**TP1 (Partie 1) : Le laboratoire de microbiologie**

1. **Règles à suivre durant les travaux pratiques de microbiologie**

* **Objectifs:**

Se familiariser avec un laboratoire de microbiologie, son équipement et son fonctionnement

* **Les consignes de sécurité**

**-** Avant de pénétrer dans la salle de travaux pratiques, le bactériologiste doit (1) déposer au vestiaire ses vêtements de ville tels que manteau, veste ... ainsi que tous les objets personnels non indispensables à son travail et (2) revêtir une blouse propre fermée sur le devant.

- Il est interdit de manger, de boire ou de fumer dans un laboratoire de bactériologie ou dans la salle de travaux pratiques.

- Procéder à un lavage minutieux des mains avant et après les manipulations, et avant toute sortie même momentanée de la salle de TP.

- En cours de travail, les mains peuvent être souillées, donc on évitera de porter les mains au visage, de toucher des objets personnels (mouchoirs, sac, ...), de serrer la main d'un visiteur, etc.

- Nettoyer soigneusement les paillasses avant et après les manipulations et de les désinfecter avec de l'eau de Javel.

- Il est impératif de travailler dans le cône de stérilité d'un bec Bunsen (20cm de diamètre), sans parler et en évitant les courants d'air (éviter les ouvertures des fenêtres et la porte pendant les manipulations).

- Flamber, avant et après chaque manipulation, les anses métalliques utilisées pour les prélèvements.

- Ouvrir avec précaution les récipients contenant des cultures microbiennes, afin d'éviter toute projection.

- Tout matériel en verre ayant été au contact avec une matière virulente doit être placé dans les bocaux contenant de l'eau de Javel.

- Prendre toutes dispositions indispensables pour la mise à l'abri des souches microbiennes ainsi que leur destruction afin d'éviter toute contamination.

* Prévenir immédiatement le responsable de TP en cas de bris d'un récipient contenant une culture, en cas de contamination accidentelle d'un manipulateur ou tout incident dispersant le matériel microbien.

**II. Matériel utilisé en microbiologie :**

**1. Le matériel optique :**

**Le microscope** est un instrument indispensable à l’étude des microorganismes. Il constitue l’outil principal du microbiologiste.

**2**.  **Le petit matériel :**

* **Les pipettes Pasteur** : c’est une pipette à bout effilé et à usage unique. On utilise à cet effet, des tubes de verre ordinaire cylindrique, d’un diamètre extérieur de 6mm et intérieur de 4mm, leur longueur est d’environ 250mm. L’une des extrémités est munie d’un petit tampon de coton cardé et l’autre est une partie effilés scellée de diamètre de 1mm environ.La pipette Pasteur permet, après rupture de l’extrémité, le prélèvement de liquide par aspiration buccale. Elle peut servir à la fabrication d’étaloirs utilisés lors des ensemencements.
* **Les boites de Pétri** :une boîte de Pétri est une boîte cylindrique transparente peu profonde en verre ou en plastique, munie d'un couvercle. Elles servent pour la culture des microorganismes. Après chaque usage, les boites en verre sont récupérées, lavées et stérilisées au four tandis que les boites en plastique sont jetées après chaque manipulation
* **Les tubes à essais** : sont utilisés pour la préparation des milieux de culture et des dilutions. Ils peuvent également contenir des réactifs.
* **Les pipettes graduées :** Elles ont des formes et des volumes différents. Elles sont utilisées pour les prélèvements en milieux liquides. Après chaque utilisation, elles sont lavées, séchées puis stérilisées au four à 180°C pendant 30min. il existe également des pipettes graduées en plastique mais à usage unique.
* **Les lames et les lamelles** : Elles sont utilisées pour les observations microscopiques. Les lamelles sont jetées après utilisation par contre les lames sont récupérée.
* **L’anse de platine** : c’est une anse munie d’un fil de platine. Elle sert au prélèvement et à l’ensemencement des milieux de cultures liquides ou solides. Elle doit être stérilisée avant et après chaque prélèvement.
* **La pince** : Elle sert a cotonner les pipettes après lavage et avant stérilisation. Elle est également utilisée pour tenir les lames lors des colorations.

**3. Les sources de chaleur :**

* **L’étuve**: c’est une enceinte chauffée par systèmeélectrique comportant un régulateur de température. Elle sert à fournir aux germes les conditions favorables pour leur bon développement. Elle est munie de plusieurs compartiments qui peuvent êtreréglées à des températures différentes. Ne pas oublier de fermer la porte de l’étuve après chaque utilisation.
* **Le Bain marie** : C’est un bac métallique équipé d’une résistance plongée dans de l’eau distillée. La température est réglée par un thermostat. Lors des manipulations, il permet d’obtenir des réactions plus rapides à des températures déterminées plus vite que dans l’étuve. Il sert surtout à l’étude de la thermorésistante des spores bactériennes.
* **Le four Pasteur** : C’est une enceinte dont le chauffage est assuré par des résistances ou bec à gaz. Il est généralement utilisé pour la stérilisation de la verrerie.
* **Le bec Bunsen** : Il sert à la stérilisation des fils des anses de platine ainsi que des cols des tubes à essai avant et après ouverture. Il est indispensable pour travailler dans des conditions aseptiques lors de l’ensemencement des microorganismes.
* **L’autoclave**: C’est un cylindre métallique, muni d’une résistance plongée dans de l’eau au fond du cylindre, la vapeur d’eau chaude sous pression arrive à des températures élevées atteignant 100°C

**4. Le matériel de conservation :**

* **Le réfrigérateur** : Il sert à conserver les milieux de cultures stérilisés. La température de conservation est de 4°C
* **Le congélateur** : il est utilisé pour conserver les sérums et les virus mais pas les bactéries ; à l’exception de celles qui doivent être conservées pendant une longue durée.

**TP1 (partie 2): Préparation des Milieux de culture**

1. **Définition**

Un milieu de culture est un support qui permet la culture de cellules, de bactéries, de levures, de moisissures afin de permettre leur étude. En principe, les cellules trouvent dans ce milieu les composants indispensables pour leur multiplication en grand nombre, rapidement, mais aussi parfois des éléments qui permettront de privilégier un genre bactérien ou une famille. Ainsi, selon le but de la culture, il est possible de placer les micro-organismes dans des conditions optimales, ou tout à fait défavorables.

La plupart des techniques bactériologiques exigent l’utilisation de milieux de culture. Ceux-ci contiennent les substances nutritives indispensables à la croissance des microorganismes. Ils sont disposés dans des récipients en verre de différentes formes (tubes, erlenmeyer, boites de pétri) préalablement stérilisés. Les milieux de culture sont liquides ou solides. Les microbes, au cours de leur développement, troublent uniformément les milieux liquides ou encore forment des agglomérats, des dépôts, des voiles superficiels. Sur les milieux solides, ils peuvent former une nappe confluente lorsque les germes ont été déposés en grand nombre à sa surface. Si les cellules bactériennes sont isolées, leurs descendants s’accumulent en une masse souvent bien délimitée appelée «une colonie» et dont l’aspect, les dimensions, les contours, la structure sont autant de caractères précieux permettant son identification.

1. **But du TP**

Préparation des milieux pour la culture des bactéries

1. **Matériel**

-Balance

-Bécher

-pH mètre

-Plaque chauffante plus agitation

-Flacon de 250 ml.

-Tubes à vis

**4. Produits**

- Bouillons nutritif (BN) en poudre: 13 g/l

- Gélose Nutritive (GN) en poudre : 20 g/l

-Eau distillée (diluant).

**5. Méthode**

- Préparer 20 ml de BN (partager dans 2 tubes à vis) ..

- Peser la masse nécessaire de poudre GN pour 100 ml d'eau distillée.

- Dissoudre les poudres dans le diluant (eau distillée) à l'aide de l'agitateur.

- Ajuster le pH a 7

- Chauffer avec la plaque chauffante jusqu'à l'ébullition

- Laisser refroidir les préparations

- Stériliser les milieux préparés