

Évaluation de la population microbienne

1. Modes de reproduction

L'augmentation de la population microbienne au cours du phénomène de croissance résulte de la reproduction qui peut se faire selon divers modes, d'un type de microorganismes à l'autre. La reproduction peut être sexuée, mais c'est relativement peu fréquent. Elle est plus généralement asexuée.

Les bactéries et les levures, organismes unicellulaires, respectivement procaryotes et eucaryotes, se reproduisent par fission et bourgeonnement. Au cours de la croissance cellulaire, on assiste à une augmentation du nombre des cellules, ou plus exactement de la concentration cellulaire (nombre de cellules par unité de volume de culture). Les deux cellules bactériennes résultant de la cellule d'origine, après la fission sont identiques entre elles alors que lors de la reproduction des levures, par bourgeonnement, les deux cellules ne sont pas identiques, l'une étant la cellule mère l'autre la cellule fille. Il en résulte au cours de l'ensemble du phénomène de croissance une évolution de la distribution d'âge des cellules de la population.

Il peut arriver, pour certaines espèces de levures, et dans certaines conditions, que les cellules restent accolées. Elles forment alors des filaments appelés pseudomycélium. La reproduction, comme pour les moisissures et les bactéries filamenteuses, organismes particulièrement importants pour les nombreux antibiotiques qu'elles sont capables de synthétiser, se fait par allongement et ramification des filaments. En fonction des conditions physicochimiques dans lesquelles se déroule la croissance, ce mécanisme, s'il se produit de façon désordonnée, peut conduire à un mycélium diffus, ou au contraire, s'il se produit symétriquement dans toutes les directions à partir d'un point initial, il conduit alors à un mycélium en pelote (pellet). La prolifération ne s'accompagne pas alors d'une augmentation du nombre des cellules, mais d'une augmentation de la biomasse microbienne. Les mêmes techniques d'évaluation de population ne pourront pas être employées, pour les deux types d'organismes, unicellulaires ou filamenteux. Enfin, lors de la croissance, dans le cas des organismes filamenteux, les phénomènes de diffusion (nutriments, oxygène et produits du métabolisme) au sein même de la biomasse microbienne (pellets) vont prendre une très grande importance, la périphérie de la pelote étant beaucoup plus active que la partie centrale, du fait de meilleurs transferts.

2. Les techniques d'évaluation des populations microbiennes

L'étude de la croissance microbienne ne peut être faite valablement que si l'on dispose de techniques appropriées d'évaluation de la population microbienne dont on souhaite étudier l'évolution. Il existe beaucoup de techniques, aucune ne convenant à tous les cas et aucune n'étant tout à fait satisfaisante. Leurs résultats devront être interprétés avec prudence en raison des erreurs et interférences possibles

et de la distinction qu'elles permettent ou non de faire entre cellules vivantes et mortes.

Les techniques peuvent être classées différemment suivant les caractéristiques que l'on privilégie :

- les méthodes directes qui vont permettre de mesurer une concentration cellulaire ou une biomasse, ou les méthodes indirectes qui évaluent un paramètre corrélable à la biomasse ;
- les méthodes sans culture qui évaluent rapidement une population microbienne présente ou les méthodes avec culture qui nécessitent un délai d'incubation pour la réponse ;
- les méthodes automatisées en ligne sur un fermenteur ou les méthodes nécessitant un prélèvement d'échantillon.

Il est clair que sur une fermentation une méthode en ligne et donc rapide, directe ou indirecte sera préférée si elle est applicable au type de microorganisme et de fermentation.

2.1. Méthodes directes

2.1.1. Détermination de la concentration cellulaire

Ces méthodes conviennent à l'évaluation de microorganismes unicellulaires (levures et bactéries non filamenteuses).

- Comptage au microscope

Les avantages de la microscopie sont la rapidité et la simplicité de mise en œuvre. Le microscope permet l'observation directe des microorganismes selon différentes modalités : il est possible, tout d'abord, d'utiliser des cellules à numération qui permettent de dénombrer les cellules dans un volume donné. Les cellules peuvent être préalablement colorées pour distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. Cette technique convient bien au dénombrement de levures. On peut aussi utiliser des lames calibrées sur lesquelles on dépose un volume donné de suspension (0,01 ml, par exemple). Après séchage, le frottis est coloré et examiné au microscope. On peut déduire la concentration microbienne dans une zone délimitée à partir de ces techniques microscopiques, si les microorganismes sont comptés en moyenne un par champ. La sensibilité de ces techniques se situe vers ce seuil, un peu en dessous si on multiplie le nombre de champs observés.

Les performances de la microscopie peuvent être améliorées par l'utilisation de fluorochromes qui facilitent la visualisation des microorganismes et donc le seuil de détection. Certains fluorochromes peuvent se fixer spécifiquement sur certains composés cellulaires et ainsi permettent de fixer spécifiquement les cellules mortes. Il est possible également de distinguer les cellules viables des cellules mortes. Il est également possible de coupler fluorochromes à un anticorps spécifiques d'un microorganisme ou d'un groupe de microorganismes ou à des sondes nucléiques. Le microscope doit être équipé d'un système de fluorescence épiscopique qui permet d'exciter les fluorochromes fixés

sur les cellules microbiennes. Ce système éclaire les microorganismes par l'objectif, et la lumière ne traverse pas l'objet ; les microorganismes peuvent donc se trouver sur des surfaces opaques, comme par exemple des membranes filtrantes.

En utilisant une ou plusieurs de ces caractéristiques simultanément, on dispose en fait de différentes techniques :

- **La microscopie en fluorescence avec des colorants de viabilité spécifiques** des levures ou des bactéries pour détecter une flore levurienne ou bactérienne viable ;
- **La microscopie par la technique DEFT** (Direct Epifluorescent Filter Technique) qui couple une filtration sur membrane et un fluorochrome (généralement l'acridine orange) pour détecter des microorganismes après concentration dans des produits filtrables. Cette technique a été automatisée grâce à l'analyse d'image ;
- **La microscopie en immunofluorescence** qui permet de détecter une catégorie particulière de microorganismes à l'aide d'anticorps spécifiques ;
- **La microscopie en fluorescence pour détecter un groupe de microorganismes** pour lesquels on dispose d'une sonde nucléique.

Les techniques microscopiques permettent d'obtenir des résultats dans des délais allant de quelques minutes à deux heures. Suivant la technique utilisée et le nombre de champs observés, le seuil de détection peut descendre jusqu'à 10^2 cellules·ml⁻¹. Les techniques microscopiques sont rapides et spécifiques quand on y ajoute l'utilisation d'anticorps. Mais alors elles perdent en précision et doivent être considérées comme des techniques de détection avec une évaluation approximative du nombre de cellules présentes plutôt que comme des techniques précises de dénombrement.

L'observation des lames peut être automatisée grâce à l'analyse d'image, mais la microscopie demande un prélèvement d'échantillon et une préparation manuelle.

- Comptage électronique des cellules

Les compteurs de particules sont adaptés au comptage des microorganismes en suspension dans un liquide comme les appareils de type Coulter. De part et d'autre d'un tube muni d'un orifice calibré, sont disposées deux électrodes de platine, plongeant dans un électrolyte, aux bornes desquelles est appliquée une tension continue. Grâce à une aspiration provoquée à la partie supérieure du tube, les cellules transitent au travers de l'orifice et déplacent à chaque passage un volume d'électrolyte égal à celui de la cellule. Ceci provoque une élévation transitoire de la résistance du circuit, ce qui engendre une impulsion électrique dont l'amplitude est proportionnelle au volume de la cellule. Les impulsions

étant de très courte durée, l'appareil permet de dénombrer un grand nombre de cellules, une par une, en un temps très court et de les différencier en volume.

Cette technique sophistiquée est très intéressante. Elle s'applique très bien à l'analyse de suspensions de levures dont elle permet à la fois le dénombrement et le dimensionnement. La charge électrique des cellules peut toutefois perturber les résultats. De plus, cette technique n'est pas utilisable dans le cas de suspension d'organismes non unicellulaires renfermant des particules en suspension autres les cellules (CaCO₃ par exemples). L'analyse morphologique des cellules qu'elle permet d'aborder est intéressante en fermentation. Dans la pratique on a souvent recours à l'examen microscopique.

Dans le cas de **la cytométrie en flux**, les cellules sont également dénombrées dans une veine liquide, mais la détection se fait par la mesure d'une fluorescence émise par les cellules préalablement marquées avec un fluorochrome. Les cellules après marquage par un fluorochrome sont entraînées dans une veine liquide et passent devant une source lumineuse qui les illumine une par une. La fluorescence émise par chaque microorganisme est captée par un photomultiplicateur et analysée. Les résultats sont traduits en histogramme qui donne le nombre d'événements en fonction de l'intensité de la fluorescence. Cet histogramme traduit donc un profil de population.

Suivant les fluorochromes utilisés, on peut avoir différents types de réponses. Si le fluorochrome est un marqueur de viabilité, on obtient un dénombrement des cellules viables et, suivant la forme de l'histogramme, l'état physiologique d'une population. Si l'histogramme comprend nettement deux pics, on peut dénombrer séparément des populations de cellules vivantes et mortes. Si le fluorochrome est un marqueur non spécifique, on peut avoir un dénombrement spécifique d'une population parmi un mélange.

La rapidité de la réponse est d'environ deux minutes, auxquelles il faut ajouter le temps de marquage de l'échantillon. Le seuil de sensibilité est de 10² levures·ml⁻¹ ou 10³ bactéries·ml⁻¹.

L'application de cette technique aux microorganismes est récente mais semble prometteuse, par exemple le dénombrement des levures dans les moûts en vinification.

- Dénombrement avec culture

Ce type de technique est très employé en microbiologie alimentaire pour analyser la qualité microbiologique d'un produit naturel ou alimentaire. Elle consiste à ensemencer des parties ou aliquotes de suspensions-dilutions, réalisées à partir de l'échantillon à doser dans ou sur un milieu de culture stérile convenant bien au microorganisme à évaluer. Lorsqu'on emploie un milieu gélosé on réalise le plus souvent l'expérience en boîte de Pétri. Après incubation le comptage des colonies est en relation avec le nombre de microorganismes présents lors de l'ensemencement. Cette technique est

longue à mettre en œuvre (préparation du matériel et manipulation proprement dite) et ne fournit un résultat qu'après 24 heures ou plus, délai d'incubation nécessaire aux microorganismes pour donner des colonies comptables. En fait on dénombre ainsi les « unités formant colonies ». En effet, plusieurs cellules en amas ne vont donner qu'une colonie, d'où un résultat par défaut. L'emploi d'un milieu de culture liquide réduit légèrement les contraintes de mise en œuvre. Toutefois, la détermination statistique du nombre le plus probable (NPP) implique l'ensemencement en parallèle de plusieurs séries de tube. Ce type de technique convient très mal à l'évaluation de populations de microorganismes filamenteux. Au surplus elle ne permet pas d'évaluer les cellules mortes. Cette technique de culture peut être simplifiée en utilisant les Pétrifilms: ce sont des dispositifs sur lesquels le milieu est prêt sous forme sèche et recouvert d'un film plastique. L'eau contenue dans le ml d'ensemencement permet la réhydratation du milieu et la croissance des microorganismes. Il existe différents types de Pétrifilm, pour les germes totaux, les levures ou les coliformes.

Enfin, un appareil, l'ensemenceur Spiral, permet d'automatiser l'ensemencement des boîtes de Pétri tout en réduisant leur nombre. Le principe consiste en un stylet qui dépose les cellules de l'échantillon en surface d'une boîte de Pétri posée sur une table tournante. La dilution s'effectue en même temps que l'ensemencement. Le stylet se déplace à partir du centre dans le sens transversal. Une came permet de propulser le piston dans la seringue. Après incubation, la lecture s'effectue à l'aide de la grille de comptage. Chaque zone de la grille correspond à un volume d'échantillon analysé.

2.1.2. Détermination de la biomasse microbienne

Certaines des méthodes décrites ci-dessous conviennent bien à la détermination de toute population cellulaire, qu'elle soit d'organisme unicellulaire ou filamenteux.

- Détermination de la matière sèche cellulaire

C'est la méthode la plus rigoureuse. La biomasse microbienne est récupérée, généralement par centrifugation, lavée afin d'éliminer le milieu de culture retenu entre les cellules et séchée à 105 °C, en présence de sable de Fontainebleau, à poids constant. Cette technique peu sensible ne s'applique qu'aux suspensions assez denses et dans lesquelles les microorganismes sont les seules particules en suspension. De plus il n'est pas possible de faire la distinction entre biomasse vivante et biomasse morte

Dans le cas des suspensions peu denses, on a plus souvent recours à une filtration sur membrane 0,45 μ ou 0,22 μ . puis un séchage à 105 °C, ou au four à micro-ondes. Pour des suspensions dans lesquelles les microorganismes ne sont pas les seules particules, on peut utiliser la seule mesure du culot de centrifugation, dans des conditions (temps, vitesse, accélération) standardisées, méthode utile parce

que simple et rapide. Les autres particules en effet sont souvent plus denses que les microorganismes et le culot va apparaître hétérogène, constitué de deux ou plusieurs couches. La détermination du volume occupé par les microorganismes, à l'aide de tubes à centrifuger de faibles diamètres, gradués, peut fournir, pour une culture donnée, des informations intéressantes.

- Mesure optique : turbidimétrie

Cette technique intéressante du fait de sa rapidité repose sur le fait que la densité optique d'une suspension est proportionnelle à la masse des particules en suspension. On mesure donc l'absorption lumineuse, généralement à 600 ou 700 nm, de la suspension microbienne et par comparaison à une gamme de référence, on en déduit la concentration en biomasse. Divers appareils permettent sa mise en œuvre pour des suspensions plus ou moins denses en fonction de leur sensibilité. Pour les suspensions denses, on effectue la détermination après dilution, pour rester dans les limites de linéarité de la loi. La présence de particules en suspension autres que les cellules perturbe évidemment les mesures. Les suspensions d'organismes filamenteux ne se prêtent pas toujours à l'utilisation de cette technique. On peut toutefois homogénéiser la suspension dans des conditions standardisées avant de faire la mesure. Cette technique se prête bien à une détermination en ligne au cours de la fermentation, grâce à la mise au point de biophotomètres stérilisables fonctionnant en continu.

2.2. Méthodes indirectes

Leur principe consiste à remplacer la détermination de la biomasse microbienne elle-même par celle d'un paramètre facilement déterminable et dont la valeur peut être corrélée avec précision à celle de la biomasse.

- Détermination des consultants cellulaires

On remplace la détermination de la matière sèche par celle d'un constituant qu'elle renferme : protéine, acides nucléiques, ATP, NAD.

La reproduction cellulaire, donc l'augmentation de la biomasse sont étroitement dépendantes de la synthèse protéique. Les méthodes classiques de détermination des protéines sont applicables: analyse de l'azote par la méthode de Kjeldahl, détermination des protéines de façon spécifique par la méthode de Bradford ou séparation et dosage des acides aminés.

La biomasse microbienne renferme une teneur remarquablement constante en ADN. Ce type de constituant est généralement absent des ingrédients du milieu de culture, ce qui évite les interférences. Malheureusement, leur détermination n'est pas simple.

L'évaluation de la biomasse microbienne par le dosage de l'ATP tend à se généraliser. Ce constituant est un intermédiaire important du métabolisme cellulaire, puisqu'il est au centre du métabolisme

énergétique. De ce fait, l'ATP est un constituant constant des cellules vivantes. Le principe de la technique repose sur l'émission lumineuse produite par le complexe enzymatique luciférine-luciférase-Mg²⁺, en présence d'ATP. Cette émission est obtenue en quelques secondes. La préparation de l'échantillon consiste en l'extraction de l'ATP des cellules microbiennes sans contaminer avec de l'ATP non-microbien. La sensibilité des fluorimètres permet de doser 10⁻¹³g d'ATP donc théoriquement 200 cellules microbiennes (environ 5.10⁻¹⁶g d'ATP/cellule). En pratique, compte tenu des dilutions réalisées au cours de la préparation de l'échantillon, le seuil de détection est plutôt de l'ordre de 10 cellules/g. On doit également vérifier la corrélation entre quantité d'ATP et nombre de cellules. En effet, les variations de la teneur en ATP en fonction de l'état physiologique et en fonction de l'espèce sont importantes, environ de 1 à 10 pour chacun de ces facteurs. Par conséquent, la concentration en ATP ne peut fournir qu'un ordre de grandeur d'une population composite ou d'âge variable. Par contre la technique est adaptée à la mesure de culture pure en fermentation continue.

On peut aussi corréler la mesure de certaines activités enzymatiques avec la biomasse microbienne. C'est en particulier le cas pour les réactions d'oxydoréduction cellulaire. Le NADH, coenzyme d'oxydoréduction émet une fluorescence à 460 nm quand il est excité par une lumière de longueur d'onde 340 nm. Sous sa forme oxydée, NAD, le coenzyme ne fluoresce pas. Au cours de la croissance cellulaire, la quantité de NAD-NADH augmente en liaison avec la reproduction cellulaire. On peut ainsi ramener l'évaluation de la biomasse à une mesure fluorimétrique.

- Dosage des constituants du milieu de culture

La croissance microbienne a pour effet de modifier considérablement la composition du milieu dans lequel elle se déroule. Parallèlement à l'apparition de la biomasse, on assiste à la disparition du substrat, à la consommation d'oxygène, d'ammoniaque, à l'apparition de sous-produits du métabolisme, mais aussi à un dégagement de chaleur. L'étude des variations de ces paramètres permet de suivre l'évolution de la biomasse, que l'on peut ramener tout d'abord à un dosage de sucre (substrat) pouvant être fait par voie chimique ou enzymatique, éventuellement, à l'aide d'un auto-analyseur couplé à la culture microbienne.

Au cours d'une fermentation, la matière sèche soluble du milieu de culture est transformée en matière sèche cellulaire, donc particulaire. On peut, dans ces conditions, suivre la cinétique par simple mesure de la densité ou de l'indice de réfraction de la solution.

La transformation physicochimique du milieu peut donner lieu à deux types de déterminations intéressantes. La première consiste à mesurer l'impédance du milieu, qui tend à diminuer au cours d'une culture microbienne du fait de la transformation de molécules électriquement neutres en molécules ionisées et ce d'autant plus vite, pour un milieu de culture donné que le microbe se

développe plus rapidement. Lorsque la variation de la conductivité dépasse le seuil de détection pour trois intervalles consécutifs, l'appareil détecte une croissance. Le temps de détection (temps écoulé entre le lancement de l'analyse et la détection) est fonction de la population microbienne initiale, de sa cinétique de croissance et du milieu. Donc pour un microorganisme donné dans un milieu standardisé, le temps de détection est directement proportionnel à la concentration initiale ce qui permet à l'appareil de dénombrer des populations. Le résultat est d'autant plus rapide que la concentration cellulaire initiale est élevée. Le seuil de détection est d'environ 10^6 ml^{-1} . Suivant les appareils, la mesure est directe ou indirecte. Pour la technique directe, on mesure la variation de conductance dans le milieu de culture.

Toutefois, certains microorganismes, particulièrement les levures et les moisissures ne provoquent pas de grands changements de conductivité du milieu compte-tenu de leur métabolisme peu producteur de molécules ionisées.

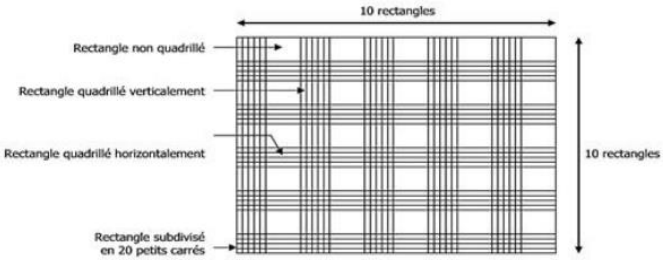
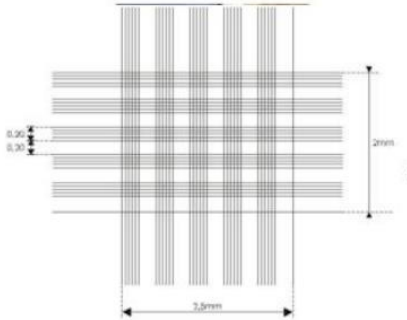
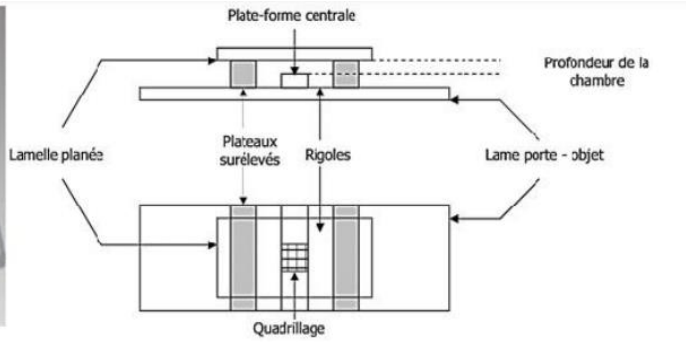
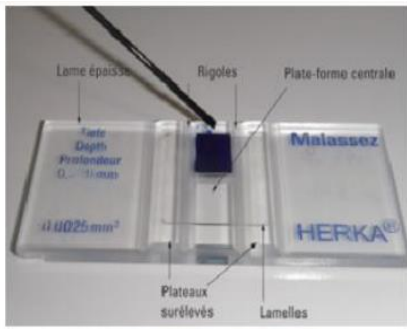
La deuxième technique basée sur la transformation du milieu de culture s'intéresse à l'évolution de la viscosité au cours de la croissance, résultant de l'influence du métabolisme microbien (dégradation du substrat, sécrétion de constituants cellulaires) sur les propriétés physiques et rhéologiques du milieu.

- Détermination des composés volatils

La chromatographie gazeuse de l'espace de tête permet d'analyser la composition de la phase gazeuse d'une fermentation et donc de suivre une cinétique microbienne. La grande sensibilité de la méthode permet de quantifier très finement les cinétiques de substances volatiles produites pendant une fermentation. Ces substances peuvent être étroitement corrélées à la croissance microbienne, comme par exemple la production d'acétaldéhyde et la concentration cellulaire en *Streptococcus thermophilus*.

- Détermination du dégagement de chaleur

Le microcalorimétrie dynamique permet de relier le dégagement de chaleur accompagnant tout développement microbien à la biomasse cellulaire présente, et à son métabolisme. Les microcalorimètres permettent aujourd'hui de mesurer des échanges thermiques entre le milieu de fermentation et le milieu extérieur avec un seuil de détection de 1 à 10 μW . Cette méthode peut être utilisée en ligne sur une fermentation.



Cellule de Malassez

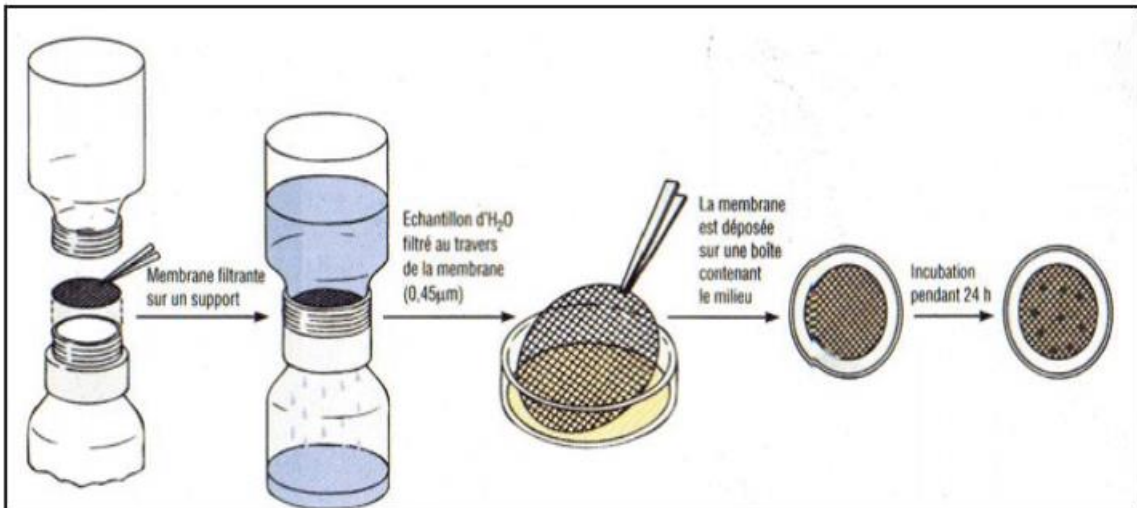
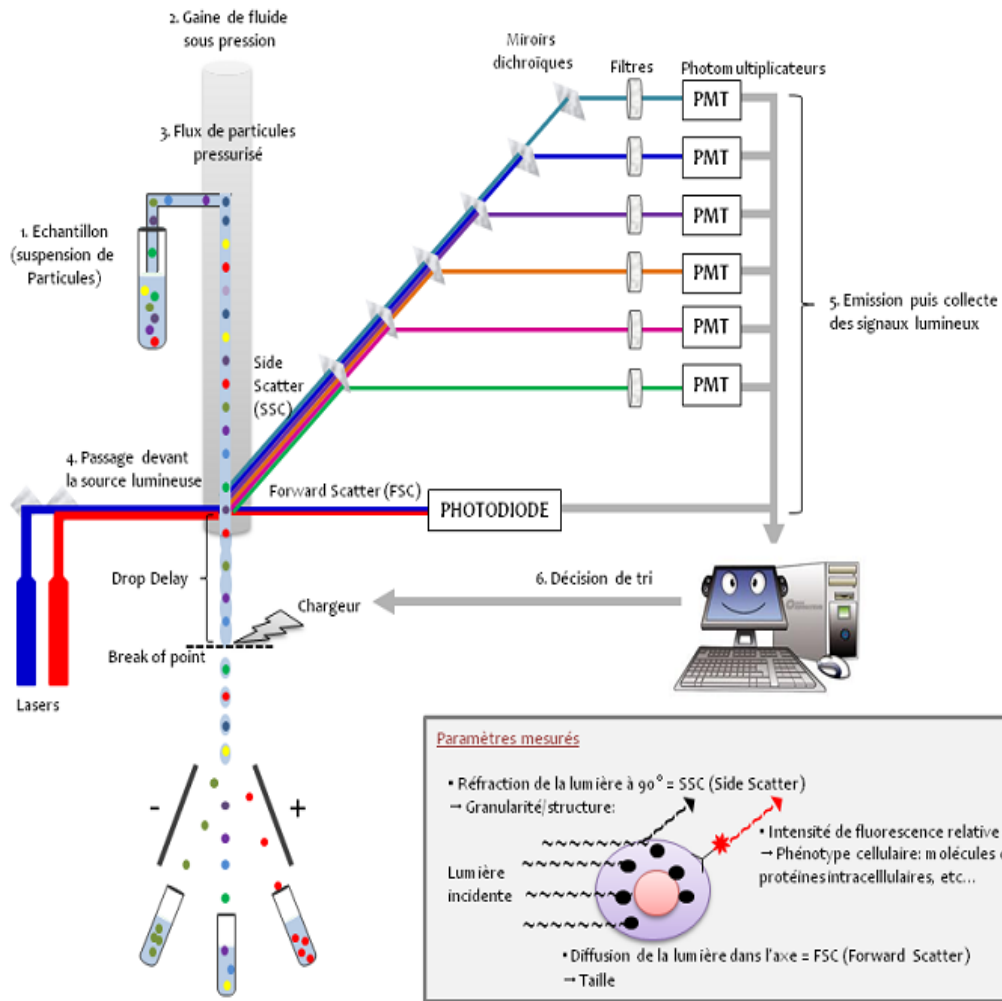


Figure : Filtration sur membrane

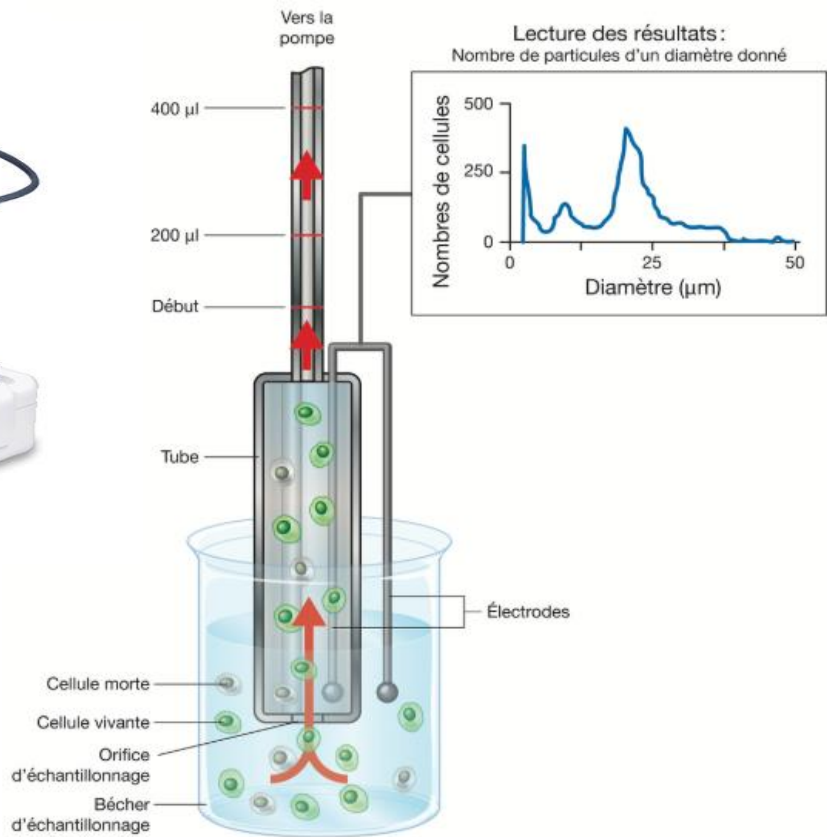


Les Pétrifilms

Principe de fonctionnement d'un analyseur-trieur



Principe du cytométrie en flux



Compteur électronique de type Coulter (Beckman CoulterMD)



L'ensemenseur spiral

Croissance microbienne

1. Courbe de croissance

L'étude consiste à suivre l'évolution de la concentration cellulaire ou concentration en biomasse microbienne (X), en fonction du temps (t) selon le type de microorganisme et le type de la méthode choisie pour suivre le phénomène.

La culture discontinue de microorganisme représente un système fermé où les cellules prolifèrent dans un milieu favorable à la croissance et dans des conditions environnementales contrôlées (température, pH, agitation...), il n'y a pas d'ajout d'éléments nutritifs et la culture se développe jusqu'à ce qu'il y ait carence d'un ou des nutriments essentiels ou qu'un stress réduise la croissance (accumulation de produits toxiques). Ce type de croissance répond à un modèle cinétique universel chez les microorganismes que l'on peut décomposer en plusieurs phases (figure 1):

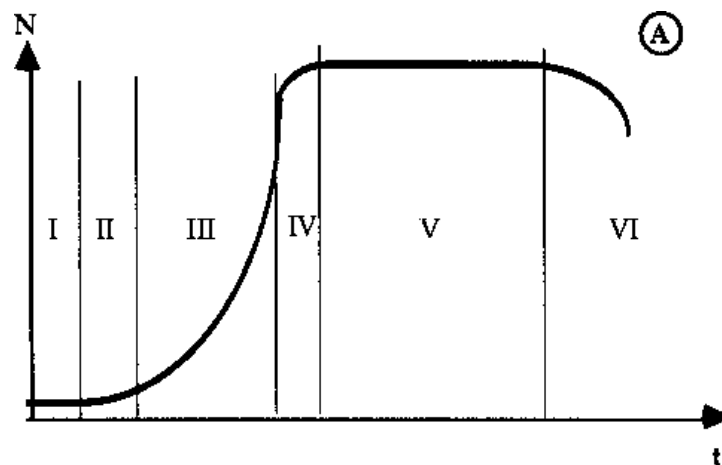


Figure 1 : Courbe de croissance en mode discontinu.

1- **Phase de latence** : le taux de croissance est nul ($\mu = 0$). La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat. Quand des cellules en pleine croissance sont inoculées dans un milieu identique à celui dans lequel elles se trouvent, la phase de latence peut être très brève, voire inexistante.

2- **Phase d'accélération** : appelée aussi la phase de démarrage, elle enregistre une augmentation de plus en plus rapide du nombre de cellules dans la culture.

3- **Phase exponentielle** : le taux de croissance atteint un maximum ($\mu = \max$). Cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante. Le temps de doublement des bactéries est le plus court. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle).

4- Phase de ralentissement : la vitesse de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets. Il existe un début d'autolyse des bactéries.

5- Phase stationnaire : le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent. Il se produit une modification de l'expression des gènes. Les bactéries en état de déprivation synthétisent des protéines de manque qui rendent la cellule plus résistante aux dommages : augmentation du pontage du peptidoglycane, fixation des protéines à l'ADN des cellules de manque.

6- Phase de déclin : le taux de croissance est négatif ($\mu < 0$). Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Cependant, il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse. La mort cellulaire est caractérisée par l'absence de réplication irréversible.

2. Méthodologie de construction de modèles cinétiques

L'élaboration d'un modèle capable de simuler les variations des concentrations de nutriment, de cellule et de métabolites, au cours d'une fermentation, consiste à proposer des lois cinétiques décrivant l'influence de la composition du milieu et de l'état des cellules sur les vitesses de croissance et de métabolisme cellulaire. Pour la plupart des fermentations, la vitesse de formation de nouvelles cellules évolue au cours d'une fermentation. Elle atteint une valeur maximale en début de culture, puis diminue progressivement. Donc le modèle doit d'abord :

- identifier les facteurs responsables de ce ralentissement de croissance ;
- identifier les facteurs qui induisent la transition métabolique ;
- prédire l'arrêt final de la production de métabolite ou de protéine qui est généralement provoqué par un décès ou une dégénérescence des cellules productrices, suite à une carence prolongée en nutriments essentiels ou une accumulation d'un métabolite toxique pour la cellule.

La construction des modèles cinétiques exige un ensemble cohérent d'études expérimentales, puis analyser ces données et établir un diagnostic des processus limitants, enfin proposer des lois cinétiques.

2.1. Étude expérimentale

Avant de modéliser un procédé de fermentation il faut disposer d'un minimum de données sur le procédé. Les études cinétiques peuvent être menées dans différents modes de culture, discontinus ou continus. Elles doivent comporter un suivi analytique des composants pouvant avoir une influence sur l'activité de croissance ou de métabolisme des cellules. Pour mettre en

évidence l'influence bénéfique ou inhibitrice de l'une ou l'autre des substances, il est nécessaire de réaliser ces études à différentes compositions initiales des milieux.

2.2. Diagnostique cinétique

A partir des résultats expérimentaux donnant l'évolution au cours du temps des différents composants du milieu de culture, il s'agit d'identifier les principaux processus qui, dans les conditions étudiées, contrôlent les activités de croissance et de métabolisme des cellules par exemple:

- Les phénomènes responsables du ralentissement de la croissance ;
- Les éléments qui peuvent accélérer le décès cellulaire ;
- Les éléments limitant la concentration maximale de cellules et de métabolite à la fin de la fermentation ;
- Les processus réorientant le métabolisme cellulaire d'un état de croissance vers un état de production de métabolites ;
- Les relations existant entre les vitesses de croissance, de consommation de substrat et de production de métabolite.

2.3. Sélection de lois cinétiques

Afin d'exprimer sous forme de modèles mathématiques les différentes interactions entre la composition du milieu de culture et les activités métaboliques de la cellule, une sélection des lois cinétiques concernant les vitesses de croissance et de décès cellulaire, les vitesses de consommation de nutriments et de production de métabolites sont utilisées. Ces lois sont évoquées dans la partie de la modélisation des différents systèmes de culture.

2.4. Simulation et identification des paramètres du modèle

Cette étape consiste à établir le système d'équations différentielles permettant de prédire la variation au cours du temps de la concentration des composants considérés du milieu de fermentation. Dans une dernière étape, la simulation par le modèle de cinétique de la fermentation nécessite l'identification de la valeur des paramètres figurant dans les lois cinétiques. Elle peut être effectuée de plusieurs manières: Certains des paramètres sont directement déterminés à partir de l'analyse cinétique des résultats expérimentaux d'autres sont ajoutés par un processus itératif de façon à obtenir le meilleur accord entre les points expérimentaux et les courbes du modèle.

Au cours de la croissance d'une population de microorganismes, les cellules synthétisent la nouvelle biomasse microbienne, à tout moment, le gain en biomasse est directement

proportionnel à la biomasse que contient la culture à ce moment précis. Cette cinétique de croissance peut être modélisée mathématiquement par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dX}{dt} = r_x = \mu \cdot X \text{ O\`u,}$$

X : concentration en biomasse (g/L) ; t = temps (h) ;
 μ = taux de croissance spécifique (h⁻¹).

De façon à établir la fonction qui unit la biomasse et le temps dans une culture, on intègre l'équation pour obtenir :

$$X_t = X_0 e^{\mu t} \text{ o\`u,}$$

X_t: concentration en biomasse au temps t (g/L) ; X₀ : concentration initiale en biomasse (g/L) ;
 e : base du logarithme népérien (environ 2,718) ; t : temps de fermentation (h).

Par une simple transformation algébrique, on obtient :

$$\ln X_t = \ln X_0 + (\mu t) \cdot \ln e \text{ o\`u,}$$

$$\ln e = 1, \text{ alors : } \ln X_t = \ln X_0 + (\mu t)$$

La fonction qui unit $\ln X$ au temps (t), à tout moment d'une croissance microbienne, est celle d'une droite ($y = mx + b$) de pente μ et d'ordonnée à l'origine $\ln X_0$. Ainsi sur un graphique de $\ln X$ en fonction du t, on obtiendra une droite chaque fois que le taux de croissance restera constant pendant un intervalle de temps significatif : c'est la courbe de croissance.

Le modèle mathématique ci-dessus utilise la concentration en biomasse (g/L) comme unité de mesure de la croissance. Toutefois, lorsque cette mesure n'est pas disponible, il est possible de lui substituer le nombre total de cellules (cellules/ mL). Dans ce cas, l'équation devient :

$$N_t = N_0 e^{\mu t} \text{ ou } \ln N_t = \ln N_0 + \mu t \text{ O\`u,}$$

N_t: nombre de cellules au temps t (cellule/mL) ; N₀ : nombre initial de cellules (cellule/mL).

Il importe cependant de faire preuve de prudence quand on choisit de travailler avec cette équation, car il est possible que certaines cellules soient en croissance sans être en division,

mais en phase exponentielle, alors que la croissance et la division se font à un rythme optimal, la pente d'un graphique de $\ln N$ en fonction de t fournit une estimation du taux de croissance spécifique (μ) équivalente à celle obtenue à partir d'un graphique de $\ln X$ en fonction de t .

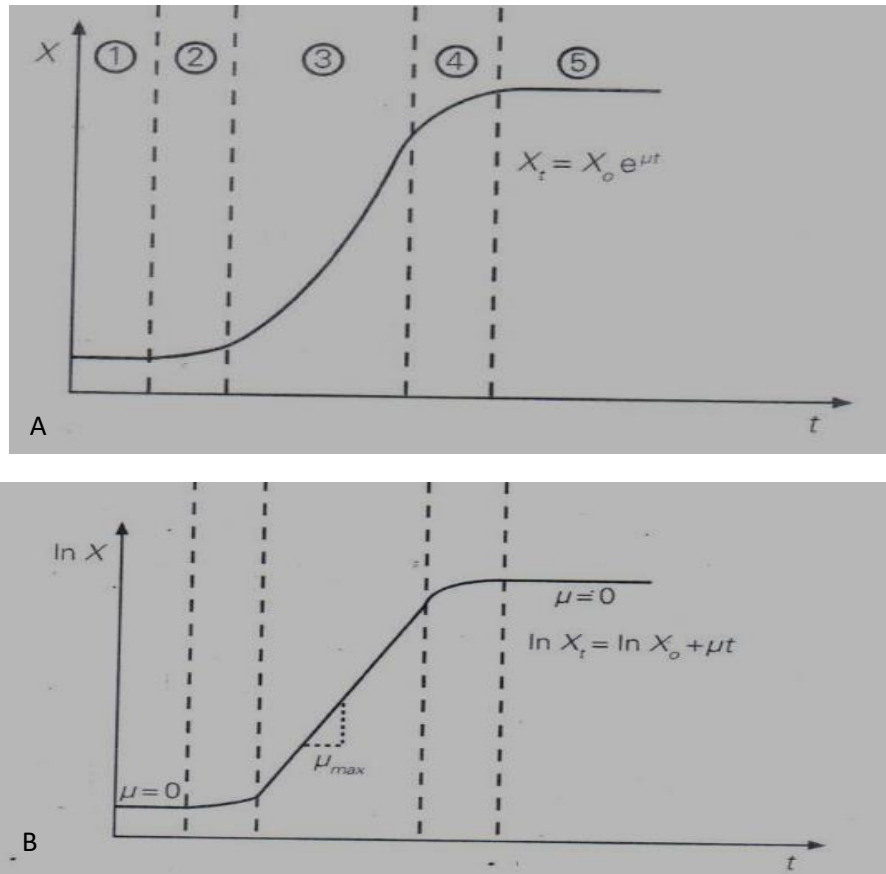


Figure 2 Courbe de croissance microbienne. (A), X en fonction de t , (B), $\ln X$ en fonction de t . **1** :Phase de latence, **2** : Phase d'accélération, **3** : phase exponentielle, **4** :Phase de ralentissement, **5** :Phase stationnaire.

Dans le même ordre d'idée, si on considère que l'absorbance d'une culture est directement proportionnelle à sa concentration en biomasse (g/L), on peut aussi modéliser la croissance par l'équation :

$$A_t = A_0 e^{\mu t} \text{ ou } \ln A_t = \ln A_0 + \mu t,$$

Où,

A_t : absorbance au temps t ;

A_0 : absorbance initiale.

Cette dernière équation est parfaitement équivalente à l'équation de la biomasse, et la pente d'un graphique de $\ln A$ en fonction de t fournit donc une estimation précise du taux de croissance spécifique (μ).

➤ *Le taux de croissance spécifique*

Le taux de croissance spécifique (μ), exprimé en h^{-1} , est une variable fondamentale de la cinétique de croissance d'une culture microbienne. En effet, comme il est proportionnel à la vitesse de croissance (selon $dX/dt = \mu X$), plus il est élevé, plus la croissance est rapide. Il constitue donc une mesure du rythme de la croissance et reflète fidèlement l'état physiologique des cellules en culture. On obtient ce taux en traçant une courbe de croissance sous la forme d'un graphique du logarithme de la biomasse ($\ln X$) en fonction du temps de fermentation (t) (figure 2-B); il correspond à la pente en chaque point de la courbe obtenue. Comme on peut l'observer, le taux de croissance spécifique varie selon les phases de croissance.

Pour toute culture microbienne, la droite obtenue sur la courbe de croissance pendant la phase de croissance exponentielle permet de calculer facilement et précisément, par une simple mesure de sa pente, le taux de croissance spécifique maximal (μ_{max}). Celui-ci est donc une variable de référence indispensable en cinétique de croissance. Spécifique à l'espèce microbienne autant qu'aux conditions de culture utilisées, μ_{max} permet notamment de comparer la croissance d'une même espèce microbienne dans différentes conditions ou celle de différentes espèces microbiennes dans des conditions similaires.

➤ *Le temps de dédoublement ou de génération*

Le temps de dédoublement d'une culture est le temps que prend une biomasse microbienne pour doubler. Evidemment, on ne le détermine qu'en phase de croissance exponentielle (le taux de croissance est maximal (μ_{max})). Il correspond alors au temps requis pour que le nombre de cellules double dans la culture, soit au temps que prend une génération pour en former une autre. Pour cette raison, on emploie aussi le terme de génération (G) pour le désigner. Il se calcule aisément à partir de la valeur de μ_{max} . En effet, selon l'équation de la cinétique de croissance, appliquée en phase exponentielle:

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu_{max} \cdot t$$

D'où :

$$\ln X_t - \ln X_0 = \mu_{max} \cdot t \text{ ou } \ln X_t / X_0 = \mu_{max} \cdot t$$

Puisque dans un intervalle de temps G , la biomasse double, alors $X_t = 2X_0$, et l'équation devient :

$$\ln (2X_0 / X_0) = \mu_{max} \cdot G$$

soit :
$$G = \ln 2 / \mu_{max} \text{ ou } G = 0,693 / \mu_{max}$$

On peut constater que le temps de dédoublement ou de génération permet simplement d'exprimer le taux de croissance spécifique maximal sous une autre forme, celle-ci offrant l'avantage d'être plus facile à traduire dans le réel. En effet, si une culture a un μ_{\max} de 1,00/h, alors G est égal à $\ln 2 / 1,00 \text{ h}^{-1}$ soit 0,693h, ce qui signifie que la population microbienne se divise et double à toutes les 0,693 heures ou 41,6 minutes durant la phase de croissance exponentielle. Comme μ_{\max} , le temps de génération (G) varie selon le microorganisme et les conditions de culture. Par exemple, en milieu riche et bien oxygéné, la bactérie *E. coli* se divise environ aux 20 minutes à 37°C (μ_{\max} autour de 2,0h⁻¹), alors que la levure *S. cerevisiae* se divise environ aux 100 minutes à 30°C (μ_{\max} autour de 0,4h⁻¹).

➤ **La consommation du substrat**

La concentration du substrat est considérée comme étant un paramètre très important pour simuler et identifier les paramètres du modèle. En effet, la courbe de consommation du substrat traduit l'évolution des concentrations, pendant une fermentation, en différents substrats carbonés ou azotés. Comme ces substrats constituent des nutriments pour les microorganismes en croissance, leur consommation est inversement proportionnelle à la croissance de la biomasse (X) et la diminution est très rapide durant la phase log (figure 3)

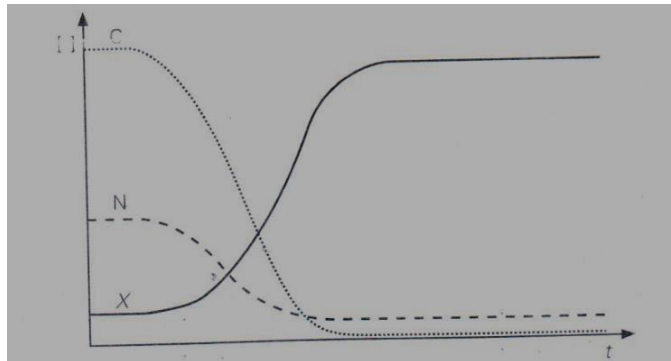


Figure 3 : Cinétique d'utilisation du substrat par rapport à la croissance cellulaire. C : concentration en substrat carboné, N : concentration en substrat azoté, X : concentration en biomasse.

➤ **La formation du produit**

De nombreux composés d'intérêt peuvent être élaborés par les microorganismes. Ces produits, selon qu'ils sont issus du métabolisme primaire ou secondaire, ne sont pas synthétisés au même moment au cours d'une fermentation. En général, lorsqu'on met en relation la production de métabolites et la croissance microbienne, on remarque qu'on peut diviser la fermentation en deux phases : la trophophase et l'idiophase. La plupart des métabolites primaires sont produits durant la trophophase, qui s'étend du début de la fermentation à la fin de la phase de croissance exponentielle environ, alors que les métabolites

secondaires sont plutôt synthétisés durant l'idiophase, qui correspond grossièrement à la phase stationnaire, en s'étendant, parfois sur une partie de la phase de déclin (figure 4).

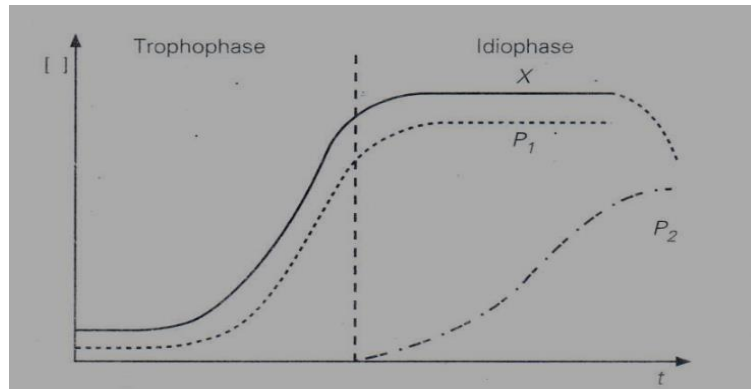


Figure 4 : Comparaison de la production d'un métabolite primaire (P1) et d'un métabolite secondaire (P2) en relation avec la croissance.

La transition entre la trophophase et l'idiophase s'effectue au cours de la phase de décélération, lorsque la croissance se trouve ralentie à la suite de l'épuisement du milieu. Cette différence touchant la phase au cours de laquelle sont produits les métabolites primaires et secondaires est due au fait que les premiers sont issus de voies métaboliques essentielles qui sont liées à la croissance, alors que les seconds résultent de voies métaboliques sans lien avec celle-ci et qui ne s'activent que lorsqu'elle ralentit ou qu'elle s'arrête. Selon l'association qui existe entre la production d'un métabolite et la croissance, on regroupe ceux-ci en trois classes :

-Produits dépendants de la croissance

La plupart des métabolites primaires résultant des réactions cataboliques, comme l'éthanol et les acides organiques, et ceux issus des réactions anaboliques, comme les acides aminés, les acides nucléiques, les vitamines et les protéines, sont des produits dépendants de la croissance. Ils sont générés exclusivement durant la trophophase selon une cinétique identique à la cinétique de croissance, de sorte que leur concentration dans la culture est en tout temps proportionnelle à la concentration en biomasse (figure 5).

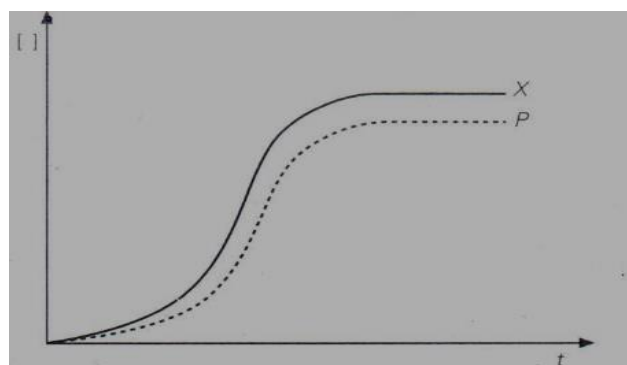


Figure 5 : Produits dépendants de la croissance

-Les produits partiellement dépendants de la croissance

Cette classe regroupe surtout des métabolites primaires dont la production ne suit pas parfaitement la cinétique de croissance. La production peut commencer avec un certain retard par rapport à la croissance, comme c'est le cas pour l'acide aminé L-lysine, et elle se prolonge souvent au-delà de la trophophase, sur une partie de l'idiophase. Sur une courbe de production, le lien avec la croissance est manifeste, mais on observe généralement un décalage par rapport à la cinétique de croissance (figure 6).

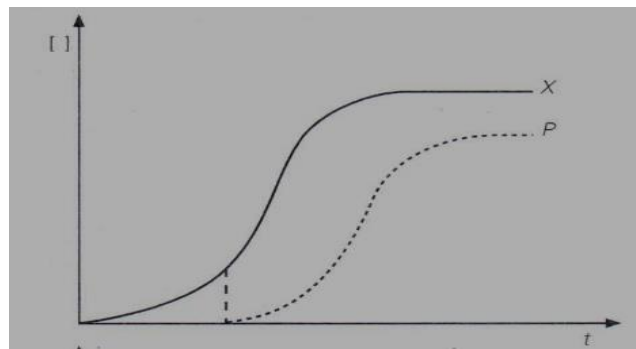


Figure 6 : Produits partiellement dépendants de la croissance

-les produits indépendants de la croissance

Ces produits sont généralement des métabolites secondaires, tels que des antibiotiques, des toxines ou des arômes. Cette production n'est pas associée à la croissance cellulaire et elle se fait principalement durant l'idiophase, selon une cinétique exclusive à chacun (figure 7). Issus de voies métaboliques non essentielles à la survie et extrêmement complexe et diversifiées, ces produits ne sont souvent synthétisés en quantité intéressante que dans des conditions de culture très particulières qui doivent être bien contrôlées durant toute la phase de production.

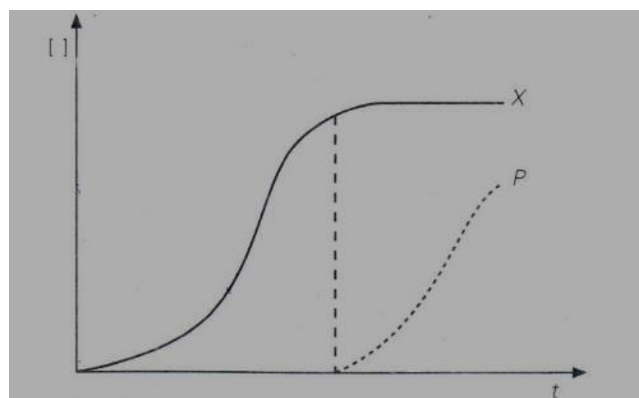


Figure 7 : produits indépendants de la croissance

3-Effet de différents paramètres du milieu de culture sur la croissance microbienne

La croissance microbienne est influencée par les constituants du milieu de culture et par les facteurs physico-chimiques (température, pH, oxygène, etc...). Donc la connaissance de ces facteurs environnementaux pour une levure donnée va permettre de connaître sa distribution écologique et de contrôler son développement.

3.1- Effet de la température

La température est un facteur qui affecte profondément les microorganismes, comme tous les êtres vivants. Il est donc important de connaître les effets de la température sur la croissance du microorganisme et la thermosensibilité des réactions catalysées par les enzymes. Aux faibles températures, l'activité cellulaire microbienne peut être totalement bloquée. Par contre, une élévation de la température va augmenter la vitesse de croissance. En effet, Les micro- organismes peuvent se classer selon l'échelle de température (tableau 3).

Tableau : Classification des microorganismes selon la température

Classification	Caractéristiques
Psychrophile	Micro-organismes capables de survivre à des températures froides. (15°C) mais peuvent se développer entre 0°C (température minimale) et 20°C (température maximale).
Mésophile	La plupart des micro-organismes font partie de cette catégorie. Les températures optimales des mésophiles sont entre 20 et 45°C et leur température minimale se situe entre 15 et 20°C L'habitat de ces organismes est très diversifié (le sol, l'eau douce et l'eau de mer, les eaux usées, les végétaux, les animaux et l'homme)
Thermophile	Micro-organismes qui peuvent se développer à des températures de 55°C (optimum) ou plus. Les thermophiles ont des enzymes beaucoup plus stables à la chaleur et des systèmes de synthèse protéique capables de fonctionner à de hautes températures

3.2. Effet du pH

Le pH est un facteur important de la croissance des microorganismes, car il détermine l'activité métabolique des cellules. Chaque espèce peut croître sur une plage de pH assez étendue, avec un taux de croissance spécifique maximal.

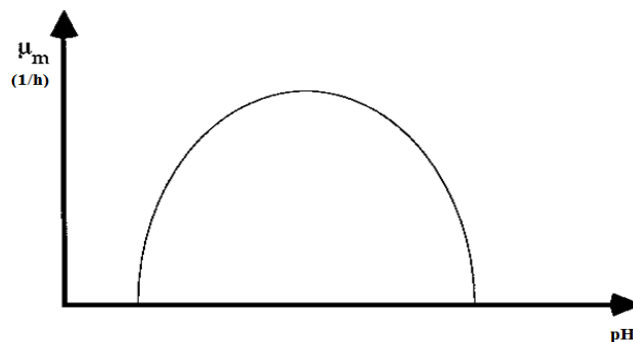


Figure 8 Variation typique du taux de croissance spécifique maximal μ_{max} en fonction du pH

L'impact du pH s'étend à la solubilité des nutriments ainsi qu'à la perméabilité de la membrane cellulaire. Les environnements alcalins sont généralement défavorables aux micro-organismes, leur capacité de croissance étant limitée à des valeurs de pH autour de 9 à 9.5. Dans la plage de pH allant de 0 à 8, différents comportements sont observés, déterminant la capacité des micro-organismes à tolérer et/ou à métaboliser les acides organiques (ou minéraux) présents dans leur environnement. En règle générale, les bactéries sont neutrophiles, affichant une croissance optimale autour d'un pH proche de 7, mais leur croissance est partiellement inhibée en dessous de 5. En revanche, les levures et les moisissures montrent une capacité significative à métaboliser les acides organiques, ce qui leur permet de prospérer sur une large plage de pH, allant de 2.5 à 8.5.

4. Croissance en milieu renouvelé : continue, système ouvert

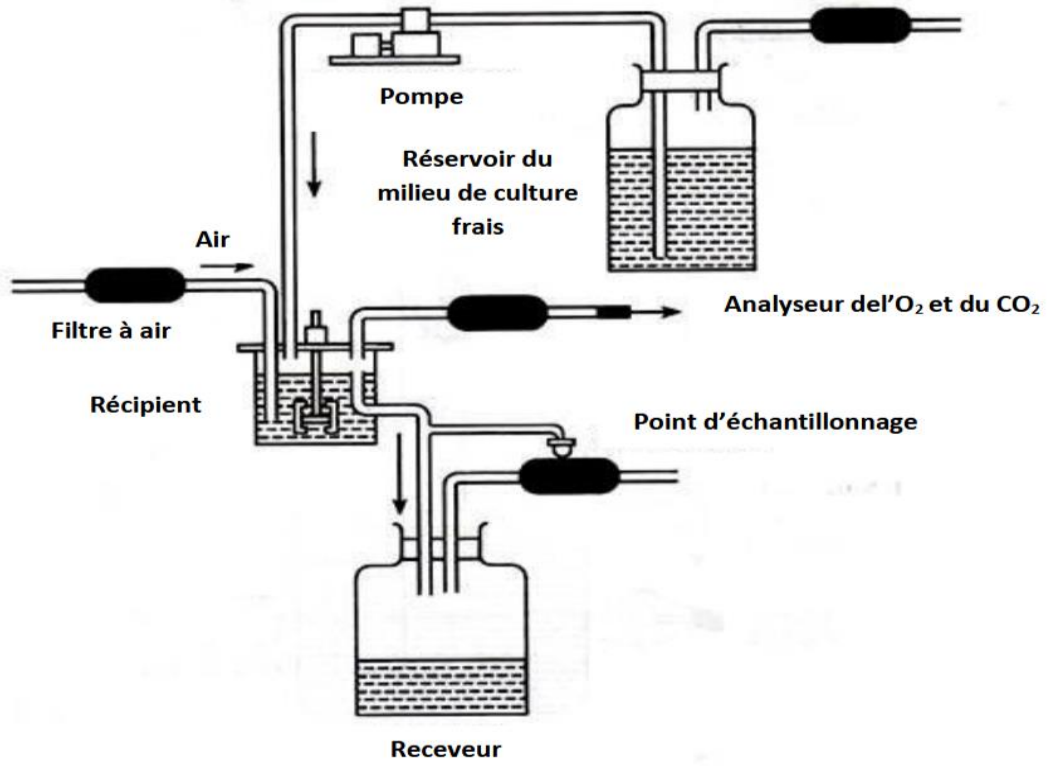
La croissance continue, à la différence de la croissance discontinue, maintient la population bactérienne dans un état de croissance équilibrée et optimale, en phase exponentielle, dans un système ouvert. Ce mode opératoire implique un renouvellement constant du milieu de culture par un apport régulier de nutriments compensé par le retrait simultané du même volume de culture bactérienne. Deux dispositifs principaux sont couramment utilisés pour soutenir ce type de culture :

4.1. Chémostat

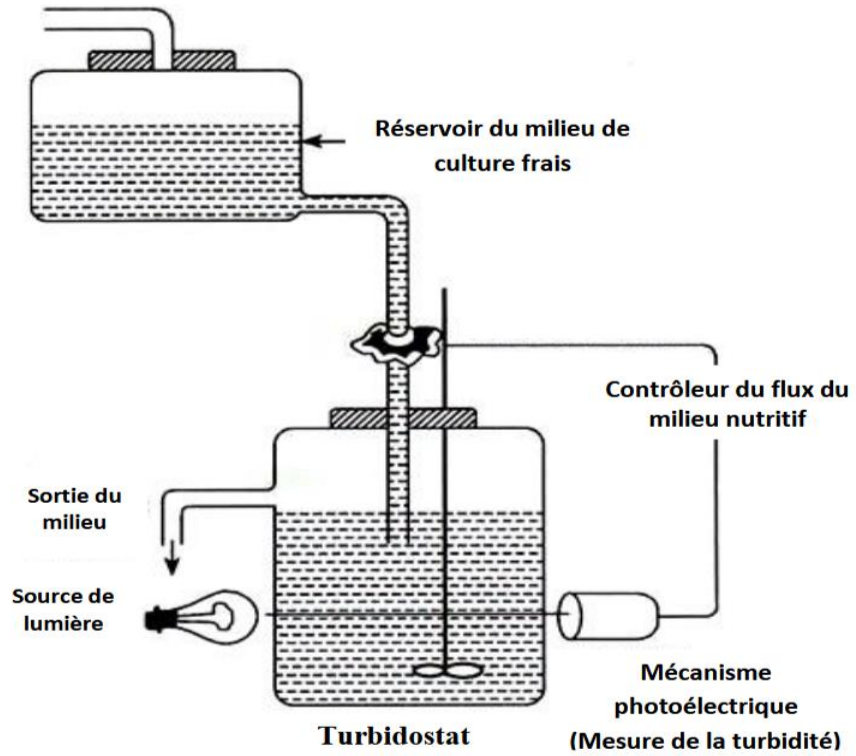
Ce dispositif de culture en croissance continue comprend un récipient muni d'un siphon de trop-plein et d'un mécanisme permettant de transférer la culture goutte à goutte, de manière régulière, dans un milieu frais provenant d'un réservoir externe. Le milieu de culture à l'intérieur du récipient est maintenu stérile par un flux d'air. Chaque goutte de milieu frais introduite entraîne une goutte de culture à sortir par le siphon. Le milieu de culture est formulé de manière à ce qu'un nutriment limite la croissance bactérienne. Après l'inoculation, les cellules se multiplient jusqu'à épuisement du nutriment limitant. À ce stade, le milieu frais est introduit du réservoir à un rythme tel que les cellules consomment le nutriment limitant aussi rapidement qu'il est apporté. Dans ces conditions, la concentration cellulaire reste constante et le taux de croissance (μ) est directement lié au débit du milieu.

4.2. Turbidostat

Ce dispositif ressemble au chémostat excepté que le flux du milieu nutritif est contrôlé par un mécanisme photoélectrique qui mesure la turbidité (DO) de la culture. Lorsque la turbidité dépasse le niveau choisi, du milieu frais est alors entré. Ainsi, les cellules peuvent croître à taux maximum à une concentration cellulaire constante. Seulement le taux de croissance est contrôlé dans le turbidostat.



Chémostat



5. Le phénomène de diauxie

Le phénomène de diauxie, découvert par Monod, se manifeste par une courbe de croissance en deux phases distinctes. Il survient dans des milieux synthétiques contenant au moins deux sources de carbone et est associé à un mécanisme de répression catabolique (RC). Par exemple, en présence de glucose et de lactose, certaines espèces bactériennes commenceront par utiliser le glucose grâce à des enzymes constitutives. La dégradation du lactose nécessite des enzymes inductibles dont l'induction est inhibée en présence de glucose. Une fois que le glucose est épuisé, les bactéries passeront à l'utilisation du lactose, entraînant une nouvelle phase de croissance exponentielle après une période de latence.

