

# Introduction

La bactériologie fait partie de la microbiologie, c'est une science qui étudie les micro-organismes (bactéries). Invisible à l'œil nu elles sont de l'ordre du micromètre, il est donc nécessaire de les étudier au microscope photonique (objectif à immersion x 1000) mais elles peuvent être observées par microscopie électronique (à balayage ou à transmission) pour la recherche. Les bactéries font partie du règne des monomères, ce sont des procaryotes (opposés au eucaryotes qui ont un noyau) ayant un ADN circulaire. Elles peuvent vivre de façon isolée dans l'environnement (eau, sol, air) mais aussi dans des milieux extrêmes (hautes températures, concentration en NaCl ou Soufre ... très élevée ...). Mais on en trouve aussi vivant de façon symbiotique (Commensable) ou pathogène (exemple Bacilles de Koch : maladie du charbon). Elles sont utilisées aussi dans des domaines comme la pharmacologie, l'agro-alimentaire (yaourt), les recherches génétiques.

Nous avons effectué trois séances de travaux pratiques qui ont pour but de nous familiariser aux différentes techniques nécessaires à une identification d'un mélange bactérien (numéroté 7). Nous allons donc adopter une démarche d'identification proche des laboratoires d'analyses médicales sur notre mélange.

## II. Méthodes

### 1) Repiquage de la culture

Le repiquage des bactéries est nécessaire pour obtenir un nombre de bactérie correcte pour les analyses. Le repiquage se fait par la culture de bactéries dans un milieu nutritif à 37° C pendant 24 heures. Cette étape n'a pas été effectuée par nos soins lors de ses séances de travaux pratiques.

### 2) Observations microscopiques

La première étape est l'observation microscopique, elle se fait en deux temps. Il y a tout d'abord l'observation microscopique à l'état frais (objectif à immersion x 1000), les bactéries sont vivantes, on peut alors déterminer des caractères tel que la morphologie générale, la mobilité et le groupement (bacille ou coque) ainsi que le type de colonies. Mais pour mieux les caractériser nous allons effectuer une coloration de Gram, cette coloration différentielle est basée sur la paroi des bactéries qui peuvent avoir une couche de peptidoglycane mince ou épaisse. Si la bactérie possède une couche de peptidoglycane épaisse elle va fixer le violet de gentiane-lugol et donc avoir une paroi colorée en violet elle est dite de Gram +. Par contre si elle possède une couche de peptidoglycane mince elle va fixer la fuchsine elle sera donc colorée en rose elle est dite Gram -. Les manipulations doivent être faites dans des conditions de stérilisation optimales (atmosphère stérile autour du bec benzène, stérilisation des ustensiles, et lavage des mains) pour éviter toute infection d'autres espèces bactériennes non étudiées.

### 3) Isolement des bactéries

Après l'identification au microscope des différents types bactériens, on cherche à isoler les bactéries du mélange pour permettre de les identifier. Pour cela nous allons utiliser la technique d'isolement par strie sur gélose coulée dans des boîtes de pétris (la méthode d'isolement par épuisement de la semence cf. schémas 1).

Nous allons coupler cette technique d'isolement des bactéries l'utilisation de milieux de culture sélectif à des groupes de bactéries. Nous allons utiliser trois milieux sélectifs présentant des caractéristiques différentes et un milieu non sélectif qui nous permettra l'observation macroscopique de toutes les colonies.

- Milieu non sélectif qui est une Gélose Nutritive Ordinaire (GNO): il est utilisé pour l'observation macroscopique des différentes colonies de la semence, on va pouvoir décrire les colonies, le nombre d'espèces du mélange correspond au nombre de colonies différentes présentes dans le milieu non sélectif. Toutes les colonies se développant hors des stries d'isollements seraient une contamination possible.
- Milieu de gélose à l'éosine et au bleu de méthylène (EMB) : ce milieu permet le développement des entérobactéries, le bleu de méthylène inhibe les bactéries Gram +, et grâce à l'éosine (indicateur de pH) on peut déterminer si les entérobactéries présentes peuvent dégrader le lactose suivant les modalités suivantes :
  - Colonies violettes ou noires : Lactose +
  - Colonies de couleur claire : Lactose –
  - Colonies violets pâles avec atmosphère : faible Lactose +.
- Milieu de Chapman : ce milieu est sélectif pour les bactéries halophiles c'est à dire les staphylocoques ou les microcoques. L'utilisation du mannitol par les bactéries est marquée par une coloration jaune autour des colonies Mannitol + et une coloration rouge autour des colonies Mannitol –, du à l'indicateur de pH du rouge de phénol.
- Milieu D-coccosel (DC) : milieu sélectif pour les coques Gram+, mais on l'utilise pour l'isolement des streptocoques, entérocoques, bactéries capables de provoquer des infections urinaires. L'utilisation par les entérocoques de l'esculine (glycide) donne une coloration noirâtre du milieu avoisinant les colonies. Cette coloration est spécifique des streptocoques du groupe D.

Les boîtes de pétris sont placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures et sont ensuite placées au réfrigérateur en attendant l'observation durant une semaine.

L'isolement des bactéries dans le milieu non sélectif va nous permettre d'observer les différentes colonies et de déterminer les caractéristiques tel que : leur forme, leur opacité, leur taille, leur couleur et l'aspect de surface. Ainsi nous pourrons savoir le nombre d'espèces présentes dans le tube N°7. Les différentes colonies seront ensuite observées au microscope (frais et coloration de Gram) afin de vérifier s'il y a la présence d'un seul type de bactéries par colonie, mais aussi si nous avons les mêmes bactéries que lors de la première observation.

Pour affiner nos recherches d'identification des types bactériens, on va rechercher des caractéristiques Biochimiques. Pour cela nous avons recours à des tests biochimiques tel que l'API20E pour les entérobactéries, DNase, Coagulase catalase pour les staphylocoques aureus. Mais pour ce TP, on va chercher le type respiratoire du cocci de notre mélange par le test Viande-Foie et nous ferons ensuite un test de résistance aux antibiotiques du bacilles.

#### **4) Test Viande Foie**

Ce test permet de déterminer le type respiratoire des bactéries présentes dans notre mélange bactérien N°7. Ce test est réalisé sur les bactéries type cocci qui ont été prélevées dans le milieu sélectif approprié précédemment (Chapman). Ce test s'effectue dans un tube présentant de la gélose Viande-Foie (VF), on y introduit la semence avec une pipette pasteur en effectuant un mouvement spiralé de bas en haut. Les bactéries aérobies strictes se

développent proche de la surface du tube tandis que les aéroanaérobie se développent dans tout le tube.

### **5) Test de résistance au antibiotiques**

Nous allons par la suite tester l'efficacité d'antibiotiques sur les bacilles de notre mélange. Pour cela nous allons utiliser une gélose Mueller Hinton (MH) dans une boîte à pétrisensemencée par les bacilles prélevés dans le milieu EMB (préalablement dilué dans de l'eau stérilisée) on disposera alors des pastilles d'antibiotiques différents (6 pour une boîte de pétris) suivant la disposition du schémas II.

Après étuvage à 37 °C pendant 24 heures nous pouvons obtenir des diamètres sans bactérie (zone d'inhibition) autour des pastilles d'antibiotique. Si ce diamètre est inférieur au **d** annoncé par le fabricant de l'antibiotique la bactérie est dite résistante à celui ci, par contre si le diamètre est supérieur au **D** elle est dite sensible, entre **d** et **D** la bactérie est dite intermédiaire.

## **III. Résultats**

### **1) Observation microscopique**

Technique	Type bactérien I	Type bactérien II
Etat frais	Bacilles immobiles	Cocci immobiles
Coloration Gram	Bacilles Gram- - bouts ronds - Coloration bipolaire - Pas de spores - Groupement par 1 ou 2 (diplobacilles)	Coques Gram+ - en amas irréguliers (quelques-uns un en grappes de raisins) - Ovoïdes
Proportion	50 %	50 %

## 2) Isolement des bactéries sur milieu sélectif

Observation de l'isolement des bactéries sur le milieu non sélectif GNO :

	Colonies type I	Colonies type II
Caractéristiques de l'aspect macroscopique des colonies	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forme circulaire</li> <li>- Couleur Beige</li> <li>- Opacité translucide</li> <li>- Taille 1 à 2 mm</li> <li>- Aspect brillant</li> <li>- Relief convexe</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forme circulaire</li> <li>- Couleur blanche</li> <li>- Opacité opaque</li> <li>- Taille 1 à 1.5 mm</li> <li>- Aspect brillant</li> <li>- Relief plat</li> </ul>
Coloration de Gram de chaque colonies	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacilles</li> <li>- Gram -</li> <li>- A bouts ronds</li> <li>- Par 2</li> <li>- Pas de spores</li> <li>- Coloration bipolaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coques</li> <li>- Gram +</li> <li>- Amas irréguliers</li> <li>- Ovoïde</li> <li>- Petite taille</li> </ul>
Test milieu sélectif EMB	Observation de colonies violettes de petites tailles, la présence de la colonie et la couleur violette permet de dire que cette bactérie est une entéro bacté r i e, et qu'elle utilise le lactose donc Lactose +.	
Test milieu sélectif Chapman		Présence de petites colonies, le milieu est orangé, il n'y a pas eu de virage au jaune donc pas de Mammitol (Mammitol -)
Test milieu sélectif D-C	Pas de colonie sur ce milieu donc pas streptocoques	

## 3) Test Viande Foie

L'observation du test viande foie nous montre un développement important des bactéries proches de la surface du tube, mais une observation plus poussée du tube montre la présence de quelques colonies sur toute la surface du tube ce qui nous laisse penser que les coques que nous avons sont aéroanaérobie (à dominance aérobie).

## 4) Test résistance au antibiotiques

Résultats :

Antibiotique	Diamètre mesuré	d	D	Sensibilité
Tétracycline	10 mm	17 mm	19 mm	Résistante
Ampicilline	15 mm	11 mm	17 mm	Intermédiaire
Kanamycine	28 mm	15 mm	17 mm	Sensible
Acide Nalidixique	28 mm	15 mm	20 mm	Sensible
Rifampicine	21 mm	14 mm	19 mm	Sensible
Streptomycine	19 mm	13 mm	15 mm	sensible

On remarque que le bacille est résistant à un seul antibiotique (Tétracycline) et sensible aux autres antibiotiques excepté à l'Ampicilline qui a une position intermédiaire.

## IV. Interprétations

La première observation microscopique que nous avons réalisé avant les autres études nous a permis d'identifier deux groupes de bactéries : un bacille Gram – et une coque Gram +.

Le bacille que nous avons dans le mélange se présente en groupement de un ou deux (diplobacilles), l'observation après coloration de Gram révèle que ces bacilles sont Gram – et présentant une coloration bipolaire. L'observation microscopique des colonies se développant sur le milieu EMB (qui est propre aux bacilles Gram -) est identique à celle effectuée lors de la première observation, et le fait que ces bacilles aient une couleur violette nous indique que nous avons une entérobactérie synthétisant du lactose donc Lactose + ce qui est confirmé par le fait que les entérobactéries sont des bacilles Gram -. Il est donc évident que nous avons là une entérobactérie lactose + qui est sensible à 4 antibiotiques sur les 6 testés (Tétracycline, Kanamycine, Acide nalidixique, Rifampicine et Streptomycine) si ce bacille était pathogène on utiliserait un de ces antibiotiques.

Si l'identification du bacille est relativement simple celle du cocci l'est beaucoup moins. La bactérie que nous avons là est une coque Gram –, et d'après les observations microscopiques la détermination du groupe ou de la famille en est plus difficile. On sait que ce coque n'est pas un streptocoque car il ne se développe pas sur le milieu sélectif DC, qui permet seulement le développement des streptocoques D. Il reste alors deux solutions, nous avons donc la possibilité entre un microcoque ou un staphylocoque. L'observation microscopique ne permet pas de les différencier car nous avons une répartition irrégulière et une répartition en grappe de raisin qui correspondent aux deux types de bactéries que nous envisageons. De plus le test de Viande-Foie aurait pu nous permettre de trancher la question mais le test est ambigu nous avons un développement important au niveau supérieur mais on remarque la présence de colonies (en faible quantité) dans tout le tube. Si le coque en question est aérobie stricte alors c'est un microcoque mais si le coque est anaéroaérobie c'est un staphylocoque. La culture sur milieu sélectif Chapman est elle aussi ambiguë le virage du milieu au jaune n'est pas net et ne nous permet pas de trancher sur la question. Cette ambiguïté peut être due au temps où les cultures sont stockées au réfrigérateur, ce qui pourrait altérer ou altérer les couleurs (malgré les basses températures) issue de la culture.

Des tests supplémentaires tels que la DNase, la coagulase ou galerie API staph permettraient d'identifier ce coque Gram +. Mais si nous considérons que le test de Viande-Foie montre un coque anaéroaérobie et que nous considérons aussi que le virage du jaune a été atteint (donc Mammitol +) nous pouvons dire alors que nous avons un staphylocoque.

## Conclusion

Dans notre mélange bactérien, nous avons une souche bactérienne de type bacille Gram -: une entérobactérie lactose +, et un coque Gram + de la famille des micrococcaceae. L'entérobactérie lactose + est aussi appelée coliformes, elles sont les témoins d'une contamination humaine dans les produits alimentaires. L'utilisation d'un des antibiotiques donc nous avons testé la sensibilité lors de ce TP permettrait de contrer une infection, le fait que notre bacille soit sensible à quatre des six antibiotiques est intéressant dans le cas où le bacille tolérerait un de ces antibiotiques. C'est travaux pratiques nous ont donc permis de comprendre les méthodes utilisées dans les laboratoires d'analyse pour déterminer les bactéries à l'origine des infections ou des intoxications.