

TP N° 1.

**Introduction au laboratoire de Microbiologie,
et les différents procédés de stérilisation.**

1. Objectifs :

1. Acquérir les connaissances indispensables relatives au risques biologiques et notamment celui lié à la manipulation des souches microbienne.
2. Se familiariser avec le laboratoire de microbiologie, son équipement et son fonctionnement
3. S'initier à la manipulation aseptique, à l'organisation du poste de travail et aux techniques de stérilisation

2. Définitions

- *Microbiologie* « *Micro* » ; petit, « *Bio* » ; vie, *logie* ; science, c'est l'étude êtres vivants invisibles à l'œil nu et qui doivent être observés, examinés et étudiés sous le microscope.
- *Germes* ; microorganismes
- *Colonne* : est l'amas, visible à l'œil nu, constitué par des milliards de descendants d'une seule cellule bactérienne.
- *Souche* : ensemble de germes ayant la même origine (descend d'un seul microorganisme et de la même culture pure).

3. Présentation du laboratoire de microbiologie

Le laboratoire de microbiologie doit être composé de trois parties principales :

- le laboratoire proprement dit où sont réalisées les analyses
- la salle de préparation des milieux de culture
- la laverie qui traite les produits et matériels utilisés pour l'analyse et qui fournit la verrerie et le matériel propre et stérile.

Le laboratoire d'analyse doit :

1. Disposer d'un espace suffisant avec une circulation limitée.
2. des murs, plafonds et sol lisses mais non glissants, non absorbants, faciles à nettoyer et à désinfecter
3. Etre bien éclairé et à l'abri des courants d'air.
4. Equipé par des hottes de sécurité microbiologique
5. Avoir des armoires pour stocker la verrerie, le matériel jetable, les milieux déshydratés et certains produits chimiques.
6. Avoir une armoire frigorifique pour la conservation des milieux prêts à l'emploi et des souches bactériennes.

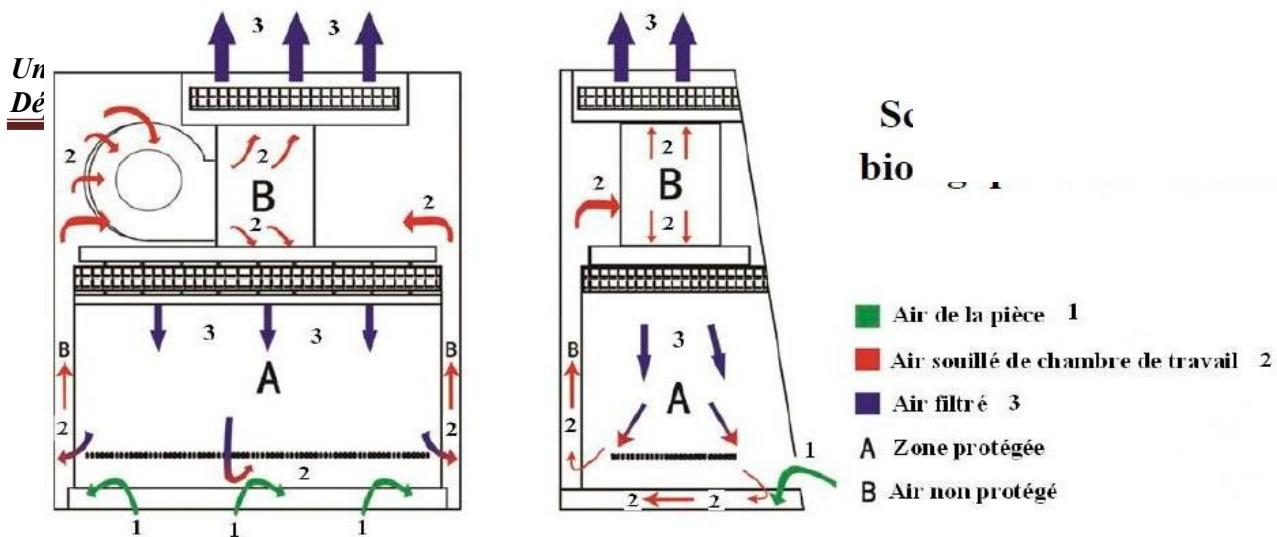


Figure 1 : Schéma hotte de sécurité biologique à flux luminaire

4. Les risques au laboratoire de microbiologie

Tableau 1 : Les risques au laboratoire de microbiologie

Matériel utilisé	Nature du risque	Geste sécurité - Prévention
Le bec bunsen	Brûlures	Port d'une blouse non inflammable. Cheveux courts ou attachés. Vigilance. Ne pas approcher un produit inflammable
Verres (lame, pipette)	Coupures	Port de gants. Vigilance.
Pipettes Pasteur : - stériles - contaminées	Piqûres	Les poser sur leur support. Ne pas laisser de fragments sur la paillasse. Les jeter immédiatement après usage dans le bac de Javel.
Matériel électrique	Electrocution	Sols et paillasses secs. Ne pas toucher une prise ou une fiche d'appareil avec les mains mouillées. Signaler au professeur tout appareil abîmé (fil dénudé).
Produits chimiques	Inhalation	Maintenir les flacons fermés. Ne pas respirer au-dessus d'un flacon ouvert.
	Ingestion	Ne jamais prélever à la bouche. Utiliser une poire aspirante ou une pipette automatique.
	Projections	Utiliser une blouse, des gants, des lunettes et travailler sous hotte.
	Combustion	Ne pas manipuler les produits inflammables à proximité d'une flamme ou d'une source d'étincelles ou de chaleur.
Micro-organismes	Inhalation	Port de masque. Manipulation de souches dangereuses sous la hotte.
	Ingestion	Utilisation de poires aspirantes, de système d'aspiration Ne pas porter les mains à la bouche.
	Projections	Eviter les courants d'air. Flamber l'oeze progressivement (boucle en dernier !!!) Ne pas porter de lentilles.

N.B : Tout matériel biologique (bactéries, champignons, levures, sang, liquides,...) doit être considéré comme potentiellement dangereux.

4.1. Règles de sécurité à appliquer avant et après chaque séance de TP.

- Nettoyer les surfaces de travail avec un désinfectant adéquat avant et après toutes manipulations.
- Se laver les mains avant et après toutes manipulations.
- Ne placer sur l'aire de travail que le matériel nécessaire
- Déposer le matériel sur l'aire de travail de manière à être le plus à l'aise possible pour manipuler.
- Bien connaître l'ensemble des étapes avant de commencer les manipulations.
- Travailler assis, sans parler, porter une blouse boutonnée afin d'éviter de contaminer les vêtements.
- Ne jamais manger ou boire.
- Nettoyer et désinfecter rapidement tout dégât sur l'aire de travail.

4.2. Pictogrammes signalant les dangers chimiques et biologiques

En microbiologie, le manipulateur doit utiliser des produits chimiques pour la préparation des milieux de culture ou des réactifs ou pour le nettoyage et la désinfection. Il est indispensable que soient connus les dangers présentés par certains d'entre eux par la lecture des avertissements figurant sur les étiquettes.

Tableau 2 : pictogrammes de sécurité

Symbol	Signification	Commentaires
	Le pictogramme « risque biologique »	Averti de la présence de matériel biologique (sang, animal, micro-organisme pathogène.....) infectieux, ou potentiellement infectieux.
	Produit Inflammable, F	Ce symbole désigne les produits inflammables, ils sont donc à utiliser loin d'une flamme ou d'une source de chaleur. (F = facilement inflammable F+ = extrêmement inflammable)
	Produit Corrosif, C	Ce symbole désigne les produits corrosifs, ils s'attaquent aux tissus biologiques ainsi qu'aux matériaux.
	Produit Explosif, E	Ce symbole désigne les produits qui ont la capacité d'exploser lors d'un choc ou s'ils sont exposés à une source de chaleur.
	Produit dangereux pour l'environnement, N	Ce symbole désigne les produits néfastes pour l'environnement, ils sont donc à récupérer après utilisation pour qu'ils soient traités.(cas des solvants organiques)
	Produit comburant, O	Ce symbole désigne les produits comburants, ils facilitent la combustion, ils sont donc à utiliser loin d'une flamme ou d'une source de chaleur.
	Produit Toxique, T	Ce symbole désigne les produits toxiques, ils peuvent donner la mort en faibles doses et doivent être manipulés avec les protections adéquates.
	Produits irritant ou nocif : Xi et Xn	Ce symbole désigne les produits irritants ou nocifs, ils peuvent occasionner des désagréments pour la santé. Ils doivent être manipulés avec les protections adéquates.

5. Matériel utilisés en microbiologie

5.1. Matériel léger

- Le bec Bünsen : fonctionne avec une flamme bleue pour donner une haute température adéquate à la stérilisation des instruments. La zone de stérilité est sphérique (un diamètre de 10 à 20 cm). Toutes les manipulations doivent être à l'intérieur de cette sphère stérile.
- Les boîtes de Pétri: de 90 cm ou 60 mm de diamètre.
- Les tubes à essai: tubes en verre fermés avec bouchons métalliques. Ces tubes peuvent être bouchés au coton cardé (hydrophobe).
- Les pipettes Pasteur stériles à longue effilure terminale destinées le plus souvent au transport stérile de produits liquides. Non graduées, elles sont achetées prêtes à l'emploi. Elles sont à utiliser avec une poire d'aspiration. Il faut stériliser les pipettes Pasteur avant et après chaque prélevement.
- Le râteau : pour étaler une suspension microbienne sur un milieu de culture solide.
- L'anse à ensemencer: un fil (en platine, en tungstène ou en nickel chrome) monté sur un porte-fil. Cette anse est utilisée pour les prélevements, les ensemencements et les repiquages. Sa stérilisation est effectuée dans la flamme bleue du bec Bünsen avant et après chaque emploi.

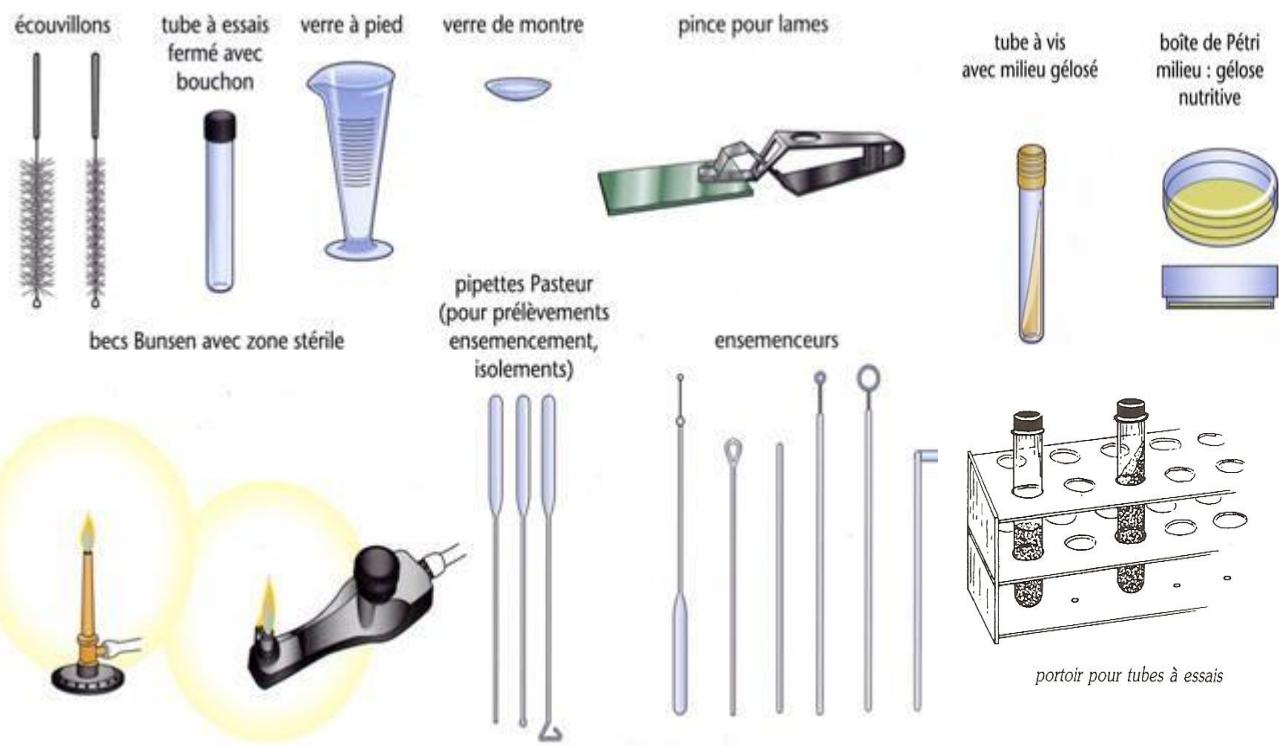


Figure 2 : Le matériel utilisé en travaux pratiques de microbiologie

5.2. Appareils

Etuve (incubateur), la balance de précision, four pasteur, autoclave, bain marie, microscope, une centrifugeuse, un compteur de colonies, un spectrophotomètre, un pH-mètre et un agitateur magnétique.

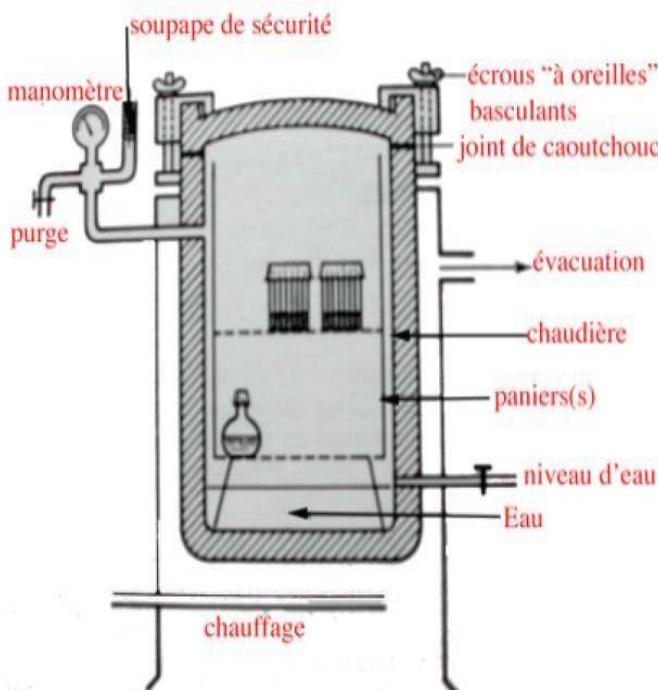


Figure 3. Schéma autoclave verticale

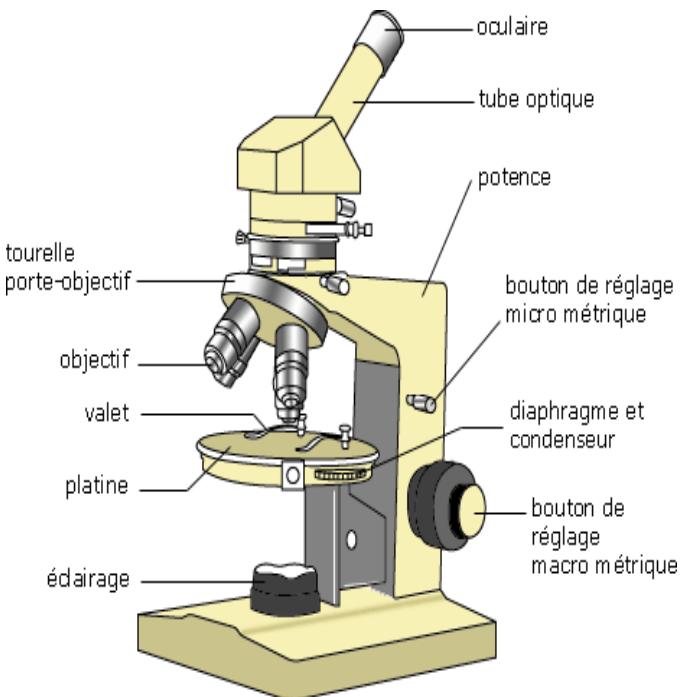


Figure 4. Schéma microscope optique

6. Organisation de la paillasse au laboratoire de microbiologie

Sa disposition sera toujours la même, de façon à ce que le manipulateur:

- travaille assis, en ayant tout le matériel nécessaire accessible sans avoir besoin de se déplacer
- manipule sans que rien ne s'interpose entre lui et la flamme
- ne croise jamais les bras pour accéder à un objet

On évitera tout ce qui est inutile (livre, stylo...) dans la zone de travail car tout matériel souillé devra être stérilisé à l'autoclave avant de sortir du laboratoire.

1. *Au milieu de la paillasse* et à 20 cm du bord se situe le bec Bunsen

2. *A gauche du bec Bunsen*

On y trouve le matériel sur lequel le travail doit être effectué :

- produit à étudier (contenant le ou les micro-organismes).
- milieux de culture : en boîte de Pétri et en tubes qui seront regroupés sur des portoirs.
- *ils seront saisis uniquement à l'aide de la main gauche.*

3. *A droite du bec Bunsen*

On y trouve les instruments avec lesquels le travail sera effectué :

- Les pipettes Pasteur
- Les instruments métalliques :
 - l'anse de platine ou öese , c'est l'instrument le plus utilisé. Le fil, terminé par une boucle de 2 mm de diamètre, sert pour les prélèvements et les ensemencements des produits bactériens solides ou liquides.
 - une pince en inox : qui servira à manipuler les lames.
 - *ils seront saisis uniquement à l'aide de la main droite.*
- a. *derrière le bec bunsen*: un peu sur la droite, On y trouve un bac contenant de l'eau de Javel (3 degré chlorométrique): on y mettra tous les instruments contaminés qui ne peuvent pas être décontaminés par la flamme du bec Bunsen , la plus part du temps les pipettes Pasteur et les pipettes en plastique.

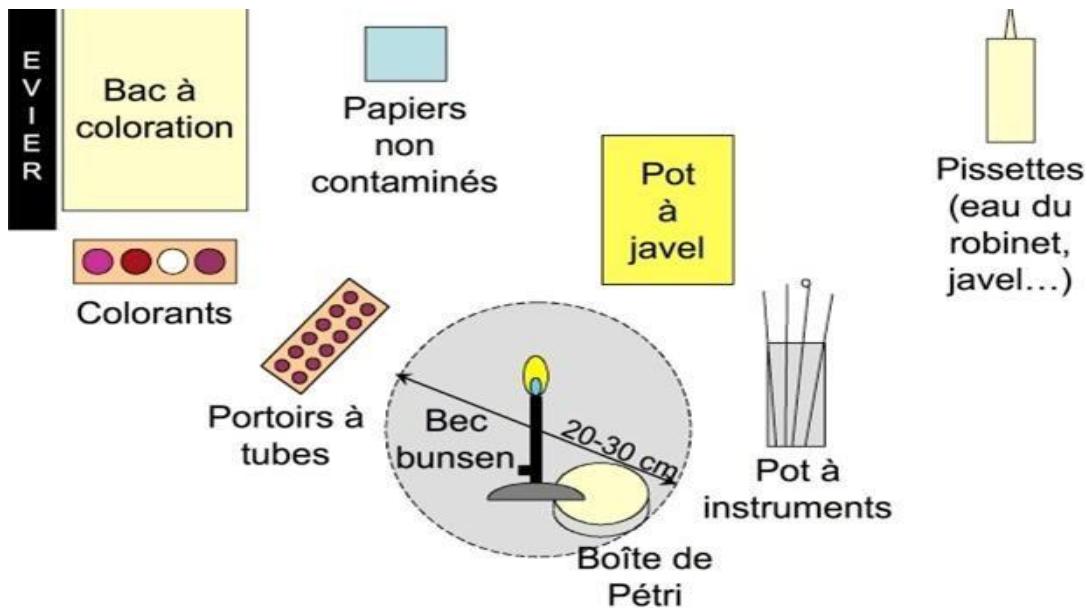


Figure 5 : Organisation de la paillasse au laboratoire de microbiologie

7- La stérilisation.

C'est le procédé par lequel on détruit ou on élimine d'un objet, des milieux inertes ou d'un lieu toutes les cellules vivantes, les spores viables et les virus, et ce de manière durable. Un objet stérile est totalement dépourvu de microorganismes et de spores, l'agent chimique ou physique qui permet la stérilisation est appelé agent stérilisant. 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.

Définition des termes fréquemment utilisés

- **Désinfection** : C'est la destruction, l'inhibition ou l'élimination des microorganismes potentiellement pathogènes. Les désinfectants sont des agents généralement chimiques et employés sur des objets. Lorsqu'on utilise un désinfectant, **on n'obtient pas toujours l'élimination totale des microorganismes** car il peut rester des spores et quelques microorganismes.

- **Décontamination** : Elle est associée à la désinfection, par ce processus, la population microbienne est réduite à des niveaux considérés sans dangers par les normes de santé publique. Exemple : des agents de décontamination sont utilisés pour nettoyer la vaisselle dans les restaurants ou dans les industries agroalimentaires. Ces traitements sont utilisés sur de la **matière** mais il est souvent nécessaire d'éliminer des microorganismes sur des **tissus vivants**

- **Antisepsie** : C'est la prévention de l'infection par l'utilisation d'antiseptiques qui sont des agents chimiques à toxicité sélective appliquée sur le tissus dans le but de détruire ou d'inhiber le développement des agents pathogènes. Il existe plusieurs procédés de stérilisation qui correspondent aux différents types de matériaux à traiter :

7.1. La stérilisation par les méthodes physiques

7.2. La stérilisation par les méthodes chimiques

Tableau 3 : les méthodes physiques de stérilisation

Méthodes		Efficacité	Utilisation
Radiations	- Rayons ultra-violets	- Ne pénètre pas en profondeur des objets.	- air et surfaces de travail, laboratoires, salle d'ensemencement, bloc opératoire, etc.
	- Rayons X et gamma (γ)	- Pénètre en profondeur des objets.	- Produits pharmaceutiques et alimentaire, matière plastique, des pansements, des boîtes de Pétri, l'industrie de la mise en conserve,
Filtration (à travers des substances poreuses = filtres): la taille des pores est de 0,22 μm		- Ne retient pas les virus	- Solutions de substances thermosensibles = thermolabiles (altérés par la chaleur) comme certains milieux de culture, acides aminés, vitamines, hormones, antibiotiques, etc.
Chaleur sèche	- Flambage par bec Bunsen (brûleur à gaz)	Contact direct avec la flamme	- Pour stériliser le matériel métalliques, en inox ou en verre : les pinces, les pipettes Pasteur, les anses à ensemencer (le fil), etc.
	- Air chaud : four Pasteur	- Une température de 180 °C pendant 1 h pour détruire les formes végétatives et également les spores	- Pour stériliser le matériel métallique (les pinces, etc.), en inox, en porcelaine, ou en verre (les pipettes Pasteur, etc.). Elle ne convient pas pour les milieux de culture, les objets en plastique, en caoutchouc,
Chaleur humide	- Ebullition (traitement par la vapeur) : 100 °C pendant 30 minutes	- Détruit la plupart (mais pas la totalité) des bactéries, les champignons et les virus. N'est pas efficace contre les endospores.	Équipement médical ou industriel thermorésistant, aiguilles, seringues, pinces, solution concentrée de sucres, gélatine,
	- Pasteurisation : 90 °C pendant 30 seconds	- Détruit tous les pathogènes, mais pas forcément toutes les bactéries. Elle ne détruit pas les endospores.	- Protège les produits alimentaires (lait, jus, etc.)
	- Tyndallisation : 3 traitements consécutifs de 60-90 °C pendant 1 h, à des intervalles de 24 h	- Les formes végétatives sont détruites le 1 ^{er} jour. Les endospores qui germent, durant les intervalles à TA, sont détruites lors des traitements suivants. - A 60-90 °C, la germination des endospores est induite	- Milieux non autoclavables (substances relativement thermosensibles et non filtrables) : vaccin, sérum, émulsion de jaune d'œuf, etc.
	- Autoclavage : 120 °C pendant 20 minutes	- Détruit toutes les cellules végétative et les endospores	- Milieux de culture, le matériel métalliques, en inox, en caoutchouc, ou en verre : les pinces, les pipettes Pasteur, etc.

*La pasteurisation ancienne : 75 °C pendant 20 minutes (déjà abandonnée à l'échelle industrielle), puis refroidir brusquement à 5 °C.

7.2. La stérilisation par les méthodes chimiques

Propriétés et utilisation de quelques groupes de désinfectants et antiseptiques courants ;

1. Les composés phénoliques :

Phénol :

- 1er désinfectant et antiseptique largement utilisé
- Activité : Dénaturation des protéines et altération des membranes cellulaires
- Avantages : Actifs longtemps après leur application
- Inconvénients : Odeur désagréable

2. Les alcools : Parmi les désinfectants et les antiseptiques les plus utilisés

- Forme : Ethanol - Isopropanol à 70-80 %
- Activité : Dénaturation des protéines

3. Les halogènes : Iodophores : iode complexé à des transporteurs organiques

- Avantages : Solubles dans l'eau, non tachant, plutôt stable.
- Inconvénients : Brûlures et irritation de la peau réduite
- Utilisation : Antisepsie préopératoire de la peau, désinfectants (hôpitaux, labos)
- Exemples ; Bétadine et proviodine

4. Chlores : un des désinfectants les plus communs.

- Utilisation : Traitement des eaux
- désinfection de locaux Forme - Gaz (Cl₂)
 - Hypochlorite de calcium
 - Hypochlorite de sodium
- Activité : Oxydation des constituants cellulaires

5. Eau oxygénée : agent oxydant (H₂O₂)

6. Les ammoniums quaternaires

- Savons : Pouvoir antiseptique variable ~ Agents mouillants
- Détergeant : Agents mouillants (tensioactifs)
 - anioniques : renforcent l'action d'autres désinfectants
 - cationiques = désinfectants + efficaces
- Activité : Déstructuration de la membrane plasmique
- Avantages : Stable, Incolores, inodores
- Utilisation : thérapeutique locale.

7. Les gaz stérilisants

- Utilisation : Produits ou objets instables à la chaleur et la désinfection de locaux
 - Vapeurs de formaldéhyde
 - Spectre d'action : pouvoir bactéricide puissant
 - Inconvénients – Toxiques
 - Oxyde d'éthylène
 - Activité : Dénaturation des protéines
 - Inconvénients : Très toxique

TP 2: Observation microscopique et coloration de GRAM

La coloration des bactéries est un moyen **d'augmenter leur contraste** de manière à mieux les observer en **microscope à fond clair**.

Dans les conditions normales, les procaryotes ont en général un pH intracellulaire neutre et une surface cellulaire globalement chargée négativement. Ceci explique l'efficacité des **colorants basiques** pour l'observation de la **morphologie bactérienne**.

La coloration peut s'appliquer :

- soit sur des cellules vivantes en utilisant des colorants dilués;
- soit sur des cellules tuées par **FIXATION** en utilisant des colorants concentrés.

Toutes les techniques de coloration sur des bactéries tuées requièrent trois étapes principales :

{ La préparation du frottis

- La fixation

La coloration proprement dite :

*Coloration simple (un seul colorant) **ou**

*Coloration différentielle type Gram (deux colorants) **ou**

*Colorations spéciales des structures bactériennes (capsules, spores, flagelles....).

Vous disposez de trois cultures bactériennes : de *Staphylococcus*, de *Bacillus* et d'*E. coli*. Les manipulations suivantes vont être réalisées pour les trois bactéries.

1. Préparation du frottis

« Un frottis c'est l'étalement en couche mince d'un liquide biologique sur une lame de verre ».

Pour ce faire :

1. Notez la référence de la bactérie échantillon sur un coté d'une lame parfaitement propre et dégraissée.
2. Mettez quelques gouttes d'eau distillée stérile sur la lame.
3. Prélever stérilement à l'aide d'une anse de platine une parcelle d'une colonie bactérienne poussée sur milieu gélosé.
4. Faites émulsionner cette colonie dans les gouttes d'eau sur lame.
5. Les frottis doivent être étalés en couche mince et régulière pour bien séparer les cellules bactériennes, puis séchés ;
 - 5.1. **Etalement** : Etalez en couche mince par l'anse avec des mouvements circulaires.
 - 5.2. **Séchage** : Le séchage est effectué à l'aire libre dans la zone stérile jusqu'à ce que le frottis présente un aspect mat.

2. Fixation du frottis sec

Cette étape a pour but :

- De tuer les bactéries ; ce qui rend leurs membranes plus perméables aux colorants.
- De fixer la structure cytologique des bactéries et donc fixer la forme sans l'en altérer.
- De faire coller les bactéries à la surface de la lame.

La fixation s'effectue soit par **l'alcool flambé**, soit **par la chaleur**

Fixation par 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.

Maintenant, notre frottis est prêt à différents types de coloration

3. Coloration de GRAM

3.1. Principe

C'est la coloration de base en bactériologie, elle est **dite différentielle** car elle permet de différencier et **de classer** la majorité des **bactéries** en **2 grands groupes** (les GRAM + et les GRAM-), selon la différence de la composition de leur paroi cellulaire ; et par conséquent selon leur aptitude à fixer ou non un colorant.

Cette distinction (**GRAM + ou GRAM -**) est fondamentale pour l'identification bactérienne. Pour ce faire :

- ✓ **Le violet de gentiane** se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes.
- ✓ **L'iode lugol** renforce cette coloration par la formation d'un complexe avec le violet de gentiane
- ✓ Les lipides sont très solubles dans **l'alcool**, en effet :
 - ⇒ Chez les bactéries à **GRAM négatif**, dont la paroi est riche en lipides, pauvre en peptidoglycane, l'alcool dissout ces lipides ce qui aboutit à une augmentation de la perméabilité de la paroi. **L'alcool pénètre facilement au cytoplasme et le décolore (l'alcool dissout le violet de gentiane).**
 - ⇒ Chez les bactéries à **GRAM positif**, dont la paroi est pauvre en lipides, riche en peptidoglycane, ce dernier constitue une barrière **imperméable à l'alcool** et le **cytoplasme demeure alors coloré en violet**.
- ✓ **La fuchsine** est utilisée afin de pouvoir observer les bactéries à GRAM négatif qui sont devenues incolores.
 - ⇒ Les **GRAM négatifs** se recolorent en **rose**.
 - ⇒ Les **GRAM positifs** gardent leur couleur **violette**.

3.2. Mode opératoire

Sur le frottis fixé et refroidi :

- Faire couler la solution de **Violet de Gentiane** sur la lame jusqu'à ce que tout le frottis soit recouvert; laisser en contact **1 minute**.
- Jeter le colorant et finir de la chasser par la solution de **Lugol**; laisser le agir environ **1 minute**.
- Jeter le Lugol et faire couler **l'alcool** goutte à goutte pendant **10 secondes sur la lame inclinée**;
- Rincer immédiatement à l'eau (ne pas diriger le jet d'eau directement sur le frottis).
- Recouvrir la préparation de la **Fuchsine** (ou Safranine), laisser agir **1 minute**.
- Rincer abondamment la lame à l'eau distillée, ou à l'eau du robinet jusqu'à élimination du colorant en excès.
- Sécher la lame au dessus de la flamme d'un bec Bunsen, ou la sécher délicatement entre deux feuilles de papier filtre fin (ou buvard), sans frotter.
- Examiner au microscope en utilisant l'objectif à immersion (x100).

Résultats

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

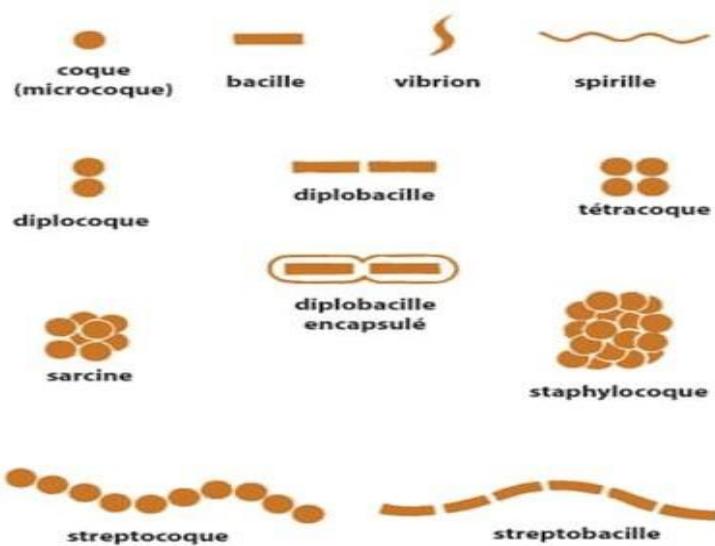
- Des bactéries colorées en violet foncé ; elles ont gardé le violet, sont dites '**GRAM positif**' ;
- Des bactéries colorées en rose ; elles ont perdu le violet, sont dites '**GRAM négatif**'.

Cette coloration permet AUSSI l'étude de la morphologie et le mode de regroupement des bactéries.

- Consignez vos observations dans ce tableau :

	Résultats obtenus après observation microscopique à immersion (x100)		
	Dessin de la forme	Mode de regroupement	GRAM
<i>E.coli</i>			
<i>Staphylococcus</i>			
<i>Bacillus</i>			

Morphologies et modes de regroupement bactériens



TP 3. Microbiologie : Les Milieux de Culture

1- Définition

Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle des micro-organismes peuvent se multiplier. Il doit satisfaire les exigences nutritives du micro-organisme étudié :

- couvrir les besoins en minéraux, en facteurs de croissance, apporter la source de carbone et d'énergie ;
- présenter un pH voisin du pH optimal de croissance du micro-organisme ;

2- Les différents types de milieux

Il existe une grande variété de milieux de culture en relation avec la diversité des exigences nutritives des micro-organismes.

On distingue :

- **Les milieux synthétiques** : de composition connue. Ils sont utilisés dans la plupart des cas pour l'étude les bactéries autotrophes ou les besoins nutritifs d'un micro-organisme. Ils sont rarement utilisés en routine à l'exception de quelques milieux tels : Citrate de Simons, Citrate de Christensen, Urée-Tryptophane...

- **Les milieux empiriques** : de composition connue seulement avec approximation car dépendant des matières premières utilisées : extrait de viande ou de levure, peptones, sucres et éventuellement liquides biologiques (sérum, sang...) mais qui conviennent aux micro-organismes étudiés. Ce sont les milieux les plus employés de nos jours comme : LB, Columbia, Gassner, Trypticase soja, Chocolat, ...

Une autre distinction de milieux se fait selon leurs consistances. En effet, les micro-organismes se développent parfaitement dans les **milieux liquides** mais l'isolement des bactéries nécessite des **milieux solides** afin de séparer les différents germes présents dans un prélèvement.

On obtient les **milieux solides** en ajoutant un agent gélifiant à un milieu liquide. Le gélifiant le plus utilisé est l'agar-agar: il s'agit d'un polygalactoside sulfaté présentant la propriété de former avec l'eau un gel solide à une température inférieure à environ 60 °C tout en étant liquéfiable par ébullition, auquel cas, il reste en surfusion (liquide) jusqu'aux environs de 45°C. D'autre part, très peu de micro-organismes sont capables d'hydrolyser l'agar. Il s'agit donc du procédé le plus utilisé pour fabriquer des milieux solides, l'addition de diverses autres molécules ne posant aucun problème particulier dans ce milieu aqueux. Les milieux solides destinés à être coulés en boîte de Pétri ou en tube ont une teneur moyenne en gélose assez élevée (15 g/L) tandis que les géloses molles ou semi-solides sont peu gélosées (3 à 5 g/L) et présentent une consistance intermédiaire.

3- Description de quelques milieux

3-1 Les milieux non sélectifs

On regroupe sous ce vocable tous les milieux ne contenant aucune molécule inhibitrice. Ils sont en général de préparation assez simple et généralement peu coûteux. Ces milieux contiennent une base nutritive constituée de molécules azotées (acides aminés, facteurs de croissance diverses...) provenant de l'hydrolyse de produit d'origine vivante (animale, végétale, mycélienne) comme les peptones, les extraits de viande ou de levure.

Souvent, les milieux non sélectifs comportent une molécule et son système de révélation (sucre le plus souvent) ce qui permet une première discrimination des genres mais ce n'est pas obligatoire.

Exemple : La gélose Mueller-Hinton

Infusion de viande de bœuf 300 ml/L

Peptone de caséine 17.5 g/L

Amidon de maïs 1.5 g/L

Agar 17 g/L

Ce milieu riche est la gélose de référence pour la réalisation d'antibiogramme selon la méthode de Kirby-Bauer. Sa composition (notamment la concentration en magnésium, en calcium, en thymine et en thymidine), son épaisseur sont standardisées (norme standards M6-P du NCCLS). Il permet la croissance de nombreux micro-organismes.

3-2 Les milieux non sélectifs enrichis

Ils sont obtenus en incorporant à un milieu de base adéquat des liquides ou suspensions riches en molécules organiques diverses : du sang, du sérum, du liquide d'ascite, de l'extrait globulaire, des suppléments polyvitaminiques... Les qualités nutritives peuvent être améliorées par dénaturation thermique des constituants, en particulier pour le sang. Ils permettent la croissance de nombreux germes exigeants ou très exigeants. Les plus utilisées sont les géloses au sang frais ou au sang cuit, et la gélose chocolat.

Exemple : Les géloses au sang frais et chocolat

L'addition de sang au milieu de base peut avoir plusieurs buts :

- apporter des facteurs de croissance nécessaire au micro-organisme étudié
- neutraliser certains inhibiteurs contenus dans les peptones des milieux
- neutraliser, du fait de l'action peroxydase et catalasique de l'hémoglobine, des ions superoxydes ou des peroxydes toxiques produits par le micro-organisme (intéressant en particulier pour les bactéries catalase négative comme les Streptococcaceae)

Par ailleurs, il permet la lecture d'un caractère important lors de la détermination du germe : l'hémolyse.

Le sang peut être d'origines diverses : cheval, mouton, lapin, homme, bœuf (attention

certains germes présentent un type d'hémolyse sur un sang et un autre type d'hémolyse avec un autre sang). Il est à ajouter à raison de 5 à 10% au milieu de base (Columbia, Tryptycase soja, Mueller Hinton, cœur cervelle). Celui-ci ne doit pas contenir de glucose, car il inhibe les hémolysines.

3-3 Les milieux sélectifs

Les milieux sélectifs sont des milieux empêchant la culture de certains micro-organismes. Ils sont utilisés pour l'isolement bactérien dans des produits polymicrobiens. La sélection peut être chimique ou antibiotique. Ce sont des milieux riches ou non et donnant souvent un ou plusieurs caractères biochimiques permettant une identification plus simple des germes.

La gélose Gassner

La gélose de Gassner est une gélose sélective des germes Gram négatifs non exigeants (Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pseudomonaceae, Alcaligenaceae) Son activité sélective est due au Jaune métachrome. Par ailleurs, il contient du lactose et du Bleu à l'eau (indicateur pH) qui permettent de différencier les germes LACTOSE + (bleu) des germes LACTOSE - (jaune).

Il existe de nombreux milieux ayant le même pouvoir sélectif que la Gélose de Gassner. Certain utilisent les même indicateurs. On peut citer la gélose rouge neutre/vert brillant, la gélose MacConkey, le milieu de Lévine ect.....

3-4 Les milieux d'enrichissement

La présence de certaines bactéries à pouvoir pathogène spécifique dans un prélèvement, a une signification pathologique indiscutable, même si elles sont peu représentées. C'est le cas par exemple des *Salmonella*, des biotypes entéropathogènes, de *Yersinia enterocolitica*, des vibrions cholériques ou encore des *Listeria* ou des *Enterocoques*. Quelques fois, leur proportion peut être minime par rapport à celle de la flore commensale et leur présence ne peut être révélée par un isolement (sélectif). L'absence de colonies suspectes sur l'isolement sélectif ne suffit pas pour affirmer l'absence de ces bactéries dans le prélèvement. C'est pourquoi un enrichissement est mis en route en même temps que l'isolement (sélectif).

Enrichir, c'est augmenter la représentation (proportion) d'un sous-groupe de micro-organismes dans un ensemble plus vaste.

Un milieu d'enrichissement réunit deux caractéristiques :

- Il contient des molécules à action sélective inhibant totalement ou partiellement la culture des micro-organismes non recherchés ou utilise une température d'incubation particulière, ou encore une atmosphère particulière ;
- il est liquide (bouillon) afin que son action sélective s'exerce sur une population importante et homogène.

Mode opératoire

Matériels :

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

Produits :

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

Protocole :

- Pesar 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 boites de pétri et des tubes à vis stériles

TP 4. Techniques d'ensemencement

Lors d'un examen bactériologique, la mise en culture est toujours nécessaire. En effet, bien souvent les micro-organismes, 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.

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. Cultures en milieux liquides

1.1. Culture à partir d'un prélèvement liquide : (manipulation)

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

1.2. Culture à partir d'un prélèvement en milieu solide

Après avoir chargé l'oese de semence, elle est introduite dans le tube à ensemencer, amenée juste au contact du liquide ; gratter l'anse sur 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.

2. Culture en milieux solides

2.1. Culture en tubes

- Milieux solidifiés inclinés : (manipulation)

Ensemencement en stries transversales :

A partir de 0.5 – 1 cm du bas de la pente, décrire avec l'oese chargée de semence des stries parallèles et serrées sur la gélose sans l'érailler. Sans stériliser l'oese, 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: (manipulation)

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

2.2. Cultures en boite 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 boite est ensuite incubée 24-48h à 37°C.

- Ensemencement par la méthode des quadrants: (manipulation)

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 boite, faire tourner la boite d'un quart de tour et ensemencer par des stries perpendiculaires aux premières stries; après un autre quart de tour de la boite, ensemencer le dernier quadrant.

Les boites 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 boites (ensemencement en nappe, par piqûre, en masse, par touche,...).

D'autres techniques d'ensemencement permettent de visualiser les colonies qui seront ensuite dénombrées

-Ensemencement par étalement ou en surface

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

- Ensemencement par incorporation

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