

TRAVAUX PRATIQUES

Microbiologie – Marc FISCHER

Noushrina CHEETAMAN
Master SACEB
Université de Strasbourg

SOMMAIRE

Sommaire.....	1
Introduction	3
Principes	3
1 Analyse : eau de rivière	3
1.1 Les bactéries de la rivière ^[3]	3
1.2 La spore bactérienne ^[4]	3
2 Les milieux de cultures.....	4
3 Le repiquage	4
4 Méthodes des quadrants	4
5 La méthode NPP (= nombre le plus probable)	4
6 CMI Concentration minimale inhibitrice	5
7 Coloration de Gram	5
7.1 La différence entre gram +/-.....	5
7.2 Les étapes de la coloration	5
8 Tests biochimiques ^[6]	5
8.1 Oxydase ^{[7],[1]}	6
8.2 Catalase ^[8]	6
8.3 Galerie API (=Analytical Profile Index) ^[9]	6
Matériels et méthodes.....	7
1 Identification des micro-organismes dans l'eau de rivière	7
1.1 Jour 1 : Filtration de l'eau et préparation des cultures sur gélose	7
1.2 Jour 1 : Recherche spécifique des bacillacées dans l'eau.....	8
1.3 Jour 2 : Repiquage d'une colonie isolée de l'eau de rivière	9
1.4 Jour 3 : La galerie API20E	9
1.5 Jour 3 : Préparation d'une lame d'observation de la bactérie inconnue	10
1.6 Jour 5 : Test de l'oxydase et de catalase.....	11
1.7 Jour 5 : Examen direct.....	11
2 Préparation des micro-organismes témoins : Escherichia coli	11
2.1 Jour 1 : Repiquage des micro-organismes témoins	11
2.2 Jour 2 : Repiquage d'une colonie isolée de la bactérie témoin E. Coli	12
2.3 Jour 2 : Préparation d'une lame d'observation de la bactérie témoin.....	12
2.4 Jour 3 : Préparation d'une lame d'observation de la bactérie témoin.....	13
3 Jour 2 : Dénombrement de la flore totale – Méthode NPP.....	13
4 Analyse d'une souche résistante au mercure : Concentration de mercure minimale inhibitrice (CMI)	14
4.1 Jour 3 : repiquage d'une souche résistante au mercure	14
4.2 Jour 4 : Recherche de la concentration de mercure minimale inhibitrice (CMI)	15
Résultats et discussions	16
1 Identification des micro-organismes dans l'eau de rivière & comparaison avec souche témoin : E. Coli	16
1.1 Culture sur gélose suite à la filtration de l'eau de rivière	16
1.2 Recherche spécifique des bacillacées dans l'eau.....	16
1.3 Repiquage d'une colonie isolée de l'eau de rivière	17
1.4 La galerie API20E	18
.....	19

1.5	Observation des lames.....	19
1.6	Gélose surfondue	21
1.7	Test de catalase et d'oxydase	21
2	Analyse d'une souche résistante au mercure : Concentration de mercure minimale inhibitrice (CMI)	22
3	Dénombrement de la flore totale – Méthode NPP.....	23
	Conclusion.....	23
	Annexes	24
	Glossaire.....	26
	Bibliographie	26

INTRODUCTION

La température augmente, l'été se rapproche et le désir de s'évader s'amplifie. Les vacances sont devenues un besoin pour lequel, personne, ne ferait l'impasse. Pour autant, se rendre dans les calanques de Marseille, bruyante et noire de monde n'est pas une situation envisageable. Nous n'avons pas non plus les moyens pour un tourisme spatial comme Richard BRANSON. Mais qu'en est-il d'un petit coin de paradis, bien sur Terre, au bord d'une rivière ?

L'inconvénient réside dans l'incertitude de sa composition biologique. Entre les rejets anthropiques et la perte d'une biodiversité qui aurait pu nous protéger contre des pathogènes, s'interroger sur la constitution de l'eau de rivière à l'échelle des micro-organismes semble justifié. Pour ce faire, l'enseignant responsable, M. FISCHER, nous a délivré un échantillon de cette eau pour procéder à des tests, que nous allons comparer avec des bactéries témoins. Nous allons également pratiquer une analyse de recherche de spores, un dénombrement par la méthode NPP, une détermination de la concentration de mercure minimale inhibitrice (=CMI) sur une colonie résistante au Hg, une galerie API20E sur une bactérie isolée, mais également de simples observations sous microscope avec une coloration de Gram.

PRINCIPES

1 Analyse : eau de rivière

1.1 Les bactéries de la rivière^[3]

Avant toutes choses, une eau de rivière polluée contient la bactérie *Sphærotilus*. En effet, une eau pure ne développe pas cette bactérie d'elle-même, puisqu'elle provient des eaux usées qui auraient pu potentiellement se déverser ^[3]. Par ailleurs, elle est souvent accompagnée de *Colpidium colpoda*, *Glaucoma scintillans*, *Litonotus fasciola*^[3], ... Cependant, les développements bactériens s'opèrent également dans les eaux non polluées. Ainsi, il n'est pas rare de noter la présence de micro-organismes plus communs, comme les entérobactériacées (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*), des Coccacées (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*), d'autres bacillacées (*Bacillus megaterium* et *Bacillus subtilis*), mais aussi des Parameceae, des Tetrahymena, des Vorticella, qui ne rendent pas l'eau potable pour autant.

Enfin, il est possible d'observer la croissance de Chlorophyceae dans les eaux douces, ce qui amène d'autres individus unicellulaires, telles que *Chlamydomonas*, *Pandorina*, *Stichococcus*,...

1.2 La spore bactérienne^[4]

Les Bacillacées forment une catégorie de bactéries, possédant l'aptitude de synthétiser des cellules (spores) ayant une résistance accrue à des facteurs de stress, notamment les fortes chaleurs, l'absence de milieux nutritifs ou d'eau. Contrairement aux spores des champignons, les spores bactériennes se forment à l'intérieur des cellules (=endospores), lorsque la bactérie se trouve en situation de stress, ce qui fait des spores une forme de résistance de la cellule.

Il existe quatre familles de bactéries sporulantes, dont :

- Les conidies
- Les cystes
- Les exospores
- **Les endospores**

Durant les manipulations, nous allons procéder à une recherche spécifique des endospores dans l'eau, avec comme bactéries témoins *Bacillus subtilis* et *Bacillus megaterium*.

2 Les milieux de cultures

Les milieux de cultures sont des préparations utilisées pour favoriser la multiplication et conserver des micro-organismes.

Dans l'objectif d'étudier les micro-organismes présents dans l'eau de rivière, nous allons non seulement utiliser des milieux nutritifs courants (bouillon ordinaire, gélose normale ordinaire), mais également des milieux d'isolements sélectifs, dont :

- Gélose avec mercure
- Gélose Eosine Méthylène Blue (=E.M.B)
- Gélose de Drigalski

La gélose au mercure nous permettra de favoriser la multiplication des bactéries ayant des résistances au mercure en inhibant ceux n'ayant pas de résistances. Les deux géloses suivantes vont nous permettre d'identifier les bactéries à Gram – (voir [Principes – La différence entre gram +/-](#)).

La gélose E.M.B, distinguable par sa couleur rouge, permet une reconnaissance privilégiée d'E. Coli par une couleur de colonie verte (dos de scarabée) et de Klebsiella aerogènes par un aspect « œil de poisson ».

La gélose Drigalski, quant à elle, se distingue par sa couleur verte. Elle différencie les germes qui fermentent le lactose (lac+) de ceux qui ne le fermentent pas (lac-).



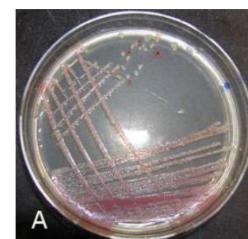
Figure 1 : coloration verte "scarabée" typique de la bactérie E. Coli

3 Le repiquage

Le repiquage est une technique qui nous permettra d'isoler une colonie dans un milieu de culture liquide dans un premier temps, puis sur une gélose solide dans un second (Voir mode opératoire dans la partie [matériels et méthodes](#)).

4 Méthodes des quadrants

La méthode des quadrants est une technique permettant de répartir une colonie, suite au repiquage, afin d'obtenir de nouvelles colonies isolées. Pour ce faire, nous utilisons une anse stérilisée par une flamme, pour prélever dans le milieu obtenu suite au repiquage. Puis, nous faisons des allers et retours sur une partie de la gélose, nous stérilisons à nouveau et nous rechargeons l'anse par un passage à 45° sur les stries précédentes.



Méthode des quadrants

5 La méthode NPP (= nombre le plus probable)

La méthode NPP est une estimation statistique du nombre de micro-organismes que contient un échantillon. En effet, cette quantification se base sur une distribution des micro-organismes dans un milieu, selon une loi Normale. Ainsi, en répétant un nombre suffisant de prélèvements, d'un même volume, d'un même milieu, nous aurons un nombre de micro-organismes représentant une cloche, dont la moyenne¹ est le nombre le plus probable de micro-organisme présent pour ce volume.

Techniquement, nous avons donc un nombre moyen μ de micro-organismes pour un volume V. Si l'on dilue ce volume V par X, le nombre de micro-organismes se retrouve également divisé X. Au fur et à mesure des dilutions, nous arriverons à un nombre très faible, voire nulle, de micro-organismes, pour un certain volume V_x . Il sera donc possible de remonter au nombre initial de micro-organismes par calcul pour le volume V. Il s'agira donc d'identifier l'absence de micro-organisme dans un milieu nutritif.

Pour cela, nous allons préparer 6 dilutions, de 10^{-1} à 10^{-6} , de la solution d'eau de rivière. Puis nous allons ensemencer une série de 3 tubes de bouillons ordinaires pour chaque dilution. Après mise à l'étuve, nous aurons un développement de micro-organismes (ou non), dans chaque tube, que l'on pourra identifier par un aspect trouble (ou limpide). Après avoir noté, le nombre de tubes positifs pour chaque

¹ Sommet de la cloche

dilution, nous obtiendrons une suite de chiffres, dont il faudra sélectionner un nombre à trois chiffres, strictement inférieur et au plus proche de 330. « Cela correspond à une meilleure répartition des dilutions »^[1].

OBSERVATION (méthode en triple essai)					
DILUTIONS	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
GROUPEMENT DES RESULTATS	+++	+++	++-	+-	---
NOMBRE CORRESPONDANT	3	3	2	1	0

Figure 3 : Exemple d'observation selon la méthode NPP : 321, 210 [1]

Enfin, il faudra se référer aux tables de Mac Grady de la norme ISO 7218 : 1996, pour connaître le nombre de micro-organismes contenu dans l'échantillon.

6 CMI Concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice est une technique indiquant, comme son nom l'indique, la plus faible concentration, pour laquelle le mercure inhibe la croissance bactérienne. Pour ce faire, nous allons ensemencer une même quantité d'échantillon, contenant une colonie de bactérie résistante à Hg, dans une série de 13 tubes à hémolyses. Ensuite, nous rajouterons une quantité décroissante de Hg, pour identifier la quantité minimale inhibitrice.

7 Coloration de Gram

7.1 La différence entre gram +/-

Les micro-organismes ne possèdent pas tous une paroi semblable. Cela permet donc de classer ces derniers en deux catégories :

- Gram +, ce sont des cellules ayant une paroi épaisse, composée d'une couche de peptidoglycane,
- Gram -, ce sont des cellules ayant une paroi plus fine, composée d'une membrane externe ayant des liaisons lipoprotéiques avec une mince couche de peptidoglycane.

7.2 Les étapes de la coloration

Après avoir préparé le frottis (Voir partie matériels et méthodes), la lame d'observation est recouverte de solution de violet de cristal, pendant 1 min. Il faudra alors fixer la couleur avec du lugol, pendant 1 min. Lors de ces étapes, Gram+ et - seront toutes deux colorées en violet. Par la suite, une décoloration des micro-organismes à l'alcool sera effectuée. Etant donnée, la caractéristique très lipophile de la paroi Gram +, celles-ci ne seront pas décolorées. En effet, elles sont imperméables à l'alcool et restent violettes. En revanche, les cellules Gram - deviendront incolores, puisque leur membrane plasmique est perméable à l'alcool et décolore le cytoplasme. Pour pouvoir observer les Gram - incolores, nous appliquons une autre coloration, en l'occurrence la fuschine, pour la différencier du violet des cellules Gram+.

8 Tests biochimiques ^[6]

Les tests biochimiques est un outil utilisé en tant que méthodes de diagnostic pour les agents pathogènes. Il existe également les tests sérologiques, moléculaires, biologiques et lysotopique, mais les

tests biochimiques sont fréquents de part leurs facilités d'utilisation, leurs couts, leurs fiabilités et leurs adaptabilités pour les micro-organismes.

Entre autres, les tests biochimiques sont employés pour distinguer les caractères morphologiques (structure des parois : Gram +/-), métaboliques (oxydative/fermentative), les systèmes enzymatiques (oxydase/catalase/nitrates réductase/pectinase), les sources carbonées et azotées utilisés par le micro-organisme et le type de respiration (aérobie/anaérobie/anoxie²). De plus, pour lever tous les doutes possibles suite à ces tests généraux, il est possible de pratiquer une méthode plus spécifique : la Galerie API20E.

8.1 Oxydase ^{[7],[1]}

L'une des techniques que nous allons employer durant les manipulations consiste en la recherche du caractère oxydase. En effet, pour identifier les bactéries, le système enzymatique utilisé peut être un élément déterminant, notamment celles des bactéries à Gram -. Cette technique consiste à détecter l'enzyme *cytochrome oxydase* à l'aide d'une bandelette de papier imbibé de « dérivés méthylés du paraphénylène diamine »^[1]. En présence de cytochrome oxydase, les dérivés procéderont à une réaction d'oxydation/réduction en se transformant en une forme oxydée semi-quinonique rose-violacée. Lorsque le test s'avère positif, la bandelette deviendra violacée rapidement. Une coloration apparaissant au-delà de 30 secondes est considérée négative, puisqu'elle aurait pu être contaminée par l'oxydase d'un micro-organisme de l'air.

8.2 Catalase ^[8]

Une bactérie ayant une respiration utilisant l'oxygène (=aérobie), le métabolisme va produire du peroxyde d'hydrogène (=eau oxygénée) grâce à la superoxyde dismutase. Cependant, l'eau oxygénée a la capacité de s'infiltrer à travers les membranes biologiques et induire des lésions. C'est pour cela, que le micro-organisme aérobie utilise comme moyen de défense la catalase, un catalyseur qui générera de l'eau et de l'oxygène³. Lors d'un test positif, nous aurons donc l'apparition de bulles.

Etant donnée, qu'il existe « des espèces appartenant au même genre »^[8], ayant des types de respiration différente, le test de la catalase pourra être utilisé pour distinguer des bactéries comme *Aerococcus urinae* (catalase positif) de *Aerococcus viridians* (catalase négatif)^[8]. Effectivement, les micro-organismes aérobies sont catalyse positive. Tandis que, les micro-organismes anaérobies sont catalyse négative. Cependant, ce test est utile lorsqu'on a d'ores et déjà une idée de la bactérie dont nous avons en notre possession.

8.3 Galerie API (=Analytical Profile Index) ^[9]

La galerie API20E est une technique plus spécifique aux entérobactéries. Elle est constituée d'une plaquette de plastique, où se trouve 20 micro-tubes contenant des milieux différents. Les galeries API20E sont surtout utilisées pour déceler une activité enzymatique dû « à la fermentation des glucides ou au catabolisme des protéines ou des acides aminés par les organismes inoculés »^[9].

Afin d'inoculer la galerie, il faudra repérer les trois types de remplissage par les annotations sous le code test.

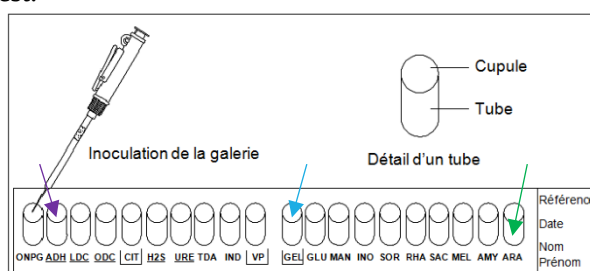


Figure 4 : Schéma de la galerie API

² Voir glossaire

³ $2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{catalase} = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

En effet, sous chaque code se trouve **une ligne**, **un demi-cadre**, ou **aucune annotation**. Lorsqu'aucune annotation apparaît sous le code test, la cupule ne doit pas être rempli par l'échantillon. En revanche, lorsqu'apparaît un demi-cadre, la cupule doit également être remplie par l'échantillon. Concernant, la ligne, elle indique que le tube est rempli d'échantillon et la cupule, d'huile minérale. Attention : certains tests nécessitent un réactif supplémentaire.

Enfin, après avoir attendu 24h, la lecture de la galerie peut être effectuée. Pour cela, il faut déterminer la positivité des 20 tests, puis additionner par groupe de 3, le nombre attribué à chaque tubes (Voir [Annexe 4](#)). Cela va nous permettre d'acquérir un code, qui sera référencé dans l'index API 20E, pour identifier notre bactérie.

MATERIELS ET METHODES

1 Identification des micro-organismes dans l'eau de rivière

1.1 Jour 1 : Filtration de l'eau et préparation des cultures sur gélose

Matériels :

- Unité de filtration,
- Bec bunsen,
- Filtres Milipore type HA, pores = 0.45µm
- Eprouvette stérile
- Pipettes automatiques et cônes associées
- Pompe à vide,
- Vortex,
- Pincés,
- Quatre milieux gélosés : gélose ordinaire (**A**), EMB (**B**), Drigalski (**C**), gélose ordinaire au mercure (**D**) et ordinaire surfondue(**A'**),
- Eau de rivière,
- Suspension T+ et T-,
- Tubes à essais stériles,
- 10 mL d'eau sérologique,

Méthodes :

Dans l'objectif, d'identifier les pathogènes présents dans l'eau de rivière, nous avons besoin de récupérer un maximum de micro-organisme, sans pour autant inoculer un volume important d'eau dans notre boîte de pétri. Pour cela, chaque binôme a rempli une éprouvette graduée d'un volume d'eau différent, pour observer la différence de population selon chaque volume. Pour notre part, nous avons mesuré un volume de 10mL. Le filtre a été récupéré à l'aide d'une pince stérile (Voir [Annexe 2](#)) et déposé dans l'unité de filtration. L'eau a été versé dans l'unité de filtration, puis un vide a été fait pour accélérer le passage de l'eau à travers le filtre.

La surface supérieure du filtre a été en contact direct avec l'eau. Cela signifie que cette surface porte le plus de micro-organismes. Toujours en milieu stérile, nous allons déposer le filtre sur la face supérieure, au contact d'un milieu gélosé. La filtration a été répétée pour les trois autres milieux, avec un filtre différent. Au bout d'une minute, le filtre a été retiré à l'aide de la pince stérilisée.

Les milieux de culture EMB, Drigalski et ordinaire au mercure sont des milieux sélectifs, donc ils permettront d'identifier la présence de pathogènes avec une résistance. Ainsi, des témoins dilués au 1000e de E. Coli résistant au mercure (T+) et non résistant (T-) ont été déposés de part et d'autre du filtre. Cela permettra d'observer les réactions normales sur la boîte de pétri, d'une souche résistante et celle qui ne l'est pas.

La dilution a été réalisée à l'aide de 10µL de la suspension T+ et T- dans 10mL d'eau physiologique, qui a été versé au préalable dans un tube à essais. Une fois les solutions passées au vortex, une goutte a été déposée à l'aide d'une pipette automatique sur la gélose, de part et d'autre du filtre. Un marquage + et - a été au préalable dessiné au dos de la boîte de pétri.

ATTENTION

Ce PDF n'a pas été publié entièrement
pour éviter les risques de plagiat et/ou de
non-respect de clauses de
confidentialité