

TP n°24 TP Contrôle

Jour 1

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

Une souche de levure, obtenue comme contaminant au sein d'une laiterie, a été ensemencée sur milieu Sabouraud + chloramphénicol. Vous devez procéder à son identification.

1. Réaliser une coloration de Gram. Observer.
2. Test de blastèse : Ensemencer un milieu pour blastèse (léger trouble). Laisser incuber 2h à 37°C.
Vous disposez également d'un témoin positif ensemencé en début de TP - le demander à l'examineur.
Observer le témoin positif (montrer une structure intéressante), puis la souche à identifier (montrer).
3. En tenant compte de l'ensemble des observations, proposer une orientation pour cette souche.
4. Ensemencer la galerie d'identification proposée.

Travail sur une moisissure (noté 1 à 15) :

Une moisissure a envahi la souche de *Penicillium roquefortii* habituellement utilisée pour ensemencer les fromages à pâte persillée. Vous devez proposer une orientation pour l'identification de cette moisissure (nom de genre).

1. Faites une observation macroscopique de cette moisissure.
2. Observer la moisissure au microscope après coloration au bleu coton (technique du drapeau ou dilacération)
3. Proposer une orientation pour l'identification de cette souche de moisissure.

Dosage de pénicilline dans un lait :

Un lait contenant des antibiotiques est impropre à la consommation humaine. Il est aussi dangereux en fromagerie car il peut inhiber le développement des levains lactiques utilisés pour la fabrication.

La pénicilline est l'antibiotique le plus souvent utilisé pour le traitement des mammites. Elle peut être dosée dans le lait par la méthode de diffusion en milieu gélose, avec une suspension de *Staphylococcus aureus* comme organisme test.

1. Préparation de la gélose pour antibiogramme

Préparer une suspension de *Staphylococcus aureus* à 0,5 MacFarland (qui correspond à environ 1.10^8 bactéries/mL).

Diluer cette suspension et ensemencer un volume V de suspension diluée dans la gélose en surfusion de manière à obtenir une concentration finale d'environ 5.10^4 bactéries/mL ($0,1\text{mL} < V < 1\text{mL}$). Couler le milieu en boîte de Pétri. Laisser solidifier.

Préciser sur le compte-rendu la dilution effectuée et le volume utilisé pour l'ensemencement de la gélose

2. Répartition des disques

Répartir 8 disques de papier filtre stériles.

3. Préparation des dilutions du lait témoin.

Compléter le tableau ci-joint pour réaliser une gamme de dilution de raison 2 du lait témoin.

Préparer cette gamme de dilution en tube eppendorf.

4. Dépôt des échantillons

Déposer sur les disques 5µL du lait à tester ainsi que du lait témoin pur et de ses 2 dilutions (réaliser chaque essai en double).

La répartition des dépôts se fera de manière aléatoire. Incuber 24 h à 37°C.

Schématiser la boîte de Pétri avec l'emplacement des disques et les dépôts correspondants (repère sur la boîte)

MILIEUX MIS A DISPOSITION

Pour le dosage de Pénicilline dans le lait

- Echantillon de lait à doser
- solutions pure contenant 1mg/mL de pénicilline
- Culture de Staphylococcus aureus sensible, sur GNI
- Tube contenant 5mL d'eau physiologique
- Témoin MacFarland 0,5
- Gélose pour antibiogramme maintenue en surfusion (50 mL)
- Tubes contenant 9 mL d'eau physiologique
- Tubes eppendorf
- Boîte de Pétri carrée
- Disques de papier filtre stériles
- Pipettes automatiques et cônes stériles

1° Réalisation de la gamme de dilution du lait témoin

	Lait témoin pur	Lait témoin dilué au 1/2	Lait témoin dilué au 1/4
Lait pénicilline			
Diluant (eau physiologique)			
Concentration finale en pénicilline			

Volume final attendu pour chaque dilution : minimum 500µL

MILIEUX MIS A DISPOSITION

Pour l'identification de la levure

- 1 gélose Sabouraud (pour isolement)
- 3 CTA, en surfusion (pour réaliser zymogramme)
- 1 Gélose pour auxanogramme en surfusion
- 1 Gélose inclinée Sabouraud + chloramph. + tétrazolium
- 1 Gélose inclinée Sabouraud + chloramph. + actidione

Réactifs :

+ solutions de sucres à 30% :

- glucose
- maltose
- saccharose
- galactose
- lactose
- raffinose

Matériel :

- + boîte de Pétri stérile
- + disques stériles
- + 1 pipette automatique p20 + cônes jaunes stériles (6)
- + 1 tube d'eau stérile 10 mL

1° Réalisation du test zymogramme

Compléter les géloses CTA avec les sucres à étudier de sorte à avoir une concentration finale à 2%.

Sucres à tester : Glucose, Maltose, Saccharose.

Ensemencer par piqûre centrale avec une pipette bien chargée en culture et en prenant soin d'aller jusqu'au fond du tube.

Incuber 24 à 48h à 30°C.

2° Réalisation du test auxanogramme

Réaliser une suspension dense de la culture de levure : 2 anses dans 1 cm³ (≈ susp. de niveau 3 MacFarland.)

Ensemencer directement en incorporant la suspension dans le milieu pour auxanogramme (5 gouttes pour 20mL de milieu) puis couler en boîte de Pétri.

Répartir 6 disques de papier filtre stériles. Les disques doivent être distants d'au moins 15mm.

Ajouter ensuite les sources de carbone en imprégnant les disques avec les sucres à étudier : 5µL d'une solution à 10%. Cette manipulation sera réalisée au niveau d'une paillasse spécialisée.

Sucres à tester : Glucose, Maltose, Saccharose, Galactose, Lactose, Raffinose.

Incuber : 24 à 48h à 30°C.

Remarque : faire un schéma de la boîte sur la copie.

Jour 2

Identification de la souche de levure :

1. Lire les différents milieux ensemencés :
 - 1 gélose Sabouraud
 - 3 CTA + sucre
 - 1 Gélose pour auxanogramme
 - 1 Gélose inclinée Sabouraud + chloramph. + tétrazolium
 - 1 Gélose inclinée Sabouraud + chloramph. + actidione

Reprendre l'ensemble des résultats au sein d'un tableau.

2. Conclure sur l'identité de la souche de levure étudiée.

Dosage de pénicilline dans un lait :

1. Mesurer les diamètres des zones d'inhibition de croissance autour des différents dépôts. Reprendre l'ensemble des résultats au sein d'un tableau.

2. Tracer la droite de correspondance entre le diamètre de la zone d'inhibition et le log de la concentration en antibiotique sur le disque, (ou déterminer l'équation de cette droite en expliquant votre démarche) :

$$\text{Log } c = f(D)$$

3. En déduire la concentration en antibiotique dans le lait à tester.

Tableau 1 - Galerie levures

Tableau 2 - Auxanogramme du carbone

Espèces de levures	GERMINATION 1	UREASE 2	REDUCTION TETRAZOLIUM 3	SENSIBILITE A L'ACTIDIONE 4	ZYMOGRAMME			Glucose 1	Maltose 2	Saccharose 3	Galactose 4	Lactose 5	Rafinose 6	Inositol 7	Cellobiose 8	Xylose 9	Trehalose 10	Arabinose 11	Adonitol 12	2-carogulonique 13	Méthyl-2-glucosose 14	Mélairose 15	N-Acetyl-glucosamine 16
					5	6	7																
<i>Candida albicans</i>	-	-	Bianche/Rose (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	+V	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> (Var stellatoidea)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida pseudotropicalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	V	-	V	-	-	-	-	-
<i>Candida krusei</i>	-	-	Bianche	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	Bianche/Rose	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	Rose/Bianche	S	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida lusitanae</i>	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+V	-	-	-	-	-	-	+V	-
<i>Candida viswanathii</i>	-	-	Bianche/Rose	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Torulopsis glabrata</i>	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Torulopsis candida</i>	-	-	Bianche	S	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	Bianche/Rose	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	V	V	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	Bianche	S	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	V	-	V	V	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	-	-	Bianche	S	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	Bianche	S	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	V	-	-	V	V	-
<i>Cryptococcus terreus</i>	-	-	Bianche	S	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	Bianche	V	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	V	-	-
<i>Rhodotorula rubra</i>	-	-	Rose (2)	V	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	V	-	-	V	V	-	-	-	-
<i>Trichosporon beigeli</i> (cutaneum)	-	-	Bianche	V	-	-	-	-	-	-	-	-	+V	+V	+V	-	+V	-	-	-	V	V	V
<i>Trichosporon capitatum</i>	-	-	Bianche	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-
<i>Trichosporon pullulans</i>	-	-	Bianche	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gectrichum candidum</i>	-	-	Bianche	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(1) Coloration rose en cas d'inoculum très dense
 (2) Coloration due au pigment

+ positif - négatif V variable

R résistant S sensible