



2019	Séquence – B
TP – 06	Contrôle de la croissance d'un microorganisme
Jour 01	

<p>Introduction</p> <p>Nous avons appris, au fil des semaines, à compter des microorganismes, à repérer des microorganismes contaminants, mais sans s'intéresser à comment les faire pousser. Les conditions de culture d'un microorganisme sont très variables, et dépendent directement de l'écologie du microorganisme. L'une des exigences du laboratoire de Microbiologie est de reproduire au mieux les conditions physico-chimiques de l'environnement naturel du microorganisme, afin de lui assurer une croissance idéale. Ceci peut parfois poser un problème notamment pour les agents pathogènes qui sont des parasites cellulaires. Certains microorganismes ne peuvent pas être cultivés en laboratoire, c'est notamment le cas des microorganismes extrémophiles (note ajoutée : après 12 ans d'essai, une équipe japonaise est parvenue à cultiver des bactéries extrémophiles type archées d'Asgård. <i>Pour la Science</i>, 21/10/19)</p>	
<p>Problématique</p> <p><i>Comment étudier les paramètres de croissance d'une souche ? Quels sont les principaux paramètres à prendre en compte ?</i></p>	
<p>Objectifs méthodologiques</p> <ul style="list-style-type: none"> • Utilisation du spectrophotomètre ; • Suivi d'une cinétique de croissance ; • Milieux sélectifs ; • Milieu VF ; • Préparation de milieux ; • Utiliser un cahier de laboratoire ; • Utilisation du numérique ; • Gérer les déchets. 	<p>Connaissances</p> <ul style="list-style-type: none"> • Turbidimétrie ; • Autoclavage ; • Milieux sélectifs ; • Milieu viande-foie.
<p>Points de vigilance</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ne pas respecter l'asepsie ; • Utilisation du spectrophotomètre ! • Ne pas respecter les protocoles fournis ; • Ne pas respecter la gestion des déchets ; • Se tromper dans les tests enzymatiques ; • La rigueur du cahier de laboratoire • Les calculs d'UFC par mL. 	<p>Livrables – Evaluation</p> <ul style="list-style-type: none"> • J01 – C2 – pt8 : format numérique à rendre le J03 ; • J02 – C2 – pt4 ; • J04 – C1 – pt7 : format numérique.
<p>Organisation du travail</p> <ul style="list-style-type: none"> • Travail en groupe ; • Réaliser la totalité du travail dans le temps imparti. 	
<p>Documentation</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Cours SL01 ➤ Cours SL02 ➤ Document 01 ➤ Document 02 ➤ Document 03 ➤ Document 04 ➤ Document 05 	<p>Fiches techniques</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ FT00-PREP04 ➤ FT00-PREP05 ➤ FT00-01 ➤ FT03-TR01

Consigne 1 – La turbidimétrie

1. **Lire** le cours SL01 ;
2. **Poser** des questions ;
3. **Assister** à la démonstration d'utilisation du spectrophotomètre. **S'aider** de la fiche technique FT00-PREP05 ;

Consigne 2 – Suivi de la croissance d'un microorganisme par turbidimétrie

4. **S'organiser** en binôme ;
5. **Respecter** le plan de manipulation présenté dans le document 01 ;
6. **Respecter** la procédure opératoire suivante :
 - a. Dès le début du cours, **placer** 9 mL de bouillon ordinaire à la température indiquée ;
 - b. **Inoculer** le bouillon ordinaire avec 1 mL d'inoculum bactérien indiqué ;
 - c. **Prélever** 1 mL de bouillon inoculé et **placer** en microcuve. **Boucher** la microcuve avec du parafilm. **Remettre** immédiatement le bouillon inoculé à température indiquée ;
 - d. **Lire** la DO du bouillon inoculé contre du bouillon stérile, à 600 nm ;
 - e. **Noter** le temps et l'absorbance lue sur le cahier de laboratoire ;
 - f. **Répéter** les étapes c – d – e, toutes les 10 minutes, pendant 90 minutes.
7. A l'aide d'un tableur, **transformer** les valeurs d'absorbance en UFC par mL, sachant que $DO_{600nm} = 0.1$ équivaut à 10^7 UFC par mL (utiliser une formule dans Excel) ;
8. A l'aide d'un tableur, **représenter** la courbe $UFC/mL = f$ (temps en minutes) ;
9. **Déterminer** l'effet de la température sur la croissance des bactéries.

2019	Séquence – B
TP – 06	Contrôle de la croissance d'un microorganisme
Jour 02	

Consigne 1 – Reprendre là où on s'était arrêté

1. **Terminer** l'analyse du TD BD01 ;

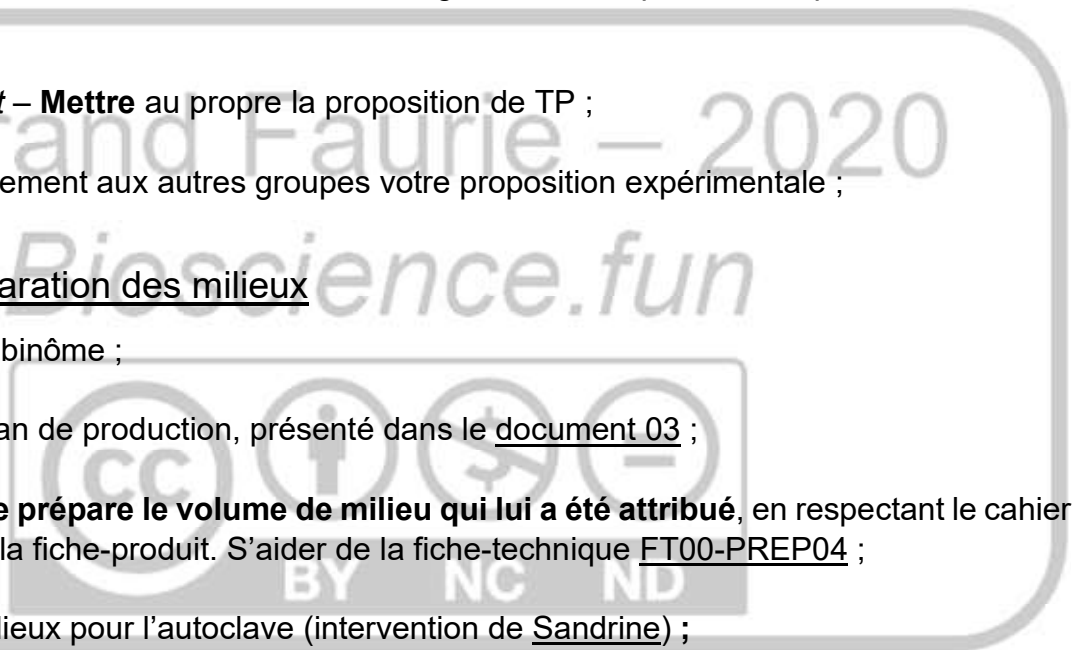


Consigne 2 – Challenge protocole

2. **S'organiser** par groupe de 4. **Consulter** le document 02 pour l'organisation des groupes ;
3. **Préparer**, pour chacun des groupes, un protocole, incluant la liste du matériel permettant d'étudier l'effet, sur la croissance d'un microorganisme, des paramètres présentés dans le document 02 ;
4. *Sur feuille à part* – **Mettre** au propre la proposition de TP ;
5. **Présenter** rapidement aux autres groupes votre proposition expérimentale ;

Consigne 3 – Préparation des milieux

6. **S'organiser** en binôme ;
7. **Respecter** le plan de production, présenté dans le document 03 ;
8. **Chaque binôme prépare le volume de milieu qui lui a été attribué**, en respectant le cahier des charges de la fiche-produit. S'aider de la fiche-technique FT00-PREP04 ;
9. **Préparer** les milieux pour l'autoclave (intervention de Sandrine) ;
10. **Lire** le cours SL02.







2019	Séquence – B
TP – 06	Contrôle de la croissance d'un microorganisme
Jour 03	

Consigne 1 – Préparation des milieux pour l'expérimentation

1. **Terminer** la préparation des milieux, stérilisés la séance précédente :

- Le milieu Chapman (+ NaCl) est prêt à l'emploi ;
- Le milieu VF est placé à 100°C pendant 20 minutes pour éliminer le dioxygène dissous (régénération), puis maintenu à 55°C (surfusion) ;
- Milieu liquide pH + : ajouter 3 mL de NaOH dans chaque tube ;
- Milieu liquide pH - : ajouter 3 mL de HCl dans chaque tube ;

Produit	Pictogramme	Mentions de danger	Conseils de prudence
Acide chlorhydrique 		H290, H314, H335.	P260, P280, P303 + P361 + P353 P304 + P340 + P310 P305 + P351 + P338
Soude sodique 		H290, H314.	P260, P280, P303 + P361 + P353 P304 + P340 + P310 P305 + P351 + P338
GESTION DES DÉCHETS :			
1. Neutraliser la solution d'acide avec une base. Neutraliser la solution de base avec un acide. 2. Contrôler la neutralité avec du papier pH. 3. Éliminer à l'évier.			

Consigne 2 – Ensemencement des milieux

1. **Ensemencer** les milieux proposés, selon le plan de manipulation présenté dans le document 04 :
 - a. **Pour les milieux solides sauf VF : préparer** une suspension cellulaire à partir de l'isolement bactérien fourni, à 2 MF. Puis **réaliser** un ensemencement en surface, avec un volume de 0.1 mL ;
 - b. **Pour le milieu VF : préparer** une suspension cellulaire à partir de l'isolement bactérien fourni, à 2 MF. **Assister** à la démonstration de l'enseignant. **Reproduire** le geste en s'aidant de la fiche technique FT03-TR01 ;

- c. **Pour les milieux liquides** : ajouter dans le tube 5-6 belles colonies de la souche indiquée pour votre groupe. **Dissoudre** les colonies en agitant l'anse stérilisée dans le milieu.

*Chaque membre du binôme ensemence un milieu.
Tous les élèves ensemencent une VF !*

2. **Identifier** clairement les tubes ;
3. **Définir** les conditions de culture des souches ;
4. **Placer** les souches en condition de culture ;
5. **Rendre-compte** des opérations réalisées, sur le cahier de laboratoire ;

Consigne 3 – Confirmation de la souche

6. **Réaliser**, pour la souche fournie (repartir de la suspension préparée pour l'ensemencement des milieux) :
 - a. Une coloration de GRAM (appeler l'enseignant pour l'observation au microscope) ;
 - b. Le test enzymatique adapté (faire confirmer par l'enseignant, le gardien des tests !) ;
 - c. Une orientation de genre/famille ;
 - d. Un isolement, avec l'aide de la fiche technique FT02-DEN05.
7. **Eliminer** les déchets et **ranger** le matériel.

Consigne 4 – Test cloud portable

8. **Mutualiser** les résultats de J01 – Consigne 2 – point 8 à l'aide du cloud portable (FT00-01) ;
9. **Nommer** les fichiers : Identifiant binôme - souche (EC ou SE) - température (chiffre) ;

Ex : F2-EC-4

Voir le document 05 pour la dénomination des binômes.

2019	Séquence – B
TP – 06	Contrôle de la croissance d'un microorganisme
Jour 04	

Consigne 1 – Analyse des résultats du jour 03

1. **Décrire** l'aspect de votre isolement ;
2. **Valider** la pureté de la souche ;

Dans le cas où l'isolement ne serait pas valide, **expliquer** l'origine de la contamination. **Proposer** une remédiation.

3. **Confirmer** que vous pouvez analyser vos résultats ;
4. **Décrire** l'aspect des milieux ensemencés, en précisant le milieu utilisé. **Prendre** des photos des résultats obtenus (boîtes et tubes) ;

Ne pas oublier de contrôler les témoins !

5. **Présenter** l'effet du paramètre sur la croissance de la souche ;
6. **Préparer** une version numérique du compte-rendu ;
7. **Intituler** la version numérique : Identifiant binôme - souche (EC ou SE) - effet ;

Ex : F2-EC-NaCl

