

## Croissance diauxique d'une souche pure *E. Coli* en milieu Minimum + glucose et lactose

### 1 Précultures

Une préculture de 18 heures d'une souche pure référencée *Escherichia coli* prototrophe (souche historique B ou DSM 1562) est réalisée. Préculture aérée, agitée, 37°C, en milieu Minithi + glucose 0,4%.

#### Composition du milieu Minithi :

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- base saline stérile « M63NaCl » : <math>KH_2PO_4</math> 13,6 g/L ; <math>(NH_4)_2SO_4</math> 2 g/L ; <math>FeSO_4 \cdot 7H_2O</math> 0,5 mg/L ; <math>NaCl</math> 0,5g/L ajusté à pH 7,0 avec NaOH</li> <li>- + 2mL <math>MgSO_4 \cdot 7 H_2O</math> 100 g/L par litre</li> <li>- + 2 mL <math>CaCl_2</math> 10 g/L par litre</li> <li>- + 1 mL thiamine 20 g/L stérile par litre (stockage par congélation)</li> <li>- + 1 mL de base 1000x de micronutriments minéraux (BG-11 Trace metal mix A5)</li> <li>- + 14 mL glucose 30 % stérile pour amener à 0,4 % final</li> </ul> |
|---|

### 2 Préparations préalables de milieux et de réactifs

Sous PSM, préparer du milieu Minithi sans glucose stérile (selon les besoins à établir...) et le préchauffer à 37°C.

- base saline stérile « M63NaCl » :  $KH_2PO_4$  13,6 g/L ;  $(NH_4)_2SO_4$  2 g/L ;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5 mg/L ;  $NaCl$  0,5g/L ajusté à pH 7,0 avec NaOH
- + 2mL  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  100 g/L par litre
- + 2 mL  $CaCl_2$  10 g/L par litre
- + 1 mL thiamine 20 g/L stérile par litre (stockage par congélation)

Préparer une solution  $NaCl$  9g/L + chloramphénicol 50µg/mL (selon les besoins à établir ...) à l'aide d'une solution  $NaCl$  9g/L et de chloramphénicol 20x à 1 mg/mL.

### 2 Suivi de la culture sur Milieu minimum glucosé et lactosé

- Mesurer la turbidité de la préculture à 600 nm. Calculer le volume x nécessaire pour un Erlen de culture de 80 mL de volume final ayant une atténuation (OD, Optical Density) de 0,20 en au temps zéro.
- Introduire ce volume calculé dans un Erlen Stérile.
- Compléter immédiatement à 80 mL avec du milieu Minithi stérile sans glucose préchauffé à 37°C.
- Ajouter immédiatement 150 µL (ou 100 µL si on est pressé) de glucose stérile à 30 % plus 800 µL de lactose stérile à 30%.
- Mettre à agiter à 37°C.

Suivre la culture en conditions aérée, agitée, 37°C. On suivra la biomasse, le glucose et l'activité  $\beta$ galactosidase toutes les 30 minutes selon les modalités qui suivent. Toutes les 30 minutes :

- un prélèvement pour mesure de biomasse par trouble à 600nm ;
- un prélèvement de 1 mL en microtube à centrifuger pour suivi de glucose et d'activité  $\beta$ galactosidase. Centrifuger immédiatement (5 min 10000g) et traiter immédiatement selon les modes opératoires présentés ci-dessous. Voir documents annexes.

### 3 Compte-rendu :

- Donner la concentration en biomasse de la préculture utilisée sous forme d'une atténuation (OD) 600 nm. Expliquer comment le volume inoculum (x) a été déterminé.
- Etablir un tableau des résultats expérimentaux pour le suivi de la croissance. Etablir un tableau des résultats expérimentaux pour le suivi du glucose et de la  $\beta$ galactosidase.
- Construire la courbe de croissance  $\ln(OD) = f(t)$ . Déterminer les différentes phases de la croissance. Peut-t-on vraiment parler de croissance exponentielle lors de la première phase de croissance ? (justifier). Calculer la(les) vitesse(s) maximale(s) spécifique(s) de croissance, le(les) temp(s) de doublement.
- Commenter la composition du tampon B. Quelles fonctions doit-il assurer ?
- Indiquer les résultats obtenus pour le glucose et la  $\beta$ galactosidase (si possible en activité relative rapportée à la biomasse) sur le graphique de croissance.
- Analyser les résultats. Conclure.

**Document annexe 1. Suivi du glucose**

Doser le glucose formé selon le mode opératoire du tableau ci-dessous qui propose une adaptation d'un kit de dosage du glucose GOD/PAP pour biologie médicale. (Voir aussi les documents de cours et de TP de première année concernant ce kit.)

	Témoin réactifs	Etalon 1g/L	Echantillon	Témoin compensation échantillon (éventuellement)
Eau	E = 20 $\mu$ L			
solution étalon		E = 20 $\mu$ L		
Échantillon à mesurer			E = 20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
solution de travail	1 mL	1 mL	1 mL	-
eau	-	-	-	1 mL
<p><u>Homogénéiser</u> puis lire les absorbance <b>contre de l'eau</b>, à 505 nm, quand la réaction est terminée. Il faut 10 minutes à 37°C et 20 minutes à 20°C. <b>Linéarité jusqu'à 2,5g/L</b> dans l'échantillon dans les conditions proposées.</p>				
	$A_{TR}$	$A_{1et}$	$A_{1ech}$	$A_{TCE}$

Calculer  $A_{et} = A_{1et} - A_{TR}$  puis  $A_{ech} = A_{1ech} - A_{TCE} - A_{TR}$

et finalement  $[glucose]_{échantillon} = \frac{A_{ech}}{A_{et}} * 1$  (exprimée en g/L)

**Document annexe 2. Suivi de la  $\beta$ -galactosidase**

L'enzyme (intracellulaire) catalyse l'hydrolyse du substrat synthétique ONPG :  
 ONPG + H<sub>2</sub>O ---> ONP (jaune) + galactose

On réalise un suivi qualitatif ou quantitatif.

Le culot de centrifugation obtenu après chaque prélèvement est immédiatement repris et lavé avec 1 mL de NaCl 9g/L stérile + chloramphénicol 50 $\mu$ g/mL (il faut éliminer le lactose qui serait en compétition avec l'ONPG pour les mesures d'activité et bloquer toute synthèse protéique grâce à l'antibiotique chloramphénicol). Après centrifugation, le culot est homogénéisé avec 400  $\mu$ L de tampon B à 37°C. Ajouter alors 100  $\mu$ L de substrat ONPG à 37°C. Incuber 10 à 30 minutes à 37°C. Ajouter 250  $\mu$ L de réactif d'arrêt. Comparer avec un témoin réactif et noter qualitativement l'intensité de coloration jaune développée : 0/+/+/+/+++. Ou centrifuger et lire la coloration à 415 nm sur le surnageant.

*Solution ONPG : ONPG à 4mg/mL en tampon B*

*Tampon B : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16,1 g/L + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 5,5 g/L + KCl 0,75 g/L + MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,25 g/L + 2-mercaptoéthanol 2,7 mL/L, sodium dodecylsulfate (SDS) 1 g/L, pH = 7,0.*

*réactif d'arrêt : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mol/L.*

**Document annexe 3. Suivi du lactose**

Intéressant à faire. Mais non réalisé pour des raisons économiques.

**Bibliographie**

Burstein, Cohn, Kepes, Monod ; Rôle du lactose et de ses produits métaboliques dans l'induction de l'opéron lactose chez E. coli. ; Biochim. Biophys. Acta, 1965, 95:85-98.

Loomis, Magasanik, Glucose-lactose diauxie in Escherichia coli , J. of bacteriology, avr. 1967, 1397-1401.

Notes. Prédiction.

En supposant que  $Y_{X/glucose} = 0,3$  g de biomasse sèche (BS) pour 1 g de glucose, comme le milieu de culture est à 0,375 g/L ou 0,56 g/L en glucose, on a un potentiel de croissance de  $0,3 * 0,375$  (ou  $0,3 * 0,56$ ) = 0,11 ou 0,17 g/L de BS.

En supposant que une OD de 1 correspond à 0,7g/L de biomasse sèche (BS). Le temps zéro de culture sera à 0,14g/L en (BS). Et donc on peut espérer atteindre  $0,14 + 0,11$  (ou  $0,17$ ) = 0,25 (ou 0,31) g/L de BS finale lors de l'utilisation du glucose. Soit environ 0,36 (ou 0,44) de OD. On va « doubler grosso modo » la biomasse. D'après la littérature le temps de génération est vers 85 minutes dans les conditions proposées. On devrait donc arriver à la transition diauxique vers ce moment là. L'adaptation diauxique demande 30-40 minutes d'après la littérature.