

50376  
1962  
7-2

50376  
1962  
7-2

N° d'ordre  
58

**THESES**

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille

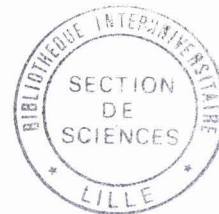
pour obtenir

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

(Mention Sciences)

par

**J. P. VOETS**



Première Thèse :

**Contribution à la Systématique des  
Azotobacter  
Différenciation Physiologique**

Deuxième Thèse

**Propositions données par la Faculté**

soutenues le 23 novembre 1962, devant la Commission d'examen

Président : **M. HOCQUETTE**

Examineurs : **M. MONTREUIL**

**M. BOURIQUET**

ETUDE MORPHOLOGIQUE ET

=====

BIOCHIMIQUE

=====

DE QUELQUES MUTANTS

=====

D'ASPERGILLUS NIGER

=====

par

J. P. VOETS

ETUDE MORPHOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DE QUELQUES  
=====

MUTANTS D'ASPERGILLUS NIGER  
=====

Depuis plusieurs décades les Aspergillus niger sont utilisés industriellement pour la production de l'acide citrique. Cette production s'effectue en général avec un rendement de 75 à 80 %.

Les producteurs d'acide citrique utilisent plusieurs souches d'Aspergillus niger. Des recherches se poursuivent pour obtenir des souches capables de produire cet acide organique avec un plus grand rendement.

Nous avons pensé qu'en provoquant des mutations sous l'influence des rayons ultra-violetes dans les cultures d'Aspergillus niger, on pourrait éventuellement arriver à isoler des souches produisant l'acide citrique avec un rendement meilleur.

Nous avons commencé nos recherches avec une souche d'Aspergillus niger qui se trouvait déjà depuis de longues années dans notre collection. Nous l'avons obtenu du "Centraal Schimmelbureau" à Baarn en Hollande.

La culture fut d'abord purifiée par la technique des "monospores". Des morceaux de pommes de terre, stérilisés en tubes à essais, sont ensemencés avec des conidies de la souche d'Aspergillus niger. Après une culture de quelques jours à 28° C le mycélium est couvert de conidies noirâtres. Avec une anse en platine nous enlevons un grand nombre de conidies qui sont ensuite mises en suspension dans de la gélatine à base de moût de bière. Sur un couvre-objet, nous disposons alors une dizaine de petites gouttes de cette suspension. Sous le microscope nous examinons chaque goutte. Celles qui contiennent plus qu'une seule conidie sont touchées avec un fil en platine chauffé au rouge. Nous gardons donc seulement les gouttes contenant une seule conidie. Les couvre-objets sont retournés sur un anneau en verre et mises

en culture dans une grande boîte de Pétri humidifiée à l'intérieur. Après 12 heures de culture à 28° C chaque goutte est à nouveau contrôlée sous le microscope. Les gouttes contenant une conidie viable possèdent maintenant un mycélium bien dense.

Avec un morceau de sureau stérile nous enlevons une goutte contenant le mycélium d'une conidie germée et nous la déposons sur une gélose à base de moût de bière, stérilisée en tubes à essais.

De cette façon nous obtenons un clone après quelques jours de culture à 28° C.

Pour provoquer des mutations dans cette culture, obtenue par la technique des monospores, nous avons opéré de la façon suivante:

Nous avons ensemené des morceaux de pommes de terre, stérilisés en tubes à essais, avec des conidies d'Aspergillus niger. Après 5 jours de culture à 28° C le mycélium avait produit de grandes quantités de conidies. Ces conidies sont mises en suspension dans 100 ml d'eau stérile. Après filtration à travers un coton stérile, pour écarter des débris de mycélium, la suspension des conidies est transvasée dans une boîte de Pétri à raison de 5 ml par boîte. Cette suspension est soumise aux rayons ultra-violet.

Dans une armoire nous avons fixé au plafond une lampe germicide à rayons ultra-violet de 30 watt (TUV Philips). La longueur d'ondes des rayons est de 2537 Å. Les boîtes de Pétri contenant la suspension des conidies sont placées exactement à 100 cm de distance de la lampe. De cette façon les conidies reçoivent une énergie de radiation de 24 microwatt/cm<sup>2</sup>.

Après des temps d'exposition de 5 à 130 minutes, une goutte de la suspension des conidies fut diluée dans de l'eau stérile. Plusieurs dilutions sont ainsi pratiquées. De chaque dilution 1 ml est transvasé dans une boîte de Pétri et mélangé avec de la gélose à base de

moût de bière, stérilisée et tenue à 45° C.

Les boîtes sont mises en culture à 28° C. Après 24 à 48 heures de culture, les colonies sont déjà bien développées. A l'oeil nu il est possible de différencier les colonies qui ont un autre aspect que celles de la culture mère. Les colonies d'apparences différentes sont repiquées et mises en culture sur la gélose à base de moût de bière, stérilisée et inclinée en tubes à essais.

Chaque culture, ainsi obtenue, est ensuite soumise à la technique des monospores. De cette façon il est possible d'obtenir des mutants d'Aspergillus niger provoqués par les rayons ultra-violetts.

Nous avons pu isoler après irradiation 14 souches d'Aspergillus niger d'apparence différente de la souche mère.

Les photos en couleur prises de chaque mutant montrent bien que les souches obtenues se laissent facilement différencier de la culture mère.

Les différences morphologiques se présentent le mieux en utilisant plusieurs milieux de culture. A cette fin nous avons utilisé:

- la gélose à base de moût de bière.
- le milieu de Sabouraud (Difco)
- le pain séché et humidifié après avec la solution nutritive de Raulin.
- un milieu synthétique liquide contenant : saccharose 200 g; phosphate d'ammoniaque 4 g; nitrate de potasse 1 g; nitrate d'ammoniaque 2 g; sulfate de magnésium 0,5 g; chlorure de calcium 0,2 g; sulfate de zinc 0,04 g; sulfate ferreux 0,01 g; sulfate de cuivre 0,02 g; sulfate de manganèse 0,003 g; eau distillée 1000 ml.

Nous pensons que les photos en couleur que nous présentons mettent bien en évidence les différences entre les mutants sur les milieux de culture utilisés.

Après l'étude morphologique nous sommes passés à l'étude biochimique des différents mutants.

En cultivant les mutants d'Aspergillus niger nous nous sommes aperçu que les conidies produites constituent un danger permanent pour les cultures environnantes, surtout quand on doit enlever le mycélium pour étudier la composition du milieu nutritif.

Nous savons par les études de Mulder (1) que la sporulation de l'Aspergillus niger est fonction de la quantité de cuivre présente dans le milieu de culture. En examinant le milieu utilisé par ce chercheur nous constatons qu'il contient une assez forte proportion de manganèse 0,7 mg/l. Après de multiples expériences nous avons constaté que la sporulation des Aspergillus niger était en effet fonction de la quantité de cuivre présente dans le milieu, à condition que le manganèse soit également présent. En supprimant le manganèse et en utilisant des sels minéraux purs, nous avons obtenu des mycélium exempts de conidies. De cette façon le danger de la diffusion des conidies dans l'atmosphère du laboratoire fut écarté. Nous avons obtenu les mêmes effets en milieux de culture à pH 6,0 et 2,8.

Les photos en couleur prises de ces cultures montrent nettement l'effet du manganèse sur la sporulation des Aspergillus niger.

Nous avons ensuite examiné le comportement biochimique de chaque souche. Le milieu à base de saccharose mais libre de toute trace de manganèse fut partagé en fioles d'Erlenmeyer à raison de 100 ml par Erlenmeyer. Après ensemencement avec des conidies obtenues de cultures sur pain humidifié, les fioles étaient placées à 28° C.

Les analyses chimiques suivantes ont été effectuées après 30 jours de croissance.

- pH final.

- production d'acides, exprimée en grammes équivalents sur le contenu liquide de deux fioles.

- production d'acide oxalique, exprimée en grammes équivalents sur le contenu liquide de deux fioles.
- poids sec du mycélium présent sur le milieu liquide de deux fioles.

Le tableau que nous reproduisons ci-joint montre bien:

- 1) que la souche originelle est un producteur moyen d'acide citrique.
- 2) que la production d'acide citrique des mutants ne diffère pas beaucoup de celle de la souche originelle. Nous n'avons donc pas réussi à produire des mutants capables de produire plus d'acide citrique que la souche mère.
- 3) que la production d'acide oxalique est presque nulle pour toutes les souches.
- 4) que le pH final pour toutes les souches se situe vers 1,60.
- 5) qu'une nette différence se manifeste dans la production du mycélium. Une très grande différence se présente entre le poids sec du mycélium de la souche originelle et la souche M 15.

Les mêmes résultats ont été obtenues sur le même milieu nutritif mais enrichi avec 0,003 g de sulfate de manganèse par litre.

Nous avons ensuite examiné la composition en acides aminés du mycélium des différentes souches, cultivées sur le même milieu nutritif. Par la technique de la chromatographie bidimensionnelle sur papier nous avons déterminé la présence des acides aminés suivants: acide aspartique - glycine - acide glutaminique - tyrosine - méthionine - leucine - proline - lysine - histidine - thréonine - glucosamine - sérine - arginine - acide  $\gamma$ -amino-butyrique.

L'acide  $\gamma$ -amino-butyrique était totalement absent dans le mycélium de la souche M 15.

Les photos en couleur indiquent l'emplacement des différents acides aminés sur les chromatogrammes. L'absence totale d'acide  $\gamma$ -amino-butyrique dans le mycélium du mutant M 15 est très remarquable, vu la grande difficulté avec la-

quelle cette souche se développe sur tous les milieux de culture utilisés.

Cette trouvaille nous a amené à l'essai suivant: au milieu nutritif déjà mentionné nous avons ajouté respectivement 50, 200 et 400 mg de l'acide  $\gamma$ -amino-butérique par litre. Une forte croissance se manifeste de la part de la souche M 15 sur ces milieux en comparaison avec une croissance très médiocre sur le milieu ne contenant pas cet acide aminé. Nous pouvons donc conclure de cet essai que la souche M 15 n'est pas capable de synthétiser cet acide aminé à partir des sels d'ammonium. Cette capacité était pourtant bien propre à la souche mère.

Cette étude nous a révélé qu'il est possible de produire des mutations chez les Aspergillus niger sous l'action des rayons ultra-violetts. Les souches mutées obtenues sont plutôt des dégénérescences. Aucune souche ne produit pas plus d'acide citrique que la souche originelle. La souche M 15 est un très bon exemple de cette dégénérescence.

L'isolement des souches, après irradiation avec des rayons ultra-violetts des conidies de la souche originelle, s'est effectué en septembre 1959. Depuis lors les souches ont été cultivées par repiquage mensuelle. La stabilité des souches aussi bien au point de vue morphologique que physiologique est totale.

-----

(1) Mulder, E.G. 1938 Over de Betekenis van Koper voor de Groei van Planten en Microorganismen. Dissertatie. Wageningen, Holland.

=====



SOUCHE ASPERGILLUS NIGER	ACIDES PRODUITS EN GR. EQ.	ACIDE OXALIQUE EN GR. EQ.	SUCRE NON METABOLISE EN GR.	PH FINAL	POIDS SEC DU MYCELIUM EN GR.
Originelle	0,19	0,0001	1,4	1,6	9,22
M 5	0,07	0,0021	132	1,6	3,86
M 8	0,10	0,0001	1,5	1,65	9,71
M 12	0,20	0,0001	3,3	1,6	9,22
M 15	0,06	0,0001	128	1,6	1,91
M 18	0,20	0,0001	8,1	1,6	8,99