

TP DE MICROBIOLOGIE - ANNEE 2010-2011

**Licence Sciences, Technologies, Santé mention Biologie
UE 6.3 b : Bactériologie et Virologie Générales**

MATERIEL :

- une blouse en coton
- un feutre indélébile
- un élastique à cheveux

Travail en binôme

**Étuve : groupe du matin, étage du haut
groupe de l'après midi, étage du bas
Pipetage uniquement avec poires**

1ère semaine

PROGRAMME DU TP :**LE COURS ET LES TD DOIVENT ETRE COMPRIS**

- ↳ Travail stérile
- ↳ Identification de 3 souches
- ↳ Identification présomptive de souches d'un mélange

- Techniques de base :

- Travail stérile
- Etat frais
- Coloration de Gram
- Ensemencement
- Isolement sur milieux gélosés sélectifs et non sélectifs

- Identification bactérienne par l'étude des caractères métaboliques et antigéniques**I - TRAVAIL STERILE (J1, J2)****1) J1**

A partir d'un bouillon Trypticase Soja (TS) de 10 mL (tube à essai), transvaser stérilement ≈ 2 mL dans 5 tubes à hémolyse à l'aide d'une pipette Pasteur.

- 2 bouillons serviront au test de stérilité : les incuber 24h à 37°C.
- les 3 autres bouillons serviront pour l'identification des 3 souches (voir II).

2) J2

Les 2 bouillons non ensemencés sont-ils limpides ? Conclusion.

II - IDENTIFICATION DE 3 SOUCHES (J1, J2, J3)

Chaque binôme reçoit 3 souches isolées sur gélose TS en vue d'une identification.

1) J1

- **Caractères morphologiques.** Pour **chacune des 3 souches**, réaliser séparément :
 - Gram (objectif x 100 à l'immersion). Dessiner la forme exacte (allongée, ovale, ronde, incurvée, ...). Préciser le groupement.
 - Étude de la mobilité
- ensemencement d'un milieu semi-solide mannitol-mobilité : piqûre centrale avec 1 colonie.
- ensemencement d'un bouillon TS de ~ 2 mL avec 1 colonie.
 - Réisolement - Faire sécher 3 géloses TS 30 min. à l'étuve.
 - Isoler à partir du bouillon TS ensemencé par 1 colonie chaque souche sur une gélose TS par la méthode des quadrants. **Flamber** entre chaque quadrant.

Semaine 1

2) J2

Etudier sur les 3 souches :

- Caractères morphologiques.

- étude de la mobilité :
 - lecture du milieu mannitol-mobilité.
 - état frais entre lame et lamelle à partir du bouillon TS (objectif x 40 à sec).
- étude macroscopique des colonies

- Métabolisme énergétique

- TESTS à REALISER SUR LA MEME LAME -

- catalase : Déposer 1 goutte de H₂O₂ puis les colonies avec 1 pipette Pasteur.
- oxydase : Déposer 1 papier buvard avec 1 goutte de TMPD. Déposer les colonies avec une pipette Pasteur à la limite de la goutte et du buvard sec. Le test est + si c'est la colonie qui vire au rouge.

Etudier selon l'identification présomptive de la famille ou du genre :

- Caractères métaboliques

- pour bacilles Gram -

Lecture de la fermentation du mannitol sur le milieu mannitol-mobilité ensemencé en J1.

Ensemencement d'une galerie d'identification simplifiée en tubes (**voir fiches techniques**) :

- milieu de Kligler-Hajna
- milieu de Clark et Lubs (pour réaction de RM et VP)
- milieu urée-indole de Ferguson
- recherche de la nitrate réductase sur mannitol-mobilité.

Ensemencement d'une galerie API 10E.

- pour staphylocoques (coques Gram +, catalase +)

Lecture de la fermentation du mannitol (cf. ci-dessus).

Recherche d'une DNase : ensemencer une gélose à l'ADN.

Recherche d'une coagulase : agglutination de particules de latex sensibilisées par du fibrinogène.

- pour streptocoques (coques Gram +, catalase -)

Lecture de la fermentation du mannitol (cf. ci-dessus).

Etude des caractères antigéniques (à faire éventuellement J3) :

Recherche du polyoside C pariétal : 1- extraction du polyoside C : mettre 20 colonies en suspension dans 0.5 mL d'enzyme d'extraction. Incuber 10 min. à 37°C au bain-marie

2- réaction d'agglutination de particules de latex sensibilisées par des anticorps spécifiques de chaque polyoside C de groupe A, B, C et D.

3) J3

- pour bacilles Gram -

Révélation et lecture de la galerie d'identification en tubes.

Test ONPG : **uniquement** si la bactérie est lactose - (voir milieu de Kligler-Hajna).

Révélation et lecture de la galerie API 10E.

Comparaison des résultats obtenus par les 2 méthodes.

- pour les staphylocoques

Révélation de la DNase.

Semaine 1

III - ETUDE D'UN MELANGE DE GERMES (J1, J2, J3)

Chaque binôme reçoit un **bouillon TS** renfermant un mélange de germes.

1) **J1**

- **Etude morphologique**

- Etat frais : mettre **1 anse** de bouillon entre lame et lamelle. Observer (cf. fiche technique).

- Gram : mettre **2 gouttes** de pipette Pasteur sur une lame.

↳- présomption : types de germes présents (forme, groupement, mobilité, Gram)

↳- choix de milieux de culture sélectifs ou non pour l'isolement de ces bactéries

- **Isolement sur milieux solides :**

Faire **sécher les géloses 30 min. à l'étuve** avant l'isolement

- sur milieu non sélectif (gélose TS) qui permettra la croissance de toutes les bactéries

- sur milieu(x) sélectif(s) si nécessaire pour inhiber certaines bactéries :

- milieu de Chapman sélectif pour staphylocoques et microcoques

- milieu de Drigalski sélectif pour bacilles Gram - courants (entérobactéries,

Pseudomonas, *Vibron*).

2) **J2**

- **Voir la qualité** des isollements. Si besoin, réisoler.

- **Lecture** des milieux Chapman et Drigalski.

- **Comparaison** des isollements entre eux. Aspect macroscopique des colonies.

- **Identification présomptive** de chaque germe :

- Gram

- oxydase

- catalase

- type respiratoire : **Lecture** des géloses **Viande Foie (VF)**. VOIR clichés fournis

Les géloses **VF** ont été ainsi préparées. Les **VF** sont préalablement régénérées 20 min. au bain-marie bouillant et ramenées à ~ 55°C. Elles sontensemencées avec une colonie sur toute la hauteur du tube puis solidifiées immédiatement en passant le tube sous l'eau froide. Les VF sont incubées 24h à 37°C. Le bouchon est légèrement **dévisé pour laisser l'air pénétrer**.

AUCUN AUTRE TEST à faire

3) **J3** Finir les lectures des tests.

COMPTE RENDU par binôme : à rendre impérativement en J3 à la fin de la séance :

- Travail stérile.

- Identification des souches : classer les résultats par souche ; regrouper les tests pour dégager la logique de la démarche d'une identification.

- Identification présomptive des germes du mélange.

- Inclure une note sur : - principe et mode de lecture des milieux TS, Chapman et Drigalski.

- principe et mode de lecture des milieux Kligler, Clark et Lubs, urée-indole et du test de la recherche de la nitrate réductase.

- définition des entérobactéries.

NB : - **Ne pas oublier le n° des 3 souches étudiées et la lettre du mélange.**

- **Les comptes-rendus ne doivent pas décrire les techniques utilisées mais doivent comporter les résultats et la démarche suivie si possible sous forme de tableau.**

Semaine 1

TP DE MICROBIOLOGIE - ANNEE 2010-2011

Licence Sciences, Technologies, Santé mention Biologie
UE 6.3 b : Bactériologie et Virologie Générales

2ème semaine

PROGRAMME DU TP :

- I - CMI et CMB vis à vis de la streptomycine - Dénombrements bactériens
- II - Mutation - Antibiogrammes par diffusion en gélose
- III - Conjugaison - Antibiogrammes par diffusion en gélose
- IV - Examen individuel

I - CMI et CMB VIS A VIS DE LA STREPTOMYCINE (J1, J2, J3)

CMI : plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance visible

CMB : plus faible concentration d'antibiotique ne laissant subsister que 0.01% de l'inoculum initial

Une solution mère d'antibiotique à 10 g/L est distribuée. Calculer le volume de solution mère d'antibiotique à ajouter pour avoir 2 mL de milieu à 1024 mg/L.

1) J1 : Préparation commune aux CMI et CMB :

- **Inoculer** un bouillon **TS** avec 1 colonie de la souche donnée sur gélose TS et incuber ce bouillon 1 à 2h à 37°C en bain-marie agité.

- **Préparer** pendant ce temps la gamme de dilution de l'antibiotique (solution mère à 10 g/L):

Préparer dans des tubes à hémolyse bouchés coton des dilutions géométriques de raison 2 de l'antibiotique dans du bouillon MH stérile sous un volume final de 1 mL de façon à obtenir une gamme allant de 1024 à 8 mg/L et 1 tube témoin sans antibiotique soit 9 tubes.

- **Préparer** une dilution du bouillon de culture au moins au 1/10 en bouillon MH (cette dilution doit être parfaitement limpide).

Répartir 1 mL de cette dilution dans chaque tube de la gamme d'antibiotique (la concentration finale en antibiotique va de 512 à 4 mg/L). **Commencer** par le tube témoin.

- **Numération** de l'inoculum initial. - Faire **sécher 30 min. 1 gélose TS** avant utilisation -

Le tube témoin sans antibiotique (1 mL de bouillon MH + 1 mL de suspension bactérienne diluée au 1/10 en bouillon MH) est utilisé pour évaluer l'inoculum initial (il devrait renfermer $\cong 10^6$ bactéries viables/mL) : Faire 4 dilutions de raison 10 en eau distillée stérile (50 μ L dans 450 μ L) : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} qui serviront pour l'interprétation des CMB car elles correspondent respectivement à 10%, 1%, 0.1% et 0.01% de survivants. Ensemencer 50 μ L des différentes dilutions et de l'échantillon non dilué (100% de survivants) sur la gélose TS.

- **Incuber** les tubes et les boîtes 18 à 24h à 37°C.

2) J2

- **Lecture de la CMI**

Déterminer la CMI

Précisez la catégorie S, R ou I de la souche

Dénombrer les colonies bactériennes de l'inoculum. Calculer le nombre de bactéries par mL de bouillon (chaque bactérie a donné naissance à une colonie) en tenant compte des dilutions.

- **Détermination de la CMB**

Dénombrer les survivants sur milieu gélosé pour tous les tubes limpides (sans pratiquer de dilution) : **Sécher 30 min. 1 gélose TS** - **Ensemencer 50 μ L** de chaque tube limpide sur cette gélose TS - **Incuber** les géloses à 37°C.

3) J3 - **Lecture de la CMB** - Déterminer la CMB en comparant le nombre de survivants dénombrés dans chaque tube limpide à la gamme étalon de l'inoculum initial.

Semaine 2

II - MUTATION (J1, J2, J3)

- **Principe.** Sélection de mutants spontanés résistants à l'acide nalidixique par la technique du gradient de Szybalski.

1) **J1**

- Préparation du milieu de culture :

On dispose de solutions mères d'antibiotiques à 10 g/L. La concentration finale en acide nalidixique dans la gélose Mueller Hinton (MH) doit être de 40 µg/mL.

- Calculer le volume de solution mère d'antibiotique à ajouter à 20 mL de gélose.
- Ajouter l'antibiotique à 20 mL de gélose de MH fondue et refroidie à ~ 50°C.
- Couler dans une boîte de Petri. Laisser solidifier **en position inclinée**.
- Lorsque la gélose est solidifiée, repérer l'axe et le noter sur le fond de la boîte.
- Mettre la boîte à plat et rétablir le niveau avec ~ 20 mL de gélose MH sans antibiotique fondue et refroidie à ~ 50°C.
- Laisser solidifier. L'antibiotique va diffuser et il s'établit un gradient de concentration allant de 0 à 40 µg/mL.
- **Mettre à sécher au moins 30 min. à l'étuve avant utilisation de la gélose.**

- Préparation de la souche bactérienne

La souche *Escherichia coli* 2 est distribuée sur gélose Trypticase Soja (TS).

Préparer une suspension **très dense (comme du lait concentré)** dans ~1 mL d'eau distillée stérile ($\geq 10^{10}$ bactéries/mL).

Ensemencer le milieu de culture par étalement **au râteau** de 0.2 mL de suspension bactérienne. Incuber 24h à 37°C.

- Sensibilité aux antibiotiques (voir fiche technique) :

Pratiquer un antibiogramme par la méthode des disques pour vérifier la sensibilité de la souche. Faire sécher 10 min. 2 géloses de Mueller-Hinton.

Ensemencer ces 2 géloses MH avec la même suspension bactérienne. Tester :

Boîte 1 : sulfamides, triméthoprime, acide nalidixique, streptomycine, kanamycine, gentamicine. Placer un disque de rifampicine au centre.

Boîte 2 : amoxicilline, amoxicilline+acide clavulanique, céfalotine, céfotaxime, ticarcilline, péfloxacin.

2) **J2**

- Lire l'antibiogramme (**voir fiche technique**).
- Repérer et compter les colonies de mutants résistants qui ont poussé dans la partie de la boîte où l'antibiotique est le plus concentré.
- Pratiquer un antibiogramme par la méthode des disques sur une colonie pour vérifier l'apparition de la résistance. Utiliser une suspension bactérienne moins diluée pour ensemencer **1 gélose MH** préséchée 10 min. : 1 colonie dans 10 mL d'eau distillée. Déposer les antibiotiques de la **boîte 1** et rajouter la **péfloxacin au centre**.

3) **J3**

Lecture de l'antibiogramme.

Semaine 2

III - CONJUGAISON (J1, J2, J3)

- **Principe.** Mise en contact directe de deux bactéries et transfert d'une information génétique d'une bactérie donneuse possédant les gènes *tra+* vers une bactérie receveuse (J. LEDERBERG et E. TATUM, 1946). Dans le TP, la sélection du transconjugant (recombinant stable) se fait sur un milieu de sélection contenant deux antibiotiques ; un correspond au marqueur de résistance chromosomique de la réceptrice et l'autre à un marqueur de résistance porté par des plasmides conjugatifs hébergés par la donatrice. La fréquence de transfert est estimée par le rapport entre le nombre de transconjugants et le nombre de bactéries donatrices.

1) J1

- Préparation du mélange Donatrice-Réceptrice :

Les bactéries donatrice et réceptrice sont distribuées en bouillon Trypticase Soja (TS).

Mélanger **1 ml de donatrice et 4 ml de réceptrice** dans un tube stérile.

Agiter doucement le tube pour homogénéiser le mélange.

Incuber 24h à 37°C dans le bain-marie **sans agitation**.

- Préparation du milieu de sélection :

On dispose de solutions mères d'antibiotiques à 10 g/L. La concentration finale en acide nalidixique et en kanamycine dans la gélose Mueller Hinton (MH) doivent être de 50 µg/mL.

- Calculer le volume de solution mère d'antibiotique à ajouter à 20 mL de gélose.

- Ajouter les antibiotiques à 20 mL de gélose de MH fondue et refroidie à ~ 50°C.

- Couler dans une boîte de Petri.

- **Laisser solidifier sans incliner.**

NB. Donner aux enseignants

- Les bouillons de la Donatrice et de la Réceptrice. Ils seront stockés à 4°C (voir J2).
- Le milieu sélecteur. Il sera mis à sécher à l'étuve puis stocké à 4°C (voir J2).

2) J2

- Sélection des transconjugants sur le milieu de sélection séché :

- Isoler sur ½ de boîte le mélange Donatrice/Réceptrice. **Etaler le contenu de 2 anses.**

- Isoler sur ¼ de boîte la Donatrice. **Etaler le contenu de 1 anse.**

- Isoler sur le ¼ de boîte restant la Réceptrice. **Etaler le contenu de 1 anse.**

- Incuber la gélose 24h à 37°C.

- Lecture des antibiogrammes de la Donatrice et de la Réceptrice.

Donatrice : La souche donatrice est la souche *E. coli* 2 utilisée dans le paragraphe Mutation (J1).

Réceptrice : La souche réceptrice est une souche *E. coli* sensible à toutes les molécules sauf à l'acide nalidixique. La bactérie pousse au contact du disque d'acide nalidixique.

- Relever son antibiogramme parmi les clichés fournis.

- Dénombrement de la Donatrice sur gélose TS. Voir le cliché numération donatrice :

En J1, 50 µL des dilutions 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} du bouillon de la donatrice ont été ensemencés sur une même gélose. La gélose a été incubée 24h à 37°C.

- Calculer le nombre de donatrice par mL.
- Evaluer la concordance et la pureté.
- Exploiter ce dénombrement en J3.

3) J3

- Milieu de sélection :
- Vérifier la sélectivité du milieu.
- Repérer les colonies des transconjugants.
- Calculer le nombre de transconjugants par mL (**volume 1 anse = 5 µl**).

- Estimer la fréquence de transfert pour 24 h de croisement.

La fréquence est le rapport entre nombre de transconjugants/ml et nombre de donatrices/ml.

- Lecture et interprétation de l'antibiogramme du transconjugant :
- Utiliser l'antibiogramme et/ou les clichés mis à votre disposition dans la salle de TP.

COMPTE RENDU par binôme : à rendre impérativement en J3 à la fin de la séance :

- CMI, CMB, rapport CMB/CMI, dénombrement du témoin.
- MUTATION et INTERPRETATION des ANTIBIOGRAMMES de la souche *E. coli 2* avant et après mutation.
- CONJUGAISON de la souche *E. coli 2* et INTERPRETATION.

Ne pas oublier les n° et nom des souches.

Utiliser le fichier compte-rendu **L3 UE 6.3 b : Bactériologie et Virologie Générales** disponible sur le site web <http://microbiologie.univ-tours.fr>

III - EXAMEN PRATIQUE INDIVIDUEL (J2 et J3)

Documents autorisés :

Un mélange de germes en bouillon TS est distribué à chaque étudiant pour

- isolement des différentes bactéries sur milieux sélectifs ou non
- Gram et Etat Frais (EF)
- identification au moins partielle (famille, genre ou espèce) des bactéries

Chaque étudiant est noté sur :

- la qualité des isolements
- les colorations de Gram et états frais
- sa démarche
- son compte rendu

Notation au cours de l'examen

Les étudiants pourront utiliser les réactifs pour les tests oxydase et catalase.

Les étudiants devront indiquer l'orientation de l'identification.

Les étudiants devront lister les milieux et réactifs qu'ils utiliseraient pour aboutir à l'identification des germes.

AUCUNE AIDE NE SERA APPORTÉE POUR REGLAGE ET LECTURE GRAM et EF

COMPTE RENDU INDIVIDUEL A RENDRE A LA FIN DE LA SEANCE EN J3

Ne pas oublier le n° du mélange.

Les comptes-rendus ne doivent pas décrire les techniques utilisées mais doivent comporter les résultats et la démarche suivie si possible sous forme de tableau.

REMARQUE

Un examen théorique de Travaux Pratiques aura lieu pendant les sessions de juin et de septembre sous la forme d'un contrôle écrit de 30 minutes sans documents.

NOTATION DES TP

Compte rendu semaine 1	: sur 20		- une note moyenne sur 20
Compte rendu semaine 2	: sur 20		
Examen pratique de TP	: sur 20		
Examen théorique de TP	:		- une note sur 20

Note finale sur 40 points, puis remise au coefficient de TP de l'UE.

Semaine 2