

**Une démonstration du TP est disponible sur les liens suivants:**

Partie 1 : <https://youtu.be/G6UVqmpH9rY>

Partie 2 : <https://youtu.be/CTLoeIxqgHg>

Partie 3 : [https://youtu.be/\\_66wP\\_MLynA](https://youtu.be/_66wP_MLynA)

**INATAA/Université Frères Mentouri, Constantine 1**

**Travaux pratiques de microbiologie générale**

**1<sup>ère</sup> année Licence Sciences Alimentaires**

## **TP1 : Présentation du laboratoire de microbiologie et stérilisation**

### **I. Présentation du laboratoire de microbiologie**

#### **Objectifs :**

Se familiariser avec un laboratoire de microbiologie, son équipement et son fonctionnement

#### **1. Visite des locaux :**

- Structure
- Présentation du matériel (étuves, autoclave, ...)

#### **2. Présentation d'un poste de travail :**

- Matériel (bec bunsen, pipettes, verres, béchers anse, pinces lame,...),
- Produits (eau, alcool, colorants divers,...)

#### **3. Les consignes de sécurité :**

- Procéder à un lavage minutieux des mains, avec brossage des ongles avant et après les manipulations, et avant toute sortie même momentanée de la salle de TP.
- Éviter les ouvertures des fenêtres pendant les manipulations
- Ouvrir avec précaution les récipients contenant des cultures microbiennes, afin d'éviter toute projection.
- Flamber, avant et après manipulations, 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.
- Prévenir immédiatement le responsable de TP en cas de bris d'un récipient contenant une culture en cas de contamination accidentelle d'un manipulateur ou tout incident dispersant le matériel microbien.
- Interdiction formelle de boire, manger et fumer pendant les TP
- Stériliser tout le matériel septique à la fin de la manipulation

-Prendre toutes dispositions indispensables pour la mise à l'abri des souches microbiennes ainsi que leur destruction afin d'éviter toute contamination.

#### **4. Le microscope :**

Le microscope est composé de 4 parties comprenant les systèmes suivants :

- Système de support
- Système de grossissement
- Système d'éclairage
- Système de réglage

**a. Système de support :** Comprend : le pied, la potence et le chariot

**b. Système de grossissement :** Constitué de l'assemblage de 2 lentilles : les oculaires et les objectifs. L'objectif 10 grossit 10 fois, l'objectif 40 grossit 40 fois... Le numéro à côté du grossissement indique le numéro d'ouverture numérique, plus ce chiffre est grand plus grand est le pouvoir séparateur.

Le pouvoir séparateur permet de voir séparément et distinctement deux points très rapprochés, plus le pouvoir séparateur de l'objectif est grand plus l'image est nette. Le pouvoir séparateur d'un bon microscope est d'environ  $0,25 \mu\text{m}$ , alors que celui de l'œil humain est de  $0,25 \text{ mm}$ .

**Remarque 1:** l'huile à immersion augmente le pouvoir séparateur en empêchant les pertes de lumière dues à la diffraction que l'on constate avec les objectifs à sec.

**c. Système d'éclairage :** Source lumineuse, miroir, condensateur et diaphragme.

**d. Système de réglage :** il comprend :

- La vis de mise au point rapide : c'est la vis la plus grande, on l'utilise en premier pour un réglage approximatif.
- La vis micrométrique (mise au point fine) avec un mouvement beaucoup plus lent, on obtient une image nette.
- La vis du chariot - La vis de montée descente du condensateur - La barrette du diaphragme.

**Remarques 2:** Après chaque utilisation des objectifs à immersion, il est indispensable de les essuyer avec du papier Josef imprégné de xylène. Eviter de mettre de l'huile dans les parties mécaniques du microscope. Protéger les lentilles de la poussière en remettant la housse sur le microscope.

## II.

## La stérilisation

La stérilisation est l'opération qui consiste à éliminer les micro-organismes d'un objet, et ce de manière durable. En microbiologie, le but de la stérilisation est d'une part de maîtriser les micro-organismes introduits dans le milieu d'étude, et d'autre part d'éviter la contamination du milieu extérieur et des personnes. Il existe deux grands moyens de Stérilisation :

1. La chaleur
2. La filtration

### I. La stérilisation par la chaleur

La chaleur détruit les bactéries et les spores. On distingue les procédés à chaleur « sèche » ou « humide ».

#### 1. Chaleur sèche :

a. **Flambage** : Le passage dans la flamme (bec BUNSEN) de la surface de matériel non inflammable assure une parfaite stérilisation. On stérilise de cette façon les fils de platine et les pipettes Pasteur.

b. **Four pasteur** : C'est un four-étuve à air chaud et sec. Il est utilisé à 180°C pendant 30 minutes. Cet appareil n'est utilisé que pour la stérilisation de la verrerie préalablement nettoyée et séchée ou de matériels métalliques (instruments de dissection) pouvant tolérer de très hautes températures.

Le matériel ainsi stérilisé sera laissé dans l'étuve jusqu'à son refroidissement complet, puis stocké à l'abri des poussières

#### 2. Chaleur humide

La stérilisation par la chaleur humide, reconnaît trois modalités

- La stérilisation à l'autoclave
- La Pasteurisation,
- La Tyndallisation

a. **Autoclave** : c'est un appareil indispensable dans un laboratoire de microbiologie. Le chauffage a lieu sous pression de vapeur d'eau, à une température de 120°C pendant une durée qui varie en fonction du milieu, de la température utilisée et du volume des récipients. Ce procédé tue toutes les cellules végétatives et les endospores.

b. **Pasteurisation** : la pasteurisation est un traitement à chaud de liquides, tuant des pathogènes mais pas forcément toutes les bactéries. Les températures de la pasteurisation se situent entre 75 à 80°C.

c. **Tyndallisation** : La tyndallisation est une série de 3 chauffages brefs à des températures de 70°C à intervalles réguliers, ceci afin de laisser aux

formes résistantes la possibilité de germer pour les tuer au chauffage suivant.

## **II. La filtration**

La filtration est une technique qui consiste à faire passer un liquide à travers un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,2  $\mu\text{m}$ . Les micro-organismes sont trop gros et sont donc retenus par le filtre.

Cette technique est intéressante lors d'utilisation de produits thermolabiles comme certains acides aminés aromatiques, vitamines, hormones de croissance, acides nucléiques et une bonne partie des antibiotiques.

## **III. Autres procédés de stérilisation**

Certaines matières (Plastique, Caoutchouc ...) ne tolèrent pas l'autoclave ou se détériorent rapidement après des expositions répétées à la chaleur.

### **1. Radiations :**

La stérilisation par les U.V. est utilisée au laboratoire pour la décontamination de l'air et des paillasse situées sous la hotte de protection. Le rayonnement n'agit que de façon directe et sa pénétration est faible. D'autres radiations (rayons X), peuvent servir pour la stérilisation industrielle des boîtes de Pétri en matière plastique et de produits pharmaceutiques.

### **2. Agents chimiques :**

Ils sont utilisés en général pour la désinfection des salles de travail et pour la destruction des germes portés par des instruments souillés. Ce mode de stérilisation doit être systématiquement pratiqué dans le laboratoire pour les lames et pour la verrerie qui ne passe pas en autoclave.