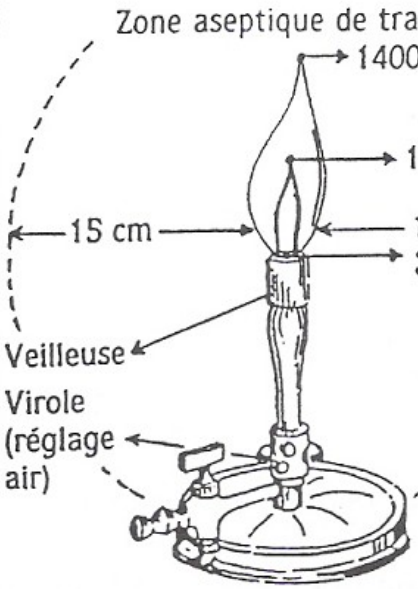
CULTURE ET IDENTIFICATION DES MICRO-ORGANISMES

1. LA CULTURE DES MICRO-ORGANISMES

1.1. TRAVAIL EN CONDITIONS ASEPTIQUES

L'étude de certains micro-organismes en particulier impose des procédures d'**asepsie : ensemble de mesures propres à empêcher tout apport exogène de micro-organismes**, de manière à ce qu'aucun micro-organisme « indésirable » ne contamine le produit étudié :

- ……
  ……
- ……
  ……

Gauche	Centre	Droite
Matériel sur lequel on travaille. Ex. : milieu de culture, boîtes de tubes…	Zone aseptique de travail 1400°C 1500°C 15 cm 15 cm 30°C Veilleuse Virole (réglage air)  IMPORTANCE DU REGLAGE - Intensité moyenne. Cône bleu visible. - Hauteur de flamme : 10 cm. - Flamme ni éclairante, ni bruyante.	Matériel avec lequel on travaille. Ex. : - pipettes - ensemenceurs - colorants. Arrière plan : bac + eau + eau de Javel pour immersion du matériel souillé.

- ……
  ……
- ……
- ……

D'autre part, certains germes manipulés peuvent être pathogènes ; il est donc nécessaire de prendre des précautions de protection des opérateurs et de l'environnement :

- ……
  ……
- ……
- ……
- ……

1.2. DÉMARCHE D'ENRICHISSEMENT ET DE SÉLECTION

Dans leur environnement naturel, pratiquement tous les micro-organismes coexistent avec une multitude d'espèces (**communauté microbienne**).

……

……

……

En fonction des objectifs, les prélèvements sont effectués dans des niches écologiques qui réunissent les conditions favorables à l'organisme recherché.

Exemple : L'enrichissement en bactéries méthanogènes peut se faire à partir du liquide contenu dans le rumen des ruminants.

……

……

……

Document n°1 : un exemple historique : l'isolement d'*Azotobacter* par BEIJERINCK

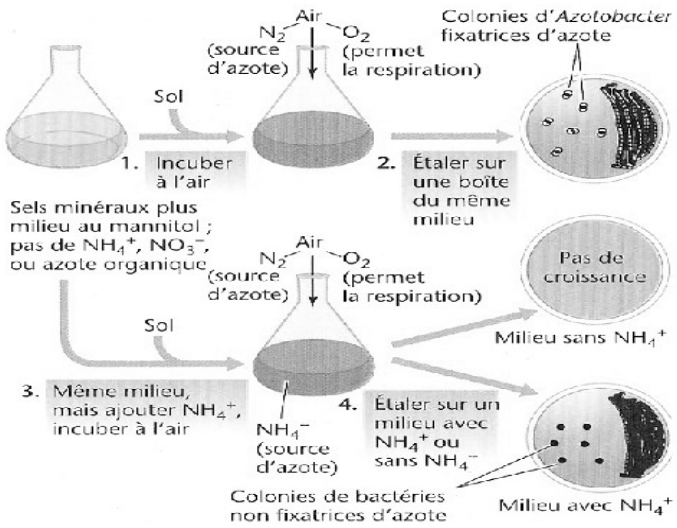


FIGURE 18.1 **Isolement d'*Azotobacter*.** Les enrichissements favorisant les bactéries aérobies fixatrices d'azote conduisent habituellement à l'isolement d'*Azotobacter* ou d'organismes proches. En revanche, les enrichissements utilisant des formes d'azote telles que NH_4^+ permettent rarement d'obtenir des bactéries fixatrices d'azote, la pression de sélection pour l'azote n'étant plus présente.

……

……

Remarque n°1 : L'isolement à partir d'une culture d'enrichissement n'apporte aucune information sur l'importance écologique ou l'abondance du micro-organisme dans l'inoculum

Remarque n°2 : L'enrichissement en milieu liquide a tendance à favoriser le développement des organismes à croissance rapide. L'enrichissement sur milieu solide permet en général d'isoler une plus grande diversité d'organismes.

1.3. PROCÉDURES D'ISOLEMENT

Document n°2 : les différentes procédures d'ensemencement

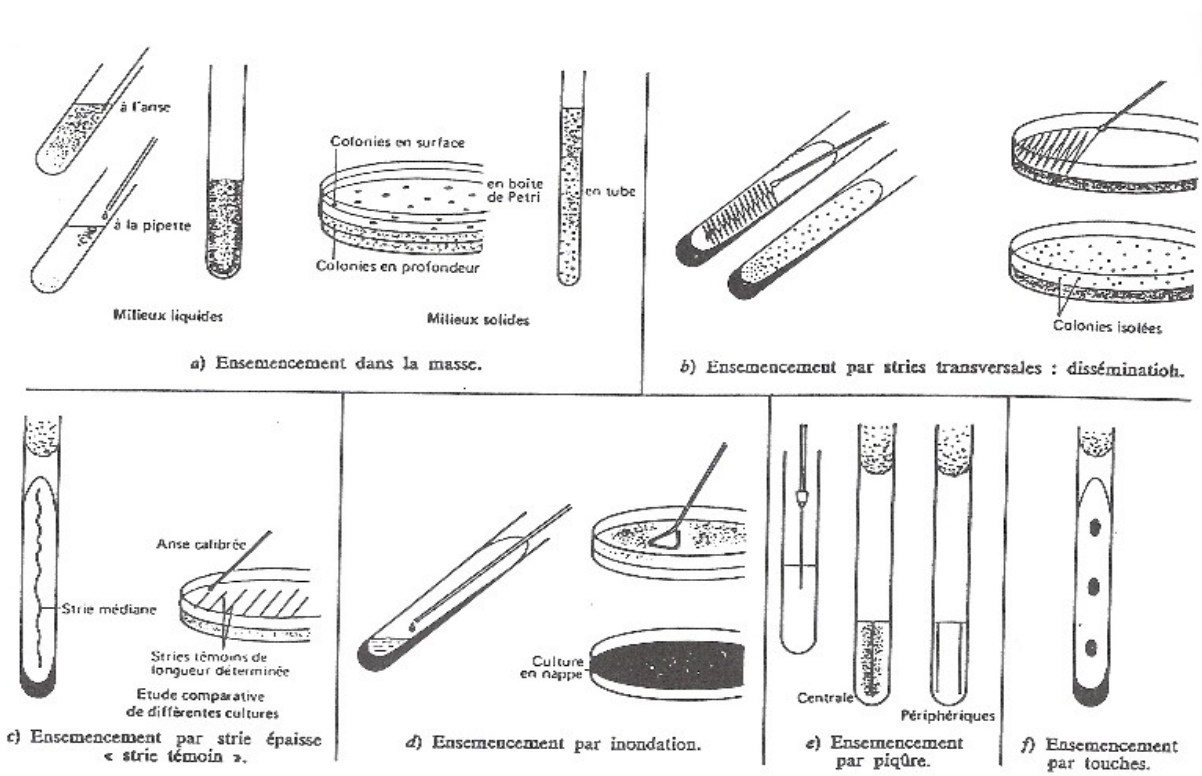
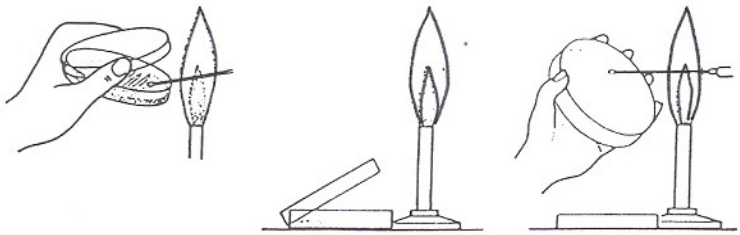
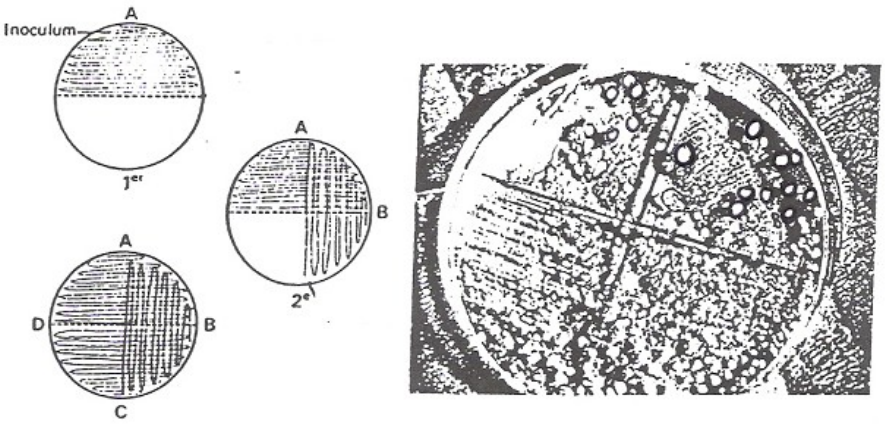


FIG. 49 — Les principaux procédés d'ensemencement.

Document n°3 : isolement par la méthode des quadrants



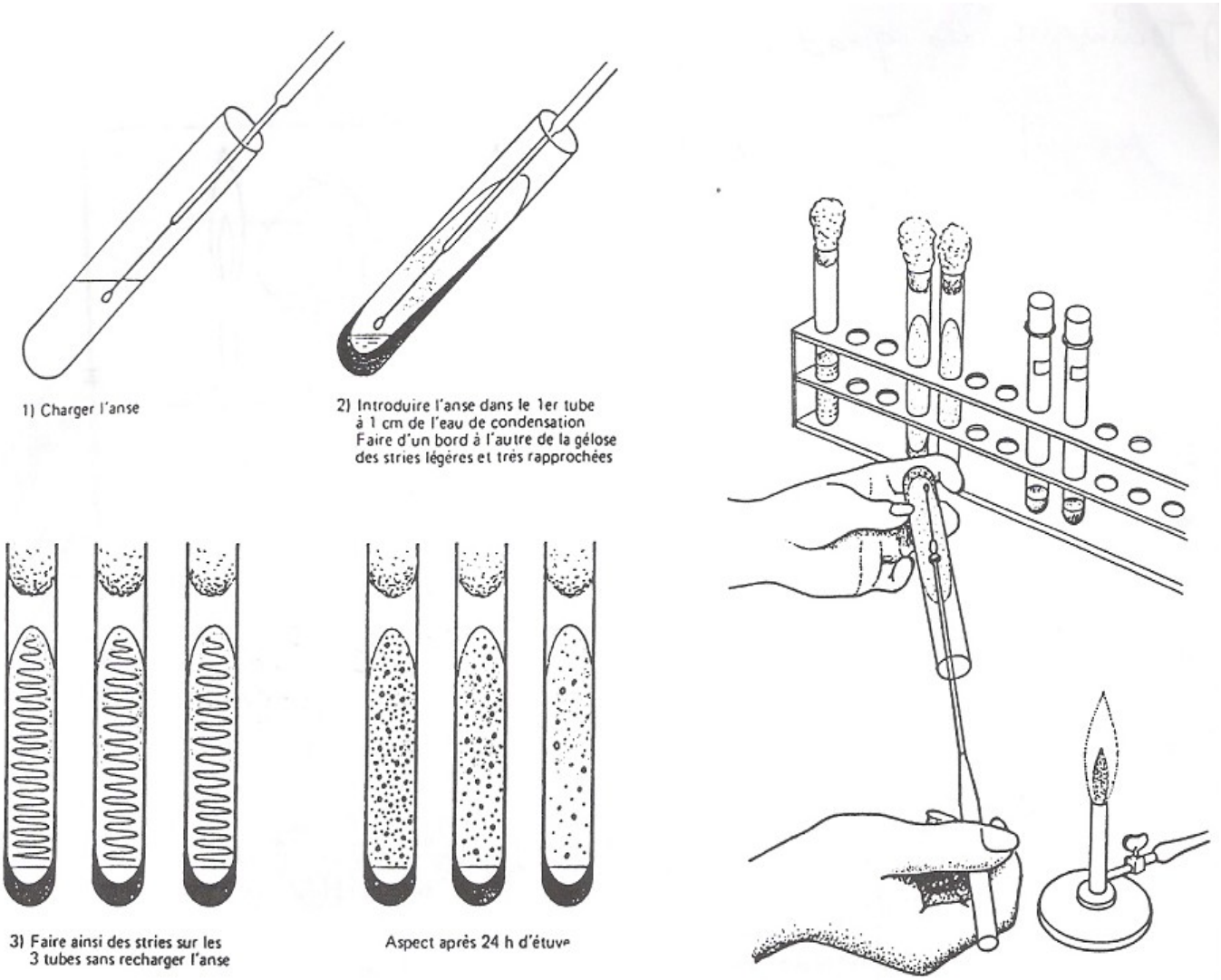
a) Tenue de la boîte de Pétri : différentes possibilités.



b) Étapes de l'ensemencement

c) Résultats

Document n°4 : isolement sur gélose inclinée



a) Les étapes.

b) Détails du geste.

FIG. 59 — *Technique d'isolement par dissémination sur 3 tubes de gélose inclinée.*

1.4. INCUBATION

……

……

……

……

……

……

……

2. IDENTIFICATION

2.1. DÉFINITIONS

La **systématique** est la branche de la biologie qui a pour but d'**étudier la diversité des êtres vivants, de comprendre l'origine de cette diversité et de les classer de manière rationnelle au travers de leurs ressemblances et de leurs différences et des relations qui existent entre eux**.

La **taxonomie** (ou taxinomie) est une discipline de la systématique.

……

……

Quand des organismes sont regroupés au sein d'un taxon donné c'est parce que la construction de ce regroupement est apparue scientifiquement pertinente. Une espèce, un genre, une famille, un ordre, une classe, un embranchement sont des taxons de niveau hiérarchique croissant.

Le classement des différents taxons repose sur diverses techniques analytiques.

……

……

……

Une définition plus précise a été proposée par les taxinomistes bactériens :

……

……

……

.....

Les souches à l'intérieur d'une espèce peuvent différer légèrement.

2.2. LES TECHNIQUES TRADITIONNELLES D'IDENTIFICATION

2.2.1. CARACTÈRES ÉTUDIÉS

Classiquement, l'identification d'une espèce se fait en fonction des caractères suivants :

- **caractères morphologiques et tinctoriaux** : forme, coloration de Gram, présence d'endospores.
- **caractères culturaux** : température de croissance, type respiratoire, besoins nutritionnels.
- **caractères biochimiques** : présence de certaines enzymes, capacité à utiliser une molécule, résistance à certains inhibiteurs.

Une identification plus précise (au sein d'une espèce) peut faire appel à d'autres critères :

- **caractères antigéniques** : classification en sérogroupes, en sérotypes.
- **sensibilité aux bactériophages** : classification en lysotypes.
- **sensibilité aux antibiotiques** : classification en antibiotypes.

2.2.2. EXPLOITATION DES RÉSULTATS : MÉTHODE DICHOTOMIQUE, MÉTHODE PROBABILISTE

.....

.....

Deux méthodes sont utilisables :

- **Méthode dichotomique** :
  Les caractères sont hiérarchisés afin de construire un schéma d'identification que l'ont suit pas à pas.
  Elle a pour inconvénient d'attribuer plus de poids à certains caractères. De plus, une erreur sur un seul caractère peut grandement fausser l'identification.

- **Méthode probabiliste** :
  Elle est basée sur le principe de l'égalité des caractères.
  Elle nécessite l'**emploi d'une base de donnée** établie à partir d'un grand nombre de souches et de caractères. **Cette base de donnée fournit pour chaque caractère à l'intérieur d'un taxon donné sa probabilité d'être positif**. A l'aide de logiciels adaptés, on recherche le profil d'identification le plus probable de celui obtenu par lecture de la galerie.

2.2.3. LIMITES DES TECHNIQUES TRADITIONNELLES

Les techniques traditionnelles d'identification des bactéries souffrent de certaines limites :

- .....
- .....
- .....

2.3. IDENTIFICATION PAR LES MÉTHODES DE TYPAGE MOLÉCULAIRE

Le développement des **techniques de biologie moléculaire** a, en particulier, permis une **classification plus rigoureuse** (différenciation de germes jusqu'alors confondus) et des **comparaisons beaucoup plus fines** entre les bactéries (analyse infra spécifique).

Les méthodes de typage moléculaire sont **applicables à la plupart des espèces bactériennes** et leur **pouvoir de discrimination est généralement très élevé**.

L'application des méthodes de biologie moléculaire au diagnostic classique se heurte principalement à un **problème de sensibilité** : les acides nucléiques bactériens sont souvent présents en très faibles quantités. Les **techniques d'amplification telle que la PCR** peuvent parfois permettre de contourner ce problème de sensibilité

Trois critères sont classiquement étudiés pour établir des classifications :

- **pourcentage en GC**.
- **taux d'hybridation ADN/ADN pour définir les espèces**.
- **Ribotypage**.

→ ***voir cours MGM de TB2***