

TP n°12 TP Contrôle

Jour 1

Travail sur la soucheensemencée sur GNI (notée S1 à S14) :

- 1 - Préparer une suspension bactérienne de cette souche.
- 2 - Observer la souche sur frottis coloré par la technique de Gram.
- 3 - Effectuer le test enzymatique nécessaire (catalase ou oxydase)
- 4 - Proposer une orientation pour la famille de cette souche et suggérer une galerie de milieux permettant de vérifier cette orientation.
- 5 - Ensemencer la galerie fournie.

Travail sur bouillon (noté B1 à B14) :

- 1 - Réaliser les observations microscopiques
- 2 - Proposer 3 milieux d'isolement intéressants pour cette culture, en justifiant vos choix.
- 3 - Réaliser des isollements sur les différents milieux fournis.

Travail sur la Salmonella fournie sur GNI (noté 1 à 14) :

- 1 - Déterminer le sérotype de la Salmonella fournie.

Milieux mis à disposition

1° Travail sur la souche isolée sur gélose (notée S1 à S14) :

- GO
- VF
- 2 Hugh et Leifson, en surfusion
- Clark et Lubs
- Citrate de Simmons
- Hajna-kligler
- Mannitol-Mobilité Nitrate
- bouillon nitraté
- film photographique
- urée tryptophane

2° Travail sur bouillon (noté M1 à M14) :

- GO
- BCP
- Hektoen
- VBRP

Travail sur la souche isolée sur gélose (notée S1 a S15) :

1 - Lire les différents milieux ensemencés :

- GO
- VF
- Hugh et Leifson
- Clark et Lubs
- Citrate de Simmons
- Hajna-kligler
- LDC / ODC / ADH
- Mannitol-Mobilité Nitrate
- bouillon nitrate
- film photographique
- urée tryptophane

2 - Identifier l'espèce étudiée à l'aide des résultats de la galerie (par une démarche dichotomique)

Travail sur bouillon (noté M1 à M15) :

1 - Lire les différents milieux ensemencés :

- GO
- BCP
- Hektoen
- VBRP

Faire les observations microscopiques ainsi que les tests nécessaires à l'analyse des colonies observées. On poussera l'étude au maximum sur les colonies suspectes d'être des *Salmonella* sur les milieux Hektoen ou VBRP.

Reprendre l'ensemble des résultats au sein d'un tableau comprenant, en ligne, les différents milieux et tests effectués, et en colonne, la ou les souches isolées du bouillon.

2 - Conclure quant au genre ou à la famille du ou des germes isolés du bouillon.

CALCULS DE FREQUENCES D'APPARITION DE PROFILS ET DE % D'IDENTIFICATION

BASE DE DONNEES

	Lac	H2S	ODC	VP
P. mirabilis	1	75	99	1
P. siuartii	1	2	2	10
S. Paratyphi A	1	1	99	0
Souche étudiée	-	-	+	-

FREQUENCE D APPARITION DES REACTIONS ET DU PROFIL dans le cas de la souche étudiée en tenant compte des risques d'erreur de lecture

* Formule pour calculer la fréquence d'apparition d'une réaction

$$F+ = P+ (1-10^{-3}) + (10^{-3} \times P-)$$

ATTENTION : $P+ = \text{base de donnée} / 100$

$$F- = P- (1-10^{-2}) + (10^{-2} \times P+)$$

$P- = (100 - \text{base de donnée}) / 100$

On calculera F+, si la souche étudiée présente un test positif et F- si ce test est négatif.

* Formule pour calculer la fréquence d'apparition du profil de la souche (Profil observé)

FPO = produit des fréquences des différentes réactions composant le profil observé

	Lac	H2S	ODC	VP	FPO
P. mirabilis	0,980	0,255	0,989	0,980	0,24231
P. siuartii	0,980	0,970	0,021	0,892	0,01778
S. Paratyphi A	0,980	0,980	0,989	0,990	0,94074
			Somme des FPO =		1,20084

POURCENTAGES D'IDENTIFICATION

$$\% = (\text{FPO} / \text{somme des FPO}) \times 100$$

P. mirabilis	20,18	
P. siuartii	1,48	
S. Paratyphi A	78,34	Correspond à la souche étudiée avec une bonne identification
	100,00	

FREQUENCE D'APPARITION DES REACTIONS ET DU PROFIL dans le cas de la souche étudiée Sans tenir compte des risques d'erreur de lecture

* Formule pour calculer la fréquence d'apparition d'une réaction

$$F+ = P+$$

ATTENTION : $P+ = \text{base de donnée} / 100$

$$F- = P-$$

$P- = (100 - \text{base de donnée}) / 100$

On calculera F+, si la souche étudiée présente un test positif et F- si ce test est négatif.

* Formule pour calculer la fréquence d'apparition du profil de la souche (Profil observé)

FP = produit des fréquences des différentes réactions composant le profil

	Lac	H2S	ODC	VP	FPO
P. mirabilis	0,990	0,250	0,990	0,990	0,24257
P. siuartii	0,990	0,980	0,020	0,900	0,01746
S. Paratyphi A	0,990	0,990	0,990	1,000	0,97030
			Somme des FPO =		1,23034

POURCENTAGES D'IDENTIFICATION

$$\% = (\text{FPO} / \text{somme des FPO}) \times 100$$

P. mirabilis	19,72	
P. siuartii	1,42	
S. Paratyphi A	78,86	Correspond à la souche étudiée avec une bonne identification
	100,00	

SUIVI DE CROISSANCE D'E. coli

Jour 1

Étude de la linéarité de la densité optique à 600 nm

1) Compléter la tableau ci-dessous, de sorte à réaliser une gamme de dilution de raison 2 de la préculture, en tubes à hémolyse. Faire en sorte d'obtenir 2 mL en final.

Dilution (d)	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/3	1/6
Bouillon cœur-cervelle stérile (mL)									
Préculture (mL)									
Dilution précédente (mL)									
DO à 600 nm									

2) Faire les mesures de densité optique à 600 nm, en utilisant un blanc adapté.

3) Tracer la courbe : $DO = f(d)$. En déduire le domaine de linéarité de la densité optique.

Détermination du volume d'inoculum

1) Déterminer la valeur théorique de l'absorbance de la préculture.

2) En déduire le volume d'inoculum nécessaire pour ensemercer l'erlenmeyer contenant 100mL de bouillon cœur-cervelle, de sorte à obtenir une densité optique initiale = 0,1.

Réaliser l'inoculation et voir la partie « Traitement des échantillons »

Dénombrement de la préculture

1) Déterminer le titre approximatif de la préculture, sachant que $1 U_{DO600} = 2.10^9$ B/mL

2) Déterminer la dilution qui serait comptable (obtention de 15 à 300 colonies) par une technique de dénombrement dans la masse (inoculation d'1 mL).

3) Réaliser une gamme de dilution de raison 10 de la préculture, de sorte à effectuer le dénombrement (seules les 3 dernières dilutions seront ensemençées - faire en sorte qu'elles encadrent la dilution déterminée en 2)).

4) Effectuer le dénombrement en gélose PCA, par inoculation d'1 mL dans la masse, puis addition d'une double couche. Tester les 3 dernières dilutions ,(faire 2 essais par dilution.

Incuber 24 H à 37°C.

Traitement des échantillons - Suivi de la croissance sur 120 minutes (minimum)

A partir du temps T_0 qui suit l'inoculation, puis toutes les 20minutes, prélever 3mL de la culture et les placer dans la glace.

1) Transvaser 1 mL en tube eppendorf et centrifuger 5 minutes. Récupérer le surnageant dans un nouvel eppendorf. Identifier et congeler, en vue d'effectuer le dosage du glucose en J2.

2) Mesurer l'absorbance de la culture à 600 nm, en effectuant une dilution préalable si nécessaire, de sorte à se maintenir dans le domaine de linéarité. Compléter le tableau ci-dessous.

3) Tracer la courbe : $\ln(DO_{600} \text{ corrigée}) = f(\text{durée})$.

4) Identifier sur le graphe les différentes phases de la croissance.

5) Déterminer graphiquement la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle $Q_{x_{\text{expo}}}$, ainsi que le temps de génération G.

Fin du suivi de croissance

Après le dernier prélèvement :

1) Effectuer un isolement sur GO de sorte à contrôler l'absence de contamination de la culture. Incuber 24 H à 37°C.

Heure									
Durée (min)									
Dilution éventuelle									
DO ₆₀₀ mesurée									
DO ₆₀₀ corrigée									
Ln (DO ₆₀₀ corrigée)									

Jour 2

Contrôle de pureté

Vérifier l'absence de contamination de la culture.

Dénombrement de la préculture

1) Compléter le tableau ci dessous avec vos résultats :

Dilutions étudiées	10 ⁻	10 ⁻	10 ⁻
UFC sur la boîte 1			
UFC sur la boîte 2			
Moyenne			

2) Calculer le titre de la préculture et en déduire la correspondance entre la DO_{600nm} et la concentration bactérienne.

Dosage du glucose

1) Décongeler les tubes eppendorf.

2) Procéder à la déprotéinisation des échantillons: dans de nouveaux tubes eppendorf déposer :

- 900µL de TCA 20%

- 100µL d'échantillon.

Réaliser de même avec l'étalon glucose.

Homogénéiser soigneusement par retournement et centrifuger 5 min.

3) Compléter le tableau ci dessous et réaliser le dosage en suivant les instructions de la fiche technique « Glucose RTU » (faire le dosage directement en microcuvettes).

Rmq : [glucose]_{étalon} = 1 g.L⁻¹

	Blanc réactif	Étalon	Milieu CC	T ₀	T ₂₀	T	T	T	T	T
Étalon										
Échantillon										
Réactif										
Homogénéiser - incuber 20 min à température ambiante										
Absorbance 505 nm										
[glucose] g/L										

4) Sur le même graphe que la courbe de croissance précédente, tracer la courbe

$$[\text{glucose}] = f(\text{durée})$$

Interpréter l'aspect obtenu

5) Déduire de cette étude :

- Le rendement en biomasse par rapport au substrat :