

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 08 Mai 1945 de GUELMA
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DÉPARTEMENT SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



**Manuel des Travaux Pratiques
en « Microbiologie »
(Deuxième année Tronc commun
Sciences de la Nature et de la Vie)**

Présenté par :

Dr. AISSAOUI Ryadh

2014 – 2015

SOMMAIRE

SEANCE N° 1 - Consignes générale à suivre dans le laboratoire de Microbiologie

SEANCE N° 2. Mise en évidence de la présence de microorganismes dans le laboratoire

SEANCE N° 3. La stérilisation

SEANCE N° 4 - Examen macroscopique des cultures

SEANCE. N° 5 - Isolement de colonies pures

SEANCE N° 6 - L'examen microscopique des bactéries

SEANCE N° 7 - Examen après coloration

SEANCE N° 8 - Coloration différentielle de Gram

SEANCE N° 1 - Consignes générale à suivre dans le laboratoire de Microbiologie

OBJECTIFS :

Connaître le laboratoire de microbiologie, présentation de son équipement ainsi que son mode de mise en marche.

I. Présentation de matériels rencontrés dans le laboratoire :

- Description du **gros matériels** utilisés (Bain Marie, autoclave, four Pasteur, étuve, centrifugeuse...)
- Présentation de matériels courants et spécifiques du laboratoire (bec Bunsen, pipettes, pipettes Pasteur, anse de platine, béchers, pincettes, lames, tube à visse, boîte de Pétri...),
- Enumération des produits utilisés usuellement (eau distillée, alcools, bleu de méthylène, fuchsine, violet de gentiane...)

II. Les consignes à entreprendre durant les manipulations :

- Il est impératif de laver minutieusement les mains à l'eau savonneuse et ce, avant et après les manipulations ;
- Fermer les portes et les fenêtres durant les manipulations ;
- Ouvrir avec prudence les boîtes de Pétri et les tubes à visse contenant des milieux de cultureensemencés ainsi que les échantillons (risque de contamination) ;

- Procéder au flambage, avant et après utilisation de l'anse de platine utilisées pour le prélèvement ou le repiquage des milieux, en chauffant la platine entière pour permettre une stérilisation complète et efficace de ce matériel ;
- Aviser rapidement l'enseignant responsable de TP en cas de casse d'une verrerie contenant un milieu de cultureensemencée ou en cas d'une fausse manipulation induisant la projection sur le visage ou l'absorption per os, de produits souillés ou dangereux ;
- Il est formellement interdit de manger ou de boire dans le laboratoire ;
- Procéder à la stérilisation de tous les matériels utilisés ainsi à la destruction des souches microbiennes présentant un danger à la fin de chaque séance.

SEANCE N° 2. Mise en évidence de la présence de microorganismes dans le laboratoire

Objectifs :

Permettre à l'étudiant de mettre en évidence la présence des microorganismes dans le milieu ambiant du laboratoire ainsi que dans le corps humain ou autres objets.

I. Matériel :

- milieux de culture solides (gélosés) coulés en boîte de Pétri,
- écouvillons,
- eau de robinet,
- cheveu,
- bec Bunsen,
- pièce de monnaie.

II. Mode opératoire :

- Prendre 5 boîte de Pétri contenant un milieu de culture solide ;
- Diviser la première boîte en en 2 parties : déposer un cheveu sur la première et quelques gouttes d'eau du robinet sur la seconde ;
- Diviser la seconde boîte en 4 zones : mettre une trace de doigt sur la première, refaire l'opération sur la seconde zone après avoir lavé les mains, déposer la pièce de monnaie sur la troisième, enfin, frotter un écouvillon sur la paillasse et appliquer celui-ci sur la dernière zone ;

- Laisser la troisième boîte ouverte entreposée sur la paille, durant environ 15 min ;
- Laisser les 2 dernières boîtes de Pétri ouvertes à proximité du bec Bunsen allumé ;
- Mettre toutes les différentes boîtes de Pétri renversées dans l'étuve réglée à 37°C pendant 24 heures ;
- Procéder à la lecture des résultats après la fin du temps d'incubation.

SEANCE N° 3 : LA STÉRILISATION

Objectifs :

Permettre à l'étudiant de connaître les différents procédés de stérilisation afin de contrôler les microorganismes introduits volontairement dans un milieu de culture donné d'une part et d'éviter de contaminer le milieu ambiant ainsi que les manipulateurs.

I. La stérilisation par la chaleur sèche et humide :

I.1. La Chaleur sèche :

I.1.1. Le Flambage :

L'opération du flambage d'un matériel inflammable (le col d'un récipient en verre, pipettes Pasteur, anse de platine) dans la flamme du bec Bunsen, garantira sa parfaite stérilisation.

I.1.2. Le four Pasteur :

Ce matériel procure à son intérieur une ambiance chaude et sèche qui assure la stérilisation de la verrerie et le matériel métalliques (préalablement nettoyés et égouttés). La stérilisation ne sera efficace qu'à une température de 180°C durant 60 minutes.

I.2. La chaleur humide

I.2.1. L'autoclavage :

La présence de l'autoclave dans un laboratoire de Microbiologie est obligatoire.

Le principe de fonctionnement de cet appareil, est le chauffage sous une pression de vapeur d'eau (1 bar) et à une température de 120°C durant une demi-

heure. Il est utilisé pour la stérilisation des milieux de culture ainsi que le matériel en caoutchouc ou en plastique.

I.2.2. La pasteurisation :

Cette technique de stérilisation est sélective puisque elle permet la destruction des germes pathogènes tout en préservant la flore normale d'un liquide. Elle se base sur le changement brusque de la température de 75 - 80 ° C à la température de 6 - 4 °C.

I.2.3. La tyndallisation :

Cette technique particulière s'articule sur 3 chauffages discontinu et court à une température avoisinant les 60 - 70°C à des intervalles réguliers suivis par des refroidissements, permettant la destruction des microorganismes non détruits par le premier chauffage. Les spores qui se développent sont détruits par les chauffages successifs.

II. La filtration

Ce procédé consiste à faire passer un liquide à travers un filtre ou une membrane ayant des pores d'un diamètre de 0,2 µm. Les microorganismes de taille supérieure sont ainsi retenus par cette barrière.

La filtration est utilisée dans des cas particuliers où certaines solutions sont détruites par les chaleurs telles que les hormones, les acides aminés aromatiques, les acides nucléiques et les vitamines.

III. Les autres techniques de stérilisation

III.1. Les radiations :

Les radiations U.V. sont utilisées au laboratoire de Microbiologie pour décontaminer l'air et les paillasses. Les rayons X, servent à la stérilisation

industrielle des boites de Pétri en matière plastique et de produit pharmaceutiques.

2. Agents chimiques :

Leurs usages assurent la désinfection des locaux de travail ainsi que la destruction des germes portés par des instruments souillés. La verrerie n'ayant pas subi un autoclavage, peut être stérilisée par cette méthode.

SEANCE N° 4 EXAMEN MACROSCOPIQUE DES CULTURES

Objectifs :

Faire connaître à l'étudiant la notion de base de « colonie » obtenue après incubation sur milieu solide et d'étudier ses différents aspects.

I. Aspect de colonies en surface sur milieu solide

I.1. La taille

La taille peut être mesurée en utilisant une règle graduée dans le cas de grandes colonies. Comme, il est possible de recourir à une loupe binoculaire ou un microscope photonique à faible grossissement où sont installés des micromètres oculaires permettant la mesure des colonies de petites tailles.

I.2. La forme

- L'allure de contours : lisse, dentelés, déchiquetés, irréguliers
- Le relief : surface bombée, demi-bombée, plate.
- Le centre : surélève, ou en creux.

I.3. L'aspect de la surface

La surface d'une colonie peut être lisse, rugueuse ou réfléchissant la lumière en leur donnant un reflet métallique.

I.4. L'opacité

Les colonies peuvent être :

- ✓ Opaques (pas de passage de la lumière) ;
- ✓ Translucides (laissent passer la lumière mais on ne voit pas les formes) ;
- ✓ Transparentes (laissent passer la lumière et permettent de voir les formes).

I.5. La consistance

En utilisant une anse de platine, nous pouvons estimer si les colonies sont grasses, crémeuses, sèches ou muqueuses.

I.6. La couleur des colonies :

Certaines souches de bactéries synthétisent des pigments qui sont insolubles et donnent une coloration spécifique de la colonie (rouge, rose, jaune ...), alors que d'autres produisent des pigments solubles qui diffusent et colorent le milieu de culture.

II. L'aspect des colonies en profondeur :

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

SEANCE N°5 - ISOLEMENT DE COLONIES PURES

Objectifs

Initier l'étudiant aux différentes techniques d'isolement et de purification d'un échantillon contenant un mélange microbien lui permettant d'obtenir des colonies bien séparées et d'aspects spécifiques.

I. Matériel

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

II. Mode opératoire (Technique des 4 séries de stries)

- Sur le fond extérieur de la boîte de Pétri, tracer deux diamètres perpendiculaires permettant d'obtenir 4 zones ;
- Prendre un inoculum en utilisant l'anse de platine à partir de la suspension bactérienne ;
- la boîte maintenue entrouverte à l'aide de la main gauche, 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 une autre fois et laisser refroidir ;
- Répéter une dernière fois l'étalement en stries serrées dans la moitié correspondante aux quadrants 3 et 4

SEANCE N° 6 L'EXAMEN MICROSCOPIQUE DES BACTÉRIES A L'ETAT FRAIS

Objectifs

L'examen microscopique des bactéries vivantes, en milieu liquide permet d'apprécier leur mobilité ou non ainsi que leur morphologie.

I. Mode opératoire

I.1. Préparation du frottis à partir d'une culture en milieu liquide :

- Prendre une lame propre et déposer une ansée à partir d'une suspension liquide à son centre;
- Recouvrir la goutte par une lamelle ;
- Observer au microscope photonique au grossissement x 10 puis x 40.

I.2. Préparation du frottis à partir d'une culture sur milieu solide :

- Déposer quelques gouttes d'eau physiologique stérile ;
- Prendre une petite quantité à l'aide de l'anse de platine au centre de la lame
- Faire mélanger un peu
- Recouvrir le mélange par une lamelle ;
- Observer au microscope photonique au grossissement x 10 puis x 40.

SEANCE N° 7 - EXAMEN APRÈS COLORATION SIMPLE

Objectifs

Etude de la morphologie d'une cellule bactérienne après fixation et coloration, permet de se renseigner sur :

- ✓ La mobilité des bactéries,
- ✓ La forme,
- ✓ La taille,

Mode opératoire

1. Réalisation du frottis :

- A l'aide d'une pipette, déposer une gouttelette d'eau, au centre de la lame ;
- Choisir une colonie bien isolée sur le milieu solide.
- Prélever une fine couche de la colonie ;
- Mélanger l'ansée prélevée avec la gouttelette d'eau
- Bien étaler tout la suspension sur toute la surface de la lame ;
- Laisser sécher à l'air libre durant quelques minutes.

2. Fixation du frottis sec :

- Prendre la lame par une pince en bois ;
- Faire passer délicatement, la lame plusieurs fois au- dessus de la flamme du bec Bunsen ;
- Laisser refroidir.

3. Coloration au bleu de Méthylène

- Prendre le frottis fixé et refroidi ;
- Faire couvrir la surface de la lame par la solution de bleu de méthylène ;

- Laisser agir pendant 1 minute.
- Rincer abondamment la lame avec de l'eau distillée, afin d'éliminer l'excès du colorant ;
- Sécher à l'air ou délicatement entre deux feuilles de papier filtre fin (ou buvard) ;
- Examiner au microscope, objectif à immersion.

SEANCE N° 8 COLORATION DIFFERENTIELLE DE GRAM

Objectifs

Permettre à l'étudiant de réaliser la coloration de base en Bactériologie et de faire la distinction entre les bactéries en Gram positif et en Gram négatif, nécessaire pour leur identification.

Réactifs :

- Violet de gentiane phénique
- Lugol (iodo-iodure de potassium)
- Alcool à 95%
- Safranine (ou Fuchsine)

Mode opératoire :

- Réaliser un frottis et le fixer comme décrit lors de la coloration simple ;
- Couvrir la lame par le violet de gentiane (ou cristal violet) phéniqué pendant 1 minute ;
- Laver la lame à l'eau distillée.
- Recouvrir la lame par une solution de lugol pendant 1 minute ;
- Laver à l'eau distillée ;
- Décolorer dix secondes à l'alcool ;
- **RINCER IMMEDIATEMENT A L'EAU DISTILLEE**
- Verser sur la lame la solution de la safranine (ou la fuchsine) phéniquée pendant 1 minute ;

- Laver la lame à l'eau distillée ;
- Sécher la lame en la tamponnant avec du papier absorbant ;
- Observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile et à pleine lumière.