



<b>2019</b>	Séquence – B
<b>TP – 07</b>	<b>Contrôle de la croissance d'un microorganisme 2</b>
<b>Jour 01</b>	

<p><b>Introduction</b></p> <p>Nous avons mis en évidence les effets des paramètres environnementaux sur la croissance des microorganismes. Température, pH, salinité, ... ne sont pas les seules contraintes qui peuvent peser sur le développement d'un microorganisme : il y a également la source de nourriture. Cette source de nourriture est assimilée à une source de carbone, atome qui compose la grande majorité des molécules du vivant. Associée à cette source de carbone, les microorganismes doivent également trouver une source d'énergie, permettant d'assurer le fonctionnement des processus métaboliques cellulaires (voir <u>document 01</u>).</p>	
<p><b>Problématique</b></p> <p><i>Une bactérie peut-elle manger de tout ? Comment la source de carbone peut-elle influencer la croissance d'un microorganisme ? Le dioxygène est-il toujours la source d'énergie idéale ?</i></p>	
<p><b>Objectifs méthodologiques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Turbidimétrie ;</li> <li>• Milieu Hugh et Leifson ;</li> <li>• Préparation de réactifs ;</li> <li>• Techniques de stérilisation ;</li> <li>• Utiliser un cahier de laboratoire ;</li> <li>• Utilisation du numérique ;</li> <li>• Gérer les déchets.</li> </ul>	<p><b>Connaissances</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Turbidimétrie ;</li> <li>• Filtration stérilisante ;</li> <li>• Milieu Hugh et Leifson.</li> </ul>
<p><b>Points de vigilance</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ne pas respecter l'asepsie ;</li> <li>• Utilisation du spectrophotomètre !</li> <li>• Ne pas respecter les protocoles fournis ;</li> <li>• Ne pas respecter la gestion des déchets ;</li> <li>• Se tromper dans les tests enzymatiques ;</li> <li>• La rigueur du cahier de laboratoire.</li> </ul>	<p><b>Livrables – Evaluation</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• J04 – C1 – pt7 : format numérique ;</li> <li>• J04 – C2 – pt10 : format numérique.</li> </ul>
<p><b>Organisation du travail</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Travail en groupe ;</li> <li>• Réaliser la totalité du travail dans le temps imparti.</li> </ul>	
<p><b>Documentation</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Document 01</li> <li>➤ Document 02</li> <li>➤ Document 03</li> <li>➤ Document 04</li> </ul>	<p><b>Fiches techniques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ FT02-DEN05</li> <li>➤ FT03-TR02</li> </ul>

## Consigne 1 – Challenge protocole

1. **S'organiser** par groupe de 4. **Consulter** le document 02 pour l'organisation des groupes ;
2. **Préparer**, pour chacun des groupes, un protocole, incluant la liste du matériel permettant d'étudier l'effet, sur la croissance d'un microorganisme, des sources de carbone présentées dans le document 02 :
  - **Prévoir** des expériences pour deux souches : *E. coli* et *S. epidermidis* ;
  - **Prévoir** une analyse qualitative (oui/non) et quantitative (à quel point c'est efficace).

2

**S'aider** de la fiche technique FT03-TR02

3. *Sur feuille à part* – **Mettre** au propre la proposition de TP. **Inclure** la méthodologie d'analyse : attention, elle peut différer en fonction du résultat attendu (qualitatif ou quantitatif).
4. **Présenter** rapidement aux autres groupes votre proposition expérimentale.

Bertrand Faurie – 2020

*Bioscience.fun*



<b>2019</b>	Séquence – B
<b>TP – 07</b>	<b>Contrôle de la croissance d'un microorganisme 2</b>
<b>Jour 02</b>	

### Consigne 1 – Préparation des réactifs

3

1. **Lister** les milieux nécessaires, par rapport aux présentations faites à la séance précédente ;
2. **Discuter** de la liste et **établir** une commande définitive. Ne pas oublier les témoins d'expérience !
3. **Préparer** les solutions de sucre (respecter le plan de travail du document 03) :
  - a. **Peser** 3 grammes de sucre ;
  - b. **Mettre** les 3 grammes dans une fiole jaugée de 10 mL ;
  - c. **Rincer** le bécher de pesée avec un peu d'eau distillée ;
  - d. **Verser** l'eau de rinçage dans la fiole jaugée ;
  - e. **Rincer** les parois de la fiole avec un peu d'eau distillée ;
  - f. **Dissoudre** le sucre au fond de la fiole en agitant (chauffage nécessaire pour l'amidon) ;
  - g. **Compléter** avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge ;
  - h. **Filtrer** la solution obtenue sur un filtre de 0.45 µm : **recupérer** le filtrat dans un tube à vis stérile.
  - i. **Indiquer** sur le tube la nature du sucre.

### Consigne 2 – Préparation des isolements

Vous aurez besoin de bactéries pour réaliser vos expériences ! Elles devront être fournies sous la forme d'isolement, afin de vérifier la pureté des souches avant utilisation.

4. **Pour chacune des souches fournies (suspension), préparer 2 isolements par binôme :**
  - Binôme « Fenêtre » : deux isolements de *E. coli* par binôme ;
  - Binôme « Placard » : deux isolements de *S. epidermidis* par binôme.
5. **Réaliser**, pour la souche fournie :
  - 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.
6. **Eliminer** les déchets et **ranger** le matériel.

<b>2019</b>	Séquence – B
<b>TP – 07</b>	<b>Contrôle de la croissance d'un microorganisme 2</b>
<b>Jour 03</b>	

### Consigne 1 – Préparation des milieux pour l'expérimentation

1. **Terminer** la préparation des milieux :

- Ajouter 7 gouttes de solution de sucre stérile dans les milieux Hugh & Leifson, maintenus à 60°C (mettre le sucre quand le tube peut être tenu à pleine main) ;
- Ajouter 7 gouttes de solution de sucre stérile dans les milieux BO ;
- La gélose à l'amidon est prête à l'emploi ;

### Consigne 2 – Ensemencement des milieux

2. **Ensemencer** les milieux proposés, selon le plan de manipulation présenté dans le document 04 :

- Pour les milieux Hugh et Leifson** : préparer une suspension cellulaire à partir de l'isolement bactérien fourni, à 2 MF. Ensemencer selon les consignes fournies par la fiche technique FT03-TR02 ;
- Pour les milieux liquides, BO + sucre** : repartir de la suspension à 2 MF, et ajouter dans chaque tube, 1 mL de suspension bien homogène ;
- Pour la gélose à l'amidon** : repartir de la suspension à 2 MF et réaliser une strie centrale à l'aide d'une oese bien chargée.

3. **Définir** les conditions de culture des milieux ;

4. **Mettre** les milieux en culture, pour la durée décidée ;

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) :

- Une coloration de GRAM (appeler l'enseignant pour l'observation au microscope) ;
- Un isolement, avec l'aide de la fiche technique FT02-DEN05.

7. **Éliminer** les déchets et **ranger** le matériel.

<b>2019</b>	Séquence – B
<b>TP – 07</b>	<b>Contrôle de la croissance d'un microorganisme 2</b>
Jour 04	

### Consigne 1 – Analyse des résultats du jour 03, partie 1

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 (Hugh et Leifson et amidon après ajout de lugol sur la gélose) ;

Ne pas oublier de contrôler les témoins !

5. **Analyser** le métabolisme du sucre à partir des résultats obtenus ;
6. **Préparer** une version numérique du compte-rendu ;
7. **Intituler** la version numérique : Identifiant binôme - souche (EC ou SE) - sucre ;

Ex : F2-EC-G

### Consigne 2 – Analyse des résultats du jour 03, partie 2

Les bouillons ordinaires ont été arrêtés après 24 heures de croissance et plongés dans la glace puis maintenus au réfrigérateur. Ainsi, toutes les conditions de culture ont été stoppées en même temps.

8. **Réaliser** une dilution au 1/... de chaque condition testée (le diluant sera du BO stérile !) ;
9. **Réaliser** l'analyse par turbidimétrie, DO<sub>600nm</sub> de la dilution au 1/... :
  - Si la DO<sub>600nm</sub> **est inférieure à 0.6**, alors **conserver** la valeur de DO<sub>600nm</sub> obtenue et **déterminer** la concentration en UFC/mL, en prenant en compte la dilution ;
  - Si la DO<sub>600nm</sub> **est supérieur à 0.6**, **réaliser** une dilution supplémentaire afin d'obtenir une DO<sub>600nm</sub> inférieure à 0.6. **Conserver** la valeur de DO<sub>600nm</sub> obtenue et **déterminer** la concentration en UFC/mL, en prenant en compte toutes les dilutions.

La lecture de la DO<sub>600nm</sub> devra s'effectuer contre un blanc judicieusement choisi.

10. **Analyser** l'effet de la source de carbone sur la croissance de la souche ;

11. **Préparer** une version numérique du compte-rendu ;

12. **Intituler** la version numérique : Identifiant binôme - souche (EC ou SE) - croissance-sucre ;

*Ex : F2-EC-croissance-G*

13. **Eliminer** les déchets et **ranger** le matériel.

Bertrand Faurie – 2020

*Bioscience.fun*

