

A microscopic view of a petri dish containing a bacterial culture. The image shows numerous circular colonies of varying sizes, some with distinct, textured surfaces. The background is a light, slightly blurred blue-grey color.

# PSE Bactéries confinées

---

MATÉRIEL ET MÉTHODES

# Culture des bactéries

**Principe** : Se constituer un stock de bactéries en faisant une culture overnight de bactéries avant la mise en croissance exponentielle.

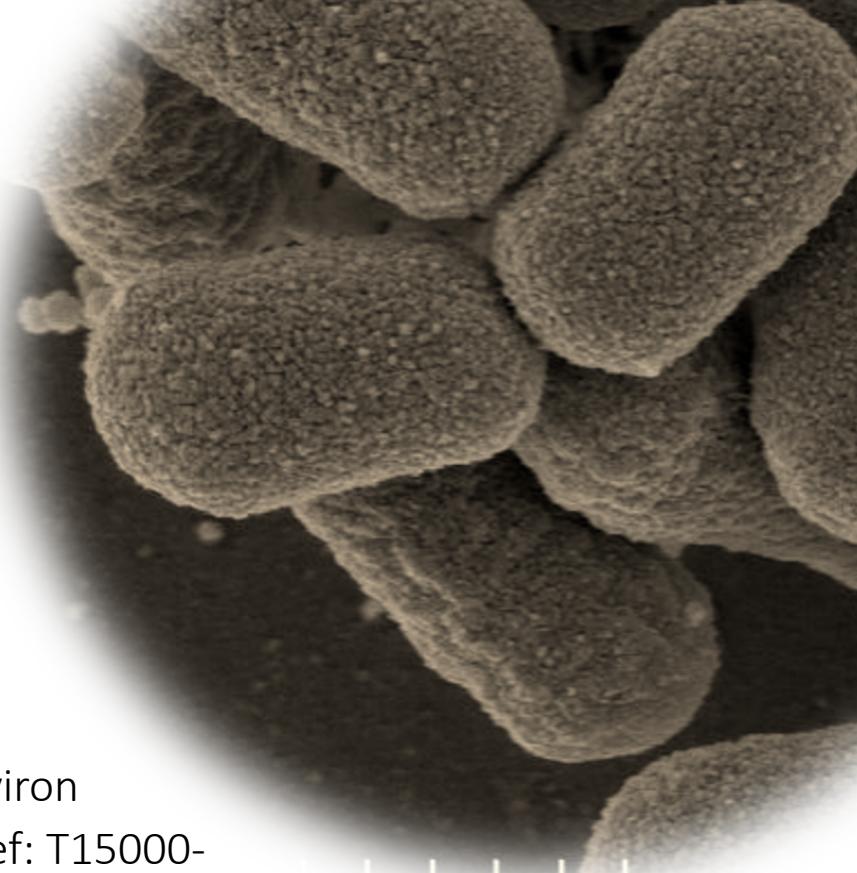
**Matériel** : Bactéries : *Bacillus subtilis* W1B68 (BS), connues pour leur motilité Stock de BS conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$

Milieu de culture utilisé : *Terrific Broth* (TB)

## Méthodes :

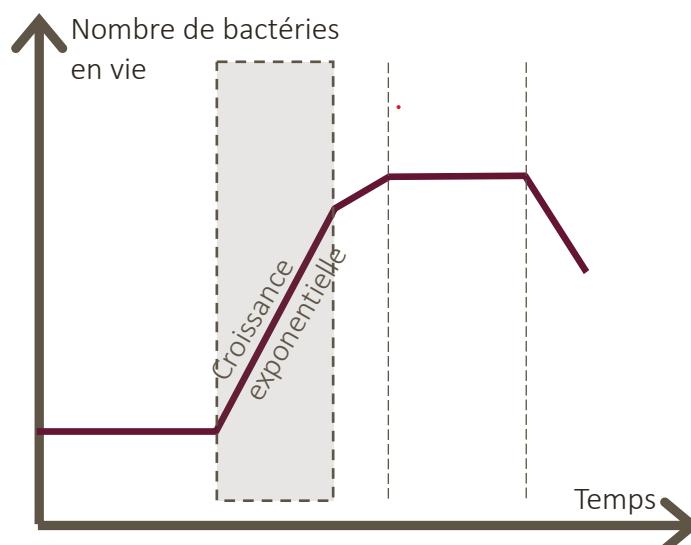
**Synthèse du TB** : On chauffe 1L d'eau distillée à environ  $60^{\circ}\text{C}$  dans laquelle on introduit 47,6g de poudre (ref: T15000-1000.0 - Terrific Broth, Modified, 1 Kilogram) et 4mL de glycérol. On autoclave à  $121^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes. Cette manipulation n'est faite qu'une seule fois, le TB obtenu est stocké dans un réfrigérateur classique et est utilisé en milieu stérile.

**Culture des BS** : On se place en atmosphère stérile. On pipette 5mL de TB qu'on insère dans un Falcon de 50mL. On gratte le fond de notre stock de BS avec une pipette P10 et on dépose les bactéries accrochées dans le Falcon. On laisse le Falcon ouvert d'un demi-tour de bouchon et on scotche le bouchon pour éviter qu'il ne se dévisse plus. On laisse incuber à  $35^{\circ}\text{C}$  pendant 12h.



## Mise en croissance exponentielle

**Principe** : Afin d'optimiser la concentration et la motilité des bactéries qu'on encapsule, on dilue et incube des bactéries jusqu'à ce qu'elles soient en fin de croissance exponentielle (cf courbe ci-dessous). On a tracé l'allure de cette courbe de croissance à différentes concentrations pour optimiser notre temps en amont des manipulations.



## Matériel :

*Dilution classique* : BS après une culture de 12h et TB de la section précédente

*Tracé de la courbe de croissance exponentielle* : Spectrophotomètre et un peu plus de 100 cuves



## Méthode :

*Dilution classique* : On dilue notre solution 200 fois en prélevant 25 $\mu$ L de BS de la culture overnight, en ajoutant 4.975 mL de TB. Pour toutes les dilutions on remet ensuite à incuber à 35° pour que les bactéries aient bien entamé leur croissance exponentielle quand on les observera. Le temps d'incubation dépend de la dilution effectuée : pour une dilution 200, c'est 5h d'incubation minimum.

*Tracé de la courbe de croissance exponentielle* :

Faire le blanc avec 600 $\mu$ L de TB.

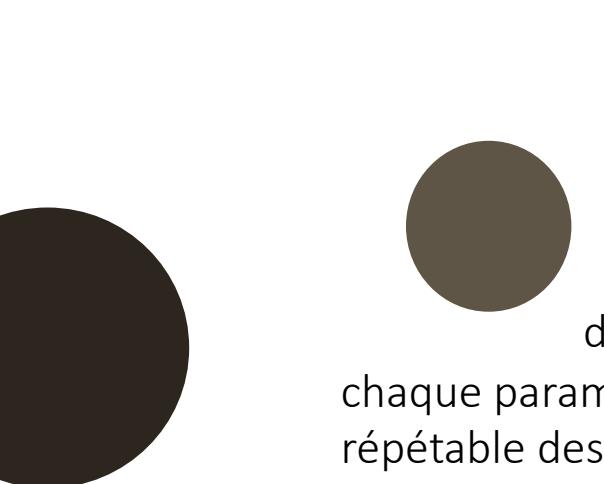
Faire une dilution classique et la re-diluer au TB plusieurs fois jusqu'à trouver pour quelle concentration (en la solution initiale) l'absorbance ne sature pas. Pour nous c'était avec une dilution x10. À partir de la culture overnight, faire 3 Falcons dilués 200 fois et 3 Falcons dilués 20 fois (250 $\mu$ L de BS dans 4,75mL de TB).

Pour chaque mesure d'absorbance, prélever 60  $\mu$ L des solutions et les insérer dans une cuve avec 540 $\mu$ L de TB. Mélanger rapidement avec le bout de la pipette. Faire 2 mesures par Falcon en retournant la cuve pour la 2ème mesure.

Pour tracer nos courbes on a fait des mesures toutes les 20 minutes pendant 5h40.

Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des absorbances des 6 mesures faites par dilution.

# Émulsions



**Principe** : On veut obtenir des microémulsions de bactéries (dans du TB) dans un milieu huileux. La tailles des gouttes devra être de l'ordre de 30 $\mu$ m avec une dispersité en taille de  $\pm 10\mu$ m pour observer des mouvements collectifs dans différentes tailles de gouttes. La technique pour l'émulsion est à suivre précisément, chaque paramètre a été testé et optimisé pour obtenir de façon systématique et répétable des vortex satisfaisants en termes de diamètre.

**Matériel :** Une culture de bactéries overnight diluée 200 fois puis incubée pendant au moins 5h ou diluée 20 fois puis incubée 3h Du dodécane + du span80 à 10mg/mL (si on ne souhaite pas traiter les images par la suite) ou de l'huile de tournesol du commerce filtrée car elle est assez visqueuse (donc ne glisse pas sous la lame du microscope) et facilite ainsi l'analyse des vortex obtenus

**Méthode :** Centrifuger 10 minutes à 1500rpm et 35°C la culture de bactéries. Enlever le surnageant en renversant le tube puis pipetter très délicatement le reste de TB au fond du tube.

Mettre 200 $\mu$ L d'huile dans un ependorf, prélever 2\*20 $\mu$ L de BS en enfonçant une pipette dans le culot et les mettre en solution. Prélever 60 $\mu$ L vers le bas de la solution avec la pipette la plus fine possible et les redisperser en relâchant de bas en haut. Répéter 10 fois au total. Faire 5-6 secousses brèves à la main.

## Observation au microscope



**Principe :** Pour observer nos émulsions au microscope, on a trois contraintes. Pour avoir un vortex visible, il faut qu'il soit le plus perpendiculaire à l'axe optique possible. Pour ça, on aplatit légèrement les sphères obtenues pour forcer le mouvement collectif des bactéries à s'aplanir. Cette aplanissement impose alors une épaisseur d'échantillon réduite qui rend non négligeables les effets de tension superficielle aux bords et peut frustrer les courbures de nos sphères. Si l'échantillon est convexe sous la lamelle, on ne pourra pas aplanir nos sphères. Pour éviter ce phénomène, on sylanise nos lames afin d'avoir un film concave par rapport à l'axe optique. Enfin, on a une contrainte de temps : les microémulsions obtenues ci-dessus ont une métastabilité d'environ 10 minutes et une fois sur une lame de microscope, les bactéries étouffent au bout de 3 à 5 minutes et arrêtent de nager. Il faut donc optimiser toutes les manipulations.

## Matériel :

Émulsions avec BS concentrées en phase de croissance exponentielle (cf Culture de Bactéries, Croissance exponentielle et Émulsions)

Lames taille standard, lamelles carrées adaptées

Microscope avec grossissement x60 (nous avons changé trois fois de microscope, le microscope x40 scolaire est suffisant pour observer à l'oeil mais pour une réelle analyse d'image nous avons utilisé un microscope professionnel avec l'objectif Apo-ph3, Olympus et une caméra Orca-Flash4.0 CMOS camera (Hamamatsu).

Isopropanol, HFE, Sylane pur liquide

## Méthode :

*Contrainte 1* : On prélève 4,84µL pour avoir 10µm d'épaisseur sur la lamelle.

*Contrainte 2* : Pour forcer l'échantillon à être convexe, on augmente les répulsions lame(lle)/eau en les couvrant de sylane. Nettoyer les lame(lle)s avec de l'isopropanol, les sécher au pistolet à air et les mettre à l'étuve dix minutes à 90°C

**Sous hotte dédiée**, pipetter 490µL de HFE, ajouter 10µL de sylane pur rapidement (pour éviter qu'il ne précipite à l'air), fermer, secouer à la main. Dans une boîte de Pétri, déposer les lame(lle)s, ajouter 10µL de solution sylanée sur un bord et mettre sous vide 10minutes.

**Attention, ne pas toucher les lame(lle)s à la main** pour éviter d'enlever le sylane et à cause de la potentielle toxicité du sylane. La sylanisation reste moins d'une semaine, veiller à toujours sylaniser avant de manipuler.

*Contrainte 3* : On laisse sédimenter 2 minutes notre émulsion tout juste réalisée pour laisser les trop grosses gouttes tomber au fond de l'éppendorf sans que tout ne flocule et on prélève 5µL au milieu (dispersité en taille la plus intéressante). On parcourt rapidement l'échantillon au x20 pour repérer les zones d'intérêt et on s'y rend directement pour observer les vortex quand les bactéries sont encore bien motiles.

*Observation* : La hauteur de focalisation est primordiale dans l'observation des vortex : si on est en bord de goutte (bactéries observées nettes), les effets de bords sont important et contrecarrent le vortex. Pour observer un vortex propre, focaliser au milieu de la goutte (nous prenons la hauteur moyenne entre le haut et le bas de la goutte).

*Enregistrement vidéo* : Les vidéos sont enregistrées avec 30 fps

# Analyse des enregistrements vidéo



**Principe** : Pour analyser la stabilité et la vitesse de rotation des vortex selon différents paramètres, nous avons traité les enregistrements vidéos avec le module PIVlab de Matlab.

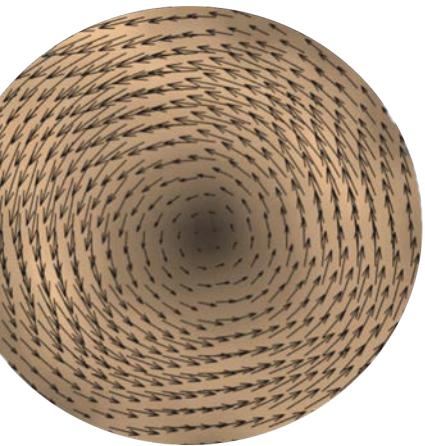
**Matériel** : PIVlab (<https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/27659-pivlab-particle-image-velocimetry-piv-tool>), Fiji

**Méthode** :

*Fiji* : Le fichier initial est sous forme czi, on le modifie en utilisant le filtre convolve sur fiji (« filter » -> « convolve »), puis on ajuste la luminosité afin d'avoir une image lisible (« adjust » -> « brigthness / contrast»). On enregistre ensuite le fichier sous la forme « image sequence ».

*PIVlab* : On commence par dessiner un masque, dans l'onglet « exclusions », pour exclure l'extérieur de la goutte.

On ouvre ensuite l'onglet « image pre-processing » et on paramètre comme suit : Enable Clahe 20, Auto contrast stretch activé  
Finalement dans la partie PIV settings, on choisi le mode « Ensemble correlation ». On active ensuite 3 passes avec des pas de 50%. La taille des fenêtres de passes dépend de la taille de la goutte. Pour l'expérience n°341 par exemple (image à gauche) la goutte a un diamètre de 20µm (136pix), on fait des passes de 30pix, 20pix et 10pix. On sélectionne ensuite « Gauss 2\*3-point » pour « sub-pixel estimator ». On désactive l'autocorrelation et on choisit une qualité de corrélation normale.



## Test de l'influence de la température sur la stabilité des vortex

**Principe** : On veut voir l'influence de la température sur la stabilité des vortex pour déterminer si une gamme de température permet d'optimiser les vortex.

**Matériel** : Lames et lamelles sylanisées, centrifugeuse. Cultures de bactéries en phase de croissance exponentielle.

**Méthode** : Mettre les tubes à incuber à température contrôlée pendant 30min. Centrifuger 3 minutes. Prélever le culot et l'insérer dans un eppendorf avec 200µL d'huile. Thermostater 15 min puis réaliser l'émulsion selon le protocole usuel et observer.