**TP N2**

Objectif de travaille

Voir l’effet de la stérilisation

Protocole

1-La préparation dessouche bactérienne

**-Préparation de milieu MH (Mueller Hinton).**

Pour la préparation de la gélose Mueller Hinton on introduit 38g de MH dans un erlenmeyer auquel est ajoutée 1L d’eau distillé, le mélange effectué sous agitation continue à une température ambiante sur une plaque chauffante jusqu'à le bouillage, le milieu sera divisée dans des flacons en verre.

* **Préparation de milieu BN (Bouillon nutritif)**

Le bouillon nutritif été préparé pour le but de la réactivation et l’entretien des souches bactériennes par l’ajoute de 20 g de BN à 1L d’eau distillé sous agitation pendant quelques minutes, la solution sera divisée dans des tubes en verre à vesse.

* **Préparation de l’eau physiologique**

L’eau physiologique est préparée par l’ajoute de 0.9g de Nacl à 100ml d’eau distillé avec agitation pendant quelques minutes et divisée dans des tubes en verre à vesse.

**.Stérilisation du matériel :**

Le milieu de culture MH, l’eau physiologie, BN, les tubes à essai

**Préparation des suspensions bactériennes:**

* Après la stérilisation de zone de travail avec l’eau de javel. Les souches sont réactivées dans le milieu BN stérile et incubées dans l’étuve à 37°C durant de 24 h.
* Les souches bactériennes ont été repiquées sur gélose nutritive en boite de pétri et incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. A l’aide d’une anse de platine stérile, quelques colonies bien isolées et identiques de chaque souche bactérienne à tester sont alors raclées, déchargées dans un tube contenant de l’eau physiologique puis homogénéisées à l’aide d’un vortex.

Nous avons fait la lecture de la suspension bactérienne à une densité optique de 0.08 à 0.10, lue à la longueur d’onde 625 nm

* un prélèvement de laboratoire est réalisé et ensemencé dans le milieu MH
* **. Ensemencement bactérien:**
* Après la préparation et l’identification des boites de pétri nous avons fait l’ensemencement des bactéries :
* L’ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boites Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l’essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L’écouvillon est Frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.
* L’opération est répétée deux fois en tournant la boite de 60° à chaque fois. L’ensemencement est fini en passant l’écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L’écouvillon est rechargé à chaque fois qu’on ensemence plusieurs boites de Pétri avec la même souche.
* Apres l’ensemencement on ajoute methanol ou ethanol ou eau de javel dans une boite et on fait l’incubation 24h

**La lecture**

**APRES 24 on fait la lecture on prend des photos et on discute les résultats on ramasse le résidu avec précaution**