

TP 1 : Connaissances de base nécessaires pour réaliser des travaux pratiques en biochimie microbienne

Objectifs

Pour effectuer des manipulations en biochimie microbienne, certaines connaissances de base sont essentielles. Les principaux aspects à maîtriser sont :

1. Sécurité au laboratoire
2. Techniques de stérilisation
3. Manipulation des milieux de culture et les techniques d'ensemencement

Ces connaissances fondamentales permettent non seulement d'effectuer des manipulations en toute sécurité, mais aussi d'assurer la validité et la fiabilité des résultats obtenus dans le laboratoire.

I. Règles générales de manipulation

Travailler dans un laboratoire de microbiologie implique de respecter des règles strictes pour garantir la sécurité du personnel, la qualité des résultats et la prévention des contaminations. Voici quelques-unes des règles les plus importantes à suivre :

1. Port des équipements de protection individuelle (EPI) : Cela comprend une blouse de laboratoire, des gants, des lunettes de sécurité et éventuellement un masque facial, des surchaussures, et une charlotte pour les cheveux.
2. Hygiène personnelle : Se laver soigneusement les mains avant et après avoir manipulé des échantillons, après avoir enlevé les gants, et après avoir quitté le laboratoire. Éviter de porter des bijoux et de se maquiller en laboratoire. Ne pas manger, boire ou fumer dans le laboratoire.
3. Nettoyage et désinfection : Les plans de travail, les équipements et les surfaces doivent être régulièrement nettoyés et désinfectés pour éviter la contamination.
4. Manipulation des échantillons : Suivre les protocoles de manipulation spécifiques pour chaque type d'échantillon afin d'éviter toute contamination.
5. Élimination des déchets : Les déchets biologiques doivent être correctement éliminés dans des contenants spécifiques et conformes aux normes de sécurité.
6. Stockage des échantillons : Les échantillons doivent être stockés dans des conditions appropriées, à la bonne température et dans des contenants étiquetés de manière adéquate.
7. Sécurité : Respecter les règles de sécurité en vigueur dans le laboratoire, notamment en cas d'accident ou de contamination.

II. Méthodes de stérilisation en microbiologie

La stérilisation est cruciale pour éliminer les micro-organismes indésirables et assurer la fiabilité des expériences. Les principales méthodes de stérilisation utilisées dans les laboratoires de microbiologie sont :

1. Stérilisation par chaleur

1.1. Chaleur humide

- **Autoclavage** : Utilise de la vapeur d'eau sous pression à 120- 121 °C pendant environ 10-20 minutes. Cette méthode est efficace pour détruire toutes les cellules végétatives et les spores. Utilisé pour les milieux de cultures et le matériel.
- **Pasteurisation** : Traitement thermique à des températures variant entre 75 °C et 80 °C, principalement utilisé pour liquides, tuant certains pathogènes mais pas nécessairement toutes les bactéries.
- **Tyndallisation** : Implique trois cycles de chauffage à 60-90 °C pendant 1 heure, à des intervalles de 24 heures, permettant la destruction des spores en les faisant germer. Elle est utilisée pour liquides

1.2. Chaleur sèche

- **Flambage** : Exposition directe à la flamme (bec Bunsen) pour stériliser des instruments métalliques.
- **Four Pasteur** : Utilise une température de 180 °C pendant 1 heure pour stériliser le matériel non thermosensible, comme le verre et certains métaux.

2. Stérilisation par filtration

Cette méthode consiste à faire passer un liquide à travers un filtre dont les pores mesurent environ 0,22 µm. Elle est particulièrement utile pour les solutions thermolabiles, comme certains antibiotiques et vitamines, qui ne peuvent pas être autoclavés.

3. Stérilisation chimique

Utilise des agents chimiques pour détruire ou inhiber la croissance microbienne. Les désinfectants courants incluent :

- **Composés phénoliques** : Utilisés pour leur efficacité contre divers micro-organismes.
- **Alcool (éthanol)** : Souvent utilisé pour désinfecter les surfaces et le matériel.
- **L'hypochlorite de sodium (eau de Javel)** : utilisé dilué au ¼ dans les bacs, ou en pissette pour la désinfection des paillasses et des sols.

4. Radiations

- Radiation non ionisante (Rayonnement UV) : La stérilisation par les UV est utilisée au laboratoire pour la décontamination de l'air et des paillasse situées sous la hotte à flux laminaire, la du pénétration rayonnement dans le produit ou le matériel à stériliser est faible.

- Radiation ionisante : Cette méthode utilise des rayonnements ionisants comme les rayons gamma ou X pour stériliser les milieux de culture et peut servir pour la stérilisation des boîtes de Pétri en plastique, médicaments non autoclavables et non filtrables, exp : vaccins et antibiotiques...

Chaque méthode de stérilisation présente des avantages et des inconvénients, et le choix de la méthode appropriée dépend du type de milieu de culture, de la nature des micro-organismes à éliminer et des exigences expérimentales spécifiques.

III. Types de milieux de culture microbiologiques

Les milieux de culture sont essentiels pour la croissance et l'étude des micro-organismes. Ils peuvent être classés selon plusieurs critères, notamment leur consistance, leur composition et leur fonction :

1. Selon la consistance

- **Milieux liquides** : Ne contiennent pas d'agar-agar. Ils permettent une croissance homogène des micro-organismes sous forme de turbidité (ex. : bouillon nutritif).
- **Milieux semi-solides** : Contiennent entre 0,5 et 0,75 % d'agar-agar. Ils sont utilisés pour des cultures nécessitant une consistance intermédiaire.
- **Milieux solides** : Contiennent entre 1,5 et 2 % d'agar-agar. Ils permettent la formation de colonies distinctes sur la surface (ex. : gélose nutritive).

2. Selon la composition

- **Milieux complexes** : Leur composition est partiellement connue et souvent dérivée de sources naturelles, comme les extraits de levure ou les peptones (ex. : bouillon au soja). Ces milieux sont adaptés à une large gamme de micro-organismes.
- **Milieux synthétiques** : Composés uniquement de substances chimiques pures dont la composition est bien définie. Ils sont idéaux pour des études précises sur les besoins nutritionnels des micro-organismes.

3. Selon la fonction

- **Milieux sélectifs** : Conçus pour favoriser la croissance d'un type spécifique de micro-organismes tout en inhibant d'autres (ex. : milieu SS pour les Salmonelles). Ces milieux contiennent des agents inhibiteurs comme des antibiotiques ou des sels à forte concentration.
- **Milieux différentiels** : Permettent de distinguer différents types de micro-organismes en fonction de leurs caractéristiques biochimiques (ex. : gélose MacConkey qui différencie les bactéries lactose-fermentantes).

- **Milieux chromogènes** : Utilisent des substrats couplés à des molécules chromogènes qui changent de couleur lors du métabolisme par certaines enzymes bactériennes, facilitant ainsi l'identification rapide.

VI. Méthodes d'ensemencement en microbiologie

L'ensemencement est une étape cruciale, permettant de transférer des micro-organismes dans un milieu de culture stérile. Les principales méthodes d'ensemencement utilisées sont :

1. Ensemencement dans des milieux liquides

- **Dépôt direct** : Une anse de platine ou une pipette Pasteur est utilisée pour prélever des micro-organismes d'une culture mère et les déposer directement dans un tube de bouillon stérile.

2. Ensemencement sur milieux solides

a. Ensemencement en surface

- **Stries d'épuisement** : Cette méthode consiste à étaler une petite quantité de suspension microbienne sur la surface d'une gélose à l'aide d'une anse de platine, en effectuant des stries pour isoler les colonies.
- **Inondation** : Utilisée principalement pour les antibiogrammes, elle consiste à verser un volume défini (1 à 5 ml) de suspension microbienne sur la surface du milieu solide, puis à éliminer l'excès.
- **Étalement** : Une petite quantité (100 µl) de suspension est déposée sur la surface du milieu, puis étalée uniformément avec un râteau ou une pipette.

b. Ensemencement en profondeur

- **Dans la masse** : 1 ml de suspension microbienne est déposé dans une boîte de Pétri vide, suivi de l'ajout d'environ 15 ml du milieu de culture en surfusion (45 °C). Le mélange est ensuite laissé solidifier.
- **Double couche** : Après avoir réalisé un ensemencement dans la masse, une seconde couche de milieu est ajoutée pour créer des conditions micro-aérobies.

3. Ensemencement par piqûre

- **Piqûre centrale** : Réalisée dans un tube de gélose en culot, cette méthode consiste à introduire une anse chargée de suspension bactérienne au centre du culot.