

ETUDE DE LA CROISSANCE D'UNE SOUCHE PURE BACTERIENNE *E. coli*, en milieu liquide agité, aéré, non renouvelé, à température constante

Préalable. Après lecture du document, il faudra, dans un premier temps, examiner les éventuelles contraintes particulières de gestion des risques chimiques ou biologiques et de gestion des déchets liées aux manipulations proposées.

Compte-rendu : formuler les remarques jugées intéressantes de gestion des risques chimiques ou biologiques, de sécurité et de gestion des déchets liées aux manipulations proposées.

1 Origine des précultures :

Des pré-cultures d'une souche pure référencée *Escherichia coli* CIP 54.8 (collection institut Pasteur) sont fournies.

La souche a été conservée par congélation à -70°C , reprise et isolée sur milieu nutritif trypticase soja gélosé. Pour réaliser chacune des précultures fournies, une colonie isolée a été prélevée, mise en suspension dans 1 mL d'eau salée stérile à 9 g/L et introduite dans 50 mL de milieu cœur-cerveille en Erlen agité, à 37°C . Les précultures sont fournies ont 18 heures (elles sont en plateau de biomasse, milieu épuisé).

Composition du milieu cœur-cerveille (BH, brain-heart).
<ul style="list-style-type: none"> - infusion de cerveau de bœuf 12,5 g ; - infusion de cœur de bœuf 5 g ; - peptone 10 g ; - glucose 2 g ; - NaCl 5 g ; - dihydrogénophosphate de sodium 2,5 g ; - pH = 7,4 +/- 0,2 ; - eau qsp 1 litre. <p>Autoclavé 15 min à 121°C.</p>

2 Suivi de croissance en milieu BH, agité, aéré, non renouvelé, à 37°C :

- Ensemencer un Erlen contenant 50 ml de milieu BH préchauffé à 37°C avec x ml de pré-culture de façon à obtenir une densité optique à 600 nm (due au trouble lié à la biomasse) voisine de 0,1 au temps zéro de culture (ceci exige la mesure de la concentration en biomasse de la pré-culture utilisée et un calcul). Homogénéiser soigneusement et placer immédiatement au bain agité à 37°C .

- Suivre la croissance par mesure de la densité optique à 600 nm . Anticiper les dilutions éventuelles pour que chaque DO mesurée n'excède jamais la limite de linéarité (0,6 pour *E. coli* avec le matériel utilisé). Mesurer toute les 15 minutes. Réaliser toutes les lectures immédiatement (dans la minute) après chaque prélèvement et contre du milieu BH stérile.

Les cuves pour spectrophotomètre contenant la souche seront toujours obturées de film paraffiné et placées dans un portoir avant lecture. Elles seront jetées dans le récipient dédié destiné à l'incinération. Il convient d'apprendre à ne pas contaminer l'environnement (même si la séance utilise une souche de classe de risque 1).

Compte-rendu :

- Analyser la composition du milieu de culture proposé.
- Présenter la mesure de la concentration en biomasse de la pré culture (zéro spectro., dilution éventuelle, diluant ...). Expliquer comment le volume inoculum (x) a été déterminé.
- Établir un tableau des résultats expérimentaux pour la croissance réalisée. Préciser convenablement les dilutions réalisées, faire apparaître clairement les valeurs de densité optique lues au spectrophotomètre et les valeurs de concentration en biomasse bactérienne exprimée en absorbance (DO_x).

- Construire la courbe de croissance $\ln(DO_x) = f(t)$. Déterminer les différentes phases de la croissance.
 - Calculer la vitesse maximale spécifique de croissance à partir de la pente de la droite obtenue en phase exponentielle de croissance. En déduire alors le temps de doublement, la fréquence moyenne de division, le taux de croissance horaire.
 - Evaluer graphiquement le temps de doublement. En déduire alors la valeur de la vitesse maximale spécifique de croissance et vérifier l'accord avec la méthode précédente.
- Construire la courbe de croissance en représentation semi logarithmique. Réaliser une mesure graphique du temps de doublement. En déduire la vitesse maximale spécifique de croissance. Vérifier l'accord avec les méthodes précédentes.

3) Suivi de croissance en milieu M63modifié-stl + glucose 4g/L, agité, aéré, non renouvelé, à 37°C
(Manipulation gérée en commun par ensemble de 3 ou 4 étudiants.)

Composition du milieu M63modifié-stl + glucose 4g/L
- base saline stérile « bsstl » : KH_2PO_4 13,6 g/L ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/L ; NaCl 0,5 g/L ; ajusté à pH 7,0
- + 2mL $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 g/L + 2 mL CaCl_2 10 g/L par litre
- + 2 mL thiamine 10 g/L stérile par litre
- + 30 mL glucose 30% stérile pour 1 litre

Il s'agit d'ensemencer un Erlen contenant 50 ml de milieu M63modifié-stl + glucose 4g/L préchauffé à 37°C avec x ml de pré-culture de façon à obtenir une densité optique à 600 nm voisine de 0,04 au temps zéro de culture. La manipulation est donc quasi identique à celle du §2. Mais l'inoculum sera lavé avant l'ensemencement. Le lavage sera réalisé par centrifugation, élimination du surnageant, reprise dans de l'eau physiologique, nouvelle centrifugation, élimination du surnageant, reprise dans de l'eau physiologique. Suivre la croissance par mesure de la densité optique toute les 45 minutes environ.

Compte-rendu :

- Établir un tableau des résultats expérimentaux pour la croissance réalisée. Préciser convenablement les dilutions réalisées, faire apparaître clairement les valeurs d'absorbances lues au spectrophotomètre et les valeurs de concentration en biomasse bactérienne exprimée en densité optique (DO_x).
- Construire la courbe de croissance $\ln(DO_x) = f(t)$. Déterminer les différentes phases de la croissance. Calculer la vitesse maximale spécifique de croissance, le temps de doublement, la fréquence moyenne de division, le taux de croissance horaire.
- Expliquer l'intérêt du lavage de l'inoculum.
- Comparer les résultats des manipulations des §2 et 3. Interpréter.

Bibliographie

Chapitre " fermentation modelling " de C. G. Sinclair et D. Cantero de l'ouvrage " Fermentation " de la collection " Practical approach (B. McNeil and L.H. Harvey (eds.). Labonto. Fermentation: A Practical Approach., IRL. Press, Oxford., 1990)