

Méthodes et Protocoles

Claire Brossier, Augustin Poinssot, Solène Ludwig

1 Objectifs du PSE

On souhaite étudier la compétition entre deux colonies de bactéries qui sécrètent un front de surfactant pour se développer.

Ce qu'on veut faire :

- Inoculer 2 colonies à différentes distances
- Visualiser l'effet du milieu sur la croissance des colonies ainsi que sur leur déformation lorsqu'elles sont proches d'une autre colonie
- Introduire des obstacles dans le milieu de culture entre les colonies
- Tester la compétition avec 2 souches différentes
- Visualiser l'effet de la température sur la croissance des colonies ainsi que sur leur déformation lorsqu'elles sont proches d'une autre colonie

2 Matériel

- souche de *Bacillus subtilis str.168*.
Caractéristiques :
 - Température optimale de croissance : 27-28°C
 - Forme des colonies : légèrement dendritique
 - Milieu de culture : LB
 - Stockage : survie pendant 2 semaines à 4°C
- Boîtes de pétris
- Agar en poudre
- LB en poudre
- Laminaire
- Caméra
- Imprimante 3D
- Logiciel de CAD
- Logiciel de tracking

3 Protocoles

Réalisation des différents milieux

Préparation de 4 milieux de 0,5L de composition suivante, afin d'étudier l'effet du milieu sur la croissance et leur déformation due à la compétition :

	LB	Agar	Eau	NaCl
Milieu 1	10g	7,5g	0,5L	0
Milieu 2	10g	10g	0,5L	0
Milieu 3	10g	10g	0,5L	2,5g
Milieu 4	10g	7,5g	0,5L	2,5g

D'après la littérature, *B. subtilis* est sensible au sel seulement à partir de 0.5M soit 14g/L. On n'a pas mis assez de sel dans les milieux 3 et 4 ce qui explique que nous ne voyons pas l'influence du sel.

Réalisation d'une culture liquide (*fait par nos encadrants*)

- 5ml de LB
- overnight 24h
- 180-250ppm
- 25°

Réalisation de la méthode Top Agar

- On réalise un milieu avec bactéries de composition :

LB	Agar	Eau	Bactéries
10g	7,5g	0,5L	qqls ml

- On coule le milieu dans une boîte
- Après solidification, on utilise un cône pour déposer un bout d'agar + bactéries sur une plaque réalisée précédemment. Utilisation du milieu 1.

Réalisation d'un timelapse

- On inocule un volume de 20 μ L aux distances d'inoculation :

0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2	2,25	témoin
-----	------	---	------	-----	------	---	------	--------

- Utilisation du logiciel PythonViewer
- 2 frames par heure, sans arrêt
- Faire attention à la qualité des images en lançant l'acquisition afin de ne pas les saturer
- Création du timelapse via ImageJ (dragdrop du dossier contenant les images, formation du film automatique)

Réduction des contaminations

- Laisser sécher les boîtes sous le laminaire pendant 20/25mn sans couvercle juste après les avoir coulées (possible diffusion des bactéries lors de l'inoculation sur le film liquide superficiel de la boîte)
- Attendre 1h30 avec le couvercle avant d'inoculer
- Retourner les boîtes de pétris afin que les gouttes de condensation présentes sur le couvercle ne tombent pas sur la plaque

Analyse d'image

- On utilise le logiciel de tracking libre de droit Tracker. Il permet de traquer l'interface milieu/Colonies, remarquable en niveau de gris, dans une direction sélectionnée. On choisit la direction qui passe au travers des deux colonies par leur point le plus proche l'une de l'autre
- On récupère deux listes de positions qui correspondent au tracking de la position du front des colonies en pixels sur chaque frame et l'indice des frames correspondant
- On fait la différence des deux listes de positions pour obtenir l'espacement inter-colonie. On obtient alors une nouvelle liste distance
- On soustrait à l'espacement d'inoculation cette distance mesurée. On obtient alors une nouvelle liste croissance
- On divise par deux les valeurs de cette liste pour faire la moyenne de la croissance d'une colonie. On obtient alors une nouvelle liste croissance moyenne
- On fait un produit en croix pour passer de la distance pixel en cm
- On multiplie la liste des frames par le temps entre chaque frame pour avoir une liste des temps
- Enfin on affiche la croissance moyenne en fonction du temps

Mise en évidence de la communication entre les colonies

- Inoculation dans une boîte de pétri de deux colonies à une distance qui permet normalement d'observer de la compétition. Utilisation du milieu 1.
- Mise en place sur le gel d'une barrière physique pour couper toute communication chimique entre les deux colonies par une lame d'aluminium

Observations attendues : avec la barrière, on coupe la communication chimique. Donc si le phénomène de compétition est dû à cette communication, on devrait observer une croissance normale des colonies qui ne devraient pas s'influencer. En revanche si le phénomène est dû à une compétition entre les colonies pour de la nourriture, la barrière physique ne devrait rien changer et les colonies devraient s'influencer comme dans le cas sans barrière.

Malheureusement, nos résultats ne sont pas concluants

Inoculation avec tampon en PDMS

- Réalisation de tampons pour inoculer à des distances précises
- Inoculer avec des formes de C pour étudier la présence de compétition entre les deux branches du C, et donc étudier la compétition intra-colonie (les bactéries sont proches spatialement, et feront partie initialement de la même colonie). Utilisation du milieu 1.

Réalisation de ces tampons

- Impression 3D de moules dont les formes ont été réalisées grâce au logiciel Fusion 360
- Utilisation d'un kit de PDMS : mélange en proportion massique 1:1 de polymère et de catalyseur
- 10g de chaque permet de faire un tampon
- Avec trombone enlever les bulles en les perçant

Etude du front de surfactant au profilomètre

- Découper la boîte de pétri afin de pouvoir la glisser dans l'appareil
- Réalisation du profil d'épaisseur

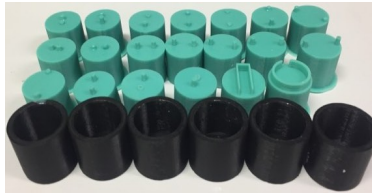


Figure 1: Tampons et moules

Résolution du problème de faible croissance

- Refaire une plaque avec des bactéries qui sortent du stock conservé à -80° afin de retrouver les bactéries avec une croissance optimale.

Étude de l'influence de la température

- Étude de la température en étuve avec des inoculations à des distances où on sait qu'il y a de la compétition à différentes températures. Utilisation du milieu 1.
- On fait croître les colonies aux températures suivantes :

Ambiante	20°	30°	37°
----------	-----	-----	-----

- Réalisation de réplicats pour faire des statistiques : pour chaque température :

Distance en cm	Témoin	0,75	1,25
Nombre de réplicats	1	5	5

4 Photographies

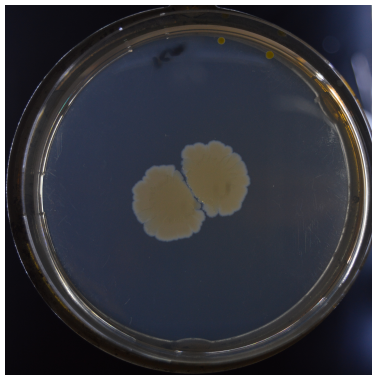


Figure 2: Visualisation de la compétition

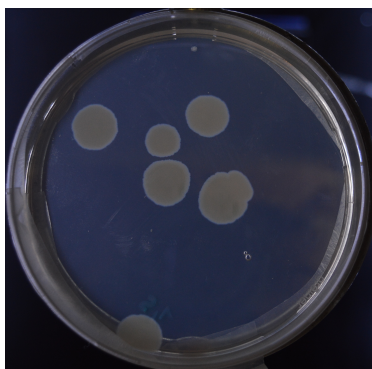


Figure 3: Contamination de *Bacillus subtilis*

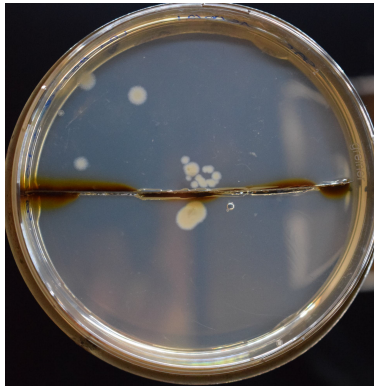


Figure 4: Barrière physique en aluminium

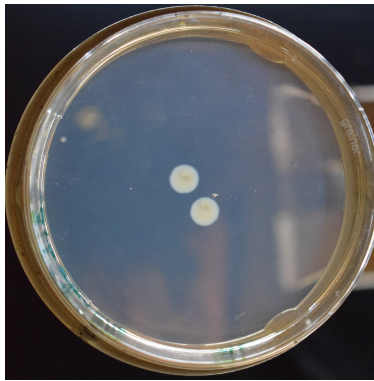


Figure 5: Colonies ne poussant pas - Expérience du 10/01

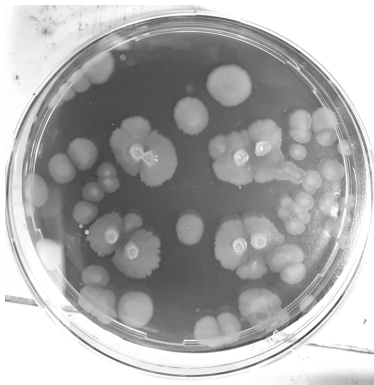


Figure 6: Inoculation avec la méthode top agar

Observations

- 2 familles de bactéries, on voit bien leur délimitation ainsi que le front de surfactant, voir Fig. 2
- Beaucoup de colonies se développent ailleurs que sur le dépôt voir Fig. 3
- Au contact de l'humidité du gel de l'oxyde d'aluminium s'est formé et a diffusé dans le milieu, rendant les résultats inexploitable voir Fig. 4
- Aucun changement avec et sans sel voir Fig. 5
- Aucune amélioration en ce qui concerne la contamination avec la méthode top agar voir Fig6

5 Documents annexes

- Modèle impression 3D des tampons
- Vidéo d'un timelapse