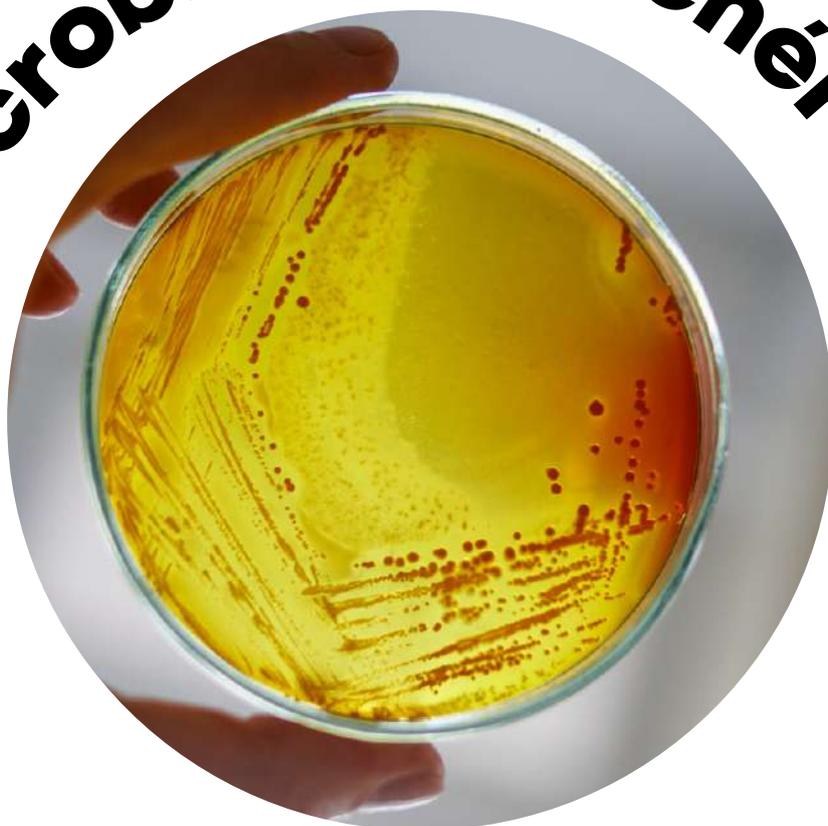


Microbiologie Générale



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 2

2016-2017



2ème SEANCE :

A/ TECHNIQUES DE DENOMBREMENT

Dénombrer les bactéries = donner le nombre de bactéries par unité de volume (ml de culture) ou parfois de masse (/g de matière analysée).

Différentes applications du dénombrement bactérien:

- Contrôle de qualité d'un aliment

Le nombre de bactéries existant dans un échantillon d'un lait est comparé à des seuils à ne pas dépasser (normes de qualité d'un lait).

- Diagnostic d'une maladie infectieuse :

Le dénombrement des bactéries dans une urine renseigne sur l'infection urinaire ou pas, par comparaison à des seuils à ne pas dépasser.

- Degré de pollution d'un milieu aquatique :

Le dénombrement certaines bactéries (coliformes fécaux) renseigne sur la qualité microbiologique du milieu étudié et son degré de pollution.

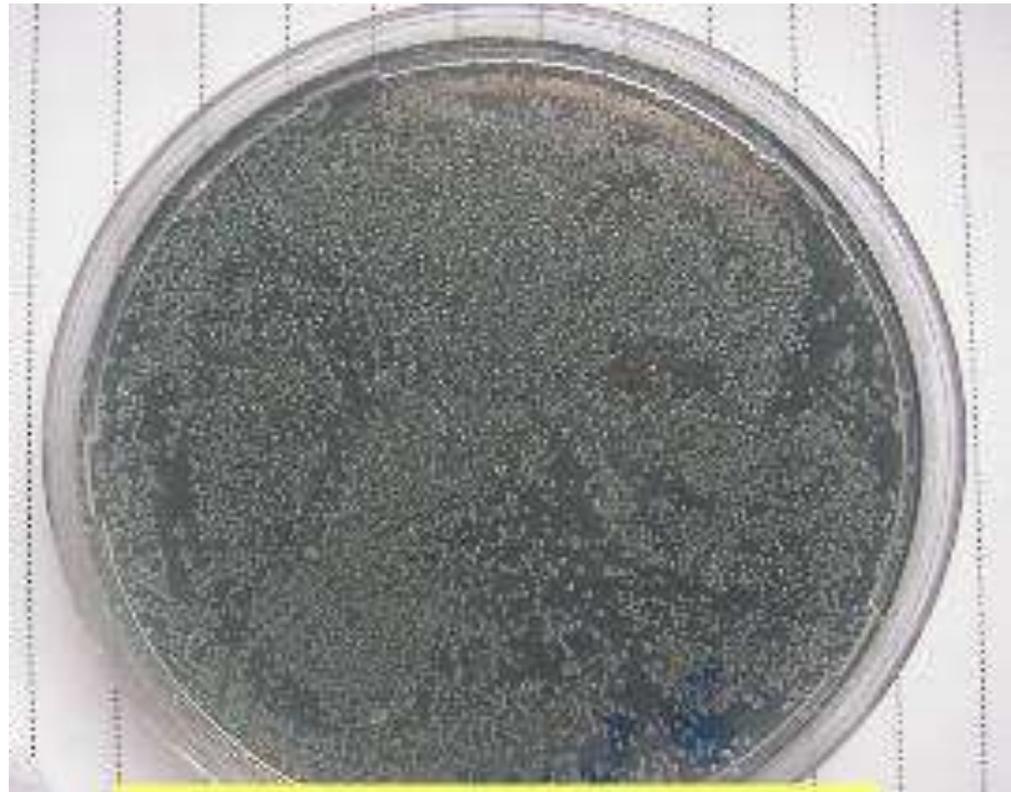
- Suivre la croissance d'une culture sur un milieu donné

I/ Dénombrement après culture sur milieu solide

On dénombre les colonies qui se développent sur le milieu.

Dans de nombreux cas, un produit peut contenir de nombreuses bactéries.

Certaines cellules peuvent ne pas former de colonies et certaines colonies peuvent fusionner, ce qui amène à des comptages erronés.



Avant de procéder à l'ensemencement on doit diluer la suspension bactérienne, et faire en sorte qu'il y ait moins de germes dans un volume donné.

On considère que dans une gélose on ne peut compter, pour des raisons statistiques et pratiques, que les boîtes contenant entre
30 et 300 colonies.



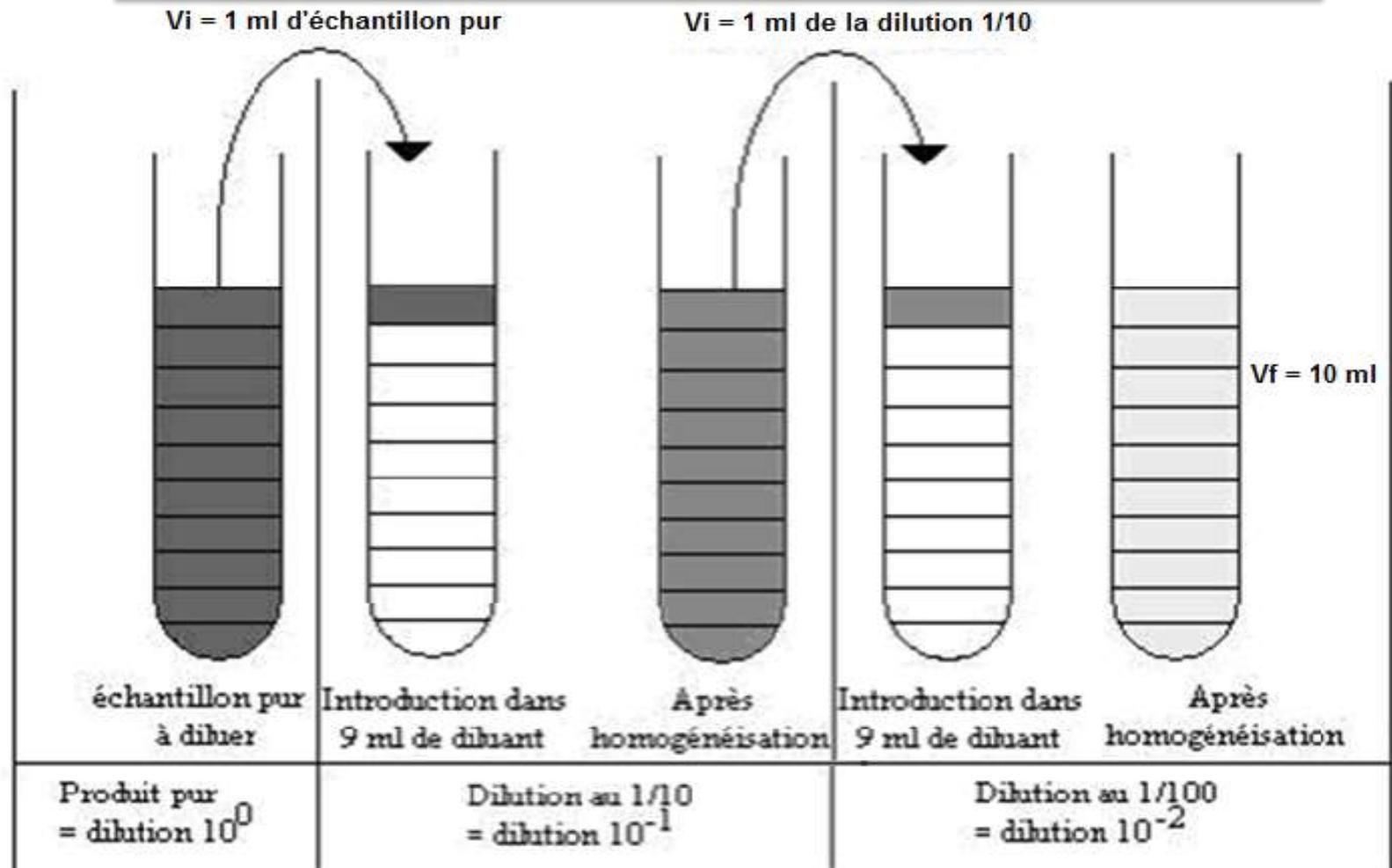
a/ Dilutions

Les dilutions sont faites dans un liquide physiologique stérile (NaCl à 9 g/l).

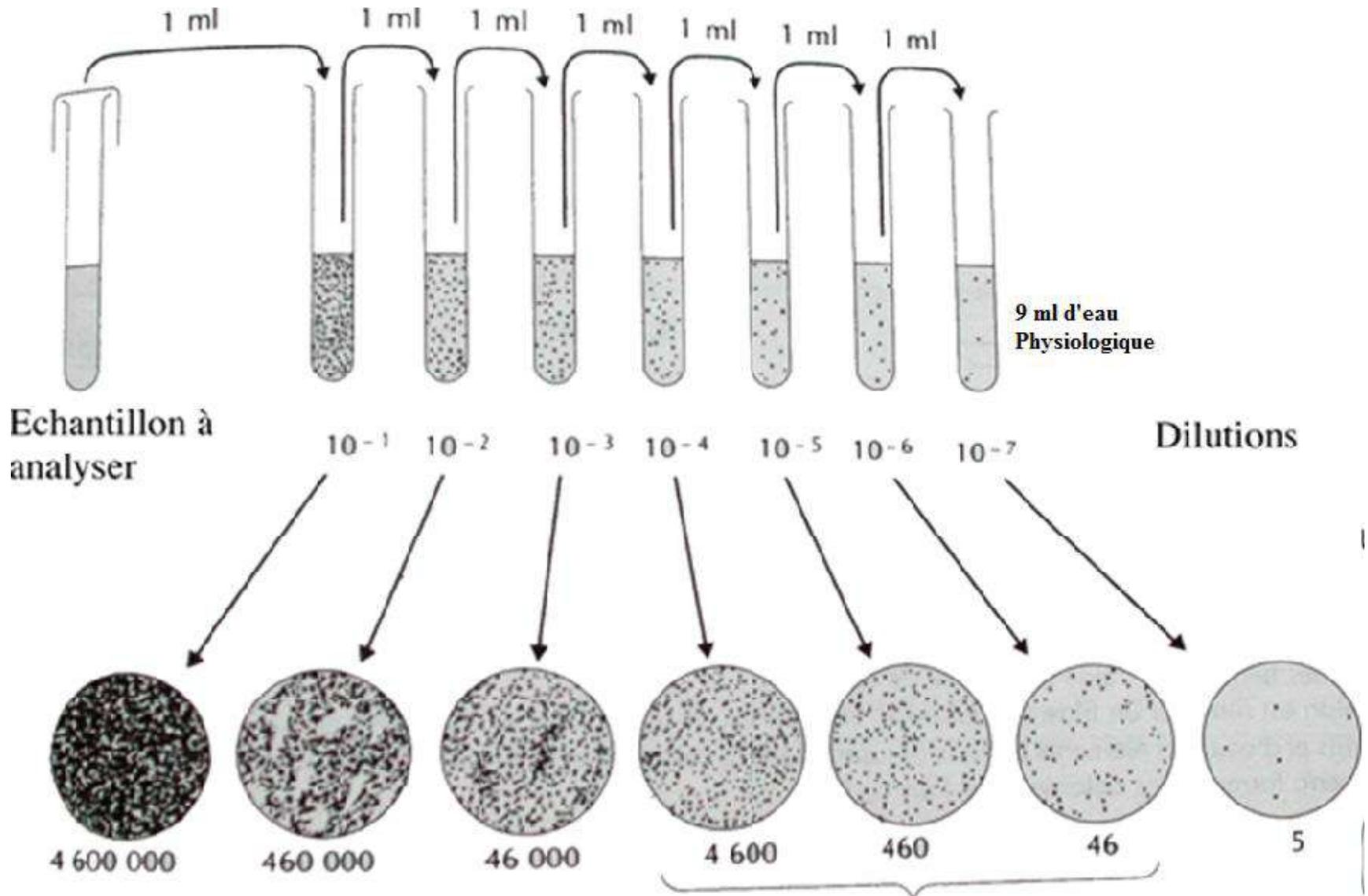
Dans une série de tubes, on met 9 ml de liquide de dilution par tube.

$$\text{Dilution} = d = V_{\text{initial}}/V_{\text{final}} = V_i/V_f$$

$$\text{Facteur de dilution} = F_d = 1/d = V_f/V_i$$



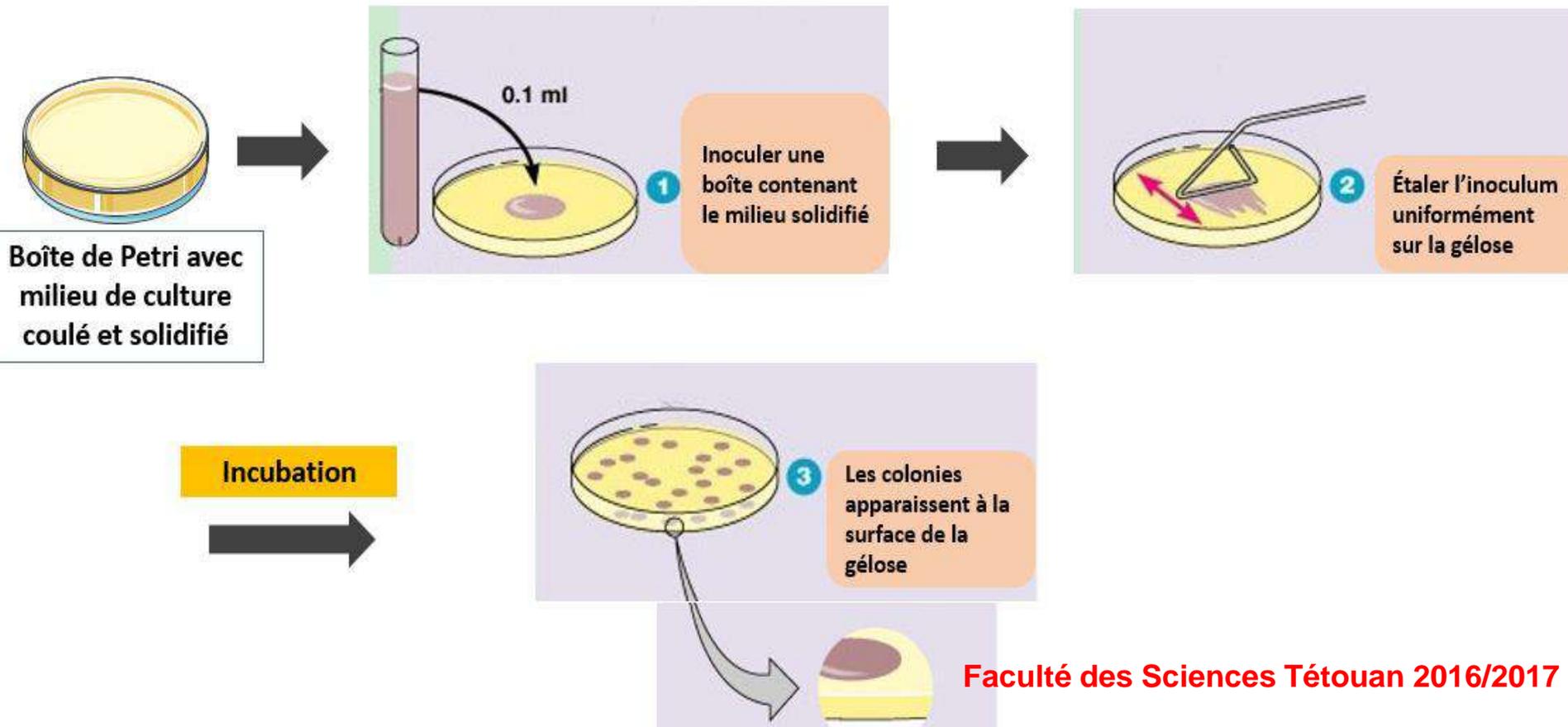
Les dilutions sont réalisées **en série**

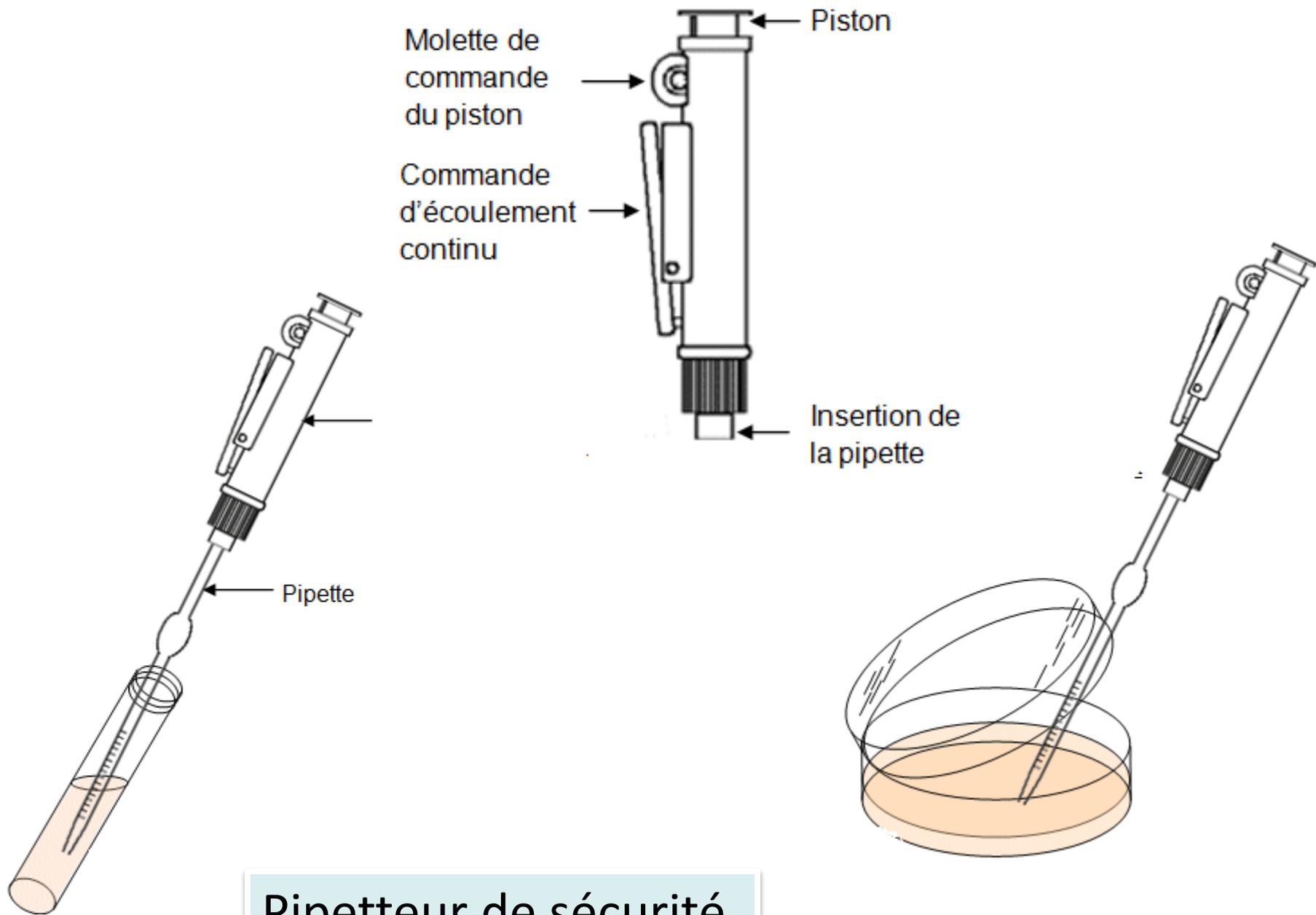


b/ Méthodes d'ensemencement

Il existe 2 méthodes d'ensemencement :

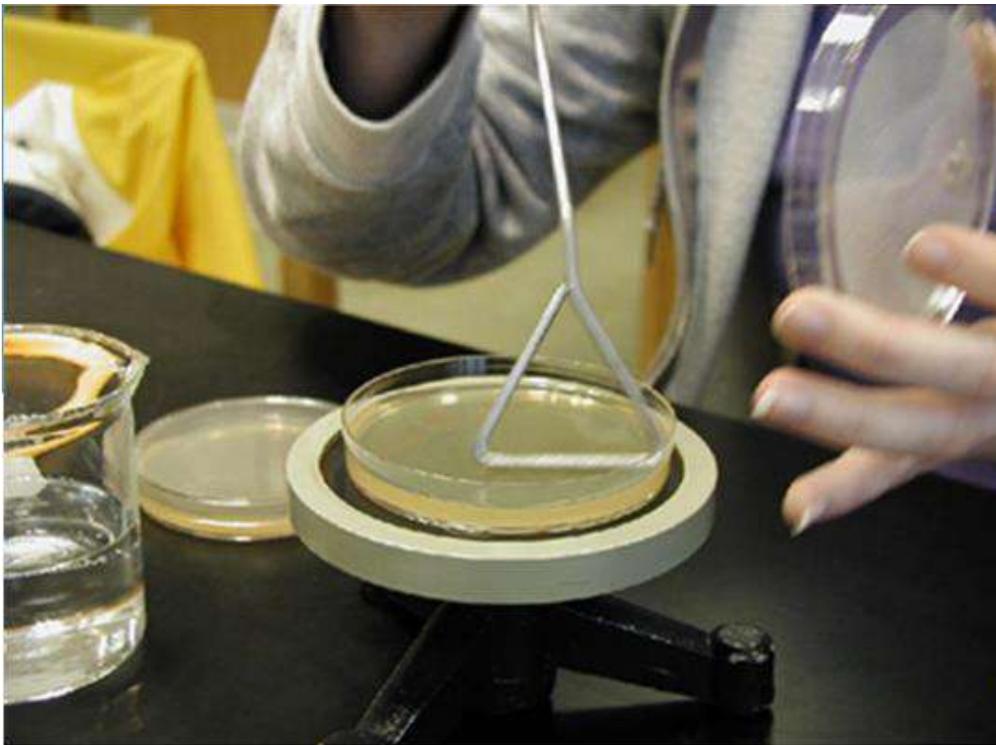
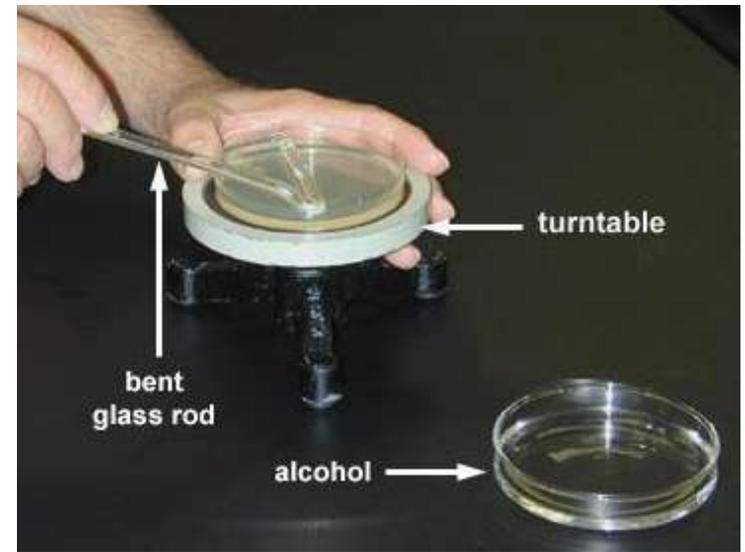
1 - Etalement en surface on disperse, à l'aide d'un étaleur, un inoculum de **0,1 ml** sur toute la surface de la boîte





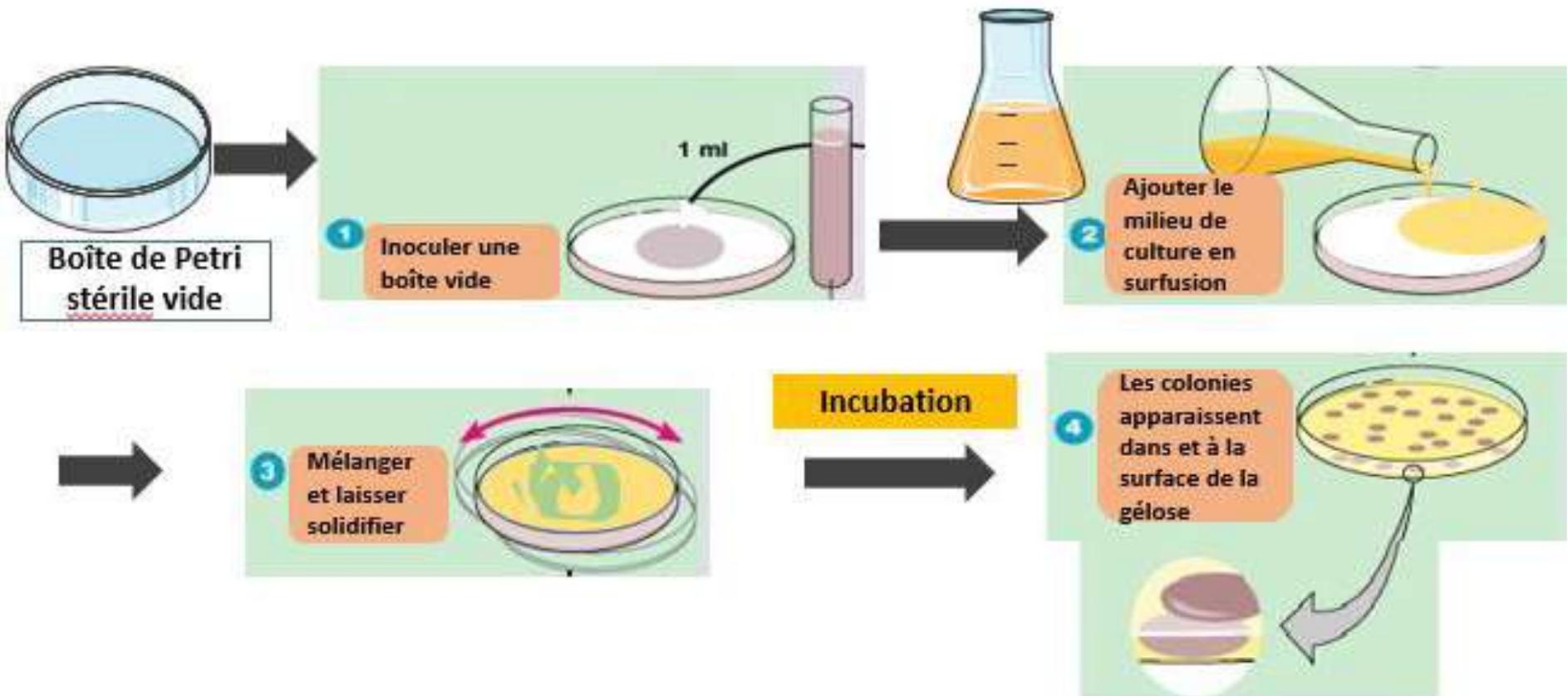
Pipetteur de sécurité

Etallement en surface



2 - Etalement en couche de gélose (en profondeur)

un inoculum précis (**1 ml**) est placé dans la boîte stérile vide. Il suffit ensuite de couler le milieu fondu et maintenu en surfusion vers 47 °C. On homogénéise, par rotation de la boîte, l'inoculum et le milieu. On laisse alors la gélose se solidifier.





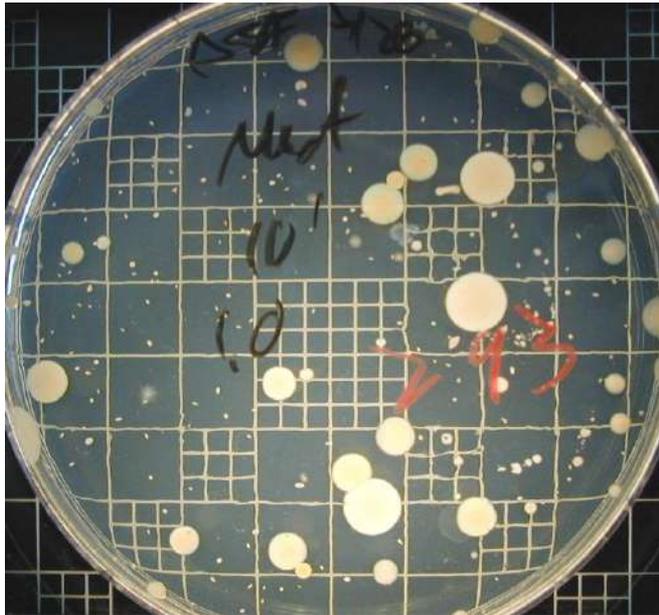
Etalement en Profondeur

Faculté des Sciences Tétouan 2016/2017

c/ Lecture des résultats

Une cellule, placée sur un milieu solide favorable, donnera naissance à une colonie.

Dans la masse



En surface



Mais une cellule ou un amas cellulaire, tous deux donneront naissance à une seule colonie.

**⇒ les résultats s'expriment
en Unités Formant Colonie (UFC)**



On considère que dans une gélose on ne peut compter, pour des raisons statistiques et pratiques, que les boîtes contenant entre **30 et 300 colonies.**



Lorsque le nombre de colonies est compris entre **30 et 300**

avec

$\sum c$ = somme des colonies comptées sur les boîtes n =

nombre de boîtes retenues pour la dilution

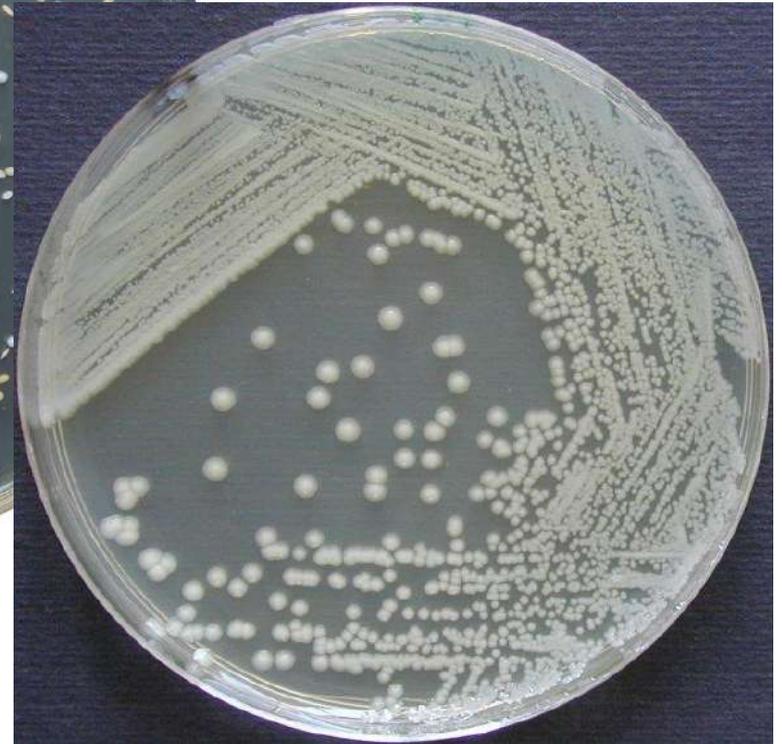
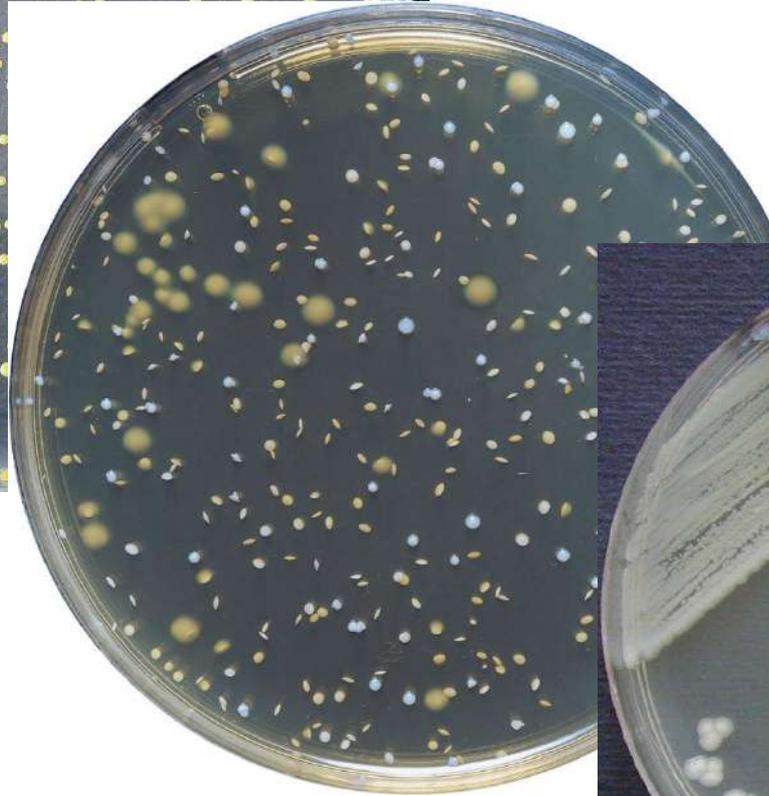
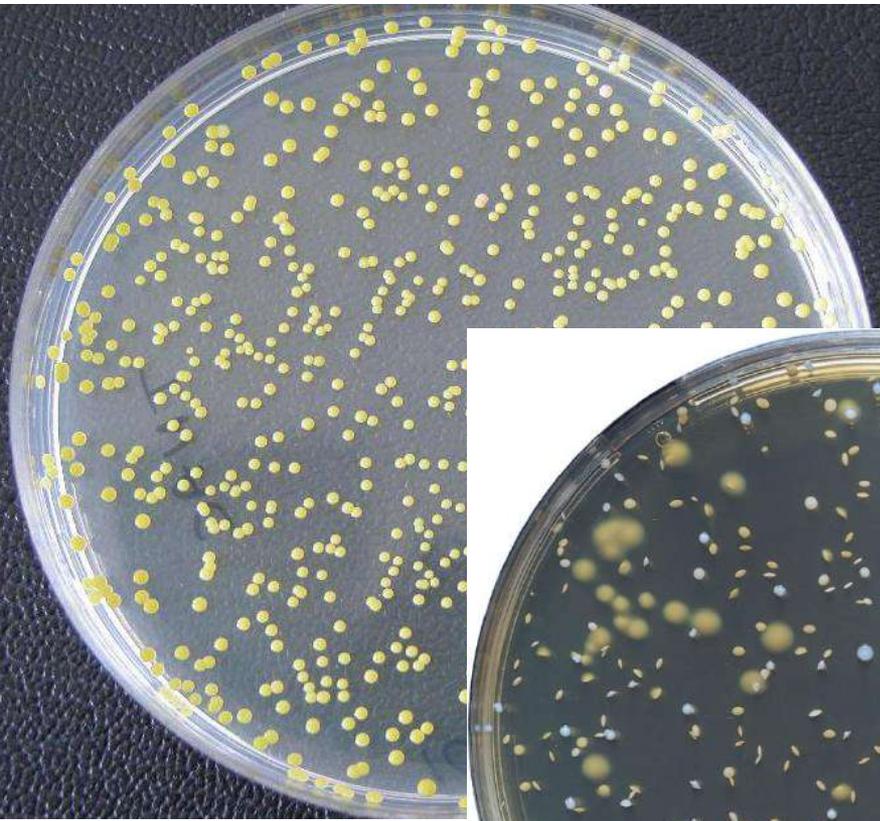
d = taux de dilution

v = volume de l'inoculum de la dilution

N est la concentration en **ufc/ml**

$$N = \frac{\sum C_n}{n \times v \times d}$$

**Quelle technique
d'ensemencement a été utilisée
pour chaque boîte ?**

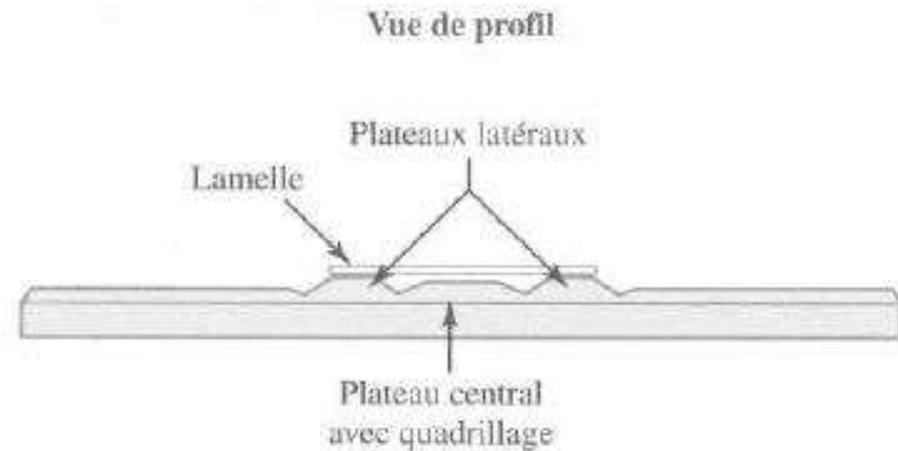
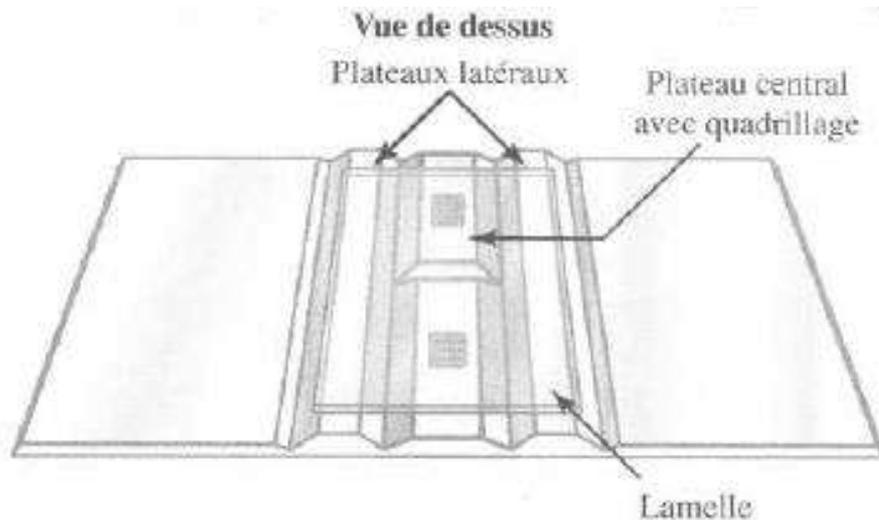


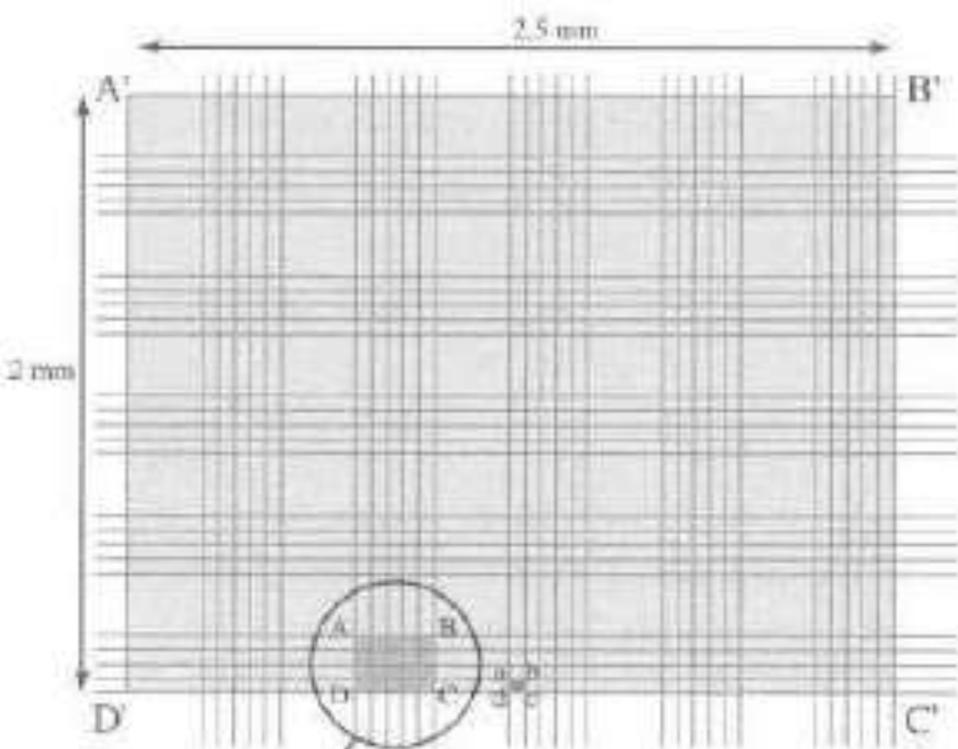
II/ Méthodes hématimétrique

Les cellules peuvent être comptées en utilisant une cellule de numération hématimétrique, par exemple celle de Thoma, Petroff-Hausser, de Malassez

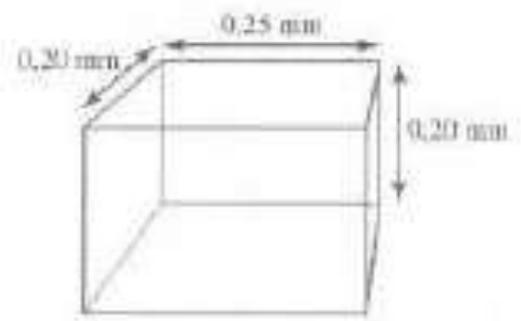
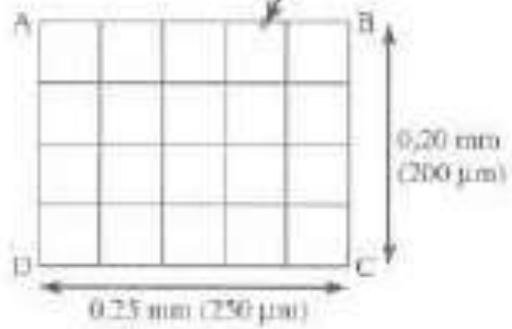
Le dénombrement direct des cellules permet de déterminer **un nombre** de cellules dans **un volume** déterminé (ou une masse).

Un hématimètre = lame de verre épais qui porte à sa partie supérieure un réseau de lignes gravées perpendiculairement et qui délimitent des carrés.



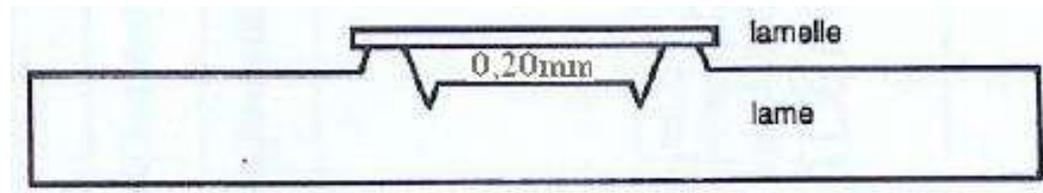


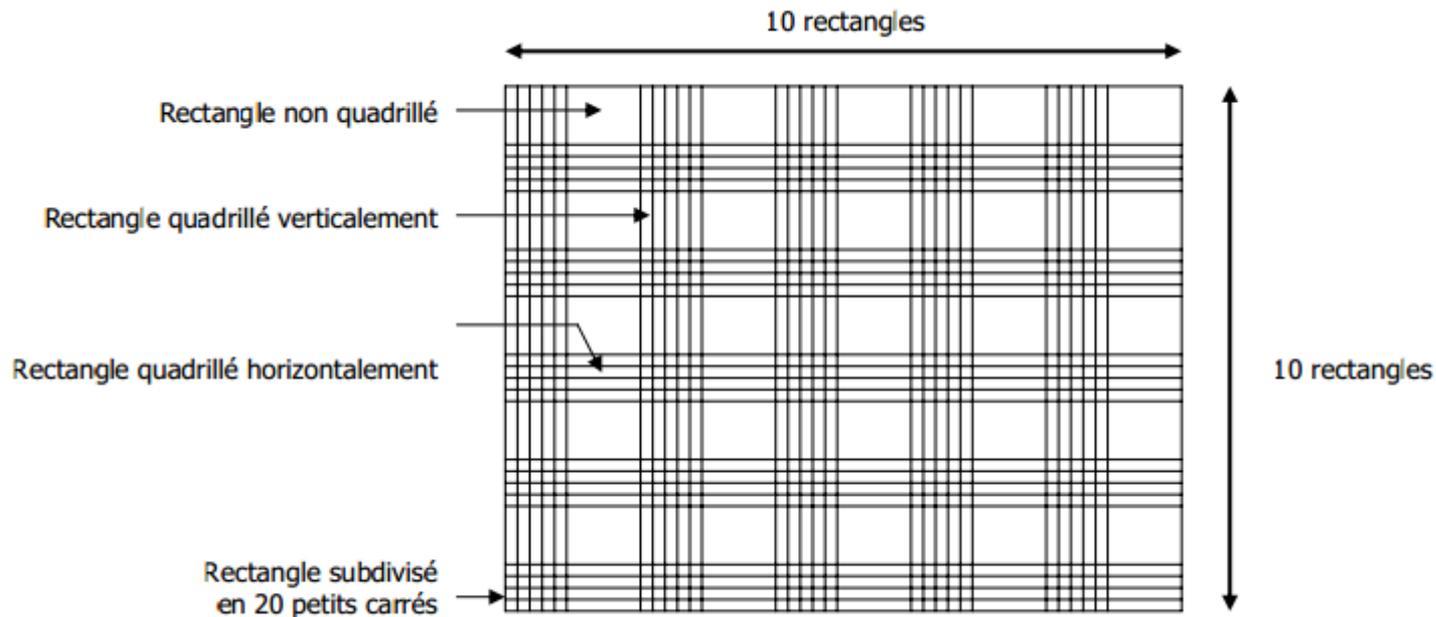
$$0,20 \text{ mm} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,20 \text{ mm} = 0,01 \text{ mm}^3$$



Volume d'une unité rectangulaire
 $0,01 \text{ mm}^3 = 0,01 \mu\text{l}$

Cellule de Malassez

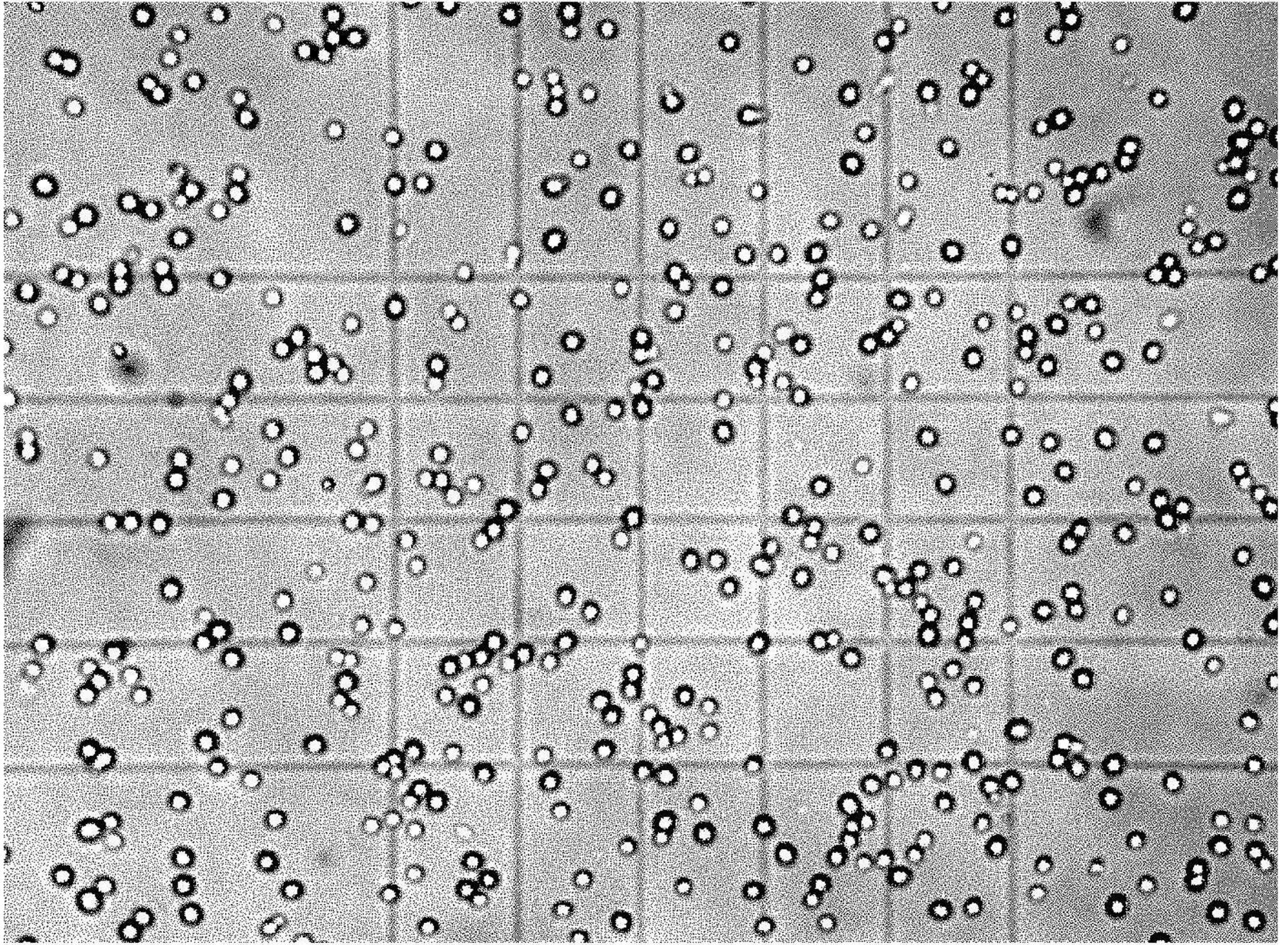


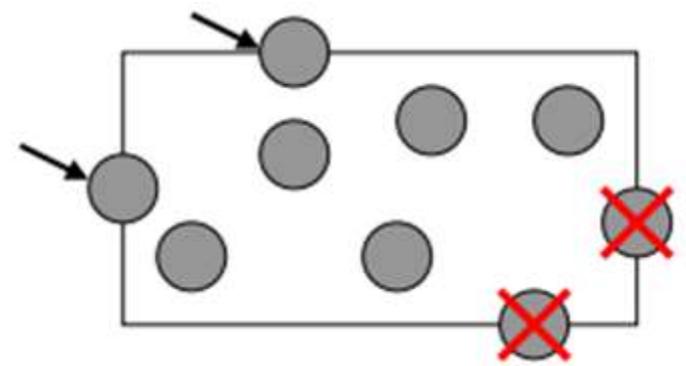
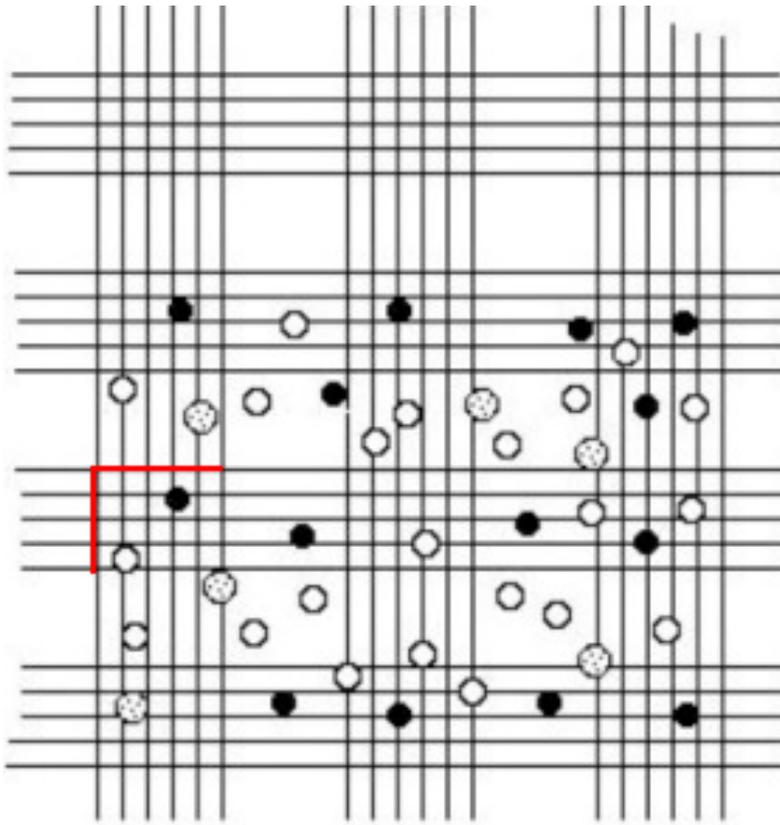


Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

**→ le volume correspondant au quadrillage total est égal à 1 mm^3
= $1 \mu\text{l}$**

**→ chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible,
soit $0,01 \text{ mm}^3 = 0,01 \mu\text{l}$**





Numération sur le rectangle = 7 cellules

Règle de comptage à utiliser pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage :
bordures **nord et ouest** à compter

Exemple :

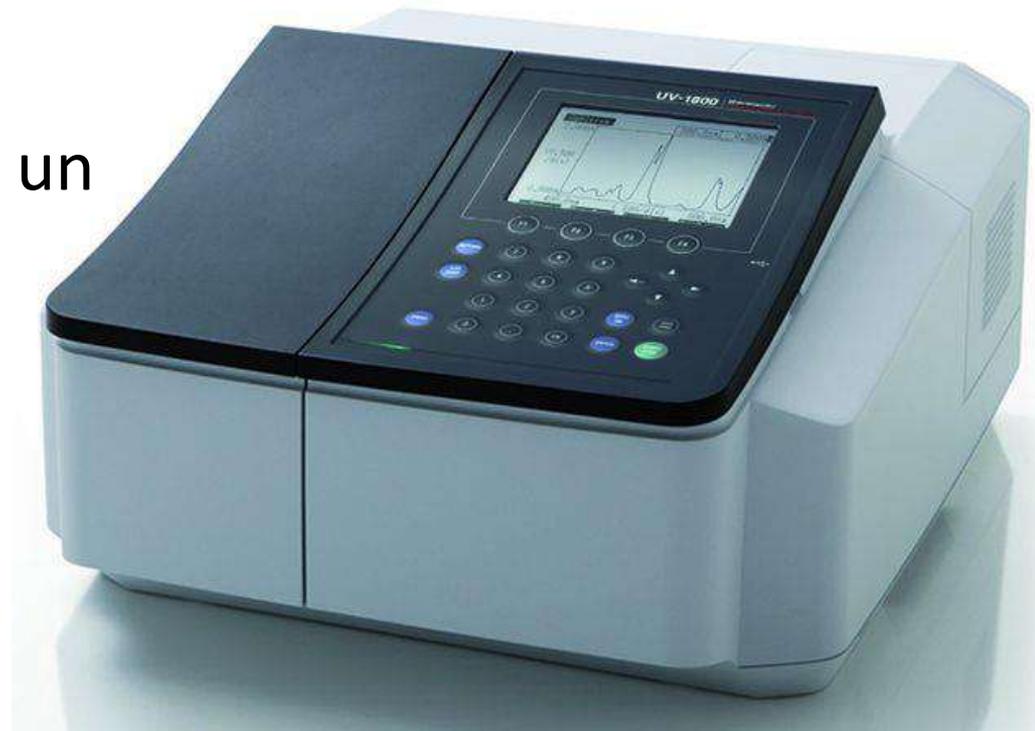
42 cellules dans 25 rectangles donc 42 cellules → 0,25 μ l
X → 1000 μ l

$$X = 1,7 \cdot 10^5 \text{ cellules/ml}$$

III/ Méthode indirecte: opacimétrie mesure du trouble après culture

Une méthode rapide et utile pour estimer la concentration cellulaire est la *mesure de la turbidité*.

Elle peut être mesurée avec un *spectrophotomètre*.



Mesure de la turbidité absorbance (A) ou densité optique (DO)

Plus de cellules

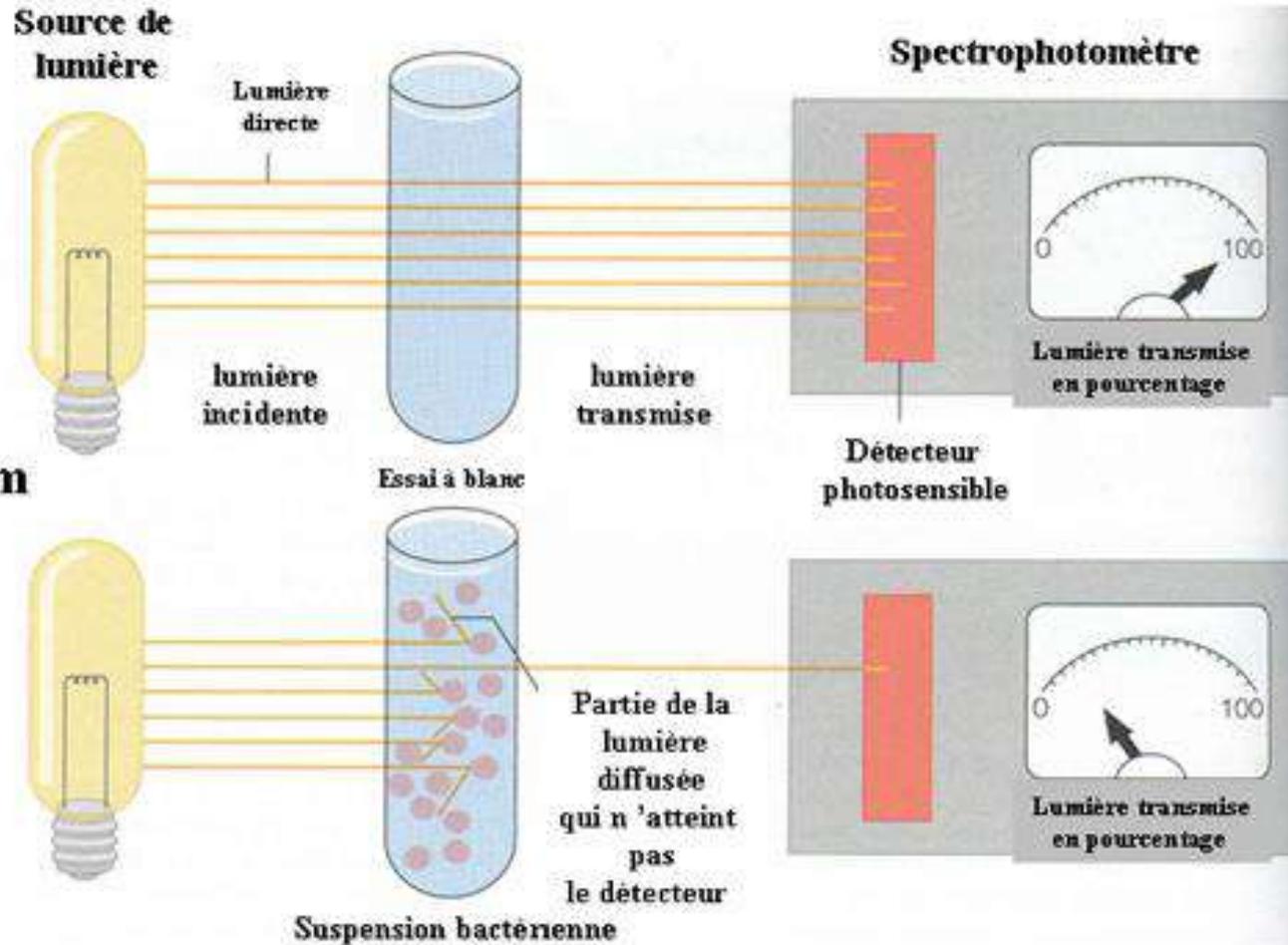


Plus de dispersion de la lumière



Moins de lumière détectée
(↑absorbance)

600-650 nm

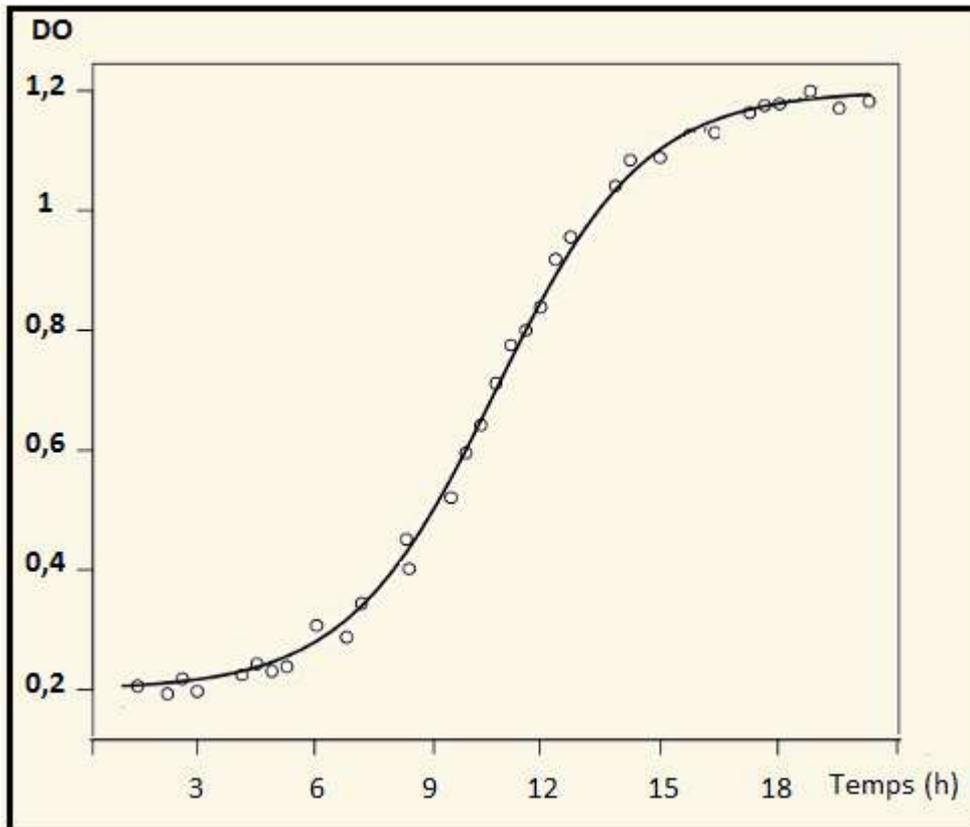


La cellule photométrique mesure la lumière incidente non déviée, ni absorbée, le résultat est exprimé en unité DO.

L'absorbance est directement proportionnelle au nombre de bactéries par unité de volume.

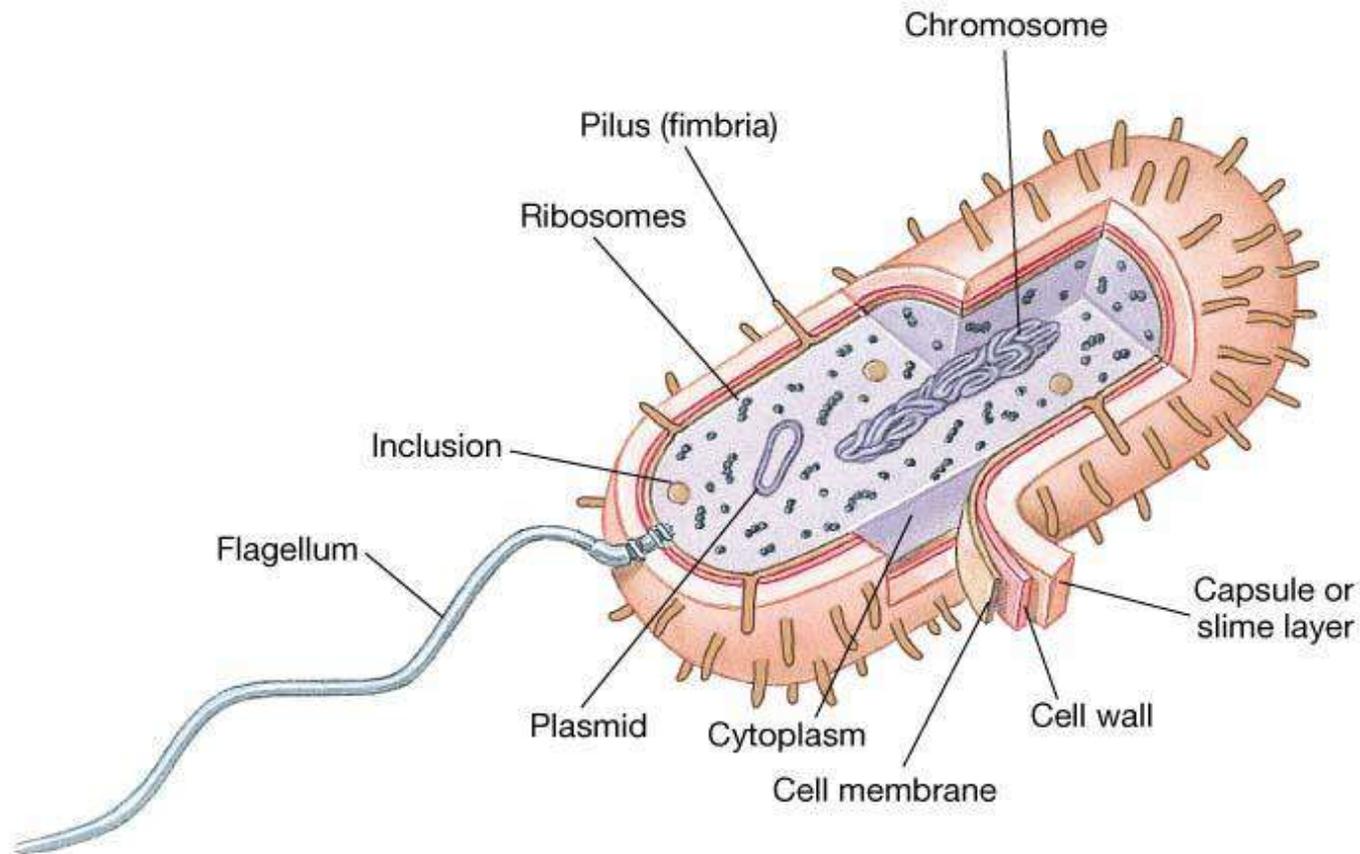
$$\text{Absorbance (DO)} = k.C$$

k : coefficient d'absorption



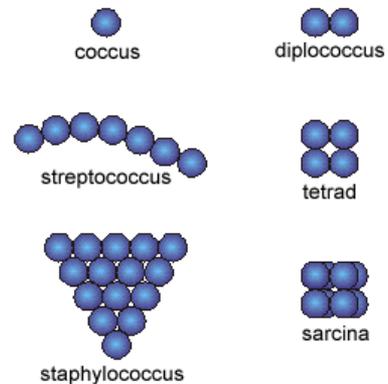
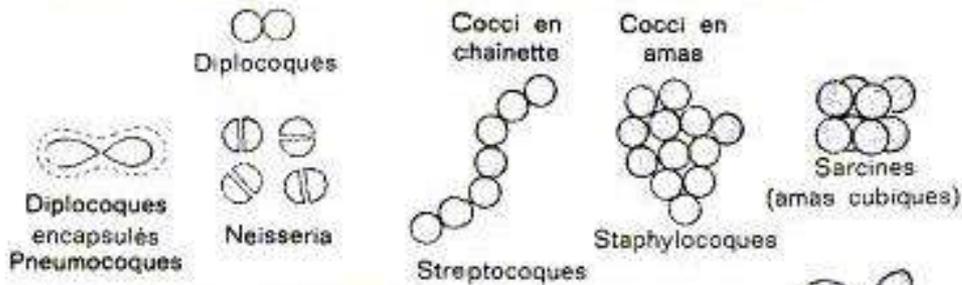
On obtient ainsi une courbe de croissance $DO = f(t)$

B/ Observation microscopique des microorganismes

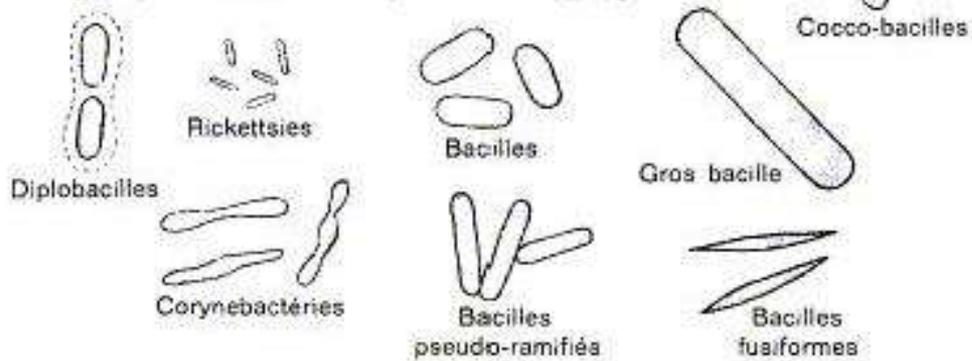


Représentation schématique de la structure générale d'une bactérie

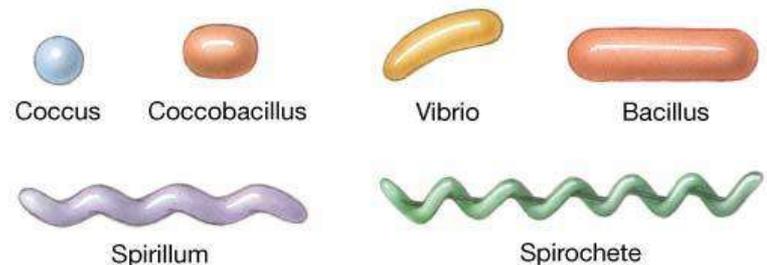
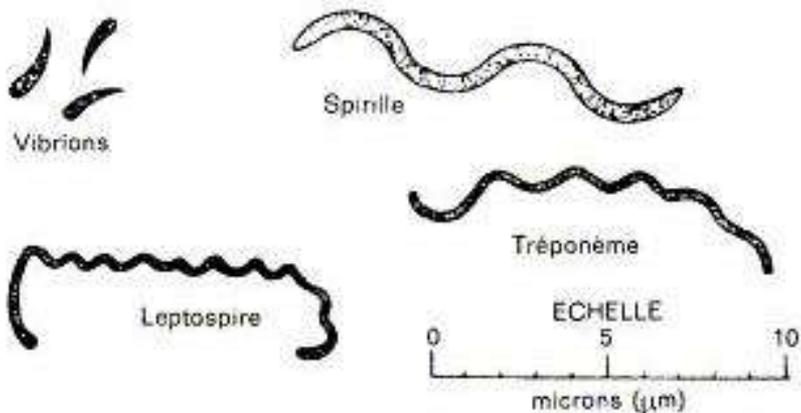
BACTERIES EN FORME DE SPHERES (COQUES, COCCI)

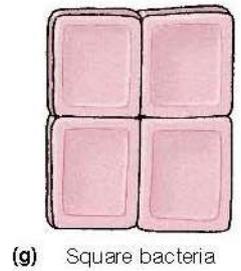
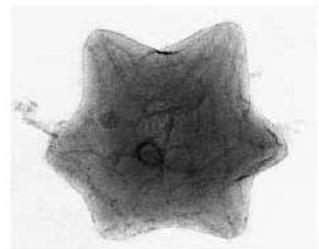
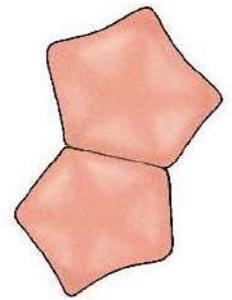
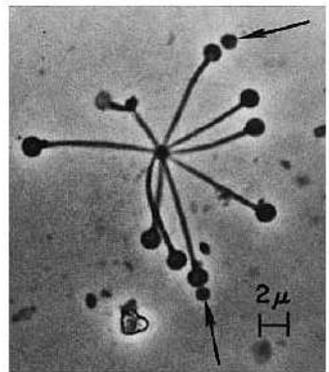
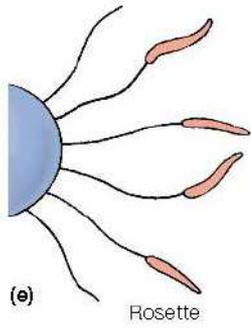


BACTERIES EN FORME DE BATONNETS

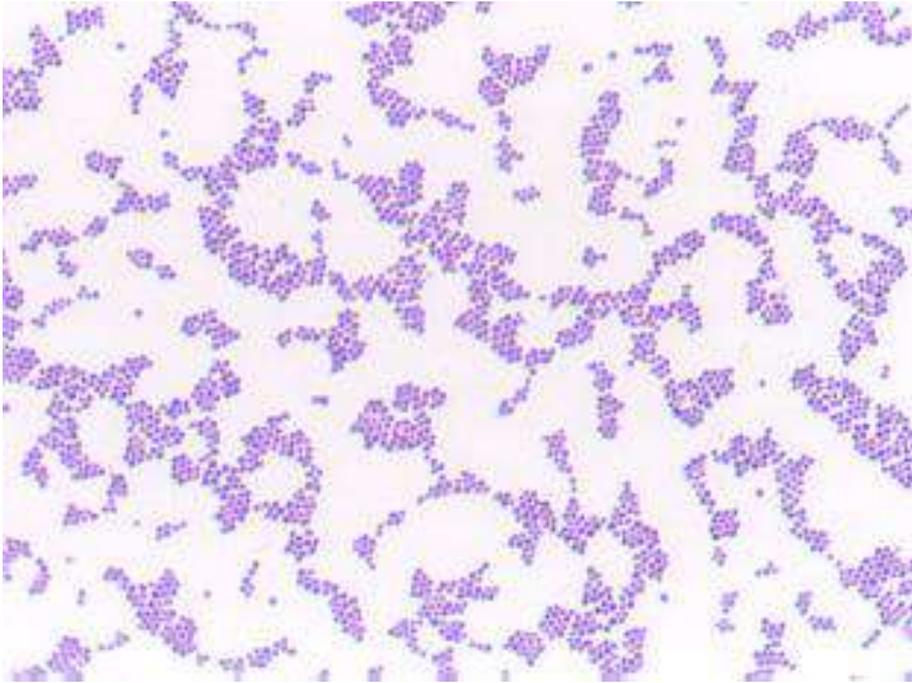


BACTERIES DE FORME INCURVEE ET-SPIRALEE

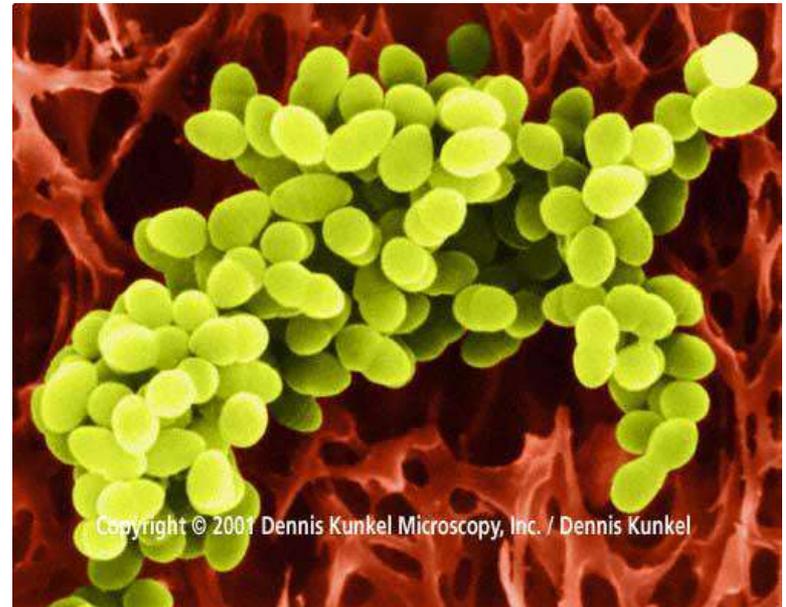


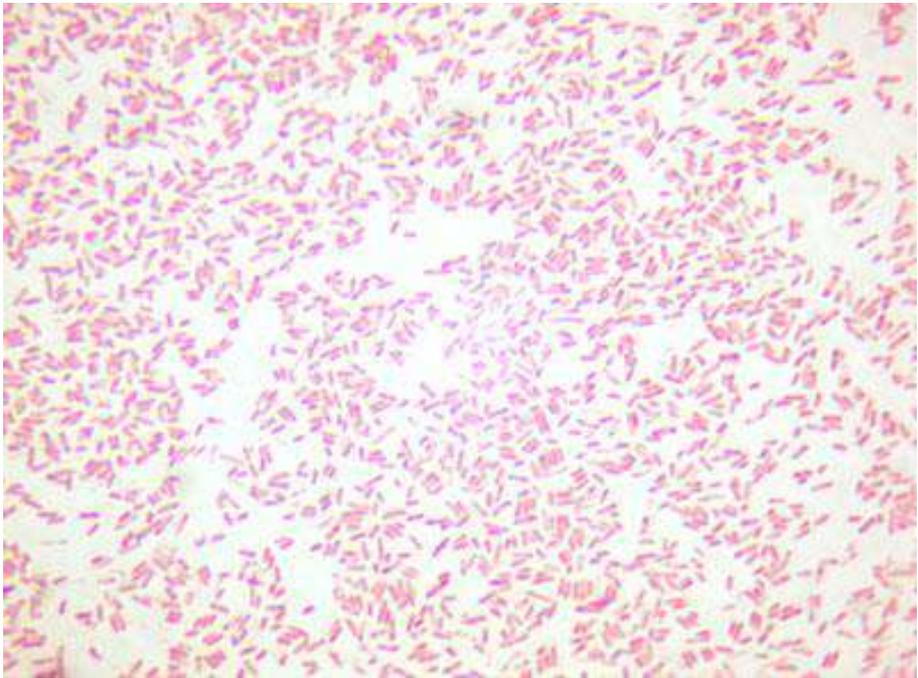


Formes rares

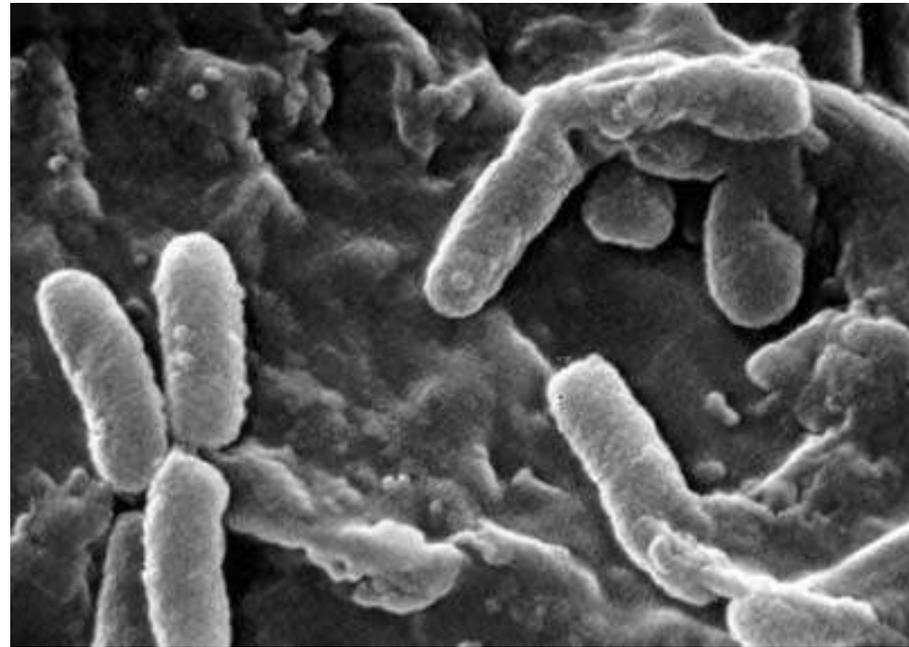


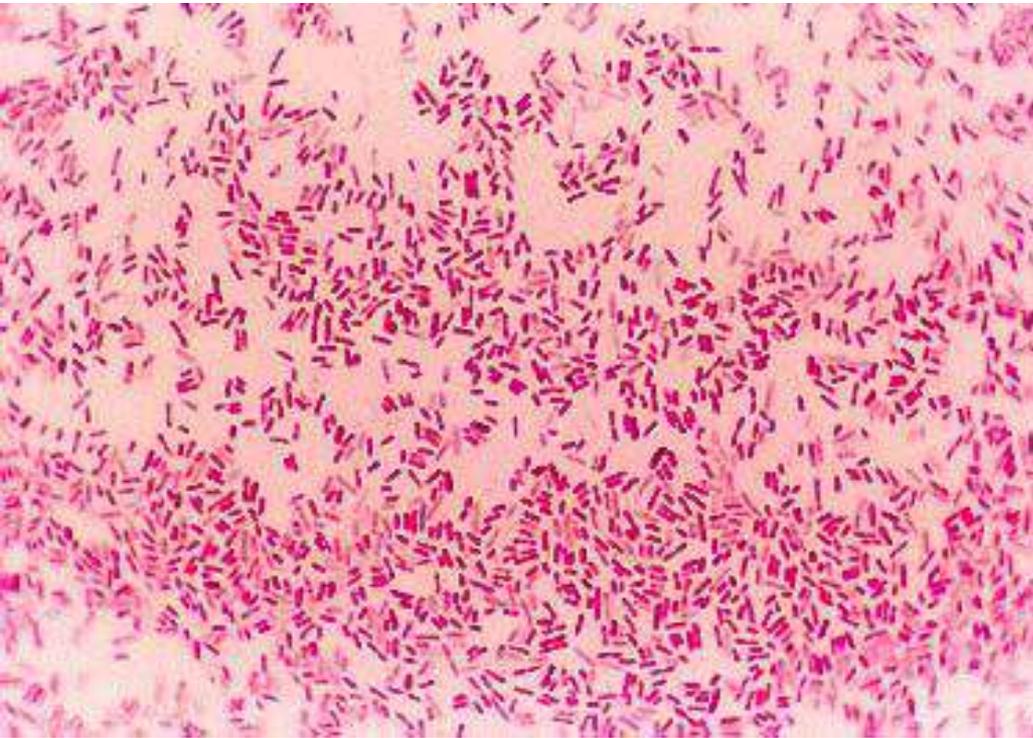
Staphylococcus aureus



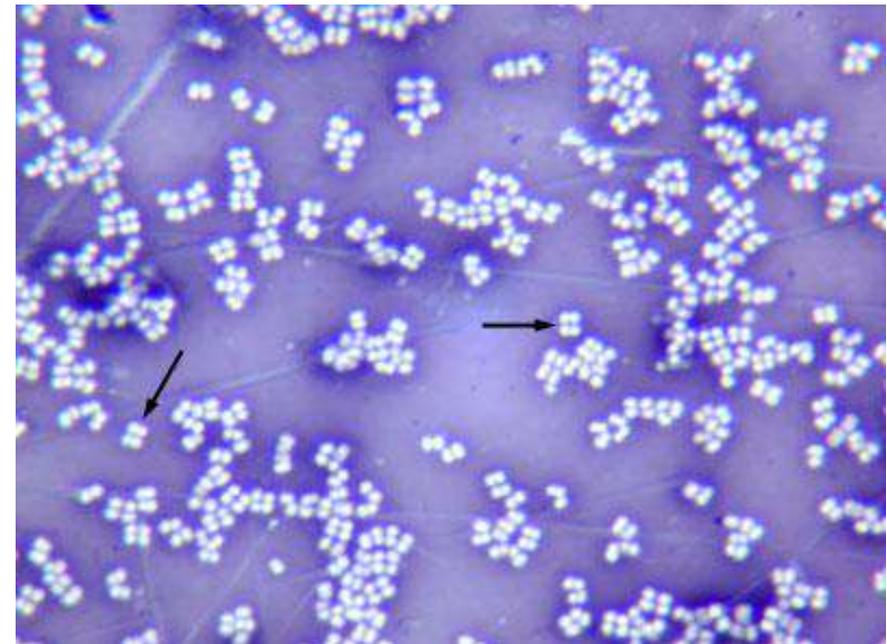


Escherichia coli

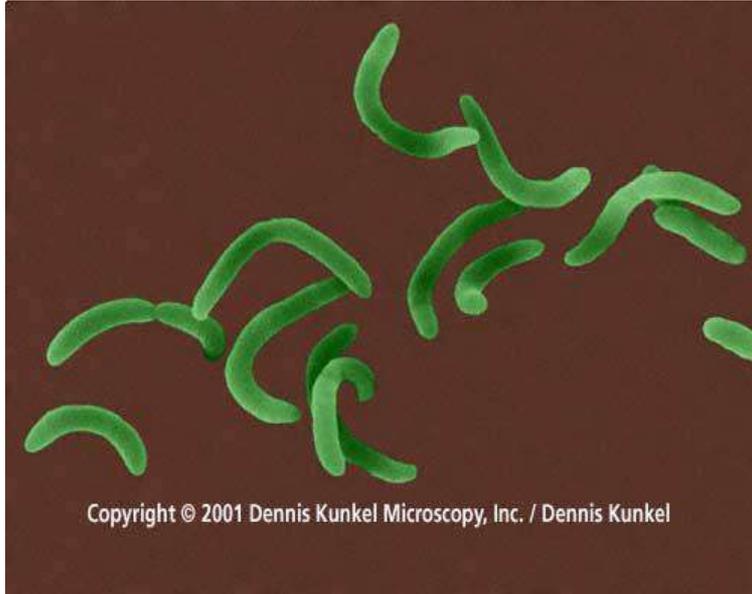




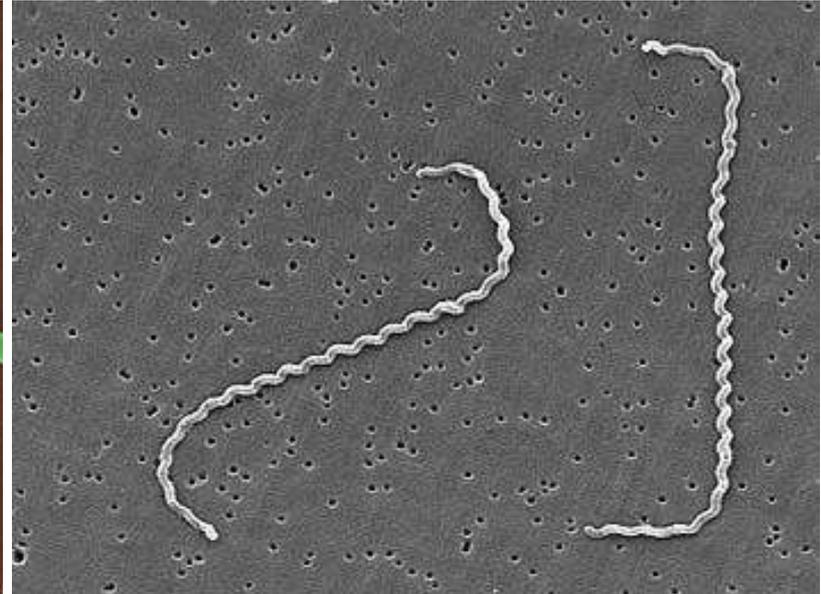
Enterobacter



Micrococcus luteus



Vibrio



Leptospira

1/ L'examen microscopique à l'état frais

- Il permet d'observer la forme des bactéries et leur mobilité.
- On dépose une goutte de liquide à examiner sur une lame (prélèvement ou culture bactérienne, sang, LCR, urine). On recouvre avec une lamelle. On examine la préparation au microscope avec un objectif à sec (40 x).

2/ Le frottis

- C'est une préparation qui utilise des bactéries tuées (pendant la fixation) et surtout colorées.
- Il permet d'examiner la forme des bactéries, leur disposition dans le frottis, leur taille, la présence (ou non) des structures non obligatoires (la spore, la capsule).

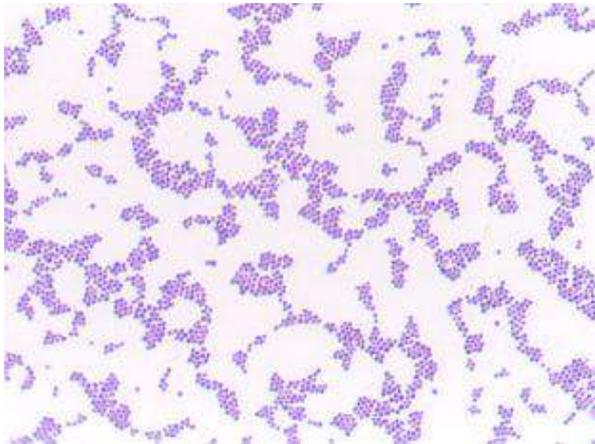
Les étapes du frottis

- L'étalement : on utilise l'anse bactériologique
- Le séchage près de la flamme
- La fixation se fait en passant 2-3 fois la préparation dans la flamme d'un bec Bunsen
- La coloration
- le lavage, le séchage , et l'examen au microscope à l'objectif d'immersion.

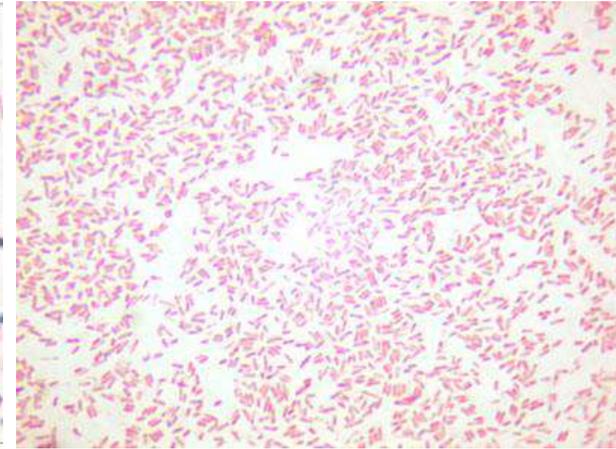
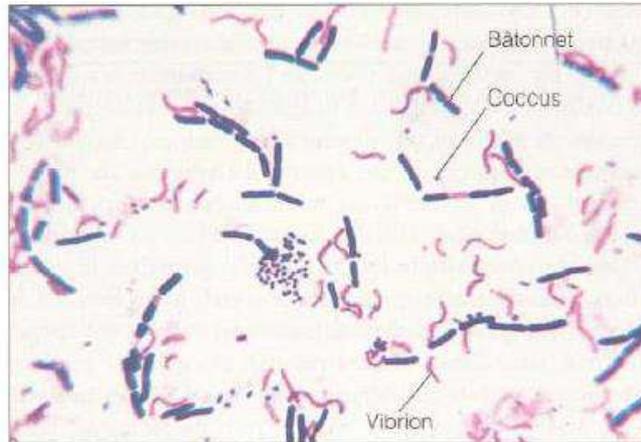
3/ La coloration de Gram

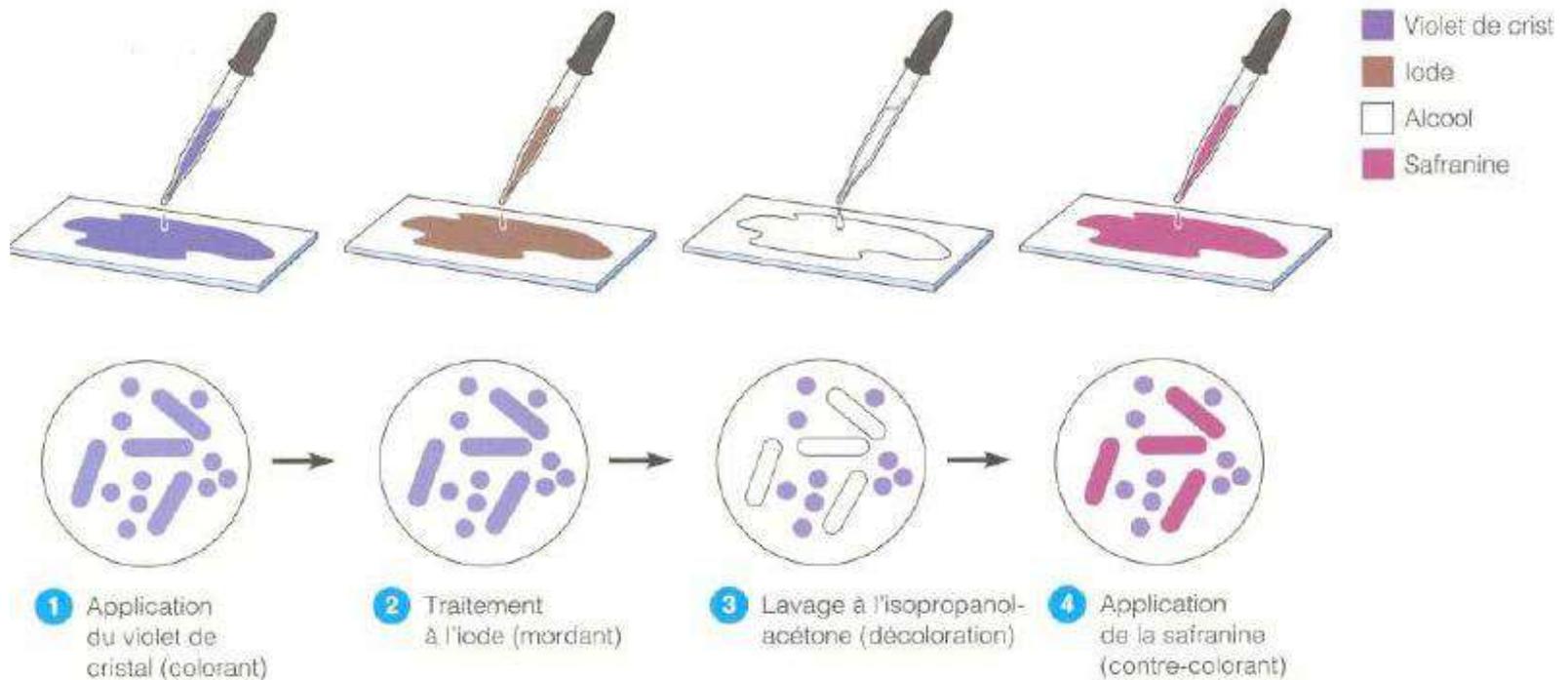
C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, ainsi que la forme et l'arrangement bactérien.

Gram+



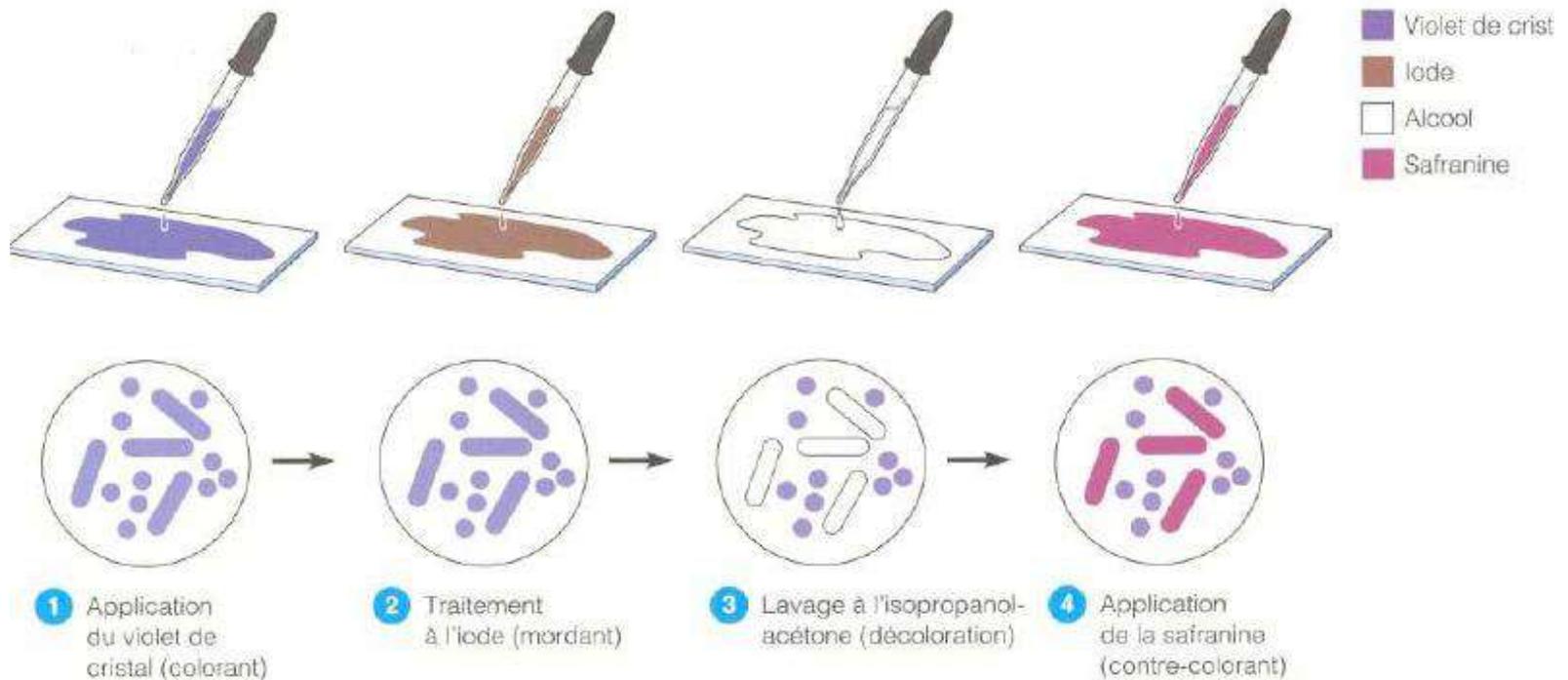
Gram-



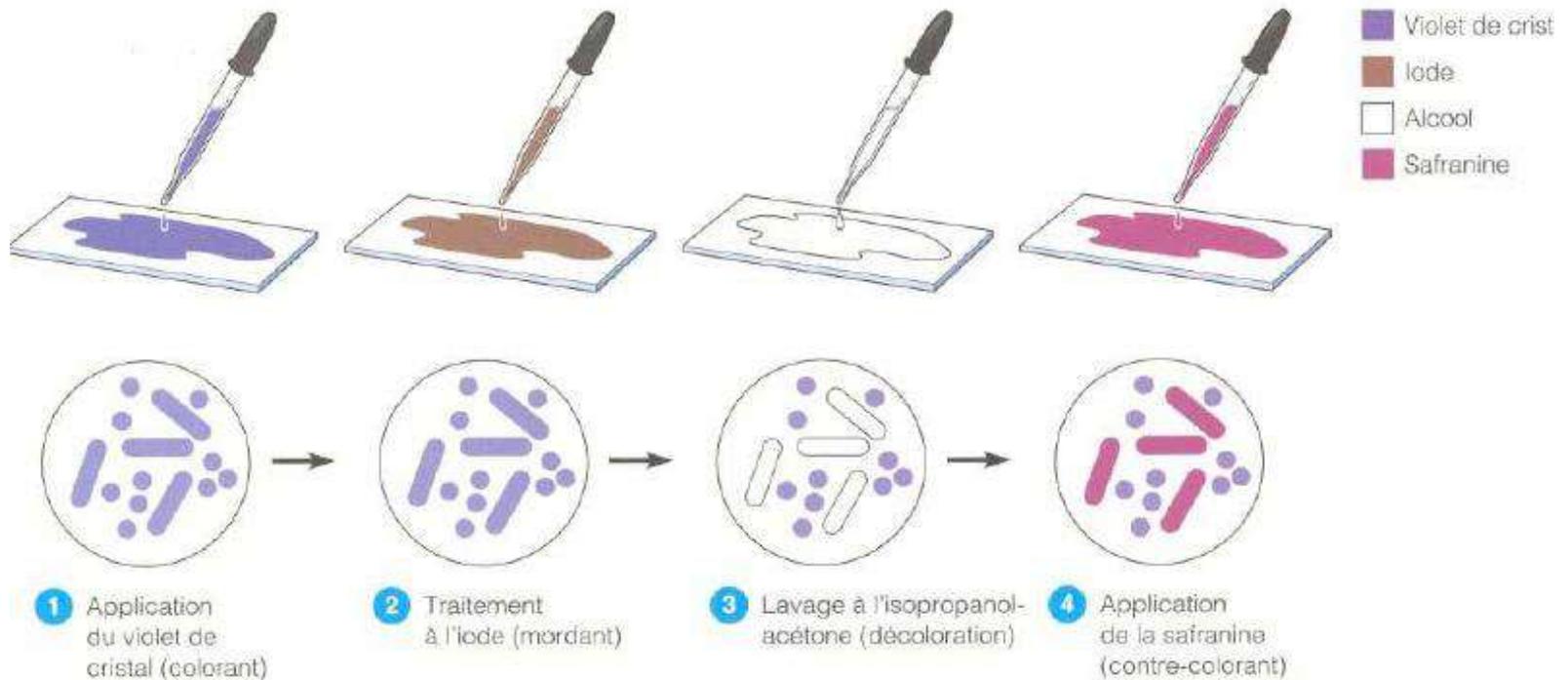


Réalisation de la coloration :

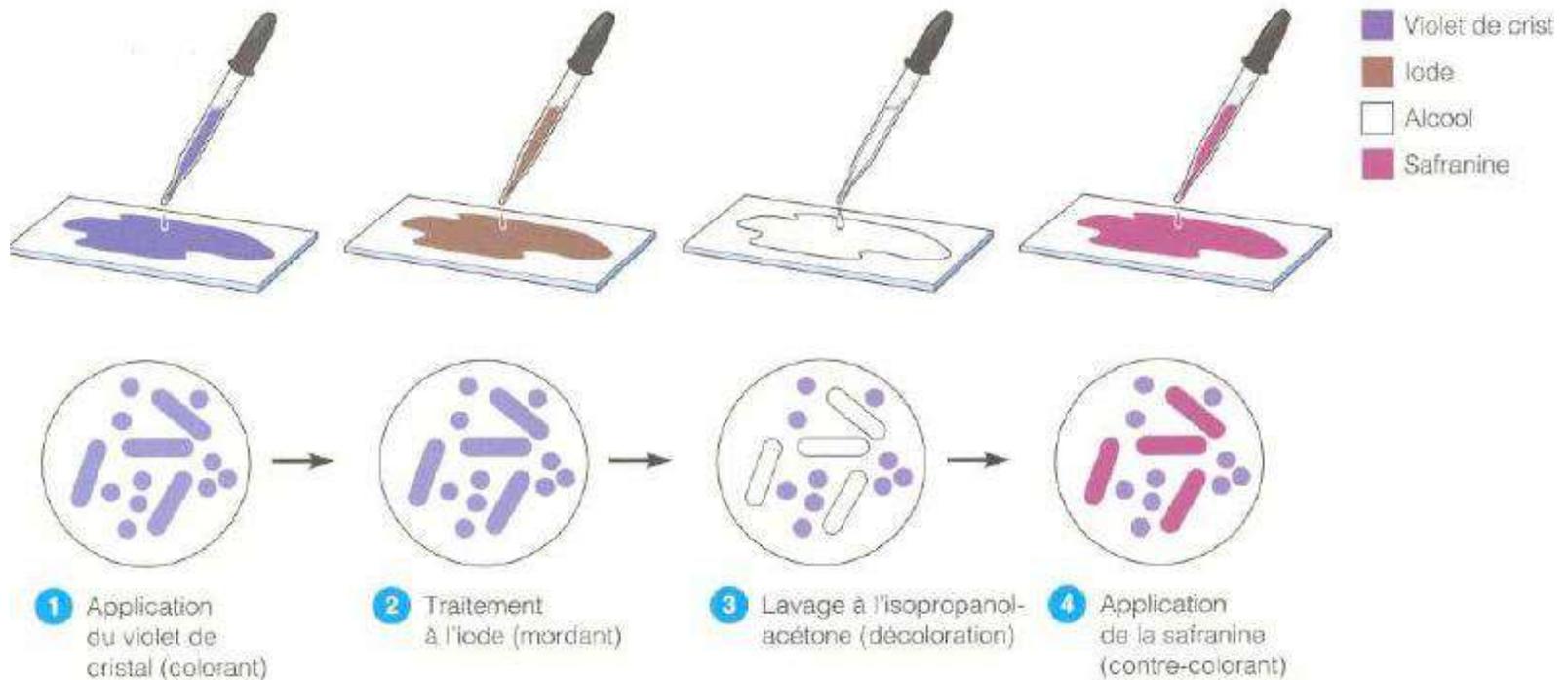
- Coloration par le cristal violet : Laisser agir de 30'' à 1'. Rincer à l'eau distillée.
- Mordançage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 20'' ; Rincer à l'eau distillée.



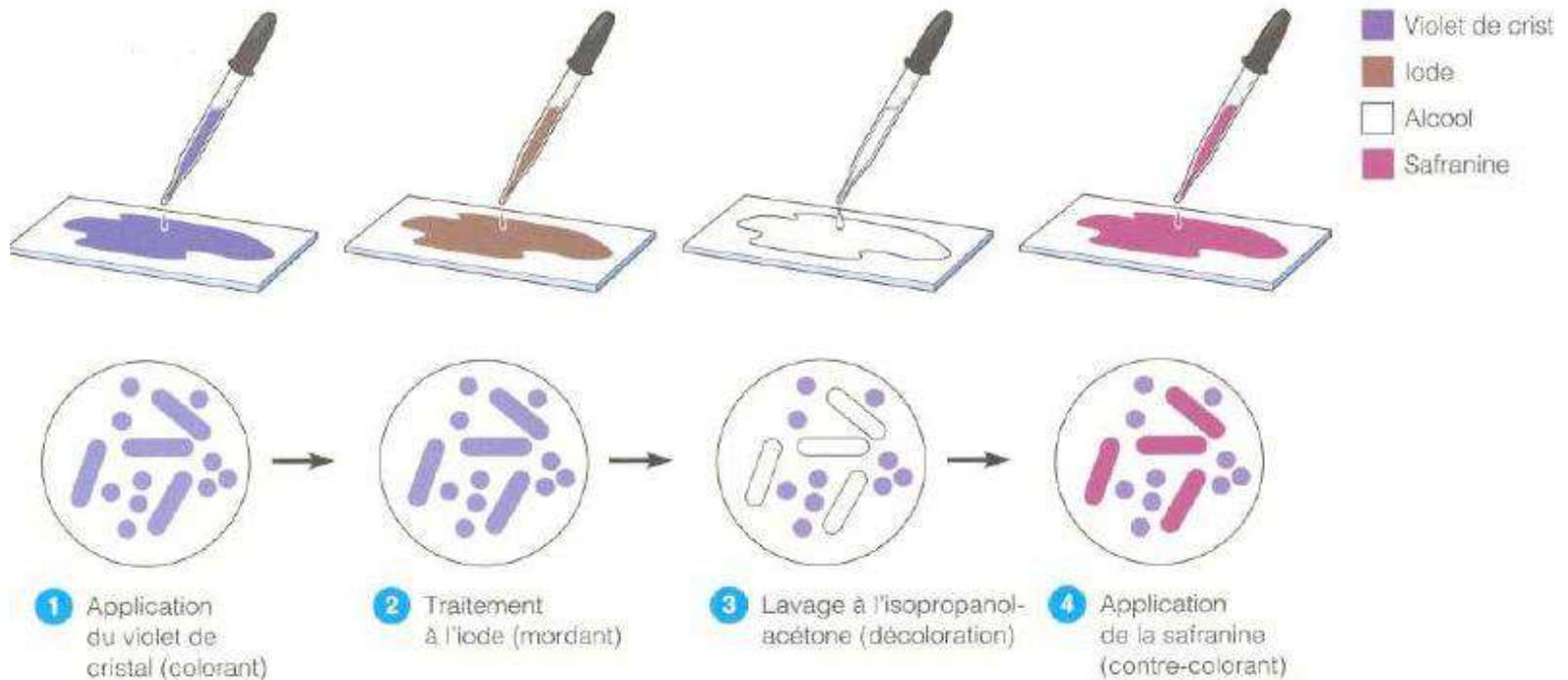
- Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone): verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée.
- Le filet doit être clair à la fin de la décoloration.
- Rincer sous un filet d'eau distillée. ;



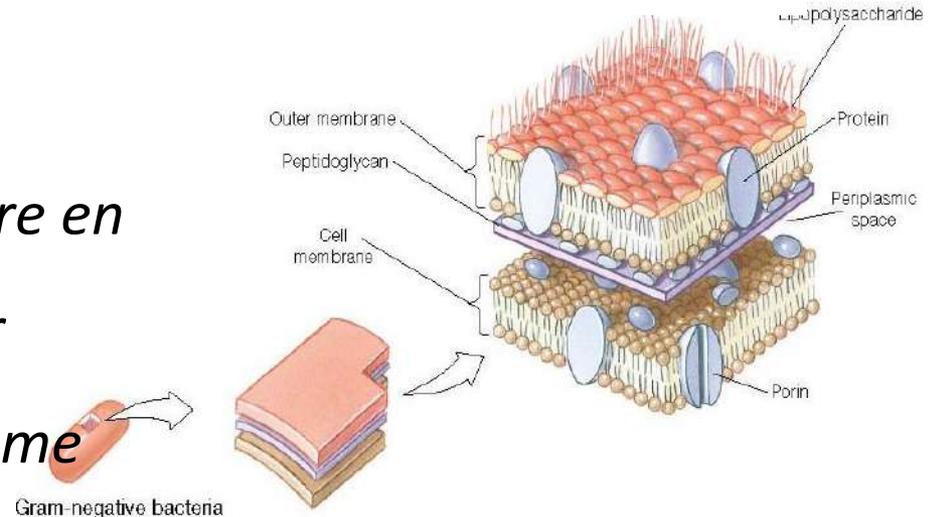
- Recoloration à la fuchsine. Laisser agir de 30'' à 1'. Laver doucement à l'eau distillée. Sécher la lame
- Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement x1000).

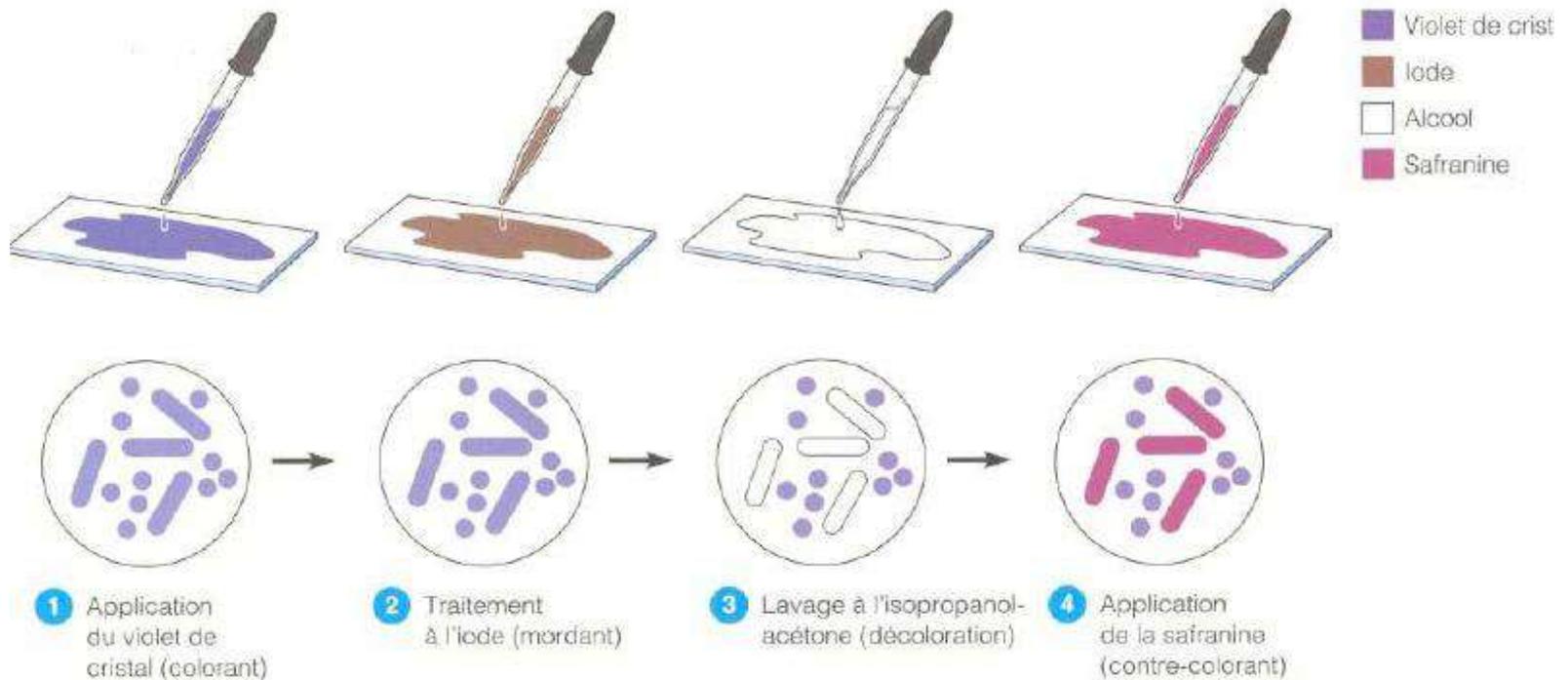


- *Les étapes 1 et 2 colorent en violet le contenu de la **bactérie**.*
- *Le cristal violet se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries.*
- *Le lugol permet de fixer cette coloration interne.*

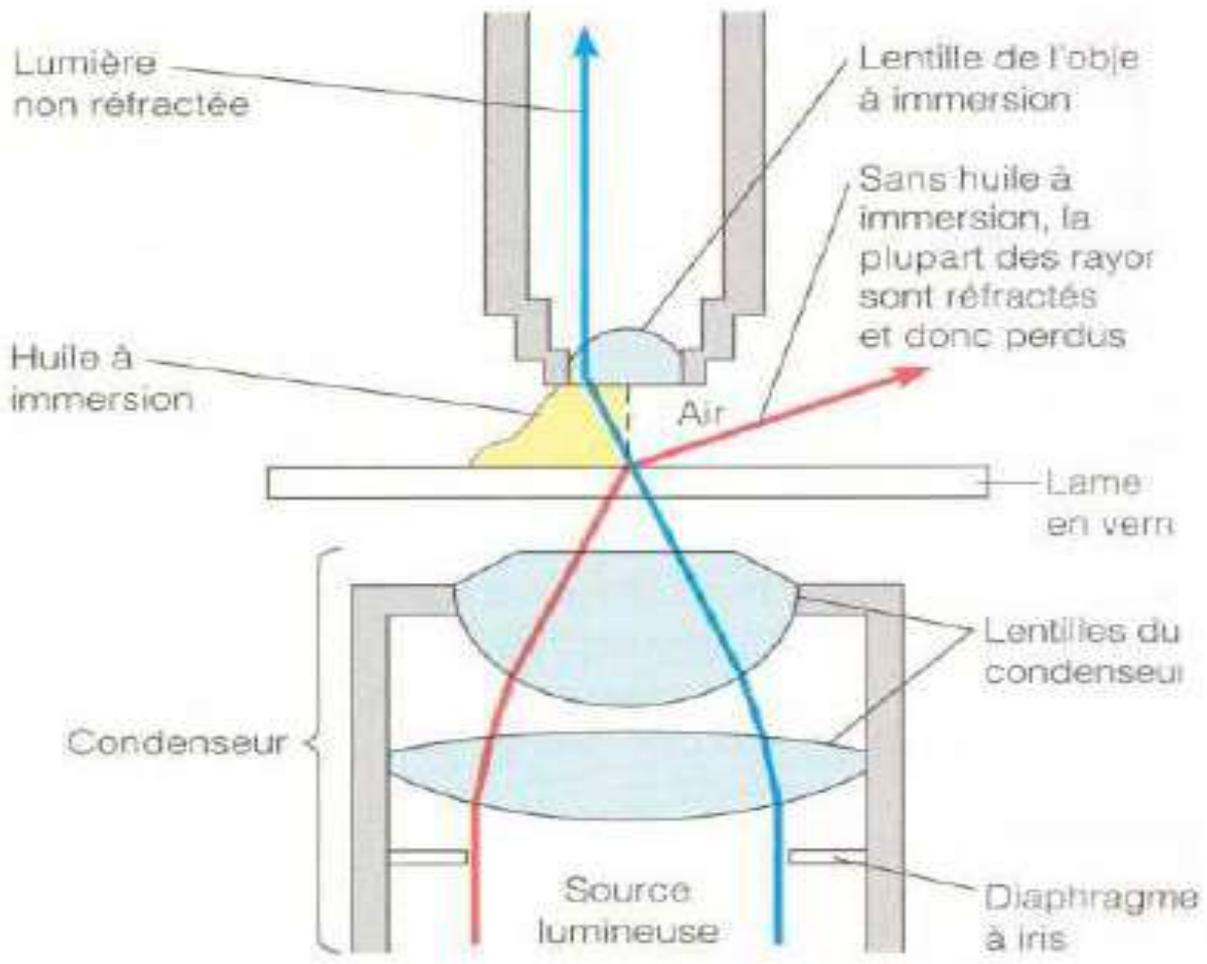


L'étape 3 décolore le cytoplasme des Gram-. Elles ont une paroi pauvre en peptidoglycane qui va laisser passer l'alcool et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le cristal violet.





- L'étape 4 est une contre-coloration ayant pour but de donner aux bactéries Gram négatives précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope.



l'examen au microscope se fait à l'objectif d'immersion (x100).

Phénomène de la réfraction dans un microscope composé muni d'un objectif à immersion. Étant donné que la lame en verre et l'huile à immersion ont le même indice de réfraction, les rayons lumineux ne sont pas réfractés lorsqu'ils passent de l'un à l'autre dans un objectif à immersion. Cette méthode permet une meilleure résolution à des grossissements de plus de 900 x.

- R.I. of lens = 1.52
- R.I. of oil = 1.52
- R.I. of slide = 1.52
- R.I. of air = 1.00

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

