

Session 2007

CAPET

CONCOURS EXTERNE

Section : BIOTECHNOLOGIE

Option : Biochimie-Génie biologique

TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

**APPORT DU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE
DANS L'IDENTIFICATION ET LA LUTTE CONTRE LES INFECTIONS
SEVISSANT EN OESTREICULTURE**

Premier jour

Durée : 2H30

Premier jour

Depuis 1991, en période estivale, de forts taux de mortalité ont été observés en France, parmi les huîtres creuses, et ce, tant en milieu naturel qu'en éclosérie.

Dans le cadre de l'étude des populations bactériennes associées aux éponges de mer, des laboratoires cherchent à identifier et caractériser les bactéries symbiotiques des éponges et à mettre en évidence le rôle éventuel de ces bactéries dans la production de substances naturelles à potentiel biotechnologique.

On souhaite ainsi mettre en évidence des activités antimicrobiennes qui permettraient de lutter contre certains microorganismes pathogènes provoquant la mort des naissains d'huîtres (œufs).

En vue d'une purification et d'une éventuelle utilisation biotechnologique, on dispose :

- d'une souche isolée à partir de naissains d'huître nécrosés : « MA+N° » et « MB+N° »
- de 3 extraits d'éponge (A, B et C) pour lesquels on cherche à déterminer :
 - l'existence d'une éventuelle activité antimicrobienne dans deux extraits : « EXTRAIT A » et « EXTRAIT B »
 - l'efficacité antimicrobienne d'un troisième extrait : « EXTRAIT C »,

1) Identification d'une souche microbienne responsable de la mort de naissains d'huître

Une souche responsable de la nécrose de naissains d'huître a été isolée sur milieu Marine Agar (« MA+n° ») et en bouillon liquide Marine Broth (« MB+n° ») dont la composition se trouve en annexe 1.

- Effectuer un examen macroscopique des colonies présentes sur le milieu Marine Agar. Justifier dans le compte-rendu l'utilisation de ce milieu pour l'isolement des micro-organismes impliqués dans la nécrose des œufs.
- Réaliser les examens microscopiques de la souche. **Montrer à un examinateur**
- Effectuer le(s) test(s) d'orientation nécessaire(s) à l'identification de la bactérie. **Montrer à un examinateur**
- Rédiger le compte-rendu (annexe 3) avant **l'heure limite** indiquée en début de séance.
- Ensemencer la galerie d'identification miniaturisée choisie et éventuellement les milieux complémentaires permettant l'identification de la souche.

2) Caractérisation d'une activité anti-microbienne des extraits A et B

Au laboratoire, l'étude de l'activité antimicrobienne des extraits d'éponge est réalisée par méthode de diffusion en milieu gélosé sur différentes souches tests :

- *Staphylococcus aureus* (ATTC 6538)
- *Escherichia coli* (ATTC 8739)
- *Vibrio anguillarum* (ATTC 19264)
- *Vibrio splendidus* (ATTC 33125)

- *Candida tropicalis* (ATTC 20336)

Matériel et réactifs :

- culture de 18 heures de *Staphylococcus aureus* sensible à l'ampicilline en Mueller Hinton (« Ref »)
- 1 écouvillon stérile
- 1 tube à hémolyse contenant l'extrait A (« extrait A »)
- 1 tube à hémolyse contenant l'extrait B (« extrait B »)
- un flacon contenant 20 mL de Mueller Hinton (MH)
- 1 portoir contenant 4 semi-microcuves
- 10 tubes de 9 mL d'eau physiologique
- 6 tubes de 15 mL de gélose dénombrement en surfusion
- 6 grandes boîtes de Pétri stériles
- 1 Gélose Mueller-Hinton (MH) en grande boîte de Pétri
- 1 gélose Trypticase Soja (GTS) en grande boîte de Pétri
- 1 petite boîte de Pétri contenant 5 disques stériles de 6mm de diamètre
- 1 pipette automatique P20
- 1 petite boîte de Pétri contenant 3 cônes jaunes stériles
- 1 boîte de Pétri vide stérile
- 1 tube à hémolyse contenant 1 disque d'ampicilline « Amp »
- pipettes stériles de 1 mL
- spectrophotomètre

2.1 Vérification de la pureté de la souche test

- Réaliser un examen microscopique.
- **Montrer à un examinateur** les observations et les descriptions correspondantes rédigées sur le compte rendu.
- Isoler les bactéries sur le milieu fourni (GTS).

2.2 Préparation de l'inoculum "I" de la souche test « ref »

- Mesurer la densité optique (DO) à 620 nm
- Présenter dans le compte-rendu, le protocole de réalisation d'une suspension ajustée à 0,2 de DO.
- Réaliser cet ajustement
- Préparer l'inoculum "I" à partir de la suspension ajustée par dilution à 10^{-2} en eau physiologique

Montrer les mesures de densité optique à un examinateur.

2.3 Contrôle de la concentration de l' inoculum « I » :

- Réaliser un dénombrement dans la masse de gélose dénombrement en ensemençant en double essai 3 dilutions correctement choisies.
- Justifier le choix des dilutions testées sur le compte rendu (*Donnée* = pour cette souche , une suspension bactérienne de DO = 0,2 a une concentration d'environ 10^8 bactéries/ml.)

2.4 Réalisation du test : méthode par écouvillonnage

- Ecouvillonner la surface d'une gélose Mueller-Hinton (MH) avec l'inoculum "I" de la souche test. (protocole en *annexe 2*)
- Déposer 10 µL d'extrait ou de témoin négatif sur un disque de 6 mm de diamètre (placé dans une boîte de Pétri stérile) et le disposer sur la gélose Mueller-Hinton.
- Prévoir 2 essais par extrait, un témoin négatif et un contrôle positif. Incuber à 37°C.
- Le choix du témoin et du contrôle positif est à préciser sur le compte-rendu.

3) Détermination de l'efficacité de l'action antimicrobienne d'un extrait C

On dispose d'un troisième extrait d'éponge («EXTRAIT C») possédant une activité antimicrobienne contre la souche *Staphylococcus aureus* « Sa » présentée en bouillon Mueller-Hinton.

On souhaite comparer l'activité antimicrobienne de l'extrait C à celle d'une solution d'antibiotique de référence notée « ATB ref »

Matériel et réactifs :

- culture de 18 heures de *Staphylococcus aureus* en bouillon Mueller-Hinton notée « Sa »
- tubes de 9 mL de bouillon Mueller-Hinton (noté MH)
- 1 tube à hémolyse contenant l'extrait C (« extrait C »)
- solution d'antibiotique de référence à 2048 U/mL notée « ATB ref»
- tubes à hémolyse stériles
- un flacon contenant 20 mL de bouillon Mueller-Hinton (MH)
- pipettes stériles de 1 mL

Protocole :

- Diluer la culture de 18 heures de *Staphylococcus aureus* "Sa" pour obtenir un inoculum de 10^5 UFC/mL sachant que la densité d'une culture de 18 heures de *S. aureus* est d'environ 10^8 UFC/mL.
- A partir de la solution d'antibiotique de référence, réaliser 8 dilutions successives de raison $\frac{1}{2}$ en bouillon Mueller-Hinton sous un volume final de 1 mL.
- Faire de même pour l'extrait C dans une deuxième série de tubes à hémolyse.
- **Montrer à un examinateur** la réalisation d'une dilution.
- Ajouter 1 mL de l'inoculum réalisé précédemment à chaque dilution.
- Réaliser un témoin pour valider la méthode.
- Incuber les tubes à 37°C.

Sur le **compte rendu** :

- Construire un tableau montrant la réalisation des dilutions,
- Justifier la composition du témoin réalisé pour valider la méthode.

ANNEXE 1

Milieu liquide : Marine Broth 2216 (MB) (Difco)

Base servant à la culture des bactéries marines hétérotrophes.

Peptone	5,0g
Extrait de levure	1,0g
Citrate de fer	0,1g
Chlorure de sodium	19,45g
Chlorure de magnésium, séché	5,9g
Sulfate disodique	3,24g
Chlorure de calcium	1,8g
Chlorure de potassium	0,55g
Bicarbonate de potassium	0,16g
Bromure de potassium	0,08g
Chlorure de strontium	34,0mg
Acide borique	22,0mg
Silicate de sodium	4,0mg
Fluorure de sodium	2,4mg
Nitrate d'ammonium	1,6mg
Phosphate disodique	8,0mg

pH : $7,6 \pm 0,2$

Mettre 37,4 g de poudre en suspension dans 1 litre purifiée.

Le milieu gélosé est obtenu en ajoutant 15 g d'agar pour 1 litre.

ANNEXE 2 : ENSEMENCEMENT PAR ECOUVILLONNAGE

- Tremper un écouvillon stérile dans la dilution et l'essorer par pression/rotation contre la paroi du tube.
- Passer l'écouvillon sur toute la surface de la gélose, trois fois de suite en le faisant pivoter de 60° entre chaque passage.

- Laisser sécher les boîtes 5 minutes à 37°C.

ANNEXE 3 : FEUILLE DE DEMANDE DE MILIEUX

N° candidat :

Aspect macroscopique

Observation(s) microscopique(s)

Test(s) d'orientation

Orientation

Demande justifiée de milieux et de galerie

Session 2007

CAPET

CONCOURS EXTERNE

Section : BIOTECHNOLOGIE

Option : Biochimie-Génie biologique

TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

**APPORT DU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE
DANS L'IDENTIFICATION ET LA LUTTE CONTRE LES INFECTIONS
SEVISSANT EN OESTREICULTURE**

Deuxième jour

Durée : 1H30

Sans document ni calculatrice personnels

Deuxième jour

L'annexe 1 correspond au protocole du jour 1.

1) Identification d'une souche microbienne responsable de la mort de naissains d'huître

- Effectuer la lecture de la galerie d'identification.
- Donner l'identification justifiée de la souche ensemencée. Analyser le résultat. : l'exploitation sera réalisée grâce au logiciel libre Taxon 2007 dont le mode d'emploi est fourni en annexe ..

2) Caractérisation d'une activité anti-microbienne des extraits A et B

- Vérifier la pureté de la souche test.
- Après dénombrement des colonies des différentes boîtes ensemencées le jour 1, calculer la concentration de l'inoculum de la souche test.
- Lire et interpréter les résultats du test d'étude de l'activité antimicrobienne des extraits A et B d'éponge.

3) Détermination de l'efficacité de l'action antimicrobienne d'un extrait C

- Lire et interpréter les résultats obtenus.

4) Conclusion générale

- Donner une conclusion générale sur l'ensemble des résultats des parties 1) à 3). Discuter notamment la pertinence des tests effectués.

L'ensemble des résultats et des interprétations sera consigné dans le compte-rendu.

ANNEXE 1

Depuis 1991, en période estivale, de forts taux de mortalité ont été observés en France, parmi les huîtres creuses, et ce, tant en milieu naturel qu'en éclosérie.

Dans le cadre de l'étude des populations bactériennes associées aux éponges de mer, des laboratoires cherchent à identifier et caractériser les bactéries symbiotiques des éponges et à mettre en évidence le rôle éventuel de ces bactéries dans la production de substances naturelles à potentiel biotechnologique.

On souhaite ainsi mettre en évidence des activités antimicrobiennes qui permettraient de lutter contre certains microorganismes pathogènes provoquant la mort des naissains d'huîtres (œufs).

En vue d'une purification et d'une éventuelle utilisation biotechnologique, on dispose :

- d'une souche isolée à partir de naissains d'huître nécrosés,
- de 3 extraits d'éponge (A, B et C) pour lesquels on cherche à déterminer :
 - l'existence d'une éventuelle activité antimicrobienne dans deux extraits = EXTRAIT A et EXTRAIT B
 - l'efficacité antimicrobienne d'un troisième extrait = EXTRAIT C,

1) Identification d'une souche microbienne responsable de la mort de naissains d'huître

Une souche responsable de la nécrose de naissains d'huître a été isolée sur milieu Marine Agar et en bouillon liquide Marine Broth.

2) Caractérisation d'une activité anti-microbienne des extraits A et B

Au laboratoire, l'étude de activité antimicrobienne des extraits d'éponge est réalisée par méthode de diffusion en milieu gélosé sur différentes souches tests :

- *Staphylococcus aureus* (ATTC 6538)
- *Escherichia coli* (ATTC 8739)
- *Vibrio anguillarum* (ATTC 19264)
- *Vibrio splendidus* (ATTC 33125)
- *Candida tropicalis* (ATTC 20336)

2.1 Vérification de la pureté de la souche test

2.2 Préparation de l'inoculum de la souche test

- Mesurer la densité optique (DO) à 620 nm
- Présenter dans le compte-rendu, le protocole de réalisation d'une suspension ajustée à 0,2 de DO.
- Réaliser cet ajustement
- Préparer l'inoculum "I" à partir de la suspension ajustée par dilution à 10^{-2} en eau physiologique

2.3 Contrôle de la concentration de l'inoculum de la souche test

Réaliser un dénombrement dans la masse de gélose dénombrement en ensemençant en double essai 3 dilutions correctement choisies.

2.4 Réalisation du test : méthode par écouvillonnage

- Ecouvillonner la surface d'une gélose Mueller-Hinton (MH) avec l'inoculum "I" de la souche test. (protocole en annexe 2)
- Déposer 10 µL d'extrait ou de témoin négatif sur un disque de 6 mm de diamètre (placé dans une boîte de Pétri stérile) et le disposer sur la gélose Mueller-Hinton.
- Prévoir 2 essais par extrait, un témoin négatif et un contrôle positif. Incuber à 37°C.
- Le choix du témoin et du contrôle positif est à préciser sur le compte-rendu.

3) Détermination de l'efficacité de l'action antimicrobienne d'un extrait C

On dispose d'un troisième extrait d'éponge («EXTRAIT C») possédant une activité antimicrobienne contre la souche *Staphylococcus aureus* "Sa" présentée en bouillon Mueller-Hinton.

On souhaite comparer l'activité antimicrobienne de l'extrait C à celle d'une solution d'antibiotique de référence notée « ATB à 2048 U/mL »

Diluer la culture de 18 heures de *Staphylococcus aureus* pour obtenir un inoculum de 10^5 UFC/mL sachant que la densité d'une culture de 18 heures de *S. aureus* est d'environ 10^8 UFC/mL.

A partir de la solution d'antibiotique de référence, réaliser 8 dilutions successives de raison $\frac{1}{2}$ en bouillon Mueller-Hinton sous un volume final de 1 mL.

Faire de même pour l'extrait C dans une deuxième série de tubes à hémolyse.

Ajouter 1 mL de l'inoculum réalisé précédemment à chaque dilution.

Réaliser un témoin pour valider la méthode.

Incuber les tubes à 37°C.