

# AT/ TD n° 8 Détermination de l'action des agents anti-microbien sur *Escherichia coli*

## Contexte de la situation et activités à réaliser

Afin d'étudier l'action de différents agents antibactérien sur l'espèce *Escherichia coli*. Les tests suivants sont réalisés :

Action de la température et d'un antiseptique sur le développement d'*Escherichia coli*.

## Travail préparatoire

Q 1 Expliquer le choix de la longueur d'onde à 600nm.

Q 2 A quel groupe bactérien appartient la souche *Escherichia coli*.

Q 3 Quel est l'intérêt utiliser un étalon de Mac Farland.

Q 4 Quelle différence existe-t-il entre un antibiotique et un désinfectant.

Q5 Calcul de la concentration initiale de la solution mère d'hypochlorite de sodium qui a la formule suivante : NaOCl.

Q 5 Calcul de la concentration en antiseptique dans chaque tube.

## 1<sup>er</sup> jour

### Effet de la température sur la croissance d'*Escherichia coli* (manipulation réaliser pour l'ensemble du groupe)

- ⊙ Réaliser une suspension bactérienne d'opacité voisine de l'étalon 2 de Mac Farland.
- ⊙ Puis Introduire 1 mL de la suspension réalisée précédemment dans un bouillon nutritif.
- ⊙ Réaliser cette opération 5 fois.
- ⊙ Placer un tube à 4°C pendant 24 h.
- ⊙ Placer un tube à 18°C pendant 24 h.
- ⊙ Placer un tube à 37°C pendant 24 h.
- ⊙ Placer un tube à 60°C pendant 24 h.
- ⊙ Placer un tube à 90°C pendant 24 h.

### Détermination du temps de réduction décimale

- ⊙ Réaliser une suspension bactérienne d'opacité voisine de l'étalon 2 de Mac Farland.
  - ⊙ Puisensemencer un tube de bouillon nutritif avec 1 mL de la suspension précédemment réalisé.
  - ⊙ Placer le tube dans un bain marie à 90°C.
- Q 6 Justifier le choix de cette température.

### Évaluation de la turbidité

On utilise un spectrophotomètre, on se place à une longueur d'onde de 600 nm.

On réalise un blanc avec un bouillon nutritif stérile qui permet la réalisation du zéro.

- ⊙ Réaliser une suspension bactérienne d'opacité voisine de l'étalon 2 de Mac Farland.
- ⊙ Puisensemencer un tube de bouillon nutritif avec 1 mL de la suspension précédemment réalisé.

Thème : les produits cosmétiques : extraction, analyse et utilisation

---

Année 2013/2014

Lire l'absorbance de ce tube toutes les 10 min à 600 nm.  
 Q 7 Compléter le tableau ci-dessous.

**Evaluation de la turbidité**

<b>A à 600nm</b>													
<b>Temps en min</b>													

Q 8 Tracer la courbe de l'absorbance en fonction du temps.

- ☉ Effectuer après chaque lecture d'absorbance un ensemencement en surface d'une gélose PCA à partir de votre tube.
- ☉ Puis placer toutes les boites 24 à 37°C.

**Détermination de l'action de différents antiseptiques sur Escherichia coli**

- ☉ Réaliser un ensemencement en masse à partir de la suspension réalisée dans la tâche précédente, en utilisant la gélose Muller Hinton.
- ☉ Laisser prendre en masse.
- ☉ Déposer la surface de la gélose des disques imprégnés de différents disques en utilisant l'annexe 1.

Q 9 Quel est le rôle du disque 5 ?

**Détermination de l'action d'un antiseptique sur Escherichia coli**

⇒ Réaliser une suspension bactérienne d'opacité voisine de l'étalon 2 de Mac Farland. Puis le dilué au 1/1000 dans un tube contenant 20 mL de bouillon nutritif.

⇒ **Préparer la gamme de dilution**

Vous disposer d'une solution d'hypochlorite de sodium. Dont vous avez calculer la concentration.

Effectuer une gamme de dilution dans une série de tube à hémolyse à l'aide du tableau ci-dessous.

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Réactif														
Mueller Hinton en mL	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Volume de solution d'antiseptique à	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Inoculum en mL	←—————→													
Concentration finale d'antiseptique en µg.mL <sup>-1</sup>														

⇒ **Ensemencement**

Thème : les produits cosmétiques : extraction, analyse et utilisation

Inoculer chaque tube de la gamme à l'aide de la suspension bactérienne.  
Incuber 18 h à 37°C.

## 2<sup>e</sup> jour

### Effet de la température sur la croissance d'*Escherichia coli* (manipulation réaliser pour l'ensemble du groupe)

On réalise un blanc avec un bouillon nutritif stérile qui permet la réalisation du zéro.

Lire l'absorbance de ces tubes t à 600 nm.

Compléter le tableau ci-dessous.

<b>A à 600nm</b>					
<b>Température en °K</b>					

Q 10 Tracer la courbe de l'absorbance en fonction de la température.

Q 11 Que peut-on en déduire ?

### Détermination de l'action de différents antiseptiques sur *Escherichia coli*

Q 12 Analyser les résultats obtenus.

Q 13 Conclure quant à l'efficacité des différents agents antibactériens utilisés dans cette activité technologique.

### Détermination de l'action d'un antiseptique sur *Escherichia coli*

Compléter la ligne concentration finale de l'antiseptique

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Réactif														
Bouillon nutritif en mL	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Volume de solution d'antiseptique à	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Inoculum en mL	←————— 1 —————→													
Concentration finale d'antiseptique														

Q 14 Expliquer les calculs pour les tubes, 2, 5 et 13.

Q 15 Que peut-on en conclure ?

### Détermination de la viabilité cellulaire

La cytométrie en flux est une technique permettant d'effectuer des analyses au niveau des cellules individuelles. Cette technique a été développée à l'origine pour l'analyse de cellules animales dans des applications à finalité médicale. Ce n'est que dans les années 90 que cette technique a été considérée dans le

cadre des cellules microbiennes procaryotes et eucaryotes. Grâce à l'évolution des technologies (laser à l'état solide, progrès dans la maîtrise des micro-écoulements,...), plusieurs développeurs proposent actuellement des cytomètres en flux pour des budgets abordables (environ 30.000 euros). Cette évolution entraîne actuellement un engouement des industriels pour la mise en oeuvre de cette technique pour le suivi de l'évolution des populations microbiennes dans divers procédés : brasserie, vinaigrerie, production de starters pour la boulangerie, production de starters lactiques,... L'intérêt manifesté pour cette technique est simple à comprendre si on considère les techniques actuelles pour l'estimation de la viabilité cellulaire.

En effet, celles-ci reposent souvent sur la revivification des cellules sur milieu gélosé et comptage des colonies après un temps d'incubation. Le problème fondamental de cette technique repose sur l'utilisation de conditions de culture qui ne sont pas forcément identiques à celle rencontrée au niveau du processus de production. Ce phénomène entraîne une sous-estimation des cellules microbiennes actives rassemblées sous le terme de "viables mais non cultivables" (Booth I.R., 2002). A cela s'ajoutent des problèmes techniques imposés par le temps de remise en culture et l'obtention des résultats bien après que le processus de production soit terminé, ainsi que par des procédures de laboratoire coûteuses en personnel et en consommables. La cytométrie s'impose donc comme une technique de choix qui permet d'analyser les cellules microbiennes individuelles sans étape de remise en culture et avec un débit expérimental élevé (Nebe-von-Caron G., 2000, Diaz, 2010). En effet, 30.000 cellules peuvent être analysées en 30 secondes immédiatement après la prise d'échantillon, ce qui permet éventuellement de corriger les conditions de procédés en fonction de l'état des micro-organismes. L'utilisation de fluorochromes spécifiques permet l'analyse de caractéristiques cellulaires. Dans le cas des bactéries lactiques, l'utilisation du couple de colorant "carboxyfluorescéine diacétate" / "iodure de propidium" (cFDA/IP) est mis en oeuvre en routine pour la détermination de la viabilité cellulaire (Rault, 2007, Smelt, 2002, Bunthof, 2001). L'iodure de propidium pénètre dans les cellules ayant une membrane endommagée et les colore en rouge, tandis que le cFDA est un composé non fluorescent qui diffuse au travers de toutes les membranes cellulaires et est hydrolysées par les activités estérases intracellulaires pour donner un composé fluorescent vert. Ces deux composantes de fluorescence peuvent être facilement caractérisées par analyse multi paramétrique au niveau d'un cytomètre en flux. La difficulté majeure que rencontre l'application de la cytométrie en flux au niveau industriel réside dans l'interprétation des résultats. Dans ce travail, trois souches de bactéries lactiques ayant des sensibilités différentes au stress de procédé ont été mise en oeuvre dans des schémas de production industriels faisant intervenir les étapes suivantes : production en bioréacteur agité de 2m<sup>3</sup>, récolte par centrifugation continue, congélation et lyophilisation. L'analyse par cytométrie en flux montre des tendances fondamentalement différentes pour les trois types de micro-organismes. Les deux souches microbiennes plus sensibles au stress de procédé (Lactobacillus acidophilus et Lactobacillus bulgaricus ) du fait de leur caractère anaérobie strict ou microaérophile montrent des sous-populations bien distinctes au niveau des cytogrammes, tandis que la souche plus résistante ne montre qu'une seule population évoluant suivant les étapes du procédé. Ces observations sont utilisées pour une meilleure interprétation des cytogrammes pour l'estimation de la viabilité cellulaire en conditions de procédé. Une meilleure interprétation peut également être obtenue en considérant la possibilité de relargage des produits de dégradation fluorescents provenant de l'hydrolyse du cFDA en fonction de l'état de la membrane cellulaire (Volkert, 2008).

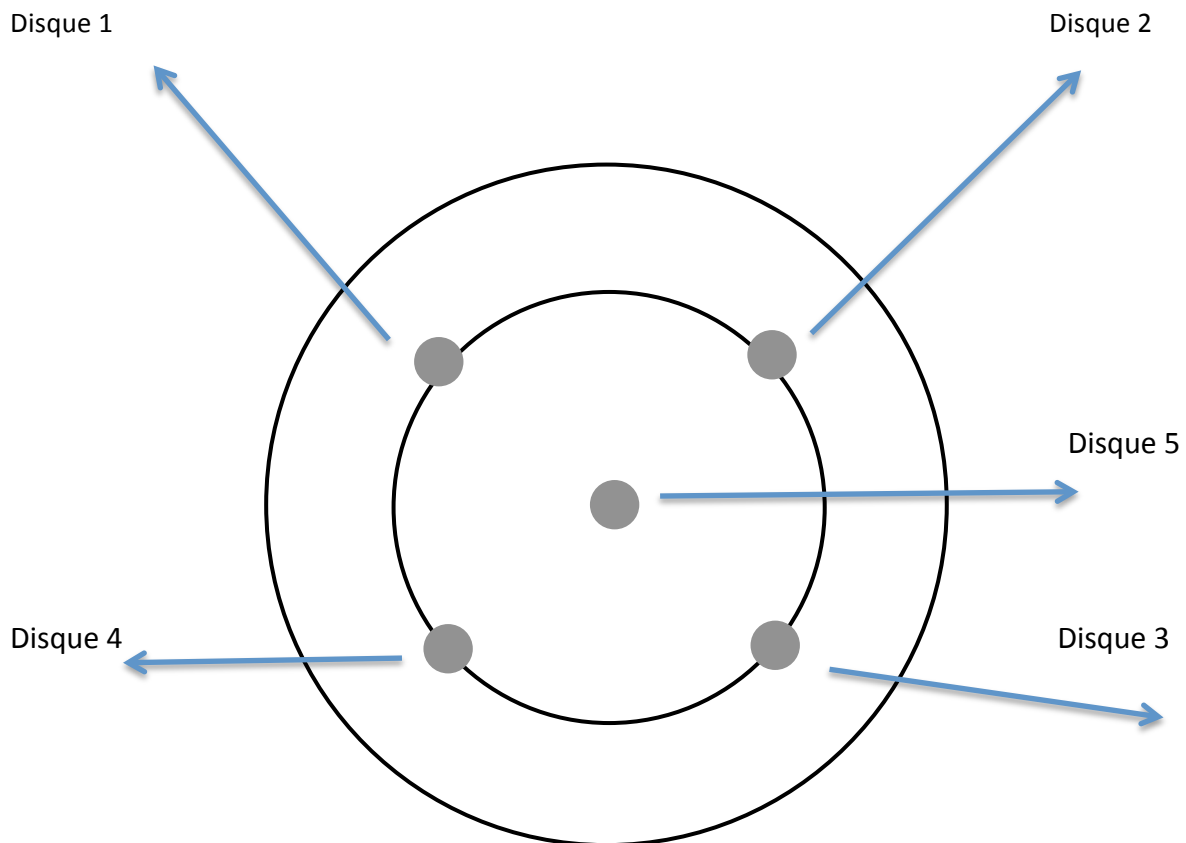
Extrait de : Evolution de la viabilité cellulaire dans les procédés de production de ferments lactiques : effet du type de bactérie sur l'évaluation par cytométrie en flux Récents Progrès en Génie des Procédés, Numéro 101 – 2011 ; ISSN 1775-335X - ISBN 2-910239-75-6, Ed. SFGP, Paris, France

Q 14 Présenter sous forme de schéma la détermination de la viabilité cellulaire.

## Annexes

Thème : les produits cosmétiques : extraction, analyse et utilisation

Année 2013/2014



*Gabarit permettant de déposer quatre disques*

- Disque 1 : dépôt d'un disque imprégné de chitine
- Disque 2 : dépôt d'un disque imprégné d'huile essentielle de menthe
- Disque 3 : dépôt d'un disque imprégné d'huile essentielle de lavande
- Disque 4 : dépôt d'un disque imprégné d'hypochlorite de sodium
- Disque 5 : dépôt d'un disque imprégné d'eau stérile

### **MILIEU MULLER HINTON**

#### PRINCIPE

Ce milieu est utilisé pour la réalisation de l'antibiogramme. Sa faible teneur en thymine-thymidine (élément inhibiteur de l'activité antibiotique) diminue les phénomènes de repousse autour des disques. La gélose doit avoir une épaisseur de 4 mm.

#### COMPOSITION en (g.L<sup>-1</sup>)

Infusion de viande de bœuf .....	300,0
Bio-case .....	17,5
Amidon .....	1,5
Gélose .....	17,0
pH 7,3	

#### TECHNIQUE

##### **. Ensemencement**

Thème : les produits cosmétiques : extraction, analyse et utilisation

É Soit plonger l'écouvillon dans la dilution réalisée au préalable et l'essorer contre la paroi du tube. Passer l'écouvillon sur la totalité de la surface de la gélose, ceci 3 fois en faisant pivoter la boîte de 60°.

É Soit verser 0,1 mL de la dilution sur la gélose l'étaler à l'aide d'un râteau.

### . Dépôt des disques et incubation

Les disques sont disposés à la surface de la gélose soit à l'aide de distributeur soit déposer manuellement. Les disques doivent bien adhérer à la gélose.

Retourner les boîtes après 15 min à la température du laboratoire.



Incuber 18 à 24 h à 37°C


### LECTURE

Pour chaque disque d'antibiotique mesurer le diamètre d'inhibition.

## Étiquetage de l'eau de javel

Depuis le 1er décembre 2010, un nouvel étiquetage des produits chimiques est obligatoire pour les substances selon le règlement (CE) no 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, dit *règlement CLP*. Le tableau ci-dessous présente les classes de danger et l'étiquetage correspondant pour l'eau de Javel selon ce nouveau système en fonction de la concentration de la préparation.

Étiquetage de l'eau de Javel selon le règlement CLP					
Concentration	Classe de danger	Catégorie	Mention de danger	Pictogramme	Mention d'avertissement
$c \geq 5 \%$	Corrosion cutanée	1B	<b>H314</b> Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.		Danger
$1 \% \leq c < 5 \%$	Irritation cutanée	2	<b>H315</b> Provoque une irritation cutanée.		Attention

<b>c x M ≥ 25 %*</b>	Danger pour le milieu aquatique – toxicité aiguë	1	<b>H400</b> Très toxique pour les organismes aquatiques.		Attention
<b>c ≥ 5 %</b>	Information additionnelle	–	<b>EUH031</b> Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique.	Pas de pictogramme	–

Source : ECB-JRC (Ex-European Chemicals Bureau)

### Auto évaluation

Activités / Taches	Eléments d'évaluation	C1 S'approprier			C2 Analyser			C3 Réaliser			C4 Valider			C5 Communiquer			C6 Autonomie Initiative		
		I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M			
Réflexions préliminaires																			
Q1	A optimale pour une suspension bactérienne																		
Q3	Permet d'obtenir une suspension dont il est possible d'évaluer le nb de micro-orga																		
Q4	Ab spé d'1 ou +ieurs bactéries Antiseptique agit sur +ieurs types de micro-orga																		
Réalisations pratiques																			
T1	Réalisation de la dilution																		
T2	Ensemencement en masse																		
T3	Dépôts des disques																		
Présentation et exploitation des résultats																			
Q7																			
Q6																			

I : insuffisant ; A : acceptable ; M : maîtrisé

Thème : les produits cosmétiques : extraction, analyse et utilisation

Année 2013/2014