

TP0 : Présentation de 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

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

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.

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 µm. 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.

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.

TP1. Observation à l'état frais

- **Objectif :** cet examen permet de mettre en évidence de la mobilité ou la stabilité des bactéries.

- **Matériel utilisé**

- | | |
|-------------------|--|
| -Anse de platine | -Cristallisoir contenant un désinfectant |
| -Pipettes Pasteur | -Eau physiologique stérile |
| - Lames | - Bouillon nutritif contenant une souche bactérienne (<i>Escherichia coli</i>) |
| -Lamelles | - Levure de boulangerie (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) |
| -Bec Bunsen | |

- **Mode opératoire**

Examen de bactérie

- Prélever une goutte du bouillon nutritif et la déposer entre lame et lamelle
- Observer au microscope optique à l'objectif 40x.

Examen de levure

- Prélever une quantité de la levure et la mélanger avec un peu de l'eau physiologique afin d'obtenir une suspension légère ;
- Prélever une goutte de la suspension et la déposer entre lame et lamelle ;
- Observer à l'objectif 40x.

TP N°2 : Observation microscopique des microorganismes après coloration

1. Observation après coloration simple (bleu de méthylène)

▪ Objectif

Cette coloration permet de distinguer la forme et le mode de regroupement des bactéries et des microbes d'une façon générale.

▪ Matériel

utilisé

-Anse de platine	-Bouillon nutritif contenant une bactérie pure
-Pipettes Pasteur	
- Lames	-Pot de yaourt contenant des bactéries lactiques
-Pince	- Bleu de méthylène

▪ Mode opératoire

✓ Préparation de frottis

-Prélever une goutte de la suspension bactérienne et la déposer sur une lame, faire étaler cette goutte sur lame en effectuant des tours circulaires ;

-Prélever une colonie et l'émulsionner dans une goutte d'eau distillée stérile déposée sur une lame.

✓ Fixation de frottis

-Laisser sécher le frottis à une température ambiante ;

-Fixer le frottis en le passant 3 à 4 fois sur la flamme du bec Bunsen ;

-Laisser refroidir.

✓ Coloration

1. Recouvrir le frottis à l'aide du colorant jusqu'à ce que toute la lame soit couverte ;

2. Laisser agir pendant une minute ;

3. Rincer abondamment à l'eau du robinet jusqu'à élimination des colorants en excès ;

4. Déposer au centre du frottis coloré une goutte d'huile à immersion ;

5. Examiner au microscope, objectif à immersion (100 ×).

2. Observation après coloration complexe (coloration de Gram)

▪ Objectif

La coloration de **Gram** est la coloration microbiologique différentielle la plus couramment utilisée. Cette coloration est la base de la taxonomie bactérienne qui permet de diviser les bactéries selon la composition de leurs parois en deux groupes : Gram (+) et Gram (-).

▪ Matériel utilisé et réactifs

-Pipette Pasteur	-Violet de Gentiane phénique
- Lames	-Lugol (iodo-iodure potassium)
-Anse de platine	-Alcool (éthanol)
-Papier buvard (ou absorbant)	-Fuchsine phénique (Safranine)
-Eau physiologique	-Des souches bactériennes pures :
-Cristalliseur contenant un désinfectant	<i>E.coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Lactobacillus</i> sp.

▪ Modes opératoire

1-Préparation d'un frottis

2-Fixation du frottis

3-Coloration :

- Recouvrir le frottis d'une solution de violet de Gentiane (VG) ; laisser un contact pendant 1min, puis jeter l'excès du colorant (coloration) ;
- Recouvrir de Lugol (L) ; laisser en contact pendant 1min(Mordançage) ;
- Décolorer à l'éthanol absolu, goutte à goutte, en inclinant la lame jusqu'à ce que devienne clair;
- Rincer avec un jet de pissette -contenant eau- rapidement ;
- Recouvrir la lame de la solution de Fuchsine, laisser agir 20-30S (Recoloration) ;

- Rincer à l'eau ;
- Sécher délicatement entre deux feuille de papier absorbant ;
- Observer à l'objectif 100x (avec huile à immersion).
- Dessiner et préciser la forme, la couleur et le Gram.

▪ **Bactéries à observer**

- Des bactéries Gram +(*Staphylocoque aureus*, *Bacillus subtilis*,...)
- Des bactéries Gram – (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,...)

P N° 3 :l'isolement des microorganismes

1. Objectif

Isolement des bactéries consiste à les séparer de l'environnement où elles se développent, cet isolement n'est effectif réalisable qu'en utilisant des milieux de culture appropriés. Le résultat de cet isolement est de mettre en évidence la culture en colonies sur milieu solide ou en trouble sur milieu liquide.

2.	Matériel	utilisé
-Boîte de Pétri		-Pipeteur
- Eau distillée stérile		- Milieu Gélose nutritive
- Spatule		- Milieu SFB
- Flacons stériles		- Milieu Sabouraud
-Pipette Pasteur		

3. Isolement des microorganismes

3.1. A partir de sol

- Préparer une solution de sol de concentration connue (en mélanger un peu de sol avec un volume de l'eau distillée stérile) ;
- Agiter bien pour permettre la dissolution des bactéries dans la solution ;
- Laisser le flacon en repos pendant 10-20 min pour faire sédimenter le sol, alors que les bactéries restent en suspension dans le surnageant ;
- De cette préparation, prélever 1 ml et le déposer dans chacune des deux boîtes de Pétri ;
- Couler dans une boîte de gélose nutritive refroidie à 50°C et dans l'autre la gélose de Sabouraud ;
- Incuber à 37°C/ 24h.

3.2. A partir de l'eau

- Flamber le robinet ;
- Ouvrir le robinet et laisser l'eau écouler ;

- Prélever un volume d'eau dans un flacon stérile ;
- A partir de ce flacon, prélever 1ml et le déposer dans une boîte de Pétri ;
- Couler la gélose nutritive refroidir à 50 °C ;
- Mélanger par des mouvements circulaires dans les deux sens pour assurer une dispersion homogène de l'eau avec le milieu de culture ;
- Incuber à 37°C pendant 24-48h.

3.3. A partir de l'air

- Faire fondre la gélose nutritive ;
- Couler aseptiquement le milieu de culture dans une boîte de Pétri ;
- Laisser la boîte ouverte loin du bec Bunsen (15min) ;
- Incuber à 37 pendant 24h ;

3.4. A partir d'organe

- Cautériser la surface de l'organe (foie de poulet) à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ;
- Prélever en profondeur un fragment d'organe par aspiration à l'aide d'un pipeteur ;
- Transférer le prélèvement dans milieu liquide adapté à la recherche (SFB) ;
- Incuber à 37°C /24h.

TP N°4 : les techniques d'ensemencement

1. Objectif

Dans leur environnement naturel, les microorganismes coexistent en populations mélangées et complexes de plusieurs espèces. Il donc d'isoler séparément ou individuellement des espèces.

2. Matériel utilisé

- | | |
|--------------------|------------------------------------|
| -Boite de Pétri | - Tube contenant un milieu incliné |
| -Anse de platine | - Tube contenant un milieu normal |
| - Pipette Pasteur | -Micropipette |
| - Gélose nutritive | -Embouts |

3. Mode opératoire

3.1. L'ensemencement sur milieu solide

▪ ensemencement sur boite de Pétri

✓ Ensemencement par des stries

-Un échantillon de bactéries peut être prélevé en effleurant une colonie ou en trempant l'anse dans un milieu liquide ;

-La séparation est ensuite réalisée par épuisement en stries du contenu de la boucle sur la surface solide d'une gélose ;

-L'épuisement peut effectuer selon différentes techniques.

✓ Ensemencement par étalement (à l'aide d'un râteau)

-Déposer un faible volume de suspension (ordre de 0.1 ml) sur surface d'un milieu gélifié en boite de Pétri ;

-Etaler d'une façon homogène sur la surface à l'aide d'un étaloir (râteau).

✓ Ensemencement en masse (ou en double couche)

-Prélever un volume de l'échantillon ;

- Le déposer dans une boite Pétri ;

- Couler un milieu solide fondu (45°C-48°C) ;

- Homogénéiser par des tours circulaires ;
- Laisser la boîte jusqu' à la solidification.

✓ **Ensemencement par inondation**

- Déposer un faible volume de suspension (ordre de 0.1 ml) sur surface d'un milieu gélosé en boîte de Pétri ;
- Etaler d'une façon homogène sur la surface par des mouvements circulaires ;
- Incliner la boîte et jeter l'excès d'un désinfectant.

▪ **Dans un tube**

✓ **Ensemencement par des stries sur milieu incliné**

- Prélever un inoculum à partir un milieu gélosé ou liquide ;
- Le déposer sur la pente de gélose à 1 cm de son point le plus déclive afin d'éviter l'eau de condensation ;
- Essuie soigneusement le fil de platine depuis la partie la plus basse jusqu'à la partie plus élevée en réalisant des stries serrés allant d'un bord à l'autre du tube à essai ;
- Afin de ne pas érailler le milieu de culture, on teint l'outil à l'ensemencement tangent à la gélose.

✓ **Ensemencement par pique centrale**

- Flamber le fil et le bran de l'anse platine / ou de pipette pasteur ;
- Prélever un échantillon d'une bactérie à l'aide d'une anse de platine ;
- Renverse le tube introduit le fil de platine ou la boucle chargé d'inoculum, verticalement au milieu ou bien auteur de masse.

3.2. L'ensemencement dans un milieu liquide

- Flamber l'anse de platine ;
- Prélever un échantillon des bactéries ;
- Plonger l'anse chargée de bactéries dans le milieu à ensemenecer.

TP N° 5 : l'antibiogramme

1. Objectif

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité ou la résistance d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus.

2. Matériel utilisé

- Gélose de Mueller Hinton
- Disques des antibiotiques
- Boîte de Pétri
- Pince
- Pipeteur
- Pipette Pasteur
- Eau physiologique
- Règle
- Vortex
- Anse de platine

3. Mode opératoire

- Prélever une colonie bactérienne à l'aide d'une anse de platine ;
- Emulsionner cette colonie dans tube contenant 2 ml eau physiologique et agiter en Vortex afin de préparer l'inoculum ;
- Couler le milieu Mueller Hinton ;
- La boîte est d'abord séchée à l'étuve 37°C ;
- Ensemencer à partir la suspension bactérienne en appliquant l'inondation ou l'écouvillonnage ;
- Déposer les disques des antibiotiques soit à l'aide de pince stérile, appuyer sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu ;
- Respecter une distance de 3cm entre deux disques ;
- Déposer au maximum 6 disques sur la boîte ;
- Incuber les boîtes à 37°C/24h-48h.
- Après l'incubation, mesurer et noter le diamètre d'inhibition autour de chaque antibiotique en mm.
- Les résultats seront interprétés en fonction des diamètres critiques figurant dans la table.