

**TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE
ENVIRONNEMENTALE**

Filière SVI - Semestre 6

(2019-2020)



Responsable : Pr. Salah Eddine SAMRI

Table des matières

Règles à suivre lors des TP de microbiologie	3
I. MICROBIOLOGIE DU SOL	1
I.1 Introduction à l'analyse microbiologique du sol	1
I.2 Examen direct de la terre prélevée	1
I.3 Dénombrement de différents groupes systématiques.....	1
I.3.1 Préparation des suspensions dilutions de terre.....	1
I.3.2 Numération de la microflore totale	2
I.3.3 Numération des champignons	2
I.3.4 Numérations des bactéries sporulées	2
I.3.5 Isolement et reconnaissance des actinomycètes.....	2
I.4 Numération de quelques groupes fonctionnels	2
I.4.1 Groupe fonctionnels du cycle de l'azote : Fixateurs aérobies d'azote	2
I.4.2 Groupe fonctionnels du cycle de carbone	3
I.5.2.1 Numération des germes Cellulolytiques	3
I.5.2.2 Numération des germes Amilolytique	4
II. MICROBIOLOGIE DE L'EAU	4
II.1 Introduction à l'analyse microbiologique de l'eau.....	4
II.2 Recherche des coliformes fécaux dans les deux types d'eau : eau usée et eau de puits..	5
II.2.1 Cas de l'eau usée :	5
II.2.2 Cas de l'eau de puits :	6
III. BIOTECHNOLOGIE MICROBIENNE	7
III.1 Introduction à la biotechnologie des Actinobactéries	7
III.2 Criblage d'Actinobactéries productrices d'antibiotique	7
III.2.1 Préparation des microorganismes test	7
III.2.2 Technique des cylindres d'agar	8
III.2.3 Lecture des résultats	8
ANNEXE : Composition des milieux de cultures et réactifs	9

Règles à suivre lors des TP de microbiologie

Les TP de microbiologie exigent une tenue exemplaire. Les manipulations doivent y être effectuées avec grand soin, gardant à l'esprit le danger toujours présent qu'entraîne l'utilisation de cultures microbiennes. Voici quelques règles à suivre :

1. Le port d'une blouse est de rigueur. Elle devra toujours être propre.
2. Ne jamais oublier de se laver les mains avant et après chaque séance de TP
3. Désinfecter les paillasse avant et après chaque période de travaux pratiques.
4. L'étudiant(e) aux cheveux longs verra à les attacher surtout lors d'un travail exigeant l'emploi d'un bec à gaz.
5. Eviter de porter ses doigts ou tout objet à sa bouche.
6. Les instruments de travail contaminés ne seront déposés sur table qu'après avoir été stérilisés par un flamage adéquat.
7. Eviter de laisser les becs Bunsen allumés inutilement.
8. Pendant les travaux pratiques, éviter de parler, notamment lorsque des ensemencements sont faits, éviter également de se déplacer inutilement
9. Déposer tout matériel qui n'est pas utile, dans les récipients destinés à cette fin.
10. Etiqueter soigneusement les cultures avant de les porter à l'étuve.

I. MICROBIOLOGIE DU SOL

I.1 Introduction à l'analyse microbiologique du sol

La microbiologie du sol est une discipline qui a pour but d'étudier les comportements des micro-organismes dans leur milieu naturel : le sol, et de l'influence qu'ils exercent sur lui par les fonctions physiologiques des divers groupes bactériens. Les fonctions remplies par tous ces groupes sont le résultat de réactions organisées en séries complexes et intriquées (oxydations - réductions - minéralisation ...) qui souvent s'organisent elles même en chaînes fermées (cycle de l'azote, du carbone, du soufre, ..) déterminant ainsi les conditions de vie des végétaux au niveau d'un sol et assurant à la surface du globe la "conservation" autant que la "régulation" des éléments indispensables à la vie.

L'étude des micro-organismes du sol fait appel à des moyens et techniques diverses, nous nous bornerons au cours de ces travaux pratiques à ce qui suit :

- Numération des populations microbiennes (Bactéries, Actinobactéries, Champignons),
- Mise en évidence des germes intervenant du cycle de l'azote et du carbone.

I.2 Examen direct de la terre prélevée

Les échantillons à étudier provient de la région de Nador et de Merzouga. Le prélèvement du sol (100 à 500 g) a été effectué dans des flacons en verre stériles à l'aide d'une spatule stérile après écartement des cinq premiers centimètres du sol.

I.3 Dénombrement de différents groupes systématiques

▪ Principe :

Ensemencement de milieux de culture spécifiques et/ou incubation dans des conditions particulières puis dénombrement des colonies apparues.

I.3.1 Préparation des suspensions dilutions de terre

▪ Matériel

- Erlenmeyer de 250 ml contient 90 ml d'eau physiologique stérile (Solution de NaCl 9 g/l).
- Une série de tubes de 1,5 mm de diamètre contenant 9 ml d'eau physiologique stérile chacun et numéroté de 1 à 9
- Pipettes graduées de 1 ml stériles.

▪ Mode opératoire (Figure I.1)

- Peser 10 g de terre (poids frais).
- Dissoudre dans un Erlenmeyer contenant 90 ml d'eau physiologique.
- Agiter vigoureusement la suspension mère pendant 10 min. On obtient ainsi la solution mère diluée au 1/10^{ème}, soit la suspension 10⁻¹.
- A l'aide d'une autre pipette, prélever 1 ml de la dilution 10⁻¹ puis transférer dans le tube n°2. Agiter, on obtient la suspension dilution 10⁻².
- En suivant la même technique, et en changeant de pipette à chaque passage, préparer à partir de chaque dilution, la suivante jusqu'à 10⁻¹⁰.
- Les différentes suspensions - dilutions ainsi préparées, doivent être immédiatement utilisées pour l'ensemencement des divers milieux de culture.

I.3.2 Numération de la microflore totale

Ensemencement par la technique du râteau avec les dilutions 10^{-5} à 10^{-7} de la gélose nutritive (GN) en boîtes de Pétri à raison de 0,1 ml par boîte et trois boîtes par dilution. Inculper à 30°C . Après 7 jours, compter pour chaque dilution le nombre de colonies sur les trois boîtes correspondantes. Calculer la moyenne par dilution et rapporter.

I.3.3 Numération des champignons

Ensemencer comme précédemment du Malt-Agar (MA) ou PDA (Potatos Dextrose Agar) avec les dilutions 10^{-1} à 10^{-3} . Incuber à en position non retournée. Lire et interpréter les résultats après 7 à 12 jours d'incubation.

I.3.4 Numérations des bactéries sporulées

Utiliser le même milieu que pour les bactéries totales mais les dilutions 10^{-5} à 10^{-7} sont chauffées pendant 10 min à 80°C (Pasteurisation) avant l'ensemencement. Lire et interpréter les résultats après 7 jours d'incubation à 37°C .

I.3.5 Isolement et reconnaissance des actinomycètes

- Ensemencer le milieu Bennett (BN) par les dilutions 10^{-2} à 10^{-3}
- Incuber comme pour les champignons
- Compter après 7 jours d'incubation le nombre de colonies d'actinomycètes et rapporter à 1 g, de sol. Ces colonies sont souvent d'aspect corné avec un centre proéminent et incrusté dans le milieu.

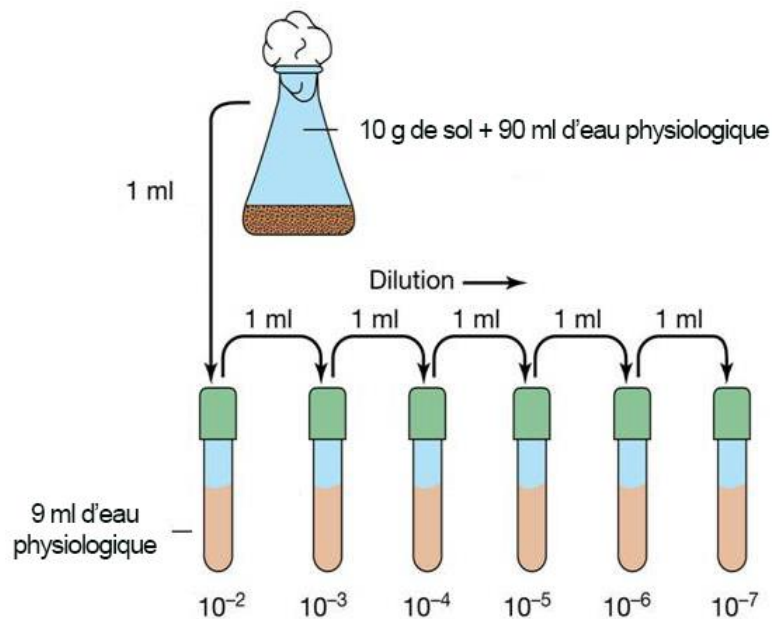


Figure I.1 : Représentation schématique de la réalisation de suspension-dilution du sol.

I.4 Numération de quelques groupes fonctionnels

I.4.1 Groupe fonctionnels du cycle de l'azote : Fixateurs aérobies d'azote

▪ Principe :

Ensemencer des milieux de culture ne contenant pas d'azote combiné et apprécier le développement des *Azotobacter* par leur aspect caractéristique.

- **Technique :**

L'appréciation de la richesse d'un sol en *Azotobacter* peut être réalisée plus rapidement en déposant des grains de sol, sur des plaques de Silicogel.

NB : La méthode des Silicogels est très utilisée en microbiologie du sol, elle permet de se rapprocher le mieux des conditions de vie des bactéries dans le sol.

- **Préparation des plaques de Silicogel** (Méthode de Winogradsky)

-Mélanger en parties égales une solution de silicates de soude et une solution de HCl ensuite verser 30 ml du mélange dans des boîtes de Pétri. Abandonner sur une table les boîtes ouvertes jusqu'à prise du gel (environ 30 heures).

- Laver le gel sous l'eau courante jusqu'à élimination de l'excès d'acide (pH = 7). Ce support est prêt pour y imprégner toute solution énergétique à tester.

- **Préparation du milieu :** imprégnation du silicogel

- Imprégner une plaque de Silicogel en boîte de Pétri avec 2 ml de solution minérale de Winogradsky (voir annexe) contenant en plus comme élément énergétique 25% de glucose et de 15 % de CaCO₃.

- Répartir la solution le mieux possible, en inclinant les boîtes de divers côtés puis les placer, couvercle enlevé, à 55 °C jusqu'à ce que tout excès de liquide ait disparu. Le milieu est ainsi prêt à l'emploi.

- **Ensemencement :**

- Grâce à une pipette Pasteur boutonnée et mouillée, prélever un grain de terre et le déposer à la surface du gel, en prenant soin de le faire bien adhérer au gel.

- Disposer ainsi régulièrement jusqu'à 30 grains par boîte et incuber à 28 °C.

- **Lecture des résultats**

- Après 2 à 3 jours d'incubation, les grains positifs seront entourés d'une colonie hyaline, visqueuse et brunissant tardivement ce sont les *Azotobacter*.

- Faire alors une observation microscopique après coloration à l'érythrosine pendant 1 min et noter les différentes formes d'*Azotobacter*.

- Etablir le pourcentage de grains positifs.

- Comparer les deux types de sol étudiés.

- Quel est l'intérêt, au point de vue agronomique, de la présence de ces germes dans un sol ?

I.4.2 Groupe fonctionnels du cycle de carbone

1.5.2.1 Numération des germes Cellulolytiques

- **Principe :**

Ensemencement avec des suspensions -dilution de terre, d'un milieu où la cellulose est fournie sous forme de papier filtre comme source de carbone, estimation de l'utilisation de la cellulose par virage au jaune de l'indicateur du milieu.

- **Mode opératoire :**

Ensemencement avec des suspensions - dilutions de terre, de l'eau peptonée additionnée de rouge de phénol et de morceaux de papier filtre, 1 à 2 ml par tube, 3 tubes par dilution de 10^{-2} à 10^{-5} . Incuber à 28°C.

- **Lecture des résultats :**

Après 15 jours de culture, compter pour chaque dilution le nombre de tubes où le rouge de phénol a viré au jaune et expliquer les résultats obtenus.

1.5.2.2 Numération des germes Amilolytique

- **Principe :**

Ensemencement avec des suspensions dilutions de terre d'un milieu nutritif solide additionné d'amidon soluble comme source de carbone et évaluation des germes amilolytiques après précipitation de l'amidon.

- **Mode opératoire :**

Ensemencement avec des suspensions -dilution de terre, (méthode du râteau) de la gélose nutritive additionné d'amidon à 1% en boîte de Pétri, 0,5 ml par boîte par dilution de 10^{-2} à 10^{-4} . Incubé à 28°C.

- **Lecture des résultats**

Après 15 jours de culture, verser à la surface du milieu dans chaque boîte de l'éthanol à 95°. Le milieu s'opacifie et devient blanchâtre sauf dans les zones où l'amidon a été hydrolysé. Compter pour chaque dilution, le nombre de colonies amylolytique sur les 3 boîtes correspondantes et en déduire le nombre de germes par gramme de terre.

II. MICROBIOLOGIE DE L'EAU

II.1 Introduction à l'analyse microbiologique de l'eau

Le risque sanitaire lié à la fréquentation des milieux contaminés, devient de plus en plus important principalement lorsque ces milieux reçoivent des contaminants pathogènes. Les bactéries et les virus responsables de certaines gastro-entérites et qui seront excrétés en quantité suffisamment importante par l'intermédiaire des selles des individus infectés, en est un exemple. Les eaux usées représentent un des moyens de dissémination de ces polluants pathogènes dans divers milieux aquatiques récepteurs (rivières, lacs, puits etc...).

L'utilisation d'une eau dépend étroitement de ses caractéristiques physiques (température, turbidité, limpidité, etc), chimiques (pH, produits chimiques organiques et inorganiques, conductivité, oxygène dissous, etc.) et biologiques (présence ou absence microorganismes pathogènes, etc...).

Sur le plan biologique, la présence de certaines bactéries dans une eau limite parfois son aptitude à certains types d'utilisation. C'est d'ailleurs dans ce domaine que la qualité bactériologique d'une eau est particulièrement importante.

Les bactéries pathogènes sont celles qui jouent un rôle déterminant pour l'évaluation de la qualité biologique d'une eau. Cependant, lorsqu'elles sont présentes, leur nombre est souvent

restreint et leur mise en évidence est difficile. De plus, si leur présence est considérée comme le critère de non potabilité d'une eau, celle-ci risque d'être consommée par de nombreux utilisateurs avant qu'un diagnostic soit fait et que des mesures de protection soient prises.

Le but de l'hygiéniste ne sera pas de détecter la présence effective des bactéries pathogènes mais de définir les circonstances dans lesquelles cette présence est possible.

L'évaluation de la qualité bactériologique d'une eau est souvent débutée par la recherche de coliformes (appelés aussi coliformes totaux : CT) et coliformes thermotolérants (appelés aussi coliformes fécaux : CF) dont *E.coli*.

La qualité de l'eau est appréciée grâce à la corrélation entre la présence de bactéries témoin de la contamination fécale et la présence de bactéries pathogènes.

II.2 Recherche des coliformes fécaux dans les deux types d'eau : eau usée et eau de puits

▪ Principe :

Il s'agit de réaliser une colimétrie. Par ce terme on désigne l'ensemble des méthodes bactériologiques permettant de dénombrer les divers groupes des coliformes dans un échantillon d'eau. Le dénombrement des coliformes constitue un examen important sur le plan sanitaire. En effet, les coliformes qui peuplent l'intestin peuvent être identifiées par la tolérance à une température de 44-45 °C. La présence de ces coliformes thermotolérants est une preuve indiscutable d'une contamination par les matières fécales.

▪ Matériel :

- Eau usée (flacon de 200ml) et eau de puits (Flacon de (500 ml)
- Tubes d'eau physiologique stérile (9 ml /tube)
- Boîtes de gélose nutritive
- Boîte de gélose lactosée au TTC et Tergitol
- Etaloirs en verre
- Système de filtration sur membrane et membranes stériles, trompe à vide.
- Etuve pour incubation à 37°C
- Etuve pour incubation à 44,5°C

II.2.1 Cas de l'eau usée :

Dénombrement des coliformes et coliformes fécaux :

1^{ère} séance :

- A partir de l'eau usée (flacon de 200 ml), réaliser des dilutions (en eau physiologique stérile) de 1/10 au 1/10 jusqu'à la dilution (-5).

- A partir de la même dilution appropriée (-x),ensemencer, avec 0,1 ml, deux boîtes de pétri contenant le milieu sélectif : Gélose lactosée au TTC et Tergitol. (Commencer par les dilutions les plus fortes).

- Une fois étalées, une série de boîtes doit être incubée à 37°C pendant 24 heures (coliformes ou coliformes totaux) et l'autre série doit être incubée à 44,5°C pendant 24 heures (Coliformes fécaux).

- Lecture : Après incubation, dénombrer les colonies jaune orangé (lactose +) sur les différentes boîtes incubées à 37°C (pour les CT) et à 44,5°C (pour les CF).

II.2.2 Cas de l'eau de puits :

▪ Dénombrement de la flore totale :

Principe de la mesure = Filtration, sur membrane, de 100 ml d'eau puis mise en culture en gélose nutritive.

1^{ère} séance :

Filtration sur membrane :

- Près du bec bunsen, placer la membrane stérile sur le système de filtration. Mettre en place la trompe à vide.
- Agiter le flacon de prélèvement de l'eau à analyser vigoureusement. Verser le volume approprié (10 ou 100 ml) de l'échantillon dans le système à filtration.
- Filtrer avec trompe à vide.

Ensemencement

- Près du bec, ouvrir le système de filtration. Retirer la membrane avec une pince stérile.
- Déposer la membrane sur la gélose, face contaminée en haut. Les éléments nutritifs de la gélose traversent la membrane ce qui permet ainsi le développement des bactéries en surface.

▪ Dénombrement des coliformes (CT et CF):

1^{ère} séance :

A partir du flacon de prélèvement de l'eau de puits, filtrer séparément 10 ml et 100ml sur membrane. Déposer les filtres sur boîtes de Gélose au TTC et Tergitol. Incuber celles-ci soit à 37°C (CT) soit à 44,5°C (CF).

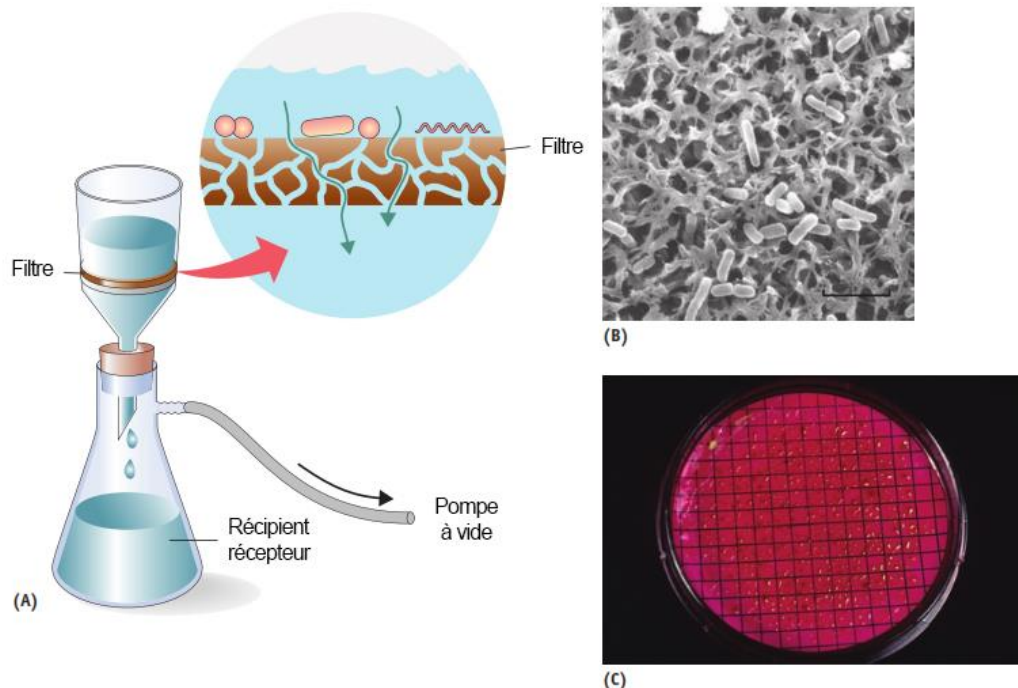


Figure II.1 : Technique de la filtration sur membrane. (A) Les cellules bactériennes de plus grandes taille que les pores du filtre, restent piégées. (B) Des cellules *Escherichia coli* piégées dans les pores d'un filtre de 0,45 μm de diamètre. (C) Croissance des colonies d'*E. coli* sur un filtre.

2^{ème} séance : Identification des colonies et dénombrement.

Examiner la membrane dès la fin de l'incubation, à travers le couvercle. Pour des raisons de sécurité, ne pas ouvrir la boîte. Le dénombrement des bactéries repose sur le principe : 1 colonie = 1 unité formant colonie (UFC).

Après dénombrement, exprimer le résultat en nombre de bactéries par 100 ml. Tenir compte de la dilution éventuelle.

III. BIOTECHNOLOGIE MICROBIENNE

III.1 Introduction à la biotechnologie des Actinobactéries

Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positif dont le pourcentage de Guanine et Cytosine est supérieur à 55 %. Ils sont en général hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont chimio-autotrophe. Les formes aérobies sont très majoritaires alors que les types anaérobies ou microaérophiles sont principalement zoopathogènes.

Ce groupe est considéré comme étant le plus prolifique en tant que producteur de métabolites secondaires bioactifs. Les actinobactéries produisent une panoplie de métabolites secondaires bioactifs notamment des antibiotiques, mais aussi des composés avec des activités anticancéreuses, antivirales, antiparasites, inhibiteurs d'enzymes, immunosuppresseurs, herbicides, insecticides et autres. Ils sont couramment utilisés en médecine, en agriculture et en industrie.

III.2 Criblage d'Actinobactéries productrices d'antibiotique

▪ Principe :

Mise en culture de l'actinobactérie ainsi que l'organisme test. Si ce dernier est sensible à l'antibiotique, le tapis bactérien sera caractérisé par une zone de non-croissance (figure III.1).

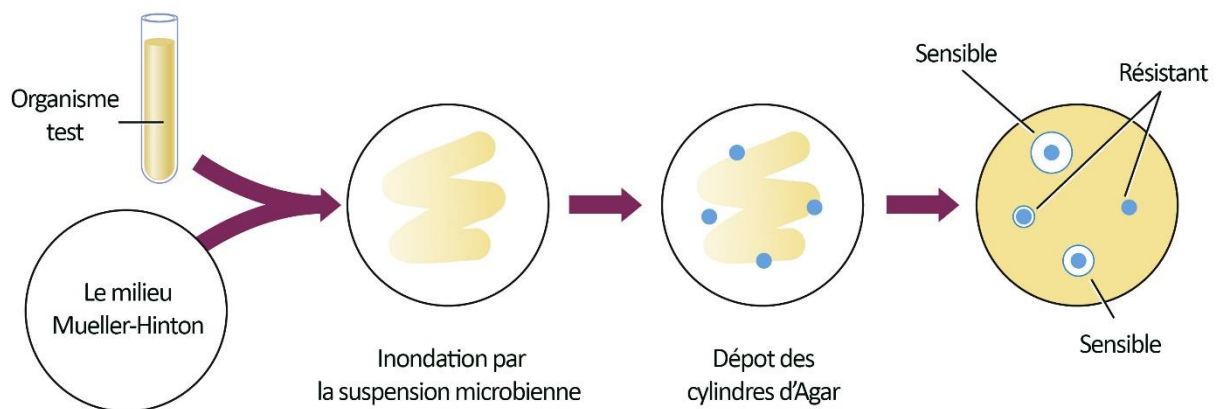


Figure III.1 : Technique des cylindres d'agar.

III.2.1 Préparation des microorganismes test

▪ Matériel

- Boîte contenant les organismes tests (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*...)

- Boîte contenant le milieu Mueller-Hinton
- Tubes d'eau physiologique stérile (9 ml /tube)

- **Mode opératoire**

- A l'aide d'une anse stérile, prélever des colonies de l'organisme test
- Les colonies isolées sont épuisées dans un tube contenant de l'eau physiologique stérile
- Vortexer pendant 1 min
- Inonder la suspension microbienne sur la boîte contenant Mueller-Hinton

III.2.2 Technique des cylindres d'agar

- **Matériel**

- Emporte-pièce à stériliser par chaleur
- Pince stérile
- Etuve pour incubation à 37°C

- **Mode opératoire**

- Prélever des cylindres de gélose de 6 mm de diamètre à partir de la culture d'actinobactérie à l'aide d'un emporte-pièce.
- Déposer les cylindres à la surface des boîtes déjà inondées avec le microorganisme test.
- Placer les boîtes à 4°C pendant quatre heures pour favoriser la diffusion des substances bioactives élaborées et arrêter la croissance des microorganismes tests.
- Incuber les boîtes à 37 °C pendant 24 heures.

III.2.3 Lecture des résultats

La lecture des résultats se fait en notant s'il y a lieu des zones d'inhibition autour des cylindres d'Actinobactéries, puis mesurer le diamètre de ces zones en comparant les différentes souches entre elles.

ANNEXE : Composition des milieux de cultures et réactifs

Bennett (BN)

D-glucose	10 g
Peptone.....	2 g
Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	1 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH 7,3 ± 0,2 à 25°C

Gélose lactosée au TTC et Tergitol (TTC)

Lactose	20 g
Agar	13 g
Peptone.....	10 g
Extrait de levure	6 g
Extrait de viande	5 g
Tergitol-7	0,1 g
Bleu de bromothymol.....	0,05 g
Solution TTC	5,0 ml

pH 7,2 ± 0,2 à 25°C

Gélose nutritive (GN)

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2,5 g
Peptone.....	5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Agar	15 g

pH = 7,0 ± 0,2 à 25°C

Malt-Agar (MA)

Extrait de malt.....	30 g
Peptone.....	5 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 5,4 ± 0,2 à 25°C

Mueller-Hinton (MH)

Hydrolysât acide de caséine	17,5 g
Infusion de viande.....	2 g
Amidon soluble.....	1,5 g
Agar agar bactériologique	17 g

pH 7,3 ± 0,2 à 25°C

Winogradsky (Wi)

Glucose	10 g
Agar	20 g
CaCO ₃	5 mg
Solution saline.....	5 ml
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7,2 ± 0,2 à 25°C

Solution saline

K ₂ HPO ₄	5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	2,5 g
NaCl	2,5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,5 g
MnSO ₄ 4H ₂ O.....	0,5 g
Na ₂ MoO ₄ 4H ₂ O.....	0,5 g
Eau de robinet	500 ml