

Etude de la croissance bactérienne en milieu non renouvelé

Le responsable d'une fromagerie produisant du camembert décide d'effectuer une étude des paramètres de la croissance de la souche *Hafnia alvei* (bacille Gram -, impliqué dans l'affinage du fromage et ayant un impact positif sur la production de composés aromatiques).

Pour cela il doit étudier la croissance de la bactérie dans les conditions optimales, son laboratoire ne lui permettant pas de faire de telles analyses, il vous demande de faire ce travail et de lui communiquer les résultats obtenus.

1. Principe :

La croissance se définit comme l'accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme. Chez les organismes pluricellulaires elle conduit à une augmentation de taille ou de masse, chez les organismes unicellulaires (bactéries, levures par exemple) elle aboutit essentiellement à une augmentation du nombre d'individus.

La mesure de la croissance se fera par le suivi de l'absorbance en fonction du temps et parallèlement par comptage en cellule de Thoma. La quantité de glucose consommée (substrat) en fonction du temps, sera dosée par méthode enzymatique.

10mL d'une préculture fraîche de la nuit de la souche sélectionnée *Hafnia alvei* en bouillon cœur-cerveille (BCC) sont introduits dans un erlen contenant le même milieu de culture dans les mêmes conditions de pH et de température. A partir de cet instant considéré comme t_0 des prélèvements stériles sont effectués et les analyses microbiologiques et biochimiques sont réalisées.

2. Etude préliminaire :

Q1 : D'après le document 1, donner le nombre de bactéries en une heure au bout de la troisième génération.

Q2 : Compléter la phrase suivante : après n divisions, le nombre de bactérie est de

Q3 : Donner le taux de croissance horaire de cette culture bactérienne : $r =$ et le temps de génération $G =$

Les paramètres de la croissance peuvent également se déterminer graphiquement, en traçant le nombre de bactéries N en fonction du temps on obtient le graphique présent dans le document 2 a, en prenant le log népérien du nombre N on obtient la courbe 2b.

Q4 : Le taux de croissance népérien (ou vitesse spécifique de croissance) : $\mu_{\text{expo}(x)}$ ou $Q_{\text{expo}(x)}$ et G : le temps de génération, sont déterminés grâce à la courbe $\ln A = f(t)$ et non par la courbe $A = f(t)$, en quoi est-ce plus judicieux d'utiliser de $\ln A$ par rapport à $A = f(t)$ en regardant les documents 2a et 2b.

Parallèlement à la mesure de la croissance bactérienne vous allez déterminer la concentration de glucose utilisé au cours du temps, pour cela vous utiliserez le kit RTU dont le mode opératoire est décrit dans le document 4. C'est une méthode de dosage de substrat en point final.

Q5 : Retrouver la condition nécessaire à ce type de dosage enzymatique

Q6 : Souligner le substrat à doser en jaune, les enzymes en rouge et le chromogène incolore en bleu et le chromophore qui absorbe en vert. Donner la réaction principale et la réaction indicatrice.

Q7: Retrouver la longueur d'onde à laquelle les mesures seront effectuées et le pH de la réaction, pourquoi a-t-on choisi ce pH ?

Q8 : Indiquer la liste du matériel à utiliser et les conditions de sécurité. Faire l'organigramme sous forme de schémas de l'ensemble des manipulations effectuées au cours de la séance.

3. Organisation de la séance :

Le travail a effectué se fera par groupe de quatre élèves :

- Chaque groupe dispose d'un erlenmeyer contenant 90 mL de milieu stérile BCC, d'un erlen de pré-culture d'*Hafnia alvei*
- Il faudra 2 élèves pour la partie biochimie et 2 élèves pour la partie microbiologique puis vous alternerez les postes à la moitié de la séance.
- Les analyses microbiologiques se feront en premier, puis les échantillons sont passés au fur et à mesure aux élèves qui font l'analyse biochimique

4. Manipulations :

A : Partie microbiologique :

- Les BCC stériles et la préculture sont placés dans un bain-marie thermostaté à 37°C sous agitation.
- Vérifier la stérilité du milieu en faisant un état frais et la pureté de la pré-culture par un Gram.
- Faire un isolement sur GN pour le BCC stérile et la pré-culture.
- Vérifier le pH qui doit être autour de 7,2 en prélevant stérilement à l'aide d'un compte-goutte stérile un petit volume du milieu BCC, déposer dans un tube hémolyse, tremper le papier pH dans le tube.
- Un élève de chaque groupe devra prélever 10 mL de la pré-culture, à l'aide de la pipette à usage unique stérile de 10 mL et ensemercer l'erien contenant le BCC stérile de la façon suivante :
 - Bien homogénéiser la pré-culture avant de prélever
 - Verser les 10 mL le plus stérilement possible dans l'erien contenant le BCC
 - **Dès cet instant déclencher le chronomètre = t_0**
 - Homogénéiser l'erien de culture
- **Prélever 1 mL à la pipette paille dans les conditions stériles et le verser dans une cuve à spectrophotomètre= échantillon 0**
 - Mettre la cuve immédiatement dans la glace pilée pour arrêter toute réaction
 - Remettre le plus rapidement possible l'erien au bain-marie
- A partir de l'échantillon t_0 , un élève effectuera un dénombrement en cellule de Thoma (cf. doc 3), l'autre lira l'absorbance à 620 nm contre un blanc réactif =
- Les autres prélèvements s'effectueront de la même façon toutes les 10 minutes pendant la première heure puis toutes les 15 minutes ensuite.
- Relever dans un tableau les différentes valeurs d'absorbance en fonction du temps ainsi que le nombre de cellules comptées/mL.
- **Attention des dilutions seront nécessaires à partir du moment où l'absorbance lue dépasse les limites du spectrophotomètre (voir selon l'appareil) ou lorsque le nombre de bactéries est indénombrable en cellule de Thoma.**
- Le tracer de $A = f(t)$ se fera en même temps que les manipulations jusqu'à l'obtention d'un plateau = phase stationnaire. Arrêter alors les manipulations.
- A la fin du TP, vérifier s'il n'y a pas eu de contamination en faisant un Gram et un isolement sur GN.

Précautions lors de la séance :

- **Eviter de contaminer l'erien en travaillant le plus proche possible du bec et en rebouchant l'erien soigneusement après les prélèvements.**
- **L'erien doit être remis au bain-marie rapidement après les prélèvements**

B : Partie biochimique :

- A partir des échantillons prélevés effectuer le dosage du glucose en fonction du temps selon la fiche d'utilisation du document 4.

Fin de séance : Réfléchir sur évacuation des déchets, des milieux utilisés et des matériels.

5. Compte rendu :

Q1 : Tracer les courbes de croissance e $A=f(t)$; $N= f(t)$.

Q2 : Tracer la courbe $\ln A = f(t)$ en tenant compte qu'une unité d'absorbance = 5.10^8 cellules/mL

Q3 : Tracer $\ln N = f(t)$.

Q4 : Pour chaque courbe, indiquer titre, échelle, conditions .Comparer les courbes et choisir celle vous permettant de déterminer les paramètres de la croissance $Q_{\text{expo(Hafnia alvei)}}$ et G.

Q5 : Tracer $\rho_{(\text{glucose ; milieu})} = f(t)$ Indiquer (titre, échelle, conditions....) sous Excel

L'exploitation des courbes sera effectuée en cours. Puis indiquer les paramètres de la croissance déterminés sur la courbe qui a pu être exploitée.

Q6 : Donner l'intérêt de placer l'erien contenant le milieu stérile dans les mêmes conditions que la pré-culture.

Q7 : Trouver l'intérêt de conserver l'agitation pendant la culture ainsi que la température.

Q8 : Analyser la composition du BCC ci-dessous et expliquer son classement dans la catégorie des milieux riches.

Q9 : Retrouver le rôle des peptones et du glucose dans la nutrition des bactéries.

Composition en g/L du bouillon cœur-cervelle BCC :

- | | |
|--------------------------------|------|
| • Peptones | 10 |
| • Infusion de cervelle de veau | 12,5 |
| • Infusion de cœur de bœuf | 5 |
| • NaCl | 5 |
| • Glucose | 2 |
| • Na_2HPO_4 | 2,5 |

DOCUMENT 1

Lors de la croissance bactérienne, il y a **reproduction asexuée par scission binaire** ou de scissiparité en l'**absence de toute recombinaison génétique** (pas de zygote). La bactérie est haploïde (possède un chromosome) .

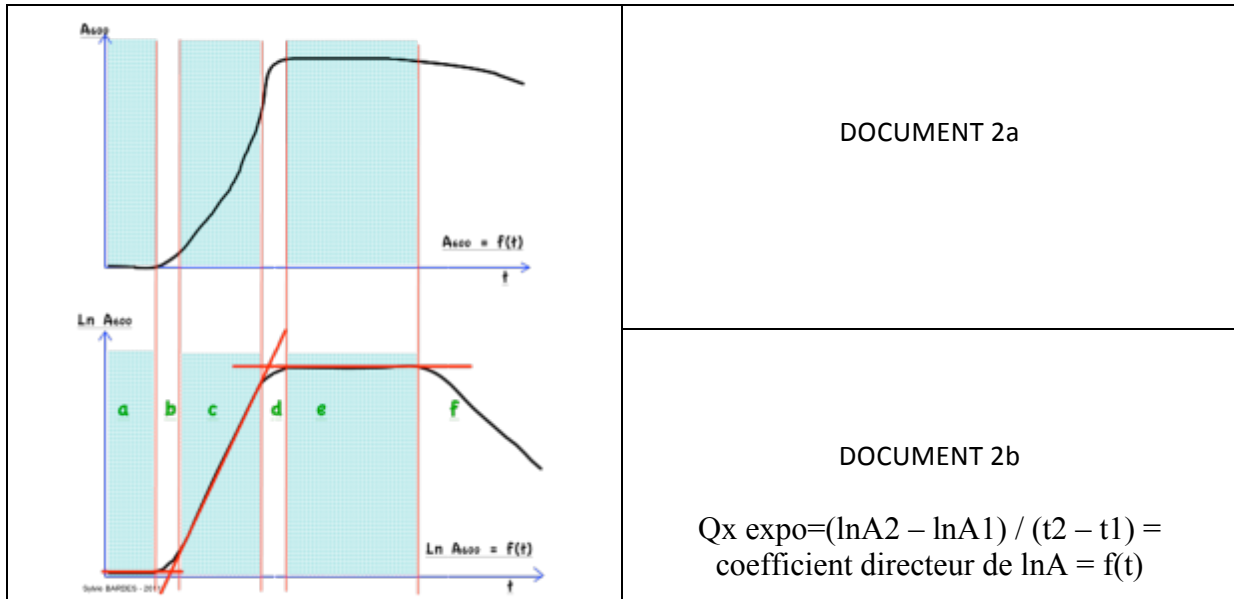


Chaque bactérie donne deux bactéries filles à chaque génération, on définit deux paramètres de la croissance :

- **Le temps de génération (G) : le temps que met une bactérie mère pour se dédoubler en deux bactéries filles** ou temps nécessaire au doublement de la population. G s'exprime en heure ou en minute
- **Le taux de croissance horaire (r) : le nombre de divisions par heure, r s'exprime en h⁻¹**

Génération	Descendance d'une bactérie après 3 divisions	Temps de multiplication à 40 °C		Nombre de bactérie
		E. coli	Mycobacterium tuberculosis	
	bactérie mère	0 min	0 min	$1 = 2^0$
première génération		20 min	4 heures	$2 = 2^1$
deuxième génération		40 min	8 heures	$4 = 2^2$
Troisième génération		1 heure		

DOCUMENT 2



DOCUMENT 3 : CELLULE DE THOMA

	<p>Compter les éléments cellulaires</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Avant de faire le comptage : faire une observation à l'objectif x10 non seulement pour repérer le quadrillage mais aussi pour vérifier que les cellules à compter sont réparties de façon homogène Passer à l'objectif x40 pour effectuer le comptage ▶ Pour les éléments chevauchant les lignes, comptez tous ceux qui chevauchent les lignes à gauche et en haut. Ne comptez aucun élément qui chevauche les lignes à droite et en bas.
<p>Description</p> <p>Le quadrillage total</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ volume : 0,1 µl ▶ côté : 1 mm ▶ hauteur : 0,1 mm <p>Manipulation :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ homogénéiser le liquide à analyser (ou sa dilution), l'introduire dans la cellule <p>Attendre au moins 4 min, la cellule bien à l'horizontal, (les éléments cellulaires doivent sédimenter).</p> <p><i>Si on prévoit un nombre élevé de cellules :</i> Diluer le liquide à analyser : à 1/2 ou 1/5 ou 1/10 ou plus, dans du sérum physiologique.</p>	<p>Calcul du nombre de cellules par microlitre</p> <p>Soit n le nombre d'éléments comptés, N le nombre d'éléments par microlitre (µl), V le volume de comptage. Thoma : V = 0,1 µl (totalité du quadrillage)</p> <p style="text-align: center;">$N = n / V$ donc $N = n / 0,1$</p> <p>Si le comptage est effectué sur du liquide dilué : ne pas oublier de multiplier le nombre d'éléments comptés par le taux de dilution.</p> <p>Nettoyage après usage : cellule et lamelle plane :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ immersion pendant 5 minutes dans un bain d'eau de javel dilué, ▶ rinçage à l'eau du robinet puis à l'eau distillée, ▶ essuyage : linge fin ou papier absorbant non pelucheux (genre « Sopalin ») sans frotter, ▶ laisser sécher à l'air libre durant quelques minutes, ▶ ranger à l'abri des poussières.

KIT Glucose RTU

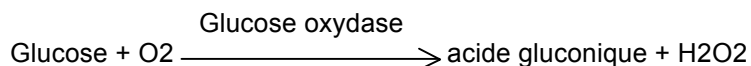
Dosage enzymatique du glucose

PRINCIPE :

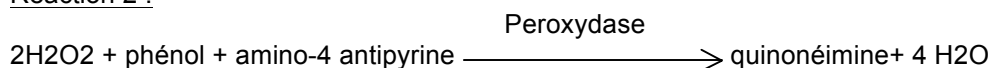
Méthode utilisant une enzyme pour permettre le dosage de son substrat, l'enzyme est ici un réactif, son activité catalytique n'est pas recherchée.

Il est nécessaire que tout le substrat à doser soit transformé. Il faut pour cela que les réactions soient totales et terminées, certains réactifs sont ajoutés en large excès pour déplacer les équilibres vers la droite

La quantité de substrat transformé est mesurée par spectrophotométrie. Une des molécules doit présenter une absorption caractéristique.

Réaction 1 :

L'eau oxygénée formée est dosée selon la réaction de TRINDER (2).

Réaction 2 :

L'intensité de la coloration rouge (quinonéimine), mesurée à 505 nm, est proportionnelle à la quantité de glucose présente dans l'échantillon.

MODE OPERATOIRE :**Préparation du réactif**

Réactif prêt à l'emploi.

Stabilité après ouverture, dans le flacon d'origine

- 2 mois à 2-8°C.
- 21 jours à 20-25°C.

Réalisation du test

Longueur d'onde : _____ 505 nm (492 à 550 nm)

Zéro de l'appareil : _____ blanc réactif

**PRESENTATION ET COMPOSITION DU COFFRET
(Réf. 61 269 : 400 tests - Réf. 61 270 : 1000 tests)
Glucose RTU™**

Tampon phosphate pH 6,6	225 mmol/l
Amino-4-antipyrine	0,3 mmol/l
Phénol	8,5 mmol/l
EDTA	5 mmol/l
Peroxydase	≥ 300 U/l
Glucose oxydase	≥ 10 000 U/l

	Blanc réactif	Etalon		Dosage	
		E1	E2	D1	D2
Etalon	-	10µl	10µl	-	
Echantillon	-			10µl	10µl
Réactif	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Mélanger.

Photométrer après une incubation de :

- 10 minutes à 37°C.
- 20 minutes à 20-25°C.

Stabilité de l'étalonnage : Effectuer un étalonnage à chaque série de dosages.

Stabilité de la coloration : 1 heure à 20-25°C.

CALCUL :

$$\text{Concentration de l'échantillon} = \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{\text{étalon}}} \times n$$

n = concentration de l'étalon

Multiplier, si nécessaire, le résultat obtenu par le facteur de dilution.

FACTEUR DE CONVERSION : mmol/l x 0,180 = g/l ; g/l x 5,56 = mmol/l ;