

Travaux pratiques - Microbiologie

Avant-propos : règles de travail en laboratoire de microbiologie

Au cours des séances de travaux pratiques, vous serez amenés à manipuler de nombreux micro-organismes (bactéries). Certaines espèces peuvent être pathogènes. L'infection est un risque biologique potentiel (pour soi, comme pour les personnes de son entourage) qui s'additionne aux autres risques inhérents aux activités de laboratoire. **Les consignes suivantes doivent donc être impérativement respectées pour éliminer tous risques de contamination.**

- **Attacher des cheveux longs** (chignons recommandés), **porter une blouse** (elle doit être enlevée avant de sortir).
- **Ne pas fumer, ni manger, ni boire pendant les séances.**
- **Se laver les mains au savon avant et après chaque séance** de laboratoire.
- **Nettoyer la surface de travail** (alcool 70%) **avant et après** chaque séance.
- **Eviter de parler ou de se déplacer inutilement** lorsque desensemencements sont faits.
- **Organiser et disposer le matériel de telle sorte que rien ne soit renversé ou ne puisse prendre feu.**
- **Toujours manipuler les micro-organismes près de la flamme (dans les 20 cm entre la flamme et vous).**
- **Ne déposer les instruments sur la table qu'après les avoir stérilisés** (anse, verrerie : par flambage).
- **Désinfecter immédiatement toute zone où a été renversé un liquide contaminé (après avoir ETEINT LA FLAMME).**

Travail préparatoire

1/ Lire **TOUT le TP**, cela vous donnera une meilleure idée du travail global et par séance à réaliser.

2/ **Préparer pour chaque séance un schéma** reprenant les manipulations que vous devez effectuer.

3/ Pour la séance 1, **calculer le volume de Bouillon Nutritif (BN)** dont vous aurez besoin (un volume global) et **la masse de BN à peser** sachant que votre solution devra être à 8 g par Litre et que vous avez 20 tubes contenant chacun 3 mL de BN, et que 10 mL de sureté sont rajoutés à votre calcul.

4/ **Calculer la masse de NaCl** que vous devez peser sachant qu'il vous est demandé une gamme de NaCl en **masse/volume** avec 0 - 2,5 - 5 - 7,5 et 10 % de NaCl dans 3 mL de BN.

5/ **Préparer des étiquettes** NON COLLANTES de 2 cm sur 3,5 cm sur le modèle suivant (au crayon de papier) :

Bactérie 1 ou 2 X °C ou X % NaCl

Le nombre d'étiquettes est à déterminer sachant que vous testerez 2 bactéries différentes dans 4 conditions températures et 5 concentrations NaCl. Les étiquettes seront fixées avec du scotch.

Il ne doit vous rester à mettre le jour du TP séance 2 QUE les initiales du binôme et à scotcher les étiquettes sur les tubes

6/ **Préparer deux étiquettes** NON COLLANTES de 2 cm sur 3,5 cm sur le modèle suivant (au crayon de papier) :

Bactérie 1 ou 2 Tube d'ensemencement

Il ne doit vous rester à mettre le jour du TP séance 2 QUE les initiales du binôme et à scotcher les étiquettes sur les tubes

Pour les 4 séances de TP, apporter :

- du scotch pour mettre sur les étiquettes (pour qu'elles ne partent pas lors de l'autoclavage)
- des feutres résistants à l'eau ou crayon de papier
- des feutres pour écrire sur les tubes de dilution, les tubes de séance 3 et les boîtes de Pétri
- une blouse et quoi s'attacher les cheveux

A la fin de certaines séances les étiquettes seront à enlever entièrement des tubes (eau chaude et grattoir), de l'éthanol 70 % devra être rajouté (~1 mL) dans les tubes, qui seront vidés à l'évier et rincés, après 5 min d'incubation avec l'alcool.

Analyse bactériologique d'un prélèvement tellurique

Les micro-organismes sont omniprésents. En milieu naturel, ils ont pour origine le sol, l'eau, les poussières et aérosols, les végétaux, les animaux (essentiellement au niveau de la peau, du tube digestif, des voies respiratoires). L'objectif de ces manipulations est d'isoler et de déterminer certaines des caractéristiques physiologiques et biochimiques de souches bactériennes présentes dans un échantillon de terre. Cet échantillon se trouve dans un tube stérile de 50 mL (un tube fourni par binôme) afin d'éviter toute contamination. Le tube ne doit être ouvert qu'à la flamme au moment du prélèvement.

Séance 1

La séance 1 **est réalisée par chaque étudiant seul et non en binôme**. Elle sera divisée en deux fois 1 heure et les étudiants se présenteront suivant la liste donnée par les enseignantes. Le but de cette séance est que chaque étudiant se familiarise avec les gestes de microbiologie et l'utilisation de la flamme pour travailler en milieu stérile.

Expérience 1 : Dilution en cascade

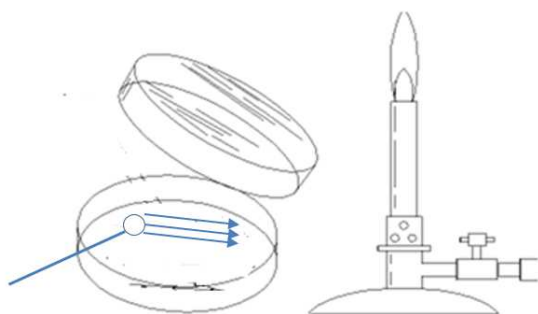
Commencez par dégager votre paillasse puis allumez le bec bunsen (**Vidéo 1**). A partir **du tube noté A**, préalablement mélangé par retournement, **prélevez 1 mL** dans les 3 premiers cm du liquide et **réaliser une dilution en cascade** : transférez 1 mL de la suspension initiale dans le 1^{er} tube contenant 4 mL de solution de dilution et mélangez par up & down 5 fois. Répétez pour les deux tubes suivants (**Vidéo 3**). Maintenez la pipette dans le dernier tube (attention aux 20 cm autour de la flamme).

Expérience 2 : Etalement sur boîtes de Pétri : au râteau et à la anse de platine

Toujours à la flamme, **prélevez 100 µL** dans le troisième tube de dilution (après avoir homogénéisé en up & down), **déposez les au centre de la boîte de Pétri et étalez au râteau** plastique [le râteau doit être sorti sous flamme car il est stérile] (**Vidéo 4**).

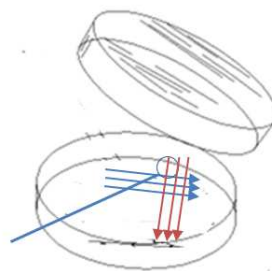
Toujours à la flamme, **trempez la anse de platine, stérile (Vidéo 3) et refroidie**, dans le tube de dilution 3. **Ressortez-la et déposez-la délicatement sur la gélose** de la deuxième boîte de Pétri. **Choisissez une des trois techniques ci-dessous** pour étaler la solution bactérienne selon la **technique des quadrants**.

1^{ère} technique : faire 3 traits rapprochés de la gauche vers la droite avec la anse. Les bactéries sont progressivement déposées le long de ces 3 traits (bleus). Flambez la anse, laissez refroidir. Déposez la anse derrière les trois traits et déplacez la anse de la gauche vers la droite pour tracer de nouveau trois traits (rouges). En passant sur les premiers dépôts, la anse est inoculée avec les bactéries et celles-ci sont étalées sur le deuxième quart de boîte. A nouveau, tournez d'un quart de tour votre boîte, déposez la anse derrière les trois nouveaux traits (sans la flamber) et recommencez (traits verts).

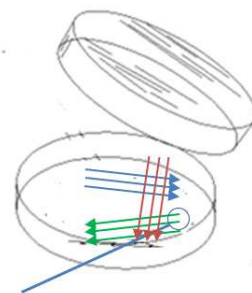


Travail en zone stérile

Anse flambée, refroidie, inoculée.
Trois traits (dépôts bactériens) de G à D.

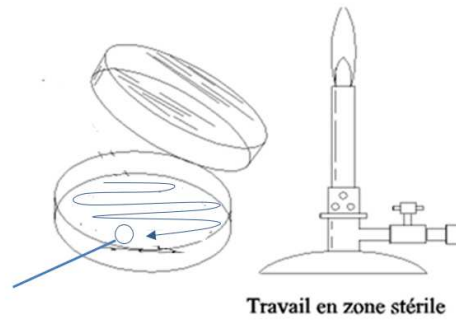


Anse flambée, refroidie.
Trois traits (dépôts bactériens) de G à D en partant de derrière les traits bleus

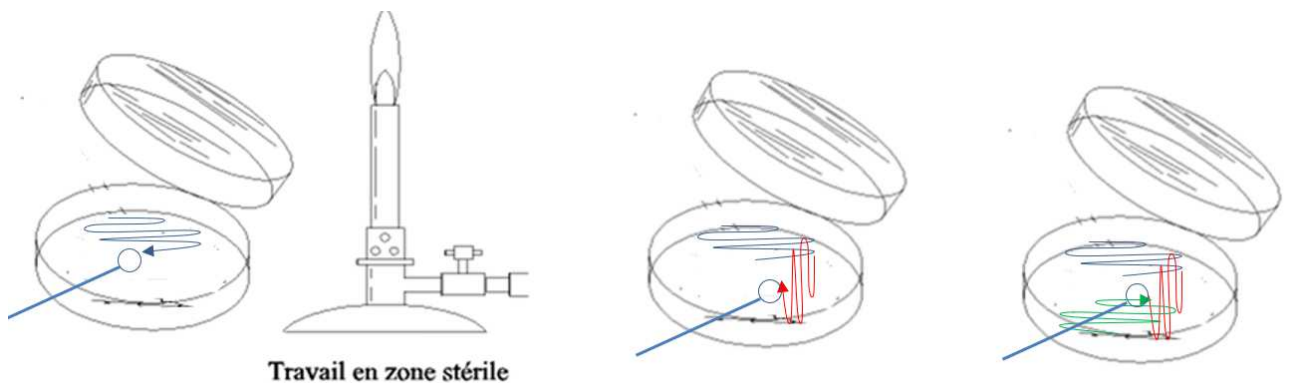


Trois traits (dépôts bactériens) de G à D en partant de derrière les traits rouges

2^{ème} technique : faire 1 trait de la gauche vers la droite puis sans soulever la anse revenir vers la gauche et ainsi de suite jusqu'en bas de la boîte



3^{ème} technique : faire 1 trait de la gauche vers la droite puis sans soulever la anse revenir vers la gauche et ainsi de suite jusqu'à la moitié de la boîte. Flambez puis refroidissez la anse. Tourner la boîte d'un quart de tour. Déposez la anse sur les premiers traits faits (bleus) et recommencez en va et vient dans le quart de la boîte (traits rouges). Recommencez sans flamber dans le dernier quart (traits verts).



Expérience 3 : Piqûre centrale dans une gélose en tube

Avec une **anse droite stérile en plastique** (partie fine et rectiligne) préalablement plongée dans le tube de dilution 3, **réalisez une piqûre centrale dans la gélose**, jusqu'à environ 2 cm du fond (**Vidéo 8**).

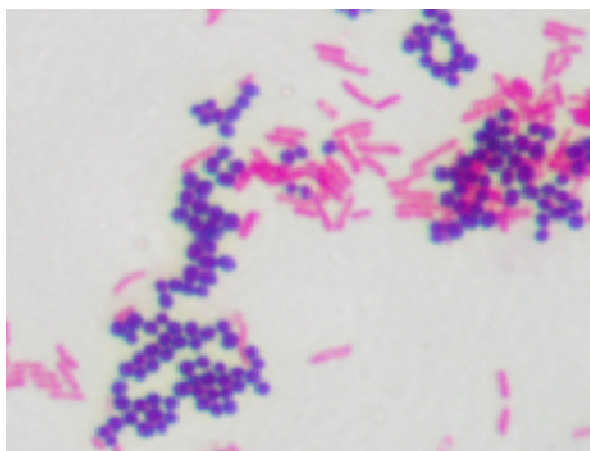
Expérience 4 : Réalisation d'un frottis bactérien et d'une coloration de Gram

Les différentes étapes de la réalisation d'un frottis (**Vidéo 6**) sont : i/ l'étalement d'un prélèvement bactérien sur une lame, ii/ le séchage et iii/ la fixation à la flamme.

Déposer sur une lame de verre une **petite goutte d'eau**. **Sous la flamme bleue, prélever**, à l'aide d'une anse en plastique stérile ou de la anse en platine (à stériliser) **une ou plusieurs colonie(s) ou un morceau de colonie** suivant la taille. **Ecrasez-la colonie dans la goutte** d'eau comme expliqué dans la **vidéo 6**.

Laissez sécher à l'air avant de fixer la préparation à la chaleur en passant la lame 3 fois sur la flamme éclairante (cellules vers le haut). Le passage doit être rapide (1 s pour l'ensemble de la lame), et effectué d'un mouvement continu (la lame chauffée doit pouvoir être tenue dans la main sans ressentir de douleur) (**Vidéo 6**).

La coloration de Gram est une coloration différentielle. Elle permet de diviser les bactéries en deux groupes selon la composition de leur paroi. Les bactéries dont la paroi retient le colorant primaire (cristal violet) après lavage à l'alcool, sont dites **Gram positif (Gram+)**; elles apparaissent violet ou bleu foncé. Celles qui sont décolorées par le passage dans l'alcool sont dites **Gram négatifs (Gram-)**. Pour mieux observer ces dernières, un second colorant (safranine) qui les colore en rose est utilisé.



Visualisation de coques Gram positif et de bacilles Gram négatifs

Pour la coloration de Gram, **travaillez** dans un premier temps **avec des gants** et suivez les instructions ci-dessous :

- * Plongez la lame dans la solution de cristal violet pendant 1 min.
- * Jetez le colorant dans le cristallisoir à cet effet et rincer délicatement à l'eau dans le cristallisoir.
- * Plongez la lame dans la solution d'iode (agent mordant) pendant 1 min.
- * Jetez le colorant dans le cristallisoir à cet effet et rincer délicatement à l'eau dans le cristallisoir.
- * Décolorez avec le mélange alcool-acétone pendant 10 sec.
- * Rincez délicatement à l'eau dans le cristallisoir.
- * Plongez la lame dans la safranine pendant 1 min.
- * Jetez le colorant dans le cristallisoir à cet effet et rincer délicatement à l'eau dans le cristallisoir.
- * **SANS LES GANTS**, Séchez le dessous de la lame et le tour du frottis (papier essuie-tout, papier buvard, air). Le frottis peut être repassé à la flamme pour être bien sec.

Pour cette première séance aucune observation au microscope n'est réalisée.

A la fin de cette séance

- * Videz les tubes à l'évier, les rincer à l'eau distillée et essuyez l'extérieur avant de les remettre sur le portoir.
- * Rangez et nettoyez votre paillasse : la anse de platine doit être flambée, les anses plastiques et la pipette (sans son emballage) doivent être mis dans la poubelle "plastiques contaminé"
- * Rangez votre siège et lavez la paillasse à l'éthanol (**PAS DE FLAMME !!!**)

Séance 2

Cette séance et les suivantes sont **réalisées en binôme**. Le travail de manipulation doit être réparti de façon équitable. La personne qui manipule à la flamme doit être installée bien en face de la flamme.

Expérience 1 : Détermination de la teneur en eau de l'échantillon de terre

Afin de déterminer la teneur en microorganismes par gramme de terre sèche et pouvoir comparer les résultats entre les échantillons, cette étape est indispensable. Vous devez, **chez vous, calculer la teneur en eau et le poids de la terre** (en gramme et en pourcentage) à partir des données qui vous seront fournies lors de cette séance.

- * Poids d'un poudrier **M1** = ____
- * Masse du poudrier et de la terre. **M2** = ____
- * Masse du poudrier et de la terre après 24 h à 100 °C **M3** = ____

Expérience 2 : Extraction de la flore microbiologique

Cette étape a déjà été réalisée. Elle permet de récupérer l'ensemble de la flore microbiologique sans contrainte sélective. Elle est réalisée dans une solution d'eau physiologique qui constitue un milieu isotonique empêchant la lyse des cellules en maintenant une valeur de pression extracellulaire proche de celle de la pression intracellulaire.

5 g de terre ont été pesés et placés un tube contenant 30 mL de solution d'extraction A (eau physiologique stérile) à la flamme (**Vidéo 2**). Le tout a été homogénéisé et ajusté au volume de 50 mL avec la solution stérile d'extraction B toujours sous la flamme (**Vidéo 2**).

Expérience 3 Dilutions et étalements

Annotez au feutre les tubes de dilution et les boîtes de Pétri (n'oubliez pas vos initiales sur les boîtes)

→ Travail à faire sous la flamme

Vous allez réaliser **les dilutions en cascade de 10^{-1} à 10^{-6}** (**Vidéo 3**) de la suspension de microorganismes qui vous a été fournie (Tube AB). **Prélevez 1 mL** de la suspension initiale et rejetez-le dans le 1^{er} tube contenant 9 mL de solution de dilution (= dilution 10^{-1}). Répétez jusqu'à obtenir la dilution 10^{-6} . Homogénéisez entre chaque dilution ("up and down" du liquide dans la pipette).

Pour **ensemencer boîtes de Pétri au râteau**, homogénéisez votre liquide de prélèvement et prélevez **100 µL** que vous étalerez au râteau sur la gélose nutritive (en commençant par la dilution la plus élevée) (**Vidéo 4**). Vous avez **3 boîtes à ensemer au râteau** (utilisez le même râteau).

A la fin de cette étape

- * Mettre de côté les boîtes (gélose vers le haut), elles seront incubées à 37 °C sur la nuit
- * Mettre de côté le tube de 50 mL la solution d'extraction bactérienne AB, elle sera conservée à 4 °C
- * Mettre environ 1 cm d'Ethanol 70 % dans tous les tubes de dilution, attendre 10 min. Pendant ce temps, effacer à l'éthanol les inscriptions sur les tubes. Vider dans l'évier et séparer tubes et bouchons.

Expérience 4 : Préparation des milieux

Cette étape permet de préparer le milieu liquide BN et de préparer les tubes contenant du NaCl. Etiquetez chaque tube (20 au total).

Pesez le BN et le NaCl en fonction des calculs faits. Pour le BN, préparez le volume de BN déterminé chez vous en mélangeant dans un bécher la masse calculée et le volume déterminé en eau distillée.

En parallèle sur balance de précision, peser la masse de NaCl vous permettra de réaliser les solutions de NaCl aux différentes concentrations demandées.

Lorsque le BN est bien dissout, distribuez 3 mL de BN dans chaque tubes (le NaCl doit être mis avant).

Pour rappels :

Calculer le volume de Bouillon Nutritif (BN) dont vous aurez besoin (un volume global) et la masse de BN à peser sachant que votre solution devra être à 8 g par Litre et que vous avez 20 tubes contenant chacun 3 mL de BN, et que 10 mL de sureté sont rajoutés à votre calcul.

Calculer la masse de NaCl que vous devez peser sachant qu'il vous est demandé une gamme de NaCl en masse/volume avec 0 - 2,5 - 5 -7,5 et 10 % de NaCl dans 3 mL de BN

A la fin de cette étape

* Mettre un bouchon à chaque tube, les placer dans le portoir commun. Les tubes seront autoclavés pour la troisième séance.

* Verser le BN en plus dans une bouteille commune (ce BN servira à faire le zéro au spectrophotomètre en séance 4).

*Rangez et nettoyez votre paillasse : la anse de platine doit être flambée, les anses plastiques et la pipette (sans son emballage) doivent être mis dans la poubelle "plastiques contaminé"

*Rangez votre siège et lavez la paillasse à l'éthanol (**PAS DE FLAMME !!!**)

Séance 3

Expérience 1 : Estimation de la teneur bactérienne

En partant du principe que chaque colonie isolée provient d'une seule cellule, dénombrez les colonies contenues dans une boîte de Pétri. **Les calculs, à faire chez vous**, seront effectués à partir du nombre de colonies isolées comptabilisées sur les boîtes. Ces calculs devront tenir compte des facteurs de dilution et des volumes étalés.

A partir des boîtes obtenues avec les dilutions (séance 2), **estimer la teneur de micro-organismes en Unités Formant Colonies/g de terre sèche** (à chercher sur internet).

Expérience 2 : Mise en culture de colonies isolées et Effets de facteurs environnementaux sur la croissance bactérienne

L'isolement des colonies pour le dénombrement permet de travailler sur des souches spécifiques de microorganismes en vue d'identifier certaines de leurs caractéristiques physiologiques et biochimiques. Pour cela il est nécessaire de partir de souches pures mises en culture sur un milieu liquide non sélectif (le bouillon nutritif BN).

→ Travail à faire sous la flamme

* Choisir **2 colonies isolées** (Bactérie 1 et Bactérie 2), **d'aspect différent** (forme et taille de la colonie, aspect de la colonie, pigmentation ...) sur une même boîte ou sur des boîtes séparées.

* **Décrire** ces colonies : grandes, petites, lisses, rugueuses.....

* **Prélever à la anse en platine une première colonie** (Bactérie 1) et **inoculer le tube d'ensemencement** correspondant (**Vidéo 5**). **Recommencer** avec la **deuxième colonie** (Bactérie 2). Si la colonie est grande, ne prendre qu'une seule colonie. Si les colonies sont moyennes à petites, prendre 3 à 4 colonies.

Les principaux facteurs de l'environnement qui interviennent sur la croissance bactérienne sont la quantité de nutriments, la présence de substances toxiques, l'humidité, la température, le pH, la pression osmotique et la composition de l'atmosphère (notamment présence ou absence de dioxygène). Seuls les facteurs température et pression osmotique seront étudiés.

Quatre températures (4 °C, 20 °C, 30 °C et 50 °C) sont testées afin d'estimer la température optimale de croissance **pour les 2 souches isolées à partir des tubes d'ensemencement**. Les cultures sont toutes réalisées dans le milieu BN non sélectif afin que la température constitue le seul facteur variable et potentiellement limitant de la croissance des microorganismes.

Cinq concentrations osmotiques (0%, 2,5%, 5%, 7,5% et 10% de NaCl) sont testées afin de voir l'effet de la pression osmotique sur la croissance bactérienne. De la même façon que pour la température, les cultures sont toutes réalisées dans le milieu BN non sélectif afin que la concentration en NaCl constitue le seul facteur variable et potentiellement limitant de la croissance des microorganismes.

→ Travail à faire sous la flamme

A partir de **100 µL du tube d'ensemencement** Bactérie 1, à la flamme, **inoculer chaque tube température et chaque tube NaCl (Vidéo 5)**. Recommencer avec le tube d'ensemencement Bactérie 2 et le lot de 9 tubes (Température et NaCl).

Séparer les tubes nouvellement inoculer sur les portoirs réservés. Chaque souche sera mise en culture dans une enceinte pendant une nuit aux températures suivantes : 4 °C, 20 °C, 30 °C et 50 °C. Chaque tube NaCl sera ainsi mis en culture pendant une nuit dans une enceinte à 37 °C.

Expérience 3 : Détermination de caractéristiques du métabolisme bactérien

Après la phase d'isolement et la mise en culture pure, l'identification d'une souche bactérienne repose souvent sur la mise en évidence de réactions biochimiques particulières, caractéristiques de son métabolisme cellulaire (identité biochimique) ou de son type respiratoire.

L'utilisation du **milieu Bouillon glucosé au rouge de phénol** permet de mettre en évidence la dégradation du glucose avec production d'acide (virage de l'indicateur coloré) et/ou de gaz par fermentation (accumulation dans la cloche de Durham - au moins 10 % du volume de la cloche).

L'utilisation de la **gélose Viande-foie (VF) en tube**, permet d'avoir une première estimation du type respiratoire des bactéries : aérobies, anaérobies, aérobies-anaérobies facultatives ...La consistance de ce milieu est une gélose molle. Placée dans un tube fin, et après passage à l'autoclave (dégazage assurant l'élimination des gaz dissous), l'ouverture du bouchon permet d'obtenir un gradient de pression partielle en O₂ (rééquilibrage partiel avec l'atmosphère).

Enfin le milieu **gélose sélective pour entérobactéries** contient un inhibiteur (désoxycholate) de la croissance des bactéries Gram+. Il permet de mettre en évidence la présence d'entérobactéries, et leur capacité à dégrader le lactose avec rejets acides.

→ Travail à faire sous la flamme

Pour chaque souche de bactéries:

- * Prélever à la anse en platine stérile du liquide dans le tube **d'ensemencement** et transvaser la anse de platine dans le **bouillon glucosé (Vidéo 7)**.
- * **Inoculer la gélose VF** avec une anse droite stérile en plastique (partie fine et rectiligne) préalablement plongée dans le tube d'ensemencement et réaliser **une piqûre centrale** dans la gélose, jusqu'à environ 2 cm du fond (**Vidéo 8**).
- * **Inoculer par la méthode des quadrants** une gélose sélective (**Vidéo 9**).
- * Déposer les tubes sur le portoir réservé et les boîtes sur les paillasse réservées. Le tout sera incubé à 37 °C sur la nuit.

Expérience 4 : Coloration de Gram

→ Travail à faire sous la flamme SANS GANTS

Les différentes étapes de la réalisation d'un frottis (**Vidéo 6**) sont : i/ l'étalement d'un prélèvement bactérien sur une lame, ii/ le séchage et iii/ la fixation à la flamme. Déposer sur une lame de verre une petite goutte d'eau. Sous la flamme bleue, prélever, à l'aide d'une anse en plastique stérile ou de la anse en platine (à stériliser) une ou plusieurs colonie(s) ou un morceau de colonie suivant la taille. Ecrasez la colonie dans la goutte d'eau comme expliqué dans la **vidéo 6**.

Laissez sécher à l'air avant de fixer la préparation à la chaleur en passant la lame 3 fois sur la flamme éclairante (cellules vers le haut). Le passage doit être rapide (1 s pour l'ensemble de la lame), et effectué d'un mouvement continu (la lame chauffée doit pouvoir être tenue dans la main sans ressentir de douleur).

→ Travail à faire SANS la flamme et avec les gants

- * Plongez la lame dans la solution de cristal violet pendant 1 min.
- * Jetez le colorant dans le cristalliseur à cet effet et rincer délicatement à l'eau dans le cristalliseur.
- * Plongez la lame dans la solution d'iode (agent mordant) pendant 1 min.
- * Jetez le colorant dans le cristalliseur à cet effet et rincer délicatement à l'eau dans le cristalliseur.
- * Décolorez avec le mélange alcool-acétone pendant 10 sec.
- * Rincez délicatement à l'eau dans le cristalliseur.
- * Plongez la lame dans la safranine pendant 1 min.
- Jetez le colorant dans le cristalliseur à cet effet et rincer délicatement à l'eau dans le cristalliseur.

→ Travail à faire sous la flamme SANS LES GANTS.

- * Séchez le dessous de la lame et le tour du frottis (papier essuie-tout, papier buvard, air). Le frottis peut être repassé à la flamme

➔ **Travail à faire SANS la flamme SANS LES GANTS.**

* Observez la lame à l'objectif 4 puis 10 puis 40. Basculez l'objectif entre 40 et 100, mettez une goutte d'huile et basculez l'objectif 100 X à immersion. Réglez avec la visse micrométrique.

A la fin de séance

* Les lames seront jetées dans le cristalliseur prévu à cet effet, les objectifs du microscopes seront nettoyés au papier Joseph dans l'ordre du grossissement croissant.

* Les paillasses du Gram seront nettoyées : pas de gants ou de papiers qui traînent, les pots seront refermés.

* Les paillasses nettoyées à l'éthanol, les mains lavées au savon

Séance 4

Expérience 1 : Effets de facteurs environnementaux sur la croissance bactérienne (suite)

Vérifier que la DO est à une longueur **d'onde de 550 nm**. **Le Zéro est systématiquement fait avec le BN nonensemencé** (Mesure d'Abs : pour NaCl de concentration la plus faible à la plus haute).

Vous pouvez verser le liquide de vos tubes directement dans les cuves sans utiliser de pipette. Rincer entre deux souches ou utiliser deux cuves.

Pour que les valeurs de DO puissent être comparées, elles doivent être inférieures à 1,5. Des dilutions seront peut-être nécessaires pour certaines cultures. Elles seront effectuées après une première estimation de la DO_{550} et réalisées dans du milieu BN.

Tracer la courbe Concentration cellulaire = f(température ou pression osmotique) pour chacune des souches.

Expérience 2 : Détermination de caractéristiques du métabolisme bactérien (suite)

Noter les résultats obtenus avec les tubes de bouillon glucosé, de gélose VF et gélose sélective. Vous pouvez utiliser **des tubes ou des boîtes témoins pour prendre des photos et comparer** les milieux.

Expérience 3 : Mise en évidence de l'existence de peroxydase/catalase

A partir des boîtes de cultures obtenues en séance 3, après avoir mis vos lunettes de protection et des gants, **déposez une ou deux gouttes de la solution de peroxyde d'hydrogène** fournie **directement sur une colonie isolée**. **Observez** l'apparition ou non d'un dégagement gazeux.

A la fin de cette étape

* Mettre environ 1 cm d'Ethanol 70 % dans tous les tubes d'ensemencement et les tubes de culture. Attendre 10 min. Pendant ce temps, effacer à l'éthanol les inscriptions sur les tubes. Vider dans l'évier et séparer Tubes et bouchons.

* Mettre de l'Ethanol 70 % dans les cuves puis les vider dans l'évier et les jeter à la poubelle

* Mettre les boîtes et tubes bouillons glucosés, VF et gélose sélective à l'emplacement indiqué par l'enseignant

* Rangez et nettoyez votre paillasse : la anse de platine doit être flambée, les anses plastiques et la pipette (sans son emballage) doivent être mis dans la poubelle "plastiques contaminé"

* Rangez votre siège et lavez la paillasse à l'éthanol (PAS DE FLAMME !!!)