

## TP contrôle 3

### **1. Recherche et dénombrement des coliphages**

#### **Matériel**

- 4 géloses LB coulées
- 1 flacons top agar en surfusion à 46°C
- P 200 + cônes jaunes
- P 100 + cônes bleus
- P 5000 + cônes blancs
- 1 flacon de bouillon LB stérile
- 1 échantillon d'eau à tester
- 1 échantillon de la souche *E. coli*
- 10 tubes à hémolyses stériles vides
- 3 cuves de 1mL stériles

On souhaite dénombrer dans une eau les bactériophages spécifiques d'*E.coli*. Une première recherche approximative par la méthode des micro-gouttes a montré donné les résultats suivants : 6 plages de lyse dénombrées dans 10 $\mu$ L d'eau diluée à 10<sup>-4</sup>.

Préparation de la suspension phagique: réaliser une série de dilutions décimales en tubes à hémolyse de l'eau à analyser dans du bouillon LB, en fonction du titre estimé (900 $\mu$ L + 100 $\mu$ L).

On testera par la suite 4 dilutions successives.

Le nombre de plages de lyse « idéal » pour le dénombrement est se situe autour de 50 plages par boîte.

#### Préparation de la culture de bactéries sensibles

Ajuster le titre de la culture d'*E.coli* sensible fournie en phase de croissance exponentielle à 2.10<sup>7</sup> cellules/mL (en bouillon LB).

0,1 UA à 600nm  $\rightarrow$  10<sup>8</sup> cellules/mL avec une limite de linéarité à 0.6UA.

Dans une série de 4 tubes à hémolyse stériles, introduire

- 100 $\mu$ L de dilution phagique à tester
- 100 $\mu$ L de culture de bactéries sensibles en phase de croissance exponentielle à 2.10<sup>7</sup> cellules/mL

Attendre 15 à 20 min à 37°C (adsorption)

- ajouter alors très doucement 4mL de gélose demi-molle (top agar) conservée en surfusion à 45°C. Homogénéiser avec précaution; couler rapidement sur un milieu gélose LB. Ne plus toucher les boîtes.

(les boîtes coulées doivent être parfaitement sèches).

- après refroidissement, incuber boîtes retournées à 37°C pendant 24h.

#### **Compte rendu**

Indiquer en justifiant le choix des dilutions de l'eau testées.

Indiquer le mode opératoire permettant d'obtenir la suspension de bactéries sensibles à 2.10<sup>7</sup> cellules/mL

### **2. Réalisation d'un challenge test**

#### **Matériel**

- 1 échantillon de lotion démaquillante ensemencée avec *C. albicans*
- 1 flacon de 100mL de gélose Sabouraud
- 6 boîtes de pétri vides
- 6 pipettes de 1mL stériles

- tubes de 9mL d'eau physiologique stérile
- billes de verre
- P200 + cônes jaunes

La durée de conservation d'un produit cosmétique ou pharmaceutique dépend de l'efficacité des conservateurs introduits dans la préparation. Le challenge test permet de tester in vitro l'efficacité d'un conservateur ; une souche connue, référencée et quantifiée est mise en présence du produit pendant une durée déterminée. On évalue alors la réduction décimale obtenue. Le résultat est analysé en fonction des critères sont fournis par la Pharmacopée Européenne.

### **Protocole**

Le produit à tester est un produit cosmétique de type lotion démaquillante. La lotion a étéensemencée le 10/04/06 avec une souche de *C.albicans* à  $10^6$  cellules/mL en concentration finale.

Dénombrer les cellules viables par dénombrement en milieu solide et en surface; l'étalement sera réalisé par la technique des billes de verre. Tester 2 boites par dilutions ; milieu : gélose Sabouraud. Dilutions du produit en eau physiologique (9 mL).

*Justifier le choix des dilutions testées sachant qu'on doit pouvoir répondre au critère demandé et qu'on dénombrera de façon idéale 100 levures par boite.*

## **3. Étude d'une douche pure**

### **Matériel**

- 1 souche à identifier sur GNI
- test oxydase
- 2 tubes à hémolyse stériles
- 1 tube de bouillon nutritif (on se servira du bouillon LB)
- 1 tube de 5mL d'eau

Une souche contaminante est isolée de la même lotion démaquillante sur gélose Drigalski. La souche est repiquée sur gélose nutritive inclinée.

Réaliser

- un état frais, après revivification de la souche. Pour cela, réaliser dans un tube à hémolyse une suspension trouble dans quelques mL de bouillon nutritif et laisser 1h à 17°C avec agitation.
- un test oxydase
- Ensemencer une galerie classique permettant l'identification du genre (galerie en tube)
- Incuber 24h à 37°C.

### **Compte rendu**

*Résultats des observations.*

*Intérêt du milieu Drigalski (déduite de l'analyse de sa composition)*

*Orientation justifiée; choix des milieux.*