



**TP DE MICROBIOLOGIE N°2**

# **IDENTIFICATION D'UN GERME RESPONSABLE D'UNE CYSTITE**



# PARTIE 1 : IDENTIFICATION D'UN GERME RESPONSABLE D'UNE CYSTITES

## I. INTRODUCTION

La cystite est une inflammation de la vessie. C'est une infection urinaire qui touche préférentiellement les femmes. Elle est le plus souvent d'origine bactérienne.

Après isolement de l'urine contaminé « contaminant » dans une gélose BCP on cherche à identifier le germe responsable. En microbiologie, la gélose BCP est un milieu non sélectif utilisé pour l'isolement et la détection et l'isolement des entérobactéries dans l'eau, les produits alimentaires, l'urine et les selles

## OBJECTIFS DE LA MANIPULATION

- Réaliser un état-frais et l'observer
- Réaliser une coloration de Gram et comprendre son principe
- Réaliser un test de mise en évidence de l'oxydase
- Réaliser un ensemencement sur gélose nutritive
- Utiliser et comprendre le principe de l'hématimètre de Malassez

## II. LES OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

*On travaille dans un milieu stérile à l'aide d'une flamme générée par un bec Bunsen. Après toute manipulation, les lames sont placées dans l'eau de javel pour être décontaminée.*

### 1. La 1<sup>e</sup> manipulation : Réalisation d'un état frais du « contaminant ».

L'état frais est l'observation des bactéries sous forme vivante. Les bactéries sont prélevées sur un milieu liquide favorable à leur mobilité.

A l'aide d'une pipette Pasteur, on prélève quelques gouttes de « contaminant » que l'on place sur une lame en dessinant des cercles afin de créer des bulles (espace air/liquide).

On dépose ensuite une lamelle sur la suspension.

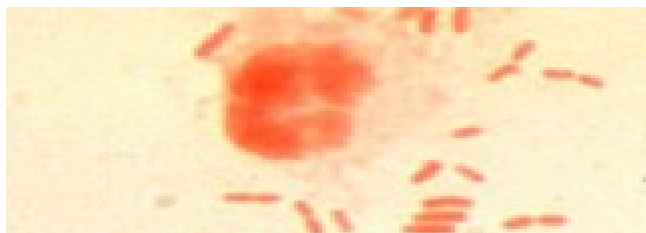
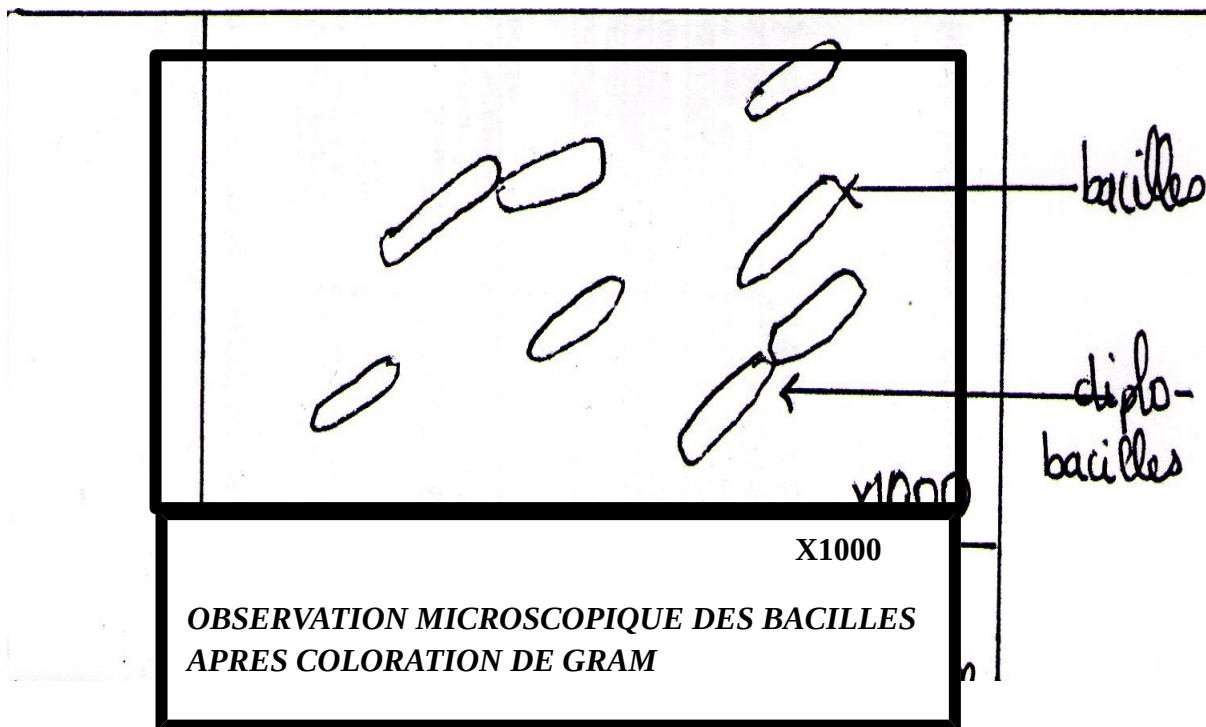
L'observation se réalise au microscope optique au grossissement x40 ; la mise au point est réalisée entre l'air et l'eau.

Ces observations nous permettent de conclure sur la forme, la taille, le groupement et la mobilité des bactéries. En effet, en milieu sec de nombreuses bactéries ne produisent pas de flagelles, il serait donc impossible pour nous de conclure sur la mobilité. C'est pour cela qu'on observe en milieu liquide.

Les résultats obtenus au microscope sont présentés dans le tableau suivant :

<b>Forme</b>	<b>Bacilles</b>
<b>Taille</b>	1 x 3 µm
<b>Groupement</b>	Isolés ou par deux
<b>Mobilité et ciliature supposée</b>	Mobiles à ciliature supposée péritriche

➤ Représentation schématique de l'observation



Urine au microscope optique X1000d'après le site [www.microbes-edu.org](http://www.microbes-edu.org)

2. 2<sup>e</sup>

ation Gram

La coloration de Gram est une technique de coloration qui très utilisée dans l'étude et la classification des bactéries en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Le principe de cette méthode, mise au point par le médecin danois Gram en 1884, est le suivant :

#### Réalisation d'un frottis en milieu stérile:

- dépôt d'une suspension bactérienne sur une lame
- Après quelques secondes, on écrase la lame sur la flamme afin de fixer les bactéries sur celle ci

Coloration au violet de Gentiane: on laisse reposer 30secs quelques gouttes de Gentiane sur le frottis

- On rince la lame à l'eau distillée

Coloration au Lugol: on dépose la solution de Lugol sur la lame pendant 30 secs

- on rince la lame à l'eau distillée

Décoloration: Des gouttes d'éthanol sont versées sur la lame jusqu'à ce qu'un nuage de couleur violette quitte la lame.

- On rince la lame à l'eau distillée

Coloration au Fuschine pendant 10s. La lame est ensuite rincée à l'eau distillée puis séchée entre deux papiers absorbants.

Cette méthode de coloration repose sur une différence fondamentale entre la composition chimique des parois des bactéries à Gram positif. On observe la lame finale au microscope à l'objectif x100, les observations sont reportées dans le tableau qui suit :

<b>Forme</b>	<b>Bacilles droits</b>
<b>Taille</b>	1 x 3 $\mu\text{m}$
<b>Groupement</b>	Isolés ou par deux
<b>Résultat de la coloration de Gram</b>	Bactéries colorées en rose : Gram négatifs

### III. MISE EN EVIDENCE DE L'OXYDASE

Les bactéries possédant l'enzyme oxydase peuvent oxyder le N-diméthyl-paraphénylène diamine en formant un produit violet.

En milieu stérile, sur une lame, on place un papier buvard imbibé de substrat. On dépose ensuite une suspension de bactérie sur le papier. La réaction a lieu au bout de 15 secondes.

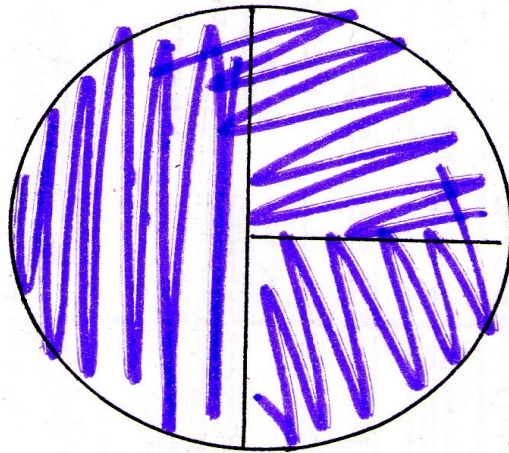
- Si Papier violet = enzyme possède une oxydase
- Si Papier incolore = l'enzyme ne possède pas d'oxydase

**En conclusion,** nous avons procédé à la manipulation précédente en utilisant la suspension du « contaminant ». Le résultat obtenu est négatif. On peut donc en conclure que notre bactérie ne possède pas l'oxydase et on suppose avec ces quelques résultats qu'elle appartient à la famille des Enterobacteriaceae.

### IV. REALISATION D'UN ISOLEMENT BACTERIEN SUR GELOSE NUTRITIVE

Un isolement bactérien permet d'obtenir des colonies isolées et donc des cultures pures.

Le principe repose sur une méthode d'épuisement. En effet, on réalise des étalements de la suspension bactérienne sur la gélose en milieu stérile, dans un sens déterminé afin d'obtenir des bactéries les plus isolées possibles. Les étalements sont réalisés selon la méthode des cadrans : on sépare la boîte de Pétri en 3 parties et on étale à l'aide d'une anse de pipette pasteur comme suit :



Après une nuit d'incubation (environ 15H) à 37°C, on observe la présence de colonies plus ou moins étalées :

<b>Forme</b>	Ronde et régulière
<b>Bord</b>	Régulière
<b>Taille</b>	De l'ordre du micron
<b>Surface</b>	Lisse
<b>Relief</b>	Semi-bombé
<b>Refllet</b>	Brillant
<b>Lumière transmise</b>	Translucide
<b>Pigmentation</b>	Incolore

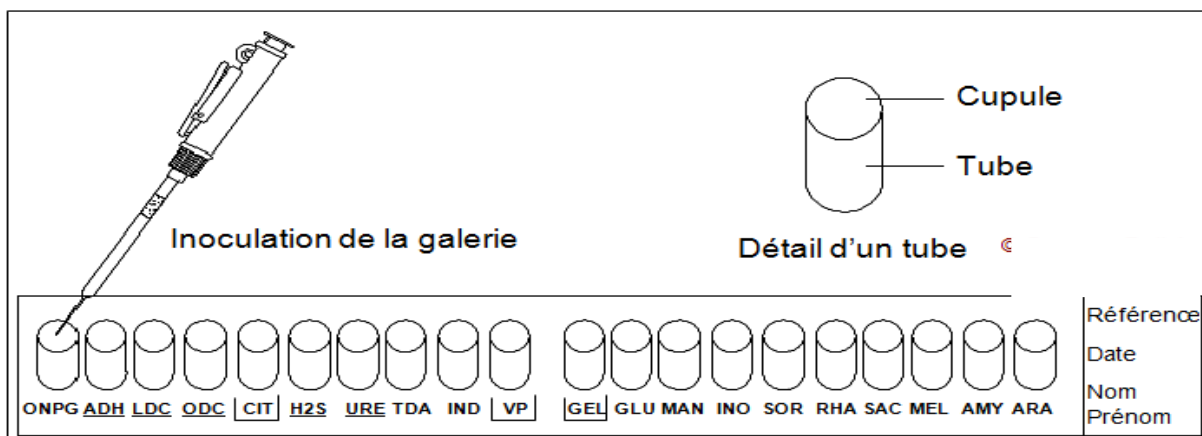
Les différentes caractéristiques relevées dans le tableau précédent permettent de conclure qu'il s'agit d'une bactérie de type S. D'autres tests ont permis de révéler d'autres particularités de la bactérie responsable de l'inflammation. Soit en récapitulant tous nos résultats :

- L'état frais conclut sur une bactérie bacille à mobilité péritriche,
- La coloration de Gram à un bacille Gram négatif,
- Le test à l'oxydase montre qu'elle n'en possède pas,
- La culture sur gélose relativement facile à un bacille de type S,
- Le test respiratoire permet de dire que cette bactérie est aéro-anaérobie facultative,
- Le test de Hugh et Leifson nous révèle que celle-ci est fermentative du glucose,
- Le test de réduction des nitrates est positif.

Ils nous permettent donc de confirmer qu'il s'agit d'une bactérie de la famille des Enterobacteriaceae qui constitue un groupe de bactéries fréquemment rencontrées en pathologies infectieuses comme dans les industries.

## V. CONCLUSION

Cette inflammation est donc causée par une bactérie de la famille des Enterobacteriaceae. On peut être plus précis en ce qui concerne l'identité de la bactérie responsable notamment à l'aide d'une galerie API qui est représentée sous formes de petits tubes permettant de réaliser aisément des tests biochimiques. Le principe d'utilisation d'une galerie API est le même que celui du complexe enzyme/substrat ; chaque cupule contient un substrat différent sur lequel va réagir le microorganisme. La galerie API 20<sup>E</sup> est la plus utilisée en ce qui concerne l'identification des entérobactéries comme E. coli par exemple.

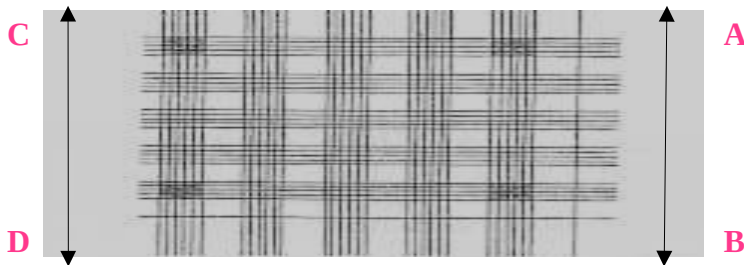


## PARTIE 2 : DENOMBREMENT D'UNE CULTURE DE LEVURE A L'AIDE DE L'HEMATIMETRE DE MALASSEZ

Notre but est de réaliser le suivi d'une fermentation d'une croissance de levures par dénombrement à différent temps T.

Le principe du dénombrement consiste à prélever l'échantillon à numérer et à le placer dans un volume connu contenu dans une cellule de comptage d'une lame microscopique en verre.

### ➤ Matériels et méthodes



Le quadrillage est constitué d'un grand rectangle (ABCD) de 2,5mm de longueur et de 2 mm de largeur.

Il est divisé en 100 rectangles égaux (25 clairs, 50 divisées en bandes, 25 divisés en 20 petits carrés).

La chambre parallélépipédique correspond au grand rectangle à un volume total de

$$V=2,5*2*0,20=1\text{mm}^3$$

Le parallélépipède correspond à chaque rectangle à un volume de :

$$V=0,25*0,20*0,20=0,01\text{mm}^3$$

On dispose de 5 solutions de levure prélevées respectivement aux temps T=0, T=40min, T=80min, T=120min, T=160min et d'une lamelle composées de p10 cupules munis d'hématimètre. Après homogénéisation des solutions, on remplies chaque cupule à l'aide d'une pipette (en veillant à bien disposer une solution par cupule). On dénombre les unités de levures au microscope optique à l'objectif x40 après avoir vérifié la répartition homogène des cellules.



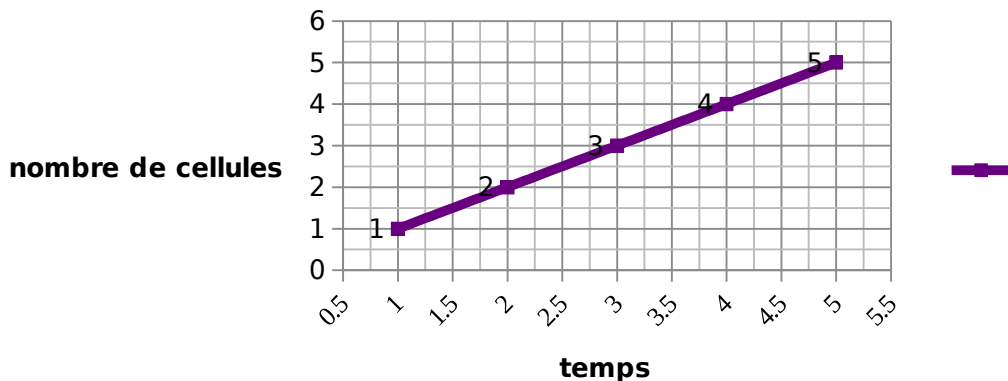
Lors du dénombrement on compte au moins 10 et au plus 100 cellules par unité de surface sur une dizaine de carrés en prenant en compte les éléments à cheval sur les limites. On trouve les résultats suivants :

T0	T40	T80	T120	T160
18	19	55	80	135
9	16	34	55	90
11	15	48	81	166
11	18	39	79	120

On constate effectivement une augmentation en nombre des levures au cours du temps.

Si on analyse les 2 premiers résultats surlignés de la première ligne, on observe qu'ils sont assez proches, on peut donc considérer une phase de latence (A) au début de la croissance. Après cette phase on distingue une augmentation régulière la représentation graphique de cette croissance est une courbe exponentielle comme suit :

**courbe de croissance d'une population de levures à différents temps T**



Il s'agit d'une méthode de dénombrement indirecte relativement simple à réaliser et surtout peu coûteuse. Il existe d'autres méthodes de dénombrement par exemple l

compteur de particule qui est une méthode de comptage directe qui permet de déterminer le nombre et la dimension des particules présentes dans un échantillon.