

Conduite d'une culture en bioréacteur de laboratoire

Entraînement individuel aux opérations techniques

Une série d'opérations techniques vous sont présentées sous la forme de 8 exercices pratiques. Pour chaque exercice, vous devez être capable de le préparer seul en moins de 10 minutes (consultation possible de la documentation technique) puis de l'exécuter de façon adéquate. Vous devez pouvoir commenter et justifier tous vos gestes.

Exercice 1

A disposition :

- une des unités « bioréacteur de laboratoire de 2L » du lycée Saint-Louis. La cuve est chargée de 1,2 L de milieu LB stérilisable à la vapeur.
- Petit matériel nécessaire : coton cardé, papier aluminium, tuyauterie autoclavable, pinces, filtres à air adaptés autoclavables ...
- Documentation technique du matériel.

A réaliser :

- Préparer la cuve de bioréaction pour autoclavage. Le capteur pH ne sera pas utilisé lors du processus. Le capteur à dioxygène sera utilisé. La durée de processus, en batch, sera de 8 heures avec un microorganisme de classe 1.
 - Placer un filtre 0,2 μm autoclavable pour une alimentation du fermenteur sous un volume de 24 mL avec stérilisation par filtration, à la seringue, en cours de processus.
-

Exercice 2

A disposition :

- Une des unités « bioréacteur de laboratoire de 2L » du lycée Saint-Louis. La cuve, chargée de 1,2 L de milieu LB stérilisable à la vapeur a été préparée et autoclavée. Les 2 capteurs dioxygène et pH sont en place. Avant installation à la cuve du bioréacteur, le capteur pH a été étalonné et le zéro de la sonde dioxygène a été réglé.
- Petit matériel nécessaire.
- Documentation technique du bioréacteur.

A réaliser :

- Mettre en place la cuve de bioréaction sur son support.
 - Démarrer l'installation qui sera mise en attente d'inoculation : température régulée à 28°C, turbine à 200 rpm, aération à 0,5 vvm (1,2 bar), suivi du dioxygène, suivi du pH.
-

Exercice 3

A disposition :

- Une des unités « bioréacteur de laboratoire de 2L » du lycée Saint-Louis. La cuve a été chargée de 1,2 L de milieu LB stérilisable à la vapeur a été préparée et autoclavée. Les 2 capteurs dioxygène et pH sont en place. Avant installation à la cuve du bioréacteur, le capteur pH a été étalonné et le zéro de la sonde dioxygène a été réglé .
- 120 mL de solution stérile CM en flacon pour transfert aseptique (à aiguille pour percer un bouchon plasma).
- Petit matériel et réactifs nécessaires.
- Documentation technique du bioréacteur.

A réaliser :

- Mettre en place la cuve de bioréaction sur son support.
- Le milieu complet à utiliser doit être additionné de 120 mL de solution CM stérilisée séparément. Réaliser le transfert aseptique de la solution CM dans le bioréacteur.
- Démarrer l'installation qui sera mise en attente d'inoculation : température réglée à 28°C, turbine à 200 rpm, aération à 0,5 vvm (1,2 bar), suivi du dioxygène, suivi du pH.

Exercice 4

A disposition :

- Une des unités « bioréacteur de laboratoire de 2L » du lycée Saint-Louis. La cuve, chargée de 1,2 L de milieu LB stérilisable à la vapeur a été préparée et autoclavée. La cuve de bioréaction a été mise en place et l'installation a été démarrée en attente d'inoculation : température réglée à 28°C, turbine à 200 rpm, aération à 0,5 vvm (1,2 bar), suivi du dioxygène, suivi du pH.
- Préculture pour inoculation, en fiole ErlenMeyer et flacon inoculateur (à aiguille pour perçage de bouchon plasma). Germe utilisé de classe 1.
- Documentation technique du bioréacteur.
- Petit matériel et réactifs nécessaires.

A réaliser :

- Vérifier le réglage de 100% de saturation en dioxygène.
- Présenter 2 techniques d'inoculation sous un volume de 40 mL.

Exercice 5

A disposition :

- Une des unités « bioréacteur de laboratoire de 2L » du lycée Saint-Louis. La cuve, chargée de 1L de milieu LB stérilisable à la vapeur a été préparée et autoclavée. La cuve de bioréaction a été mise en place et l'installation a été démarrée et inoculée (germe de classe 1). Température réglée à 28°C, turbine à 200 rpm, aération à 0,5 vvm (1,2 bar), suivi du dioxygène, suivi du pH.
- Petit matériel et réactifs nécessaires.
- Documentation technique du bioréacteur.

A réaliser :

- Réaliser un prélèvement (5 mL suffisent) en conditions d'aseptie.
 - Relever les valeurs de vitesse de rotation de la turbine, pression d'aération, débit d'aération, dioxygène dissous, pH et température.
 - Alimenter le bioréacteur de 10 mL de la solution A fournie (la solution sera stérilisée par filtration stérilisante lors de son ajout. Le bioréacteur est équipé de façon adéquate).
-

Exercice 6

A disposition :

- Une des unités « bioréacteur de laboratoire de 2L » du lycée Saint-Louis. La cuve, chargée de 1L de milieu LB stérilisable à la vapeur a été préparée et autoclavée. La cuve de bioréaction a été mise en place et l'installation a été démarrée et inoculée (germe de classe 1). Température régulée à 28°C, turbine à 200 rpm, aération à 0,5 vvm, suivi du dioxygène, suivi du pH.
- Petit matériel et réactifs nécessaires.
- Documentation technique du bioréacteur.

A réaliser :

- Réaliser un prélèvement (5 mL suffisent) en conditions d'aseptie.
 - Relever les valeurs de vitesse de rotation de la turbine, pression d'aération, débit d'aération, pH et température.
 - Relever la valeur en dioxygène dissous, couper l'aération et déclencher un chronomètre. Suivre la cinétique de chute du dioxygène jusqu'à 10-5 %, reprendre l'aération et suivre la cinétique de réoxygénation jusqu'à la nouvelle valeur « d'équilibre dynamique ». Une mesure chaque 20s.
-

Exercice 7

A disposition :

- Une des unités « bioréacteur de laboratoire de 2L » du lycée Saint-Louis. La cuve, chargée de 1,2 L de milieu LB stérilisable à la vapeur a été préparée et autoclavée. La cuve de bioréaction a été mise en place et l'installation a été démarrée et inoculée (germe de classe 1). Température régulée à 28°C, turbine à 200 rpm, aération à 0,5 vvm (1,2 bar), suivi du dioxygène, suivi du pH.
- Petit matériel nécessaire.
- Documentation technique du bioréacteur.

A réaliser :

- Réaliser un prélèvement (5 mL suffisent) en conditions d'aseptie.
 - Relever les valeurs de vitesse de rotation de la turbine, pression d'aération, débit d'aération, pH et température.
 - Réaliser un prélèvement de 500 mL en conditions propres (pas d'aseptie nécessaire).
 - Arrêter la fermentation. Préparer le bioréacteur pour la phase de nettoyage.
-

Exercice 8

A disposition :

- Une des unités « bioréacteur de laboratoire de 2L » du lycée Saint-Louis. La cuve, chargée de 1,2 L de milieu LB stérilisable à la vapeur a été préparée et autoclavée. La cuve de bioréaction a été mise en place et l'installation a été démarrée et inoculée (germe de classe 1). Température régulée à 28°C, turbine à 200 rpm, aération à 0,5 vvm (1,2 bar), suivi du dioxygène, suivi du pH.
- Unité de microfiltration tangentielle du lycée saint-Louis (filtre 0,5 μm ; surface 50 cm^2)
- Petit matériel nécessaire
- Documentation technique du bioréacteur et de l'unité de microfiltration tangentielle

A réaliser :

- Relever la valeur du pH , de la température et du dioxygène dissous.
- Réaliser un prélèvement de 500 mL en conditions propres (pas d'aseptie nécessaire).
- Transférer proprement dans l'unité de microfiltration tangentielle et concentrer à 50 mL de volume final.