

TP 3 — Organisation d'un laboratoire type de Microbiologie Appliquée.

I. Objectifs pédagogiques

1. Identifier et décrire les équipements spécifiques d'un laboratoire de microbiologie ;
2. Comprendre le principe de la stérilisation par chaleur humide (autoclave) et sèche (four Pasteur) ;
3. Maîtriser les règles de sécurité microbiologique ;
4. Expliquer le rôle et le fonctionnement du microscope optique.

II. Introduction

Le laboratoire de microbiologie appliquée est actif dans deux secteurs principaux : le secteur médical (microbiologie clinique : bactériologie, virologie, parasitologie, mycologie) et le secteur alimentaire (microbiologie alimentaire : hygiène, contrôle qualité, répression des fraudes). La sécurité est la préoccupation centrale en microbiologie. Selon le niveau de risque des agents manipulés (NSB 1 à 4), les équipements de protection (PSM, autoclaves, EPI) et les procédures (stérilisation, décontamination) varient en rigueur et en complexité.

III. Équipements du laboratoire de Microbiologie

1. Microscope optique

FORMULE DU GROSSISSEMENT TOTAL

$G_t = \text{Grandissement objectif} \times \text{Grossissement oculaire}$
 Exemple : objectif $\times 40$ et oculaire $\times 10 \rightarrow G_t = 40 \times 10 = 400\times$

Composantes du microscope binoculaire

Composante	Rôle
Source lumineuse (lampe halogène ou LED)	Éclaire l'objet à observer
Condenseur (lentille convergente)	Concentre les rayons lumineux sur l'objet — améliore le contraste
Diaphragme d'ouverture	Règle la quantité de lumière — contrôle le contraste
Platine (porte-objet)	Support de la lame — déplacement croisé par molettes
Objectifs ($\times 4$, $\times 10$, $\times 40$, $\times 100$)	Lentilles à courte focale — produisent l'image intermédiaire agrandie
Oculaires ($\times 10$)	Lentilles à longue focale — grossissent l'image intermédiaire
Vis macrométrique	Mise au point grossière (déplacement rapide)
Vis micrométrique	Mise au point fine (déplacement lent et précis)
Coulisse inter-pupillaire	Réglage de l'écartement des oculaires (binoculaire)

Objectif à immersion ($\times 100$)

L'objectif $\times 100$ nécessite l'utilisation d'huile à immersion (indice de réfraction $n = 1,515$, proche de celui du verre) pour obtenir une ouverture numérique (ON) effective de 1,40, permettant une résolution maximale ($d = \lambda / 2 \times ON \approx 0,2 \mu\text{m}$ en lumière blanche).

2. Broyeurs et Stomacher

Stomacher (broyeur péristaltique)

Le stomacher homogénéise des échantillons solides (aliments, tissus) dans un sac stérile (sac stomacher) par pétrissage entre deux palettes. Cette technique d'homogénéisation est non destructive, évite l'échauffement et réduit les risques d'aérosols biologiques par rapport aux broyeurs classiques.

- Principe : compression–pétrissage alternatif simulant un mouvement d'estomac ;
- Avantages : asepsie garantie par le sac stérile, pas de contamination croisée, volumes de 15 à 400 mL ;
- Application : préparation des échantillons alimentaires selon les normes ISO (ex. : ISO 6887 — dilution décimale initiale).

Mortier et pilon

- Broyage manuel des échantillons solides durs (fromages, céréales, épices) ;
- Préchauffer ou refroidir (-80°C) le mortier selon la nature de l'échantillon ;
- Limiter les aérosols en microbiologie : travailler sous PSM si l'échantillon est infectieux.

3. Bain-marie

Le bain-marie est utilisé pour maintenir des réactions biochimiques et microbiologiques à une température constante et contrôlée, bain à basse température. Il existe des bains à haute température ; bain de sable te bain d'huile.

Composantes

- Cuve en acier inoxydable avec grille diffusante (uniformisation de la T°) ;
- Résistances thermoplongeuses (internes à la cuve) ou externes (conduction thermique) ;
- Thermostat + sonde de température + afficheur numérique ;
- Robinet de vidange.

Applications en microbiologie

- Liquéfaction et maintien des géloses ($44\text{--}50^{\circ}\text{C}$) avant coulage des boîtes ;
- Incubation des tubes de gélose inclinée (mise en pente) ;
- Réactions enzymatiques à T° contrôlée (37°C).

4. Étuve et Incubateur

Appareil	Étuve (Four de Pasteur)	Incubateur
Principe	Chaleur sèche (air chaud) sans humidité	Atmosphère contrôlée T° , HR%, CO_2 (si besoin)
Plage de T°	Ambiante à 350°C (selon modèle)	-10°C à $+75^{\circ}\text{C}$ (selon modèle)
Stérilisation	$170\text{--}180^{\circ}\text{C}$ / 60–90 min (matériel sec en verre ou métal)	Pas de stérilisation — conditions de croissance
Application principale	Stérilisation verrerie, métal, poudres thermostables	Culture bactérienne (37°C), fongique ($25\text{--}30^{\circ}\text{C}$), cellulaire (37°C , 5% CO_2)

5. Autoclave

Principe de stérilisation par vapeur d'eau

L'autoclave réalise la stérilisation par vapeur d'eau saturée sous pression, qui est plus efficace que la chaleur sèche car elle dénature irréversiblement les protéines des microorganismes (y compris les spores bactériennes résistantes).

Cycles standards :

- 121°C – 1 atm de surpression – 15 minutes : stérilisation générale ;
- 134°C – 2 atm de surpression – 18 minutes : stérilisation hospitalière (prions).

Applications

- Stérilisation des milieux de culture liquides (bouillons, géloses) ;
- Stérilisation de la verrerie (tubes, pipettes, boîtes en verre, récipients) ;
- Stérilisation des instruments et des consommables ;
- Décontamination du matériel contaminé avant élimination (déchets biologiques).

Règles de sécurité

- *Ne jamais verrouiller la porte avant contrôle de la pression (= 0) ;*
- *Ne pas stériliser des produits inflammables, volatils ou hermétiquement fermés ;*
- Attendre le retour à la pression atmosphérique avant d'ouvrir ;
- Vérifier l'efficacité par bandelettes indicatrices chimiques et/ou bioindicateurs (spores).

6. Agitateur chauffant (Plaque chauffante magnétique)

L'agitateur chauffant (plaque chauffante avec agitateur magnétique) combine deux fonctions indépendantes ou combinées : chauffage de la surface (résistance électrique) et agitation magnétique par champ électromagnétique rotatif entraînant un barreau aimanté (barreau magnétique = *stirbar*).

Paramètres

- Température : de l'ambiance à 500°C — contrôle par thermocouple intégré ;
- Vitesse d'agitation : de 60 à 1200 tr/min — réglable indépendamment.

7. Bec Bunsen

Le bec Bunsen (*inventé par le chimiste allemand Robert Wilhelm Bunsen, 1855*) crée une zone de travail relativement stérile en laboratoire de microbiologie. La flamme génère un cône d'air chaud d'environ 20 cm de diamètre qui réduit la viabilité des microorganismes aéroportés et crée une zone stérile autour du poste de travail.

Utilisation en microbiologie

- Stérilisation de l'anse d'inoculation par passage dans la flamme ;
- Décontamination de l'embouchure des flacons et tubes lors des transferts ;
- Maintien de l'asepsie lors des ensemencements.

Flamme correcte : blanche/bleue non éclairante

- Deux cônes : un externe bleu pâle (combustion incomplète) et un interne bleu profond (combustion complète) ;

- Température au centre : $\approx 1500^{\circ}\text{C}$;
- Flamme jaune = flamme lumineuse (excès gaz, manque d'air) → non utilisable pour l'asepsie.

8. Boîtes de Pétri

Les boîtes de Pétri (*inventées par Julius Richard Petri, 1887*) sont des récipients cylindriques à fond plat avec couvercle débordant, utilisées pour la culture des microorganismes sur milieux gélosés.

- Boîtes en verre : réutilisables après stérilisation à l'autoclave (134°C) ;
- Boîtes en polystyrène à usage unique : plus pratiques, irradiées aux rayons γ , diamètre 90 ou 55 mm ;
- Règle de dénombrement : entre 30 et 300 / 10 et 150 colonies par boîte pour un dénombrement fiable.