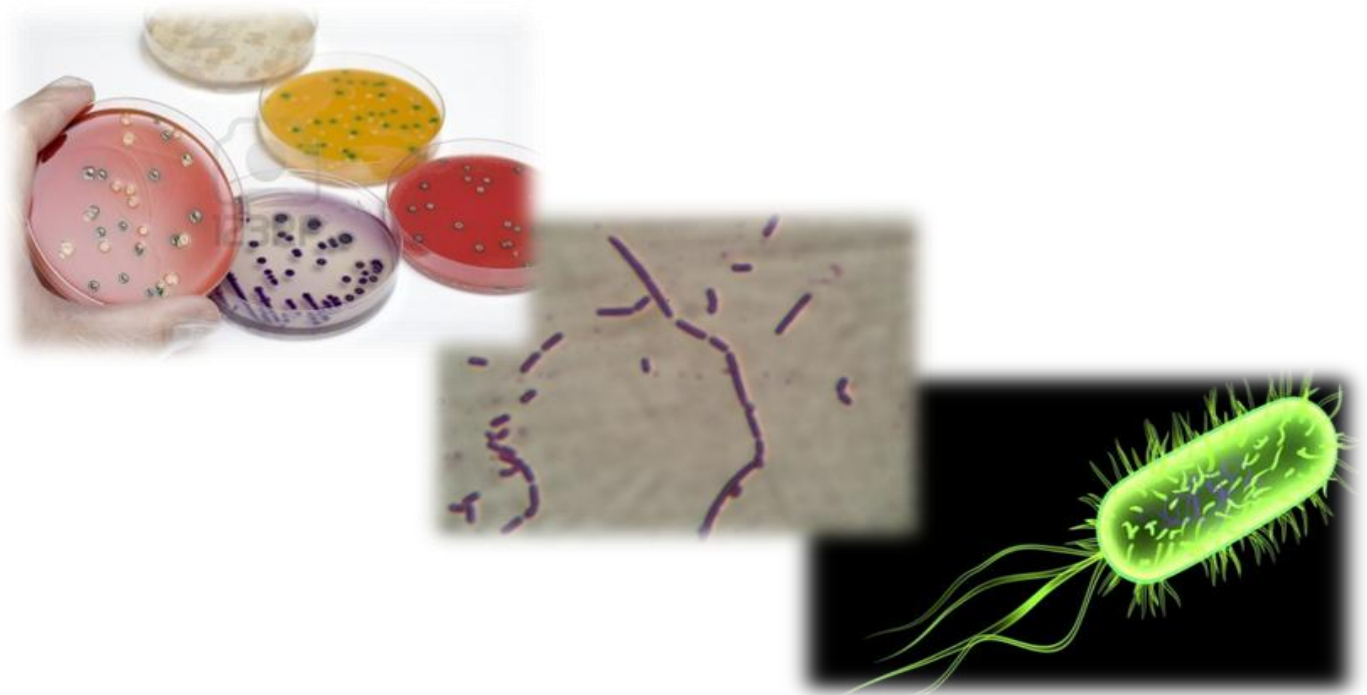


TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

LMD SNV

Sciences de la Nature et de la Vie



Pr. KIHAL Mebrouk

Pr. HEDDADJI Miloud

Pr. BENLAHCEN Kheira

Pr. HENNI Jamal Eddine

Pr. GUESSAS Bettache

Dr. BENMECHERNE Zineb

Dr. SAIDI Noureddine

2013

Préface

Ce manuel pratique de microbiologie couvre en pages et photos, tout ce qu'un étudiant doit savoir en microbiologie. C'est la réussite d'un pari pédagogique d'une œuvre collective. Il a été réalisé par des microbiologistes de l'université d'Oran (Algérie).

Il explique clairement tout ce qu'il faut comprendre sur les bactéries et les moyens d'identifier.

Cet ouvrage est avant tout un moyen d'enseignement. Il s'adresse principalement aux étudiants en biologie, mais aussi, pourquoi pas, aux biologistes médicaux.

Il se présente donc comme un document d'enseignement universitaire.

Dans cette optique ce manuel est concis et exhaustif, il paraît ainsi particulièrement attrayant par ses illustrations, la richesse et la clarté des tableaux exposant de façon synthétique l'essentiel de ce qu'il faut savoir sur un germe.

Ce qui fait de ce livre un outil précieux et efficace pour la préparation et la révision des examens.

Le premier chapitre décrit les principales caractéristiques morphologiques des bactéries.

Expose des méthodes modernes de diagnostic et de toutes les colorations utilisées, expose des principales affections causées par le germe, et des méthodes diagnostiques.

Les rappels sont volontairement réduits à l'essentiel, c'est à dire à ce qui est nécessaire à la compréhension du comment et du pourquoi des analyses destinées au diagnostic bactériologique et à leur interprétation.

Les chapitres sont des parties techniques qui envisagent la mise en évidence des bactéries à partir des divers écosystèmes qui parviennent au laboratoire, l'identification des germes isolés et l'étude de leur morphologie et leur sensibilité aux antibiotiques. Les techniques qui sont toujours en cours y sont développées. Une place importante est faite aux techniques de Biologie Moléculaire dans un prochain ouvrage. En effet les techniques de bases de bactériologie certainement les méthodes de la Microbiologie qui au cours des vingt dernières années a le plus bénéficié des apports de méthodes nouvelles. Ce furent d'abord l'utilisation des cultures en milieu liquide qui permettent de raccourcir les délais de réponse, puis l'utilisation des sondes nucléiques qui en quelques heures permet l'identification des espèces bactériennes les plus fréquentes.

La nouvelle technologie de l'utilisation de la PCR avait, dans un premier temps, permis d'envisager le diagnostic de la Lèpre et de la Tuberculose pouvant être faits en 24 heures. Ces espoirs devaient par la suite être tempérés par le manque de sensibilité de cette méthode par rapport à la technique de culture.

Le grande partie est consacré aux monographies cellulaires dont le pouvoir pathogène pour l'homme est établi. En annexe se trouvent le détail des techniques usuelles Pour les technique d'utilisation moins fréquentes le lecteur pourra, s'il le désire, se référer uG.B.EA. Mycobactéries (wwwmp5.univ-Paris5.fr).

TABLE DE MATIERE

| | |
|--|----|
| Généralités | 1 |
| Les Règles à suivre lors des séances de TP | 1 |
| L'Environnement d'une salle du laboratoire de microbiologie | 2 |
| I. - La paillasse ou table de travail | 2 |
| II. – La place de travail : | 2 |
| III - les Précautions générales de travail : | 2 |
| Equipement, petit matériel, verrerie et colorants | 3 |
| I L'équipement..... | 3 |
| II. – Le petit Matériel de base | 3 |
| 1). – Le bec bunsen | 3 |
| 2) – Les pipettes pasteur..... | 4 |
| 3). – L'anse de platine (ou à ensemercer). | 4 |
| 4) – Les pinces : | 5 |
| III. – La verrerie | 5 |
| IV. – Les colorants | 5 |
| Le microscope | 7 |
| I- Le Statif | 7 |
| II- La Partie optique | 7 |
| 1) Les oculaires | 7 |
| 2) La source lumineuse | 8 |
| 3) Le condenseur..... | 8 |
| 4) Le réglage du diaphragme. | 8 |
| III- La Mise au point | 8 |
| 1)- Objectif à sec (10 et 40) | 8 |
| 2)- Objectif à immersion (IH x 100) | 8 |
| 3)- Recommandations | 8 |
| IV– L'examen au microscope | 8 |
| Les méthodes Mise au point..... | 9 |
| V- Les Technique d'observation..... | 9 |
| 1) - Etat frais | 9 |
| 2) – Le frottis fixé | 9 |
| 3) Méthode de l'examen des frottis colorés | 12 |
| 4) Le microscope donne une image inversée des objets. | 12 |
| VI- Technique de fixation respectant la morphologie cellulaire..... | 12 |
| Utilisation de l'Alcool à froid. | 12 |
| VII- Technique de fixation ne respectant pas la morphologie cellulaire, (inemployable sur des produits pathologiques)..... | 12 |
| Utilisation de l'Alcool flambé..... | 12 |
| Utilisation de la flamme chauffante du bec bunsen. | 12 |
| Les différentes colorations | 13 |
| I- Les Colorations simples | 13 |
| Le Bleu de méthylène | 13 |
| II- La Nature Chimique des colorants | 13 |
| 1) Les colorants acides | 13 |
| 2) Les colorant basiques..... | 13 |
| III- Les Colorations différentielles..... | 13 |
| 1) La coloration de Gram. | 13 |
| 2) La coloration de Ziehl- Neelsen..... | 14 |
| 3) La coloration des spores | 15 |
| III- Les Colorations spécifiques | 15 |
| 1) La coloration des « noyaux » (la coloration de Rebinow)..... | 15 |
| 2) La coloration de Vago | 15 |

| | |
|--|----|
| La morphologie bactérienne..... | 17 |
| I-. La forme cellulaire | 17 |
| II- L'association ou le regroupement cellulaire | 17 |
| III- La forme de la colonie bactérienne..... | 18 |
| La Stérilisation – La Désinfection | 19 |
| I– la Stérilisation | 19 |
| 1)- La Stérilisation par la chaleur..... | 19 |
| 2)- La Tyndalissation | 19 |
| 3) La pasteurisation..... | 19 |
| 4) L'ébullition dans l'eau à 100°C..... | 20 |
| 5) L'Utilisation de l'autoclave | 20 |
| 6) La Stérilisation par la Chaleur sèche | 20 |
| 7) – La Stérilisation par filtration..... | 20 |
| 8). – La Stérilisation par les radiations | 21 |
| II– La Désinfection (Stérilisation par les Antiseptiques)..... | 22 |
| 1) – Les Antiseptiques liquides..... | 22 |
| 2) – Les Antiseptiques gazeux | 22 |
| Les Milieux de culture | 23 |
| I- Généralités sur leur préparation | 23 |
| 1- La Pesée des ingrédients..... | 23 |
| 2- La Dissolution des ingrédients..... | 23 |
| 3- La Mesure du pH du milieu | 23 |
| 4- La Répartition du milieu | 23 |
| 5- La Stérilisation..... | 23 |
| 6- La Conservation..... | 23 |
| II– Préparation de deux milieux simples..... | 24 |
| 1. – L'Eau peptonée (milieu liquide) | 24 |
| 2. – La Gélose nutritive (milieu solide). | 24 |
| 3.- La Préparation..... | 24 |
| 4- La Répartition | 24 |
| L'Isolement et purification des bactéries | 25 |
| I- Introduction aux méthodes d'isolement | 25 |
| II. – Isolement sur tube inclinée..... | 25 |
| II- L'Isolement sur une gélose en boîte de Pétri. | 26 |
| III– L'Isolement par inhibition sélective | 27 |
| IV- La Purification des colonies | 28 |
| Les Techniques d'identification biochimique | 29 |
| I- Le Type respiratoire | 29 |
| 1) Culture en gélose profonde..... | 29 |
| 2)- Réduction des nitrates..... | 29 |
| 3)- Recherche de l'oxydase (cytochrome oxydase)..... | 29 |
| d)- Recherche de la catalase..... | 30 |
| e)- Milieu au KCN | 30 |
| II- Métabolisme glucidique..... | 31 |
| 1) Eaux peptones additionnées de glucide et d'indicateur de pH..... | 31 |
| 2). Milieu glucose-lactose H ₂ S (milieu de Kligler)..... | 31 |
| 3)) Milieux de Hugh et Leifson et milieux M.E.V.A.G..... | 32 |
| 4) Caractérisation du type métabolique : oxydatif ou fermentatif | 32 |
| II- Le Métabolisme protéique : | 38 |
| 1) Protéolyse de la gélatine | 38 |
| 2) Recherche de l'uréase et de l'indole | 38 |
| 3). Test de CAMP | 38 |
| 4)- Recherche de l'indole | 39 |

| | |
|--|----|
| 5) Mise en évidence par le réactif d'Erlich-Kovacs | 39 |
| 6)- Recherche du tryptophane désaminase (T.D.A.)..... | 39 |
| 7)-Recherche de la phénylalanine désaminase (A.P.P.)..... | 39 |
| 8)-Recherche de la lysine décarboxylase (L.D.C.) | 40 |
| III- Le Métabolisme lipidique | 40 |
| 1)- Recherche de la lipase | 40 |
| 2)- Recherche d'une lécithinase..... | 41 |
| V- Recherche de l'H ₂ S. | 41 |
| La Recherche d'enzymes intervenant dans le pouvoir pathogene..... | 41 |
| I- <i>Hémolysines</i> | 41 |
| II- La Coagulase..... | 41 |
| II)- <i>ADNase</i> | 42 |
| IV- <i>La Phosphatase</i> | 42 |
| V- <i>La Fibrinolysine</i> | 42 |
| L' Action de divers factures sur la croissance et la vie des bacteries | 43 |
| I- L'antibiogramme | 43 |
| 1)- Les méthodes de dilution : antibiogramme en milieu liquide | 43 |
| 2)- Les méthodes de diffusion : antibiogramme en milieu solide..... | 43 |
| 3)- Les méthodes de dilution en milieu liquide..... | 43 |
| 4)- Les Méthodes de diffusion en milieu solide..... | 44 |
| 5) - <i>Choix des disques pour antibiogramme</i> | 45 |
| II- La dessiccation..... | 46 |
| Expérience :..... | 46 |
| Conséquences de la déshydratation..... | 46 |
| III- La température d'incubation..... | 46 |
| La chaleur humide..... | 47 |
| IV- Les agents chimiques..... | 47 |
| Expérience :..... | 47 |
| V- Action des métaux lourds | 47 |
| VI - Les antigènes flagellaires (Ag H) | 48 |
| 1) - Les antigènes capsulaires (Pneumococcus, Klebsiella) | 48 |
| 2) - Les antigènes somatiques (AgO)..... | 48 |
| 3) - Antigènes de surface ou d'enveloppe | 49 |
| 4) - Identification d'un Escherichia coli par sero agglutination | 49 |
| Virologie - Rickettsiologie - Sérologie | 50 |
| I- Coloration des virus..... | 50 |
| Coloration de Vago-Amargier 1963 | 50 |
| II- Coloration des rickettsies sur frottis..... | 50 |
| 1) Coloration de Macchiavello (1937) | 50 |
| 2) Coloration de May-Grunwald et Giemsa..... | 51 |
| La conservation des aliments | 52 |
| I- La dégradation des aliments. | 52 |
| II Les antioxydants..... | 52 |
| III Les radicaux libres | 52 |
| 1) Dosage de l'acide citrique contenu dans un jus de citron..... | 52 |
| 2) Principe du dosage. | 52 |
| 3) Protocole expérimental. | 52 |
| 4) Principes : | 54 |
| 5) L'épreuve au bleu de méthylène sur le lait, | 55 |
| Introduction..... | 58 |
| Principe de la méthode..... | 58 |
| Préparation de l'échantillon..... | 58 |
| Analyse bactériologique..... | 58 |

| | |
|--|----|
| Interprétation des résultats | 58 |
| Le Contrôle de l'efficacité du nettoyage et désinfection | 59 |
| Principe de la méthode | 59 |
| Méthode | 59 |
| Interprétation des résultats | 59 |
| Le Contrôle microbiologique de l'hygiène du personnel | 59 |
| Principe de la méthode | 59 |
| Méthode | 59 |
| Interprétation des résultats | 60 |
| Le Dosage du chlore actif dans l'eau et les solutions de désinfection | 60 |
| Principe | 60 |
| Méthode | 60 |
| Interprétation des résultats | 60 |
| La Détermination de l'acidité Dornic | 61 |
| 1-Echantillonnage | 61 |
| 2- Principe | 61 |
| 3- Matériel et réactifs | 61 |
| 4- Méthode de détermination | 61 |
| Le Test de la CMT pour la détection de laits mammiteux | 62 |
| Introduction | 62 |
| Principe | 62 |
| Echantillonnage | 62 |
| Matériel et réactifs | 62 |
| 5- Détermination | 62 |
| 6- Lecture | 63 |
| La Détection des inhibiteurs et des défauts potentiels de fermentation | 63 |
| Introduction | 63 |
| Test au Yaourt | 63 |
| 3- Lactofermentation | 63 |
| 3-1 Matériel | 63 |
| 3-2. Méthode | 64 |
| 3-3. Lecture des résultats | 64 |
| Le Test de la rézasurine | 64 |
| Introduction | 64 |
| Matériel | 64 |
| 3- Méthode | 65 |
| 4- Interprétation des résultats | 65 |
| La Recherche de la peroxydase : | 65 |
| Principe: | 65 |
| Mode opératoire : | 65 |
| Résultats : | 66 |
| La Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline dans les produits alimentaires | 67 |
| I Application | 67 |
| II- Description | 67 |
| III- Principe | 67 |
| 1) Prélèvement des échantillons | 67 |
| 2)- Fournitures et matériel spéciaux | 68 |
| 3)- Demarche à suivre | 68 |
| IV- Courbe d'étalonnage du phénol et témoins | 68 |
| 1) Courbe d'étalonnage du phénol | 68 |
| 2) Témoin négatif | 69 |
| 3) Témoin positif | 69 |
| La Bibliographie | 81 |

GÉNÉRALITÉS

Pendant les travaux pratiques de microbiologie, quelques précautions élémentaires doivent être observées. La propreté est essentielle et le travail en conditions stériles exige un comportement adapté. Une blouse blanche en coton (lavable à 95°C) à manches longues doit recouvrir au mieux les vêtements. Les cheveux longs doivent être recouverts ou attachés. Risque de contamination et de dissémination. Il est interdit de manger, boire, fumer ou mâcher du chewing-gum au laboratoire. Le matériel utilisé et les mains sont à désinfecter avant de quitter le laboratoire. Lavage des mains au savon ou à l'alcool 70%.

LES RÈGLES À SUIVRE LORS DES SÉANCES DE TP

- Port de la blouse de rigueur. La blouse en coton doit être boutonnée.
- Nouer les cheveux longs. S'asseoir pour manipuler et pour observer au microscope.
- Se laver les mains. Désinfecter la paillasse.
- Eviter les courants d'air; limiter les déplacements; éviter de parler (Aucun pipetage à la bouche).
- Ne pas porter ses doigts ou tout objet à sa bouche. Ne pas manger, boire, fumer.
- Eviter de mettre tout objet personnel en contact avec les bactéries.
- Marquer soigneusement les lames, tubes, boîtes, etc. avec un feutre indélébile.
- Les manipulations seront faites dans un rayon de 10 cm autour de la flamme du bec Bunsen.
- Ne pas éteindre la flamme sans couper l'arrivée du gaz.
- Ne pas laisser à proximité de la flamme des objets ou liquides inflammables (papiers, alcool, etc...).

L'ENVIRONNEMENT D'UNE SALLE DU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE

I. - LA PAILLASSE OU TABLE DE TRAVAIL

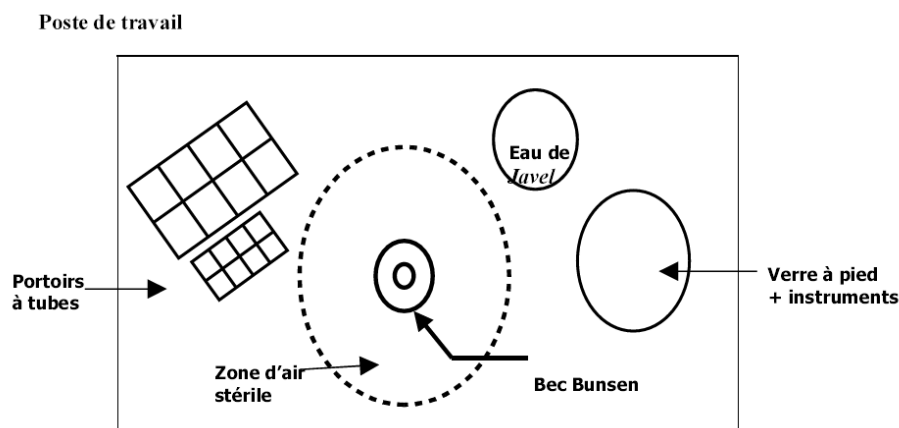
- Elle doit au minimum mesurer 1.50 m x 0.60 m.
- Elle doit être recouverte d'un matériau lisse, imperméable, résistant aux bases et aux acides, incombustible.
- La paillasse classique est recouverte de carreaux de faïence. Elle devra être nettoyée après chaque séance de travail avec une éponge imbibée d'un peu d'eau de javel.

II. – LA PLACE DE TRAVAIL :

L'éclairage naturel ou artificiel ne doit pas provoquer des ombres portées.

La hauteur du siège sera réglée de telle sorte que les avant bras du manipulateur reposent sur le plan de travail (ceci permet de maîtriser le tremblement fréquent chez les débutants).

La place de travail devra être à l'abri des courants d'air, le bactériologiste travaille toujours portes et fenêtres fermées.



Organisation du poste de travail

III - LES PRÉCAUTIONS GÉNÉRALES DE TRAVAIL :

- Le bactériologiste travaille assis, sans parler, le plus près possible de son bec bunsen (20 cm).
- Ses mains seront lavées à l'eau de javel après manipulation.
- Les cheveux longs seront attachés (risque de brûlure au contact de la flamme du bec)
- Eviter les courants d'air (fenêtres fermées).

EQUIPEMENT, PETIT MATÉRIEL, VERRERIE ET COLORANTS

I L'ÉQUIPEMENT

- Un microscope optique équipé pour l'examen en immersion
- Spectrophotomètres UV-Visible
- Autoclave 20 litres
- Etuve
- Four pasteur
- Bain – marie
- Balance de précision
- Une centrifugeuse
- Distilleuse
- pH-mètres
- Agitateur magnétique
- Vortex
- Compteur de colonie
- Congélateur
- Réfrigérateur

II. – LE PETIT MATÉRIEL DE BASE

- Bec bunsen (nécessaire au maintien de l'aseptie).
- Trépied avec grillage.
- Anse de platine ou de nichrome (ose)
- Bac à colorant rectangulaire surmonté d'un portoir sur lequel les lames sont déposées pour réaliser les différentes colorations.
- Portoir ou Panier métallique pour tube à essai
- Pissette emplie d'eau distillée ou d'alcool.
- Pot en verre ou en plastique à large encolure rempli d'eau de javel (pour déposer les pipettes pasteur utilisées, ainsi que les lames usagées).
- Ecouvillons.

1). – LE BEC BUNSEN

Il ne doit fonctionner qu'avec une flamme bleue non éclairante. Il produit ainsi une haute température, mise à profit pour la stérilisation extemporanée des instruments. La chaleur produite stérilise l'atmosphère dessus de la flamme, de plus, il se produit tout autour du bec un fort courant d'air ascendant qui empêche les retombées de poussière et de germes.

On obtient de la sorte une zone de protection circulation d'un diamètre de 15 à 20 cm environ.

Toutes les manipulations devront donc être effectuées à l'intérieur de cette zone de protection.



2) – LES PIPETTES PASTEUR

Il s'agit là d'un instrument de base, devant être parfaitement réalisé. Utilisé pour les prélèvements et les repiquages de cultures en milieu liquide.

a) **Matériel** - tubes de verre ordinaire cylindrique

- diamètre extérieur 6mm
- diamètre intérieur 4mm
- longueur 25 à 30 cm.

Les sections de tube sont rodées à la flamme afin de rendre leur bord non tranchant. A chaque extrémité, on introduit en force avec un fil rigide, un peu de coton cardé. L'ensemble est stérilisé au four pasteur à 180°C, pendant 20 minutes.

b) Technique : porter la partie moyenne du tube au-dessus du cône bleu de la flamme d'un bec bunsen : tenir la baguette de verre inclinée par rapport à l'horizontale (plus elle est inclinée, plus l'effilure de la pipette sera large).

- Chauffer en tournant sans arrêt la baguette entre ses doigts. Le verre rougit, la flamme jaunit, puis le verre s'amollit.
- Retirer le verre de la flamme, tirer d'abord lentement, puis de plus en plus fort, jusqu'à l'obtention de la longueur souhaitée.
- Couper au milieu en approchant la partie rétrécie du bord de la flamme on obtient deux pipettes : l'extrémité pointue est arrondie par chauffage à la veilleuse ou aux bords de la flamme (la partie interne est stérile).

Une bonne pipette Pasteur doit être assez longue et rigide.

c) **Emploi**

- Flamber la pince qui servira à casser la pointe de la pipette, la conserver dans la zone de protection du bec.
- Casser l'extrémité de la pipette.
- Passer alors dans la flamme toute la partie de la pipette susceptible de pénétrer dans les récipients de culture (très rapidement pour ne pas receler ou fondre la pipette).
- Laisser refroidir dans la zone de protection du bec.
- Opérer alors les manipulations nécessaires, toujours dans la zone de protection. Laisser le coton en place (séparation entre le liquide septique et la bouche).
- Les pipettes souillées sont déposées dans le bocal à eau de javel, partie effilée vers le bas.

Recommandations.

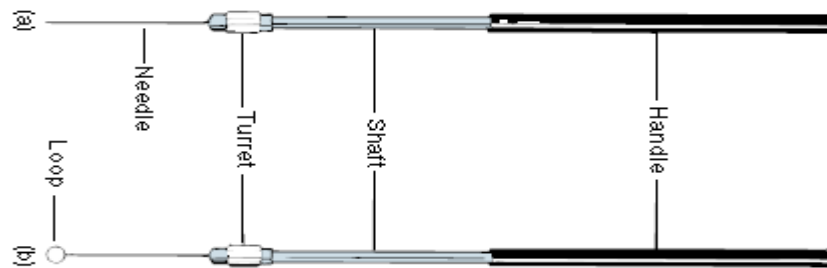
Ne jamais exposer directement à la flamme une pipette contenant du liquide, elle risque d'éclater, projetant son contenu mêlé de débris de verre.

Si le bocal destiné à recevoir les pipettes souillées ne contient pas d'eau de javel, il peut être utile de procéder à la fermeture de la partie effilée de la pipette. Pour réaliser correctement cette opération, tenir la pipette horizontale, l'index étant relevé de la partie rodée pour ne plus assurer l'étanchéité (afin d'éviter les projections résultant de l'augmentation de la pression des gaz et liquides contenus dans la pipette sous l'effet de la température) et approcher la pipette de la flamme.

Lorsque la fermeture est effective, placer la pipette, partie effilée bouchée vers le bas, dans le bocal.

3). – L'ANSE DE PLATINE (OU À ENSEMENCER).

Elle est utilisée pour les repiquages et prélèvements en milieu solide. On l'utilise aussi en milieu liquide quand la quantité de matériel à transporter est minime. La stérilisation est effectuée dans la flamme du bec, immédiatement avant son emploi et après chaque transport de germes, afin que ceux-ci ne puissent contaminer et polluer l'atmosphère.



Pour procéder à sa stérilisation procéder la manière suivante :

- Tenir l'anse par son manche, passer dans la flamme le fil de nichrome qui doit rougir. Insister sur la virole de fixation du fil.
- Laisser refroidir dans la zone de protection du bec, puis sans sortir de cette zone, procéder au prélèvement ou au repiquage.
- Restériliser ensuite les parties de l'anse ayant été au contact des germes. On commencera cette opération, on desséchant d'abord au dessus de la flamme, les fragments de culture qui pourraient adhérer encore au fil de platine, puis en portera ce dernier au rouge dans la flamme même. Le procédé évite toute dispersion de germes par crépitement. En effet, si l'on passe directement le fil de platine dans la flamme, les fragments de culture encore adhérent risquent d'exploser sous l'effet de la brusque chaleur, et de disperser des germes encore vivants.

4) – LES PINCES :

Utilisées surtout pour casser les points des pipettes pasteur et pour décoller les bouchons de coton des récipients de culture avant le débouchage. Un flamage un peu prolongé suffit à leur stérilisation.

III. – LA VERRERIE

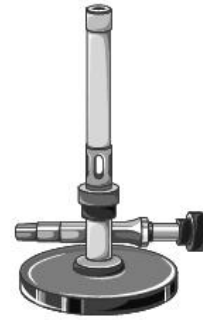
- Les tubes à essai
- Les boîtes de pétri.
- Les erlens Meyer ou flacons.
- Les béchers.
- L'étaioir de verre :
- Pot en verre à large encolure à font tapissé de coton pour entreposer les pipettes en verre et les pipettes pasteur non utilisées.

IV. – LES COLORANTS

- Bleu de méthylène
- Violet de gentiane.
- Fuchsine acide.
- Encre de chine.
- Vert de malachite.
- Lugol.
- Alcool.
- Huile de cèdre ou l'huile à immersion etc....



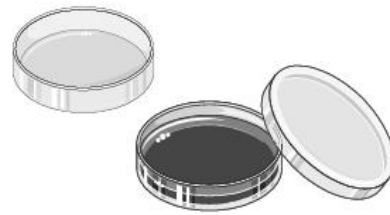
écouvillon



Bec Bunsen



Autoclave



Boîtes de Pétri



grattoir

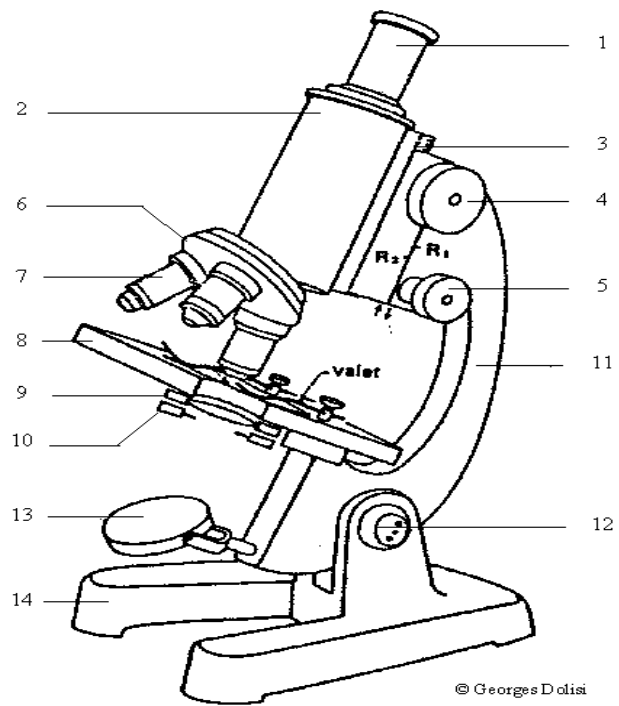
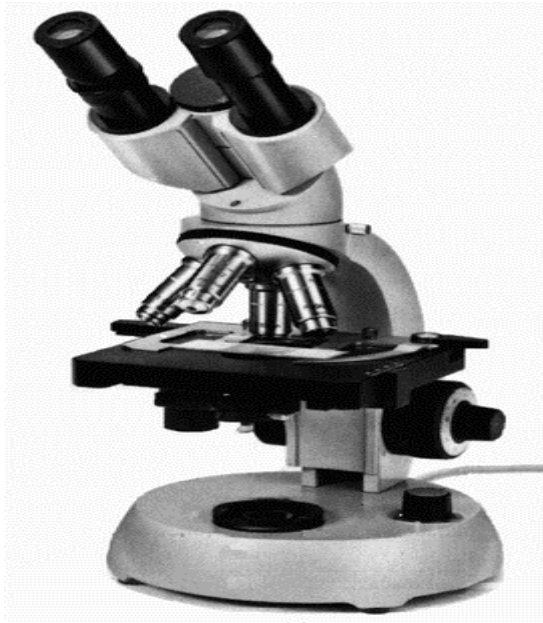


Flacon pour milieu de culture



Etuve

LE MICROSCOPE



1. Oculaire , 2. Tube optique , 3. Crémaillère, 4. Vis macrométrique (grands déplacements), 5. Vis micrométrique (déplacements fins), 6. Revolver, porte objectifs, 7. Objectifs (faible grossissement x 4, moyen x 10, fort x 40 ou plus, parfois immersion (x 100)), 8. Platine, souvent avec un dispositif qui permet de déplacer la lame, 9. Sur certains modèles : condenseur de lumière, 10. Diaphragme, pour régler la quantité de lumière qui traverse la lame, 11. Potence, 12. Vis d'inclinaison, à ne pas utiliser si la préparation à observer est dans un liquide, 13. Miroir ou lampe, 14. Socle

Étude de l'appareil et de son fonctionnement

Le microscope comporte une partie mécanique ou statif et une partie optique.

I- LE STATIF

Il comprenant : le pied, la colonne, la platine (cavaliers), le tube (Support de la partie optique) le révoluer (porte-objectif), la crémaillère et la vis micrométrique.

La partie de la colonne située au dessus du point d'insertion est aménagée en poignée au dessous des commandes de mise au point. L'appareil doit donc être saisi exclusivement par sa poignée sous peine de détérioration.

Le microscope doit être utilisé avec la platine horizontale, sinon l'huile de cèdre utilisé en immersion coulera et l'observation de préparation à l'état frais en milieu liquide sera très difficile.

II- LA PARTIE OPTIQUE

Elle comporte :

1) Les oculaires

- Les objectifs interchangeables (x8 ou x 10 ou x 13)
- x 10 faibles grossissements
- x 40 (ou x 20) fort grossissement
- IM x 100 objectif à immersion permettant de très forts grossissements en interposant une goutte d'huile de cèdre entre la lentille frontale et la préparation.

2) La source lumineuse

Elle est solidaire ou non de la colonne, éclaire la préparation par dessous : observation par transparence.

3) Le condenseur

Il est situé sous la platine est mobile par rapport à celle-ci (et la préparation) grâce à une commande à crémaillère. Le condenseur focalise vers la préparation les rayons lumineux issus de la source, augmentant ainsi l'éclairement de l'objet étudié. Il est très souvent muni d'un diaphragme.

- Pour l'objectif x 10 abaisser le condenseur.
- Pour l'objectif IH x 100, amener le condenseur le plus près possible de la préparation.
- Pour l'objectif x 40 positions intermédiaires.

4) Le réglage du diaphragme.

Ouvrir au maximum pour les objectifs forts (IH x 100).

III- LA MISE AU POINT

1)- Objectif à sec (10 et 40)

La préparation étant sur la platine régler la hauteur du tube optique de façon à voir l'image. Parfaire sa netteté au moyen de la vis micrométrique.

Pour l'objectif x10 la distance entre la préparation et la lentille frontale de l'objectif est voisine de 1 cm. Pour l'objectif x 40 cette distance est de l'ordre du mm.

Remarque : il arrive parfois lors de la descente du tube optique de ne pas voir l'image.- La poursuite de cet abaissement peut aboutir au contact entre la préparation et la lentille frontale (risque de détérioration et surtout de contamination par rupture de la lamelle couvre-objet). On peut, pour éviter cet inconvénient procéder de la manière suivante : en regardant latéralement, descendre le tube optique, en agissant sur la crémaillère, jusqu'à quelques dixièmes de mm de la préparation. La recherche de l'image se fera en remontant le tube optique.

2)- Objectif à immersion (IH x 100)

Déposer sur la partie intéressante de la préparation (repérée par observation aux objectifs à sec) une goutte d'huile de cèdre. Descendre le tube optique jusqu'à ce que l'objectif entre en contact avec l'huile (le contrôle, de l'opération se fait en regardant latéralement).

Rechercher l'image en manœuvrant très lentement la crémaillère. Parfaire sa mise au point à l'aide de la vis micrométrique. Nettoyer l'objectif au papier joseph imbibé de xylol après observation.

3)- Recommandations

- Agir lentement et avec précaution sur la crémaillère.
- Ne jamais forcer la vis micrométrique.
- Ne pas faire tremper la lentille frontale des objectifs à sec dans un liquide.

IV- L'EXAMEN AU MICROSCOPE

L'examen microscopique permet de distinguer différents les formes et les associations cellulaires des bactéries:

Les lames porte-objet qui recevront le produit à examiner doivent être en verre et exemptes de rayures. Les rayures provoquent des images artificielles. Elles ont en général une surface de 76 x 26 mm et une épaisseur de 1 mm. Pour assurer leur propreté ("dégraissage"), les laisser séjourner au moins 24 heures dans un mélange d'alcool à 90° (9 parties) et d'acide chlorhydrique (1 partie). Au moment de l'emploi, les essuyer avec du papier joseph. Une lame propre est mouillable.

Les lamelles très fines, donc très fragiles, sont de plusieurs dimensions

18 x 18 mm 22 x 22 mm 22x 32 mm.

En bactériologie on utilise généralement que des lames et lamelles neuves.

Les méthodes Mise au point

Mise au point grossière par remontée du tube à la vis micrométrique.

Mise au point fine à la vis micrométrique.

V- LES TECHNIQUE D'OBSERVATION

1) - Etat frais

Déposer au centre d'une lame une gouttelette de produit à examiner. Le volume de la goutte doit être proportionné aux dimensions de la lamelle de façon à ce que le produit ne déborde pas.

S'il s'agit d'un produit semi-solide, déposer au centre de la lame une gouttelette d'eau dans laquelle on dissociera au fil de platine une très faible quantité de produit.

Il peut être plus facile de faire la mise au point sur le bord d'une bulle d'air. Il est indispensable de régler l'ouverture du diaphragme pour obtenir une netteté maximum : plus les objets sont transparents (bactéries) et plus le diaphragme doit être fermé. Les bactéries apparaissent alors sous forme de bâtonnets (bacilles) ou de points (coques) réfringents.

L'examen à l'état frais s'effectue au grossissement x 40, il permet d'apprécier la mobilité du germe étudié. On dit qu'une bactérie est mobile lorsqu'on voit au moins un élément bactérien traversant le champ du microscope, ou lorsque deux bactéries continues se croisent. Il faut en effet, éviter de confondre la mobilité d'une bactérie avec le mouvement général du liquide (platine très légèrement inclinée, affaissement de la lamelle) ou avec le mouvement brownien (dû à l'élévation de température du liquide de montage très fortement éclairé).

N.B. - Les bactéries aérobies s'immobilisent rapidement. Donc examiner de préférence au contact d'une bulle d'air : mieux oxygénées les bactéries apparaissent plus mobiles. Les germes anaérobies peuvent nécessiter un montage spécial.

Pour l'observation à l'immersion il est indispensable de luter à la paraffine. Cette opération, en évitant la dissémination des bactéries sur la platine ou dans l'huile de cèdre, consiste à étaler de la paraffine sur les 4 côtés de la lamelle.

Très Important : dès que l'observation est terminée Placer la préparation dans le récipient contenant l'hypochlorite. En aucun cas ne laisser la préparation sur le microscope ou sur la paillasse : risque de contamination.

2) – Le frottis fixé

a)- Préparation du frottis à partir du milieu liquide.

- Déposer une goutte d'eau stérile sur une lame en verre à l'aide d'une pipette stérile, prélever une colonie bactérienne ou fongique à l'aide d'une anse stérile, et la mélanger à la goutte d'eau et l'étaler au fil de platine ou à la pipette de façon à réaliser un étalement mince et homogène.
- Laisser sécher à l'air ambiant puis fixer par la flamme du bec bunsen.

b) - Préparation du frottis à partir du milieu solide

Déposer sur une lame une gouttelette d'eau et y dissocier une faible quantité de culture. Étaler de façon à réaliser un frottis mince et homogène. Sécher et fixer.

c) - Préparation du frottis à partir du milieu d'un organe

Sectionner un petit fragment. Le saisir avec une pince et réaliser un étalement sur une série d'appositions, sans trop appuyer de façon à obtenir des préparations minces.

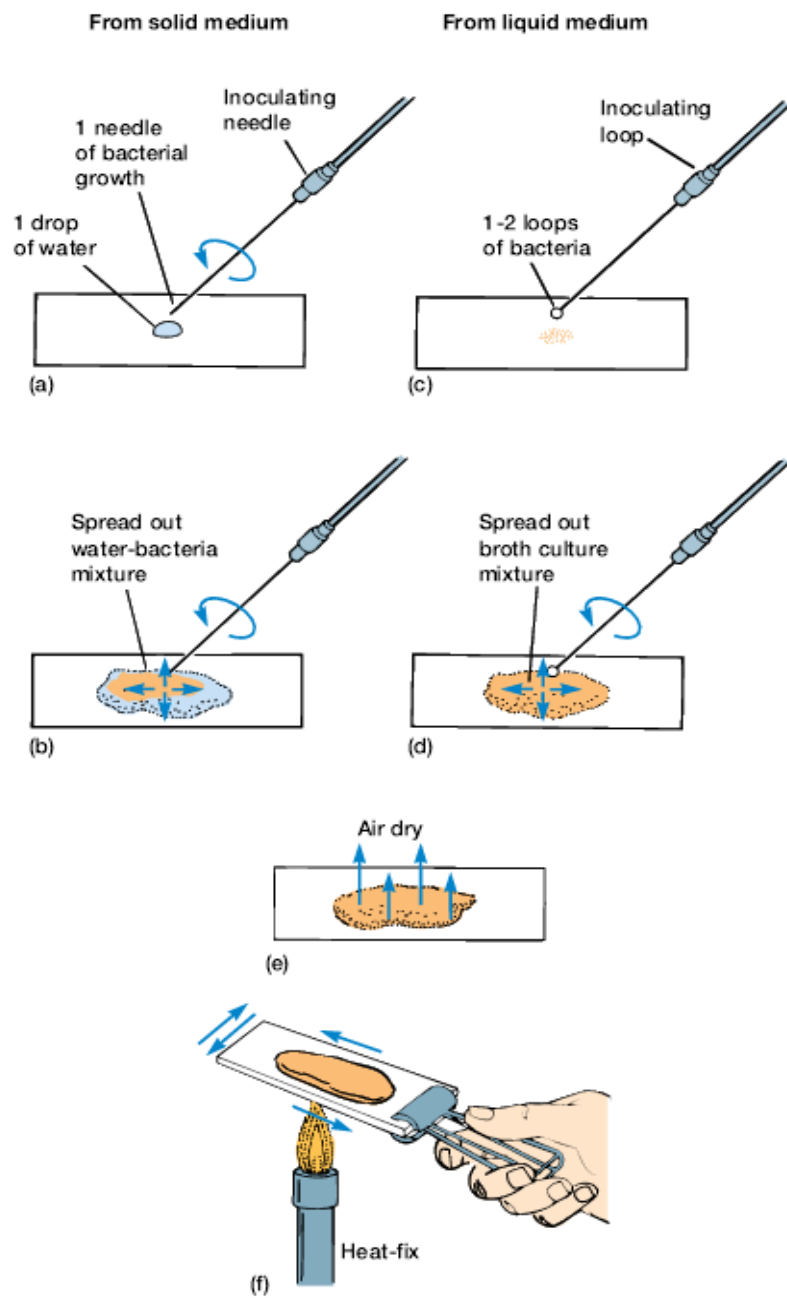
d) - Séchage

Laisser sécher le frottis sur la paillasse. On peut accélérer la dessiccation en chauffant légèrement au-dessus (20 ou 30 cm) de la flamme du bec bunsen.

e) Fixation

Lorsque l'étalement est complètement sec, procéder à sa fixation. Seules quelques colorations particulières ne doivent pas être précédées d'une fixation.

La Préparation d'un frottis



3) Méthode de l'examen des frottis colorés

Tous les frottis colorés s'examinent en immersion (TH x 100).

- Déposer une goutte d'huile sur la lame.
- La fixer par les valets.
- Immerger l'objectif, très près (1/10mm) de la lame
- Remonter le condenseur.
- Ouvrir le diaphragme
- Eclairer la préparation.
- Observer au microscope.

4) Le microscope donne une image inversée des objets.

Causes du non fonctionnement du microscope.

d1) Absence de lumière, ou lumière très faible.

- L'objectif n'est pas en place sur son crantage.
- Le diaphragme est fermé.
- Le condenseur n'est pas situé dans sa position normale.

d2) Absence d'image avec les objectifs à sec, ou image indistincte.

La lentille frontale est mouillée (l'essuyer avec du papier joseph)

L'oculaire est sale (nettoyage au xylol, puis avec du papier joseph) .

d3) Absence d'image distincte avec l'objectif à immersion.

- Nettoyer la lentille frontale de l'objectif (par le xylol)

d4) Absence d'image avec les objectifs 40 et IH 100

- La préparation a été placée à l'envers sur la platine.

VI- TECHNIQUE DE FIXATION RESPECTANT LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE

Utilisation de l'Alcool à froid.

- Recouvrir la préparation d'alcool éthylique absolu ou d'alcool méthylique.
- Laisser agir 5 minutes.
- Egoutter.
- Laisser sécher.

VII- TECHNIQUE DE FIXATION NE RESPECTANT PAS LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE, (INEMPLOYABLE SUR DES PRODUITS PATHOLOGIQUES).

Utilisation de l'Alcool flambé.

- Verser sur la préparation quelques gouttes d'alcool absolu.
- Après quelques secondes de contact, enflammer.
- La combustion doit durer 3 ou 4 secondes au maximum.
- Souffler pour éteindre, ou en agitant la lame au bout de ce temps.
- Laisser refroidir.

Utilisation de la flamme chauffante du bec bunsen.

- Tenir avec la pince (frottis en haut).
- Chauffer a la flamme chauffante du bec bunsen 2 ou 3 fois.
- Laisser sécher.

LES DIFFÉRENTES COLORATIONS

I- LES COLORATIONS SIMPLES

Le Bleu de méthylène

Préparation de la coloration du bleu de méthylène phéniqué.

| | |
|------------------------|--------|
| Bleu de méthylène | 2 g |
| Acide phénique neigeux | 2 g |
| Alcool absolu | 10 ml |
| Eau distillée | 100 ml |

- Triturer au mortier le colorant et l'alcool.
- Ajouter l'acide phénique puis l'eau distillée.
- Laisser 24 heures.
- Filtrer.

Méthode de la coloration.

- Recouvrir le frottis fixé d'une solution de bleu de méthylène phéniquée.
- Laisser agir 2 minutes.
- Laver à l'eau.
- Sécher.
- Observer au microscope.

II- LA NATURE CHIMIQUE DES COLORANTS

La plupart sont des dérivés des hydrocarbures aromatiques. EHRLICH les a divisés en deux groupes.

1) Les colorants acides

Tels que l'acide picrique (trinitrophénol), l'éosine (résorcine-phtaléine) et son dérivé tétrabromé, la fluorescéine, n'ont pas d'action élective et colorent uniformément les micro-organismes.

2) Les colorant basiques

Ils sont en général des sels formés à partir d'un acide qui peut-être incolore et d'une base toujours colorée. Ils ont une grande affinité pour le cytoplasme bactérien. Les plus employés sont la *Fuchsine*, ses dérivés méthyles ou éthyles, tel le violet de gentiane. Parmi les matières colorantes on peut encore citer : la safranine, la thionine, le bleu de méthylène

III- LES COLORATIONS DIFFÉRENTIELLES.

1) La coloration de Gram.

Cette coloration double constitue un des premiers stades de l'étude microscopique d'une bactérie, en ce sens qu'elle permet un premier classement en bactéries dites Gram + et Gram -.

Violet de gentiane phéniquée

| | |
|------------------------|--------|
| Violet de gentiane | 1 g |
| Acide phénique neigeux | 2 g |
| Alcool absolu | 10 ml |
| Eau distillée | 100 ml |

Solution de lugol (liquide de Gram)

| | |
|---------------------|--------|
| Iode | 1g |
| Iodure de potassium | 2g |
| Eau distillée | 200 ml |

- Verser sur le frottis fixé, 4 à 5 gouttes d'une solution aqueuse de violet de gentiane phéniqué, Laisser agir 1 minute au maximum (Colorant primaire)
 - Rejeter le colorant en inclinant la lame, *Ne pas laver.*
 - Recouvrir avec du lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) ; celui-ci prend une teinte mordorée. On le jette au bout d'une dizaine de secondes et on le remplace par une liqueur fraîche. Cette opération est encore répétée deux fois (la pellicule mordorée n'apparaît plus). Le lugol constitue le mordant.
 - La préparation prend alors une teinte noirâtre.
 - Laver à l'eau et laisser couler goutte à goutte sur la préparation tenue inclinée de l'alcool à 90°, jusqu'à ce que cet alcool s'écoule incolore, mais sans trop insister. C'est là le temps délicat de la coloration de Gram (différenciateur).
 - Arrêter alors immédiatement la décoloration en lavant la lame à l'eau.
 - Verser sur la lame 4 à 6 gouttes de fuchsine de Ziehl diluée (1/10). (On peut utiliser la fuchsine non diluée : dans ce cas précis recouvrir la lame d'eau distillée et ajouter 4 à 5 gouttes de fuchsine normale). Laisser agir de 45 secondes à 1 minute (colorant de contraste)
 - Laver à l'eau.
 - Egoutter.
 - Sécher.
- Les bactéries Gram+ sont colorées en bleu ou violet.
Les bactéries Gram - sont colorées en rouge ou rose.

2) La coloration de Ziehl- Neelsen.

Certains bacilles (BK. par exemple) sont colorés seulement à chaud et par des colorants très actifs. Une fois colorés, ils gardent leur coloration même soumis à l'action des acides forts dilués ou de l'alcool. Ils sont dits acido-alcool-résistants (A.A.R).

Fuchsine phéniquée de Ziehl

| | |
|------------------------|-------|
| Fuchsine | 1g |
| Acide phénique neigeux | 5g |
| Alcool absolu | 10ml |
| Eau distillée | 100ml |

- Placer la préparation déjà fixée sur une plaque chauffante.
- Recouvrir le frottis de Fuchsine de Ziehl. Il doit y avoir émission de vapeurs et non ébullition. Si la préparation se dessèche, ajouter quelques gouttes de Fuchsine.
- Opérer ainsi 10 minutes.
- Jeter le colorant et Laver à l'eau.
- Décolorer par l'acide nitrique au 1/3 (ou sulfurique au 1/4) en laissant cet acide sur la lame- pendant 2 minutes.
- Laver à l'eau
- Décolorer à *l'alcool* absolu pendant 5 minutes
- Laver à l'eau
- Colorer au *bleu de méthylène* phéniqué pendant 30 secondes
- Laver à l'eau
- Egoutter.
- Sécher.

Les mycobactéries sont colorées en rouge vif sur fond bleu.

3) La coloration des spores

a) La coloration au vert de malachite

- Placer la préparation déjà fixée sur une plaque chauffante.
- Recouvrir d'une solution aqueuse de vert de malachite à 5 %.
- Laisser agir pendant 15 minutes jusqu'à l'émission de vapeurs (ne jamais laisser sécher : rajouter du colorant si nécessaire).
- Laver sous filet d'eau.
- Colorer avec la safranine ou au une solution aqueuse 5 % de mercurochrome (pendant 5 minutes).
- Rincer sous filet d'eau.
- Laisser sécher.
- Observer à l'immersion

Les spores sont colorés en vert, le reste de la bactérie ou les bactéries n'ayant pas sporulées sont colorées en rouge.

b) La coloration de Moeller

- Verser sur le frottis fixé quelques gouttes d'acide chromique en solution aqueuse à 10%.
- Laver plusieurs fois à l'eau.
- Colorer par la Fuchsine de Ziehl pure à chaud pendant 8 minutes,
- Recouvrir de Fuchsine pure et chauffer plusieurs fois jusqu'à émission de vapeur.
- Laver
- Verser sur la préparation quelques gouttes d'une solution aqueuse de Chlorhydrate d'aniline à 2%, puis aussitôt de l'alcool absolu.
- Mélanger et laisser agir quelques secondes.
- Laver à l'eau longuement.
- Colorer par quelques gouttes d'une solution aqueuse de bleu de méthylène (30 sec).
- Laver à l'eau.
- Sécher.

Les spores sont teintées en rose ou rouge, le cytoplasme en bleu.

5) La coloration des capsules.

- Déposer au centre de la lame une goutte d'**encre de chine**.
- Déposer à côté une goutte de la suspension bactérienne à étudier.
- Poser une lamelle et observer dans la région moyenne.
- La présence de capsule est indiquée par un halo ou une zone claire.

III- LES COLORATIONS SPÉCIFIQUES

1) La coloration des « noyaux » (la coloration de Rebinow)

- La lame fixée à l'alcool (ou mieux à l'acide osmique et à l'alcool méthylique).
- Plonger la lame dans un tube de Borell contenant de l'acide chlorhydrique N et maintenu au bain-marie à 60° C.
- La durée de cette hydrolyse est de 10 minutes.
- Laver à l'eau.
- Sécher.

Les noyaux sont colorés en bleu, le cytoplasme en rose violacé.

2) La coloration de Vago

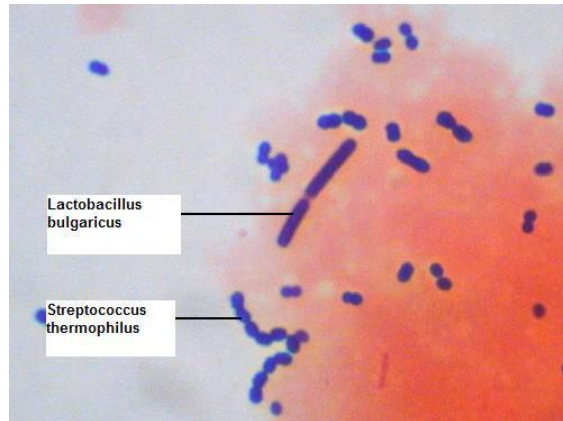
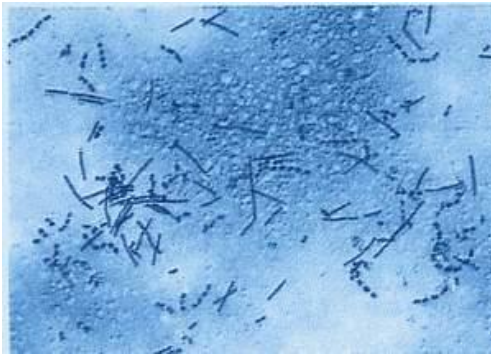
Utilisée pour la coloration des spirochètes, tréponèmes et leptospires.

- Sécher le frottis.
- Fixer 3 à 5 minutes par une solution aqueuse à 2% de mercurochrome.
- Laver à l'eau distillée,
- Colorer au violet de méthyle en solution aqueuse à 2% filtré extemporanément, pendant 5 minutes ou par une solution de pyocyanine pendant 2 mn.
- Laver à l'eau distillée.
- Sécher.



Les microorganismes apparaissent violet clair (violet de méthyle) ou rouge (pyocyanine) sur fond presque incolore.

LA MORPHOLOGIE BACTÉRIENNE

I-. LA FORME CELLULAIRE



- ★Forme ronde : ● Ex. : *Staphylococcus*
- ★Forme ovale (ovoïde) : ● Ex. : *Streptococcus*


- ★ Formes droites :
 - court ■ Long ■
 - épais ■ fin —
 - Bouts ronds ● bords carrés ■
 - Coccobaccille ● Fusiforme ●
- ★ Formes particulières
 - Forme incurvée  ex : *Vibrio*
 - Forme spiralée  ex : *Treponema*

La forme sphérique ou ovoïde caractérise les coques ou cocci.

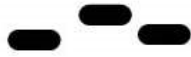



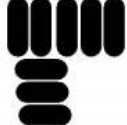
La forme cylindrique, en bâtonnet caractérise les bacilles.

II- L'ASSOCIATION OU LE REGROUPEMENT CELLULAIRE

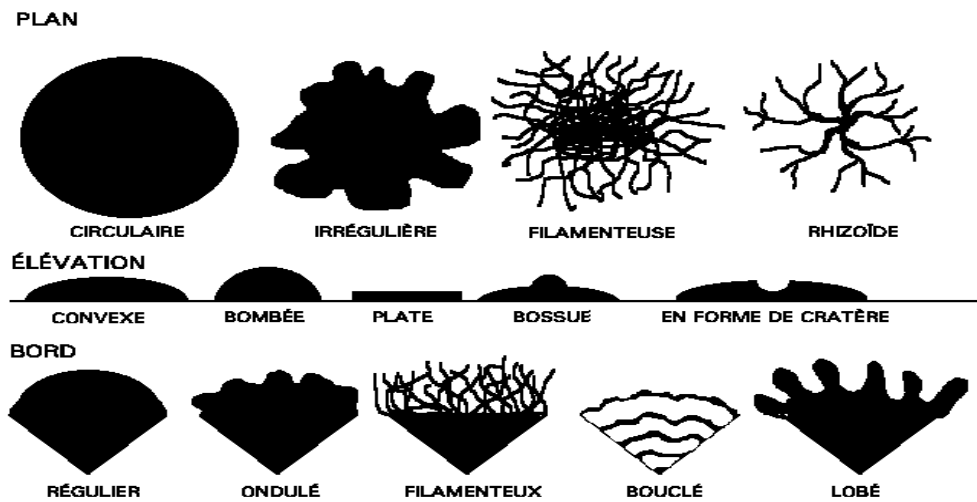
★ Mode de groupement :

- isolé 
- par deux (diplocoques) 
- En flamme de bougie 
- En grain de café 
- Par quatre : tétrade 
- En amas 
- En chaînette 

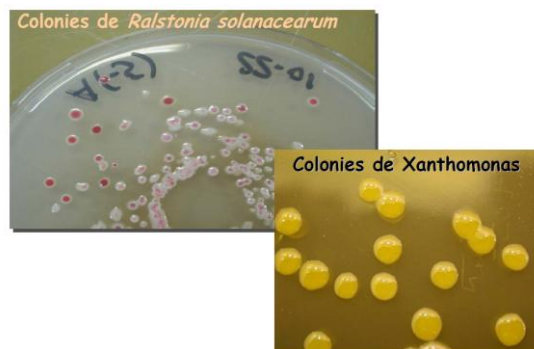
★ Modes de groupement :

- isolés 
- diplobacille 
- En amas 
- En chaînette 
- En palissade 

III- LA FORME DE LA COLONIE BACTÉRIENNE



- La forme : Punctiforme, circulaire, filamenteuse, irrégulière, rhizoïde, fusiforme,
- L'élévation : Plane élevée, convexe, bombée, bossue
- Le bord : Régulier, ondulé, lobé, dentelé, filamenteux, bouclé



LA STÉRILISATION – LA DÉSINFECTION

Il faut opposer la stérilisation (destruction totale des bactéries) à la désinfection (destruction incomplète).

Lorsque l'on opère expérimentalement la désinfection ou la stérilisation d'une population microbienne dans un milieu, on remarque que l'agent désinfectant ou stérilisant employé à intensité constante ne tue pas en même temps tous les germes.

Le nombre d'individus tués pendant un temps donné est proportionnel au nombre de bactéries constituant la population exposée à l'agent léthal, ainsi qu'à la durée d'exposition.

Par exemple, un agent stérilisant tue 90% d'une population bactérienne par minute. Il est évident que le nombre de bactéries tuées par minute en poursuivant la stérilisation sera de plus en plus bas à mesure que baisse le nombre de survivants :

| Durée d'exposition | Nombre de germes tués | Nombre de survivants |
|--------------------|-----------------------|----------------------|
| 1 mn | 90% de 1000 = 900 | 100 |
| 2 mn | 90% de 100 = 90 | 10 |
| 3 mn | 90% de 10 = 9 | 1 |

Ceci montre que l'existence de survivants à un moment donné dépend du nombre de bactéries initial : d'où la nécessité :

- 1°) de réduire au maximum avant stérilisation le nombre de bactéries (lavages préalables - savonnage, rinçage...)
- 2°) de vérifier après stérilisation l'absence de bactéries au moyen de tests de contrôle :
 - Destruction de souches de référence
 - Ensemencement en milieu nutritif de substances stérilisées
 - Indicateurs physiques ou chimiques.

I– LA STÉRILISATION

1)- La Stérilisation par la chaleur

Très utilisé au laboratoire pour la verrerie, la préparation des milieux de culture, ainsi que pour la stérilisation des milieux septiques utilisés. 3 principales méthodes de stérilisation sont utilisées : tyndallisation, chaleur humide, chaleur sèche.

2)- La Tyndalissation

Consiste en chauffages répétés à température modérée à la pression atmosphérique. Les produits à stériliser sont mis en tubes scellés à une température de 58°C par exemple pendant une heure, chauffage répété plusieurs jours de suite.

Les spores bactériennes ne sont pas détruites à cette température qui ne tue que les formes végétatives, Elles vont cependant ou être sensibilisées (par hydratation de la paroi) ou passer sous forme végétative et de ce fait devenir sensibles à de nouveaux chauffages.

Technique utilisé pour les liquides biologiques (sérum, ascite...) ne supportent pas les températures élevées. On lui préfère d'autres méthodes (filtration).

3) La pasteurisation

La pasteurisation s'opère à des températures inférieures à 100° C. Seules les formes végétatives sont détruites.

4) L'ébullition dans l'eau à 100°C

L'ébullition ne détruit que les formes végétatives et non les spores.

5) L'Utilisation de l'autoclave

La stérilisation se fait par vapeur sous pression. Elle est utilisée pour les récipients, mais surtout pour les solutions et les milieux nutritifs (avant et après ensemencement).

En milieu saturé d'humidité, la stérilisation s'opère à des températures moins élevées qu'en milieu sec (Purger l'appareil pour éliminer l'air froid).

Papin a montré que l'on pouvait chauffer l'eau au-dessus de son point d'ébullition normal ($PV = n RT$).

| | | | | | |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| P (atmosphère) | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 3 |
| Température en °C | 100 | 110 | 120 | 134 | 144 |

L'autoclave de Chamberland, permet de réaliser la stérilisation (1 at, 120°C). Le temps de stérilisation est en général de 15 à 20 minutes.

6) La Stérilisation par la Chaleur sèche

a) Le Flambage (la flamme du bec bunsen).

Utilisé pour les fils de platine, pipettes, cols des tubes et fioles.

b) Les Four Pasteur (Fours à air chaud)

Utilisés pour stériliser les-récipients vides (tubes, ballons, fioles) bouchés au coton cardé. La température est de 170°C pendant 30 minutes (A 180°C il se formerait des goudrons à partir du coton cardé, d'où perte du pouvoir d'arrêt des bactéries par le coton).

7) – La Stérilisation par filtration

Utilisée quand les milieux sont altérables et sensible à la chaleur cas de sérum, des milieux sucrés, des vitamines, des antibiotiques ect...)

On fait passer les liquides à travers les filtres qui arrêtent les bactéries. Deux types de dispositifs sont utilisés : Les bougies, les disques en verre ou les membranes filtrantes, filtre millipore.

a) Les bougies

a1) En porcelaine (bougies Chamberland).

Les bougies sont numérotées de 1 à 7

L₁ laisse passer les bactéries.

L₅ retient les bactéries et les gros virus

a2) En terre d'infusoire.

b) Les disques filtrants

Alors que les bougies arrêtent quelques bactéries dont la taille est inférieure à celle de leur pores, les disques et membranes arrêtent les particules en fonction de leur taille.

b1) Les Filtres En verre fritté

| | | | | | |
|----------|---|---|---|---|---|
| Porosité | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------|---|---|---|---|---|

| | | | | | |
|------------------------|---------|--------|-------|------|-------|
| Pores en μm | 200-150 | 150-90 | 90-45 | 15-5 | 1,5-1 |
|------------------------|---------|--------|-------|------|-------|

b2) Les Plaques d'amiante cellulosé

b3) Les filtres millipores en esters de cellulose

Ils existent en 12 tailles :

| | | | | | |
|-----------------------------------|---------|-----------|------------|------------|------------|
| Référence | SC | RA | HA | G5 | VF |
| Taille des pores en μm | 8 μ | 1,2 μ | 0,45 μ | 0,22 μ | 0,01 μ |

b4) Les filtres Duralon (en nylon)

c) Le Mode d'emploi

L'appareil filtrant est préalablement stérilisé (enveloppé dans du papier filtre) à l'autoclave à 120°C pendant 30 minutes. On accélère la filtration par dépression (aspiration par une trompe à vide avec piège).

Les filtres sont ensuite stérilisés (à la chaleur, ou avec des agents bactéricides : KMnO_4 hypochlorite...)

8). – La Stérilisation par les radiations

1) Les U.V.

Ultra-Violet ont le pouvoir bactéricide est très élevé (il est d'autant plus grand que λ est petit).

- $\lambda = 2000 \text{ \AA}$ l'eau pure est traversée
- λ inférieur à 2000 \AA l'eau n'est plus traversée

2°) Les Rayons X

Ce sont les rayons X de grande longueur d'onde qui ont le plus grand effet bactéricide : X mous (peu pénétrants mais très absorbés).

3)- Les Radiations corpusculaires

Ce sont surtout les rayons e-(électrons) qui sont utilisés. Etant donné leur masse très faible, ils sont facilement détournés et diffusent dans le milieu.

- Produits par des générateurs (Van de Graff,..)
- Par les corps radioactifs :
- Radiostrontium
- Césium 137 (T= 33ans)

Ces éléments sont utilisés pour la stérilisation des boîtes de pétri en matière plastique enveloppées dans une feuille de polyéthylène soudée.

4) L'Utilisation des radiations

a) La Stérilisation de l'eau

(Pas de goût, ni d'odeur, ni modification chimique) pour être détruit, chaque microorganisme doit absorber une quantité d'énergie U.V. définie (cette énergie est le produit du temps d'exposition par l'intensité du rayonnement),

b) La Stérilisation de l'air (Salles de T.P. d'opération chirurgicale...)

Les lampes n'agissent qu'en rayonnement direct Les U.V. peuvent provoquer des accidents oculaires graves (lunettes),

II– LA DÉSINFECTION (STÉRILISATION PAR LES ANTISEPTIQUES)

1) – Les Antiseptiques liquides

Au laboratoire de bactériologie, on utilise surtout l'eau de javel. Elle est diluée au 1/4 dans des bocaux à pipettes ou à lames et dans les pissettes (lavages des mains).

D'autres sont utilisés

- 1 *L'iode et ses dérivés* (bactéricide par combinaison aux protéines cellulaires) actif seulement sur les germes Gram +.
- 2- *Mercurure et ses composés* (oxycyanure de mercure, chlorure mercurique) Bactériostatiques, sont de mauvais désinfectants.
- 3 - *Ammonium quaternaire* bactéricides pour les bactéries à Gram +.
- 4 - *Alcool* action très faible bactéricidique par dénaturation des protéines bactériennes.
- 5 - *Formol* utilisé à 5%.

2) – Les Antiseptiques gazeux

Connues depuis fort longtemps les fumigations de soufre servaient à désinfecter les pièces chez les grecs.

a) Les Vapeurs de Formol Agissent superficiellement

b) L'Ozone O_3 O_2 O_3 1800 A

L'ozone a une odeur caractéristique (dès que sa concentration atteint 10-7M). A la température ordinaire l'ozone se décompose en O_2 et en O actif. L'ozone est utilisé pour purifier les eaux de boisson. Un volume relatif de 0,5 10-5 suffit pour tuer en quelques minutes tous les germes (virus compris) d'une pièce. Il s'agit d'un gaz toxique pour l'homme.

c) L'Oxyde d'Ethylène $CH_2 - CH_2$

En milieu aqueux, donne de l'éthylène glycol ($CH_2-OH-CH_2OH$) qui possède une activité germicide, par cloquage des groupes - NH_2 , - SH , - OH .

LES MILIEUX DE CULTURE

I- GÉNÉRALITÉS SUR LEUR PRÉPARATION

La fabrication d'un quelconque milieu de culture doit obéir à un certain nombre de règles générales.

1- La Pesée des ingrédients

Il faut avant de peser vérifier la nature exacte du produit pesé. Si on peut généralement tolérer des erreurs de pesées de l'ordre du centigramme, certaines mesures devront être beaucoup plus précises.

2- La Dissolution des ingrédients

Sauf indication contraire s'effectue dans de l'eau distillée provenant d'appareils en acier inoxydable (les appareils en cuivre, les colonnes de résines, échangeuses d'ions peuvent donner une eau impropre aux usages bactériologiques, du fait de ses propriétés bactéricides ou bactériostatiques).

Pratiquer la dissolution dans des récipients en verre, émaillés ou en acier inoxydable. Dissoudre à chaud si nécessaire, mais jamais à une température trop forte.

3- La Mesure du pH du milieu

L'ajustement du pH à la valeur nécessaire au milieu est indispensable (Chaque espèce de bactérie a son maximum d'activité à un pH bien déterminé). D'une manière générale, les bactéries préfèrent les milieux neutres ou très légèrement alcalins. Il existe toutefois des espèces acidophiles (*Thiobacillus* qui prolifèrent dans des milieux à pH = 0,1).

Ne mesurer le pH que sur des milieux dont la température est au maximum égale à 50°C. (Variation du pH en fonction de la température).

L'ajustement du pH se fait par addition de Na OH N/10 ou d'HCl N/10, et sa mesure se fait au papier pH en général et au pH mètre.

4- La Répartition du milieu

En tubes à essais, ballons, erlens, fioles.

Si la répartition est approximative, l'opérateur verse à la pipette dans un tube à essai (ballon, erlen, fiole) témoin la quantité exacte. Il répartit du liquide en se servant d'un témoin. Si la répartition doit être plus précise, alors, on utilise un appareil à répartition automatique (seringue à piston...). Quel que soit le mode de répartition, éviter de déposer des gouttes de milieu à la partie supérieure des tubes, ou ballons ou fioles (risque de contamination): Boucher les récipients (bouchon vissé, coton cardé...)

5- La Stérilisation

Sauf indication contraires, elle se fait à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

6- La Conservation

Les tubes à essais, ballons, erlens ou fioles sont bouchés hermétiquement au coton cardé, et encapuchonnés par du papier aluminium. Conserver à l'obscurité, en atmosphère sèche (pour éviter les moisissures et à faible température au réfrigérateur.

II- PRÉPARATION DE DEUX MILIEUX SIMPLES

1. – L'Eau peptonée (milieu liquide)

La Formule est la suivante

| | |
|---------------|------|
| Peptone | 15 g |
| NaCl | 5 g |
| pH = | 7.6 |
| Eau distillée | 1 l |

La Préparation

Chauffer vers 80°C un litre d'eau distillée. Ajouter par petites fractions la peptone et le sel et mélanger soigneusement avec un agitateur jusqu'à dissolution complète. Porter à ébullition 10 minutes, filtrer sur papier dur. Ramener le volume à un litre avec de l'eau distillée. Laisser refroidir vers 40°C. Ajuster le pH à 7,6. Répartir en tubes a essai de 17-170 ou 18-180 à raison de 5 ou 10 ml. Boucher au coton cardé. Autoclaver à 115° 15 mn (les tubes vissés seront légèrement dévissés à l'autoclavage et revissés ensuite).

2. – La Gélose nutritive (milieu solide).

Il s'agit d'un bouillon nutritif solidifié par addition d'agar.

La Formule est la suivante.

| | |
|---------------------------|---------|
| Peptone | 15 g |
| Extrait de viande de bœuf | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| Agar | 20 g |
| Eau distillée | 1000 ml |
| pH | 7.2 |

3.- La Préparation.

Chauffer vers 80°C, un litre d'eau distillée. Dissoudre peptone, extrait de viande et NaCl. Retirer du feu. Laisser refroidir. Ajuster le pH à 7,2, 7,4. Ajouter par petites fractions la gélose (agar). Chauffer au voisinage de l'ébullition en remuant avec un agitateur.

(On peut autoclaver à 120°C pour précipiter (30 mn)-vérifier le pH). Filtrer.

4- La Répartition

Aussitôt filtrée, la gélose est versée dans un entonnoir répartiteur ; on la distribue, d'une part en tubes de 18-180 sous un volume de 25 ml pour couler en boîtes de Pétri, à chaud.

- Boucher, stériliser à l'autoclave 15 mn à 120°C.
- Inclinaison des tubes de 18-180. Pour faire des géloses inclinées, coucher les tubes encore chauds sur un plateau en maintenant leur orifice soulevé par une baguette de verre, ou le bord d'un portoir, et laisser prendre sans remuer.
- Après- séchage de 24 heures, capuchonner les tubes (ou visser) et les conserver dans un endroit frais (15°C) en position verticale.

L'ISOLEMENT ET PURIFICATION DES BACTÉRIES

Il s'agit d'un chapitre capital, sur le plan pratique, renfermant l'essentiel de la technique bactériologique, doit être l'objet d'exercices permanents. Les prélèvements de différents échantillons peuvent contenir différents microorganismes qu'il faudra isoler avant d'en effectuer l'identification. La méthode des stries permettant d'obtenir des colonies distinctes à partir d'un inoculum liquide ou solide, il sera dès lors très facile de prélever une seule colonie de chaque type pour procéder à l'identification

L'étude précise de microorganismes tels que les bactéries exige d'une façon générale :

L'isolement du microorganisme envisagé Sa culture aseptique (sur des milieux permettant sa culture ou son identification) c'est à dire sa croissance ou sa prolifération en l'absence de tout être vivant de type différent : (culture pure). Une telle culture doit pouvoir être poursuivie aussi longtemps que nécessaire.

L'extrême abondance des germes disséminés dans l'atmosphère et le milieu ambiant, apporte quelques difficultés à la réalisation de ces objectifs, car ces germes peuvent compromettre la validité d'un isolement, aussi bien que la pureté des cultures. Inversement, il est indispensable d'éviter le phénomène opposé, c'est-à-dire la dissémination dans le milieu ambiant du microorganisme cultivé. Cette recommandation est évidente dans le cas d'espèces pathogènes, mais elle doit être observée systématiquement, car certains bacilles anodins (*Bacillus subtilis*) peuvent compromettre toutes les manipulations effectuées dans une enceinte polluée de leur germe, souvent très résistant.

Les techniques particulières de la microbiologie permettent précisément de surmonter ces obstacles. Elles sont d'ailleurs applicables dans leurs grandes lignes à toutes les cultures aseptiques en général : culture d'organe de tissu.

I- INTRODUCTION AUX MÉTHODES D'ISOLEMENT

Il s'agit de cultures du produit pathologique ou du mélange, sur des milieux spéciaux. Leur principe est identique : le mélange de germes est introduit dans une enceinte et sur un milieu nutritif stérile de manière :

À éviter tout apport de nouveaux organismes

À ce que les conditions de développement de ces germes produisent une dissociation des types d'organismes en présence, et permettent ainsi de prélever uniquement celui que l'on désire conserver.

Le but de l'isolement est d'obtenir des colonies bactériennes nettement séparées. Les colonies bactériennes de forme, de taille, de couleur et de consistance variables, dépendant de l'espèce bactérienne en cause, sont des amas de bactéries toutes identiques, issues d'une seule bactérie originelle.

Pour réaliser un isolement, il faut donc déposer en divers points de la *surface d'un milieu solide* des bactéries à l'unité. Chacune, en se multipliant, va donner naissance après incubation à une colonie visible à l'œil nu. On parle des bactéries cultivables.

Nous allons voir quels artifices permettent de réaliser la dispersion désirée.

II. – Isolement sur tube inclinée

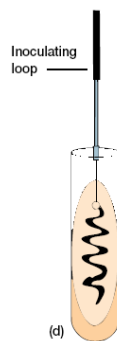
a- La dilution

La dilution préalable du produit examiné doit être adaptée à la richesse de ce dernier en bactéries et à la nature présumée de ces bactéries. Elle sera donc réalisée en fonction des données fournies par l'examen microscopique direct. Elle n'est pas toujours indispensable (on parle alors d'isolement par épuisement de la semence). En moyenne, lorsqu'on part d'un produit pathologique riche en bactéries ou d'un bouillon de 24 heures : mettre de 1 à 10 gouttes du produit à examiner dans 10 ml d'eau distillée stérile.

N.B. Il faut préférer l'eau distillée stérile à l'eau physiologique stérile classique, qui peut empêcher la multiplication de certaines espèces bactériennes.

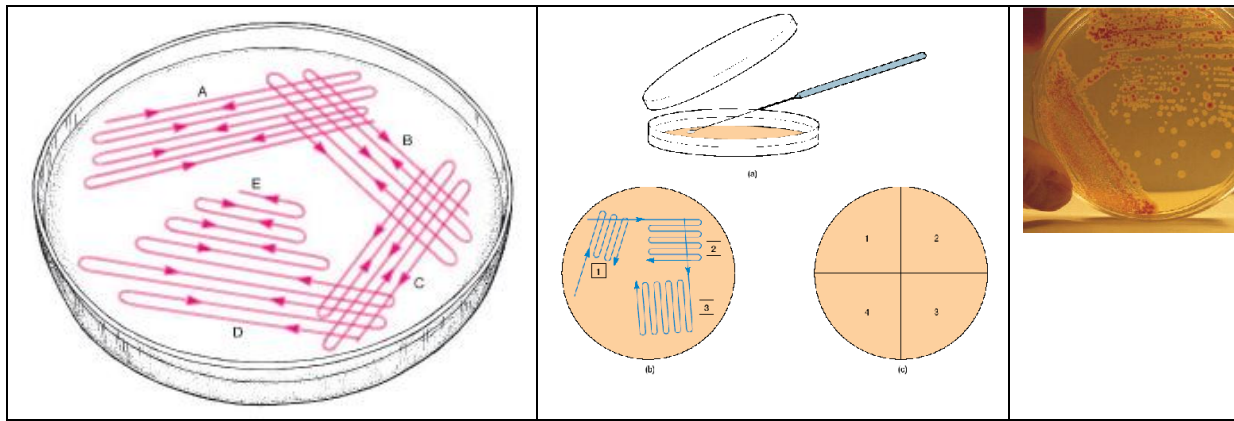
b- L'isolement

Il est absolument indispensable d'appliquer lors de manipulations de rigoureuses précautions d'aseptie. Les précautions devront, par la suite, toujours être observées, quelles que soient les manipulations de cultures effectuées. Le bactériologiste doit acquérir un automatisme réfléchi qui lui permettra le travail aseptique, et d'éviter la contamination. Dans le cas de l'isolement les opérations à effectuer sont les suivantes:



- Prendre l'anse de platine de la main droite et la stériliser, puis sans sortir de l'aire de protection du bec, laisser refroidir,
- Décapuchonner le tube de culture si celui-ci possède un capuchon de caoutchouc. Avec une pince flambée, prendre le coton cardé, et, sans déboucher le tube, tirer légèrement ce coton en tournant, de façon à le décoller du verre. Réaliser la même opération sur les 3 tubes de gélose inclinée; les tubes seront alors placés sur un portoir à gauche du bec bunsen,
- Prélever une ose du produit à examiner (dilué),
- Déposer sur la pente de la gélose à un centimètre environ au-dessus de son point de contact avec le verre (pour éviter l'eau de condensation),
- Remonter en décrivant des stries serrées, allant d'un bord à l'autre du tube,
- Toute la surface de la pente de la gélose étant ainsi recouverte,
- Si le tube est correctement ensemencé, les stries doivent être à peine visibles. En aucun cas la gélose doit être éraillée,
- Ressortir l'anse et reflamber l'orifice du tube. Remettre le coton en place,
- Recommencer pour les autres tubes de la même façon.
- Stériliser l'anse de platine. La reposer.
- Incuber les tubes verticalement à l'étuve (37°C - 24 heures).

II- L'ISOLEMENT SUR UNE GÉLOSE EN BOITE DE PÉTRI.



Placer la boîte de Pétri le plus près possible du bec de gaz. (Tracer 2 diamètres perpendiculaires sur le fond de la boîte au crayon feutre).

L'inoculum (1 ose) est déposé en un point de la boîte (0) puis étalé à l'aide de la pipette boutonnée sur le quadrant I par passages successifs à la surface de la gélose. (la pipette boutonnée se confectionne en tenant verticalement, partie effilée vers le bas, une pipette Pasteur dans la flamme). Le couvercle est tenu de la main gauche très légèrement soulevé pour permettre le passage de l'étaleur (pipette boutonnée). L'ouverture de la boîte de Pétri ainsi obtenu sera située vers le bec bunsen. L'étalement se fera alors sur le quadrant opposé à l'ouverture par raison de commodité.

Une fois l'étalement de l'inoculum réalisé sur le quadrant 1, la pipette boutonnée est sortie, flambée, puis refroidi.

Le 2^{ème} quadrant est alorsensemencé à partir du premier.

Pour cela passer la pipette boutonnée sur la surface de la gélose du quadrant 1 pour la recharger puis réaliser des stries serrées sur le quadrant 2. Recharger ainsi 2 ou 3 fois la pipette sur le quadrant.

Ensuite sans flamber la pipette, réaliser de la même manière l'isolement sur les quadrants 3 et 4. Une foisensemencée, fermer la boîte et la retourner aussitôt. Flamber la pipette boutonnée (ou à boule).

Une boîte de pétriensemencée doit toujours reposer couvercle en bas, que ce soit à l'étuve ou sur la paillasson, sinon, l'eau de condensation, quasi inévitable à la face inférieure du couvercle, va retomber à la surface du milieu transformant l'isolement en une nappe inutilisable.

III- L'ISOLEMENT PAR INHIBITION SÉLECTIVE

Il est fondé sur l'utilisation de milieux de culture favorisant la croissance de certains germes, ou au contraire inhibant la croissance.

Ainsi des milieux nutritifs additionnés d'antibiotiques fongiques tels que la pénicilline, en inhibant les bactéries favorisent l'isolement des champignons à partir d'un mélange bactéries - champignons. Au contraire si on additionne de la mycostatine au milieu les champignons seront inhibés.

De même, la culture en anaérobiose d'un mélange de germes aérobies et anaérobies, permet seulement le développement des derniers et facilite ainsi leur isolement.

On utilise ces milieux spéciaux en tubes ou coulés en boîte de Pétri, en se servant des techniques d'isolement déjà décrites.

Le Milieu de Chapman (sélectif pour les staphylocoques)

| | |
|-------------------------------|------|
| Peptone pepsique | 2 g |
| Extrait de viande | 1 g |
| Protéose peptone n° 3 (Difco) | 9 g |
| NaCl | 75 g |

| | |
|-----------------|---------|
| Mannitol | 15 g |
| Agar | 10 g |
| Rouge de phénol | 0,025 g |
| Eau distillée | 1000 ml |
| pH | 7,4 |

La concentration élevée en NaCl inhibe la croissance des bactéries non halophiles. L'unique source de carbone mannitol (qui est un polyol dérivé du mannose) le rend sélectif pour les Staphylocoques. Le rouge de phénol est un indicateur du pH qui met en évidence la fermentation avec production d'acides organiques. En milieu acide, le rouge de phénol vire au jaune. Les staphylocoques pathogènes pour l'homme possèdent en général ce caractère : ils sont dit mannitol + (*Staphylococcus aureus*).

Le Milieu E.M.B (Eosine - bleu de Méthylène) sélectif pour les Entérobactéries)

| | |
|-----------------------------|--------|
| Peptone pancréatique | 10g |
| Phosphate bipotassique | 2g |
| Agar agar | 20g |
| Eau distillée | 1000ml |
| Ajuster à pH | 7,2 |
| Ajouter après stérilisation | |
| Lactose | 5g |
| Saccharose | 5g |
| Eosine jaune | 0,4g |
| Bleu de Méthylène | 0,065g |

Un milieu sélectif pour les bactéries qui attaquent le lactose (ex : les Entérobactéries). La présence du bleu de méthylène inhibe la croissance de la plupart des germes Gram +. L'éosine est un indicateur du pH qui met en évidence la fermentation du lactose avec production d'acides organiques. En milieu acide, les colonies des bactéries lactose + apparaissent en violet foncé. Par contre, les bactéries lactose - apparaissent grises.

IV- LA PURIFICATION DES COLONIES

Choisir une colonie bien isolée de chaque type de milieu, prélever stérilement à l'anse de platine la colonie choisie et la mettre en suspension dans quelques gouttes d'eau distillée. (Dans un tube à hémolyse stérile bouché au coton cardé). Faire toujours un contrôle microscopique (Etat frais - Gram) avant de procéder à l'identification de la bactérie ainsi isolée.

LES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE

Une bactérie ne peut être identifiée qu'une fois isolée et obtenue à l'état pur. Pour parvenir à identifier le germe on est en général amené à réaliser :

L'étude des caractères biochimiques : seul un ensemble de caractères biochimiques permettra l'identification. Les différents constituants de cet ensemble (galerie) sont choisis en fonction de l'examen morphologique, macro et microscopique. Cette étude est applicable à toutes les bactéries.

L'étude antigénique (recherche d'antigènes bactériens par réaction de floculation avec les anticorps correspondants). Méthode largement utilisée.

L'étude du pouvoir pathogène expérimental par inoculation à un animal sensible moins utilisée en médecine, mais fréquente en pathologie animale.

L'étude du lysotype (très rarement effectuée).

I- LE TYPE RESPIRATOIRE

1) Culture en gélose profonde

Certaines bactéries aérobies strictes, capables d'utiliser les nitrates comme accepteurs d'hydrogène cultivent en profondeur (condition anaérobie), si la gélose contient des nitrates. Ainsi, pour étudier le type respiratoire n'utilise-t-en que des géloses sans nitrate telles que la gélose V.F.

- Régénérer la gélose 30 mn au bain-marie bouillant, puis la laisser refroidir à 45°C environ. Le but de cette régénération est de chasser l'oxygène dissous dans le milieu. Si le milieu est bien régénéré la lecture donne une bonne interprétation du rH de départ plus le milieu a un rH élevé, plus il est oxygéné. D'ou, la nécessité d'une bonne régénération par l'ébullition pour appauvrir le milieu en O₂ dissous. Sur le tube de gélose V.F. un gradient décroissant en teneur d'O₂ est ainsi obtenu après solidification.
- Ensemencer à la pipette Pasteur boutonnée, plongée jusqu'au fond,
- Puis remonter en décrivant une spirale serrée (le milieu doit être encore liquide t° = 45°C).

Les rH compatibles avec la vie bactérienne sont compris entre 3 et 20. Les aérobies cultiveront pour des rH de 20, pour les anaérobies, il faudra un rH suffisamment bas inférieur à 9 pour assurer le démarrage de la culture. Les anaérobies d'ailleurs abaissent le rH de leurs milieux par la production de corps réducteurs et le rH auquel ils aboutissent est fixe selon l'espèce. Ce rH final caractéristique peut être mis en évidence aisément par des indicateurs de rH : safranine, rouge neutre, vert Janus.

2)- Réduction des nitrates

On met en évidence la formation des nitrites, par la coloration rouge qu'ils donnent en milieu acétique en présence d'acide sulfanilique et α -naphtylamine. On utilise comme milieu de culture un milieu gélosé ou liquide auquel on a additionné des nitrates.

Si la réduction a dépassé le stade de formation des nitrites la réaction sera négative. Dans ce cas on met en évidence la disparition des nitrates. En effet, en présence de poudre de zinc les nitrates sont réduits en nitrites.

3)- Recherche de l'oxydase (cytochrome oxydase)

Production de cytochrome-oxydase.

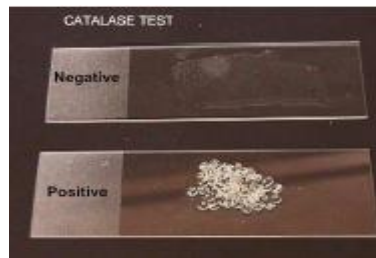
- **Principe** : ce test établit si une bactérie contient un certain type de cytochrome dans sa chaîne respiratoire. L'oxydation de substrat chromogène comme la 3,2-tétraméthyl-p-phénylènediamine entraîne l'apparition d'une couleur violette intense.
- **Utilité du test** : identification phénotypique selon la production d'enzyme : différenciation des bacilles à Gram –
- **Mode opératoire** : on utilise une bandelette de papier imprégnée du réactif, le N diméthyl paraphénylène diamine, sur laquelle un fragment de colonie est étalé au moyen d'une oese. Les espèces contenant l'oxydase donnent en 30 secondes au maximum une réaction positive, de coloration violette.
- **Interprétation** : certaines bactéries non fermentantes comme le *Pseudomonas aeruginosa* (ou bacille pyocyanique) sont cytochrome- oxydase positive tandis que les Entérobactéries, ne réagissent pas (cytochrome- oxydase négative)

Des étapes réalisées précédemment (observation des milieux de culture, lecture du frottis bactérien après coloration, réalisation des tests oxydase OU cytochrome oxydase), vous connaissez le type de bactérie en présence :

- soit Staphylocoque
- Soit Streptocoque
- Soit entérobactérie
- Soit bacille gram négatif non fermentant
- Soit levure

d)- Recherche de la catalase

- **Principe** : mise en évidence par une production d'oxygène (test positif) lorsque la bactérie est mise en contact avec du peroxyde d'hydrogène. Utilité du test : différenciation des bactéries de type coque à Gram +
- **Mode opératoire** : le test consiste à transférer au moyen d'une oese un fragment de colonie dans une goutte d'eau oxygénée placée sur une lame de verre : la présence de catalase donne lieu à l'apparition de bulles d'oxygène.
- **Interprétation** : par exemple : les staphylocoques présentent une réaction positive et sont dits « catalase-positifs » tandis que les streptocoques sont « catalase-négatifs ».



Réaction de l'enzyme catalase produite par certaines bactéries (dégagement des bulles d'air indique une réaction positive)

e)- Milieu au KCN

Le KCN inhibe les cytochrome-oxydases, ce qui supprime la phosphorylation oxydative. Dans ce cas les bactéries ne peuvent cultiver sur ce milieu.

RAPPEL. Les indicateurs de pH

Ils doivent être considérés comme des acides faibles dont l'ion A n'a pas la même couleur que la molécule AH.

Soit, x la concentration ou l'activité de l'indicateur dissocié. A pH acide x est très faible, l'indicateur à la couleur de sa molécule.

A pH alcalin x est très important : l'indicateur à la couleur de son ion dissocié.

Indicateurs de pH utilisés en bactériologie :

| Nom de l'indicateur de pH | couleur de la molécule pH acide | couleur de l'ion pH alcalin | zone de virage |
|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------|----------------|
| Tournesol | rouge | bleu | 4,5 - 8,3 |
| Rouge de méthyle | rouge | jaune | 4,2 - 6,3 |
| Rouge de phénol | jaune. | rouge | 6,8 - 8,4 |
| Bleu de bromothymol | jaune | bleu | 6,0 - 7,7 |
| Pourpre de bromocrésol | jaune | violet | 6,5 |

II- MÉTABOLISME GLUCIDIQUE

L'étude de l'assimilation des hydrates de carbone et de leur voie métabolique utilisée par la bactérie est fondamentale dans l'identification des bactéries. Lorsqu'il y a fermentation des hydrates de carbone, diverses productions acides peuvent être mises en évidence par des quantités minimales d'indicateur de pH ajoutés en présence du glucide dans le milieu de culture.

1) Eaux peptonées additionnées de glucide et d'indicateur de pH

a) Eau peptonée stérile.

Glucide stérile (glucose, galactose, mannose, fructose, maltose, saccharose, lactose, arabinose, xylose.ect..) incorporé à la concentration de 0,5%.

L'indicateur de pH : le plus souvent utilisé est le *rouge de phénol* à 0,2%, rouge à pH 7, et jaune à pH inférieur à 7.

b) Bleu de bromothymol

Technique :

- Ensemencer largement. Etuver 24 heures à 37°C.
- Le virage au jaune indique l'utilisation du glucide.

Dans certains tubes, on place une petite cloche renversée qui permet d'apprécier la production éventuelle de gaz (tubes de Durham ou tubes à "cloches").

2). Milieu glucose-lactose H₂S (milieu de Kligler)

Valable seulement pour les bactéries fermentatives cultivant facilement.

Composition du milieu :

| | |
|---------------------------|---------|
| Peptone pancréatique | 20 g |
| NaCl | 5 g |
| Agar | 17 g |
| Eau | 1000 ml |
| Lactose | 10 g |
| Glucose | 1 g |
| Hyposulfite de sodium | 0,2 g |
| Sulfate de fer ammoniacal | 0,3 g |
| Rouge de phénol à 1% | 2,5 ml |
| pH | 7,2 |

Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

Pour l'utilisation, liquéfier au bain marie bouillant puis laisser solidifier incliné de façon à avoir, au-dessous de la pente, un culot de 3 cm de hauteur environ. N'utiliser que des milieux récemment inclinés.

Principe : en anaérobiose, la bactérie utilisera le glucose avant le lactose bien que le premier soit en proportions beaucoup plus faibles. Le sulfate ferreux sert d'indicateur d'H₂S.

Technique :

Ensemencer la surface abondamment, puis le culot par pique centrale. Ne pas capuchonner pour les milieux du commerce présentés avec un bouchon, ne pas visser à fond. Etuver 24h à 37°C.

Résultats :

- Glucose fermenté : culot jaune (rouge dans le cas contraire).
- Production de gaz : bulles dans le milieu ; parfois décollement.
- Lactose fermenté: pente jaune (rouge dans cas lac-).
- Production H₂S : noircissement du milieu sur une zone ou entièrement.

3) Milieux de Hugh et Leifson et milieux M.E.V.A.G.

Ce sont des géloses molles faiblement peptonées, contenant un indicateur de pH (bleu de bromothymol ou rouge de phénol) présentées en culot.

e) Milieu de Hugh et Leifson

| | |
|----------------------------------|---------|
| Trypticase | 2 g |
| NaCl | 5 g |
| K ₂ H PO ₄ | 0,3 g |
| Agar | 3 g |
| Bleu de bromothymo | 0,03 g |
| Eau distillée | 1000 ml |
| pH | 7,2 |

Répartir en culots de 5 cm. Autoclaver 20 mn à 120°C

- Utilisation : elle est double

4) Caractérisation du type métabolique : oxydatif ou fermentatif

- Faire fondre au bain-marie à 100°C deux tubes de l'un de ces milieux. Ramener à 45°C et ajouter un sucre (glucose par exemple) à la concentration finale de 1%. Après solidification dans un bain d'eau froide, ensemencer par piqûre centrale les deux tubes avec une pipette Pasteur. (On peut aussi ensemencer dans la masse avant solidification : souches cultivant pauvrement).
- Recouvrir la surface d'un des deux tubes d'huile de paraffine stérile sur une hauteur de 0,5 cm.
- Les deux tubes sont placés à l'étuve à 37°C pendant au moins 24 heures.

Résultats :

3) Métabolisme oxydatif :

Acidification du milieu seulement à la partie supérieure du tube sans paraffine. (L'oxygène est indispensable). Métabolisme fermentatif acidification sur toute la hauteur des deux tubes avec ou sans production de gaz. Bactéries n'utilisant par le glucide additionné : pas d'acidification, parfois alcalinisation.

1) Etude du métabolisme glucidique des souches oxydatives.

Cette méthode est plus sensible que les géloses inclinées. Ensemencer comme précédemment un tube "ouvert" pour chaque sucre à étudier, introduit à concentration finale de 1%.

2) Recherche de la β -galactosidase

Principe pour que lactose soit fermenté il faut qu'il pénètre dans la cellule bactérienne. Cette pénétration dépend de la β -galactoside perméase, qu'un autre enzyme intracellulaire, la β -galactosidase, hydrolyse en glucose et galactose la molécule de lactose. Ensuite interviennent les chaînes enzymatiques présentes dans les bactéries glucose+ par voie fermentative.

Une bactérie possédant la β -galactosidase, mais chez laquelle la β -galactoside perméase est absente ou non fonctionnelle n'acidifie pas les milieux lactose, alors qu'elle est potentiellement capable de le faire.

Si après plusieurs jours de culture, un mutant perméase + apparaît, la fermentation aura lieu et le milieu lactose sera acidifié tardivement. Les variations, dans les délais d'acidification des milieux lactoses par ces bactéries sont donc liées à la perméase. Elles seront supprimées si l'on recherche la β -galactosidase seulement.

L'ortho-nitrophényl β -D galactopyranoside (O.N.P.G.) est hydrolysée comme le lactose, par la galactosidase qui libère à partir de cette substance incolore, l'ortho-nitrophénol jaune.

Technique

- Une pleine ose de culture bactérienne prélevée sur un milieu lactosé (Kligler) est mise en suspension dans 0,5 ml d'eau distillée stérile.
- Ajouter un disque d'ONPG. Porter à 37°. La solution devient jaune si les bactéries possèdent une β -galactosidase.

3) Milieu de Clark et Lubs (R.M. et V.P.)

Le but de ce milieu est d'étudier deux aspects du métabolisme glucidique, en particulier celui du glucose (il faut donc que la bactérie soit glucose +) Après ensemencement, au bout de 48 heures on recherche

- la présence d'un dérivé intermédiaire du métabolisme glucosidique l'acétyl-méthyl-carbinol (ou acétoïne) mis en évidence par la réaction de Voges-Proskauer (V.P)
- on étudie le pH final obtenu : toutes les bactéries glucose +, acidifient en 24 heures le milieu. Cependant certaines d'entre elles élaborent secondairement des produits alcalins (diamines comme la cadavérine résultant de la décarboxylation de la lysine) qui font remonter le pH, Mesure du pH au rouge de méthyle (R.M.)

Composition :

| | |
|----------------------------------|---------|
| Peptone tryptique | 10 g |
| K ₂ H PO ₄ | 2 g |
| Glucose | 10 g |
| Eau distillée | 1000 ml |
| pH | 7 à 7.5 |

Le milieu se présente dans le commerce en ampoules stériles

Technique :

4) Réaction au rouge de méthyle (R.M.)

A partir du milieu de Clark et Lubs ensemencé depuis 4 jours, et incubé à 37° C.,

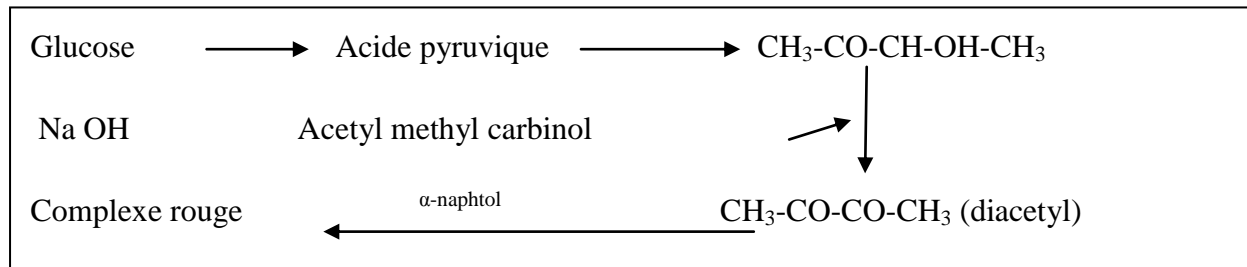
Dans un tube à hémolyse, et stérilement prélever 2 ml du milieu ajoute 3 gouttes de rouge de méthyle à 0,02% dans l'alcool à 60%.

Le rouge de méthyle est rouge pour $\text{pH} \leq 4,6$ (RM +) et jaune pour $\text{pH} > 4,6$ (RM -)

5) Réaction de Voges-Proskauer

A partir du milieu de Clark et Lubs, après deux jours d'incubation. Dans un tube à hémolyse, et stérilement, prélever 1 ml du milieu, ajouter 05 ml d' α -naphthol 6% dans l'alcool et 1 ml de NaOH 16%. Laisser au repos 15 minutes

Une teinte violacée apparaît plus intense à la partie supérieure du tube si la souche a produit de l'acétyl-méthyl carbinol (V.P. +)



6) Milieu mannitol-mobilité

Milieu : C'est une gélose molle contenant du mannitol (polyol dérivé du mannose) et un indicateur coloré (Rouges de phénol).

| | |
|----------------------|---------|
| Peptone panoréatique | 20g |
| Mannitol | 10g |
| KNO_2 | 1g |
| Rouge de phénol | 2,5ml |
| Gélose | 5g |
| Eau | 1000 ml |

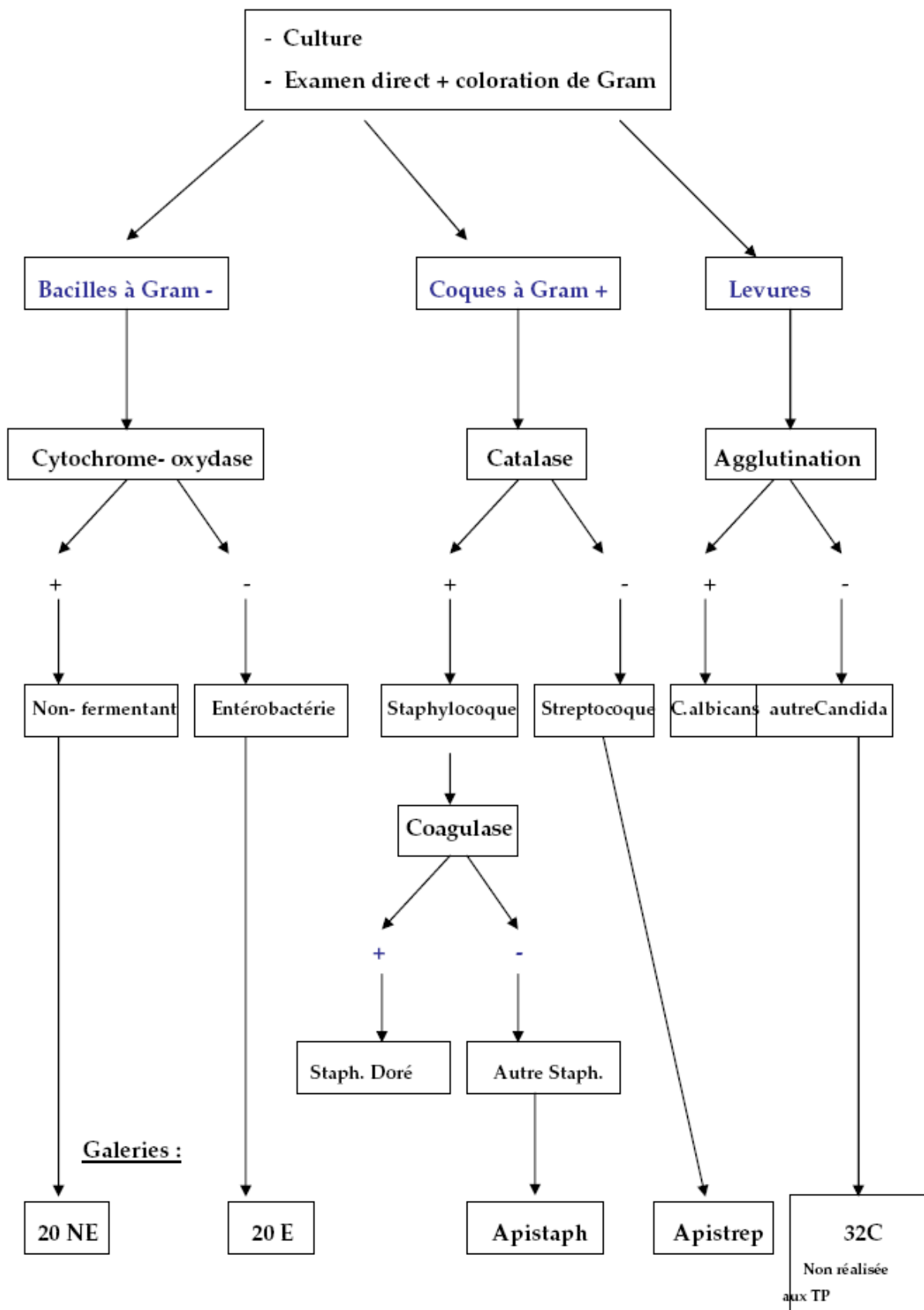
On l'ensemence par pique centrale aussi fine que possible. Incuber à 37°C.

Lecture : Les bacilles mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble dans le milieu. Les bacilles immobiles cultivent le long de la strie d'ensemencement. Si le mannitol est fermenté (mannitol +) le milieu vire au jaune.

N.B. -Le milieu dispense de recherche la mobilité entre lame et lamelle (on confirme) les bactéries qui ne sont pas anaérobies facultatives ne cultiveront pas en profondeur.

7) Gélose à l'amidon

Poudre de foie (extrait de viande) 3g amidon soluble de riz 10g; gélose 14g; eau distillée 1 litre.



8) Milieu synthétique eu citrate (milieu de Simmon)

a) Principe

Dans ce milieu synthétique la source d'azote est constituée par le dihydrogénophosphate d'ammonium. La source de carbone par le citrate de sodium (premier composé formé dans le cycle de Krebs). Seuls les germes capables d'utiliser le citrate cultivent sur ce milieu, avec alcalinisation (passage au bleu de l'indicateur).

Composition

| | |
|--|---------|
| NaCl | 5g |
| Mg SO ₄ | 0,2 g |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 1g |
| K ₂ H PO ₄ | 1g |
| Citrate trisodique | 2g |
| Bleu de bromothymol | 0,08g |
| Gélose | 20g |
| Eau distillée | 1000 ml |
| pH | 7 |

b) Ensemencement

Le milieu doit êtreensemencé avec une suspension bactérienne en eau distillée, réalisée à partir d'une culture prélevée sur milieu gélosé, jamais avec une culture en bouillon ou en eau peptonée, qui pourrait apporter, des facteurs nutritifs susceptibles de fausser les résultats.

Prélever peu de bactéries et surtout pas de gélose sous-jacente. Ensemencer en surface en une strie longitudinale. Incuber à 37°C pendant 1 à 5 jours.

Ne pas capuchonner. Pour les tubes vissés, ne pas bloquer le bouchon.

9) Utilisation du malonate

- **Principe** : le malonate $\text{Na}^+ \text{C}00^- - \text{CH}_2 - \text{C}00^- \text{Na}^+$ est le sel disodique de l'acide malonique qui est un inhibiteur de la succinodéshydrogénase du cycle de Krebs. Si la bactérie dégrade cette substance le milieu sera alcalinisé et l'indicateur de pH (bleu de bromothymol) virera au bleu (malonate +).
- **Ensemencement** : s'effectue à partir d'un peu de culture de 18 à 24 heures. Incuber 48 heures à 37°C.
- **Résultats** : malonate + : le milieu vire du vert au bleu outremer si la souche est malonate - pas de changement de coloration

Composition :

| | |
|---|-----------------|
| Extrait de levure | 1g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2g |
| K ₂ H PO ₄ | 0,6g |
| K H ₂ PO ₄ | 0,4g |
| NaCl | 2g |
| Malonate de sodium | 3g |
| Glucose | 0,25g |
| Bleu de bromothymol | 0,025g |
| Eau distillée | 1000 ml |
| pH | 6,1(jaune vert) |

II- LE MÉTABOLISME PROTÉIQUE :

1) Protéolyse de la gélatine

La gélatine solidifiée en culot estensemencée par piqure centrale. Laisser à la température du laboratoire (20°C), la liquéfaction de la gélatine, sous des formes différentes (clou, cylindre etc,..) permet de conclure que le germe est gélatinase +.

Variantes

- **Méthode de Frazier** à de la gélose nutritive on ajoute de la gélatine (boite de Pétri). Après ensemencement et incubation de 2 jours à 37°C, on ajoute une solution de chlorure mercure à 15% dans HCl 17%, qui produit un précipité blanchâtre partout où la gélatine n'a pas été hydrolysée.
- **Méthode à la pellicule photographique** (Microfile Kodak). Faire une suspension très épaisse de bactéries dans 1 ml eau distillée (dans un tube à hémolyse). Ajouter un carré de 0,5 x 0,5 cm de pellicule exposée à la lumière, puis développée. Si la gélatine est hydrolysée, l'argent métallique est libéré : dépôt noirâtre et la pellicule devient transparente.

II) Hydrolyse de la caséine

La recherche se fait à partir de milieux à base de lait. On peut observer après ensemencement: du lait tournésolé et après incubation à 37°C une acidification du milieu avec souvent coagulation (lactose +) - alcalinisation simple indique l'attaque de la caséine. L'alcalinisation et la peptonisation (éclaircissement progressif du milieu débutant vers la surface ; avec ou non coagulation préalable) et réduction du colorant au fond du tube.

2) Recherche de l'uréase et de l'indole

Composition (milieu urée-indole)

| | |
|----------------------------------|--------|
| L. tryptophane | 3g |
| KH ₂ PO ₄ | 1g |
| K ₂ HPO ₄ | 1g |
| NaCl | 5g |
| Urée | 20g |
| Alcool 95° | 10ml |
| Solution de rouge de phénol à 1% | 2,5ml |
| Eau distillée | 1000ml |

Ce milieu se présente en ampoules scellées de 1 ml (jaune orangé).

Ensemencement : doit être relativement riche. Incuber à 37°C pendant 24 heures.

Lecture :

Si le germe est uréase + (possède une uréase), le milieu devient alcalin par formation de carbonate d'ammonium et vire au rouge violacé en 2 heures (*Proteus*) en 18 heures (*Klebsiella*).
pas de modification de couleur si le germe est uréase -

3). Test de CAMP

a) Principe

Déterminer si un microorganisme synthétise le facteur CAMP qui agit en synergie avec l'hémolysine B du staphylocoque, ce qui produit une lyse complète des érythrocytes à la jonction des deux organismes.

b) Technique

Sur une gélose au sang, faire une strie de *Staphylococcus aureus* avec le fil de platine. Faire une deuxième strie avec la culture à identifier, de façon à ce qu'elle soit perpendiculaire à celle du *Staphylococcus aureus*. Cette deuxième strie ne doit pas toucher la première, tout en étant très proche. Plusieurs cultures peuvent être soumises à l'épreuve sur la même gélose. Incuber à 37°C pendant 24h.

c) Résultats

Réaction positive: zone typique d'hémolyse complète en forme de pointe de flèche, à la jonction des deux stries. Réaction négative: aucune augmentation de l'hémolyse à la jonction des deux stries.

4)- Recherche de l'indole

A partir d'une culture de 24 heures en eau peptonée ou en milieu urée indole, le tryptophane fourni à la bactérie est transformé en indole. Plusieurs voies métaboliques peuvent être utilisées selon la bactérie : d'une part une succession de désaminations oxydatives et de décarboxylation, d'autre part une hydrolyse du tryptophane avec production d'indole et de sérine.

- Mise en évidence de l'indole par la réaction de Salkowsky. Elle consiste en une nitrosation par l'acide nitreux

$(2\text{NaNO}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 \longrightarrow 2\text{HO-N}=\text{O} + \text{Na}_2\text{SO}_4)$ du noyau indole. Le nitrosoindole est coloré en rouge.

A 0,5 ml de milieu, ajouter 5 gouttes de nitrite de sodium à 1‰, puis 12 gouttes d'H₂SO₄ pur. Indole +: coloration rose.

5) Mise en évidence par le réactif d'Erlich-Kovacs

Le paradiméthylaminobenzaldéhyde donne avec l'indole, en milieu acide, un complexe coloré en rouge, solubilisé par l'alcool amylique de la réaction coloration rouge vif dans la phase amylique surnageant si la bactérie est indole +.

Réactif de Kovacs :

| | |
|-------------------------------|--------|
| Paradiméthylaminobenzaldéhyde | 10 g |
| Alcool amylique | 150 ml |
| HCl pur | 50 ml |

A 0,5 ml de milieu, ajouter 5 à 6 gouttes de réactif. Agiter lentement. Indole + donne une coloration rouge vif de la phase amylique du surnageant.

6)- Recherche du tryptophane désaminase (T.D.A.)

En présence de perchlorure de fer l'acide indolylpyruvique donne une coloration brun rouge. A partir de 0,5ml de milieu urée-indole incubé à 37°C au moins 2 heures, ajouter 1 goutte de perchlorure de fer officinal au 1/3.

TDA + : coloration brun rouge et TDA - ; coloration jaunes

7)-Recherche de la phénylalanine désaminase (A.P.P.)

L'acide phénylpyruvique donne avec le perchlorure de fer une coloration brun rouge.

Dans un tube à hémolyse, 5 gouttes de solution à 0,5% de phénylalanine et 5 gouttes d'eau physiologique sontensemencés richement. Incuber au moins 2 heures à 37°C Opérer ensuite comme pour la TDA.

8)-Recherche de la lysine décarboxylase (L.D.C.)

La décarboxylation des acides aminés (lysine, ornithine etc...) conduit à la formation de diamines basiques.

Milieu de Taylor

| | |
|---|--------|
| L. lysine monochlorhydrate | 5g |
| Extrait de levure | 3g |
| Glucose | 1g |
| Pourpre de bromocrésol à 1.6% dans l'alcool | 1ml |
| Eau distillée | 1000ml |
| pH | 7,2 |

b) Ensemencement : Avec un peu de culture sur gélose du germe à étudier incuber 24 heures à 37°C.

c) Lecture : Si la lysine a été décarboxylée le milieu est bleu violet LDC t. Il est jaune dans le cas contraire.

III- LE MÉTABOLISME LIPIDIQUE

1)- Recherche de la lipase

a) Principe :

Les lipides sont hydrolysés sous l'action de la lipase, en acides gras et alcools. En présence de sels de calcium les acides gras donnent des précipités.

b) Milieu :

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Peptone pepsique | 10g |
| NaCl | 5g |
| CaCl ₂ | 0,1g |
| Gelose | 25 g |
| Eau distillée | 1000ml |
| pH | 7,4 |
| Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes | |

Technique

Au moment de l'utilisation, liquéfier au bain marie bouillant 25 ml de ce milieu, et ajouter 10 gouttes de Tween 80 (lipide) stérilisé préalablement. Bien mélanger. Couler en balte de Pétri. Laisser solidifier. Bien sécher.

Ensemencer en touches de 0,5 cm de diamètre environ. La même boîte peut recevoir plusieurs touches de souches différentes.

c) Lecture

Une réaction positive se traduit par un halo opaque autour des colonies, et à la précipitation des acides gras et de leurs sels de calcium.

2)- Recherche d'une lécithinase

a) Milieu gélosé additionné de jaune d'œuf.

b) Milieu favorisant la pigmentation

Dans le cas particulier des Pseudomonas, on met très facilement en évidence la pigmentation sur des milieux spéciaux : milieu de KING A et milieu de KING B.

Milieux de KING

Milieu A

| | |
|--------------------------------|---------|
| Becta peptone | 20 g |
| Agar | 15 g |
| Glycéril P | 10 g |
| K ₂ SO ₄ | 10 g |
| Mg Cl ₂ | 1,4 g |
| Eau distillée | 1000 ml |
| pH | 7,2 |

Milieu B

| | |
|---|---------|
| Protéose peptone | 20 g |
| Agar | 15 g |
| Glycérol P | 10 g |
| K ₂ MPO ₄ | 1,5 g |
| Mg SO ₄ , 7 H ₂ O | 1,5 g |
| Eau distillée | 1000 ml |
| pH | 7,2 |

2- Utilisation

Inoculer un tube de milieu A et un tube de milieu B, inclinés, en faisant une strie médiane à la surface gélose avec une 5^{se} prise dans un bouillon. Replacer le bouchon sans le revisser, Incuber à 30 ou 37°C pendant 24 heures à 4 jours.

3) Lecture

Le milieu de KING A favorise la production de pyocyanine, pigment bleu soluble dans l'eau et le chloroforme.

Le milieu de KING B favorise la production de pyoverdine, pigment vert fluorescent.

V- RECHERCHE DE L'H₂S.

L'H₂S provient du catabolisme des acides aminés soufrés. Il est mis en évidence sur le milieu de Kligler (voir métabolisme glucidique) par formation à partir de sulfate de fer ammoniacal de sulfure de fer qui est noir.

On peut utiliser des bandes de papier buvard imprégnées de sous acétate de plomb à 10% puis séchées, que l'on introduit au-dessus du milieu. La présence d'H₂S se traduit par la formation de sulfure de plomb noir.

LA RECHERCHE D'ENZYMES INTERVENANT DANS LE POUVOIR PATHOGENE

I- HÉMOLYSINES

On ensemence une gélose au sang, coulée en boîte de Pétri. On étudie l'hémolyse autour des colonies.

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| hémolyse α : | Hb Méthémoglobine verte |
| hémolyse β : | libération de l'Hb : auréole claire |
| hémolyse γ : | pas d'hémolyse |

II- LA COAGULASE.

Ce test, mettant en évidence l'aptitude des bactéries à coaguler le plasma, est le principal test caractérisant *Staphylococcus aureus*. Il permet donc de différencier le Staphylocoque doré des Staphylocoques- coagulase négative.

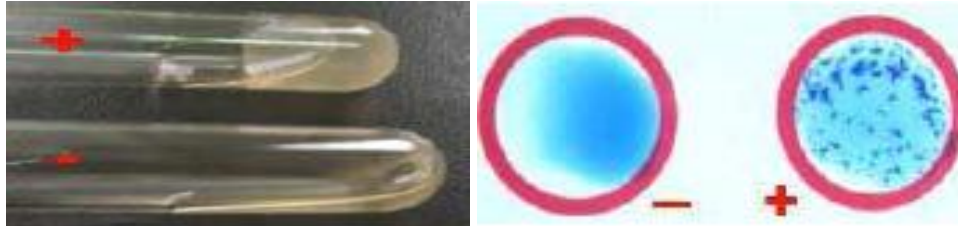
Le test de détection consiste à incuber pendant 4 heures à 37°C un mélange de plasma de lapin et de la souche à tester. L'apparition d'un caillot est observée en inclinant le tube à 90°.

En pratique, la détection de la coagulase est obtenue par un test d'agglutination.

Plusieurs tests d'agglutination détectant un ou plusieurs antigènes ou récepteurs de surface (récepteur pour le fibrinogène, protéine A, antigènes capsulaires) sont commercialisés.

Le test de la coagulase permet l'identification de 99% des souches de *Staphylococcus aureus* mais certaines souches ne produisent pas de coagulase. L'identification de l'espèce est dans ce cas réalisée par d'autres tests.

Il faut réaliser le test de coagulase sur les deux souches de *Staphylococcus aureus*.



Test de coagulase en tube et sur lame

La Coagulase (Staphylocoque)

Le plasma de lapin est coagulé en moins de 2 heures si le germe possède une coagulase (0,5 ml de plasma 0,5 ml de milieu de base pour recherche de la coagulase) incubé à 37° pendant 2 heures en notant les variations de viscosité de 30 mn en 30 mn).

II)- *ADNASE*

On ensemence un milieu contenant de l'ADN coulé en boîte de Pétri, par une strie. Après incubation à 37°C, on verse de l'HCl N sur la surface. L'ADN précipite sauf dans les zones où il a été hydrolysé (zone claire)

IV- *LA PHOSPHATASE*

L'hydrolyse des liaisons phosphate de l'ATP en particulier. L'orthonitrophényl-phosphate di sodique est hydrolysée par la bactérie qui possède une phosphatase. Il y a libération d'O. nitrophénol jaune.

V- *LA FIBRINOLYSINE*

La fibrine est du sang est liquéfiée par l'enzyme fibrinolysine bactérienne.

L'ACTION DE DIVERS FACTURES SUR LA CROISSANCE ET LA VIE DES BACTERIES

I- L'ANTIBIOGRAMME

Il permet de déterminer la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques in vitro. On peut réaliser cette détermination de deux manières :

En utilisant deux principales méthodes:

1)- Les méthodes de dilution : antibiogramme en milieu liquide

2)- Les méthodes de diffusion : antibiogramme en milieu solide

3)- Les méthodes de dilution en milieu liquide

Elle consiste à effectuer des dilutions successives d'antibiotique dans un milieu liquide approprié,ensemencé avec le germe à étudier et à noter à quelle concentration la croissance est totalement inhibée. On détermine ainsi la concentration bactériostatique.

Milieu.

| | |
|--------------------|--------|
| Peptone trypsique | 10g |
| Extrait de levures | 0,5 g |
| NaCl | 5g |
| Glucose | 10 g |
| Rouge de phénol | 0,02 g |
| Eau distillée | 1000ml |
| pH | 7,5 |

Ensemencement

On ensemence 10 ml de ce milieu avec une goutte de culture de 24 heures de la souche à étudier. Agiter avec précaution pour obtenir une suspension homogène. On utilise ce milieu ainsi ensemencé à raison de 0,8 ml par tube.

Antibiotique

Préparer une solution A, à 0,10 g pour 1000 ml (100 µg/ml) : solution A

Une solution de 1 au 1/16 : solution B (100/16 µg/ml).

Dans une série de 9 tubes à hémolyse stériles, on réalise des solutions à concentration croissante en antibiotique contenant le même nombre de germes.

| Tubes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 Temoin |
|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------|
| Eau distillée stérile (ml) | 0 | 0,4 | 0,6 | 0,7 | 0 | 0,4 | 0,6 | 0,7 | 0,8 |
| Solution A (ml) | 0,8 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Solution B (ml) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,8 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0 |
| Culture (ml) | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| Antibiotique en ug/ml | 50 | 25 | 12 | 6 | 3 | 1,5 | 0,8 | 0,4 | 0 |

Placer les- tubes à 37°C pendant 18 Heures

a)- Lecture :

On apprécie la culture du germe (donc l'inefficacité de l'antibiotique à la concentration correspondante) au demi-virage de l'indicateur au rose, ou au virage franc (jaune).

La souche est dite sensible à une concentration déterminée lorsque celle-ci inhibe la croissance : teinte rouge.

b)- Remarque :

Il faut que la bactérie soit glucose

4)- Les Méthodes de diffusion en milieu solide

Cette méthode, plus facile à réaliser que la précédente, est mieux adaptée aux techniques de laboratoire.

a) - Principe

Des disques imprégnés de l'antibiotique à tester, sont déposés sur la surface de la gélose ensemencée du germe dont on veut étudier la sensibilité.

L'antibiotique contenu dans le disque diffuse dans le milieu. La concentration diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne du disque.

En général, la quantité C d'antibiotique des disques est calculée de telle façon que la concentration correspondant au taux sanguin normal (TS), qu'il est possible d'atteindre dans l'organisme humain, soit répartie sur un cercle de 15 mm de diamètre (10 mm pour la polymyxine qui diffuse mal) (fig. 7.).

Il s'agira donc de mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque, imprégné d'un antibiotique déterminé, déposé à la surface du milieu de culture gélosé ensemencé.

b)- Milieu

| | |
|-------------------|---------|
| Peptone tryptique | 20 g |
| Extrait de levure | 3 g |
| NaCl | 5 g |
| Agar | 15 g |
| Eau distillée | 1000 ml |
| pH | 7,2 |

Le milieu, réparti en flacon de 25 ml, est régénéré au bain-marie bouillant. Laisser refroidir (50°C). Couler en boîte de Pétri stérilement. Laisser solidifier et sécher à l'étuve.

c)- Ensemencement

Il doit surtout être homogène sur la surface de la gélose.

- Diluer 1 goutte de culture de 24 heures dans 10 ml d'eau stérile.
- Diluer 1 ose de culture sur milieu solide dans 10 ml d'eau stérile.
- Déposer 1 goutte de la suspension sur la surface du milieu et on l'étale le plus régulièrement possible en nappe au moyen d'une pipette coudée.
- Les colonies apparaissant à la surface ne doivent pas être confluentes. Un développement trop dense entraîne une diminution de la zone d'inhibition.
- Déposer six ou sept disques à la surface du milieu au moyen d'une pince flambée entre chaque opération, en ouvrant la boîte de Pétri légèrement du côté du bec bunsen.

La boîte est incubée 18 heures à 37°C, couvercle en bas.

d) - Lecture

Elle est effectuée en fonction de l'existence ou non de zones d'inhibition. Cette lecture est essentiellement qualitative.

Trois réponses sont possibles.

- **Souche sensible** : diamètre de la zone d'inhibition égal ou supérieur à 15 mm (sauf pour la polymyxine et la colimycine dont le diamètre limite est de 10 mm) (disque 1-4).
- **Souche limite** : diamètre de le zone d'inhibition inférieur à 10 mm. (disque 6-2).

- **Souche résistante** : pas de zone d'inhibition (disques (3-5-7)).

E. On peut étudier par cette technique les effets de l'association d'antibiotiques. L'association d'antibiotiques (2 en général) peut produire une synergie des effets bactériostatiques ou bactéricides, ou l'addition d'effets des deux antibiotiques pris séparément, ou au contraire un antagonisme (les deux antibiotiques voient leurs effets annulés du fait de leur association).

Pour réaliser cette étude, on utilise des bandes de papier buvard, imprégnées d'antibiotiques dont on veut étudier les effets d'association, disposées perpendiculairement dans une boîte de Pétri ensemencée.

Les antibiotiques diffusent à partir de chaque bande dans la gélose. Dans les zones de contact de 2 bandes, les deux antibiotiques sont présents et la forme de la zone d'inhibition permet la lecture de l'effet de l'association

| | |
|-------------|--------------------|
| Association | 1-4 : indifférence |
| Association | 1-2 : addition |
| Association | 2-3 : synergie |
| Association | 3-4 : antagonisme |

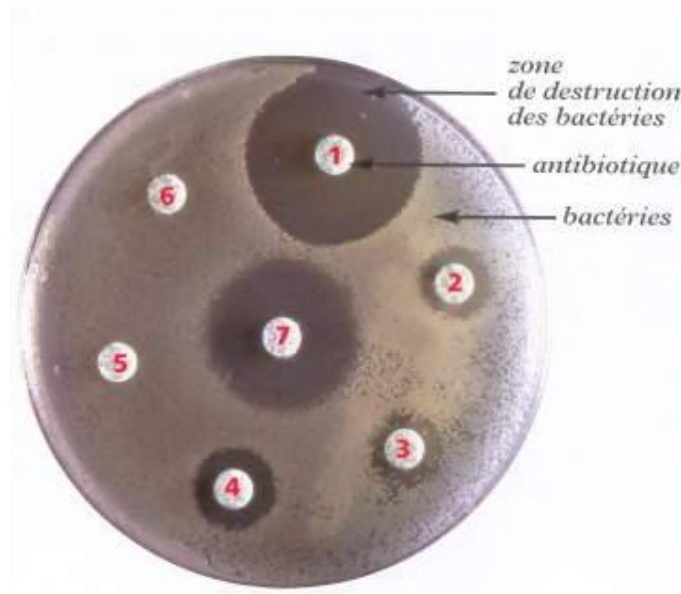
5) - Choix des disques pour antibiogramme

a) Pour un staphylocoque à Gram positif

| | |
|--------------------------|----------------|
| Pénicilline G | Erythromycine |
| Méthiciline (oxacilline) | Spiramycine |
| Céphalotine | Bristinamycine |
| Streptomycine | Kanamycine |
| Gentamycine | Rifamycine |
| Chloramphénicol | Novobiocine |
| Tétracycline | Fucidine |

b) Pour un bacille Gram négatif

| | |
|----------------------|-------------------|
| Ampicilline, | Tétracycline |
| Céphalotine, | Colimycine |
| Streptomycine, | Furadoïne |
| Kanamycine, | Nibiol |
| Gentamycine, | Furoxane |
| Chloramphénicol | Rufol (sulfamide) |
| Justamil (sulfamide) | |



Résultats de l'antibiogramme et présence de zones d'inhibition autour du disque d'antibiotique.

II- LA DESSICCATION.

Expérience :

- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur stérile un peu de culture bactérienne en bouillon nutritif. Déposer une goutte de cette culture dans deux tubes vides stériles.
- Laisser ces tubes à la température ambiante pendant 8 jours.
- Au bout de 8 jours, ajouter au 1^{er} tube 3 ml de bouillon nutritif stérile. Mettre à l'incubation 24 h. Noter la croissance bactérienne (trouble,).
- Au bout de 14 jours; ajouter au 2^{ème} tube 3 ml de bouillon nutritif stérile. Mettre à l'étuve pendant 24 h. Noter la croissance.

Conséquences de la déshydratation.

De quelle façon agit la dessiccation sur les bactéries
Propriétés des spores.

III- LA TEMPÉRATURE D'INCUBATION

Expérience : 1) Prélever à l'aide d'une pipette pasteur stérile un peu de culture bactérienne en bouillon, ensemencer 4 tubes de bouillon nutritif. Mettre ces tubes à l'incubation comme suit :

- 1^{er} tube à 4°C (réfrigérateur)
- 2^{ème} tube -18°C (congélateur)
- 3^{ème} tube à température ambiante
- 4^{ème} tube à 37°C (étuve)

2) Au bout de 24h noter la croissance bactérienne dans chaque tube ou bien mesurer la densité à 575 nm au spectrophotomètre.

Replacer à nouveau tous les tubes à leur température d'incubation.

3) Après 8 jours, noter la croissance.

A partir des tubes 1, 2, 3, ensemencer une gélose nutritive en boîte de pétri. Placer à l'incubation pendant 24h à 37°C.

4) Après 24h, noter la croissance.

Conclusion :

- Notion d'action bactériostatique des basses températures.
- De quelle façon agit la température sur les bactéries.
 - Notion de température optimale de croissance.
 - Intérêt et application possible de l'action de ces basses T "

La chaleur humide

Expérience:

- Préparation de la boîte de pétri contenant une gélose nutritive. Ensemencer par stries le quart désigné "témoin" avec une culture bactérienne.
- Placer la culture bactérienne au bain marie à 100°C pendant 1 min. Ensemencer ensuite le quart désignée "1 min".
- Replacer la culture à 100°C pendant 5 min supplémentaires. Ensemencer la partie désignée "5 min".
- Replacer la culture à 100°C pendant 10min. Ensemencer la partie désignée "10 min".
- Mettre à l'étuve la boîte de pétri et au bout de 24h faire la lecture : Noter la croissance bactérienne.

Conclusion :

- Expliquer les résultats.
- De quelle façon agit la chaleur humide sur les bactéries.
- Propriétés des spores.
- Intérêt et application de ces connaissances.

IV- LES AGENTS CHIMIQUES

Expérience :

- Préparation de la boîte de pétri contenant de la gélose nutritive
- Ajouter 5ml de l'agent chimique dans des tubes stériles. Alcool 20°, 70°, Phénol 2% , 5%,,Javel 8%..
- Dans le tube contenant l'agent chimique, ajouter 0,5 ml de la culture en bouillon. Agiter en tournant le tube entre les doigts Noter l'heure.
- Après 30 secondes, faire un ensemencement sur la boîte de pétri faire de même après 2 min, 8 min, 16 min. mettre les boîtes à l'étuve pendant 24h. Après 24h noter la croissance.

V- ACTION DES MÉTAUX LOURDS

Expérience :

- Nettoyer une pièce de métal, 5 DA, 10 DA, 20 DA,
- Ensemencer une gélose nutritive en boîte de pétri sur toute la surface en utilisant l'étalement,
- Placer la pièce de métal sur la gélose ensemencée,
- Appuyer pour qu'elle y adhère. Retourner les boîtes,
- Placer à l'étuve,
- Après 24h noter les résultats. Expliquer.

10 - DETERMINATION DU SEROTYPE D'UNE BACTERIE

I. - Généralités sur les antigènes bactériens

Un antigène peut être défini comme toute substance qui, pénétrant dans l'organisme provoque l'apparition d'un anticorps, globuline réagissant spécifiquement avec l'antigène qui lui a donné naissance.

On peut distinguer deux groupes d'antigènes bactériens :

- les antigènes libérés ou excrétés par la bactérie (toxines, enzymes extracellulaires)
- les antigènes faisant partie du corps bactérien.

Dans la détermination du sérotype d'une bactérie on ne cherche en général qu'à mettre en évidence les antigènes faisant partie du corps bactérien. Les antigènes sont de 3 types principaux :

VI - LES ANTIGÈNES FLAGELLAIRES (AG H)

- **Propriétés** : nature protéique ; thermolabiles, détruits par la chaleur à 100 °C, dénaturés par l'alcool. Les antigènes flagellaires sont spécifiques de chaque type bactérien, d'où une distinction possible des nombreux types antigéniques.
- **L'agglutination** : Les antigènes flagellaires **H** donnent naissance dans l'organisme à des anticorps anti **H** qui ont la propriété d'agglutiner les bactéries mobiles qui leur ont donné naissance. L'agglutination **H** est rapide, à gros flocons, facilement dissociable par agitation.

Au microscope on observe l'immobilisation ciliaire due à la fixation sur les flagelles de l'anticorps correspondant ; les agglutinats sont constitués par des amas de bactéries immobiles reliés les unes aux autres par leurs flagelles sans contact des corps bactériens entre eux.

1) - Les antigènes capsulaires (Pneumococcus, Klebsiella)

Il s'agit d'un polysaccharide (pneumocoque) d'un polypeptide (*Bacteridium*). Sont précipités spécifiquement par les immun sérums correspondant

2) - Les antigènes somatiques (AgO)

Sont situés au niveau de la paroi. Constituées par un complexe glucido-lipido-polypeptidique. (C'est d'après les caractères antigéniques **O** et **H** que KauffmannWhite ont établi la classification sérologique des salmonelles = 1000 sérotypes).

- 1 Propriétés thermostables (résistent 2 heures à 100 °C), résistent à l'alcool, à l'acide phénique.
- Constitues par : un polysaccharide : haptène, responsable de la spécificité.
- Une protéine : permet la formation d'anticorps.
- Un phospholipide toxique.
- 2 Agglutination : Les antigènes provoquent dans l'organisme la formation anti-O agglutinant spécifiquement les bactéries. L'agglutination est lente à se produire, granulaire, difficilement dissociable par agitation (amas de bactéries accolées les unes aux autres par leurs extrémités). Les AgO n'existent que chez les souches S (Smooth). Chez les souches R (Rough) les antigènes R ne sont pas spécifiques.

3) - Antigènes de surface ou d'enveloppe

a)- Antigène Vi

Chez *Salmonella typhi* et *Salmonella paratyphi C*, l'antigène Vi entoure complètement la bactérie et masque l'AgO (inagglutinabilité).

b)- Antigènes K des Escherichia coli

Il masque l'AgO. D'après la thermolabilité divisée en 3 groupes L, A et B.

- Antigènes L, thermolabiles : rendent les colonies bombées.
- Antigènes A, thermostables : il faut un chauffage de 100°C, pendant 2 heures pour démasquer l'agglutinabilité O.
- Antigènes B : thermolabiles.

Sont intimement liés avec les AgO. Comme on ne peut les séparer on étudie l'association O-B.

4) - Identification d'un Escherichia coli par sero agglutination

Il existe 172 types sérologiques d'*E. coli*.

AgH 49

AgO 146

AgK : Ag L 32

Ag A 26

Ag 30

On ne recherche en général dans ce cas que les antigènes O et B (O+ B sont indissociables).

En France, au point de vue pathologique, la recherche ne porte que sur les sérotypes OB suivants :

- O.111 B.4 O.55 B. 5 O.26 B. 6 O.86 B. 7
- O.119 B.14 O.127 B. 8 O.125 B. 15 O.126 B.16
- O.128 B.12

Pour effectuer les tests de séro-agglutination sur lame, on émulsionne à l'anse de platine plusieurs colonies prélevées sur gélose nutritive ordinaire, ou E.M.B., dans une goutte de chacun des antisérums spécifiques jusqu'à l'apparition d'une lactescence.

Noter pour quel sérum on observe une agglutination macroscopique et un éclaircissement.

Cette méthode peut au maximum demander 9 déterminations.

Pour réduire le nombre d'opérations on utilise des immun sérums contenant un mélange de 3 anticorps (ce qui ne nécessite au maximum que 3 typages). Quand la réaction est positive avec le mélange, il ne reste plus qu'à rechercher l'agglutination avec les anticorps monovalents composant le mélange.

VIROLOGIE - RICKETTSIOLOGIE - SÉROLOGIE

I- COLORATION DES VIRUS

Coloration de Vago-Amargier 1963

Colorants

Hématéine

- Hématéine 1 g
 - Alcool 95° 100 ml
 - B). Eau chaude 900 ml
 - Alun de K 50 g
- Mélanger A et B, filtrer avant l'emploi et ajouter 1 ml d'acide acétique pour 100 ml.

Eau aniliné vieilli :

- A. 10 ml d'aniline dans 200 ml d'eau distillée.
 - Fuchsine acide poudre à saturation
 - B. Bleu de méthyle 1 g
 - Eau distillée 100 ml
- Ajouter 3 ml de la solution B à 100 ml de la solution A

Jaune de métanile à 1% dans l'alcool 40° :

- Jaune de métanile à 1% dans l'alcool 40°.
 - Marche à suivre
 - Déparaffinage et hydratation des coupes
 - Coloration à l'hémalum (a) pendant 3 à 10'
 - Lavage à l'eau courante : 10'
 - Coloration à 60°C avec le mélange aniline de bleu de méthyle et de fuchsine acide (b) pendant 10'.
 - Rinçage à l'alcool 40°
 - Différenciation et coloration dans la solution de jaune de métanile - pendant 5 à 15'.
 - Déshydratation et montage.
 - Résultats
- Les corps d'inclusion de virus se colorant en rouge
Les noyaux des cellules sont bruns ou marrons.

II- COLORATION DES RICKETTSIES SUR FROTTIS

1) Coloration de Macchiavello (1937)

- 1 – solution alcoolique saturée de fuchsine basique.
 - 2- solution tampon (pH 7,4 - 7,6)
 - NaH₂PO₄ à 1% 12 ml
 - Na₂HPO₄ à 2,5% 88 ml
 - 3- Acide citrique à 0,5% dans l'eau distillée.
 - 4- Bleu de méthylène phéniqué dilué au 1/4
- Mélange - colorant : Etendre 1 ml de la solution n° 1 avec 250 ml de la solution tampon 2 et filtrer au papier. Ce colorant est instable et doit être préparé au moment de l'emploi.

Marche à suivre

- Coloration de la préparation non fixée pendant 3' par le mélange A.
- Différencier par l'acide citrique.
- Colorer le fond par le bleu de méthylène phéniqué.
- Rincer – sécher

Résultats

Les rickettsies se colorent en rouge vif.

2) Coloration de May-Grunwald et Giemsa

- Colorants :
 - Colorant de May-Grunwald R.A.L. commercial.
 - Solution de Giemsa
- 1 ml de Giemsa R (rapide) R.A.L. commercial
- 20 ml d'eau distillée tamponnée à pH 7.
- Tampon phosphate pH7
 - solution aqueuse à 33,5 g/1000 ml de H_2KPO_4 10 ml
 - solution aqueuse à 75 g/1000 ml de $Na_2HPO_4, 12H_2O$ 20 ml
- eau distillée 1000 ml

Marche à suivre

- La lame, séchée, non fixée, est placée dans une boîte de Laveran. Verser X gouttes de colorant de May-Grunwald; couvrir la lame pour éviter l'évaporation du solvant (alcool). Laisser agir 3 minutes.
- Sans enlever le colorant, verser X gouttes de tampon pH 7, laisser agir 3 minutes.
- Eliminer l'excès de colorant en rinçant à l'eau distillée.
- Placer la lame, face en dessous dans une boîte de Pétri contenant la solution de Giemsa, Colorer pendant 13 minutes.
- Rincer à l'eau distillée et sécher.

Résultats

Les rickettsies se colorent en rose.

LA CONSERVATION DES ALIMENTS

I- LA DÉGRADATION DES ALIMENTS.

Laissés à l'air libre, la majorité des aliments se dégradent (brunissement, modification de l'odeur et de la saveur, ...).

Ceci est dû à des réactions d'oxydation des molécules (glucides, lipides et autres ...). Une oxydation est une réaction d'altération due au dioxygène (essentiellement celui de l'air). Cette « oxydation » est accélérée par la température et la lumière.

La prévention de l'oxydation des aliments s'organise dans deux directions :

- Protéger les aliments de l'air, de la lumière et les conserver à basse température.
- Addition dans l'aliment d'une espèce chimique bloquant le processus d'oxydation : cette espèce est appelée antioxygène ou antioxydant

II LES ANTIOXYDANTS

Les anti-oxygènes sont des substances qui, naturellement présentes dans les aliments ou incorporées à ceux-ci lors de leur fabrication, ont pour fonction de retarder leur détérioration par le dioxygène de l'air.

Il existe deux catégories d'anti oxygènes, les anti oxygènes naturels (vitamine C et vitamine E) et les anti-oxygènes de synthèse (dont 13 sont autorisés en France), que l'on peut repérer dans la composition d'un aliment par un code allant de E300 à E321.

Il existe également des substances chimiques qui n'ont pas qu'une action anti-oxydante et d'autres qui peuvent renforcer l'action d'un antioxydant.

III LES RADICAUX LIBRES

Activité documentaire sur le vieillissement.

1) Dosage de l'acide citrique contenu dans un jus de citron.

Le jus de citron contient naturellement un anti-oxygène : l'acide ascorbique ou vitamine C de code E300. Il contient également une substance capable de renforcer l'action anti-oxydante de la vitamine C : l'acide citrique de code E330.

2) Principe du dosage.

On se propose de réaliser deux transformations parallèles :

- L'une sur une solution S dont on connaît la concentration.
- L'autre sur une solution dont on recherche la concentration.

On dispose pour cela de trois solutions :

- Une solution S de concentration connue en acide citrique 12 g/L.
- Une solution S' de concentration inconnue : le jus de citron dilué 10 fois.
- Une solution de soude de concentration 0,1 mol/L.

Pour une même prise d'essai de solution de soude, on détermine à la burette, le volume V1 de solution de concentration connue qui permet d'obtenir le changement de couleur de l'indicateur coloré et le

Volume V1 de jus de citron qui conduit au même résultat.

3) Protocole expérimental.

- Dans un bécher étiqueté 1, on introduit :
 - À l'aide d'une pipette jaugée, 20 mL de solution d'hydroxyde de sodium (soude).
 - Quelques gouttes de phénolphtaléine.
- Préparation de la burette :
- Rincer la burette avec la solution S de concentration connue.

- Introduire dans la burette la solution S, ajuster le zéro.
- Placer l'erenmeyer sur l'agitateur magnétique et installer le tout sous la burette.
- Introduire goutte à goutte la solution S dans l'erenmeyer en agitant doucement. Arrêter au changement de couleur.
- Noter le volume V1.
V1 = mL
- ✓ Rincer la burette à l'eau distillée.
- ✓ Recommencer l'expérience en plaçant cette fois ci dans la burette la solution S' (jus de citron dont on veut trouver la concentration).
- ✓ Introduire goutte à goutte la solution S dans l'erenmeyer en agitant doucement. Arrêter au changement de couleur.
- ✓ Noter le volume V2.
V2 = mL
- Exploitation des résultats
- ✓ Rappeler les valeurs des volumes de solution d'hydroxyde de sodium versé dans les deux béchers.
- ✓ Que peut-on dire alors des masses d'acide citrique contenues dans les volumes V1 et V2 ?
- ✓ Rappeler la masse d'acide citrique contenue dans 1L de solution S.
- ✓ Quelle est la masse d'acide citrique contenue dans 1 mL de solution S ?
- ✓ Quelle est la masse d'acide citrique contenue dans le volume V1 de solution S ?
- ✓ Quelle est la masse d'acide citrique contenue dans le volume V2 de jus de citron « dilué » ?
- ✓ En déduire la masse d'acide citrique contenue dans 1 L de jus de citron dilué.
- ✓ Le jus de citron a été dilué 10 fois, en déduire la concentration massique en acide citrique du jus de citron.

$$CM = \dots\dots\dots G.L-1$$

13 - MANIPULATIONS ELEMENTAIRES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

ETUDE DU FONCTIONNEMENT DES ENZYMES DE RESTRICTION

But : Visualisation et compréhension du fonctionnement des enzymes de restriction, outils de base de la biologie moléculaire utilisés en biotechnologie. Ces dernières réalisent des coupures de l'ADN au niveau de séquences qui leur sont spécifiques.

4) Principes :

- ✓ Réalisation d'une extraction / purification d'ADN.
- ✓ Choix de l'ADN : Plasmide bactérien ; c'est une petite molécule d'ADN circulaire présente dans le cytosol des bactéries. Le plasmide choisi ici est le « pCR 2.1 TOPO » commercialisé par la société Invitrogen, inséré dans une bactérie *Escherichia coli* cultivée en milieu liquide.
- ✓ Digestion de cet ADN plasmidique par des enzymes de restriction *Dde I* et *Bgl II*, utilisées ensemble ou séparément.
- ✓ Visualisation des résultats des différentes digestions par électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN : cette technique permet la séparation de fragments d'ADN par migration dans un champ électrique en fonction de leur taille. La détermination de celle-ci se fera par comparaison avec la migration de marqueurs de taille calibrés sur une piste voisine. Un témoin sans traitement enzymatique sera mis à migrer sur une dernière piste.

Travail à réaliser :

| N | Matériel / documents | Consignes | Points clefs |
|---|---|--|---|
| 1 | <p>Fiche technique : extraction et purification de l'ADN plasmidique de bactérie</p> <p>Fiche technique : action des enzymes de restriction</p> <p>Fiche technique : réalisation d'une électrophorèse d'ADN</p> <p>Accès aux fiches techniques</p> <p>Suspension bactérienne ayant incorporé le plasmide</p> <p>Enzymes de restriction <i>DdeI</i> et <i>Bgl II</i> et leurs tampons respectifs</p> <p>Matériel mentionné dans les protocoles</p> | <p>Mettre en oeuvre les protocoles fournis</p> <p>Garder une trace de l'électrophorèse (photo)</p> | <p>Respect strict d'un protocole</p> <p>Utilisation rationnelle du matériel</p> <p>Respect des consignes de sécurité</p> |
| 2 | <p><u>Carte générale du plasmide utilisé</u></p> <p><u>Localisation des sites de restriction</u></p> <p><u>Résultat de l'électrophorèse des marqueurs de taille</u></p> <p><u>Quelques caractéristiques des enzymes de restriction</u></p> <p>Milieux de culture solide en boîte de pétri avec ou sans ampicilline</p> <p>Suspension bactérienne mélange de bactéries avant ou après la mise en contact avec le plasmide</p> | <p>Exploitation :</p> <p>A l'aide des documents et/ou de manipulations complémentaires, justifier :</p> <p>le choix d'un plasmide comme séquence d'ADN utilisée</p> <p>la présence de l'ampicilline (antibiotique) dans le milieu de culture de la bactérie</p> <p>la lyse des cellules</p> <p>l'utilisation d'un tampon de restriction, et la contrainte qui en a découlé pour le choix des enzymes de restriction ; incubation à 37°C</p> <p>l'ajout d'un tampon de charge aux échantillons d'ADN</p> <p>Interpréter les résultats obtenus, positionner les sites de coupure</p> <p>Discuter ces résultats en les comparant avec les prévisions théoriques</p> | <p>Compréhension des différentes étapes et des détails d'un protocole</p> <p>Utilisation de connaissances préalables</p> <p>Conception de protocoles</p> <p>Manipulation / traitement de résultats expérimentaux bruts</p> <p>Mise en relation de données d'origines diverses</p> |

5) L'épreuve au bleu de méthylène sur le lait,

Un outil pour vérifier sa qualité microbiologique.

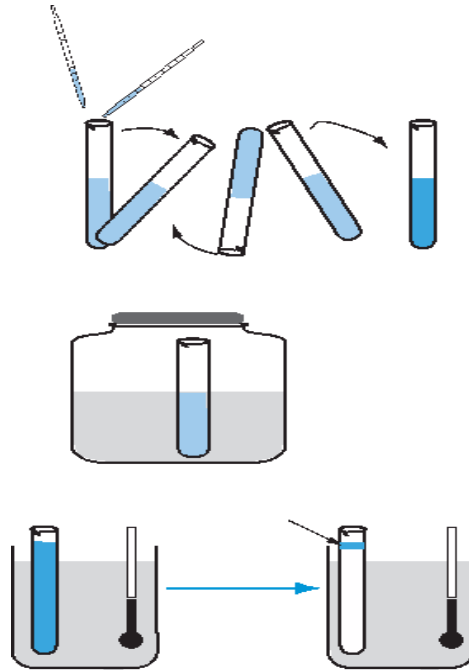
Ce test donne **une idée** de la quantité de germes présents dans le lait, de leur activité et de leur vitesse de multiplication. Il permet d'identifier des différences de niveau de contamination du lait et de mettre en évidence des problèmes éventuels d'hygiène notamment du matériel et de la traite.

Les germes **présents dans le lait et actifs à 37 °C** (température du bain-marie pendant le test) consomment l'oxygène dissout dans le lait. Le bleu de méthylène se décolore quand le milieu s'appauvrit en oxygène.

Le temps de décoloration du bleu de méthylène donne ainsi une mesure du niveau de contamination du lait:

Décoloration rapide = beaucoup de germes dans le lait à activité élevée

La méthode



Matériel

- bleu de méthylène concentré à 5 mg/100 ml
- bain-marie à 37 °C (thermos à grande ouverture et résistance d'aquarium **ou** chauffe biberon)
- 1 tube à essai de 40ml
- pipettes stériles de 1 ml et 10 ml.

Méthode

- Se laver soigneusement les mains.
- Stériliser un tube dans l'eau bouillante (5 minutes) (cf. schéma 1).
- Avant ensemencement**, agiter le lait et en prélever 10 ml.
- Introduire dans le tube 10 ml de lait et 1 ml de bleu de méthylène. Bien mélanger par 2 retournements successifs (attention à mélanger par des retournements et non par agitation) (cf. schéma 2).
- Incuber à 37 °C dans un bain-marie, à parois et couvercle opaques de préférence (cf. schéma 3).
- Retourner les tubes **toutes les heures. 7.** Faire une lecture au bout de 2 heures, puis éventuellement au bout de 4 heures.
- Observer s'il y a décoloration, sans tenir compte de l'anneau bleu qui peut persister en surface, par suite de la réoxydation du colorant au contact de l'air.

NB: Ce test peut être associé **dans le même tube** au test de la lactofermentation, il permet d'en confirmer le résultat.

Interpréter les résultats

- ✓ **Comparez** le temps de décoloration du bleu à la **moyenne établie sur votre exploitation**, vous pouvez ainsi déceler un problème de contamination.
- ✓ Quelques repères: Contamination

- ✓ Lait très contaminé =moins de 2 heure
- ✓ Lait contaminé =entre 2 et 4 heures
- ✓ Lait faiblement contaminé =plus de 4 heures

Comment intervenir?

Une décoloration trop rapide du bleu **par rapport à un temps de réduction normal moyen établi sur l'exploitation** doit déclencher un contrôle de l'hygiène notamment du matériel et de la traite.

Limites-Avantages-Inconvénients

Ce test est intéressant surtout dans une utilisation quotidienne pour une interprétation par comparaison d'un jour à l'autre. Il permet ainsi de tenir compte des variations journalières de la contamination du lait. Il est peu coûteux. Il permet d'identifier rapidement des variations de qualité bactériologique du lait. Ce test ne permet pas de connaître les familles de bactéries présentes dans le lait et met en évidence essentiellement la présence de germes mésophiles qui consomment l'oxygène du lait.

14- CONTRÔLE DES PRATIQUES HYGIÉNIQUES AU LABORATOIRE

INTRODUCTION

Toutes les analyses microbiologiques décrites ci-après sont réalisées au laboratoire de LedYef. Ceci permis de suivre plus facilement la qualité microbiologique des produits et des opérations à l'entreprise en cours de fabrication.

Contrôle de la qualité microbiologique de l'eau

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Un volume important d'eau est aseptiquement filtré sur une membrane qui retient les germes contenus dans l'eau. La membrane est ensuite aseptiquement transférée sur une boîte de Petri contenant un milieu nutritif sur lequel cultivent les germes retenus sur la membrane. Après incubation, ces germes sont comptés pour évaluer la qualité microbiologique de l'eau.

PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Laisser couler l'eau pendant 2 à 3 minutes avant de prélever un échantillon de 5 litres qui seront placés aseptiquement dans un conteneur stérile. L'analyse doit se faire le plus rapidement possible. Autrement, il faut garder l'échantillon dans un réfrigérateur pendant un délai qui ne doit pas dépasser 4 heures. Si l'eau est chlorée, il faut la mélanger avec une solution de thiosulfate de sodium stérile à raison de 1 ml par litre.

ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE

4 x 500 à 4 x 1000 ml d'eau sont filtrés séparément et aseptiquement sous vide à travers une membrane filtrante (Milipore) de 0,45 µm de porosité. Chaque membrane est ensuite placée dans une boîte de Petri dans laquelle on a préalablement coulé le milieu de culture adéquat (Eosine méthylène blue pour les coliformes, milieu de Slanetz pour les streptocoques, milieu " Reinforced *Clostridium* medium RCA " pour les *Clostridium* sulfito-réducteurs). Les boîtes de Petri sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37°C pour les coliformes totaux et les streptocoques fécaux et à 44,5°C pour les coliformes fécaux et les *Clostridium* sulfitoréducteurs.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les critères microbiologiques, établis par la CEE (1980) et par l'Organisation mondiale pour la santé (OMS, 1984) sont présentés ci-après (tableau 4).

Tableau 4. Critères microbiologiques de l'eau potable

| | Critères de la CEE (1980) | Critères de l'OMS (1984) |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Coliformes totaux | Absence dans 100 ml | |
| Coliformes fécaux | Absence dans 100 ml | Absence dans 100 ml. |
| Streptocoques fécaux | Absence dans 100 ml | Absence dans 100 ml |
| <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs | Absence dans 20 ml | |

*: Pour les résultats d'analyse sur une période longue (un an par exemple), L'OMS admet la présence de coliformes totaux, à raison de 3/ 100 ml, dans de rares échantillons, mais jamais dans deux ou plusieurs échantillons consécutifs.

LE CONTRÔLE DE L'EFFICACITÉ DU NETTOYAGE ET DÉSINFECTION

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Après nettoyage et désinfection, la charge microbienne des surfaces est estimée en balayant la surface à analyser à l'aide d'un écouvillon stérile qui est ensuite transféré dans de l'eau distillée stérile pour dilution. Les germes sont dispersés à l'aide d'un mixeur Vortex et la numération est réalisée sur milieu de culture gélosé.

MÉTHODE

Les zones critiques de l'entreprise sont identifiées. Ce sont les zones où il y a une concentration d'opérations préparatoires et qui nécessitent un nettoyage et désinfection minutieux. Une surface de 100 à 400 cm² est délimitée. Elle est balayée à l'aide d'un écouvillon stérile qui est transféré dans 250 ml d'eau peptonée stérile (0,1% p/v). Les germes sont dispersés à l'aide d'un mixeur Vortex avant de préparer des dilutions décimales successives dans l'eau peptonée (0,1% p/v). La numération est réalisée en ensemençant, à partir des dilutions, la gélose " Plate count agar PCA" pour la flore totale. Les boîtes de Petri de PCA sont ensemençées en profondeur et incubées à 35°C pendant 72 heures.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'efficacité du nettoyage et de la désinfection est évaluée selon le tableau 5 suivant:
Tableau 5. Critères microbiologiques pour évaluer l'efficacité du nettoyage et de la désinfection

| Charge microbienne UFC/ 50 cm ² | Classement |
|--|--------------|
| > 300 | Inacceptable |
| 100 - 300 | acceptable |
| 10 - 100 | satisfaisant |

* UFC: Unités formant des colonies

Il faut noter que seule une certaine proportion (environ 40%) de la microflore présente sur la surface analysée est prélevée. L'exploitation des résultats se fait surtout en comparant deux surfaces différentes et en étudiant l'évolution des résultats dans le temps pour détecter le développement des "germes de l'atelier". Auquel cas, il faut changer de désinfectant et de programme de nettoyage et désinfection, du moins temporairement jusqu'à la disparition de ces germes.

LE CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE DE L'HYGIÈNE DU PERSONNEL

PRINCIPE DE LA METHODE

L'hygiène corporelle observée par les employés est contrôlée en réalisant des empreintes digitales ou de la peau, ou un écouvillonnage, sur un milieu de culture gélosé préalablement coulé en boîtes de Petri. Ces boîtes sont ensuite incubées sous des conditions dépendant des germes recherchés.

METHODE

Des membres du personnel sont choisis au hasard et soumis à un écouvillonnage sur les mains et les avant-bras. Chaque écouvillon est transféré dans 250 ml d'eau peptonée stérile (0,1% p/v). Les germes sont dispersés à l'aide d'un mixeur Vortex avant de préparer des dilutions décimales successives dans l'eau peptonée (0,1% p/v). La numération est réalisée en ensemençant, à partir des dilutions, la gélose "Eosine methylene blue EMB" pour les coliformes

ou le milieu de Baird Parker pour la numération de *Staphylococcus aureus*. Les boîtes de Petri contenant EMB sont incubées à 37°C pendant 24 heures pour les coliformes totaux ou à 44,5°C pour les coliformes fécaux, alors que les boîtes contenant Baird Parker sont incubées à 37°C pendant 48 heures.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Si le nettoyage et la désinfection des mains sont faits convenablement, il ne doit pas y avoir de coliformes sur la peau des mains et des avant-bras.

Par contre, la présence des staphylocoques sur la peau humaine est un phénomène naturel. Ce sont des bactéries ubiquistes qui se rencontrent chez l'homme et chez de nombreuses espèces animales, sur la peau et la muqueuse du rhino-pharynx. On estime que 30 à 60% des sujets sont des porteurs de *S. aureus*. Les résultats des analyses peuvent être utilisés pour orienter les personnes porteuses de *S. aureus* vers des activités où ils n'effectueront pas de manipulations directes des produits.

LE DOSAGE DU CHLORE ACTIF DANS L'EAU ET LES SOLUTIONS DE DÉSINFECTION

PRINCIPE

Le chlore actif libre réagit instantanément avec la DPD pour donner une coloration rouge stable.

MÉTHODE

Placer la cuve moulée contenant 10 ml d'échantillon dans le compartiment gauche du comparateur Lovibond. Rincer l'autre cuve avec l'échantillon et y placer quelques gouttes du même échantillon. Y mettre une tablette DPD et laisser agir en agitant. Compléter le volume de la cuve de 2 à 10 ml avec l'échantillon et la placer dans le compartiment de droite du comparateur Lovibond. Tenir le comparateur en position verticale et placer le disque d'essai à son centre en s'assurant que l'échelle de lecture fait face à l'utilisateur. Tenir le comparateur dirigé vers une source de lumière naturelle ou artificielle puis faire tourner le disque d'essai jusqu'à obtenir la coïncidence de la couleur de l'échantillon avec celle du disque. Faire la lecture de la teneur en chlore actif.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'eau traitée doit contenir une teneur en chlore résiduel compris entre 1 et 2 ppm. L'eau potable de la ville doit contenir 0,3 à 0,5 ppm de chlore actif au moins. Pour les solutions de désinfection, se rapporter au tableau.

Annexe 3-2. Evaluation sensorielle du lait cru

Une première estimation de la qualité du lait cru est faite au moment de sa livraison à LedYeF afin d'y déceler toute anomalie perceptible par les sens et qui pourrait affecter la qualité des produits finis. Elle consiste à vérifier:

La couleur du lait qui doit être blanche caractéristique

- Son odeur et sa flaveur qui ne doivent pas être fruitées, rances, putrides ou fortement acides
- Son aspect qui doit être liquide sans présence de grumeaux ou de coagulum
- L'absence de corps étrangers (poils, cheveux, poussière,...)

LA DÉTERMINATION DE L'ACIDITÉ DORNIC

1-ECHANTILLONNAGE

Avant de prélever un échantillon de lait, agiter le bidon pendant 1 à 2 minutes pour bien homogénéiser le lait et disperser la matière grasse qui a tendance à s'accumuler en surface au repos.

Ensuite, prélever un échantillon de lait à l'aide d'une louche propre et le transvaser rapidement dans un flacon propre. Identifier l'échantillon et procéder à l'analyse immédiatement. Autrement, placer l'échantillon au froid pour ralentir ou arrêter l'activité enzymatique et microbienne.

2- PRINCIPE

L'activité des bactéries lactiques peut être mesurée indirectement par l'estimation de l'acide lactique qui s'est accumulée dans les produits laitiers suite à cette activité. Cette mesure se fait par un dosage acide-base dans le lait ou le sérum (petit lait).

3- MATÉRIEL ET RÉACTIFS

- Un acidimètre Dornic comprenant un flacon contenant la soude Dornic (N/9) dans lequel plonge une colonne graduée
- Une pipette ou une seringue graduée de 10 ml
- Un compte-gouttes
- Un béccher, un verre ou un pot de yaourt propre
- Soude Dornic (N/9)
- Indicateur coloré: phénolphtaléine

4- MÉTHODE DE DÉTERMINATION

- ✓ Verser dans un béccher, un verre ou un pot de yaourt propre 10 ml de lait ou de sérum mesurés avec précision à la pipette
- ✓ Ajouter 3 gouttes de phénolphtaléine
- ✓ Remplir, de soude Dornic (N/9), la colonne graduée de l'acidimètre
- ✓ Verser goutte à goutte la soude en agitant constamment le verre jusqu'à apparition d'une couleur rose pâle persistante

Lire la graduation sur la colonne graduée de l'acidimètre. Celle-ci représente l'acidité Dornic.

Une acidité de 14 à 18° Dornic, pH = 6,5 à 6,7 caractérisent un lait très frais

- 16 à 18° Dornic, pH = 6,4 à 6,5 caractérisent un lait acceptable
- 25 à 27 ° Dornic , pH = 6,0 à 6,2 caractérisent un lait à odeur acide détectable
- 26 à 30 ° Dornic , pH = 5,6 à 6,0 caractérisent un lait à flaveur acide détectable
- 50 à 60 ° Dornic , pH = 4,4 à 4,8 coagulation de la caséine

LE TEST DE LA CMT POUR LA DÉTECTION DE LAITS MAMMITEUX

INTRODUCTION

Les vaches atteintes de mammites donnent un lait dont la charge en micro-organismes dépasse les taux souhaités. Ces microorganismes provoquent souvent des modifications indésirables de la composition du lait et diminuent l'aptitude fromagère du lait. Ceci se manifeste par des difficultés d'acidification, de coagulation et d'égouttage, avec à la fin des défauts de texture et de goût.

De plus, certains germes comme *S. aureus* et *Listeria* peuvent causer des mammites, mais également se retrouver dans les produits finis et causer des toxi-infections alimentaires chez les consommateurs.

C'est pourquoi LeDyE juge important de pouvoir détecter le lait mammitique en cas de doute ou lors de l'approvisionnement à partir de nouveaux fournisseurs.

PRINCIPE

Le "California mastitis test" ou CMT est un test rapide et efficace qui mesure indirectement le taux de leucocytes dans le lait. Ce taux de leucocytes traduit le niveau d'infection des mamelles et se manifeste par la formation d'un gel lorsque le lait mammitique est mis en présence du réactif CMT; le gel étant le résultat de l'agglutination des cellules du lait par le réactif CMT. Plus il y aura de cellules, plus le gel sera épais.

De plus, on peut déterminer le pH du lait à l'aide d'un indicateur coloré (pourpre de bromocrésol). Un lait provenant de vache mammitique a un pH voisin de 7 et sa couleur est alors violette.

ECHANTILLONNAGE

Avant de prélever un échantillon de lait, agiter le bidon pendant 1 à 2 minutes pour bien homogénéiser le lait et disperser la matière grasse qui a tendance à s'accumuler en surface au repos.

Ensuite, prélever un échantillon de lait à l'aide d'une louche propre et le transvaser rapidement dans un flacon propre. Identifier l'échantillon et procéder à l'analyse immédiatement. Autrement, placer l'échantillon au froid pour ralentir ou arrêter l'activité enzymatique et microbienne.

MATÉRIEL ET RÉACTIFS

- Un petit plateau spécial ou un verre
- Un flacon de réactif Leucotest ou Maxilait (préparations commerciales)

5- DÉTERMINATION

Placer dans le plateau quelques gouttes de lait et y ajouter la même quantité de réactif. Donner un mouvement circulaire au plateau ou au verre pour bien mélanger le lait et le réactif
Observer l'aspect du mélange

Le test peut se faire au moment de la traite en rejetant les premiers jets de lait de chaque trayon avant de recueillir quelques jets de lait dans le lait et procéder comme décrit cidessus.

6- LECTURE

Les considérations d'interprétations présentées ci-après sont valables pour le lait de vache

| Aspect | Notation | Lait individuel* | Lait de mélange de troupeau |
|---|----------|---|---|
| Aucune réaction Consistance liquide et couleur grise | 0 (0) | Lait normal | Entre 0 et 18% de vaches positives à des degrés divers dans le troupeau |
| Léger gel en flocons Disparaissant après 10 Secondes (couleur gris violacée) | 1 (+) | Mammite latente Mammite subclinique traite irritante | Environ 30% des vaches positives |
| Léger gel persistant sous forme de filament grumeleux (couleur gris violet) | 2 (+) | Mammite subclinique Traite irritante | Environ 40% des vaches positives |
| Gel épais adhérent en amas Visqueux au fond de la coupelle lorsqu'on imprime le mouvement de rotation au plateau | 3 (++) | Mammite bien établie | Environ 60% des vaches positives |
| Gel de la consistance du blanc d'œuf (couleur violet foncé) | 4 (+++) | Mammite bien établie | Environ 80% des vaches positives |

* La réaction de gélification est liée au nombre de cellules dans le lait, qui est lui-même lié au niveau d'infection de la mamelle.

Pour le lait de vache, ce test permet de détecter les mammites latentes qui se caractérisent par un fort taux leucocytaire.

LA DÉTECTION DES INHIBITEURS ET DES DÉFAUTS POTENTIELS DE FERMENTATION

INTRODUCTION

Lors de la fermentation des produits laitiers, plusieurs problèmes peuvent se manifester à cause de la présence dans le lait d'inhibiteurs de la fermentation (antibiotiques par exemple) ou de germes indésirables capables de proliférer plus rapidement que la flore lactique du lait.

La présence d'inhibiteurs peut être vérifiée grâce au test au yaourt alors que les défauts de fermentation sont généralement détectés par lactofermentation

TEST AU YAOURT

Le test assez simple consiste à vérifier la coagulation du laitensemencé avec un yaourt.

Un litre de lait cru est mélangé à un yaourt frais et le mélange est incubé à 35/40°C pendant 3 à 4 heures. Si le lait ne caille pas, on peut suspecter la présence d'inhibiteurs de la fermentation.

3- LACTOFERMENTATION

La lactofermentation permet d'apprécier la qualité du lait à diverses étapes (traite, conservation, fermentation, caillage,...). Ce test tient compte des germes présents dans le lait, de ses qualités physico-chimiques et des capacités d'adaptation de chaque germe au milieu.

3-1 MATÉRIEL

- ✓ Une louche pour prélever le lait
- ✓ Tubes à essai (18 mm de diamètre environ) avec des bouchons en caoutchouc

- ✓ Un goupillon (diamètre 20 mm) pour nettoyer les tubes
- ✓ Un chauffe-biberon avec thermostat réglable pour maintenir la température de l'eau à 37°C

3-2. MÉTHODE

Le matériel qui doit rentrer en contact avec le lait doit être propre, préalablement ébouillanté quelques instants puis refroidi avant utilisation.

Pour nettoyer les tubes à essai, les débarrasser à l'aide du goupillon de toute trace de caillé. Les tremper pendant 24 heures dans une solution concentrée froide de produit alcalin chloré de nettoyage de machine à traire. Goupillonner de nouveau jusqu'à disparition de toute trace de matières. Rincer abondamment puis laisser sécher. Avant chaque utilisation, tremper dans l'eau bouillante, puis laisser refroidir les tubes à essai et la louche.

Verser le lait à contrôler dans un tube à essai identifié

Le déposer dans le chauffe-biberon rempli d'eau préalablement réglé à 30-37°C (températures habituelles de fabrication) et laisser pendant 24 heures pour le lait de vache ou de chèvre (48 h pour le lait de brebis)

3-3. LECTURE DES RÉSULTATS

Très bon lait: Les caillés sont très homogènes avec parfois quelques rares bulles et fissures dans le haut du tube. Le risque de gonflement ou d'ouverture des fromages est nul avec un lait de cette qualité

Bon lait: Caillé relativement homogène, avec quelques rares fissures dans la masse du caillé et quelques raies de remontées de bulles. Le risque de gonflement ou d'ouverture est très faible.

mauvais lait: Caillés digérés, malodorants et présence de bulles éparses de taille plus ou moins importante, indiquant un important défaut de propreté. Le risque de gonflement est important.

Mauvais lait: Caillés digérés, malodorants dégagement gazeux très important visualisé par le soulèvement du bouchon, indiquant un important défaut de propreté. La flore est très active et le risque de gonflement est maximum.

LE TEST DE LA RÉZASURINE

INTRODUCTION

Le test à la rézasurine permet d'évaluer la charge microbienne d'un lait cru non ensemencé par les levains lactiques. Cette charge est en relation avec la durée de décoloration d'un indicateur coloré, la rézasurine.

MATÉRIEL

L'ensemble de la verrerie est stérilisé à l'eau bouillante.

Elle comprend:

- ✓ Un tube à essai de 15 à 20 ml
 - ✓ Des pipettes de 10 ml
 - ✓ Des pipettes de 1 ml
 - ✓ Des flacons de 50 ml
 - ✓ Un chauffe-biberon réglable à 37°C
- Des pastilles de rézasurine

3- MÉTHODE

- Préparer une solution de rézasurine en en faisant dissoudre une pastille dans 50 ml d'eau bouillie contenant dans un flacon préalablement stérilisé à l'eau bouillante pendant 10 minutes
- Verser dans un tube à essai stérilisé un ml de solution de rézasurine et 10 ml de lait à tester. L'ensemble est de couleur bleu turquoise
- Plonger le tube dans le chauffe-biberon et noter l'heure
- Contrôler régulièrement la couleur du tube et noter l'heure à laquelle on obtient une décoloration complète (le tube passe du bleu, à divers roses, puis au blanc)

4- INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

| Temps de décoloration | germes/ml | Observations |
|----------------------------|--------------------------|--|
| Moins de 20 minutes | Plus de 10^7 | Lait trop chargé |
| 30 minutes à 2 heures | Plus de 10^6 | Lait chargé |
| Entre 2 heures et 4 heures | Plus de 10^5 | Lait nécessitant une maturation Avant emprésurage et un ensemencement éventuel |
| entre 4 heures et 5 heures | Plus de 5×10^4 | Laits nécessitant un apport de bactéries (ferments) lactiques |
| Plus de 7 heures | Moins de 2×10^4 | Laits nécessitant un apport de bactéries (ferments) lactiques |

Critères à observer: Moins de 10^5 germes/ml sitôt la traite. Plus d'un million de germes à l'emprésurage.

LA RECHERCHE DE LA PEROXYDASE :

PRINCIPE:

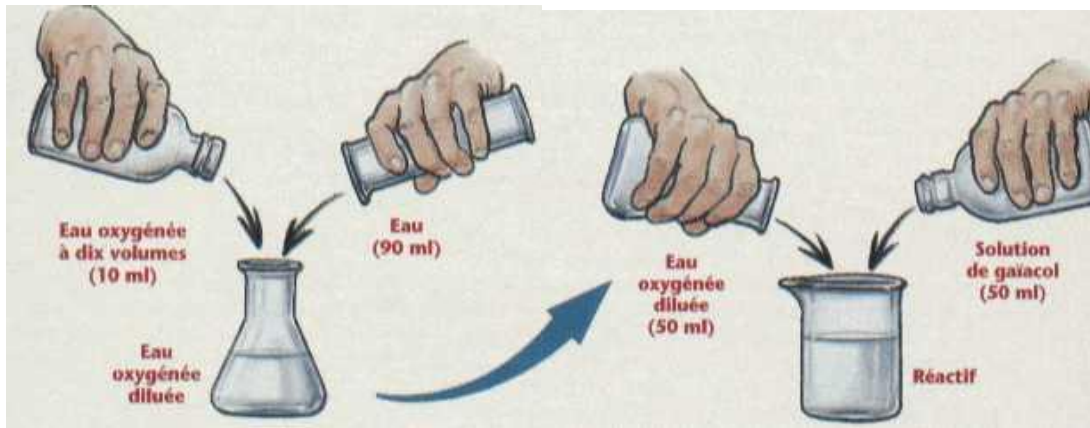
La peroxydase est une enzyme qui se trouve naturellement dans la banane. Elle est caractérisée par sa sensibilité à la chaleur et au traitement thermique.

On exploite alors cette caractéristique pour s'assurer de l'efficacité du traitement thermique apporté au lait, sachant que cette enzyme est inactivée pendant quelques secondes à 80°C et qu'elle est totalement dégradée lors d'un chauffage à 72°C pendant 30 minutes.

Afin de révéler sa présence, on exploite une autre propriété dont cette enzyme est douée, à savoir la dégradation de H_2O_2 et la libération de l'oxygène. Alors, on ajoute une substance donatrice d'hydrogène et qui s'oxyde en présence d' O_2 dans le milieu comme le gaïacol. Cette oxydation se traduit par une coloration rose.

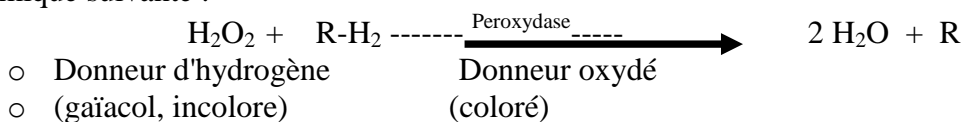
MODE OPÉRATOIRE :

- Dans un bêcher, on introduit 2 g de purée de banane à analyser, on ajoute 2 ml d'une solution aqueuse de gaïacol et une solution d' H_2O_2
- Après homogénéisation, s'il n'y a pas de changement de coloration, on peut dire que la peroxydase est absente et que le blanchiment a été bien conduit.
- Préparer : Eau oxygénée à 10 volumes que l'on diluera au 1/10 (mélanger 10 mL avec 90 mL d'eau). 100 mL d'une solution de gaïacol à 2 g/L (demander à un pharmacien de préparer cette solution).



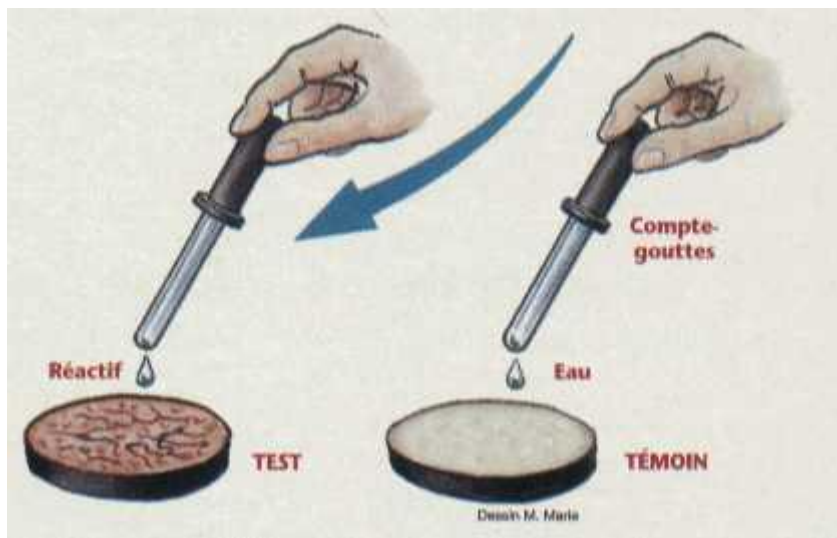
- Verser dans un même flacon 50 mL de chaque solution pour obtenir le réactif (voir figure ci-dessus).

Ce dernier donnera une réaction colorée en présence de peroxydase selon l'équation chimique suivante :



Localiser la peroxydase dans les tissus

Couper deux tranches de chaque végétal à tester, les essorer avec du papier essuie-tout et les disposer à plat. Recouvrir entièrement une des deux tranches avec du réactif en le versant goutte à goutte et l'autre tranche avec de l'eau pour servir de témoin. Remettre du réactif lorsqu'il a été absorbé. Laisser la coloration se développer (quelques minutes à une demi-heure).



RÉSULTATS :

Nous avons constaté une coloration rose caractéristique de la réduction du gaïacol à cause de la subsistance de la peroxydase. Ceci nous permet de conclure que le blanchiment n'a pas été conduit de manière correcte.

LA DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DANS LES PRODUITS ALIMENTAIRES

I APPLICATION

La présente méthode peut servir à déterminer l'activité de la phosphatase alcaline dans les produits laitiers comme indice de pasteurisation..

II- DESCRIPTION

La phosphatase alcaline est une enzyme thermolabile endogène à tous les produits laitiers, y compris le lait cru. Sa température d'inactivation dépasse légèrement celle qui détruit les micro-organismes pathogènes les plus résistants qu'on est susceptible de trouver dans le lait. C'est pourquoi cette méthode sert à déterminer si la pasteurisation a été suffisante ou à repérer la contamination de produits pasteurisés par le lait cru après la transformation.

Un premier résultat positif ne signifie toutefois pas nécessairement que la pasteurisation présentait des lacunes ou que le produit a été contaminé par du lait cru. La méthode peut produire des résultats faussement positifs dans trois situations différentes :

- **Phosphatase microbienne** : Les micro-organismes présents dans les produits laitiers pasteurisés peuvent produire des phosphatases microbiennes thermolabiles sensibles à la pasteurisation ou des phosphatases microbiennes thermostables : tout dépend du type de contaminant microbien. Afin de confirmer que la phosphatase initiale est attribuable à la phosphatase alcaline et n'est pas reliée à l'activité enzymatique de ces phosphatases microbiennes, on pasteurise et analyse de nouveau une partie de l'unité d'échantillonnage. Si l'équivalent phénol ne diminue pas de façon significative, il faut attribuer le résultat initial à la présence de phosphatases microbiennes thermostables.
- **Réactivation de la phosphatase** : On peut observer des résultats positifs à la phosphatase dans des produits laitiers faits de lait transformé par pasteurisation à haute température pendant une brève période (HTST) ou à ultra haute température pendant une brève période (UHTST). Cette réaction peut être causée par la réactivation de la phosphatase. La phosphatase réactivée se distingue de la phosphatase résiduelle par sa réactivation rehaussée lorsqu'elle est exposée à des sels de magnésium. On compare alors l'activité enzymatique de l'échantillon dilué (1:6) à l'activité enzymatique d'une partie de l'échantillon non dilué.
- **Substances interférentes** : On peut relier des résultats positifs initiaux aux effets de substances interférentes qui réagissent directement avec le réactif 2,6-Dichloroquinone-4-chloroimide (CQC) pour produire une coloration de fond de l'ordre de 620 nm (p. ex., phénol libre, acide vanilique), ce qui produit des résultats faussement positifs. Par ailleurs, des substances ajoutées aux produits, comme des aromatisants ou des colorants, pourraient nuire à l'activité de la phosphatase (p. ex., chocolat ou cacao) et produire ainsi des résultats faussement négatifs.

III- PRINCIPE

La phosphatase alcaline présente dans le lait cru libère du phénol d'un substrat de phénylphosphate disodique à un pH et à une température contrôlés. Le phénol libéré réagit ensuite avec le 2,6-dichloroquinone-4-chloroimide (CQC) pour former du bleu d'indophénol. La quantité de phénol libérée est proportionnelle à l'activité de l'enzyme présente. On peut mesurer l'intensité par colorimétrie à 620 nm. On quantifie le niveau de l'activité enzymatique au moyen d'une courbe d'étalonnage.

1) Prélèvement des échantillons

Prélever au hasard trois unités d'échantillonnage dans chaque lot.

2)- Fournitures et matériel spéciaux

- Carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3) (PF 106,00)
- Bicarbonate de sodium anhydre (NaHCO_3) (PF 84,01)
- Phénylphosphate disodique, sel (sans phénol) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4\text{Na}_2$) (PF 218,10)
- Acide trichloroacétique ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) (PF 163,39)
- Acide chlorhydrique (HCl ca 37 %) (PF 36,46)
- Calgon (hexamétaphosphate de sodium) (NaPO_3)₆ (PF 611,77))
- 2,6-Dichloroquinone-4-chloroimide (CQC) ($\text{C}_6\text{H}_2\text{Cl}_3\text{NO}$) (PF 210,4)
- Phénol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$) (PF 94,11)
- Alcool éthylique (absolu) anhydre ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) (PF 46,07)
- Chlorure de magnésium (hexahydraté) ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (PF 203,31)
- Spectrophotomètre ou colorimètre pour mesures à 620 nm.
- Agitateurs en verre
- Filtre Whatman n° 42 de 11 cm
- Pipettes volumétriques (classe A) de 1, 2 et 10 mL
- Fioles volumétriques
- Bain-marie capable de maintenir une température de 37 °C.
- Bain-marie capable de maintenir une température de 63,3 °C.
- Bain-marie capable de maintenir une température de 90 à 95 °C.
- Bain-marie capable de maintenir une température de 34 °C.

Important : Il faut éviter de contaminer la verrerie avec du phénol, du crésol ou d'autres substances phénoliques. Ne pas laver la verrerie avec du détergent contenant des substances phénoliques

3)- Demarche à suivre

Il faut analyser chaque unité d'échantillonnage individuellement. Il faut effectuer l'épreuve conformément aux instructions suivantes :

a) Manipulation des unités d'échantillonnage

À l'exception des aliments qui se conservent bien à la température de la pièce, il faut que les unités d'échantillonnage demeurent réfrigérées (0 – 5 °C) au cours de l'entreposage et du transport. Les unités d'échantillonnage congelées doivent le rester. Faire décongeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur, ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des micro-organismes.

Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

b) Préparation pour l'analyse

- ✓ Préparer toute les solutions tampons et les solutions de la façon décrite à la section 10.
- ✓ Établir la courbe d'étalonnage du phénol et calculer la pente de la façon correcte
- ✓ Préparer tous les témoins et vérifier qu'ils conviennent
- ✓ Préparation des échantillons

Lait et autres produits laitiers à l'état liquide : Pipeter des portions de 1 mL des unités d'échantillonnage dans des éprouvettes de 25 x 150 mm.

IV- COURBE D'ÉTALONNAGE DU PHÉNOL ET TÉMOINS

1) Courbe d'étalonnage du phénol

- Utiliser des pipettes volumétriques pour déposer des volumes de 1 à 10 mL de la solution de phénol (10.8) dans des éprouvettes séparées et diluer à 10 mL avec le tampon au carbonate (10.1).
- Ajouter 1 mL de solution de Calgon (10.5) et 1 mL de réactif CQC (10.6) et mélanger.

- Préparer de la même façon un « blanc » contenant seulement 10 mL de tampon au carbonate.
- Placer toutes les éprouvettes pendant 15 min dans un bain-marie à 37 °C pour que la coloration se forme complètement.
- Mesurer, par rapport au « blanc » (7.4.1.3), la coloration bleue formée à une longueur d'onde de 620 nm (c.-à-d. remettre l'instrument à zéro avec le blanc à une longueur d'onde de 620 nm).
- Calculer la pente de la partie rectiligne de la courbe d'étalonnage du phénol en utilisant des valeurs d'absorbance (densité optique) (c.-à-d. 2-log % divisé par les :g de phénol présents). Cette valeur servira à calculer la teneur en phénol des unités d'échantillonnage à analyser en 7.5.9.

2) Témoin négatif

3) Témoin positif

Tableau 1. Quantité requise de MgCl₂ par rapport à la teneur en matières grasses du lait dans l'échantillon

| Teneur en matières grasses Du lait dans l'échantillon (*) | Solution de MgCl ₂ par fraction de 5 mL |
|--|---|
| (%) | (mL) |
| 3-7 | 0,200 |
| 8-12 | 0,175 |
| 13-18 | 0,150 |
| 19-25 | 0,125 |
| 26-31 | 0,100 |
| 32-40 | 0,075 |

Note : Dans le cas des échantillons de fromage, utiliser le contenu en matières grasses de l'unité d'échantillonnage indiqué sur l'étiquette divisé par deux puisqu'on utilise au début un mélange de 0,5 g de fromage et de 0,5 mL

Techniques de dénombrement en microbiologie alimentaire en milieu solide

| Type de micro-organisme dénombré | Nom | Milieu Principaux composants | Technique d'ensemencement | Conditions d'incubation | Dilutions dénombrées | Tests complémentaires ou poursuite d'analyse. |
|--|--------------------------------------|--|--|---|--|--|
| Moisissures | Milieu au malt et saccharose | Malt Saccharose Chloramphénicol | Étalement de 0,1 mL de dilution en surface. | 25°C, 2 à 3 jours | entre 5 et 50 thalles (moisissures) et entre 30 et 300 colonies de levures. | Aucun |
| Flore totale = micro-organismes aérobies totaux à 30°C | PCA (plate count agar) | Glucose extraits de levures + 1 % de lait écrémé pour analyse du lait cru) | 1 mL de dilution dans la masse + double couche (sauf pour eau et lait). | 24 heures à 30°C <i>Autres possibles :</i> 45°C - micro-organismes totaux thermophiles 20°C - micro-organismes totaux cryophiles | entre 30 et 300 colonies. | Aucun |
| Coliformes | Désoxycholate 0,1 % | Lactose Rouge neutre Désoxycholate de Na | 1 mL de dilution dans la masse + double couche | 24 heures à : + 30°C pour les coliformes totaux 44°C pour coliformes | entre 15 et 150 colonies. On dénombre les colonies rouges d'au moins 0,5 mm de diamètre. | Aucun |
| | Gélose lactosée au TTC et Tergitol 7 | Lactose BBT Tergitol 7 TTC (chlorure de 2-3-5 triphényl tétrazolium) | Filtration sur membrane d'eau : déposé le filtre sur le milieu (face septique vers le haut) | 24 heures à : 27°C pour les coliformes totaux 44°C pour les coliformes thermotolérants | Entre 15 et 150 colonies. Colonies lactose ⁺ : colonie rouge ou rose (réduction TTC) halo jaune (virage du BBT) | identification de chaque colonie suspecte par test IMVIC (p100) ou galerie classique. |
| Staphylococcus aureus | Baird Parker | Jaune d'œuf Tellurite de potassium | Étalement de 0,1 mL de dilution en surface. | 24 à 48 heures à 37°C | Entre 1 et 100 colonies. On dénombre les colonies noires avec liseré blanc et entourées d'un halo d'éclaircissement | Identifier : toutes les colonies suspectes s'il y en a moins de 10. acine carré du nombre de colonies, s'il y en a moins de 100, moins de 50 colonies + S'il y a plus de 100 colonies, proposer un nouveau dénombrement avec de nouvelles 4 |
| Streptocoques fécaux - <i>Enterococcus</i> | Slanetz | Glucose Azide de sodium TTC | Filtration sur membrane d'eau : déposé le filtre sur le milieu (face septique vers le haut) | 24 à 37°C | Entre 15 et 150 colonies. On dénombre les colonies roses ou rouges (réduction du TTC) | Identification des colonies suspectes par repiquage sur gélose BEA (on doit obtenir des colonies noires). |
| Anaérobies sulfite réducteurs à 46°C | Milieu TSC Milieu TSN | Tryptone-sulfite-cyclosérine Tryptone sulfite néomycine | En tube : 1 mL de dilution dans la masse pour aliments frais ou surgelés. 10 mL pour semi-conserves En boîte : 1 mL de dilution dans la masse + double couche | 24 à 48 h à 46°C 20 h à 46°C en anaérobiose. | On dénombre les colonies noires (réduction des sulfites) | Identification possible de <i>Clostridium perfringens</i> |
| Spores de <i>Clostridium</i> sulfite réducteurs | Milieu TSC Milieu Wilson-Blair | Tryptone-sulfite-cyclosérine Milieu VF + sulfite et alun de fer | En tube : analyse de 20 mL d'eau réparties en 4 tubes (ensemencement de 5 mL dans la masse) | 24 à 48 h à 37°C | On dénombre les colonies noires (réduction des sulfites) | Identification possible de <i>Clostridium perfringens</i> |

Pour les coliformes on dénombre entre 15 et 150 colonies car au delà on risque d'avoir des colonies faussement négatives par ré-alcalinisation du milieu. Dans tous les cas si le dénombrement est supérieur ou inférieur aux fourchettes fixées (ex : moins de 15 colonies ou plus de 150 sur TTC) on réalise le dénombrement et l'interprétation en précisant que le résultat est soumis à caution car les conditions de dénombrement ne sont pas optimales.

LA BIBLIOGRAPHIE

- Anonyme (1991): Microbiologie – Directives générales pour le dénombrement des micro-organismes – Méthode par comptage des colonies obtenues à 30°C. Norme ISO 4833; Organisation internationale de normalisation
- Anonyme.1992. Fluoreszenzoptischer Schnellnachweis von Clostridium perfringens. MERCK E. (Schweiz) AG, Diagnostica 4032.
- Anonyme (1997): Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (Staphylococcus aureus et autres espèces) – Partie 2: _Technique utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène. Norme ISO 6888-2; Organisation internationale de normalisation.
- Baron S .1996. Medical Microbiology, 4/e, New York, Churchill Livingstone,
- Bartz JC, Kincaid AE, Bessen RA. 2003. Rapid prion neuroinvasion following tongue infection. *Journal of Virology*, 77:583–591.
- Brown P, Wolff A, Gajdusek DC. 1990. A simple and effective method for inactivating virus infectivity in formalin-fixed tissue samples from patients with Creutzfeld-Jakob disease. *Neurology*, 40:887–890.
- Collins CH, Kennedy DA. 1999. Laboratory acquired infections: history, incidence, causes and prevention, 4th ed. Oxford, Butterworth-Heinemann,
- Garner JS, 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for isolation precautions in hospitals. *American Journal of Infection Control*, 24:24–52,
- Gavrilovic M., Maginot M.J., Schwartz-Garvilovic C., Wallach J. 1996. Manipulation d'analyse biochimique. Biosciences et techniques Doin edition.
- Guide de prévention des infections. 1998. lavage des mains, nettoyage, désinfection et stérilisation dans les établissements de santé, 2 éd. Ottawa, Laboratoire de lutte contre la maladie, Bureau des maladies infectieuses, Santé Canada,
- Guiraud J. et Galzi P. 1980. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Ed de l'usine.
- Hansen M.V. and Elliott L.P.1980. New presumptive identification test for Clostridium perfringens: Reverse CAMP test. *J. Clin. Microbiol.* **12**: 617-619.
- Joffin J.N et Leyral G. 2006. Microbiologie technique. Tome 1 Ed. CRDP. Aquitaine.
- Larpent J.P et Larpent_Gourgaud M . 1997. Mémento technique de microbiologie. 3^{ième} Ed Lavoisier Tec et Doc.
- Murray PR (1999). Manual of Clinical Microbiology, 7/e, ASM Press,
- National Research Council. 1997. Occupational health and safety in the care and use of research animals. Washington, DC, National Academy Press,
- Organisation Mondiale de la Santé.1993. Maintenance and distribution of transgenic mice susceptible to human viruses : memorandum from a WHO meeting. *Bulletin of the World Health Organization*, 71:497–502.
- Richmond JY, McKinney RW, 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 4th ed. Washington, DC, United States Department of Health and
- Richmond JY, Quimby F. 1999. Considerations for working safely with infectious disease agents in research animals. In : Zak O, Sande MA, eds. Handbook of animal models of infection. London, Academic Press, 69–74.
- Schneider PM. 1997. Emerging low temperature sterilization technologies. In : Rutala WA, eds. Disinfection & sterilization in health care. Champlain, NY, Polyscience, 79–92.

Standards Australia/Standards New Zealand. 2002. Safety in laboratories – microbiological aspects and containment facilities. Sydney, Standards Australia International, (Standard AS/NZS 2243.3:2002).

Taylor DM. 1999. Transmissible degenerative encephalopathies : inactivation of the unconventional causal agents. In : Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, eds. Disinfection, preservation and sterilization, 3rd ed. Oxford, Blackwell Scientific, 222–236.

- 1- بن سلطان أ، كيجل م ، عبد الكاظم أ، موساوي ع، 1999 . ميكروبيولوجيا الاراضي. دار الغرب للنشر والتوزيع وهران الجزائر.
- 2- كيجل م، بن سلطان أ، هني ج، عبد الكاظم أ، قصاص ب، سعدي ن، هداجي م. 2000. اساسيات ميكروبيولوجيا الحليب. دار الغرب للنشر والتوزيع وهران الجزائر.
- 3- كيجل م، عبد الكاظم ا، هني ج، بن سلطان أ، بوتيبا ز، 2000 . ميكروبيولوجيا المياه والتلوث البيئي. دار الغرب للنشر والتوزيع وهران الجزائر.
- 4- كيجل م، هني ج، عبد الكاظم ا. 2001 . الكيمياء الحيوية للكائنات الدقيقة. دار الغرب للنشر والتوزيع وهران الجزائر.
- 5 - عبد الكاظم ا. كيجل م، هني ج و دليمي ا. 2005 . المجمل في علوم الابل. رياض العلوم الجزائر. 265 ص