**TP N°1**

**RÈGLES À SUIVRE AU LABORATOIRE DE**

**MICROBIOLOGIE**

**I - BUT DES TP DE MICROBIOLOGIE**

a- Se familiariser avec le monde microbien,

b- Acquérir les techniques utilisées.

**II - DEFINITION**

a)- Microbiologie « Micro » - petit « Bio » - vie « logie » - science, c’est la science qui étudie les êtres vivants microscopiques.

b)- Germes : Microorganismes

c)- Colonie : ensemble le microorganisme issu de la multiplication d’un seul germe.

d)- Souche : ensemble de germes ayant la même origine et définie par une caractéristique qui leur est propre

Exemple: alors que de nombreuses souches d’*Escherichia* ne sont pas pathogènes,

Certaines sont réputées pour des cause des infections (urinaire notamment).

e)- Milieu de culture : C’est un ensemble de composés nutritifs, dissout dans l’eau qui permettent le développement des germes. Exemple : le pain, les fruits, les légumes constituent des milieux de culture pour certaines moisissures.

f)- Ensemencement : C’est la mise en développement des germes. En déposant sur un milieu de culture.

g)- Repiquage : C’est le prélèvement et la transposition d’un groupe microbien d’un milieu de culture dans un autre.

h)- Stérilisation : C’est l’opération qui consiste à détruire des germes on parle également de désinfection, d’aseptisation.

**III - Le matériel utilisé en micro biologie**

Il répond aux exigences suivantes

1- Travailler dans une atmosphère stérile.

2 - Manipuler les germes avec des instruments appropriés.

3 - Fournir aux germes à étudier des conditions contrôlées de croissance (milieux de culture, incubation etc... adéquats).

Ce matériel comprend :

A - Place de travail :

a) - La paillasse : Son revêtement en carreaux de faïences lui confère une bonne

Résistance au feu. Elle est facilement nettoyable par des agents désinfectants tels que l’eau de javel, l’alcool.

b) - Le bec bunsen: Sa flamme bleue procure une zone circulaire stérile de 15 à 20

cm de diamètre dans laquelle toutes les manipulations doivent s’effectuer.

B - Les instruments d’ensemencement

L’ensemencement peut se faire à l’aide de :

a - pipette pasteur

b - pipette graduée a usage unique

Ces deux types de pipettes permettent d’ensemencer sur un quelconque milieu des germes en suspension dans une solution, Alors que la première est stérilisable par 2 autoclavage donc réutilisable, la seconde en plastique n’est utilisée qu’une seule fois puis jeté. Elle a cependant l’avantage d’être graduée et permet de prélever un volume bien déterminé de suspension de germe.

c - Anse à ensemencer:

Appelée aussi « manche pasteur, elle est usage simple car elle se stérilise par simple flambage au bec bensun avant et après chaque prélèvement de germes .Elle est constituée d’une manche en acier inoxydable surmonté d’un fil en platine ou en nickel chrome avec lequel prélève des fragments de sur milieu de culture solide.

C- La verrerie :

Les milieux de culture peuvent être contenues dans des Erlenmeyers, des flacons a sérums, des boites de pétrie, des tubes à essais .Ces derniers sont très utilisées pour les testes biochimiques de même que les pipettes graduées en verre.

D- Le microscope

Les microscopes et plus particulièrement les bactéries dont la taille est de l’ordre du micron ne peuvent être observés que si l’on utilise un très fort grossissement. Celui-ci est assuré par l’objectif 100° ou objectif à immersion .Pour ce type d’observation il faut :

- faire la mise au point avec les objectifs 10, 25,40 puis 63

- déposer une goutte d’huile à immersion la lamelle

- Après observation, nettoyer l’objectif 100 à de papier joseph imprégné d’alcool.

Le gros équipement

a - L’autoclave

C’est une grosse « cocotte minute » étanche dans la quelle un fond d’eau est porté à ébullition puis soumis à une température de 121° C. Cette dernière maintenue pendant 20 mn permet une stérilisation parfaite du verrier et des milieux de culture.

Pourquoi faut-il une température supérieure à 100°C on sait que certaines spores résistent à des températures inferieurs.

b - Le four à air chaud :

Appelé aussi « Four pasteur », il permet de stériliser entre autre les boites de pétri que l’on maintient en général à 180° C pendant l’heure.

c - Etuves ou incubateurs :

Ce sont des caissons dans lesquelles il est possible de régler finement la température pour mettre à incuber, les cultures de germes à des températures bien précises.

d - Bain-marie

Il permet de maintenir en surfusion les milieux solides

**Règles d’hygiène et de sécurité à respecter en TP de microbiologie**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Avant les TP** | **Consignes** | **Justification** |
| - Passer aux vestiaires (aménagés hors du laboratoire) où vêtements de Ville et de travail sont séparés. | Eviter la contamination microbienne |
| - Mettre une blouse en coton | Lavable à 90°C, javellisable, ininflammable, éviter les accidents avec les acides et les bases |
| La boutonner.  Les manches doivent être longues pour protéger les avant-bras reposant sur la paillasse. | Protection efficace y compris des avant-bras |
| - Attacher les cheveux | Danger du Bec Bunsen |
| - Enlever les bijoux | Sensibles aux produits chimiques et vecteurs de contaminations |
| - Fermer les portes et les fenêtres du laboratoire | Courants d’air donc apport de  micro-organismes |
| - Se laver les mains avec un savon désinfectant. Les ongles doivent être courts | Destruction des micro-organismes |
| - Ne pas toucher aux flacons de produits chimiques avant d’avoir été informé des précautions à prendre | Produits parfois dangereux |
| - Procéder à un lavage minutieux des mains, avec brossage des ongles avant les manipulations, et avant toute sortie même momentanée de la salle de TP | Désinfection  Eviter la propagation des microorganismes |
| **Pendant les TP** | - Avoir un plan de travail net et bien organisé | Travail plus sûr et plus facile |
| - Laisser au poste de travail que le matériel nécessaire à la manipulation | Eviter l’encombrement |
| - Eviter les gestes inutiles (disposer le matériel et les cultures de manière à travailler efficacement) | Eviter les accidents de travail |
| - Travail sous hotte microbiologique ou chimique | Risque de microbes pathogènes et des produits toxiques ou volatiles |
| - Travail **assis** bec bunsen allumé (flamme bleue) | Meilleure position de manipulation |
| - 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. |
| - Eviter le contact des produits avec la peau, la bouche, les yeux | Parfois très toxiques |
| - Le pipetage à la bouche est interdit (utiliser les poires d’aspiration ou les propipettes) | Risque d’absorption de micro-organismes ou de produits chimiques |
| - Refermer les flacons de produits après utilisation | Vapeurs parfois toxiques ; risque de renversement |
| - Si des cultures sont renversées, nettoyer rapidement le lieu de l’accident | Désinfection du lieu de l’accident |
| - Après utilisation mettre lames, lamelles et pipettes à tremper dans de l’eau javellisée (1 verre à 12° chlorométriques pour 2l d’eau) | Destructions des micro-organismes |
| - Etiqueter produits et préparations | Pour ne pas les mélanger |
| - Ne pas porter les mains à la bouche | Eviter la contamination microbienne et sa propagation |
| - Ne pas toucher des objets personnels |
| - Ne pas serrer la main des visiteurs |
| - Il est interdit de fumer, de boire et de manger | Idem |
| - Il est interdit de téléphoner et même dans certains cas de parler au personnel du laboratoire lors de manipulations très délicates | Organisation du laboratoire |
| **Après les TP** | - Autoclaver les cultures à détruire avant de les jeter | Parfois microbes pathogènes |
| - Laver le matériel, (désinfecter si cela n’a pas déjà été fait par trempage dans l’eau javellisée) et ranger | Destruction des micro-organismes |
| - Laver le plan de travail puis le pulvériser d’eau javellisée et essuyer au papier absorbant | Idem |
| - Se laver les mains avec produits désinfectant et les essuyer avec une serviette à usage unique | Idem |
| - Laver la blouse (séparément du linge familial) à 90°C et la javelliser | Pour ne pas contaminer le linge familial |
| Repasser à fer fort | Destruction efficace des micro-organismes |

***N.B :*** Tout matériel biologique (bactéries, champignons, levures, sang, liquides,…) doit être considéré comme potentiellement dangereux.