

PROGRAMME des TP de MICROBIOLOGIE de L2 SV2

2013/2014

CHAQUE ETUDIANT DOIT SE MUNIR D'UNE **BLOUSE EN COTON** ET D'UN **MARQUEUR A ENCRE INDELEBILE**.

Ces 2 séances de TP ont pour but de vous familiariser avec les premières étapes de l'identification de micro-organismes par leur culture, leur étude macroscopique et leur étude microscopique.

SEANCE 1

1) Transvasement stérile (travail individuel)

- **Matériel :**
 - 1 tube à essai avec 10 mL de bouillon Trypticase Soja (TS) stérile.
 - 2 tubes à hémolyse vides et stériles.
- **Manipulation**
 - transvaser Avec une pipette Pasteur, 1 à 2 mL de bouillon TS dans chaque tube à hémolyse.
 - Incuber 24 H à 37°C le tube à essai et 1 des 2 tubes à hémolyse.
 - L'autre tube à hémolyse servira au 2)

2) Souche à identifier (travail individuel)

- **Matériel :**
 - 1 isolement bactérien sur gélose TS en boîte de Petri. Noter son n°.
 - 1 gélose TS et 1 bouillon TS en tube à hémolyse préparé en 1)
- **Manipulation :**
 - Ensemencer le bouillon TS avec 1 colonie prélevée à l'anse de platine. Bien dissocier la colonie.
 - Faire 1 ré-isolement en quadrant sur la gélose TS à partir du bouillon TS que vous venez d'ensemencer.
 - Incuber 24 H à 37°C le bouillon TS et la gélose TS.
 - La suite de l'étude de cette souche se fera en séance 2.

3) Souches connues distribuées en bouillon (travail par binôme)

- **Matériel :** 2 cultures bactériennes en bouillon TS en tubes à hémolyse :
 - 1 culture d'un coque Gram⁺ : *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus agalactiae*
 - 1 culture d'un bacille Gram⁻ : *Enterobacter cloacae* ou *Pseudomonas aeruginosa*
- **Manipulation :**
 - état frais (voir fiche technique) : observer la mobilité, le type de groupement (et la forme) des bactéries.
 - coloration de Gram (voir fiche technique) : observer la couleur, la forme et le type de groupement.

SEANCE 2

1) Transvasement stérile (lecture)

Observer les bouillons avant et après agitation. Ils doivent être limpides.

2) Souche à identifier (suite)

- Étude macroscopique des colonies obtenues sur votre ré-isolement (voir fiche technique) :
- Un isolement réussi comporte au moins 10 colonies isolées et aucun contaminant.
- prélever et dissocier une colonie dans une goutte d'eau en observant son aspect.

Pour vous aider, plusieurs isollements comportant des colonies typiques sont en démonstration.

- Aspect du bouillon après culture : observer avant et après agitation.
- Coloration de Gram à partir du bouillon et/ou à partir d'une colonie (voir fiche technique).

4) Lames colorées sous microscope (travail individuel)

Une dizaine de préparations microscopiques montrent différents types de bactéries (B. sporulées, B. capsulées, B. spiralées, mélanges de coques, bacilles, Gram+ et Gram- etc...) et des colorations spéciales.

- Observez toutes les lames puis dessinez en 4 au choix avec soin. N'oubliez pas les légendes!

COMPTE-RENDU : Il est individuel et à rendre en fin de séance 2. Il se fait uniquement sur la feuille pré-remplie. N'oubliez pas les n° ou noms de vos tubes et boîtes et les légendes (échelle, grossissement, etc).

FICHE TECHNIQUE des TP de MICROBIOLOGIE de DEUG SV2

1) → **Règles à suivre lors des séances de TP.** Une étoile (*) indique que cette technique est décrite plus loin.

- 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*.
- Éviter 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.
- Éviter 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...).

→ **Désinfection.**

- **paillasse** : alcool 60° (ou eau de Javel à 3° chlorométriques) à l'aide d'un papier jetable.
- **peau contaminée** : **savon et alcool 60°.**
- **instruments** (pipette Pasteur, anse, etc...) : **flambage***.

→ **Aucun instrument (pipette, anse) ni objet contaminé ne doit être posé directement sur la paillasse.**

→ **Flambage des instruments et de l'orifice des tubes** : sert à stériliser localement tout objet métallique ou en verre.

Ouvrir la virole du bec Bunsen. Le flambage se fait dans le cône bleu de la flamme.

- **Orifice des tubes** : flamber 1 à 2 secondes. A faire après chaque ouverture et avant chaque fermeture de tube.
- **Anse de platine** : tenir l'anse verticalement ; placer la boucle métallique dans la flamme ; attendre qu'elle devienne rouge. La maintenir 5 secondes. A faire avant et après chaque utilisation.
- **Pipette Pasteur** : La pipette est utilisée soit boutonnée (fermée) pour prendre une colonie, soit ouverte pour prélever un liquide. Il faut l'ouvrir avant le flambage. Tenir la pipette horizontalement et passer lentement la partie effilée de la pipette 5 à 6 fois dans la flamme.

Laisser refroidir anses et pipettes environ 10 secondes avant tout contact avec un liquide, une colonie bactérienne...

Ne jamais passer du plastique ou la pince en bois dans la flamme.

2) **Étude macroscopique des colonies .** Choisir des colonies bien isolées. **Cette description doit mentionner :**

- **La taille : diamètre des colonies.** Vous pouvez mesurer cette taille à l'aide d'une règle graduée. On distingue les petites colonies (< 1 mm), les moyennes (1 à 3 mm), les grandes colonies (> 3 mm).
- **La forme avec vue de profil** (bombée, plate, ombiliquée, à bords surélevés ou en oeuf au plat) et **avec vue de dessus** (ronde, bords dentelés, en étoile, ovoïde).
- **L'aspect de la surface** (lisse, rugueuse, brillante).
- **L'opacité.** Les colonies opaques ne laissent pas passer la lumière contrairement aux translucides. Certaines sont très transparentes car laissent passer la lumière .
- **La consistance.** Elle se juge au moment du prélèvement. On distingue les colonies crémeuses des sèches et des muqueuses.
- **La couleur ou pigmentation.** La plupart des colonies isolées sur gélose ordinaire sont couleur crème = sans pigment mais certaines sont blanc porcelaine, jaune, vert, ;

Cette description aboutit à distinguer **3 types principaux de colonies :**

- **Colonies S** (smooth en anglais) : colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées de consistance crémeuse. Elles donnent des suspensions homogènes.
- **Colonies R** (rough en anglais) : colonies à surface rugueuse et bords souvent dentelés, plates, de consistance sèche. Elles donnent des suspensions hétérogènes.
- **Colonies M** (pour muqueuse) : colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées mais filantes au prélèvement à l'anse. Elles donnent des suspensions hétérogènes.
- Tous les intermédiaires sont possibles (ex. **SR**).

3) État frais.

- **A faire uniquement à partir d'un bouillon.** Déposer la suspension bactérienne avec l'anse de platine totalement refroidie (1 ou 2 anses) sur la zone centrale de la lame. **Éviter les excès de liquide** (risque de contamination et gêne l'observation)
- **Recouvrir d'une lamelle** le liquide. Éviter les bulles d'air. Recommencer au besoin.
- **Observer rapidement en faible luminosité SANS HUILE** : poser la lame avec lamelle sur la platine porte objet abaissée par rapport aux objectifs. Mettre l'**objectif x 40. Fermer le diaphragme. (Baisser le condensateur si le microscope le permet)**. Monter la platine porte objet jusqu'à 1 mm de l'objectif, puis observer la préparation. Faire le réglage en abaissant progressivement la platine porte objet tout en affinant la netteté avec la vis micrométrique.

JETER l'état frais (lame et lamelle) dans **le petit container jaune pour déchets contaminés.**

4) Coloration de Gram : *La coloration est en 4 temps principaux.*

Les bactéries Gram⁻ apparaissent roses et les Gram⁺ violettes à l'observation microscopique.

Étape 1 : réalisation d'un frottis qui est séché et fixé.

- A partir d'un bouillon** : déposer au centre de la lame 1 goutte de bouillon ; étaler
- A partir d'un isolement sur gélose** : déposer une petite goutte d'eau (flacon du portoir à colorants) au centre de la lame. Faire une suspension homogène avec une seule colonie prélevée à l'anse. Étaler sur environ ¼ de la lame.
 - Laisser sécher en chauffant **légèrement** la lame au-dessus de la flamme. Ne pas brûler les bactéries sinon l'observation sera délicate voire impossible. La lame doit être totalement sèche.
 - Fixer le frottis en versant 1 ou 2 gouttes (pas plus) d'alcool 100° sur la lame et enflammer à l'aide d'une allumette.
 - **Laisser refroidir.**

Étape 2 : coloration au violet de Gentiane suivie d'un mordantage par une solution iodo-iodurée de Lugol.

- Recouvrir toute la lame de **Violet de Gentiane**. Laisser 1 minute.
- Chasser le violet avec le **Lugol**. Laisser 1 minute.
- Rincer à l'eau . Egoutter la lame.

Étape 3 : décoloration à l'alcool

- Recouvrir la lame d'**alcool 100°**. Attendre 15 secondes.
- **Rincer immédiatement à l'eau** . Laisser un peu d'eau sur la lame.

Étape 4 : recoloration à la fuchsine. - Mettre 2 gouttes de **Fuchsine**. Laisser 1 minute.

- Laver abondamment à l'eau.
- Sécher délicatement la lame dans un papier jetable. Nettoyer au besoin **le dessous de la lame** avec un papier jetable . La lame doit être totalement sèche.
- **Observer à l'immersion en pleine lumière** : Mettre une goutte d'**huile à immersion** sur la lame totalement sèche . Observer à l'**objectif x 100** (objectif à immersion). **Ouvrir le diaphragme. (Monter le condensateur si le microscope le permet)**. L'objectif doit toucher la goutte d'huile.

5) Gestion des déchets.

Matériels non contaminés (papier, allumettes, etc...) : poubelle à papier en bout de paille, sous les éviers.

Cultures bactériennes en boîtes et bouillons : grands containers jaunes pour déchets contaminés en bout de paille.

Pipettes Pasteur, lames et lamelles : petits containers jaunes posés sur les pailles pour chaque binôme.

6) Entretien des microscopes.

Manipuler avec soin le microscope. Ne jamais mettre d'huile sur l'objectif x 40.

Oter les lames dès l'observation terminée.

Nettoyer les lentilles des objectifs et des oculaires avec du papier Joseph en début et en fin de séance.

Nettoyer la platine porte objet et le corps du microscope à l'alcool 60°. Pas d'alcool sur les lentilles.

7) Ranger la paille en fin de séance : éteindre et nettoyer avec soin le microscope* ; remplir les flacons de colorants; évacuer les déchets dans les poubelles adéquates et les colorants usagés dans les bouteilles à déchets ; couper l'arrivée de gaz ; ordonner et désinfecter la paille.