

## Action de l'ampicilline sur *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* (CIP 52.62, ATCC 6633) : croissance en milieu liquide non renouvelé en présence d'ampicilline

### 1 Travail pratique à réaliser, instructions

#### 1.1 Suivis de cultures

- Préchauffer à 37°C deux Erlenmeyer contenant chacun 50 mL de bouillon Muller-Hinton.
- Une pré-culture de *Bacillus subtilis* CIP 52.62 sur bouillon Muller Hinton agité, aéré, 37°C est disponible. Inoculer chaque Erlenmeyer avec un volume inoculum ( $v_{inoc}$ ) de 2 mL. Cultiver à 37°C sous agitation.
- Suivre la croissance par mesure de densité optique (DO) à 600 nm. Mesurer la DO à  $t=0$  puis toutes les 30 minutes pendant 4h. Attention, *B. subtilis* a tendance à former des agglomérats, il faut « vortexer » (en tube fermé) chaque prélèvement avant lecture de DO et lire immédiatement après retournement des cuves échantillons. On admettra qu'il y a linéarité de correspondance entre DO et concentration en biomasse jusqu'à 0,6 de DO pour une culture standard de *B. subtilis*. Éviter le plus possible les écarts de température en cours de culture.
- Au temps  $t=1,75$  h (1h 45 min) ajouter un volume  $V_{ab}$  de solution d'ampicilline à 10 mg/mL à un des Erlenmeyers.  $V_{ab}$  sera indiqué par l'enseignant. Différentes valeurs seront testées sur l'ensemble du groupe (100, 400, 1000  $\mu$ L, 2000  $\mu$ L...).
- Observer la morphologie des bactéries au temps 1 h (coloration de Gram) et au temps 3,5 h dans l'Erlenmeyer traité à l'ampicilline.

#### 1.2 Vérification de la DO à $t=0$

Juste après l'inoculation et les 2 mesures de DO à  $t=0$ , prélever un peu de pré-culture inoculum, mesurer la DO de biomasse et calculer la valeur théorique de la DO à  $t=0$ . Comparer avec les 2 valeurs expérimentales.

### 2 Compte-rendu

- Résultats expérimentaux et calculs réalisés. Indication précise du « zéro spectro. » et du diluant utilisé. Tableau des résultats du suivi des croissances comportant les lignes suivantes : dilution éventuelle du prélèvement ; DO mesurée ; DO de biomasse ( $DO_{Biomasse}$ ) ; normalisation éventuelle des  $DO_{Biomasse}$  ;
- Courbes de croissance ( $\ln(DO_{Biomasse})=f(\text{temps})$ ) obtenues (sur le même graphique, éventuellement normalisées). Annotation des courbes de croissance : phases de la croissance, vitesse spécifique maximale de croissance, temps de génération, biomasse plateau ...
- Observations de morphologie.
- Conclusion concernant les résultats personnels
- Collecte des résultats du groupe d'étudiant, mise en forme judicieuse et analyse.

### 3 Données annexes

**Définition du terme antibiotique.** Toute substance d'origine naturelle (historiquement, les premiers antibiotiques étaient des molécules synthétisées par des microorganismes) ou synthétique ayant une toxicité à faible concentration et à mécanisme d'action biospécifique très ciblé (il existe une ou un nombre très limité de biomolécule(s) cible(s) précise(s) de l'antibiotique) envers certaines souches bactériennes. Les molécules cibles sont absentes ou de structure très différente chez les cellules eucaryotes si bien que la toxicité vis à vis des cellules eucaryotes est toujours faible et donc l'administration de l'antibiotique peut être envisagée dans un cadre thérapeutique par voie générale à l'hôte humain, animal, ou végétal (c'est la face thérapeutique du mot).

Sont donc exclus de la définition :

- les antiviraux et les antifongiques à action biospécifique ;
- les désinfectants et antiseptiques qui ont action sans biospécificité ciblée comme définie ci-dessus et qui sont trop toxiques pour envisager toute administration par voie générale.

Sur une cellule souche sensible en culture, la toxicité de l'antibiotique va se manifester par des effets de ralentissement ou d'arrêt de la croissance (bactériostase) ou par des effets létaux (bactéricidie).

La concentration minimale inhibitrice de l'ampicilline (pas de culture visible en 24h) vis à vis de la souche *Bacillus subtilis* CIP 52.62 a été préalablement mesurée à 0,04 mg/L en milieu Muller-Hinton avec une charge bactérienne standard de  $5 \cdot 10^5$  bactéries par mL de milieu de culture.

Pour information, une DO de 0,1 correspond à environ  $2 \cdot 10^7$  bactéries par mL avec les spectrophotomètres utilisés. Le suivi de culture proposé est donc réalisé avec une concentration bactérienne de l'ordre de 100 fois plus élevée que celle du standard de détermination de la CMI lors de l'ajout de l'ampicilline.