendants s'accumulent en une masse souvent bien délimitée appelée « une colonie » et dont l'aspect, les dimensions, les contours, la structure sont autant de caractères précieux permettant son identification.

#### 1. Classification des milieux de culture

On distingue en général :

##### 1.1. Les milieux usuels ou milieux de base

Ils permettent la culture de toutes les bactéries. Le choix d'un milieu usuel est en général fonction de l'habitat naturel des bactéries à isoler.

- Milieux à base d'extraits de viande utilisés pour la culture des microbes commensaux et pathogènes de l'homme et des animaux.
- Milieux à base de lait, d'extraits végétaux utilisés en bactériologie alimentaire... etc.

##### 1.2. Les milieux d'isolement

Ils peuvent être selon les techniques et les bactéries :

- Les milieux de base déjà cités.
- Les milieux enrichis de produits biologiques tels que : sang, sérum, lait, levure...etc.
- Les milieux électifs ou sélectifs : ils favorisent la croissance d'une ou de plusieurs espèces bactériennes particulières.

Un milieu électif est un milieu sur lequel apparaît une culture abondante et rapide de certaines bactéries, alors que la plupart des espèces bactériennes s'y développent peu et lentement.

Un milieu sélectif est un milieu ne permettant la croissance que d'une espèce bactérienne ou d'un groupe d'espèces bactériennes. La croissance des autres bactéries est entravée ou inhibée. L'effet sélectif est obtenu en jouant sur les facteurs physico-chimiques (tels que pression osmotique, pH, ...) ou par l'action bactériostatique ou bactéricide de certaines substances telles que : sels minéraux (azide de sodium, tellurite de sodium, ...) ; substances organiques (eau peptonée phéniquée) ; ou des substances colorantes (vert brillant, vert malachite, cristal violet, ...).

##### 1.3. Les milieux d'identification

Ils permettent la mise en évidence des caractères biochimiques des bactéries et, en conséquence, de résoudre les problèmes d'identification différentielle qui se posent entre des espèces ou genres voisins.

#### **1.4. Les milieux de conservation**

Ils permettent la survie des bactéries dans un état de vie ralentie.

La plupart des milieux de culture utilisés en bactériologie dérivent du bouillon de viande qui reste le plus courant des milieux liquides. La gélose nutritive, milieu solide, est la base de tous les milieux d'isolement et n'est en fait qu'un bouillon solidifié par l'agar-agar (mucilage d'origine végétale).

L'agar-agar est un polyside à haut poids moléculaire tiré de certaines algues rouges (Rhodophycées). L'agar-agar peut absorber et solidifier (ou gélifier) 300 à 500 fois son poids d'eau.

### **2. Qualités exigibles d'un milieu de culture**

Certaines qualités sont indispensables à un milieu pour favoriser le développement bactérien et qui sont relatives à :

#### **2.1. La composition**

Le milieu de culture doit contenir quantitativement et qualitativement les aliments exigés pour la croissance et l'entretien des microorganismes et assimilables par eux.

- Aliments essentiels azotés et carbonés.
- Facteurs de croissance (métabolites essentiels que la bactérie est incapable de synthétiser).
- Facteurs stimulants ou facteurs de départ dont la présence accélère le rythme de la multiplication bactérienne ou permet l'adaptation à un milieu artificiel d'une bactérie isolée d'un milieu naturel.

#### **2.2. Le pH**

En général, les bactéries à un pH voisin de la neutralité (pH 7 à 7.6) ; certaines d'entre elles exigent ou supportent un pH particulier.

#### **2.3. L'isotonie**

Elle correspond pour la plupart des milieux à celle d'une solution de NaCl à 9‰.

#### **2.4. Le potentiel d'oxydoréduction**

Les bactéries ont des exigences strictes, en rapport avec leur type respiratoire.

#### **2.5. L'humidité**

L'eau est nécessaire au métabolisme bactérien, les milieux de culture doivent en contenir une quantité suffisante.

Il convient de rappeler également qu'il est indispensable que l'incubation soit effectuée à la « température optimale » de croissance des bactéries à cultiver.

### **3. Stérilisation des milieux de culture**

Les milieux de culture sont stérilisés à la vapeur d'eau sous pression. L'appareil permettant d'atteindre ces conditions est appelé « autoclave », son principe est le suivant : quand la pression augmente la température de l'eau s'élève et atteint 250°F ou 121°C à 2 atmosphères ou 15 livres de pression.

Plusieurs facteurs contribuent à l'obtention d'une stérilisation parfaite dont la température de chauffage, le volume des récipients à stériliser, la nature des produits à stériliser, le degré thermique,... etc.

La chaleur humide agit sur les bactéries en entraînant la dénaturation de leurs protéines.

Les milieux renfermant des sucres sont stérilisés à une température ne dépassant pas 116 à 118°C. D'une manière générale, il faut éviter de trop chauffer les milieux de culture. Certains milieux peuvent être utilisés sans qu'il soit nécessaire de les stériliser à l'autoclave.

#### **4. Recommandations pour l'utilisation de milieux déshydratés**

##### **Intérêt**

Les milieux déshydratés présentent de nombreux avantages :

- Ils sont très stables.
- Leur utilisation étant simple, ils peuvent être préparés peu de temps avant leur mise en service.
- Un faible volume de poudre permet la préparation d'une quantité importante de milieu, leur stockage ne nécessite qu'un emplacement restreint.
- Ils sont économiques.

##### **Préparation**

La technique pour réhydrater les milieux secs est très importante pour obtenir des produits de bonne qualité.

- Il convient de ne commencer à faire dissoudre la quantité de poudre nécessaire que dans une partie du volume total d'eau distillée.
- Bien mélanger, puis ajouter le reste d'eau distillée en rinçant les parois du récipient.
- Il est possible d'accélérer la dissolution en utilisant de l'eau à 45-50°C. Le chauffage est parfois nécessaire pour obtenir une mise en solution complète. Dans ce cas, il faut agiter le mélange eau-poudre de temps en temps ou en utilisant un agitateur magnétique. Si le milieu est gélosé, attendre 5 minutes en agitant fréquemment avant de le porter à ébullition. Ne jamais surchauffer inutilement (en règle générale, une à deux minutes d'ébullitions suffisent).
- Vérifier ensuite le pH et l'ajuster, si nécessaire, à la valeur indiquée sur la fiche technique. Il est indispensable d'effectuer cette vérification, car le pH de l'eau distillée peut varier selon les conditions d'obtention et de stockage.

Les milieux ainsi préparés n'ont pas besoin d'être filtrés.

Dans tous les cas, il faut respecter les indications portées sur les étiquettes des boîtes et ne jamais dépasser la température de stérilisation.

#### **5. Conservation**

##### **5.1. Milieux en poudre**

- Les milieux déshydratés sont très hygroscopiques. Il est donc indispensable de refermer rapidement les boîtes aussitôt le prélèvement de poudre effectué (ne pas oublier de replacer la capsule hermétique).
- Conserver les boîtes à l'abri de la lumière, dans endroit frais et sec.
- ne pas utiliser de milieux fortement réhydratés.

##### **5.2. Milieux réhydratés**

- Après stérilisation, il est nécessaire de conserver les milieux dans de bonnes conditions.
- Les milieux devant être stockés avant leur utilisation sont protégés de la dessiccation et de la lumière. Pour cela, il est indispensable de fermer les récipients qui les contiennent par capuchons en caoutchouc ou des capsules vissées.
- Les milieux gélosés, coulés en boîtes de pétri, doivent être de préférence utilisés le jour même de leur préparation. Il est toutefois possible de les conserver quelques jours au

réfrigérateur, mais il est alors nécessaire qu'ils reprennent la température du laboratoire avant leur emploi.

## Travaux pratiques de microbiologie générale

### « Examens macroscopique et microscopique des microorganismes »

#### 1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique n'est applicable qu'à l'étude de certains produits pathologiques : urines, liquide céphalo-rachidien, pus, ... et exceptionnellement de quelques produits alimentaires.

##### 1.1. Les cultures bactériennes sur gélose

Il s'agit d'un examen à l'œil nu ou à faible grossissement de boîtes de pétri et de noter l'aspect des colonies à savoir :

##### - **Élévation des colonies**

Plates, surélevées, bombées, colonies à centre ombiliqué, ...

##### - **Contours des colonies**

Lisses ou irréguliers, colonie circulaire, ondulée, amiboïde,...

##### - **Taille des colonies**

Elle varie de 1/10<sup>e</sup> de mm à plus de 1cm et dépend d'une part de l'espèce bactérienne et d'autre part de la composition du milieu de culture.

##### - **Chromogénèse**

Couleur du pigment, pigment soluble ou insoluble dans le milieu.

##### - **La surface des colonies**

C'est un aspect particulièrement important. Il sert à différencier les colonies lisses « S » (Smooth), souvent formées par les germes pathogènes, des colonies rugueuses « R » (Rough) constituées généralement par des germes saprophytes. Il existe donc des colonies lisses, rugueuses, brillantes, sèches, poudreuses, plissées, muqueuses,...

##### - **L'opacité des colonies**

Colonies transparentes, translucides, opaques,...

##### - **La consistance**

Colonies à consistance granuleuse ou visqueuse.

##### - **L'odeur**

Présence ou absence, essayer d'en déterminer la nature.

##### 1.2. Cultures bactériennes en bouillon

- Turbidité plus ou moins abondante.
- Formation d'une pellicule à la surface du bouillon.
- Dépôts de cellules au fond du tube.

#### 2. Examen microscopique

L'examen des bactéries dans leur milieu naturel permet de mettre en évidence :

- L'absence ou la présence des bactéries ainsi que leur abondance.
- Le caractère mono ou poly microbien du produit examiné et, dans ce cas, la prédominance d'une espèce particulière.
- La morphologie et la réaction à la coloration de Gram des bactéries présentes.

L'examen microscopique est le premier stade de la détermination des bactéries. S'il ne permet pas l'identification des microorganismes, il est cependant indispensable pour orienter

les recherches ultérieures : culture et isolement, mise en évidence des caractères biochimiques,...

L'examen morphologique des microorganismes peut se faire soit à l'état frais, soit après coloration.

### 2.1. Examen à l'état frais

Il est pratiqué à partir de produits pathologiques ou de culture jeune en milieu liquide, de culture en milieu solide. Lorsqu'il s'agit de produits pathologiques ou de culture en milieu solide, une suspension en eau physiologique est réalisée. Cet examen donne certains renseignements sur « la forme », « le nombre des bactéries », mais son intérêt réside surtout dans l'étude de « **la motilité** » des germes.

La bactérie mobile doit se déplacer dans le champ microscopique avec un mouvement qui lui est propre, les autres bactéries restants immobiles ou se déplaçant dans d'autres directions. Cette motilité ne doit pas être confondue ni avec les mouvements browniens, se traduisant par des mouvements désordonnés autour d'un axe sans déplacement véritable, ni avec les mouvements transmis par les courants de convection entraînant toutes les bactéries dans le même sens.

La motilité est d'allure caractéristique dépendant des types de ciliature :

- Les bactéries péritriches avancent soit par pirouette, soit par mouvements de reptation.
- Les bactéries porteuses d'un cil polaire sont agitées de frémissements.
- Les leptospires, les tréponèmes ont des mouvements en vrille.

#### 2.1.1. Prélèvement à partir de culture en milieu liquide

- Flamber la pipette Pasteur ou l'öse, tenue par la main droite, sur toute sa longueur en lui donnant de mouvement de rotation.
- Agiter la culture bactérienne prise de la main gauche, saisir le bouchon dans le pli du cinquième doigt de la main droite (entre l'auriculaire et la paume de la main) et l'enlever en lui imprimant un mouvement de rotation. Incliner légèrement le tube ouvert et flamber son ouverture aussitôt qu'il aura été débouché, y plonger alors l'anse platine (ou la pipette Pasteur) refroidie, elle est alors chargée de bactéries.
- Retirer la pipette Pasteur en la remontant horizontalement, reflamber l'ouverture du tube et le reboucher.
- Déposer une goutte de la culture bactérienne sur la lame. Repasser l'anse sur la flamme du bec Bunsen pour la restériliser ; en cas d'utilisation de pipette Pasteur, celle-ci est déposée, après usage, dans un récipient contenant du désinfectant.
- Ne jamais oublier de laisser refroidir la pipette Pasteur ou le fil de platine avant d'effectuer le prélèvement, sinon les bactéries sont tuées par la chaleur.
- Poser ensuite délicatement la lamelle, bien orientée. La goutte doit être suffisante mais proportionnée à la lamelle choisie : le liquide ne doit pas déborder.
- Répartir le liquide sous la lamelle en appuyant très légèrement avec l'extrémité d'une pince, mais jamais avec la pulpe du doigt (les traces grasses rendent impossible tout examen microscopique).
- Examiner la préparation sous le microscope à sec à l'aide de l'objectif (40x).
- Après avoir examiné la culture, désinfecter et laver les lames. Une solution de désinfectant est fournie à cet effet.

Les bactéries **manipulées** sont **vivantes** : toutes les précautions doivent être prises pour éviter de se contaminer ou de contaminer l'environnement.

### 2.1.2. Prélèvement à partir de culture sur milieu solide

- L'examen doit être fait dans la mesure du possible à partir de « cultures jeunes ». Préparer une suspension de la colonie dans de l'eau physiologique et prélever comme précédemment (à partir de la suspension liquide). Le prélèvement peut aussi être effectué directement à partir du milieu solide et l'on procède comme suit :

- Déposer au centre de la lame une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique, y dissocier une très petite quantité de culture à l'anse flambée et refroidie.

- Poser la lamelle comme précédemment.

Il y a souvent intérêt à effectuer une suspension épaisse dans une microgoutte déposée à côté de la goutte normale et l'incorporer peu à peu à la totalité du liquide. Cette technique permet d'obtenir une suspension plus homogène et moins riche en bactéries.

## 2.2. Examens microscopiques après coloration

Les colorations sont indispensables à l'étude précise de la morphologie, voire la structure des bactéries. Par ailleurs les préparations colorées peuvent se conserver très longtemps.

### 2.2.1. Préparation des frottis

Le frottis destiné à la coloration doit être étalé en couche mince et régulière, séché et le plus souvent fixé.

#### - Etalement

Les lames utilisées doivent être parfaitement propres et dégraissées. La technique de prélèvement est celle décrite à propos des examens à l'état frais. Etaler donc la goutte de culture ou de suspension bactérienne en un film mince et régulier. L'étalement est effectué, de préférence, par un mouvement circulaire régulier à l'aide de l'anse platine.

#### - Séchage

Il doit se faire autant que possible à la température du laboratoire. Il est très rapide si la lame est parfaitement dégraissée et le frottis mince et régulier. Le frottis peut, éventuellement, être séché en chaleur douce :

En posant la lame sur une platine chauffante réglée à 37°C, ou en maintenant la préparation dans l'air chaud au dessus de la flamme de la veilleuse d'un bec Bunsen.

La mauvaise qualité d'une préparation provient souvent d'un séchage trop brutal qui a altéré certains constituants de la bactérie (en particulier la paroi).

#### - Fixation

Elle consiste à tuer les bactéries et à les « fixer » sur la lame, sans en altérer la structure. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées, exemple :

##### -- Fixation par la chaleur

La lame tenue par une pince, frottis situé sur le dessus, est passée dans une flamme chauffante. Le geste doit être lent et la lame doit écraser 3 à 4 fois la flamme. Il convient d'attendre le refroidissement de la lame avant d'entreprendre toute coloration. Ce procédé est rapide mais brutal, des altérations bactériennes sont possibles.

##### -- Fixation par l'alcool flambé

Ce mode de fixation est le plus utilisé mais doit être réservé aux cultures bactériennes. Il consiste à mettre sur la lame quelques gouttes d'alcool à 95° et enflammer après quelques secondes de contact. Il est prudent de mettre au préalable de l'eau au fond de la cuve à coloration au dessus de laquelle sont placées les lames et de rejeter une partie de l'alcool (s'il y en a en excès) avant le flambage. Il faut attendre le refroidissement de lame avant de commencer toute coloration.



### 2.2.2. Coloration simple

Elle consiste à faire agir sur l'étalement un seul colorant.

#### Coloration simple au bleu de méthylène

- Préparer et fixer sur une lame une suspension de la souche bactérienne.
- Recouvrir de quelques gouttes de réactif au bleu de méthylène et laisser agir une minute.
- Laver à l'eau, égoutter et sécher entre deux feuilles de papier filtre.
- Observer à l'objectif à immersion.

#### Coloration simple à la fuchsine de Ziehl

- Prépare et fixer une suspension de la souche bactérienne.
- Recouvrir de quelques gouttes de fuchsine diluée au 1/10<sup>e</sup> et laisser agir 30 secondes à 1 minute.
- Laver à l'eau distillée puis sécher entre deux feuilles de papier filtre.
- Observer à l'objectif à immersion.

### 2.2.3. Colorations différentielles

Les microorganismes se différencient entre eux chimiquement et physiquement. Ils peuvent réagir différemment à des colorants donnés. Les colorations différentielles sont des méthodes permettant de distinguer entre eux les différents types bactériens.

#### Coloration de Gram

C'est la coloration de base en pratique bactériologique. Elle permet de reconnaître les bactéries présentes et leur caractère « Gram-positif » ou « Gram-négatif » selon qu'elles ont gardé la coloration violette ou non.

- Préparer et fixer une suspension de la souche bactérienne.
- Recouvrir le frottis d'une solution de violet de gentiane ; laisser agir une minute.
- Entraîner le violet par la solution de lugol. Recouvrir la lame de lugol et laisser agir 1 minute sans laver à l'eau.
- Décolorer aussitôt par l'alcool acétone ; pour cela, verser l'alcool à la surface de la préparation placée obliquement et observer sa couleur en s'écoulant, il est d'abord violet puis bleuté et enfin incolore ; arrêter à ce stade.
- laver rapidement à l'eau courante (eau distillée).
- Recouvrir la lame de solution de fuchsine et laisser agir 20 à 30 secondes.
- Laver et sécher entre deux feuilles de papier filtre.
- Observer en immersion.

Les Gram<sup>+</sup> (Gram positifs) apparaissent en violet-noir, les Gram<sup>-</sup> (Gram négatif) apparaissent en rose.

#### -- Interprétation

Les parois des bactéries Gram- ont une teneur élevée en lipides, alors que celles des Gram+ ne contiennent pas de lipides. Les lipides sont facilement dissous par l'alcool ou l'acétone. La réaction se résume de la manière suivante :

Les cellules Gram+ et Gram- absorbent le colorant primaire (violet). L'iode (lugol) en solution pénètre dans les deux types de cellules et forme un précipité avec le colorant. L'alcool passe facilement dans les cellules gram- à travers la paroi cellulaire, dissout le complexe colorant-iode, l'élimine et laisse la cellule incolore. Dans les cellules Gram+, l'alcool pénètre difficilement, la dissolution du complexe colorant-iode est lente et son élimination encore plus lente. La plus grande partie du complexe reste dans la cellule qui garde sa coloration initiale.

#### 2.2.4. Colorations spécifiques

##### Coloration de la spore

Il existe des espèces bactériennes produisant des spores dans des conditions de vie défavorables. Ces spores résistent aux conditions physico-chimiques du milieu plus facilement que les cellules végétatives. Elles ont ainsi la particularité d'être thermorésistantes.

- Préparer un frottis bactérien fixé sur lame (à partir d'une vieille culture de *Bacillus*).
- Couvrir le frottis de vert de malachite, laisser agir 3 à 5 minutes, chauffer sur la veilleuse du bec Bunsen jusqu'à émission de vapeurs blanches.
- Laver à l'eau et recouvrir d'une solution de fuchsine basique à 0.85% et laisser agir une minute.
- Rincer, sécher entre deux feuilles de papier filtre et observer au grossissement 100x à l'immersion.

Les spores de couleur vertes sont libres ou incluses dans des corps bactériens roses.

##### La capsule

- Préparer une suspension bactérienne sur lame (à partir d'une souche de *Klebsiella pneumoniae*).
  - Ajouter une goutte de rouge de Congo et placer dessus une lamelle.
  - Observer au grossissement 40x et 100x sans utiliser l'huile d'immersion.
- La capsule apparaît comme un halo clair entourant les bactéries sombres.

## Travaux pratiques de microbiologie générale

### « Techniques d'ensemencement, dilutions et dénombrement »

Lors d'un examen bactériologique, la mise en culture est toujours nécessaire. En effet, bien souvent les microorganismes, peu nombreux, n'ont pu être décelés lors de l'examen microscopique. Si le prélèvement contient plusieurs espèces bactériennes, culture et isolement sont indispensables. Enfin, c'est à partir de cultures que les divers caractères métaboliques peuvent être déterminés permettant ainsi l'identification des diverses bactéries.

#### 1. Techniques générales de culture

L'ensemencement, c'est-à-dire le transport des bactéries dans un milieu de culture neuf, doit être fait dans des conditions d'asepsie totale. Les cultures sont faites en milieux liquides ou en milieux solides.

##### 1.1. Cultures en milieux liquides

###### 1.1.1. Culture à partir d'un prélèvement liquide

L'öse flambée et refroidie est introduite aseptiquement dans le prélèvement puis enfoncée stérilement dans le milieu à ensemenecer.

###### 1.1.2. Culture à partir d'un prélèvement en milieu solide

Après avoir chargé l'öse de semence, elle est introduite dans le tube à ensemenecer, amenée juste au contact du liquide ; gratter l'anse la paroi du tube afin d'obtenir une suspension épaisse et bien homogène, celle-ci est ensuite mélangée à la totalité du milieu de culture. Après ensemencement, le bouillon est incubé à 37°C. Après 24 à 48 heures d'incubation, observer la présence ou l'absence d'un dépôt, son aspect, sa couleur ainsi que la présence d'un voile.

##### 1.2. Cultures en milieux solides

###### 1.2.1. Culture en tubes

###### Milieux solidifiés inclinés

###### - Ensemencement en stries transversales

A partir de 0.5 – 1cm du bas de la pente, décrire avec l'öse chargée de semence des stries parallèles et serrées sur la gélose sans l'érailler. Sans stériliser l'öse, refaire l'opération dans deux autres tubes. Incuber 24 – 48h à 37°C.

Il y a également des ensemencements sur pente : en nappe, en touches, en strie médiane.

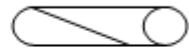
###### Milieux en culot

###### - Ensemencement en piqûre

Le fil métallique (platine ou nichrome) parfaitement droit et chargé de semence sert à faire une piqûre centrale. Le tube est ensuite incubé 24 – 48h à 37°C.



Ensemencement en culot

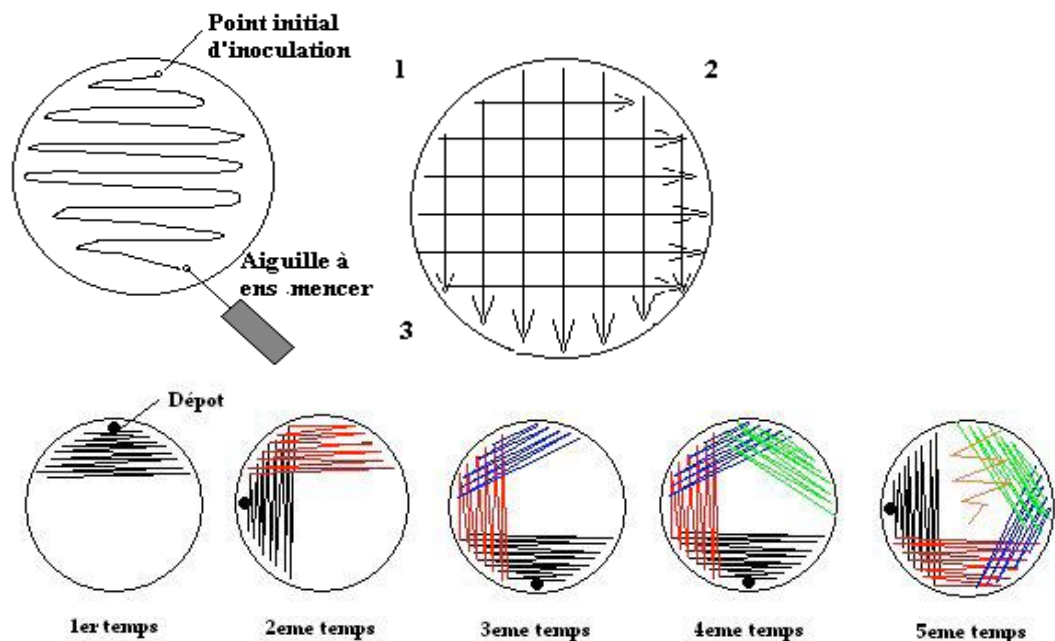


Gélose inclinée

### 1.2.2. Cultures en boîtes de pétri par la méthode de stries

#### - Ensemencement en stries parallèles

L'inoculum, prélevé à partir d'un bouillon de culture, est déposé sur un point périphérique de la plaque gélosée. La gouttelette de culture est disséminée sur toute la gélose en décrivant des stries parallèles. La boîte est ensuite incubée 24 - 48h à 37°C.



#### - Ensemencement par la méthode de quadrants

L'inoculum, prélevé à partir d'un bouillon de culture, est déposé à la périphérie de la gélose. Il est ensuite disséminé par des stries parallèles sur une moitié de la boîte, faire tourner la boîte d'un quart de tour et ensemer par des stries perpendiculaires aux premières stries ; après un autre quart de tour de la boîte, ensemer le dernier quadrant. Les boîtes de pétri sont toujours incubées renversées. Il y a évidemment d'autres méthodes d'ensemencement par quadrants ; et d'autres méthodes d'ensemencement de milieux en boîtes (ensemencement en nappe, par piqûre, en masse, par touches,...).

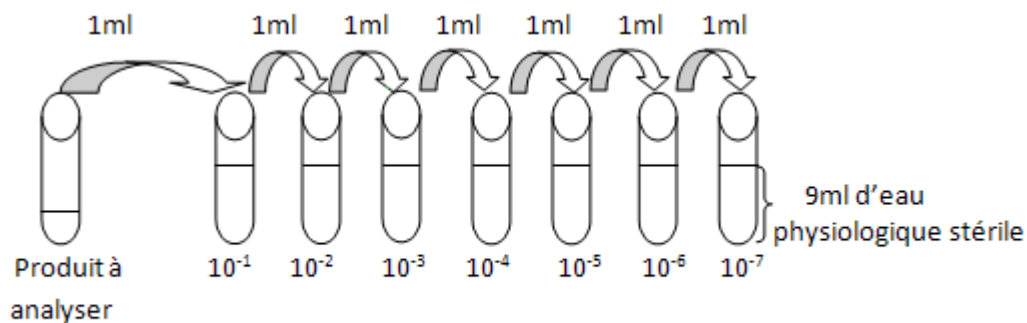
## 2. Dilutions et numérations des bactéries

La numération bactérienne permet de détecter et d'évaluer une pollution du produit à analyser. Théoriquement chaque bactérie donne naissance à une colonie dans un milieu gélosé favorable. Comme les produits à analyser peuvent être trop chargés en bactéries, il est plus pratique d'effectuer des dilutions pour diminuer le nombre de germes dans un

volume donné et qui sera par la suite introduit dans un milieu de culture généralement solide pour pouvoir faire des dénombrements.

### 2.1. Dilutions

- Préparer une série de 7 tubes à vis contenant chacun 9ml d'eau physiologique stérile.
- A partir du produit à analyser, introduire aseptiquement 1ml à l'aide d'une pipette stérile dans le tube 1 contenant 9ml d'eau physiologique stérile (il s'agit de la dilution  $10^{-1}$ ). Agiter doucement le tube par des mouvements de rotation.
- Refaire la même opération en partant cette fois-ci de la dilution  $10^{-1}$  du tube 1 et en prélevant 1ml avec une autre pipette stérile et l'introduire dans le tube 2 pour avoir la dilution  $10^{-2}$ .
- Procéder de la même manière pour les autres tubes jusqu'à la dilution  $10^{-7}$ .
- Toutes les pipettes utilisées sont déposées dans bocal d'eau de javel.
- Les ensemencements, à partir des tubes de dilution, sont effectués en allant du tube le moins concentré au plus concentré pour éviter un apport supplémentaire de bactéries dans le volume à transférer dans le milieu gélosé et qui sera dénombré.



#### Série de dilutions

### 2.2. Numérations

Les techniques d'ensemencement permettent de visualiser les colonies qui seront ensuite dénombrées.

#### 2.2.1. Ensemencement par étalement ou en surface

A partir de la dilution  $10^{-6}$  prendre 0.1ml et le répartir en gouttes à la surface de la gélose, étaler l'échantillon sur la surface du milieu à l'aide d'un râteau (étaleur), en verre, stérile. Le milieu est ensuite incubé 24 -48h à  $37^{\circ}\text{C}$ . Dénombrer les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies.

#### 2.2.2. Ensemencement par incorporation

A partir de la dilution  $10^{-5}$  transvaser stérilement 1ml dans une boîte de pétri vide et stérile ; verser dessus le contenu d'un tube de gélose en surfusion (à  $45 -50^{\circ}\text{C}$ ) ; mélanger milieu et inoculum par des mouvements circulaires de sens opposés ; laisser refroidir, donc solidifier le milieu avant d'incuber la boîte renversée 24 - 48h à  $37^{\circ}\text{C}$ . Dénombrer les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies à la surface et dans la masse de la gélose.

#### 2.2.3. Filtration sur membrane

Le produit à analyser (ou l'une de ses dilutions, selon la charge microbienne) est filtré à travers une membrane inerte dont la porosité ne permet pas le passage des bactéries,

celles-ci étant donc retenues sur la membrane qui est aseptiquement déposée sur le milieu de culture approprié. Les bactéries pompent les matières nutritives par capillarité.

Placer aseptiquement une membrane filtrante (porosité : 0.45µm) le support de filtre stérile, vider les 10ml de la dilution 10<sup>-7</sup> dans l'entonnoir de filtration, allumer l'appareil producteur de vide et laisser filtrer, rincer les parois avec de l'eau distillée stérile, transférer le filtre aseptiquement sur une gélose nutritive en évitant les bulles d'air entre le filtre et la gélose. Incuber 24 – 48h à 37°C. Dénombrer les membranes contenant entre 20 et 200 colonies.

Le résultat est exprimé en UFC/ml (unités formant colonie par un volume de 1ml).

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{nombre de colonies} \times \text{l'inverse de la dilution}}{\text{Volume réparti dans la boîte dénombrée}}$$

Le nombre « UFC » est utilisé car la colonie peut aussi bien provenir d'une seule cellule bactérienne ou d'un groupe de cellules bactériennes.

## Travaux pratiques de microbiologie générale

### «Effet des conditions physico-chimiques du milieu sur la croissance»

L'utilisation de différents critères permet d'identifier une bactérie isolée d'un milieu de culture. C'est ainsi que la détermination de certaines conditions physico-chimiques est souvent nécessaire pour classer les germes, l'étude des besoins, des exigences nutritionnelles des microorganismes, tout comme l'étude de leur équipement enzymatique, est indispensable à leur identification.

#### 1. Action des agents physiques

##### 1.1. La température

Les bactéries peuvent être classées en fonction de température de croissance.

	Température de croissance			
	Minimum	optimum	maximum	
<b>Psychrophiles</b>	0°C	15°C	30°C	généralement saprophytes
<b>Mésophiles</b>	5–25°C	18-45°C	30-50°C	pathogènes et autres
<b>thermophiles</b>	25-45°C	55°C	60-90°C	souvent retrouvées dans les conserves souillées

A partir d'une culture bactérienne, trois géloses en boîte de pétri sontensemencées en stries. Les boîtes sont incubées, l'une à +4°C (au réfrigérateur), la seconde à 44°C et la troisième à 37°C.

##### 1.2. Le pH

Le pH optimum de croissance peut aussi être très utile pour la classification des microorganismes ; ceux-ci sont sensibles au changement de pH du milieu de culture. Parmi les streptocoques par exemple, l'entérocoque est le seul à cultiver à pH=9.6.

À partir d'une culture en milieu solide, ensemençer trois tubes de bouillon nutritif correspondant à 3 pH différents : un tube à PH=4.5, le second à pH=7 et le dernier à pH=9.6. Les trois tubes sont incubées 24h à 37°C.

## **2. Action des agents chimiques**

### **2.1. Les sels**

Le chlorure de sodium, les sels biliaires mis en quantité dans un milieu ne permettent la croissance que de certaines bactéries. Exemple : les staphylocoques ont l'aptitude de cultiver à des concentrations élevées en NaCl, la bile inhibe le développement de la flore à Gram positif mais pas celui des entérobactéries.

À partir d'une culture bactérienne (en bouillon) ensemercer une gélose hypersalée (à 75g/l) ou un bouillon hypersalé (à 75g NaCl/l) à partir d'une culture en gélose. Incuber 24h à 37°C.

### **2.2. Les colorants**

Certains colorants inhibent la croissance de certains microorganismes. Exemple, le vert brillant inhibe les Gram-positifs et n'a pas d'effet sur les entérobactéries ; le vert malachite permet la croissance du bacille tuberculeux.

À partir d'un bouillon de culture, ensemercer en stries (ou en nappe) une gélose sélective VRBG (agar glucosé, bilié au vert brillant ou cristal violet). Incuber 24h à 37°C.

### **2.3. Les antiseptiques**

Le phénol, par exemple, inhibe à une concentration de 1‰ la multiplication de nombreux germes mais pas celle du colibacille.

Un bouillon additionné de phénol à 1‰ est ensemençé à partir d'une culture en gélose. Incuber 24h à 37°C.

### **2.4. Les antibiotiques**

La sensibilité aux antibiotiques peut souvent aider à l'identification des bactéries, c'est ainsi que parmi les streptocoques seul *S.pyogenes* est inhibé par la bacitracine.

#### **2.4.1. Réalisation d'un antibiogramme**

À partir d'une culture en milieu liquide, effectuer une dilution au 1/100<sup>e</sup>, prélever 3 à 5 ml de cette dilution (10<sup>-2</sup>) et les mettre dans une boîte de pétri dont il faut inonder la surface (de toute la plaque gélosée) par une légère rotation de la boîte (ensemencement par inondation), éliminer ensuite l'excès dans un récipient un antiseptique, laisser sécher la boîte entrouverte à l'étuve pendant 5 à 10 minutes, appliquer ensuite des disques d'antibiotiques à la surface de la surface de la gélose. Incuber 24h à 37°C.

La croissance se traduira par l'apparition d'une nappe à la surface de la gélose sauf aux endroits où ont été déposés les disques d'antibiotiques auxquels la souche est sensible. Si la souche est sensible à un antibiotique, il y aura une zone d'inhibition autour du disque (appelée plage de lyse).

## Travaux pratiques de microbiologie générale

### « Le métabolisme des bactéries »

L'étude des caractères métaboliques constitue la dernière étape permettant l'identification bactérienne. Le métabolisme propre à chaque espèce bactérienne est étudié de plusieurs façons :

Etude des exigences nutritionnelles, recherche d'enzymes microbiens, mise en évidence de métabolites produits par les microorganismes.

#### 1. Etude du type respiratoire

Pour mettre en évidence l'effet de l'oxygène sur la croissance bactérienne, chauffer au bain-marie un tube contenant de la gélose « viande-foie » pendant 15 minutes pour chasser les gaz et particulièrement l'oxygène dissous dans le milieu (régénération du milieu). Laisser refroidir le milieu ainsi régénéré jusqu'à une température de 45-50°C. À l'aide d'une pipette Pasteur prélever la culture bactérienne et ensemencer la gélose VF (viande-foie), en surfusion, en décrivant des spires de bas en haut. Refroidir immédiatement sous l'eau du robinet. Incuber 24-48h à 37°C. Après incubation plusieurs cas peuvent se produire :

- Croissance bactérienne au niveau de la partie supérieure du tube : bactéries aérobies strictes.
- Croissance bactérienne dans tout le milieu : bactéries aéro-anaérobies facultatives.
- Croissance au fond du tube : bactéries anaérobies strictes.

#### 2. Culture sur milieu minimum

Certaines espèces bactériennes sont aptes à croître dans un milieu purement minéral (synthétique) tel « le milieu au citrate de Simmons », celui-ci est utilisé pour l'identification des bacilles Gram-négatifs. Il permet la recherche de l'utilisation du citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie. Ce milieu doit être ensemencé à partir d'une culture prélevée sur milieu solide. Une culture en milieu liquide ou en eau peptonée n'est, en aucun cas, utilisée car elle apporterait avec les bactéries des éléments nutritifs susceptibles de fausser les résultats. Ensemencer en surface par une strie centrale et longitudinale (le milieu est incliné en tube), incubé à 37°C pendant 1-7 jours. La croissance des bactéries « citrate-positives » se traduit par un virage de la couleur du milieu vert au bleu. Si les bactéries sont « citrate-négatives », le milieu garde sa coloration verte même après plusieurs jours d'incubation.

Ce milieu contient du bleu de bromothymol, celui-ci est vert à pH neutre et bleu à pH alcalin. Les bactéries « citrate-positives » entraînent une alcalinisation du milieu et par conséquent un bleuissement du milieu.

#### 3. Mise en évidence d'enzymes respiratoires

##### 3.1. Recherche de l'oxydase (phénylène diamine oxydase)

Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée une colonie et la déposer sur « un disque oxydase », celui-ci contient de l'oxalate de diméthyl paraphénylène diamine. Les bactéries



« oxydase-positives » donnent rapidement une coloration violette foncée ; dans le cas contraire, il n'y a pas de coloration.

Ne pas utiliser le fil en nickel-chrome de l'anse platine, il peut donner des réactions faussement positives.

### 3.2. Recherche de la catalase

La catalase est un enzyme présent chez la plupart des bactéries aérobies et anaérobies facultatives contenant un cytochrome. La catalase décompose l'eau oxygénée selon la réaction :  $\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$ . Cet enzyme sert de « système de sécurité » en neutralisant l'excès de  $\text{H}_2\text{O}_2$  formé comme produit final lors de l'attaque des sucres, puisque ce produit est toxique et tue les bactéries.

Mettre une goutte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et y dissocier une colonie prélevée à l'aide d'une anse platine. Les bactéries catalase-positives provoquent un dégagement de  $\text{O}_2$  se traduisant par l'apparition de bulles de gaz.

## 4. Métabolisme glucidique

L'attaque des glucides par les bactéries se fait soit par voie oxydative, soit par voie fermentative ou par les deux voies. Le mode d'attaque des sucres joue un rôle important dans l'identification des microorganismes.

### 4.1. Mise en évidence de la fermentation-oxydation

La fermentation consiste en une séquence d'oxydoréductions où l'oxygène moléculaire n'intervient pas. Elle conduit à la formation d'alcools, d'aldéhydes et d'acides avec ou sans production de gaz ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ). La fermentation est généralement appréciée par le virage d'un indicateur de pH par acidification même en milieu tamponné.

L'oxydation est un phénomène respiratoire où l'oxygène intervient. Une réaction complète se traduit par la formation de  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  sans dégagement gazeux. Une réaction incomplète donne des produits intermédiaires acides mais en faible quantité, d'où l'utilisation de milieux peu tamponnés pour mettre en évidence de telles réactions.

L'étude de ces phénomènes est effectuée sur milieu de « Kligler » permettant d'observer la fermentation de deux sucres : le glucose et le lactose. À partir d'une culture bactérienne, ensemercer un milieu de Kligler : ensemencement à la fois du culot par pique et de la pente par stries. Incuber 24-48h à 37°C.

Après incubation, la fermentation du glucose provoque un virage du culot du rouge au jaune. Au niveau de la pente, zone aérobie, il y a dégradation des acides aminés donnant des produits alcalins qui neutralisent la pente déjà acidifiée par l'attaque du glucose, la pente retrouve alors sa couleur rouge après les 24h d'incubation ; mais si le lactose est fermenté, il suffit largement pour acidifier la pente et pour que l'alcalinité due au métabolisme protéique n'interfère pas. La production de gaz se traduit par l'apparition de bulles au niveau du culot, ou encore par la formation d'une poche qui décolle complètement le milieu du fond du tube. **glucose+  $\longrightarrow$  culot jaune ; lactose+  $\longrightarrow$  pente jaune**

## 4.2. Mise en évidence de voies fermentaires particulières

### 4.2.1. Réaction au rouge de méthyle (RM)

Elle consiste en une mesure du pH du milieu, en effet, de nombreuses bactéries produisent des composés organiques acides à partir de l'acide pyruvique. La zone de virage du rouge de méthyle est situé entre pH 4.2 et 6.3.

Ensemencer 5ml de milieu de Clark et Lubs avec une colonie de la souche à étudier, incuber 24h à 37°C. Après incubation, prélever environ 2ml de cette culture et les transvaser dans un tube vide et stérile, y verser quelques gouttes de rouge de méthyle à 0.5% dans l'alcool à 60°. Souche RM(+) → teinte rouge (pH < 4.2) ; RM(-) → teinte jaune (pH > 6.3)

### 4.2.2. Réaction de Voges-Proskauer (V.P.)

La réaction VP(+) est caractéristique de certaines bactéries lorsqu'il y a présence d'acétyl-méthyl carbinol (acétoïne) dans le milieu. Ce composé est un produit de dégradation de l'acide pyruvique. L'acétoïne est un précurseur de la voie du butylène glycol.

Le milieu Clark-Lubs, étant ensemencé comme pour la réaction RM, est incubé 24h à 37°C, puis 1ml du milieu est additionné de 0.5ml d'alpha-naphtol dans l'alcool à 90° (réactif conservé au frais et à l'obscurité) et de 0.5ml KOH (potasse) à 16% et agitée. S'il y a apparition d'une coloration rouge, la souche est VP(+) généralement en moins de 10 minutes. Si le milieu est inchangé la souche est VP(-).

## 5. Métabolisme protéique

Le métabolisme protéique est étudié en mettant en jeu plusieurs sortes d'épreuves.

- Des épreuves, dites globales, montrent la protéolyse du milieu (gélatine, sérum, lait,...).
- Des épreuves plus précises mettant en évidence des catabolites de dégradation (indole, H<sub>2</sub>S,...) ou qui déterminent la présence de certains enzymes (uréase, lysine décarboxylase,...).

### 5.1. Mise en évidence de la protéolyse globale

Pour rechercher les protéases, la méthode de Frazier est retenue pour la mise en évidence de gélatinases. Une gélose nutritive en boîte de pétri est ensemencée par touches à partir de la souche à étudier, sachant que la gélose est additionnée de gélatine à 4%. Incuber quelques jours à 37°C. Après incubation, verser 1 à 2ml de réactif de Frazier sur la plaque gélosée. Le milieu est tout opaque sauf aux endroits où la gélatine a été hydrolysée.

Ensemencement par touches : la colonie prélevée, par l'anse platine, est directement déposée en petites taches sur la gélose à ensemencer.

Réactif de Frazier : solution de HgCl<sub>2</sub> (15g) + HCl (20ml) + H<sub>2</sub>O (100ml).

### 5.2. Mise en évidence de certains catabolites

#### 5.2.1. Production d'indole

Certaines bactéries dégradent le tryptophane (présent dans la plupart des protéines) en indole grâce à une tryptophanase.



La culture est effectuée sur eau peptonée exempte d'indole à partir d'une colonie de la souche à étudier. Incuber 24-48h à 37°C. L'indole produit est révélé par des réactifs divers, le plus utilisé est le réactif de Kowacs. Après incubation, la culture est additionnée de réactif de Kowacs ; si l'espèce bactérienne est indole (+), un anneau rouge apparaît à la surface du

milieu ; si au contraire elle est indole (-), il y a un anneau jaune ou le milieu demeure inchangée.

### **5.2.2. Production de H<sub>2</sub>S**

Elle est le témoin de dégradation de peptones et de leurs acides aminés soufrés tels que la cystéine, la méthionine. La production de H<sub>2</sub>S peut être observée sur le milieu de Kligler utilisé pour l'étude de l'attaque des sucres. La réaction H<sub>2</sub>S (+) se traduit par l'apparition de dépôt noir composé de sulfure de fer formé au cours de la réduction de thiosulfate en anaérobiose en présence de citrate ferrique.

## **6. Métabolisme lipidique**

De nombreuses bactéries sont douées d'activité lipolytique et estérasique. L'étude porte sur la recherche de la lipase, celle-ci hydrolyse les esters d'acides gras.

Une gélose en boîte de pétri, additionnée de tween 80 à 16ml/l (monoléate de sorbitol), estensemencée en pique (ou par touches) à partir d'une culture en milieu solide de la souche à étudier. Incuber 24-48h à 37°C. Après incubation, les colonies de souches lipase(+) sont entourées d'un halo opaque formé suite à la précipitation d'acides gras issus de la lipolyse.