



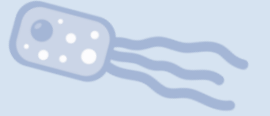
# Introduction aux techniques de base en microbiologie classique

BIO1410 Hiver 2025

Microbiologie Environnementale



# Introduction



- Importance de la participation / présence
- Respect des règles de sécurité
- Adresses courriels:
  - [betty.pierre@courrier.uqam.ca](mailto:betty.pierre@courrier.uqam.ca)
  - [ross.david.2@courrier.uqam.ca](mailto:ross.david.2@courrier.uqam.ca)
- S'adresser à nous pour les questions en lien avec le labo

# Microbiome



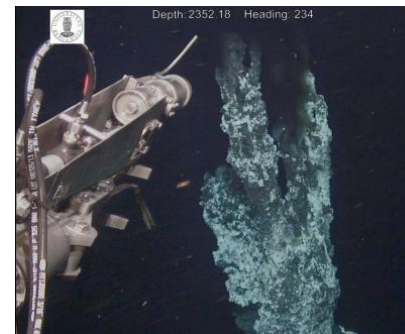
- Ensemble des microorganismes vivants dans un environnement  
Différentes parties du corps humain, plante, sol, eau, air, etc.
- Historiquement étudiés à l'aide de milieux de culture et d'observations  
Seulement environ 1% des microorganismes peuvent être cultivés en laboratoire (Hofer, 2018)
- Aujourd'hui beaucoup d'études réalisées à partir de l'ADN environnemental (eDNA)  
Pas besoin de cultiver en laboratoire



# Importance des microorganismes



- Santé générale (Human Microbiome Project 2007 - 2016)
- Alimentation (World Institute of Kimchi)
- Découverte de nouveaux médicaments (*Streptomyces hygroscopicus*)
- Restauration d'œuvres d'art (*Serratia ficaria* SH7)
- Origine des eucaryotes (Château de Loki et *Lokiarchaeum*)



# Objectif du cours



## Le microbiome humain

**Labo 1** (21 janvier) : Introduction aux techniques de base en microbiologie classique (visualisation des microorganismes, utilisation d'un microscope, techniques d'observation, culture stérile, pipetage, ensemencement, etc.)

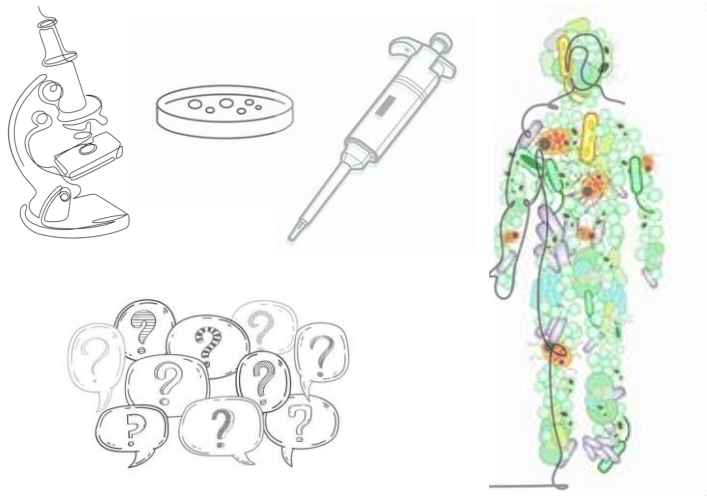
**Labo 2** (4 février) : Introduction à l'analyse de l'ADN, échantillonnage du microbiome humaine, extraction de l'ADN d'une bactérie et électrophorèse

**Labo 3** (11 mars) : Introduction à la bio-informatique et à l'analyse des séquences ([attention : Salle informatique PK-S1535](#))

**Labo 4** (18 mars) : Introduction à la bio-informatique et analyse des séquences par BLAST, analyses statistiques des données

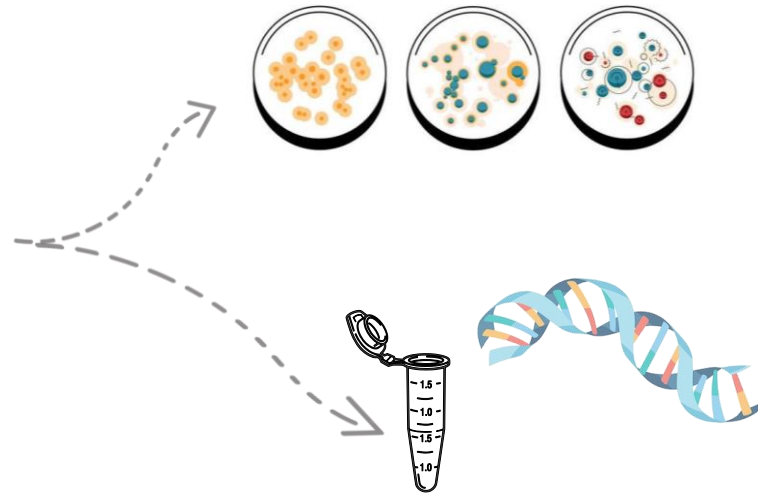
**Remise du rapport 1 avril**

# Résumé des séances



Familiarisation avec les techniques de bases  
Question de recherche  
Mise en culture sur gélose

21 janvier



Observation de vos cultures  
Échantillonnage  
Extraction et électrophorèse

4 février



Séquençage  
Présentation de vos  
résultats

11 mars



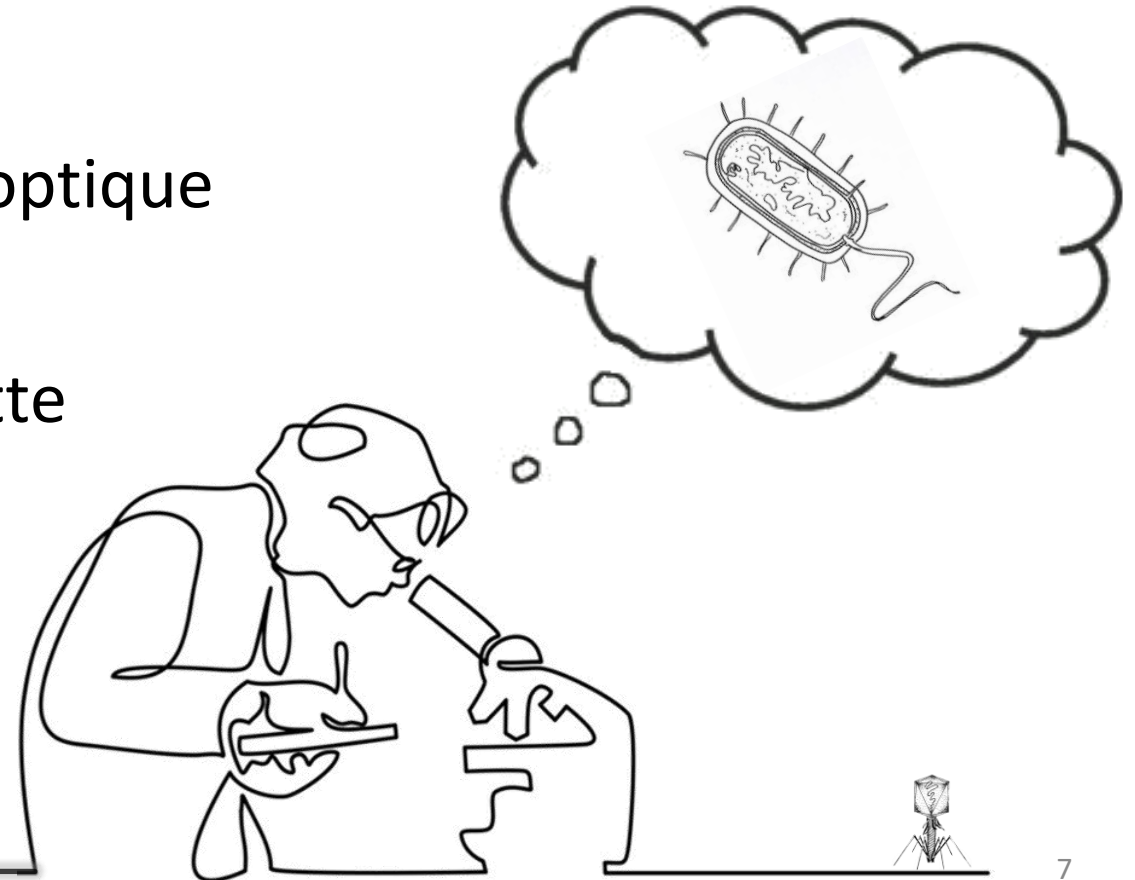
Analyses bio-info  
BLAST

18 mars

# Objectifs du labo 1



- Se familiariser avec les milieux de culture et ensemerer des milieux de culture stérile
- Apprendre à utiliser le microscope optique
- Apprendre à utiliser une micropipette

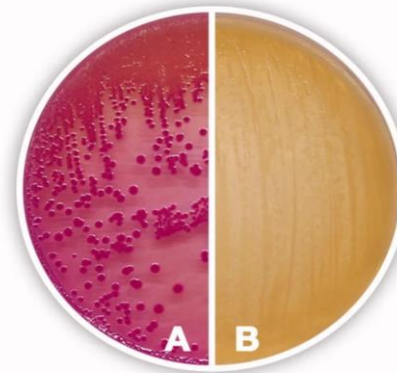




# Milieux de cultures

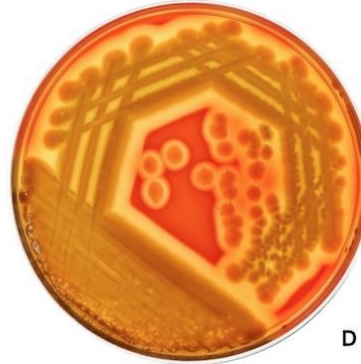
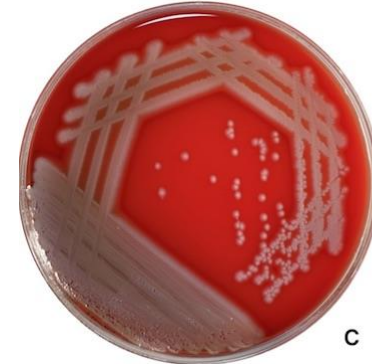


- Peuvent être liquides ou solides
  - Ajout d'agar pour les géloses
- Permettent la culture, le transport, la conservation des microorganismes
- Différents types de milieux
  - Enrichis (gélose sang)
  - Sélectifs et différentiels (MacConkey)
  - Différentiels (gélose sang)



**Gélose MacConkey**

A : fermentation du lactose  
B : pas de fermentation



**Gélose sang**

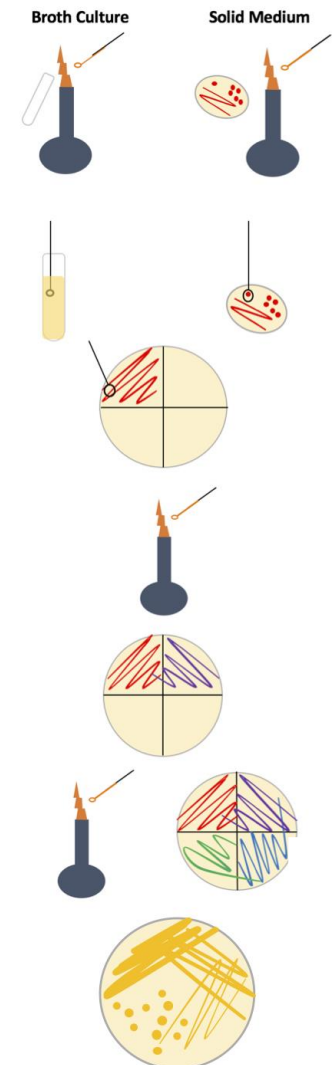
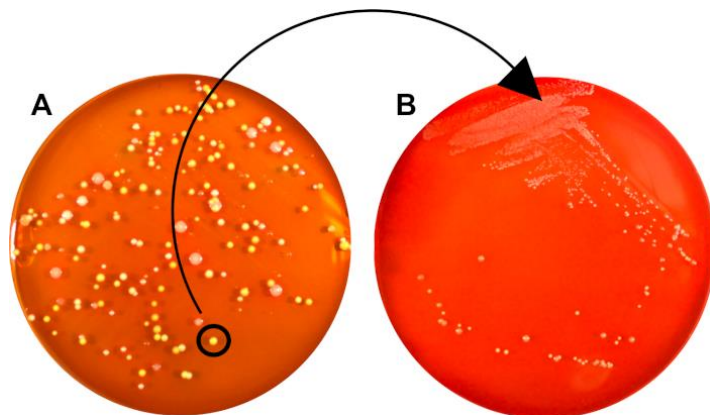
C : pas d'hémolyse  
D : avec hémolyse



# Isolement



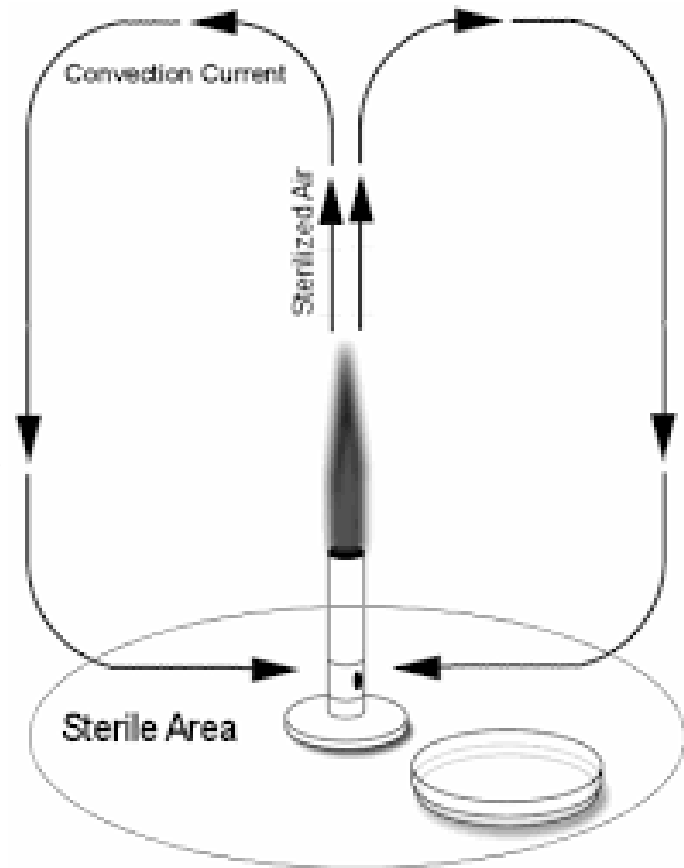
- Technique ayant pour but d'obtenir une culture pure
  - Population de microorganismes provenant d'une seule cellule initiale
  - Permet de caractériser une espèce
  - Chaque sphère est une colonie
- Isolement par stries



# Manipulation stérile



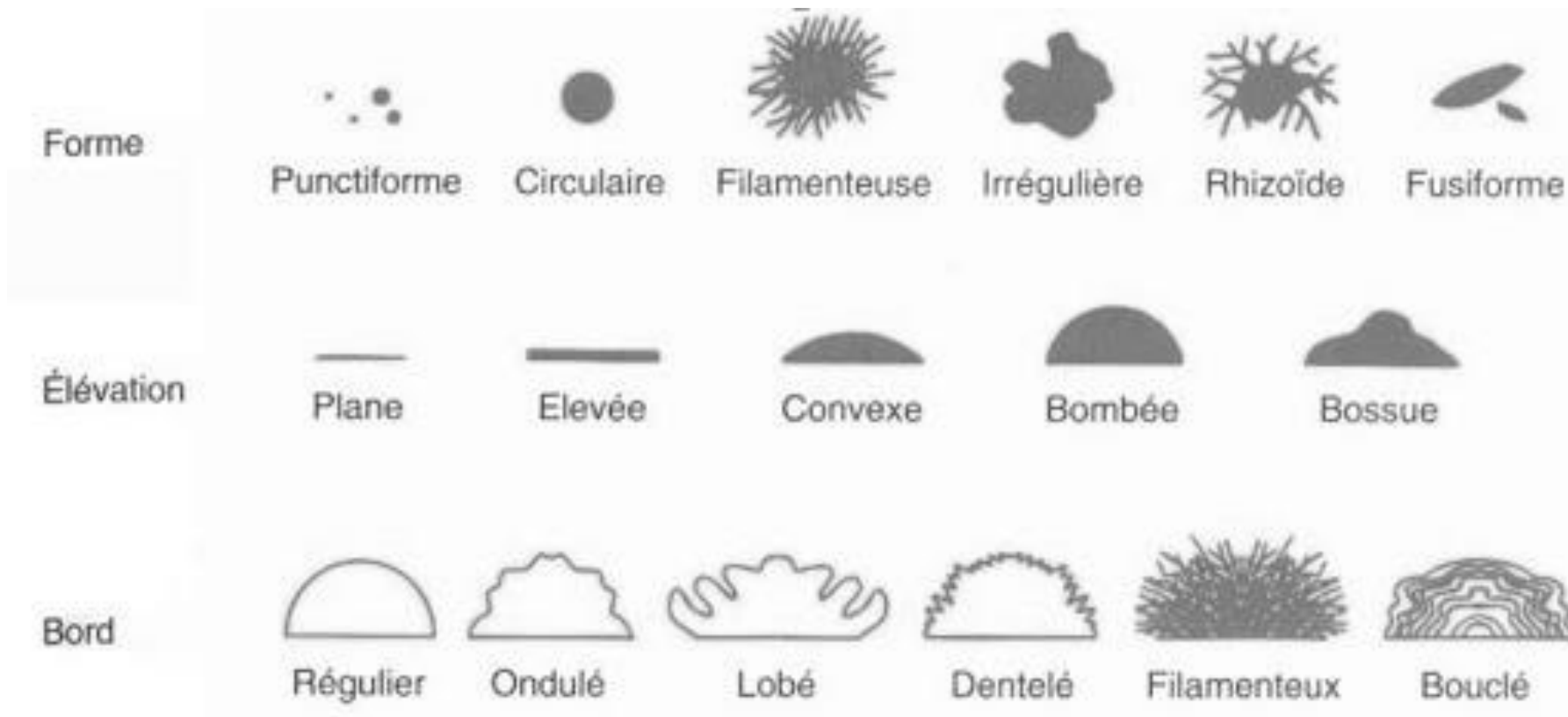
- Travail en aseptie: Technique permettant de ne pas apporter de microorganismes à l'objet manipulé.
- Zone de stérilité du bec bunsen
- Nettoyage à l'éthanol 70% ou javel
- Limiter la parole au-dessus des échantillons
- Stérilisation des instruments à la flamme



# Identification des microorganismes



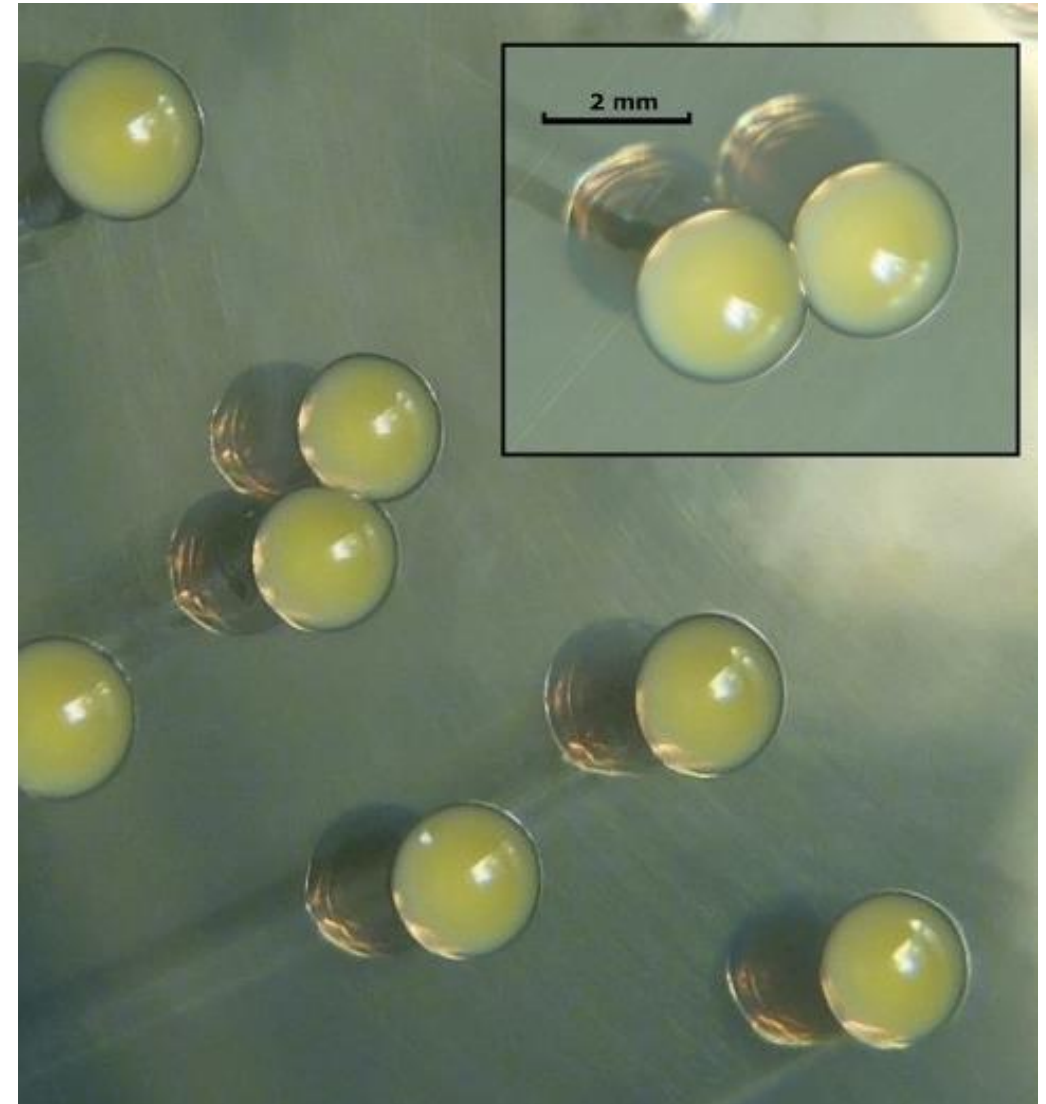
- Critères morphologiques macroscopiques:
  - Certains critères sont associés à des espèces en particulier



# Identification des microorganismes (exemple)



- Caractéristiques: 1mm, rondes, régulières, bombées, lisses, brillantes, couleur jaune/or.
  - Suspicion de *Staphylococcus aureus*.
- Nécessite toujours une vérification par biochimie





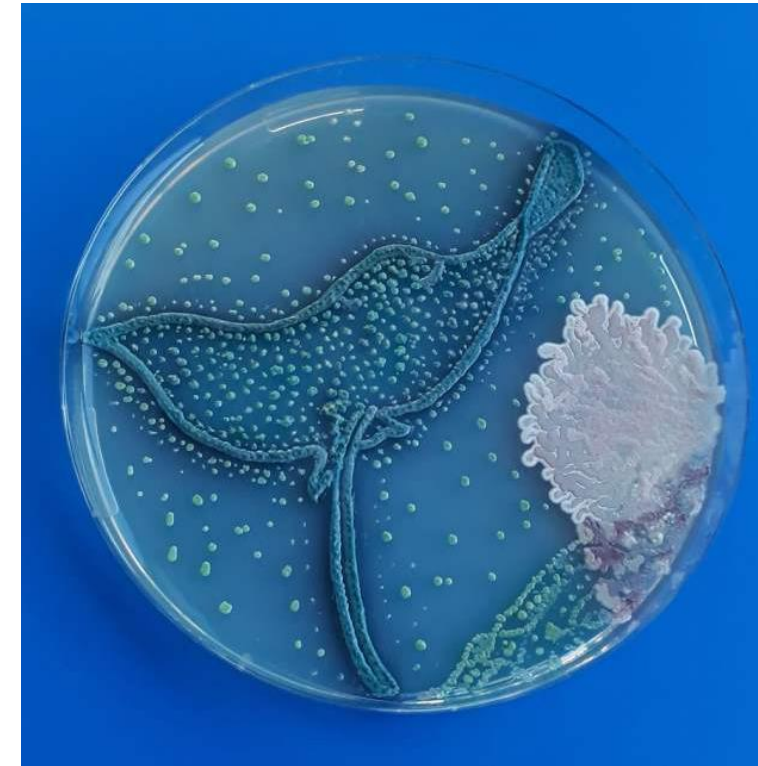
# Agar art



Compétition officielle par



AMERICAN  
SOCIETY FOR  
MICROBIOLOGY



# Préparation de cultures bactériennes



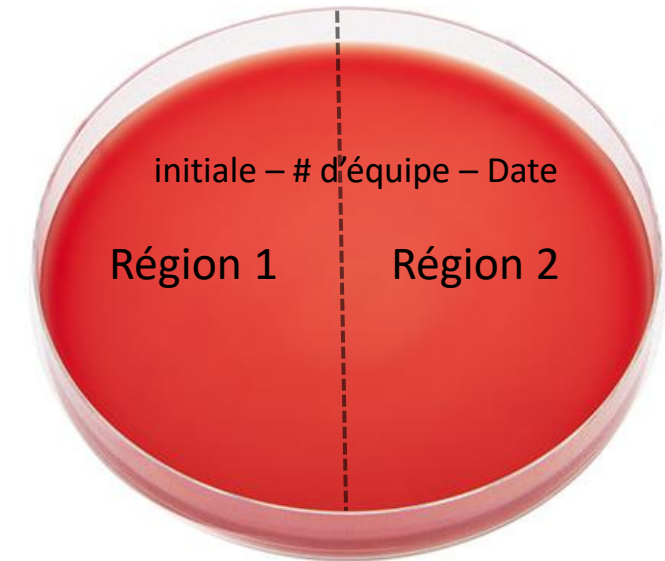
Vous disposez de:

- Écouvillons stériles
- Gélose sang
- Crayon gras et ruban adhésif

Méthode d'ensemencement:

- Séparer votre gélose en deux puis identifier votre gélose et chacune des moitiés (initiale – # d'équipe – Date)
- Prendre l'écouvillon stérile et le tremper dans l'eau physiologique
- Enlever l'excès de liquide, pour que l'écouvillon soit humide
- Frotter l'écouvillon humide sur la région à l'étude afin d'y prélever des microbes
- Ouvrir la gélose et strier doucement avec l'écouvillon la moitié de la surface de la gélose
- Répéter pour la deuxième région sur la seconde moitié de la gélose

Incuber à 37°C pendant 24h et conserver à 4°C jusqu'à la prochaine séance



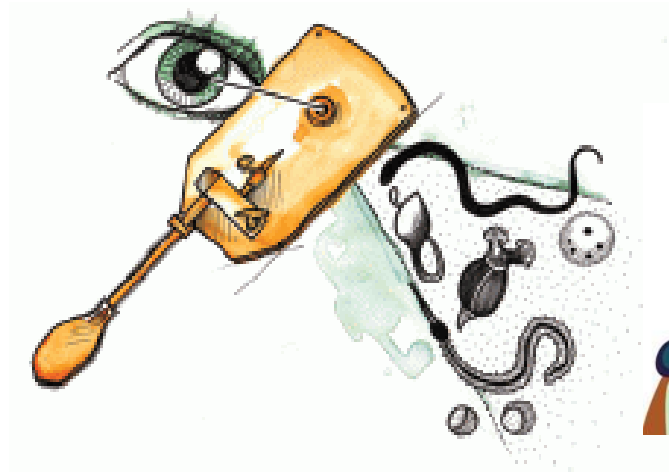
# Microscope – Première méthode



- Microscope simple 1590 par Zacharias Janssen (1585-1632)
- Observation des premiers microorganismes par Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723)
- Nécessaire à l'observation de microorganismes  
La limite de résolution de l'œil est de 0.2mm à 25cm
- La taille d'une bactérie varie de 1 à 10 $\mu$ m



Microscope de Janssen



Microscope de van Leeuwenhoek



# Grossissement



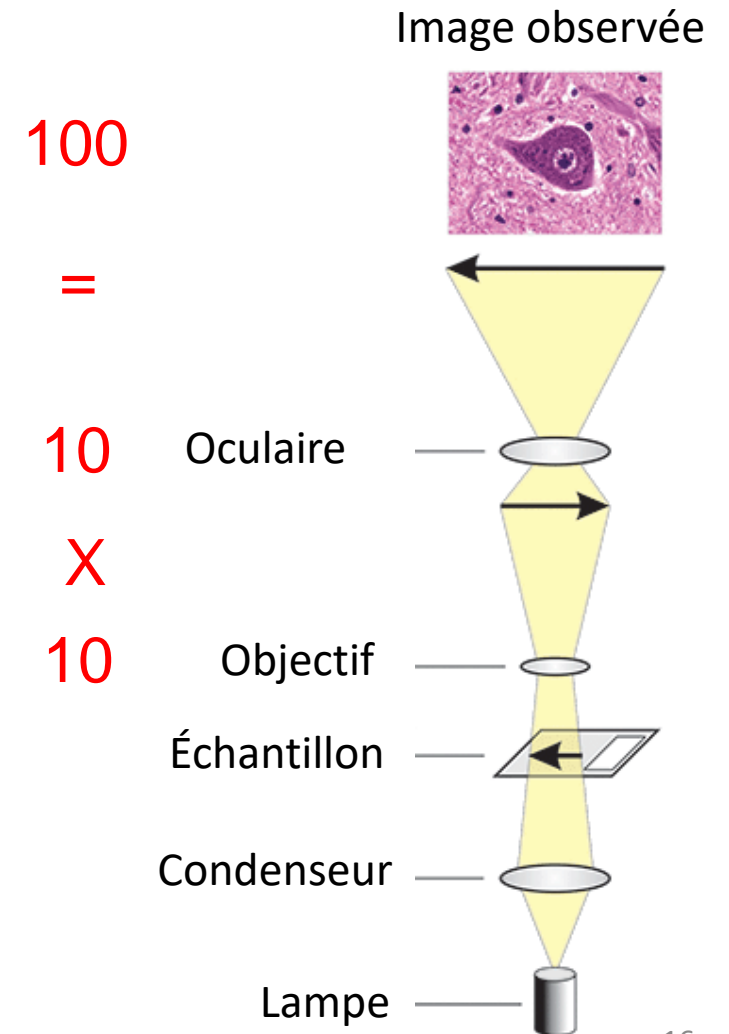
Différentes tailles d'objectifs



Tourelle porte objectifs



Oculaires



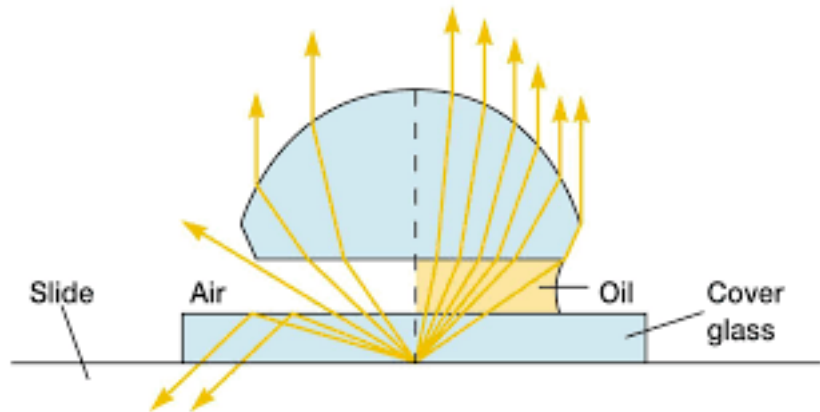
# Objectif à immersion



Différentes tailles d'objectifs



Dépôt d'une goutte d'huile à immersion sur la lame



L'huile à immersion permet une réfraction des rayons, similaire au verre

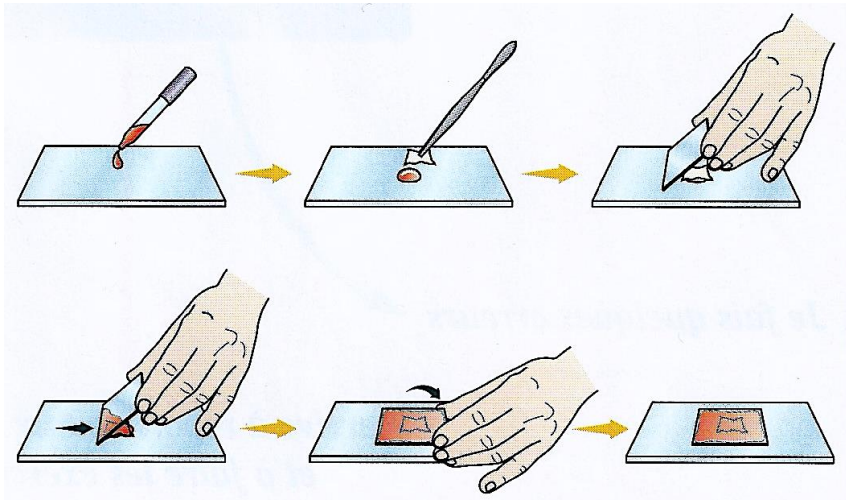
**AJUSTEMENT AVEC VIS MICROSCOPIQUE SEULEMENT!**

# Types de préparation



## État frais

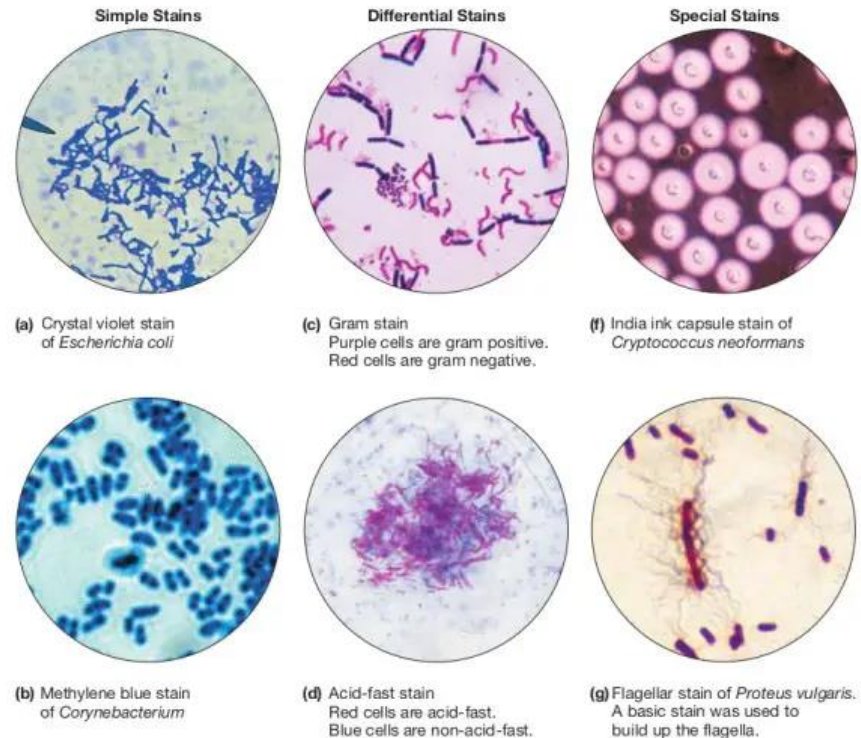
Permet d'observer la mobilité



Vidéo vie sous microscope

## Frottis

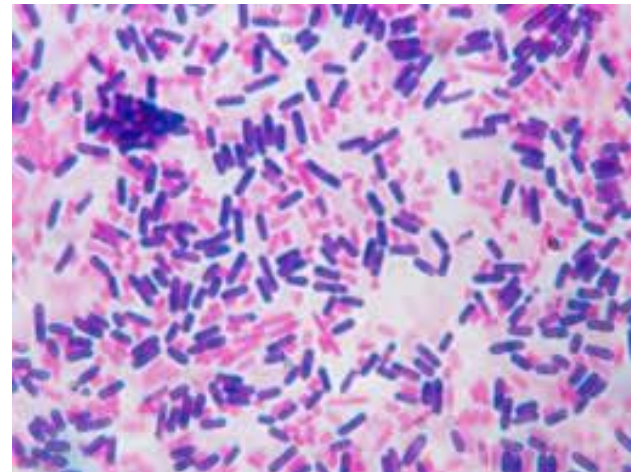
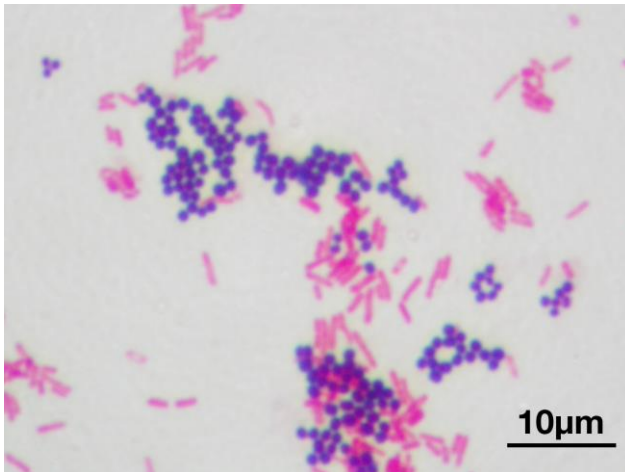
Permet d'appliquer des colorations



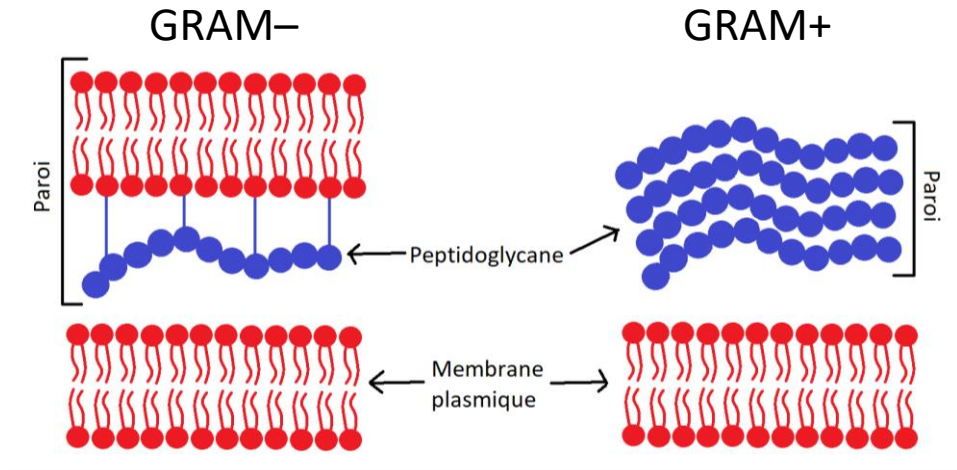
# Coloration de GRAM



Permet de classer les bactéries en fonction des caractéristiques de leur paroi



■ GRAM+  
■ GRAM-



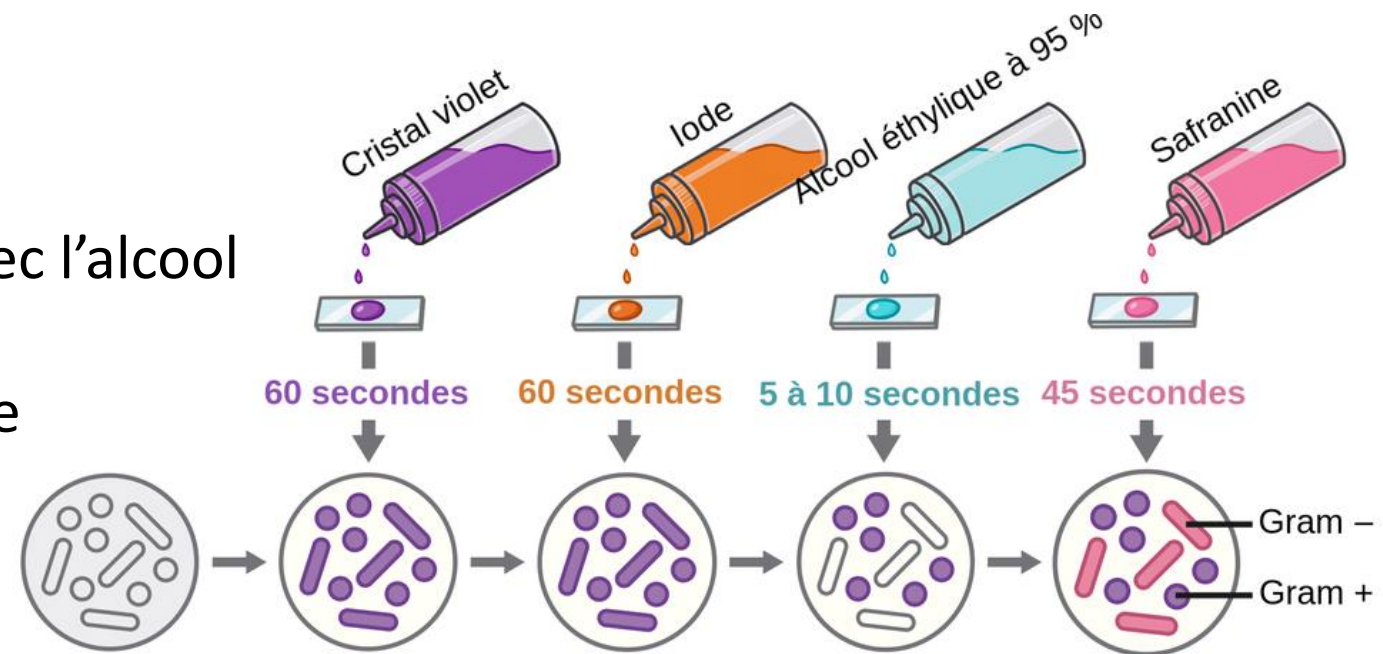
Morphologie de la paroi des GRAM- et GRAM+



# Coloration de GRAM



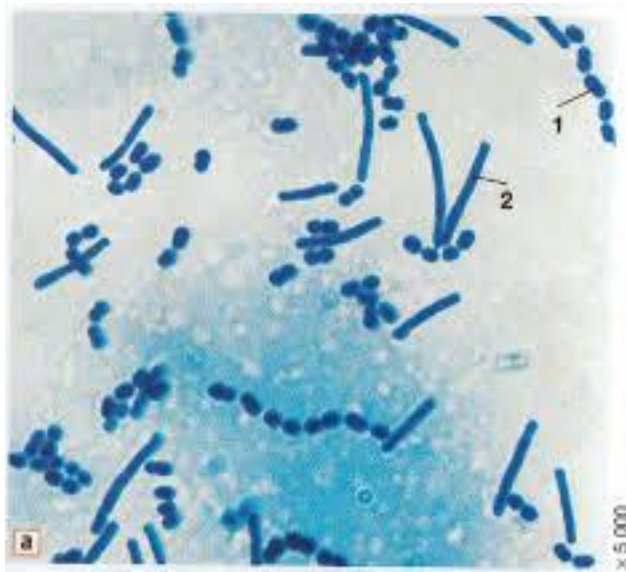
1. Fixer les microorganismes contenus dans le liquide sur la lame
2. Colorer l'intégralité des microorganismes avec le cristal violet
3. Fixer le cristal violet avec l'iode
4. Décolorer uniquement les GRAM– avec l'alcool
5. Recolorer les GRAM– avec la safranine



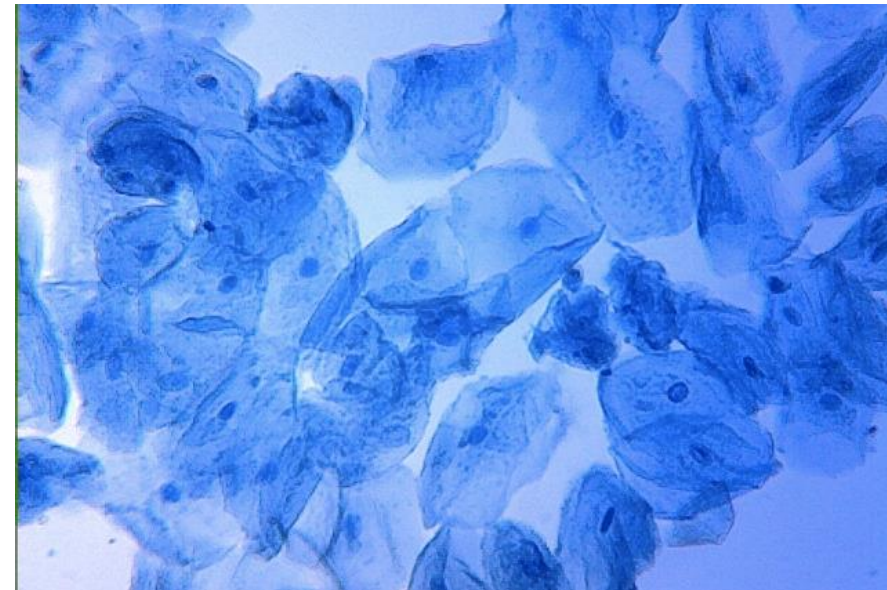
# Coloration bleu de méthylène



- Discriminer les cellules mortes des cellules vivantes
- Colorer les microorganismes pour une meilleure observation
- Colore l'ADN d'un bleu plus intense, donc meilleure vision du noyau



Bactéries



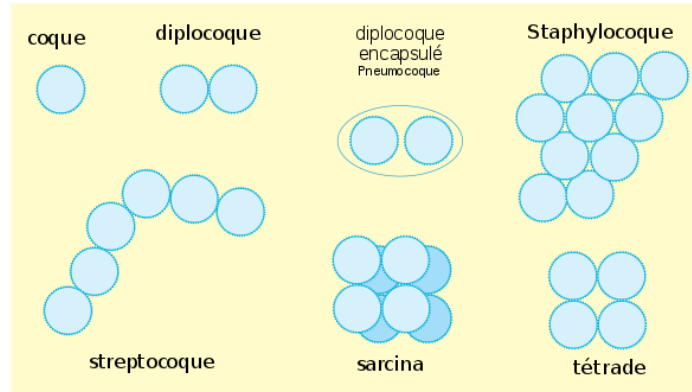
Cellule de l'épithélium buccale

# Morphologie

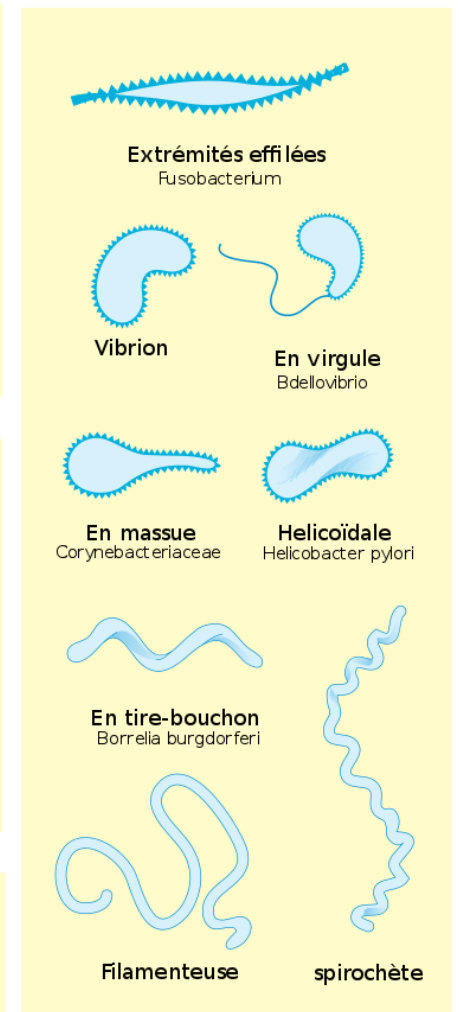


- Morphologie et arrangement des microorganismes entre eux
- Noms issus de ces caractéristiques:
  - Diplocoque: coques par deux
  - Strepto- : en chaines
  - Staphylo- : en amas

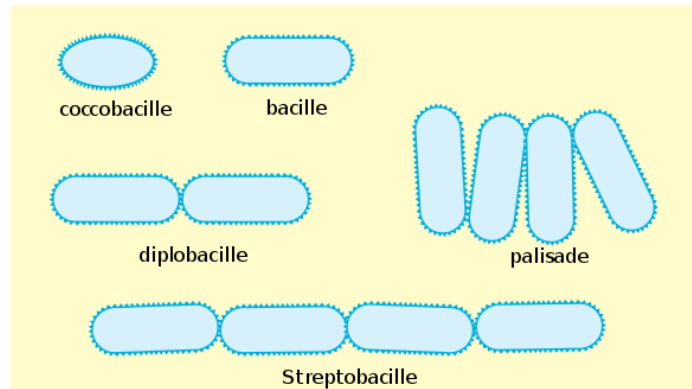
## Cocci



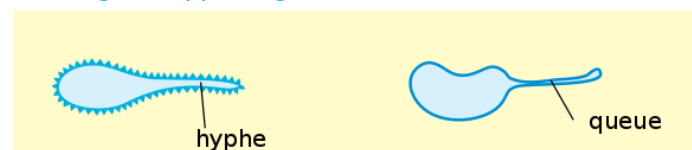
## Autres



## Bacilli

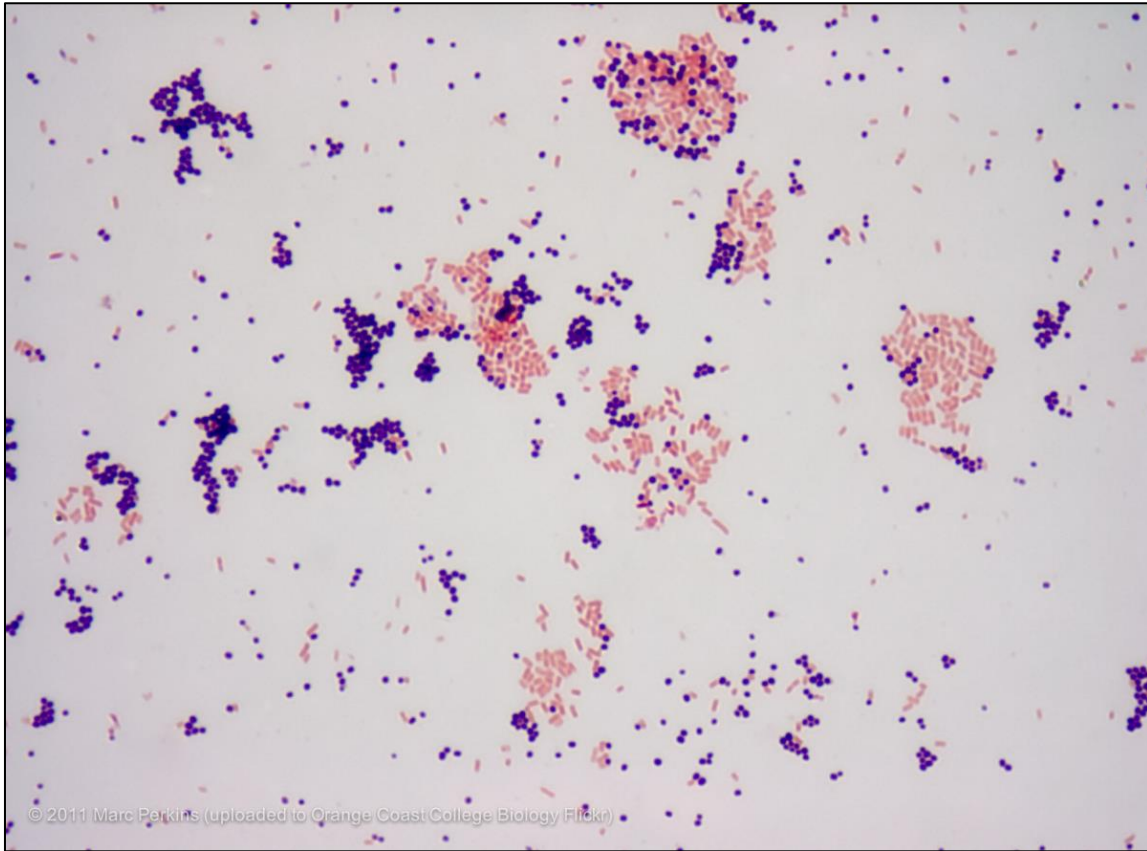


## Budding and appendaged bacteria





# Observations

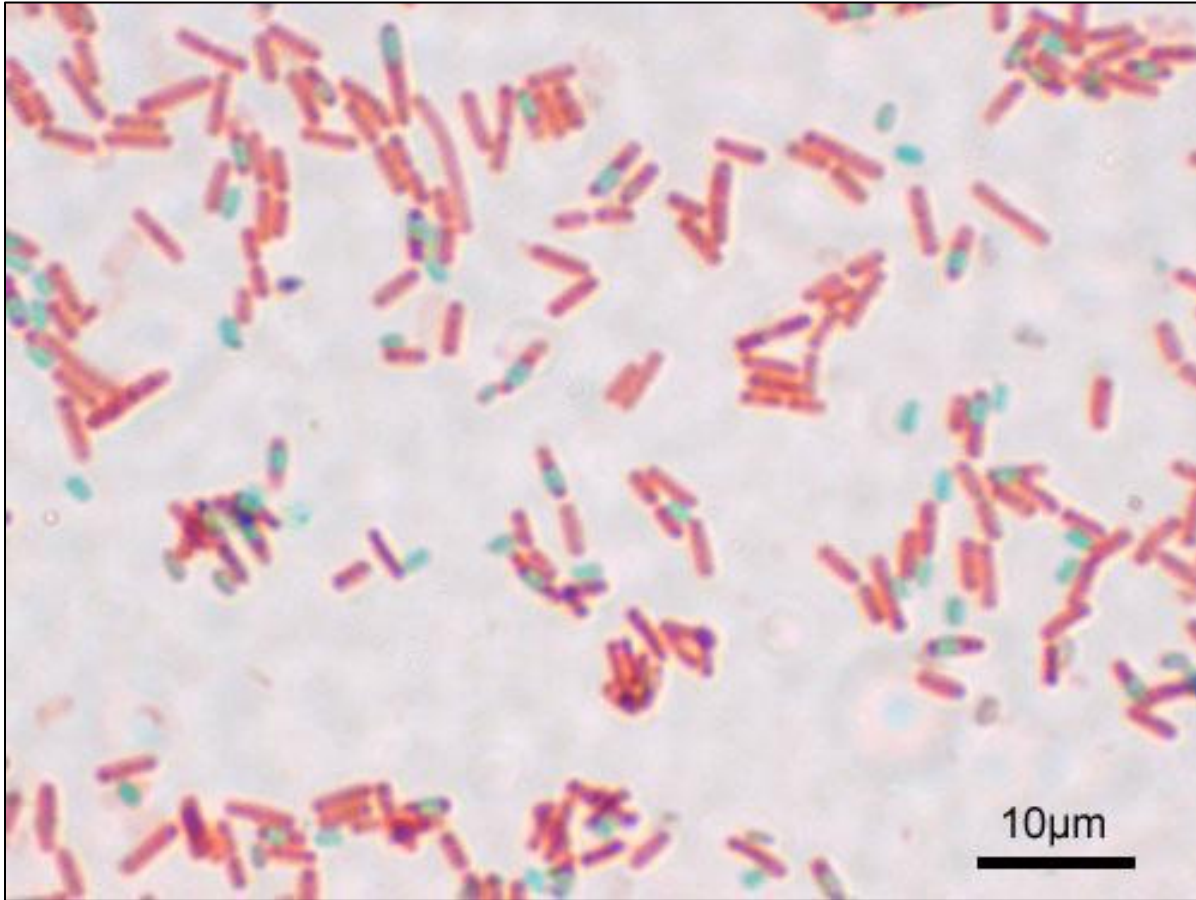


*Escherichia coli* (GRAM–) et *Staphylococcus aureus* (GRAM+) X1000

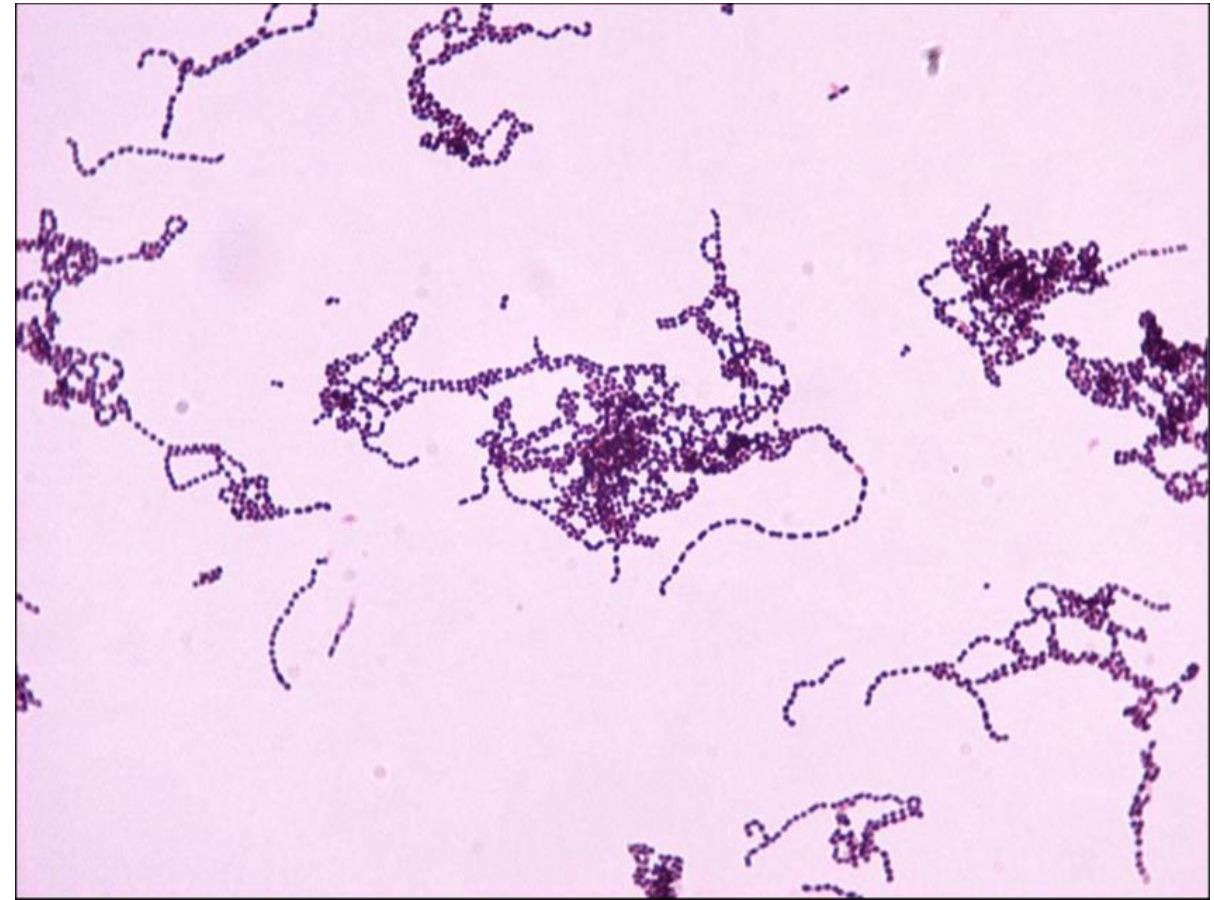


*Spirillum volutans* avec flagelles (Coloration de Gray) x1000

# Observations



Endospores colorés en vert chez *Bacillus subtilis*  
X1000



Streptocoques (coloration de Gram)  
x1000

# Exercice de pipetage



Vous disposez de :

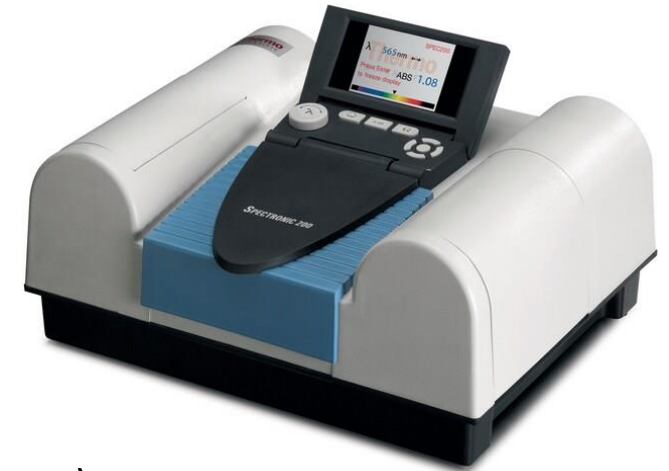
- Spectrophotomètre et cuvette
- Kimwipes
- Micropipette (P20 – P200 – P1000)
- Embouts de pipettes
- DCPIP
- Parafilm



# Calibration du spectrophotomètre



1. Brancher et allumer le spectrophotomètre (bouton derrière)
2. Attendre que l'appareil se réchauffe
3. Sélectionner SPEC 200
4. Régler absorbance à 600 nm
5. Utiliser la P1000 et un bécher pour mettre 1 ml d'eau distillée dans la cuvette
6. Nettoyer avec un kimwipe les côtés de la cuvette (le gras des doigts peu affecter la lecture)
7. Placer la cuvette dans le sens du faisceau et fermer le couvercle
8. Appuyer sur GO
9. Une valeur clignotera, lorsque stable, appuyer sur Enter
10. Appuyer sur le bouton 0.00 pour calibrer
11. Vous pouvez maintenant lire vos autres cuvettes en les insérant puis en appuyant Enter lorsque la valeur est stable (ne réappuyer pas sur 0.00 une fois la calibration faite)





# Utilisation du spectrophotomètre



**Cuvette # 1 (P200)**



**Cuvette # 2 (P200)**



**Cuvette # 3 (P20)**



**Cuvette # 4 (P10)**



**Eau distillée (P1000)**

900  $\mu$ l

950  $\mu$ l

980  $\mu$ l

995  $\mu$ l

**Pipette**

P200

P200

P20

P10

**DCPIP**

100  $\mu$ l

50  $\mu$ l

20  $\mu$ l

5  $\mu$ l

**Valeur obtenue # 1**

**Valeur obtenue # 2**

**Valeur obtenue # 3**

**Moyenne**

The background of the slide is a repeating pattern of various stylized microorganisms. These include green, multi-lobed amoeba-like shapes; green, rod-shaped bacteria with flagella; green, chain-like structures of cocci; and various other smaller, irregular shapes in shades of green and grey. The pattern is dense and covers the entire slide area.

# Questions ?