

TP. N° 0. PRECAUTIONS A PRENDRE DURANT LES TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

I. Objectifs :

Ce document a pour but de vous informer sur le fonctionnement des salles de TP et de son matériel afin de travailler dans des conditions de sécurité optimales pour vous et les autres.

II. Recommandations préliminaires :

- Porter une blouse de coton
- Il est interdit de boire, manger et téléphoner dans les salles de TP.
- Il est interdit de demeurer dans les salles de TP en dehors de vos horaires de TP et en l'absence de l'enseignant.
- Se laver les mains avant et après manipulation.

III. Présentation d'un poste de travail (La paillasse de travail) :

Tout travail doit s'effectuer sur une paillasse propre. A votre disposition se trouvent des poubelles, des pissettes (eau distillée, javel pour la décontamination et la désinfection, éthanol, bactéricide et...).

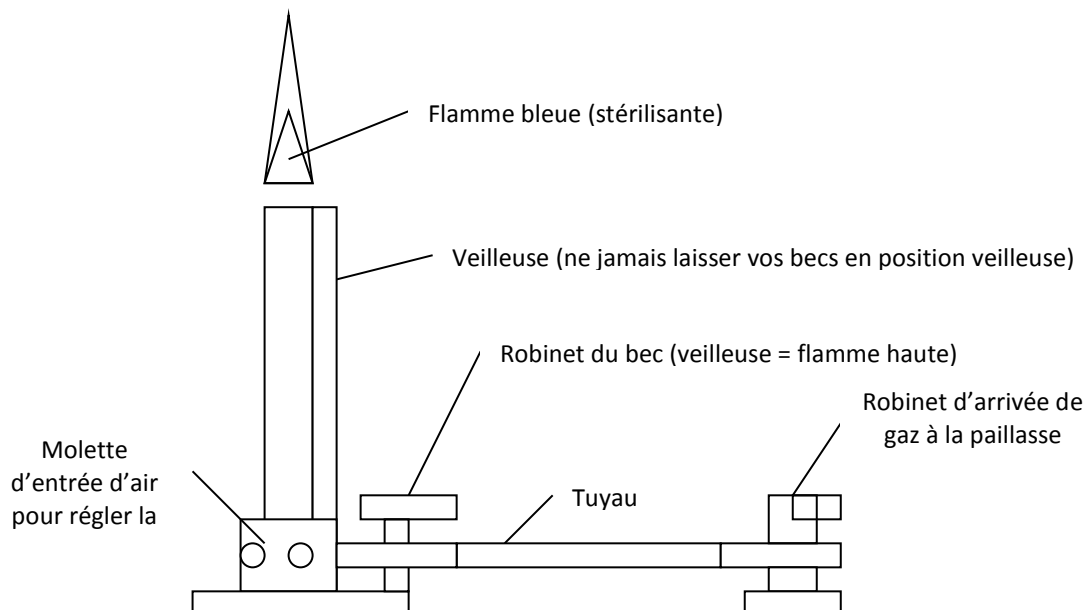
Pour désinfecter la paillasse avant d'allumer le bec Bunsen, mettre de quelques gouttes d'eau de javel sur la surface de la paillasse et l'étaler avec une éponge absorbante (en bout de paillasse) jusqu'à ce que la paillasse soit sèche.

En fin de la séance il est impératif de laisser les paillasses propres c'est-à-dire d'y avoir passé un coup de bactéricide.

On trouve aussi du scotch blanc pour éviter d'écrire sur les flacons en verre, un marqueur, des ciseaux, du parafilm et une boîte d'allumette.

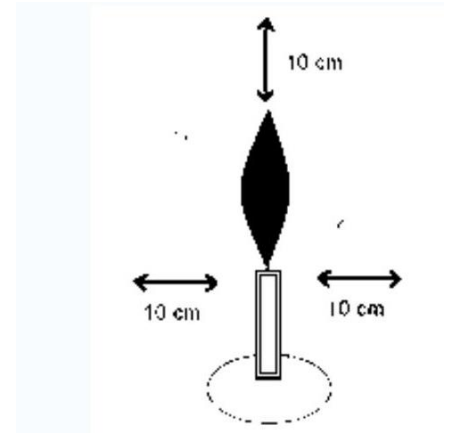
Selon les TPs d'autres matériels s'ajouteront :

1) Bec Bunsen ou Bec Mecker :



- Vérifier que le robinet du bec soit bien fermé et que la molette soit en position fermée.
- Ouvrir le robinet d'arrivée de gaz à la paillasse (jaune)

- Approcher une allumette au sommet du bec et ouvrir dans le même temps le robinet du bec progressivement jusqu'à ce que la flamme s'allume
- Mettre doucement la molette en position ouverte (arrivée d'oxygène par les trous). Dès lors une flamme bleue apparaît au centre de la flamme jaune. C'est le sommet de cette flamme qui permet de stériliser son anse de platine ou oese (instrument servant au prélèvement). On considère que jusqu'à 20 cm de la flamme on se trouve en zone stérile.
- En fin de manipulation, fermer le robinet du bec ainsi que le robinet paillasse.
- **Attention**, attacher les cheveux et ne pas porter des vêtements amples sous peine de risque d'inflammation. Veiller aussi à ne pas laisser la pissette d'alcool et le cristalliseur à proximité du bec.



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.

2) 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.

3) Anse de platine (öse)

Matériel spécifique du bactériologiste constitué d'un manche, d'une tige et d'un fil rigide généralement en platine ou en une autre matière telle plastique soit droit, forme L ou se terminant par une boucle fermée de 2 mm ou plus de diamètre intérieur. Elle sert à différents usages en microbiologie : transférer un peu de liquide, prélever une colonie, étaler une goutte..., comme une pipette Pasteur. Entre chaque usage l'öse doit être stérilisée, généralement par flambage jusqu'à la couleur rouge blanc (incandescence), pour détruire tous les résidus...

4) Bains-marie :

- Les bains-marie sont remplis avec essentiellement de l'eau distillée (robinets à bouchon rose dans la salle) afin d'éviter le dépôt de tartre mais il convient aussi de rajouter environ 10% d'eau du robinet afin de supprimer l'effet corrosif de l'eau distillée.
- La température est réglée par un thermostat. Sur certains appareils il y a aussi une valeur de sécurité qu'il faut penser à régler juste au-dessus de la température désirée.

5) Autoclave :

- L'autoclave est un outil de stérilisation montant à des pressions de un bar et des températures de 120°C. Son utilisation nécessite donc des précautions d'emploi (affichées sur l'autoclave).
- 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.
- Ne jamais ouvrir l'autoclave avant que la pression ne soit redescendue.
- Toujours mettre un autoclave en route en présence d'un enseignant ou d'un technicien.

Lors de l'ouverture de l'autoclave faire attention aux brûlures

6) Microscope :

- Les microscopes des salles de TP sont équipés de trois objectifs : un « X10 » qui permet la recherche générale sur la lame de la zone intéressante, un « X40 » qui sert à l'observation des états frais et permet la mise au point initiale, et un « X100 » utilisé pour l'observation des GRAM avec une goutte d'huile à immersion déposée sur la lame (Ne jamais utiliser d'huile pour les objectifs X10 et X40)
- Les microscopes possèdent aussi un contraste de phase qu'il faut régler sur le grossissement (ou la valeur) correspondant à l'objectif (ou la valeur indiquée sur l'objectif).
- La mise au point se fait à l'aide de deux molettes : la vis macrométrique et la vis micrométrique
- Commencer par mettre en butée l'objectif sur la lame sans forcer en tournant la grosse vis (macrométrique) jusqu'à s'approcher de la zone de mise au point.
- Finir la mise au point avec la petite vis (micrométrique).
- Jeter lames et lamelles dans la poubelle prévue à cet effet.
- En cas de trouble ou de traces parasites, nettoyer les objectifs et les oculaires uniquement avec du papier optique (risque de rayures).

Mise en évidence de la présence de micro-organismes au laboratoire

1. Matériel : milieux gélosés en boîte de Pétri, écouvillon, eau de robinet, cheveu, bec Bunsen, pièce de monnaie.

2. Mode opératoire :

Prendre 3 milieux gélosés en boîte de Pétri :

- diviser la boîte n°1 en 2 secteurs : déposer un cheveu sur le premier et quelques gouttes d'eau du robinet sur le second.

- diviser la boîte n°2 en 4 secteurs : appliquer une trace de doigt sur le premier, refaire l'opération sur le second après s'être lavé les mains, déposer une pièce de monnaie sur le troisième, frotter un écouvillon sur la paillasse et appliquer celui-ci sur le dernier secteur.

- laisser la troisième boîte ouverte au dessus de la paillasse (environ 10 min).

Remarque 1 : une boîte de Pétri de 8cm de diamètre remplie par une gélose liquéfiée est laissée ouverte sur une paillasse près d'un bec Bunsen allumé.

A la fin de la manipulation, regrouper les différentes boîtes de Pétri et les placer à l'étuve à 37°C / 24 heures.

Remarque 2 : pour éviter que l'eau de condensation dans les boîtes de Pétri perturbe la surface du milieu gélosé, on place les boîtes en position retournée dans l'étuve.

Fin de TP

- Désinfecter et se laver les mains.
- fermer les stores avant de partir.
- Ranger le matériel dans les placards.
- Ramener la vaisselle sale à la laverie.
- Nettoyer les paillasses y compris les paillasses communes de toutes les salles occupées.

VEILLER A UTILISER LE MATERIEL STERILE A BON ESCIENT