

**TP 2 : Techniques de dilution et préparation des solutions en conditions aseptiques****1. Objectif :**

Les étudiants apprendront à effectuer des dilutions en série et à préparer des solutions stériles en appliquant des méthodes garantissant l'absence de contamination

**2. Matériel :**

- **Équipement :**
  - Balance de précision
  - Agitateur magnétique ou vortex
  - Micropipettes (P20, P200, P1000) avec embouts stériles
  - Pissettes contenant de l'eau distillée stérile, de l'eau de Javel, et de l'alcool à 70%
  - Papier hygiénique
- **Verre et tubes :**
  - Tubes à essai contenant 9 mL d'eau physiologique stérile
  - Tubes à essai stériles vides
- **Produits chimiques et solutions :**
  - Ampicilline (solution de 100 mg/mL)
- **Échantillons :**
  - Lait UHT
  - Lait cru
  - Yaourt
  - Levure de boulanger (1 g de levure sèche / 10 ml d'eau stérile)

**3. Techniques de dilutions en série logarithmique :**

Les dilutions en série sont utilisées pour réduire progressivement la concentration d'un échantillon de manière contrôlée.

### 3.1. Étapes de réalisation :

- **Préparation des tubes de dilution :**

- Remplir plusieurs tubes à essai stériles avec 9 mL de diluant stérile (eau physiologique).

- **Transfert aseptique :**

- Utiliser une micropipette avec un embout stérile pour prélever 1 mL de l'échantillon de départ (par exemple le lait cru) et l'ajouter au premier tube contenant 9 mL de diluant. Cela fait une dilution  $10^{-1}$ .
- Mélanger doucement le tube en aspirant et en soufflant le contenu à l'aide de la micropipette.

- **Dilutions successives :**

- Prendre 1 mL de la dilution  $10^{-1}$  et l'ajouter au second tube contenant 9 mL de diluant, pour obtenir une dilution  $10^{-2}$ .
- Répéter cette procédure pour obtenir des dilutions  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , etc.
- À chaque transfert, utiliser un nouvel embout stérile pour éviter la contamination.

### 4. Calcul des dilutions et préparation des solutions :

L'ampicilline est un antibiotique largement utilisé dans le domaine du contrôle microbiologique, il peut être utilisé pour évaluer la sensibilité ou la résistance des bactéries à l'ampicilline.

#### 4.1. Préparation de la Solution d'Ampicilline :

- Pour préparer **200  $\mu$ L** de solution à **25 mg/mL** à partir de la solution de **100 mg/mL**, utilisez la formule de dilution :
- **$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$**
- **$V_1 = C_2 \times V_2 / C_1 = (25 \text{ mg/ml} \times 0.2 \text{ ml}) / 100 \text{ mg/ml} = 0.05 \text{ ml}$  (ou 50  $\mu$ l).**

- **Préparation :**

- Prenez **50 µL** de la solution d'ampicilline concentrée avec une micropipette stérile.
- Ajoutez **150 µL** de solution stérile (eau distillée ou soluté physiologique) dans un tube à essai stérile.
- Mélangez doucement en évitant de créer des bulles d'air.

- **Conservation :**

- Étiquetez le tube avec la concentration, la date et vos initiales.
- Conservez la solution d'ampicilline selon les recommandations (généralement à 2-8 °C).

- ❖ **Conseils pour Maintenir la Stérilité :**

- Toujours travailler sous une hotte à flux laminaire si possible ou devant un bec Bunsen.
- Utiliser des matériels stériles (pipettes, tubes, flacons).
- Éviter de toucher les bords des tubes ou des flacons avec des mains non stériles.
- Manipuler les échantillons rapidement pour minimiser le risque de contamination

## 5. Gestion des déchets :

- **Matériel non contaminé :** Jetez le papier et autres déchets non contaminés dans la poubelle normale.
- **Matériel contaminé (embouts, tubes) :** Utilisez des poubelles spéciales pour les déchets biologiques. Désinfectez tout matériel avant élimination selon les protocoles du laboratoire (par exemple, en les trempant dans de l'eau de Javel).