

Université Mohamed Khider Biskra  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie  
Matière : Microbiologie générale  
Niveau : Deuxième année licence      Année universitaire 2024/2025

Durée : 3h

## TP n°0 : Précautions à prendre durant les travaux pratiques de microbiologie

### I. Objectifs

- Comprendre les règles de sécurité et d'hygiène essentielles en microbiologie.
- Apprendre à préparer et maintenir un poste de travail stérile.
- Familiariser les étudiants avec l'utilisation sécurisée du matériel de base (bec Bunsen, anse de platine, etc.).

### II. Recommandations générales

#### 1. Tenue et hygiène personnelle :

- Porter une blouse en coton fermée.
- Attacher les cheveux longs et éviter les vêtements amples.
- Ne pas porter de bijoux à main.
- Se laver les mains avant et après toute manipulation avec de l'eau et du savon ou une solution ou gel hydroalcoolique.

#### 2. Comportement en salle de TP :

- Interdiction de boire, manger ou utiliser son téléphone.
- Respect strict des horaires et de la supervision de l'enseignant.
- Prévenir immédiatement tout incident (verrerie cassée, déversement, etc.).

#### 3. Organisation du poste de travail :

- Désinfecter la paillasse avant et après chaque séance avec une solution de javel ou un bactéricide.
- Éliminer correctement les déchets biologiques dans des poubelles spécifiques.
- Ranger le matériel après utilisation.

### III. Présentation des équipements et leur utilisation

#### 1. Paillasse de travail :

- Nettoyer avec une éponge imbibée d'eau de javel.
  - Ranger uniquement les outils nécessaires à la manipulation pour éviter le désordre.
-

## 2. Bec Bunsen :

### Avant utilisation :

#### 1. Vérifications initiales :

- Assurez-vous que le robinet d'arrivée de gaz à la paillasse (jaune) est fermé.
- Vérifiez que le robinet du bec et la molette de réglage d'air sont bien fermés.

#### 2. Mesures de sécurité :

- Attachez les cheveux longs et évitez les vêtements amples pour réduire les risques d'inflammation.
- Placez les objets inflammables (pissette d'alcool, cristalliseur, etc.) à distance du bec.

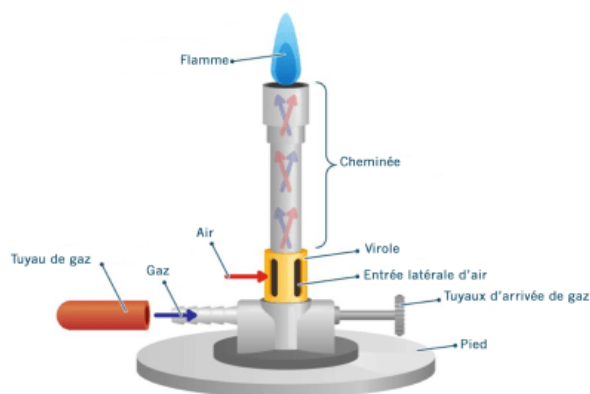
### Allumage :

#### 1. Ouverture de l'arrivée de gaz :

- Ouvrez lentement le robinet d'arrivée de gaz à la paillasse.

#### 2. Allumage de la flamme :

- Approchez une allumette allumée ou un briquet au sommet du bec.
- Ouvrez progressivement le robinet du bec jusqu'à ce que la flamme s'allume.

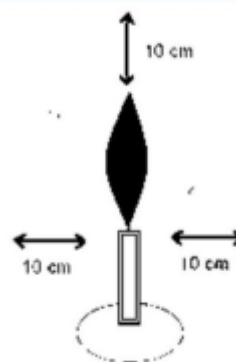


#### 3. Réglage de la flamme :

- Tournez doucement la molette d'entrée d'air pour permettre l'arrivée d'oxygène.
- Obtenez une flamme bleue (flamme stérilisante) avec un cône interne bleu au centre de la flamme jaune.

### Utilisation en zone stérile :

- La zone stérile s'étend jusqu'à environ **20 cm autour de la flamme bleue**.
- Utilisez cette zone pour stériliser des outils comme l'anse de platine (ose) en passant l'extrémité dans la flamme jusqu'à incandescence.



### Après la manipulation :

#### 1. Extinction :

- Fermez d'abord le robinet du bec.
- Ensuite, fermez le robinet d'arrivée de gaz à la paillasse.

#### 2. Nettoyage et rangement :

- Assurez-vous que le bec est froid avant de le déplacer ou de le ranger.

### Précautions importantes :

- Ne jamais laisser le bec Bunsen en veilleuse sans surveillance.
- Évitez de travailler avec des vêtements inflammables ou non ajustés près du bec.
- En cas de problème ou d'incident (ex. fuite de gaz), éteignez immédiatement le bec et alertez l'enseignant.

---

### 3. Anse de platine (öse) :

#### Description :

L'anse de platine est un outil indispensable en microbiologie, composé de trois parties :

- **Manche** : Partie tenue en main, souvent en métal ou en plastique.
- **Tige** : Relie le manche à la boucle.
- **Boucle** : Généralement fermée, de 2 mm ou plus de diamètre, utilisée pour les manipulations précises.

Cet outil est fabriqué en platine, inox ou plastique et peut se présenter sous différentes formes (droite, en "L", ou boucle).

#### Usages principaux :

- **Transférer** une petite quantité de liquide.
- **Prélever** une colonie bactérienne ou fongique.
- **Étaler** une goutte sur un milieu de culture ou une lame microscopique.

#### Procédure d'utilisation :

##### 1. Stérilisation avant usage :

- Passez la boucle de l'anse dans la flamme d'un bec Bunsen jusqu'à ce qu'elle devienne **rouge-blanc incandescente**.
- Laissez refroidir l'anse quelques secondes avant de la mettre en contact avec l'échantillon pour éviter de le détruire par la chaleur.

##### 2. Manipulation :

- Utilisez l'anse pour prélever ou transférer l'échantillon selon les besoins.
- Travaillez toujours dans la **zone stérile** (environ 20 cm autour de la flamme bleue du bec Bunsen).

##### 3. Stérilisation après usage :

- Après chaque utilisation, stérilisez l'anse en la passant à nouveau dans la flamme jusqu'à incandescence.
- Assurez-vous de bien détruire tous les résidus de matière biologique pour éviter les contaminations croisées.

#### Précautions importantes :

1. **Ne jamais déposer l'anse chaude** sur une surface non stérile, car cela compromettrait la stérilité.
2. Toujours **manipuler avec précaution** pour éviter les brûlures ou la contamination.
3. Si l'anse est endommagée ou déformée, remplacez-la immédiatement pour assurer la précision des manipulations.

---

### 4. Four Pasteur

#### Description et utilisation :

Le four Pasteur est une étuve à air chaud et sec, utilisée pour la stérilisation de la verrerie et des instruments métalliques.

**Procédure d'utilisation :**

**1. Préparation du matériel :**

- Nettoyez soigneusement la verrerie ou les instruments métalliques pour éliminer tout résidu.
- Assurez-vous que les objets sont parfaitement secs avant de les placer dans le four.
- Conditionnement du matériel : Enveloppez délicatement les objets dans du papier journal propre ou placez-les dans une boîte de stérilisation adaptée, en métal ou en verre, conçue pour résister à de hautes températures.
- Étiquetez le matériel si nécessaire pour identifier son contenu après la stérilisation.

**2. Paramétrage du four :**

- Réglez la température à **180 °C**.
- Programmez le temps de stérilisation à **90 minutes**.

**3. Après la stérilisation :**

- Laissez le matériel dans le four jusqu'à refroidissement complet pour éviter les chocs thermiques.
- Stockez ensuite le matériel dans un endroit propre et sec, à l'abri des poussières.

**Précautions spécifiques :**

- Ne pas stériliser des objets sensibles à la chaleur, comme les plastiques ou les solutions liquides.
- Évitez de surcharger le four pour garantir une bonne circulation de l'air chaud.

-----

**5. Autoclave :**

- Utiliser le four pour stériliser la verrerie à 180 °C pendant 90 minutes.
- L'autoclave est réservé pour les milieux et équipements résistant à la chaleur et à la pression. Toujours l'utiliser sous la supervision de l'enseignant et/ou l'ingénieur.

**Description et utilisation :**

L'autoclave est un appareil qui stérilise sous haute pression à l'aide de vapeur d'eau, permettant de détruire toutes les cellules végétatives et endospores.

**Procédure d'utilisation :**

**1. Préparation du matériel :**

- Placez les objets à stériliser (milieux de culture, instruments, verrerie) dans des contenants adaptés ou enveloppés dans du sac d'autoclavage.
- Vérifiez que les bouchons des flacons sont légèrement desserrés pour éviter les éclatements.

**2. Paramétrage de l'autoclave :**

- Réglez la température à **120 °C** et la pression à **1 bar**.

- Programmez la durée en fonction du volume et du type de matériel (généralement **20 à 30 minutes** pour la plupart des milieux).

### 3. Après la stérilisation :

- Attendez que la pression soit complètement retombée avant d'ouvrir l'autoclave pour éviter tout risque de brûlure.
- Manipulez le matériel avec précaution (port de gants recommandé) et laissez-le refroidir avant de l'utiliser ou de le stocker.

#### Précautions spécifiques :

- Toujours utiliser l'autoclave sous la supervision d'un enseignant ou d'un technicien.
- Vérifiez régulièrement le niveau d'eau dans le réservoir de l'autoclave.
- N'ouvrez jamais l'appareil tant que la pression interne n'est pas redescendue à zéro.

-----

### 6. Microscope :

#### Caractéristiques des objectifs :

- **Objectif X10** : Utilisé pour une recherche générale sur la lame et l'identification de la zone d'intérêt.
- **Objectif X40** : Convient à l'observation des *états frais* et à la mise au point initiale.
- **Objectif X100** : Réservé à l'observation des préparations colorées, comme les frottis Gram, avec une goutte *d'huile à immersion* sur la lame.

#### Utilisation et mise au point :

##### 1. Réglage initial :

- Positionnez l'objectif à faible grossissement (X10) au-dessus de la lame sans forcer.
- Tournez la **vis macrométrique** pour approcher la zone de mise au point.

##### 2. Ajustement précis :

- Utilisez la **vis micrométrique** pour affiner la mise au point.

##### 3. Contraste de phase (si disponible) :

- Réglez le contraste de phase en fonction du grossissement utilisé, en alignant les valeurs indiquées sur l'objectif et le dispositif.

#### Précautions :

- Jetez les lames et lamelles usagées dans les **poubelles spécifiques** prévues pour les déchets en verre.
- Évitez tout contact entre les objectifs et la lame pour prévenir les rayures ou les dommages.
- Manipulez le microscope avec soin pour maintenir sa calibration et ses performances.

#### Nettoyage et entretien :

- Nettoyez les objectifs et les oculaires avec du **papier optique** avant et après chaque utilisation pour éviter les rayures et les dépôts.
- En cas de trouble ou de traces parasites, inspectez et nettoyez soigneusement les surfaces optiques.
- **Ne jamais utiliser d'huile à immersion** sur les objectifs « X10 » et « X40 », car cela peut les endommager.

-----

#### IV. Activités pratiques

##### 1. Préparation du poste de travail

- Désinfecter la paillasse et préparer le matériel nécessaire.
- Identifier et organiser les outils disponibles (pissettes, marqueurs, ciseaux, etc.).

##### 2. Simulation de manipulation stérile

- Apprendre à allumer et régler le bec Bunsen.
- Stérilisation de l'anse de platine et manipulation de boîtes de Pétri.
- Effectuer un flambage et apprendre à travailler dans la zone stérile (20 cm autour de la flamme).

##### 3. Observation du matériel :

- Identifier les composants du microscope et apprendre à régler les objectifs.
- Explication des étapes pour observer un *état frais*.

##### 4. Nettoyage et rangement

- Désinfecter les surfaces et le matériel.
- Ranger les équipements dans les placards.
- Éliminer les déchets biologiques de manière sécurisée.

#### V. Évaluation rapide

1. Citez deux règles essentielles pour éviter les contaminations croisées.
2. Pourquoi est-il important de stériliser le matériel avant et après utilisation ?
3. Expliquez comment allumer correctement un bec Bunsen.

#### VI. Clôture du TP

- Nettoyer et désinfecter les paillasses.
- Fermer les stores et éteindre les équipements électriques.
- Signaler toute anomalie à l'enseignant.

**Mohamed Khider University of Biskra**  
Faculty of Exact Sciences and Natural and Life Sciences  
Department of Natural and Life Sciences

Subject: General Microbiology  
Level: Second-year undergraduate  
Academic Year: 2024/2025  
Duration: 3 hours

**Lab Session No. 0: Precautions to Take During Microbiology Lab Practices**

### **I. Objectives**

- Understand the essential safety and hygiene rules in microbiology.
- Learn to prepare and maintain a sterile workstation.
- Familiarize students with the safe use of basic equipment (Bunsen burner, platinum loop, etc.).

### **II. General Recommendations**

*Personal attire and hygiene:*

- Wear a closed cotton lab coat.
- Tie back long hair and avoid loose clothing.
- Do not wear hand jewelry.
- Wash hands with soap and water or hand sanitizer before and after handling.

*Lab behavior:*

- No drinking, eating, or using phones.
- Strict adherence to schedules and teacher supervision.
- Immediately report any incident (broken glassware, spills, etc.).

*Workstation organization:*

- Disinfect the bench before and after each session with bleach or a bactericide.
- Dispose of biological waste in designated bins.
- Store equipment properly after use.

### **III. Equipment Overview and Usage**

*Workbench:*

- Clean with a sponge soaked in bleach.
  - Only keep necessary tools on the bench to avoid clutter.
- 

### **Bunsen Burner:**

#### *Before use:*

- Ensure the gas tap at the workstation (yellow) is off.
- Verify that the burner tap and air adjustment knob are closed.

#### *Safety measures:*

- Tie back long hair and avoid loose clothing to reduce fire risks.
- Keep flammable objects (alcohol bottle, crystallizer, etc.) away from the burner.

#### *Ignition:*

1. Open the gas supply:
  - Slowly open the gas tap at the workstation.
2. Light the flame:
  - Bring a lit match or lighter near the top of the burner.
  - Gradually open the burner tap until the flame ignites.
3. Adjust the flame:
  - Slowly turn the air intake knob to allow oxygen flow.
  - Create a blue flame (sterilizing flame) with a blue inner cone in the yellow flame center.

#### *Sterile zone use:*

- The sterile zone extends about 20 cm around the blue flame.
- Use this area to sterilize tools like the platinum loop by passing the tip through the flame until glowing.

#### *After use:*

- Turn off the burner tap first, followed by the gas tap.
- Ensure the burner cools before moving or storing it.

#### *Important precautions:*

- Never leave the burner unattended.
- Avoid working with flammable or loose clothing near the burner.
- In case of a problem (e.g., gas leak), turn off the burner immediately and alert the teacher.

-----

## **Platinum Loop:**

### *Description:*

- A platinum loop is essential in microbiology, consisting of three parts:
  - Handle: Held by hand, often made of metal or plastic.
  - Rod: Connects the handle to the loop.
  - Loop: Usually closed, 2 mm or larger in diameter, used for precise manipulations.
- Made of platinum, stainless steel, or plastic and can have various shapes (straight, L-shaped, or looped).

### *Main uses:*

- Transfer small amounts of liquid.
- Collect bacterial or fungal colonies.
- Spread a drop on a culture medium or microscope slide.

### *Procedure:*

#### **1. Sterilization before use:**

- Pass the loop through the flame of a Bunsen burner until it glows red-hot.
- Allow it to cool for a few seconds before contacting the sample to prevent heat damage.

#### **2. Handling:**

- Use the loop to collect or transfer the sample as needed.
- Always work within the sterile zone (about 20 cm around the blue flame).

#### **3. Sterilization after use:**

- Sterilize the loop again by passing it through the flame until glowing.
- Ensure all biological residues are destroyed to avoid cross-contamination.

-----

### *Important precautions:*

- Never place the hot loop on a non-sterile surface.
- Handle with care to avoid burns or contamination.
- Replace damaged or deformed loops immediately for accurate manipulations.