

TP N° 1. PARTIE I : Présentation du laboratoire de Microbiologie

Introduction

Depuis la plus haute antiquité, les microorganismes ont été utilisés empiriquement pour produire et conserver les aliments ; la fabrication des laits fermentés et des fromages a été pratiquée depuis des millénaires dans les différentes régions du globe.

Les micro-organismes aussi appelés microbes et protistes, forment un ensemble d'organismes vivants microscopiques, invisibles à l'œil nu.

Les protistes se composent : des bactéries, des protozoaires, des champignons (mycètes) microscopiques, et des algues. Les virus sont considérés comme des microorganismes acellulaires qui dépendent entièrement des cellules hôtes infectées.

Aujourd'hui, les microorganismes affectent tous les domaines de la vie telle que la Bioremédiation en éliminant les composants toxiques, ils assurent le recyclage du carbone, de l'azote et du phosphore.

Aussi il nous permet de lutter contre les multiples affections avec des drogues thérapeutiques, des antibiotiques, vaccins, et des enzymes, sans oublier leur utilisation dans l'industrie alimentaire dans la fermentation des fromages, du pain et du yaourt.

L'étude *in vitro* de ces 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.

L'objectif de ce TP : est de se familiariser avec un laboratoire de microbiologie, son équipement et son fonctionnement :

1) Visite des locaux :

- Structure
- Présentation du gros matériel (autoclave, étuve, four....)

2) Présentation d'un poste de travail :

- Matériel (bec bunsen, pipettes, anse de platine, pince..) en désignant ceux qui sont récupérables et ceux qui sont jetables (à utilisation unique)
- Produits (alcool, colorants,...)

3) Consignes de sécurité et d'asepsie

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 jets**.
- **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 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 Pétri en verre** : un support pour **cultiver les microorganismes**.
- **La loupe** : utile dans les examens macroscopique 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,

Agar-agar = gélose

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 suivant :

- 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** : 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 (deux verticaux et deux horizontaux)**: 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 ; il est donné par la relation :

$$R = \lambda / 2 a$$

R : pouvoir de résolution

λ : longueur d'onde de la lumière

a : ouverture numérique de l'objectif, on peut la calculer en utilisant par la relation :

$$a = n \sin (\theta/2)$$

n : indice de réfraction du milieu traversé par la lumière entre l'objet et l'objectif (n de l'huile de cèdre = 1,52)

θ : angle d'ouverture de l'objectif (pour l'objectif X100, $\sin (\theta/2)$ est voisin de 1).

Pour augmenter la durée de vie de microscope et de ses objectifs, économiser de l'argent et éviter tous types de problèmes liés au dysfonctionnement de cet appareil, on doit suivre ces conseils d'entretien technique :

- **Éteindre la lumière** après utilisation du microscope.
- Utiliser **l'huile d'immersion** parcimonie et seulement avec les objectifs d'immersion en huile (**100x ou 50x**).
- Après avoir terminé avec **une lame**, il faut la **retirer** directement.
- **Ne pas laisser** les objectifs d'immersion dans **l'huile** pendant une longue période (elle peut les endommager).
- **Nettoyer** l'objectif après chaque utilisation avec du papier Joseph imbibé des produits conçus pour nettoyer les lentilles (**xylène ou alcool à 90°**).
- **Laisser l'objectif de faible puissance** en place après avoir terminé la visualisation et abaisser le plateau ainsi que le condensateur afin d'être à la bonne position pour une autre observation.
- Une fois terminé avec le microscope, on doit le **couvrir avec sa housse** protectrice.
- Les **coups violents sont à éviter**.
- Le **transport du microscope** doit s'effectuer en le tenant avec les **deux mains**, une supportant la base et l'autre portant fermement la potence.

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

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.
- 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 **crystalliseur 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.

Remarque importante

Apporter un petit cahier de laboratoire, scotch et un marqueur permanent pour repérer les boîtes en écrivant les initiales de vos noms, le microorganisme ensemencé ainsi que la date d'ensemencement

TP N° 1. PARTIE II: Stérilisation et désinfection

La **destruction des microorganismes** est indispensable lors de la préparation du matériel et des milieux destinés aux manipulations, ainsi qu'avant le lavage ou l'élimination du matériel et des milieux utilisés.

1) La stérilisation

Est une opération appliquée **sur des substances inertes** permettant une **élimination durable** de **tous les microorganismes** sous leurs **formes végétatives** ou leurs **formes sporulantes** et aussi **élimination des virus**.

Les **objets stérilisés** doivent être **protégés** jusqu'à l'utilisation suivante pour **éviter une recontamination**.

La **technique utilisée sera choisie** en fonction de : **la nature du produit ou du matériel** à stériliser, le prix de revient et les possibilités locales d'utilisation.

a- Stérilisation par la chaleur sèche : (oxydation des protéines microbiennes)

a-1/ Le flambage : est basé sur l'emploi de **la flamme** du **bec bunsen**, utilisé pour la stérilisation de l'air de la zone du travail et ainsi pour la **stérilisation extemporanée** (pour utilisation immédiate) du matériel exemple : le fil de platine d'une anse, col des tubes et des flacons, extérieur des pipettes Pasteur.

a-2/ Le four Pasteur : **L'air est chauffé** à des températures contrôlable pendant un temps variable suivant le volume du matériel à stériliser : de **140° à 210° pendant 30 à 180** minutes. La matière organique est détruite à cette température. Il peut être utilisé sur le **matériel métallique**, **la porcelaine** (filtres, mortiers, ...), **la verrerie** sauf verreries de précision qui peuvent subir des déformations entraînées par la dilatation. En revanche, il est inutilisable sur le caoutchouc, les matières plastiques, milieux de culture et tous les liquides.

La verrerie à stériliser doit être **propre** et parfaitement **sèche**, éventuellement **bouchée** avec du coton et **emballée** dans du papier solide. Le matériel ainsi **stérilisé** sera laissé dans le four jusqu'à son refroidissement complet, puis **stocké à l'abri de la poussière**.

b- Stérilisation par la chaleur humide : (dénaturation des protéines microbiennes)

L'action conjuguée de l'eau et de la température amène la dénaturation des protéines des microorganismes et par conséquent la coagulation de ces protéines ; ce qui entraîne, pour eux, l'impossibilité de se reproduire et la mort.

b-1/ Autoclavage : (la plus employée et la plus efficace)

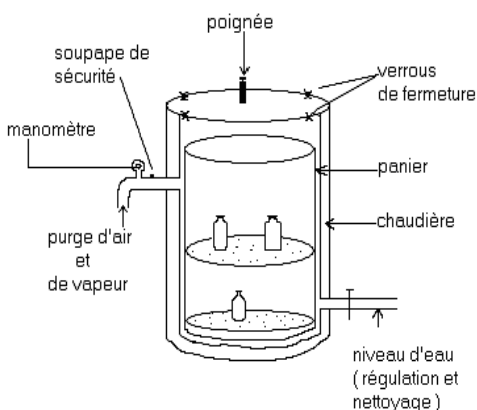
C'est une technique appliquée dans l'**Autoclave** qu'est une chaudière fonctionnant en vase clos dont le principe de fonctionnement est le suivant : L'eau bout à 100° C sous une pression atmosphérique normale (760 Hg ou 1006 millibars), Si la pression augmente, la température d'ébullition s'élève aussi.

C'est une technique de stérilisation dans **une atmosphère de vapeur d'eau exempte d'air**, dans tel cas, tous les germes y compris les spores sont tués en **15-20 min à 115-121°C, 1.5 – 2 atm**

Il est utilisé pour stériliser les **milieux de culture neufs non thermolabiles**, **tous les liquides**, matériel en **plastique et en caoutchouc**.

Le matériel à stériliser est déposé dans le panier métallique dont on doit vérifier le niveau d'eau avant chaque opération de stérilisation. Les récipients sont préalablement bouchés avec du coton et recouverts de papier d'aluminium ou de papier d'emballage résistant.

Les **flacons et les tubes** ne doivent **pas être complètement remplis** et **pas fortement serrés**.



L'AUTOCLAVE

- Couvercle maintenu par des boulons à oreille.
- Panier contenant les objets à stériliser.
- Manomètre.
- Soupapes : une pour la purge et une pour la sécurité (surpression)
- Dispositif de chauffage : électricité ou gaz.

b-2 / Pasteurisation : (ce n'est pas une stérilisation, les spores ne sont pas tuées)

Elle peut se faire en bouteilles ou en vrac dans des **bains marie**.

Elle est toujours **suivie d'un refroidissement rapide**.

Le produit est soumis à une aspersion d'eau de plus en plus chaude, jusqu'à 65-75°C et séjourne à cette température pendant 20 à 30min, puis il est refroidit par de l'eau de plus en plus froide. On distingue la **pasteurisation basse** (chauffage à 65°C pendant 30 min) et la **pasteurisation haute** (chauffage à 85-90°C pendant 20 à 30 secondes). Cette méthode est utilisée **pour les aliments liquides** (lait) ou les boissons (jus, cidre).

b-3/ Tyndallisation : (stérilisation à usage très limité)

Elle consiste en **chauffage discontinu** dans le **bain marie** à une température relativement basse (60 ou 70°C suivant le cas) suivis de refroidissements. Au cours de ce traitement, les **bactéries perdent leur aptitude à sporuler**.

Actuellement, le procédé est réalisé en une série de **3 chauffages de 1h à 70-80°C, séparées par un intervalle de 24h à température ambiante**, ce qui permet la germination et la destruction des spores, sans l'emploi de température excessive. Cette méthode est utilisée pour les milieux fragiles contenant des **substances thermolabiles** et de **forte viscosité** qui ne peuvent être stérilisées par filtration, comme le sérum, œuf...

c- Stérilisation par la filtration

Elle consiste à faire passer un liquide à travers une substance poreuse qui retient les éléments solides et les bactéries en suspension contenus dans ce liquide. Cette méthode est utilisée pour les **milieux thermolabiles** et de **viscosité faible** (vitamines, certains médicaments). On utilise alors, selon le cas, les **bougies de porcelaine** (type Chamberland), les **filtres de verre** poreux (verre fritté N°5 arrête de nombreuses bactéries) ou les **membranes filtrantes** à usage unique, de type Millipore ou Sertorius.

La filtration n'est **stérilisante** qu'avec des **filtres** dont la porosité est **inférieure à 0,2 µm**.

Les **virus** où leur taille est **< 0,1 µm** ne sont **pas retenus par les filtres**.

d- Stérilisation par les radiations

Les radiations peuvent être : ionisantes (**radio activité**) ou non-ionisantes (**rayons UV**).

d-1/ Radiations ionisantes (rayons X,...) : leur longueur d'ondes est ≤ 10 nm, utilisables seulement en condition spéciales puisque elles sont **trop dangereuses**. Elles peuvent servir pour la stérilisation, des **boîtes de Pétri en plastique**, médicaments non autoclavables et non filtrables, exp : vaccins et antibiotiques...

d-2/ Radiations non ionisantes (Ultra-Violet) : leur longueur d'ondes est située entre celle des rayons X et celle de la lumière visible ; c'est-à-dire entre 15 et 385 nanomètres.

On utilise généralement un rayonnement entre **200 et 280 nm** (activité maximum : 280nm) 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**, le rayonnement n'agit que de façon directe et **sa pénétration dans le produit ou le matériel à stériliser est faible**.

2) La désinfection

C'est l'élimination des formes végétatives des microorganismes sans ou peu d'effets sur les spores bactériennes. Pour ce faire, des **produits chimiques** sont utilisés, généralement pour la désinfection des salles et plans de travail et pour la destruction des germes portés par des instruments souillés.

Elle s'effectue grâce aux **antiseptiques = toxicité modérée (utilisés sur les **tissus vivants** ; exp: alcool à 70°, solutions iodées, eau oxygénée, eau iosinée, lotions,...) ;

Et aux **désinfectants = toxicité élevée (utilisés sur les **substances inertes** ; exemple: dérivés chlorés (eau de Javel), dérivés phénoliques (crésyl), Formol,...). Selon l'état physique, il existe :

☞ Les désinfectants liquides :

- **L'éthanol** : pour la désinfection des paillasse et des instruments.
- **L'hypochlorite de sodium (eau de Javel)** : utilisé dilué au $\frac{1}{4}$ dans les bacs destinés à recevoir les lames utilisées, ou en pissette pour la désinfection des paillasse et des sols.
- **Les savons et les détergents.**

☞ Les désinfectants gazeux :

- **Formol**: la vapeur d'une solution chauffée de formol est utilisée pour désinfecter les pièces et **les étuves**. L'ammoniac aussi peut être utilisé en combinaison pour diminuer la toxicité des vapeurs.
- **L'oxyde d'éthylène** : en industrie, il est utilisé pour la désinfection de certains **matériaux en plastique à usage unique**, exp : seringues, emballage,...