

Travaux pratique d'agents antimicrobien



ZENATI Fatima

Université ABOU BEKR
BELKAÏD

Faculté des SNV - STU

email : f_zenati@yahoo.com

1.0

27/2/2024

Table des matières

I - TP1 :Examen microscopique des bactéries	3
1. Objectif spécifique	3
2. Examen macroscopique (description des colonies)	3
3. Examen microscopique	3
3.1. Examen microscopique a l'état frais	4
3.2. Examen microscopique après coloration	6
Glossaire	10
Webographie	11

I TP1 :Examen microscopique des bactéries

L'identification permet de mettre en évidence une ou plusieurs propriétés biochimiques d'une bactérie. Elle se base sur les caractères morphologiques (examen macroscopique et microscopique), les caractères enzymatiques et biochimiques.

1. Objectif spécifique

💡 *Fondamental*

- Établir des observation microscopique des micro-organismes a l'état frais et après fixation
- Réaliser la mise au point avec le microscope et schématiser les résultat obtenu

2. Examen macroscopique (description des colonies)

🔍 *Définition : Examen macroscopique (description des colonies)*

Le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. Leur étude se fait à l'œil nu et à la loupe binoculaire. Permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. Les principaux caractères à étudier sont : La forme, Le relief, Le contour, La taille, La surface, l'opacité, La couleur, La consistance.

3. Examen microscopique

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des micro- organismes peut se faire à l'état frais soit après coloration.

3.1. Examen microscopique a l'état frais

But

Il permet l'étude microscopique des bactéries vivantes, en l'absence de toute fixation ou coloration. Cette méthode permet de mettre en évidence :

- La morphologie des bactéries
- Le mode de groupement
- La mobilité

Méthode

Prélèvement à partir d'une culture en milieu liquide :

- Homogénéiser la culture liquide à prélever.
- Flamber l'anse de platine ou pipette pasteur sur toute sa longueur.
- Déposer sur une lame propre une goutte de la suspension bactérienne prélevé d'une culture jeune en bouillon à l'aide d'une pipette pasteur ou anse de platine.
- Repasser l'anse de platine sur la flamme de bec bunsen jusqu'à rougissement de fil de platine, en cas d'utilisation de pipette pasteur celle-ci est déposée après usage dans un récipient contenant un désinfectant.
- Recouvrir la goutte d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air, la goutte doit être suffisante mais proportionnée à la lamelle choisie : le liquide ne pas déborder

Prélèvement à partir d'un milieu solide :

- Déposer une gouttelette de liquide (l'eau distillé) sur la lame.
- une trace de culture à l'anse de platine et l'émulsionner dans le liquide.
- Recouvrir d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air.
- Le liquide ne doit pas déborder (sinon jeter la lame et recommencer).

Remarque : en milieu solide, la mobilité exprime mal et de façon aléatoire.

Prélèvement à partir de produits alimentaire ou biologique :

Observation des micro-organismes à partir d'un pot de yaourt :

- Prendre une lame propre.
- Déposer une goutte du lactosérum du yaourt sur la lame.
- Recouvrir le frottis obtenu d'une lamelle
- Placer la lame sur le microscope.
- Faire la mise au point

⊕ Complément : Condition d'observation

- À l'objectif x40,
- Diaphragme quasiment fermé pour augmenter le contraste,
- Forte intensité lumineuse.

🔗 Remarque

Ne pas prolonger le temps d'observation au-delà de quelques minutes.

⊕ Complément : Observations (interprétation)

L'examen à l'état frais permet d'observer :

3.1.1. la morphologie et mode de groupement

Le tableau suivant représente les différents types de la morphologie et mode de groupement des bactéries

Formes sphériques : coques	Formes allongées
<ul style="list-style-type: none">*Forme ronde : ● Ex. : <i>Staphylococcus</i>*Forme ovale (ovoïde) : ● Ex. : <i>Streptococcus</i>	<ul style="list-style-type: none">* Formes droites :<ul style="list-style-type: none">court ■ Long ■■épais ■■ fin —Bouts ronds ■■ bouts carrés ■■Coccobacille ● Fusiforme ●* Formes particulières<ul style="list-style-type: none">> Forme incurvée) ex : <i>Vibrio</i>> Forme spiralée ~ ex : <i>Treponema</i>
<ul style="list-style-type: none">*Mode de groupement :<ul style="list-style-type: none">> isolé ●●> par deux (diplocoques) ●●> En flamme de bougie ●● ex. : <i>Streptococcus pneumoniae</i>> En grain de café ●● ex. : <i>Neisseria</i>> Par quatre : tétrade ●● ex : <i>Micrococcus</i>> En amas ●●●●> En chaînette ●●●●	<ul style="list-style-type: none">* Modes de groupement :<ul style="list-style-type: none">> isolés ■■ ■■> diplobacille ■■ ■■> En amas ■■ ■■> En chaînette ■■ ■■ ■■ ■■> En palissade ■■ ■■ ■■ ■■

Tableau : Forme et Mode de groupement

3.1.2. La mobilité

la mobilité

Une bactérie est dite mobile si elle se déplace dans le champ du microscope avec un mouvement qui lui est propre.

🔗 Remarque

Les bactéries mobiles peuvent laisser deviner leurs ciliatures :

- Un déplacement rapide linéaire : ciliature susceptible d'être polaire
- Un déplacement lent, circulaire et sinueux : ciliature susceptible d'être péritriche

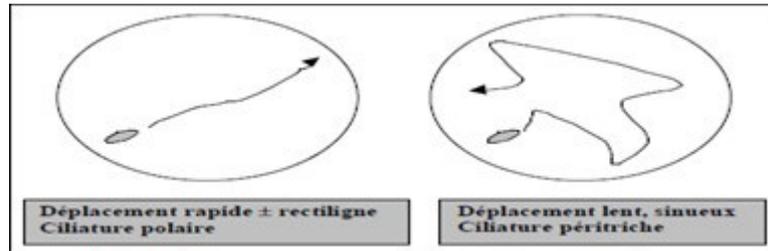


figure 1 :déplacement des bactéries en fonction de leur ciliature

Causes d'erreurs

Mobilité faussement positive :

- Mouvements browniens *

Mobilité faussement négative :

- Température de culture ne permettant pas la mobilité
- Prélèvement de la culture avec un instrument trop chaud
- Observation trop tardive

📎 Remarque : Élimination de la préparation

La préparation doit être immergée dans le pot "lames souillées" contenant de l'eau de Javel dès la fin des observations

3.2. Examen microscopique après coloration

L'examen après coloration permet d'observer des bactéries tuées fixées sur une lame et ayant subi l'action d'un ou plusieurs colorants. Les colorations, réalisées sur des frottis sèches et fixes, sont classées en :

- Coloration simple (un seul colorant)
- coloration différentielle type Gram
- Colorations spéciales des structures bactériennes (capsules, spores....).

Remarque

La réalisation de frottis de bonne qualité est une condition préalable à toute coloration.

3.2.1. Réalisation des frottis

⚙️ Méthode

Les frottis doivent être étalés en couche mince et régulière, puis séchés et fixés afin de pouvoir réaliser une coloration permettant ; observation au microscope.

Étalement sur lame de verre

- Notez la référence de l'échantillon sur une lame parfaitement propres et dégraissées

- Prélevez stérilement à l'aide d'une anse de platine une goutte de culture bactérienne et étalez un film mince

Séchage

- Le séchage est effectué à l'aire libre jusqu'à ce que le frottis présente un aspect mat.

Fixation du frottis sec

- Cette étape consiste à tuer les bactéries et les coller sur la lame, sans en altérer la structure. La fixation s'effectue par la chaleur :
- La lame, tenue par une pince (frottis situé sur le dessus) est passée 3 ou 4 fois dans la flamme du bec Bunsen. Laisser refroidir avant d'entreprendre une coloration.

3.2.2. Coloration simple (coloration au bleu de méthylène)

Par définition, une coloration simple veut dire colorer un frottis microbien par l'utilisation d'un seul colorant.

But

Déterminer la morphologie des cellules étudiées ainsi que leur mode de regroupement.

⚙️ Méthode

- Préparer un frottis.
- Fixer le frottis par la chaleur.
- Inonder le frottis de bleu de méthylène, attendre 5 minutes.
- Rincer le frottis à l'eau distillée.
- Sécher la lame avec du papier filtre (sans frotter).

⊕ Complément : Observation

Examiner à l'objectif **x100** à immersion (avec une goutte d'huile) avec un éclairage important (diaphragme ouvert).

Toutes les cellules apparaissent colorées en bleu.

Noter : la morphologie et le mode de groupement des bactéries

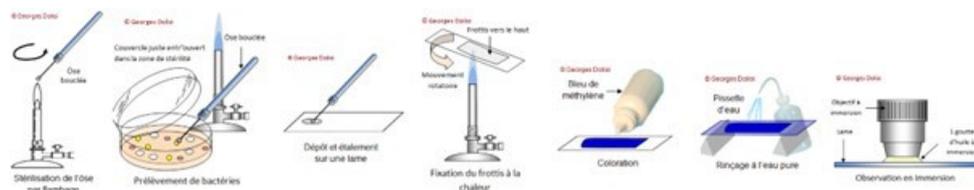


figure : coloration au bleu de méthylène

⊕ Complément : Avantages et inconvénients

- Coloration simple et rapide qui permet d'apprécier la morphologie des bactéries
- Peu d'échecs possibles

- Ne permet pas de différencier les bactéries de même morphologie.

3.2.3. Coloration différentielle coloration de gram

Définition

La coloration de Gram est la coloration différentielle microbiologique la plus importante et la plus largement utilisée, publiée par Hans Christian Gram en 1884, elle permet de différencier des bactéries dites Gram + de bactéries dites Gram -. d'après leur forme et d'après leur affinité pour les colorants

But

La coloration de Gram présente un double intérêt :

- Elle permet d'observer la morphologie bactérienne (forme, taille, groupement...) .
- Elle Permet d'observer une propriété à qui permet la classification des bactéries : l'alcool-résistance (ou Gram)

Principe

Le colorant utilisé est le violet de gentiane qui colore l'intérieur des bactéries. Celles-ci sont ensuite décolorées à l'alcool-acétone. En raison de leur paroi de structure plus épaisse et de composition chimique particulière, les bactéries Gram+ gardent la coloration violette. Les bactéries Gram-, avec une paroi plus fine et plus perméable à la décoloration, perdent la couleur violette. De manière à visualiser les bactéries Gram-, on recolore avec de la fuschine (rose). Les bactéries Gram+ resteront violettes alors que les Gram- seront maintenant teintées en rose(3) *

Méthode

réaliser un frottis et le fixer à la flamme

- Couvrir le frottis par le cristal violet (violet de gentiane) et laisser pendant 1 min.
- Rincer brièvement le colorant, à l'aide d'une pissette d'eau distillée pendant quelques secondes.
- Couvrir le frottis par le Lugol (solution de l'iode) et la laisser pour 1 min.
- Rincer brièvement le colorant, à l'aide d'une pissette d'eau distillée pendant quelques secondes.
- Décolorer par l'inondation du frottis par de l'éthanol 95% (pendant 4 à 6 secondes). Cette étape est critique. Les frottis épais auront besoin de plus de temps que ceux légèrement mince. La décoloration s'est produite quand le dissolvant coule incolore de la lame.
- Rincer brièvement le colorant, à l'aide d'une pissette d'eau distillée.pendant quelques secondes.
- Couvrir le frottis par la fuschine (safranine) pendant 1 min.
- Laver doucement pendant quelques secondes par de l'eau distillée, et sécher par un papier absorbant puis à l'air.
- Examiner la préparation (lame) sous immersion (microscope : objectif à immersion).

pour voir ce vedio cliquez *ici*

⊕ Complément : Observation

A l'issue de cette coloration, on peut distinguer :

- Des bactéries colorées en violet foncé ; elles ont gardé le violet, 'le gram' elles sont dites 'Gram positif'
- Des bactéries colorées en rose ou rouge pâle ; elles ont perdu le violet, 'le Gram' elles sont dites 'gram négatif.'

Glossaire

Mouvements browniens

est une description mathématique du mouvement aléatoire d'une « grosse » particule immergée dans un liquide et qui n'est soumise à aucune autre interaction que des chocs avec les « petites » molécules du fluide environnant.

Webographie

<https://www.bioutils.ch/protocoles/5-la-coloration-de-gram>