

TP ANTIBIOGRAMME

Avec des produits de substitution.

1. LE FILTRAT DE CHOUX ROUGE.

Matériel :

- 1 plaque chauffante.
- 2 béchers Pyrex.
- Quelques morceaux de chou rouge.
- 1 spatule.
- 1 entonnoir + 1 papier filtre.
- De l'eau distillée.

Pour une vingtaine de géloses : Sur une plaque chauffante, placer un bécher Pyrex avec 400mL d'eau distillée et les morceaux de chou rouge. Faire chauffer (il n'est pas nécessaire de faire monter la température à ébullition pour cette étape) jusqu'à obtenir une belle coloration violacée. Filtrer grâce à l'entonnoir et le papier filtre.

Si le filtrat paraît « trop » concentré, ajouter de l'eau distillée pour le rendre plus translucide (il faut savoir qu'en refroidissant, la gélose vire au bleu foncé comme cela est montré dans la vidéo). Il nous faudra 400mL de ce filtrat.

Réserver.

2. LA GELOSE.

Matériel :

- Le filtrat de chou rouge (400mL)
- Agar-Agar.
- 1 spatule.
- 1 sabot de pesée.
- 1 balance.
- 1 plaque chauffante.
- Des boîtes de Pétri (Taille moyenne).

Placer le bécher Pyrex contenant le filtrat de chou rouge sur la plaque chauffante.

Pendant ce temps, peser 2,5g d'Agar-Agar (le fait de moins concentrer la gélose permettra à la solution de vinaigre de se diffuser plus facilement et donc plus rapidement).

Ajouter l'Agar-Agar et remuer pour dissoudre totalement la poudre.

Porter à ébullition en remuant de temps en temps.

Retirer le bécher, laisser refroidir légèrement.

Couler les géloses (environ 20-25mL par boîte de Pétri). Une fois que les géloses sont solidifiées, les placer au réfrigérateur.

3. LES SOLUTIONS D'ANTIBIOTIQUES DE SUBSTITUTION.

Matériel :

- 1 porte-tubes adapté pour Eppendorfs.
- 5 Eppendorfs annotés : **AMX** (amoxicilline) – **CEF** (céfotaxine) – **TET** (tétracycline) – **AMP** (ampicilline) – **ED** (eau distillée pour le TEMOIN) - En fonction de votre protocole bien sûr.
- 2 béchers : 1 pour la solution initiale et 1 pour la solution diluée.
- 1 solution de vinaigre 8%
- 2 pipettes graduées de 3mL.
- 1 pipette graduée de 10mL et 1 pipette graduée de 5mL.
- 1 pro-pipette ou 1 poire.
- De l'eau distillée.

Verser environ 20mL de vinaigre à 8% dans un bécher, prélever 3mL de cette solution, verser dans un autre bécher. Prélever 7mL d'eau distillée et verser dans le bécher avec les 3mL vinaigre pour obtenir la solution de vinaigre diluée.

Placer les Eppendorf, capuchons ouverts, sur le porte-tube.

Selon le protocole du professeur, remplir au $\frac{3}{4}$ (soit environ 1mL), avec la solution initiale de vinaigre à 8%, l'Eppendorf contenant l'antibiotique qui sera le plus réactif (dans mon exemple, il s'agit de l'AMP). Fermer le capuchon de l'Eppendorf.

Remplir au $\frac{3}{4}$, avec la solution diluée de vinaigre, l'Eppendorf contenant l'antibiotique qui sera moins réactif (dans mon protocole, il s'agit de la TET). Fermer le capuchon.

Puis remplir au $\frac{3}{4}$ les autres Eppendorfs dont le Témoin avec de l'eau distillée. Fermer les capuchons.

4. LA PRATIQUE.

Matériel pour les élèves :

- 1 gélose.
- 1 pince fine.
- 1 cure-dent (pour aider à déposer le disque sur la gélose si nécessaire).
- 1 petite boîte avec 5 disques de papier Wattman.
- 1 pissette d'eau + 1 bécher pour rincer la pince entre chaque dépôt.
- 1 chiffon.
- 1 gabarit OU un marqueur.
- Les solutions d'antibiotiques de substitution.

Avec le marqueur, annoter l'emplacement des disques sur le couvercle de la boîte de Pétri.

Placer le couvercle en dessous de la boîte contenant la gélose. (Cette étape peut être remplacée par le placement du gabarit en dessous de la boîte contenant la gélose.)

Grâce à la pince fine, prélever un disque de papier. Le tremper dans la solution d'antibiotique. Essuyer le disque sur le bord de l'Eppendorf. Refermer le capuchon et reposer l'Eppendorf dans le porte-tubes.

Placer le disque sur la gélose à l'emplacement prévu. Si le disque « colle » à la pince, s'aider du cure-dent.

Rincer la pince grâce à la pissette d'eau, au-dessus du bécher. Essuyer la pince avec le chiffon et répéter la manipulation avec les autres disques.

Attendre environ 15-20min. Observer les résultats.