

**Module : Microbiologie de l'environnement****TP N° 02 : Microbiologie de l'air****Introduction**

De toutes les espèces d'êtres vivants, les microorganismes sont, sans doute, les plus abondants ; on les retrouve partout, dans l'air, l'eau, le sol, et sur toutes les surfaces.

Ainsi les institutions d'enseignement et tous les lieux publics caractérisés par un va-et-vient incessant sont des endroits où l'on peut isoler une grande quantité de microorganismes.

L'étudiant en microbiologie devra être particulièrement conscient de l'existence de ces microorganismes et ses travaux lui demanderont des techniques spéciales dont le but sera toujours de prévenir la contamination de l'environnement.

**But**

- Prendre conscience que les microorganismes existent bien autour de soi.
- S'initier à la diversité de formes que peuvent offrir les colonies bactériennes.

**Technique****1- Il s'agit dans un premier temps d'identifier les boîtes, par exemple :**

Boîte N° 01 : **Air**

Boîte N° 02 : **Cheveux**

Boîte N° 03 : **Eternuement**

Boîte N° 04 : **Doigt**

Boîte N° 05 : **Paillasse**

Boîte N° 06 : **Murs ou planchers**

Boîte N° 07 : **Hotte à flux laminaire.**

**2- Prélèvement et contamination des boîtes :**

**Boîte N° 01** : Soulever le couvercle complètement et exposer la gélose à l'air pendant environ 30 min.

**Boîte N° 02** : Enlever le couvercle de la boîte, placer la tête juste au-dessus et secouer vigoureusement la chevelure à l'aide des doigts. Si les cheveux sont longs, il est possible de passer sur la surface de la gélose une mèche de cheveu ou de couper de 01cm une mèche de cheveu dans la boîte. Renfermer aussitôt le couvercle.

**Boîte N° 03** : Ouvrir la boîte et la placer devant la bouche ; tousser ou Eternuer violemment en direction de la boîte. Refermer la boîte de Pétri.

**Boîte N° 04** : Avec un doigt toucher la surface de la gélose.

**Boite N° 05** : En utilisant un morceau de Scotch, l'appliquer sur une petite aire de la paillasse. Procéder ensuite à la contamination de la gélose.

**Boite N° 06** : De la même manière que précédemment mais sur un mur du laboratoire.

**Boite N° 07** : Placer une boîte de Pétri ouverte sous la hotte à flux laminaire en arrêt.

Placer toutes les boîtes contaminées, bien numérotées et bien identifiées dans l'étuve à température appropriée et au temps voulu.

### **Lecture**

Examen des boîtes. Evaluer le nombre de colonies sur chacune d'elles. Décrire en termes généraux l'apparence des colonies isolées.

### **Microorganismes recherchés et milieux de culture utilisés**

#### **1- Milieux pour la recherche des moisissures et levures**

Les milieux les plus utilisés sont :

- Milieu pomme de terre glucosée gélosée (PDA).
- Milieu Malt gélose (MA).
- Milieu gélose glucosée de Sabouraud.
- Milieu gélosé glucosé à l'oxytétracycline (OGA).

#### **2- Milieux pour la recherche de bactéries**

##### **2.1. Recherche des Entérobactéries**

- Les milieux les plus communément utilisés :

- **Gélose glucosée au cristal violet et au rouge neutre (VRBG)** : Après 24h d'incubation à 37°C, le comptage des colonies rouges (au moins 0.5 mm de diamètre) donne le nombre de colonies.
- **Gélose lactosée au Pourpre de bromocrésol (BCP)** : Ce milieu permet l'isolement et l'identification des entérobactéries Gram négatif, les autres germes étant inhibés par les colorants. Sur ce milieu les colonies de *Salmonella* et de *Shigella* apparaissent incolores ou légèrement teintées et transparentes ; celles de *E. coli* sont bleu foncé et présentent un reflet métallique lorsqu'on les examine en lumière réfléchie. Les autres coliformes donnent des grosses colonies convexes muqueuses et brunettes. Les germes Gram + sont fortement inhibés.
- **Gélose d'Endo** : Ce milieu est utilisé pour l'isolement des coliformes et autres entérobactéries. Les germes Gram + sont inhibés par le sulfite de Na et par la fuschine basique. Les colonies Lactose + sont roses. Les colonies des autres entérobactéries (compréhant *Salmonella*, *Shigella*) sont incolores.
- **Gélose au Désoxycholate (DCL)** : Ce milieu est utilisé pour la numération et l'isolement des coliformes. Le desoxycholate et citrate de Na inhibent la croissance des germes Gram +. Les colonies des coliformes sont rose-rouge brillant et généralement de forme lenticulaire.

- **Milieu de Mac Conkey** : Les colonies Lactose -, sur ce milieu, sont incolores ; les colonies Lactose + apparaissent rouge brique entourées d'un halo opaque de sels biliaires précipités.

## 2.2. Recherche des Staphylocoques

**Les milieux d'isolement utilisés :**

- **En bactériologie médicale : Gélose hypersalée au mannitol (Chapman)**
- **En bactériologie alimentaire : Milieu de Baird Parker**

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement des staphylocoques pathogènes. Sa teneur élevée en chlorure de Na permet une inhibition sélective des autres germes. La fermentation du mannitol est mise en évidence par le virage de l'indicateur (le rouge de phénol). Les colonies de St. non pathogènes apparaissent petites et entourées d'une zone rouge ou pourpre. Les colonies de pathogènes sont entourées d'une zone jaune.

## Annexes

**Milieu de culture :** Gélose au Sabouraud et Gélosé OGA (Levures et Moisissures).  
Gélose au (BCP) (Entérobactéries et colifomes)  
Gélose d'Endo (idem)  
Gélose Mac Conkey (idem)  
Gélose au VRBG (idem)  
Gélose Chapman (Staphylocoques)