

## Introduction aux dosages microbiologiques d'antimicrobiens par diffusion en milieu solide.

### Travail pratique d'application : dosages de Nisine, comparaison d'échantillons obtenus de 2 moûts de fermentation

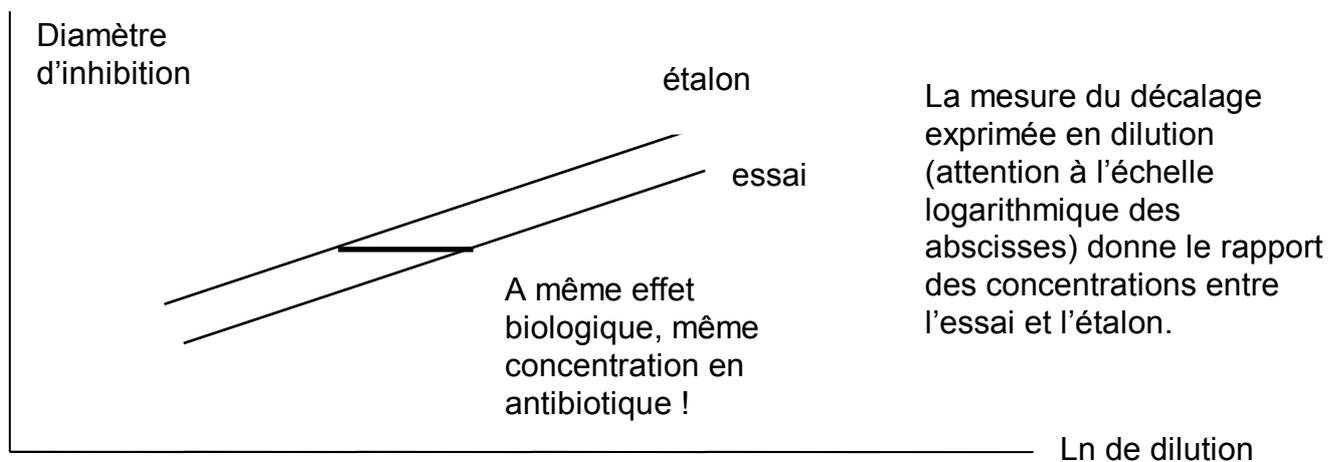
La nisine est une bactériocine, peptide antimicrobien produit par des souches de bactéries lactiques. Elle est utilisée comme conservateur alimentaire.

De la nisine est produite en bioréacteur agité sur un milieu non renouvelé à base de lactosérum par une souche de *Lactococcus lactis*. Deux fermentations ont été conduites à 2 températures différentes, 30 et 37°C. Des échantillons de moût de fermentation,  $M_{30^{\circ}\text{C}}$  et  $M_{37^{\circ}\text{C}}$ , ont été prélevés afin de doser la nisine produite et de comparer les résultats.

### 1. Principe d'un dosage microbiologique d'antibactérien par diffusion en milieu solide

Un milieu gélosé estensemencé en surface ou dans la masse avec une souche test sensible à l'antimicrobien est réalisée. La méthode consiste à comparer les diamètres d'inhibition obtenus avec une série de dilutions de l'échantillon à doser et avec une série de dilutions d'une solution étalon déposées sur des disques de papier buvard placés à la surface du milieuensemencé. On pourrait aussi déposer les dilutions dans des puits confectionnés à l'emporte pièce.

On analyse l'allure des 2 fonctions diamètre d'inhibition =  $f(\text{Ln}(\text{dilution}))$  pour la solution étalon et la solution essai pour valider le dosage puis on peut calculer la concentration de la solution à doser en utilisant la mesure du décalage des 2 fonctions.



Remarque : on peut aussi simplement vérifier le parallélisme des 2 droites, ce qui valide le dosage. Puis on trace la fonction  $d = f(\text{Ln}(\text{concentration en antibiotique}))$  pour l'étalon puis on reporte les différents résultats obtenus pour les différentes dilutions de l'essai à doser. On calcule alors les différentes valeurs obtenues pour la concentration de l'essai à doser et on fait la moyenne.

### 2 Travail pratique à réaliser et modes opératoires

#### Préparation des boîtes de culture

- Préparer 55 mL de milieu de culture Mueller-Hinton en surfusion (45 °C).
- Prévoir une culture récente de la souche test sensible *Micrococcus luteus* CIP 53160 sur milieu Mueller Hinton, par exemple sur gélose inclinée. Préparer alors une suspension « d'absorbance » 0,2 ( $\pm$  0,1) à 620 nm (limite de linéarité des mesures de biomasse vers 0,6 d'absorbance avec le matériel utilisé). Incorporer 2 mL de cette suspension aux 60 mL de gélose Mueller Hinton en surfusion. Incorporer aussi du Tween 20 à raison de 1% (v/v) final (le Tween 20 est un tensioactif qui favorise la diffusion de la nisine dans la gélose).

Homogénéiser et couler en boîte de Pétri 120 mm x 120 mm sur support horizontal. Attention, le Tween 20 est un agent moussant ! Attention, il est important que l'épaisseur de milieu dans la boîte soit uniforme d'où la vérification d'horizontalité. Laisser solidifier. Sécher la surface.

- Préparer ainsi deux boîtes.

### Préparation de la gamme d'étalonnage.

- Utiliser la solution étalon nisine S1 fournie à  $2 \cdot 10^4$  UI/mL (soit 500 mg/L de nisine pure).
- Puis réaliser 4 dilutions de raison géométrique (ou de pas) 1/2 en tube à hémolyse, sous un volume final de 100 à 200  $\mu$ L. On obtient ainsi finalement les 5 standards S1, S2, S3, S4, S5.

### Préparation des essais.

- Des essais de production précédents ont montré que les solutions échantillons  $M_{30^\circ C}$  et  $M_{37^\circ C}$  devraient titrer entre  $4 \cdot 10^4$  UI/mL à  $16 \cdot 10^4$  UI/mL.
- On fournit  $M_{30^\circ C}$  et  $M_{37^\circ C}$  dilués au  $\frac{1}{4}$  appelés x1 et y1 respectivement. Réaliser une série de 4 dilutions de raison géométrique  $\frac{1}{2}$  des échantillons x1 et y1 sous un volume de 100 à 200  $\mu$ L. On obtient ainsi finalement x1 à x5 et y1 à y5.

### Technique des disques imprégnés

- Il est indispensable de travailler avec des boîtes à la surface parfaitement exempte d'eau superficielle (par exemple par « séchage » sous hotte à flux laminaire).
- Pour chaque disque de papier, déposer le disque à l'aide d'une pince stérile puis, immédiatement, l'imprégner avec 16  $\mu$ L de solution d'antimicrobien, au moyen d'une pipette automatique et en suivant le schéma fourni ci-dessous (deux boîtes sont nécessaires). Ou mieux, imprégner le disque alors qu'il est tenu avec des pinces, en l'air, avant de le déposer.
- Laisser diffuser une demi-heure à la température du laboratoire.
- Incuber à  $37^\circ C$  pendant dix-huit heures.

<b>T-</b>	<b>x2</b>	<b>y3</b>	<b>S5</b>
<b>S1</b>	<b>y1</b>	<b>x5</b>	<b>x1</b>
<b>y5</b>	<b>S2</b>	<b>y2</b>	<b>y4</b>
<b>S4</b>	<b>x3</b>	<b>S3</b>	<b>x4</b>

Tableau à 16 dépôts. T- = témoin négatif.

### 3. Exploitation des résultats. Compte rendu.

- Compte-rendu du travail réalisé : résultats expérimentaux, tracés de graphe ...
- Justification de la dilution préalable au  $\frac{1}{4}$  des solutions échantillons  $M_{30^\circ C}$  et  $M_{37^\circ C}$ .
- Calcul du titre des 2 solutions échantillons  $M_{30^\circ C}$  et  $M_{37^\circ C}$ .

#### Bibliographie :

- Sujet de TP, BTS Biotechnologies, session d'examen 2006
- *Influence of the carbon source on nisin production in Lactococcus lactis subsp. lactis batch fermentations*, DE VUYST and VANDAMME, J Gen Microbiol 138 (3): 571.

