

Règles d'hygiène et de sécurité

I- Généralités

Au cours des travaux pratiques, vous allez manipuler des souches bactériennes potentiellement pathogènes.

Pour éviter tout accident ou incident, nous vous rappelons certaines règles :

- A- Il est obligatoire de préparer le protocole du TP avant d'arriver dans la salle.
- B- Il est obligatoire de porter une blouse pour travailler,
- C- Il est obligatoire d'éteindre vos téléphones portables.
- D- Il est interdit de manger ou de boire.
- E- Il faut se laver les mains chaque fois que nécessaire au cours d'une séance et en tout cas avant de quitter la salle.
- F- Il est recommandé de travailler dans un local sans courant d'air pour ne pas risquer de mettre des bactéries en suspension dans l'air, donc évitez d'ouvrir les fenêtres.

II- Hygiène de la paillasse et de la hotte

Avant d'entreprendre toute manipulation, il est indispensable de prendre certaines précautions d'asepsie afin d'éviter des contaminations extérieures et de travailler le plus proprement possible.

La paillasse, ou la hotte, sera nettoyée à l'alcool, avant le début de chaque manipulation, ainsi qu'à la fin des TP, parfois aussi pendant le travail. **Les paillasses seront numérotées et nominatives.**

III- Manipulations

Veiller à la propreté absolue des mains : porter des gants neufs pour chaque nouvelle manipulation et les enlever dès que la manipulation est terminée.

Ne jamais ouvrir de flacons, de tubes, de boîtes de Petri, hors de la zone stérile (hotte). Même ouverts dans cette zone stérile, ne jamais les tenir verticalement, mais inclinés à 45° environ, pour éviter la chute de microorganismes de l'atmosphère par gravité.

Pendant les manipulations, il est préférable de garder les bouchons dans les mains. Ne pas les poser sur la paillasse.

En cas de blessure accidentelle, se désinfecter immédiatement avec de l'alcool.

IV- Déchets

Tout le matériel contaminé à usage unique (gants, öses, boîtes de Petri, pipettes) doit être jeté dans les sacs à autoclave prévus à cet effet.

Les lames et lamelles seront placées dans des pots spécifiques contenant de la javel.
Les papiers sont à jeter dans les poubelles classiques. Ne rien jeter dans les éviers

V- Avant de quitter la salle, vérifiez :

- | | |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| Microscope : | - lumière éteinte |
| | - pas de lame de verre sur la platine |
| | - objectif à immersion essuyé |
| Paillasse nette et propre : | - pas de taches de colorants |
| | - pas de débris de verres |
| | - pas de matériel contaminé |
| | - pas de liquide répandu |

Travaux pratiques de microbiologie

Le programme des six séances de TP est le suivant :

- **Identification des organismes eucaryotes présents dans la boue d'une station d'épuration.**
- **Observation microscopique de bactéries après coloration au bleu de méthylène, et coloration de Gram.**
- **Identification de bactéries présentes dans un échantillon d'eau d'un lac proche.**
- **Contrôle qualité de yaourts.**
- **Analyse microbiologique de différents environnements.**
- **Comparaison de l'activité bactéricide des antibactériens.**
- **Effets des antibiotiques sur *E. coli*.**

Jour 1 :

A- Identification des organismes eucaryotes présents dans la boue d'une station d'épuration

1- Observation d'organismes eucaryotes

Sur une lame, déposer une goutte des mélanges à observer et couvrir d'une lamelle en évitant les bulles. Attention, la goutte ne doit pas être trop épaisse pour qu'elle ne déborde pas de la lamelle, et contaminer l'opérateur mais elle ne doit pas être non plus trop petite afin d'éviter un séchage trop rapide et ne pas pouvoir observer la mobilité éventuelle des microorganismes. Quoiqu'il en soit comme son nom l'indique, un état frais doit s'observer rapidement. Les observations se font à l'objectif X 40.

Selon la morphologie, les organites présents, le groupement caractéristique, la mobilité, vous identifierez chaque organisme en consultant la documentation mise à votre disposition (classeur).

2- Identification des organismes eucaryotes présents dans la boue d'une station d'épuration

Examinez l'échantillon au microscope à l'état frais. Identifiez les eucaryotes que vous observez et dessinez-les.

B- Observation microscopique de bactéries après coloration au bleu de méthylène.

- Préparer une lame propre, déposer au centre de la lame une goutte d'eau dans laquelle une faible quantité de la colonie prélevée à l'öse est mise en suspension.
- Chauffer la lame pour la faire sécher (fixation des bactéries sur la lame par la chaleur).
- Le frottis est trempé dans une solution de bleu de méthylène à 0,6% pendant une minute, puis dans une solution de rinçage eau-éthanol (50/50).
- Après séchage, l'observation est réalisée à l'immersion. Les cellules bactériennes apparaissent bleu foncé.

Chaque binôme réalisera une lame pour une bactérie de référence mais une description (schémas possibles) de l'observation sera effectuée pour toutes les bactéries de référence : forme (coque, bacille), regroupement (isolé, tétrade, en amas...).

Bactéries de référence

E. coli ; *Klebsiella pneumoniae* ;

Micrococcus luteus ; *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus thermophilus* ; *Enterococcus faecium*

C- Identification de bactéries présentes dans un échantillon d'eau d'un lac proche

Un échantillon d'eau provenant d'un lac voisin (lac de Grigny) a été analysé concernant sa flore microbienne. De nombreuses bactéries y ont été isolées.

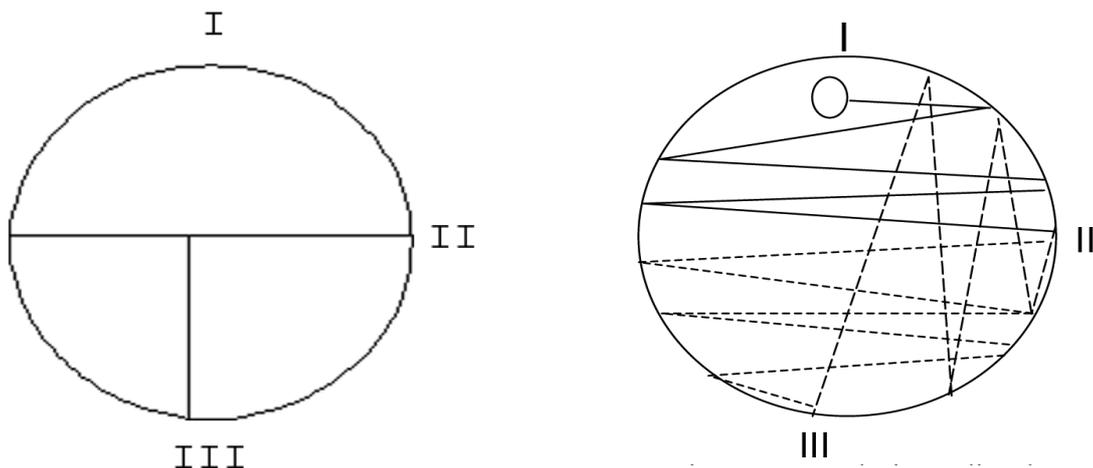
Chaque binôme **devra identifier deux bactéries** de cet échantillon par diverses techniques (croissance sur milieux sélectifs, test biochimiques...) effectuées tout au long des six séances de TP et devra discuter sur la présence normale ou non de ces bactéries dans l'eau.

Mélanges : **A. *E. coli*/Staphylococcus** ; **B. *Klebsiella*/Micrococcus**

Technique d'isolement : méthodes des cadrans.

But : séparer les bactéries les unes des autres de façon à obtenir des colonies isolées. La colonie représente un clone bactérien, c'est-à-dire une bactérie avec toute sa descendance.

A l'aide d'une öse stérile, étaler une goutte de la suspension bactérienne en stries très serrées sur toute la surface du milieu LB comme indiqué sur la figure, et incuber toute la nuit à 37°C, boîte retournée.



Jour 2

A- Identification de bactéries présentes dans un échantillon d'eau d'un lac proche

Examen macroscopique

Identification et description des deux colonies différentes sur la boîte. Il s'agit de décrire l'aspect des colonies obtenues après ensemencement de la veille. (Vous décrirez notamment la forme de la colonie, les bords, la surface, la transparence, la consistance, la pigmentation éventuelle...) pour chaque type de colonies. Voir documents dans le classeur.

Amplification

But : Obtenir un grand nombre de colonies des deux espèces bactériennes isolées

Séparer une boîte de Petri en deux. Prélever, avec une öse, une colonie bien isolée et identifiée et faites des stries sur toute la moitié de la boîte. Faire de même avec l'autre colonie sur l'autre moitié de la boîte. Incuber à 37°C toute la nuit, boîte retournée.

B- Contrôle qualité de yaourts

La fabrication du yaourt est relativement simple. Elle peut se faire de manière artisanale, à la maison ou de manière industrielle.

Le yaourt est fabriqué à partir de lait (entier, demi-écrémé ou écrémé), généralement de vache; celui-ci est pasteurisé, et souvent enrichi avec du lait en poudre. Le yaourt aura ainsi une teneur en protéines et en calcium plus importante que du lait normal. Puis, deux bactéries sont ajoutées pour la fermentation :

Streptococcus thermophilus et *Lactobacillus bulgaricus*

Les préparations laitières faites sur le même principe mais avec d'autres bactéries (*Bacillus*, *Bifidobacterium*...) n'ont pas en France le droit d'être appelés « yaourt ».

La date limite de consommation (DLC) des yaourts est au maximum de 30 jours à partir de la date de fabrication car les bactéries doivent rester vivantes et en nombre suffisant (10^7 bactéries/g à la DLC). En fin de fabrication, le yaourt contient environ 100 milliards de bactéries vivantes par gramme.

A partir de deux yaourts, vous ferez un contrôle qualité afin de déterminer quel yaourt est consommable et quel yaourt a une DLC dépassée. Le but du contrôle qualité est de déterminer le nombre de bactéries présentes par gramme de yaourt.

- Pour cela, préparer 8 tubes contenant 9 ml de milieu TS liquide. Ajouter au 1^{er} tube 1 gramme de yaourt (=1ml de yaourt A ou B), bien homogénéiser, puis faire des dilutions en séries de 10 en 10 jusqu'à 10^{-8} .

- Après avoir homogénéisé, ensemencez 100 µl des 3 dernières dilutions :

A : Yaourt périmé ; B. Yaourt frais.

3 boîtes MRS et 3 Boîtes M17

Chaque quadrinome : un binôme réalise un MRS et l'autre le M17

Il faut un minimum de 300ml de milieu (15ml + 100µl de suspension bactérienne + un layout de 5ml une fois le milieu est solide)

→ avec 15 ml de milieu MRS-agar tiède (environ 45°C, liquide), bien mélanger et déposer sur boîte, attendre que le milieu se solidifie puis recouvrir de 5 ml de milieu (ensemencement en double couche, pour isoler *Lactobacillus bulgaricus* en condition micro-aérophile).

→ sur 3 boîtes de Petri contenant du milieu M17-agar solide (pour isoler *Streptococcus thermophilus*)

→Après avoir homogénéisé, ensemencez 100 µl des 3 dernières dilutions sur 3 boîtes de Petri contenant **du milieu TS solide**.

Incuber les boîtes à 37°C, retournées.

Conserver la dilution 10^{-7} de yaourt à 4°C pour la coloration de Gram du jour 3.

C- Analyse microbiologique de différents environnements

But : isoler et identifier les bactéries présentes dans différents environnements.

Exemples d'environnements :

- comparaison salive fumeur / non fumeur
- analyse microbiologique des toilettes
- isolement des bactéries présentes sur les doigts
- isolement des bactéries présentes dans l'air

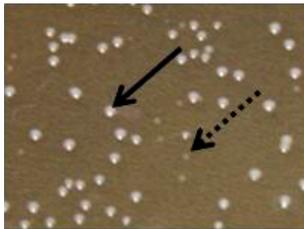
Chaque binôme aura deux boîtes de Petri LB et pourra faire des prélèvements sur les environnements qu'il aura choisis (même en dehors des exemples donnés ci-dessus).

Chaque binôme devra trouver le protocole adéquat pour faire son prélèvement et devra en discuter préalablement avec les enseignants (détermination du protocole avant la séance de TP).

Jour 3

A- Contrôle qualité de yaourts

- 1- Identification des deux bactéries normalement présentes dans les yaourts



Colonies bactériennes de *Streptococcus thermophilus* (flèche en pointillés, colonies translucides) et *Lactobacillus bulgaricus* (flèche pleine, colonies opaques) du yaourt sur milieu nutritif gélosé.

- 2- Comptage de chaque espèce bactérienne

Comptez le nombre de colonies obtenues pour chaque espèce bactérienne sur une boîte contenant entre 10 et 100 colonies. Ramenez ce chiffre par gramme de yaourts et déterminez quel yaourt avait une DLC dépassée.

- 3- Caractéristiques des bactéries du yaourt

- * Vous ferez une amplification pour chaque espèce bactérienne (cf page 4)
- * Vous ferez une coloration de gram pour les deux espèces (cf après)

B- Analyse microbiologique de différents environnements

- * Analyse des résultats : description des colonies obtenues, comptage, comparaison...
- * Vous ferez une amplification pour deux espèces bactériennes au choix (cf page 4)
- * Vous ferez une coloration de gram pour ces deux espèces (cf après)

C- Coloration de Gram

But : il s'agit de la coloration de base en microbiologie. Elle permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer en deux genres (Gram+ et Gram-). Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

Protocole

Etaler une goutte de suspension microbienne sur une lame
Laisser bien sécher à l'air
Recouvrir la lame avec du violet de Gentiane ou crystal violet ; laisser agir 30s
Par-dessus ajouter le lugol 30s
Eliminer les colorants et décolorer rapidement à l'alcool 30sec
Rincer à l'eau pour arrêter la décoloration
Recouvrir la lame de Fuchsine ou safranine 1 min
Rincer à l'eau et laisser sécher à l'air (ou à la flamme)
Observation à l'objectif X 100 avec l'huile à immersion

Principe

Après l'application du violet de gentiane et de la solution de lugol, il se forme un complexe coloré dans les cellules et toutes sont colorées en bleu-violet. Il existe une différence de perméabilité à l'agent de décoloration (alcool) entre la structure des parois des bactéries Gram+ et Gram- ce qui entraîne une différence dans la vitesse de dissolution des complexes formés. Ainsi, les bactéries Gram+ conservent leur coloration violette alors que les Gram- sont complètement décolorés. La dernière étape (fuchsine) constitue simplement une coloration de contraste afin de recolorer les bactéries Gram- en rose-rouge pâle.

Manipulation : Faire une coloration de Gram sur

- les deux espèces bactériennes à identifier (échantillon d'eau)
- une bactérie de référence (à tester, vous garderez la même pour tous les tests)
- les deux bactéries isolées du yaourt (une par binôme)
- une ou deux colonies provenant des différents prélèvements

D- Comparaison de l'activité bactéricide des antibactériens

L'activité bactéricide de plusieurs antibactériens sera comparée. Chaque binôme choisira deux antibactériens à tester parmi :

- les UV
- l'éthanol
- l'eau de javel
- eau bouillante

Préparer une suspension bactérienne de *E. coli*.

1- Les UV

- Etaler 50 µl d'une suspension de *E. coli*/Serratia/ (1boîte), puis *Micrococcus/Bacillus/Deinococcus* sur 1 autre boîte de Petri
- Exposer les boîte (ouverte) aux UV pendant **50/100/150/200/250s**
- Incuber une nuit à 37°C, boîte retournée.

2- Ethanol et eau de javel

- Dans un tube eppendorf contenant 900µl d'éthanol ou d'eau de javel, ajouter 100µl de suspension bactérienne de *E. coli*.

100µl de suspension bactérienne + 900µl alcool/eau de Javel
100µl de suspension bactérienne + 750µl alcool/eau de Javel + 150µl LB liquide
100µl de suspension bactérienne + 450µl alcool/eau de Javel + 450µl LB

Témoin 100µl de suspension bactérienne + 900µl d'eau

- Bien mélanger en reoulant plusieurs fois avec la pipette et laisser agir une minute
- Centrifuger le tube 1 minute à 4500 rpm
- Reprendre le culot avec 1ml de milieu LB (élimination de l'éthanol ou de l'eau de javel)
- Re-centrifuger le tube 1 minute à 4500 rpm
- Reprendre le culot avec 1ml de milieu LB (lavage)
- Etaler 10µl du mélange sur une boîte de Petri et laisser incuber une nuit à 37°C, boîte retournée (à l'aide d'un rateau).

3- eau bouillante

- Dans un eppendorf contenant 900µl d'eau, ajouter 100µl de suspension bactérienne de *E. coli*.
- Faire chauffer les tubes 1 minute ; 1min 50s et 2 min à 95°C dans un bloque chauffant, refroidir dans la glace
- Etaler 10µl du mélange sur une boîte de Petri et laisser incuber une nuit à 37°C, boîte retournée.

Une seule boîte témoin pour chaque agent antibactérien sera faite pour tous les groupes en utilisant le même protocole sauf l'agent antibactérien.

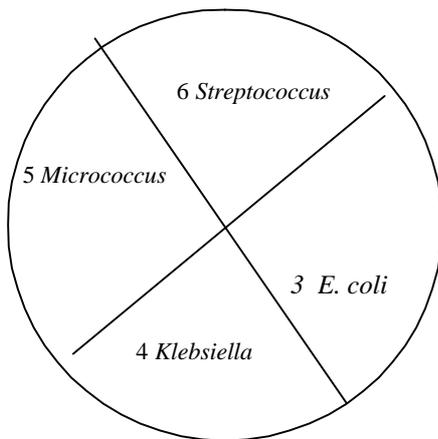
Jour 4

A- Comparaison de l'activité bactéricide des antibactériens

Description et analyse des résultats, conclusion

B- Utilisation de milieux sélectifs pour identifier une bactérie

Chromagar, EMB, Mannitol-Salt Agar, Mc Conkey

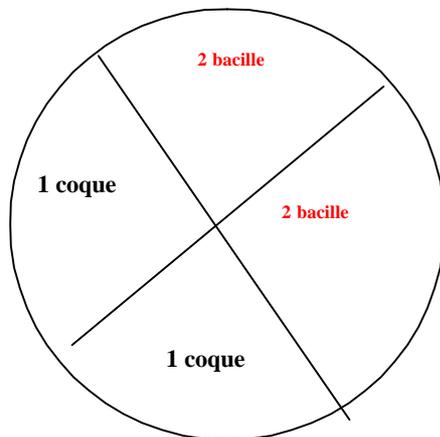


Boîte Témoin pour chaque milieu de culture

3 : *E. coli* 4. *Klebsiella* 5- *Staphylococcus*

6- : *Micrococcus*.

Deux trinômes ensementeront leurs cocci/bacilli dans une boîte/milieu



- Partager la boîte de Petri en six comme indiqué sur la figure à gauche.
- A l'aide d'une öse et de vos amplifications, faire des stries dans la partie correspondante de l'intérieur vers l'extérieur de la boîte
- Incuber la boîte retournée à 37°C toute la nuit

Pour chaque mélange A, ou B, ensementer les bactéries à identifier de la manière suivante :

1- Cocci

2 : bacille

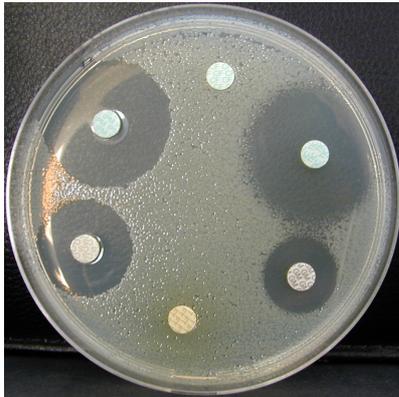
C- Effets des antibiotiques sur *E. coli*

1- Réalisation d'un antibiogramme : méthode des disques

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence du ou des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. On peut par exemple placer plusieurs pastilles imbibées d'antibiotiques sur une souche bactérienne déposée dans une boîte de

Petri. Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante



- Diluer la suspension bactérienne de *E. coli* au 1/100^e
- Etaler 100µl de la dilution de *E. coli* sur une boîte de Petri
- Sécher la boîte 15 min à 37°C
- Déposer les disques à la surface de la boîte, les plus éloignés les uns des autres, en appuyant légèrement à l'aide d'une öse.
- Laisser les boîtes 15 minutes à température ambiante, puis les incuber à 37°C toute la nuit.

2- Mesure de la CMI

CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) : Plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible de la souche bactérienne étudiée (à ne pas confondre avec la **CMB**, Concentration Minimale Bactéricide, plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle l'effet bactéricide souhaité est de 99,99%).

Préparer 2ml de la solution mère d'ampicilline à partir de la concentration de :100mg/ml

- 1- 10mg/ml : 20µl de solution mère + 180µl de LB soit un total de 200µl
- 2- 100µg/ml : 10µl de la solution précédente + 990µl de LB = 1ml
- 3- 1µg/ml : 10µl de la solution précédente + 990µl de LB = 1ml

N° tube	1	2	3	4	5	6	7	8
Milieu LB (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4
Antibiotique	40µL	4µl	40µL	4µl	40µL	4µl	40µL	4µl
Suspension <i>E. coli</i> (µl)	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl
[Antibiotique]	100mg/ml	100mg/ml	10mg/ml	10mg/ml	100µg/ml	100µg/ml	1µg/ml	1µg/ml

A compléter selon la souche utilisée et les valeurs de CMI attendues.

Les 2 binômes d'un même quadrinôme feront respectivement une seule concentration, soit 4µl soit 40µl.

Incuber les tubes à 37°C toute la nuit.

A- Utilisation de milieux sélectifs pour identifier une bactérie

Milieux utilisés :

MILIEU DE CHAPMAN

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles. Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif.

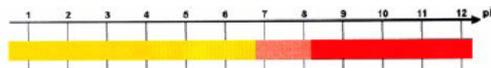


Composition

La composition, en grammes par litre d'eau distillée, est la suivante :

Peptones	11,0 g
Extrait de viande	1,0 g
Chlorure de sodium	75 g
Mannitol	10,0 g
Rouge de phénol	0,025 g
Agar	15 g
Eau distillée (qsp)	1000 mL

Rouge de phénol



Principe

Ce milieu contient un inhibiteur : fortes concentrations en chlorure de sodium (75 g.L^{-1}), ce qui permet un isolement sélectif de *Staphylococcus* tolérant les fortes concentrations en NaCl.

On peut étudier la fermentation du mannitol par virage au jaune de l'indicateur coloré, le rouge de phénol, autour des colonies.

Technique

L'ensemencement doit être massif, en stries serrées ou par inondation.

Ne pas sécher le milieu à l'étuve avant l'ensemencement : la dessiccation du milieu pourrait entraîner une augmentation de la concentration en NaCl et rendre le milieu trop inhibiteur.

Lecture

L'utilisation du mannitol se traduira par une acidification du milieu, provoquant le virage au jaune de l'indicateur de pH.

Les colonies mannitol + sont entourées d'une auréole jaune.

L'utilisation du mannitol est un caractère discriminatif important dans le genre *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus* étant mannitol +.



Ne pas confondre la pigmentation des colonies et le virage de l'indicateur coloré.

Ainsi des colonies pigmentées en jaunes et mannitol + : forte suspicion de *S. aureus*

Remarque : le milieu de Chapman permet la sélection des *Staphylococcus* et une orientation pour l'identification de l'espèce *S. aureus*. Mais il ne s'agit que d'un test de présomption et une confirmation par des tests plus spécifiques (coagulase, ADNase...) reste obligatoire.

MILIEU MAC CONKEY

Milieu sélectif pour l'isolement des bacilles Gram⁻ Salmonella et Shigella ainsi que des bactéries coliformes dans les eaux, les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques et biologiques.

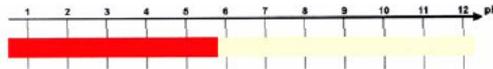


Composition

Formule en g/L d'eau distillée :

Peptone	20
Lactose	10
Sels biliaries	1.5
Cristal violet	0.001
Rouge neutre	0.05
Chlorure de sodium	5
Agar	15
pH = 7,1	

Rouge neutre



Principe

→ Ce milieu contient deux inhibiteurs de la flore Gram⁺, les sels biliaries et le cristal violet.

→ Le milieu contient un critère de différenciation, le lactose dont l'utilisation est révélée par l'indicateur coloré du milieu, le rouge neutre.

Il vire au rouge en milieu acide.

⇒ si la bactérieensemencée fermente le lactose, le milieu devient rouge, par virage du rouge neutre, du fait de l'acidification du milieu.

Ensemencement

Isolement par la méthode des cadrans.

Incuber 18 à 24 h à 37 °C.

Lecture

Colonies rouges entourées d'un halo opaque de la même couleur du à la précipitation des sels biliaries: lactose⁺

Colonies jaunes ou incolores : lactose⁻

MILIEU EMB (éosine, bleu de méthylène)

Principe

Milieu utilisé pour isoler les bacilles G⁻. Ce milieu contient deux colorants, l'éosine et le bleu de méthylène qui inhibent la majeure partie de la flore Gram⁺ (sauf Streptocoques D). Bien que les Entérobactéries lactose - puissent s'y développer, la culture des Entérobactéries lactose + y est favorisée. Le milieu contient un critère de différenciation, le lactose

→ lactose + : colonies violet foncé

→ lactose - : colonies grisâtres ou incolores

Lecture

• colonies violettes :

semi-bombées de 2 à 3mm de diamètre avec éclat métallique, centre sombre : *E. coli* très bombées muqueuses de diamètre 5 mm centra gris marron sans reflet *Klebsiella*

• colonies grisâtres :

1 à 2 mm de diamètre transparentes, grises ambrées : *Salmonella*, *Shigella*.

2 mm de diamètre, grisâtres avec une pellicule autour de la colonie : *Proteus morganii*
 punctiformes et grisâtres : *Enterococcus*.

MILIEU CHROMAGAR

CHROMagar_orientation (urinary tract infection)

Escherichia coli, enterococci, the *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (KES) and the *Proteus-Morganella-Providencia* (PMP) groups are frequently encountered organisms in urinary tract infections (UTI). Most UTIs are caused by *E. coli* alone, or in combination with enterococci. *Staphylococcus saprophyticus* and *Streptococcus agalactiae* may be isolated from females, although less frequently.

Due to the different antimicrobial susceptibility patterns of the microorganisms involved, identification to the species level is necessary for effective antimicrobial therapy. The most frequently isolated species or organism groups produce characteristic enzymes. Thus, it is possible to identify these organisms to the species level with a limited number of substrate fermentation or utilization tests.¹

Some of the organisms encountered in UTIs produce enzymes either for the metabolism of lactose or glucosides or both. Other organisms produce none of these enzymes. For example, *E. coli* contains enzymes for lactose metabolism but is β -glucosidase negative. Some members of the family *Enterobacteriaceae* are β -glucosidase positive but do not contain enzymes necessary for

lactose fermentation; others may contain both types of enzymes or none of them. β -glucosidases are also found in gram-positive cocci, such as *S. agalactiae* and the enterococci. Tryptophan deaminase (TDA) is an enzyme characteristically found in the *Proteus-Morganella-Providencia* group.

CHROMagar Orientation medium was developed by A. Rambach and is sold by BD under a licensing agreement with CHROMagar, Paris, France.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Specially selected peptones supply the nutrients in BBL CHROMagar Orientation medium. The chromogen mix consists of artificial substrates (chromogens), which release differently colored compounds upon degradation by specific microbial enzymes, thus assuring the differentiation of certain species or the detection of certain groups of organisms, with only a minimum of confirmatory tests. *Proteus* swarming is partially to completely inhibited.

PERFORMANCE TEST PROCEDURE

1. Inoculate representative samples with dilutions of the cultures listed below.
 - a. Streak inoculate with 10^3 - 10^4 CFUs of all organisms.
 - b. Incubate plates at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ in an aerobic atmosphere.
 - c. Include Trypticase™ Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) plates as nonselective controls for all organisms.
2. Examine plates after 18–24 h for amount of growth and color formation.
3. Expected Results

Organisms	ATCC™	Recovery	Colony Color
* <i>Enterobacter cloacae</i>	13047	Fair to heavy growth	Dark blue to medium blue with or without violet halos in the surrounding medium
* <i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Fair to heavy growth of small size colonies	Blue-green
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Fair to heavy growth of medium to large size colonies	Transparent, dark rose to pink, with or without halos
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33495	Fair to heavy growth	Medium blue to dark blue, mucoid
* <i>Proteus mirabilis</i>	43071	Fair to heavy growth of medium size colonies. Swarming is partially to completely inhibited	Transparent, pale beige to brown, surrounded by a brown halo. In areas of dense growth, the medium may be completely orange-brown.
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Fair to heavy growth of small to medium size colonies	White to cream (natural pigmentation)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	Fair to heavy growth	White to cream (natural pigmentation)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	15305	Fair to heavy growth	Light pink to rose
* <i>Streptococcus agalactiae</i>	12386	Fair to heavy growth of pinpoint to small size colonies	Light blue-green to light blue with or without halos

Description et analyse des résultats

Jour 5

A- Test biochimiques pour identifier une bactérie

- **Milieu API OF pour déterminer la voie d'utilisation du glucose : Voie fermentaire ou respiratoire**

2 tubes/souche : Chaque binôme testera la souche de référence et les deux bactéries à identifier (eau).

Le milieu de culture est solide : on le fait chauffer à 80°C dans un bain marie bouillant (penser à enlever le bouchon blanc), pendant 3 minutes

Lorsque le milieu a refroidi mais est encore liquide on introduit alors la bactérie isolée à l'aide d'une öse en remontant dans le tube. Pour un des deux tubes, un environnement anaérobie sera créé en ajoutant de l'huile à la surface (0,5ml d'huile minérale = 5mm suffisent)

Les tubes sont incubés à 37 pendant une nuit.

Etude du type respiratoire :

- **Milieu viande foie (VF) pour déterminer le type respiratoire (1 tube / souche)**

C'est un milieu destiné à identifier le caractère aérobie ou anaérobie d'une bactérie.

Chaque binôme testera une bactérie du yaourt et deux bactéries issues des différents prélèvements. Le milieu de culture est solide : on le fait chauffer à 80°C dans un bain marie bouillant (penser à dévisser le bouchon)

Lorsque le milieu a refroidi mais encore liquide on introduit, à l'aide d'une öse, la bactérie isolée à étudier en faisant des vrilles en remontant dans le tube.

On porte à 37° à l'étuve pendant une nuit et l'on regarde si des colonies ont poussé.

Culture limitée entre 0,5 et 1,5 cm du haut : micro-aérophile.

Utilisation de la gélose viande-foie (VF)

Peptone pepsique de viande et de foie : 30 g/L

Glucose : 2 g/L

Agar : 6 g/L

Principe

Les milieux utilisés contiennent du glucose (métabolisme énergétique), mais ils sont dépourvus de nitrates qui pourraient être réduits et permettre le développement en anaérobiose de certaines bactéries aérobies (par exemple, *Pseudomonas aeruginosa*).

On utilise des géloses profondes telle que la gélose VF (viande foie), coulées dans des tubes longs et étroits (180 mm x 9 mm).

Technique

Au moment de l'emploi, placer les tubes dont la capsule a été partiellement dévissée dans un bain-marie bouillant pendant 20 minutes (régénération du milieu). Maintenir les milieux en surfusion dans un bain-marie à 45-50 °C.

Plonger le manche d'une öse stérile dans une suspension de la bactérie à étudier. Transporter l'inoculum dans le fond du tube puis remonter la pipette en décrivant des tours de spires très serrés en prenant soin de ne pas aérer le milieu. Incuber à 37 °C durant 18 à 24 heures

Lecture

Après incubation, on peut reconnaître quatre types respiratoires :

Bactérie aérobie (aérobie strict) : croissance uniquement dans la zone superficielle de la gélose ;

Bactérie anaérobie (anaérobie strict) : croissance uniquement dans la zone profonde de la gélose ;

Bactérie aéro-anaérobie (aéro-anaérobie facultatif) : croissance sur toute la hauteur de la gélose ;

Bactérie micro-aérophile : croissance dans un cylindre de gélose d'environ 0,5 cm de hauteur et situé à environ 1 à 2 cm de la surface.

- **Caractérisation d'enzymes intervenant dans les voies oxydatives : Test à l'oxydase**

Ce test permet de mettre en évidence l'existence d'une chaîne respiratoire fonctionnant avec **le cytochrome C membranaire**. Elle est déterminée par l'addition dans le milieu de culture d'un réactif, le tetraméthyl-p-phenylenediamine dihydrochloride. Ce donneur d'électrons, développe, en s'oxydant, une couleur rose, marron et enfin noirâtre en présence du cytochrome c oxydase et d'oxygène libre.

Ce test est utile chez les bactéries à Gram négatif. (Utiliser *Pseudomonas* et *E. coli* comme témoins)

La réaction est :

Positive chez les bactéries aérobies strictes : *Vibrionaceae*, ***Pseudomonaceae***, *Neisseria*, *Moraxella*

Négative chez les aéro-anaérobies facultatives tel que les enterobacteriacés ; bien que ces bactéries possèdent une chaîne respiratoire avec des cytochromes mais ceux ci sont de type b ou o.

Sont oxydases variables selon les souches: *Brucella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*.

Technique utilisée:

Sur une lame, déposer un disque de papier filtre pour le test « oxydase », l'imbiber d'une goutte d'eau distillée. Ajouter une goutte du réactif oxydase puis ajouter à l'aide d'une öse stérile, une colonie bactérienne. Noter ce que vous observez.

B- Galerie API20E (cf planche annexe)

Il s'agit de l'identification des bactéries par un ensemble de réactions du métabolisme intermédiaire utilisant la galerie commerciale API20E et après vérification que la bactérie à ensemencer est bien **Gram négatif**.

Présentation des galeries API 20 E (d'après la documentation bioMérieux) :



Principe

La galerie API 20 E, commercialisée par la société bioMérieux, est un système miniaturisé, prêt à l'emploi et standardisé. La galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. Les tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau physiologique (milieu "Suspension Medium"). Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Un fond et un couvercle complètent la galerie *sensu stricto* et permettent de constituer une boîte d'incubation. La galerie API 20 E permet d'effectuer les tests suivants : ONPG, ADH, LDC, ODC, citrate de Simmons (CIT), production d'hydrogène sulfuré par réduction du thiosulfate (H₂S), synthèse d'une uréase (URE), recherche d'une tryptophane désaminase (TDA), recherche du pouvoir indologène (IND), production d'acétoïne (VP), synthèse d'une gélatinase (GEL), recherche de l'acidification de neuf "glucides" : glucose (GLU), mannitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA), saccharose (SAC), mélibiose (MEL), amygdaline (AMY), et arabinose (ARA). La galerie permet également la recherche de la nitrate réductase qui se fait dans le microtube "GLU".

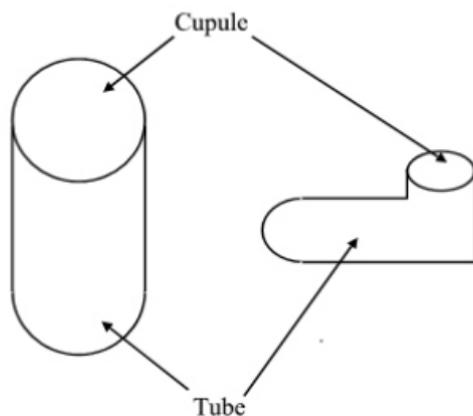
Technique

Placer de l'eau dans les alvéoles présents dans le fond de la boîte afin de créer une atmosphère humide. Retirer la galerie de son emballage et la placer dans le fond de la boîte. Prélever à l'aide d'une öse une colonie parfaitement isolée. Dissocier soigneusement la colonie dans du LB liquide (2,5ml). Remplir les microtubes de la galerie avec 100µl (environ) de suspension bactérienne. Au sein des microtubes, le fabricant distingue deux parties, le tube et la cupule. Selon les tests, la suspension bactérienne doit être placée uniquement dans le tube ou dans le tube et la cupule.

Lorsque le sigle du test est encadré, ce qui est le cas des tests CIT, VP et GEL, la suspension doit remplir le tube et la cupule.

Lorsque le sigle du test est souligné (ADH, LDC, ODC, URE, H₂S), la suspension doit remplir uniquement le tube. Après ensemencement complet de la galerie, la cupule sera secondairement remplie d'huile de paraffine.

Lorsque le sigle du test n'est ni encadré ni souligné (ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA), la suspension doit remplir uniquement le tube.



Représentation schématique d'un microtube d'une galerie API 20 E

Refermer la boîte d'incubation, écrire les références du prélèvement sur la languette du fond de la boîte et placer la boîte à 37 °C durant 18 à 24 heures.

A utiliser sur le Gram- du mélange à identifier (eau) et sur d'autres Gram- (maximum 2 galeries par binôme).

Incuber la galerie à 37°C pendant la nuit.

C- Effets des antibiotiques sur *E. coli*

- 1- Analyse et discussion des résultats des antibiogrammes et de la mesure de la CMI
- 2- Mesure de la CMB

Rappelez les principes de la bactériostase et de la bactéricidie d'un antibiotique sur une bactérie.

Partager une boîte LB sans antibiotiques de manière à étaler (en faisant des stries) une öse de chaque tube utilisé pour la mesure de la CMI où la bactérie n'a pas poussé.

Laisser incuber une nuit à 37°C.

Jour 6

- **Réaction à la catalase:**

Les souches bactériennes qui possèdent une catalase, peuvent utiliser l'oxygène moléculaire et former l'eau oxygénée avec les atomes d'hydrogène libérés par oxydation du FADH₂ en FAD. L'eau oxygénée qui, en s'accumulant, tuerait les bactéries (ce qui se produit pour les bactéries anaérobies strictes) est dégradée immédiatement par la catalase.



L'oxygène libéré se dégage sous forme gazeuse.

Technique utilisée:

Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée et y dissocier directement un peu de la culture à étudier, prélevée sur milieu solide.

Le dégagement immédiat de bulles gazeuses traduit la présence d'une catalase.

Attention! La recherche de la catalase n'a qu'un intérêt très limité pour les bactéries Gram négatives, car elles sont toutes catalase-positives à une exception près: *Shigella dysenteriae* sérotype 1 (bacille de Shiga).

Concernant les bactéries Gram positives, la recherche de la catalase permet de différencier parmi les bactéries aérobies qui sont normalement Catalase+, les bactéries lactiques telles que ***Streptococcus* et *Lactobacillus* qui sont catalase –**

(utiliser *E. coli* (cat +) et *Streptococcus* (cat -) comme témoins)

B- Effets des antibiotiques sur *E. coli*

Résultat de la mesure de la CMB, comparaison avec la CMI.

C- Test biochimiques pour identifier une bactérie

Lecture

Sortir la boîte de l'étuve et noter sur la fiche de lecture les résultats obtenus pour les tests à lecture spontanée.

Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir ci-dessous le tableau de lecture) :

TDA : ajouter une goutte du réactif TDA

IND : ajouter une goutte du réactif de James

VP : ajouter une goutte du réactif VP 1 et une goutte du réactif VP 2

Nitrate réductase : après avoir noté le résultat obtenu pour l'acidification du glucose, ajouter une goutte du réactif NIT 1 et une goutte du réactif NIT 2. Si aucune coloration rouge n'est obtenue (attendre deux à trois minutes), ajouter une petite quantité de poudre de zinc.

Noter les résultats sur la fiche de lecture.

Calculer le profil numérique.

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupe de trois (chaque groupe de trois tests est séparé du groupe voisin par un trait vertical). Chaque test donnant une réaction négative prend la valeur 0. Lorsqu'un test est positif, il prend la valeur 1, 2 ou 4 selon sa position au sein d'un groupe de trois : si le premier test d'un groupe de trois est positif il est noté 1, si le deuxième test est positif il est noté 2 et si le dernier test d'un groupe de trois est positif il est noté 4.

Le 21ème test mentionné sur la fiche de résultat (OX), correspond à l'oxydase (test réalisé avant l'ensemencement de la galerie).

Pour chaque groupe de trois, additionner les chiffres correspondants. On obtient un nombre à sept chiffres qui constitue le profil numérique de la souche étudiée.

La recherche du profil numérique dans le "Catalogue analytique" commercialisé par le fabricant permet d'identifier la bactérie. Si le profil à sept chiffres ne permet pas une identification, il convient de noter les résultats obtenus pour les tests réduction des nitrates en nitrites (NO₂), réduction des nitrates en azote (N₂), mobilité (MOB), croissance sur gélose de Mac Conkey (McC), oxydation du glucose (OF-O), fermentation du glucose (OF-F). On obtient alors un profil numérique à neuf chiffres plus discriminant que le précédent.

Analyse et discussion des résultats.

Compte rendu du TP

Faire un compte rendu par trinôme qui reprendra les six séances des TP
A rendre au plus tard 3 jours après la dernière séance des TPs.
Il est recommandé de rédiger votre CR à la fin chaque séance

I-Introduction sur la microbiologie et but des TP / 1

II- Identification des organismes eucaryotes présents dans la boue d'une station d'épuration

A- Identification de chaque organisme (préciser comment vous les avez identifiés) /1°

B- Identification des eucaryotes présents dans la boue } 0.5

C- Dessin légendé }

III- Observation microscopique de bactéries après coloration au bleu de méthylène et coloration de Gram

A- Décrire le protocole pour chaque coloration /1 (0,5 par coloration)

B- Description de l'observation pour la coloration au bleu de méthylène (les observations des colorations de Gram seront reportées dans les parties suivantes correspondantes) /0,5.

IV- Identification de bactéries présentes dans un échantillon d'eau d'un lac

A- Décrire les protocoles d'isolement et d'amplification /0,5

B- Description des colonies après isolement /0,5

C- Protocole et résultats de chaque test effectués sur ces bactéries (Gram, milieux sélectifs, tests biochimiques...) /3

D- Identification des deux bactéries /1

E- Explications sur la présence de ces bactéries dans l'eau d'un lac /1

V- Contrôle qualité de yaourts

A- Décrire le protocole /0,5

B- résultats et identification des yaourts /1

C- Résultats des différents tests sur les propriétés biochimiques des bactéries du yaourt (Gram, milieux sélectifs...) /1,5

VI- Analyse microbiologique de différents environnements

A- Décrire le protocole /0,5

B- Description et discussion des résultats /1

VII- Comparaison de l'activité bactéricide des antibactériens

A- Description des protocoles /0,5

B- Résultats

C- Comparaison des différents antibactériens } /1

VIII- Effets des antibiotiques sur *E. coli*

A- Description des protocoles (antibiogramme, mesure des CMI et des CMB) /1

B- Résultats et discussion /2

IX- Conclusion /1