

TP6 Cinétiques de bactéricidie d'un agent anti-microbien

1. Cinétique de bactéricidie de l'éthanol

On cherche à déterminer la cinétique de bactéricidie de l'éthanol à 18% sur une souche de *E. coli* par une méthode semi-quantitative de dénombrement.

1.1. Évaluation de la concentration de la suspension bactérienne

La souche testée, *E. coli*, est fournie sous forme d'une culture de 18h. Mesurer l'absorbance de la culture (ou d'une dilution) et évaluer grossièrement la concentration microbienne sachant que 0,1 UA correspond à 10^8 cellules/mL (limite de linéarité : 0,6 UA).

1.2. Étalonage de la méthode semi-quantitative de dénombrement

Effectuer les dilutions décimales nécessaires de la culture, en eau physiologique stérile (tubes 9 mL).

Pour chaque dilution testée:

Prélever 10 μ L à l'anse calibrée ou à la pipette automatique

Déposer sur gélose PCA coulée et sèche, sous la forme d'une strie de 5 cm, en effectuant plusieurs aller retour à l'anse de façon à bien « décharger » les 10 μ L. Laisser sécher la boîte, incuber à 37°C.

On peut réaliser 3 à 4 stries par boîte. Il est important que le geste effectué soit reproductible.

Ne tester que les dilutions à partir de 10^{-2}

Une boîte peut être utilisée comme « brouillon » pour tester le geste.

1.3. Cinétique de bactéricidie

Attention : l'éthanol est inflammable, ne pas l'approcher de la flamme ; lors du pipetage, l'alcool s'écoule très vite, penser à déboucher les tubes au préalable.

- L'éthanol est fourni pur (éthanol absolu). Préparer un volume suffisant d'éthanol à 20% (attention : tenir compte de la dilution ultérieure de l'éthanol)

Introduire 9 mL de solution d'éthanol à 20% dans un tube à essai stérile.

- Ajouter 1 mL de suspension bactérienne non diluée = temps t_0 .

- Aux intervalles de temps imposés, prélever 1 mL du mélange, le transférer immédiatement dans un tube de 9 mL de diluant-neutralisant (e_au stérile). Homogénéiser.

- Ensemencer 10 μ L sous forme d'une strie de 5 cm (voir plus haut). Incuber à 37°C

- Tester $\Delta t = 2$ min; 5 min; 8 min; 12 min; 20 min; 30 min

Remarque : on considère que pour l'éthanol, la dilution au 1/10ème est suffisante pour neutraliser l'action de l'éthanol.

Compte rendu

1) Déterminer la concentration en éthanol à préparer en tenant compte de la dilution imposée par le protocole.

2) Donner les résultats de l'évaluation spectrophotométrique de la concentration microbienne. Justifier le choix des dilutions testées.

3) Étalonage de la méthode semi-quantitative de dénombrement :

Présenter les résultats sous forme de tableau (ordre de grandeur des résultats attendus et résultats obtenus)

Pourquoi est-il inutile de tester 10^0 et 10^{-1} ?

4) Cinétique de bactéricidie

Présenter les résultats obtenus. Donner pour les boîtes comptables le taux de survivants (comparaison avec le dénombrement semi-quantitatif) ; en déduire un ordre de grandeur du temps de réduction décimal D de *E. coli* vis à vis de l'éthanol. Si l'alcool n'avait aucun effet sur la souche d'*E. coli*, quel serait le résultat du test ?

5) Comment faudrait-il s'assurer expérimentalement de la validation de la méthode de dilution - neutralisation ? Proposer un protocole.

2. Évaluation de l'activité bactéricide des rayons ultra-violet. Mise en évidence de leur effet mutagène.

On étudie l'effet bactéricide des rayons U.V. sur des cellules de levure *Saccharomyces cerevisiae*. La souche est haploïde, de type a, prototrophe. Elle est fournie en phase de croissance exponentielle sur milieu YPD.

2.1. Préparation des cellules à exposer aux U.V.

Couler 11 boîtes de milieu YPD, les faire sécher.

Déterminer la concentration en levures de la culture fournie par dénombrement en cellule de Malassez. À partir de cette culture, réaliser des dilutions permettant d'obtenir 5 suspensions à $1,5 \cdot 10^6$; $1,5 \cdot 10^5$; $1,5 \cdot 10^4$; $1,5 \cdot 10^3$; $1,5 \cdot 10^2$ cellules parmi.

Une série de 6 boîtes notées N serviront de témoins de numération et ne seront pas exposées aux UV.

Une série de 5 boîtes notées UV seront soumises à la mutagenèse et donc exposées aux UV.

Étaler avec des billes de verre 0,1 mL de suspension convenable en surface des boîtes de façon à ce que le nombre de colonies soit :

N1	N1'	N2	N2'	N3	N3'
$1,5 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^2$	15	15
UV1	UV2	UV3	UV4	UV5	
$1,5 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	

2.2. Exposition aux U.V.

Précautions : ne pas s'exposer aux UV, porter des lunettes et des gants s'assurer de la présence d'un écran plastique devant la lampe.

Procédure générale :

- allumer la lampe à l'avance pour que le rayonnement soit régulier. La hauteur de la lampe est fixe et préétablie ; ne pas la modifier car elle détermine l'activité bactéricide.
- positionner la boîte fermée à exposer exactement à la verticale de la source UV. Le plastique est un écran, la phase d'exposition ne débute que lorsque le couvercle est ôté.
- respecter précisément (à la seconde près) la durée d'exposition ; elle s'achève lorsque le couvercle est repositionné.
- les durées d'exposition seront : 8, 16, 20, 28, 32 secondes

Toutes les boîtes sont incubées à °C.

Compte rendu

- 1) Résultat du dénombrement en cellule de Malassez ; dilutions effectuées
- 2) Résultats des numération des boîtes témoins N :
Comparer dans un tableau le nombre d'UFC attendu, le nombre d'UFC obtenu.
- 3) Résultats des numération des boîtes témoins UV. Présenter à l'aide d'un tableau le nombre N_0 de levures attendu s'il n'y avait aucune mortalité, (utiliser le résultat réel du dénombrement), le nombre N de levures obtenues (survivantes), le taux de survivants N/N_0 puis le $\text{Log}N/N_0$.
Tracer la courbe N/N_0 en fonction de t (temps d'exposition) sur papier semilog. Tracer la courbe $\text{logio } N/N_0$ en fonction de t.
Montrer que la cinétique de destruction par les UV est une cinétique d'ordre 1.
Déterminer la constante k puis le temps de réduction décimal D_T .
- 4) Quelle est la durée d'exposition nécessaire à une bactéricidie (obtenue pour une réduction décimale de 10^5).

2.3. Mise en évidence de l'effet mutagène des U.V.

(24/01 et lecture 31/01)

Les UV ont un effet létal, bactéricide, mais ils ont aussi un effet mutagène sur les cellules survivantes. Certains mutants auxotrophes adénine - sont facilement repérables car donnent des colonies rouges sur gélose YPD.

D'autres mutants dits RD (respiratoires déficients) sont repérables par la taille plus petite des colonies (1 à 2 mm au mieux de 4 à 5 en 48h), et leur couleur blanche alors que les colonies de la souche sauvage sont teintées crème.

Cette petite taille est due à l'absence de respiration, le métabolisme est alors obligatoirement fermentaire or la fermentation est moins efficace en terme de rendement que la respiration. La couleur blanche serait liée à la disparition des cytochromes de la chaîne respiratoire qui sont des molécules pigmentées. Les mutants RD apparaissent spontanément à la fréquence de 1% sur milieu complet mais l'action des UV permet d'augmenter ce taux.

On peut mettre en évidence les mutants auxotrophes par réplique sur velour d'une boîte exposée au UV sur 2 milieux :

- une gélose YPD
- une gélose YNB^{wo/aa} minimum

Choisir la boîte qui contient environ 1% de survivants (soit.....colonies pour $1,5 \cdot 10^4$ déposées). Réaliser la réplique à l'aide d'un tampon recouvert de velours stérile. Incuber les 2 boîtes 48h à 30°C.

Résultats :

Repérer les colonies auxotrophes.

Repérer les colonies auxotrophes mutantes adénine - (rouges sur YPD).

Compte rendu

- 1) Discuter la composition du milieu YNB^{wo/aa} minimum ; quelles levures poussent sur ce milieu ? quelles levures poussent sur milieu YPD ? Définissez les termes utilisés.
- 2) Expliquer à l'aide de l'annexe 2 la coloration rouge des colonies de mutants ade1 ou ade2
- 3) Résultats obtenus concernant l'obtention de mutants auxotrophes ou RD.

Annexe 1: Composition des milieux

- **Milieu YPD** (Yeast Peptone Dextrose) :
composition pour 1L : extrait de levure 10g; bactopeptone 10 g; glucose 20g.
- **Gélose YNB^{wo/aa} minimum** (Yeast Nitrogen Base) :
Composition pour 1L : base YNB sans acides aminés ni sulfate d'ammonium 1,7g; sulfate d'ammonium 5g; glucose 20g; agar 20g.
La base YNB est formée, d'un cocktail de vitamines à des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$, d'éléments minéraux KH_2PO_4 0,85g; K_2HPO_4 0,15g; $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g; NaCl 0,1g; $\text{CaCl}_2,6\text{H}_2\text{O}$ 0,1g pour 1L et de traces de microéléments.

Annexe 2

Explication : la coloration rouge est due à l'accumulation d'un produit coloré (dérivé d'un intermédiaire nommé AIR pour phosphoribosyl aminoimidazole) La mutation des gènes *ade1-* et *ade2-* entraîne le blocage de la chaîne de biosynthèse de l'adénine mono phosphate à partir du prpp (phosphoribosylpyrophosphate). Il s'accumule un métabolite intermédiaire qui en présence d'oxygène prend une coloration rouge.

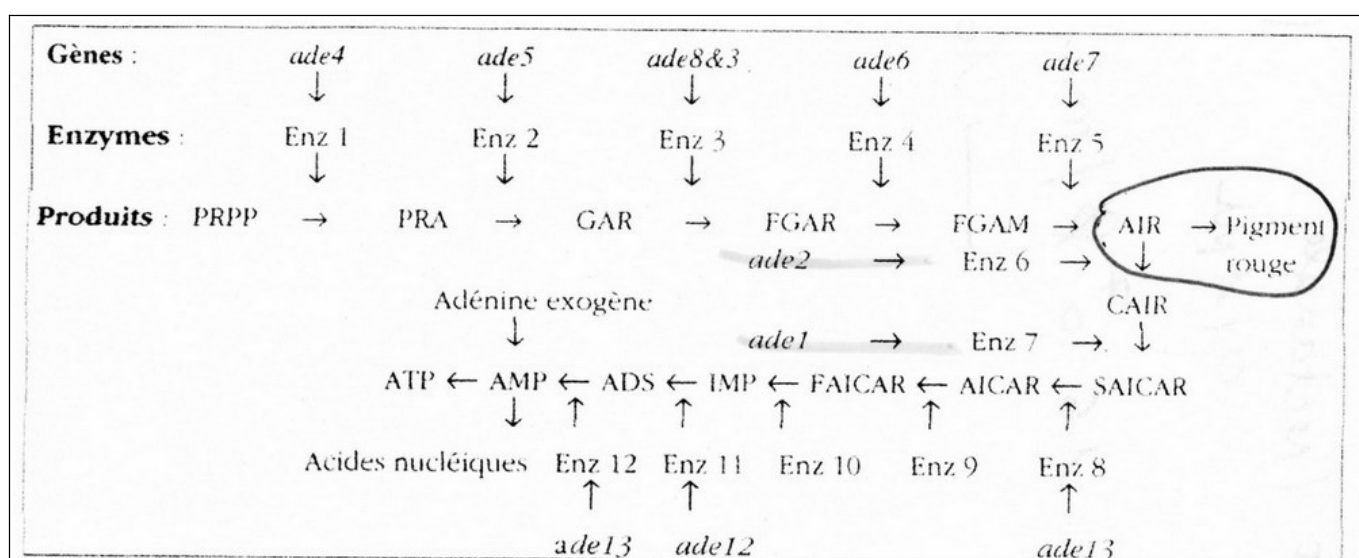


Figure 2 : chaîne de biosynthèse de l'adénine.

PRPP : phosphoribosyl pyrophosphate ; **PRA** : 5-phosphoribosylamine ; **GAR** : glycinamide ribotide ; **FGAR** : formyl glycinamide ribotide ; **FGAM** : formyl glycinamide ribotide ; **AIR** : phosphoribosyl aminoimidazole ; **CAIR** : 5-amino 4-carboxyimidazole ribotide ; **SAICAR** : 5-amino 4-succinocarboxy imidazole ribotide ; **AICAR** : 5-amino 4-carboxamide imidazole ribotide ; **FAICAR** : 5-formamido 4-carboxamide imidazole ribotide ; **IMP** : inosine monophosphate ; **ADS** : adénylo succinate ; **AMP** : adénosine monophosphate ; **ATP** : adénosine triphosphate.