

Estimation du titre d'une culture bactérienne et étude de la croissance bactérienne en fonction des conditions de culture

1 Préambule

Vous trouverez en **gras** les termes importants et en *italique* les remarques sur la pratique et/ou culture générale

2 Introduction

Au cours des deux séances de TP, nous avons étudié les conditions de croissance de la bactérie *Escherichia coli*. Les deux séances sont interdépendantes car si dans la première nous permet de faire le **lien entre absorbance et concentration** en bactéries par mL, la seconde s'intéresse à **l'influence de deux paramètres (température et concentration en NaCl) sur la dynamique de croissance** mesurée grâce au temps de génération.

3 Matériel et méthodes

L'organisme étudié est une bactérie : *E. coli*, afin de ne pas fausser les mesures par développement d'autres organismes, nous nous plaçons en **conditions stériles** lors des manipulations. Pour estimer la concentration en bactéries nous avons utilisé :

- Une culture de nuit (i.e. une culture en phase stationnaire). *Cependant, elle n'est pas utilisable directement car la concentration en bactérie est trop grande, il a donc fallu utiliser une dilution en cascade.* Pour réaliser une dilution en cascade, il faut : prélever 100 μ L de culture, et le diluer dans 900 μ L d'eau, homogénéiser la solution et répéter en prélevant dans la solution diluée. Nous obtenons trois facteurs de dilutions d'intérêt : 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} .¹
- Nous prélevons 100 μ L de chacune de ces dilutions pour étalement sur du milieu gélosé (boîte de Pétri). Les boîtes sont mises en culture pendant 24h à 37 ° C puis stockées au froid (4 ° C) pour analyse ultérieure.
- Connaissant le facteur de dilution f et le volume étalé V, il est possible de trouver la concentration initiale en comptant le nombre de colonies :

– La concentration étalée est définie par $c_{et} = N/V$, avec N le nombre de colonies

¹Bien évidemment, si l'on choisissait par convention un facteur de dilution >1 , on devrait remplacer f par $1/f$ dans les formules.

- $c_{initiale} = c_{et}/f$ je peux ici vérifier facilement que $c_{initiale} \gg c_{et}$
- D'où $c_{initiale} = \frac{N}{V \times f}$

D'autre part, nous avons mesuré ou estimé l'absorbance de la culture de nuit diluée par 10, ce qui nous permet (par application de la loi de Beer-Lambert dans la zone de linéarité du spectrophotomètre) d'en **déduire le lien entre concentration et absorbance**.

Pour étudier la dynamique de croissance, il a fallu :

- Ensemencer 20mL de LB frais avec environ 2mL de milieu de culture (absorbance de départ de 0.1 à t_0)
- Mettre en culture à 30° C ou 37° C avec/sans présence de NaCl (à 0,5 mol/L)
- Le milieu de culture n'ayant pas une densité optique nulle, il convient de faire le blanc (« zéro ») du spectrophotomètre avec le milieu de culture utilisé.²³
- Les spectrophotomètres ayant une **zone de linéarité** pour $A < 1$ en général, nous nous sommes placés dans des conditions optimales d'observations avec une absorbance de départ autour de 0,1. Toutefois si l'absorbance devenait trop grande, il pourrait falloir diluer le milieu de culture pour se retrouver dans des conditions adéquates de culture.
- **Principe de calcul du temps de génération** : voir interface web
Lien: <https://deveaup.shinyapps.io/GenerationTime>

4 Résultats

Nous avons observé que les dilutions à 10^{-4} et 10^{-5} étaient trop concentrées, et donnaient un tapis cellulaire. Cependant, la dilution à 10^{-6} a fourni les résultats suivants :

Groupe	Nombre de colonies	Absorbance mesurée (dilution au 1/10)
1	100	0.1
2		

Ceci nous permet de définir un **titre moyen pour la culture de nuit** de ... colonies/mL, ce qui correspond à une absorbance théorique de ... Lors du second TP nous avons observé les valeurs suivantes de l'absorbance :

²Pour plus de renseignements sur l'absorbance, voir les remarques en annexe

³La présence de NaCl change l'absorbance, mais cela ne change pas la dynamique de la courbe, et n'influencera donc pas le calcul du temps de génération. En revanche si le milieu servant de "blanc" venait à être contaminé, il peut être nécessaire de le remplacer par du milieu frais, afin de ne pas fausser les mesures.

Temps (min)	Absorbance	concentration en bactéries
0	0.1	
10	0.1	

Ce qui est récapitulé par la **courbe ci-jointe**. **Le calcul du temps de génération se fait dans la partie de croissance exponentielle de la courbe**. Soit je détermine graphiquement le temps nécessaire pour doubler l'absorbance sur la « droite » moyenne, soit je calcule le coefficient directeur de la fonction $\ln(A) = f(t)$ Par le même procédé, les différents groupes ont obtenu les valeurs suivantes :

Groupe	G (min)
1	
2	

5 Conclusion

Nous pouvons déjà remarquer qu'il existe une certaine **variabilité dans les mesures**, que ce soit au sein d'un même groupe (*écart à la « droite » moyenne pour l'absorbance en fonction du temps, différence dans les concentrations calculées avec les trois dilutions*), mais aussi entre deux groupes (détermination du temps de génération pour des conditions identiques). Avoir plusieurs mesures permet de prendre la valeur moyenne, ce qui diminue l'erreur par rapport à chacune des mesures prises indépendamment. Le cas échéant, si le nombre de mesures est suffisant, il est possible d'éliminer un résultat qui présenterait un caractère anormal.

En ce qui concerne la dynamique de croissance, par **comparaison des cultures à 30° C et 37° C sans NaCl** nous observons qu'un écart à la température optimale de 37° C augmente le temps de génération (*il est possible de quantifier cela en utilisant la différence*

$$(G_{30} - G_{37})/G_{37}$$

). De la même manière, **la présence de sel se fait au détriment de la croissance bactérienne**, *ce qui explique que la salaison était un moyen de conservation des aliments avant l'apparition de la réfrigération*. Pour justifier cela, **on comparera $G_{30-NaCl}$ à G_{30} et $G_{37-NaCl}$ à G_{37}** .

Enfin, on peut remarquer que **la combinaison des deux facteurs ralentit plus encore la croissance que chacun des facteurs séparément**.

6 Annexe

Les domaines de linéarité des spectrophotomètres sont disponibles dans le sujet du TP. L'absorbance d'un milieu est lié à sa composition. Pour les solutions

diluées, on peut écrire la loi de Beer-Lambert:

$$A = \sum_i \lambda_i \times c_i$$

- où λ_i est le coefficient d'extinction de l'espèce i
- et c_i est la concentration de l'espèce i

On peut aussi ajouter que la température peut influencer l'absorbance, mais on négligera ce paramètre dans le cadre de ce TP.