

TP contrôle 2

Jour 1

1. Préparation et dénombrement d'une suspension de conidies de Fusarium

La manipulation consiste à réaliser une suspension de spores d'une moisissure: Fusarium. Les spores sont nommées conidies et présentent un aspect allongé, en forme de fuseau.

Une numération en milieu gélose est alors réalisée après une estimation de la concentration en conidies en cellule de Malassez.

1.1. Matériel

- Culture de Fusarium sur gélose Sabouraud
- 120 mL de gélose Sabouraud + chloramphénicol en surfusion
- 6 boîtes de pétri vides stériles
- 1 tubes de 10 mL d'eau physiologique stérile
- pipettes paille ou graduées de 1 mL stériles
- à disposition : P1000 et tubes d'eau physiologique 5 mL, 9mL et 10 mL
- Cellule de Malassez

1.2. Préparation de la suspension F de conidies de Fusarium

Déposer 10 mL d'eau physiologique stérile à la surface de la culture de Fusarium sur gélose Sabouraud. Imbiber très délicatement de mycélium à l'aide d'un râteau stérile. Laisser en contact une dizaine de minutes en agitant de temps en temps. Récupérer quelques mL de la suspension dans un tube à hémolyse.

Effectuer le dénombrement des conidies en cellule de Malassez ; dénombrer au moins 200 conidies. (montrer un champs microscopique à l'examineur). Évaluer la concentration en conidies par mL de suspension F (Document 1 à disposition : quadrillage de la cellule de Malassez).

1.3. Dénombrement des conidies en milieu gélose

Réaliser les dilutions décimales nécessaires de la suspension F en vue d'un dénombrement en milieu gélose (faire vérifier le choix des dilutions par l'examineur). On vise un nombre compris entre 15 et 150 pour la dilution centrale. Le milieu utilisé est une gélose Sabouraud + chloramphénicol. Réaliser 2 par dilution, sans double couche. Incuber 24 à 48h à 30°C.

Compte rendu

Exposer le résultat du dénombrement en cellule de Malassez et le calcul de la concentration en conidies par mL de suspension F. Justifier le choix des dilutions testées.

2. Identification d'un contaminant

2.1. Matériel

- Contaminant présenté sur GNI
- Colorants de gram
- Oxydase/catalase

2.2. Manipulation

Au cours d'une analyse dans le stock de levain, on a isolé une souche microbienne indésirable. Afin d'intervenir rapidement, le laboratoire demande une identification systématique.

La souche est présentée sur gélose nutritive inclinée.

Réaliser une orientation préalable. A la suite des premières analyses, dresser la liste des milieux nécessaires à l'identification complète.

Compte-rendu

Donner le résultat des observations et tests effectués. La liste des milieux demandés est à rendre au

plus tard à 11H30).

NB : les observations microscopiques ainsi que la réalisation des tests biochimiques seront présentés au correcteur.

3. Dosage d'un antibiotique dans le lait

Les antibiotiques administrés aux vaches laitières dans le traitement des mammites se retrouvent dans le lait. Leur présence, indépendamment des inconvénients qu'elle peut avoir pour les consommateurs, risque d'empêcher la fermentation lactique et de créer des difficultés sérieuses en fromagerie. Une précédente recherche a mis en évidence la présence d'ampicilline dans un lait. On se propose de doser cet antibiotique dans un échantillon de lait.

3.1. Matériel

- Culture en bouillon de *Staphylococcus epidermidis* de 18h
- 1 tube de 20 mL de gélose Müller Hinton en surfusion
- 1 tube de 10 mL de bouillon Müller Hinton
- 7 disques de papier filtre stérile
- 1 tube d'ampicilline étalon à 100 µg/mL
- 1 tube de lait à tester
- 5 tubes à hémolyse stériles vides
- P20 et P1000
- 1 anse calibrée

3.2. Préparation de culture de la souche test

On utilise une souche sensible à l'ampicilline de *Staphylococcus epidermidis*. Incorporer dans 20 mL de milieu Müller Hinton maintenu en surfusion à une température convenable une anse calibrée (10µL) de la suspension de) *Staphylococcus epidermidis*. La géloseensemencée est ensuite coulée uniformément dans la boîte de Pétri.

Laisser solidifier. Sécher la boîte 30 minutes (boîte ouverte mais retournée sur le couvercle à l'étuve).



3.3. Préparation de la gamme étalon d'antibiotique

A partir d'une solution d'ampicilline à 100µg/mL, préparer en tubes à hémolyse la gamme étalon suivante :

Numéro du point de gamme	1	2	3	4	5
Solution d'ampicilline (mL)					
Diluant : bouillon MH	4	1	1	1	1
Dilution					
Concentration (en µg/mL)	20	10	5	2,5	1,25

3.4. Dépôt des disques

Déposer régulièrement les disques à la surface de la gélose sèche. Appuyer légèrement avec la pince pour faire adhérer le disque sur la gélose. Imprégner les disques avec 5µL de solution étalon d'ampicilline avec une pipette automatique. Opérer de même avec le lait (deux essais).

Laisser diffuser 30 min à température ambiante. Incuber à 37°C pendant 24 /heures, boîte à l'envers.

Compte rendu

Compléter le tableau indiquant les volumes prélevés pour la réalisation de la gamme.

Représenter sous forme de schéma le dépôt des différents disques et la dilution correspondante.

Document 1

Caractéristiques de la cellule de Malassez

Volume total $V_{\text{tot}} = 1\text{mm}^3$ (soit $1\mu\text{L}$)

100 rectangles de 20 petits carrés

volume v de 1 rectangle = $0,01\text{mm}^3$

Humecter légèrement les plateaux latéraux puis faire adhérer la lamelle en pratiquant un mouvement de va et vient avec les pouces jusqu'à perception d'une résistance (frange irisée).

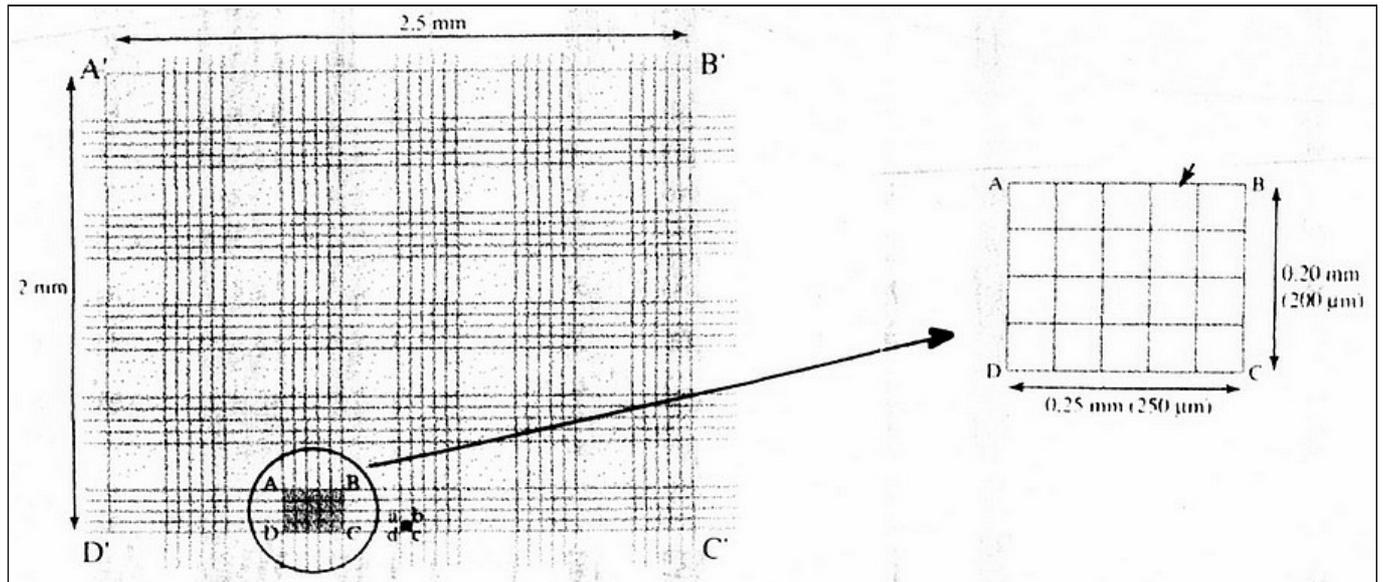
Introduire la suspension, après homogénéisation, en plaçant l'extrémité de la pipette (ou d'un cône) près de la lamelle. Le liquide ne doit pas arriver dans la rigole centrale.

Laisser sédimenter 10 minutes environ.

Observer au $\times 10$ puis au $\times 40$. Vérifier la répartition homogène des cellules.

Le nombre de cellules doit être compris si possible entre 10 et 100 par rectangle. Diluer éventuellement la suspension si ce nombre est trop élevé.

Compter sur un nombre de rectangles correspondant à environ 200 cellules.



1. Préparation et dénombrement d'une suspension de conidies de Fusarium

- 1.1. Donner le résultat du dénombrement dans la suspension de conidies (utiliser la fiche technique 2).
- 1.2. Déterminer l'intervalle de confiance à 95 % du résultat.
- 1.3. Comparer (arbitrairement) ce résultat avec le résultat du dénombrement en cellule de Malassez

2. Identification d'un contaminant

Les cupules de la série de tests dits «d'assimilation» (GLU à PAC) ensemencées avec l'ampoule AUX MEDIUM. Voici la composition de ce milieu :

- | | | |
|--------------------------|----------|-------------|
| - sulfate d'ammonium | 2 g | |
| - agar | 1,5 g | |
| - base minérale | 82,8 mg | |
| - acides aminés | 250 mg | |
| - vitamines | 35,9 mg | |
| - Tampon phosphate 0.04M | pH = 7,1 | qsp 1000 ml |

2.1. Observer la composition du milieu AUXmédium.

- a) Comment peut-on qualifier ce milieu?
- b) Quel est le rôle du sulfate d'ammonium?
- c) Comment s'effectue la lecture des tests d'assimilation; exprimer en une phrase ce que signifie par exemple «GLU +».
- d) Quel est le rôle des acides aminés et vitamines ? Justifier leur présence à des concentrations très faibles.
- e) Les cupules des tests d'assimilation sont ensemencées avec un inoculum très faible (voir fiche technique API 20NE). Pourquoi?
- f) La galerie API 20NE comporte finalement 2 test «GLU». Un test classique, GLU (sous huile) et un test d'assimilation. Comparer la signification de ces deux tests. Quelle relation peut-on écrire entre ces deux tests?

2.2. Lire les milieux ensemencés.

Identifier la souche en utilisant les tableaux (document 2) et la méthode probabiliste (index API 20NE et logiciel APILAB à disposition). Discuter les tests à l'encontre éventuels.

3. Dosage d'un antibiotique dans le lait

Mesurer les diamètres des zones d'inhibition en mm.

Tracer la droite d'étalonnage en portant en abscisse les diamètres et en ordonnée les logarithmes décimaux des concentrations. En déduire la concentration en ampicilline dans le lait.