

# TP microbiologie - Etude de la croissance d'une souche bactérienne

Claudine Baraquet et Virginie Garlatti  
Université de Toulon  
2023

L'objectif de des travaux pratiques est d'acquérir les gestes essentiels au travail en stérilité et à l'étude des micro-organismes et en particulier de leur croissance.

Chaque étudiant manipulera seul et interprètera ses propres données obtenues au cours du TP.

## Critères d'évaluation :

Avant le TP :

- Préparation du TP

Pendant le TP :

- Respect des critères de stérilité
- Respect de la gestion des déchets
- Organisation et propreté de la paillasse

Vous devrez appeler votre encadrant lors d'une des mesures de densité optique.

Suite au TP :

Fiche expérience avec les figures ET leur interprétation des données personnelles obtenues :

- Courbe de croissance avec les calculs de taux de croissance et temps de génération
- Tableau avec les valeurs de Malassez, moyenne écart-type et calculs de concentration cellulaires
- Dilutions en cascade : déterminer la concentration dans le bouillon – comparaison avec ce qui est attendu
- Une photo de l'étalement sur boîte avec la méthode des cadrans, réflexion sur la réalisation

NB : La fiche expérience ne peut excéder deux pages recto-verso. Attacher un soin particulier aux parties figures/analyses/traitement des données.

Cette fiche expérience devra être déposée sur l'Espace Moodle prévu à cet effet 15 jours jour pour jour après la réalisation du TP.

## La fiche expérience

NOM — PRÉNOM

Observation au microscope optique et analyse du cycle cellulaire dans un apex racinaire d'oignon (recto)

### Figures réalisées



Figure 1 : Photographie et dessin d'une coupe longitudinale d'un apex racinaire d'oignon vu au microscope optique ( $\times 100$ )

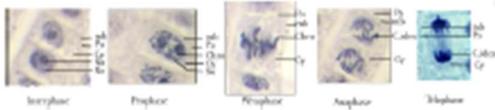


Figure 2 : Figures de mitose dans un apex racinaire d'oignon ( $\times 1000$ ). mb = membrane plasmique, Nu = Nucleole, No = Noyau, Pk = paroi, Chro = chromosomes, C.ch = chromatides, cy = cytoplasme



Phase	Nombre de cellules	Temps (s)	Temps (h)
Interphase	10	100	2,78
Prophase	10	100	2,78
Métaphase	10	100	2,78
Anaphase	10	100	2,78
Télophase	10	100	2,78

Figure 3 : Dessin d'observation d'une métaphase dans un apex racinaire d'oignon ( $\times 1000$ ) et estimation de la durée des phases du cycle (cycle complet 25h) à partir du comptage des cellules.

### Analyse des résultats

Une coupe fine de racine d'oignon a été réalisée puis colorée au bleu de toluidine. Les coupes sont montées entre lame et lamelle et observées au microscope optique du grossissement 100 au grossissement 1000 (objectif à immersion). Les résultats des observations et des comptages réalisés sont présentés dans les Figures A à E.

Les figures A et B montrent que l'apex racinaire est formé de 4 grands types de tissu : le parenchyme dans la zone d'élongation, l'épiderme autour de l'apex, la zone méristématique et la cotyle à l'extrémité. Toutes les cellules présentent un cytoplasme, une membrane plasmique et une paroi. Dans la cotyle les cellules sont de forme plus arrondi alors qu'elles sont rectangulaires dans les autres tissus. Dans le parenchyme les cellules s'allongent en s'éloignant du méristème.

La figure C montre les différents stades du cycle cellulaire observés dans la zone méristématique. Les cellules en interphase présentent un noyau avec un nucléole bien visible.

[...] La suite n'est pas rédigée afin de laisser les étudiants travailler dessus pour d'autres tissus présentant du méristème.

NOM — PRÉNOM

Observation au microscope optique et analyse du cycle cellulaire dans un apex racinaire d'oignon verso

### Expérimentation

#### Protocole

1. Prélevez une ou des extrémités de jeunes racines (<10 mm)
2. Placez les échantillons dans un verre de montre avec de l'acide acétique à 10% durant 2 min
3. Placez les échantillons dans l'acide chlorhydrique pendant 3 min. Au bout d'1 min, utilisez la pince ou une lame pour dilacérer (c'est à dire découper grossièrement en fibres longitudinales) les morceaux de racine.
4. Rincez les échantillons à l'eau distillée
5. Déposez l'échantillon sur une lame. Posez une lamelle dessus et écrasez l'échantillon avec un bouchon (appuyez de manière uniforme sur la lamelle). L'échantillon doit être assez étalé.
6. Soulevez la lamelle et déposez une goutte de bleu de toluidine de la concentration de votre choix (n'hésitez pas à tester)
7. Placez sous microscope et réalisez votre observation

#### Risques et EPI

#### Difficultés rencontrées

### Traitement des données

## Informations nécessaires au bon fonctionnement des Travaux pratiques

### I Recommandations

Vous devez, avant de venir en séance :

- Revoir vos cours de microbiologie sur les techniques d'étude des microorganismes
- Lire les manipulations à effectuer et faire un organigramme de ces expériences
- Prévoir des tableaux pour recueillir les données
- Préparer les calculs demandés
- Faire de la bibliographie sur l'étude des micro-organismes

Pour les séances de Travaux Pratiques, vous devez apporter votre polycopié de TP **imprimé**, votre cahier de laboratoire ou du moins de quoi noter, une blouse blanche, un feutre - marqueur indélébile pour le verre, une calculatrice.

Les cheveux doivent être attachés, les chaussures doivent protéger les pieds (pas de chaussures ouvertes), rien ne doit être mis dans la bouche (pas de chewing gum notamment), les téléphones portables sont éteints.

Vous devez enlever vos bagues.

### II Connaissance des micro-organismes et des risques

#### A. Contamination par les micro-organismes

La voie de contamination par un micro-organisme peut se faire par la peau ou les muqueuses, par ingestion, par voie aérienne ou par voie sanguine. Cela va dépendre du matériel que vous utilisez (une seringue peut provoquer une entrée par voie sanguine), de la présence de plaies sur la peau et du mode d'infection de certains organismes pathogènes.

Vous allez travailler avec des quantités de bactéries assez élevées et donc parfaitement compatibles avec une contamination. N'hésitez pas à prévenir l'enseignant si votre état de santé peut vous rendre plus sensible aux infections ou si pendant le déroulement du TP vous avez un doute sur une contamination possible (en particuliers les personnes immunodéprimées, femmes enceintes ...)

Pour information, vous manipulerez au cours de ce TP une souche d'*Escherichia coli* non pathogène.

#### B. Risques associées à la manipulation de micro-organismes

Extrait des recommandations de l'INRS :

« Les dispositions réglementaires relatives à la prévention des risques biologiques relèvent des articles R. 4421-1 à R. 4427-5 du Code du travail. Elles s'appliquent aux établissements dans lesquels la nature de l'activité peut conduire à exposer les travailleurs à des agents biologiques. »

« L'article R. 4421-2 du Code du travail définit les agents biologiques comme étant des micro-organismes, y compris les micro-organismes génétiquement modifiés, des cultures cellulaires et des endoparasites humains susceptibles de provoquer une infection, une allergie ou une intoxication.

Conformément aux dispositions de l'article R. 4421-3 du Code du travail, les agents biologiques sont classés en quatre groupes, en fonction de la gravité croissante du risque d'infection qu'ils représentent pour l'homme. Ce classement ne prend pas en compte les autres risques biologiques (immunoallergiques, toxiques, cancérigènes). Les agents des groupes 2, 3 et 4 sont considérés comme pathogènes. »

« Présentation résumée de la classification réglementaire des agents biologiques

NATURE DU RISQUE	GROUPE 1	GROUPE 2	GROUPE 3	GROUPE 4
Susceptible de provoquer une maladie chez l'homme	Non	Oui	Grave	Grave
Constitue un danger pour les travailleurs	–	Oui	Sérieux	Sérieux
Propagation dans la collectivité	–	Peu probable	Possible	Risque élevé
Existence d'une prophylaxie ou d'un traitement efficace	–	Généralment oui	Généralment oui	Généralment non

Il existe une **liste réglementaire d'agents biologiques** seulement pour les agents des groupes 2, 3 et 4. Cette liste n'est cependant pas exhaustive (agents non encore répertoriés ou identifiés comme pathogènes) et l'absence de classement ne dispense pas d'effectuer une évaluation du risque.

Sont considérés comme agents biologiques pathogènes, au sens de la présente section, les agents biologiques des groupes 2, 3, et 4. Les agents pathogènes se manipulent, selon leur classe de risques, en respectant les mesures de confinement définies pour les laboratoires L1, L2, L3 et L4.

Même si la souche manipulée en TP est non pathogène, vous pourrez être amené plus tard au cours de vos études à manipuler des pathogènes de type 2 et des bactéries issues de l'environnement et qui à ce titre doivent être manipulées comme des pathogènes de type 2. Raison pour laquelle vous considérez ici que vous travaillez avec des souches du groupe 2.

« Dispositions spécifiques à certaines activités :

Au-delà de ces principes généraux de prévention des risques biologiques, certaines dispositions sont plus spécifiques à certaines activités (R. 4424-7 à R. 4424-11).

Dispositions spécifiques aux laboratoires et biotechnologies

Des mesures de confinement appropriées au résultat de l'évaluation des risques s'appliquent dans les salles dédiées aux activités techniques des laboratoires et autres locaux (art. R. 4424-9 et R. 4424-10).

L'arrêté du 16 juillet 2007 modifié précise les mesures techniques de prévention (notamment de confinement) à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses,

d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.

#### Protection des travailleurs en contact avec des objets perforants

En application de l'article R. 4424-11 du Code du travail, l'arrêté du 10 juillet 2013 prévoit des mesures de prévention des blessures et des risques de contamination par des agents biologiques pathogènes pour les travailleurs susceptibles d'être en contact avec des objets perforants dans les établissements de soins.

Cet arrêté précise les catégories d'établissements et les services concernés, les règles applicables en matière d'information et de formation des travailleurs et de prise en charge du travailleur blessé. Il définit ce qu'on entend par accident exposant au sang (AES) et insiste notamment sur la mise à disposition de dispositifs médicaux de sécurité. Son annexe I détaille les précautions standard vis à vis des AES et l'annexe II l'organisation de la prise en charge après AES.

#### Dispositions relatives aux Dasri

Des dispositions relatives aux déchets d'activités de soins à risques infectieux précisent notamment : les modalités d'entreposage et le contrôle des filières d'élimination de ces déchets (deux arrêtés du 7 septembre 1999 modifiés) ;

les emballages devant être utilisés pour l'évacuation de ces déchets (arrêté du 24 novembre 2003 modifié). »

#### C. Consignes de sécurité générales

D'une façon générale, il est préférable d'éliminer le risque ou au moins de circonscrire le risque à la source. Il est essentiel de prendre des mesures de prévention matérielle et d'utiliser des moyens de protection :

- Porter une blouse, qu'il est possible de fermer
- N'utiliser des gants qu'en cas de nécessité et quand leur utilisation ne comporte pas de danger.

Sous un Poste de Sécurité Microbiologique, les gants ne sont pas nécessaires mais peuvent être autorisés MAIS il ne faut jamais les stériliser à l'alcool car cela rend le gant poreux et donc rend possible la contamination.

Autour d'un bec électrique : LES GANTS SONT INTERDITS, le latex peut fondre sur la peau.

- Indiquer au marqueur indélébile sur chaque récipient la nature de la substance qu'il contient.
- Ne jamais pipeter à la bouche ni mettre quoique se soit en bouche pendant un travail sur des micro-organismes
- Ne jamais jeter à l'évier ou dans des poubelles classiques des liquides contaminés (ou des contenants contaminés), il est essentiel de tuer les microorganismes avant leur élimination (soit en javellisant la culture, soit en la passant à l'autoclave)
- Se laver soigneusement les mains avant la manipulation pour protéger celle-ci et après la manipulation pour vous protéger
- Ne jamais fumer, boire, manger, dans la salle de travaux pratiques.

Après chaque manipulation, videz dans les « bidons déchets solides ou liquides » réservés à cet effet tous vos récipients souillés et nettoyez toute votre verrerie sans oublier les inscriptions aux marqueurs.

Nettoyez soigneusement la paillasse ou la table en arrivant et en partant

Ranger comme à l'initial votre paillasse et débrancher les appareils électriques.

#### III Les bons gestes

Le travail en sécurité dans des salles de microbiologie pour les travaux pratiques est très bien décrit sur un site destiné aux enseignants : Réseau Ressource Risque Biologie (3RB) qui a été réalisé en

partenariat entre l'éducation nationale et l'INRS. L'ensemble des consignes ici sont tirées de ce site.A.  
se laver les mains

Il faut se laver les mains : après avoir enlevé les gants – si utilisation de gants (sous les gants :  
majoration de la flore transitaire), à la fin du travail de paillasse, après un éternuement ou pour se  
moucher, à la sortie du laboratoire.

Pour le lavage il faut utiliser un poste équipé pour le lavage des mains avec lave-mains à  
déclenchement non manuel, un savon doux et des essuie-mains jetables. Il faut surtout éviter les  
antiseptiques ou désinfectants pour se laver les mains sauf en cas de contamination accidentelle, le  
mélange de différents produits, la brosse à ongles, responsable de la formation d'excoriations  
favorisant la pénétration de contaminants.

Pour réaliser le lavage des mains :

- 1 - Se mouiller les mains après avoir retroussé les manches.
- 2 - Recueillir une dose de savon liquide.
- 3 - Se savonner 30 secondes environ en insistant sur les espaces interdigitaux, le dos des  
mains et les poignets.
- 4 - Rincer abondamment.
- 5 - Essuyer les mains avec un essuie-mains jetable.
- 6 - Éliminer l'essuie-mains dans une poubelle ouverte ou à commande à pédale (ne pas les jeter en  
DASRI).

## B. Lavage de la paillasse

Le nettoyage est une opération ayant pour but d'éliminer les salissures par une action mécanique ou  
chimique et de priver les micro-organismes de tout substrat organique pouvant favoriser leur  
développement, détachant les salissures d'une surface et les dispersant ou les mettant en solution.  
Le nettoyage doit être suivi d'une désinfection qui permet une "réduction du nombre de micro-  
organismes dans ou sur une matrice inanimée, obtenue grâce à l'action irréversible d'un produit sur  
leur structure ou leur métabolisme, à un niveau jugé approprié en fonction d'un objectif donné,  
action du désinfectant momentanée et pouvant être limitée à certaines espèces : bactéries :  
bactéricide par exemple.

Pour un Nettoyage et une désinfection sans contamination apparente, il faut passer un produit  
détergent/désinfectant en suivant les indications du fabricant ou en utilisant un détergent puis un  
désinfectant selon la procédure suivante à pratiquer intégralement en arrivant dans la salle de  
travaux pratiques et en la quittant :

- Nettoyer, après rangement du matériel et gestion des déchets de la manipulation, à  
l'aide d'un agent tensioactif et d'un papier absorbant éliminé ensuite avec les déchets à  
risque infectieux en portant des gants de ménage.
- Rincer à l'eau puis essuyer en éliminant à nouveau le papier.
- Désinfecter la surface en laissant agir le produit désinfectant.

Ici de l'éthanol dilué sera utilisé.

Après une contamination accidentelle, il faut réaliser une pré-désinfection :

- Mettre des gants à usage unique et absorber le maximum, par mouvement centripète, à l'aide d'un  
papier absorbant éliminé ensuite avec les déchets à risque infectieux.
- Verser un tensioactif en évitant les projections. Essuyer de l'extérieur vers l'intérieur à l'aide d'un  
papier absorbant éliminé ensuite avec les déchets infectieux. Verser de l'eau de Javel à 1 pour cent  
de chlore actif (3 degrés chlorométriques) en recouvrant largement la zone contaminée et laisser agir  
10 à 15 minutes.
- Essuyer de l'extérieur vers l'intérieur à l'aide d'un papier absorbant éliminé ensuite, comme les  
gants, avec les déchets à risque infectieux.

- Pratiquer ensuite un cycle complet de nettoyage - désinfection de la paillasse.

### C. Organisation du poste de microbiologie

Il faut disposer, sur la paillasse de microbiologie, les différents matériels et équipements en fonction de la latéralité de l'opérateur (droitier ou gaucher) et en considérant plusieurs zones en fonction de la position de l'élément chauffant qui crée la zone stérile.

Zone 1 : Placer, selon ses habitudes gestuelles, autour voire dans la zone stérile où seront manipulés les produits biologiques :

- portoirs pour recevoir les tubes de réactifs et de cultures microbiennes
- matériel nécessaire à la manipulation préparé et référencé si nécessaire, avant la mise en route de celle-ci : lames, pipettes, boîtes et tubes stériles ...
- conteneur pour DASRI pour permettre l'élimination immédiate des matériels contaminés

Zone 2 : Installer, à côté, dans une zone à plus faible risque de contamination, les équipements susceptibles d'être en contact avec des matériels ayant été au contact de produits biologiques : microscope, Vortex ...

Zone 3 : Disposer, à distance, dans (ou sur) une zone sans risque de contamination à priori le matériel qui ne sera pas touché lors de la manipulation : fiches de procédures sous plastique, cahier de laboratoire, nécessaire d'écriture (stylos, crayons, ...) ou ordinateur..

ATTENTION A NE JAMAIS METTRE A PROXIMITE DU BEC ELECTRIQUE, TOUTE SOURCE CONTENANT DE L'ETHANOL, COMME LE PULVERISATEUR. ATTENDRE LE REFROIDISSEMENT DU BEC ELECTRIQUE AVANT DE NETTOYER VOTRE PAILLASSE A L'ETHANOL.



Figure 1. Organisation de paillasse sous bec bunzen.

### D. Utilisation d'un poste de sécurité microbiologique

Employer, dans le cadre de la prévention du risque biologique lié aux aérosols dangereux, un PSM aux caractéristiques suivantes : de type II de marque NF-PSM répondant à la norme NF EN 12469 (pour protection du manipulateur, de l'environnement et du produit), de largeur 1,20 m, un plan en

inox plein ou perforé, des filtres absolus HEPA (High Efficiency Particulate Air au moins de classe H14).

Avant la manipulation, il faut préparer le PSM

- Mettre la ventilation en marche 15 minutes minimum avant la manipulation.
- Se laver soigneusement les mains et les avant-bras.
- Nettoyer le plan de travail à l'aide d'un détergent sans oxydant compatible avec les matériaux. Un vaporisateur d'éthanol sera à votre disposition.
- Introduire le matériel nécessaire après l'avoir passé à l'alcool.
- Positionner le matériel en n'obstruant pas les bandeaux d'aspiration avant et arrière.

Lors de la manipulation, il faut :

- Régler la hauteur du siège
- Se positionner de façon à ne pas gêner l'aspiration par la veine de garde (bandeau d'air aspiré à l'avant du plan de travail qui crée une barrière immatérielle et protège le manipulateur)
- Utiliser des gants pour la manipulation des prélèvements pathologiques et des cultures cellulaires infectées par des virus.
- Ne jamais utiliser de bécqs chauffants dans l'enceinte (perturbation du flux et risque d'altération du filtre HEPA).
- Manipuler au centre en évitant tout mouvement brusque.
- Décontaminer immédiatement le plan de travail en cas de contamination.



Figure 2. Organisation de la paillasse sous PSM.

## Conseils divers

### En arrivant en salle de TP de microbiologie :

Déposer vos affaires dans les casiers mis à votre disposition.

Récupérer les affaires dont vous aurez besoin durant le TP (blouse, marqueur, calculatrice, de quoi noter ...)

**Lavez vous les mains** en entrant dans la salle, puis rejoignez une paillasse

NB : il est interdit de boire ou manger dans les salles de TP (pour boire par exemple, demandez à sortir, lavez vous les mains, sortez boire, revenez dans la salle, lavez vous les mains et rejoignez votre paillasse)

### Très important conseils/modes opératoires préalables :

#### Stérilité :

En microbiologie il est important de :

- Ne pas se contaminer quand est manipulée une bactérie pathogène,
- Ne pas contaminer la culture avec les bactéries présentes dans l'environnement,

d'où l'importance de **manipuler stérilement** c'est-à-dire autour d'un bec électrique, sous un PSM, avec des mains propres, des outils (oese, pipettes, ...) stériles et des milieux stériles.

Tout le matériel utilisé lors de ce TP a été stérilisé d'une manière ou d'une autre :

- Les milieux (LB), les ustensiles (comme les erlens, les tubes de 1.5 ou 2 ml, les cônes de vos pipettes ...) ont été stérilisés à l'autoclave. En règle générale tous les ustensiles stériles passés à l'autoclave possèdent un scotch témoin de stérilité (blanc avec des stries noires). Il est important d'ouvrir ces différents ustensiles dans un environnement stérile et de maintenir l'indicateur de stérilité quand c'est possible (boîtes de cônes ou pots de tubes par exemple).
- Les éléments (comme les oeses) sont à stériliser au bac électrique avant toute utilisation et à re-stériliser après utilisation (pour éviter de contaminer le lieu de stockage).
- Des éléments à usage unique stériles sont utilisés sous PSM (oeses, tubes, erlens ...).

Vous devez donc maintenir des conditions de stérilité optimales tout au long de ce TP.

**IL EST IMPORTANT DE SE LAVÉ LES MAINS SOUVÉNT AFIN DE NE PAS CONTAMINER VOS ÉCHANTILLONS AVEC LES BACTÉRIES PRÉSENTES SUR VOTRE PEAU.**

#### Gestion des déchets :

Vous allez lors de ce TP, générer des **déchets biologiques**, il est important de respecter les consignes de gestion des déchets.

Les déchets biologiques ne doivent pas être jetés dans les poubelles classiques. Ils se distinguent entre **déchets biologiques liquides** et **déchets biologiques solides**. Il est formellement interdit de relâcher potentiellement dans la nature des déchets biologiques.

Les **déchets liquides doivent être autoclavés**, pour cela une « poubelle déchets liquides sera à votre disposition afin d'y jeter vos déchets biologiques liquides (comme les cultures que vous aurez utilisé pour mesurer la densité optique de votre culture en croissance).

Les déchets biologiques solides (comme les cuves souillées par vos cultures) vont dans une poubelle appelée **DASRI jaune**.

Tout au long du protocole de ce TP des indications sur la gestion des déchets seront faites, il est important de les respecter, cela est un critère d'évaluation.

Sur chaque paillasse (et sous un PSM), une « mini-poubelle » de déchets solides sera à votre disposition, la vider dans la poubelle DASRI quand elle est pleine et/ou à la fin du TP.



Figure 3 : Gestion des déchets biologiques

### Importance de l'organisation de votre paillasse (ou du PSM)

Il est important d'avoir une paillasse organisée selon que vous êtes droitiers ou gauchers, afin de faciliter les manipulations.

Pour les droitiers, le portoir de pipettes, peut être au fond de la paillasse, la boîtes de cônes doit être sur votre droite, elle sera ainsi plus facilement ouvrable avec votre seule main droite. Tous les outils d'une façon générale doivent être sur votre droite. A l'inverse les tubes, portoirs et autre contenants doivent être situés sur votre gauche. La manipulation en elle-même se fait devant, en ramenant les contenants devant vous.

Pour les gauchers c'est l'inverse ...

L'organisation correcte de votre paillasse ainsi que sa propreté constituent un critère d'évaluation.

### En cas de renversement de liquides biologiques

En cas de renversement, et dans la mesure où la bactérie avec laquelle vous travaillez n'est pas pathogène vous devez :

- Epongez le liquide renversé avec du papier sopalin (avec gant) et jeter ce papier sopalin dans un DASRI (déchets solides)
- Puis nettoyer avec de l'éthanol la région souillée, puis le jeter en DASRI (cf précédemment)
- Puis lavez vous les mains consciencieusement à l'évier avec du savon.

En cas de projection de bactéries sur la peau, de la même façon épongez puis lavez vous à l'eau et au savon consciencieusement.

En cas de projection dans les yeux, un lave-œil est à votre disposition dans la salle.

## Manipulations à réaliser pendant le TP

Vous disposerez de deux sources d'une même souche d'*E. coli* (souche non pathogène) :

- Un tube appelé bouillon correspondant à une culture liquide d'*E. coli* contenant 2 ml de culture. Cette culture de bactérie correspond à une croissance sur la nuit de la souche à 37°C. Elle est dense en bactérie et a un aspect opaque.
- Une boîte de Pétri ensemencée sur la gélose avec la souche d'*E. coli* sur milieu nutritif LB. Le LB est considéré comme un milieu riche.

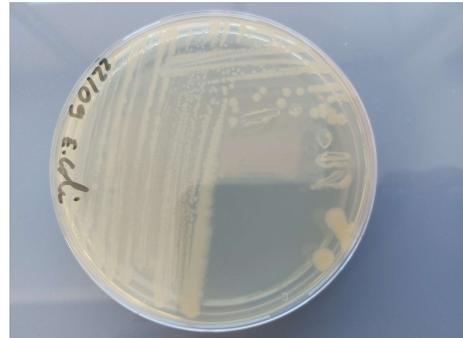
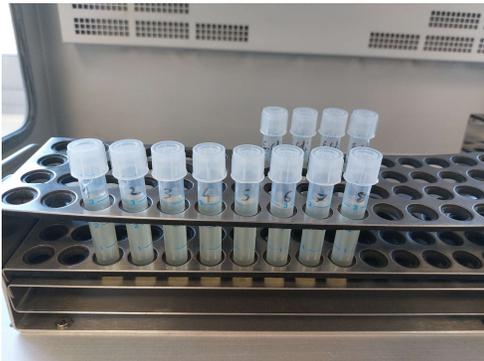


Figure 4 : Sources de bactéries à la disposition des étudiants.

### Réaliser une courbe de croissance

Ces expériences se réaliseront sur la paillasse.

#### Mode opératoire :

- Prélever 0.5 ml du bouillon et ensemencer (c'est-à-dire ajouter ces 0.5 ml dans) un erlen de 100 ml bouché avec du coton cardé et de l'aluminium dans lequel est disposé 20 ml de milieu LB.
- NB : Il est important de maintenir dans votre main le coton cardé/aluminium dans une main quand vous prélevez, le coton cardé/aluminium ne doit pas être posé sur la paillasse. Anticipez donc l'ouverture de la boîte de cônes par exemple.
- Notez vos initiales sur l'erien au marqueur indélébile
- Placer cet erlen dans un incubateur à 37°C dans un support (appelé tulipe) de taille approprié ou sur une plaque collante selon l'incubateur utilisé (Figure 4). Si aucune tulipe appropriée n'est disponible, caller votre erlen avec du papier absorbant. L'incubation se faisant avec agitation (condition aérobie) il est important d'éviter tout renversement de votre erlen.
- Déclencher un timer en mode chronomètre (début de l'expérience = t0)
- Mesurer la densité optique de votre culture toutes les 30 minutes au spectrophotomètre à 600 nm. Ces mesures devront être effectuées tout au long du TP.

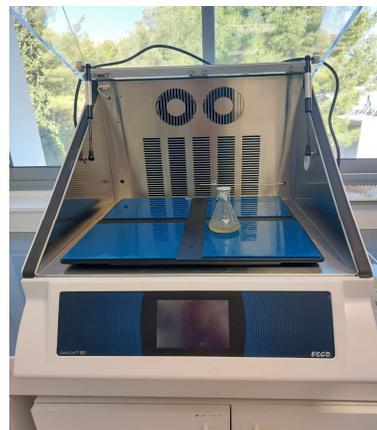


Figure 5 : Incubateurs

NB : Faire une mesure de densité optique toutes les 30 minutes est optimal. Cependant si pour une raison ou une autre vous n'êtes pas en mesure de prendre la densité optique à l'heure voulue, il est important de noter l'heure exacte à laquelle vous mesurez votre densité optique. Vous pouvez par exemple mesurer votre densité optique au bout de 1h10 (au lieu de 1h) mais notez 1h10 (en non 1h) de manière à représenter le plus fidèlement la courbe de croissance. Vous pouvez également anticiper une mesure à 2h20 (au lieu de 2h30 par exemple) en fonction du travail à effectuer.

Protocole de mesure de densité optique :

- Récupérer votre erlen dans l'incubateur
- Prendre une cuve de 1.5 ml
- Aller à votre paillasse et ouvrir l'erlen en respectant les critères de stérilité
- Prélever 1 ml de culture et la transférer dans la cuve
- Refermer votre erlen et aller le replacer dans l'incubateur – vérifier à la fermeture de la porte de l'incubateur que l'agitation reprend correctement.
- Mesurer au spectrophotomètre à 600 nm la densité optique
- Noter la valeur mesurée et le temps au quel votre mesure a été faite

NB : il est important d'être assez rapide et d'éviter que votre culture passe trop de temps en dehors de l'incubateur et de son agitation. Cela fausse et ralentit considérablement la vitesse de croissance.

Gestion des déchets :

- Les cônes, cuves vont dans la poubelle de paillasse « déchets solides » puis finiront leur course dans la poubelle DASRI en fin de TP
- Les cultures issues de vos cuves vont en « déchets liquides ». Ne pas remplir les déchets liquides à ras bord. Ces déchets vont être autoclavés (liquides montés à 120°C bouillent et donc il faut éviter tout risque de débordement) Quand la poubelle liquide atteint les 4/5eme de son volume maximal en demander un autre ...
- Une fois les mesures finies, l'erlen doit être nettoyé de toute trace d'écriture et doit être placé dans une bassine tel quel sans enlever la culture restante au fond de l'erlen. L'erlen sera autoclavé avec la culture restante. Ces bassines sont localisées à proximité des éviers.

NB : quand votre densité optique deviendra supérieure à 0.8-1, il est important de diluer votre échantillon, un spectrophotomètre est linéaire (cad mesure correctement vos échantillons) dans une gamme entre 0.1-0.2 et 0.8-1. Au dessus de cette dernière valeur, il est essentiel de diluer votre échantillon (au 1/2, 1/4 ...) afin de mesurer une DO dans la gamme de linéarité du spectrophotomètre. Bien évidemment lors de la prise en compte de votre valeur pour établir votre courbe de croissance, il faudra prendre en compte la valeur réelle de votre culture et non sa version diluée !

Une fois l'ensemble des valeurs de DO réunies, vous devrez faire une courbe de croissance et mesurer toutes les valeurs essentielles pour interpréter correctement une courbe de croissance (temps de génération, taux de croissance ...).

### Mesurer une concentration bactérienne avec les Cellules de Malassez

#### Expérience à réaliser sous PSM

Lorsque votre culture atteindra environ une DO600 de 0.2, 0.6 et 1.2 vous devrez déterminer la concentration bactérienne en utilisant une cellule de Malassez.

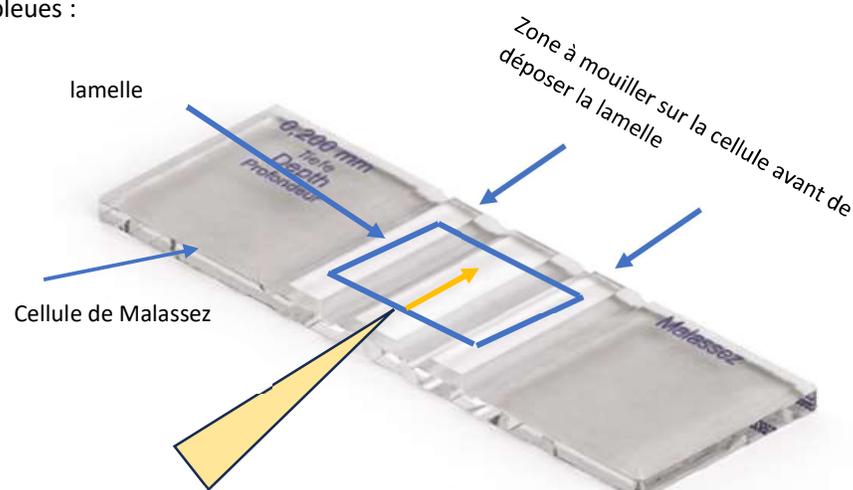
Vous devez lire le document relatif aux Cellules de Malassez avant de réaliser la manipulation.

Protocole de préparation des cultures :

- Prendre la DO600 de la culture
- Diluer la culture dans du LB pour atteindre une DO600 à 0.2 dans des tubes eppendorf de 1.5 ml.

Montage de la cellule de Malassez :

- Mouiller un doigt et passer le sur les côtés de la cellule comme indiqué ci-dessous par les flèches bleues :



Pipette + Cône rempli de culture à placer à poser sur la lame à proximité de la lamelle

La culture va diffuser sous la lamelle

Figure 6, Les cellules de Malassez

- Ajouter une lamelle recouvrant la partie centrale
  - Pipeter 50  $\mu$ l de la culture diluée et venir mettre le cône à la jointure entre la lamelle et la cellule,
  - expulser votre culture du cône (elle va naturellement passer sous la lamelle)
  - arrêter d'expulser votre culture lorsqu'elle atteint le côté opposé de la lamelle
- NB : si le volume expulsé est trop important l'excès de culture va déborder dans les rigoles prévues à cet effet. Cependant un excès de culture peut soulever la lamelle et rendre le comptage faux.
- Moralité, il faut vraiment arrêter d'expulser la culture du cône lorsqu'elle atteint le côté opposé de la lamelle.
- Placer votre cellule sous le microscope objectif x40.
  - Compter le nombre de bactéries sur 10 petits carrés (en rouge sur la figure ci-dessous) de manière aléatoire

- Faire la moyenne et l'écart type à partir de vos données et calculer selon les indications du document sur les cellules de Malassez le nombre de bactéries/ml. Ne pas oublier le facteur de dilution quand une dilution est réalisée.
- Discuter de la cohérence des valeurs obtenues avec celles des DO600
- En profiter pour observer les cellules : coques, bacilles forme, coloration ? et se poser des questions sur le mode de vie de cette bactérie (mouvement, bactérie aérobie/anaérobie ...)

#### Gestion des déchets :

- Les cônes, tubes fermés (même avec un faible volume de liquide de culture à l'intérieur) vont dans les poubelles déchets solides
- La cellule de Malassez entre chaque utilisation doit être nettoyée. Plongez votre cellule dans un bain d'éthanol. Vous disposerez de pots en verre rempli d'éthanol, à 70° localisez près des éviers. Dans le bain d'éthanol, séparer la lame de la lamelle en poussant légèrement la lamelle. Jetez la LAMELLE (et pas la cellule !!!) dans la poubelle à verre déchets biologiques. Incubez la cellule environ 15 minutes dans le bain. Rincez la cellule à l'eau et séchez là près du bec électrique. Attention à ne jamais mettre le bain d'éthanol à proximité du bec électrique (risque d'inflammation).
- Après la dernière utilisation de la cellule de Malassez plongez la directement sans enlever la lamelle dans un bain de javel prévu à cet effet et situé proche de l'évier.
- Ne jetez surtout pas la cellule de malassez dans la poubelle à verre déchets biologiques !!!!

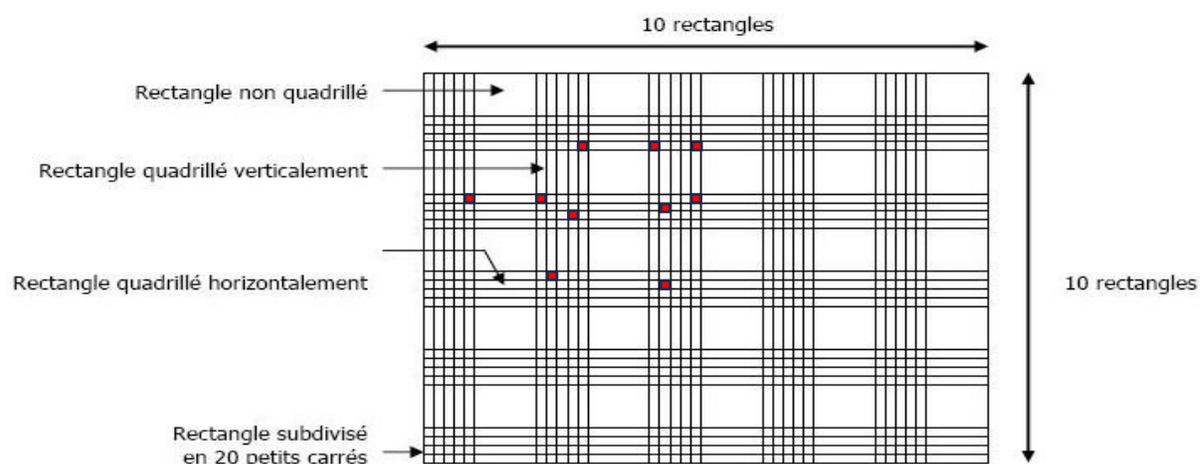


Figure 7 : Cellule de Malassez

#### **Mesurer une concentration bactérienne par dilution en cascade**

On considère approximativement que pour une DO600 de 1 il y a environ  $5 \cdot 10^8$  bactéries /ml. Il s'agit d'une approximation car la taille des bactéries varie (quelques  $\mu\text{m}$  pour du *Myxococcus*,  $1 \mu\text{m}$  pour un *E. coli* et plutôt  $0.5 \mu\text{m}$  pour un *Staphylococcus*). De plus quand on mesure une DO, les bactéries mortes, les vivantes et tout débris cellulaire va être pris en compte. La DO600 ne permet donc pas de mesurer parfaitement la concentration cellulaire.

En outre, ici nous souhaitons mesurer la concentration de bactéries vivantes uniquement.

Le but ici va être de mesurer par dilution en cascade la concentration bactérienne du bouillon qui vous est fourni.

Vous devez ici préparer un mode opératoire pour réaliser des dilutions en cascade de telle sorte à pouvoir compter sur boîtes après incubation d'une nuit : 10 colonies sur une boîte de Pétri, 100 colonies sur une deuxième boîte et 1000 colonies sur une troisième boîte.

Pour cela vous devez respecter les contraintes suivantes :

- Vous disposez d'un spectrophotomètre pour mesurer la DO600 de votre culture. Attention aux dilutions !!!
- Vous disposez de tubes de volume maximum de 1.5-2 ml (ne pas utiliser d'autres tubes pour réaliser vos dilutions)
- Vous disposez de 15 ml de milieu LB
- Vous ne pouvez pas pipeter de volumes de moins de 10 µl
- Vous devez étaler sur chaque boîte un volume de 100 µl

Les calculs et organigramme de la manipulation sont à préparer avant le TP et doivent être montrés à l'enseignant référant avant de commencer. La préparation correcte du TP inclut la réalisation des calculs.

**La manipulation se fait sous PSM.**

Notes opératoires :

- Nettoyer la paillasse du PSM à l'alcool
- Amener sous le PSM le matériel nécessaire et le passer à l'alcool (pipettes, boîtes de cônes, tubes, LB, portoirs ...)
- Rentrer sous le PSM un vortex (prise au fond du PSM)
- Réaliser les dilutions par pipetage successif
- Penser à bien vortexer vos tubes avant/après tout pipetage
- Penser à bien changer de cônes selon ce qui est pipeté
- En général, on ajoute d'abord le LB partout, puis les cultures en cascade d'un tube à l'autre (vortexez !)
- Une fois que vos échantillons sont prêts il faudra étaler, sur boîtes de Pétri, vos dilutions en utilisant la technique du râteau. Votre enseignant vous fera une démonstration.
- Placez ensuite les boîtes géloses en haut, couvercle en bas dans un incubateur à 37°C
- Entre 24 à 48h après l'expérience vous devrez revenir au laboratoire (Attention venez par groupe TP entier) après avoir vu avec votre enseignant la meilleure période pour venir dans les délais impartis, prendre en photo vos boîtes de pétri afin de les compter
- Une fois les données obtenues vous devez « remonter » votre cascade afin de déterminer la concentration de votre culture originelle. Mettre vos données en rapport avec ce qui était attendu. Discutez de la cohérence de vos résultats.

Gestion des déchets :

- Les tubes de 1.5-2 ml fermés (même contenant du liquide) peuvent être jetés dans la poubelle « déchets solides » puis in fine dans le DASRI. Idem pour les cônes, les râtaux ...
- Les restes de LB non utilisés peuvent être vidés à l'évier et même s'ils ne sont pas des déchets biologiques véritables, les jeter dans la poubelle déchets solides
- Les tubes de bouillon fournis en début de TP sont à vider en « déchets liquides » et les tubes en « déchets solides », ces tubes n'étant pas parfaitement fermables.
- Après avoir pris en photo vos boîtes de Pétri, ces boîtes sont jetées dans les DASRI.

**Étalement par la méthode des cadrans (ou étalement trois temps)**

A partir de la boîte de Pétri fournie où a poussé votre souche de référence, vous allez devoir repiquer cette souche selon la méthode des cadrans. Cette technique est utilisée lorsqu'une souche doit être repiquée pour une utilisation ultérieure ou lorsqu'une souche est sortie du congélateur à -80°C par exemple et permet notamment de vérifier l'uniformité des colonies et l'absence de contaminants.

Mode opératoire :

**Expérience réalisée autour du bec électrique**

- se munir d'une oese (ensemenceur), d'une boîte de Pétri vierge stérile et d'une boîte de Pétri où la culture a été préalablement étalée
- stériliser l'oese au bec électrique
- puis la laisser refroidir sans la poser (elle doit rester stérile) soit en attendant soit en la plongeant dans la gélose d'une boîte de Pétri dans une zone dépourvue de cellules (au contact de la chaleur la gélose va crépiter, c'est normal)
- prélever avec la boucle de l'oese une colonie isolée sur la boîte préalablement ensemencée
- étaler à la surface de la gélose cette colonie sur environ 1/3-1/2 de la boîte de Pétri vierge
- stériliser l'oese afin d'éliminer toute bactérie
- refroidir l'oese
- faire quelques aller/retour à la surface de la gélose nouvellement ensemencée puis étaler ce qui a été récupéré sur environ 1/3-1/4 de la boîte vierge
- restériliser l'oese, la refroidir et refaire la même opération sur le 1/3 restant de la boîte
- Mettre la boîte à incuber gélose en haut dans un incubateur (sans agitation) à 37°C

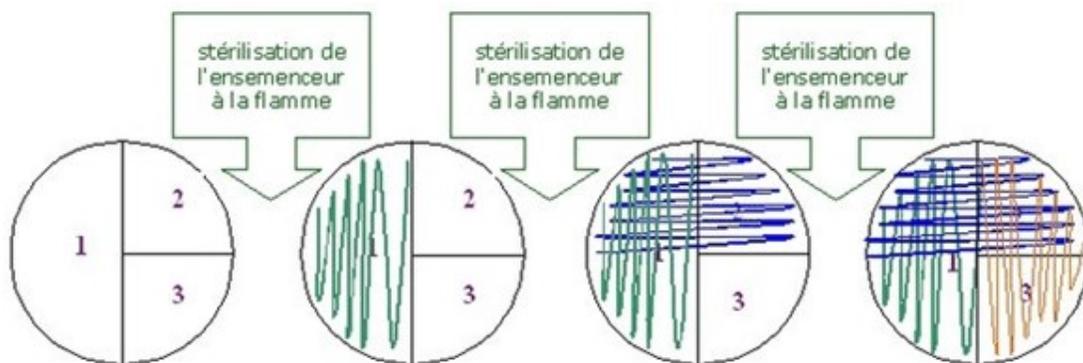


Figure 8 : Etalement en cadran

Vous devriez obtenir une boîte ressemblant à la figure 4 après 24-48h d'incubation à 37°C

Gestion des déchets :

Cette boîte, après 24-48h d'incubation, sera jetée dans les containers DASRI.