

FICHE TECHNIQUE des TP de MICROBIOLOGIE de DEUG SV2

1) → **Règles à suivre lors des séances de TP.** Une étoile (*) indique que cette technique est décrite plus loin.

- Port de la blouse de rigueur. La blouse en coton doit être boutonnée.
- Nouer les cheveux longs. **S'asseoir pour manipuler et pour observer au microscope.**
- Se laver les mains. Désinfecter la paillasse*.
- Éviter les courants d'air ; limiter les déplacements ; éviter de parler .
- **Aucun pipetage à la bouche.**
- Ne pas porter ses doigts ou tout objet à sa bouche. Ne pas manger, boire, fumer.
- Éviter de mettre tout objet personnel en contact avec les bactéries.
- Marquer soigneusement les lames, tubes, boîtes, etc... avec un feutre indélébile.
- Les manipulations seront faites dans un rayon de 10 cm autour de la flamme du bec Bunsen.
- Ne pas éteindre la flamme sans couper l'arrivée du gaz.
- Ne pas laisser à proximité de la flamme des objets ou liquides inflammables (papiers, alcool, etc...).

→ **Désinfection.**

- **paillasse** : alcool 60° (ou eau de Javel à 3° chlorométriques) à l'aide d'un papier jetable.
- **peau contaminée** : **savon** et alcool 60°.
- **instruments** (pipette Pasteur, anse, etc...) : **flamage***.

→ **Aucun instrument (pipette, anse) ni objet contaminé ne doit être posé directement sur la paillasse.**

→ **Flamage des instruments et de l'orifice des tubes** : sert à stériliser localement tout objet métallique ou en verre.

Ouvrir la virole du bec Bunsen. Le flamage se fait dans le cône bleu de la flamme.

- **Orifice des tubes** : flamber 1 à 2 secondes. A faire après chaque ouverture et avant chaque fermeture de tube.
- **Anse de platine** : tenir l'anse verticalement ; placer la boucle métallique dans la flamme ; attendre qu'elle devienne rouge. La maintenir 5 secondes. A faire avant et après chaque utilisation.
- **Pipette Pasteur** : La pipette est utilisée soit boutonnée (fermée) pour prendre une colonie, soit ouverte pour prélever un liquide. Il faut l'ouvrir avant le flamage. Tenir la pipette horizontalement et passer lentement la partie effilée de la pipette 5 à 6 fois dans la flamme.

Laisser refroidir anses et pipettes environ 10 secondes avant tout contact avec un liquide, une colonie bactérienne...

Ne jamais passer du plastique ou la pince en bois dans la flamme.

2) **Étude macroscopique des colonies .** Choisir des colonies bien isolées. **Cette description doit mentionner :**

- **La taille : diamètre des colonies.** Vous pouvez mesurer cette taille à l'aide d'une règle graduée. On distingue les petites colonies (< 1 mm), les moyennes (1 à 3 mm), les grandes colonies (> 3 mm).
- **La forme avec vue de profil** (bombée, plate, ombiliquée, à bords surélevés ou en oeuf au plat) et **avec vue de dessus** (ronde, bords dentelés, en étoile, ovoïde).
- **L'aspect de la surface** (lisse, rugueuse, brillante).
- **L'opacité.** Les colonies opaques ne laissent pas passer la lumière contrairement aux translucides. Certaines sont très transparentes car laissent passer la lumière .
- **La consistance.** Elle se juge au moment du prélèvement. On distingue les colonies crémeuses des sèches et des muqueuses.
- **La couleur ou pigmentation.** La plupart des colonies isolées sur gélose ordinaire sont couleur crème = sans pigment mais certaines sont blanc porcelaine, jaune, vert, ;

Cette description aboutit à distinguer **3 types principaux de colonies :**

- **Colonies S** (smooth en anglais) : colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées de consistance crémeuse. Elles donnent des suspensions homogènes.
- **Colonies R** (rough en anglais) : colonies à surface rugueuse et bords souvent dentelés, plates, de consistance sèche. Elles donnent des suspensions hétérogènes.
- **Colonies M** (pour muqueuse) : colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées mais filantes au prélèvement à l'anse. Elles donnent des suspensions hétérogènes.
- Tous les intermédiaires sont possibles (ex. **SR**).

3) État frais.

- **A faire uniquement à partir d'un bouillon.** Déposer la suspension bactérienne avec l'anse de platine totalement refroidie (1 ou 2 anses) sur la zone centrale de la lame. **Éviter les excès de liquide** (riche de contamination et gêne l'observation)
- **Recouvrir d'une lamelle** le liquide. Éviter les bulles d'air. Recommencer au besoin.
- **Observer rapidement en faible luminosité SANS HUILE** : poser la lame avec lamelle sur la platine porte objet abaissée par rapport aux objectifs. Mettre l'**objectif x 40. Fermer le diaphragme. (Baisser le condensateur si le microscope le permet)**. Monter la platine porte objet jusqu'à 1 mm de l'objectif, puis observer la préparation. Faire le réglage en abaissant progressivement la platine porte objet tout en affinant la netteté avec la vis micrométrique.

JETER l'état frais (lame et lamelle) dans le **petit container jaune pour déchets contaminés**.

4) Coloration de Gram : La coloration est en 4 temps principaux.

Les bactéries Gram⁻ apparaissent roses et les Gram⁺ violettes à l'observation microscopique.

Étape 1 : réalisation d'un frottis qui est séché et fixé.

- a) **A partir d'un bouillon** : déposer au centre de la lame 1 goutte de bouillon ; étaler
 - b) **A partir d'un isolement sur gélose** : déposer une petite goutte d'eau (flacon du portoir à colorants) au centre de la lame. Faire une suspension homogène avec une seule colonie prélevée à l'anse. Étaler sur environ ¼ de la lame.
- Laisser sécher en chauffant **légèrement** la lame au-dessus de la flamme. **Ne pas brûler** les bactéries sinon l'observation sera délicate voire impossible. La lame doit être totalement sèche.
 - Fixer le frottis en versant 1 ou 2 gouttes (pas plus) d'alcool 100° sur la lame et enflammer à l'aide d'une allumette.
 - **Laisser refroidir.**

Étape 2 : coloration au violet de Gentiane suivie d'un mordantage par une solution iodo-iodurée de Lugol.

- Recouvrir toute la lame de **Violet de Gentiane**. Laisser 1 minute.
- Chasser le violet avec le **Lugol**. Laisser 1 minute.
- Rincer à l'eau . Egoutter la lame.

Étape 3 : décoloration à l'alcool

- Recouvrir la lame d'**alcool 100°**. Attendre 15 secondes.
- **Rincer immédiatement à l'eau** . Laisser un peu d'eau sur la lame.

Étape 4 : recoloration à la fuchsine. - Mettre 2 gouttes de **Fuchsine**. Laisser 1 minute.

- Laver abondamment à l'eau.
- Sécher délicatement la lame dans un papier jetable. Nettoyer au besoin **le dessous de la lame** avec un papier jetable . La lame doit être totalement sèche.
- **Observer à l'immersion en pleine lumière** : Mettre une goutte d'**huile à immersion** sur la lame totalement sèche . Observer à l'**objectif x 100** (objectif à immersion). **Ouvrir le diaphragme. (Monter le condensateur si le microscope le permet)**. L'objectif doit toucher la goutte d'huile.

5) Gestion des déchets.

Matériels non contaminés (papier, allumettes, etc...) : poubelle à papier en bout de paillasse, sous les éviers.

Cultures bactériennes en boîtes et bouillons : grands containers jaunes pour déchets contaminés en bout de paillasse.

Pipettes Pasteur, lames et lamelles : petits containers jaunes posés sur les paillasses pour chaque binôme.

6) Entretien des microscopes.

Manipuler avec soin le microscope. Ne jamais mettre d'huile sur l'objectif x 40.

Oter les lames dès l'observation terminée.

Nettoyer les lentilles des objectifs et des oculaires avec du papier Joseph en début et en fin de séance.

Nettoyer la platine porte objet et le corps du microscope à l'alcool 60°. Pas d'alcool sur les lentilles.

7) Ranger la paillasse en fin de séance : éteindre et nettoyer avec soin le microscope* ; remplir les flacons de colorants; évacuer les déchets dans les poubelles adéquates et les colorants usagés dans les bouteilles à déchets ; couper l'arrivée de gaz ; ordonner et désinfecter la paillasse.