

Faculté ENAC
Institut des Sciences et Technologies de l'Environnement
Laboratoire de Biotechnologie Environnementale

Microbiologie pour l'ingénieur

Epreuve écrite du 30 octobre 2008

Nom de l'étudiant :

.....

Remarques :

- Cet examen comporte 6 questions, avec un maximum de 4 à 6 points chacune
- Le nombre maximal de points est de 28
- Un total de 25 points est requis pour une note de 6.0
- La note se calcule de la manière suivante :

$$\text{Note} = 1 + (\text{nombre de point})/5$$

Question 1 : (4 points)

Les résultats suivants sont obtenus au cours d'une réaction enzymatique, (1) en absence et (2) en présence d'un inhibiteur à la concentration de 5 mM. $[E_{tot}]$ est le même dans chaque expérience.

[S] (mM)	(1) v ($\mu\text{mol/ml/s}$)	(2) v ($\mu\text{mol/ml/s}$)
1	12	4.3
2	20	8
4	29	14
8	35	21
12	40	26

Est-ce que l'inhibiteur a une certaine affinité pour le site actif de l'enzyme ou non ?

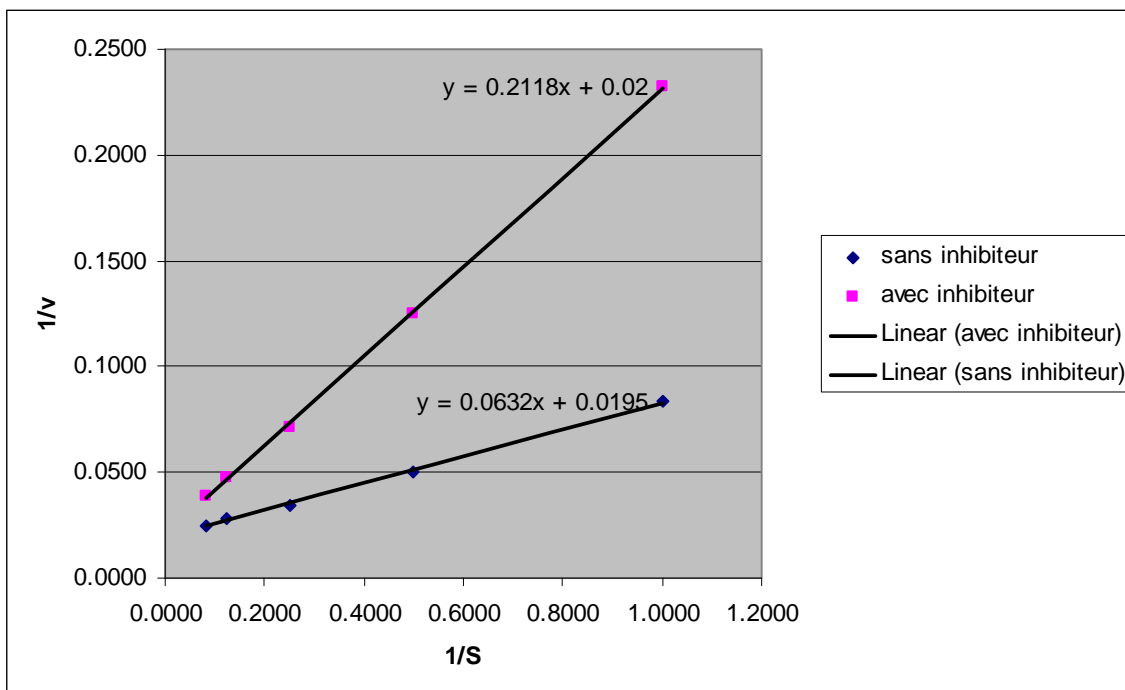
Expliquez votre réponse.

Réponses

La solution consiste à réaliser un graphique de type « Lineweaver-Burk » pour déterminer les constantes V_{max} et K_m de ces réactions enzymatiques.

$$(1) \quad \begin{aligned} V_{max} &= 51,3 \mu\text{mol ml}^{-1} \text{s}^{-1} \\ K_m &= 3,2 \text{ mM} \end{aligned} \quad (2) \quad \begin{aligned} V'_{max} &= 49,9 \mu\text{mol ml}^{-1} \text{s}^{-1} \\ K'_m &= 10,6 \text{ mM} \end{aligned}$$

L'analyse des données selon ce graphique « Lineweaver-Burk » montre que seul le K_m change, alors que V_{max} reste constant. L'inhibition dans ce cas est compétitive, l'inhibiteur est donc en compétition avec le substrat et a donc une assez grande affinité pour le site actif de l'enzyme.



Question 2 : (6 points)

Plusieurs bactéries forment des inclusions de polyhydroxybutyrate (PHB) à l'intérieur de leurs cellules sous conditions de limitation d'azote. Le PHB est une réserve de carbone et énergie et il a des caractéristiques d'un plastique. Dans un chémostat, on a trouvé que la biomasse contient des taux de PHB différents, et ceci en fonction de la vitesse de dilution (voir tableau ci-dessous). Ces résultats ont été obtenus avec du glucose comme substrat (10 g l^{-1}) et une bactérie qui a un μ_{\max} de 0.5 h^{-1} , une K_S de 0.2 g l^{-1} et un Y de $0.55 \text{ g}_X \text{ g}_S^{-1}$. Sous quelles conditions aurait-on une production maximale de PHB et donc de bioplastique ?

D (h^{-1})	PHB (% de la biomasse)
0.05	65
0.10	75
0.15	74
0.20	60
0.25	45
0.30	34
0.35	25

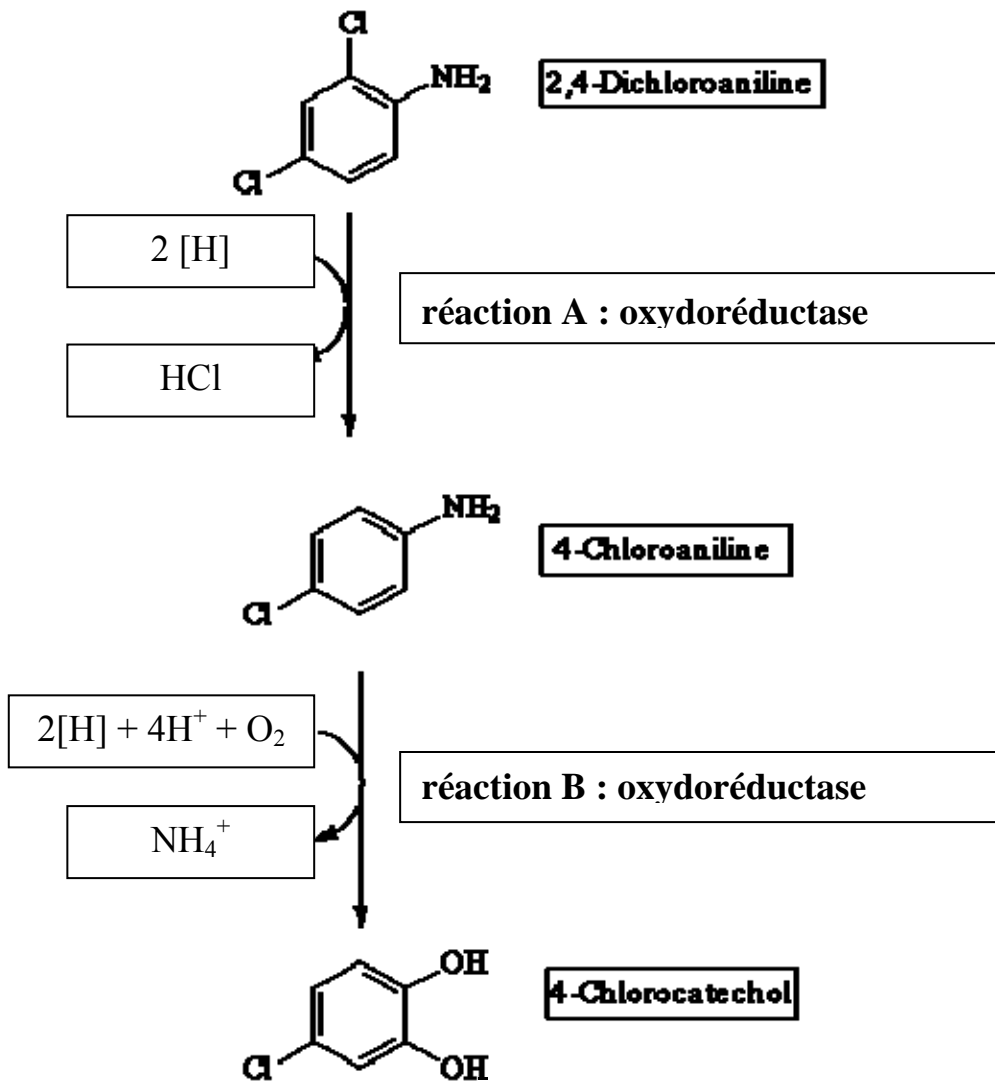
Réponse :

Il faut appliquer la formule pour la productivité d'un chémostat car c'est la quantité de PHB produit par unité de temps qui nous intéresse. La formule est $R = D \times Y \times (S^0 - K_S \times D / (\mu_{\max} - D))$. R multiplié par le taux de PHB par unité de biomasse donne la production de PHB par unité de temps. On peut alors déterminer la production maximale de PHB. La production est donc maximale avec une vitesse de dilution D de 0.2 h^{-1} .

D (h^{-1})	PHB (% de la biomasse)	R_X ($\text{g}_X \text{ h}^{-1}$)	R_{PHB} ($\text{g}_{\text{PHB}} \text{ h}^{-1}$)
0.05	65	0.2744	0.1784
0.10	75	0.5473	0.4104
0.15	74	0.8179	0.6053
0.20	60	1.0853	0.6512
0.25	45	1.3475	0.6064
0.30	34	1.6005	0.5442
0.35	25	1.8352	0.4588

Question 3 (4 points)

La bactérie *Pseudomonas* sp. souche JL2 est capable de dégrader le composé 2,4-dichloroaniline et de l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie. Les deux premières étapes de la dégradation sont montrées ci-dessous. Complétez le schéma et indiquez à quelle classe appartient l'enzyme qui catalyse la réaction A et / ou B.



Question 4 (4 points)

Pour le dimensionnement du biotraitement d'une eau usée industrielle polluée par des composés organiques biodégradables, vous avez besoin du taux de croissance maximale de la biomasse et du rendement de croissance pour pouvoir estimer la production de boues. Il faut déterminer ces paramètres expérimentalement.

- Quelle(s) approche(s) expérimentale(s) choisiriez-vous pour la détermination de ces deux paramètres ?
- Quels paramètres allez-vous mesurer pour ce faire ?
- Quelles sortes de graphique faut-il produire pour déterminer le taux de croissance maximale et le rendement ?

Réponses :

a) On peut utiliser un système de culture de type « batch ». On prend une certaine quantité de l'eau usée non-traitée comme substrat et on inocule celle-ci avec des boues activées de la STEP ou d'une STEP différente.

b) Il faut mesurer la concentration du substrat et de la biomasse. Pour la biomasse on peut mesurer la matière sèche, pour le substrat le carbone organique dissous.

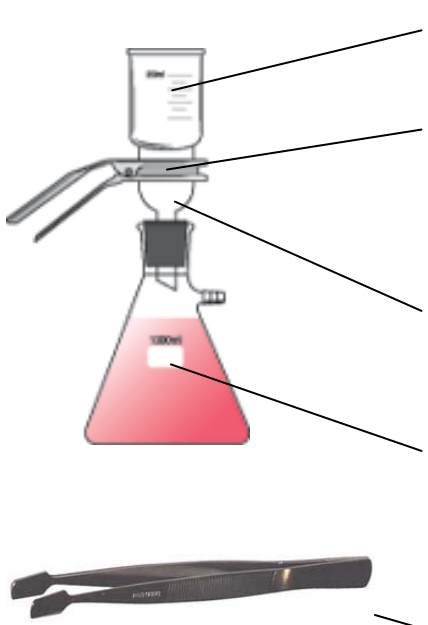
c) Il faut produire un graphe avec le logarithme naturelle de la biomasse X dans le temps t . Pendant la phase de croissance exponentielle, la projection de la courbe selon les axes choisis devient une droite dont la pente est égale au taux de croissance maximale μ_{max} .

En plus il faut faire un graphe avec $(X-X_0)$ en fonction de (S_0-S) . La pente de la droite obtenu est le rendement de croissance Y .

Question 5 : (6 points)

Pour la culture des clones qui contiennent un vecteur avec des gènes de résistance contre l'antibiotique tétracycline, on a choisi la méthode de filtration pour la stérilisation du milieu qui contient tous les nutriments et l'antibiotique.

- a) Est-ce que vous avez une idée pourquoi on a choisi la filtration pour stériliser le milieu ?
b) Indiquez dans le schéma ci-dessous ce qu'il faut stériliser avant la filtration et avec quelle méthode.



Entonnoir pour le milieu à filtrer :
- besoin d'être stérilisé : **non**

Filtre :
- besoin d'être stérilisé : **oui**
- si oui, quelle méthode : **par autoclavage avec filtres emballés en papier alu ou par irradiation gamma**

Porteur de filtre avec bouchon :
- besoin d'être stérilisé : **oui**
- si oui, quelle méthode : **par autoclavage, emballé en papier alu**

Récipient du milieu filtrée :
- besoin d'être stérilisé : **oui**
- si oui, quelle méthode : **par autoclavage, ouverture couverte avec du papier alu**

Pincette pour poser les filtres :
- besoin d'être stérilisé : **oui**
- si oui, quelle méthode : *soit les emballer une par une et les stériliser par chaleur humide ou sèche, soit dans la flamme*

- c) Quel est le diamètre maximal des pores du filtre pour retenir tous les bactéries ?
- d) Est-ce que vous voyez un point faible dans le set-up utilisé qui pourrait amener à une contamination du milieu filtré ?
- e) Si oui, qu'est-ce vous proposez pour éviter ce problème ?

Réponse :

- a) *L'antibiotique est probablement sensible à la chaleur et est inactivé si on applique une stérilisation par autoclavage.*
- b) *voir schéma*
- c) *Le diamètre maximal est de 0,2 µm.*
- d) *Le récipient doit être stérile mais la connexion vers le tuyau de la pompe à vide est encore ouvert et peut amener une contamination du milieu filtré.*
- e) *On peut connecter un filtre sur cette ouverture du récipient pour éviter une contamination via ce point faible du système pendant la filtration.*

Question 6 : (4 points)

Pour pouvoir utiliser la réaction en chaîne par polymérase ou la transcriptase réverse, on a besoin d'un « primer ». Expliquez de quoi il s'agit et en quoi il est nécessaire à la réaction. Argumentez aussi sur l'avantage de son utilisation dans le clonage de fragments d'ADN spécifiques.

Réponse :

Les « primers » sont de petites amorces d'ADN ou appelés aussi oligonucléotides. Les polymérases et transcriptases peuvent créer le brin complémentaire d'un brin d'ADN ou d'ARN simple brin uniquement si ce petit fragment d'ADN est apparié, formant une petite section double brin permettant d'initier la réaction.

L'avantage de ce fait est qu'on peut utiliser des oligonucléotides très spécifiques si on connaît la séquence du gène qu'on veut étudier. Ainsi les gènes possédant une séquence similaire sont amplifiés uniquement pendant la réaction de polymérisation en chaîne . De la même manière, les ARN messagers des gènes spécifiques sont transcrits en ADN (transcriptase inverse).