**FICHES techniques**

# Fiche technique n° 1 : recherche de bactériophages actifs contre une souche test : *Escherichia coli* ATCC 23848.

**Étape 1 - Élimination des bactéries des échantillons d’eau par filtration sur membrane**

Ressources matérielles et documentaires :

* Échantillons d’eau douce environnementale apportés par les élèves : Eau 1, 2, 3, 4.
* Fiche protocole du laboratoire de biotechnologie : Filtration sur membrane (Fiche technique 2 du document 8).

Mode opératoire à réaliser par paillasse :

* Filtrer 100 mL d’eau sur une membrane de porosité 0,45 µm, en condition aseptique en utilisant un appareil de filtration.
* Réaliser 4 fractions aliquotes de 25 mL de chaque filtrat dans un flacon stérile noté F+ Eau-n° de l’eau testée.
* Répartir les filtrats dans la salle (1 par paillasse, 1 pour 4 élèves max)
* Déposer le filtre sur une GTS et incuber 24 h à 37 °C.

**Étape 2 - Pré-enrichissement en phages éventuellement présents et actifs contre *E. coli* des filtrats d’eaux testées**

Ressources matérielles (par paillasse et groupe de 4 élèves) :

* 4 × 25 mL de Filtrat d’eau FEau 1, FEau 2, FEau 3, FEau 4 par paillasse (étape 1)
* 15 mL LB 10x
* 5 mL de suspension phagique témoin ϕ825
* 5 mL de Bouillon 24 h d’*Escherichia coli ATCC 23848* test

Mode opératoire à réaliser par paillasse :

* Préparer en condition aseptique 6 tubes en suivant le tableau ci-dessous pour chaque échantillon de filtrat d’eau.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Test  (1 tube par filtrat) | Témoin de croissance | Témoin d’efficacité |
| LB 10x (mL) | 1 | 1 | 1 |
| Filtrat eau à tester (mL) | 8 | / | / |
| Eau stérile (mL) | / | 8 | 7 |
| Suspension phagique ϕ825 (mL) | / | / | 1 |
| Bouillon 24 h d’*Escherichia coli* test (mL) | 1 | 1 | 1 |

* Boucher le tube et incuber 24 h à 37 °C

**Étape 3 - Réalisation du phagogramme**

Ressources matérielles par élève :

* 4 Filtrats d’eau FEau 1, FEau 2, FEau 3, FEau 4 par paillasse (étape 1)
* Préculture de 18 h de la souche test d’*Escherichia coli* en milieu LB
* 1 boite de gélose LB1x
* 6 mL gélose LB 1x semi-molle en surfusion.
* Suspension calibrée phagique contrôle positif : ϕ825

Mode opératoire à réaliser par chaque élève :

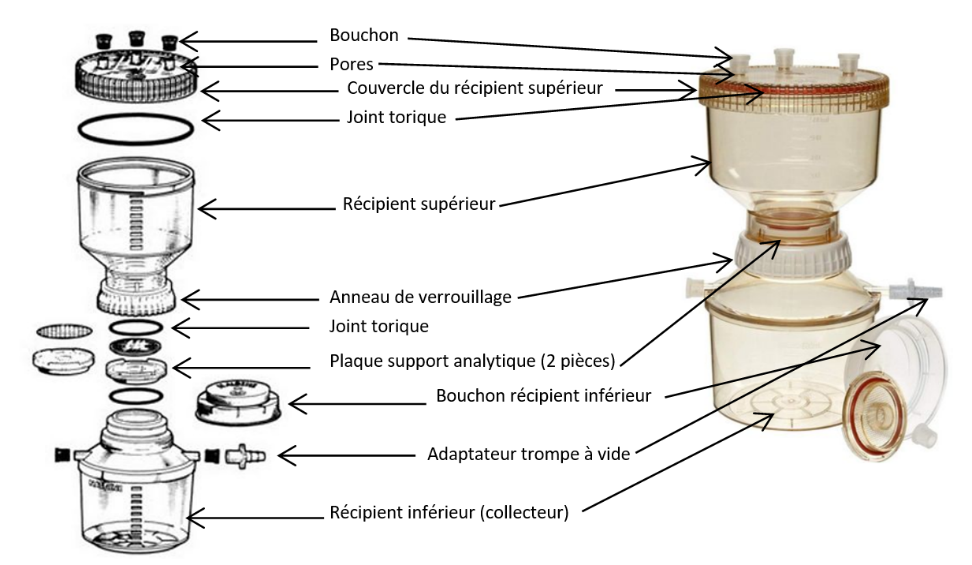
* Délimiter 6 espaces sur le dos de la boite de gélose LB selon le modèle ci-dessous.
* Introduire 200 µL de pré-culture d’*E. coli* dans 6 mL gélose LB semi-molle en surfusion.
* Homogénéiser délicatement.
* Verser sans attendre pour couvrir la surface de la gélose LB → double couche
* Déposer, selon le plan de dépôt et dans chaque zone :
  + 10 µL de chaque filtrat d’eau à tester (espacés régulièrement) ;
  + 10 µL d’eau physiologique ;
  + 10 µL de suspension de phage ϕ825.
* Laisser la boite reposer 15 minutes sans la déplacer.
* Incuber 24 h à 37 °C (boite non retournée).

# Fiche technique n° 2 : filtration sur membrane

L’appareil à filtration est stérile. La manipulation s’effectue en conditions aseptiques.

1. **Appareil utilisé : unité de filtration sous vide nalgene® en ps, réutilisable**

Schéma du montage



Source : d’après images [Servilab](https://www.servilab.fr/catalogue/produits/unite-de-filtration-sous-vide-nalgene-r-en-ps-reut)

Description :

* Le couvercle possède 3 pores obturés par des petits bouchons.
* Le récipient supérieur gradué se termine par un anneau de verrouillage.
* La plaque de support est destinée à assurer une parfaite planéité de la membrane (filtre).
* Récipient récepteur avec 2 bras latéraux et 2 capuchons de bras latéraux.
* Un adaptateur de tuyau (trompe à vide) permettant de « faire le vide » à partir d’un des deux bras latéraux.
* 1 couvercle pour le récipient récepteur en vue de stocker le filtrat stérile.

1. **Protocole**

2.1 - Mise en place de la membrane filtrante

* Dévisser l’anneau de verrouillage puis retirer le récipient supérieur. Il faut s’assurer que les 2 joints sont placés correctement ; dans le cas contraire, il y aura des fuites.
* Mettre en place avec une pince stérile une membrane filtrante de 47 mm sur la plaque support appropriée après avoir enlevé le papier Wattman qui protège la membrane. Le quadrillage est placé vers le haut.

Attention, la membrane doit être bien centrée et ne doit pas faire de pli.

* Remettre le récipient supérieur en serrant l’anneau de verrouillage à la main.

2.2 - Filtration

* Glisser le tuyau à faire le vide sur l’un des bras latéraux du récipient récepteur. Le bras latéral opposé doit être bouché avec un capuchon.
* Enlever le capuchon d’un des pores du couvercle pour amener une ventilation convenable.
* Enlever le couvercle du récipient supérieur, humidifier le filtre avec un peu d’eau stérile (verser un tube de 10 mL) et appliquer le vide en ouvrant l’eau quelques secondes. Utiliser un débit moyen : le liquide doit filtrer goutte à goutte.

Attention : il faut appliquer le vide lentement pour éviter de déchirer la membrane.

* Débrancher le tuyau de la pompe à vide sans fermer l’eau puis verser lentement l’échantillon dans le récipient supérieur.
* Fermer le récipient supérieur.
* Brancher le tuyau de la pompe à vide (débit moyen, le liquide doit filtrer goutte à goutte).
* Rincer, avec 50 mL d’eau distillée stérile, le récipient supérieur en particulier les bords internes.
* Sécher la membrane en effectuant plusieurs fois successivement le vide pendant 2 secondes (brancher et débrancher plusieurs fois le tuyau de la pompe à vide).
* Débrancher le tuyau de la pompe à vide de l’appareil à filtration.
* Couper l’eau.
* Récupérer la membrane à l’aide d’une pince stérile.
* Déposer cette membrane filtrante sur le milieu de culture, quadrillage vers le haut et sans faire de bulles. Le milieu doit avoir une épaisseur minimale de 5 mm et doit être sec.
* Incuber le milieu à la température adéquate, couvercle vers le bas.

# Fiche technique n° 3 : dénombrement des phages par la technique des spots

**Ressources matérielles par élève**

* Préculture de 18 h de la souche test d’*Escherichia coli ATCC 23848* en milieu LB
* 1 boite carrée de 12 cm de côté de gélose LB → Tracer un quadrillage de 12 rectangles égaux sur le fond de la boite, et numéroter chaque emplacement ainsi délimité de 1 à 16.
* 12 mL gélose LB 1x semi-molle en surfusion.
* Suspension phagique « P ».

**Mode opératoire à réaliser par chaque élève**

**1 - Ensemencement du milieu LB avec *E. coli ATCC 23848***

* Ajouter 400 µL de préculture d’*E. coli* aux 12 mL de gélose LB semi-molle en surfusion.
* Homogénéiser.
* Couler immédiatement à la surface du milieu LB en boite de Petri carrée.
* Laisser solidifier.

**2- Préparation des dilutions décimales de la suspension de phages « P »**

* Réaliser, en tubes Eppendorf, les dilutions décimales 10-1 à 10-9 de la suspension phagique fournie en eau physiologique sous un volume final de 1 mL.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Dilution | 10-1 | 10-2 | 10-3 | 10-4 | 10-5 | 10-6 | 10-7 | 10-8 | 10-9 |
| Eau physiologique stérile (µL) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Suspension de phages “P” (µL) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Redistribuer mL |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

* Montrer la réalisation de deux dilutions successives.

**3 - Dépôts des dilutions sur la gélose LB**

* Préparer un plan de dépôt à l’échelle de la boite montrant le quadrillage et permettant :
  + d’orienter la boite ;
  + d’assigner chacune des 9 dilutions (10-1 à 10-10) à une position sur la boite ;
  + d’assigner le témoin d’efficacité (TE) à une position sur la boite ;
  + d’assigner le témoin de croissance (TC) à une position sur la boite.
* S’assurer que la surface de la double couche est suffisamment gélifiée.
* Déposer, selon le plan de dépôt établi, 10 µL de chaque suspension diluée de phages (10-1 à 10-9) à partir de la suspension phagique la plus diluée pour n’utiliser qu’un seul cône de distribution.
* Déposer 10 µL d’eau physiologique stérile à l’emplacement du « TC ».
* Déposer 10 µL de la suspension phagique non diluée (P) à l’emplacement « TE ».
* Ne pas bouger la boite pendant au moins 15 minutes.
* Incuber 24 h à 37 °C (boite non retournée).

**Document 10** - Fiches de préparation et matières d’œuvres

Matière d’œuvre pour 1 groupe de 15 élèves

**Activité technologique expérimentale 1 :** recherche de bactériophages actifs contre une souche test

**Étape 1 - J1**

* 4 appareils à filtration et 4 membranes filtrantes 0,45 µm
* 4 échantillons d’eau prélevés et apportés par les élèves (donner des indications de lieux pour avoir une petite chance de trouver des phages : en aval des stations d’épuration, en bas de champs avec animaux d’élevage, eau de vase croupie, eau de mare… éviter les moments de crues, fonte des neiges. Les bactériophages se trouvent là où il y a des bactéries
* 4 × 10 mL d’eau physiologique stérile pour humidifier la membrane
* 4 flacons d’eau physiologique stérile pour rincer la membrane après filtration
* 4 × 4 flacons stériles vides de 50 mL pour récupérer et distribuer les filtrats
* 4 boites LB – diamètre 55 mm

**Étape 2 – J1**

* 12 × 1 mL de milieu LB10X
* 8 × 10 mL d’eau physiologique stérile tubes
* 2 mL de suspension de phage T2 noté Φ825 (utilisé également en étape 3)
* 12 × 10 mL d’une préculture de 18 h d’*Escherichia coli* sensible au phage T2 notée souche-test *E. coli* ATCC 23848 *(utilisé aussi en étape 3)*
* pipettes graduées stériles 10 mL
* P1000 + cônes stériles

**Étape 3 – J1**

* 15 boites de Petri de 90 mm de diamètre de géloses LB
* 15 × 6 mL de gélose LB semi- molle en surfusion (6 g agar /L)
* P200 + cônes jaunes stériles
* P20 ou P10 + cônes jaunes stériles

**Jour 2:**

**Activité technologique expérimentale 2 :** dénombrement des phages par la technique des spots

* 15 × 1 L de préculture de 18 h d’*Escherichia coli*
* 15 boites carrées 12cm de côté de milieu LB
* 15 × 1 mL de suspension de phage T2 titre : environ 108 UFP/mL
* 15 × 12 mL de géloses LB semi-molle en surfusion (6 g agar /L)
* 150 Tubes EppendorfTM 1,5 mL
* 15 × 10 mL d’eau physiologique stérile
* P1000 + cônes bleus stériles
* P10 ou P20 + cônes jaunes stériles

Nécessité d’un accès à un poste informatique.

Aide possible : ce document peut être en partie complété en ajoutant le volume de diluant (et/ou le volume de suspension P), dans la colonne 10-1.