

**OBJECTIFS :**

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

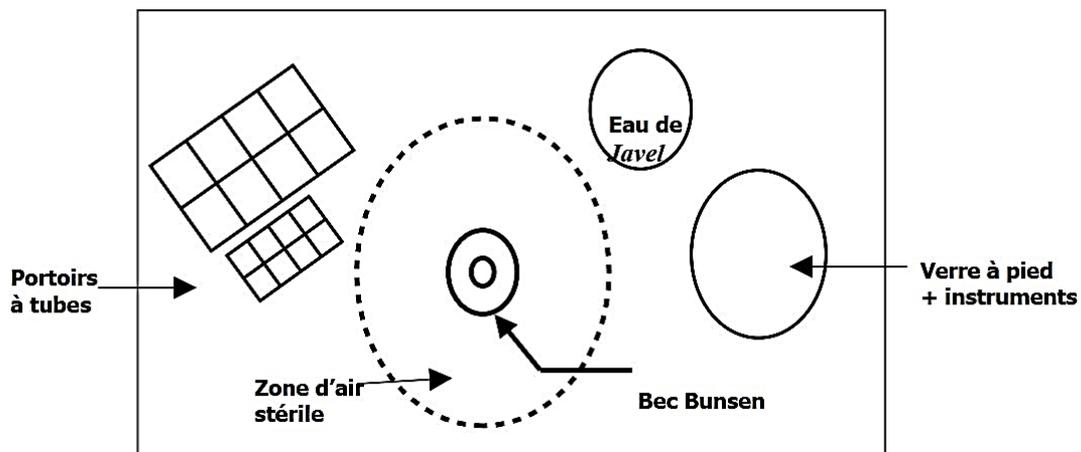
**1. Visite des locaux :**

- Structure
- Présentation des gros matériels (étuves, autoclave, ...)

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

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

Poste de travail



**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 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.

## 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 :

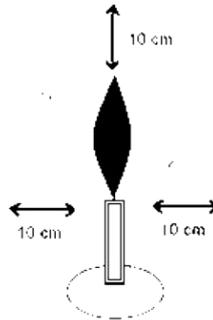
1. La chaleur
2. La filtration

### 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.



Zone de stérilité d'un bec bunsen

**b. Four pasteur :** C'est un four-étuve à air chaud et sec. Il est utilisé à 180°C pendant 90 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.

Par exemple la destruction des pathogènes du lait se fait par un cycle de 63°C pendant 30 minutes suivie de 73°C pendant 15 minutes.

## **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 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.

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

Certaines matières (Plastiques, Caoutchoucs ...) 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 boites de Pétri en matière plastique et de produit 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.