

TP contrôle 2

Jour 1

1. Étude d'une souche contaminante

Un isolement d'une souche de *E. coli* a été réalisé sur gélose trypticase soja; il apparaît que la souche est contaminée. Le but de la manipulation est

1. d'identifier le contaminant

2. de réaliser une CMI en milieu liquide sur la souche contaminante en vue de d'éliminer la souche en incorporant l'antibiotique à la concentration voulue dans le milieu.

L'antibiotique testé est la pénicilline, *E. coli* est résistant à la pénicilline.

(attention : le prélèvement des colonies servant à la réalisation de la suspension doit être extrêmement soigné de façon à ne pas prélever aussi des cellules d'*E. Coli*).

1.1. Identification du contaminant (40 min + 30 min)

Repérer les colonies du contaminant

Réaliser une coloration de gram (à montrer avec la description)

Réaliser le test enzymatique voulu (à montrer)

Proposer une orientation

Compte rendu: résultats et orientation ; choix de la galerie (à 12h dernière limite). La galerie imposée sera alors distribuée.

Ensemencer la galerie fournie (30 min)

1.2. Détermination de la CMI en milieu liquide (1h)

Réaliser une détermination de CMI en milieu liquide et en microplaque sur la souche contaminante. On impose:

- Les concentrations finales en pénicilline à tester doivent être comprises entre 16 et 0,03µg/mL, avec une progression géométrique de raison 2.
- La solution fournie de pénicilline est à 64µg/mL, les dilutions sont à effectuer en eau stérile et en microplaque.
- Le volume final dans les cupules doit être de 200µL.
- L'inoculum est à réaliser dans du milieu de Müller Hinton double concentration, et doit être de environ 10^6 cellules/mL. On peut l'obtenir simplement en introduisant 10µL (anse calibrée) d'une suspension légèrement trouble dans les 10 mL de Müller Hinton.
- La solution d'antibiotique et l'inoculum en MH seront donc présents dans les cupules volume à volume. L'inoculum doit être distribuée après les dilutions de l'antibiotique. Incuber la microplaque 24h à 37°C.

Compte rendu: réalisation de l'inoculum ; tableau de composition des cupules avec les volumes et les concentrations finales en antibiotique.

2. Détermination du temps de réduction décimal de E.coli vis-à-vis de l'éthanol à 25% (1h 20)

A partir de la culture en bouillon nutritif de la souche, réaliser une suspension calibrée à 10^8 cellules/mL, On tolère une marge d'erreur de 5%. (dilution à faire dans du bouillon stérile)

0,1 UA à 600nm → 10^8 cellules/mL

(montrer la dernière mesure d'absorbance à l'examineur)

-Dénombrement de la culture en milieu gélose

- Réaliser les dilution décimales jusqu'à 10^{-7} . Dénombrer dans la masse en gélose PCA les dilution 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} ; un essai par dilution. Incuber 24h à 37°C.

Cinétique de bactéricidie

L'éthanol est fourni pur (éthanol absolu). Préparer dans un flacon un volume suffisant d'éthanol à% de façon à ce que la concentration finale soit de 25%.

Introduire 9 mL de solution d'éthanol à% dans un tube à essai stérile. Ajouter 1 mL de suspension bactérienne à 10^8 cellules/mL. Aux intervalles de temps imposés, prélever 1mL du mélange, le transférer immédiatement dans un tube de 9 mL d'eau stérile. Homogénéiser.

Dénombrer ensuite 1 mL dû-mélange éventuellement dilué dans la masse selon les indications suivantes :

Temps en minutes	3	6	9	12	15
Dilution à tester	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1} et 10^0	10^0	10^0

Incuber les boîtes 24h à 37°C

Compte rendu

Préparation de la suspension calibrée. Préciser le blanc utilisé.

Matériel et réactifs

- portoir + 4 micro-cuves
- tube de bouillon nutritif stérile
- 7 + 5 + 6 tubes de 9 mL d'eau stérile
- P 1000 + cônes bleus et jaunes + P 200
- 9 boîtes stériles
- 2 tubes de 10 ml d'eau stérile (pour diluer éthanol)
- tube éthanol absolu + flacon rouge vide
- 3 lames
- papier filtre + Joseph
- 1 eppendorf avec pénicilline à $64\mu\text{g.mL}^{-1}$
- 2 tubes hémolyse vide + eau stérile (pour suspension)
- 1 tube de 10 mL de Müller Hinton double concentration
- 1 anse calibrée $10\mu\text{L}$
- 5 pipettes pasteur

Souches

- isolement avec le contaminant
- culture en bouillon d'*E.coli* (bactéricidie)

Surfusion

1 flacon de 150 mL de gélose nutritive

Pour 2

- Microplaques
- Cônes

1. Étude d'une souche contaminante

1.1. Identification du contaminant

Lecture de l'isolement. Quel est l'intérêt de cet isolement ?

1.2. Détermination de la CMI en milieu liquide

Déterminer la CMI de la souche contaminante vis-à-vis de la pénicilline.

On donne les concentrations critiques pour la pénicilline :
conclure

$$C = 16\mu\text{g.mL}^{-1} \qquad c = 0,25\mu\text{g.mL}^{-1}$$

2. Détermination du temps de réduction décimal de *E.coli* vis-à-vis de l'éthanol à 25%

2.1. Résultat du dénombrement de la suspension calibrée :

Comparer dans un tableau le nombre d'UFC attendu, le nombre d'UFC obtenu. Donner le résultat du dénombrement obtenu pour la suspension.

Formule utilisée : norme AFNOR 1996
(retenir les boîtes présentant au plus 300 colonies)

2.2. Résultat de la cinétique

Présenter sous forme de tableau pour les différents temps et dilutions testées ;

- le nombre d'UFC attendu s'il n'y avait aucune mortalité, (utiliser le résultat réel du dénombrement) : bactéries présentes
- le nombre d'UFC obtenues : bactéries survivantes.
- le taux de survivants puis le Log (décimal) du taux de survivants.
- tracer la courbe $L^{\wedge}\text{décimat}$) du taux de survivants en fonction du temps sur papier semilog

2.3. Montrer que la cinétique de destruction par l'éthanol est une cinétique d'ordre 1.
Déterminer graphiquement le temps de réduction décimal D_T .

2.4. Quelle est la durée d'exposition nécessaire à une bactéricidie (obtenue pour une réduction décimale de 10^5).