

TP MGF : CULTURE D'*Escherichia coli* EN MILIEU LIQUIDE NON RENOUVELÉ

NOM :

PRÉNOM :

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 micro-organismes unicellulaires (bactéries, levures), elle aboutit essentiellement à **une augmentation du nombre d'individus**.

Les principales méthodes de dénombrement permettant un suivi de croissance sont :

- l'opacimétrie.
- le dénombrement en hématimètre.
- la détermination du poids sec.
- le compteur de particules.
- l'ATPmétrie.
- l'impédancemétrie.

1. BUTS

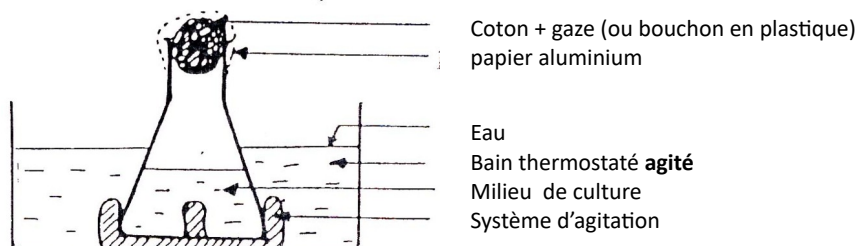
On se propose ici d'effectuer un suivi de croissance d'une souche d'*Escherichia coli* par opacimétrie à différentes températures d'incubation.

On étudiera également l'action d'un antibiotique, l'ampicilline, sur la croissance de cette bactérie à 41°C.

2. MÉTHODES

2.1. CULTURES AÉROBIES D'*Escherichia coli* EN MILIEU LIQUIDE NON RENOUVELÉ

La culture se fait en fiole d'Erlenmeyer :



Les températures d'incubation étudiées sont : **30°C, 37°C, 41°C, 45°C, 50°C**.

Les incubations se feront en **bain marie agité** ou à **l'étuve (agitation manuelle)**.

→ Au temps t_0 , inoculer 100 mL de BCC (bouillon Coeur Cervele) avec un volume de préculture égal à 5 % du volume du milieu.

Calcul du volume de préculture à utiliser :

2.2. SUIVI DE CROISSANCE PAR OPACIMÉTRIE

- Mesurer immédiatement après l'ensemencement l'atténuation D à $\lambda = 650$ nm, notée D_{650} .
- Toutes les 15 minutes, prélever aseptiquement dans une microcuve de spectrophotomètre, environ 0,5 mL de milieu et mesurer l'atténuation D_{650} .

Remarques :

- Les prélèvements doivent être **conservés dans la glace** et **couverts avec du parafilm**.
- **Effectuer les prélèvements le plus rapidement possible** pour limiter les variations de température du milieu.
- **Effectuer toutes les mesures sur le même appareil** et bien essuyer l'extérieur des cuves pour éliminer la buée.
- **Utiliser du BCC stérile pour effectuer le zéro du spectrophotomètre**.
- On précise la **limite de linéarité** des appareils: $D_{650} = 0,6$.

Au-delà de cette limite les échantillons doivent être **dilués en BCC** et on utilisera l'atténuation corrigée :

$$D_{650} \text{ corrigée} = D_{650} \text{ lue} \times \text{facteur de dilution}$$

Pour la croissance en présence d'ampicilline :

- À $t = x$ minutes (donné par l'enseignant), ajouter de manière aseptique 1 mL de la solution d'ampicilline à $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.3. GESTION DES DÉCHETS

Éliminer les cuves + parafilm dans un bain d'eau de Javel.

3. RÉSULTATS

Compléter le tableau de suivi de croissance suivant :

temps (minutes)	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195
D_{650} $\theta = 30^{\circ}\text{C}$														
D_{650} $\theta = 37^{\circ}\text{C}$														
D_{650} $\theta = 41^{\circ}\text{C}$														
D_{650} $\theta = 41^{\circ}\text{C}$ + ampicilline														
D_{650} $\theta = 45^{\circ}\text{C}$														
D_{650} $\theta = 50^{\circ}\text{C}$														

Pour la croissance réalisée à 41°C en présence d'ampicilline, indiquer le temps d'ajout de la solution d'ampicilline à 5 g·L⁻¹.

4. EXPLOITATION DES RÉSULTATS

4.1. CINÉTIQUES ET BILANS DE CROISSANCE À LA TEMPÉRATURE $\theta = 41^\circ\text{C}$

Q1. Compléter le tableau d'exploitation de résultats suivant avec les données obtenues à $\theta = 41^\circ\text{C}$, en absence d'ampicilline.

temps (minutes)	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
D_{650}													
$\log_e(D_{650})$													
μ_x (minute ⁻¹)													

Q2. Tracer la courbe $D_{650} = f(\text{temps})$.

Q3. Tracer la courbe $\log_e(D_{650}) = f(\text{temps})$.

Évaluer pour chaque temps, la **vitesse spécifique de croissance** μ_x . Expliquer la méthode. Ajouter la courbe correspondante $\mu_{xx} = f(\text{temps})$ sur ce graphique, et **déterminer** $\mu_{x \text{ expo}}$.

$\mu_{x \text{ expo}} =$

Q4. Évaluer le **temps de génération** $G_{41^\circ\text{C}}$ à $\theta = 41^\circ\text{C}$, en absence d'ampicilline.

$G_{41^\circ\text{C}} =$

Q5. Compléter le tableau d'exploitation de résultats suivant avec les données obtenues à $\theta = 41^\circ\text{C}$, en présence d'ampicilline.

temps (minutes)	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
D_{650}													
$\log_e(D_{650})$													
μ'_x (minute⁻¹)													

Q6. Tracer la courbe $D_{650} = f(\text{temps})$.

Q7. Tracer la courbe $\log_e(D_{650}) = f(\text{temps})$.

Évaluer pour chaque temps, la **vitesse spécifique de croissance** μ'_x .

Ajouter la courbe correspondante $\mu'_x = f(\text{temps})$ sur ce graphique, et **déterminer** $\mu'_{x \text{ expo}}$.

$\mu'_{x \text{ expo}} =$

Q8. Évaluer le **temps de génération** $G'_{41^\circ\text{C}}$ à $\theta = 41^\circ\text{C}$, en présence d'ampicilline.

$G'_{41^\circ\text{C}} =$

Q.9. Comparer la croissance d'*Escherichia coli* à 41°C en absence et en présence d'ampicilline.

Indiquer l'effet de cet antibiotique sur la culture *Escherichia coli* (bactéricidie ou bactériostase).

4.2. CINÉTIQUES ET BILANS DE CROISSANCE EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE

Q10. Tracer les courbes $D_{650} = f(\text{temps})$ aux différentes températures étudiées et en absence d'ampicilline sur une même feuille de papier semi-log.

Q11. Déterminer les paramètres de la croissance μ_{expo} et G pour chaque température étudiée.

	$\theta = 30^{\circ}\text{C}$	$\theta = 37^{\circ}\text{C}$	$\theta = 41^{\circ}\text{C}$	$\theta = 45^{\circ}\text{C}$	$\theta = 50^{\circ}\text{C}$
$\mu_{\text{expo}} \text{ (min}^{-1}\text{)}$					
$G \text{ (min)}$					

Q12. Tracer la courbe $\mu_{\text{expo}} = f(\theta)$. Commenter.

Q13. En fin de croissance, il est nécessaire de vérifier la pureté de la souche. Indiquer un moyen de procéder.

