

Thème 2 – Chapitre 1 – Activité 2

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DU pH SUR LA CROISSANCE EN BATCH D'*ESCHERICHIA COLI*

Eléments de réponse



1. ANALYSE DE L'ORGANIGRAMME

1.1.

Lors du suivi de croissance d'*Escherichia coli* en aérobiose, le glucose est catabolisé par voie oxydative en CO_2 et H_2O . Lors du suivi de croissance d'*Escherichia coli* en anaérobiose, le glucose est catabolisé par voie fermentative en acide organique comme l'acide pyruvique, l'acide éthanoïque...

1.2.

L'hypothèse d'acidification du milieu de culture est justifiée puisque dans les deux cas, le glucose est catabolisé en acide, acide volatil (CO_2) en aérobiose et acides non volatils (acide pyruvique, acide éthanoïque...) en anaérobiose.

1.3.

Pour réguler le pH il faudra donc ajouter une base dans le milieu de culture du bioréacteur dans lequel le pH est régulé.

1.4.

Voir le cours thème 2 chapitre 1.

1.5.

Le volume de milieu de culture du bioréacteur est de 2 L donc le volume de milieu de pré-culture doit être compris entre

$$V_{\min} = [(5 \times V_{\text{bioréacteur}}) / 100] = [(5 \times 2) / 100] = 0,1 \text{ L} = 100 \text{ mL}$$

et

$$V_{\max} = [(10 \times V_{\text{bioréacteur}}) / 100] = [(10 \times 2_{\text{bioréacteur}}) / 100] = 0,2 \text{ L} = 200 \text{ mL}.$$

Ici le volume de pré-culture introduit dans le bioréacteur est de 150 mL donc compris entre V_{\min} et V_{\max} . La condition est bien vérifiée.

1.6.

Le zéro du spectrophotomètre, avant chaque mesure à 650 nm, est réalisé à l'aide d'un témoin réactif composé de milieu de culture nonensemencé.

2. ANALYSE DES RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

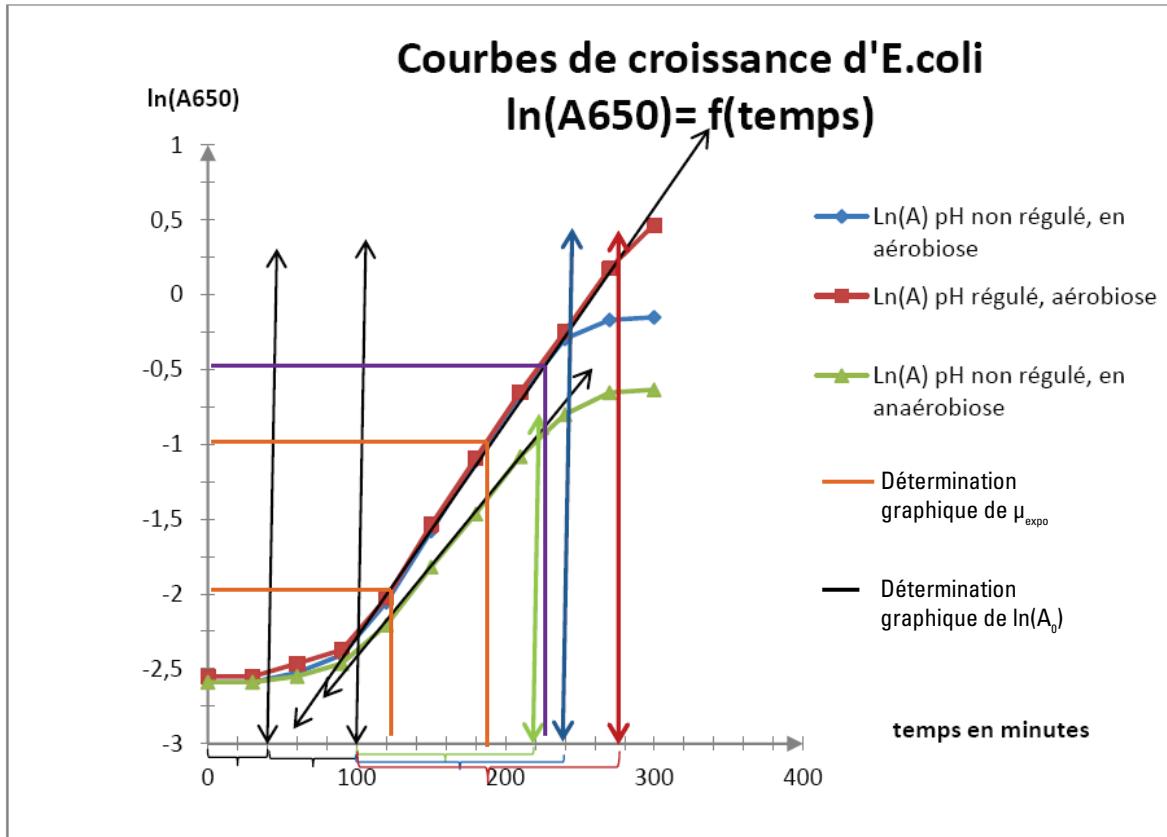
2.1.

La valeur de pH utilisée comme valeur de référence pour le fonctionnement de la boucle de régulation de pH sera la valeur de pH à t_0 soit 6,95.

2.2.

À t_{10} le pH du milieu est plus acide pour la culture menée en anaérobiose que pour celle menée en aérobiose sans régulation de pH, car en anaérobiose le catabolisme du glucose produit des acides non volatils qui restent dans le milieu alors qu'en aérobiose le catabolisme du glucose produit du CO_2 , qui est un acide volatil éliminé en parti lors de l'agitation du milieu de culture.

2.3.



Pour les trois courbes :

- . de t_0 à t_{40} minutes : phase de latence, soit 40 minutes ;
- . de t_{40} à t_{100} minutes : phase d'accélération, soit 60 minutes.

La phase exponentielle de croissance a une durée différente pour chaque courbe, soit :

- . de t_{100} à t_{220} minutes : phase exponentielle pour la croissance en anaérobiose, soit 120 minutes ;
- . de t_{100} à t_{240} minutes : phase exponentielle pour la croissance en aérobiose, pH non régulé, soit 140 minutes ;
- . de t_{100} à t_{280} minutes : phase exponentielle pour la croissance en aérobiose, pH régulé, soit 180 minutes.

La phase de décélération débute à un temps différent pour chaque courbe, soit :

- . de t_{220} à t_{260} minutes : phase de décélération, soit 40 minutes, puis au-delà de t_{260} minutes on entre en phase stationnaire, pour la croissance en anaérobiose ;
- . de t_{240} à t_{280} minutes : phase de décélération, soit 40 minutes, puis au-delà de t_{280} minutes on entre en phase stationnaire, pour la croissance en aérobiose, pH non régulé ;
- . de t_{280} à la fin de l'expérience : phase de décélération pour la croissance en aérobiose, pH régulé, on n'atteint pas la phase stationnaire au cours de l'expérience dans ces conditions expérimentales.

2.4.

Ces deux courbes, ont la même partie linéaire pendant leur phase exponentielle (même pente) ; l'équation de cette droite est $\ln(A) = \mu_{\text{expo}} \times t + \ln(A_0)$

On peut déterminer graphiquement $\mu_{\text{expo}} = [(-1 - (-2)) / (180 - 120)] = 0,0167 \text{ min}^{-1}$; pour déterminer $\ln(A_0)$, on prend une valeur de $\ln(A)$ pendant la phase exponentielle, soit :

$$\ln(A) = -0,5 \text{ pour } t = 220 \text{ minutes.}$$

$$\text{On en déduit } \ln(A_0) = [-0,5 / (0,0167 \times 220)] = -0,136.$$

L'équation de la droite correspondant à la phase exponentielle, dans ces 2 conditions expérimentales de croissance est donc $\ln(A) = (0,0167 \times t) - 0,136$.

2.5.

Dans ces deux conditions expérimentales, μ_{expo} = pente de la droite (calculé en 2.3.).

Donc $\mu_{\text{expo}} = 0,0167 \text{ min}^{-1}$ soit $1,002 \text{ h}^{-1}$ et $G = (\ln(2) / \mu_{\text{expo}}) = 41,5 \text{ minutes.}$

2.6.

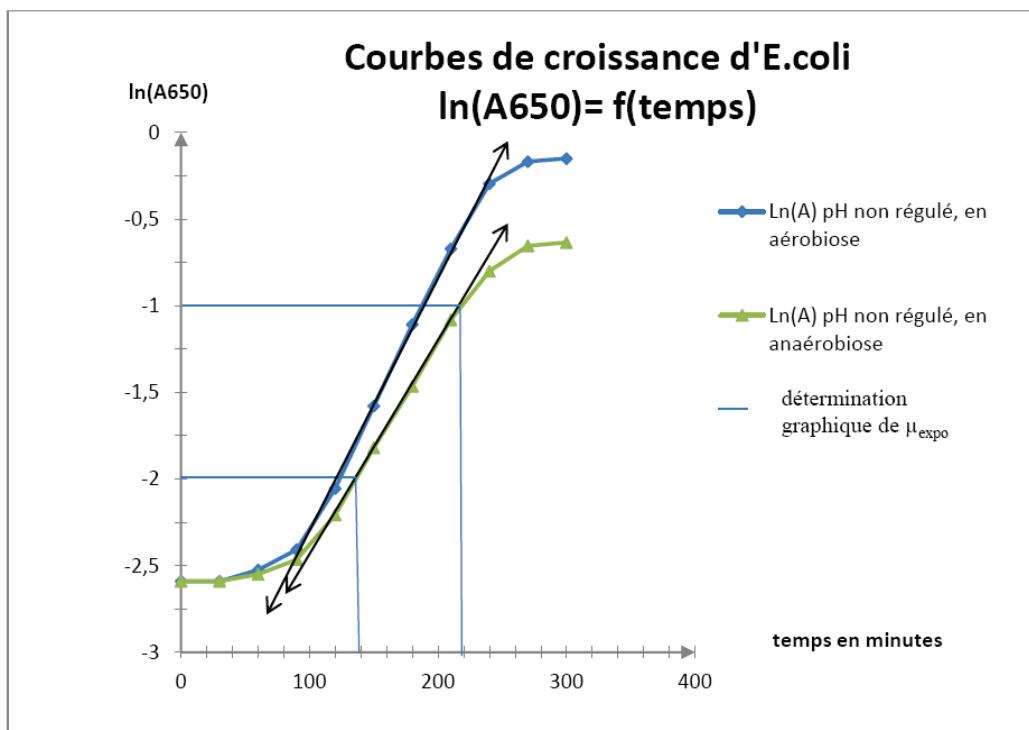
L'allure de ces deux courbes est très proche :

- . phases de latence confondues et de même durée ;
- . phases d'accélération confondues et de même durée ;
- . phases exponentielles confondues et ayant la même équation, mais n'ayant pas la même durée.
Dans le cas de la croissance en aérobiose sans régulation du pH, la phase exponentielle de croissance est plus courte (140 minutes), alors qu'elle dure 180 minutes dans le cas de la croissance en aérobiose avec pH régulé. Comparer l'allure des deux courbes de croissance dans ces deux conditions expérimentales ;
- . la phase de décélération puis la phase stationnaire sont visibles sur la courbe de croissance en aérobiose sans régulation de pH, alors que seule la phase de décélération apparaît sur la courbe de croissance en aérobiose avec régulation du pH.

2.7.

On peut déduire de l'analyse comparative des deux courbes (2.6.) que la régulation du pH permet de rester plus longtemps en phase exponentielle de croissance (prolongation de 40 minutes) ; lorsque le pH est maintenu à sa valeur initiale de 6,95, il permet de prolonger la période de croissance exponentielle, en maintenant des conditions optimales de croissance. En revanche l'acidification du milieu, dans le cas de non régulation du pH, crée des conditions défavorables à la croissance et fait entrer la culture en phase de décélération.

2.8.



Les paramètres cinétiques μ_{expo} et G sont définis pendant la phase exponentielle de croissance :

μ_{expo} = pente de la droite pendant la phase exponentielle de croissance donc :

$$\mu_{\text{expo}} = [(-1 - (-2)) / (220 - 140)] = 0,0125 \text{ min}^{-1} \text{ soit } 0,75 \text{ h}^{-1}$$

$$G = \ln(2) / \mu_{\text{expo}} = [\ln(2) / 0,0125] = 55,45 \text{ min.}$$

2.9.

Au début de l'expérience, l'allure de ces deux courbes est très proche :

- . phases de latence confondues et de même durée ;
- . phases d'accélération confondues et de même durée.

Les différences apparaissent à partir de la phase exponentielle :

- . pour la croissance en aérobiose, pH non régulé, la phase exponentielle est plus longue (140 minutes) alors qu'elle ne dure que 120 minutes, pour la croissance en anaérobiose, pH non régulé ;
- . la pente de la courbe en phase exponentielle pour la croissance en aérobiose, pH non régulé est plus importante, que celle de la croissance en anaérobiose, pH non régulé.

La phase de décélération, et la phase stationnaire débutent à des temps différents pour les 2 courbes de croissance :

- . de t_{220} jusqu'à t_{260} minutes : phase de décélération (soit 40 minutes), puis au-delà de t_{260} minutes on entre en phase stationnaire, pour la croissance en anaérobiose, pH non régulé ;
- . de t_{240} jusqu'à t_{280} minutes : phase de décélération (soit 40 minutes), puis au-delà de t_{280} minutes on entre en phase stationnaire, pour la croissance en aérobiose, pH non régulé.

2.10.

Pour la croissance en anaérobiose, pH non régulé $\mu_{\text{expo}} = 0,75 \text{ h}^{-1}$ et $G = 55,45 \text{ min}$ et pour la croissance en aérobiose, pH non régulé, $\mu_{\text{expo}} = 1,0 \text{ h}^{-1}$ et $G = 41,5 \text{ min}$.

Donc en aérobiose, pH non régulé, la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle de croissance est plus importante qu'en anaérobiose, pH non régulé => les bactéries se multiplient plus rapidement en aérobiose qu'en anaérobiose, et par conséquent leur temps de génération (temps nécessaire au doublement de la population) est plus court, ce qui se traduit par une absorbance plus importante à 600 nm donc un nombre de bactéries plus important dans le bioréacteur en aérobiose que dans le bioréacteur en anaérobiose à la fin de l'expérience.

2.11.

Pour expliquer les différences observées entre les deux courbes de croissance, on peut émettre les hypothèses suivantes :

- . le métabolisme fermentatif utilisé par les bactéries en anaérobiose est moins énergétique que le métabolisme oxydatif utilisé en aérobiose, ce qui pourrait expliquer les différences de vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle entre les deux courbes de croissance ;
- . le métabolisme fermentatif utilisé par les bactéries en anaérobiose produit plus d'acide que le métabolisme oxydatif utilisé en aérobiose, soit une acidification plus rapide et plus importante du milieu de culture en anaérobiose, ce qui pourrait expliquer les différences d'entrée en phase de décélération entre les deux courbes de croissance.