

BACTERIOLOGIE

VI. Méthodes de culture et Observations microscopiques

- 1) Les différentes formes de bactéries
- 2) Observations en microscopie électronique
- 3) Les méthodes de culture
- 4) Identification des Staphylocoques

VII. Les traitements

VIII. Prévention

La Croissance Bactérienne

I. Définition

II. Méthodes de mesure de la croissance

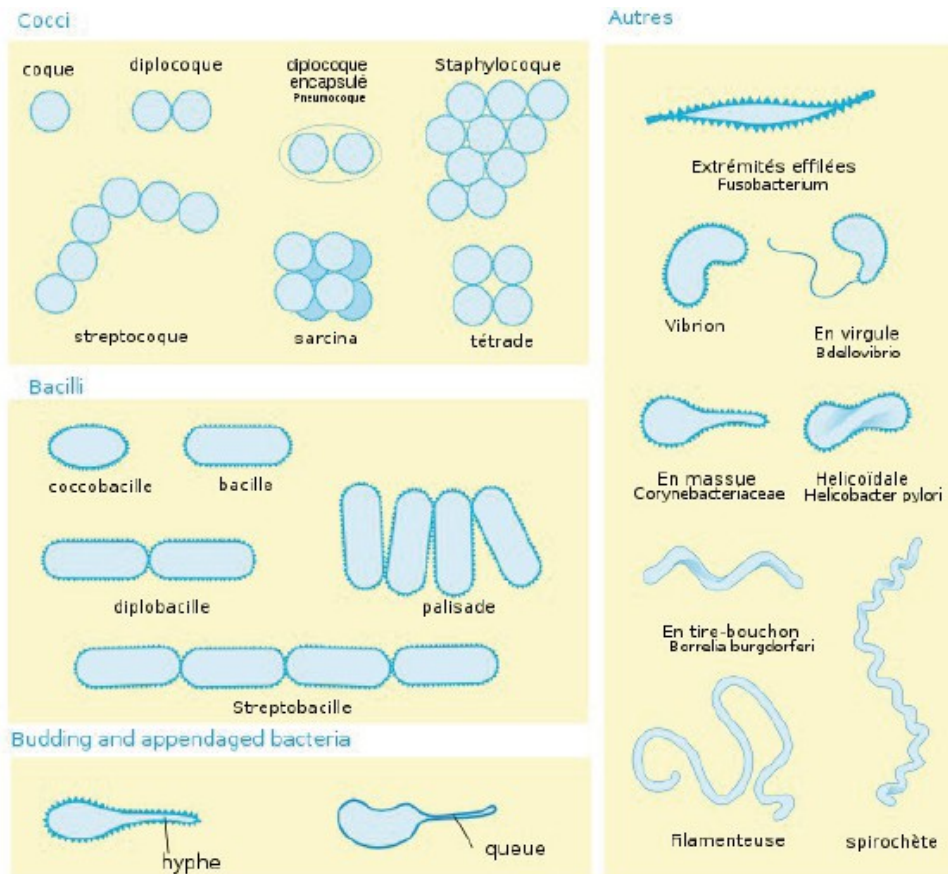
- 1) Dénombrement des cellules par unité de volume
- 2) Mesure de la masse cellulaire
- 3) Mesure de métabolisme

III. Aspect théoriques de la croissance en milieu liquide non-renouvelé

VI. Méthode de culture et Observation microscopique

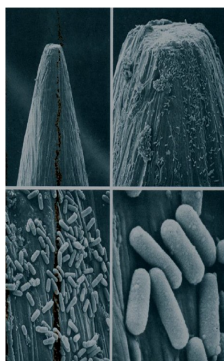
1) Les différentes formes de bactéries

En microscopie optique il est possible de distinguer seulement 3 particularités de la bactérie : La forme (coques, bacille, vibrille), le GRAM et l'organisation.



- on peut ajouter les Bifides en forme de Y qui ne sont pas marquées.
- La forme tétrade correspond au fait que les bactéries restent collées entre elles lors des divisions.

2) Observation en microscopie électronique



La nécessité de passer des microscopes optiques aux microscopes électroniques est due à l'existence de bactéries intracellulaires comme les Rickettsias (agent du Tifus), les mycobactéries comme le bacille de Koch (agent de la tuberculose), des Chlamydia (agent de la syphilis) ou les mycoplasmes qui sont des bactéries sans paroi.

De plus des études sont menées dans le but d'observer les modes de colonisation des bactéries et leurs attaques sur différentes surfaces : C'est la **Biocorrosion**.

3) Les méthodes de culture

Il y a 2 principales méthodes de culture :

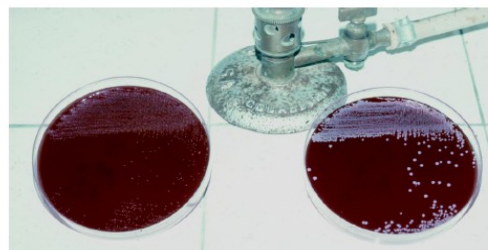
- en liquide (bouillon)
- en solide (géloses dans des boîtes de pétri ou des tubes).

Pour optimiser la culture de type bactérien, il faut connaître les propriétés de leurs environnements tels que le pH, la température et la pression osmotique qui sont des critères de croissance d'une bactérie. Pour chaque espèce bactérienne, il y a un optimum de température, de durée d'incubation, de pH du milieu et une certaine tolérance pour ces différents facteurs. Ces conditions sont appelées **conditions optimales de croissance**.

Notons que si sur un prélèvement on observe après mise en culture, un certain type de bactérie, ce sera dû au milieu de culture qui aura permis la croissance. Pour autant ça ne veut pas dire que les autres types de bactérie n'étaient pas présents...

La stérilité est une notion récurrente dans les mises en culture. Pour cela on travaille près d'un bec benzène pour créer un champs stérile autour de la boîte de pétri qui permettra non seulement de ne pas contaminer l'échantillon par d'autres bactéries et de plus de ne pas être contaminer par l'échantillon.

En boîte de Pétri (Ø 9 cm)



Culture pure



Culture mixte

– Le milieu solide

Lorsque l'on dépose une bactérie sur la surface d'une boîte de pétri, on va pouvoir observer à l'œil nu, après incubation, des amas de cellules correspondants à des colonies qui contiennent à peu près 10^8 cellules.

Ces amas sont appelés **UFC** (unité formant des colonies) formés à partir d'une cellule isolée (ou d'un clone).

En milieu solide on peut observer deux types de culture :

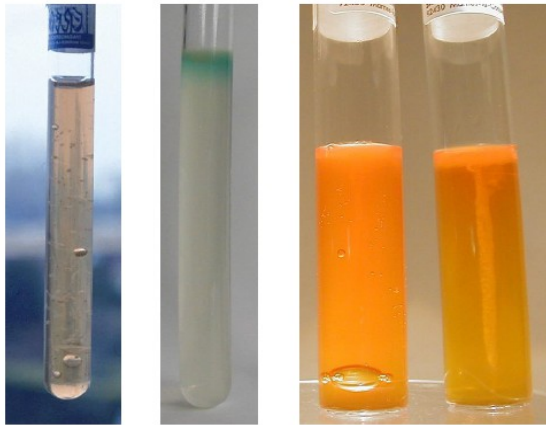
- des cultures pures avec des colonies formées à partir d'un seul type de bactérie.
- des cultures mixtes dont les colonies sont formées d'au moins 2 types de bactéries.

Le but est maintenant de pouvoir reconnaître les types de bactérie grâce aux UFC qui sont caractéristique d'une espèce bactérienne.

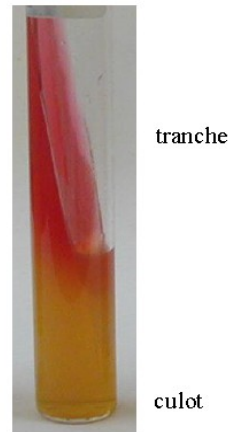
- Le milieu liquide

En tube

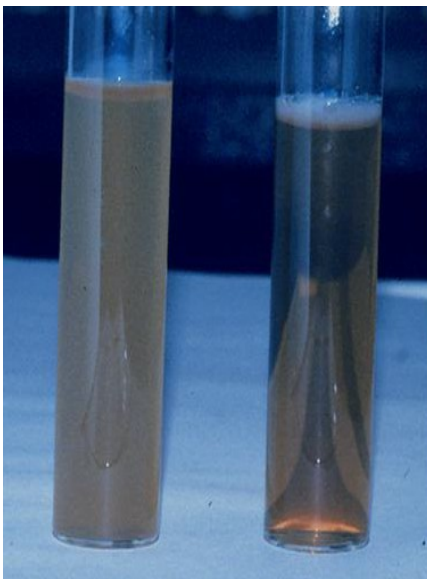
Géloses en culot



gélose semi-inclinée



En milieu liquide, on observe principalement des modifications biochimiques pour identifier les types bactériens comme par exemple la présence de gaz, des modifications de pH par fermentation de sucres.



La turbidité nous renseigne aussi sur la nature des bactéries présentes. Dans le tube de droite la présence d'un trouble seulement à la surface du tube met en évidence la nature aérobie des bactéries (elles ont besoin d'air et ne peuvent donc pas se développer dans le liquide).

4) Identification des Staphylocoques

Pour identifier un staphylocoque on va utiliser un milieu solide contenant du sang gélifié. Après dépôt et formation d'UFC, on peut voir autour une zone plus claire qui est due à la dégradation des hématies par les hémolysines du staphylocoque. Cette hémolyse est appelée hémolyse α à la différence des streptocoques qui sont β hémolytiques selon l'importance de la zone décolorée.



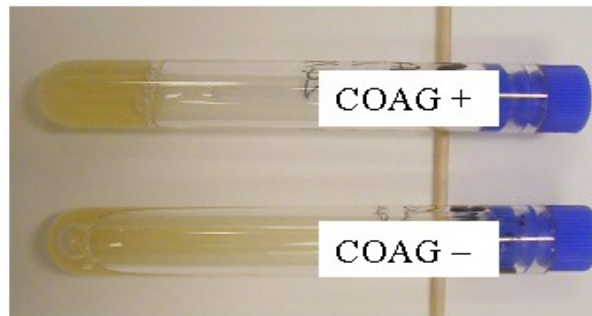
Une autre caractéristique du staphylocoque qui permet de l'identifier est sa capacité de pousser sur les milieux hypertoniques. Ce milieu s'appelle **milieu de Chapman**; il est hypersalin et riche en mannitol. Le mannitol est utilisé par les staphylocoques comme source de carbone dont la fermentation va augmenter le pH. Il suffit donc d'avoir un indicateur coloré dans la gélose pour révéler cette utilisation par la bactérie.



D'autres bactéries sont capables de croître dans de tels milieux mais l'addition de cette caractéristique et la présence d' α hémolyse permet de confirmer la présence de staphylocoques.

– Les autres méthodes utilisées pour identifier un staphylocoque sont des méthodes enzymatiques. Elles ont l'avantage d'être plus discriminantes car elles permettent de déterminer la nature d'une bactérie en fonction des enzymes qu'elle sécrète.

- La coagulase : on dépose une culture bactérienne dans du sérum de lapin. S'il y a présence de coagulase le sérum va prendre en masse et se solidifier. Cette méthode a l'avantage d'être extrêmement simple et rapide.



- Le clumping factor : c'est la capacité des bactéries de fixer le fibrinogène. Dans un milieu on dépose des petites billes de latex à la surface desquelles se trouve du fibrinogène. Au contact d'un dépôt de culture de staphylocoque les billes vont agréger. Cette méthode est aussi très rapide.



- La DNase : Dans un milieu contenant de l'ADN on va déposer un culture bactérienne. La présence de DNase va être visible par la décoloration du milieu comme visible sur l'image.

VII. Traitement

Pour les staphylocoques superficiels on utilise des antibiotiques locaux pour éviter la diffusion.

Pour les cas plus sévères (furuncles, panaris) on pratique la chirurgie, une simple incision mis à part pour les sujets fragiles (personnes âgées) pour lesquels on utilise juste des antibiotiques.

On distingue deux types de staphylocoques :

- Les **SASM** (Staphylocoque Aureus Sensible à la Méricilline).
- Les **SARM** (Staphylocoque Aureus Résistant à la Méricilline).

Pour les SASM l'antibiotique de choix est la Pénicilline M (oxacilline).

Pas les pénicillines G, car on estime aujourd'hui qu'il y a environ 95% de résistants chez les staphylocoques.

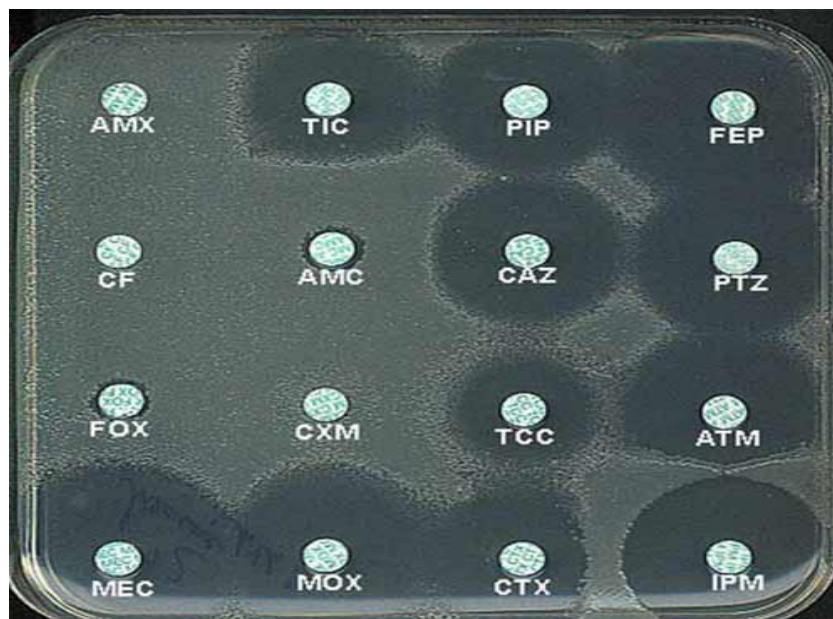
On peut aussi utiliser : Rifampicine, Pristinamycine, certains glycopeptides.

Autre traitement qui est très efficace, la combinaison entre la pénicilline et un aminoside (la gentamycine). On parle d'action synergique entre les deux.

En ce qui concerne les SARM : ils ont toujours existé mais l'utilisation d'antibiotiques à base de méticilline leur a permis de croître puisque ces antibiotiques leur ont laissé le champs libre en éliminant les autres *staphylocoques aureus*.

On parle donc d'émergence des SARM et non d'apparition. On estime qu'actuellement 25% des *staphylocoques aureus* en milieu hospitalier sont des SARM (à noter qu'en plus d'être résistant à la méticilline ils sont régulièrement multi-résistants à d'autres antibiotiques, antiseptiques courants tels que : chlorure benzalkonium, chrorhexidine...). C'est pourquoi avant prescription, il faut faire un **antibiogramme** :

- Les ronds blancs sont différentes pastilles d'antibiotiques, elles sont déposées sur une culture de staphylocoque prélevées chez le patient. On voit grâce aux **auréoles d'inhibition** quelles sont les résistances aux antibiotiques.



Comment agit la pénicilline ? Le staphylocoque synthétise sa paroi grâce à une protéine la PBP (Penicillin Biding Protein) seulement cette protéine a comme effet secondaire de se fixer à la pénicilline or celle-ci empêche cette protéine d'agir et donc empêche la synthèse de la paroi. Les SARM ont comme protéine la PBP2a qui ne se fixent pas à la pénicilline. Cette différence est due au gène MecA porté par les SARM. Le problème c'est que ce gène est sur un élément transposable, on parle donc de flexibilité génétique qui joue en la faveur du développement des staphylocoques résistants.

Les SARM sont beaucoup plus présents en milieu hospitalier, on les distingue de ceux en milieu communautaire que l'on nomme CA-SARM (rarement multi résistants et donc il s'agit souvent d'infections peu graves). Le traitement se fait par glycopeptides (essentiellement la vancomycine). Seulement à force d'utiliser la vancomycine de manière systématique on tombe sur des VRSA-SARM (résistants en plus à la vancomycine). Actuellement la vancomycine est réservée

aux cas graves de SARM et donc le taux de VRSA-SARM à diminué, elle est associée dans son traitement à de la rifampicine.

VIII. Prévention

Les infections nosocomiales sont des problèmes fréquents en milieu hospitalier. Une des démarches est de dépister les porteurs de SARM à leur arrivée à l'hôpital avant l'opération. En effet, bien souvent ce sont des endo-infections, donc on regarde si la personne est déjà porteuse, on va la traiter avant l'opération pour limiter les risques d'infection.

Problème du portage nasal des *Staphylococcus aureus* qui entraîne des mesures d'isolement pour limiter la dissémination et des mesures préventives essentielles : hygiène des mains, tenues, locaux.

Ces mesures ont permis de baisser le taux de SARM à l'hôpital de 15%.

La Croissance Bactérienne

I. Définition

Croissance cellulaire : Gain pondéral de matière organique.

Multiplication cellulaire : Augmentation du nombre de cellules formées et donc augmentation de la masse cellulaire.

Croissance in vitro : Dans des milieux liquides/solides, souvent dans un environnement optimal.

Croissance in vivo : Nécessité d'adaptation aux nutriments présents, aux effets de l'environnement extérieur (phagocytose, inhibition par des produits anti-bactériens...) ce qui engendre une croissance ralentie comparée à un environnement optimal.

II. Méthodes de mesure de la croissance

Principe de Turbidité : passage d'un faisceau lumineux dans un tube contenant une souche en culture. Plus la turbidité est élevée, plus le faisceau lumineux est freiné, ce qui est proportionnelle à la croissance microbienne du milieu. Mesurable donc par l'absorbance ou la Densité Optique (DO).

Ex : Un tube contenant une souche qui s'est beaucoup développée absorbera une grande partie du faisceau lumineux. Après traversée du tube on mesure ce qu'il « reste » du faisceau et on peut en déduire la croissance microbienne.

L'aspect macroscopique du tube est variable selon la souche qu'il contient. On ne peut comparer la turbidité de deux souches différentes.

1) **Dénombrement des cellules par unité de volume**

Par microscope : comptage des bactéries cultivables et mortes.

Dépôt d'un volume connu dans une cellule de comptage, comptage des bactéries cultivables et

mortes, extrapolation du nombre initial de bactéries.

Numération des cellules visibles cultivables : On ne va compter que ce qui est viable grâce à cette méthode.

- Méthode par dilution en milieu gélosé : On dilue une culture, puis on dépose sur une masse de gélose. Enfin on compte le nombre de bactéries viables (s'il y en a trop on dilue encore jusqu'à obtenir une bonne dilution) puis on extrapole le nombre initial de bactéries.

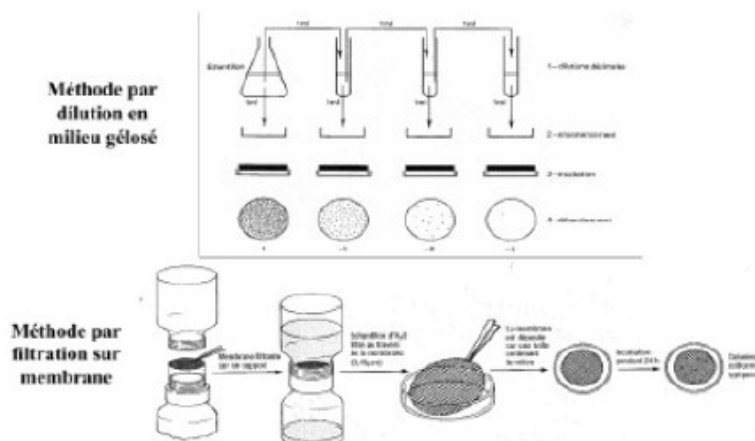
Nombre de cellules au départ = nombre UFC x facteur de dilution

(Les UFC sont les Unités Formant de Colonies. Explication : une bactérie en un cycle en donne deux autres, parfois cette bactérie initiale est constituée de plusieurs parties (diplocoque, streptocoque...), pour éviter tout mélange (savoir si l'on parle de bactérie ou de « partie » de bactérie) on parle d'UFC. Et donc une UFC donne, après un cycle, deux UFC peu importe de quelle souche il s'agit.)

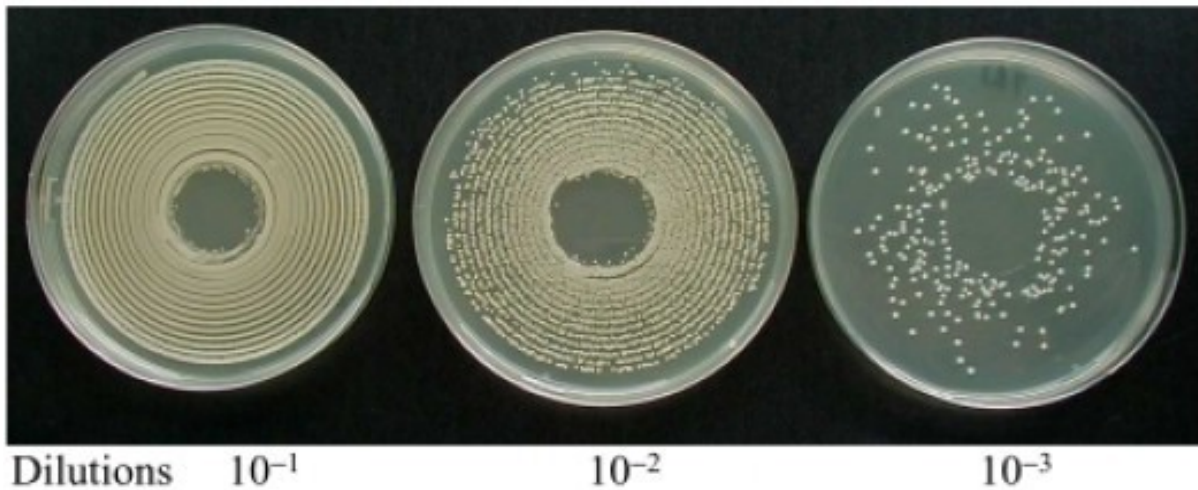
- Méthode par filtration sur membrane

Utile pour les grands volumes d'eau. Dans un grand volume les bactéries vont être diluées et donc difficilement comptabilisables. On filtre ce volume par une membrane retenant les bactéries, on dépose le résultat sur de la gélose et enfin si on obtient des colonies on en déduit le nombre d'UFC par litre filtré.

Exemple avec 10 litres, on obtient 9 colonies on en déduit qu'il y a 0,9 UFC par litre.



– Méthode par numération en surface par ensemencement spirale.



La boîte est mise sur un rotor et c'est une aiguille qui ensemence la gélose en faisant une spirale. On connaît le volume qui a été déposé, en comparant les boîtes on arrive à connaître le nombre de bactérie.

Exemple: une boîte contient 100 colonies, celle diluée 100 fois moins en contient donc 10 000.

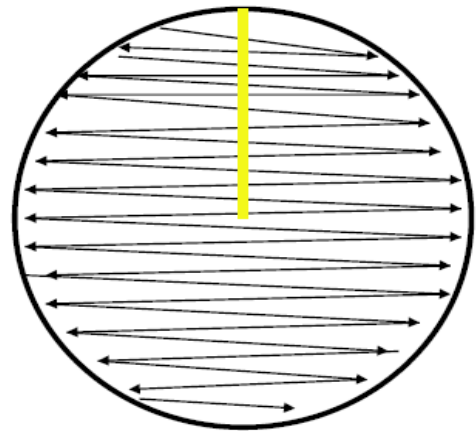
– Méthode de numération en surface avec une anse calibrée

–

Utilisée pour les infections urinaires. On cherche juste à savoir s'il y a présence ou non (pas à compter les bactéries).

On prend une anse calibrée qui est trempée dans l'échantillon d'urine, c'est déposé sur la boîte d'une façon particulière (voir l'illustration ci-contre)

si rien = pas de bactérie, pas d'infection
si c'est très chargé = infection urinaire
délai de 24h



2) Mesure de la masse cellulaire (= biomasse)

On cherche à suivre la croissance via cette mesure soit par :

- Détermination du poids sec : méthode de référence.
- Mesure de turbidité : dispersion de la lumière proportionnelle au nombre de cellules à l'aide d'un spectromètre. La turbidité est proportionnelle au nombre de cellules. Méthode simple, rapide et efficace donc très utilisée en laboratoire.

3) Mesure du métabolisme

Comme précédemment on cherche à suivre la croissance via cette mesure par :

- Dosage à l'azote : méthode de référence.
- modification des propriétés électriques du milieu (impédancemétrie, conductimétrie).
- mesure d'une activité enzymatique qui va s'exprimer par modification du ph, épifluorescence, consommation d'O₂, production de CO₂, substrat marqué (radiométrie au carbone 14), ATP (bioluminescence)...

L'automate d'hémoculture :

Le sang du patient est ensemencé dans les flacons, l'un est en anaérobiose l'autre en aérobie.

Puis les flacons sont insérés dans les tiroirs dans lesquels se trouvent des cupules au fond qui réagissent à l'augmentation du CO₂ (quand le métabolisme de l'O₂ diminue celui du CO₂ augmente) s'il y a présence de bactérie la pastille change de couleur et l'automate sonne.

Ici, on cherche juste à savoir s'il y a des bactéries en développement dans nos flacons.

A partir de là, on les prélève et on va chercher à identifier ces bactéries.

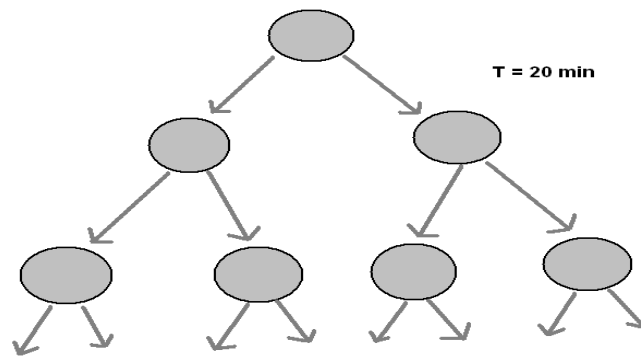


III) Aspects théoriques de la croissance en milieu liquide non-renouvelé

2 paramètres :

Le temps de génération G : temps de division d'une cellule en 2 cellules (dans un cas de scissiparité). = temps de doublement de la population.

Le taux de croissance μ : ou constante de vitesse, de croissance moyenne. = le nombre de divisions par unité de temps.



$$N = N_0 2^n$$

N = le nombre de cellules

N_0 = le nombre initiale de cellules

n = le nombre de générations

Si une cellule d'E. Coli (en sachant que sa masse est de 10^{-12} g et que le temps de génération est de 20 minutes) était cultivée en conditions optimales alors au bout de 48h la colonie obtenue aurait pour masse $2,2 \cdot 10^{28}$ kg soit 3000 fois le poids de la Terre ($6 \cdot 10^{24}$ kg)

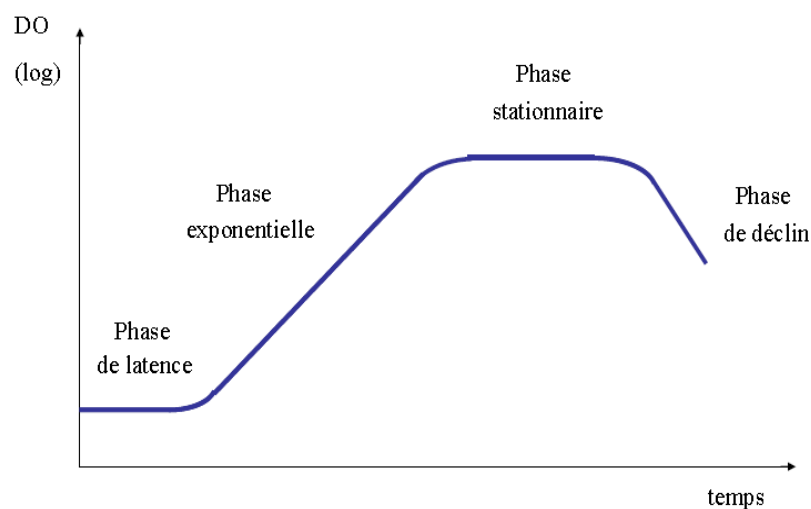
En effet : 3 générations en 1 heure soit $48 \cdot 3 = 144$ générations, soit $2^{144} = 2,2 \cdot 10^{43}$ cellules, soit $2,2 \cdot 10^{28}$ kg.

La croissance bactérienne est donc exponentielle. Dans la réalité le manque d'un nutriment ou l'effet d'un élément extérieur limite la croissance, les conditions optimales ne sont jamais atteintes in vivo.

Aperçu de la courbe de croissance :

- Utilisation d'une échelle semi-logarithmique pour que la phase exponentielle soit représentée par une droite.

- DO = densité optique servant à mesurer le nombre de bactéries



Quelques VDM parce que les staphylo c'est pas marrant

Aujourd'hui, mon copain et moi avons oublié une capote dans ma chambre. Mon petit frère de cinq ans est évidemment tombé dessus. Il est allé voir mes parents et leur a demandé si c'était un sac de couchage pour Action Man. VDM

Aujourd'hui, au retour d'une soirée bien arrosée, ma copine a refusé de faire l'amour, car "tes spermatozoïdes sont ivres et vont foutre le bordel dans mon utérus". VDM

Aujourd'hui, au programme, choucroute chez mes parents avec ma copine. Au moment de servir ma copine, ma mère lui a demandé : "Petite ou grosse saucisse ? Allez, une grosse, tu ne dois pas avoir l'habitude." [VDM](#)

Aujourd'hui, je me suis rendu compte que je ressentais plus de plaisir en nettoyant mes oreilles avec un coton-tige qu'en faisant l'amour avec mon copain. VDM

Aujourd'hui, je suis tellement peu sportive que j'ai eu un point de côté en faisant une fellation. VDM

Aujourd'hui, moment chaud avec mon copain. Au moment de me pénétrer, il a mis la capote et... Panne. Pour le taquiner, je lui ai dit que c'était dommage, car j'aurais bien voulu tester son fantasme, la sodomie. Il a eu une érection. Je n'aurais pas dû dire ça. VDM

The Google logo is displayed in its characteristic multi-colored font (blue, red, yellow, green, red) with a trademark symbol.

comment comprendre la femme

Veillez patienter !!! on cherche nous aussi...

TROLL2GEEK