

# HYDRODYNAMIQUE ET MORPHOLOGIE D'UNE BACTÉRIE FILAMENTEUSE DANS UN FERMENTEUR À CUVE AGITÉE

S. Gros Lambert, S. Blacher, M. Crine

Laboratoire de Génie Chimique, Département de Chimie Appliquée,  
Université de Liège, Bâtiment B6c, Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgique.

## Résumé

Afin d'étudier l'influence de l'hydrodynamique sur une bactérie filamenteuse, *Actinomadura* R39, nous l'avons cultivée dans un fermenteur de laboratoire de 5 litres à cuve agitée en faisant varier les conditions d'agitation. Les variables sont la vitesse de rotation et le type de mobile utilisé : turbines Rushton ou Intermig. Les deux mobiles se distinguent par leur géométrie et par les schémas d'écoulement qu'ils induisent dans la cuve. L'influence de l'hydrodynamique sur *Actinomadura* R39 est quantifiée par l'évolution de sa morphologie. Cette dernière est estimée par analyse d'images sur des échantillons prélevés lors des cultures. Parallèlement, nous avons caractérisé l'hydrodynamique du fermenteur dans un milieu artificiel reproduisant la rhéologie des fermentations en mesurant la puissance dissipée et en effectuant des essais de traceurs. Ces derniers sont utilisés pour la modélisation du fermenteur par un modèle compartimenté et le calcul du temps de mélange. Nous avons pu ainsi mettre en relation les modifications de la morphologie et des grandeurs caractérisant les écoulements dans le fermenteur. L'existence de corrélations entre les paramètres du modèle et la morphologie a également permis une validation de la signification physique de ce modèle.

## INTRODUCTION

Outre les effets positifs induits par l'agitation (par exemple l'amélioration des transferts de matière, de chaleur et d'impulsion), la turbulence induite par ce processus peut altérer l'activité des micro-organismes ou modifier certaines de leurs caractéristiques [1-4]. On utilise le terme générique "stress hydrodynamique" pour décrire ces effets indésirables de la turbulence sur les bactéries. Afin de mieux comprendre ce phénomène complexe, nous avons étudié l'influence des conditions d'agitation sur la morphologie d'une bactérie filamenteuse. On peut faire varier les conditions hydrodynamiques régnant dans le fermenteur de différentes façons, notamment en modifiant la vitesse d'agitation ou le type de mobile utilisé. Les conséquences pour la bactérie peuvent être quantifiées par les modifications de sa morphologie. Les mesures de diverses grandeurs ont été réalisées au moyen des outils de l'analyse d'images.

Parallèlement, les outils du génie chimique permettent l'étude des écoulements dans le fermenteur. Des mesures de puissance et une représentation de l'hydrodynamique du fermenteur par un modèle compartimenté permettent d'en déterminer certaines grandeurs caractéristiques, et de les relier à l'évolution de la morphologie en fonction des conditions d'agitation.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. FERMENTATIONS

*Actinomadura* R39 est une bactérie filamenteuse de la famille des actinomycètes, provenant du Centre

d'Ingénierie des Protéines (Professeur J-M. Frère, ULg). Elle a été sélectionnée pour sa sensibilité au stress hydrodynamique, suite à un test en fioles. Afin de standardiser les inoculums, une préculture-mère a été réalisée à partir d'une pente sur gélose, et conservée à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Les cultures sont démarrées à partir d'un inoculum préparé avec cette préculture-mère.

Nous avons mis au point un milieu de culture simple, optimisé par la méthodologie des plans d'expériences [5]. Sa composition est la suivante : amidon : 15 g/l, peptone de soja A3 : 12 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  : 2 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 0.6 g/l, TE : 1 ml/l, où TE sont des éléments en trace :  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 1 g/l,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  : 1 g/l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 1 g/l,  $\text{CaCl}_2$  : 1 g/l.

Toutes les fermentations ont été menées à  $28^{\circ}\text{C}$  et avec une surpression de 25 kPa. Le pH est régulé à 8. L'aération se faisait avec un débit fixe de 1 vvm (c'est-à-dire 1 volume d'air par volume de fermenteur et par minute, soit 5 litres par minute).

La croissance des micro-organismes est mesurée par le poids sec.

Le fermenteur utilisé pour l'ensemble des expériences est une cuve à agitation mécanique de 5 litres utiles (Biostat ED, B. Braun, Melsungen, Allemagne). Son rapport hauteur/diamètre est de 2:1, son diamètre  $D$  est de 0.147 m. Il est équipé de trois mobiles d'agitation identiques montés sur le même axe. Deux types de mobiles ont été utilisés, qui se différencient par leur géométrie et les schémas d'écoulement qu'ils engendrent dans la cuve : des turbines Rushton (écoulement radial, diamètre  $d = 0.056$  m, Figure 1) et des Intermig (écoulement axial-radial,  $d = 0.102$  m, Figure 2).

Les deux mobiles ayant des diamètres très différents, nous avons choisi comme variable de référence (c'est-à-dire qui aura une valeur identique pour les deux mobiles) la vitesse périphérique des pales. La vitesse de cisaillement maximale lui est proportionnelle, et c'est le facteur le plus utilisé pour caractériser l'influence du stress hydrodynamique [6]. Le Tableau I reprend les conditions d'agitation.

Turbines Rushton ( $d = 0.056$ m)	Intermig ( $d = 0.102$ m)	Vitesse périphérique
300 rpm ( $5 \text{ s}^{-1}$ )	165 rpm ( $2.75 \text{ s}^{-1}$ )*	0.88 m/s
450 rpm ( $7.5 \text{ s}^{-1}$ )	247 rpm ( $4.12 \text{ s}^{-1}$ )	1.32 m/s
600 rpm ( $10 \text{ s}^{-1}$ )	329 rpm ( $5.48 \text{ s}^{-1}$ )	1.76 m/s
900 rpm ( $15 \text{ s}^{-1}$ )	494 rpm ( $8.23 \text{ s}^{-1}$ )*	2.64 m/s

\*uniquement pour l'étude hydrodynamique – pas de fermentation à ces vitesses avec les Intermig

Tableau I – Conditions expérimentales.

## 2. HYDRODYNAMIQUE

L'étude de l'hydrodynamique a été faite selon la méthodologie des essais de traceurs. Le traceur colorimétrique est la rhodamine wt. L'absorbance est mesurée à 550 nm par un spectrophotomètre (Metrohm 662).

La puissance dissipée a été mesurée via la mesure du couple exercé sur l'axe de rotation.

L'intensité de mélange a été évaluée par le temps de mélange à 95%, noté  $\theta_m$  [7].

Les mesures ont été faites dans un milieu artificiel transparent reproduisant les caractéristiques rhéologiques des fermentations. Ces dernières se caractérisent par un comportement non-newtonien de type rhéofluidifiant. Une solution de xanthane à 1.25 g/l permet d'obtenir une viscosité proche de celles des fermentations à la fin de la phase de croissance. Nous y avons également ajouté les mêmes

sels que dans le milieu de culture (même concentration) pour obtenir un liquide non coalescent. La viscosité est modélisée par une loi en puissance dont les paramètres valent : index de consistance  $K = 0.17 \text{ Pa.s}^n$  et index de comportement  $n = 0.4$  (-).

## 3. MORPHOLOGIE

Des échantillons sont prélevés lors des fermentations à la fin de la phase de croissance lorsque la concentration en oxygène dissous est à sa valeur minimum. Les échantillons sont colorés (violet cristallisé) et fixés sur des lames de microscope.

Les images sont digitalisées pour pouvoir les traiter au moyen d'un logiciel d'analyse d'images (Visilog5, Noesis, France). Nous avons développé un algorithme qui permet une caractérisation entièrement automatique de la morphologie des objets, quelles que soient leur forme et leur taille. Les bactéries filamenteuses peuvent en effet se présenter sous différentes formes : filaments, enchevêtrement et pelotes avec un cœur plein (Figure 3). Dans les conditions de nos fermentations, *Actinomadura* R39 se développe essentiellement sous forme d'enchevêtrements et de pelotes. Nous les désignerons par "pelotes" pour plus de simplicité.

Parmi les paramètres morphologiques, notre attention s'est essentiellement portée sur l'aire des pelotes ( $\text{mm}^2$ ), leur périmètre (mm), les diamètres de Féret maximum et minimum (mm) (longueur et largeur d'un rectangle dans lequel l'objet s'inscrit complètement, pris selon différentes orientations), le nombre de trous (-), ainsi que la circularité (-) (facteur de forme comparant l'objet à un disque plein, pour lequel la circularité vaut 1) :

$$\text{circularité} = \frac{\text{périmètre}^2}{4 \pi \text{ aire}} \quad (1)$$

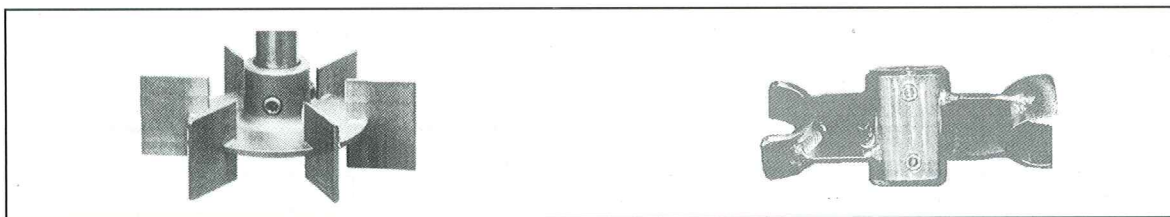


Figure 1 – Turbine Rushton.

Figure 2 – Intermig.

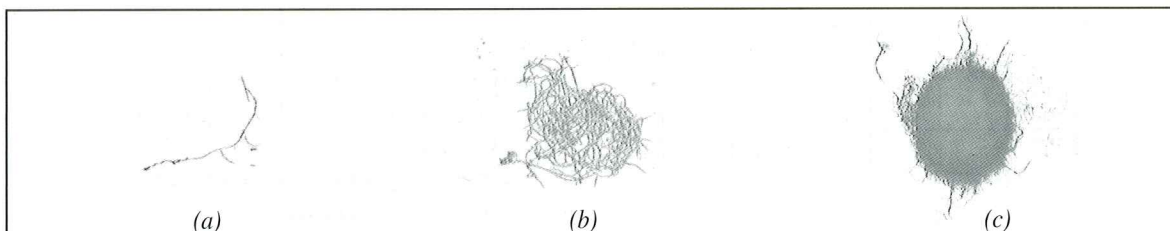


Figure 3 : Différentes morphologies d'*Actinomadura* R39 : (a) filament, (b) enchevêtrement, (c) pelote (grossissement 10 ×)

## RÉSULTATS

## 1. INFLUENCE DE L'HYDRODYNAMIQUE SUR LA CROISSANCE

On n'observe pas d'influence significative de la concentration en oxygène dissous, de la vitesse d'agitation ou de la nature du mobile. Dès lors, toute modification de la morphologie devrait refléter l'action des contraintes mécaniques induites par l'hydrodynamique.

## 2. PUISSANCE DISSIPÉE

Les mesures de la puissance dissipée nous ont permis de calculer les nombres de puissance des deux types de mobiles, sans aération ( $Np$ ) et avec aération à 5 l/min ( $Npg$ ). Ils valent respectivement (pour 3 mobiles sur le même axe) :

- Turbines Rushton :  $Np = 15.3 (\pm 0.3)$  et  $Npg = 7.9 (\pm 0.4)$
- Intermig :  $Np = 2.3 (\pm 0.1)$  et  $Npg = 1.3 (\pm 0.1)$ .

Ces mesures sont cohérentes avec les valeurs trouvées dans la littérature (en mode non aéré : 14.7 et 0.84 pour respectivement les turbines Rushton et les Intermig, [7] [8] [9]) et soulignent les différences existant au niveau des propriétés dissipatives de ces mobiles.

## 3. ESSAIS DE TRACEUR

La Figure 4 montre les résultats enregistrés pour les essais de traceur avec les deux mobiles aux différentes vitesses de rotation.

Quel que soit le mobile, la réponse du système se rapproche de la fonction échelon (mélange parfait) lorsqu'on augmente la vitesse de rotation. Toutefois, cet état n'est pas atteignable et on tend en fait vers une asymptote : au-delà de ce point, tout apport supplémentaire d'énergie est dissipé en chaleur sans être utilisé pour le mélange et n'améliore donc pas les performances.

À vitesse périphérique ou à vitesse d'agitation égale, les

turbines Rushton ont une capacité de mélange supérieure à celle des Intermig. Cette différence diminue avec l'augmentation de la vitesse de rotation pour devenir quasi inexistante à 900 rpm (pour les turbines Rushton) ou 494 rpm (pour les Intermig)

## 4. MODÉLISATION DU FERMENTEUR

Les essais de traceur sont exploités pour représenter les écoulements dans le fermenteur par un modèle compartimenté. Les paramètres sont le flux de pompage,  $fp$  ( $m^3/s$ ), entre les 8 compartiments que comporte le modèle, et le diamètre des compartiments représentant la zone des mobiles,  $dz$  (m) (Figure 5a). Cette figure montre également la correspondance géométrique entre le fermenteur et le modèle compartimenté.

La modélisation se fait par ajustement de la courbe-réponse de la cuve n°6 (c6) sur l'essai de traceur. L'allure des courbes-réponses calculées par le modèle dans les différents compartiments de la zone périphérique (c4, c5 et c6, Figure 5b) est en accord avec des mesures effectuées par Nienow dans une cuve à plusieurs turbines Rushton [10]. Les dissemblances des réponses selon l'étage du modèle (ou de la cuve) indiquent l'importance de la position des sondes lors de ce type de mesure.

Le flux de pompage  $fp$  augmente de plus en plus lentement avec la vitesse d'agitation (exposant < 1). Ceci rejoint nos observations lors de l'examen des essais de traceurs où le système tendait asymptotiquement vers une vitesse de mélange finie (et non pas infinie) (voir la Figure 4). On peut réunir les points obtenus avec les deux types de mobiles, sans aération et avec aération au débit de 5 l/min, en une seule corrélation :

$$fp = 0.0002 N^{0.8} \quad (2)$$

où  $fp$  est le flux de pompage ( $m^3/s$ ), et  $N$  la vitesse de rotation du mobile ( $s^{-1}$ ) (Figure 6).

Le diamètre des compartiments de la zone des mobiles est

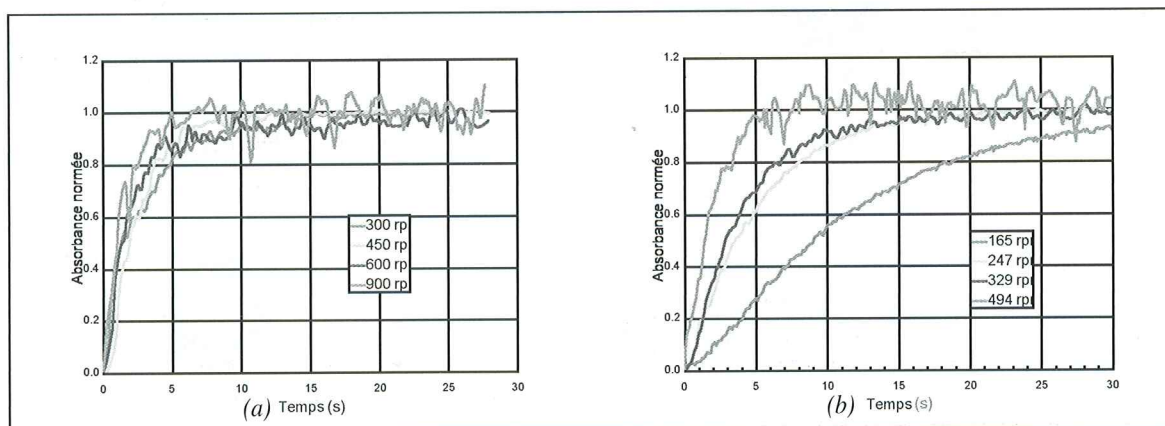


Figure 4 : Essais de traceur en fonction de la vitesse d'agitation  $N$  : (a) turbines Rushton ; (b) Intermig.

indépendant des conditions d'agitation et vaut :  $dz = 0.073 \text{ m}$  ( $\pm 0.008\text{m}$ ) (dans les limites de confiance à 95% : LC95%) (Figure 7). Il semble qu'il corresponde au diamètre de la zone critique de l'agitateur où a lieu la plus grande dissipation d'énergie spécifique. Selon Norwood et Metzner [11], la quasi-totalité du mélange se passe dans un petit volume parfaitement mélangé près du mobile, et l'écoulement dans le reste de la cuve sert essentiellement à ramener le fluide dans cette zone de l'agitateur.

5. TEMPS DE MÉLANGE

Le temps de mélange  $\theta_m$  diminue logiquement avec la vitesse d'agitation. On peut réunir les mesures effectuées avec les turbines Rushton et les Intermig (y compris en conditions aérées) par une loi en puissance comportant un terme indépendant (qui permet de prendre en compte

l'existence d'une valeur asymptotique minimale du temps de mélange ainsi que rencontrée lors des expériences) (Figure 8).

$$\theta_m (s) = 369 * N^{-2.5} + 4.6 \quad (3)$$

où  $\theta_m$  est le temps de mélange à 95% (s) et  $N$  la vitesse d'agitation ( $s^{-1}$ ). Cette relation a une allure similaire à celle proposée par Ryzski [12].

Le temps de mélange est corrélé à l'inverse du paramètre représentant le pompage dans le modèle,  $1/fp$ , indépendamment du type de mobile utilisé (Figure 9).

Le temps de mélange étant proportionnel au temps de circulation, qui est lui-même inversement proportionnel au débit de pompage [13], l'établissement d'une corrélation entre  $\theta_m$  et  $1/fp$  est cohérente avec le concept que recouvre de ce

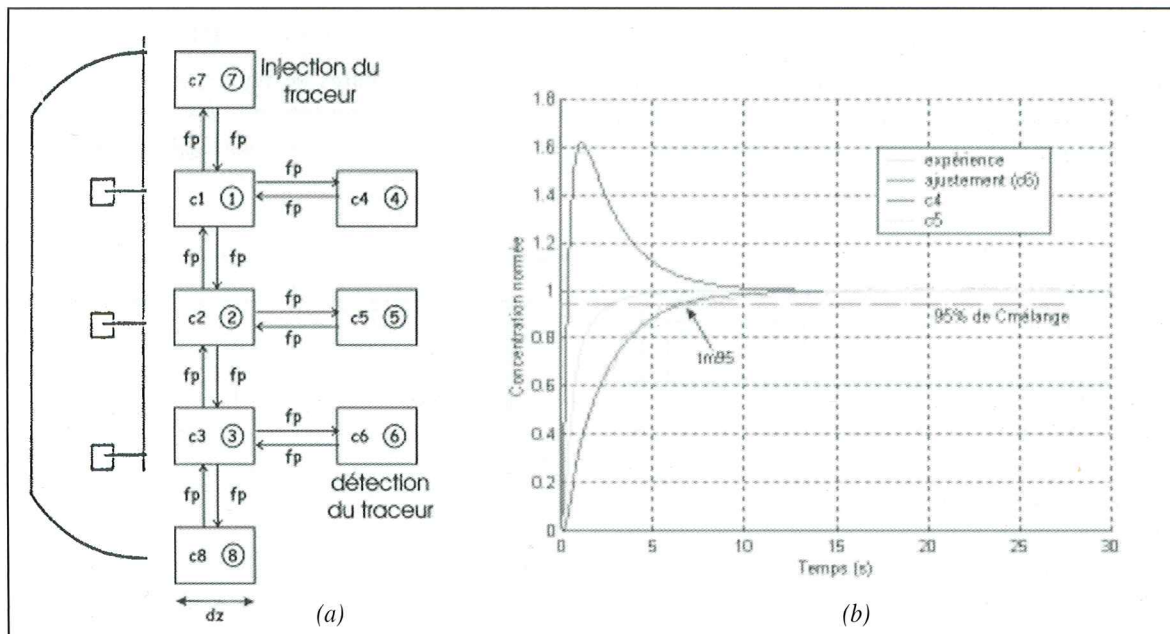


Figure 5 : (a) modèle compartimenté et correspondance géométrique avec le fermenteur ; (b) courbes réponses ajustées dans les cuves et comparaison avec l'expérience.

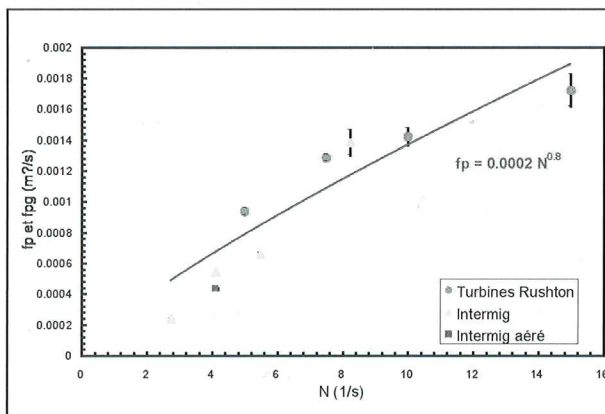


Figure 6 – fp en fonction de N.

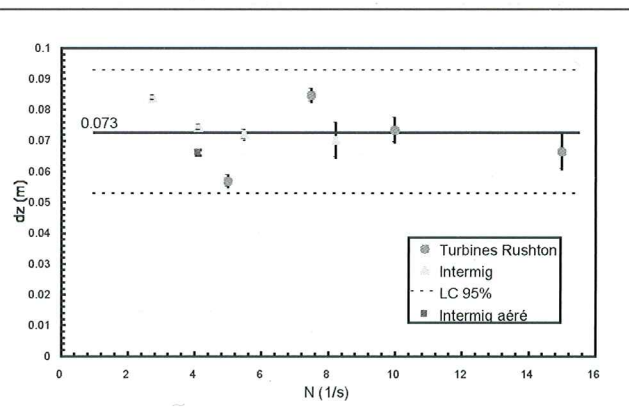


Figure 7 – dz en fonction de N.

paramètre (flux de pompage entre les compartiments) et valide la signification physique du modèle.

6. MORPHOLOGIE

Le but de cette partie du travail est de trouver le(s) paramètre(s) permettant de réunir les résultats des turbines Rushton et des Intermig en une seule corrélation, en utilisant des grandeurs caractéristiques de la forme  $N^a d^b$ . Une analyse plus détaillée des résultats est présentée dans la thèse de doctorat de S. Gros Lambert (ainsi qu'une description de l'algorithme d'analyse d'images) [14].

6.1. Aire des pelotes et diamètres de Féret

L'aire des pelotes (Figure 10) et les diamètres de Féret minimum et maximum (Figure 11) diminuent lorsque la vitesse d'agitation augmente. À la même vitesse d'agitation, les pelotes formées avec les Intermig sont de plus petite taille que celles obtenues avec les turbines Rushton.

L'aire et les diamètres de Féret (minimum et maximum) sont liés à  $N^3 d^5$ , correspondant au rapport  $P/Np$  par définition du nombre de puissance (à la densité près) ( $P$  étant la puissance dissipée en  $W$ , et  $Np$  le nombre de pompage des mobiles), et à  $fp^3 d^5$  (non illustré).

6.2. Rapport des diamètres de Féret

Le rapport de diamètres de Féret minimum et maximum est constant et indépendant des conditions d'agitation. Il vaut  $0.59 (\pm 0.02)$  (Figure 12).

6.3. Densité de trous

La densité de trous (c'est-à-dire le nombre de trous par  $mm^2$ ) est également indépendante des conditions de culture (Figure 13). Elle est de l'ordre de  $5500$  trous/ $mm^2$  ( $5465 \pm 602$  trous/ $mm^2$ ).

6.4. Circularité

La circularité est corrélée à la vitesse périphérique  $Nd$  (Figure 14), à la puissance  $P$  (Figure 15), et à  $fp d$  (non illustré). Étant donné que la densité de trous ne varie pas avec les conditions d'agitation, cette diminution indique une modification du périmètre extérieur de la pelote. Les pelotes deviennent plus "lisses", moins "chevelues".

DISCUSSION

L'aire et les diamètres de Féret (minimum et maximum) sont reliés à  $N^3 d^5$ , correspondant au rapport  $P/Np$ . Ces quantités sont des caractéristiques globales de l'hydrodynamique.

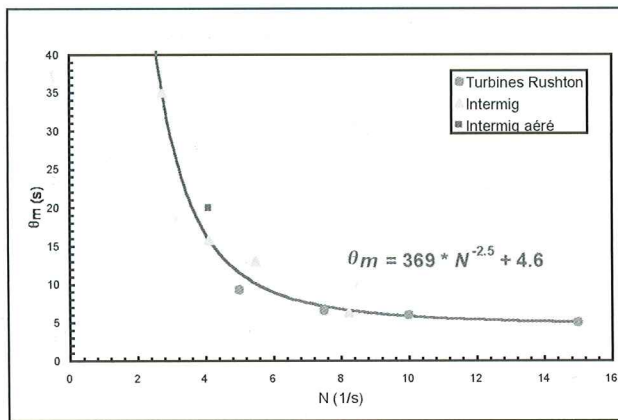


Figure 8 –  $\theta_m$  en fonction de  $N$ .

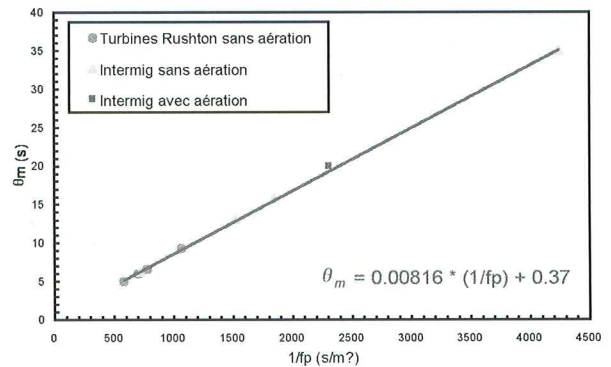


Figure 9 –  $\theta_m$  en fonction de  $1/fp$ .

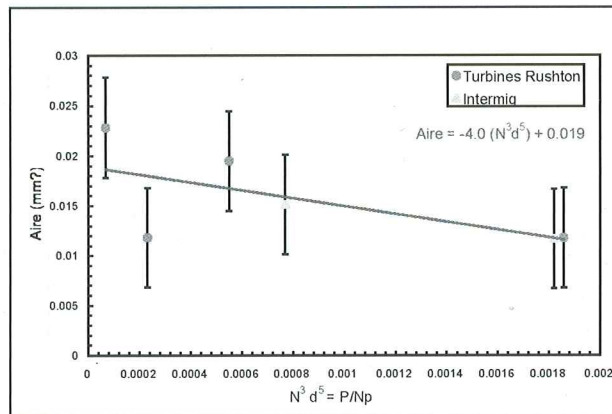


Figure 10 – Aire versus  $N^3 d^5 (=P/Np)$ .

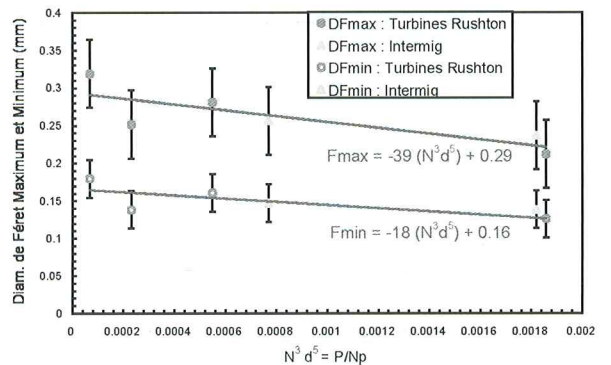


Figure 11 – Diamètres de Féret min. et max. versus  $N^3 d^5 (=P/Np)$ .

mique du fermenteur. Le rapport  $P/Np$  indique que non seulement la puissance est un facteur important, mais aussi la façon dont le mobile la dissipe dans le milieu. Les turbines Rushton sont des mobiles à grand nombre de puissance ( $Np = 15.3$ ) alors que les Intermig ont un nombre de puissance beaucoup plus faible ( $Np = 2.3$ ).

La circularité est corrélée à la vitesse périphérique  $Nd$ , à la puissance  $P$ , et à  $fp d$ . Ces grandeurs sont liées à des caractéristiques locales de l'hydrodynamique du fermenteur (à savoir la vitesse de cisaillement maximale). Le rapport de diamètres de Féret minimum et maximum est constant et indépendant des conditions d'agitation. Il vaut 0.59. La densité de trous (c'est-à-dire le nombre de trous par  $mm^2$ ) est également indépendante des conditions de culture. Elle est de l'ordre de 5500 trous/ $mm^2$ . Les relations développées dans ce travail s'appliquent de façon pertinente à des mobiles de deux types (turbines Rushton et Intermig) qui induisent des schémas d'écoulement très différents dans la cuve.

## CONCLUSIONS

Au-delà des résultats s'appliquant à une souche spécifique (*Actinomadura* R39), ce travail propose une méthodologie générale pour étudier l'influence des conditions de mélange

sur la morphologie d'une bactérie filamenteuse. Cette morphologie reflète l'influence complexe et à plusieurs échelles de l'hydrodynamique. Durant leur croissance, les micro-organismes font l'intégration à la fois spatiale et temporelle des fluctuations des conditions hydrodynamiques régnant dans le fermenteur. Ce travail valide également la pertinence de la signification physique des modèles compartimentés pour décrire l'écoulement dans un fermenteur à cuve agitée.

## RÉFÉRENCES

- [1] CHARLES M., Technical aspects of the rheological properties of microbial cultures, *Adv. Biochem. Eng.*, **8**, (1978), 1-62.
- [2] KAWASE Y. and MOO-YOUNG M., Mixing time in bioreactors. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **44**, (1989), 63-75.
- [3] NIENOW A.W., Hydrodynamics of stirred bioreactors. *Appl. Mech. Rev.*, **51**, (1998), 3-32.
- [4] JUSTEN P.; PAUL G.C.; NIENOW A.W. and THOMAS C.R. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology and Bioengineering*, **52**, (1996), 672-684.
- [5] MURPHY T.D. Design and analysis of industrial experiments. *Chem. Eng. Sci.*, **6**, (1977), 168-182.

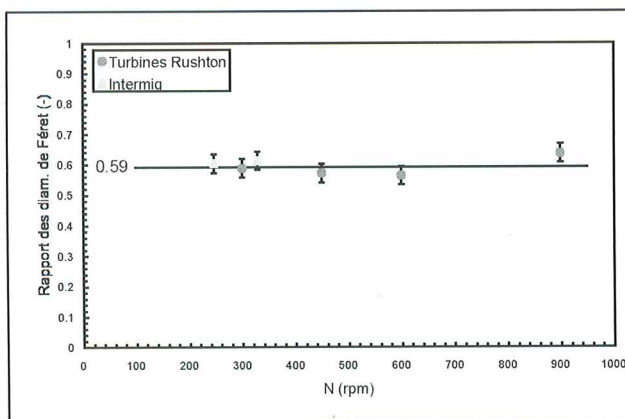


Figure 12 – Rapport des diamètres de Féret versus  $N$ .

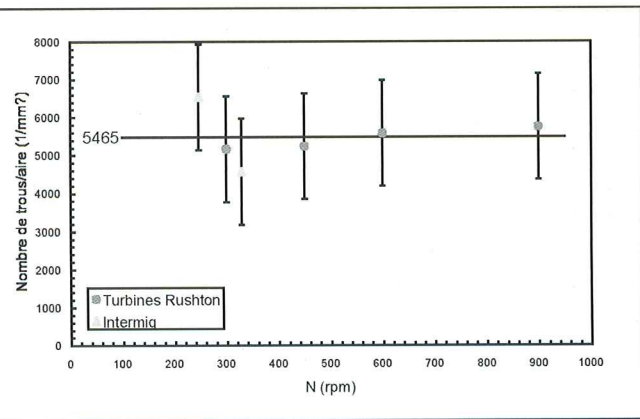


Figure 13 – Densité de trous versus  $N$ .

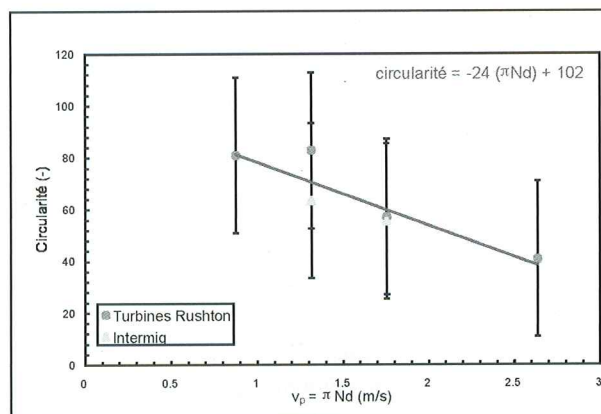


Figure 14 – Circularité versus la vitesse périphérique.

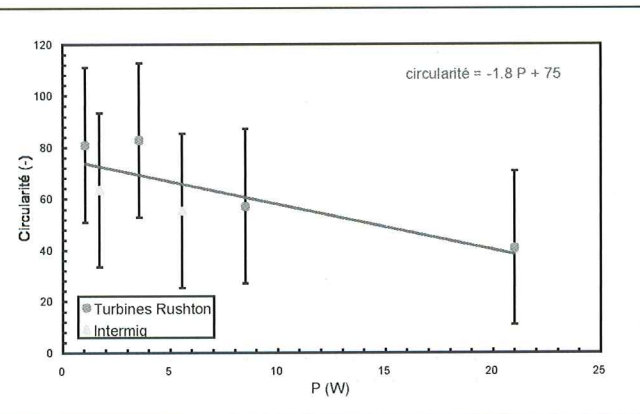


Figure 15 – Circularité versus la puissance.

- [6] REUSS M. Influence of mechanical stress on the growth of *Rhizopus nigricans* in stirred bioreactors. *Chem. Eng. Technol.*, **11**, (1988), 178-187.
- [7] VAN'T RIET K. and TRAMPER J., *Basic Bioreactor Design*, Marcel Dekker Inc., New York (1991).
- [8] DUNN, I.J. and HEINZLE, E. "Types of understanding in scaling down and up, as illustrated with an oxygen sensitive-culture". *Proceedings of the International Symposium on Bioreactor Performance*, Helsingor, Denmark, (1993), 189-203.
- [9] *Ekato Handbook of Mixing Technology*, publié par Ekato Rühr-und Mischtechnik GmbH, Schopfheim, Allemagne (1991).
- [10] NIENOW A.W. Hydrodynamics of stirred bioreactors. *Appl. Mech. Rev.*, **51**, (1998), 3-32.
- [11] NORWOOD K.W. and METZNER B., Flow patterns and mixing rates in agitated vessels. *AIChE J.*, **6**, (1960), 432-437.
- [12] RZYSKI E., Liquid homogenization in agitated tanks. *Chem. Eng. Technol.*, **16**, (1993), 229-233.
- [13] NIENOW A.W., Gas dispersion performance in a fermenter operation. *Chem. Eng. Prog.*, February, (1990), 62-71.
- [14] S. GROSLAMBERT, *Influence de l'hydrodynamique sur la morphologie d'une bactérie filamenteuse dans un fermenteur à cuve agitée mécaniquement*, Thèse de Doctorat en Sciences Appliquées, Université de Liège, Belgique (2001).