Université Oum El-Bouaghi

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie

Département de la Nature et la Vie

Niveau : **Master I Microbiologie Appliquée**.

Module : **Interaction microbienne.**

**TP N°1/ Isolement de la flore commensale.**

**I-Flore cutanée humaine**

1. **Prélèvement**
* **Laver les mains.**
* **Frotter 5 à 6 fois 3 de vos doigts derrière votre oreille.**
* **Agiter ces doigts pendant 3 minutes dans une boîte de Pétri contenant 5 mL d’eau stérile.**
* **Bien frotter la peau avec les ongles. Ceci constitue l’échantillon mère.**
* **Evaluer en cm2 la surface de peau prélevée.**
1. **Coloration de Gram**
* **Frotter un écouvillon imbibé d’eau distillée derrière votre oreille.**
* **Re-frotter l’écouvillon sur 1 lame.**
* **Faire une coloration de Gram.**
* **Estimer le % de chaque type de bactéries.**
1. **Dilutions**
* **Dans des tubes à hémolyse stériles, réaliser les dilutions 10-1 et 10-2  dans un volume final de 1 mL d’eau distillée.**
* **Bien vortexer chaque tube.**
1. **Ensemencement des milieux de culture**
* **Vortexer la dilution avant de prélever.**
* **Ensemencer 0.1 mL des dilutions (10-1,10-2) sur les milieux GN et Chapman (prévoir 1 gélose par dilution).**
* **Répartir sur la gélose puis étaler rapidement au râteau.**
* **Incuber à 37° C pendant 24 à48h.**

**II – Flore bucco-dentaire humaine**

1. **Prélèvement**
* **Avec un écouvillon stérile, frotter environ 2 cm2 de la muqueuse buccale (intérieur de la joue).**
* **Agiter l’écouvillon dans 2 mL d’eau stérile. Ceci constitue l’échantillon mère.**
1. **Colorations de Gram**
* **Frotter l’écouvillon « muqueuse » sur 1 lame.**
* **Faire une coloration de Gram.**
* **Estimer le % de chaque type de bactéries.**
* **Avec un autre écouvillon frotter une dent du fond et la gencive l’entourant.**
* **Frotter l’écouvillon « dent » sur 1 lame.**
* **Faire une coloration de Gram.**
* **Estimer le % de chaque type de bactéries et comparer avec la flore de la muqueuse.**
1. **Dilutions**
* **Dans des tubes à hémolyse stériles, réaliser les dilutions 10-1,10-2, 10-3, 10-4  dans un volume final de 1 mL d’eau distillée.**
* **Bien vortexer chaque tube.**
1. **Ensemencement des milieux de culture**
* **Vortexer la dilution avant de prélever.**
* **Ensemencer 0.1 mL des dilutions (10-2,10-3,10-4) sur les milieux GN et de la solution mère sur milieu Chapman (prévoir 1 gélose par dilution).**
* **Répartir sur la gélose puis étaler rapidement au râteau.**
* **Incuber à 37° C pendant 24 à48h.**

**III. Flore nasale humaine**

1. **Prélèvement**
* **Avec un écouvillon stérile, frotter environ 1 cm2 de la muqueuse nasale (intérieur de la narine).**
* **Agiter l’écouvillon dans 2 mL d’eau stérile. Ceci constitue l’échantillon mère.**
1. **Colorations de Gram**
* **Frotter l’écouvillon « nez » sur 1 lame.**
* **Faire une coloration de Gram.**
* **Estimer le % de chaque type de bactéries.**
1. **Dilutions**
* **Dans des tubes à hémolyse stériles, réaliser les dilutions 10-1,10-2, 10-3 dans un volume final de 1 mL d’eau distillée.**
* **Bien vortexer chaque tube.**
1. **Ensemencement des milieux de culture**
* **Vortexer la dilution avant de prélever.**
* **Ensemencer 0.1 mL des dilutions (10-2,10-3) sur les milieux GN et Chapman (prévoir 1 gélose par dilution).**
* **Répartir sur la gélose puis étaler rapidement au râteau.**
* **Incuber à 37° C pendant 24 à48h.**

**IV- Identification**

* Après incubation, réaliser une étude macroscopique des différentes colonies obtenues.
* Refaire une observation microscopique par coloration de Gram si nécessaire.
* Réaliser des tests biochimiques d’identification.