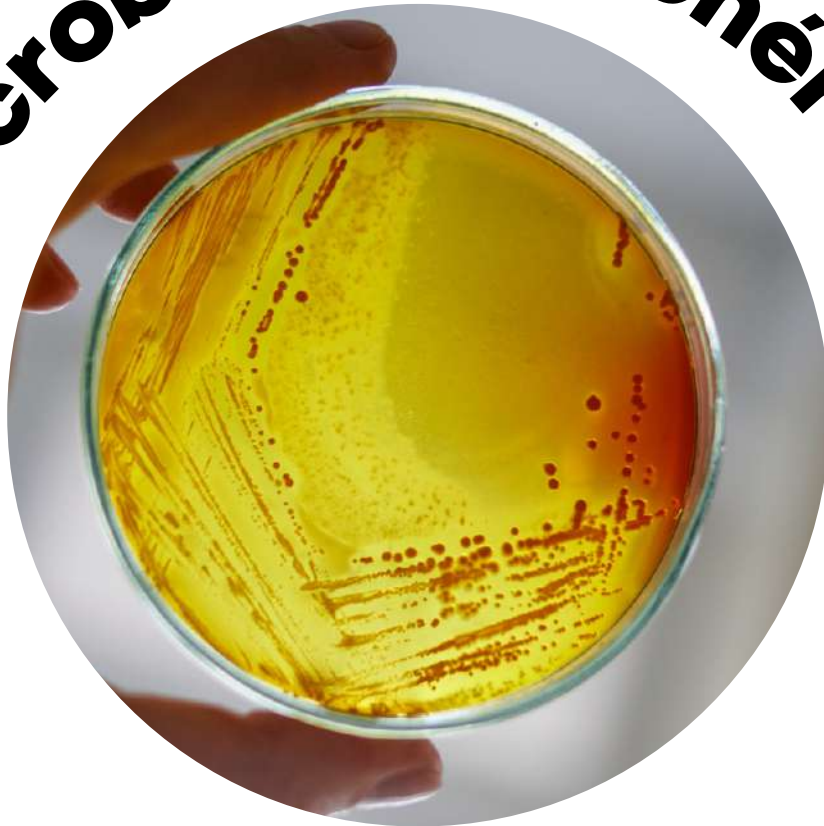


Microbiologie Générale



SCIENCES DE LA
VIE



Shop



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



Etudier



Visiter [Biologie Maroc](#) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



Emploi



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE

Milieux de culture



Milieux de culture

- Préparation nutritive destinée à la croissance de microorganismes en laboratoire
- Peuvent être liquides ou solides
- Milieux synthétiques
- Milieux complexes

Milieu solide

- Milieu liquide auquel on ajoute un agent de solidification tel que l'agar-agar
- L'agar-agar est un polysaccharide extrait d'une algue marine.
- C'est un gel qui est à l'état solide à une T° de moins de 60°C et qui se liquéfie à 100°C.
- Permet donc l'incubation à des T° élevées.
- N'est pas une source nutritive pour les bactéries
- Permet d'obtenir des colonies isolées

Milieux synthétiques

- Milieu qui doit fournir une source d'énergie et des éléments tels que le carbone, l'azote, le soufre, le phosphore et des facteurs de croissance.
- La composition chimique de ce milieu est connue.

Milieux complexes

Aussi appelés milieux empiriques.

Contiennent des ingrédients dont la composition chimique est indéterminée.

Ingrédients des milieux complexes

- Extrait de levure (source de vitamine B)
- Extrait de viande (vitamines et facteurs de croissance)
- Peptones (source d'azote)
- Sang (élément nutritif +observation des propriétés hémolytiques de certaines bactéries)
- NaCl : isotonie
- Phosphates: tampon
- Eau : hydratation du milieu.

Ingrédients (suite)

Indicateurs de pH

- indiquent une activité enzymatique qui produit un métabolite acide ou alcalin

	pH	Acide	Alcalin
Rouge de phénol	6.8 à 8.3	jaune	rouge
Rouge de méthyl	4.2 à 6.3	rouge	jaune
Bromothymol bleu	6.0 à 7.6	jaune	bleu
Bromocrésol pourpre	5.6 à 6.8	jaune	pourpre

Milieux enrichis

- Contiennent des substances organiques complexes (sang, infusions, extraits de levure).
- Permettent la croissance des bactéries plus exigeantes.
Ex : gélose au sang

Gélose sang (composition)

- Infusion de cœur de bœuf
- Peptone
- NaCl
- Agar
- Sang défibriné de mouton ou de cheval de 5 à 10%
- Utilité: visualiser l'hémolyse



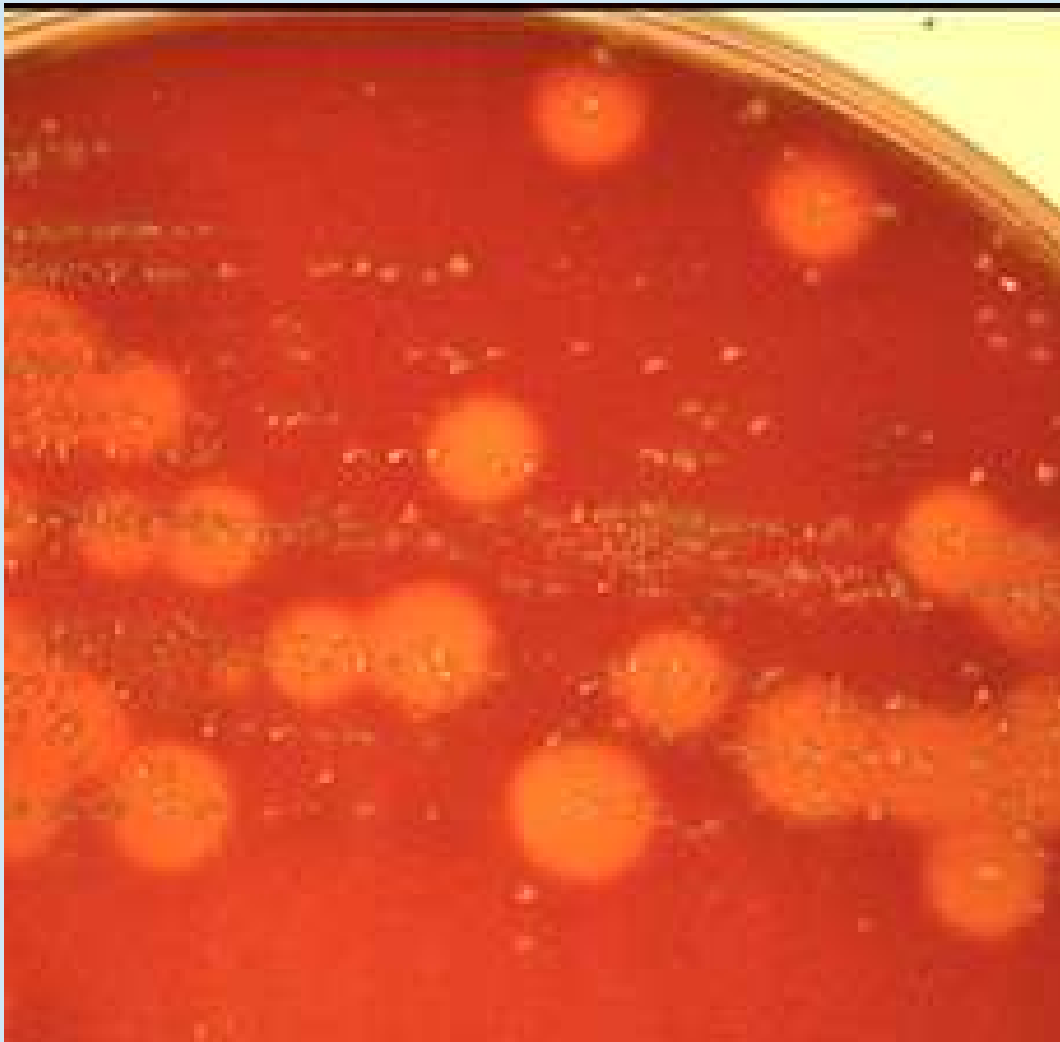
Types d'hémolyse

- Alpha (α) : hémolyse incomplète (partielle)
- Zone verdâtre autour de la colonie



Types d'hémolyse

- Bêta (β) : hémolyse complète (complète)
- Zone transparente autour de la colonie



Types d'hémolyse

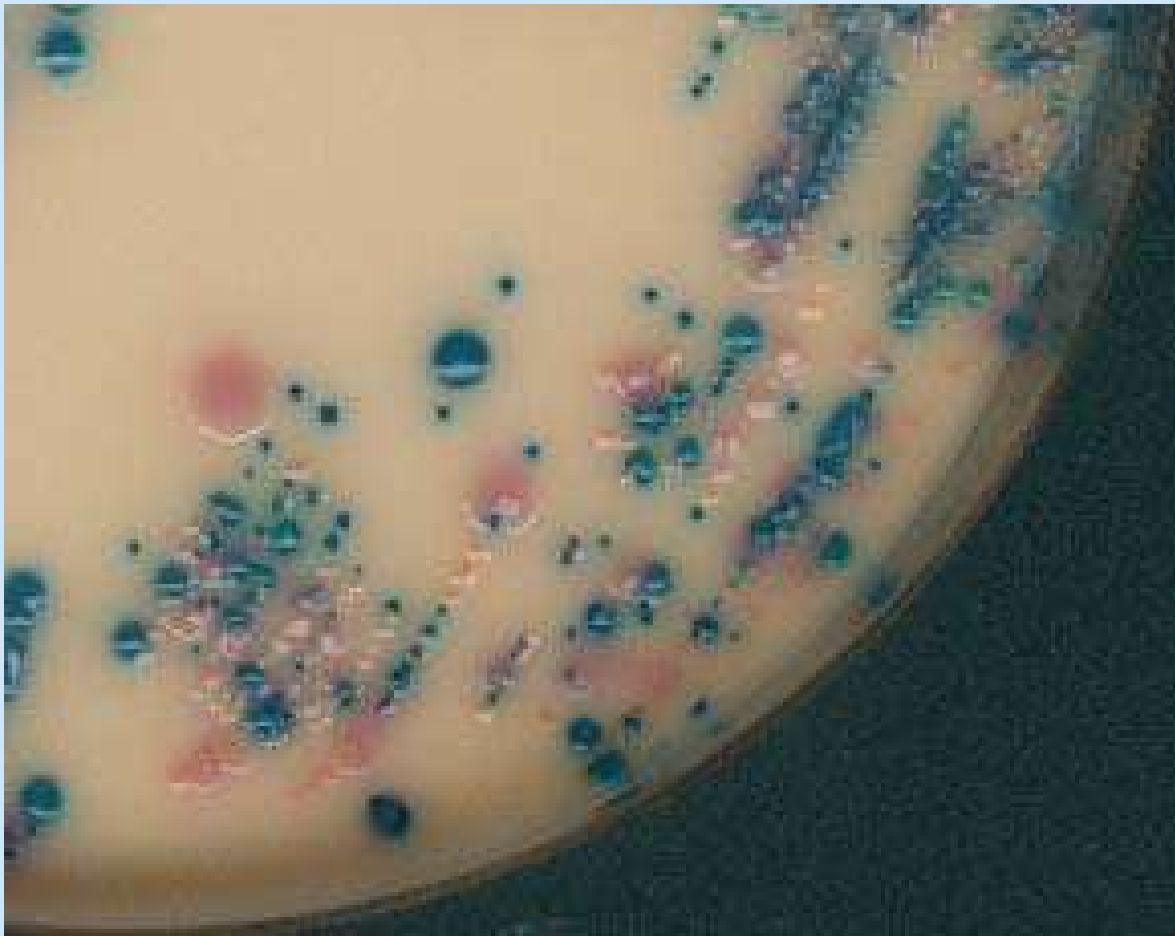
- Alpha prime (α') : double hémolyse
 - hémolyse α tout près de la colonie
 - hémolyse β qui entoure l'hémolyse α
- Gamma (γ) : absence d'hémolyse

Milieu sélectif

- Inhibe la croissance des bactéries indésirables et stimule celle des microbes recherchés
- Contiennent des agents inhibiteurs (Ab, sel, colorant)
Ex : cristal violet et sels biliaires dans la gélose MacConkey

Milieu différentiel

- Facilite la distinction entre les colonies de la bactérie recherchée et les autres colonies présentes sur le même milieu.



Milieux sélectif-différentiel

Possède les caractéristiques des milieux sélectifs et différentiels

Ex : MacConkey

mannitol salt

Gélose MacConkey composition

- Peptones
- Lactose (sucre) : élément différentiel
- Sels biliaires et cristal violet : éléments sélectifs
- NaCl
- Agar
- Rouge neutre: indicateur de pH
- Utilité: isolement et distinction des bactéries Gram (-)



Gélose Mannitol salt Composition



- Extrait de boeuf
- Peptones
- NaCL 7.5% : élément sélectif
- Mannitol: élément différentiel
- Rouge de phénol: indicateur de pH
- Utilité: isolement des bactéries halophiles comme les Staphylocoques.



Milieux d'enrichissement

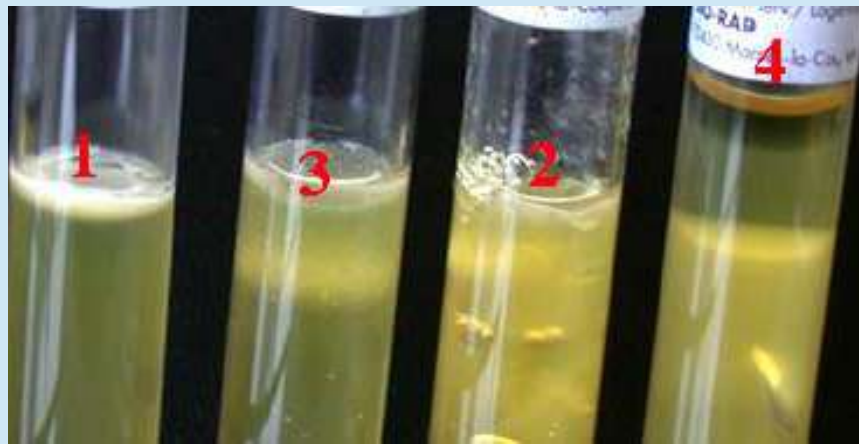
- Milieu liquide
- Donne des conditions favorables à la croissance d'un seul microbe donné ce qui en favorise la multiplication

Ex : milieu sélénite utilisé dans les spécimens de selles pour favoriser la croissance des salmonelles et des shigelles au détriment des autres bactéries présentes.

Milieux de transport

- Utilisés pour assurer la survie des microorganismes fragiles présents dans les spécimens cliniques pendant leur transport
- Milieux pauvres en nutriments.
Ex : Stuart-Amies

Milieux et méthodes de culture des anaérobies



- On doit utiliser un milieu réducteur tel que le thioglycollate de sodium.



- Lorsqu'on a des boîtes de Petri, on utilise une jarre pour placer les bactéries en atmosphère anaérobie.

Jarre anaérobie

Figure 32.4 Procédés permettant la culture des microorganismes anaérobies



Photographie : Becton-Dickinson.

- 2 générateurs :
 - borohydrure de sodium (H_2)
 - bicarbonate de sodium (CO_2)
- Catalyseur : chlorure de palladium
- Indicateur : bleu de méthylène
- Composition finale de l'air ambiant :
 - 10% H_2
 - 5% CO_2
 - 85% N_2

Méthode de culture en CO₂



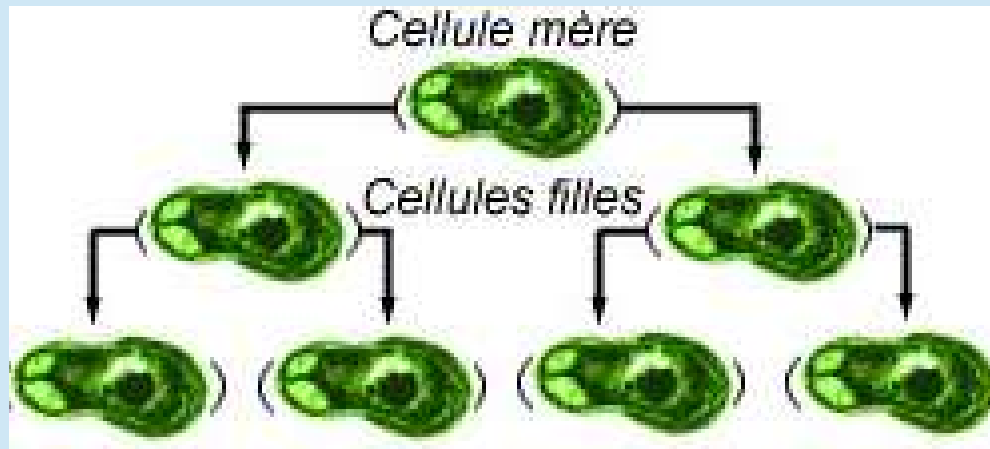
- Utilisée pour la culture des bactéries aérobies nécessitant une concentration de CO₂ plus élevée que celle de l'atmosphère(bactéries capnophiles).
- On peut les cultiver soit en étuve, en jarre à chandelle ou par la méthode des sachets.
- Le but est d'obtenir des conditions semblables à celles du tube digestif ou du système respiratoire où se développent des bactéries pathogènes.

Méthode de culture en CO₂

- **Jarre à chandelle** : jarre étanche avec une chandelle allumée qui consomme l'O₂.
- La chandelle s'éteint lorsqu'on atteint l'atmosphère CO₂.
- **Méthode du sachet**: acide citrique
bicarbonate de sodium

Concentration finale en CO₂ : 10%

Préparation d'une culture pure

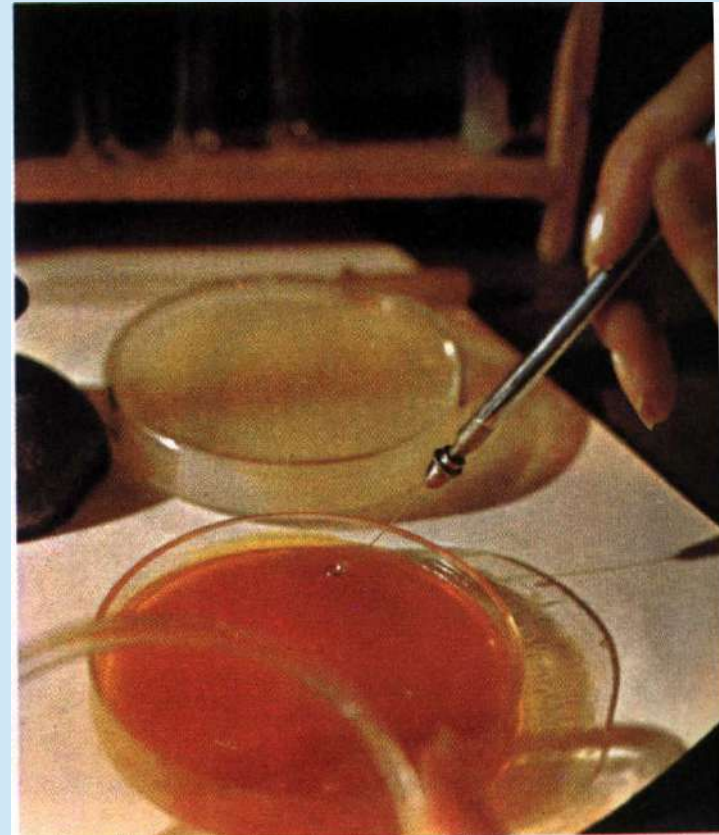
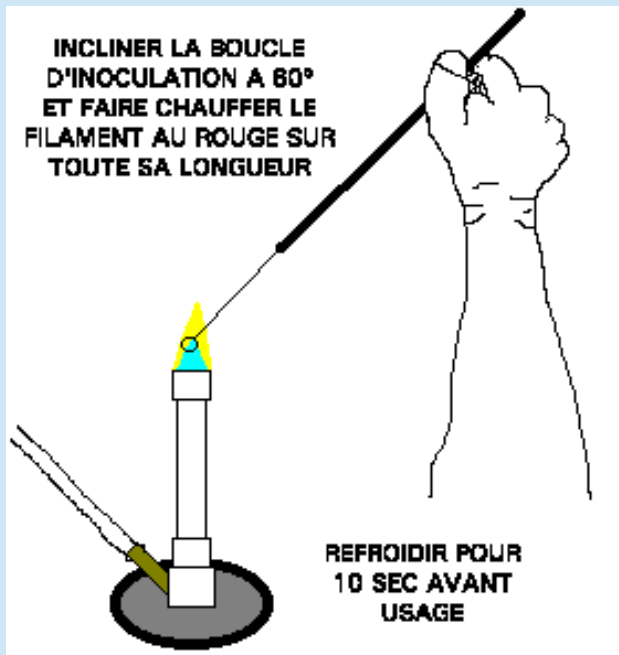


- But : obtention de colonies isolées
- Colonie : masse visible à l'œil nu de bactéries qui proviennent toutes d'une même cellule mère (clones)
- Technique la plus courante : méthode en stries

Outils du microbiologiste

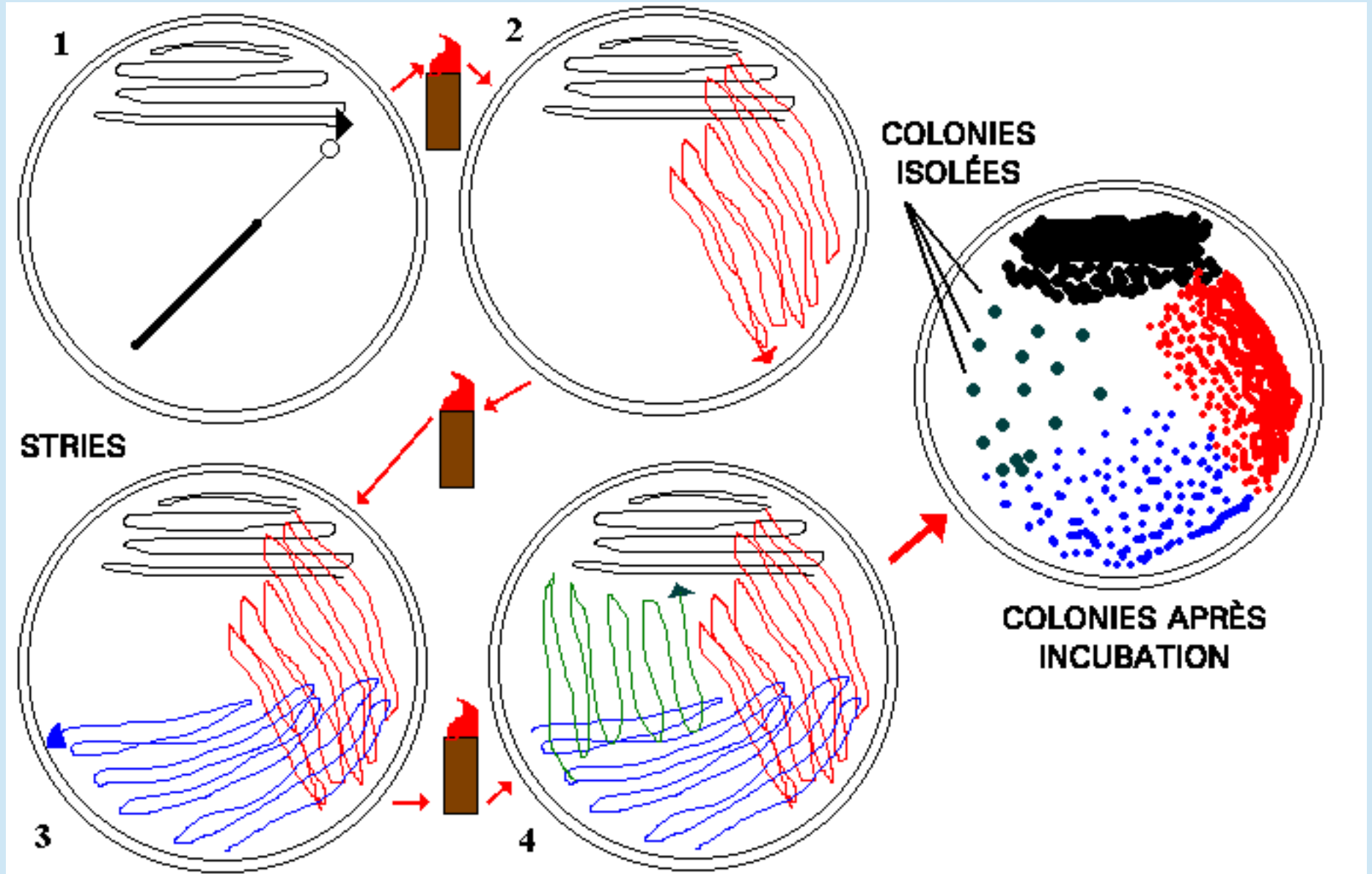


Méthode des stries





Technique des stries



Aspect des colonies (macroscopie)

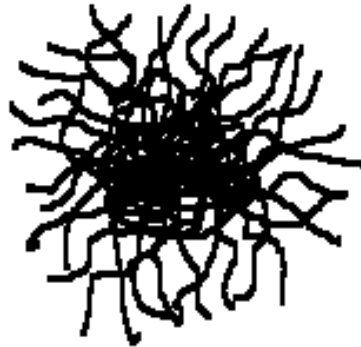
PLAN



CIRCULAIRE



IRRÉGULIÈRE



FILAMENTEUSE



RHIZOÏDE

ÉLÉVATION



CONVEXE



BOMBÉE



PLATE



BOSSUÉ



EN FORME DE CRATÈRE

BORD



RÉGULIER



ONDULÉ



FILAMENTEUX



BOUCLÉ



LOBÉ

Aspect des colonies

Gélose-sang



Gélose BHI



Conservation d'une culture bactérienne

- Réfrigération
- Surgélation
- Lyophilisation

Réfrigération

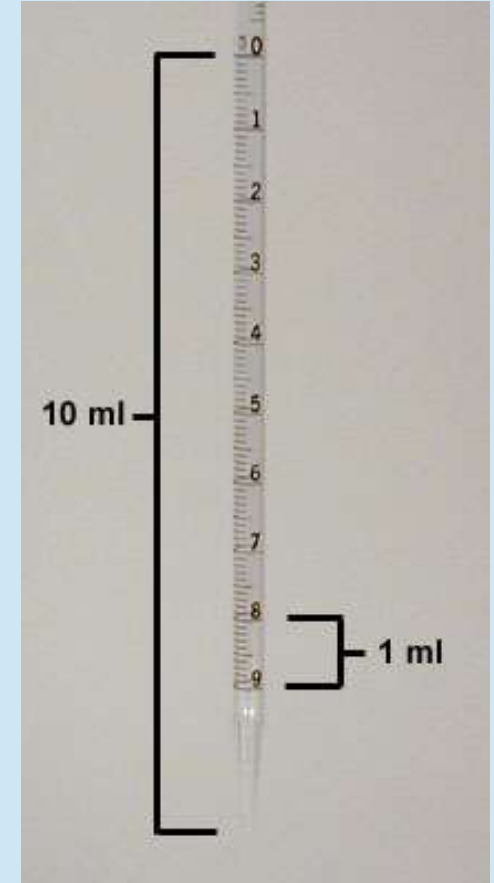
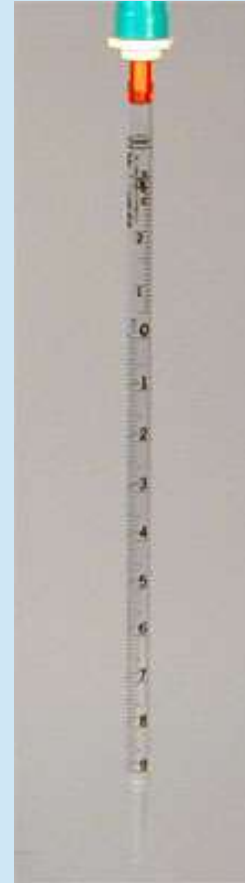
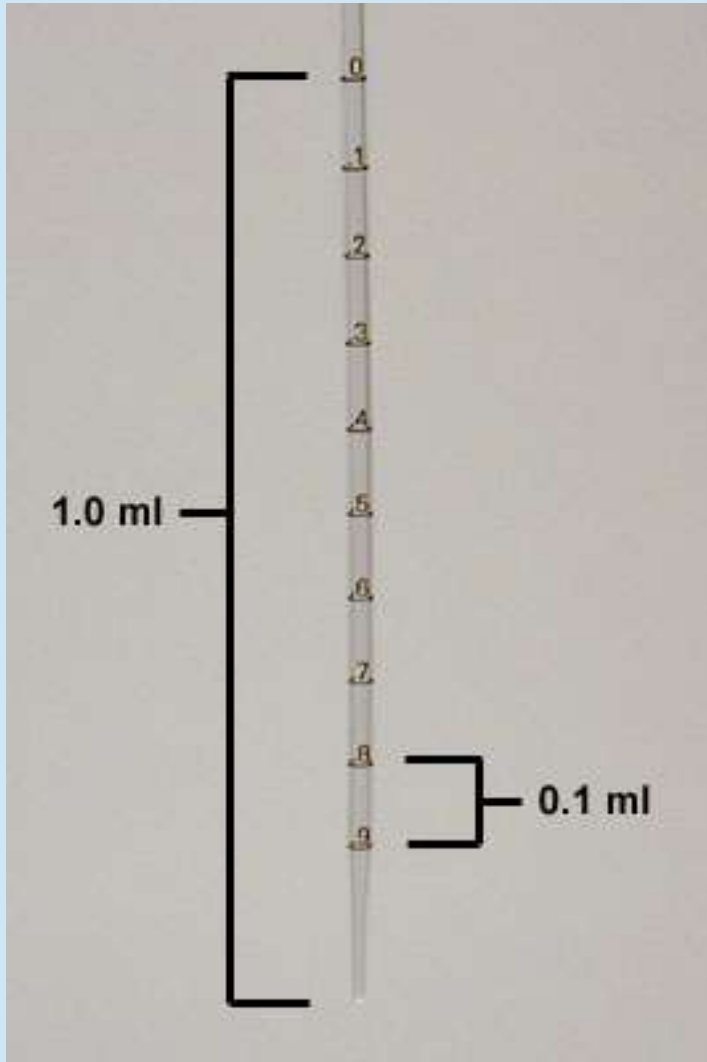
- Méthode qui permet de ralentir le métabolisme bactérien sans tuer les microorganismes.
- Permet de conserver des cultures bactériennes pendant un court laps de temps
- Conservation entre 4 et 7°C (frigo)

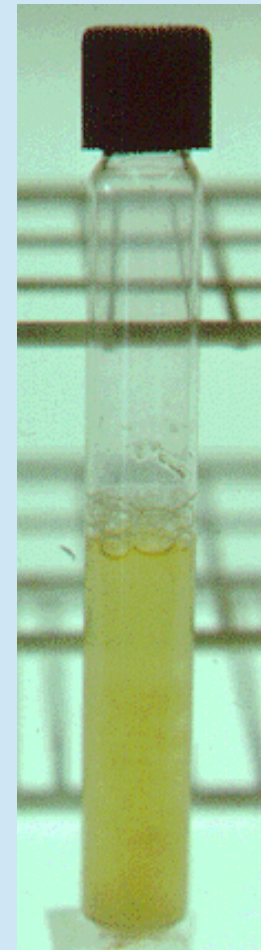
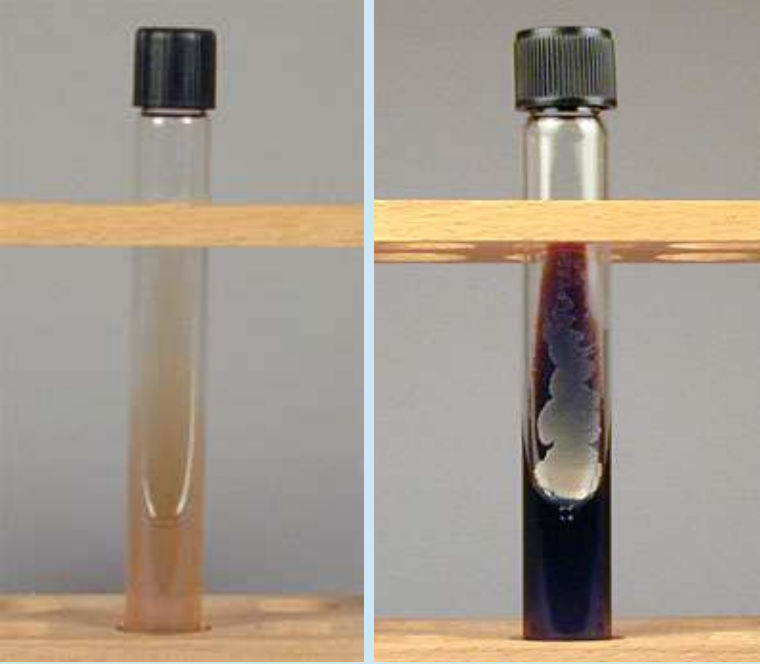
Congélation et surgélation

- Conservation pour une plus longue période
- Conservation des bactéries et des virus
- Culture microbienne pure dans un liquide en suspension
- Refroidir rapidement à des T° entre -50 et -95 $^{\circ}\text{C}$ (-18° C pour congélation).
- Aucune activité métabolique ; développement totalement bloqué mais la plupart des cellules restent vivantes.
- Permet de décongeler la culture et de la faire croître, même après plusieurs années.

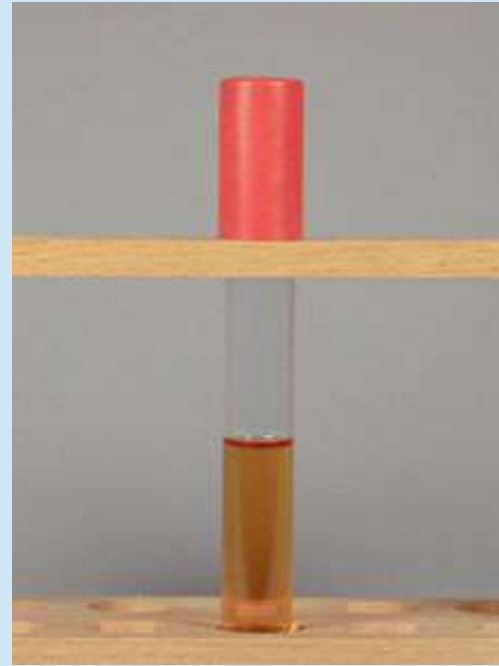
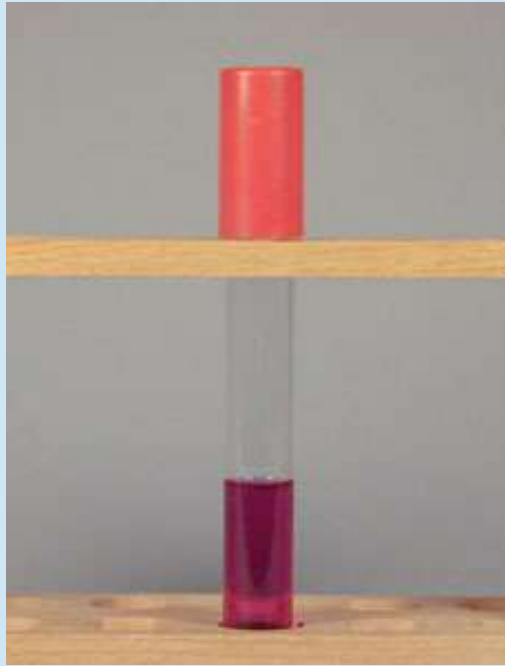
Lyophilisation ou cryodéshydratation

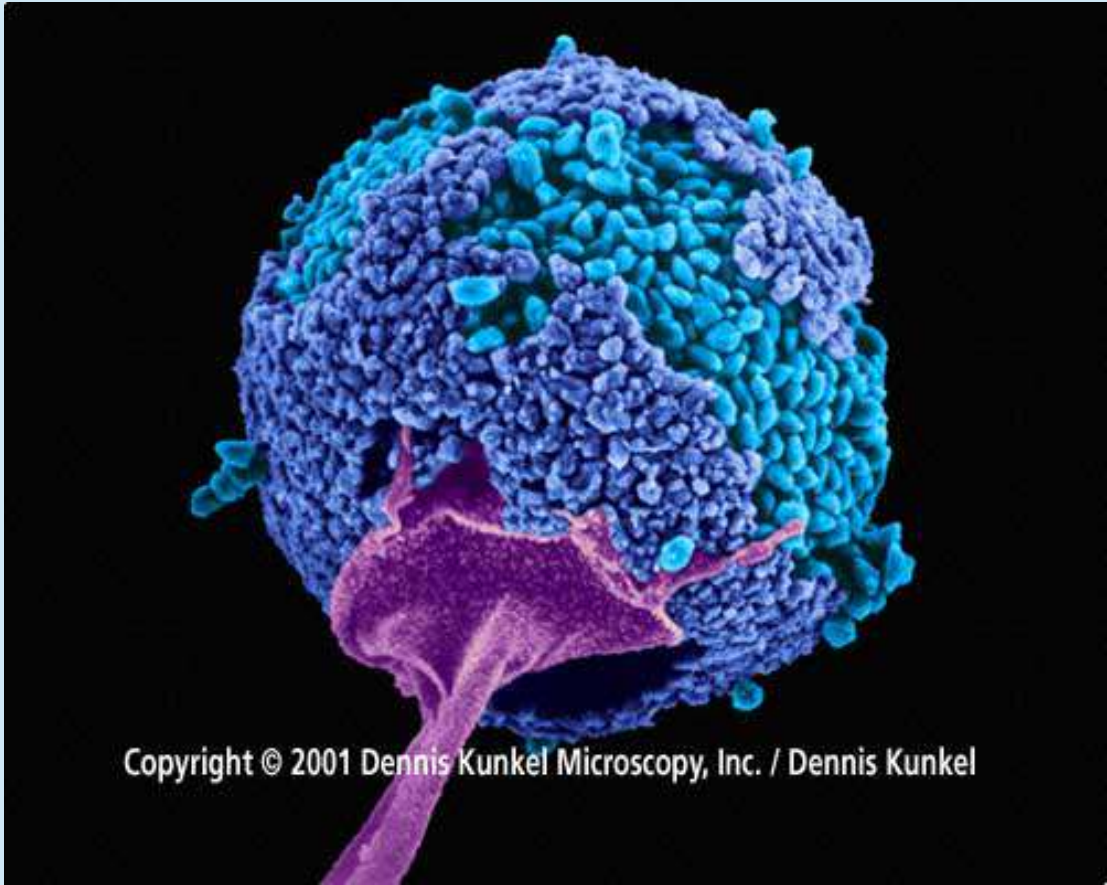
- Congélation rapide d'une suspension microbienne à des T° entre -54 et -72°C tout en éliminant l'eau par la création d'un vide ce qui donne une poudre.
- Récipient scellé sous vide.
- Les bactéries sont toujours vivantes mais dépourvues d'activité métabolique.
- Poudre peut être conservée pendant des années.
- Les bactéries peuvent être ranimées en tout temps par hydratation avec un milieu nutritif.



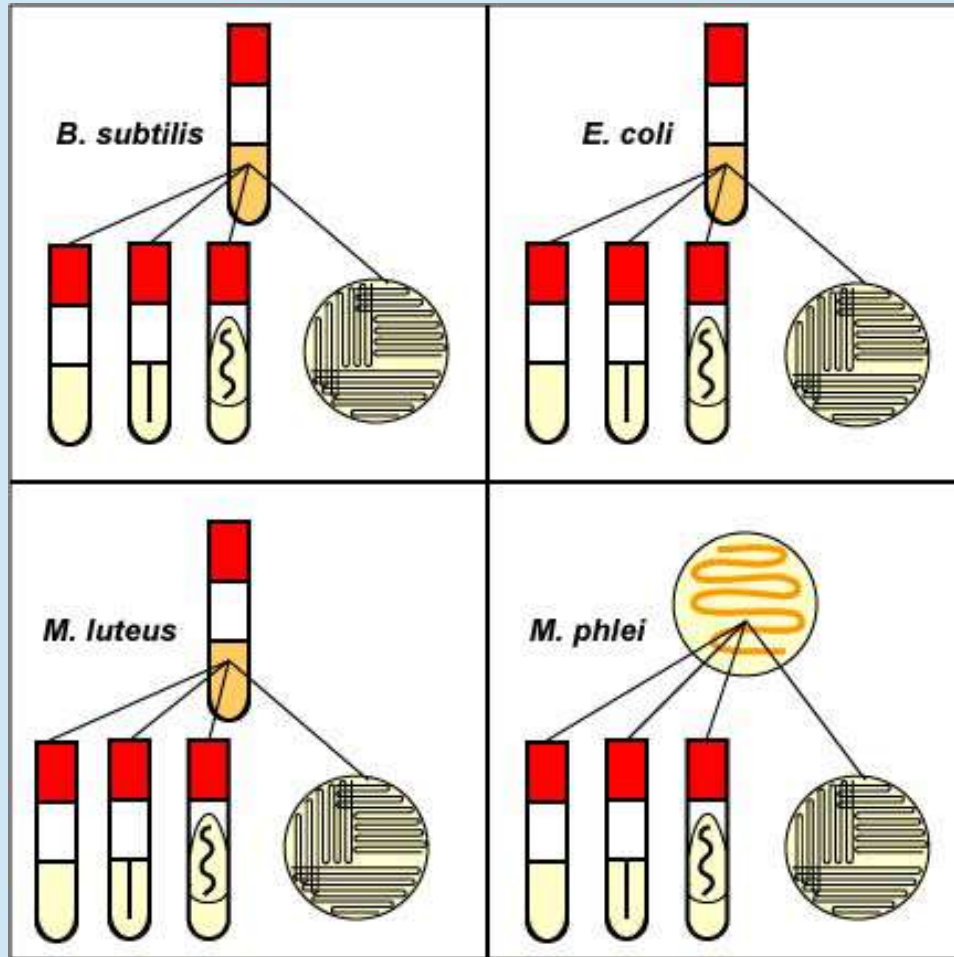


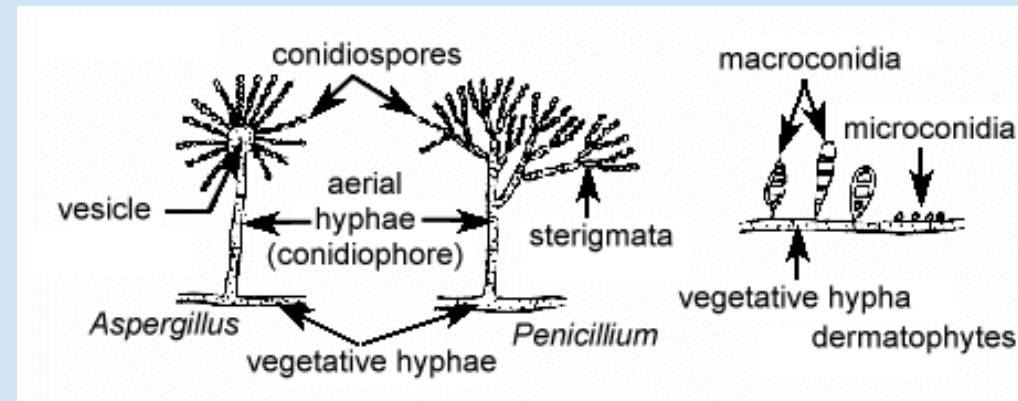
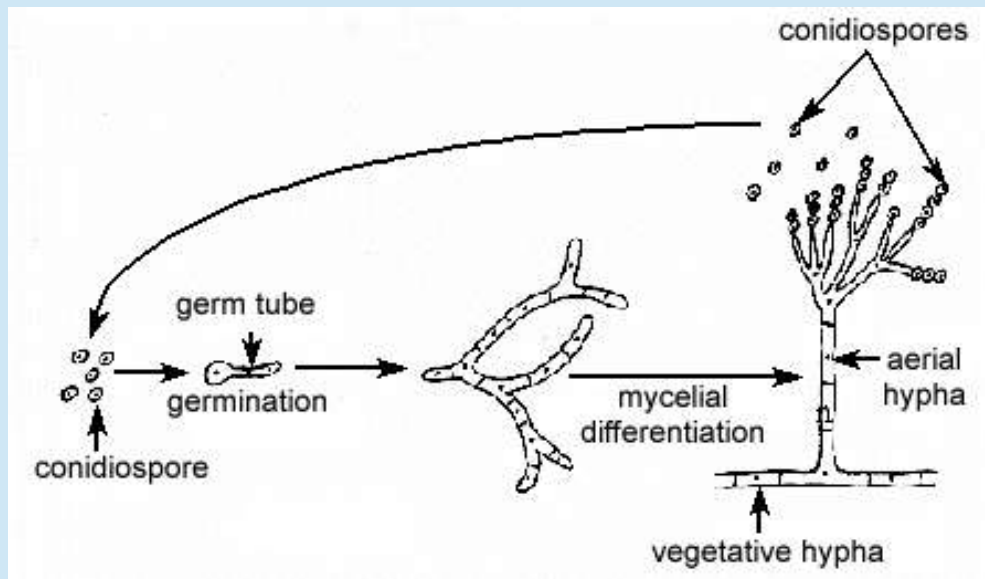
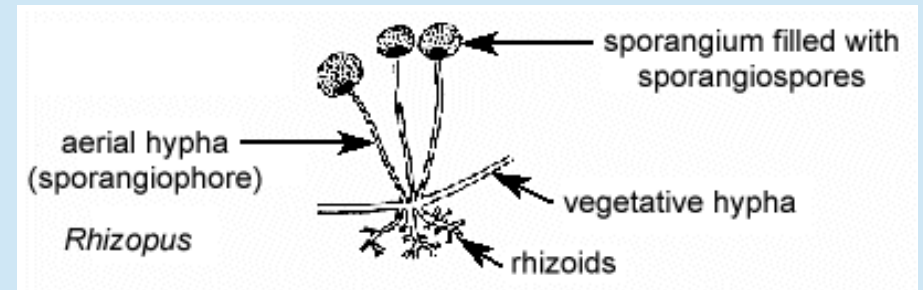
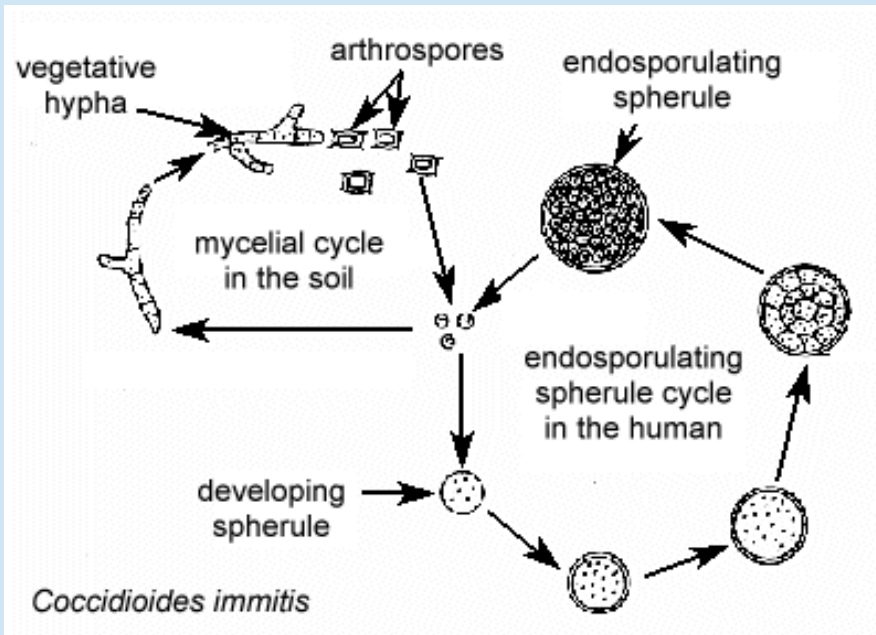
Clostridium en anaerobiose

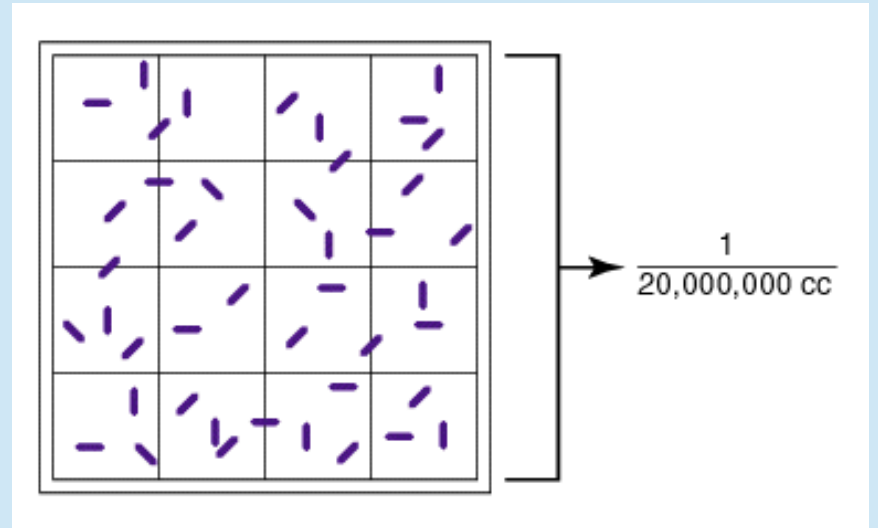
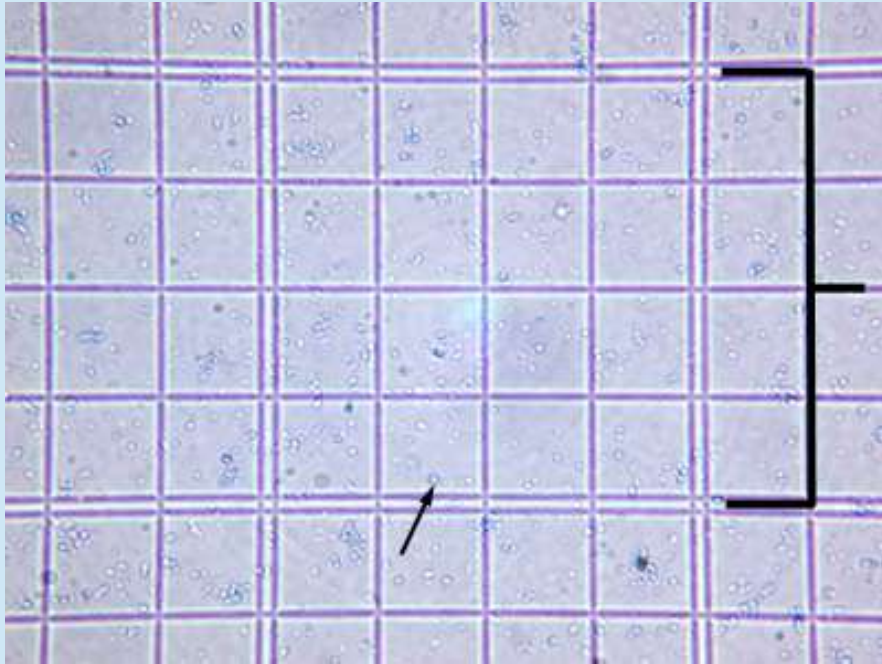


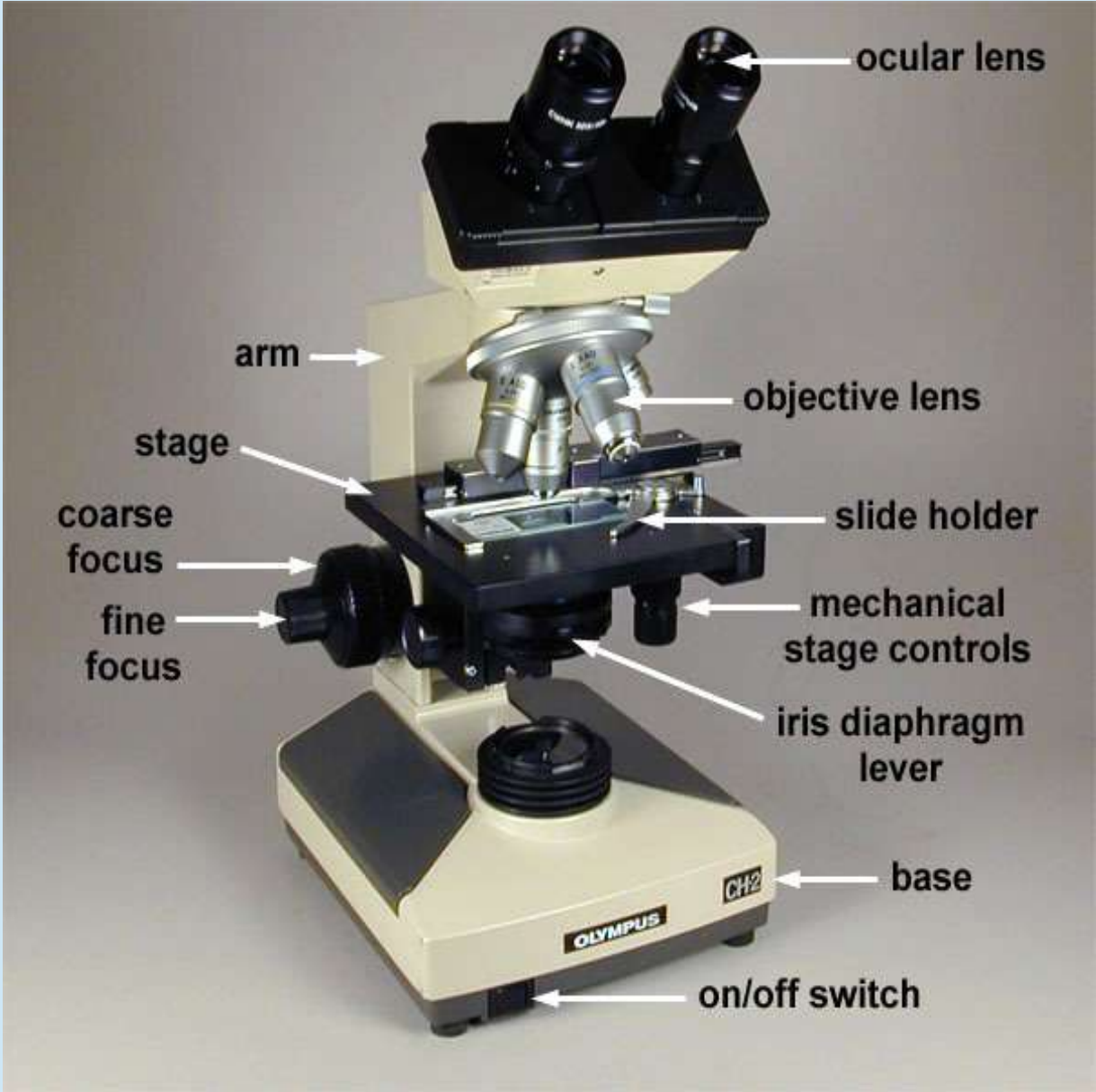


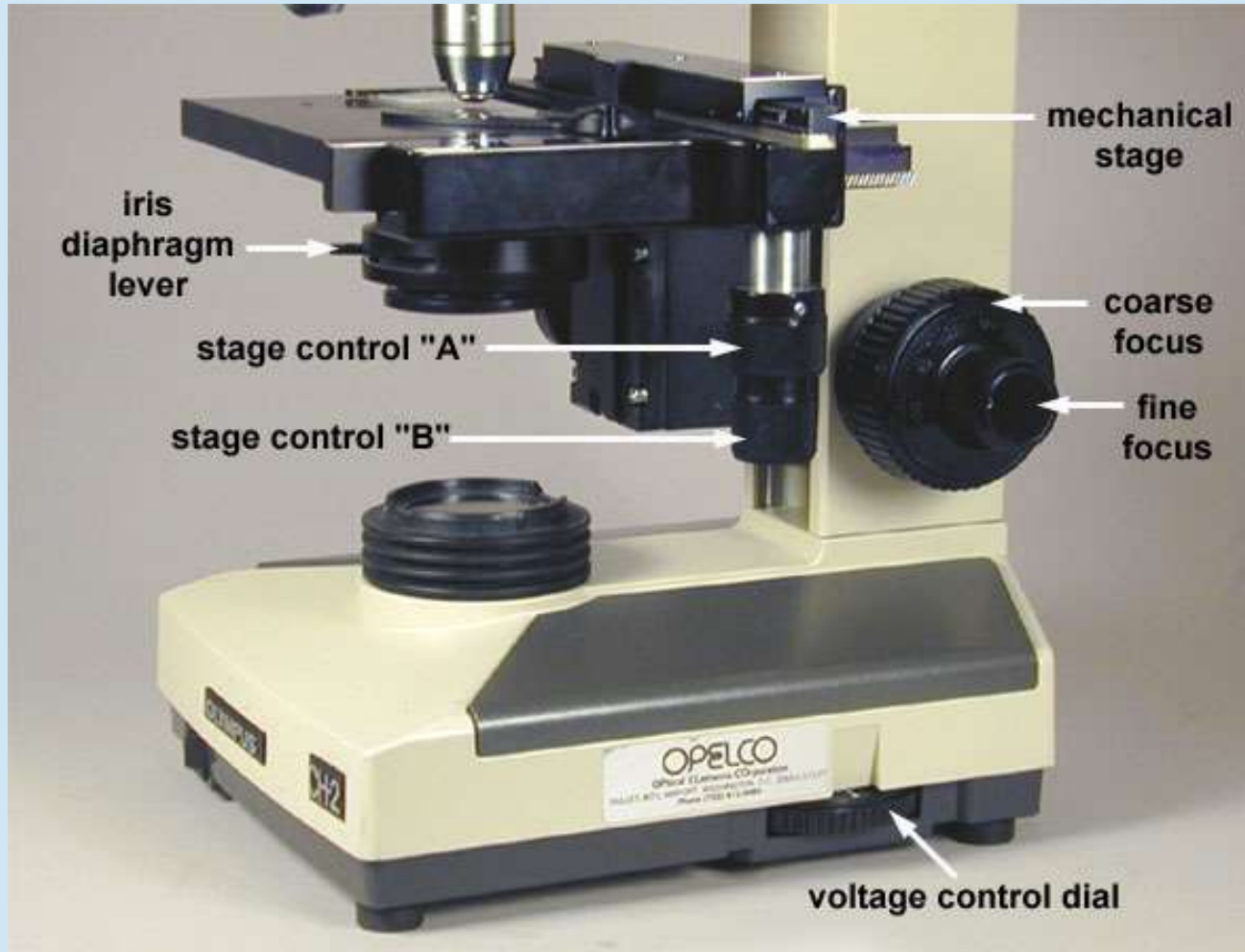
Copyright © 2001 Dennis Kunkel Microscopy, Inc. / Dennis Kunkel











iris diaphragm lever

stage control "A"

stage control "B"

mechanical stage

coarse focus

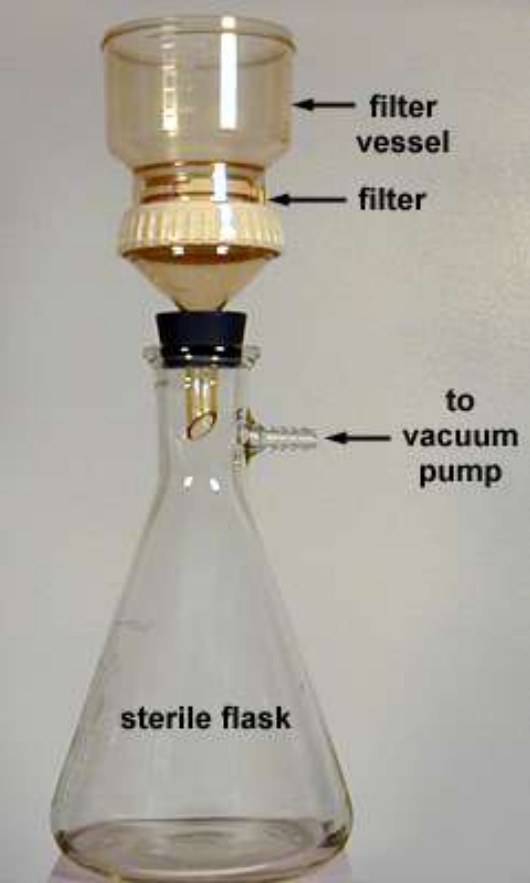
fine focus

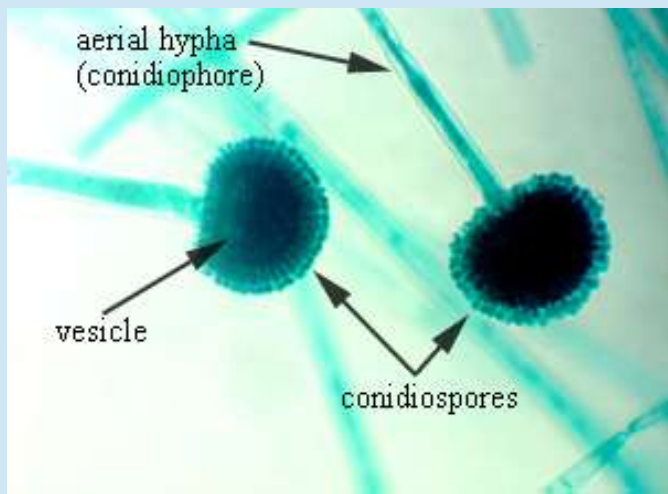
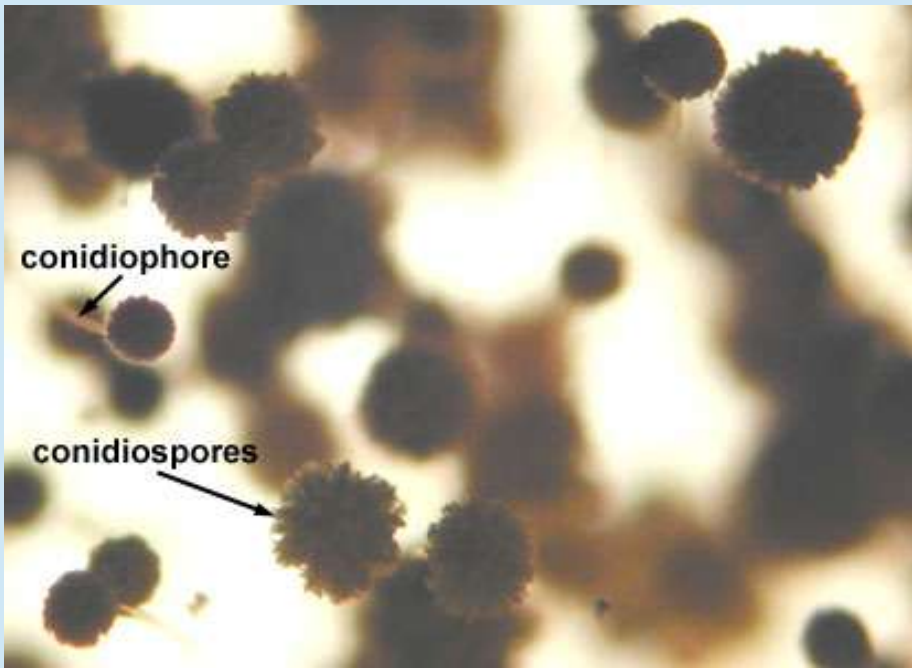
voltage control dial

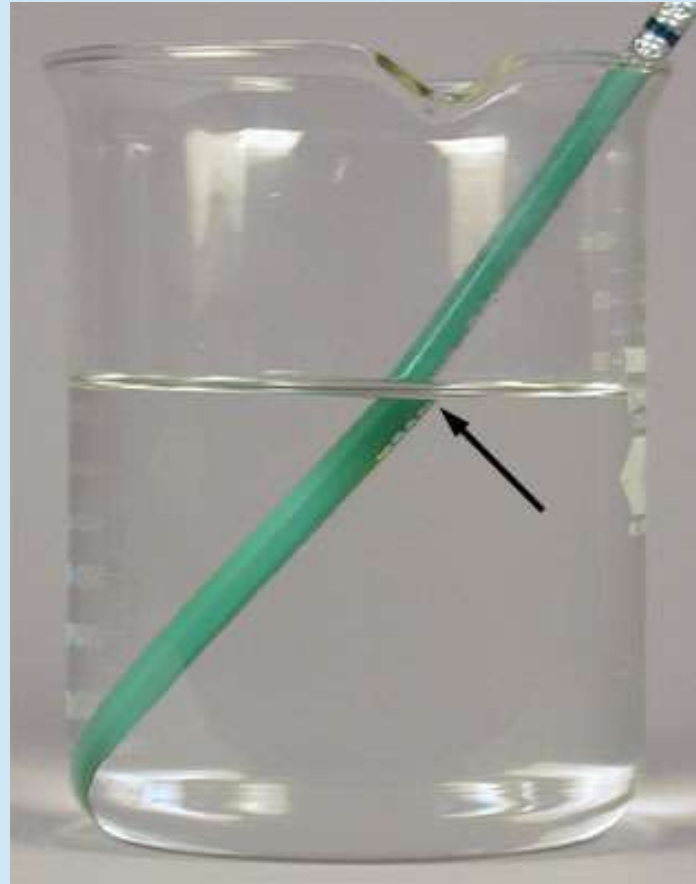
OPELCO
Oxford Instruments Corporation
11001 Rte. 108, Norwalk, Conn. 06854-0101
Phone (203) 833-0800

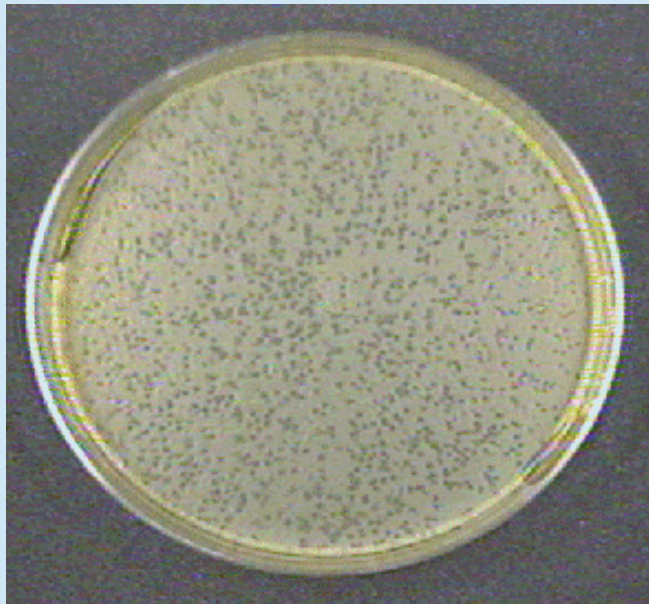


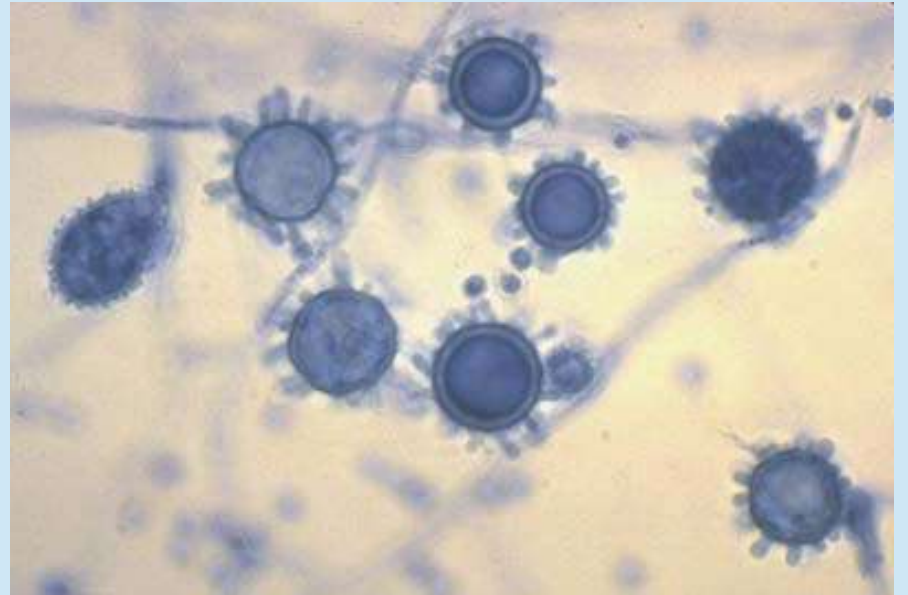
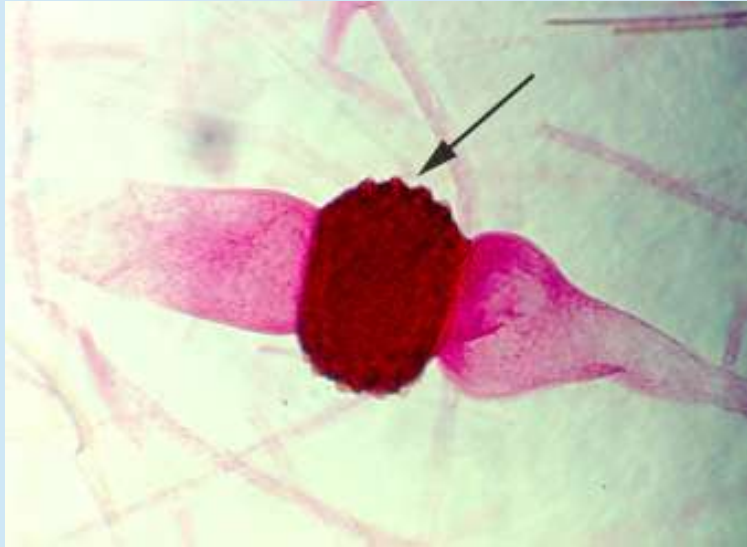


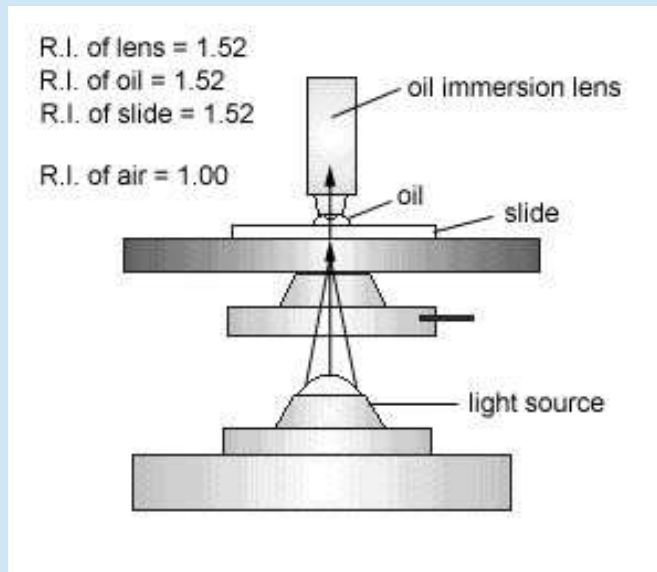
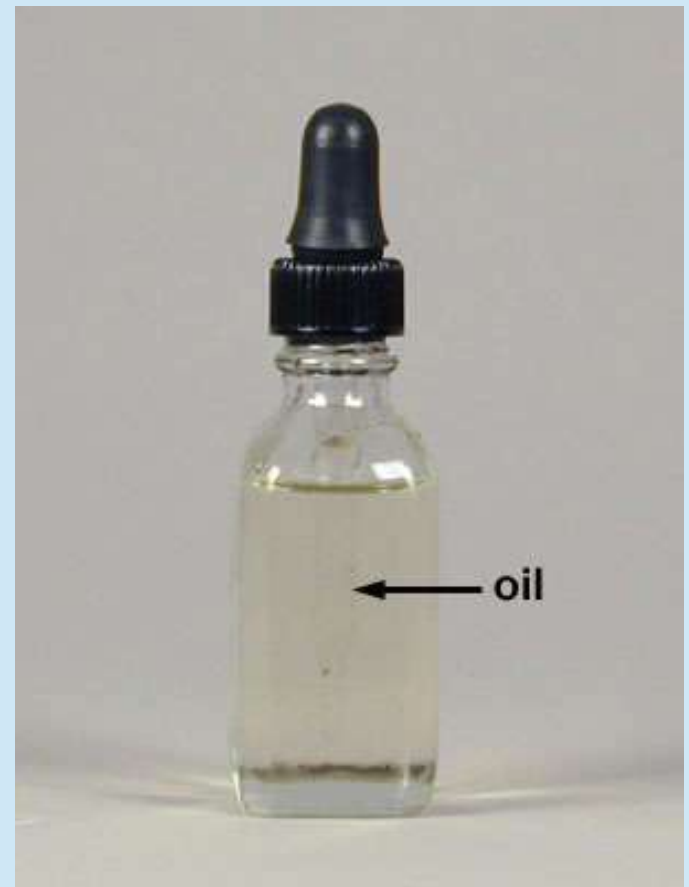
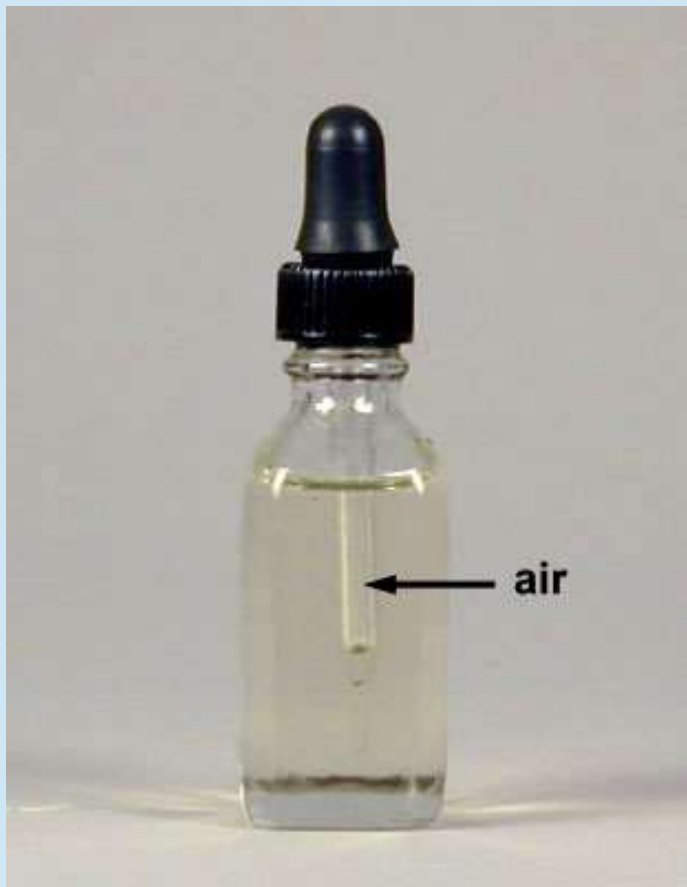




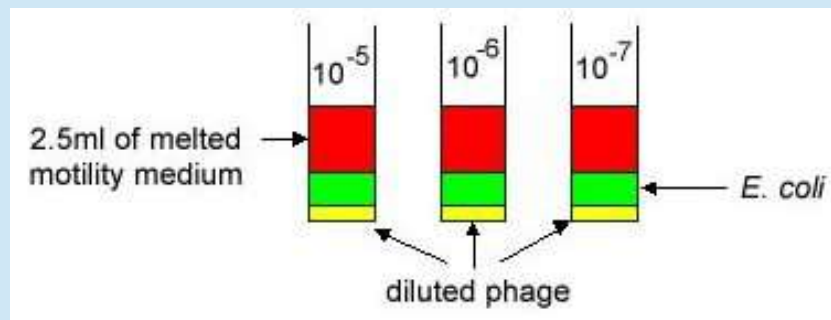
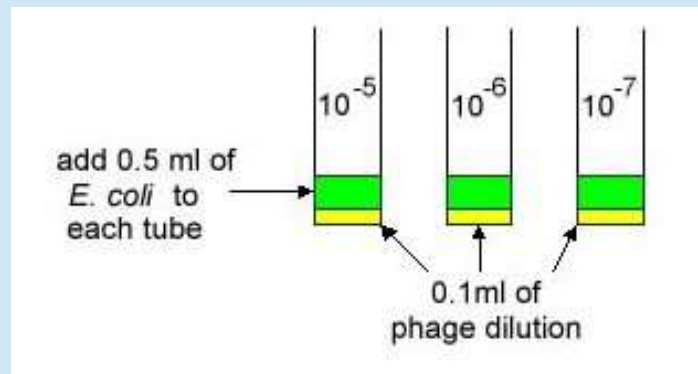
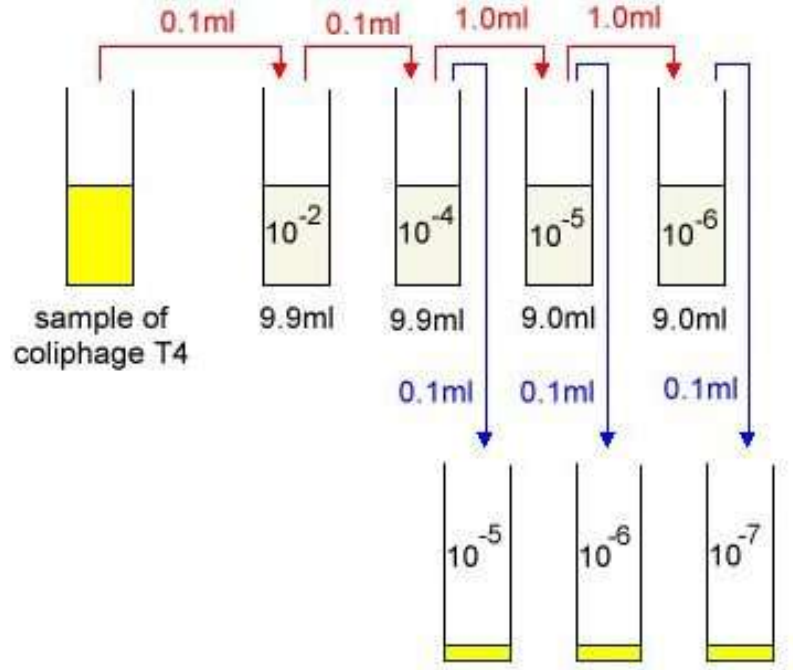


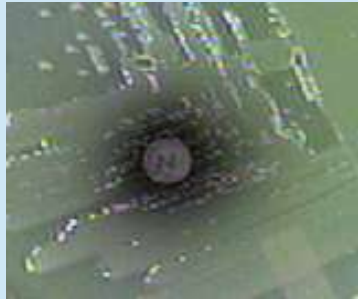












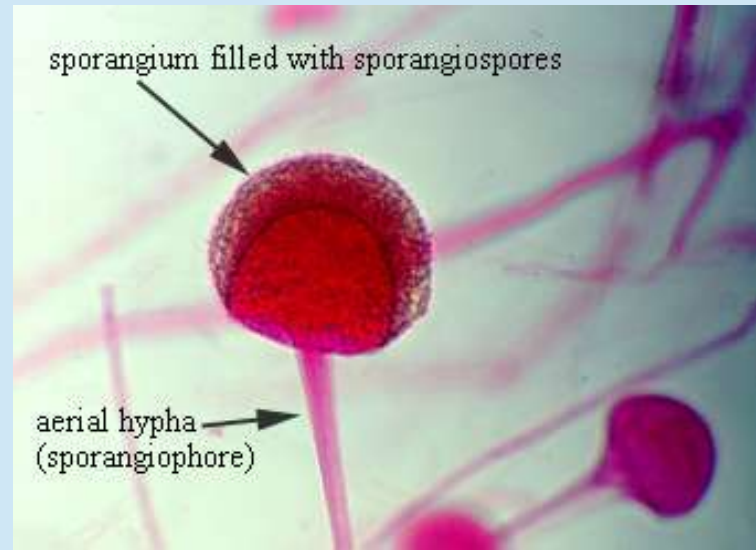
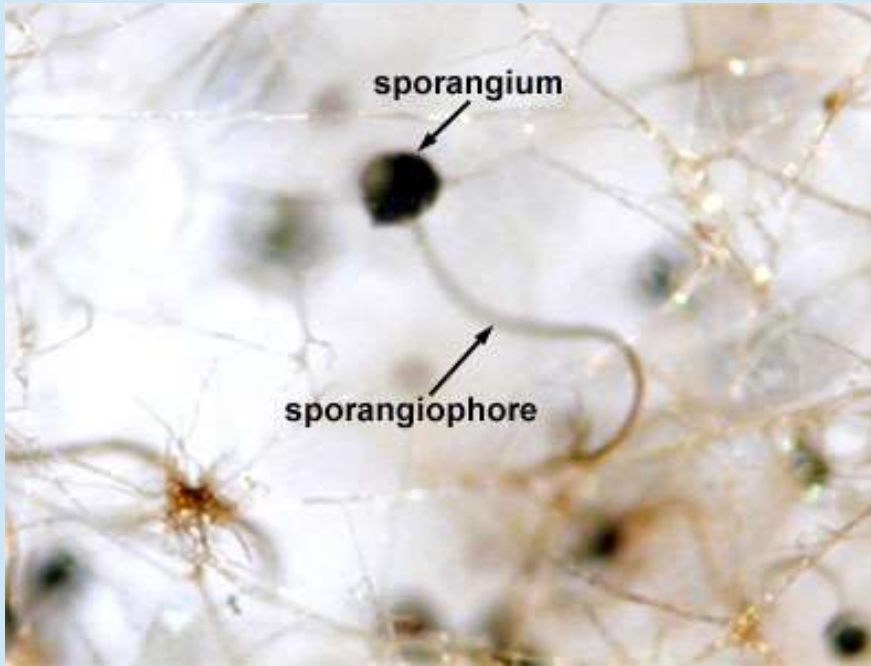
Oxydase positive

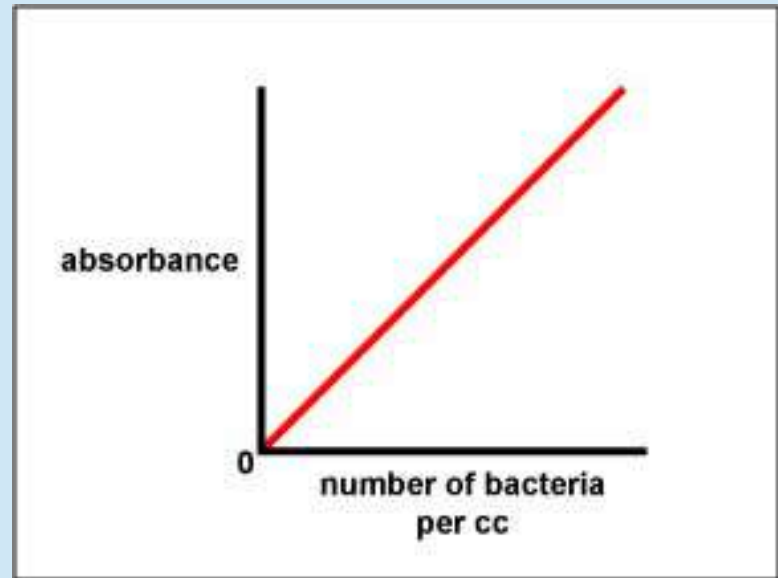
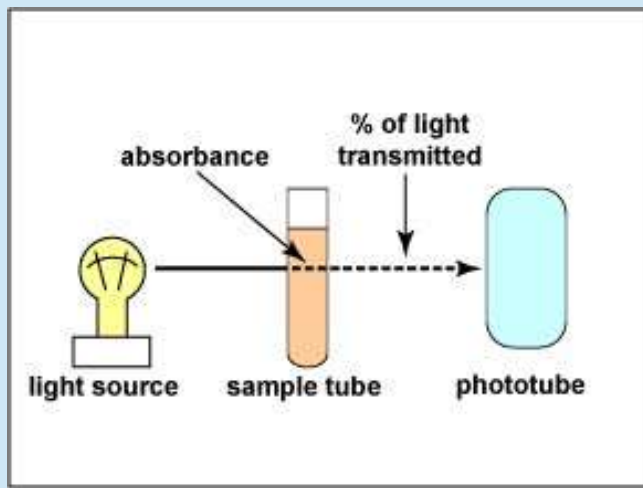


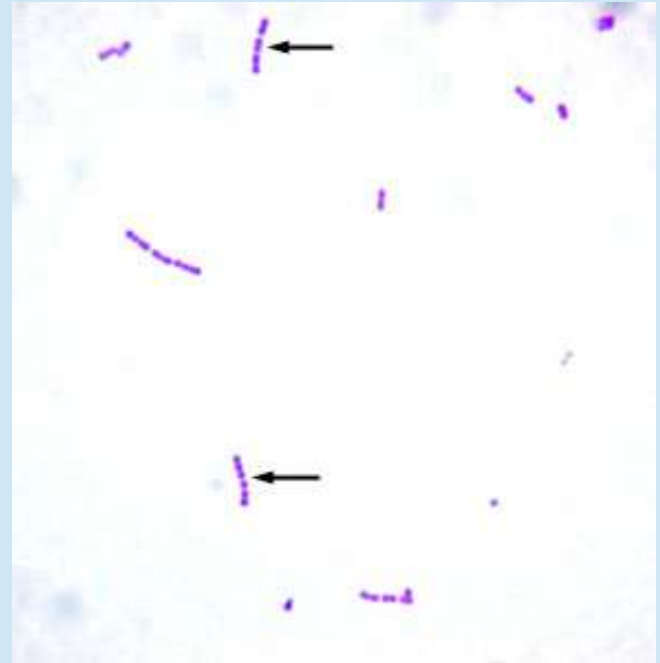
Oxydase négative

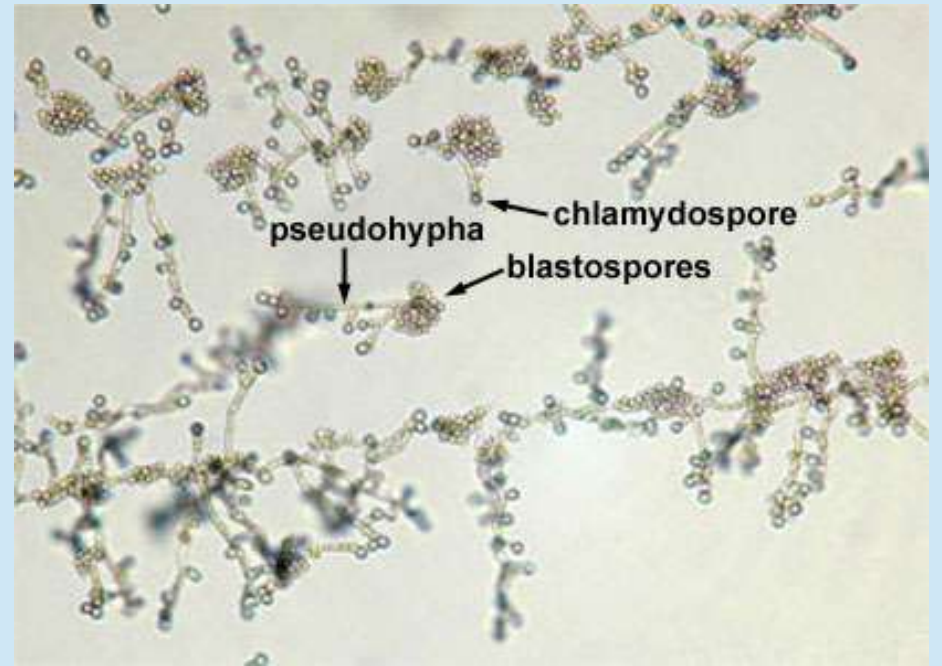
Test pour l'oxydase







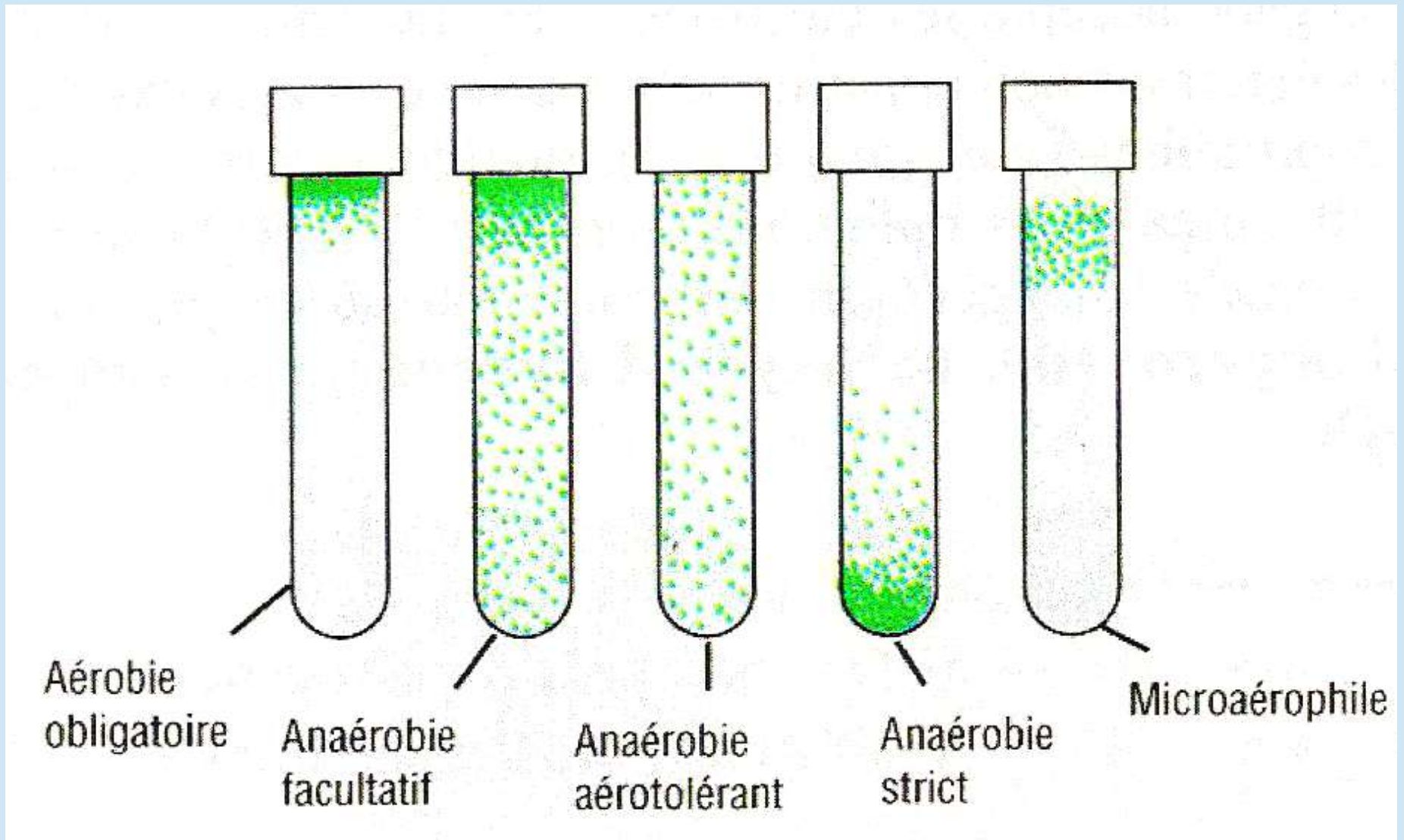


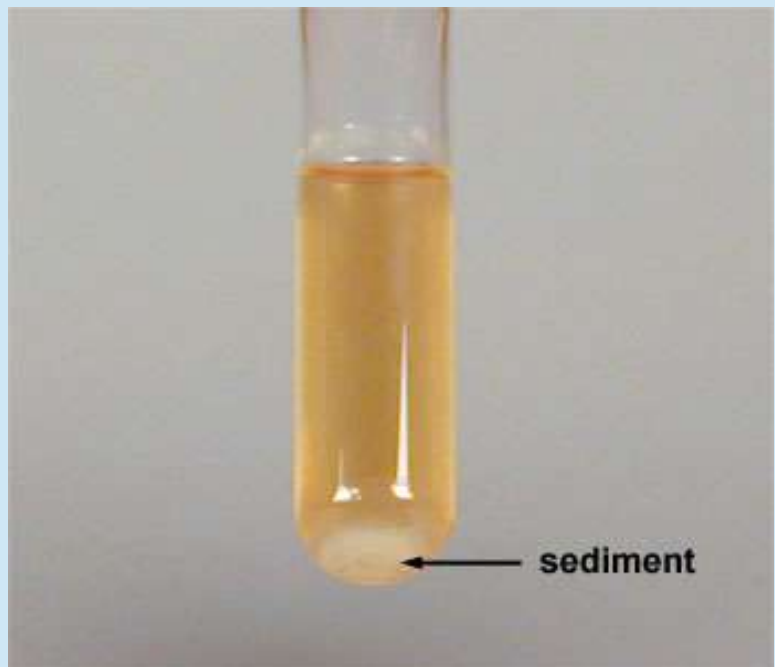
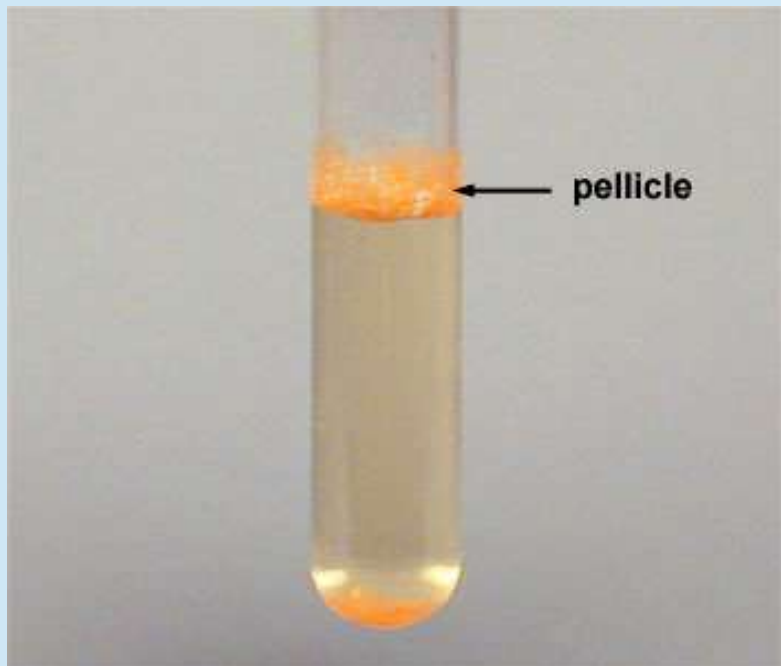


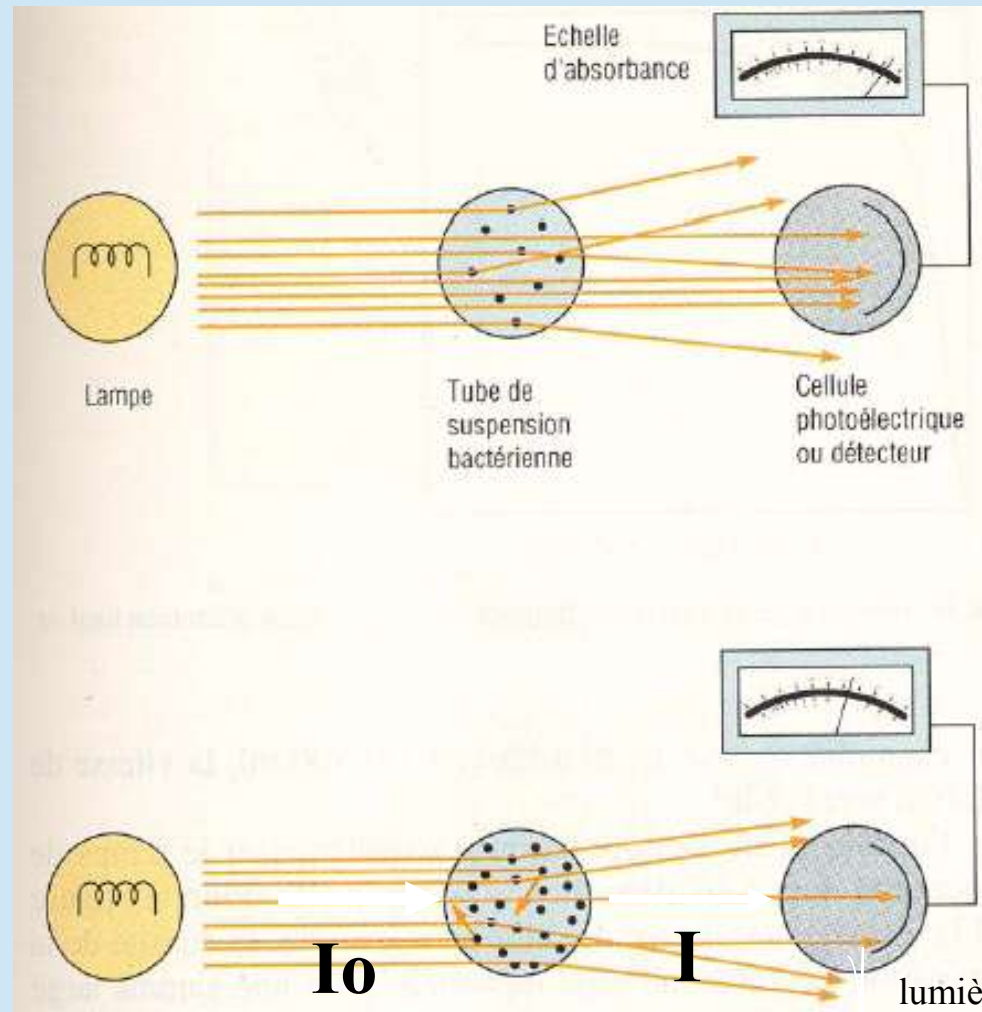
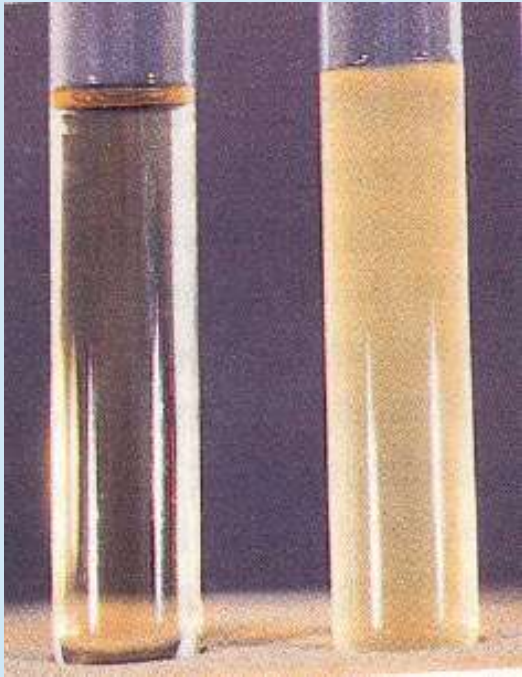
LA CROISSANCE MICROBIENNE

Les conditions de croissance

Influence de la concentration en oxygène:





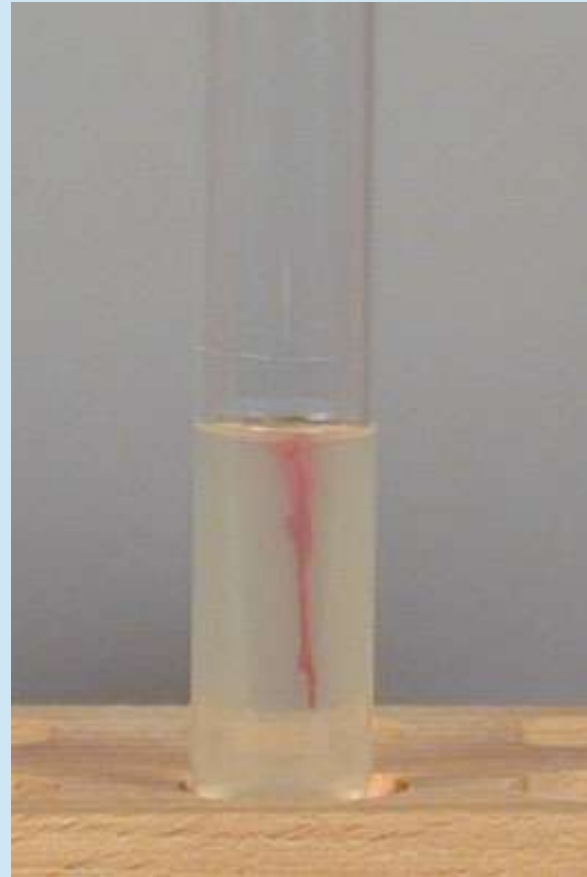
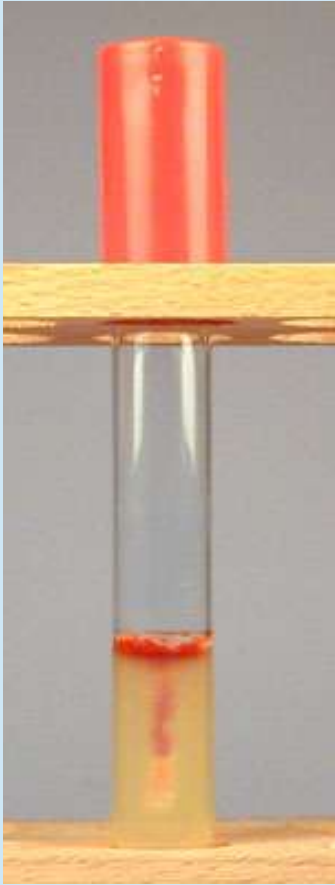


I_0

I

lumière transmise (mesurée par spectrophotomètre)

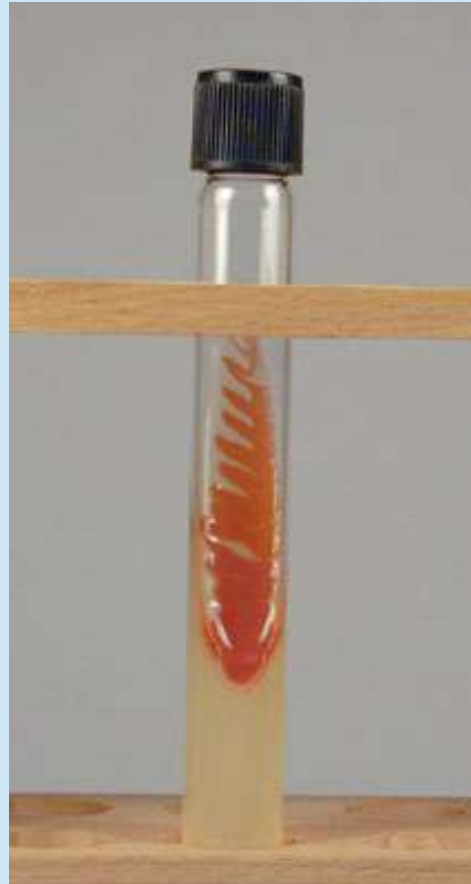
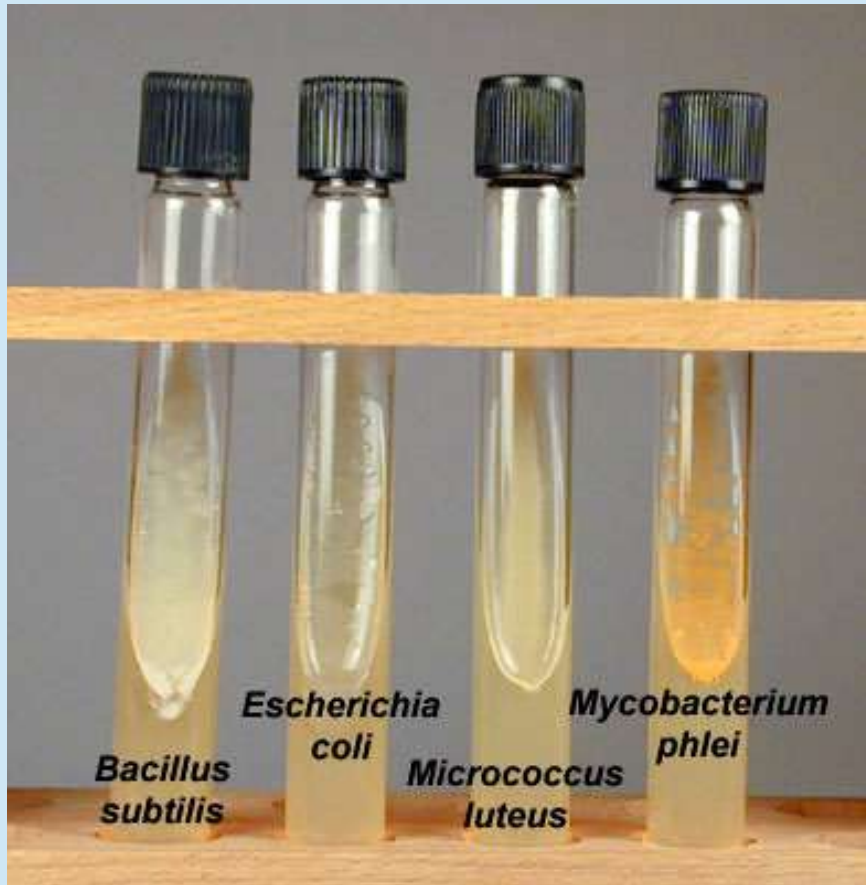
lumière diffractée (mesurée par néphélomètre)

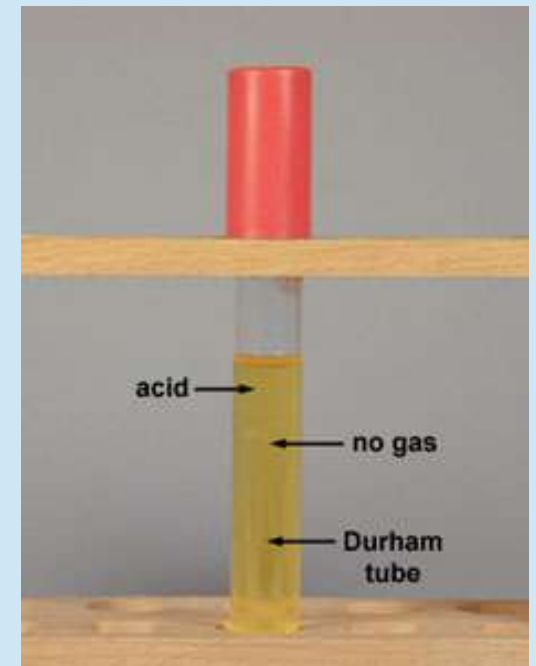
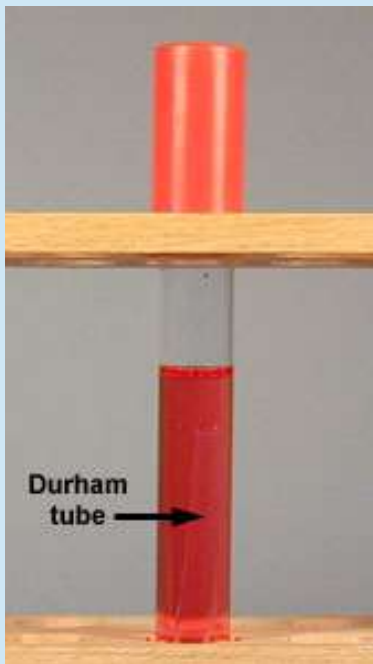
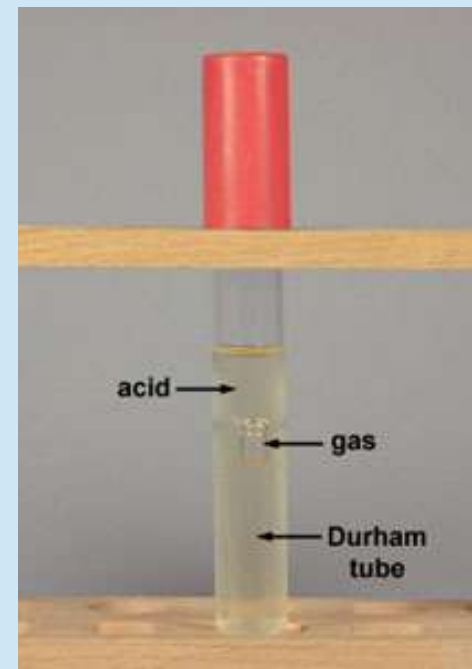
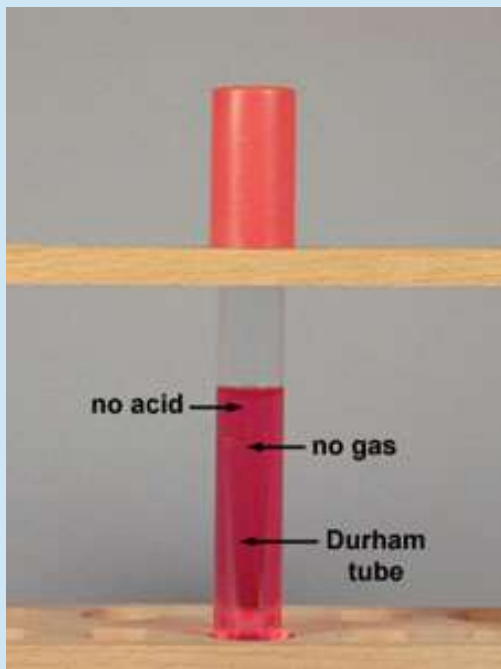


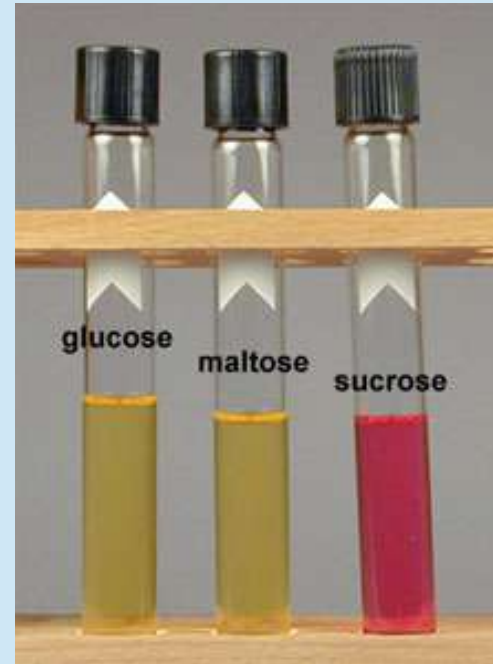
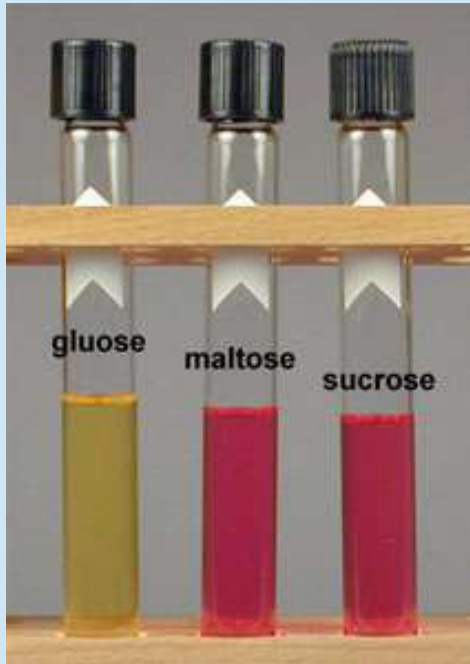
Staphylococcus aureus



Pseudomonas aeruginosa

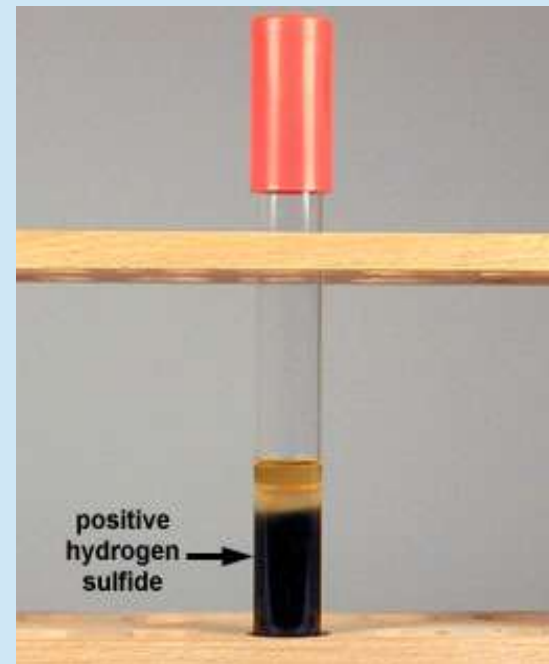
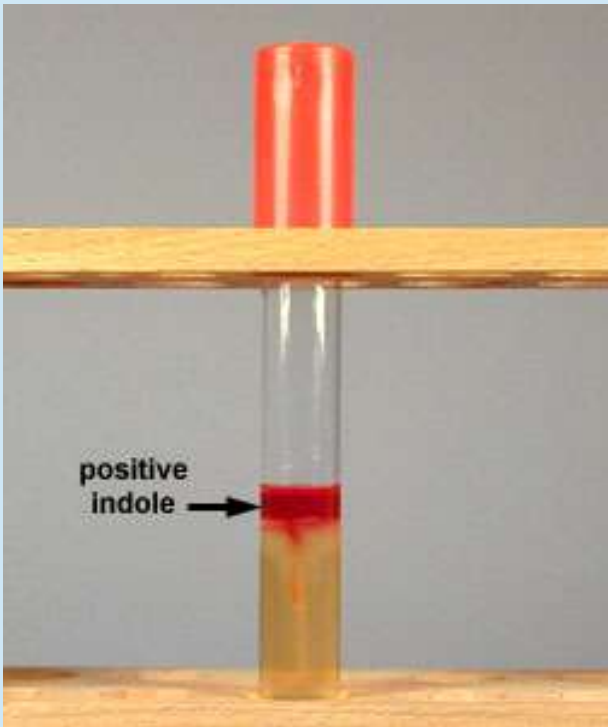
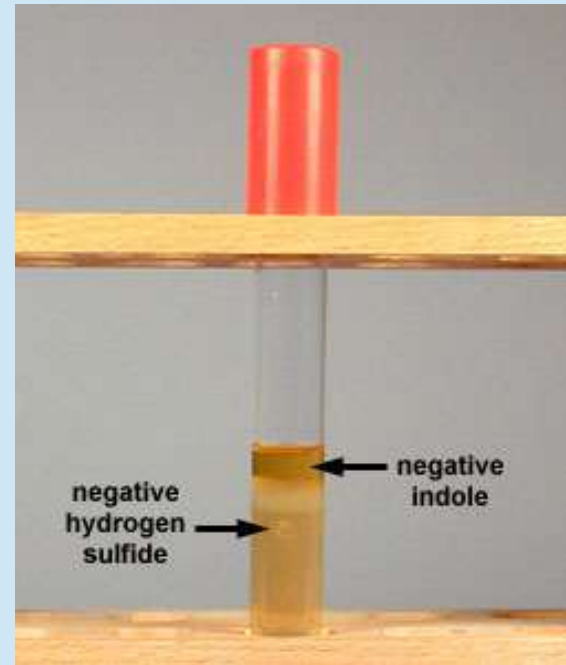
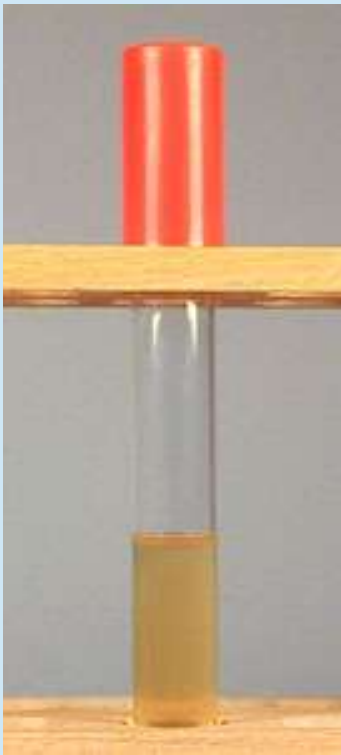


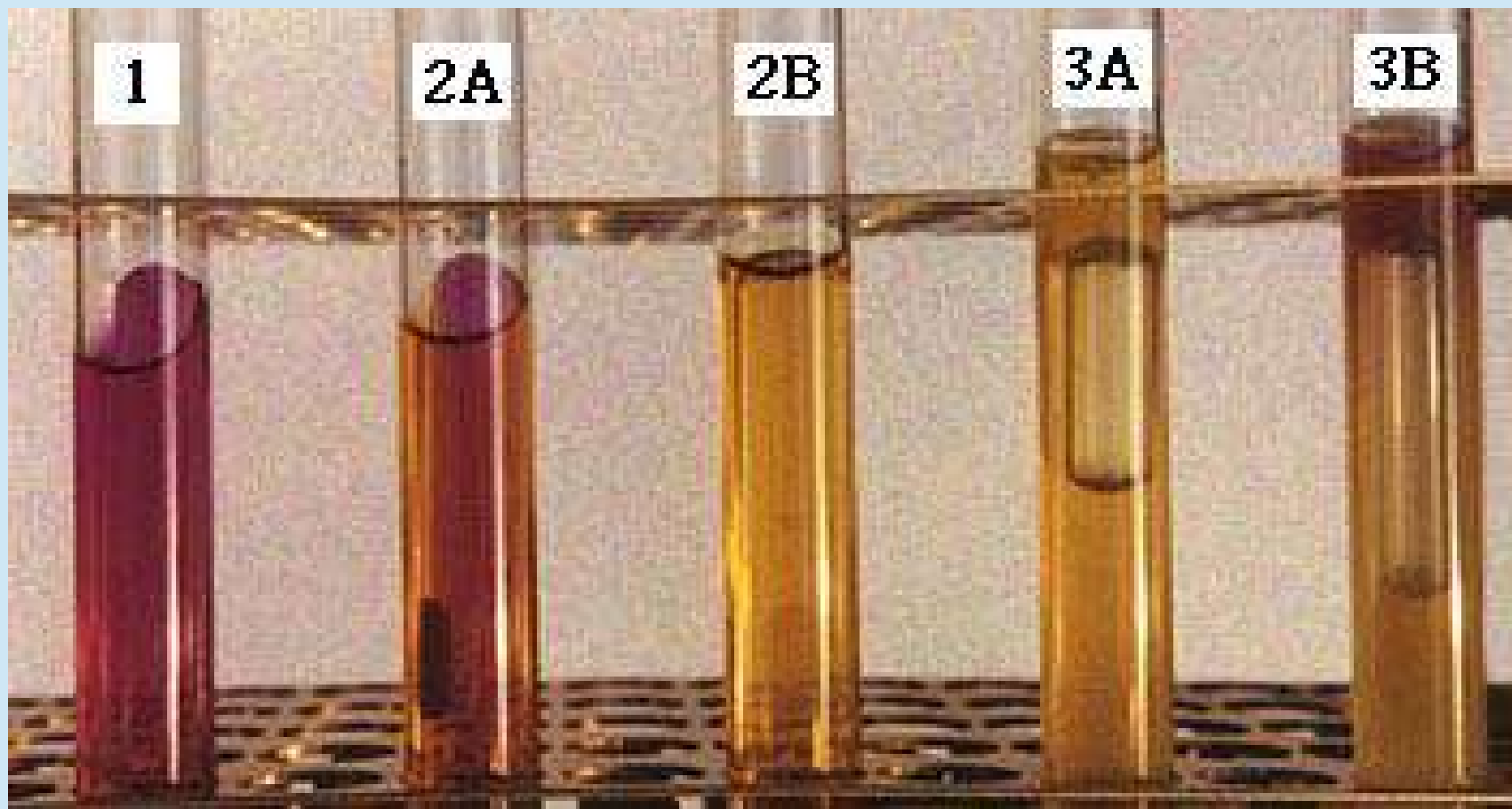




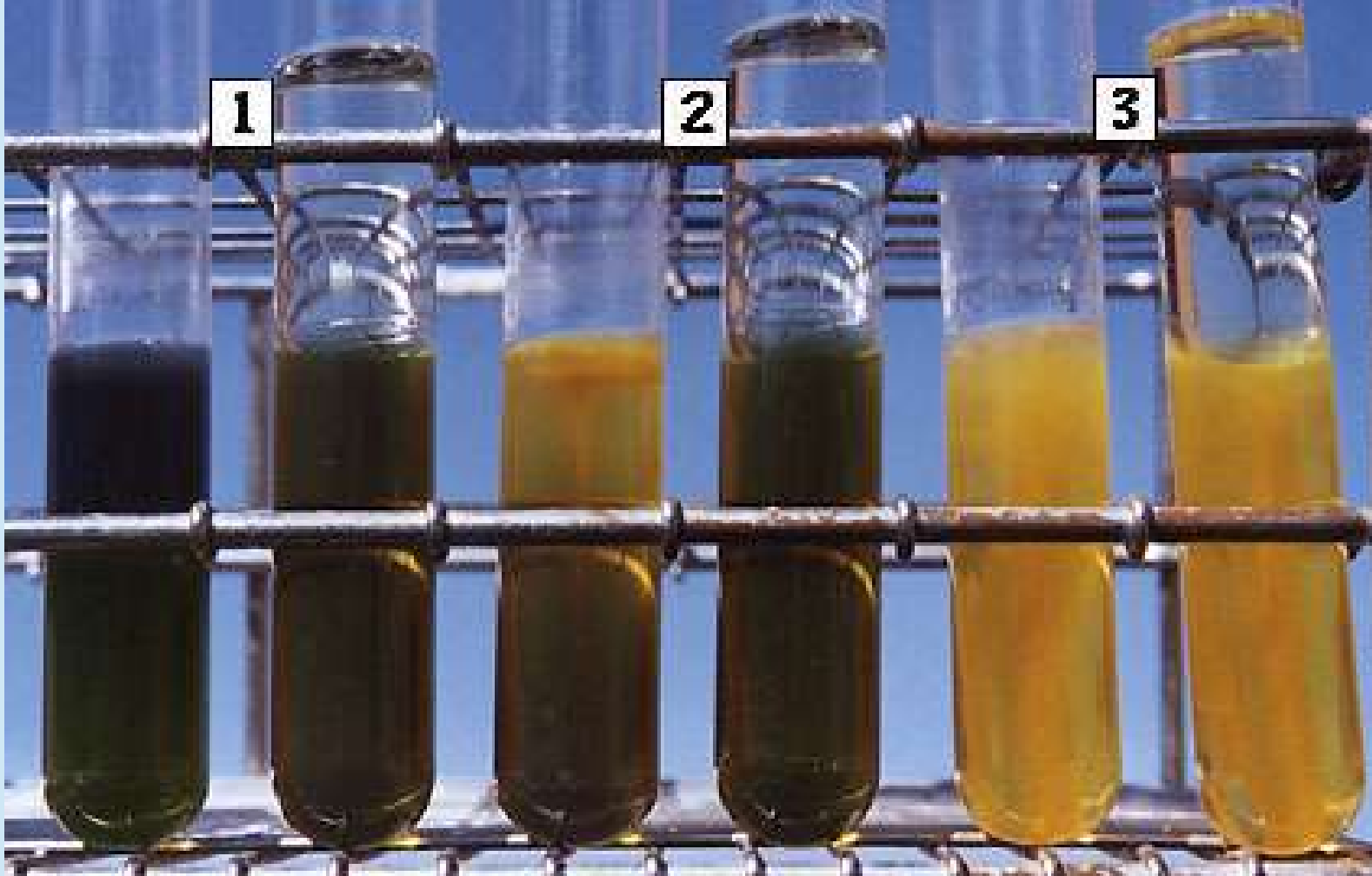
Fermentation des carbohydrates

Sulfite
Indole
Mobilité

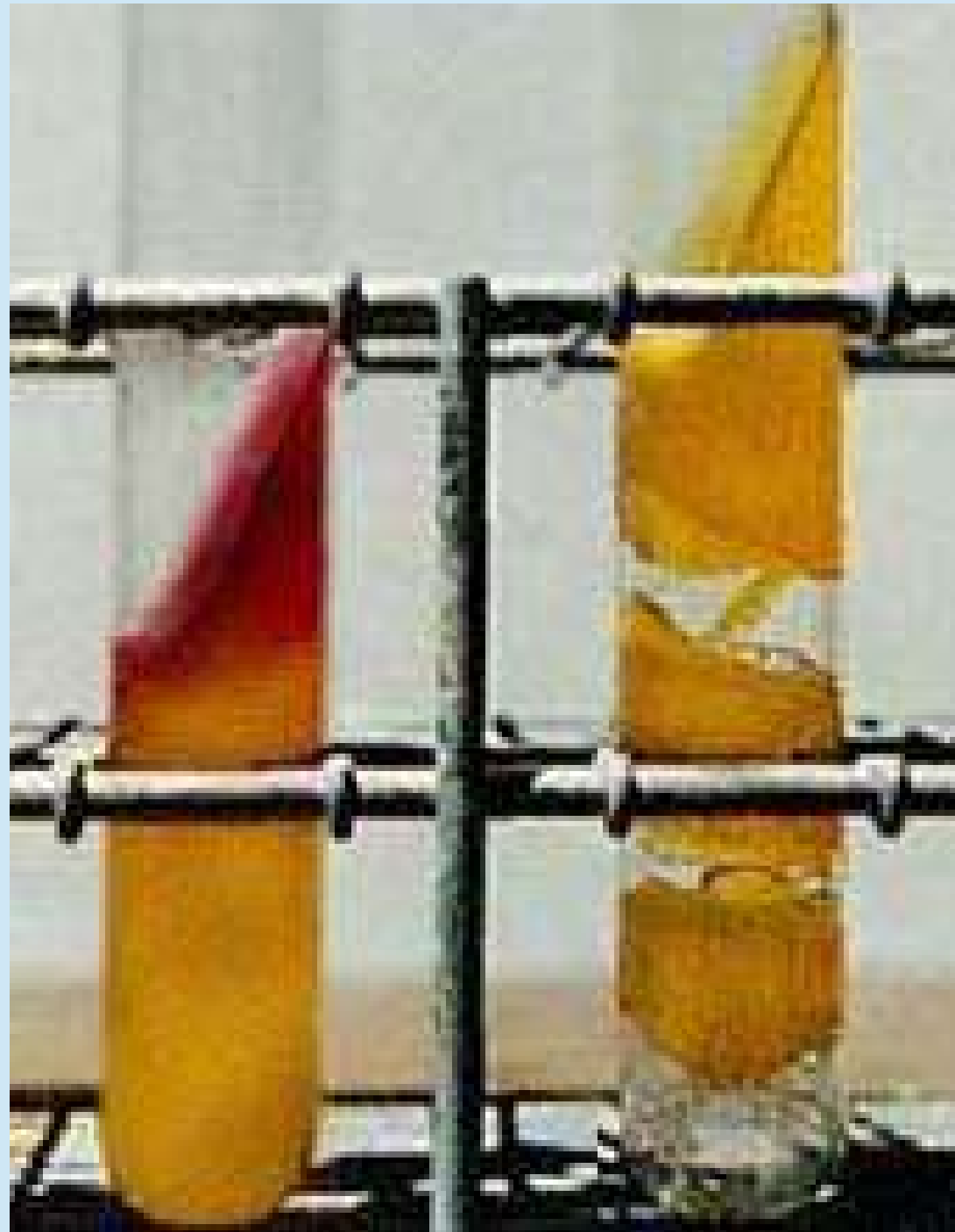


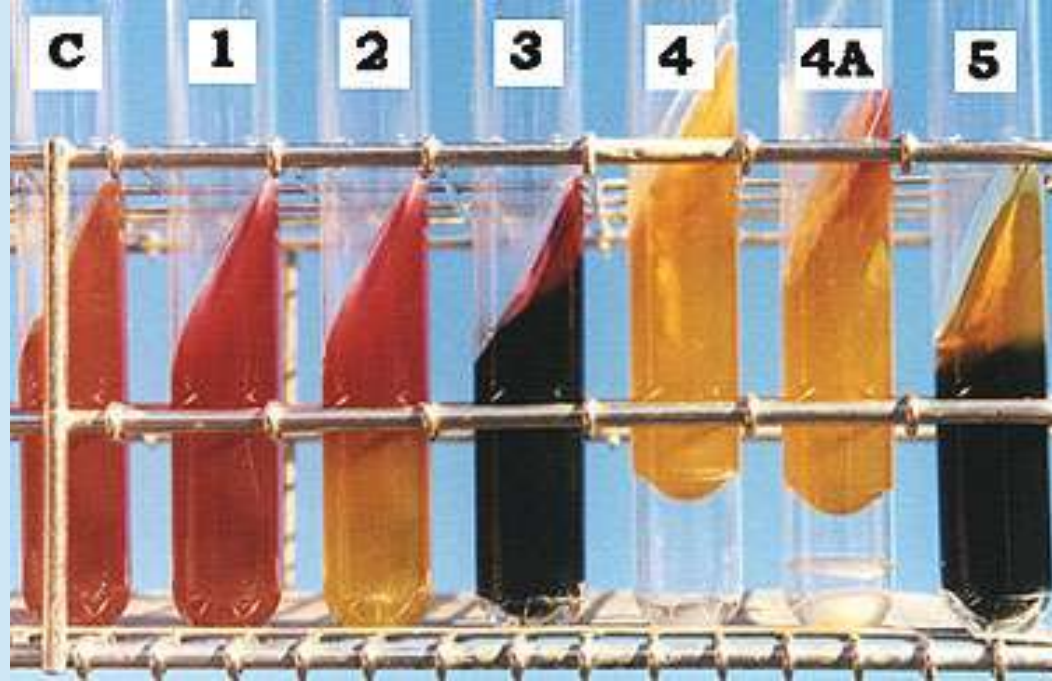


Production de gaz



Huile de paraffine
Glucose O/F





Tube	1	2	3	4*	5
Deamination de Ac. aminés (Rx alcalin aérobique.)	+	+	+	+	+
Glucose Fermentation	-	+	+	+	+
Lactose Fermentation	-	-	-	+	+
H2S production	-	-	+	-	+ **
Exemples typiques	<i>Pseudomonas</i>	<i>Morganella</i> <i>Providencia</i> <i>Shigella</i>	<i>Citrobacter</i> <i>Salmonelle, Proteus</i> <i>Edwardsiella</i>	<i>E. Coli, Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i>	H2S + <i>E. coli</i> Lactose + <i>Salmonelle</i>

Staphylococcus epidermidis



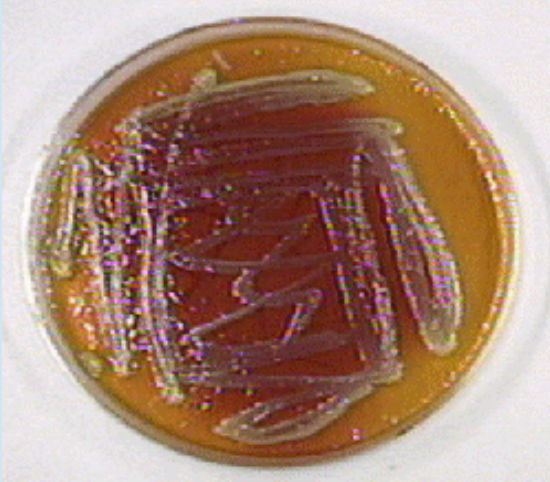
FERMENTATION du MANNITOL

Staphylococcus aureus

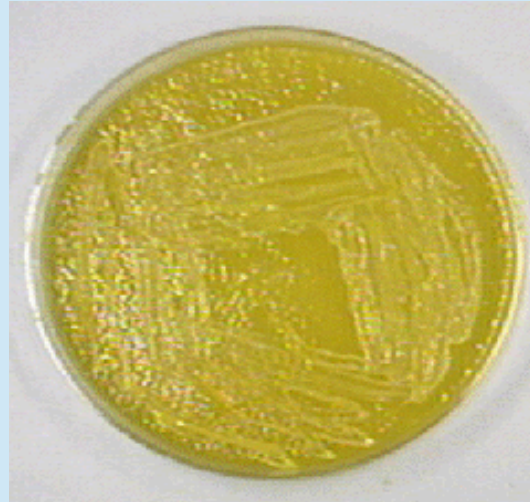


Staph. saprophyticus

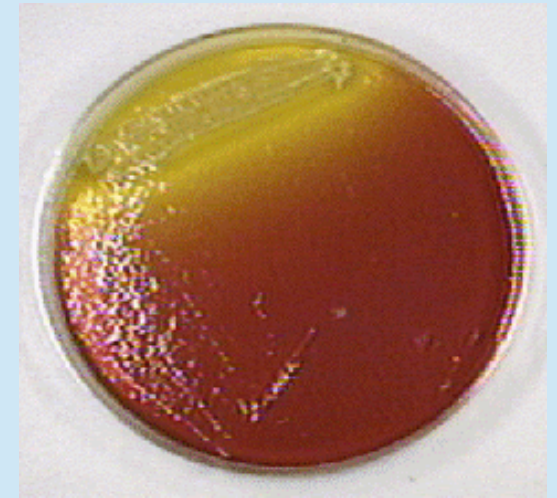




Enterobacter



Klebsiella

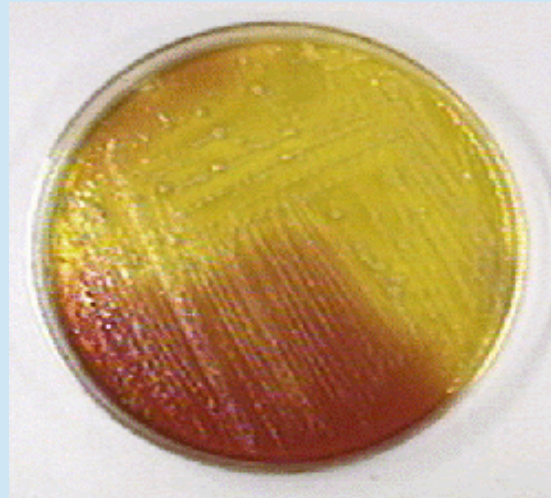


Proteus

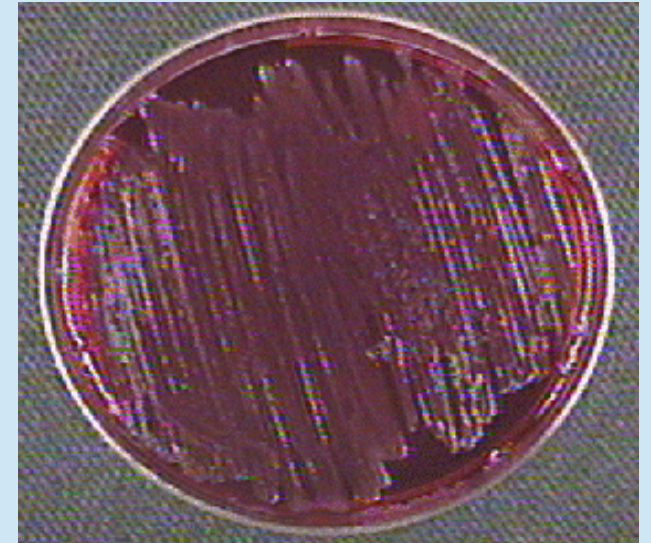
sur milieu XLD agar



Salmonella

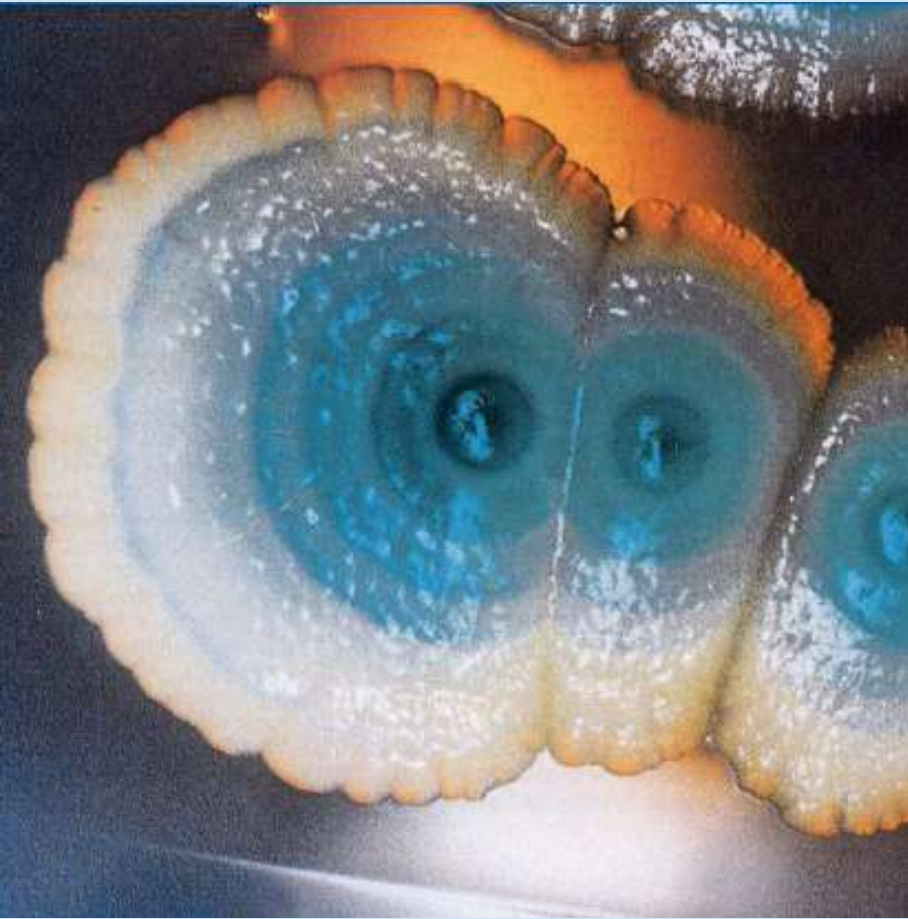


E. coli

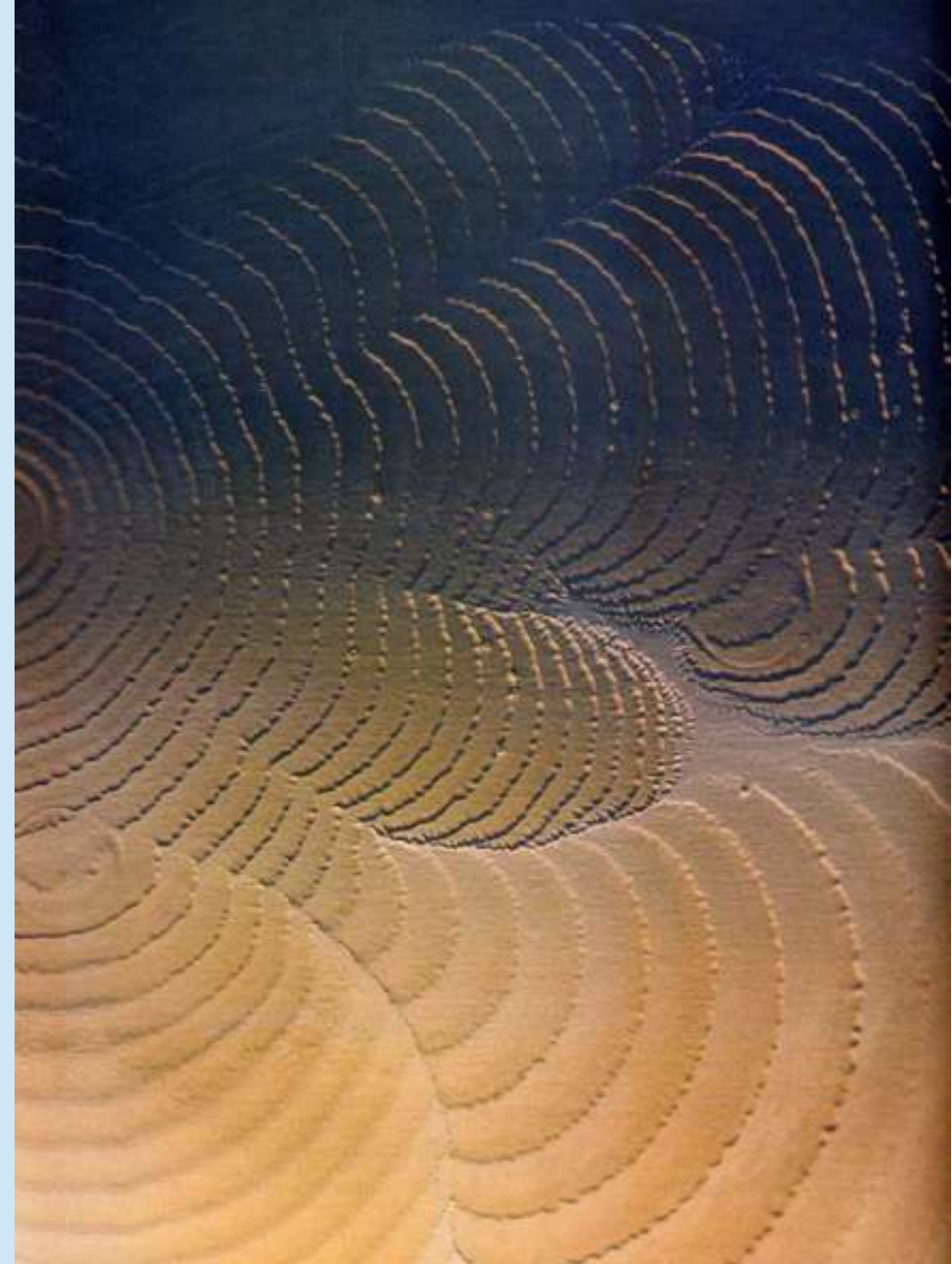


Shigella

Sur milieu XLD



- Environ 10⁶ cellules
- Cellules non motiles
- Métabolisme différent au centre et en périphérie de la colonie, révélé par une activité enzymatique



Périodiquement, les cellules s'allongent pour explorer de nouveaux territoires. Des cellules « normales » envahissent ensuite la zone.



Enterotube II contient 12 milieux différents permettant 15 tests biochimiques pour identifier les enterobactéries



8-0-1



1225



125



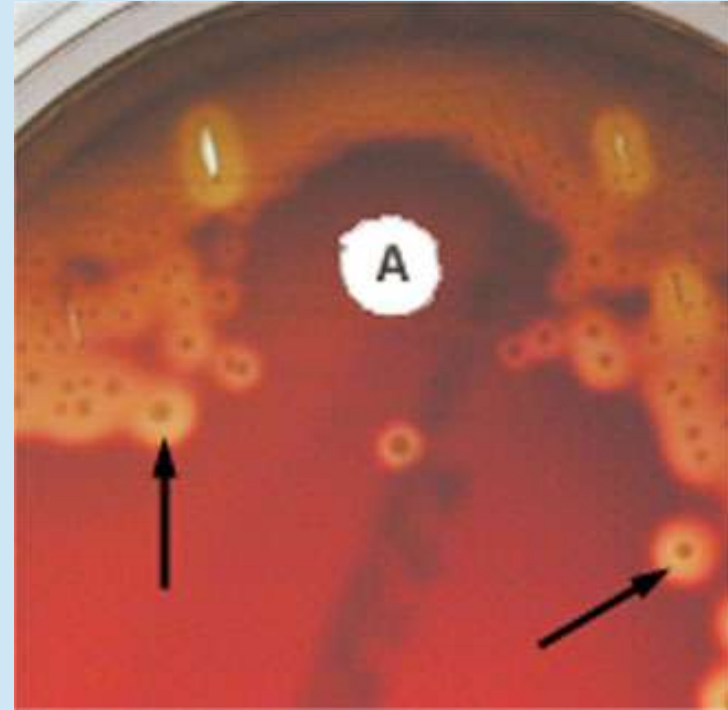
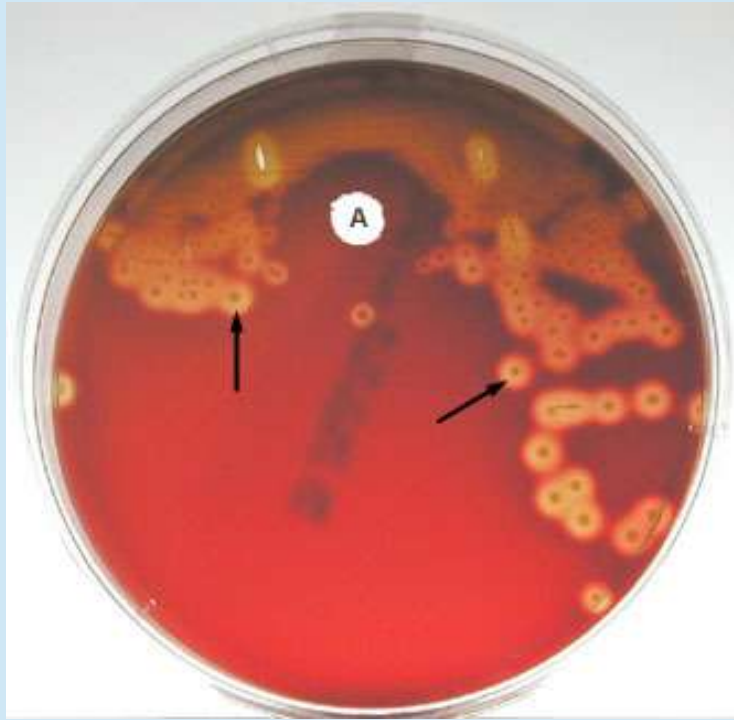
0200



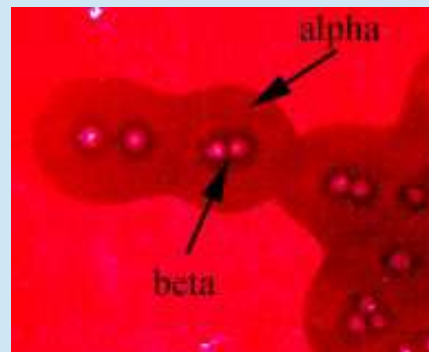
200



100

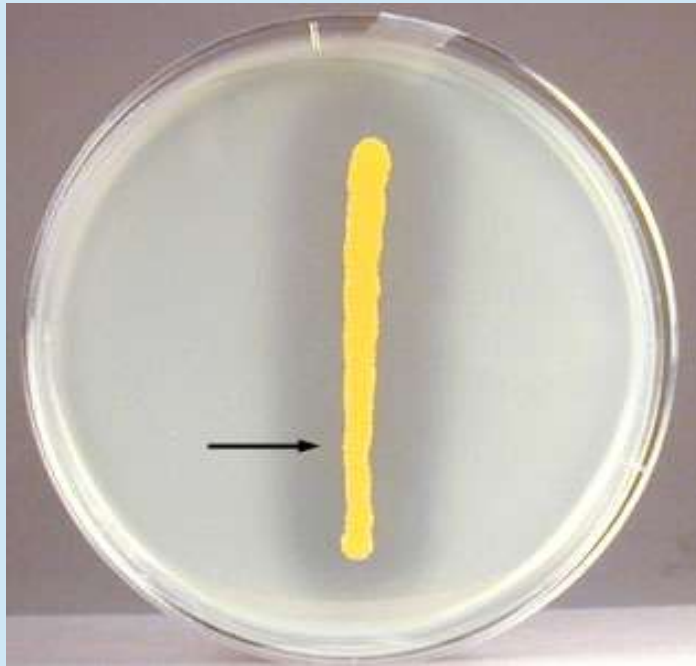


hémolyse sur milieu au sang





Milieu au sang (absence d'hémolyse)

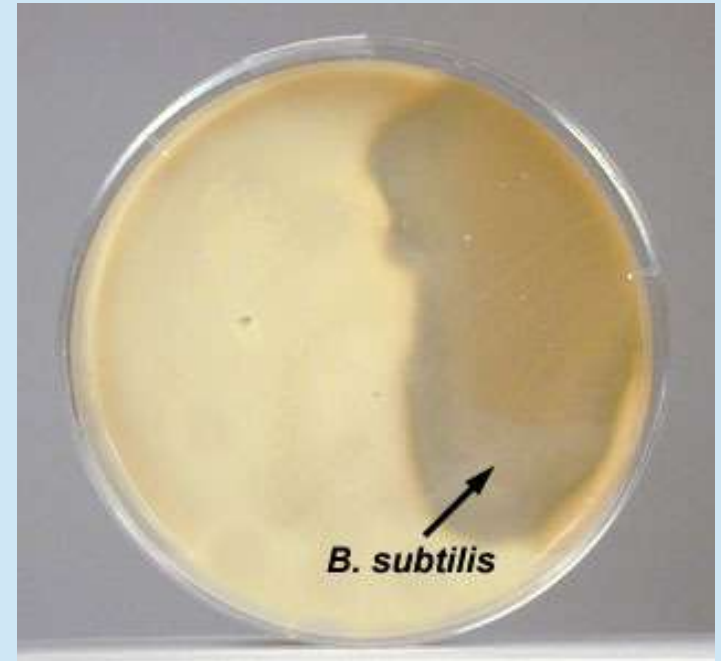
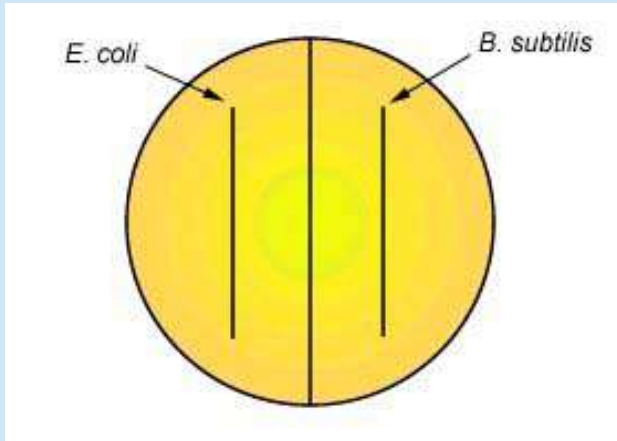


DNase positive

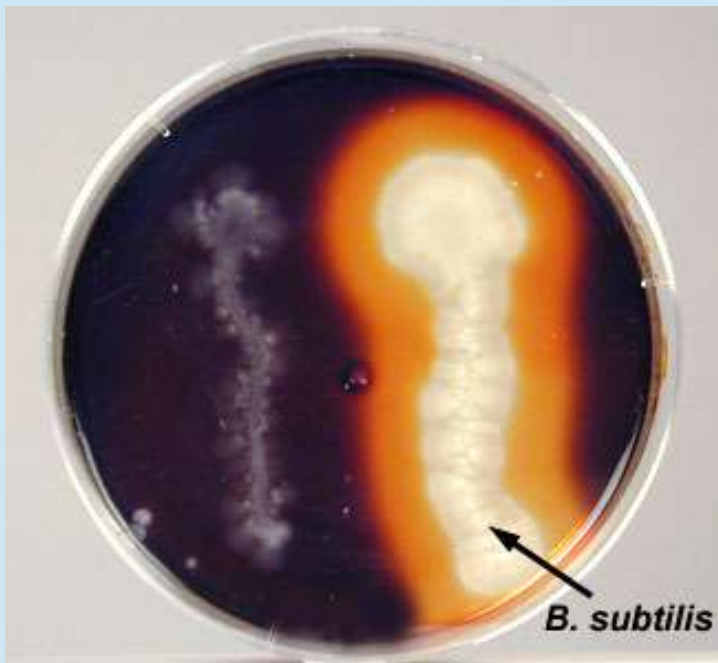


DNase négative

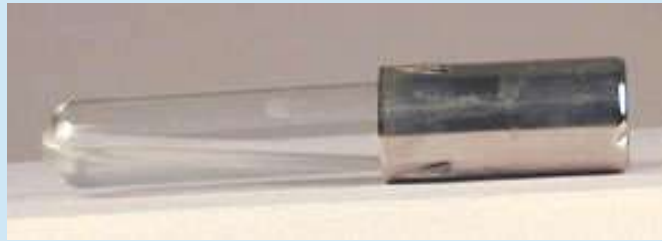
Test de dégradation de l'ADN



Hydrolyse de la caseine



Hydrolyse de l'amidon



Test de coagulase

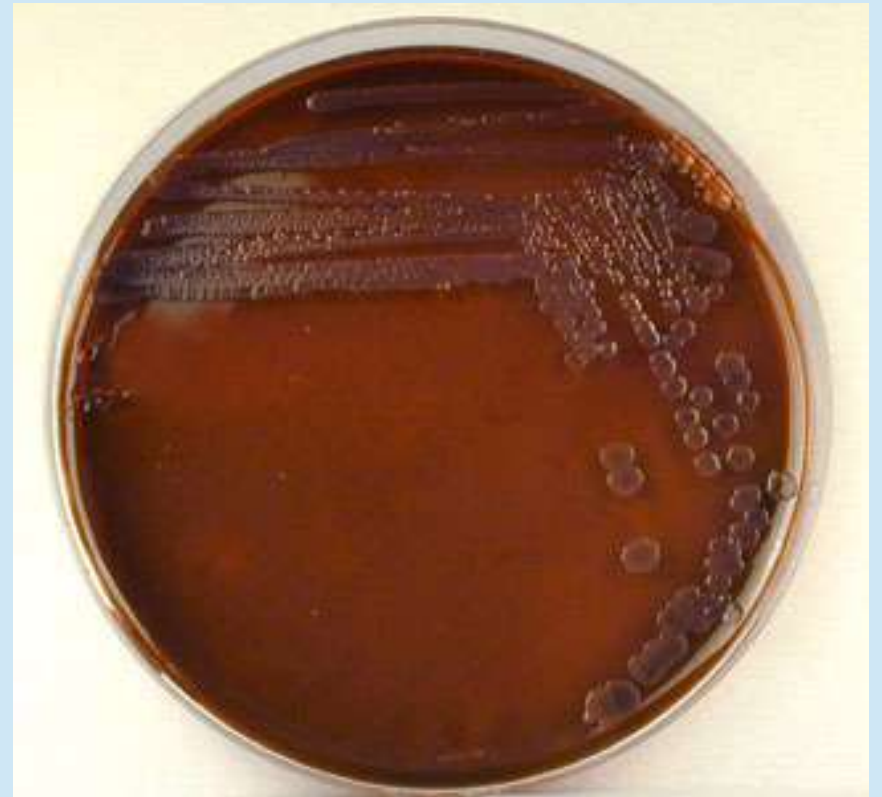


Milieu au chocolat pour sélectionner Neisseria



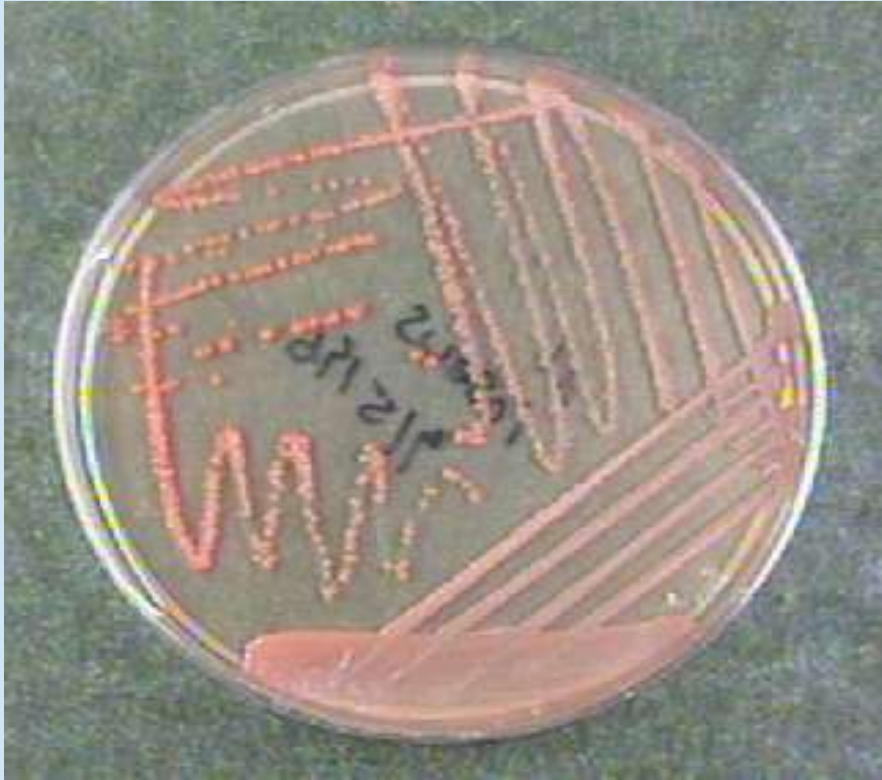


E. coli



Enterobacter

milieu EMB agar

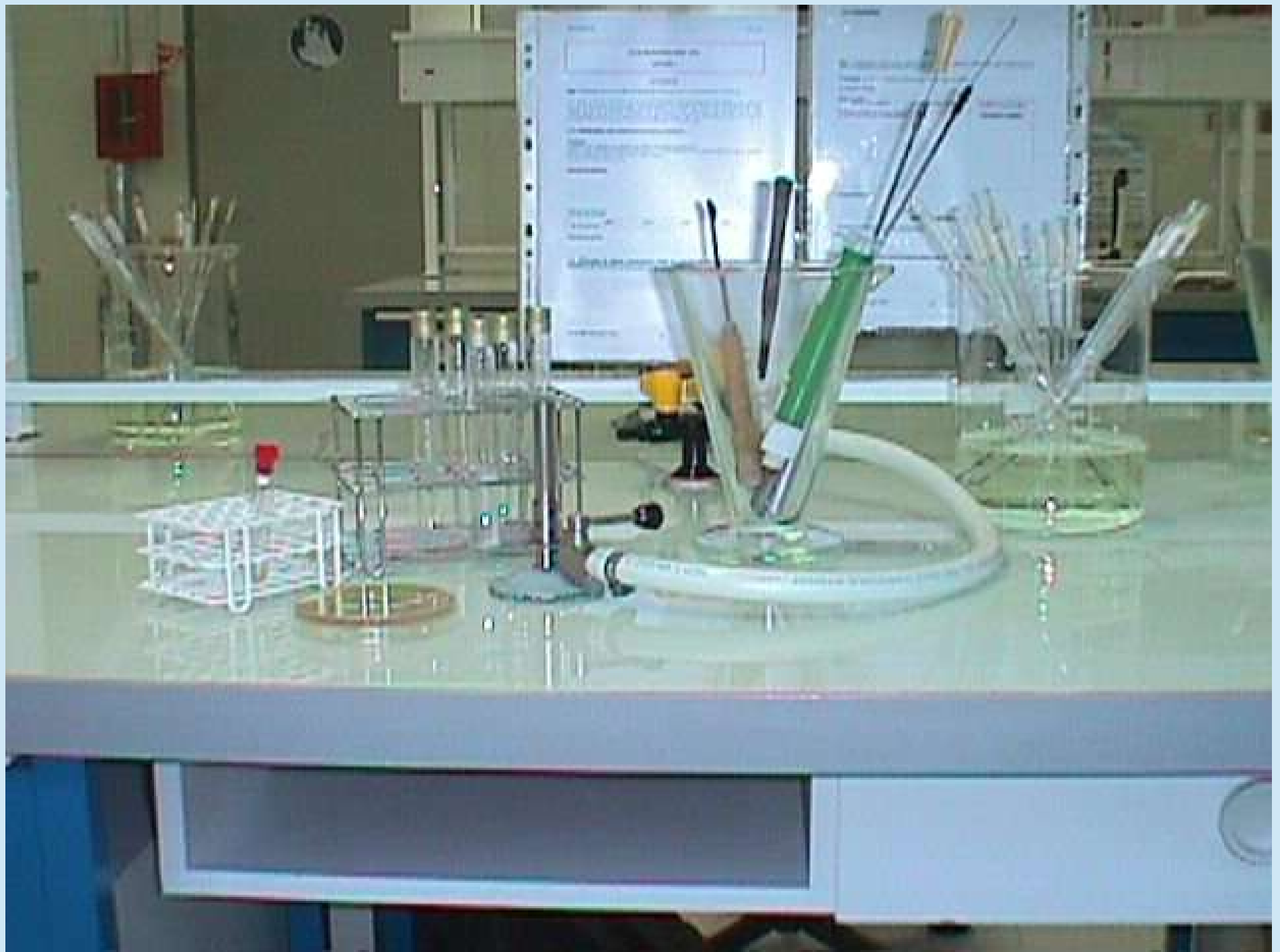


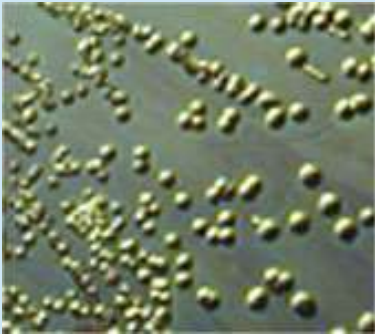




Sous UV

Mise en évidence de pigment chez *Pseudomonas aeruginosa*







1/ Avant la mise en culture :

Protège tes vêtements à l'aide d'une blouse et noue tes cheveux s'ils sont longs.

Lave soigneusement tes mains avec un antiseptique (laisse les sécher).

Désinfecte ton plan de travail avec un chiffon imbibé d'eau de javel.

Place le bec bunsen au centre du plan de travail et allume le (sans que sa flamme dépasse 10 cm) pour permettre l'asepsie de l'air.

Dépose le tube vide qui contenait la suspension de levures sur le plateau prévu à cet effet (à l'endroit indiqué par ton professeur)

Dispose dans la zone stérile délimitée par un cercle d'une vingtaine de cm de rayon autour du bec bunsen le matériel que tu vas utiliser :

- un tube contenant la suspension de levures
- une boîte de Pétri contenant le gel nutritif
- un öse (= ensemenceur) placé dans un verre à pied

Laisse toujours le matériel dans le rayon de 20 cm autour du bec bunsen.

Ne touche pas la partie de l'öse qui sera en contact direct avec les levures et ne pose pas l'öse directement sur la table.

N'ouvre le tube contenant les levures et la boîte de Pétri que dans un environnement situé à 10 cm de la flamme du bec bunsen.

Evite de bouger brusquement et de parler pour ne pas projeter de micro-organismes.

Ne porte pas tes mains à la bouche.

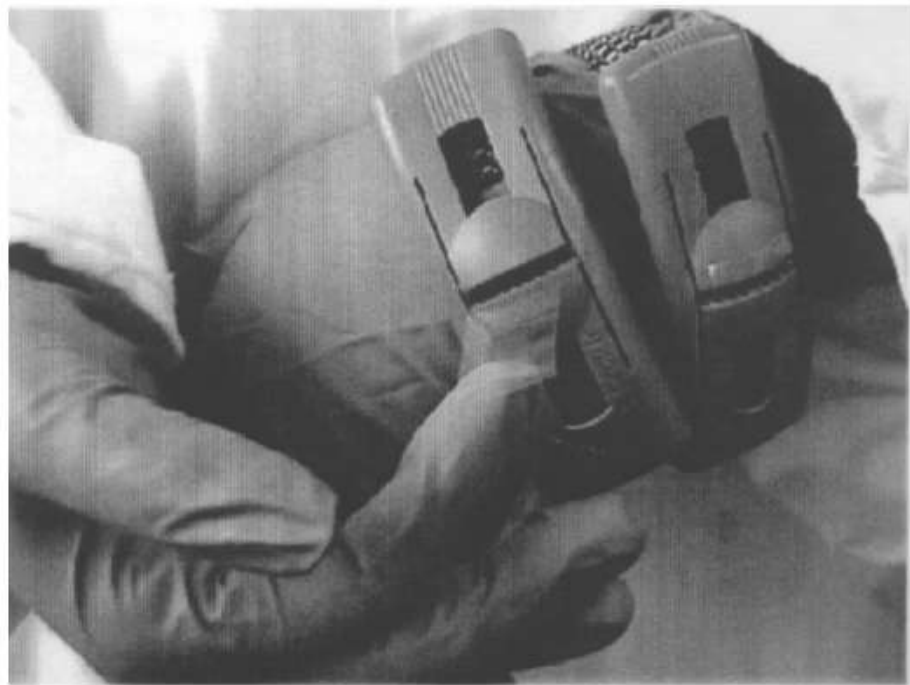


Figure 3—Pulling sterile “pop-up” tape for sampling



Figure 4—Application of tape to meat surface for 15 sec

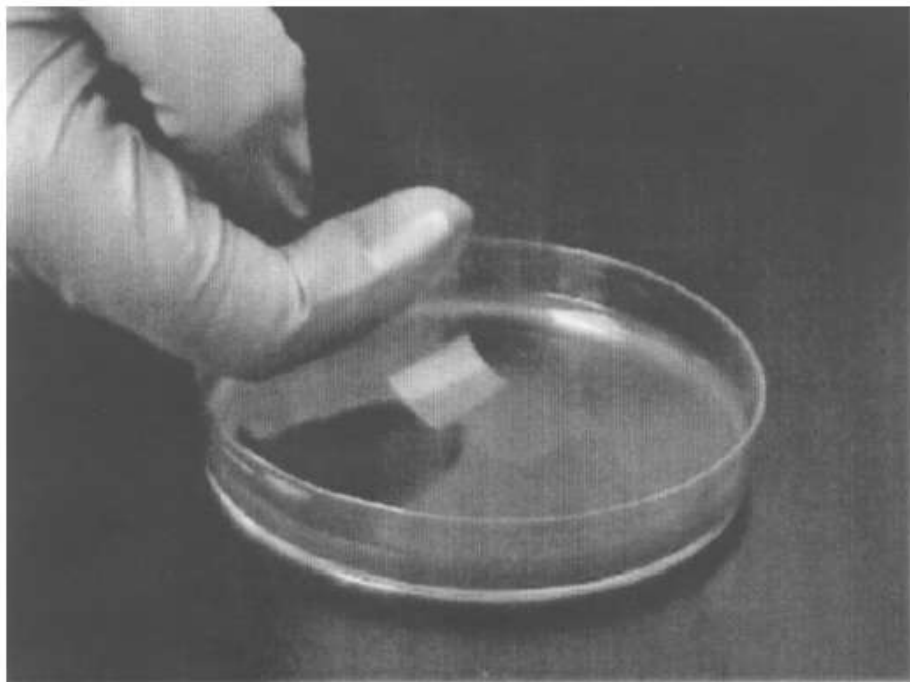
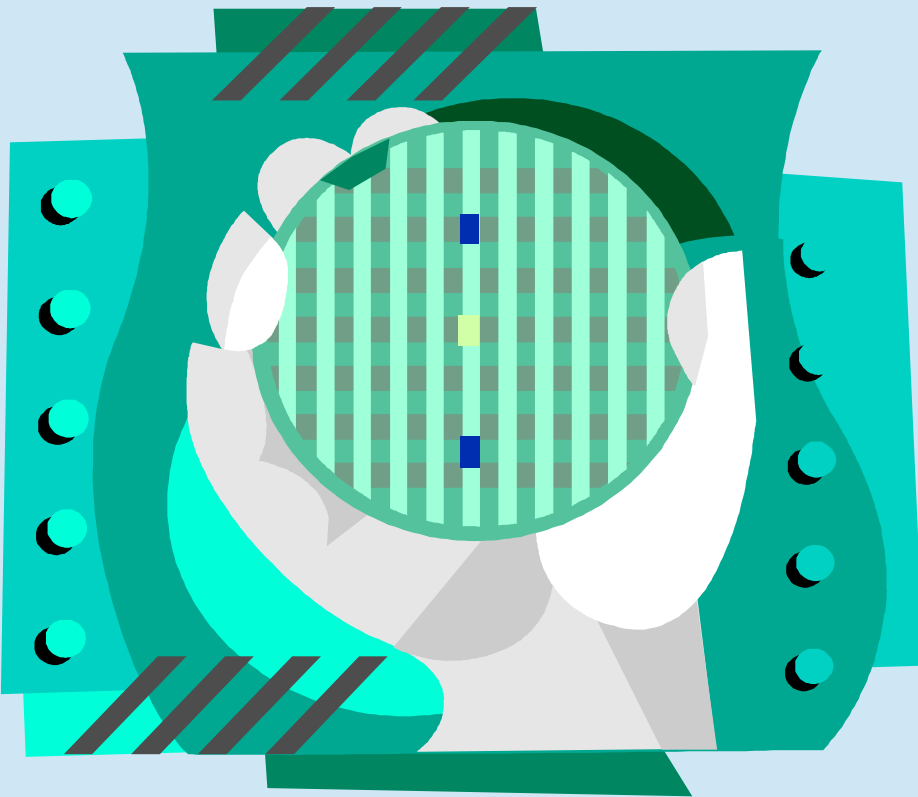


Figure 4—Application of tape with microbial sample from meat to agar for 15 sec

Rapid methods and automation in microbiology

La croissance microbienne



- Facteurs essentiels à la croissance
- Croissance microbienne
- Milieux de culture
- Préparation d'une culture pure
- Conservation

Facteurs essentiels à la croissance

- Se divisent en deux catégories:
- Physiques
 - eau
 - température
 - pH
 - pression osmotique
- Chimiques:
 - carbone, azote, soufre et phosphore
 - oligo-éléments
 - oxygène

Facteurs physiques

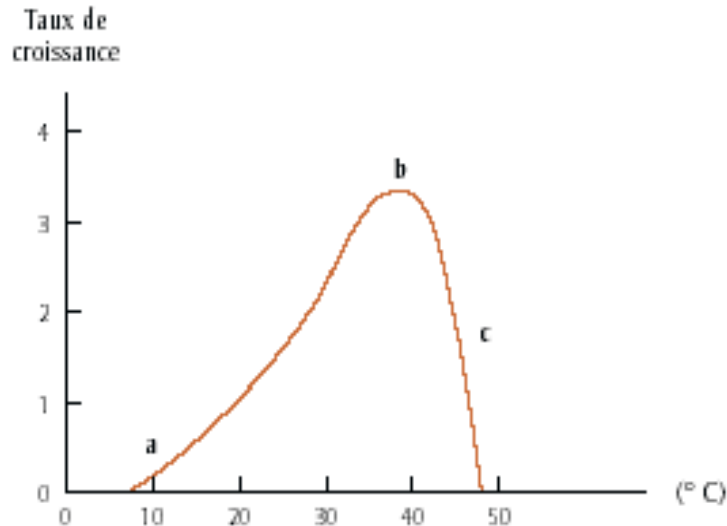
Eau

- Indispensable à la croissance des microorganismes
- En absence d'eau: les bactéries peuvent survivre mais non se multiplier
- Les bactéries possèdent une résistance plus ou moins grande à la dessiccation.

Facteurs physiques

Température

Figure 2.17 Influence de la température sur la croissance d'*Escherichia coli*



a) Température minimale b) Température optimale c) Température maximale

On remarque que la température minimale est située aux alentours de 10 °C, que la température optimale (à laquelle la croissance est maximale) est atteinte entre 37 et 40 °C, tandis que la température maximale de 46 °C ne peut être dépassée sans que la vitesse de croissance ne soit grandement affectée. Ces températures optimale et maximale dépendent de la thermolabilité des enzymes qui catalysent les réactions chimiques du métabolisme bactérien.

- T° minimale : T° la plus basse à laquelle se développe une bactérie
- T° optimale: T° à laquelle une bactérie croît le plus rapidement
- T° maximale: T° la plus élevée à laquelle se développe une bactérie

Température

- Les bactéries se divisent en trois grands groupes selon leur température optimale

- **Psychrophiles:**

de -10°C à 20°C

T° optimale: 10°C

Retrouvées dans les grands fonds marins ou les régions polaires

- **Mésophiles:**

de 20°C à 45°C

T° optimale: 37°C

Comprend la majorité des microorganismes pathogènes

Température (suite)

- **Thermophiles:**

de 55°C à 65°C

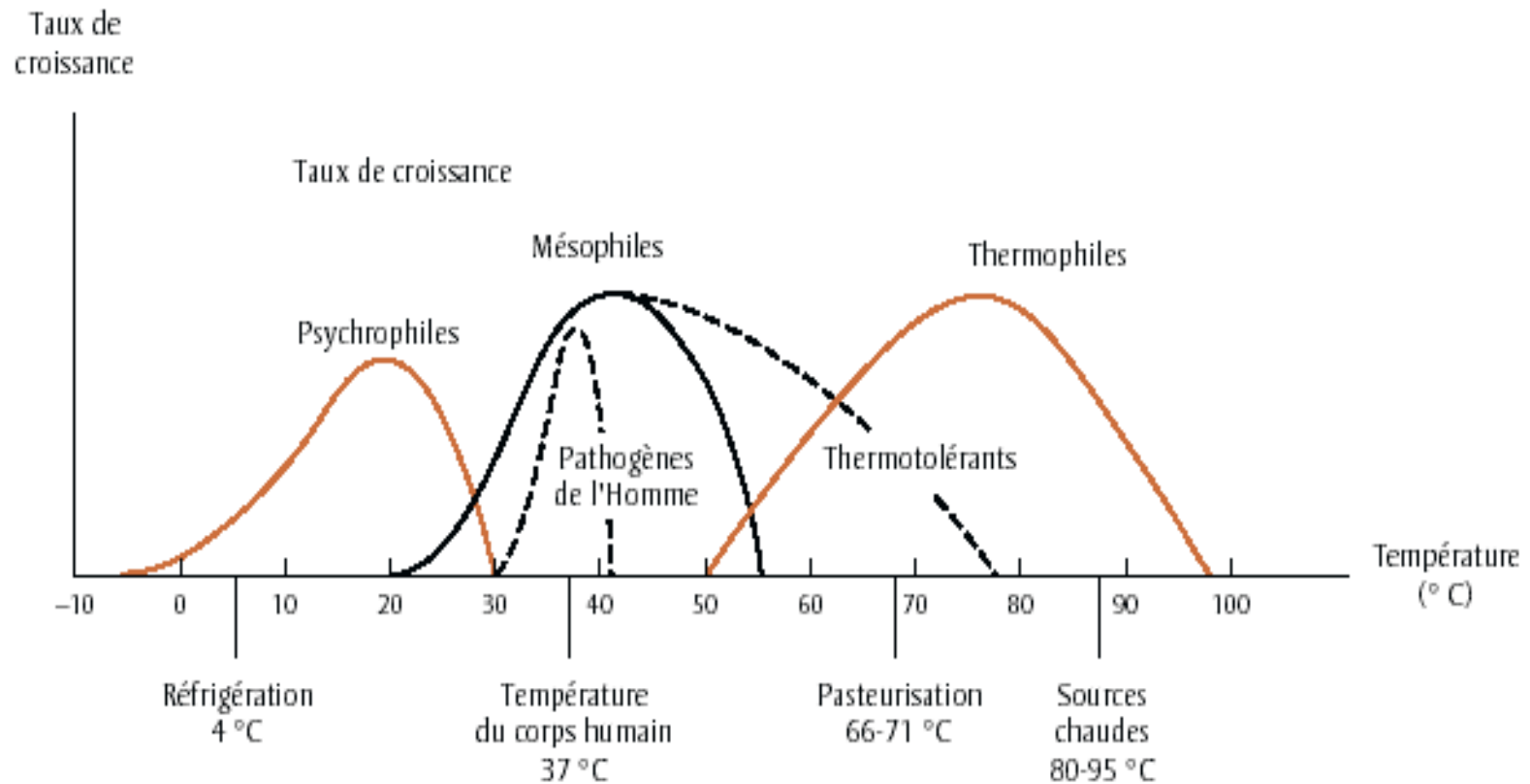
- **Thermophiles extrêmes:**

+ de 80°C

Certaines Archéobactéries présentes dans des sources thermales associées à l'activité volcanique

Température

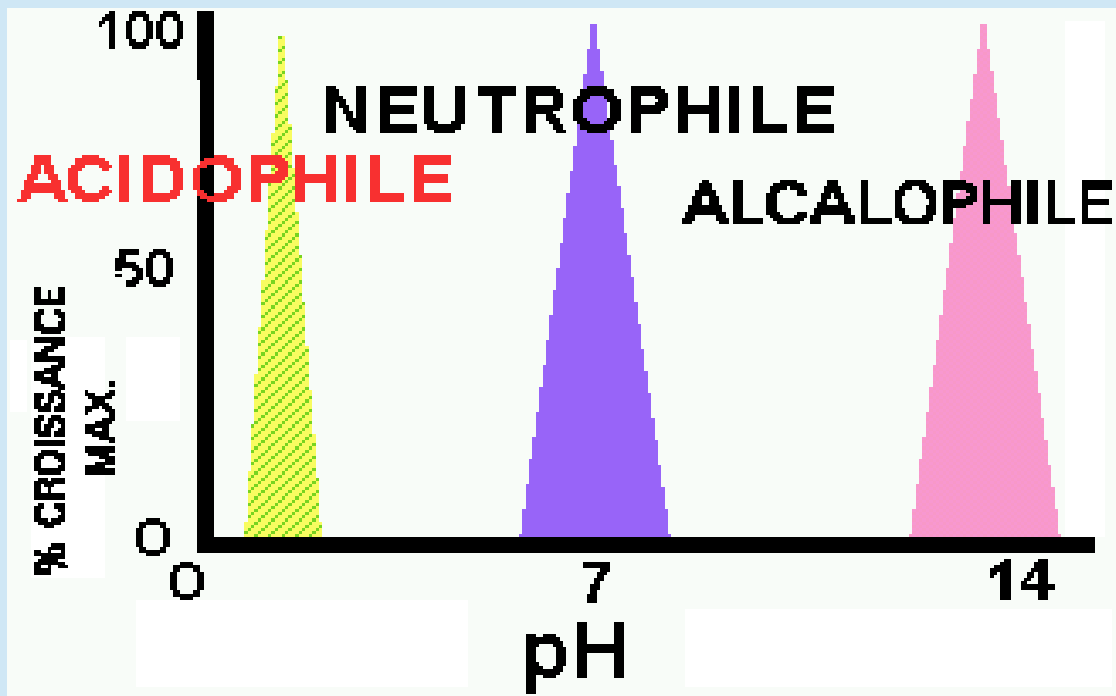
Figure 2.18 Courbes de croissance des microorganismes psychrophiles, mésophiles et thermophiles selon la température



Facteurs physiques pH

- La majorité des bactéries ont une croissance optimale dans un intervalle de pH entre 6.5 et 7.5
- Peu de bactéries se développent à un pH < 4.
Ces bactéries sont dites **acidophiles**.
- Les bactéries peuvent produire durant leur développement des acides qui peuvent les empêcher de croître normalement.
- Pour neutraliser ces acides et maintenir un pH optimal, on ajoute des solutions tampons aux milieux de culture. Ex: tampon phosphate.

pH



- Acidophiles: pH de 1 à 4
- Neutrophiles : pH de 5.5 à 8.5
- Alcalophiles: pH de 8.5 à 11.5

Facteurs physiques Pression osmotique

- Milieu hypotonique ([] plus basse en sel) :
 - eau entre dans la cellule et en provoque l'éclatement
- Milieu hypertonique([] plus haute en sel) :
 - eau sort de la cellule
 - celle-ci se déshydrate
 - plasmolyse

On doit donc cultiver la majorité des bactéries dans un milieu environnant constitué presque exclusivement d'eau.

Pression osmotique

- Bactéries **halophiles** bien adaptées à des [] élevées en sel
Ex. : Staphylococcus aureus peut tolérer une [] de sel de 7.5%
- **Halophiles facultatifs** tolèrent une [] en sel de 2%

Facteurs chimiques
Types nutritionnels
CARBONE

- Autotrophe: utilise le CO_2 comme source de carbone.
- Hétérotrophe: puise le carbone à même une source organique
 - hétérotrophe saprophyte: source organique morte ou en décomposition
 - hétérotrophe parasite : source organique provenant d'hôtes vivants

Types nutritionnels

- Chimioautotrophe : utilise une substance chimique comme source d'énergie et du CO₂ comme source de carbone.
Chimiohétérotrophe : utilise des molécules chimiques organiques comme source d'énergie et de carbone. Ex. : la plupart des bactéries, mycètes et protozoaires.

Types nutritionnels

	Énergie	Carbone
Autotrophe	-	CO ₂
Hétérotrophe	-	Matière organique
Chimioautotrophe	Substance chimique	CO ₂
Chimiohétérotrophe	Molécules chimiques organiques	Molécules chimiques organiques

Facteurs chimiques
Azote, soufre et phosphore

- **Azote**: utilisé par les bactéries pour former le groupement amine des acides aminés de leurs protéines
- **Soufre** : sert à synthétiser les acides aminés contenant du soufre et des vitamines (thiamine)
- **Phosphore**: essentiel dans la synthèse des acides nucléiques et des phospholipides de la membrane cytoplasmique

Oligo-éléments

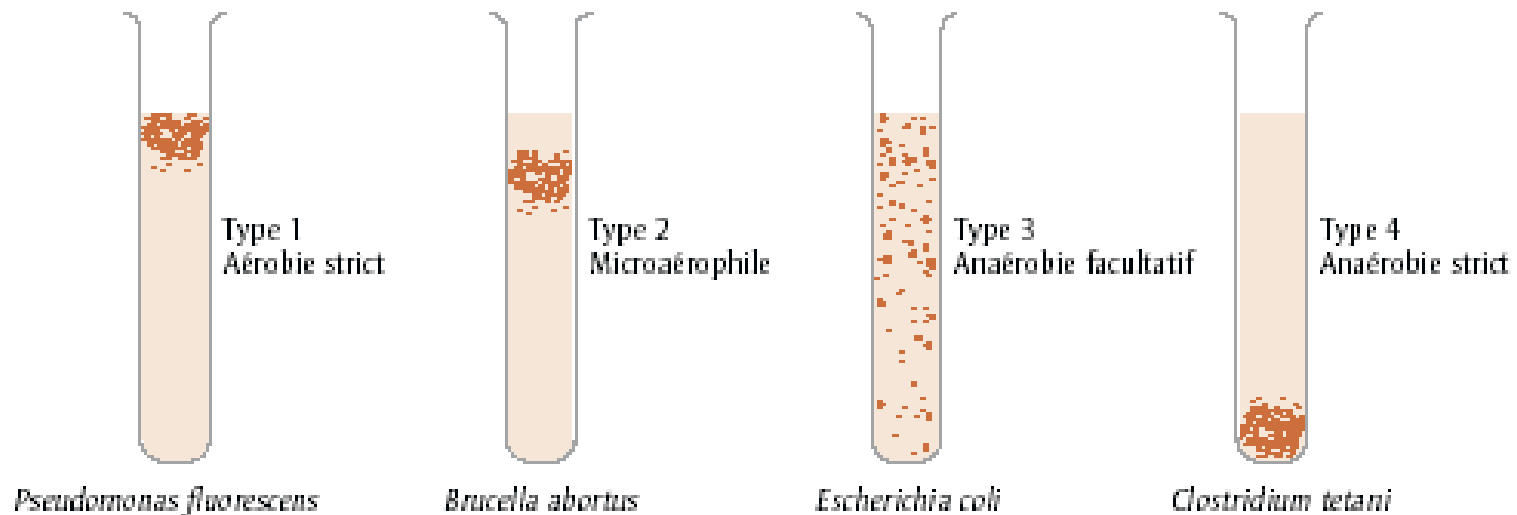
Fer, cuivre, molybdène et zinc

Essentiels au bon fonctionnement de certaines enzymes.

Présents dans l'eau du robinet ou ajoutés artificiellement aux milieux de culture.

Figure 2.19 page 49

Figure 2.19 Types respiratoires microbiens



Les tubes contenant un milieu au thioglycollate sont ensemencés sur toute leur hauteur. Le thioglycollate capture l'oxygène du milieu et le rend inutilisable pour les bactéries.

Une petite quantité de l'oxygène provenant de l'air diffuse dans la partie supérieure du tube et permet la croissance des aérobies stricts et des microaérophiles. Ne contenant pas d'oxygène, le fond du tube permet le développement des anaérobies stricts. Les microorganismes anaérobies facultatifs se développent sur toute la hauteur du tube.

Facteurs chimiques Besoins en oxygène

- 4 types respiratoires:
- Aérobie stricts : présence d'oxygène essentielle
- Anaérobies facultatifs : croissance optimale en présence d'oxygène mais se développent bien sans.
- Anaérobies strictes: absence totale d'oxygène
- Micro aérophiles : se développent en présence d'oxygène mais à une concentration inférieure à celle de l'air.

Facteurs organiques de croissance

Composés organiques dont un microorganisme a besoin mais qu'il ne peut synthétiser lui-même.

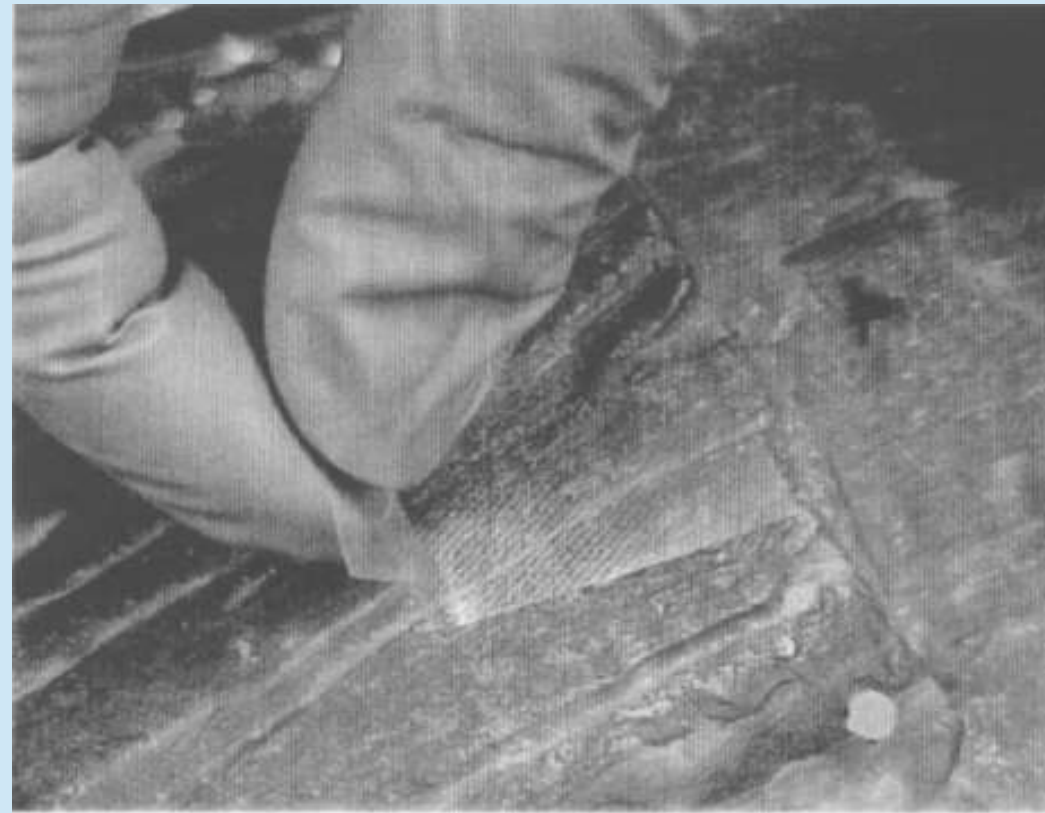
Ex : vitamines (coenzymes)

acides aminés

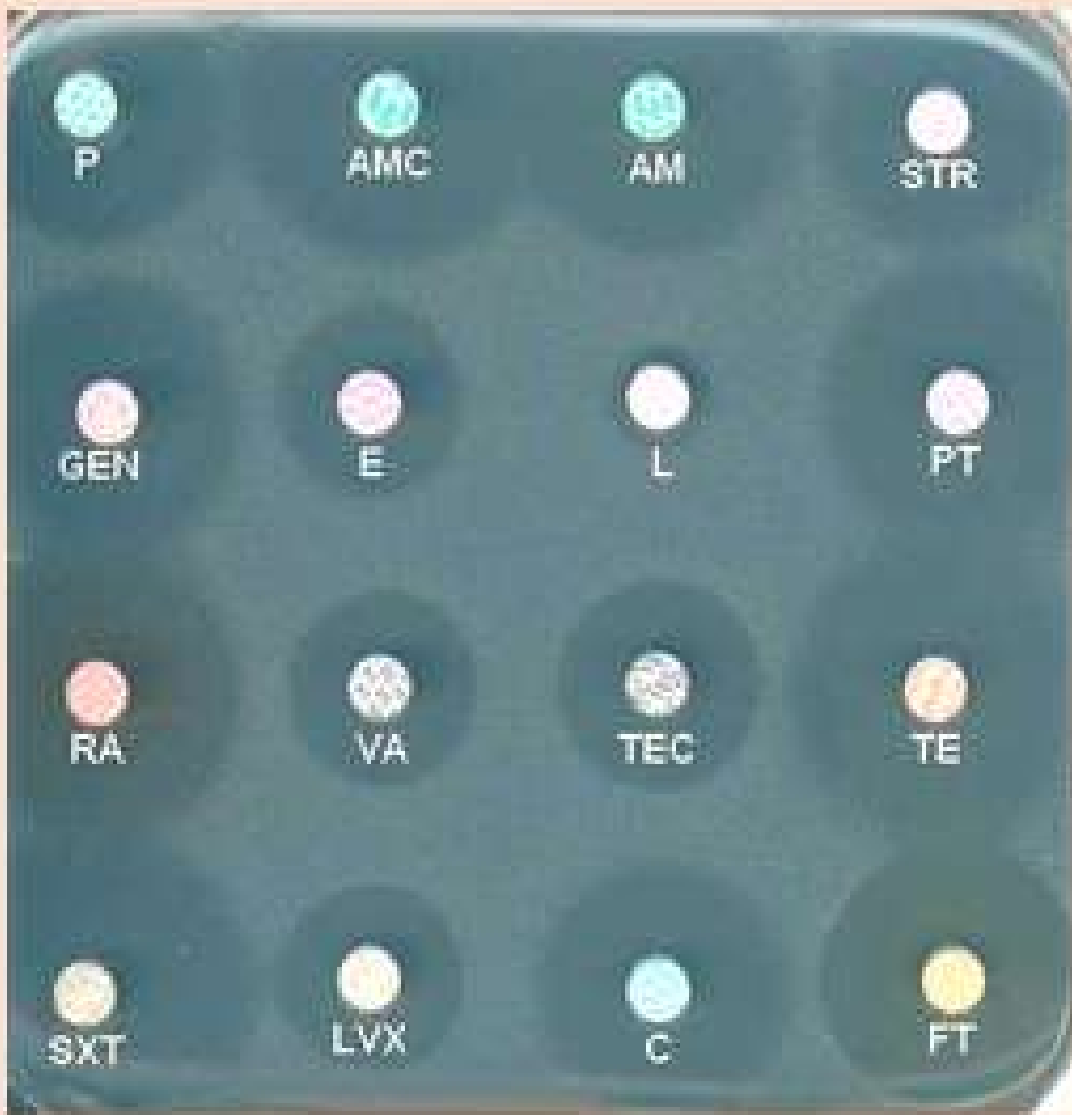
API 20A-bacteroides fragilis



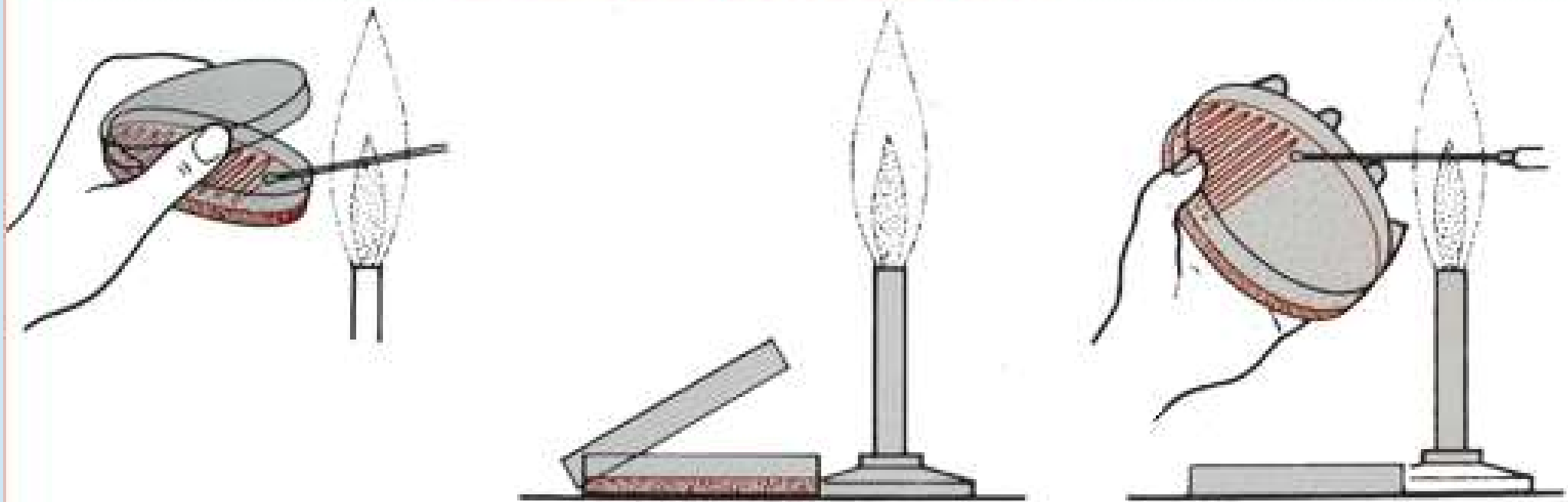




Analyse de la surface d'une viande

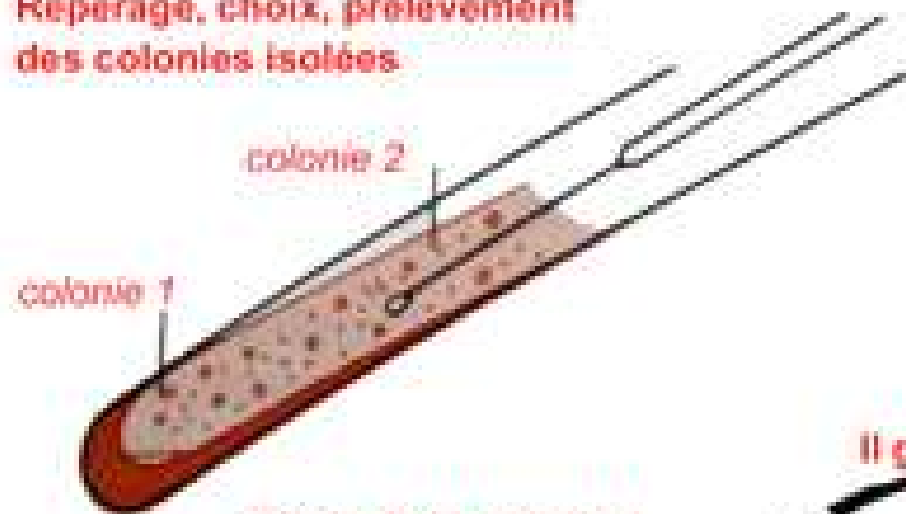


TENUE DE LA BOITE DE PETRI



PURIFICATION

Repérage, choix, prélèvement
des colonies isolées



Choix de la colonie 1

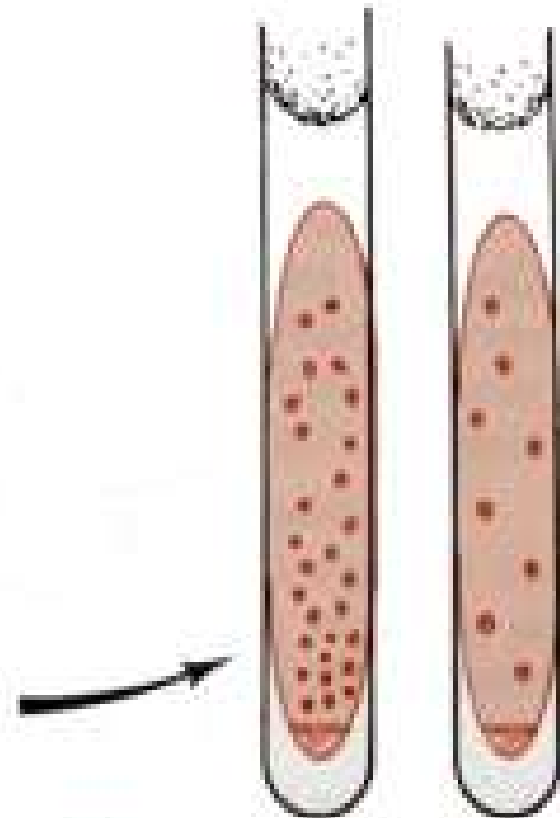


Suspension

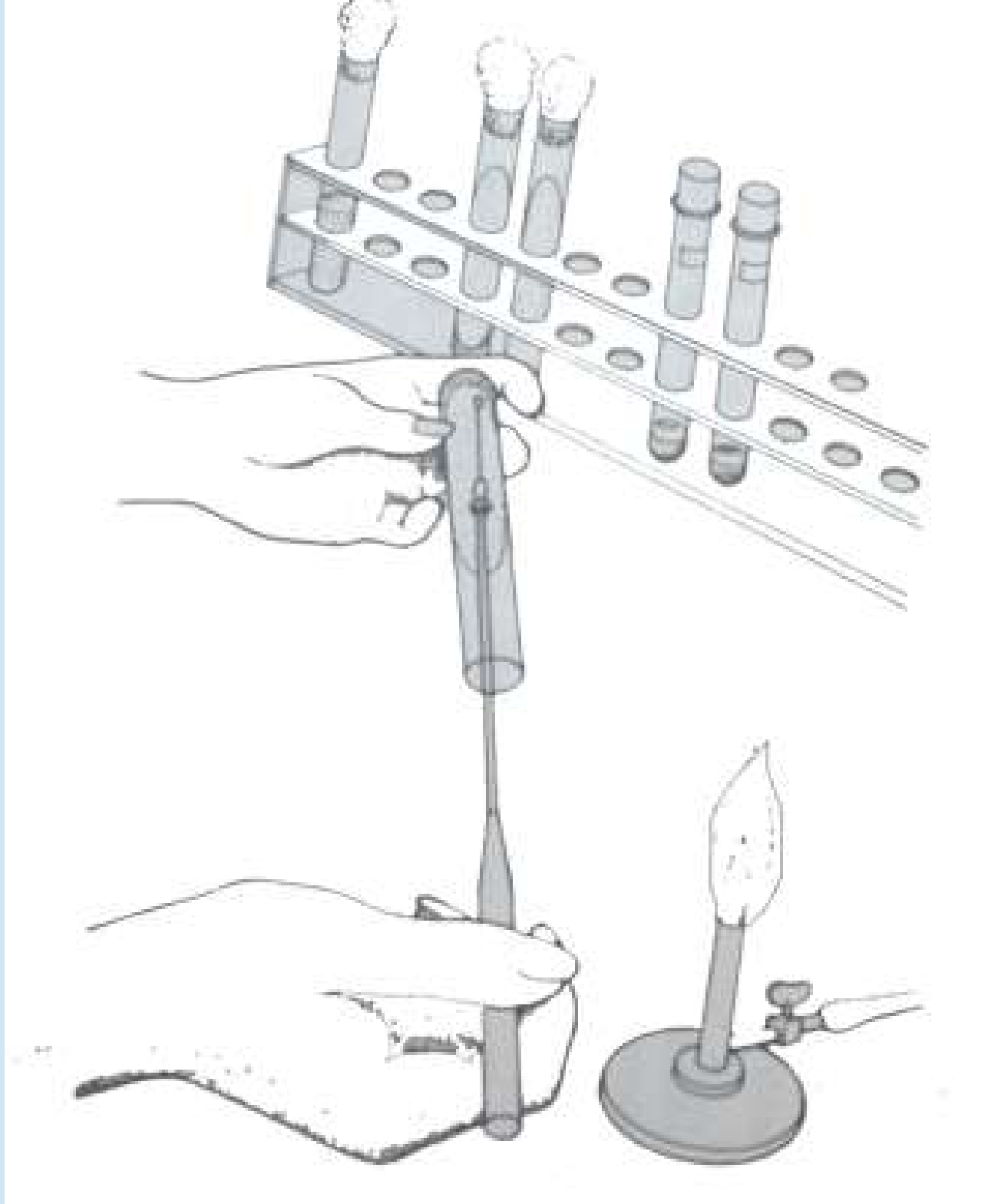
11 gouttes

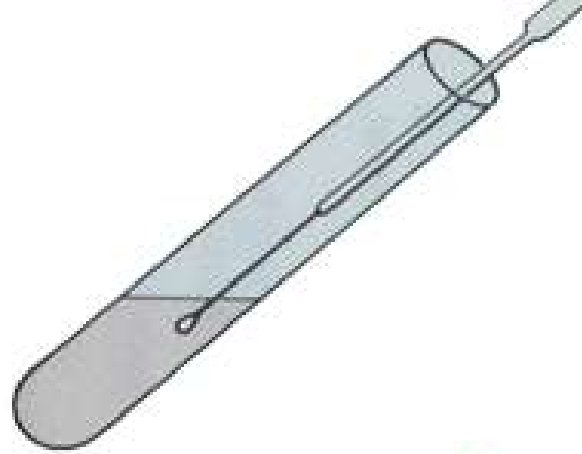


Dilution

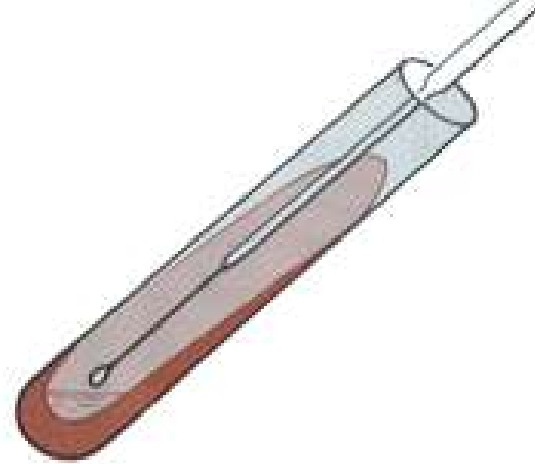


Culture pure de bactéries
donnant des colonies de type 1



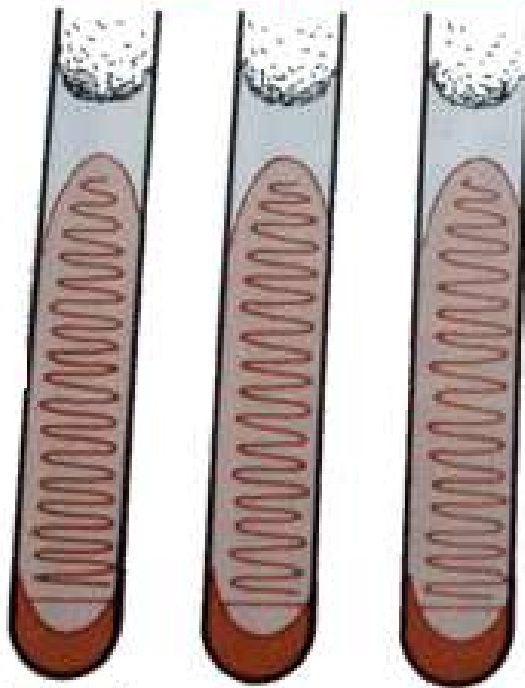


1 Charger l'anse

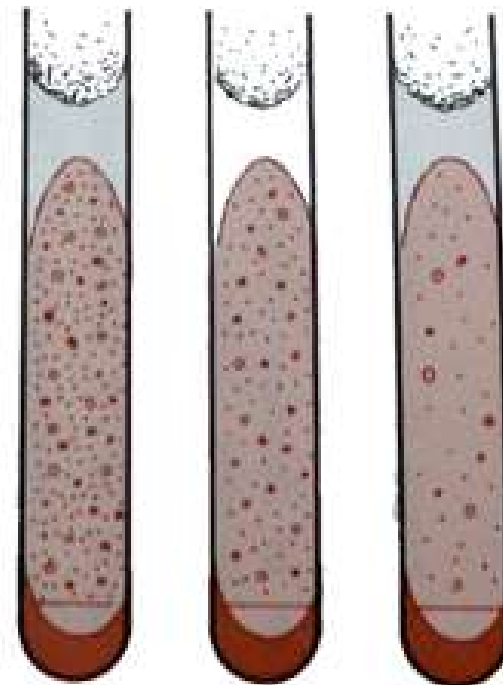


2 Introduire l'anse dans le 1er tube à 1 cm de l'eau de condensation
Faire d'un bord à l'autre des stries très serrées

3 isolement en tubes

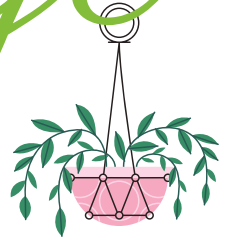


Faire des stries serrées sans recharger l'anse



4 Aspect après 24 Heures d'étuve

Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

