



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل

Université Mohammed Seddik Benyahia-Jijel



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département Enseignement Fondamentale SNV

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم التعليم الأساسي علوم الطبيعة والحياة

Microbiologie

Polycopié de TP

**2^{ème} Année Licence Sciences Biologiques, Sciences Alimentaires,
Sciences Agronomiques, Ecologie et Environnement**

Code du TP selon le canevas de formation

UE Fondamentale 4

Préparé par Dr BENHAMADA Ouahiba

Grade de l'auteur

MCA

2025/2026

Ref.....

Tables des matières

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction.....	1
TP n°1 : Introduction au laboratoire de microbiologie	2
TP n°2 : Procédés de stérilisation	6
TP n°3 : Les milieux de culture.....	10
TP n°4 : Méthodes d'ensemencement	13
TP n°5 : Etude morphologique des différentes colonies bactériennes sur milieu de culture.....	17
TP n°6 : Etude microscopique des bactéries, coloration simple, Coloration de Gram	22
TP n°7 : Critères d'identification biochimique des bactéries.....	29
TP n°8 : Etude de la croissance bactérienne	32
TP n°9 : Les inhibiteurs de la croissance, l'antibiogramme.....	34
TP n°10 : Levures, cyanobactéries et moisissures.....	37
TP n°11 : Isolement de la flore totale et spécifique de certains produits (eau, lait...).	41
Conclusion.....	49
Références bibliographiques.....	50

Liste des figures

Figure 1. Photo d'une étuve (incubateur).....	4
Figure 2. Quelques instruments de base de laboratoire de microbiologie.....	5
Figure 3. Bec bunsen et exemple de flambage.....	6
Figure 4. Photo d'un four Pasteur.....	7
Figure 5. Photo d'un autoclave.....	8
Figure 6. Photo des filtres bactériens (0,22 um).....	9
Figure 7. Ensemencement par la méthode de stries	15
Figure 8. Ensemencement par la méthode des quadrants	16
Figure 9. Quelques résultats de la culture des bactéries selon les différentes techniques d'ensemencement	16
Figure 10. Caractéristiques des colonies bactériennes	19
Figure 11. Ponctiforme et autres types de colonies bactériennes négatif.....	19
Figure 12. <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose Chapman	20
Figure 13. Opacité des colonies bactériennes.....	21
Figure 14. Exemple de colonies lisses et brillantes	21
Figure 15. Observation microscopique d' <i>Escherichia coli</i> à l'état frais x40	23
Figure 16. Observation microscopique à l'immersion d' <i>E. coli</i> et <i>S. cerevisiae</i> après coloration au bleu de méthylène.....	25
Figure 17. Composition de la paroi bactérienne chez les Gram positif et les Gram négatif.....	27
Figure 18. Observation microscopique des bactéries après coloration de Gram....	28
Figure 19. Résultat d'un antibiogramme.....	36
Figure 20. Observation microscopique de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> à l'état frais (x40).....	39
Figure 21. Observation microscopique de quelques moisissures à l'état frais (x40)	40
Figure 22. Observation microscopique des cyanobactéries à l'état frais (x40).....	40
Figure 23. Résultat de l'isolement sur milieu solide.....	41
Figure 24. Résultat de l'isolement sur milieu liquide.....	41
Figure 25. Protocole de dénombrement sur milieu liquide.....	47

Liste des Tableaux

Tableau 1. Table de MacCrady.....	36
Tableau 2. Exemple de seuil de quelques antibiotiques (EUCAST, CLSI).....	48

Introduction

La microbiologie est une discipline fondamentale des sciences biologiques qui s'intéresse à l'étude des micro-organismes, de leurs caractéristiques, de leur physiologie et de leurs interactions avec leur environnement. Ses applications concernent de nombreux secteurs, notamment la santé, l'industrie agroalimentaire, l'environnement, les biotechnologies et le contrôle de la qualité. L'acquisition des techniques de laboratoire constitue donc une étape essentielle dans la formation des étudiants afin de leur permettre de maîtriser les méthodes d'analyse et d'identification des micro-organismes.

Les travaux pratiques occupent une place centrale dans cet apprentissage, puisqu'ils permettent de mettre en application les connaissances théoriques acquises en cours et de développer les compétences expérimentales indispensables à toute activité en laboratoire de microbiologie. Ils offrent également aux étudiants l'occasion de se familiariser avec les bonnes pratiques de laboratoire, les règles de biosécurité, ainsi que les méthodes d'observation, d'isolement, de culture et d'identification des microorganismes.

Ce polycopié a été conçu comme un support pédagogique destiné à accompagner les étudiants durant les différentes séances de travaux pratiques. Il rassemble les protocoles expérimentaux relatifs à l'organisation du laboratoire de microbiologie, aux techniques de stérilisation, à la préparation et à l'utilisation des milieux de culture, aux méthodes d'ensemencement, ainsi qu'à l'étude des caractères macroscopiques et microscopiques des bactéries. Il présente également les principales techniques d'identification biochimique, les méthodes d'étude de la croissance bactérienne, l'évaluation de la sensibilité aux agents antimicrobiens par antibiogramme, ainsi que l'observation des levures et des cyanobactéries. Enfin, il aborde les techniques d'isolement de la flore microbienne totale et spécifique à partir de différents échantillons, notamment l'eau et le lait.

L'objectif de ce document est d'aider l'étudiant à acquérir une démarche scientifique fondée sur la rigueur, la précision et l'esprit critique. Il constitue un guide pratique favorisant la compréhension des manipulations, l'interprétation des résultats expérimentaux et le respect des exigences de qualité et de sécurité propres aux laboratoires de microbiologie.

TP n°1 : Introduction au laboratoire de microbiologie

1. Objectifs

L'objectif de ce TP est de permettre aux étudiants de découvrir le laboratoire de microbiologie, de se familiariser avec son organisation, ses différentes zones de travail, ainsi qu'avec les principaux équipements et le matériel utilisés. Cette première visite vise également à leur faire connaître les règles de fonctionnement, les consignes d'hygiène et de sécurité, ainsi que les bonnes pratiques de laboratoire, afin qu'ils puissent évoluer dans un environnement sécurisé et réaliser les travaux pratiques dans le respect des procédures établies.

2. Consignes de sécurité en laboratoire de microbiologie

- Procéder à un lavage soigneux des mains avec un savon antiseptique, en insistant sur les paumes, les espaces interdigitaux et le brossage des ongles, avant et après toute manipulation, ainsi qu'avant de quitter le laboratoire, même temporairement.
- Porter en permanence les équipements de protection individuelle (blouse, gants, masque et lunettes selon le risque).
- Éviter toute ouverture des fenêtres ou création de courants d'air pendant les manipulations afin de limiter la dispersion des micro-organismes.
- Désinfecter la paillasse de travail avant et après chaque séance à l'aide d'un désinfectant approprié.
- Ouvrir avec précaution les récipients contenant des cultures microbiennes afin d'éviter toute projection ou aérosolisation.
- Flamber les anses et instruments métalliques avant et après utilisation : commencer par chauffer la partie médiane pour éviter les projections, puis porter l'extrémité à la flamme jusqu'à stérilisation complète.
- Manipuler les échantillons et cultures près de la zone de sécurité (près de la flamme ou sous hotte à flux laminaire selon le cas).
- Ne jamais pipeter à la bouche et utiliser uniquement des dispositifs mécaniques adaptés (pipeteurs automatiques).
- Interdiction formelle de manger, boire ou fumer dans le laboratoire afin d'éviter toute contamination.

- Signaler immédiatement au responsable du TP tout incident : bris de récipient, projection, contact accidentel avec un agent biologique ou contamination du manipulateur.
- Éliminer les déchets biologiques dans des conteneurs spécifiques (sacs biohazard, boîtes à objets piquants/tranchants).
- Stériliser tout le matériel contaminé ou potentiellement infectieux à la fin des manipulations (autoclave ou désinfection appropriée).
- Respecter strictement les zones de travail et ne pas introduire de matériel non autorisé dans la zone de manipulation.
- Maintenir une hygiène rigoureuse de l'environnement de travail et ranger correctement le matériel après usage.

3. Équipements de laboratoire de microbiologie

3.1. Équipements de base

- **Hotte à flux laminaire** (ou poste de sécurité microbiologique) : assure un environnement stérile et protège l'opérateur ainsi que les échantillons.
- **Incubateur (étuve bactériologique)** : permet la culture des micro-organismes à une température contrôlée (Figure 1).
- **Autoclave** : stérilise le matériel et les milieux de culture à la vapeur sous pression.
- **Microscope optique** : utilisé pour l'observation des bactéries, levures, champignons et autres micro-organismes.
- **Centrifugeuse** : sépare les constituants des échantillons par centrifugation.
- **Réfrigérateur (2–8 °C)** : conserve les réactifs, les milieux de culture et certains échantillons.
- **Congélateur (-20 °C ou -80 °C)** : stockage à long terme des souches microbiennes et des échantillons.

3.2. Équipements d'analyse

- **Spectrophotomètre** : mesure la concentration des cultures bactériennes ou de certaines solutions.
- **Système d'identification microbiologique** (ex. API, VITEK) : identification rapide des micro-organismes.



Figure 1. Photo d'une étuve (<https://www.bing.com/images/search?q=etuve&form=HDRSC3&first=1>)

3.3. Matériel de manipulation

- Micropipettes automatiques et embouts stériles.
- Boîtes de Pétri.
- Tubes à essai et tubes Falcon.
- Anses de prélèvement (jetables ou métalliques).
- Bec Bunsen ou micro-incinérateur.
- Agitateur magnétique ou vortex.
- Balance de précision.
- pH-mètre.

La Figure 2 donne des photos de quelques instruments de laboratoire de microbiologie.

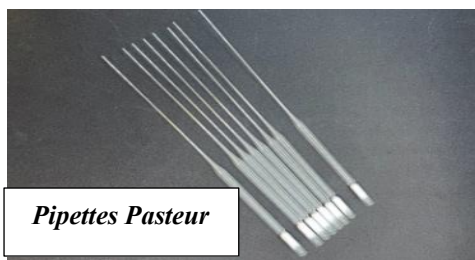
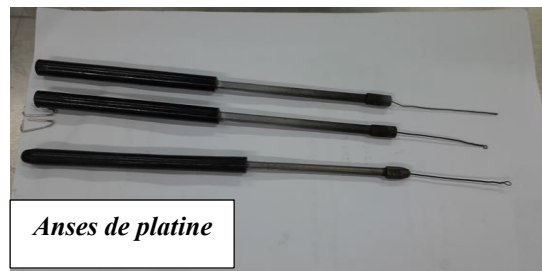
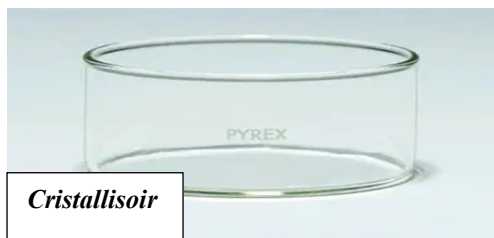
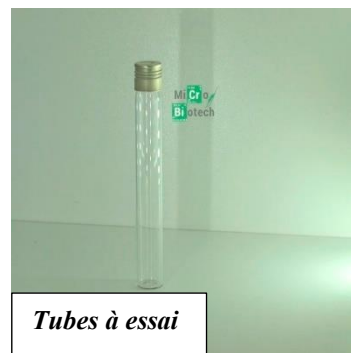
*Pipettes Pasteur**Anses de platine**Cristallisateur**Lames et lamelles**Pipettes**Tubes à essai**Boîtes de Petri en verre**Boîtes de Petri en plastique*

Figure 2. Quelques instruments de base de laboratoire de microbiologie (Leboffe et Pierce, 2021).

TP n°2 : Procédés de stérilisation

1. Objectif

L'objectif de ce TP est de permettre aux étudiants de comprendre les principes de la stérilisation, de connaître les principaux procédés de stérilisation utilisés en laboratoire, ainsi que leurs domaines d'application selon la nature du matériel à traiter. Il vise également à les familiariser avec les critères de choix d'une méthode de stérilisation et à souligner l'importance de la stérilisation dans la prévention des contaminations et le maintien de conditions aseptiques au laboratoire.

2. Techniques de stérilisation

2.1. La chaleur

2.1.1. La chaleur sèche

La chaleur sèche est une méthode de stérilisation par air chaud utilisée pour détruire les micro-organismes (bactéries, spores, virus, champignons) sans utiliser d'eau ou de vapeur. La destruction est réalisée généralement à 160–180 °C ou plus.

2.1.1.1. Flambage

Le passage dans la flamme (bec BUNSEN) de la surface de matériel non inflammable assure une parfaite stérilisation. On stérilise de cette façon les fils de platine et les pipettes Pasteur (Figure 3).



Figure 3. Bec bunsen et exemple de flambage

(<https://www.bing.com/images/search?q=bec+bensun+et+flombage&form=HDRSC3&first=1>)

2.1.1.2. Four pasteur

C'est un four-étuve à air chaud et sec. Il est utilisé généralement à 160 °C pendant 2 heures ou 170 °C pendant 1 heure (Prescott *et al.*, 2023). Cet appareil n'est utilisé que pour la stérilisation de la verrerie préalablement nettoyée et séchée ou de matériels métalliques (instruments de dissection) pouvant tolérer de très hautes températures. Le matériel ainsi stérilisé sera laissé dans l'étuve jusqu'à son refroidissement complet, puis stocké à l'abri des poussières (Figure 4).



Figure 4. Photo d'un four Pasteur

(<https://www.bing.com/images/search?q=four+pasteur&form=HDRSC3&first=1>)

2.1.2. La chaleur humide

La chaleur humide est une méthode de stérilisation qui utilise la vapeur d'eau chaude sous pression ou l'eau bouillante pour détruire les micro-organismes. Elle agit par différents modes d'action :

- Coagulation des protéines.
- Hydrolyse des composants cellulaires : l'eau chaude provoque la rupture des molécules biologiques (membranes cellulaires, ADN, protéines essentielles).

La stérilisation par la chaleur humide, reconnaît trois modalités :

- La stérilisation à l'autoclave
- La Pasteurisation,
- La Tyndallisation

2.1.2.1. Autoclave

C'est un appareil indispensable dans un laboratoire de microbiologie. Le chauffage a lieu sous pression de vapeur d'eau, à une température de 120°C 30 minutes (Tortora *et al.*, 2019). Ce procédé tue toutes les

cellules végétatives et les endospores (Figure 5).

2.1.2.2. Pasteurisation

La pasteurisation est un traitement à chaud de liquides, tuant des pathogènes mais pas forcément toutes les bactéries (Deeth et Lewis, 2017). Les températures de la pasteurisation se situent entre 75 à 80°C.

2.1.2.3. Tyndallisation

La tyndallisation est une série de 3 chauffages brefs à des températures de 70°C à intervalles réguliers, ceci afin de laisser aux formes résistantes la possibilité de germer pour les tuer au chauffage suivant (Prescott et *al.*, 2023).



Figure 5. Photo d'un autoclave

(<https://www.bing.com/images/search?q=autoclave+vertical&form=HDRSC3&first=1>)

2.2. La filtration

La filtration est une technique qui consiste à faire passer un liquide à travers un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,2 μm (Figure 6). Les micro-organismes sont trop gros et sont donc retenus par le filtre (Madigan et *al.*, 2021 ; Prescott et *al.*, 2023). Cette technique est intéressante lors d'utilisation de produits thermolabiles comme certains acides aminés aromatiques, vitamines, hormones de croissance, acides nucléiques et une bonne partie des antibiotiques.



Figure 6. Photo des filtres bactériens (0,22 µm)

(<https://www.bing.com/images/search?q=filtre+bact%a9rien&form=HDRSC3&first=1>)

2.3. Autres procédés de stérilisation

Certaines matières (Plastique, Caoutchouc ...) ne tolèrent pas l'autoclave ou se détériorent rapidement après des expositions répétées à la chaleur.

2.3.1. Les radiations

La stérilisation par les U.V. est utilisée au laboratoire pour la décontamination de l'air et des paillasse situées sous la hotte de protection. Le rayonnement n'agit que de façon directe et sa pénétration est faible. D'autres radiations (rayons X), peuvent servir pour la stérilisation industrielle des boîtes de Pétri en matière plastique et de produits pharmaceutiques (Tortora *et al.*, 2019).

2.3.2. Les agents chimiques

Ils sont utilisés en général pour la désinfection des salles de travail et pour la destruction des germes portés par des instruments souillés. Ce mode de stérilisation doit être systématiquement pratiqué dans le laboratoire pour les lames et pour la verrerie qui ne passe pas en autoclave (McDonnell et Russell, 1999).

TP n°3 : Les milieux de culture

1. Rappel sur les milieux de culture

Les milieux de culture sont des préparations stériles, solides, semi solides ou liquides. Les microorganismes doivent trouver dans le milieu de culture toutes les substances requises pour leur croissance. Ils contiennent généralement :

- De l'eau ;
- Des nutriments (sources de carbone, d'azote, sels minéraux) ;
- Parfois des vitamines, des facteurs de croissance ou des substances sélectives ;
- Un agent gélifiant, comme l'agar, lorsqu'il s'agit d'un milieu solide.

On distingue principalement :

- Les milieux liquides : utilisés pour la multiplication des micro-organismes.
- Les milieux solides : utilisés pour isoler et observer les colonies.
- Les milieux sélectifs : favorisent la croissance de certains micro-organismes tout en inhibant d'autres.
- Les milieux différentiels : permettent de distinguer des micro-organismes selon leurs caractéristiques biologiques ou biochimiques.

2. Objectif

La préparation des milieux de culture a pour objectif de fournir un environnement nutritif et des conditions appropriées pour permettre la croissance, l'isolement, la multiplication et l'identification des micro-organismes ou des cellules en laboratoire.

Plus précisément, elle permet de :

- Assurer le développement des micro-organismes dans des conditions contrôlées.
- Isoler des micro-organismes à partir d'un échantillon.

- Identifier les micro-organismes grâce à leurs caractéristiques de croissance et à leurs réactions biochimiques.
- Réaliser des analyses microbiologiques, des tests de sensibilité aux antibiotiques ou des contrôles de qualité.
- Conserver et entretenir des souches microbiennes pour des études ou des applications industrielles et médicales.

3. Matériel utilisé

- Béchers (1 L)
- Flacons stériles et tubes stériles
- Plaque chauffante
- Eau distillée stérile
- Barreau magnétique

4. Mode opératoire

4.1. Préparation d'un milieu de culture solide à partir d'une poudre lyophilisée, ex : Plate Count Agar (PCA) (Atlas, 2010 ; Cappuccino et Welsh, 2017).

- Mettre en suspension 20,5 g de milieu déshydraté dans 1 L d'eau.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante jusqu'à dissolution complète.
- Répartir le milieu dans des tubes ou des flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Note : Une liquéfaction partielle de l'agar entraînera inévitablement une altération significative de la consistance du gel du milieu solidifié, après stérilisation et refroidissement.

4.2. Préparation d'un milieu solide à partir des ingrédients (Atlas et *al.*, 2010 ; Cappuccino et Welsh, 2017)

- Ajouter 20 g d'agar aux ingrédients de bouillon nutritif en appliquant chauffage plus agitation ;
- Répartir en tubes ou en flacons ;

- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

4.3. Préparation d'un milieu liquide (ex : le bouillon nutritif-BN-) (Atlas et *al.*, 2010 ; Cappuccino et Welsh, 2017)

Dans un bécher, mélanger les ingrédients suivants :

- Peptone :10,0 g
- Extrait de viande : 5,0 g
- Chlorure de sodium :5,0 g
- Eau distillée :1000 mL

Ajuster le pH du milieu à $7,0 \pm 0,2$.

- Porter lentement le milieu sous agitation constante.
- Maintenir l'agitation jusqu'à dissolution complète du milieu.
- Répartir le milieu en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

TP n°4 : Méthodes d'ensemencement

1. Objectif

Les techniques d'ensemencement ont pour objectif principal de transférer des microorganismes dans un milieu de culture approprié afin de permettre leur croissance et leur étude dans des conditions contrôlées.

Plus précisément, elles permettent de :

- Introduire des microorganismes dans un milieu stérile sans contamination extérieure (respect de l'asepsie).
- Obtenir des colonies isolées à partir d'un mélange microbien afin de réaliser une culture pure.
- Favoriser la croissance des bactéries ou champignons en leur fournissant les nutriments nécessaires dans un milieu adapté.
- Permettre l'identification des microorganismes grâce à l'observation de leurs colonies (forme, couleur, taille, aspect).
- Réaliser des tests microbiologiques tels que l'antibiogramme, les tests biochimiques ou l'étude de virulence.
- Assurer la conservation et la multiplication des souches microbiennes pour des usages ultérieurs en recherche, médecine ou industrie.

2. Matériel utilisé

- Boîtes de Pétri
- Anse de platine
- Pipette Pasteur
- Gélose nutritive
- Gélose Chapman
- Gélose Hektoen
- Tube contenant un milieu incliné
- Tube contenant un milieu non incliné (milieu droit)
- Micropipette
- Embouts stériles

3. Mode opératoire

3.1. L'ensemencement sur milieu solide

3.1.1. Ensemencement sur boîte de Pétri

Ensemencement par des stries (Jiang et al., 2016)

- Un échantillon de bactéries peut être prélevé en effleurant une colonie ou en trempant l'anse dans un milieu liquide.
- La séparation des bactéries est ensuite réalisée par épuisement en stries sur la surface d'une gélose solide.
- L'objectif est de diluer progressivement l'inoculum afin d'obtenir des colonies isolées.
- L'épuisement peut être effectué selon différentes techniques d'ensemencement en stries (stries quadrants, en secteurs, en Z, etc.).

Ensemencement par étalement (à l'aide d'un râteau) (Aryal, 2022 ; Ossila, 2024)

- Déposer un faible volume de suspension (environ 0,1 mL) sur la surface d'un milieu gélosé dans une boîte de Pétri.
- Étaler la suspension de manière homogène sur toute la surface à l'aide d'un étaloir stérile (râteau).
- Laisser la surface sécher avant incubation afin de permettre une répartition uniforme des microorganismes.

Ensemencement en masse (ou en double couche) (Aryal, 2022 ; Alliance Bio Expertise, 2025)

- Prélever un volume de l'échantillon.
- Le déposer dans une boîte de Pétri stérile.
- Couler le milieu gélosé fondu (refroidi à 45–48 °C) dans la boîte.
- Homogénéiser par des mouvements circulaires afin de bien répartir l'échantillon.
- Laisser reposer la boîte jusqu'à solidification complète du milieu.

Ensemencement par inondation (Sanders, 2012 ; Cappuccino et Welsh, 2017)

- Déposer un faible volume de suspension (environ 0,1 mL) sur la surface d'un milieu gélosé dans une boîte de Pétri.
- Répartir la suspension de façon homogène sur toute la surface par des mouvements circulaires.
- Incliner la boîte de Pétri pour éliminer l'excès de suspension, puis le recueillir dans un récipient contenant un désinfectant.

3.1.2. Ensemencement dans un tube

Ensemencement par stries sur milieu incliné (Jiang et al., 2016)

- Prélever un inoculum à partir d'un milieu gélosé ou liquide.
- Déposer l'inoculum sur la pente de la gélose, à environ 1 cm du point le plus déclive, afin d'éviter l'eau de condensation.
- Réaliser des stries serrées en déplaçant le fil de platine de la partie la plus basse vers la partie la plus élevée, d'un bord à l'autre du tube.
- Maintenir l'outil d'ensemencement tangent à la surface de la gélose afin d'éviter d'endommager le milieu de culture.

Ensemencement par piqûre centrale (Prescott, 2023)

- Flamber le fil de platine (ou la pipette Pasteur) ainsi que le bord du tube.
- Prélever un inoculum bactérien à l'aide d'une anse de platine stérile.
- Introduire verticalement le fil de platine chargé d'inoculum au centre du milieu de culture, jusqu'à la profondeur souhaitée.
- Retirer le fil de platine en suivant le même trajet afin de réaliser une piqûre centrale.

3.2. Ensemencement dans un milieu liquide (QB3 Berkeley, 2025)

- Flamber l'anse de platine pour la stériliser.
- Prélever un inoculum bactérien à l'aide de l'anse de platine.
- Introduire l'anse chargée de bactéries dans le milieu liquide à ensemer.
- Retirer l'anse puis refermer le tube dans des conditions d'asepsie.

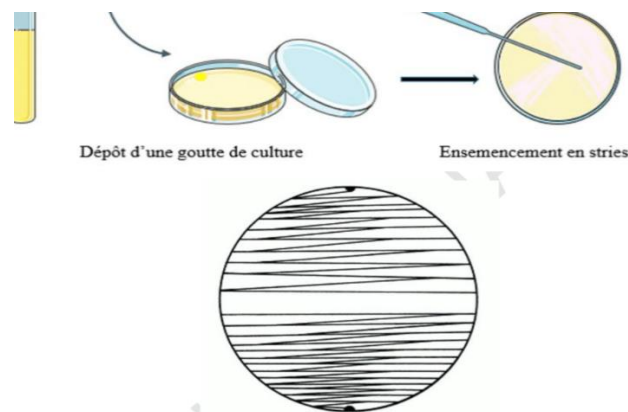


Figure 7. Ensemencement par la méthode de stries (Knott, 2003)

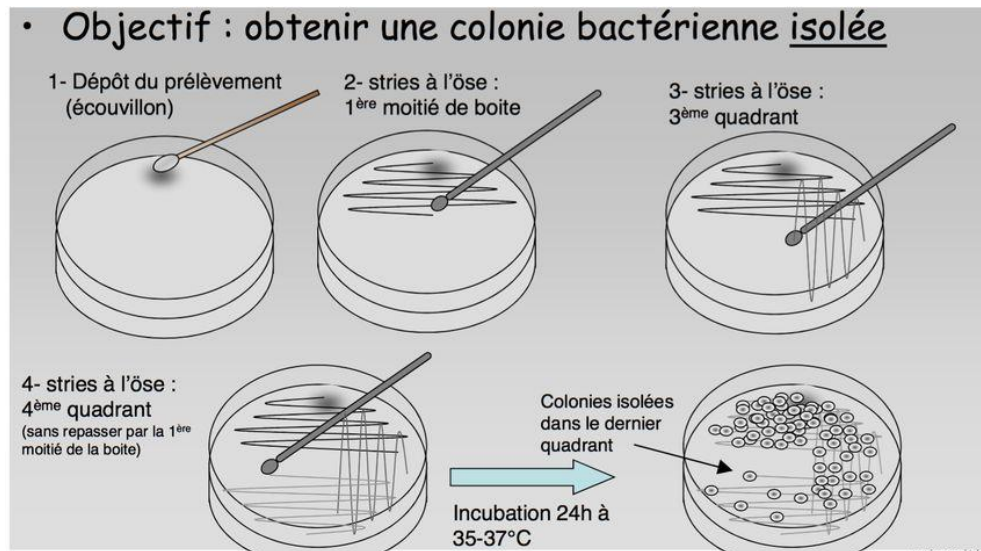


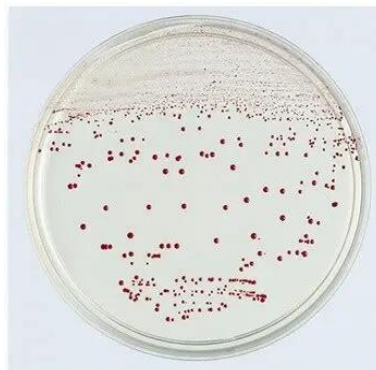
Figure 8. Ensemencement par la méthode des quadrants (Benaissa, 2021)

4. Exemples de résultats

La Figure 8 donne quelques exemples de résultats des cultures bactériennes ensemencées par différentes techniques.



Ensemencement par pique centrale



Ensemencement par la méthode de stries



Ensemencement par la méthode de quadrant

Figure 9. Quelques résultats de la culture des bactéries selon les différentes techniques d'ensemencement (**Photos originales**).

TP n°5 : Etude morphologique des différentes colonies bactériennes sur milieu de culture

1. Objectif

L'objectif de ce TP est d'observer et de décrire les caractéristiques morphologiques des colonies bactériennes développées sur milieu de culture solide, afin de distinguer les différents types de colonies et de comprendre l'importance des caractères cultureux dans l'identification préliminaire des bactéries.

Les bactéries se développent sur des milieux solides sous forme de colonies. Une colonie est définie comme une masse visible de micro-organismes provenant d'une seule cellule mère. Les principales caractéristiques de ces colonies bactériennes servent de critères importants pour leur identification.

2. Matériel

- Boîtes de Petri contenant des cultures bactériennes sur gélose nutritive ou milieu sélectif
- Cultures bactériennes pures ou mixtes (souches pédagogiques)
- Anse de platine stérile
- Bec Bunsen ou hotte à flux laminaire
- Loupe ou loupe binoculaire (si disponible)
- Marqueur indélébile
- Règle ou grille d'observation (optionnel)
- Gants, blouse de laboratoire
- Désinfectant (éthanol 70 %)
- Fiche d'observation ou cahier de TP

3. Mode opératoire (Cappuccino et Welsh, 2020)

- Désinfecter le plan de travail et se munir des équipements de protection (blouse, gants).
- Observer les boîtes de Petri sans les ouvrir dans un premier temps.
- Noter l'aspect général des colonies visibles (taille, répartition, densité).
- Ouvrir la boîte de Petri à proximité d'une flamme ou sous hotte stérile.
- Observer les colonies à l'œil nu puis à la loupe si disponible.

4. Lecture des résultats

4.1. Taille des colonies bactériennes

La taille de la colonie peut être une caractéristique utile pour l'identification. Le diamètre d'une colonie représentative peut être mesuré en millimètres ou décrit en termes relatifs tels que ponctiforme (très petite), petite, moyenne et grande.

4.2. Forme des colonies bactériennes

La forme fait référence à l'aspect général de la colonie dont les plus importantes sont (Figure 10):

- Circulaire,
- Irrégulière,
- Filamenteuse, et
- Rhizoïde.

4.3. Relief des colonies bactériennes

Elle donne des informations sur la hauteur de la colonie par rapport à la surface de la gélose. Elle décrit la « vue de profil » d'une colonie. Les six élévations les plus courantes des colonies bactériennes sont (Figure 10) :

- Plate,
- Surélevée,
- Ombiliquée (présentant une protubérance en forme de nodule),
- Cratériforme,
- Convexe, et
- Pulvinate (en forme de coussin).

4.4. Contour des colonies bactériennes

La marge ou le bord d'une colonie peut être une caractéristique essentielle pour l'identification des organismes (Figure 10). Exemples :

- Entière (lisse),
- Irrégulière,

- Ondulée (en forme de vagues),
- Lobée,
- Frisée, et
- Filiforme.

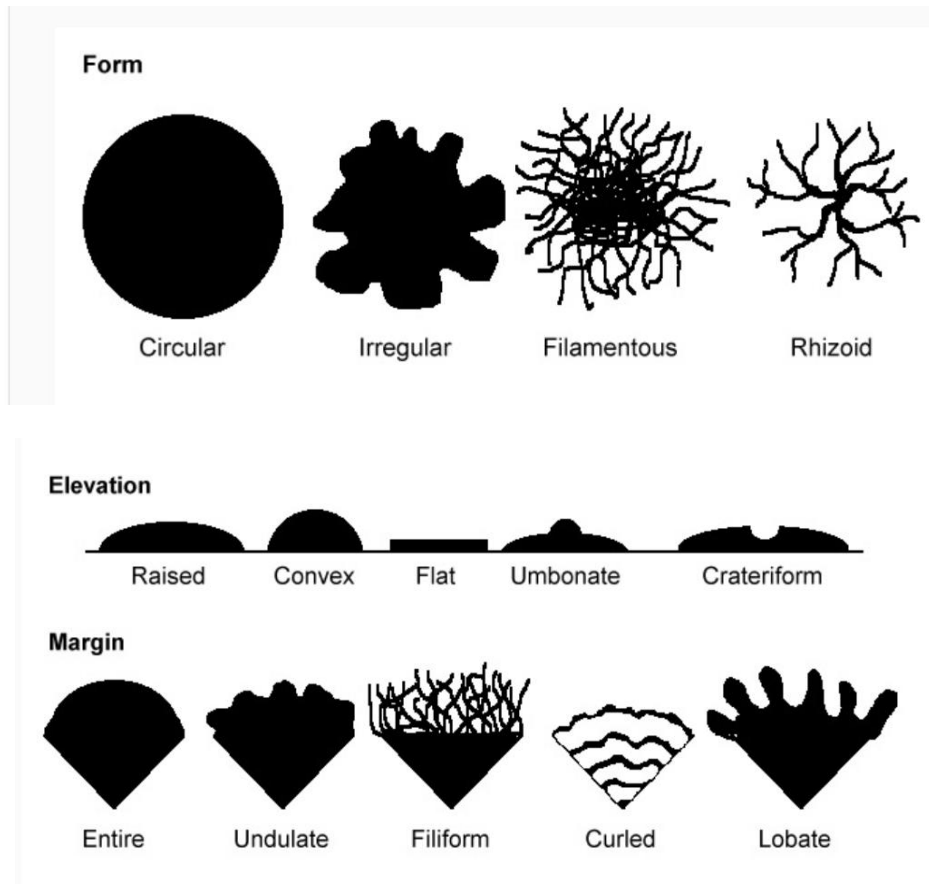


Figure 10. Caractéristiques des colonies bactériennes (Shrestha, 2024)

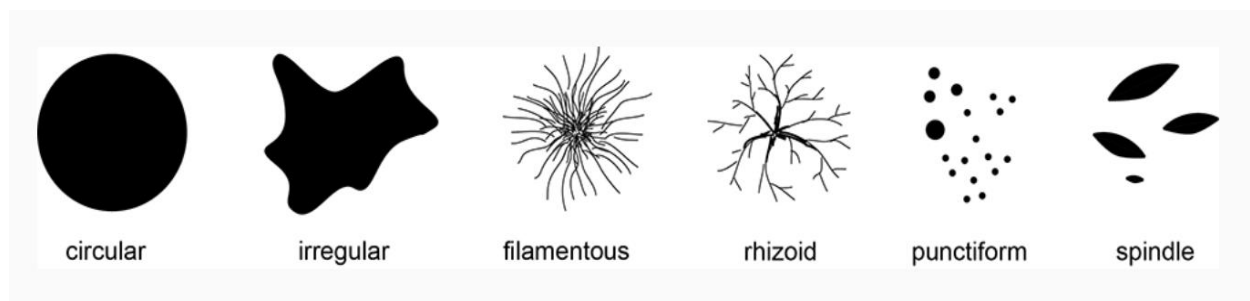


Figure 11. Ponctiforme et autres types de colonies bactériennes (Shrestha, 2024)

4.5. Couleur et pigmentation des colonies bactériennes

Certaines bactéries produisent des pigments lorsqu'elles se développent dans le milieu, par exemple le pigment vert produit par *Pseudomonas aeruginosa*, les colonies de couleur beige de *Mycobacterium tuberculosis* sur milieu de Lowenstein-Jensen (LJ), colonies de couleur rouge de *Serratia marcescens* et des colonies jaunes (dorées) de *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman (Figure 12).



Figure 12. *Staphylococcus aureus* sur gélose Chapman (Editorial Team, 2025)

4.6. Transparence ou opacité

L'opacité d'une colonie bactérienne peut être décrite comme transparente (claire), opaque (non transparente ou non claire), translucide (presque claire, mais avec une vision déformée — comme à travers un verre dépoli), ou irisée (changeant de couleur selon la lumière réfléchiée). Une colonie ponctiforme translucide β -hémolytique sur gélose au sang est très probablement une espèce de *Streptococcus*. Les staphylocoques donnent des colonies opaques, lisses et circulaires à la surface de la gélose (Figure 13).

4.7. Apparence des colonies bactériennes

Les colonies bactériennes sont souvent brillantes et lisses en apparence. D'autres descriptions de la surface peuvent être : mate (opposé de brillante), veinée, rugueuse, ridée (ou fripée), ou brillante. Les espèces de *Bacillus* donnent des colonies sèches et ridées. *Pseudomonas stutzeri* produit également des colonies ridées d'apparence similaire (Figure 14).

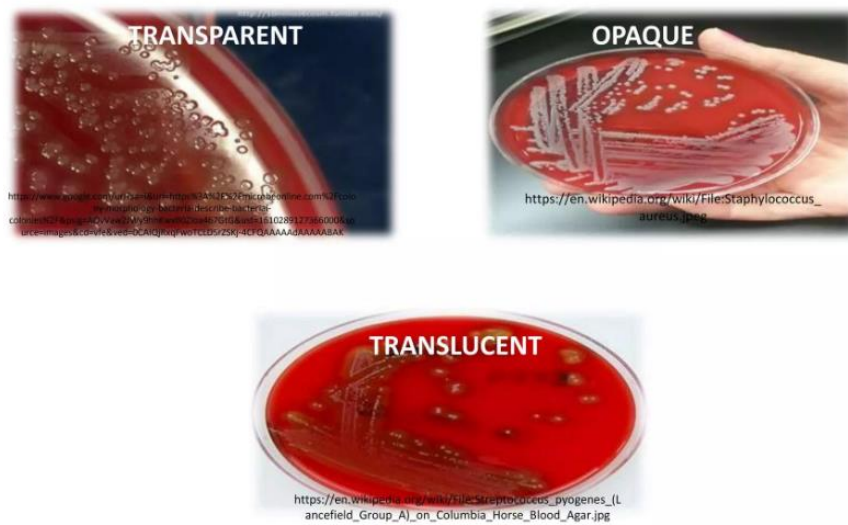


Figure 13. Opacité des colonies bactériennes (Microbe Online, 2025)



Figure 14. Exemple de colonies lisses et brillantes (Microbe Online, 2025)

TP n°6 : Etude microscopique des bactéries, coloration simple, Coloration de Gram

I. Observation microscopique des microorganismes à l'état frais

1. Objectif

Cet examen permet de mettre en évidence de la mobilité ou la stabilité des bactéries. Il est réalisé selon le protocole de.

2. Principe

Le principe de l'observation microscopique des microorganismes à l'état frais consiste à observer des microorganismes vivants, sans les ne fixer ni les colorer, afin de préserver leur état naturel.

Une goutte de la suspension contenant les microorganismes est déposée sur une lame, recouverte d'une lamelle, puis observée au microscope optique. Cette technique permet d'examiner les cellules vivantes dans leur état naturel, d'apprécier leur morphologie, leur disposition et surtout leur mobilité, sans modification due à la fixation ou à la coloration.

3. Matériel utilisé

- Anse de platine
- Pipettes Pasteur
- Lames
- Lamelles
- Bec Bunsen
- Cristalliseur contenant un désinfectant
- Eau physiologique stérile
- Bouillon nutritif contenant une souche bactérienne (*Escherichia coli*)

4. Mode opératoire (Prescott et *al.*, 2023).

- Prélever une goutte du bouillon nutritif contenant une culture jeune de la bactérie *Escherichia coli* et la déposer entre lame et lamelle
- Observer au microscope optique à l'objectif x40

5. Lecture des résultats

La lecture des résultats de la mobilité des bactéries consiste à déterminer si une bactérie est capable de se déplacer par ses propres moyens (généralement grâce à des flagelles).

6. Exemples des observations microscopiques

La Figure 15 présente un exemple d'observation à l'état frais des bactéries (*Escherichia coli*).

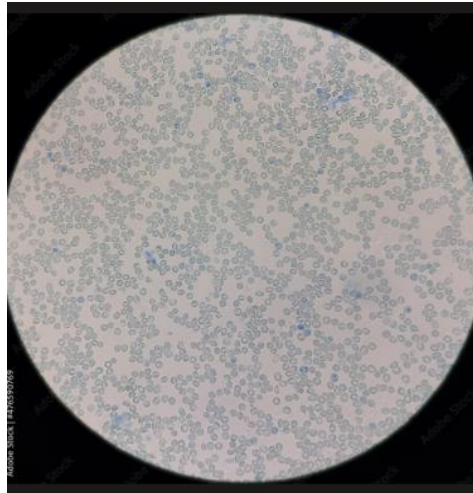


Figure 15. Observation microscopique d'*Escherichia coli* à l'état frais x40 (Photo originale)

II. Observation microscopique après coloration simple (bleu de méthylène)

1. Objectif

L'objectif de l'observation microscopique après une coloration simple au bleu de méthylène est de rendre les bactéries ou les cellules plus visibles au microscope en augmentant le contraste.

Plus précisément, cette technique permet de :

- Observer la forme des micro-organismes (coques, bacilles, spirilles, etc.).
- Déterminer leur taille approximative.
- Étudier leur disposition (isolés, en paires, en chaînes, en amas, etc.).

- Faciliter la visualisation des cellules, qui sont naturellement transparentes et difficiles à distinguer sans coloration.

2. Principe

Le bleu de méthylène est un colorant basique qui se fixe sur les constituants acides de la cellule, colorant ainsi les micro-organismes en bleu et les rendant facilement observables au microscope.

3. Matériel utilisé

- Anse de platine
- Pipettes Pasteur
- Lames de microscope
- Pince
- Bouillon nutritif contenant une culture bactérienne pure
- Pot de yaourt contenant des bactéries lactiques
- Bleu de méthylène (colorant)

4. Mode opératoire (Brown et Smith, 2022)

4.1. Préparation du frottis

- Prélever une goutte de la suspension bactérienne et / ou de levure et la déposer sur une lame.
- Étaler la goutte en effectuant des mouvements circulaires.
- Ou prélever une colonie bactérienne et l'émulsionner dans une goutte d'eau distillée stérile déposée sur une lame.

4.2. Fixation du frottis

- Laisser sécher le frottis à température ambiante.
- Fixer le frottis en le passant 3 à 4 fois dans la flamme du bec Bunsen.

- Laisser refroidir la lame.

4.3. Coloration simple au bleu de méthylène

- Recouvrir entièrement le frottis avec le bleu de méthylène.
- Laisser agir pendant 1 minute.
- Rincer abondamment à l'eau du robinet pour éliminer l'excès de colorant.
- Déposer une goutte d'huile à immersion au centre du frottis coloré.
- Observer au microscope avec l'objectif à immersion (100×).

5. Lecture des résultats

- Les bactéries apparaissent colorées en bleu.
- Observer la forme des bactéries (coques, bacilles, spirilles, etc.).
- Déterminer leur disposition (isolées, en paires, en chaînes, en amas, etc.).
- Estimer leur taille et leur répartition sur le frottis.
- Vérifier la qualité du frottis (bonne répartition des cellules, absence d'amas excessifs).
- Conclure sur la morphologie et l'agencement des bactéries observées.

La Figure 16 donne un exemple d'observation microscopique à l'immersion après coloration au bleu de méthylène.

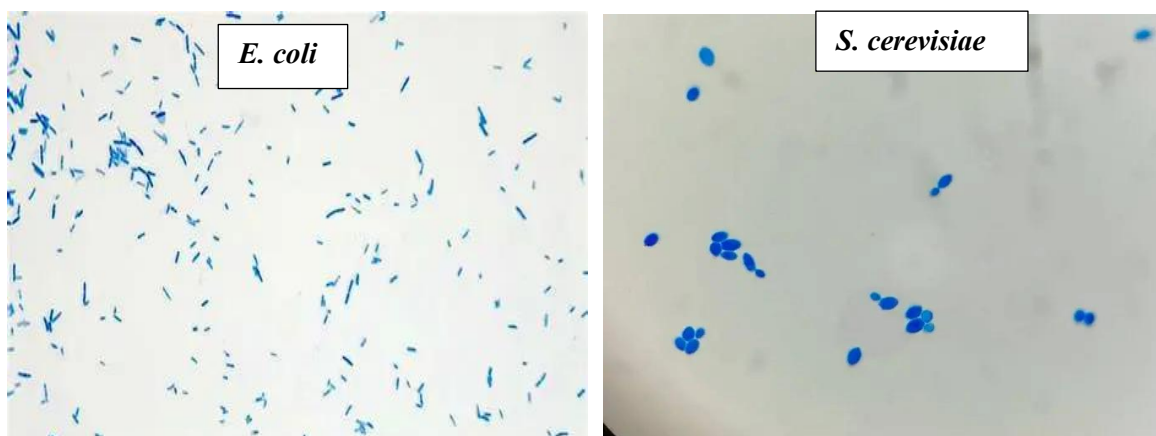


Figure 16. Observation microscopique à l'immersion d'*E. coli* et *S. cerevisiae* après coloration au bleu de méthylène (**Photos originales**).

III. Observation microscopique après coloration de Gram

1. Objectif

La coloration de Gram (méthode décrite initialement par **Hans Christian Gram, 1884**) a pour objectif de différencier les bactéries selon la structure de leur paroi cellulaire afin de les classer en bactéries Gram positif et bactéries Gram négatif.

Elle permet également de :

- Différencier les bactéries en Gram positif et Gram négatif.
- Observer la morphologie des bactéries (coques, bacilles, etc.).
- Déterminer leur disposition (isolées, en chaînes, en amas, etc.).
- Faciliter l'identification et l'orientation du diagnostic microbiologique.

2. Principe

Le principe de la coloration de Gram repose sur les différences de structure et de composition de la paroi bactérienne entre les bactéries Gram positives et Gram négatives. Les bactéries Gram positives possèdent une paroi épaisse, riche en peptidoglycane fortement réticulé et contenant des acides téichoïques, sans membrane externe, ce qui leur confère une structure dense capable de retenir durablement les complexes colorés (**Sharma, 2024**).

À l'inverse, les bactéries Gram négatives présentent une fine couche de peptidoglycane située dans un espace périplasmique et sont entourées d'une membrane externe riche en lipides et en lipopolysaccharides, ce qui rend leur enveloppe plus fragile et moins apte à retenir ces complexes. Ainsi, la distinction entre Gram positif et Gram négatif repose essentiellement sur la capacité de la paroi, selon sa richesse en peptidoglycane et sa teneur en lipides, à fixer ou non les complexes colorés utilisés lors de la coloration. La Figure 17 présente la différence de la composition de la paroi bactérienne entre les Gram négatif et les Gram positif.

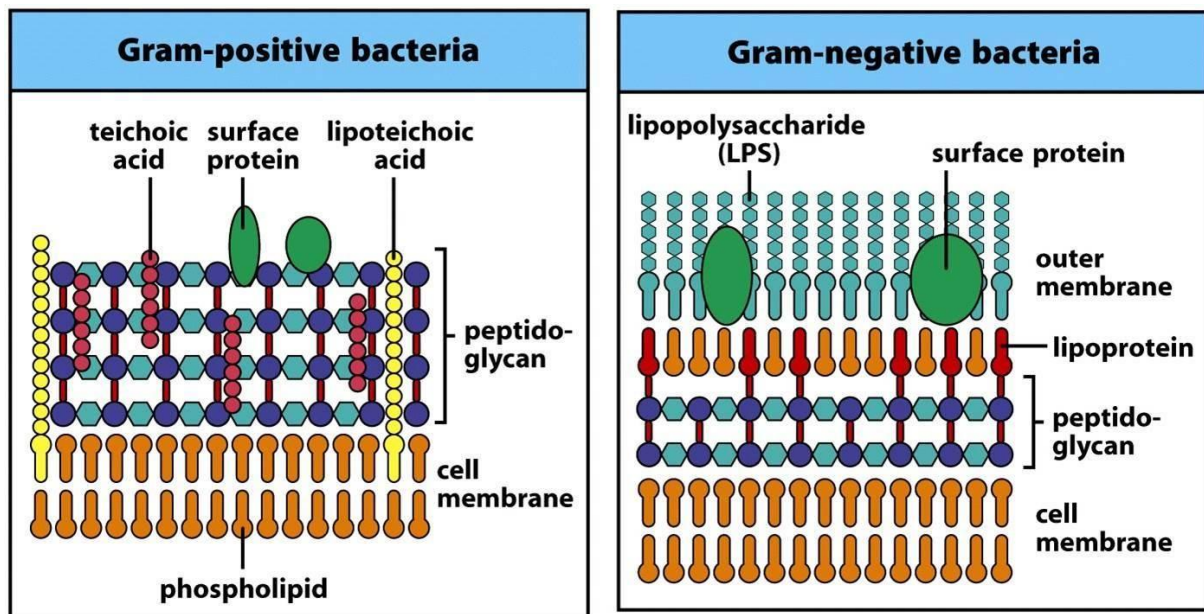


Figure 2-14 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Figure 17. Composition de la paroi bactérienne chez les Gram positif et les Gram négatif
(Murphy et Weaver, 2008 ; Sharma, 2024)

3. Matériel utilisés

- Matériel utilisé et réactifs
- Pipette Pasteur
- Lames
- Anse de platine
- Papier buvard (ou absorbant)
- Eau physiologique
- Cristallisateur contenant un désinfectant
- Violet de gentiane phénique
- Lugol (iode–iodure de potassium)
- Alcool (éthanol)
- Fuchsine phénique (ou safranine)
- Souches bactériennes pures : comme *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

4. Mode opératoire

4.1. Préparation du frottis (voire coloration au bleu de méthylène).

4.2. Fixation du frottis (voire coloration au bleu de méthylène).

4.3. Étapes de coloration (Soni, et al. 2024).

- **Coloration** (violet de gentiane phénique) : réouvrir le frottis pendant une minute, puis rincer à l'eau distillée.
- **Mordançage** (lugol : iode-iodure de potassium) : Laisser agir pendant 1 minute, puis rincer.
- **Décoloration** (alcool éthanol 95% ou alcool-acétone) : Appliquer pendant 10 à 20 secondes maximum (étape critique), puis rincer immédiatement pour stopper la décoloration.
- **Recoloration** (fuchsine phénique ou safranine) : Laisser agir pendant 30 à 60 secondes, puis rincer à l'eau.
- **Séchage et observation** : Sécher avec du papier absorbant, puis observer au microscope à immersion.

5. Lecture des résultats

- **Gram positif** → violet (retient le complexe violet-iodé)
- **Gram négatif** → rose/rouge (coloration de contre-type)

6. Exemples d'observation microscopique

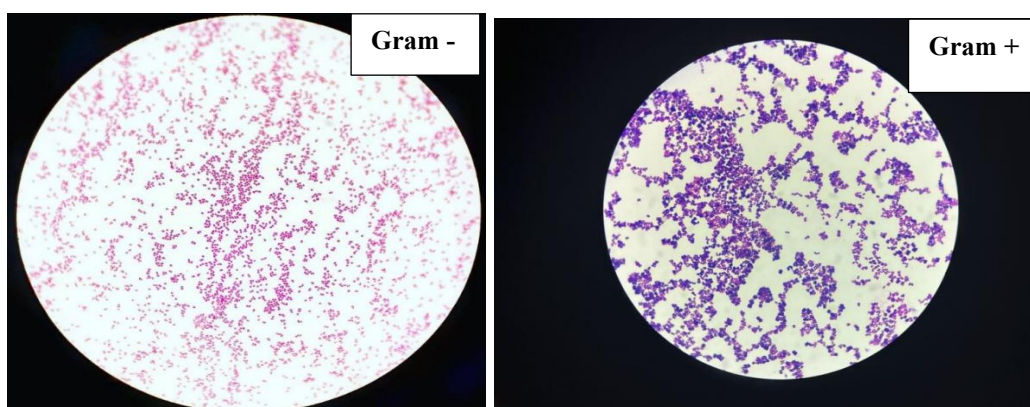


Figure 18. Observation microscopique des bactéries après coloration de Gram (**Photos originales**)

TP n°7 : Critères d'identification biochimique des bactéries

1. Objectif

L'objectif de ce TP est de permettre aux étudiants de comprendre le principe de l'identification biochimique des bactéries, de réaliser quelques tests biochimiques couramment utilisés en microbiologie et d'interpréter les résultats obtenus afin de différencier et d'identifier les bactéries sur la base de leurs caractéristiques métaboliques et enzymatiques (Altheide, 2019; Davis et Pezzlo, 2023 ; Dunn, 2023).

2. Matériel

- Cultures bactériennes pures (par exemple : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ou autres souches pédagogiques)
- Milieux de culture appropriés
- Galerie de tests biochimiques ou milieux biochimiques (TSI, citrate de Simmons, urée, SIM, etc.)
- Réactif de Kovacs (test de l'indole)
- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 3 % (test de la catalase)
- Réactif de l'oxydase
- Anses de prélèvement stériles
- Micropipettes et embouts stériles
- Tubes à essai et portoirs
- Incubateur (35–37 °C)
- Bec Bunsen ou hotte à flux laminaire
- Marqueur
- Éthanol à 70 %
- Blouse, gants et lunettes de protection

3. Mode opératoire

3.1. Test de catalase

- Déposer une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 à 3 %) sur une lame propre.

- Prélever une colonie bactérienne fraîche à l'aide d'une anse stérile.
- Mélanger la colonie à la goutte de H₂O₂.
- Observer immédiatement la réaction.
- **Interprétation :**
 - Apparition de bulles : **catalase positive (+)**.
 - Absence de bulles : **catalase négative (-)**.

3.2. Test de l'oxydase

- Déposer une goutte de réactif à l'oxydase sur un papier filtre ou une bandelette d'oxydase.
- Prélever une colonie bactérienne fraîche à l'aide d'un bâtonnet en bois ou d'une anse en plastique.
- Étaler la colonie sur la zone imprégnée du réactif.
- Observer la coloration dans les 10 à 30 secondes.
- **Interprétation :**
 - Coloration violette ou bleu foncé : **oxydase positive (+)**.
 - Absence de coloration : **oxydase négative (-)**.

3.3. Test de l'indole

- Ensemencer un tube de milieu tryptone avec une colonie bactérienne.
- Incuber à 37 °C pendant 24 heures.
- Ajouter quelques gouttes de réactif de Kovacs.
- Observer la surface du milieu.
- **Interprétation :**
 - Anneau rouge à la surface : **indole positif (+)**.
 - Absence d'anneau rouge ou coloration jaune : **indole négatif (-)**.

3.4. Test de l'uréase

- Ensemencer le milieu à l'urée avec une colonie bactérienne.
- Incuber à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

- Observer le changement de couleur du milieu.
- **Interprétation :**
 - Milieu rose ou fuchsia : **uréase positive (+)**.
 - Milieu jaune-orangé ou inchangé : **uréase négative (-)**.

3.5. Test du citrate de Simmons

- Ensemencer la gélose citrate de Simmons par stries sur la pente, sans piquer le milieu.
- Incuber à 37 °C pendant 24 à 48 heures.
- Observer la croissance bactérienne et la couleur du milieu.
- **Interprétation :**
 - Croissance avec virage du vert au bleu : **citrate positif (+)**.
 - Absence de croissance et milieu restant vert : **citrate négatif (-)**.

TP n°8 : Etude de la croissance bactérienne

1. Objectif

L'objectif de ce TP est de permettre aux étudiants de comprendre les différentes phases de la croissance bactérienne en culture, de suivre l'évolution d'une population bactérienne au cours du temps à l'aide de méthodes simples de mesure, et d'interpréter la courbe de croissance en relation avec les conditions de culture. Ce TP vise également à familiariser les étudiants avec les techniques de manipulation aseptique et les méthodes d'évaluation de la croissance bactérienne.

2. Matériel

- Culture pure d'une bactérie (par exemple *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*)
- Bouillon nutritif stérile
- Tubes à essai ou Erlenmeyers stériles
- Micropipettes et embouts stériles
- Pipettes Pasteur stériles
- Spectrophotomètre (lecture à 600 nm) ou colorimètre
- Cuvettes pour spectrophotomètre
- Agitateur-incubateur (37 °C pour *E. coli*)
- Bec Bunsen ou hotte à flux laminaire
- Marqueur et étiquettes
- Désinfectant (éthanol à 70 %)
- Gants et blouse de laboratoire

3. Mode opératoire (Zwietering et *al.*, 1990 ; Kovárová-Kovar et Egli, 1998)

- Préparer un flacon contenant du bouillon nutritif stérile.
- Ensemencer aseptiquement le milieu avec une culture bactérienne jeune.
- Incuber la culture à la température appropriée sous agitation.
- Mesurer la densité optique (DO₆₀₀) au temps 0, puis à intervalles réguliers (toutes les 30 à 60 minutes) pendant la durée de l'expérience.
- Noter les valeurs de densité optique obtenues dans un tableau de résultats.

- Tracer la courbe de croissance bactérienne en représentant la densité optique (DO_{600}) en fonction du temps d'incubation.
- Identifier les différentes phases de la croissance bactérienne : phase de latence, phase exponentielle (logarithmique), phase stationnaire et, si elle est observée, phase de déclin.
- Analyser et interpréter la courbe obtenue en expliquant l'évolution de la population bactérienne au cours des différentes phases de croissance.

4. Résultats attendus

Les étudiants doivent obtenir une courbe illustrant les différentes phases de la croissance bactérienne et être capables d'expliquer les caractéristiques biologiques de chaque phase ainsi que les facteurs susceptibles d'influencer la croissance des bactéries.

TP n°9 : Les inhibiteurs de la croissance, l'antibiogramme

1. Objectif

Un antibiogramme est une technique de laboratoire de microbiologie qui permet d'évaluer la sensibilité ou la résistance d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Son objectif principal est de déterminer si une bactérie isolée à partir d'un prélèvement clinique (urine, sang, pus, etc.) peut être inhibée ou détruite par des antibiotiques spécifiques. Ce test est réalisé selon **Clinical and Laboratory Standards Institute, 2025**.

2. Matériel utilisé

- Gélose de Mueller-Hinton
- Disques d'antibiotiques
- Boîte de Pétri
- Pince stérile
- Pipeteur
- Pipette Pasteur
- Eau physiologique (solution saline stérile)
- Règle graduée
- Vortex
- Anse de platine

3. Mode opératoire

- Prélever une colonie bactérienne à l'aide d'une anse de platine ;
- Émulsionner cette colonie dans un tube contenant 2 mL d'eau physiologique ;
- Agiter au vortex afin de préparer une suspension bactérienne homogène (inoculum) ;
- Couler le milieu gélosé Mueller-Hinton dans des boîtes de Pétri ;
- Laisser sécher les boîtes à l'étuve à 37 °C ;
- Ensemencer la gélose à partir de la suspension bactérienne par la méthode d'inondation ou par écouvillonnage ;
- Déposer les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile ;

- Presser légèrement chaque disque afin d'assurer un contact uniforme avec la gélose ;
- Respecter une distance d'environ 3 cm entre deux disques ;
- Déposer au maximum 6 disques par boîte de Pétri ;
- Incuber les boîtes à 37 °C pendant 24 à 48 heures ;
- Après incubation, mesurer le diamètre des zones d'inhibition autour de chaque disque en millimètres ;
- Interpréter les résultats en se basant sur les diamètres critiques figurant dans les tables de référence.

4. Lecture de résultats

La lecture d'un antibiogramme consiste à analyser les zones d'inhibition obtenues autour des disques d'antibiotiques afin de déterminer si une bactérie est sensible, intermédiaire ou résistante à chaque antibiotique testé.

4.1. Observation des zones d'inhibition

Après incubation :

- Une zone claire (halo) autour du disque = inhibition de la croissance bactérienne (Figure 19)
- Absence de zone = la bactérie pousse jusqu'au disque
- Plus le diamètre du halo est grand, plus l'antibiotique est efficace

4.2. Mesure

- Mesurer le diamètre des zones d'inhibition en millimètres (mm)
- Utiliser une règle ou un pied à coulisse
- Mesurer le diamètre complet (bord à bord du halo)

4.3. Interprétation des résultats

Les diamètres obtenus sont comparés à des valeurs critiques de référence (**EUCAST ou CLSI**) :

S (Sensible) : l'antibiotique est efficace, la bactérie est inhibée

I (Intermédiaire) : efficacité réduite, possible effet si forte dose

R (Résistante) : antibiotique inefficace, pas d'inhibition

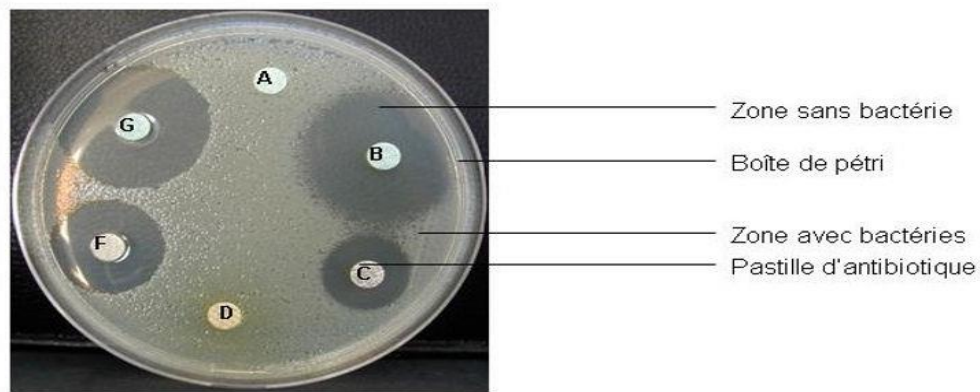


Figure 19. Résultat d'un antibiogramme

Tableau 1. Exemple de seuil de quelques antibiotiques (EUCAST, CLSI)

Antibiotique	S ($\geq$ mm)	I (mm)	R ($\leq$ mm)
Amoxicilline	≥ 18 mm	15–17 mm	≤ 14 mm
Ciprofloxacine	≥ 22 mm	16–21 mm	≤ 15 mm
Ceftriaxone	≥ 23 mm	20–22 mm	≤ 19 mm

TP n°10 : Levures, cyanobactéries et moisissures

1. Objectif

- Observer au microscope des levures (champignons unicellulaires) et des cyanobactéries (bactéries photosynthétiques)
- Comparer leur structure, taille et organisation cellulaire
- Comprendre leurs différences biologiques fondamentales (eucaryote vs procaryote)
- Mettre en évidence leur mode de reproduction et leur rôle écologique

2. Matériel utilisé

- Microscope optique
- Lames et lamelles
- Pipettes Pasteur
- Eau distillée
- La levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Échantillon de cyanobactéries (eau stagnante, bassin ou culture)
- Bécher
- Papier absorbant

3. Mode opératoire

3.1. Examen de la levure (Prescott et *al.*, 2023)

- Préparer une suspension de levure dans de l'eau sucrée
- Prélever une goutte de la suspension et la déposer entre lame et lamelle ;
- Observer au microscope optique à l'objectif 40x.

3.2. Examen des cyanobactéries (Wilmotte et *al.*, 2017)

- Prélever une goutte d'eau stagnante ou de culture
- Déposer la goutte sur une lame propre
- Ajouter éventuellement une goutte de lugol pour améliorer le contraste
- Recouvrir avec une lamelle sans bulles d'air
- Observer au microscope (objectif $\times 10$ puis $\times 40$)

- Identifier les filaments ou colonies verdâtres (ex : *Anabaena*, *Oscillatoria*)

3.3. Examen des moisissures

L'identification microscopique des moisissures est réalisée selon la méthode de scotch-test (Chabasse et *al.*, 2002) :

- Appliqué par la face collante sur la surface de la moisissure à l'aide d'une pince ;
- Observer au microscope optique à l'objectif 40x.

4. Lecture des résultats

4.1. États frais de la levure

La lecture des résultats d'un état frais de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est la suivante :

- **Des cellules ovales ou rondes**, transparentes et réfringentes.
- **Des cellules isolées**, en paires ou en petits amas.
- **Des bourgeonnements** (blastoconidies), caractéristiques de la multiplication de la levure.
- **Une absence de mobilité active** : les levures ne possèdent pas de flagelles. Les éventuels petits déplacements observés sont dus au mouvement brownien ou aux courants du liquide, et non à une véritable mobilité.

4.2. États frais des moisissures

L'observation microscopique à l'état frais des moisissures peut inclure :

- La présence ou l'absence de moisissures ;
- L'aspect des hyphes (septés ou non, ramifiés, etc.) ;
- La présence de spores ou de conidies ;
- Une estimation de l'abondance (rare, modérée, abondante).

4.3. État frais des cyanobactéries

- Présence de cellules de couleur verte à bleu-vert, due aux pigments photosynthétiques (chlorophylle et phycobilines).
- Observation de cellules procaryotes, dépourvues de noyau et d'organites membranaires.
- Les cellules sont souvent regroupées en filaments ou en colonies.
- Les filaments peuvent être droits, courbés ou spiralés selon l'espèce observée.
- Chez certaines cyanobactéries (ex. *Anabaena*), présence de cellules spécialisées appelées hétérocystes, impliquées dans la fixation de l'azote.
- Les cyanobactéries observées présentent une organisation simple caractéristique des organismes procaryotes photosynthétiques.

5. Exemples des observations microscopiques

Les Figures 20, 21 et 22 présentent respectivement des exemples d'observation à l'état frais des levure (*Saccharomyces Cerevisiae*), cyanobactéries et quelques moisissures.

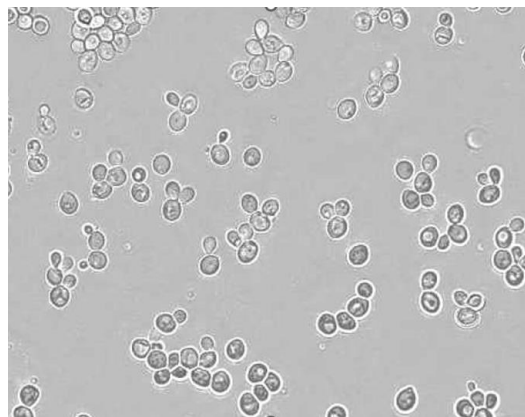


Figure 20. Observation microscopique de *Saccharomyces cerevisiae* à l'état frais (x40)
(Photo originale)

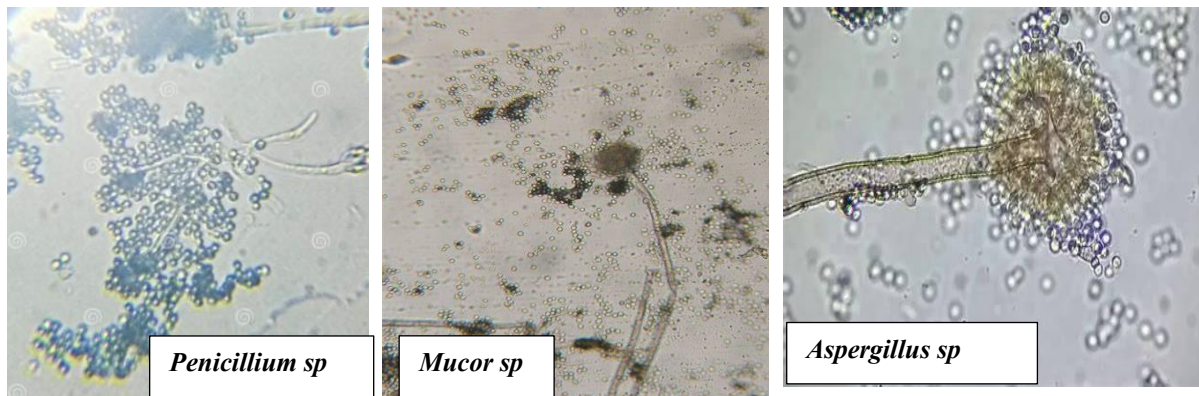


Figure 21. Observation microscopique de quelques moisissures à l'état frais (x40) (Photos originales)



Figure 22. Observation microscopique des cyanobactéries à l'état frais (x40)
(<https://labsvt.fr/Transversal/Cyanobacteries/Cyanobacteries.html#d%C3%A9but>)

TP n°11 : Isolement de la flore totale et spécifique de certains produits (eau, lait...).

1. Objectif

L'isolement des bactéries est une étape fondamentale en microbiologie. Il consiste à séparer une espèce bactérienne des autres microorganismes présents dans son environnement naturel (eau, sol, aliments, prélèvements cliniques, etc.) afin d'obtenir une culture pure, composée d'une seule espèce bactérienne.

Cet isolement est réalisé en utilisant des milieux de culture appropriés, dont la composition fournit les éléments nutritifs nécessaires à la croissance des bactéries. Selon les besoins, on utilise des milieux non sélectifs (favorisant la croissance de nombreuses espèces) ou des milieux sélectifs et différentiels (favorisant certaines bactéries tout en inhibant d'autres).

Sur un milieu solide, le résultat de l'isolement se traduit par l'apparition de colonies isolées (Figure 23), dont l'aspect (taille, forme, couleur, relief, bord, texture, etc.) peut fournir des informations utiles pour l'identification des bactéries. En revanche, sur un milieu liquide, la croissance bactérienne se manifeste par un trouble (turbidité) du bouillon, parfois accompagné d'un dépôt au fond du tube, d'un voile en surface ou de flocons en suspension (Figure 24).

Sur milieu solide
Observation de colonies



Figure 23. Résultat de l'isolement sur milieu solide (Photo originale)

Sur milieu liquide
Observation d'un
« trouble »



Figure 24. Résultat de l'isolement sur milieu liquide (Photos originales)

2. Matériel utilisé

- Boîtes de Pétri stériles
- Eau distillée stérile
- Spatule stérile
- Flacons stériles
- Pipette Pasteur stérile
- Pipeteur
- Milieu de gélose nutritive
- Bouillon nutritif
- Milieu SFB (Bouillon SFB)
- Milieu de Sabouraud

3. Mode opératoire

3.1. Isolement à partir de l'air (sédimentation en boîtes) (Napoli et *al.*, 2012)

- Faire fondre la gélose nutritive.
- Couler aseptiquement le milieu de culture dans une boîte de Pétri stérile.
- Laisser la boîte de Pétri ouverte, à l'écart du bec Bunsen, pendant 15 minutes afin de permettre le dépôt des microorganismes présents dans l'air.
- Refermer la boîte de Pétri.
- Incuber à 37 °C pendant 24 heures.
- Observer l'apparition et les caractéristiques des colonies développées.

3.2. Isolement à partir de l'eau (Hammes et Egli, 2010).

- Flamber le robinet pour assurer l'asepsie.
- Ouvrir le robinet et laisser l'eau s'écouler quelques secondes.
- Prélever un volume d'eau dans un flacon stérile.
- À partir de ce flacon, prélever 1 mL d'eau à l'aide d'une pipette stérile et le déposer dans une boîte de Pétri.
- Couler la gélose nutritive refroidie à environ 50 °C dans la boîte.
- Mélanger par des mouvements circulaires dans les deux sens afin d'assurer une répartition homogène de l'échantillon dans le milieu de culture.

- Laisser solidifier le milieu.
- Incuber à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

3.3. Isolement à partir du sol (Kizheva et *al.*, 2021)

- Préparer une suspension de sol en mélangeant une petite quantité de sol avec un volume d'eau distillée stérile.
- Agiter vigoureusement afin de mettre les microorganismes en suspension.
- Laisser reposer le flacon pendant 10 à 20 minutes pour permettre la sédimentation des particules de sol, tandis que les bactéries restent en suspension dans le surnageant.
- Prélever 1 mL du surnageant et le déposer dans chacune des deux boîtes de Pétri.
- Couler la gélose nutritive refroidie à environ 50 °C dans l'une des boîtes et la gélose de Sabouraud dans l'autre.
- Mélanger par des mouvements circulaires pour assurer une répartition homogène de l'inoculum.
- Laisser solidifier le milieu.
- Incuber à 37 °C pendant 24 heures.

3.4. Isolement à partir des surfaces (Rose et *al.*, 2016)

- Préparer un coton stérile monté sur un support (écouvillon).
- Humidifier légèrement le coton stérile avec de l'eau distillée stérile si nécessaire.
- Frotter la surface à analyser en effectuant des mouvements réguliers afin de prélever les microorganismes.
- Transférer immédiatement l'échantillon prélevé sur un bouillon nutritif.
- Incuber à 37 °C pendant 24 à 48 heures.
- Observer l'apparition du trouble dans le milieu de culture.
- Une goutte à partir du bouillon nutritif présentant un trouble est ensemencée sur la surface de la gélose Chapman par la méthode de strie (Figure 15).
- Incuber à 37 °C pendant 24 heures.

3.5. Isolement à partir d'organe

- Cautériser la surface de l'organe (foie de poulet) à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.
- Prélever en profondeur un fragment d'organe par aspiration à l'aide d'un pipeteur.
- Transférer le prélèvement dans un milieu liquide adapté (milieu SFB).
- Refermer le tube de manière aseptique.
- Incuber à 37 °C pendant 24 heures.
- Une goutte à partir du bouillon SFB présentant un trouble est ensemencée sur la surface de la gélose Hektoen par la méthode de quadrant (Figure 16).
- Incuber à 37 °C pendant 24 heures.

3.6. Isolement à partir de lait et techniques de dénombrement

1. Objectif

Le but des techniques de numération (ou dénombrement) est de déterminer la concentration en bactéries présentes dans une préparation initiale. Elles permettent d'estimer avec précision la charge bactérienne d'un échantillon, c'est-à-dire le nombre total de bactéries viables contenues dans un produit à analyser.

Ces techniques sont essentielles en microbiologie car elles servent à évaluer la qualité microbiologique d'un produit (aliment, eau, médicament, etc.), à contrôler son innocuité, et à vérifier le respect des normes d'hygiène. Elles reposent généralement sur des méthodes de dilution, d'ensemencement sur milieu gélosé et de comptage des colonies formées (UFC : unités formant colonies).

2. Matériel utilisé

- Flacon stérile
- Eau physiologique
- Tubes à essai stériles
- Pipettes stériles (1 mL)
- Pipeteur

- Milieu PCA
- Milieu BCP
- Lait de vache

3. Mode opératoire

3.1. Dénombrement des colonies sur milieu solide (ex : FTAM) (Joffin et Leyral, 2013)

- Prélever un volume de lait de vache dans un flacon stérile ;
- Préparer des dilutions dans l'eau physiologique jusqu'à 10^{-4} ;
- Ensemencer en masse 1 mL de la dilution choisie dans un milieu PCA ;
- Incuber pendant 3 jours à 30 °C ;
- Utiliser deux boîtes pour deux dilutions successives ;
- Dénombrer les colonies à l'aide d'un compteur de colonies.

3.2. Dénombrement dans un milieu liquide (ex : CT) (Wehr et Frank, 2004)

- Prélever un volume de lait de vache;
- Préparer des dilutions jusqu'à 10^{-3} (ou utiliser la préparation précédente) ;
- Ensemencer 3 tubes de BCPL à double concentration avec cloche, avec 1 mL de chaque dilution ;
- Incuber à 30 °C pendant 48 h ;
- Observer les tubes où le lactose est fermenté avec production de gaz ;
- Évaluer le nombre de coliformes en se référant aux tables de Mac Grady pour calculer l'indice NPP.

4. Lecture des résultats

4.1. Dénombrement des colonies sur milieu solide

- Observer les boîtes et compter les colonies visibles, chaque colonie correspondant théoriquement à une UFC (Unité Formant Colonie) issue d'une bactérie ou d'un amas bactérien.
- Choisir les boîtes contenant un nombre exploitable de colonies (généralement entre 30 et 300 colonies).

- Calculer la concentration bactérienne initiale avec la formule :

$$N = \frac{\sum C}{V \times (n_1 + 0,1n_2) \times d}$$

(Joffin et Leyral, 2013)

Explication :

- N : concentration en bactéries (UFC/mL ou UFC/g)
- $\sum C$: somme totale des colonies comptées sur les boîtes retenues
- V : volumeensemencé sur chaque boîte (mL)
- n_1 : nombre de boîtes retenues à la première dilution choisie
- n_2 : nombre de boîtes retenues à la dilution suivante
- d : facteur de dilution de la première dilution retenue

Remarque : on prend en considération les boîtes présentant un nombre de colonies compris entre 30 et 300.

Exemple

On suppose les résultats suivants :

- $\sum C$ (somme des colonies comptées) = 240
- V (volumeensemencé) = 1 mL
- n_1 = 3 boîtes retenues à la première dilution
- n_2 = 1 boîte retenue à la deuxième dilution
- d = dilution = 10^{-2}

Donc : $N \approx 7,7 \times 10^3$ UFC/mL

4.1. Dénombrement des colonies sur milieu liquide (Figure 18)

Le dénombrement se fait par la méthode du NPP (Nombre le Plus Probable) selon **Rodier et al., 2009** Tableau 1) :

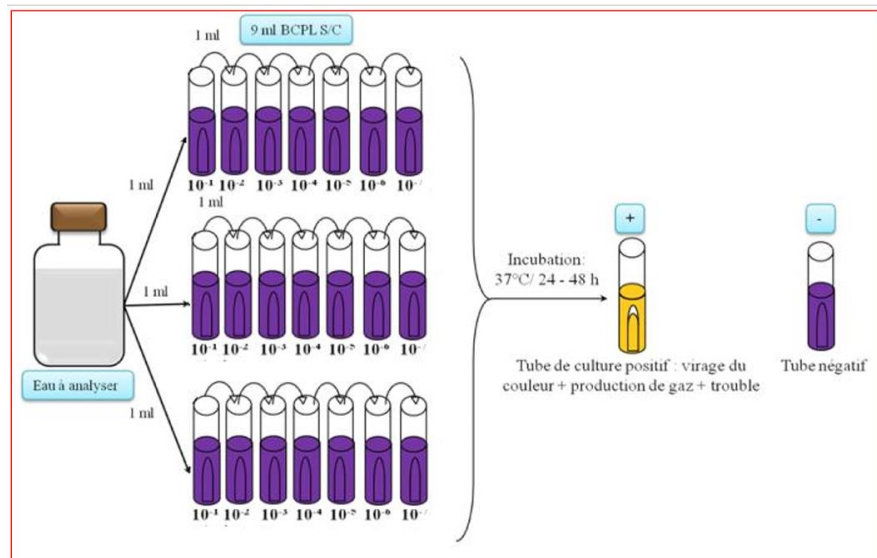


Figure 25. Protocole de dénombrement sur milieu liquide (Rodier et al., 2009)

- On note le nombre de tubes positifs à chaque dilution (ex : 3-2-1, 5-3-0, etc.).
- On compare ces résultats à une table de MacCrady.
- On obtient un résultat exprimé en :

Exemple

Après incubation on fait la lecture des 3 séries un tube de BCPL avec un virage au jaune et un dégagement de gaz est considéré comme tube +

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Série 1	+	+	+	-	-	-	-
Série 2	+	+	-	-	-	-	-
Série 3	+	+	+	+	-	-	-
	3	3	2	1	0	0	0

- On prend les 3 numéros avant l'apparition de 0 dans notre cas on a 321.
- 321 sur la table de Mac Grady donne un numéro de 15.0.
- Résultat de dénombrement $15 \cdot 10^4$ coliforme/ml

Tableau 2. Table de MacCraday (McCraday, 1915)

3 tubes par dilution					
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	0.7	221	3.0	321	15.0
102	1.1	222	3.5	322	20.0
110	0.7	223	4.0	323	30.0
111	1.1	230	3.0	330	25.0
120	1.1	231	3.5	331	45.0
121	1.5	232	4.0	332	110.0
130	1.6	300	2.5	333	140.0
200	0.9	301	4.0		

Conclusion

Les séances de travaux pratiques présentées dans ce polycopié ont pour objectif de fournir aux étudiants les bases expérimentales indispensables en microbiologie. En associant les connaissances théoriques aux manipulations de laboratoire, elles permettent de mieux comprendre les caractéristiques des micro-organismes, leurs exigences de culture, leurs modes d'identification ainsi que les méthodes utilisées pour étudier leur développement et leur sensibilité aux agents antimicrobiens.

Au cours de cette formation pratique, les étudiants sont amenés à maîtriser les techniques fondamentales de microbiologie, depuis la préparation du matériel et le respect des règles d'asepsie jusqu'à l'isolement, l'observation et l'identification des microorganismes. Ces apprentissages contribuent également au développement d'une démarche scientifique fondée sur l'observation, la rigueur expérimentale, l'analyse critique des résultats et le respect des normes de qualité et de sécurité en laboratoire.

Les compétences acquises à travers ces travaux pratiques constituent un prérequis essentiel pour de nombreuses disciplines des sciences biologiques et trouvent des applications dans des secteurs variés tels que les analyses biomédicales, le contrôle de la qualité des aliments et de l'eau, les biotechnologies, l'industrie pharmaceutique, l'environnement et la recherche scientifique.

Ce polycopié se veut un outil pédagogique destiné à accompagner les étudiants tout au long de leur apprentissage pratique. Il est conçu pour faciliter la préparation des séances de laboratoire, favoriser une meilleure compréhension des protocoles expérimentaux et servir de support lors de l'interprétation des résultats obtenus. Nous espérons qu'il contribuera à développer les compétences techniques, l'autonomie et l'esprit scientifique des étudiants, tout en leur offrant une base solide pour la poursuite de leur parcours universitaire et leur future carrière professionnelle.

Références bibliographiques

Altheide, S. T. (2019). Biochemical and culture-based approaches to identification in the diagnostic microbiology laboratory. *ASCLS Journal*, 32(4), 166–175. <https://doi.org/10.29074/ascls.2019001875>

Alliance Bio Expertise. (2025). Préparation des milieux de culture : l'ensemencement dans la masse. <https://www.alliance-bio-expertise.com/fr/preparation-des-milieux-de-culture-lensemencement-dans-la-masse>

Aryal, S. (2022). Spread plate technique – Principle, procedure and uses. *MicrobiologyInfo*. <https://microbiologyinfo.com/spread-plate-technique-principle-procedure-and-uses/>

Atlas, R. M. (2010). Handbook of microbiological media (4th ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/EBK1439804063>

Benaissa, A. (2021). Étapes de réalisation d'un ensemencement en strie sur milieu solide (méthode des quadrants) [Schéma]. Dans *Techniques d'analyse microbiologique – Cours polycopié*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/figure/Etapes-de-realisation-dun-ensemencement-en-strie-sur-un-milieu-solide_fig7_350357012

Brown, A. E., & Smith, H. R. (2022). Benson's microbiological applications: Laboratory manual in general microbiology (15th ed.). McGraw-Hill Education.

Cappuccino, J. G., & Welsh, C. T. (2017). Microbiology: A laboratory manual (11th ed.). Pearson.

Cappuccino, J. G., & Welsh, C. T. (2020). Microbiology: A Laboratory Manual (12th ed.). Pearson.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2025). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (CLSI M100, 35th ed.). CLSI. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2026). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (CLSI Standard M100, 36th ed.). CLSI. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>

Davis, R. E., & Pezzlo, M. T. (2023). Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. In *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781555818814.ch3.17.1>

Deeth, H. C., & Lewis, M. J. (2017). High temperature processing of milk and milk products (1st ed.). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118460467>

Dunn, J. J. (2023). Guidelines for biochemical identification of aerobic bacteria. In Clinical Microbiology Procedures Handbook. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781683670438.cmph0019>

Editorial Team. (2025). Colony morphology of bacteria with their identification and examples. Biology Notes Online. <https://biologynotesonline.com/colony-morphology-of-bacteria-and-examples/>

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2026). EUCAST clinical breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. <https://www.eucast.org>

Gram, H. C. (1884). Travaux originaux sur la méthode de coloration de Gram en bactériologie (publication fondatrice).

Hammes, F., & Egli, T. (2010). Cytometric methods for measuring bacteria in water. Aquatic Microbial Ecology, 61(1), 1–16. <https://doi.org/10.3354/ame01409>

Jiang, C.-Y., Dong, L., Zhao, J.-K., Hu, X., Shen, C., Qiao, Y., Zhang, X., Wang, Y., Ismagilov, R. F., Liu, S.-J., & Du, W. (2016). High-throughput single-cell cultivation on microfluidic streak plates. Applied and Environmental Microbiology, 82(7), 2210–2218. <https://doi.org/10.1128/AEM.03588-15>

Joffin, J.-N., & Leyral, G. (2013). Microbiologie technique, tome 1 (4e éd.). CRDP d'Aquitaine.

Kizheva, Y., & Nikolova, I. (2021). Enrichment, isolation and enumeration of soil microorganisms. In Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-513840-6/50019-7>

Knott, T. (2003). Streak plates [Diagram]. Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Streak_plates.png

Kovárová-Kovar, K., & Egli, T. (1998). Growth kinetics of suspended microbial cells. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62(3), 646–666. <https://doi.org/10.1128/mmbr.62.3.646-666.1998>

Leboffe, M. J., & Pierce, B. E. (2021). A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory (5th ed.). Morton Publishing.

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). Brock biology of microorganisms (16th ed.). Pearson.

McCrary, M. H. (1915). Tables for rapid interpretation of fermentation tube results (travaux sur la méthode du Most Probable Number – MPN en bactériologie de l'eau).

McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147>

Microbe Online. (2025). Colony morphology of bacteria (smooth and glistening colonies). <https://microbeonline.com/colony-morphology-bacteria-describe-bacterial-colonies/>

Murphy, K., & Weaver, C. (2008). Janeway's Immunobiology (7th ed.). Garland Science.

Napoli, C., Marcotrigiano, V., & Montagna, M. T. (2012). Air sampling procedures to evaluate microbial contamination in operating theatres: A comparison between active and passive methods. *BMC Public Health*, 12, 594. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-594>

Ossila. (2024). Spread plate method. <https://www.ossila.com/pages/spread-plate-method>

Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2023). Microbiologie de Prescott (6e éd. fr.). De Boeck Supérieur.

QB3 Berkeley. (2025). Inoculation into liquid culture. University of California, Berkeley. <https://qb3.berkeley.edu/education/lab-fundamentals-bootcamp/manual/cloning/overnights/>

Rodier, J., Bazin, C., Broutin, J. P., Chambon, P., Champsaur, H., & Rodi, L. (2009). L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer (9e éd.). Dunod.

Rodier, J., Legube, B., & Merlet, N. (2009). L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer (9e éd.). Dunod.

Rose, L. J., Noble-Wang, J., & Arduino, M. J. (2016). Surface sampling. In *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press.

Sanders, E. R. (2012). Aseptic laboratory techniques: Plating methods. *Journal of Visualized Experiments*, (63), e3064. <https://doi.org/10.3791/3064>

Sharma, P. (2024). Structure of the bacterial cell envelope and interactions with antimicrobials. *Langmuir*, 40(15), 7791–7811. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c03474>

Shrestha, A. (2024). Martin Lewis agar: Principle, composition, and uses. *Microbe Online*. <https://microbeonline.com/category/bacteriology/>

Soni, J., Sinha, S., & Pandey, R. (2024). Understanding bacterial pathogenicity: A closer look at the journey of harmful microbes. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1370818. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1370818>

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2019). *Microbiology: An Introduction* (13th ed.). Pearson.

Wehr, H. M., & Frank, J. F. (2004). *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (17th ed.). American Public Health Association.

Wilmotte, A., Dail Laughinghouse IV, H., Capelli, C., Rippka, R., & Salmaso, N. (2017). Taxonomic identification of cyanobacteria by a polyphasic approach. In *Molecular Tools for the Detection and Quantification of Toxigenic Cyanobacteria*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119332169.ch4>

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>

Sites web

<https://biologynotesonline.com/colony-morphology-of-bacteria-and-examples/>

<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Streak_plates.png

<https://labsvt.fr/Transversal/Cyanobacteries/Cyanobacteries.html#début>

<https://microbeonline.com/category/bacteriology/>

<https://microbeonline.com/colony-morphology-bacteria-describe-bacterial-colonies/>

<https://microbiologyinfo.com/spread-plate-technique-principle-procedure-and-uses/>

<https://qb3.berkeley.edu/education/lab-fundamentals-bootcamp/manual/cloning/overnights/>

<https://www.alliance-bio-expertise.com/fr/preparation-des-milieux-de-culture-lensemencement-dans-la-masse>

<https://www.bing.com/images/search?q=autoclave+vertical&form=HDRSC3&first=1>

<https://www.bing.com/images/search?q=bec+bensun+et+flombage&form=HDRSC3&first=1>

<https://www.bing.com/images/search?q=etuve&form=HDRSC3&first=1>

<https://www.bing.com/images/search?q=filtre+bact%C3%A9rien&form=HDRSC3&first=1>

<https://www.bing.com/images/search?q=four+pasteur&form=HDRSC3&first=1>

<https://www.eucast.org>

<https://www.ossila.com/pages/spread-plate-method>

https://www.researchgate.net/figure/Etapes-de-realisation-dun-ensemencement-en-strie-sur-un-milieu-solide_fig7_350357012