

TP N° 1.

Présentation du laboratoire de Microbiologie

Introduction

L'étude in vitro des microorganismes nécessite un matériel et appareillage spécifique et un laboratoire de structure un peu aussi spécial. Les manipulations microbiologiques font intervenir souvent des microorganismes pathogènes. Donc il est indispensable de se protéger contre les contaminations tout en respectant les conditions d'asepsie et les consignes de sécurité.

Objectif du TP

C'est de se familiariser avec un laboratoire de microbiologie, son équipement et son fonctionnement :

Matériel utilisé en microbiologie

1- Verrerie et petits instruments

Une variété d'outils sont utilisés en manipulations microbiologiques, certains sont spécifiques (limités à la microbiologie), d'autres sont d'utilisation commune entre plusieurs sciences expérimentales. On distingue des instruments à utilisation unique et d'autres réutilisables (à plusieurs utilisations mais après stérilisation).

• A utilisation unique (*jetables*)

- ✓ **Pipettes Pasteur** : est une pipette à bout effilé dont l'une de ses extrémités est cotonnée par du coton cardé pour empêcher les microorganismes de passer, et assez lâche pour permettre une aspiration du liquide. Après utilisation, la pipette Pasteur est désinfectée dans l'eau de Javel puis jetée.
- ✓ **Lames** : est une petite plaque en verre utilisée pour poser et maintenir un échantillon préparé pour une observation au microscope. Après utilisation, on les met dans un cristalliseur contenant l'eau de javel puis on les jete.
- ✓ **Lamelles** : est une petite et fine plaque de verre utilisée pour couvrir un échantillon placé sur une lame pour une observation au microscope. Ayant le même devenir que les lamelles.
- ✓ **Boîtes de Pétri en plastique** : récipient circulaire, très utilisée en microbiologie, il sert comme un support pour cultiver les microorganismes. Après utilisation, elles seront immédiatement incinérées.

• Récupérables (*à plusieurs utilisations*)

- ✓ **Anse de platine** : c'est un fil droit et bouclé en extrémité, il est en platine (métal inoxydable) ou en alliage de nickel-chrome, et doit être protégé des torsions et maintenu en bon état de propreté. Il est utilisé pour le prélèvement des germes.
 - ✓ **Boîte de Pétri en verre** : un support pour cultiver les microorganismes.
 - ✓ **La loupe** : utile dans les examens macroscopiques des colonies microbiennes.
 - ✓ **La pince** : instrument métallique ou en bois qui sert à tenir les lames lors des colorations et peut être utilisé également pour cotonner les pipettes graduées avant leur stérilisation.
 - ✓ **Tubes à essai** : utilisés pour la préparation des dilutions, comme ils peuvent contenir des milieux de culture (solides inclinés, en culot, liquides) ou des réactifs.
 - ✓ **Différentes verreries** : il existe plusieurs types d'instruments en verre utilisés en microbiologie entre autres : bécher, fiole jaugée, erlenmeyer, pipettes graduées, cellules de Thoma et Malassez (utilisé dans le comptage des cellules).....

• **Autres**

Produits (milieux de culture, alcool, colorants, réactifs...), coton cardé, cônes,

2- Appareillage

2.1. Le microscope optique

Les organismes étudiés en microbiologie ont une certaine particularité. En effet leur **très petite taille** (de l'ordre du micron) nécessite l'emploi d'une panoplie de techniques pour les étudier tels que la microscopie.

Le microscope optique constitue l'outil principal de microbiologie, il permet de séparer les détails de l'image d'un objet de petites dimensions, et par conséquent de grossir l'image de cet objet afin qu'il soit observable par l'œil humain. Il est composé de deux parties :

A) Partie mécanique : comportant les éléments suivants :

- a) **Base** : constitue le pied du microscope.
- b) **Potence** : supporte le dispositif porte-oculaire et le dispositif porte-objectif.
- c) **Porte-objectif (revolver)** : muni de 3 ou 4 objectifs ; par son système de rotation, il permet le changement des objectifs.
- d) **Platine (chariot)** : support fixe, sert à porter l'échantillon à examiner.
- e) **Sur-platine (valets)** : un système de fixation de la lame porte-objet.
- f) **Porte-oculaire** : sert à porter 1 ou 2 oculaires muni d'un système de glissière pour bien régler les oculaires suivant l'utilisateur.
- g) **Porte-condensateur** : système de réglage contenant le diaphragme qui sert à régler l'intensité lumineuse.
- h) **Vis à mouvement rapide et fin** : servent pour la mise au point.

B) Partie optique : comportant :

- a) **Une lampe et un condensateur**, formé de plusieurs lentilles afin d'augmenter l'éclairage de la préparation.
- b) **Les objectifs** : sont des systèmes optiques formés d'une ou de plusieurs lentilles servant à donner une image réelle de l'objet. Deux sortes d'objectifs sont rencontrées :
 - ✓ Objectif à sec : la lentille de ce type ne touche pas l'objet, elle est séparée de la préparation par l'air
 - ✓ Objectif à immersion : la lentille de ce type touche l'objet par l'intermédiaire d'une huile ayant un indice de réfraction très voisin de celui du verre de la lamelle. Cette huile est utilisée pour donner une réflexion totale des rayons lumineux à la sortie de la lame. L'huile couramment utilisée est « l'huile de cèdre ».
- c) **Les oculaires** : formés de deux lentilles, une inférieure pour éclairer l'image réelle fournie par l'objectif, l'autre supérieure qui agrandit l'image réelle x10 pour donner une image virtuelle.

Les types de microscopes se différencient par leur pouvoir séparateur ou de résolution qui exprime la capacité d'un système optique à distinguer les détails. On peut le définir aussi comme étant la petite distance entre deux points que peut un microscope visionner avec précision

2.2. Matériel d'incubation



- **L'étuve** : est une enceinte chauffée par un système électrique comportant un régulateur de température. Elle est utilisée pour l'incubation des cultures microbiennes.
- **Le bain-marie** : est bac métallique muni d'une résistance plongée dans de l'eau distillée. La température est réglée par un thermostat. On l'utilise pour une incubation nécessitant des ajouts permanents, pour la recherche des spores,....

2.3. Matériel de stérilisation

- **Le bec Bunsen** : convient pour stériliser : l'air de la zone du travail (15-20cm au tour du bec), les fils de platine, col des tubes et des fioles et extérieur des pipettes Pasteur. Il s'agit d'une stérilisation temporaire.
- **Le four Pasteur** : le chauffage est assuré par une résistance électrique ou des becs à gaz. Le four est utilisé pour la stérilisation de la verrerie, le métal, la porcelaine.
- **L'autoclave** : un cylindre métallique, muni d'une résistance plongée dans de l'eau, la vapeur d'eau chaude sous pression arrive à des températures élevées (plus de 110°C). Il convient surtout pour la stérilisation des milieux de culture non thermolabiles, tous les liquides, matériel en plastique et en caoutchouc.
- **Les filtres** : les membranes filtrantes sont plus utilisées pour la stérilisation des solutions thermolabiles non visqueuses. Les filtres utilisés sont de plusieurs matières : bougie Chamberland à base de porcelaine, bougie Birkenfeld à base de terre d'infusoire, membrane du collodion ou de cellulose, etc.

2.4. Matériel de conservation (du froid)

- **Réfrigérateur (4°C)**: pour la conservation des milieux de culture, les souches microbiennes, les réactifs.
- **Congélateur (-20 à -80°C)**: pour la conservation pendant une longue durée des sérums, des bactéries et des champignons mais dans le glycérol qui les protège de l'action mortelle du froid.
- **Glacière** : pour le transport des échantillons sensibles aux effets de températures.

Consignes de sécurité et d'asepsie dans le laboratoire de microbiologie

Présentation d'un poste de travail (La paillasse)

- Tout travail doit s'effectuer sur une paillasse de travail propre, où se trouvent des poubelles, des pissettes (eau distillée, javel pour la décontamination et la désinfection, éthanol, bactéricide et...).
- Pour désinfecter la paillasse avant d'allumer le bec Bunsen, mettre de quelques gouttes d'eau de javel sur la surface de la paillasse et l'étaler avec une éponge absorbante (en bout de paillasse) jusqu'à ce que la paillasse soit sèche.
- En fin de la séance il est impératif de laisser les paillasses propres c'est-à-dire d'y avoir passé un coup de bactéricide.
- On trouve aussi du scotch blanc pour éviter d'écrire sur les flacons en verre, un marqueur, des ciseaux, du parafilm et une boîte d'allumette.

Les recommandations à la biosécurité sont les suivantes :

- Porter une blouse à manches longues fermée.
- Attacher les cheveux et découper vos angles.
- Oter les bijoux (bagues et bracelets)
- Il est strictement interdit de manger, de boire et de fumer au laboratoire. cv



- Nettoyer la paillasse à l'eau de javel diluée.
- Allumer le bec bunsen pour créer la zone de stérilité.
- Procéder à un lavage minutieux des mains avant et après les manipulations et avant toute sortie même momentanée du laboratoire.
- Eviter les ouvertures de fenêtres pendant les manipulations.
- Travailler en position assise.
- Travailler dans des conditions d'asepsie près du bec bunsen et en reproduisant les gestes du démonstrateur = enseignant (exemple : comment tenir le tube, le bouchon, l'anse de platine utilisé pour l'ensemencement...)
- Agiter toutes les suspensions avant de les utiliser.
- Ouvrir avec précaution les récipients contenant des cultures microbiennes afin d'éviter toute projection.
- Ne pas toucher à la bouche ni au visage lors des manipulations.
- Flamber avant et après manipulation, les anses métalliques utilisées pour les prélèvements, en commençant par chauffer la partie moyenne de l'instrument afin de dessécher les restes de culture avant de porter l'extrémité dans la flamme, ceci pour éviter toute projection.
- Attention à l'alcool en contact de la flamme (il est inflammable).
- Tout le matériel utilisé pour la mise en culture (écouvillon, pipette Pasteur, lames) doit être déposé dans un cristalliseur contenant de l'eau de javel.
- Stériliser tout le matériel septique à la fin de la manipulation.
- Prendre toutes les 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 culture en cas de contaminations accidentelles d'un manipulateur ou tout incident dispersant le matériel microbien
- Avant de quitter laboratoire :
 - ✓ Nettoyer les paillasses, les éviers, les objectifs des microscopes.
 - ✓ Remettre tout le matériel propre à sa place et ranger les chaises.
 - ✓ Vérifier la fermeture des robinets d'arrêt du gaz et de l'eau avant sortir.

