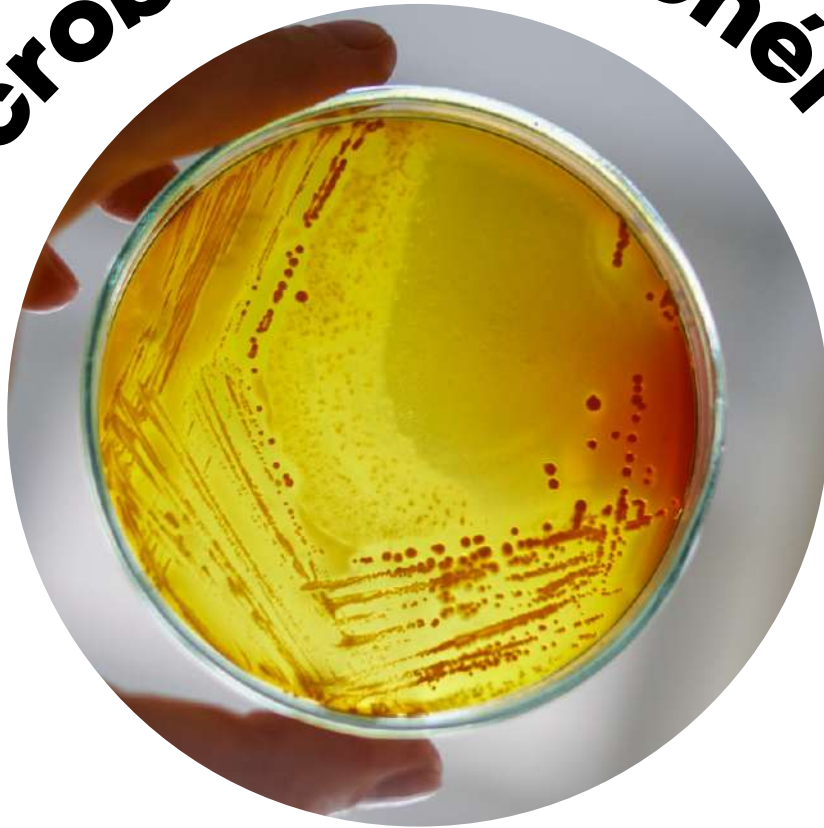


# Microbiologie Générale



SCIENCES DE LA  
VIE



## Shop



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



## Etudier



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) 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

# Microbiologie générale

## SVI. (S3)

### Travaux pratiques/Séance 1

### 2016-2017



# INITIATION A LA MICROBIOLOGIE

## BUT

- ✓ Apprendre à **manipuler** dans les conditions d'**asepsie**,
- ✓ apprendre à **cultiver** les microorganismes
- ✓ connaître les techniques usuelles d'**ensemencement**

# INITIATION A LA MICROBIOLOGIE

## 1. GENERALITES

- 1.1. Matériel de la salle de travaux pratiques de microbiologie
- 1.2. Milieux de culture
- 1.3. Stérilisation

## 2. MANIPULATION ASEPTIQUE

## 3. TECHNIQUES D'ENSEMENCEMENT

- 3.1. Inoculation à la surface d'une gélose inclinée
- 3.2. Ensemencement par la méthode des stries

## 4. ISOLEMENT DE SOUCHES MICROBIENNES PAR SELECTION

## 5. INCUBATION

# 1. GENERALITES

## 1.1. Matériel de la salle de travaux pratiques de microbiologie

- Four Pasteur ou Poupinel
- Autoclave électrique automatique
- Etuve bactériologique ou incubateur thermostaté
- Bain-marie thermostaté
- Hotte à Flux laminaire
- Bec Bunsen

# Four Pasteur ou Poupinel



**Stérilisation** de **matériel** (objet de **verrerie** ou de **porcelaine**) pouvant tolérer des températures de **180°C** pendant 30 min

# Autoclave électrique automatique



- **stérilisation** du matériel (verrerie, milieux de cultures, ...)
- **décontamination** du matériel après analyse,,

# Etuve bactériologique ou incubateur thermostaté



**Incubation** des **cultures bactériennes** ; **maintien** des cultures à leur **température optimale** de développement pendant un temps déterminé.

# Bain-marie thermostaté



- **Incubation** de cultures
- **Fusion** de milieux gélosés ou leur maintien en surfusion ...

# Hotte à Flux laminaire

**Moteur (ventilateur) :**  
aspiration et recyclage  
de l'air.

**Filtre absolu en sortie :**  
stérilisation de l'air sortant  
(protection de l'environnement).

**Filtre absolu principal de même  
dimension que le plan de travail :**  
stérilisation de l'air soufflé sur  
le plan de travail (protection de  
la manipulation) .

**Ecran de façade en verre  
sécurité**

**Plan de travail en acier  
inoxydable (eau de Javel  
interdite)**

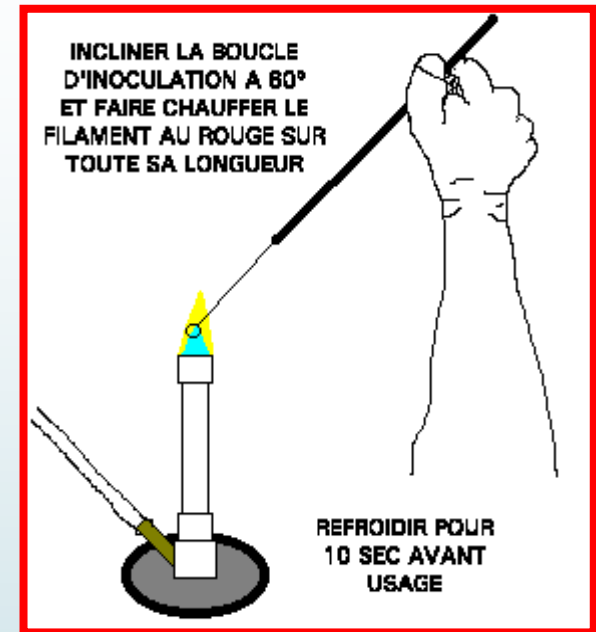
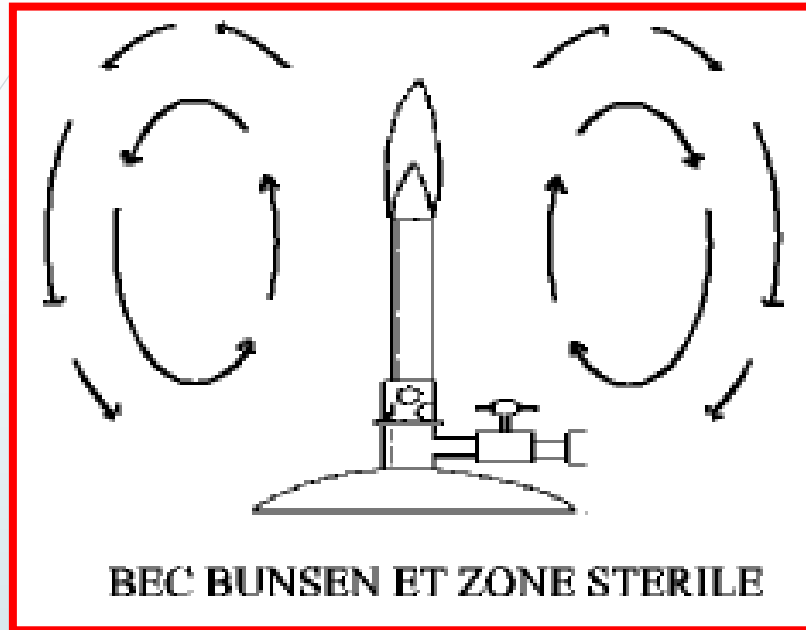
**Air contaminé aspiré sous  
le plan de travail (35 %).**

**Grilles en périphérie.**

SCHEMA DE PRINCIPE D'UN PSM DE TYPE II

PSM: poste de sécurité microbiologique

# Bec Bunsen



- Travail en **zone stérile** autour de la flamme réglée avec le cône bleu
- **stérilisation** des  **fils et anses** en métal.

## 1.2. Milieux de culture

Un milieu de culture doit satisfaire à toutes les **exigences nutritives** des micro-organismes :

- apport de la source d'énergie, de C, N, P .....
- besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance;
- pH et force ionique voisins des valeurs optimales.

## Les milieux de culture se présentent sous forme :

### \* Selon la consistance

- liquide (bouillon)
- solide (gélose)
- semi-solide (gélose molle)

### \* Selon la composition

- milieu complexe ou empirique
- milieu synthétique
- milieu semi-synthétique

### \* Selon utilisation

- milieu usuel, ordinaire
- milieu enrichi
- milieu sélectif
- milieu différentiel ou d'identification

# Quel milieu utilisé ?

Qu'est ce que je veux faire ?

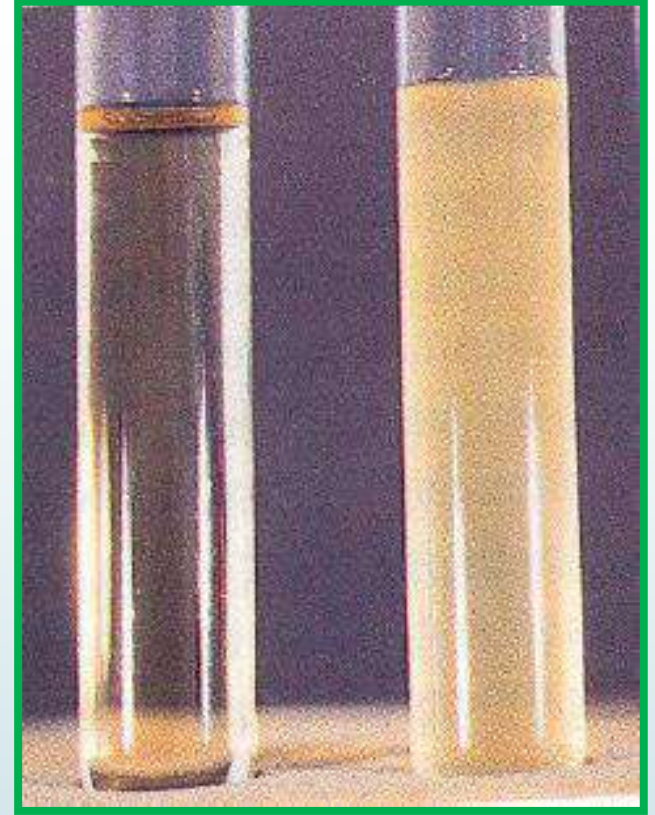
J'ai une souche pure

- multiplication
- conservation
- purification
- Identification

J'ai un mélange polymicrobien

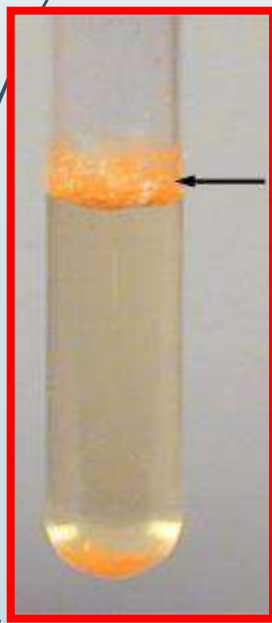
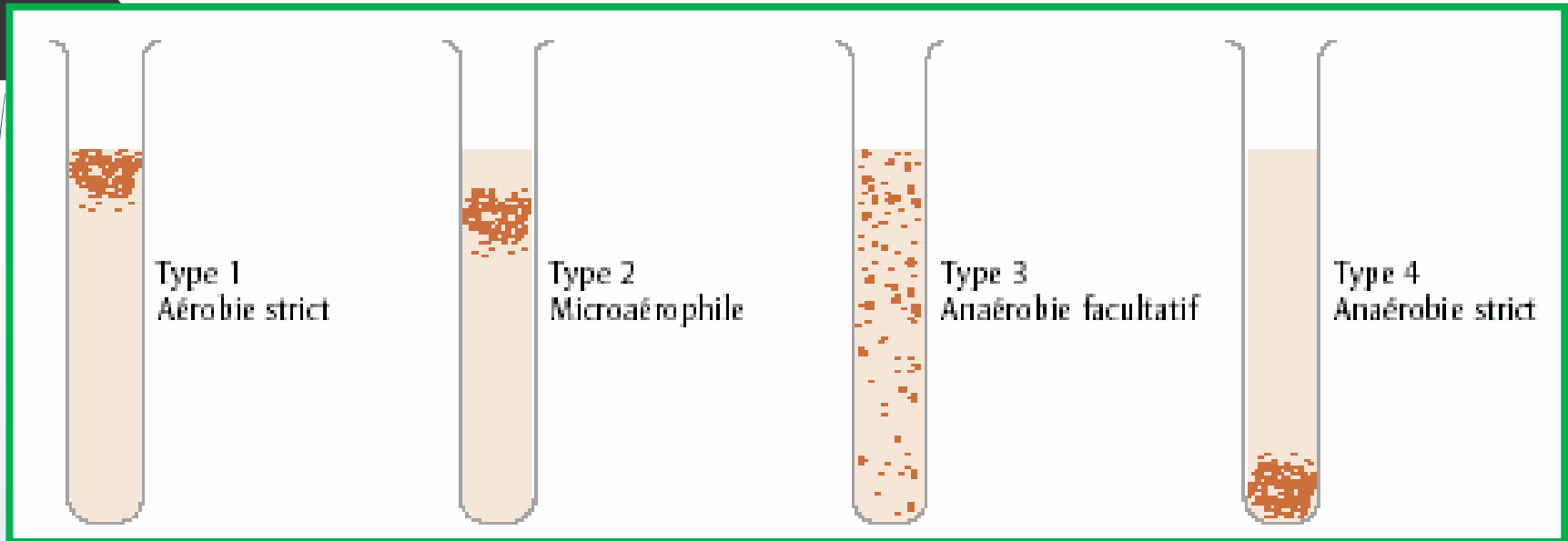
- Sélection d'une espèce particulière
- Multiplication de toute la population

# Croissance en milieux de culture liquides

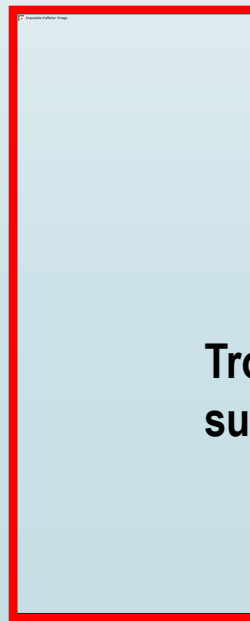


Dans un bouillon la croissance microbienne s'exprime par l'apparition de **trouble** ou **opalescence** mais l'aspect varie selon les espèces.

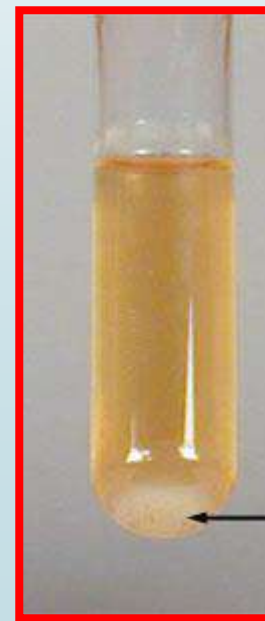
# Croissance dans un bouillon nutritif



Voile ou  
Pellicule

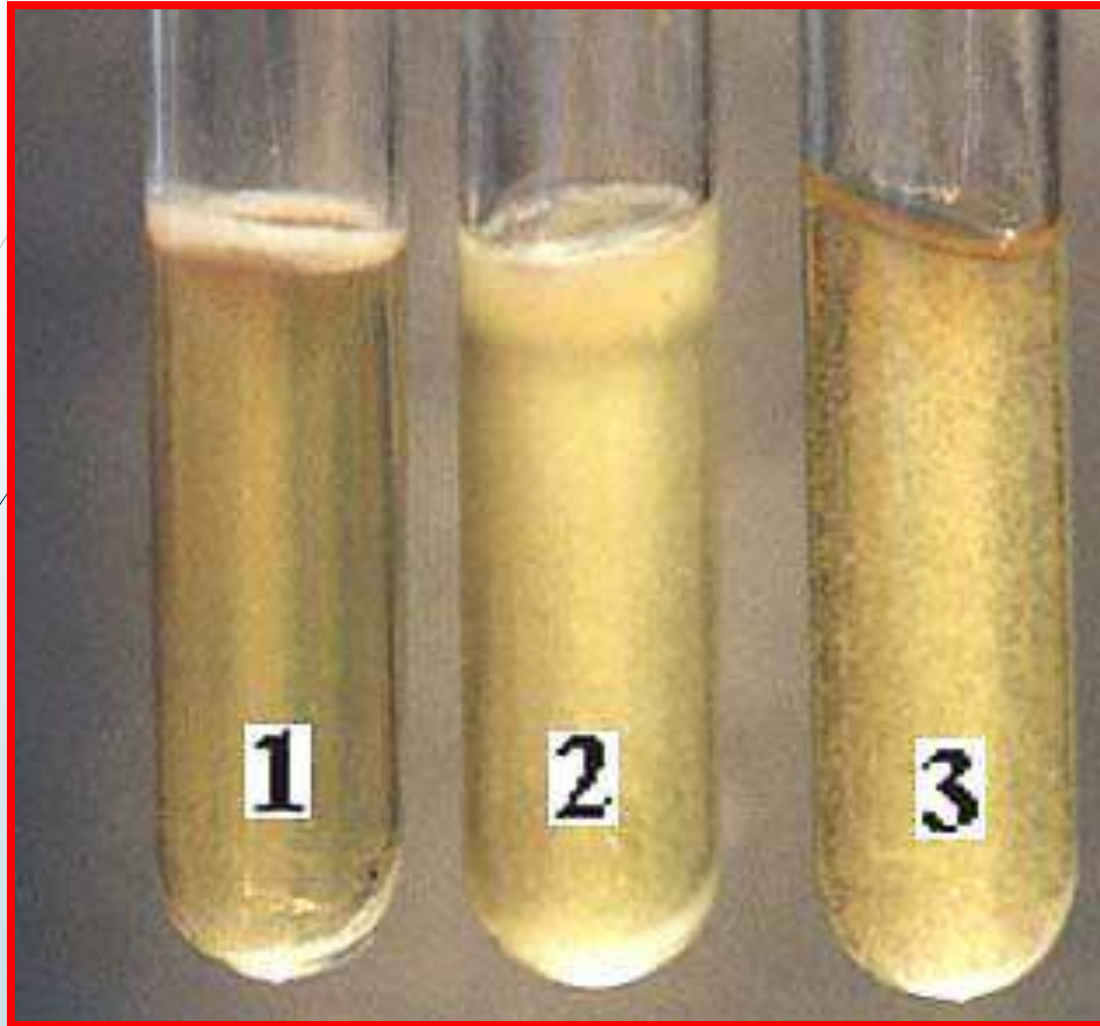


Trouble  
suspension



Sédiment  
Culot

# Croissance dans un bouillon nutritif



**Aérobie  
strict**

**Aéro-anaérobie  
facultatif**

**Anaérobie  
facultatif**

## Comment obtenir un milieu de culture solide ?

- Les milieux de culture liquides peuvent être gélifiés par addition d'Agar, substance extraite d'algues.
- L'Agar se dissout dans l'eau à 100°C, et peut être maintenu en surfusion à des températures supérieures à 46°C.
- En dessous de cette température on obtient un gel plus ou moins solide selon la concentration en agar.

# Milieu de culture solide



Le conditionnement des milieux de culture se fait dans des récipients en verre pyrex neutre ou en plastique (tubes à essai, flacons, boîtes de pétri).

# Le milieu **solide** permet l'obtention de **colonies**

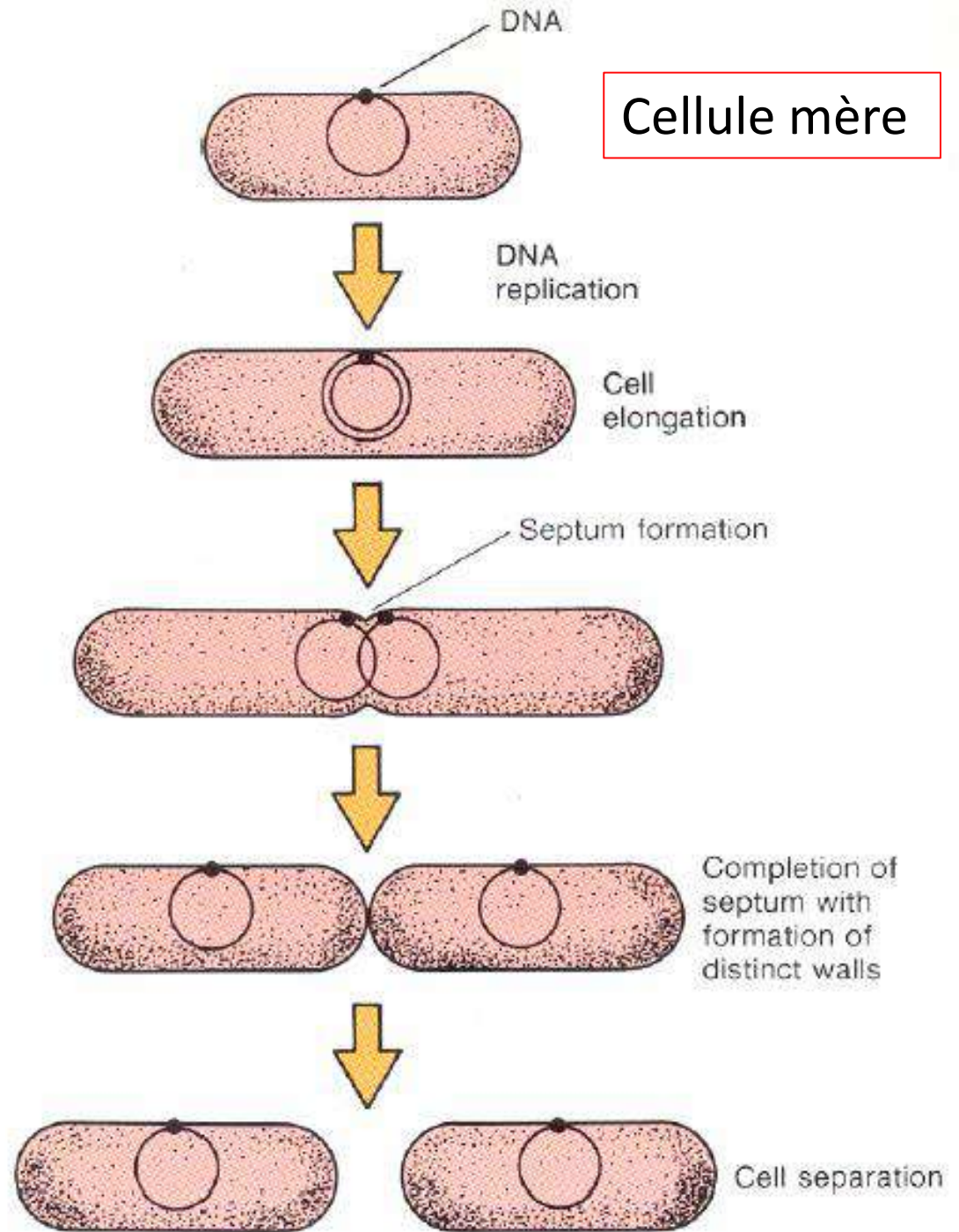


Il permet ainsi

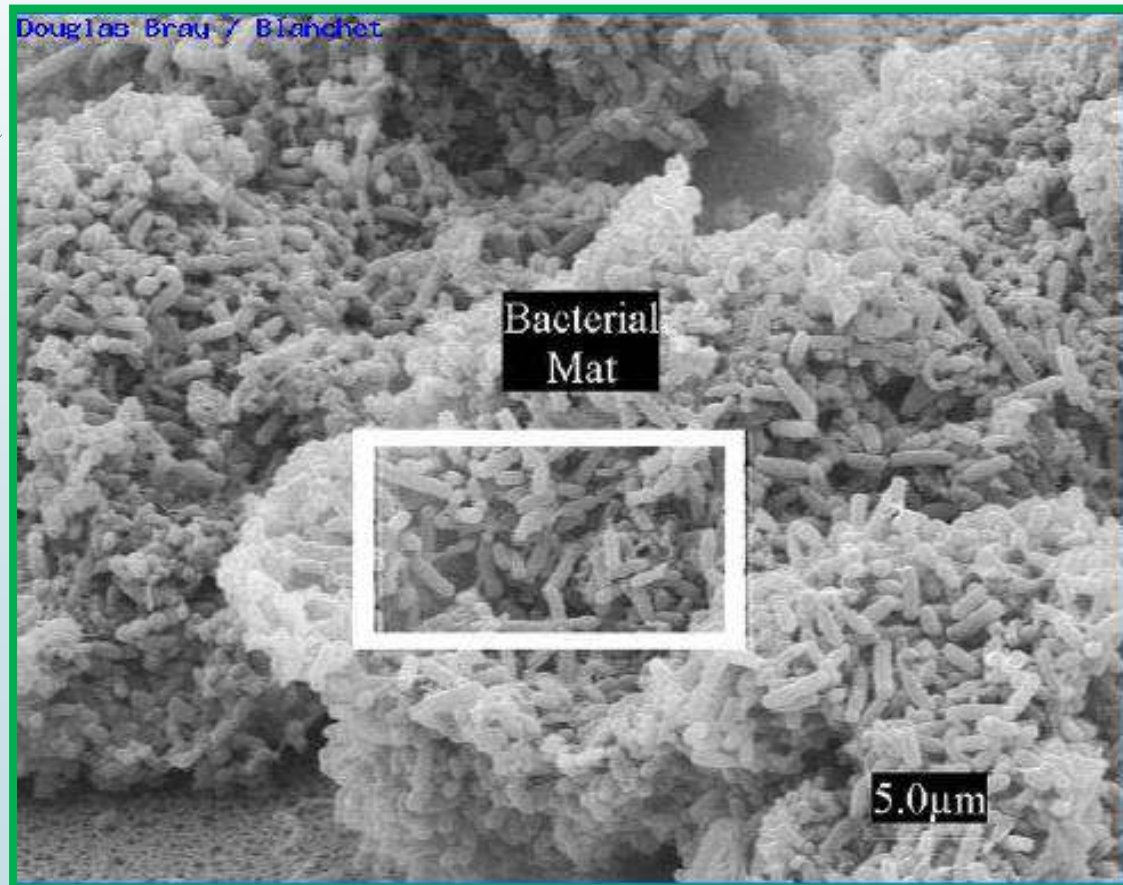
- Multiplication
- Isolement
- **Purification**
- **Identification**

# Division /multiplication bactérienne

Cellules filles



# Formation d'une colonie bactérienne



# Préparation des milieux de culture

## Gélose nutritive

|                    |         |        |                            |
|--------------------|---------|--------|----------------------------|
| Peptone            | 5 g     |        |                            |
| Extrait de viande  | 1 g     |        |                            |
| Chlorure de sodium | 5 g     |        |                            |
| Agar               | 15 g    |        |                            |
| Eau distillée      | 1000 ml | pH 7,4 | Stériliser 20 min à 120 °C |

## Bouillon nutritif

|                    |         |        |                            |
|--------------------|---------|--------|----------------------------|
| Peptone            | 5 g     |        |                            |
| Extrait de viande  | 1 g     |        |                            |
| Chlorure de sodium | 5 g     |        |                            |
| Eau distillée      | 1000 ml | pH 7,4 | Stériliser 20 min à 120 °C |

## 1.3. La Stérilisation

- Milieux de culture et Matériels ne sont utilisés que s'ils sont biologiquement **stériles**  $\Rightarrow$  ne contiennent aucune forme de microorganisme revivifiable (spore).
- On peut distinguer plusieurs agents stérilisants :

## 1. Agent thermique

### - Chaleur humide

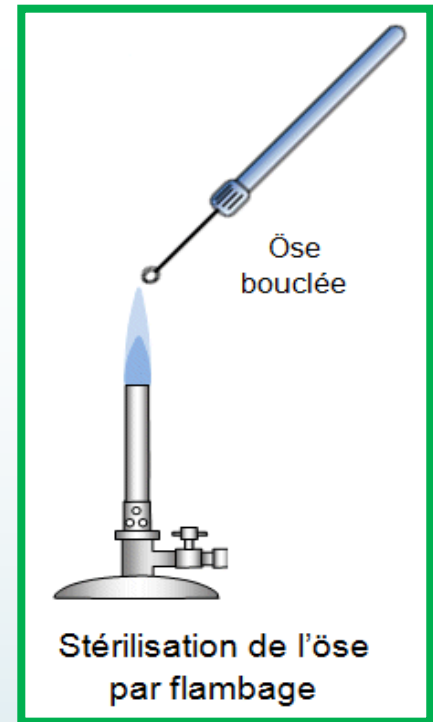
Chauffage sous pression de vapeur d'eau, réalisée dans un **autoclave**.



## 1. Agent thermique

### - Chaleur sèche

Incinération ou **flambage** : pour l'aiguille à ensemencer ou pipette Pasteur.



Stérilisation au **four Pasteur** :  
essentiellement pour les récipients en verre, portés 1h à 170°C ou 90 mn à 160°C.



## 2. Agent physique

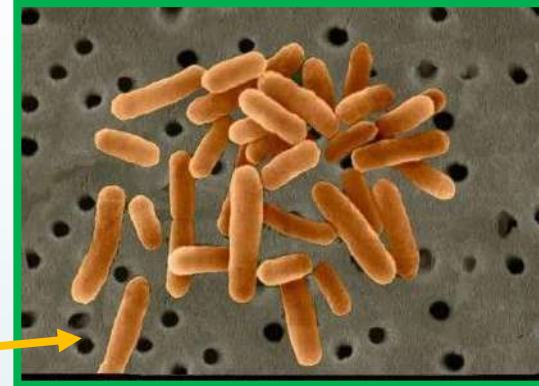
Stérilisation aux rayons **U.V** qui sont **germicides**, ils sont utilisés pour les lieux de travail, les hottes à flux laminaire.

Les **U.V** sont utilisés en l'absence du personnel, car irritants pour les yeux et cancérigènes pour la peau.



### 3. Agent mécanique

Pour les substances liquides **thermosensibles** (détruites par la chaleur), telles les **vitamines** on utilise la **filtration**, les substances à stériliser sont passées au travers d'une **membrane filtrante**, présentant des pores calibrés.



### 3. Agent chimique

Pour le **petit matériel** et les **surfaces** de travail :

eau de javel, formol, alcool, .. etc





## **2. MANIPULATION ASEPTIQUE**

# Avant la mise en culture

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



Laver soigneusement les mains avec un antiseptique (alcool) Laisser sécher.



Désinfecter le plan de travail avec un chiffon imbibé d'eau de javel (désinfectant)



# POSTE DE TRAVAIL

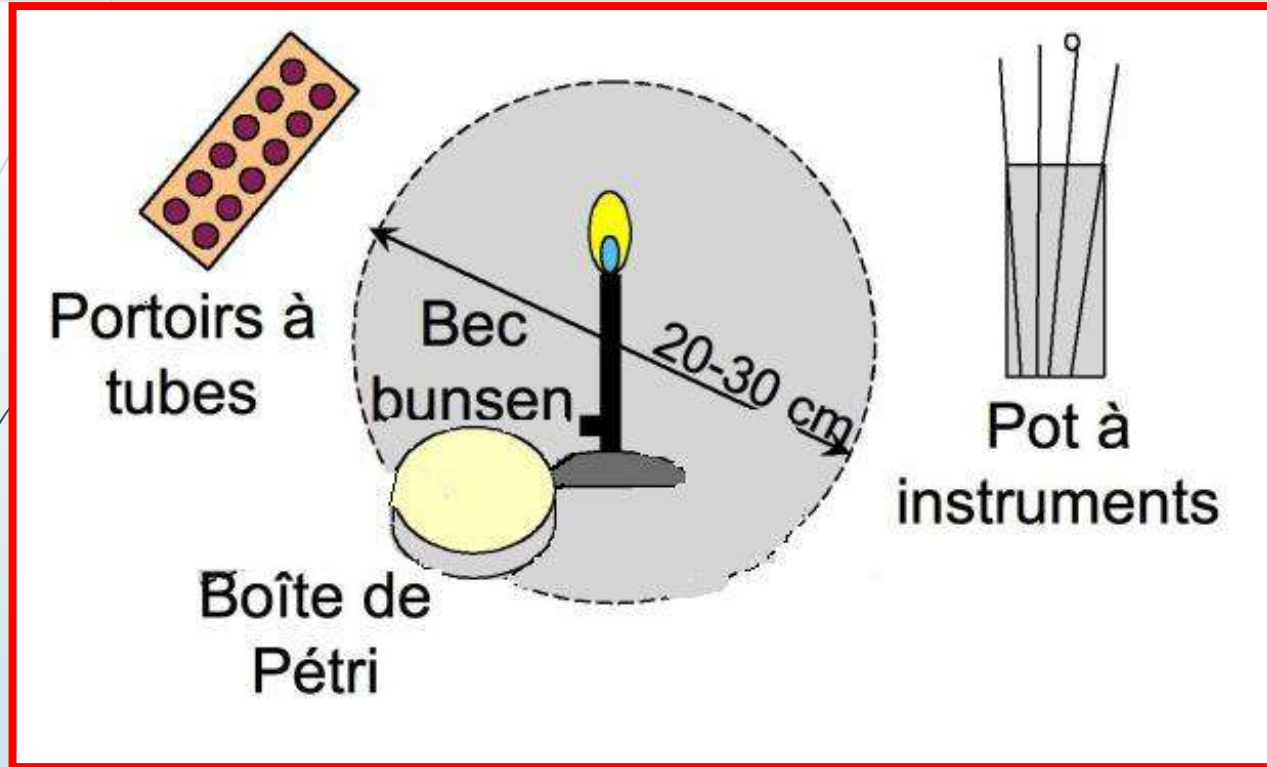
## Disposition du matériel (pour **un droitier**)



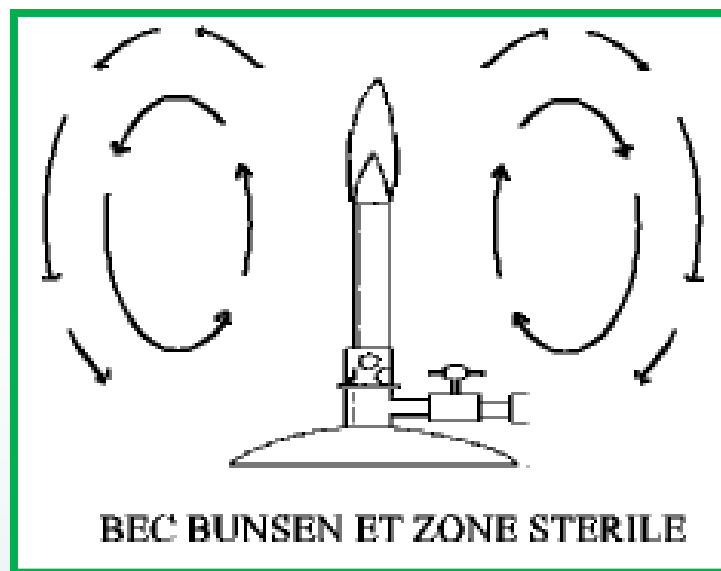
Placer le bec bunsen au centre du plan de travail et allumer le, pour permettre **l'asepsie de l'air**.

# POSTE DE TRAVAIL

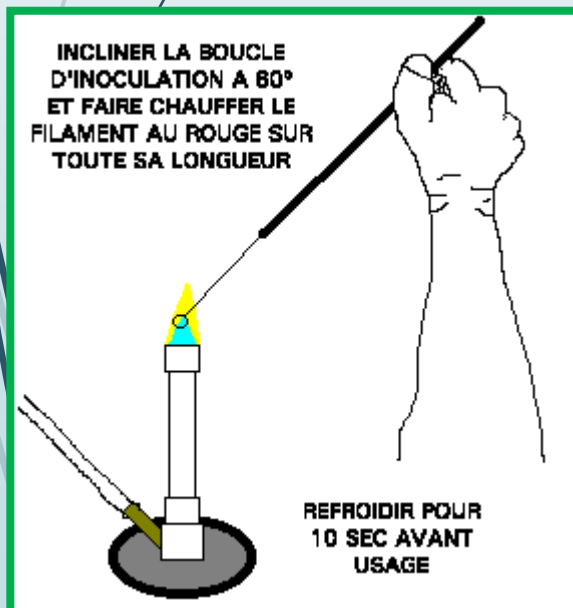
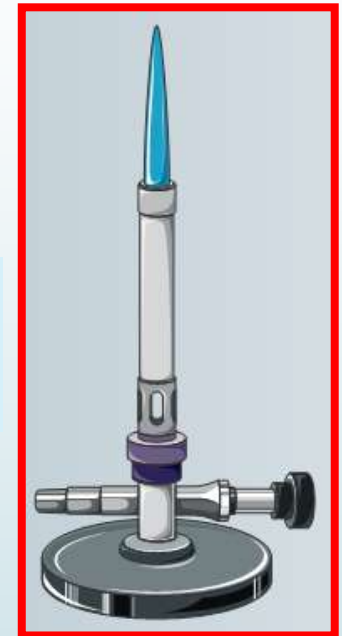
## Disposition du matériel (pour un droitier)



- Disposer dans la zone stérile (cercle d'une vingtaine de cm de rayon autour du bec bunsen) le matériel à utiliser .
- Laisser toujours le matériel stérile dans le rayon de 20 cm autour du bec bunsen.



- Travail en **zone stérile** autour de la **flamme** réglée avec **le cône bleu**



- **stérilisation** des **fil** et **anses** en **métal**.

# Consignes de sécurité

- Faire attention pour ne pas se brûler avec la flamme du bec bunsen ;
- Ne pas toucher la partie de l'öse qui sera en contact direct avec les germes et ne pas la poser directement sur la table sans stérilisation ;
- jamais toucher les colonies bactériennes avec les doigts ;
- Eviter de bouger brusquement et de parler pour ne pas projeter de micro-organismes ;
- Ne pas porter les mains à la bouche, ni aux yeux ;
- Se laver les mains avant de sortir du laboratoire

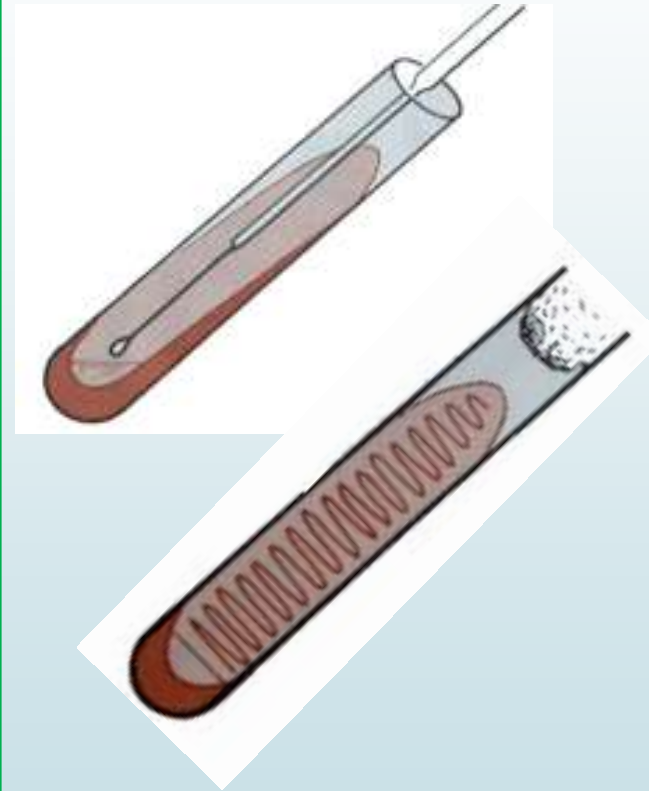
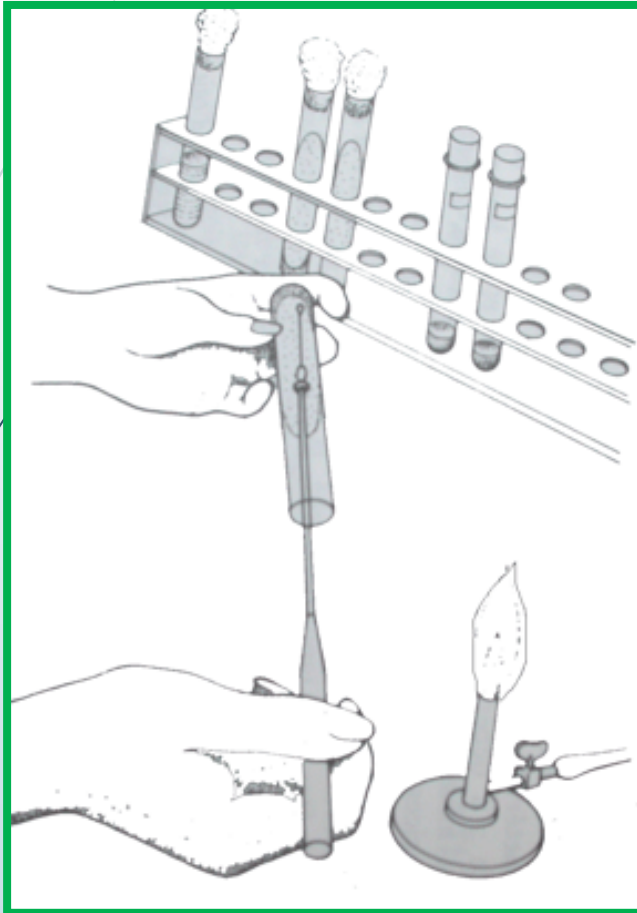
# 3. TECHNIQUES D'ENSEMENCEMENT

- Tout travail de bactériologie exige l'assurance que les souches utilisées soient pures
- proviennent d'un clone (ou colonie) issu d'une seule bactérie mère.
- L'isolement qui a pour but d'isoler des clones est donc primordial.

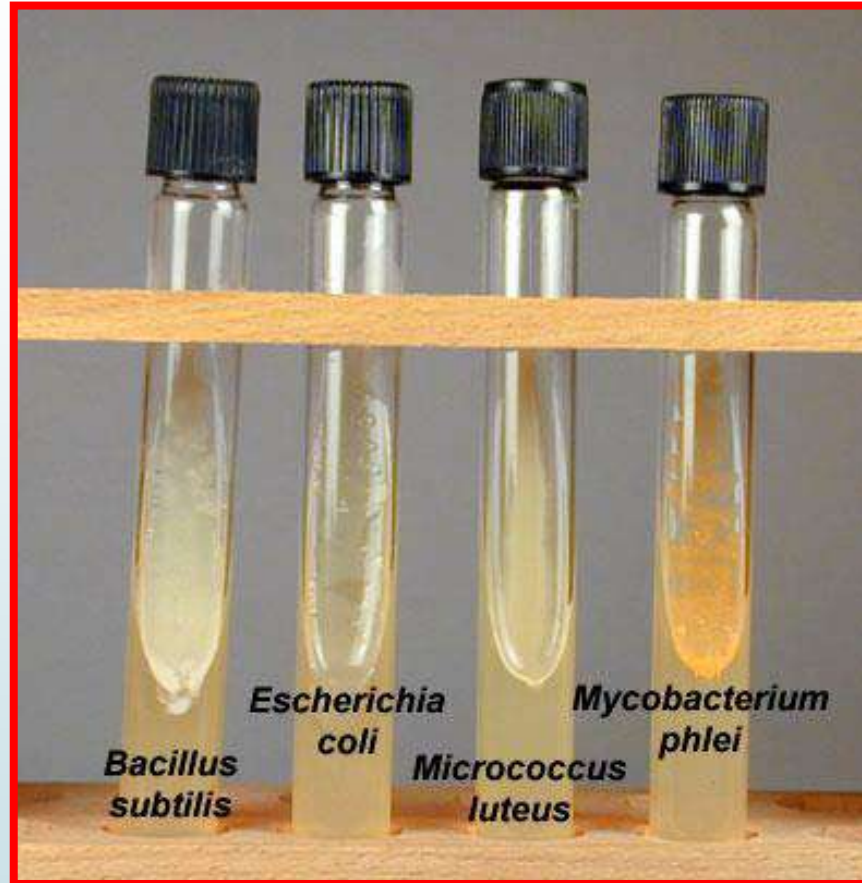
## L'ensemencement

prélever des germes à partir d'une source de micro-organismes et les déposer dans un milieu neuf (stérile) liquide ou solide.

# 1. Inoculation à la surface d'une gélose inclinée



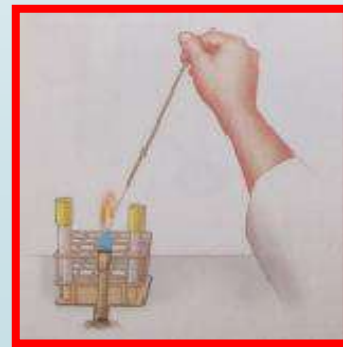
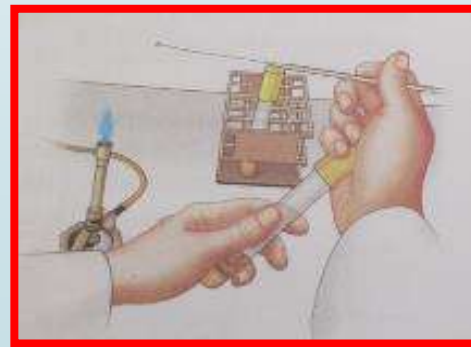
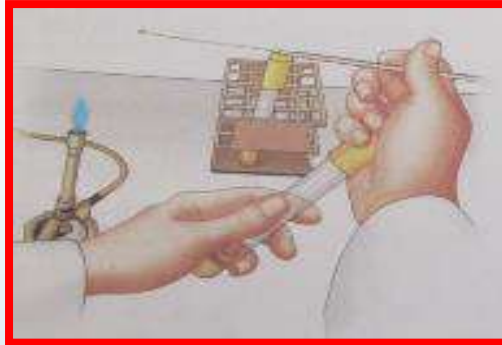
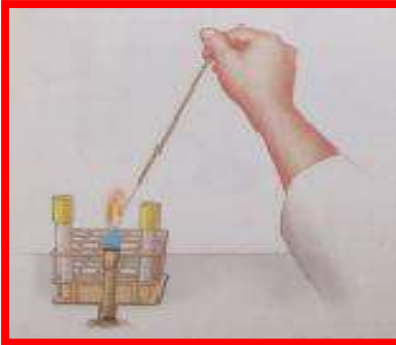
# Gélose inclinée



Pour les souches pures :

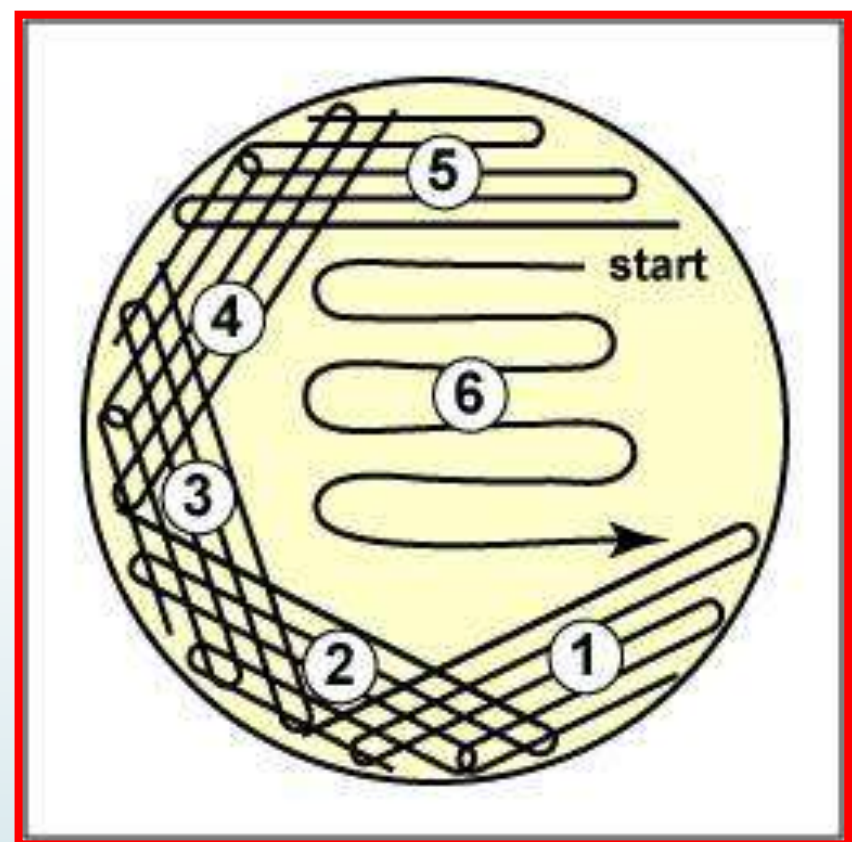
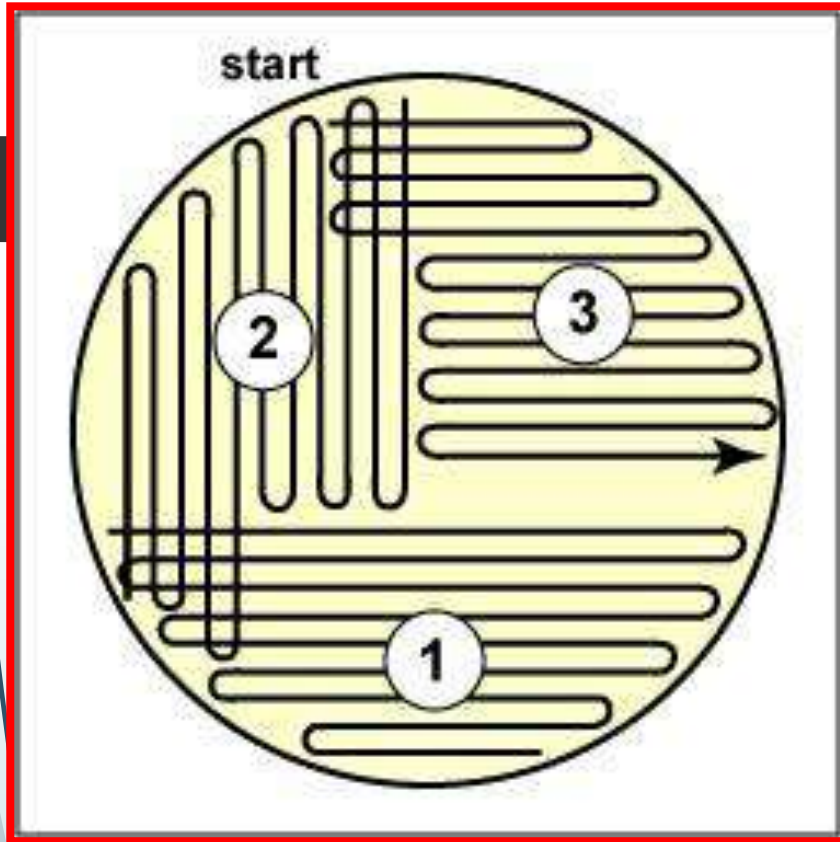
- Conservation
- Tests biochimique pour identification

# Les étapes pour prélever un inoculum à partir d'une culture liquide



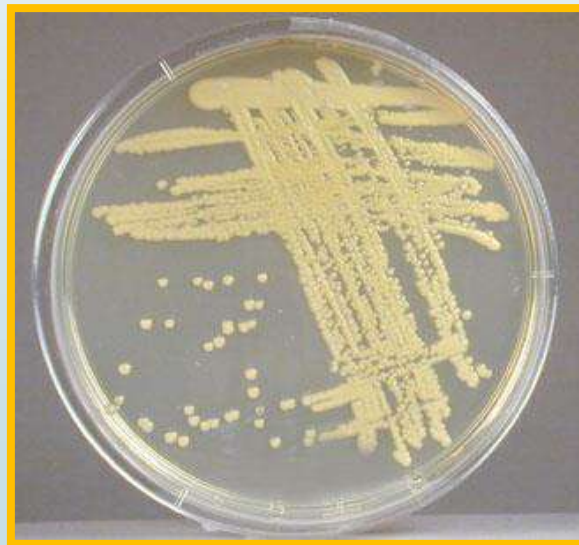
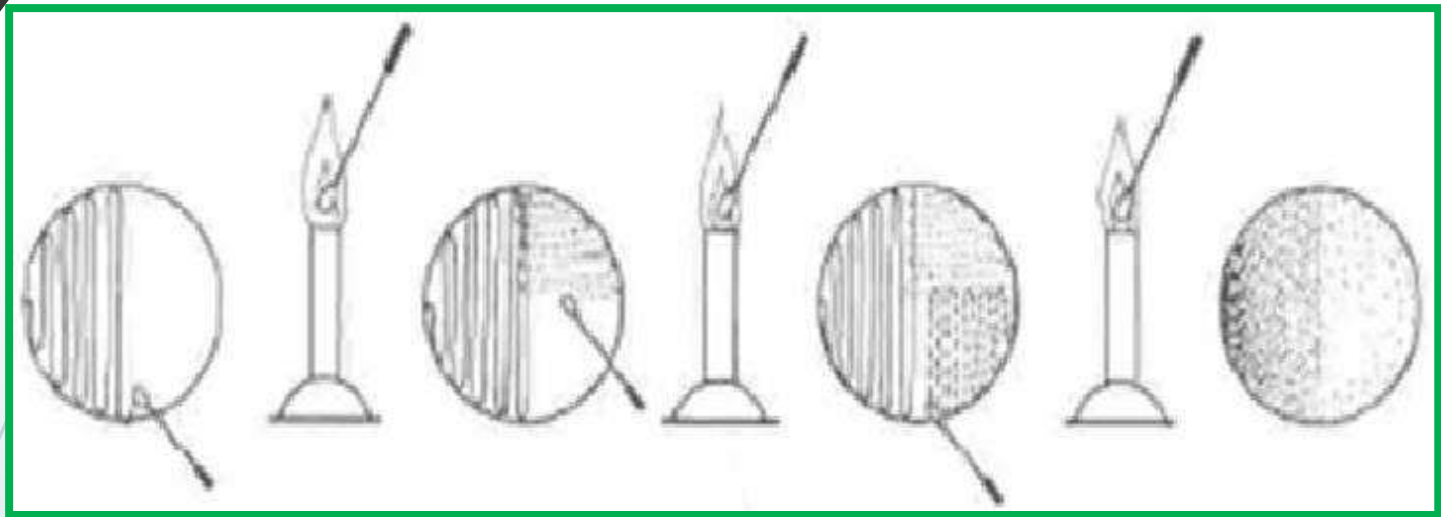
## 2. Ensemencement par la méthode des stries

- Pour **étudier** les microorganismes, il faut les **isoler** et en faire une culture pure.
- La méthode des **stries** est **une technique d'isolement et purification.**



Ensemencement par **épuisement**  
 Ensemencement par **stries**  
 Méthodes des **cadrans**

# Ensemencement par la méthode des stries



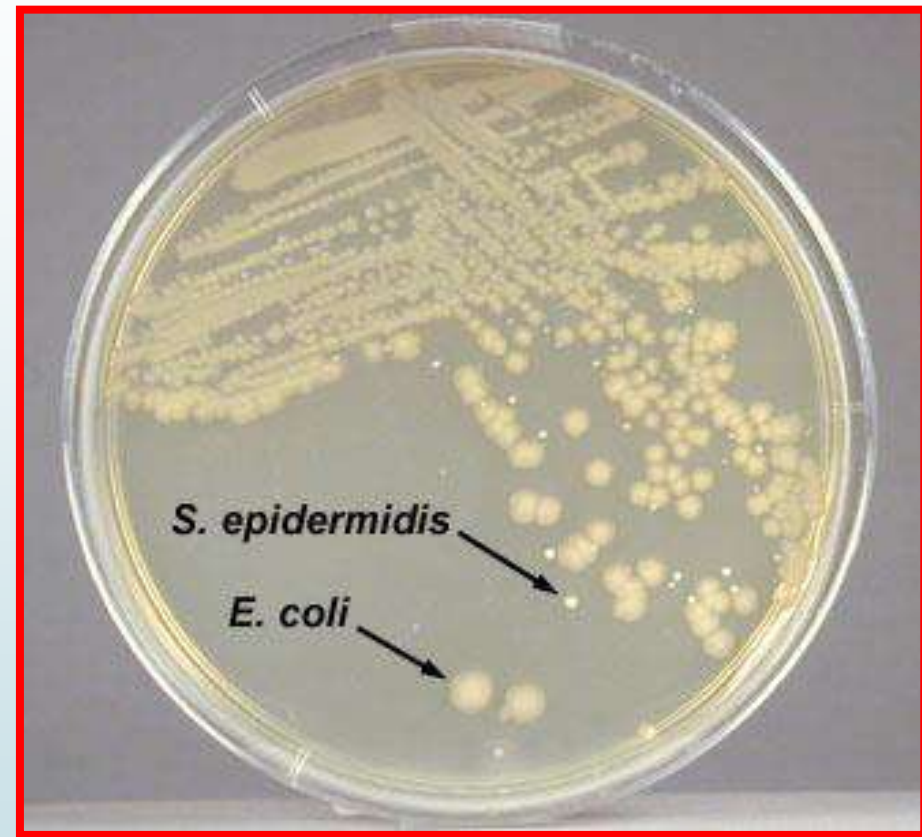
## Isolement des colonies sur milieu solide

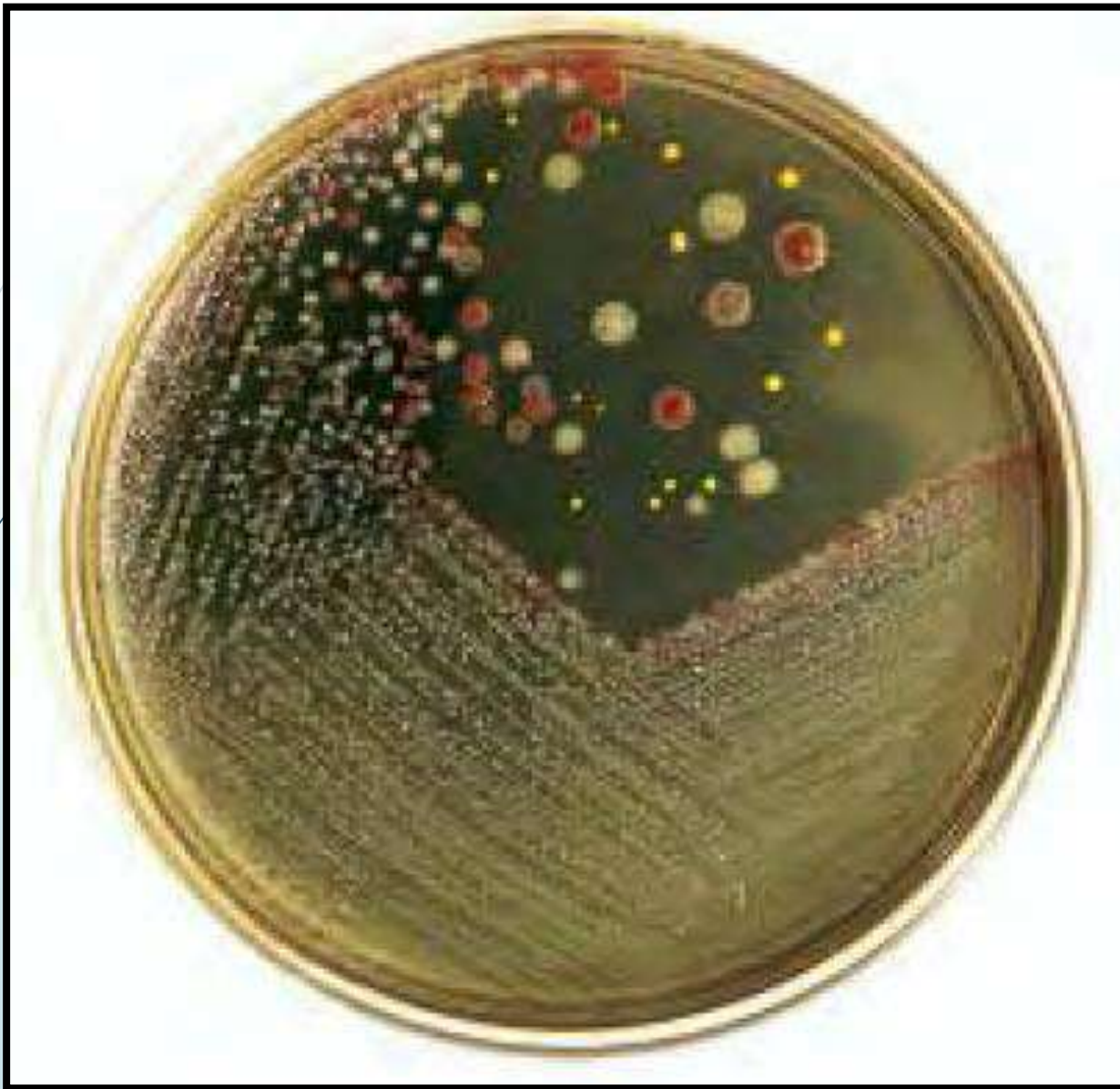


*Bacillus subtilis*



*Staphylococcus aureus*





## 4. ISOLEMENT DE SOUCHES MICROBIENNES PAR SELECTION

Pour montrer la présence d'un type de **micro-organisme particulier** dans une **population microbienne** ou dans un prélèvement pathologique, il faut modifier les conditions de culture de façon à **favoriser** la croissance du **germe recherché** et à **inhiber** les germes qui lui sont **associés**.



On utilise en général deux types de milieux.

- **Milieu sélectif** : ne permettant la croissance que d'une espèce bactérienne ou d'un nombre limité d'espèces.
- **Milieu différentiel** dont la composition chimique permet la sélection d'un groupe physiologique particulier en différenciant les espèces qui le composent.

# Milieu différentiel

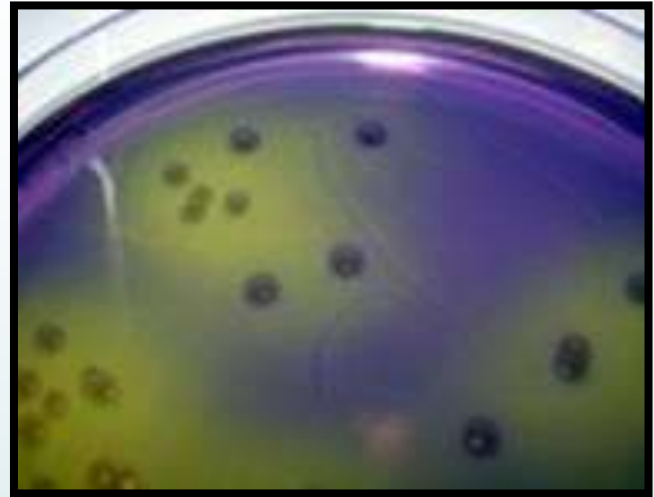
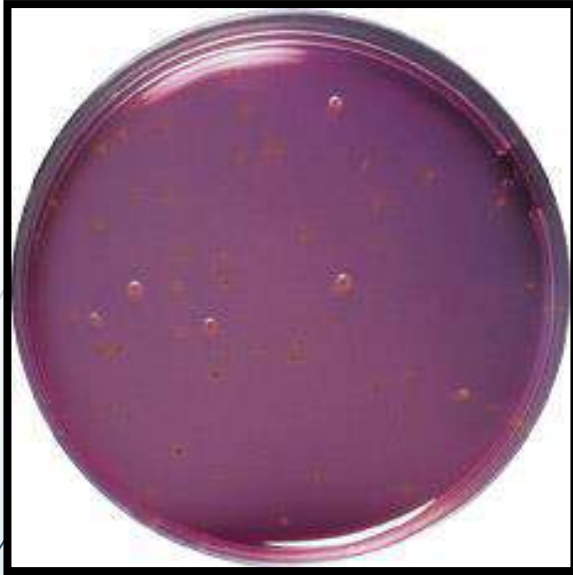
- Facilite la **distinction** entre les **colonies** de la bactérie recherchée et les autres colonies présentes sur le même milieu.

## Gélose lactosée au BCP

Pour 1 litre de milieu :

- |                                       |       |                           |
|---------------------------------------|-------|---------------------------|
| - Tryptone .....                      | 5 g   | → Source de C, N,         |
| - Extrait de viande .....             | 3 g   |                           |
| - <b>Lactose</b> .....                | 10 g  | → Source énergétique de C |
| - <b>Pourpre de bromocrésol</b> ..... | 25 mg | → Indicateur de pH        |
| - Agar bactériologique .....          | 13 g  |                           |





- La **fermentation** du **lactose** en acide est révélée, en présence de **pourpre de bromocrésol**, par le virage du bleu violacé au **jaune**.
- Les germes **lactose-négatif** donnent des colonies de couleur **bleue**.

## Milieu sélectif

- **Inhibe** la croissance des bactéries **indésirables** et **sélectionne** les microbes **recherchés**.
- Contient des **agents inhibiteurs** (sel, antibiotique, colorant).  
Ex : cristal violet et sels biliaires dans la gélose MacConkey

## Milieus sélectif-différentiel

Possède les caractéristiques des milieux sélectifs et différentiels.

Ex : MacConkey

# ISOLEMENT DES STAPHYLOCOQUES

## Milieu de Chapman

Peptone

Extrait de viande

Mannitol

Chlorure de sodium

Rouge de phénol

Agar

Eau distillée

10 g

1 g

10 g

75 g

25 mg

15 g

1000 ml

Source de C, N,

Source de C, N,

Source énergétique de C

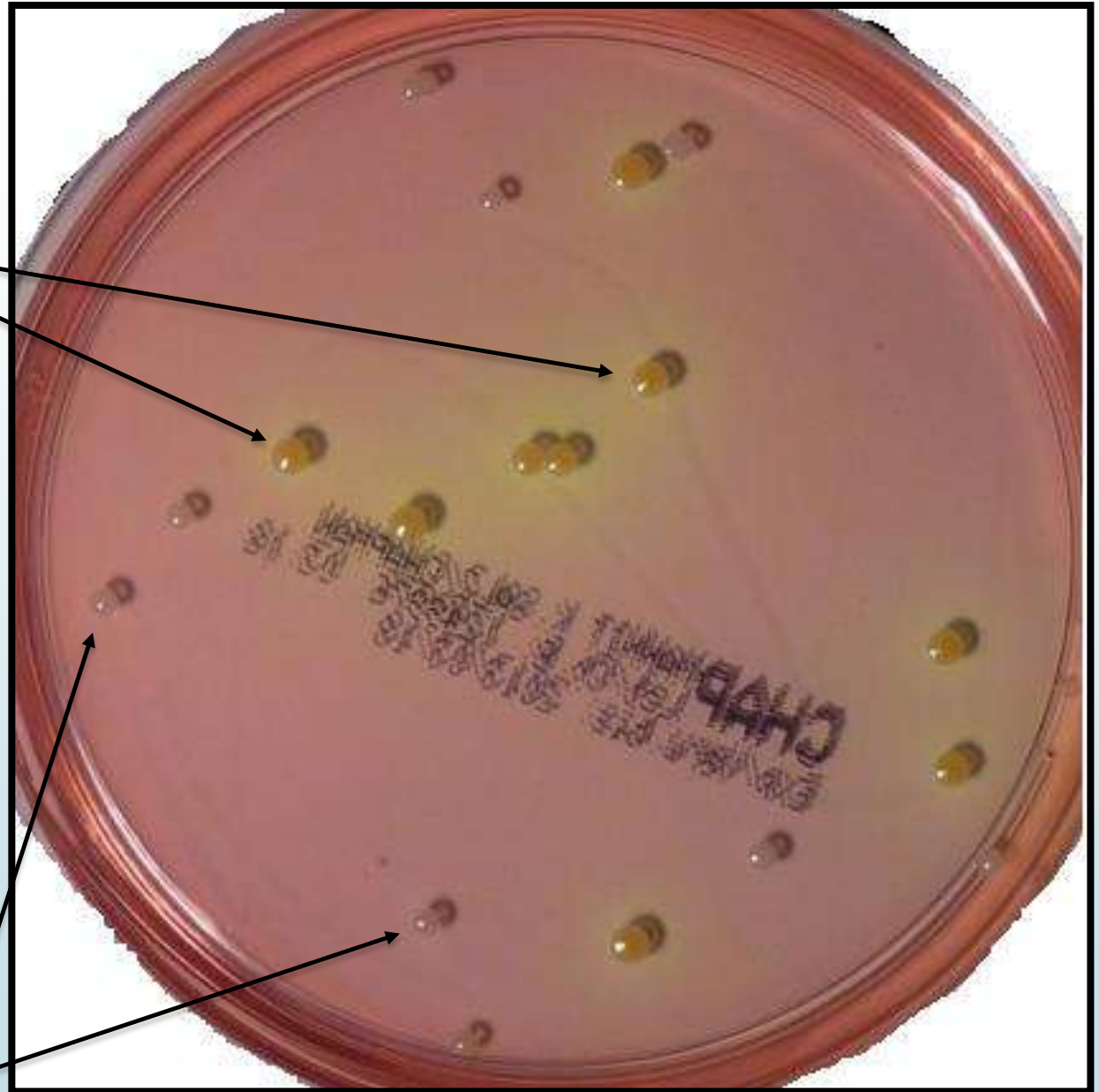
Inhibiteur

(à grande concentration)

Indicateur de pH

**Colonies mannitol +**

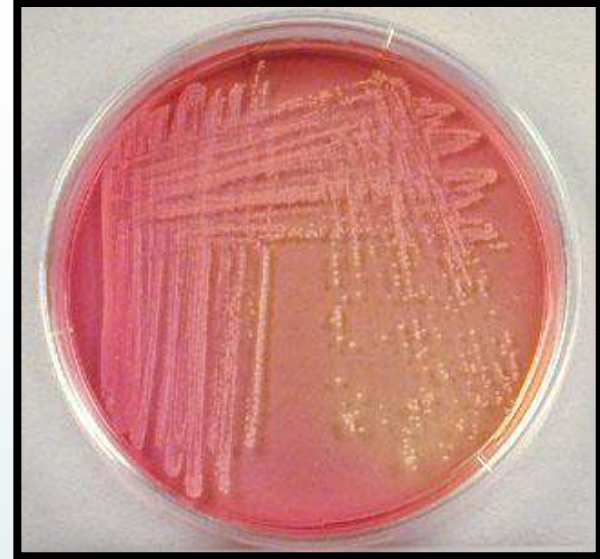
**Colonies mannitol -**



*Staphylococcus epidermidis*



*Staphylococcus saprophyticus*



*Staphylococcus aureus*

# ISOLEMENT D'*Escherichia coli*

## Milieu EMB agar

Peptone

$K_2HPO_4$

Lactose

Eosine

Bleu de méthylène

Agar

Eau distillée

10 g

2 g

10 g

400 mg

65 mg

15 g

1000 ml

Source de C, N,

Sels minéraux

Source énergétique de C

Inhibiteur de Gram+

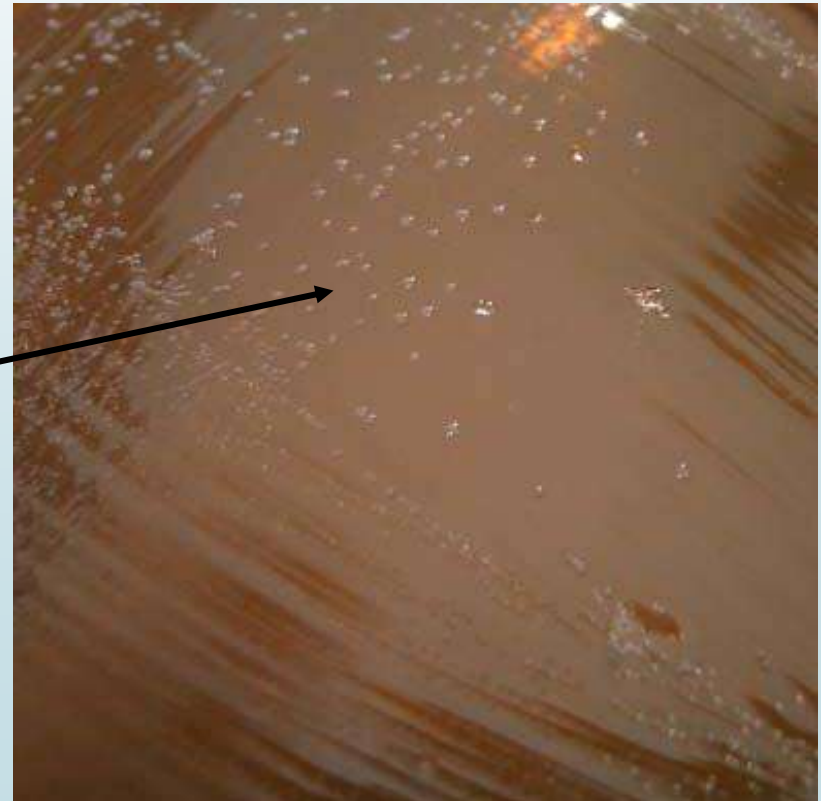
Inhibiteur de Gram+

pH = 6,8 à 7

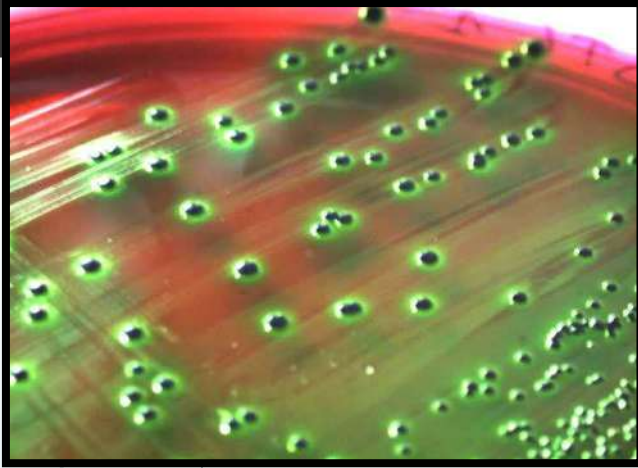


Colonies violet foncé → le pH est acide .  
Les bactéries fermentent le lactose en  
produisant des acides: **LACTOSE +**

Colonies grisâtres → le pH est  
neutre ou basique .  
Les bactéries ne fermentent pas le  
lactose : **LACTOSE -**



# Colonies lactose positif sur la gélose EMB



*E. coli*



*Klebsiella*



*Enterobacter*

## 5. INCUBATION

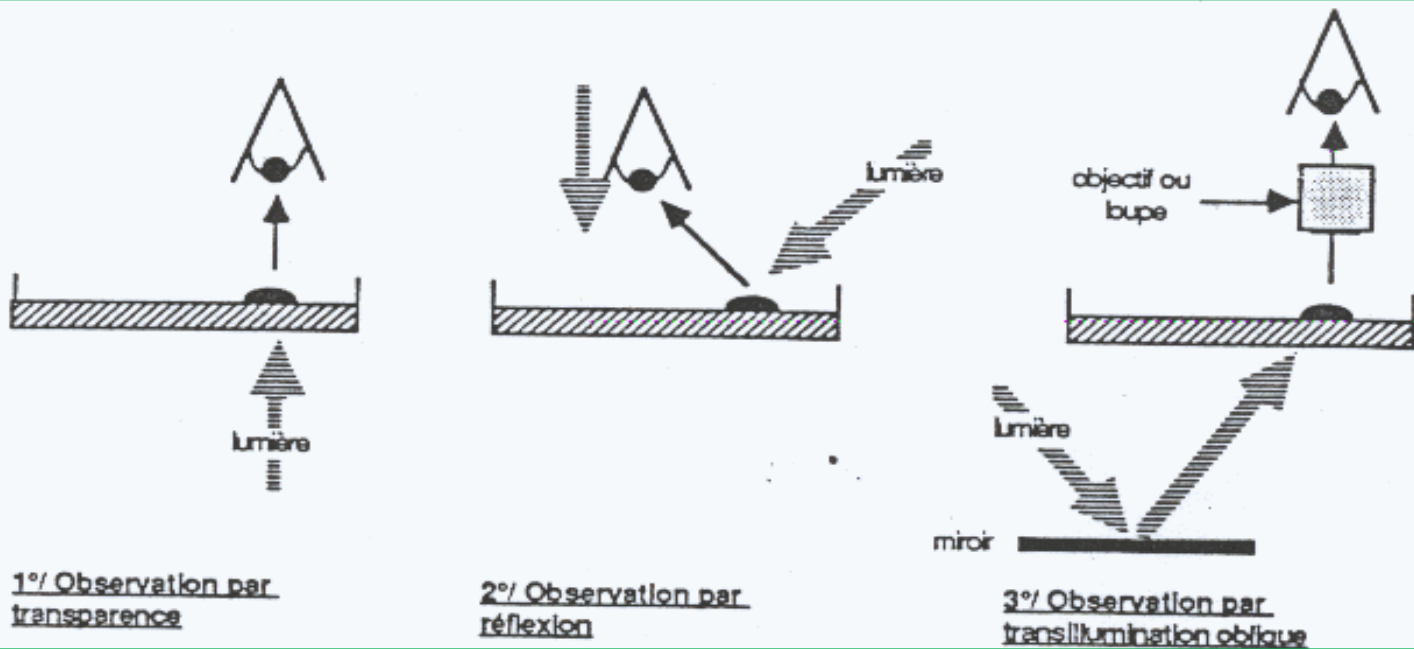
Tous les milieux de cultureensemencés (tubes et boites de Pétri) sont ensuite placés dans une **étuve** à **température optimale de croissance** (37°C) pendant 24 à 48 h



Les boîtes de Pétri sont **incubées** en **position retournée** pour limiter la condensation de l'eau dans l'incubateur sur le couvercle, afin d'éviter que les gouttes d'eau ne coulent sur le milieu de culture.

# Observation macroscopique des colonies

- **L'aspect des colonies** dépend du **milieu utilisé**, de la **durée** et de la **température** de l'incubation .
- Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien **isolées** : les colonies sont d'autant plus petites qu'elles sont rapprochées.
- Les colonies sont observées par transparence, réflexion ou trans-illumination oblique.

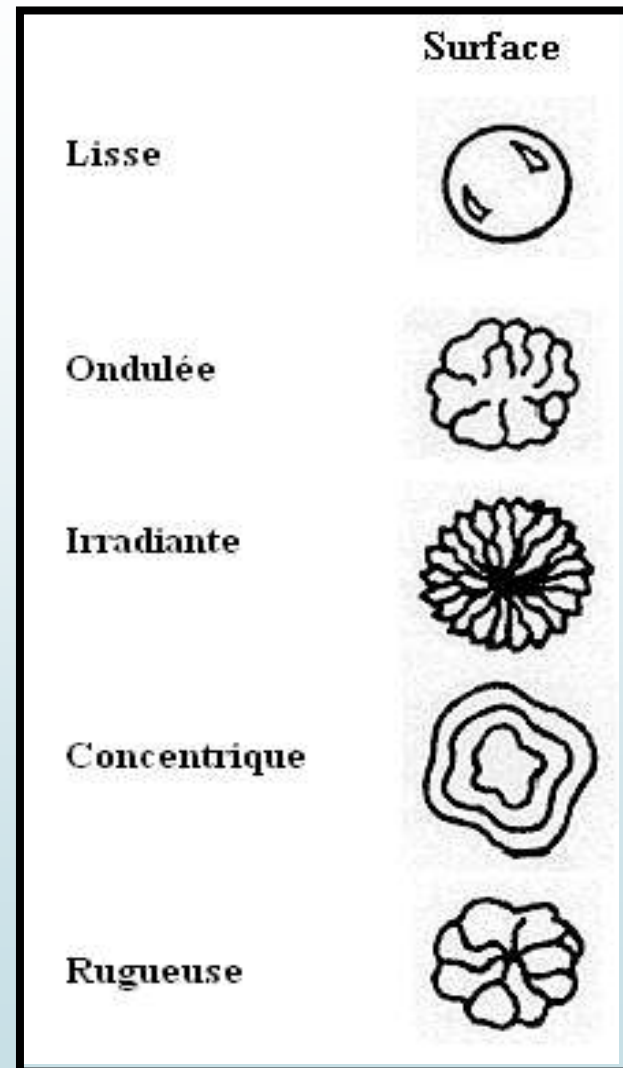
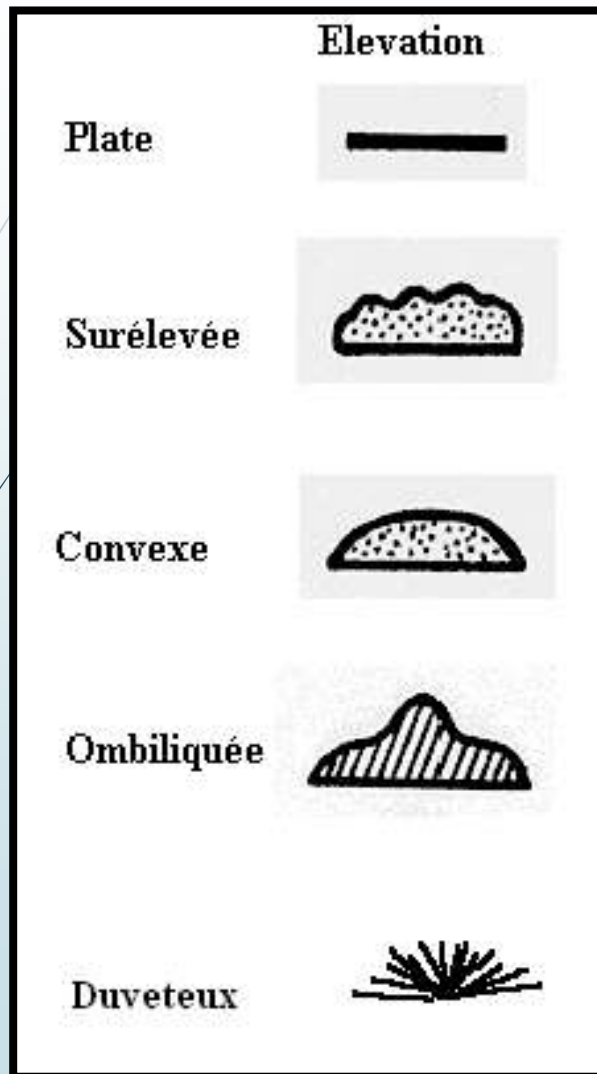


# Observation macroscopique des colonies

| Forme        |                                                                                     |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Punctiforme  |    |
| Circulaire   |    |
| Filamenteuse |    |
| Rhizoïde     |    |
| Irrégulière  |  |
| Fusiforme    |  |

| Contour     |                                                                                       |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Régulier    |    |
| Ondulé      |    |
| Dentelé     |    |
| Filamenteux |    |
| Bouclé      |  |

# Observation macroscopique des colonies



# Observation macroscopique des colonies

## Forme

Punctiforme



Circulaire



Filamenteuse



Rhizoïde



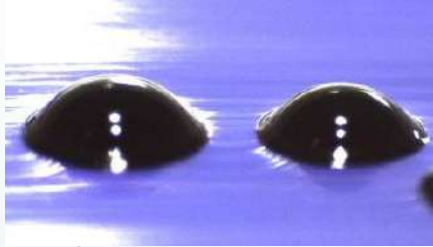
Irrégulière



Fusiforme



# Observation macroscopique des colonies



| Elevation  |  |
|------------|--|
| Plate      |  |
| Surlevée   |  |
| Convexe    |  |
| Ombiliquée |  |
| Duveteux   |  |

| Forme        |  |
|--------------|--|
| Punctiforme  |  |
| Circulaire   |  |
| Filamenteuse |  |
| Rhizoïde     |  |
| Irrégulière  |  |
| Fusiforme    |  |

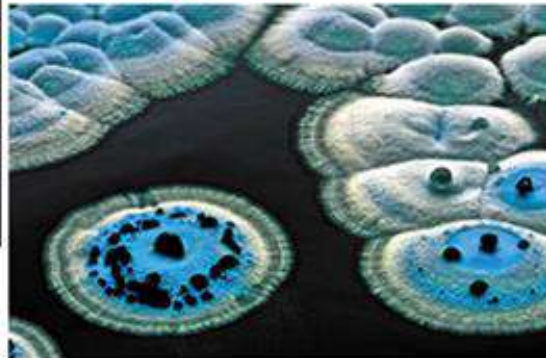
| Surface      |  |
|--------------|--|
| Lisse        |  |
| Ondulée      |  |
| Irradiante   |  |
| Concentrique |  |
| Rugueuse     |  |

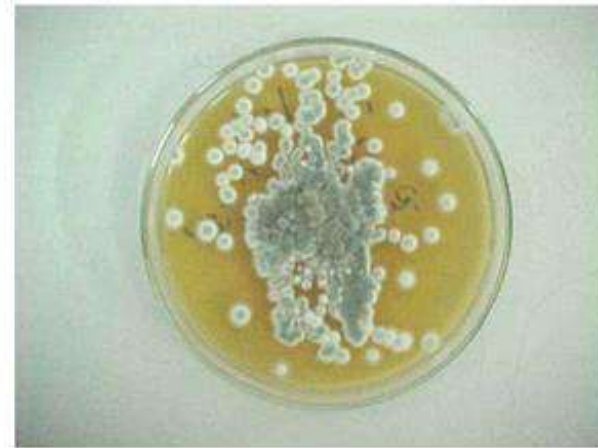
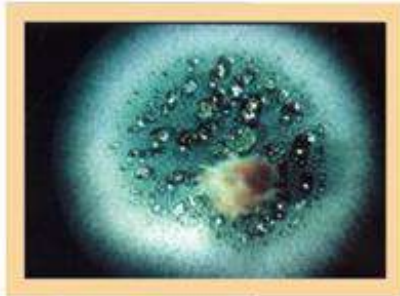
| Contour     |  |
|-------------|--|
| Régulier    |  |
| Ondule      |  |
| Dentelé     |  |
| Filamenteux |  |
| Bouclé      |  |



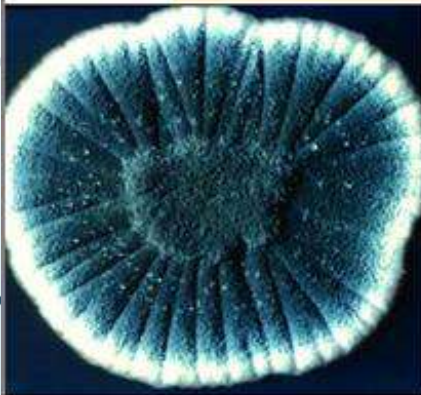


**Colonies de  
*Streptomyces***

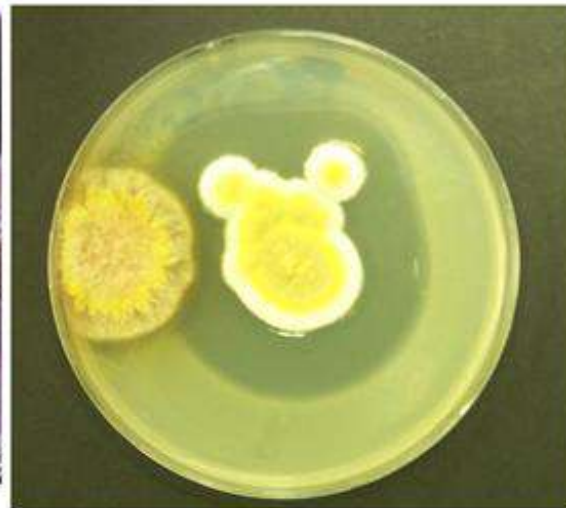




**Colonies de  
*Penicillium***



*Penicillium*- Class Ascomycetes



# 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

