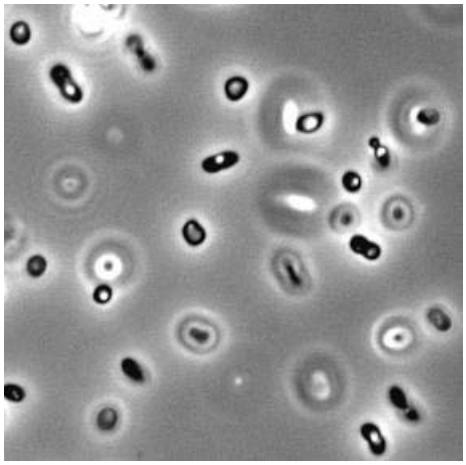
## Kit "Bioluminescence"

**ATTENTION :** Nous attirons votre attention sur le fait qu'il convient de stocker le micro-tube de culture lyophilisée et le micro-tube de milieu liquide au réfrigérateur.

## Informations générales

Qu'est-ce que des bactéries luminescentes ?



*Organismes luminescents observés au microscope x400*

Vibrio Fischeri sont des bactéries marines bioluminescentes. Elles utilisent un flagelle pour se déplacer, d'où leur nom Vibrions (virgule). D'une taille d'environ 2 microns (0,002 mm), elles ont la capacité de produire une lueur bleu-vert. Cette lueur est si intense qu'elle permet d'éclairer l'environnement du micro-organisme. Elles peuvent se nourrir en décomposant de la matière organique. Elles peuvent également très souvent former des symbioses avec d'autres organismes marins. Elles ne sont pas pathogènes et ne provoquent pas de putréfaction.

Présence :

Même dans l'eau claire, les rayons du soleil ne peuvent pénétrer à plus de 200m de profondeur. La plupart des océans dépassent cette profondeur, et devraient donc être obscurs au-dessous de cette distance, mais ce n'est pourtant pas le cas ! Les mers abritent de nombreux organismes qui sont en mesure de produire de la lumière. La plupart vivent en

© Tous droits réservés –

symbiose avec des espèces connues (par ex.: le merlan, le hareng). Ce mode de vie assure aux deux partenaires des avantages déterminants: les organismes lumineux disposent d'un abri et d'un apport de nourriture - l'hôte dispose d'une "lampe", lui facilitant l'accès à la nourriture et permet de décourager ses prédateurs.

Comment ces bactéries émettent-elles de la lumière ?

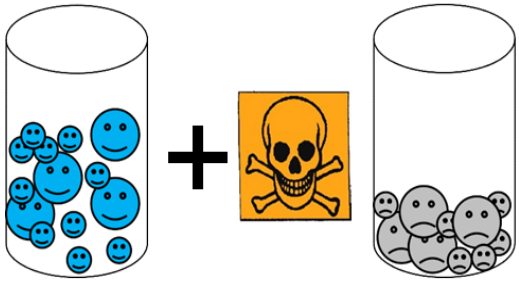
*Photographie d'organismes luminescents en gélose nutritive*

La capacité à émettre de la lumière dépend de la présence d'oxygène. En effet, l'enzyme appelée "luciférase" utilise l'oxygène présent dans l'eau pour émettre un photon, et donc émettre de la lumière. Cette lumière paraît pour nous bleu-vert. Un autre facteur important permettant d'émettre de la lumière est le nombre de bactéries présentes. L'organisme brille uniquement si suffisamment de bactéries se trouvent dans son voisinage. Pour déterminer combien d'entre elles sont présentes, ils utilisent un système complexe appelé "Quorum Sensing" ou "détection du quorum".

**Avantages des bactéries luminescentes :**

- Pour le symbiote (poissons, méduses, crustacés, calmars, ...):
  1° ils servent d'éclairage afin de permettre aux symbiotes d'apercevoir leur proie dans l'obscurité. La baudroie, par exemple, utilise les organismes comme appât parce que sa lumière attire d'autres proies.
  2° les symbiotes sont protégés par les organismes, car ils sont utilisés comme dissuasion ou camouflage.
  3°Une autre fonction est l'identification du sexe ou d'un partenaire d'accouplement.

- Pour contrôler la qualité de l'eau :
  La qualité de l'eau peut être déterminée en fonction de l'intensité lumineuse émise par les organismes luminescents. Si la qualité est mauvaise ou qu'il y a la présence de toxines dans l'eau, il y aura une faible intensité lumineuse voire même aucune lumière.



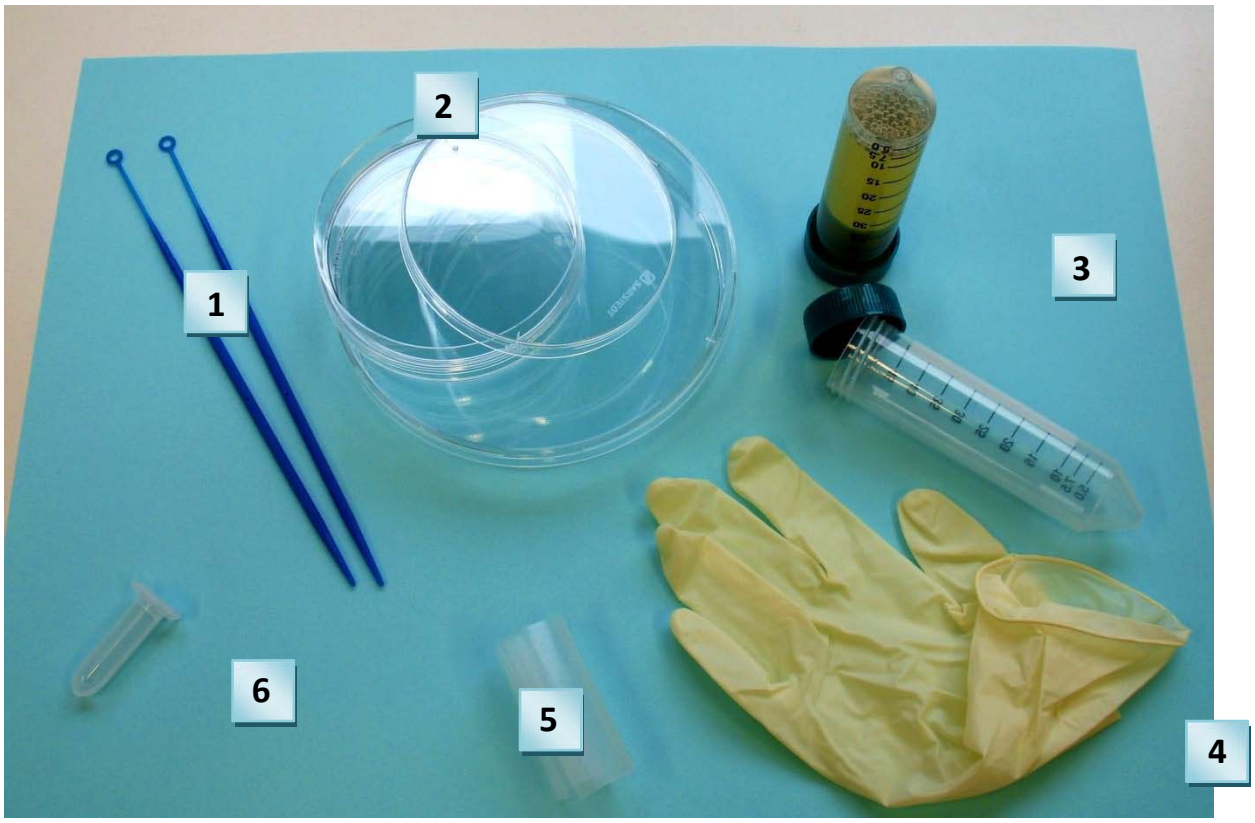
*Test des substances nocives*

- Pour contrôler l'efficacité d'une station d'épuration :
  La performance de purification des eaux peut être déterminée grâce à la luminescence des organismes.

- Pour détecter les polluants atmosphériques:
  De plus en plus de tests utilisent également des bactéries luminescentes pour la détection de poussières fines ou l'émission des imprimantes laser et photocopieurs.

© Tous droits réservés –

**Contenu :**




(1) 10 anses d'inoculation
(2) 1 grande boîte de Pétri Ø140mm et 10 boîtes de Pétri Ø 90mm
(3) 4 tubes de 50ml de gélose de poisson (Agar)
(4) Des gants
(5) Du Parafilm
(6) 1 micro-tube de culture lyophilisée et 1 micro-tube de milieu liquide

Egalement inclus :

- ✓ Notice
- ✓ Du papier absorbant

**ATTENTION !**

**Le matériel n'est pas comestible !**

**Travail préparatoire**

Nettoyer soigneusement le plan de travail, se laver les mains et mettre les gants.

© Tous droits réservés –

**Instructions de travail :**

**Etape 1 : Régénération des cultures lyophilisées**

a) ouvrez le micro-tube (repère 6) de culture lyophilisée repéré par la lettre K
b) ouvrez le micro-tube (repère 6) avec le milieu liquide repéré par la lettre F
c) versez le contenu du tube K dans le tube F et refermez le tube F
d) agitez afin de dissoudre complètement le milieu de culture lyophilisé
e) placez le récipient de culture avec le milieu mélangé au réfrigérateur (6 à 8°C) pendant environ 24 heures pour permettre aux cellules de se développer. Vous pouvez maintenir la culture au réfrigérateur jusqu'à ce que la croissance des plaques soit visible.

**Etape 2 : Liquéfaction de l'Agar**

Faites chauffer un tube (repère 3 sur la photo) contenant l'Agar (gélose) au bain-marie pendant 10 minutes dans de l'eau à ébullition. Veillez à agiter et à plonger au maximum le tube dans l'eau bouillante, pour le rendre liquide.

**Etape 3 : Remplissage de la boîte de pétri**

Sortir le tube et l'agiter légèrement afin d'homogénéiser la gélose. Ouvrez le tube et versez de suite la gélose dans une boîte de Pétri. Le contenu d'un tube permet de remplir la boîte de Pétri Ø140mm ou 2 boîtes de Pétri Ø 90mm. Fermez la boîte de Pétri et laisser l'Agar se solidifier environ 10-15 minutes.

Astuce :

Les boîtes de Pétri une fois fermées peuvent être protégées de la déshydratation pour une prochaine utilisation grâce Parafilm fourni. Il suffit d'appliquer le film sur le bord du récipient.

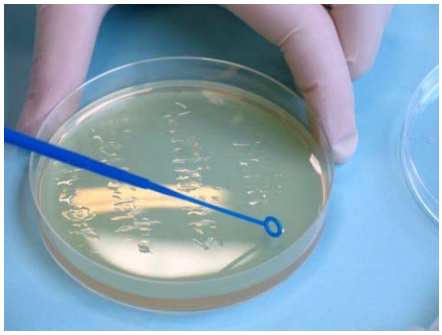
© Tous droits réservés –

**Etape 4 : Apport des organismes luminescents**

Plongez une anse d’inoculation dans le micro-tube de culture de micro-organismes luminescents que vous aurez préalablement réhydraté (cf. étape 1). Réitérez à plusieurs reprises pour garantir d’avoir suffisamment ‘chargée’ l’anse.
Appliquez les bactéries sur l’Agar dont vous avez rempli la ou les boîtes de pétri. Pour cela, déposez soigneusement l’anse d'inoculation sur l'Agar et "dessinez" des motifs à votre guise.

**Etape 5 : Incubation des organismes luminescents**

Une fois votre motif réalisé, fermez la boîte de Pétri et placez la, à l’envers (gélose vers le haut) dans le réfrigérateur. Après 2-3 jours, on peut observer que les organismes brillent dans l'obscurité. Ceux-ci peuvent être prélevés avec une anse d'inoculation et transférées à de nouvelles boîtes de gélose (Agar).



**Élimination :**

S'il y a apparition de polluants et donc baisse de l'intensité lumineuse, les plaques doivent être scellées puis jetées avec les ordures ménagères.

**NB:** Il peut arriver que l’expérience ne fonctionne pas. Malheureusement, nous ne pouvons pas donner de "raison" expliquant pourquoi les bactéries ne brillent pas. Cependant, on observe souvent ce phénomène à des températures ambiantes élevées. Cette expérience est réalisée avec des organismes vivants, qui comme nous les humains ne réagissent pas toujours selon le protocole.

Parfois, l'agar-agar n’est pas suffisamment refroidi avant que les bactéries soient appliquées. Il peut également arriver que les cellules soient trop denses ou trop peu serrées (dans les deux cas il n’y a pas de luminescence). Il en est de même dans l’environnement naturel de la bactérie. La bioluminescence est directement liée à un mécanisme de régulation dépendant de la densité de la population de cellules. Ce mécanisme est uniquement activé lorsqu’il est nécessaire à la survie du symbiote.

Parfois, les bactéries n’ont tout simplement «pas envie» de briller lorsqu’un des paramètres environnementaux ne leur convient pas. Dans ces expériences, il n'y a malheureusement aucune garantie de réussite.

© Tous droits réservés –