

(1)

TP(1) : Présentation du laboratoire de microbiologie

[1] Equipements

1- Le gros matériel : (principe et mise en marche).

Autoclave, (Stérilisation à chaleur humide).

Etuve, (Incubation).

Hotte bactériologique, (Stérilisation à UV et manipulation).

Microscope, (Observation).

Four Pasteur, (Stérilisation à chaleur sèche).

Bain-marie, (Maintien en surfusion les milieux et incubation).

Réfrigérateur, (Conservation).

2- Poste de travail :

Paillasse : Elle est facilement nettoyable par des agents désinfectants tels que l'eau de javel et l'alcool (éthanol).

Bec bunsen: Sa flamme bleue procure une zone circulaire stérile de 15 à 20 cm de diamètre dans laquelle toutes les manipulations doivent s'effectuer.

Matériels ; (Boîtes Pétri, pipettes, lame, béchers, anse, pinces, divers).

Produits ; (Milieux de culture, eau distillée, alcool, colorants, divers).

3- Consignes de sécurité :

Procéder à un lavage minutieux des mains, avant et après les manipulations.

Nettoyer la paillasse avec un désinfectant avant et après toutes manipulations.

Eviter les ouvertures des fenêtres pendant les manipulations.

Ouvrir avec précaution les récipients contenant des cultures microbiennes.

Flamber, avant et après manipulations, les anses métalliques utilisées.

Travailler dans une atmosphère stérile.

Prévenir immédiatement le responsable de TP en cas de contamination accidentelle d'un manipulateur.

Interdiction formelle de boire, manger et fumer pendant le TP.

Stériliser tout le matériel septique à la fin de la manipulation.

Prendre toutes dispositions pour la mise à l'abri des souches microbiennes.

[2] Procédés de stérilisation

A/ Stérilisation par la chaleur

1/ Flambage : trois passages lents (à la flamme bleue du bec Bunsen) des objets à stériliser (objets en verre et en métal).

2/ Stérilisation à air chaud : (Four Pasteur), Emballage du matériel à stériliser dans le papier aluminium (objets en verre et en métal).

3/ Autoclavage : méthode de stérilisation la plus efficace (20 minutes à 120°C).

4/ Ébullition : 30 minutes à 100°C par ébullition.

5/ Pasteurisation : Le liquide est porté rapidement à 90°C pendant 30s, puis refroidit brusquement à 10°C. Utilisée pour la Conservation des produits naturels.

6/ Tyndallisation : Chauffage à 70°-100°C à plusieurs reprises (1 heure tous les jours pendant 3 jours) dans un bain marie. Utilisée pour des substances thermolabiles.

B/ Stérilisation par filtration

1/ Filtration par membranes : membranes plastiques minces comportant des millions de pores par cm², très uniforme, varie de 0.22 à 0.45 µm et occupant environ 80% du volume du filtre.

C/ Stérilisation chimique

1/ Antiseptiques : teinture d'iode, mercryl laurylé, permanganate de potassium, eau oxygénée.

2/ Désinfectants : vapeurs (formol), liquides (eau de Javel, éthanol).

3/ Antibiotiques : bactériostatiques et bactéricides.

D/ Action des radiations

1/ Hottes à flux laminaire : La lumière U.V,est la plus souvent utilisée (lampes germicides ou stéri-lampes).

2/ Les rayons X ou γ : sont utilisés pour la conservation des produits alimentaires.

[3] Milieux de culture

Un milieu de culture est un support qui permet la culture de microorganismes, les cellules trouvent dans ce milieu les nutriments indispensables pour leur multiplication, mais aussi parfois des éléments qui permettront de privilégier un groupe microbien.

Les milieux sont soit liquides, soit solides. On utilise l'agar-agar (polysaccharide extrait d'algues rouges). Il constitue un support du milieu de culture. Capable d'absorber 200 à 250 fois son poids d'eau, l'agar forme une gelée à 40-45°C qui se liquéfie à 65-70°, l'agar est incorporé aux milieux à la dose de 15 à 20%.

(2)

Notion de milieu minimum : un milieu comportant les éléments chimiques nécessaires à la croissance microbienne, sous une forme utilisable par des microorganismes n'ayant pas d'exigence particulière.

Composition d'un milieu minimum:

Une source de carbone et d'énergie, exemple : le glucose.

Une source de potassium et de phosphore: (K₂HPO₄)

Une source d'azote et de soufre: (NH₄)₂SO₄

Une source de magnésium: MgCl₂

Une source de calcium: CaCl₂

Une source de fer: on emploie le citrate de fer.

Une source d'oligoéléments: Cu, Zn, Co, Ni, B, Ti.

Une source d'eau, (eau distillée).

Un tampon pH: il permet de maintenir un pH correct.

L'adjonction de facteurs de croissance, permet le développement des auxotrophes.

Milieus de culture empiriques :

Ce sont des milieux dont on ne connaît pas exactement la composition.

Exemple : Milieu cœur-cervelle.

Milieus synthétiques

Ce sont des milieux dont on connaît exactement la composition chimique.

Exemple : Milieu citrate de Simmons.

Milieus semi-synthétiques

On ne connaît la composition exacte que pour certains composants.

Les autres composants étant présents de manière empirique.

Exemple : Milieu MRS.

Milieus sélectifs

Ce sont des milieux qui permettent la culture de certains genres de microorganismes (Présence d'agents sélectifs).

Exemple : milieu S-S pour Salmonelles et Shigelles.

Préparation d'un milieu de culture

Matériels :

2 béchers de 500 ml, thermomètre, agitateur, bec bunsen, trépied et sa grille, boîtes de pétri stériles, pince en bois ou gants.

Produits :

Bouillons nutritif (BN) et Gélose Nutritive (GN), en poudre. Eau distillée.

Mode opératoire :

Peser la masse nécessaire de poudre GN pour 250 ml.

Dissoudre la poudre dans l'eau distillée à l'aide de l'agitateur.

Chauffer au bec bunsen jusqu'à l'ébullition.

Laisser refroidir la préparation jusqu'à 60°C.

Couler dans des boîtes de pétri, dans le cône stérile du bec bunsen.

[4] Méthodes d'ensemencement

L'ensemencement consiste à déposer dans un milieu de culture neuf des germes microbiens. Le transport est effectué avec une anse de platine ou une pipette Pasteur.

Plusieurs techniques d'ensemencement sont utilisées ; tels que l'ensemencement en stries, l'ensemencement par pique, l'ensemencement par touche, l'ensemencement par étalement (inondation), etc....

Mode opératoire : La méthode des stries (épuisement sur milieu solide).

Laver les mains et la surface de travail avec le désinfectant,

Disposer sur l'aire de travail tout le matériel nécessaire,

Allumer le bec Bunsen,

Placer la boîte de Pétri, couvercle en haut,

Prendre l'anse de platine et la stériliser dans la flamme,

Ouvrir le tube de bouillon, placé dans la main opposée,

Stériliser l'ouverture du tube à la flamme,

Introduire l'anse de platine dans le tube,

Stériliser de nouveau l'ouverture du tube à la flamme et le refermer,

Ouvrir la boîte et introduire l'anse sans toucher au bord de la boîte,

Déposer l'anse sur la gélose et faire un mouvement de va et vient,

Retirer l'anse et refermer la boîte de Pétri,

Tourner d'un quart de tour la boîte de Pétri,

Ouvrir la boîte de Pétri de nouveau et introduire l'anse,

Déposer l'anse sur la gélose et refaire un mouvement de va et vient,

Retirer l'anse et refermer la boîte de Pétri,

Enfin, flamber le fil de platine avant de le déposer,

Retourner la boîte de Pétri couvercle au dessous,

Placer la boîte de Pétri dans l'étuve à 37°C pour 24 heures.