

**MICROBIOLOGIE
PRATIQUE**

**J.-P. LARPEN
M. LARPENT-
GOURGAU**

A.57/59-62 EX.1

MICROBIOLOGIE PRATIQUE

A.57/59-62

EX. 1



Collection Méthodes

MICROBIOLOGIE PRATIQUE

JEAN-PAUL LARPENT MONIQUE LARPENT-GOURGAUD

I
Techniques d'isolement et de culture

II
Critères de détermination des bactéries

III
Étude de la croissance bactérienne

IV
Étude des virus

V
Quelques manipulations de génétique

VI
Notion d'immunologie

Milieux de culture et réactifs - Glossaire

TABLE

INTRODUCTION	15
I. TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET DE CULTURE	
1. Préparation et stérilisation des milieux de culture	17
1.1. Récipients utilisés	17
1.2. Préparation des milieux de culture.	18
1.2.1. Milieux liquides	19
1.2.2. Milieux solides.	20
1.3. Stérilisation	21
X 1.3.1. Stérilisation par autoclavage.	21
X 1.3.2. Stérilisation par filtration	22
2. Techniques d'ensemencement.	23
2.1. La place de travail.	23
2.2. Les outils de travail	23
X 2.2.1. Les fils de nichrome	23
X 2.2.2. La pipette Pasteur	23
2.2.3. L'étaioir de verre.	24
X 2.2.4. La pince à coton.	24
2.3. Précautions à observer lors des repiquages	24
X 2.4. Méthodes d'ensemencement	25
X 2.4.1. Méthode d'ensemencement avec le fil nichrome.	25

TABLE

X 2.4.2. Méthodes d'ensemencement avec la pipette Pasteur	25
2.5. Expériences à réaliser.	26
2.5.1. Repiquage de champignons.	26
2.5.2. Repiquage de bactéries.	28
3. Techniques d'isolement	29
? 3.1. Méthode des stries.	29
- 3.2. Dilution en gélose liquéfiée	30
3.3. Dilution en milieu liquide.	30
4. Milieu d'enrichissement. Milieu sélectif. Milieu différentiel	31
4.1. Milieu d'enrichissement.	31
4.2. Milieu sélectif	31
4.3. Milieu différentiel	31
4.4. Applications à l'étude de la microflore d'une terre	32
4.5. Questions.	32

II. CRITÈRES DE DÉTERMINATION DES BACTÉRIES

1. Étude morphologique des cultures et des cellules.	36
1.1. Étude des colonies bactériennes	36
1.1.1. Inoculation des boîtes de Pétri.	36
- 1.1.2. Culture en bouillon nutritif	38
1.1.3. Résultats.	38
1.2. Étude morphologique des bactéries.	38
1.2.1. Observation des organismes vivants.	39
X 1.2.2. Coloration négative des bactéries.	39
1.2.3. Réalisation d'un frottis	40
- 1.2.4. Étude de la cellule bactérienne par la méthode des colo- rations.	40
1. 3. Questions.	48
2. Étude physiologique des bactéries.	49
2.1. Détermination de la sensibilité des cellules bactériennes à quelques facteurs du milieu	49
X - 2.1.1. Action de la température sur la croissance	49
X - 2.1.2. Résistance des bactéries à la chaleur.	50
X - 2.1.3. Action du pH	50
X 2.1.4. Action de la pression osmotique.	51
2.1.5. Action des ultra-violets sur la croissance bactérienne.	51
2.1.6. Action des désinfectants.	51

2.2. Utilisation des diverses sources de carbone.	52
2.2.1. Action des bactéries sur les sucres.	52
2.2.2. Utilisation du citrate comme seule source de carbone	56
2.3. Utilisation de diverses sources d'azote	56
2.3.1. Utilisation de l'azote atmosphérique	56
2.3.2. Utilisation des protéines et des acides aminés.	59
2.4. Étude de la respiration et de la fermentation chez les micro-organismes.	61
2.4.1. Culture des bactéries anaérobies	61
2.4.2. Réduction du bleu de méthylène.	61
2.4.3. Applications à la numération bactérienne des germes de lait.	62
2.4.4. Réduction des nitrates.	63
2.4.5. Mise en évidence de la catalase et des oxydases.	65
2.4.6. Étude de quelques fermentations	65
2.5. Bactéries autotrophes.	71
2.5.1. Nitrification	72
2.5.2. Bactéries du soufre.	73
2.5.3. Bactéries photosynthétisantes	74
2.5.4. Bactéries du fer	75
2.6. Tests biochimiques et enzymatiques	75
2.6.1. Matériel et technique.	75
2.6.2. Mise en évidence des enzymes.	76
2.7. Questions	77
3. Quelques données de systématique bactérienne	77
3.1. Les Pseudomonadales.	78
3.1.1. Les Rhodobacteriineæ	78
3.1.2. Les Pseudomonadineæ	78
3.2. Les Chlamydobactériales	80
3.3. Les Eubactériales	80
3.3.1. Les Azotobacteriaceæ	80
3.3.2. Les Rhizobiaceæ	80
3.3.3. Les Achromobacteriaceæ.	81
3.3.4. Les Enterobacteriaceæ.	81
3.3.5. Les Bacteroidaceæ	83
3.3.6. Les Micrococcaceæ	83
3.3.7. Les Neisseriaceæ	83
3.3.8. Les Lactobacillaceæ	84
3.3.9. Les Corynebacteriaceæ	84
3.3.10. Les Bacillaceæ	86

TABLE

3.4. Les Actinomycétales	87
3.4.1. Les Mycobacteriaceæ	87
3.4.2. Les Actinomycetaceæ	87
3.4.3. Les Streptomycetaceæ	87
3.5. Les Beggiatoales	89
3.6. Les Myxobacterales	89
3.7. Les Spirochaetales	89
3.8. Question.	90
3.8.1. Clef de détermination.	90
3.8.2. Manipulations	91

III. ÉTUDE DE LA CROISSANCE BACTÉRIENNE

1. <i>Mise en évidence des diverses phases de la croissance</i>	95
1.1. Le problème du dénombrement d'une population bactérienne	95
1.1.1. Numération des bacilles « vivants »	96
1.1.2. Numération directe des cellules microbiennes	96
1.2. Manipulation	97
1.2.1. Mise en culture de la souche étudiée <i>Escherichia coli</i> B.A.M.	97
1.2.2. Étude de la croissance	97
1.2.3. Technique des dilutions.	97
1.2.4. Expression des résultats.	98
2. <i>Étude du phénomène de diauxie</i>	99
3. <i>Variation de l'activité physiologique d'une culture avec l'âge</i>	100
3.1. Matériel utilisé.	100
3.2. Réactifs employés	100
3.3. Expériences	100
4. <i>Action des facteurs de croissance sur la croissance bactérienne</i>	101
4.1. Action de la riboflavine	101
4.2. Action de la biotine	102
5. <i>Action d'un antimétabolite : inhibition de la croissance bactérienne par la sulfanilamide.</i>	103
5.1. Mise en évidence.	103
5.2. Effet de l'antagonisme métabolique.	103
5.2.1. Culture	103
5.2.2. Réactifs	104
5.2.3. Expérience.	104

6. Étude des phénomènes d'antagonisme et de synergisme entre microorganismes. Action des antibiotiques sur la croissance bactérienne	105
6.1. Interactions entre <i>Bacillus subtilis</i> et quelques souches d'Actinomycètes	105
6.1.1. Préparation des géloses contenant le germe à tester	105
6.1.2. Disposition des souches d'Actinomycètes	105
6.2. Interactions entre un champignon et une bactérie.	106
6.3. Commensalisme bactérien en culture mixte.	106
6.4. Synergisme bactérien	106
6.5. Sensibilité des bactéries aux antibiotiques.	107
6.5.1. Mise en évidence.	107
6.5.2. Méthode de diffusion en milieu solide	108
6.5.3. Antagonisme entre microorganismes	108
6.6. Résistance des bactéries aux antibiotiques.	109
6.6.1. Technique	109
6.6.2. Interprétation.	109
6.7. Questions	109

IV. ÉTUDE DES VIRUS

1. Étude des virus pathogènes des plantes	111
1.1. Transmission mécanique du virus de la mosaïque du tabac	112
1.1.1. Extraction et purification du virus	112
1.1.2. Inoculation mécanique du virus	113
1.2. Étude du pouvoir infectieux de l'ARN viral	114
1.2.1. Extraction de l'ARN viral	115
1.2.2. Inoculation des échantillons.	116
1.3. Essais de détermination de virus par sérologie et caractérisation sur plante test.	117
1.3.1. Détermination par sérologie.	117
1.3.2. Détermination par indexage sur plante test	119
1.4. Étude de la multiplication du virus de la mosaïque du tabac.	119
1.4.1. Préparation du matériel à marquer.	119
1.4.2. Prélèvement et marquage des échantillons.	120
1.4.3. Évaluation de la quantité de virus en fonction du temps.	120
1.4.4. Expression des résultats.	121
2. Étude des bactériophages	121
2.1. Titration du phage.	121
2.1.1. Matériel utilisé.	122

TABLE

2.1.2. Manipulation.	122
2.1.3. Expression des résultats.	123
2.2. Mode d'action des bactériophages	123
2.2.1. Infection de bactéries sensibles par un bactériophage virulent	124
2.2.2. Interprétation.	126
2.2.3. Expression des résultats.	126
2.3. Étude de la lysogénie.	127
2.3.1. Manipulation.	127
2.3.2. Expression des résultats.	128
2.4. Questions	128

V. QUELQUES MANIPULATIONS DE GÉNÉTIQUE

1. Hérité des caractères.	129
1.1. Étude de la mitose.	129
1.1.1. Préparation du matériel.	130
1.1.2. Techniques.	130
1.1.3. Observations.	130
1.1.4. Conclusions	130
1.2. Étude de la méiose. Vérification de la première loi de Mendel.	131
1.2.1. Matériel et technique.	131
1.2.2. Observations.	132
1.2.3. Discussion. Conclusion	133
1.3. Cycle de développement et sexualité du <i>Podospora anserina</i> et du <i>Coprinus radiatus</i>	133
1.3.1. Observations des organes sexuels.	133
1.3.2. Milieu de culture.	133
1.3.3. Cycle du <i>Podospora</i>	134
1.3.4. Définitions.	134
1.3.5. Mise en évidence des deux possibilités	136
1.3.6. Cas du <i>Coprinus radiatus</i>	137
1.4. Étude de la notion de préréduction et de postréduction.	139
1.4.1. Principe	139
1.4.2. Matériel et technique.	140
1.4.3. Observations.	141
1.4.4. Discussion.	142
1.4.5. La pré- et la postréduction	142
1.4.6. Conclusions	143

1.5. Indépendance et liaison des gènes. Étude de la deuxième loi de Mendel	144
1.5.1. Étude des gènes indépendants	144
1.6. Étude de la recombinaison bactérienne.	151
1.6.1. Caractères génétiques différentiels des souches utilisées.	151
1.6.2. Manipulation.	151
1.6.3. Interprétation et résultats	152
2. <i>Étude des mutations</i>	152
2.1. Étude des mutations bactériennes	153
2.1.1. Étude d'un exemple de mutation spontanée, mutation affectant la fermentation des sucres	153
2.2. Les mutations bactériennes. Test de Newcombe.	154
2.2.1. Manipulations	154
2.2.2. Interprétation et résultats	155
2.3. Étude d'une chaîne de biosynthèse.	156
2.3.1. Principe de la manipulation	156
2.3.2. Manipulation.	157
2.3.3. Observations, Discussion.	157
2.4. Questions	158

VI. NOTION D'IMMUNOLOGIE

1. <i>Étude de la séroagglutination</i>	159
1.1. Test d'agglutination.	159
1.1.1. Technique	159
1.1.2. Observation	160
1.2. Détermination de la concentration d'un sérum en agglutinines.	160
1.2.1. Préparation des dilutions du sérum.	160
2. <i>Étude de l'immunodiffusion</i>	161
2.1. Système précipitant.	161
2.2. Support de diffusion	161
2.3. Technique.	162
2.3.1. Incubation.	162
2.3.2. Lavage.	162
2.3.3. Rinçage	162
2.3.4. Déminéralisation et séchage	162
2.3.5. Coloration des protéines	162
3. <i>Étude de l'immunoélectrophorèse</i>	162
3.1. Système précipitant.	163

TABLE

3.2. Support de diffusion	163
3.3. Technique.	163
3.3.1. Électrophorèse	163
3.3.2. Immunodiffusion	165
3.4. Questions	165
MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	167
Milieux de culture	167
Réactifs	181
POIDS ATOMIQUES.	185
GLOSSAIRE.	187
BIBLIOGRAPHIE	195
INDEX.	198

en issue de la réforme de l'enseignement, la collection
offre à l'étudiant et au chercheur des livres nouveaux.

Les auteurs de cette collection ont la double vocation de chercheurs
et d'enseignants; aussi leurs livres donnent-ils l'exposé le plus a
pour des questions traitées, avec une présentation pédagogique
expérimentée et attrayante. Cette synthèse permet au lecteur, dans
chaque discipline et à chaque niveau, d'accéder aux stades les plus
avancés de la connaissance en percevant l'ensemble du sujet de
façon claire et en étant informé des développements en cours.

Microbiologie

MICROBIOLOGIE PRATIQUE, J.-P. Larpent, M. Larpent-Gourgaud

Introduction à la biologie

LA CELLULE, Michel Durand, Pierre Favard

BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE, Berkaloff, Bourguet, Favard, Guinnebault

GÉNÉTIQUE ET ÉVOLUTION, Claudine Petit, Georges Prévost

SEXUALITÉ, Charles Houillon

EMBRYOLOGIE, Charles Houillon

Biologie moléculaire

LE MÉTABOLISME CELLULAIRE ET SA RÉGULATION, Georges Cohen

STRUCTURE ET DYNAMIQUE CONFORMATIONNELLE DES PROTÉINES, J. Yon

LE CODE GÉNÉTIQUE, Jean Tavlitzky. *En préparation*

Éléments de chimie-physique

STRUCTURE DE LA MATIÈRE, CINÉTIQUE CHIMIQUE,

J. Ficini, N. Lumbroso-Bader, J.-C. Depeza

THERMODYNAMIQUE ET ÉQUILIBRES CHIMIQUES,

J. Ficini, N. Lumbroso-Bader, J.-C. Depeza

Les méthodes

sont les habitudes de l'esprit

et les économies de la mémoire

Rivar

