

Kit initiation à la microbiologie

Réf. C/INIMIC

A RECEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- Stocker** les articles du colis dans les bonnes conditions :
 - ⚡ Placer le milieu prêt à l'emploi au réfrigérateur à **+4 °C** ⚡ couvercle vers le bas.
- Avant toute manipulation, étudier la fiche sécurité** en fin de notice

COMPOSITION DU COLIS POUR 20 BINOMES

- 1 Souche d'*Halobactérium salinarum* sur boîte de pétri
- 20 boîtes de milieu diamètre 90 mm
- 20 ensemenceurs stériles

MATERIEL NECESSAIRE :

- Etuve à 30°C
- Feutres permanents

PRINCIPE ET INTERET PEDAGOGIQUE

Ce TP a pour but d'initier les élèves aux manipulations de microbiologie à travers le repiquage d'une souche bactérienne et sa mise en culture.

Nous avons sélectionné la souche *Halobactérium salinarum* car elle présente l'avantage de pousser sur un milieu de culture très salé ce qui évite la pousse de tout autre micro-organisme.

Au travers d'un repiquage de la souche *Halobacterium salinarum*, les élèves vont apprendre les principes suivants :

Lorsque l'on manipule des micro-organismes, il faut prendre des précautions qui sont de deux ordres : ne pas contaminer l'espèce étudiée avec des souches externes et ne pas polluer l'environnement avec nos expériences. Ainsi, il est fondamental de respecter certaines conditions expérimentales propres à l'espèce étudiée.

Voici quelques règles concernant la manipulation des levures :

- nettoyage de la paillasse à l'alcool ou à l'eau de javel
- travail dans un rayon de 30 cm autour de la flamme d'un bec bunsen
- mains passées à l'alcool, port d'une blouse en coton
- instruments et milieux stérilisés ouverts et utilisés autour de la flamme
- ne mettre en contact que des matériels stérilisés entre eux et avec les cellules ; ne pas poser le matériel sur la paillasse ni toucher le col des tubes ou la partie du matériel qui sera en contact avec les levures, les milieux ou les solutions
- pot avec javel pour récupérer les pipettes usagées
- éviter les mouvements brusques, ne pas parler devant des boîtes ouvertes
- noter au marqueur indélébile au dos des boîtes : initiales des binômes et dénomination de la boîte.

Vous trouverez en fin de notice un article sur *Halobactérium salinarum* extrait du site Internet de Didier Pol. Cet article est extrêmement riche en informations sur cette archéobactérie.

FICHE PREPARATEUR

1) Distribution des boîtes de milieu de culture

Chaque binôme recevra 1 boîte de pétri contenant du milieu riche et un enseigneur stérile dont l'extrémité arrondie sera conservée dans du papier aluminium lavé à l'alcool.

FICHE DE MANIPULATION PAR LES BINOMES

Chaque binôme dispose d'une boîte de pétri contenant du milieu halophile.

Chaque élève sera chargé de prélever une colonie sur la boîte mère de la souche de bactéries et effectuera un repiquage en striant cette colonie sur une boîte de milieu vierge.

La boîte sera ensuite mise en culture une semaine à 30° C couvercle vers le bas.

Penser à noter les boîtes au dos avec un feutre permanent.

Noter :

- La date
- Le nom de la souche
- Les initiales du binôme

FICHE SECURITE

Le repiquage d'un microorganisme nécessite des conditions de travail particulières :

- Il faut impérativement porter une blouse en coton
- Il faut impérativement se laver soigneusement les mains après la manipulation.
- il faut plonger les boîtes dans de la javel (concentration 1%) ou de l'eau oxygénée pour tuer tous les germes et bien se laver les mains.

FICHE CONSERVATION

Les milieux de culture prêts à l'emploi se conservent jusqu'à 1 mois au réfrigérateur à 4°C.

FICHE TRI ET RECUPERATION

La gélose des boîtes doit impérativement être avec de la javel (concentration 1%) ou de l'eau oxygénée puis jetée à la poubelle.

Les boîtes de pétri ayant contenu la gélose peuvent être jetées dans les bacs de récupération du plastique après avoir bien été décontaminées.

!! ATTENTION !! :

On ne contrôle jamais totalement ce qui pousse sur milieu complet, la décontamination est obligatoire.

Présentation et culture de l'archéobactérie halophile extrême *Halobacterium salinarum* (par Didier Pol)

Halobacterium salinarum est une archéobactérie extrémophile qui colonise des milieux aquatiques dont la concentration en chlorure de sodium est proche de la saturation et où la plupart des autres organismes ne peuvent survivre. Ce microorganisme présente un métabolisme énergétique comportant des modalités variées : respiration aérobie et anaérobie, phototrophie et fermentation. Associé, d'une part, à la capacité à détecter et discriminer différentes longueurs d'onde de la lumière, diverses substances organiques ou encore la concentration en dioxygène dissous et, d'autre part, à la propriété de se déplacer par rapport à ces stimulus à l'aide de flagelles, ce métabolisme flexible lui confère d'exceptionnelles capacités d'adaptation. *H. salinarum* présente en outre une extraordinaire résistance au sel et à la dessiccation ainsi qu'au rayonnement ultraviolet. Enfin, cette espèce présente un taux de mutations spontanées particulièrement élevé (de 10^{-2} à 10^{-5} selon les caractères, alors que le taux habituel est de 10^{-6}) qui permet d'[obtenir des mutants en culture](#) sans avoir à mettre en œuvre de système de mutagenèse provoquée.

H. salinarum est une espèce représentative d'un vaste groupe d'archéobactéries, la famille des halobactériacées, dont une vingtaine de genres différents, comportant une cinquantaine d'espèces, ont été décrits. Ces archéobactéries se développent dans des milieux contenant une concentration extrêmement élevée en chlorure de sodium (de 3,5 à 5 mol.L⁻¹, soit plus de 290 g/L), proche de la saturation qui intervient vers 300 g/L. On les trouve, par exemple, dans les bassins d'évaporation des marais salants, dans des mares salées temporaires au bord de la mer, dans la Mer Morte et dans le Grand Lac Salé à l'ouest des États-Unis où elles prolifèrent en formant des nappes de couleur rouge, en raison des carotènes et de la bactériorhodopsine présents dans leur membrane. On peut aussi en trouver parfois dans la saumure et dans diverses salaisons (morue salée, jambons) où elles forment des taches rouges et où elles furent initialement

décrites. *Halobacterium* ne peut survivre que si la concentration en sel est très élevée et la concentration optimale pour sa culture est de 4,6 mol.L⁻¹. Si la concentration en sel est inférieure à 2,5 mol.L⁻¹, elle ne peut se multiplier. Enfin, les cellules éclatent si la concentration devient inférieure à environ 1,5 mol.L⁻¹. Au laboratoire, cette propriété facilite la préparation d'extraits cellulaires pour l'étude des enzymes intracellulaires, la séparation des membranes, notamment si l'on veut étudier leurs propriétés optiques, et l'[isolement de l'ADN](#).

Compte tenu de la facilité de sa culture et de sa manipulation au laboratoire, de l'absence de risque de contamination des milieux de culture par d'autres microorganismes (rien d'autre ne pousse à de telles concentrations en sel), de son innocuité pour l'homme et de la diversité des problèmes biologiques qu'il permet d'explorer, *H. salinarum* et les espèces proches constituent des microorganismes exceptionnels pour mener des activités scientifiques variées en classe, qu'il s'agisse de microbiologie, d'écologie, de métabolisme énergétique, de génétique, etc. Ajoutons que la connaissance approfondie de son génome, dont la séquence a été établie en 2000, apporte des informations précieuses dont l'accès est public. L'article correspondant (en anglais) peut être consulté librement à l'adresse : <http://www.pnas.org/cgi/content/full/97/22/12176>

- Culture sur milieu solide
 - **Comme aucun autre microorganisme n'est susceptible de contaminer le milieu en raison de sa concentration en sel, l'utilisation de *H. salinarum* rend possible l'apprentissage par les élèves des techniques de base de la microbiologie, en particulier la mise en culture de bactéries, l'isolement de colonies, le suivi de la croissance au colorimètre ou par étalement, etc. sans aucun risque de voir se développer d'autres bactéries ou de voir le milieu envahi par des microorganismes indésirables, même si les élèves ne respectent pas rigoureusement les conditions de travail en asepsie. En réalité, les conditions de travail en asepsie ne sont même pas nécessaires, mais il est bon que les élèves apprennent à les respecter.**
 - **Ne jamais mettre une colonie dans l'eau, ni même dans de l'eau physiologique : lorsque la concentration en sel est inférieure à 1,5 mol/L, les cellules de *Halobacterium* sont détruites. Chaque fois que l'on veut mettre une colonie en suspension, il convient d'utiliser, soit du [milieu de culture liquide](#), soit du [milieu minéral liquide](#).**

1. Pour un simple isolement de colonies : étalement en stries classique.

Pour les détails techniques, voir :

[Isolement de colonies de microorganismes sur milieu gélosé](#)



Colonies isolées par étalement en stries

Noter les colonies colorées en rose et les traces dues à l'écoulement d'eau de condensation.

2. Pour repiquage ou obtention de nombreuses colonies : dilutions en série

Préparer une série de tubes à hémolyse avec 1 mL de milieu de culture liquide dans chaque.

Prélever une colonie avec une anse et la déposer dans le milieu contenu dans un des tubes en faisant tourner rapidement l'anse entre les doigts pour décrocher la colonie. Une colonie contient environ 100 millions de cellules. Fermer le tube et l'agiter vigoureusement à la main ou, mieux, sur vortex pour bien mettre en suspension les cellules qui ont tendance à rester collées entre elles.

Prélever 100 μ L (3 gouttes) de cette suspension avec une pipette Pasteur et les déposer dans un autre tube contenant 1 mL de milieu de culture. Fermer le tube et l'agiter vigoureusement.

Recommencer les opérations pour obtenir au total six tubes : les dilutions croissantes permettront, théoriquement, d'obtenir une centaine de cellules dans 100 μ L prélevés dans le tube 6 et donc une centaine de colonies bien séparées après étalement sur le milieu solide avec un [râteau](#) (étaleur) et incubation.

C'est notamment la procédure à suivre pour [observer des mutations spontanées](#) détectables par la couleur des colonies. Mais comme le nombre de bactéries prélevé n'est jamais sûr, faire un étalement dans trois boîtes différentes à partir d'un prélèvement dans les tubes 4, 5 et 6.

Pour obtenir un tapis de bactéries, procédure à suivre si l'on veut, par exemple, [extraire l'ADN](#), prélever une goutte de suspension dans le tube 1 ou 2 avec une pipette Pasteur et déposer la goutte au centre d'une boîte de milieu de culture.

Étaler la goutte soigneusement sur toute la surface avec un râteau.



Quelques milliers de colonies formées à la suite de l'étalement avec un râteau

Dans tous les cas de culture sur milieu solide :

Mettre les boîtes dans un sachet étanche pour empêcher l'évaporation et les placer retournées (couvercle vers le bas) à l'étuve à 37°C.

À cette température, il faut environ 1 semaine pour obtenir les colonies (le temps de doublement est d'environ 6 heures et il faut environ 25 générations pour voir une colonie).

À température ambiante, il faut environ 2 semaines.

Pour obtenir une croissance plus rapide, on peut placer les cultures jusqu'à 42°C maximum.

- Culture en milieu liquide

Prélever avec une anse une colonie ou un échantillon de culture sur boîte de Pétri et ensemer 25 à 50 mL de milieu liquide complet contenus dans un flacon conique (Erlenmeyer) en faisant pivoter rapidement entre les doigts la tige de l'anse pour décoller les bactéries.

Pour obtenir une croissance optimale, plonger un barreau magnétique dans le flacon et placer l'ensemble sur un agitateur magnétique (rotation modérée), si possible chauffant, sans dépasser 42°C.

Le liquide se trouble en quelques jours avec la multiplication des bactéries et il est possible de suivre la croissance en prélevant quotidiennement un échantillon de la culture et en mesurant sa turbidité avec un colorimètre ou un spectrophotomètre.



Début de la culture : le milieu est transparent

Après une semaine : le milieu est opaque

Culture en milieu liquide

Noter la couleur de la culture due aux pigments caroténoïdes contenus dans la membrane des cellules.

Les pigments présents chez *H. salinarum* absorbent le rayonnement ultraviolet. Lorsqu'une culture est exposée à une source de lumière ultraviolette de longueur d'onde 365 nm, elle réémet par fluorescence une lumière de couleur turquoise comme on le voit sur le cliché ci-dessous.



Culture exposée à un tube à UV (longueur d'onde 365 nm)

Préparation du milieu

Dissoudre le chlorure de sodium dans un peu moins de 1 litre d'eau distillée chaude sur agitateur magnétique. Une fois que le sel est dissous, ajouter les autres constituants et poursuivre l'agitation jusqu'à dissolution complète. Répartir ensuite dans plusieurs flacons de façon à ce que seulement la moitié de chaque flacon soit occupée par le milieu. Fermer les flacons par du papier d'aluminium et les autoclaver 20 minutes. On peut aussi placer les flacons dans le panier d'un autocuiseur avec un peu d'eau au fond, fermer et laisser chauffer 20 minutes après mise en rotation de la soupape.

Milieu solide

Le milieu peut être laissé dans les flacons jusqu'à refroidissement et solidification puis conservé plusieurs mois au réfrigérateur. Dans ce cas, avant de le couler dans des boîtes de Pétri, il est nécessaire de le refondre en le plaçant pendant environ 1 heure dans un bain marie bouillant.

On peut aussi couler directement le milieu dans des boîtes de Pétri à ergots (permettant l'oxygénation), de 90 mm de diamètre, immédiatement après refroidissement à environ 55°C (lorsque l'on peut toucher les flacons avec la main sans se brûler). Couler le milieu encore liquide sur une hauteur d'environ 5 mm.

Il est important d'avoir une couche épaisse de milieu pour éviter qu'il se dessèche trop vite ce qui conduirait à la cristallisation du sel.

Laisser refroidir jusqu'à la prise du milieu puis retourner les boîtes et les abandonner une nuit à température ambiante. Éliminer l'eau de condensation des couvercles avec un papier absorbant.

À ce stade, les boîtes peuvent être utilisées ou stockées au réfrigérateur enveloppées dans un sachet étanche pour éviter l'évaporation et retournées, couvercles vers le bas.

Milieu complet liquide et milieu minéral

Après stérilisation, laisser refroidir puis boucher les flacons de façon étanche.

Les milieux peuvent être utilisés directement ou être stockés plusieurs mois au réfrigérateur.

Conditions de culture

Le temps de doublement des cellules est d'environ six heures à 37°C. Comme il faut 25 cycles cellulaires pour observer une colonie à l'œil nu à partir d'une cellule, il faut environ une semaine à cette température, ce qui évite aux élèves de surveiller quotidiennement leurs cultures. À température ambiante, il faut compter environ deux semaines pour observer des colonies.