

N.GUEZLANE-TEBIBEL B.KAHLOUCHE S.ATHMANI-GUEMOURI

MICROBIOLOGIE

TRAVAUX PRATIQUES



2^{ème} année TCB et LMD

Office des Publications Universitaires

TABLE DES MATIERES

TP 1 INTRODUCTION A LA MICROBIOLOGIE

Méthodes d'études des micro-organismes

I- Définition	9
II- Buts	9
III- Notion de culture pure	10
IV- Matériel utilisé en microbiologie	11
IV-1 Le bec Bünsen	11
IV-2 Les boîtes de Petri	12
IV-3 Les tubes à essai	12
IV-4 La pipette Pasteur	12
IV-5 L'anse à ensemençer	13
IV-6 La pince à coton	13
IV-7 La verrerie utilisée pour la préparation des milieux de culture	14
V- L'entretien du matériel	14
VI- Les techniques de stérilisation	15
VI-1 Les méthodes physiques	16
VI-1-1 La stérilisation par les radiations	16
VI-1-1-1 Les rayons solaires	16
VI-1-1-2 Les rayons ultraviolets	16
VI-1-1-3 Les rayons X et Gamma	16
VI-1-2 La stérilisation par la chaleur	17
VI-1-2-1 La chaleur non contrôlée	17
VI-1-2-2 La chaleur contrôlée	17
VI-1-3 La stérilisation à basse température ambiante	21
VI-1-3-1 La filtration	21
VI-2 Les méthodes chimiques	23
VI-2-1 La stérilisation par les agents chimiques	23
VII- Le matériel lourd	26

TP 2 LE REGNE DES CHAMPIGNONS ou des EUMYCOTA

Identification du mycélium et des fructifications

I- Les caractères généraux des champignons	29
II- La nutrition	30
III- L'appareil végétatif ou thalle	30
III- 1 Le thalle unicellulaire	30
III- 2 Le thalle pluricellulaire	32
IV- Les organes de reproduction : les spores	34
IV- 1 La reproduction asexuée	34
IV- 2 La reproduction sexuée	36
V- La paroi des mycètes	39
V-1- Structure et biosynthèse de la paroi cellulaire d' <i>A. fumigatus</i>	39
VI- Classification actuelle	40
VII - L'identification	42
VII- 1 Les levures	42
VII- 1-1 Examen macroscopique	42
VII- 1-2 Examen microscopique	42
VII- 2 Les champignons filamenteux	43
VII- 2-1 Examen macroscopique	43
VII- 2-2 Examen microscopique	43

TP 3 LES MILIEUX DE CULTURE

I- Définition	51
II- Les qualités exigibles d'un milieu de culture	52
II-1 La composition	52
II-2 Le pH	54
II-3 L'isotonie	54
II-4 Le rH ou potentiel d'oxydo-réduction	55
II-5 Le taux d'humidité	56
III- La classification des milieux de culture	57
III-1- Leur consistance	57
III-2- Leur composition	58
III-2-1- Les milieux complexes	58

III-2-2- Les milieux synthétiques ou définis	59
III-3- Leur utilisation	59
III-3-1- Des milieux usuels ou milieux de base	59
III-3-2- Des milieux d'isolement	60
III-3-2-1- Des milieux d'enrichissement	60
III-3-2-2- Des milieux sélectifs	60
III-3-2-3- Des milieux différentiels	61
III-3-2-4- Des milieux électifs	61
III-3-3- Des milieux d'identification	61
III-3-4- Des milieux de conservation	61
IV- Composition de certains milieux de culture	61
IV-1- Le bouillon nutritif	61
IV-2- La gélose nutritive	62
IV-3- La gélose MacConkey	62
IV-4- La gélose de Chapman	62
IV-5- La gélose VF	62
IV-6- Milieu synthétique liquide pour l'isolement d'Escherichia coli	63
IV-7- Milieu Sabouraud	63
V- Préparation d'un milieu de culture	64

TP 4 LES TECHNIQUES D'ENSEMENCEMENT

I- Introduction	67
II- Le coulage des milieux gélosés en boîtes de Petri	68
III- Les règles générales sur l'ensemencement	68
IV- Les techniques d'ensemencement	69
IV-1 Ensemencement par stries ou par épuisement sur gélose	69
IV-1-1 Sur milieu solidifié incliné en tubes à essai	69
IV-1-2 Sur milieu solidifié en boîtes de Petri	70
IV-1-2-1 Isolement par épuisement sur trois secteurs ou cadrans	70
IV-1-2-2 Isolement par épuisement sur quatre secteurs ou quadrants	71
IV-2 Ensemencement en nappe ou par étalement	74
IV-2-1 En tubes à essai	74

IV-2-2 En boîtes de Petri	74
IV-3 Ensemencement dans la masse	74
IV-4 Ensemencement en touches ou en spots	74
IV-5 Ensemencement par piqûre centrale profonde	75
IV-6 Ensemencement dans un milieu liquide	75
V- Les précautions d'asepsie	75

TP 5 ETUDE MORPHOLOGIQUE DES COLONIES BACTERIENNES

I - Introduction	77
II- Définition d'une colonie	77
II-1 Observation macroscopique des colonies bactériennes	78
II-2 Conditions d'examen	78
III- La croissance des colonies	78
IV- Description morphologique	79
V- Aspects morphocultureux	81

TP 6 & 7 EXAMEN MICROSCOPIQUE DES BACTERIES APRES COLORATION SIMPLE ET COLORATION DOUBLE

LA COLORATION SIMPLE

I- La coloration des bactéries vivantes : coloration vitale ou à l'état frais	86
I-1 - La préparation de l'étalement	86
I-2 - La coloration	87
II- La coloration des bactéries tuées	88
II- 1 - La préparation de l'étalement	88
II- 2 - La fixation	89
II- 3 - La coloration	89

LA COLORATION DOUBLE OU LA COLORATION DE GRAM

I- Les caractéristiques des bactéries	90
I- 1 - Les Gram-positives	90
I- 2 - Les Gram-négatives	91
II- Principe de la coloration de Gram	93
III- Mécanisme de la coloration de Gram	93

IV- Méthode de la coloration de Gram	94
IV-1- Les réactifs utilisés	94
IV-2- Technique	94

TP 8 LA CROISSANCE BACTERIENNE

I- Définition	99
II - Coordonnées de la croissance	99
III - Les phases de la croissance	100
III-1 - La phase de latence	100
III-2 - La phase exponentielle	100
III-3 - La phase maximale stationnaire	101
III-4 - La phase de déclin	102
IV -Mesure de la croissance	103
IV- 1 - Mesure du nombre	103
IV- 1- 1 - Lecture au microscope	103
IV- 1- 2 - Dénombrement après culture : la méthode de dilution	105
IV- 1- 3 - Dénombrement après filtration	105
IV-2 - Mesure de la masse	107
IV-2- 1 - Détermination du poids sec	107
IV-2- 2 - Mesure du trouble	107
IV-3 - Mesure de l'activité	109
IV-3- 1- Mesure de la consommation de substrat	109
IV-3- 2- Mesure des variations physico-chimiques du milieu	109
IV-3- 3- Mesure des constituants cellulaires	109
V - Exercices d'application	113

TP 9 LES ANTIBIOTIQUES : ETUDE IN VITRO, L'ANTIBIOGRAMME

I - Introduction	115
II - Définition des antibiotiques	115
III - Définition de l'antibiogramme	116
IV - Détermination de la CMI par la méthode des dilutions	116
IV - 1 En milieu liquide	117

IV - 2 En milieu solide	119
V - La méthode de diffusion ou des disques en milieu solide	120
VI - Méthode du E-test	127
Annexe	133