

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE L'HYDRODYNAMIQUE SUR UNE BACTÉRIE FILAMENTEUSE PAR ANALYSE D'IMAGES

S. GROSLAMBERT
S. BLACHER
M. CRINE

◊ Laboratoire de Génie Chimique
Université de Liège
Bâtiment B6
Sart Tilman
4000 Liège
Belgique

Résumé:

Le but de ce travail est l'analyse des relations qui peuvent exister entre l'hydrodynamique d'un fermenteur à cuve agitée mécaniquement et la morphologie d'une bactérie filamenteuse qui y est cultivée. Bien que n'ayant pas d'impact sur la croissance, l'augmentation de la vitesse de rotation des mobiles d'agitation (quelque soit leur type) modifie la morphologie d'*Actinomadura* R39. Nous avons ainsi pu établir une relation entre différents paramètres morphologiques (aire, périmètre, diamètres de Féret maximum et minimum, circularité) et des grandeurs directement liées à l'agitation (puissance dissipée, vitesse périphérique des pales).

I. INTRODUCTION

L'opération de mélange est une étape particulièrement importante dans la conception d'un bioréacteur. Elle gouverne les transferts de matière, de chaleur et de quantité de mouvement. En contre-partie, la turbulence engendrée risque d'entraîner la destruction des micro-organismes, ces dommages étant regroupés sous le terme générique de *stress hydrodynamique*. Dans un fermenteur à cuve agitée mécaniquement, il résulte des actions conjuguées des mobiles d'agitation (rotation, cisaillement), de la présence d'interface gaz-liquide (bulles), des variations de pression (derrière les pales des mobiles, aux abords des bulles), des collisions avec les mobiles ou les parois, etc.(1)(2).

Nous avons étudié l'influence de l'hydrodynamique d'un fermenteur de laboratoire à cuve agitée mécaniquement avec différentes configurations du système d'agitation sur la croissance et la morphologie d'une bactérie. Les micro-organismes filamenteux sont réputés pour être particulièrement sensibles au stress hydrodynamique et ils sont également très utilisés industriellement (80% des antibiotiques sont produits par ce type d'organismes (3)). C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier les réponses d'une bactérie filamenteuse à divers niveaux de stress. L'influence du stress hydrodynamique sur la morphologie est mesurée par analyse d'images et quantifiée par différents paramètres qui en sont issus.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1. Souche et milieu de culture

Une étape préliminaire à ce travail a consisté à sélectionner une souche sensible au stress hydrodynamique : *Actinomadura* R39 (Actinomycète filamenteux). Un milieu de culture simple et performant a été mis au point, comprenant une source carbonée (amidon, 15 g/l), une source d'azote organique (peptone de soja, 12 g/l) et des sels (2.6

(amidon, 15 g/l), une source d'azote organique (peptone de soja, 12 g/l) et des sels (2.6 g/l). Le démarrage des fermentations a été standardisé par préparation d'une préculture mère stockée à basse température (-70°C) qui a servi à l'ensemencement des inoculums pour toutes les expériences. Cette méthodologie a permis d'obtenir une bonne reproductibilité des fermentations.

II.2. Fermenteur

Le fermenteur comporte une cuve de cinq litres utiles, d'un diamètre de 0.147 m (B. Braun). Deux types de mobiles différents sont utilisés : les turbines Rushton (écoulement radial, $d=0.056$ m) et les Intermig (écoulement mixte axial-radial, $d=0.102$ m). Trois mobiles (identiques) sont disposés sur le même arbre d'agitation. Les vitesses d'agitation sont fixées en prenant comme point de comparaison la vitesse périphérique des pales (correspondant au cisaillement maximum) : 300, 450, 600 et 900 rpm avec les turbines Rushton, 247 et 329 rpm avec les Intermig.

II.3. Mesures hydrodynamiques

La puissance consommée a été mesurée par un capteur de force dans un milieu artificiel reproduisant le comportement rhéofluifiant du milieu de culture contenant les micro-organismes filamenteux (xanthane 1.25 g/l + sels 2.6 g/l et antimousse).

II.4. Préparation des échantillons

Les échantillons ont été prélevés lors des fermentations au moment correspondant au minimum de la concentration en oxygène dissous. Ils ont été dilués et colorés par du violet cristallisé et fixés sur une lame de microscope. Les lames ainsi préparées peuvent être conservées durant plusieurs années.

II.5. Analyse d'images

L'acquisition des images se fait par microscopie optique (Zeiss Axioplan, Allemagne; objectif Zeiss Neofluar-epiplan, 5X / 0.15 dic). Le contraste est amélioré par l'utilisation d'un filtre bleu. L'éclairage des plaques est identique pour tous les échantillons. Cette précaution sera importante par la suite pour permettre le choix du seuillage des images enregistrées lors du traitement informatique. Une caméra monochrome (Ikegami, caméra CCD, modèle ICD-42E, type L REV. A) envoie les images vers un PC équipé d'une carte d'acquisition sur laquelle la caméra est branchée et l'acquisition se fait en utilisant le logiciel Microsoft Photo Editor, avec sauvegarde des images sous format TIFF. Les fichiers d'images sont transférés sur une station Sun et traités par le logiciel Visilog 5.0 (Noésis, France).

Cent vingt images sont enregistrées pour chaque échantillon (ce qui correspond à environ deux cents à deux cent cinquante objets).

III. ANALYSE D'IMAGES

III.1. Préparation des images

Malgré les précautions prises lors de la préparation des plaques, il reste des objets parasites sur les images. Ces dernières doivent être éliminées au maximum avant de pouvoir faire des mesures sur les objets intéressants. Le filtrage se fait sur base des outils de la morphologie mathématique.

Tout d'abord, l'image digitalisée est chargée par le logiciel. Cette première image comporte 256 niveaux de gris (blanc=255, noir=0). Cette image est brute, et comporte à

la fois des objets intéressants (pelotes, agrégats) et des débris ou des impuretés (quelques filaments libres ou des fragments, des poussières, des cristaux, etc.).

Le traitement de cette image comprend deux étapes principales: l'extraction des contours et celle des noyaux. La Figure 1 reprend l'algorithme de nettoyage des images. La Figure 2 montre deux exemples d'images brutes ("im. 1") et la Figure 3 ces mêmes images après nettoyage ("im. 12").

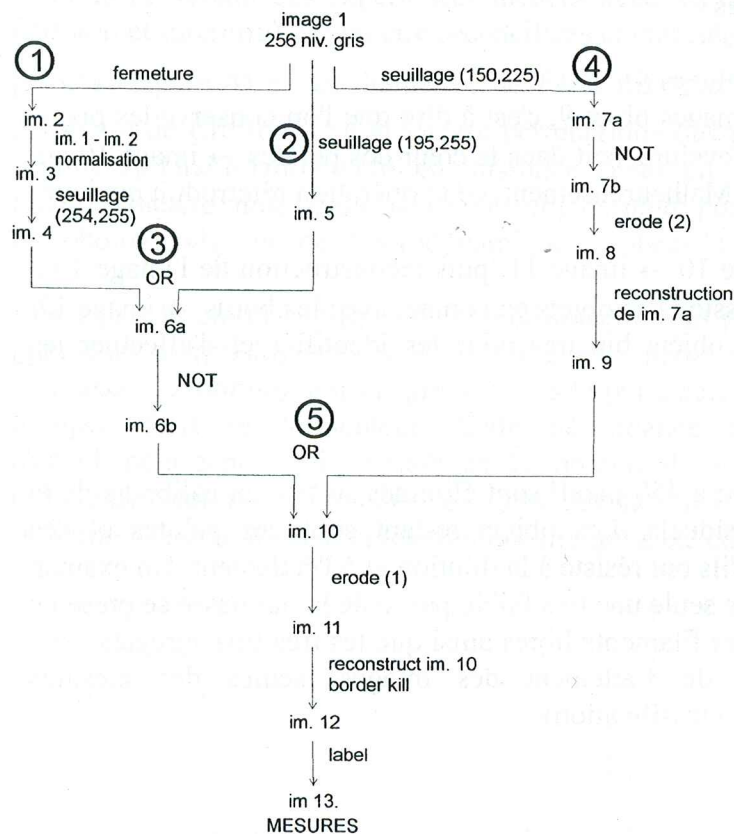


Figure 1 : Algorithme de nettoyage des images

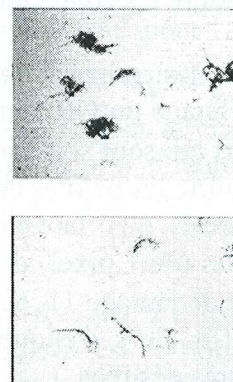


Figure 2 : Images d'origine

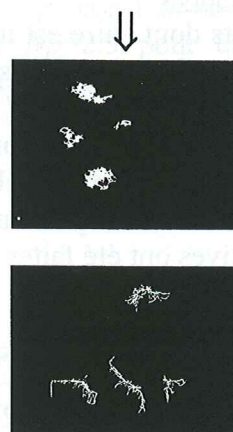


Figure 3 : Images après nettoyage

Extraction des contours ↗ :

1. fermeture (de 1 pixel) de l'image 1
2. soustraction de l'image 2 (élargie) de l'image 1 (originale) (ce qui extrait les contours des objets) et normalisation de l'image obtenue → image 3
3. seuillage de l'image 3 entre 254 et 255 → image 4

Seuillage ↗

4. parallèlement, l'image originale est seuillée entre 195 et 255 → image 5.

Réunion des images obtenues ↘

5. on compare alors les images 4 et 5 par un "ou logique" (opération OR) → image 6a (qui contient les objets avec les contours affinés mais pas de cœur, c'est à dire uniquement la "chevelure" des pelotes). Inversion de l'image 6a (NOT) → image 6b (chevelures blanches sur fond noir)

Extraction des noyaux ↘

6. l'image originale est seuillée entre 150 et 255 → image 7a puis inversion → image 7b
7. érosion de l'image 7b de deux pixels → image 8
8. reconstruction de l'image 7b à partir de l'image 8 → image 9. En effectuant cette reconstruction, on récupère dans l'image 7b les objets (entiers) qui correspondent aux objets rescapés de l'image 8. L'image 9 a été nettoyée de ses impuretés, mais le seuillage utilisé ne laisse que des objets incomplets. On a en fait obtenu par cette procédure les cœurs des pelotes

Réunions des cœurs et des chevelures ⇔

9. on effectue un OR entre les images 6b et 9, c'est à dire que l'on conserve les pixels blancs qui sont soit dans la chevelure, soit dans le cœur des pelotes → image 10 qui comporte les pelotes entières. Malheureusement, cette opération réintroduit quelques impuretés, qu'il faut éliminer
10. érosion (de 1 pixel) de l'image 10 → image 11, puis reconstruction de l'image 10 à partir de l'image 11, et suppression des objets en contact avec les bords → image 12. Il suffit alors d'étiqueter les objets binaires pour les identifier et d'effectuer les mesures désirées.

III.2. Mesures

Les objets dont l'aire est inférieure à 450 pixel² sont éliminés suite à un calibrage de la taille des éléments parasites résiduels. Les objets restant sont des pelotes et des enchevêtrements "stables" puisqu'ils ont résisté à la dilution et à l'étalement. Un examen visuel des échantillons montre que seule une très faible partie de la biomasse se présente sous forme de filaments libres. Ces filaments libres ainsi que les très fins agrégats étant éliminés automatiquement lors du traitement des images, seules des mesures quantitatives ont été faites (pas de classification).

Nous avons mesuré :

- l'aire
- le périmètre de Crofton
- le facteur de forme ou la circularité : $circularité = \frac{périmètre^2}{4 \pi aire}$
- la rose des diamètres de Féret ainsi que les diamètres de Féret minimum et maximum

IV. RÉSULTATS

IV.1. Influence de l'hydrodynamique sur la croissance

Les différentes conditions de culture ont donné des résultats similaires en terme de production de biomasse (évaluée par le poids sec) et de vitesse de croissance maximale. On n'observe pas d'influence significative de la concentration minimale en oxygène dissous, du taux d'inoculation, de la vitesse d'agitation pour un mobile donné ou du type de mobile utilisé. Malgré les différentes conditions d'agitation, la croissance d'*Actinomadura* R39 n'est pas influencée par le stress hydrodynamique. On peut supposer que, même aux vitesses d'agitation élevées qui entraînent des champs de cisaillement intenses (particulièrement dans la région de l'agitateur), le temps de séjour des bactéries dans cette zone proche des mobiles est suffisamment court que pour ne pas handicaper leur croissance.

IV.2. Influence de l'hydrodynamique sur la morphologie

Une augmentation de la vitesse d'agitation entraîne la formation de pelotes qui sont plus petites, plus compactes et plus circulaires. A vitesse de rotation ou à vitesse périphérique des pales identique, les Intermig produisent des pelotes plus petites et plus compactes que les turbines Rushton.

Les résultats morphologiques ont été corrélés aux paramètres hydrodynamiques. Les données provenant des expériences menées avec les deux types de mobiles (turbines Rushton et Intermig) ont pu être réconciliées et corrélées au produit $N^3 d^5$ pour l'aire des pelotes (Figure 4) et les diamètres de Féret maximum et minimum, à $\sqrt{N^3 d^5}$ pour périmètre de Crofton, et à la vitesse périphérique des pales ($=\pi Nd$) pour la circularité (Figure 5). Une relation en loi en puissance n'étant pas statistiquement meilleure que la relation linéaire, nous avons conservé cette dernière pour exprimer la dépendance de la morphologie vis à vis de l'hydrodynamique (Tableau 1).

Mis à part la circularité (qui est proportionnelle à la puissance dissipée P), les autres grandeurs morphologiques sont corrélées au rapport P/Np (où Np est le nombre de puissance du mobile), qui intègre à la fois la puissance fournie et la façon dont elle est dissipée dans le fermenteur. Cette dépendance montre l'importance du type d'écoulement généré par les mobiles. Le nombre de puissance Np (constant en régime turbulent) vaut $Np=15.3$ pour les trois turbines Rushton et $Np=2.3$ pour les trois Intermig. C'est également la relation linéaire qui a été conservée (Tableau 1).

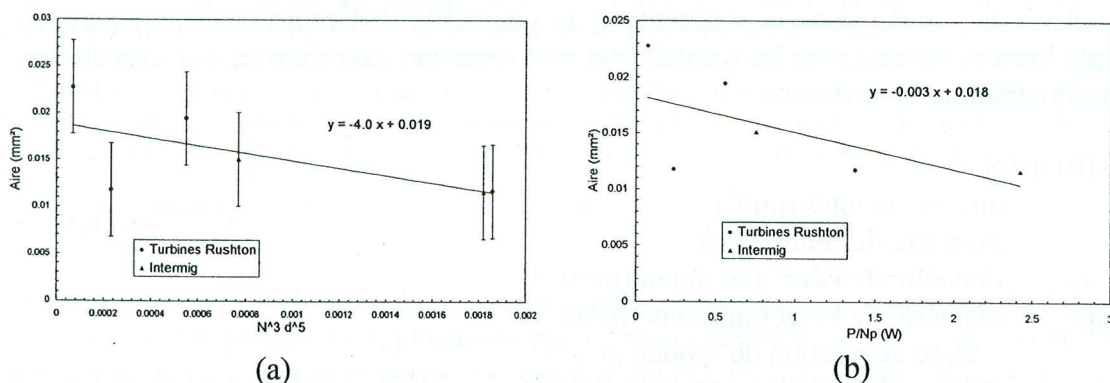


Figure 4 : Aire des pelotes (mm^2) en fonction (a) de $N^3 d^5$ (m^5/s^3) et (b) de P/Np (W)

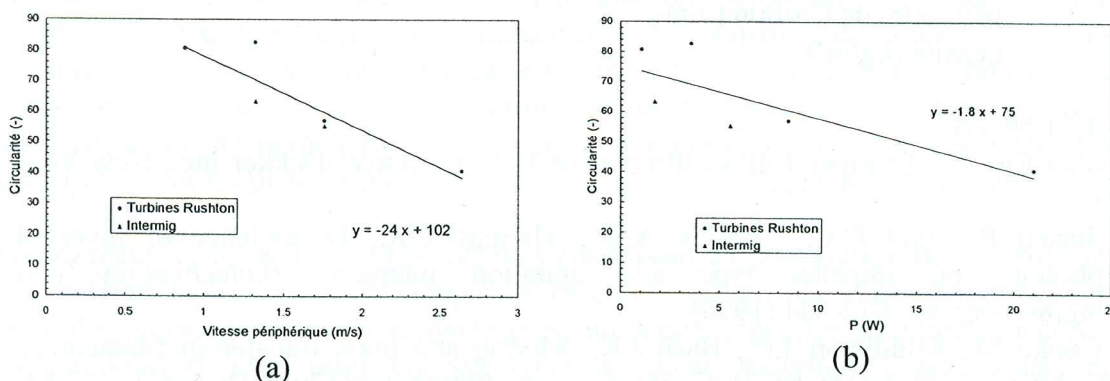


Figure 5 : Circularité des pelotes (-) en fonction (a) de πNd (m/s) et (b) de P (W)

$aire = 0.019 - 4 N^3 d^5$	$aire = 0.018 - 0.003 P/Np$
$PC = 4.4 - 48 \sqrt{N^3 d^5}$	$PC = 4.2 - 1.3 \sqrt{\frac{P}{Np}}$
$dFmax = 0.29 - 39 N^3 d^5$	$dFmax = 0.28 - 0.03 P/Np$
$dFmin = 0.16 - 18 N^3 d^5$	$dFmin = 0.16 - 0.013 P/Np$
$circularité = 102 - 24 \pi Nd$	$circularité = 75 - 1.8 P$

Tableau 1 : Relations entre la morphologie et l'hydrodynamique

V. CONCLUSIONS

La morphologie d'*Actinomadura* R39 reflète l'influence de l'hydrodynamique régnant dans le fermenteur, en effectuant une intégration spatiale et temporelle des conditions rencontrées au cours de la croissance et des déplacements. C'est pourquoi les mesures morphologiques effectuées sur les pelotes peuvent être corrélées aux paramètres décrivant l'hydrodynamique ($N^3 d^5$ ou πNd).

Cette étude a présenté la mise au point d'une méthodologie d'étude de l'influence de l'hydrodynamique dans les procédés de fermentation. Après quelques fermentations de calibration, il est ainsi possible de prédire la morphologie que l'on obtiendra dans des conditions hydrodynamiques déterminées.

Inversement, sur base cet étalonnage, on pourra caractériser l'hydrodynamique d'un système complexe sur base de l'étude de la morphologie d'*Actinomadura* R39. Il suffit de cultiver la souche dans un fermenteur de géométrie différente et de comparer la morphologie résultante avec les résultats obtenus dans une cuve dont les caractéristiques hydrodynamiques sont connues.

SYMBOLES

aire	aire des pelotes (mm ²)
d	diamètre du mobile (m)
dFmax	diamètre de Féret maximum (mm)
dFmin	diamètre de Féret minimum (mm)
N	vitesse de rotation du mobile (s ⁻¹)
Np	nombre de puissance ($Np = P/\rho N^3 d^5$)
P	puissance consommée (W)
PC	périmètre de Crofton (mm)
ρ	densité (kg/m ³)

RÉFÉRENCES

- (1) van't Riet K., Tramper J. Basic Bioreactor Design, Marcel Dekker Inc., New York (1991)
- (2) Justen P., Paul G.C., Nienow A.W., Thomas C.R., Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology and Bioengineering*, **52**, 672-684 (1996)
- (3) Cooke M., Middleton J.C., Bush J.R., Mixing and mass transfer in filamentous fermentations. 2nd International Conference on *Bioreactor Fluid Dynamics*, 37-64, Editor R. King, BHRA The Fluid Engineering Center, Cranfield, Bedford, UK (1988).