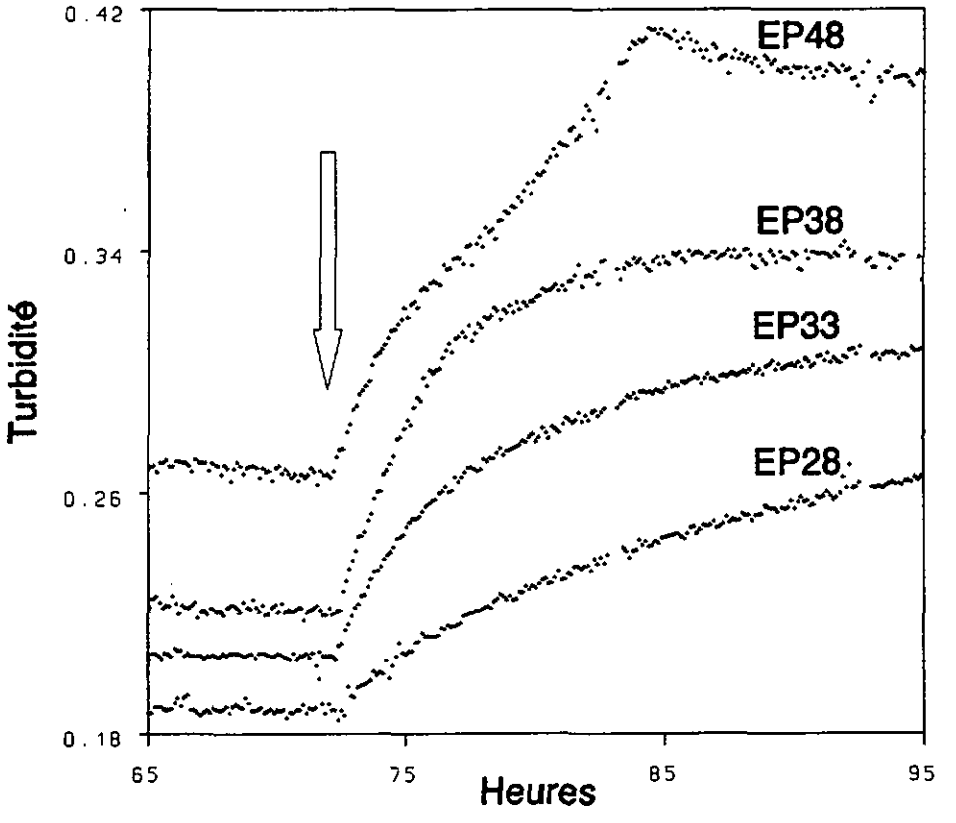
1283

DESCRIPTION RAISONNEE DE LA DYNAMIQUE DES TRANSITIONS D'UNE POPULATION DE MICROORGANISMES EN CULTURE CONTINUE

-

CROISSANCE HETEROTROPHE ET AUTOTROPHE D'*AQUASPIRILLUM AUTOTROPHICUM*



Marco Pagni
Laboratoire de Microbiologie
Université de Neuchâtel

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Description raisonnée de la dynamique des transitions d'une population de microorganismes en culture continue - Croissance hétérotrophe et autotrophe d'*Aquaspirillum autotrophicum*

de M. Marco Pagni

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

Messieurs M. Aragno, O. Besson, Th. Egli (EAWAG Dübendorf) et J.P. Flandrois (Lyon)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 5 mai 1995

Le doyen:

H.-H. Nägeli

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
Matériel et méthodes	11
Le pH	15
Les gaz	23
Bases théoriques I: définitions et généralités	39
Bases théoriques II: les transitions	44
Bases théoriques III: compléments	59
La croissance exponentielle hétérotrophe	66
La croissance stationnaire et les transitions limitées en hétérotrophie	70
Les transitions non-limitées en hétérotrophie	77
La croissance autotrophe	87
Discussion I: les modèles non-structurés	101
Discussion II: un modèle compartimental	103
Discussion III: croissances limitée et non-limitée	108
Discussion IV: aspects écophysiologiques	110
Conclusions	115
Littérature citee	118

ANNEXES

Listes des symboles utilisés	1
Les mini-fermenteurs	6
Predicting the kinetics of substrate-limited transitions in continuous culture using steady-state data: the case of *Aquaspirillum autotrophicum* limited by pyruvate	24
Linear growth and poly(ß-hydroxybutyrate) synthesis in response to pulse-wise addition of the growth-limiting substrate to steady-state heterotrophic continuous cultures of *Aquaspirillum autotrophicum*	58

INTRODUCTION

Ce travail porte sur la physiologie et la dynamique de la croissance microbienne dans l'"environnement" de la culture continue et tente d'établir une description raisonnée de la croissance d'*Aquaspirillum autotrophicum*.

Physiologie microbienne. L'organisme que nous avons étudié expérimentalement est l'hydrogénobactérie autotrophe facultative, *Aquaspirillum autotrophicum*, un spirille mobile strictement aérobie. Il est capable de croître avec un métabolisme organohétérotrophe aux dépens de certains substrats organiques (acides organiques). Il peut aussi réaliser une croissance autotrophe en oxydant certains donneurs d'électrons (hydrogène, formiate) et en fixant le gaz carbonique par le cycle de Calvin (Aragno & Schlegel, 1978 a & b). *A. autotrophicum* est également capable de métabolisme mixotrophe, c'est-à-dire d'utiliser simultanément un substrat organique et un donneur d'électrons, et, suivant les conditions, de fixer le gaz carbonique. Les enzymes clés du métabolisme autotrophe d'*A. autotrophicum* ne sont généralement induits qu'en présence d'un donneur d'électrons et si la source de carbone organique est limitative (Fasnacht, 1988). Notre organisme se distingue par là d'*Alcaligenes eutrophus*, la plus étudiée des hydrogénobactéries, qui exprime certains des enzymes de l'autotrophie (hydrogénases) même en l'absence du donneur d'électrons.

Les cultures liquides d'*A. autotrophicum* sont parfaitement homogènes, c'est-à-dire dépourvues d'agrégat ou de floc; elles ne forment pas de dépôts sur les parois des récipients de culture et, qui plus est, ne moussent jamais. Toutes ces "qualités" simplifient grandement le travail analytique et en font un organisme de choix pour l'étude quantitative de la croissance en milieu liquide.

Mireille Fasnacht (1988) a étudié un certain nombre de situations de croissance en fermenteur, et s'est surtout intéressée aux transitions d'un mode de croissance hétérotrophe à des modes de croissance mixotrophe. Elle a centré son approche sur les cinétiques d'induction de deux enzymes clés de l'autotrophie: la ribulose-bis-phosphate-carboxylase et l'hydrogénase. Nous avions alors utilisé ces résultats pour élaborer un modèle mathématique

de la croissance, qui incluait aussi bien l'hétérotrophie et l'autotrophie que la mixotrophie (Pagni, 1986).

Afin de poursuivre ces travaux sur la physiologie de la croissance d'*Aquaspirillum autotrophicum*, un certain nombre de points fondamentaux nous ont semblé devoir être mieux étudiés, en particulier, la description quantitative des croissances hétérotrophe limitée par le substrat organique et autotrophe limitée par l'hydrogène. Sans ces connaissances de base, on ne peut que difficilement envisager l'interprétation quantitative du métabolisme mixotrophe limité par l'énergie, et c'est dans cette perspective que s'inscrit ce travail, même si, finalement, il n'y sera jamais question de mixotrophie. Si la croissance hétérotrophe des microorganismes est fort bien connue, il n'en va pas de même de la croissance autotrophe limitée par l'hydrogène, qui n'a été que rarement étudiée quantitativement (Probst, 1980).

Cependant, la physiologie cellulaire ne constituera qu'une part restreinte de ce travail, qui se concentrera avant tout sur un autre aspect de la physiologie de la croissance, plus en rapport avec l'écologie, à savoir la description des dynamiques de croissance à taux non-constant. Une comparaison succincte des conditions de croissance telles qu'on peut les supposer exister dans les environnements "naturels" et telles qu'elles sont réalisées au laboratoire permettra de mieux situer l'intérêt écologique du problème.

La nature et le laboratoire. Dans leurs environnements "naturels", les microorganismes sont soumis à des conditions de croissance qui fluctuent dans l'espace et dans le temps. La plupart des milieux "naturels" sont hétérogènes (par exemple, un compost). Ils sont parcourus par des flux de matière et les nutriments essentiels à la croissance des microorganismes leur parviennent par diffusion, en général sur de courtes distances (de la surface d'une autre cellule), mais parfois également là où se rencontrent des gradients de diffusion opposés sur de grandes distances (chémocline d'un étang). Les apports de nutriments dans les milieux "naturels" sont soumis à différentes périodicités, par exemple, aux rythmes circadiens. Ceux-ci déterminent la croissance des organismes photosynthétiques, et ces rythmes doivent se propager dans toute la chaîne trophique. D'autres sources de périodicité existent, comme les cycles annuels, les cycles tidaux dans les environnements marins ou encore la fréquence des repas d'un animal pour la flore microbienne qu'il héberge. Enfin, des apports "accidentels" de nutriment peuvent se produire à tout moment, venant profondément bouleverser les conditions de croissance; il n'y a qu'à songer aux modifications que doit provoquer une chute

de pluie sur la physico-chimie d'un sol. La croissance dans un environnement hétérogène, soumis à des fluctuations périodiques et sujet à de fréquents bouleversements, est certainement la règle dans la plupart des environnements "naturels". Les grandes masses d'eau océaniques constituent certainement une exception.

En laboratoire, il est d'usage de cultiver les microorganismes dans des environnements où l'on cherche à minimiser les perturbations extérieures. Pour le physiologiste de la croissance, la culture en fermenteur est un outil qui lui offre la possibilité de contrôler et de mesurer l'ensemble des flux traversant une culture homogène. L'opération des fermenteurs en mode continu (culture continue) conduit à l'obtention du chémostat, dans lequel l'analyse de la croissance est grandement facilitée puisque le taux de croissance est choisi et maintenu constant par l'expérimentateur. Bien que des cultures homogènes croissant à taux constant soient peu représentatives des environnements "naturels", ces techniques ont apporté d'intéressantes contributions à l'écologie microbienne (Veldekamp, 1977).

Dans la pratique, la culture "batch" permet l'étude de la croissance non-limitée à un taux dit "maximal", le chémostat permet d'ajuster le taux de croissance entre 5 et 95% de ce taux "maximal" et le fermenteur à recyclage de biomasse permet d'observer des taux de croissance bien plus faibles, jusqu'à 0.1% du taux "maximal". Ces dernières années, de nombreuses études ont porté sur le fermenteur à recyclage de biomasse. Elles ont révélé de nouveaux aspects de la physiologie de la croissance, en particulier la "stringent response" (van Verseveld et al., 1984 & 1986; Bryers, 1988; Bulthuis et al., 1989; Chesbro et al. 1990). Il ne sera cependant jamais question ici de ces "très faibles" taux de croissance et des phénomènes qui s'y manifestent; au demeurant, nous considérerons une large fourchette de taux de croissance: de "faible" à "maximal".

A ce jour, l'emploi de cultures liquides homogènes demeure un excellent moyen d'investigation quantitative de la croissance microbienne et l'on s'y restreindra. Toutefois, en faisant varier les conditions de culture dans le temps, on abordera un domaine mal connu qui est celui des transitions en culture continue, auxquelles ce travail est consacré. Les transitions les plus simples à envisager sont les suivantes: en partant d'une culture continue à l'état stationnaire, on peut modifier ponctuellement un des paramètres du système et suivre la dynamique de la transition qui s'ensuit vers un nouvel état stationnaire. Cette façon de procéder est une sorte de compromis entre les conditions "optimales" de la culture en

laboratoire et les conditions "naturelles", où l'existence d'états stationnaires est improbable. Mais les problèmes tant expérimentaux que théoriques sont énormes dès que l'on abandonne la condition de stationnarité, et le fait de disposer d'un attracteur stable vers lequel le système doit retourner constitue une simplification bienvenue.

Approches expérimentales. Il y a différentes façons de concevoir l'étude expérimentale des transitions. Nous avons choisi de privilégier la fréquence et la précision des mesures, plutôt que de maximiser le nombre de paramètres mesurés. Pour décrire raisonnablement une portion d'un signal expérimental, c'est-à-dire déterminer sa valeur moyenne, sa pente, et le signe de sa courbure, il faut au minimum 3 mesures et en pratique 5 ou 6 du fait des imprécisions expérimentales. Par conséquent, si l'on désire observer des phénomènes qui se déroulent durant une heure, il faut échantillonner les cultures à une fréquence au moins égale à six fois par heure. L'automatisation des mesures est alors la meilleure méthode applicable dans la pratique et cette méthodologie est parvenue à la portée d'un petit laboratoire comme le nôtre depuis l'avènement de la micro-informatique. Nous avons entrepris la construction d'une installation de six fermenteurs fonctionnant en parallèle, dans laquelle les mesures de la turbidité, du pH et de l'oxygène dissous ont été complètement automatisées. Il faut bien constater qu'entre la conception de cette installation et le moment où la présente introduction a été rédigée, plusieurs fermenteurs munis de système d'acquisition de données automatisée sont apparus sur le marché. Cependant, la mesure de la turbidité que nous présentons s'est révélée d'une grande fiabilité et n'a pas encore, à notre connaissance, d'équivalent commercial.

Probablement en raison de l'apparition récente de la micro-informatique et des difficultés techniques liées à l'automatisation de la mesure directe de la biomasse, nous n'avons trouvé aucune publication rapportant une étude systématique des transitions "simples" en culture continue. D'après un article de Mateles et al. (1965), il semblerait qu'une recherche systématique ait été effectuée chez *Escherichia coli*, et qu'elle soit présentée dans les thèses de doctorat de T. Yasuda et de J. Sinclair, (M.I.T, 1964), que nous n'avons malheureusement pas réussi à nous procurer. Ces auteurs ont cependant utilisé une mesure très indirecte de la biomasse durant les transitions: la consommation d'ammonium.

Comby (1989) a effectué un travail de doctorat consacré aux cinétiques de croissance en "batch" de différents organismes en présence de concentrations subinhibitrices d'antibiotique.

Ce travail porte autant sur des cinétiques expérimentales de croissance mesurées automatiquement que sur une revue des modèles existants, et procède donc du même type de démarche que celle entreprise ici. Cependant, force est de constater, que les problématiques soulevées par la description raisonnée des croissances en "batch" et en culture continue sont bien différentes.

Description et modélisation. Les comportements transitoires d'une population de microorganismes placée dans un système ouvert sont difficiles à appréhender et souvent contre-intuitifs. Quoi qu'il en soit, la dynamique de la croissance microbienne est impossible à comprendre sans recourir à des modèles mathématiques. Et de cette nécessité découle une inexorable imbrication des considérations théoriques et des résultats expérimentaux. De plus, ce travail tente résolument de se placer à l'interface de la théorie et de l'expérience. Dans cette perspective, il faut préciser que nous allons considérer les modèles comme étant avant tout un moyen d'investigation de la physiologie. Cette attitude prend assurément le contre-pied de celle de notre précédent travail (Pagni, 1986), où nous avions tenté de formuler un modèle sur la base d'un *corpus* de données physiologiques.

On peut distinguer deux niveaux extrêmes de complexité lorsque l'on aborde la description de la dynamique d'une population de microorganismes dans une installation de culture continue. Le plus haut degré de complexité est évidemment celui du système "réel". L'étude complète de la composition d'une population de cellules et de sa variation dans le temps relève de l'utopie. Une telle approche essentiellement descriptive est forcément incomplète. On peut mettre en rapport la complexité du système réel avec celle, bien moindre, de certains énormes modèles descriptifs, qui tentent d'exprimer sous forme d'équations différentielles toutes les caractéristiques connues d'un organisme. Certains auteurs sont ainsi parvenus à considérer des systèmes de plus de 50 équations différentielles hautement non-linéaires (Moreira et al., 1979; Peretti & Bailey, 1985; Shu & Shuler, 1989). Or, de pareils modèles sont presque aussi difficiles à étudier que la réalité, sans offrir aucune garantie quant à leur bien-fondé. A notre avis, ce type d'approche est en général stérile, à quelques exceptions près (Palsson & Joshi, 1987).

A l'opposé, il existe quelques modèles élémentaires dont la complexité est minimale, et qui permettent, du moins de comprendre, parfois de décrire quantitativement certains aspects des dynamiques observées. Lorsque l'extension de la population de microorganismes, la

biomasse, est décrite par une variable unique, on parle de modèles non-structurés. Le prototype de ces modèles élémentaires est évidemment celui de Monod (1950). L'étude de ces modèles peut se faire en grande partie algébriquement, ce qui leur confère une grande "intelligibilité". On peut envisager d'aborder le problème de la description et de la modélisation de la croissance sur une base encore plus simple en apparence, à l'aide de ce que nous appellerons modèles locaux. Ces derniers sont censés décrire correctement une série de mesures, mais ne s'appliquent qu'à une portion d'expérience bien délimitée dans le temps; la croissance exponentielle non-limitée en est l'exemple le plus représentatif. Une expérience de longue durée pourrait être découpée et décrite par une série de modèles locaux, dont la succession ne devrait certainement rien laisser au hasard. Or, dans cette perspective, il nous semble qu'une question essentielle se pose: doit-on faire appel à des structures explicatives présentant des niveaux de complexité très différents en fonction des portions d'expérience considérées?

On pourrait reconnaître un niveau de complexité intermédiaire à ceux précédemment mentionnés avec l'utilisation de modèles structurés où l'on donne une structure à la biomasse et où l'on doit introduire des flux qui lui sont internes. Ces modèles sont (parfois) plus proches des observations expérimentales, et conservent généralement une base conceptuelle accessible pour peu que la biomasse ne soit pas subdivisée en un nombre trop élevé de compartiments. Malheureusement, il faut bien constater que ces modèles sont nettement plus difficiles à manipuler algébriquement et qu'il n'est pas toujours possible de faire la part du particulier et du général dans leur formulation. Enfin, l'obtention des valeurs des nombreux paramètres de ces modèles demeure le plus souvent un problème difficilement soluble.

Le problème fondamental posé par les transitions. L'étude des modèles classiques de croissance microbienne implique généralement une étude algébrique des états stationnaires et l'on doit se contenter de solutions numériques pour décrire les transitions. La plupart des modèles n'ont été sérieusement confrontés à l'expérience que pour des états stationnaires. Il pourrait en résulter qu'une partie de l'information contenue dans ces modèles n'ait jamais été confrontée à l'expérience. D'ailleurs, de nombreux auteurs ont affirmé que la dynamique des transitions ne peut être décrite qu'en prenant en compte des mécanismes plus complexes que ceux nécessaires à caractériser les états stationnaires. Par exemple, Esener et al. (1983): "*As shown, particularly by fed-batch experiments (...), the unstructured growth model developed fails to describe growth behavior during transition from the substrate unlimited to limited*

growth phase. Here, the detailed kinetics play a significant role and models allowing for changes in internal structure, i.e., structured models should be tried to describe such regions"; Ataai & Shuler (1985): "*These unstructured or simple growth models, in general, are able to predict the stead-state growth data quite well, partly due to the fact that the parameters used in the models derived from steady-state data. However, in most cases, these models are less satisfactory in predicting transient behavior, because of the oversimplified representation of the cellular component.*" et Chu & Papoustaki (1987): "*It has been demonstrated that the specific growth rate of cells in continuous culture cannot instantaneously respond to changes in substrate concentration following a perturbation in the steady-state values. (...) These observations indicate that the prediction of the dynamic behavior of the system requires a highly structured model that takes into account the interactions of the main cellular components*".

N'hésitons pas à caricaturer ces propos au moyen d'un exemple simplissime. Soit un système dynamique qui obéit à l'équation différentielle

$$\frac{dX}{dt} = -\alpha X, \quad \alpha > 0$$

et dont la solution stationnaire, unique et stable, est évidemment

$$\tilde{X} = 0.$$

Or, de la connaissance de cette solution stationnaire, il n'est pas possible de déduire ni la valeur de α, ni même la nature de la dynamique! Par analogie, bien des aspects du métabolisme microbien ne s'"exprimeraient" que durant les transitions!

Perret (1960) et Storer & Gaudy (1969), ont exprimé d'une façon différente cette préoccupation théorique. Depuis Monod, on sait qu'il existe, à l'état stationnaire du moins, une relation monotone croissante entre la concentration du substrat limitant et le taux de croissance, relation que l'on a représentée par une ligne pleine sur la figure 1. Si l'on envisage une transition d'où résultera, entre l'état initial et l'état final, un changement de taux de croissance et donc de la concentration du substrat, et si l'on envisage également la transition opposée qui ramènera le système dans son état premier, alors on pourrait observer l'apparition d'un cycle d'hystérèse, tel celui représenté sur la figure 1 par les deux courbes pointillées. Cette excellente idée n'a malheureusement pas rencontré d'intérêt parmi les

expérimentateurs et le "growth rate hysteresis" de Perret n'a jamais été ni prouvé, ni infirmé.

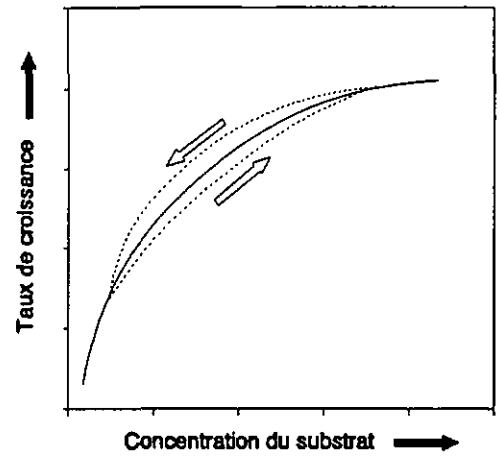


Figure 1 "Growth-rate hysteresis" d'après Perret (1960).

Quelle est la part de l'environnement et quelle est la part du métabolisme dans le déterminisme de la croissance? Un organisme placé dans un milieu adéquat finit généralement par exhiber une croissance exponentielle non-limitée, dont le taux constant est déterminé par son métabolisme (cause endogène). La fin de cette croissance non-limitée est causée par épuisement du milieu (cause exogène). Si cet exemple apparaît transparent en ce qui concerne les causalités, il n'en va pas de même durant les transitions en culture continue et nous nous efforcerons de clarifier ce point dans la partie théorique de ce travail.

Systèmes hiérarchisés. Nous renvoyons le lecteur à la littérature citée, pour une présentation formelle de ces concepts. La description de la matière par les scientifiques est subdivisée en de nombreuses disciplines qui correspondent chacune à un niveau d'organisation de cette matière (particules élémentaires, atomes, molécules, organelles, cellules, organismes, populations). Cette vision de la matière est celle d'un système hiérarchisé, où l'on reconnaît différents niveaux d'organisation, dotés d'une certaines indépendance les uns face aux autres... à en juger par les difficultés qu'éprouvent les scientifiques de disciplines différentes à communiquer entre eux. On reconnaît l'existence de hiérarchies dans des systèmes mieux circonscrits que la "matière", par exemple au sein même des réseaux métaboliques ou des populations animales (Auger, 1989). La nature de ces hiérarchies peut être structurelle ou temporelle, encore que souvent, pour un système donné, ces deux notions soient intimement liées: les processus individuels étant généralement beaucoup plus rapides que les processus collectifs.

On va tenter de situer les bornes de notre domaine d'observation dans le temps. Puisque nous sommes intéressés en premier lieu par la croissance des microorganismes, on doit considérer une échelle temporelle de référence dont l'unité correspond au temps de génération de ces organismes, soit quelques heures. Les phénomènes se déroulant à l'échelle moléculaire, avec des temps caractéristiques de réaction inférieurs à la seconde, seront certainement hors de

nos possibilités d'observation. Ces processus seront considérés comme étant toujours parvenus à un état stationnaire local (état quasi-stationnaire). De même, nous bornerons notre fenêtre d'observation, pour les plus longs temps d'observation, par l'évolution (darwinienne?) que nous ne souhaitons pas prendre en compte. En résumé, nous essayerons d'observer des phénomènes dynamiques dont les différents temps caractéristiques pourront s'échelonner sur 4 à 5 ordres de grandeur, ce qui est beaucoup. Or, justement, le concept de système hiérarchisé s'applique particulièrement bien à l'étude des systèmes dans lesquels s'observent des phénomènes dont les constantes temporelles sont échelonnées sur plusieurs ordres de grandeur.

Reich & Sel'kov (1974 & 1975) donnent deux excellentes introductions (compréhensibles de surcroît) de l'application du concept de système hierarchisé à la biochimie. D'un point de vue mathématique, la subdivision des dynamiques sur différentes échelles temporelles s'effectue avec une méthode de pertubation singulière. Le bien-fondé de cette méthode pour la classe de système d'équations qui nous intéressera, repose sur un théorème dû à Thikonov (Heineken et al. 1967). On trouvera dans ce travail quelques exemples simples de dynamique hiérarchisée que nous avons traités avec un formalisme emprunté à Reich & Sel'kov et à Dvorak & Siska (1989). Il eut été également possible (et peut-être préférable?) d'effectuer explicitement ce traitement en utilisant le formalisme des méthodes de perturbation... qui conduisent aux mêmes résultats.

Le concept de dynamique hiérarchisée a trouvé un de ses plus intéressants domaines d'application dans l'étude théorique des réseaux métaboliques. Bien qu'en dehors du cadre de ce travail, il nous semble important de citer ici une des conclusions auxquelles parviennent Heinrich & Sontag (1982): "*It is evident that real metabolic systems must generally involve a very great number of enzymes and metabolites in order to synthesize the chemical compounds which are necessary for the many biological functions of a cell. However, despite the high degree of structural complexity, metabolic systems often show a rather simple dynamic behaviour. In many cases only unique stable steady states are observed. In our opinion this discrepancy between structural and dynamic complexity may be explained by the time hierachy of large metabolic systems. (...) For all metabolic models studied in this paper the simplest dynamics are observed (...) for parameters values where the time hierarchy attains its maximal value.*". Dans le même ordre d'idée, on peut mentionner Schuster & Heinrich (1987), qui montrent que l'introduction de contraintes d'optimalité (optimality

principles) sur les voies métaboliques conduit également à une maximalisation de la hiérarchisation temporelle des processus. La glycolyse dans l'érythrocyte a été démontrée comme se conformant à cette prédiction.

Ces recherches sur les réseaux métaboliques ne sont évidemment pas directement applicables à notre problème central. Cependant, elles mettent en évidence que la complexité structurelle du métabolisme ne doit pas forcément avoir pour corollaire une grande complexité comportementale au niveau cellulaire. Nous pouvons ainsi légitimement prendre quelque distance avec l'idée que la dynamique des croissance transitoires doit être le reflet de la complexité du métabolisme microbien, et que la dynamique des transitions en culture continue n'est descriptible *a priori* qu'en considérant des modèles très complexes.

Structure du travail. Dans la mesure où les considérations théoriques et les résultats expérimentaux se complètent mutuellement et constamment, il nous a semblé préférable de les présenter conjointement, dans leur ordre "naturel" d'apparition. On commencera par décrire l'environnement des microorganismes (conception des fermenteurs, chimie acide-base du milieu de culture, physique des gaz), puis on s'intéressera à la classification des phénomènes se déroulant à l'interface milieu-biomasse (modèles de référence et classification théorique des transitions), pour aboutir à la physiologie de la croissance (description expérimentale des états stationnaires et des transitions, implications théoriques et réflexions sur quelques modèles). Deux articles, l'un soumis et l'autre publié, contiennent les principaux résultats concernant la croissance hétérotrophe. Ils sont reproduits en annexe de ce travail.

MATERIEL ET METHODES

Organisme: *Aquaspirillum autotrophicum* SA32 (souche type, NEU2012, DSM732, ATCC29984, Aragno et Schlegel 1978a) a été cultivée dans le milieu minéral de base de Schlegel (Schlegel et al., 1961; Aragno & Schlegel, 1981). La composition, les modifications, les ajouts et les propriétés de ce milieu sont exposés dans le chapitre consacré au pH. Les cultures continues ont toutes été inoculées avec des précultures fraîches cultivées dans le milieu de Schlegel avec 0.5% de pyruvate de sodium ajouté pour les expériences en hétérotrophie et 10 mM de bicarbonate de sodium sous mélange de gaz (5% O_2, 10% CO_2, 85% N_2) pour les expériences en autotrophie.

La pureté a été vérifiée une fois par jour de culture au moyen d'étalement polygonal sur NA; ainsi que par observation au microscope à contraste de phase: *A. autotrophicum* se reconnaît aisément à sa forme de spirille de petite taille.

Dispositifs de culture. Deux dispositifs de culture ont été utilisés. D'une part un Biostat S (Braun, Melsungen, RFA) dont l'équipement a été décrit précédemment (Fasnacht, 1988). Cet appareil permet l'obtention de cultures de densité élevée et est particulièrement destiné à la production de cellules en grande quantité. Mais, il n'est pas conçu pour l'observation de la dynamique des cultures durant les transitions, et c'est pourquoi, d'autre part, nous avons construit une installation de fermenteurs adaptés pour cette nouvelle tache. Cette installation de laboratoire comporte six petits fermenteurs fonctionnant en parallèle. Ces six fermenteurs sont identiques. Le milieu de culture et le mélange de gaz sont les mêmes pour toutes les cultures, qui ne diffèrent que par le taux de dilution. L'habitude a été prise de désigner cette nouvelle installation par les mini-fermenteurs quand bien même leurs volumes ne soit pas si faible (~ 1l). Une description détaillée de cette installation est donnée dans les annexes de ce travail (page 6).

Analyses: La turbidité a été mesurée manuellement avec un spectrophotomètre Zeiss PM4 à 436 nm et 1 cm de chemin optique. Sa mesure automatique a été réalisée à la même longueur d'onde avec un spectrophotomètre Philips PU8600 et une cuvette HELMA 170.004-

QS de 2 mm de chemin optique. Le principe de cette mesure automatisée est exposé en annexe. Le domaine où la turbidité est proportionnelle à la biomasse avec 2 mm de chemin optique à été établi à partir de dilution connue d'une culture batch sur le pyruvate de sodium (Lawrence & Maier, 1977) et ce domaine s'étend jusqu'à au moins 0.4 densité optique, ce qui est équivalent à une densité optique de 2 pour 1 cm de chemin optique. Tout au long des expériences, le rapport des turbidités mesurées avec chacun des deux appareils est demeuré voisin de 5 ($\pm$5%). Le chemin optique des turbidités présentées sur les figures n'a pas été mentionné à chaque fois; lorsque la fréquence des mesures est égale ou supérieure à 8 par heure, le chemin optique est de 2mm, sinon il est de 1 cm.

Le pyruvate a été dosé avec la méthode de Czok & Lamprecht (1974). Nous nous sommes rendu compte, mais un peu tard, que la concentration du pyruvate en solution est modifiée par la congélation. Elle diminue de 5% à 20% par mois de congélation. Depuis 1992, l'utilisation de cette mesure a été exclue des calculs de rendement, et nous avons utilisé les concentrations calculées lors de la fabrication des milieux de culture. En revanche, il ne semble pas que la forme des cinétiques de disparition du pyruvate en soit affectée.

Le carbone organique dissous (D.O.C.) a été déterminé au moyen d'un analyseur Xertex Dohrmann DC-180.

L'analyse élémentaire (carbone, azote, hydrogène) a été effectuée au moyen d'un CHN EA1108-Elemental analyseur (Carlo Erba Instruments).

La composition des gaz a été déterminée avec un chromatographe Gow Mac (série 552) muni d'un détecteur à conductivité thermique et de deux colonnes (Tamis moléculaire 5Å 60/80 et Carbosiev B 120/140). L'hélium a été utilisé comme gaz porteur, les paramètres de calibration ont été déterminés par l'injection de mélanges de gaz de composition connue. L'aire des pics à été calculée avec un intégrateur Hewlet Packard 3390A.

Les protéines ont été dosées avec la méthode du Biuret modifiée par Schmidt et al. (1963) pour toutes les expériences jusqu'à IP28. Depuis BP1, la méthode de l'acide bicinconinique (Smith et al. 1985) a été utilisée parce que plus sensible. L'albumine sérique de boeuf a été utilisée comme standard.

Les méthodes utilisées pour le poids sec, le poly-ß-hydroxybutyrate, les polyphosphates et les activités respiratoires ont déjà été présentées ailleurs (Pagni et al., 1992). Les techniques mises en oeuvre pour mesurer automatiquement le pH et l'oxygène dissous sont présentées en annexe.

Traitement de données. L'interpolation cubique a été utilisée pour soustraire une courbe d'une autre, lorsque ces deux courbes n'avaient pas la même répartition des points sur l'abscisse. Les splines cubiques ont été utilisés pour lisser et surtout pour estimer la pente d'un signal expérimental. En effet, lorsqu'un signal varie lentement et que la fréquence des mesures est élevée, le calcul direct de la pente sur les points expérimentaux ne met en évidence que le bruit de fond. On a vérifié systématiquement le bien-fondé des observations découlant d'un lissage en comparant les résultats obtenus en faisant varier l'intensité du lissage. En fin de compte, il nous a paru souhaitable de lisser le moins fortement possible les signaux. Ainsi les figures qui en résultent apparaissent assez bruitées, mais ne comportent probablement aucun artefact.

L'ajustement des modèles aux données expérimentales, et l'identification des valeurs de leurs paramètres, a été effectué par régression linéaire (ou poylnômiale) lorsque ces modèles consistaient en des polynômes. Dans tous les autres cas, on a procédé par régression non-linéaire (Vila, 1982; Robinson, 1985), de loin préférable aux méthodes de transformation des données pour les représenter sous forme de droite (Jolivet, 1983). La somme des carrés des résiduels a été utilisée comme critère à minimiser. Différents logiciels ont été testés et ont fournit des estimations des paramètres identiques; finalement la méthode de Gauss de la procédure NLIN du logiciel SAS a été retenue parce que procurant la plus grande palette d'estimateurs statistiques. Lorsque le but des ajustements était de trancher entre deux modèles, nous avons toujours commencé par ne considérer que les modèles pour eux-mêmes, en essayant au préalable d'ajuster un modèle sur l'autre. Cette façon de procéder donne de précieuses indications sur l'interdépendance des paramètres des deux modèles. De même, nous avons systématiquement vérifié l'unicité du minimum des moindres carrés, en fournissant initialement au second modèle les valeurs des paramètres provenant de l'ajustement par le premier, et réciproquement.

L'emploi du terme ajustement a été restreint aux seuls résultats des régressions. Le terme prédicition va qualifier toute description que l'on confronte à des données expérimentales,

mais qui provient soit de la théorie, soit d'autre données expérimentales. Il nous paraît évident qu'une prédiction moyennement satisfaisante est supérieure aux meilleurs des ajustements en ce qui concerne l'établissement de la cohérence des résultats. Nous avons restreint l'emploi du terme approximation aux résultats de calculs se basant sur des simplifications explicites, et l'emploi du terme estimation aux valeurs que l'on donne arbitrairement à certains paramètres.

LE pH

L'interprétation des signaux mesurés à l'aide des électrodes pH requiert une bonne compréhension de la chimie acide-base du milieu de culture. On commencera par rappeler comment on détermine le pH d'une solution de composition connue, pour ensuite montrer comment les variations du pH peuvent être interprétées lors de la croissance hétérotrophe.

Généralités. L'eau est un solvant qui se caractérise par sa capacité de se dissocier selon

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-,$$

réaction qui se conforme à la loi d'action de masse exprimée dans ce cas particulier par

$$[H^+]\,[OH^-] = K_e = 10^{-14}$$

où K_e est appelé produit ionique de l'eau. On définit le pH d'une solution aqueuse par

$$pH = -\log [H^+] .$$

On appelle acide, selon Brønstedt, une substance qui est capable de fournir un ou plusieurs ions H^+. De même, on appelle base toute substance capable d'accepter un ou plusieurs ions H^+. Un acide AH et une base A^- sont décrits comme un couple acide-base conjuguée s'ils participent à la réaction

$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^- .$$

Lorsque la dissociation n'est pas complète, on parle d'acide (respectivement de base) faible et l'équilibre est soumis à la loi d'action de masse

$$\frac{[H^+]\,[A^-]}{[HA]} = K_a$$

où K_a est la constante de dissociation. On introduira A_{tot}, la concentration totale de l'espèce chimique considérée

$$A_{tot} = AH + A^- .$$

Etant donnés A_{tot}, K_a et le pH connu d'une solution, on peut en déduire les concentrations respectives de l'acide et de la base

$$[AH] = \frac{[H^+]\,A_{tot}}{[H^+]+K_a} \quad \text{et} \quad [A^-] = \frac{K_a A_{tot}}{[H^+]+K_a}.$$

Ces relations se généralisent à tout couple acide-base conjuguée, quelque soient leurs charges électriques, par exemple $H_2PO_4^-$ et HPO_4^{2-}.

Le milieu de Schlegel. Le tableau suivant résume la composition du milieu de Schlegel (Schlegel et al., 1961; Aragno & Schlegel, 1981).

Composé	Poids moléculaire	Concentration finale		Remarque
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	358.14	9.0 g/l	25.1 mM	
KH_2PO_4	136.09	1.5 g/l	11.0 mM	
NH_4Cl	53.49	1.0 g/l	18.7 mM	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	249.48	0.2 g/l	0.8 mM	
$FeNH_4$Citrate	2760	5 mg/l	1.81 μM	
$CaCl_2$	147.02	10 mg/l	6.8 μM	
SL6 10X	-	1 ml/l	-	Solution d'oligo-éléments
$H_2CO_3^*$	-	?	?	$H_2CO_3^* = H_2CO_3 + CO_2(aq)$

Le pH de ce milieu minéral de base se situe entre 7.1 et 7.2. Dans le voisinage de ces valeurs, seuls trois équilibres acide-base déterminent le pouvoir tampon du milieu

$$\frac{[HPO_4^{2-}]\,[H^+]}{[H_2PO_4^-]} = K_p = 10^{-6.82}, \qquad \frac{[NH_3]\,[H^+]}{NH_4^+} = K_n = 10^{-9.25},$$

$$\frac{[HCO_3^-]\,[H^+]}{[H_2CO_3^*]} = K_c = 10^{-6.33}.$$

Il est à noter que la constante de dissociation du dihyrogénophosphate dépend de la table

consultée: $K_p = 10^{-7.21}$ dans le Handbook of Chemistry and Physics (1979); $K_p = 10^{-7.10}$ dans The Merck Index (1976) et enfin $K_p = 10^{-6.82}$ d'après Dawson et al. (1989). Cette dernière valeur a finalement été retenue car elle correspond à celle que nous avons déterminée expérimentalement au laboratoire.

Seules les espèces chimiques suivantes sont à prendre en considération aux concentrations totales

phosphates: $P_{tot} = [HPO_4^{2-}] + [H_2PO_4^-] = 0.0361$ M,
métaux: $M_{tot} = [Na^+] + [K^+] = 0.0612$ M,
ammoniaque: $N_{tot} = [NH_4^+] + [NH_3] = [Cl^-] = 0.0187$ M,
carbonate: $C_{tot} = [H_2CO_3^*] + [HCO_3^-] = ?$.

Soit la balance des charges électriques

$$[Na^+] + [K^+] + [NH_4^+] + [H^+] = [OH^-] + 2[HPO_4^{2-}] + [H_2PO_4^-] + [Cl^-] + [HCO_3^-]$$

qui peut être développée en fonction des concentrations totales, des constantes de dissociation et de $[H^+]$

$$M_{tot} + \frac{[H^+]N_{tot}}{[H^+]+K_n} + [H^+] = \frac{K_e}{[H^+]} + \frac{(2K_p + [H^+])P_{tot}}{[H^+]+K_p} + N_{tot} + \frac{K_c C_{tot}}{[H^+]+K_c}$$

et qui va servir de relation de base pour l'interprétation de l'évolution du pH dans les cultures. Nous avons vérifié expérimentalement la validité de cette expression en titrant du milieu de Schlegel par NaOH et par HCl et en simulant cette titration comme suit. La simulation de la titration par HCL se fait en rajoutant un terme chlorure (provenant de HCl) dans le membre de droite de la balance des charges électriques, en recalculant la dilution des concentrations totales due à l'addition de HCl aqueux et en résolvant numériquement

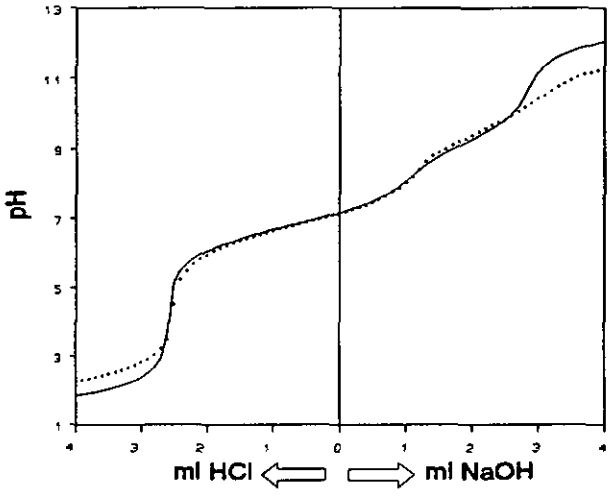


Figure 1 Titration de 100 ml de milieu minéral de base par HCl ou NaOH 1N. Expérience (+) et simulation (————).

l'équation par rapport à $[H^+]$. De même, pour la titration par NaOH, on rajoute un terme sodium (de NaOH) dans le membre de gauche. La figure 1 montre que l'adéquation de cette simulation à l'expérience est satisfaisante dans un domaine de pH allant de 5 à 9, mais pas au delà, puisque les équilibres acide-base éloignés de la neutralité n'ont pas été pris en compte. Une valeur de c_{tot} de 1.1 mM a été déterminée comme optimale lors de l'ajustement de cette équation. Cette valeur apparaît tout à fait raisonnable, puisqu'à Neuchâtel, l'eau du réseau contient environ 2 mM Ca^{2+} et 4.8 mM c_{tot} et que la fabrication de l'eau bidistillée retire le carbone inorganique sous la forme de $CaCO_3$. Il pourrait donc rester au plus 2.8 mM d'acide carbonique en solution qui ne peut s'échapper qu'en partie vers l'atmosphère du fait de la quasi étanchéité de l'appareillage de distillation.

Le magnésium. En consultant une table de produits de solubilité, il nous est apparu que le sel $MgNH_4PO_4$ est très peu soluble, son produit de solubilité valant

$$K_{PS} = 10^{-13.2}\ M^3$$

qui est bien inférieur au produit des concentrations

$$[Mg2^+][NH_4^+][PO_4^{3-}] = 10^{-11.8}\ M^3$$

déterminées pour un pH de 7.15, les réactions supplémentaires

$$HPO_4^{2-} \rightleftharpoons PO_4^{3-} + H^+ \quad \text{et} \quad Mg^{2+} + OH^- \rightleftharpoons MgOH^-$$

ayant été prises en compte dans ce calcul. Le Mg^{2+} en solution devrait donc se trouver sous une forme métastable. Or, nous avons constaté que la plupart des tentatives de modification de la composition du milieu de Schlegel se soldent par sa précipitation. Par ailleurs, une propension du magnésium à précipiter spontanément expliquerait certaines limitations de la croissance qui on été observées et qui n'ont pu être ni identifiées, ni reproduites (IP3, EP18, EP19, EP20).

Le pyruvate de sodium. L'acide pyruvique, $CH_3COCOOH$, est un acide faible dont la constante de dissociation vaut $K_a = 10^{-2.49}$ (the Merck Index, 1976) et qui est donc complètement dissocié aux pH voisins de la neutralité. L'effet de la consommation du pyruvate de sodium sur le pH va dépendre de l'efficacité de son assimilation. On admettra

que le catabolisme du pyruvate ne produit que du gaz carbonique et de l'eau; l'éventuelle excrétion de métabolites n'est pas prise en compte ici. Soit n_{pyr} le nombre d'atomes de carbone du pyruvate assimilés sous forme de biomasse de composition arbitraire $<CH_2O>$, les quatre stoechiométries suivantes montrent clairement

$n_{pyr} = 3$: $CH_3COCOONa + H_2O \rightarrow 3<CH_2O> + NaOH$

$n_{pyr} = 2$: $CH_3COCOONa + H_2O + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow 2<CH_2O> + NaHCO_3$

$n_{pyr} = 1$: $CH_3COCOONa + H_2O + \frac{3}{2}O_2 \rightarrow <CH_2O> + NaHCO_3 + H_2CO_3$

$n_{pyr} = 0$: $CH_3COCOONa + H_2O + \frac{5}{2}O_2 \rightarrow NaHCO_3 + +2H_2CO_3$

qu'une forte assimilation alcalinise le milieu (production de soude), alors qu'une faible assimilation l'acidifie (production d'acide carbonique).

La balance des charges électriques doit être complétée par l'introduction du pyruvate [Pyr$^-$] et du sodium qui lui est associé $[Na^+]_{Pyr}$, que l'on considérera séparément du sodium introduit avec les phosphates. La balance des charges électriques se récrit

$$[Na^+] + [K^+] + [NH_4^+] + [H^+] + [Na^+]_{Pyr} = [OH^-] + 2[HPO_4^{2-}] + [H_2PO_4^-] + [HCO_3^-] + [Cl^-] + [Pyr^-]$$

et peut se réarranger

$$[Na^+] + [K^+] + [NH_4^+] + [H^+] - [OH^-] - 2[HPO_4^{2-}] - [H_2PO_4^-] - [Cl^-] = [HCO_3^-] + [Pyr^-] - [Na^+]_{Pyr}$$

de façon à regrouper dans le membre de gauche $[H^+]$, $[OH^-]$ et toutes les espèces chimiques dont les concentrations ne sont influencées que de façon négligeable par la croissance, et dans le membre de droite les espèces chimiques dont les concentrations peuvent varier fortement. On introduira la fonction f qui correspond au membre de gauche de l'équation précédente et que l'on peut développer en fonction de $[H^+]$

$$f([H^+]) = M_{tot} + \frac{[H^+]N_{tot}}{[H^+]+K_n} + [H^+] - \frac{K_e}{[H^+]} - \frac{(2K_p+[H^+])P_{tot}}{[H^+]+K_p} - N_{tot}.$$

Il est avantageux de récrire le membre de droite de la balance des charges électriques réarrangée sous la forme

$$[HCO_3^-] - [Na^+]_{Pyr} + [Pyr^-] = \frac{c_{tot}(t)}{10^{-\Delta pH(t)}+1} - \Delta_{Pyr}(t)$$

avec $\Delta pH = pH - pK_c$, et $\Delta_{Pyr} = [Na^+]_{Pyr} - [Pyr^-]$, qui à l'état stationnaire correspondra au pyruvate consommé. La balance des charges électriques réarrangée se récrit finalement

$$f([H^+]) = \frac{c_{tot}(t)}{10^{-\Delta pH(t)}+1} - \Delta_{Pyr}(t)$$

dont on tire

$$c_{tot}(t) = (10^{-\Delta pH(t)}+1)(f([H^+]) + \Delta_{Pyr}(t)).$$

Ainsi, en connaissant la composition du milieu (f), en mesurant ou en calculant la consommation du pyruvate (Δ_{Pyr}) et en suivant l'évolution du pH ($[H^+]$), on peut calculer l'évolution de $c_{tot}(t)$ dans le milieu. Afin d'interpréter les résultats de ce calcul, il faut se pencher sur la dynamique de c_{tot} dans un fermenteur.

La variation de c_{tot}. Quatre flux déterminent la variation de c_{tot}: son entrée dans la culture par l'apport de milieu à la concentration constante c_f et au taux de dilution constant D; sa sortie par le trop-plein à la concentration c_{tot} et au même taux de dilution; sa production par litre de culture P_c ($mol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$) qui peut être fonction du temps; et son transfert par diffusion de la phase liquide vers la phase gazeuse $Diff_c$ ($mol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$) qui est exprimé par litre de culture et par heure. Ce qui nous amène à considérer l'équation différentielle

$$\frac{dc_{tot}}{dt} = (c_f - c_{tot})D + P_c - Diff_c.$$

La description explicite de la diffusion est difficile. Elle dépend de la différence des pressions partielles entre les phases gazeuse et liquide. Or, la pression partielle en phase gazeuse évolue dans le temps et la pression partielle dans la phase liquide, proportionnelle à $CO_2(aq)$, dépend elle-même du pH, et peut-être également de la présence de catalyseurs de l'hydratation du gaz carbonique, métaux ou anhydrase carbonique (Stumm & Morgan, 1981). On se contentera de considérer la relation empirique

$$Diff_c \approx K_c c_{tot}$$

où K_c est une constante. L'applicabilité de cette approximation est certainement restreinte à

nos seules conditions expérimentales. En effet, les variations du pH ont toujours été faibles durant les expériences: moins de 0.2 unité de pH, et constamment au voisinage de la neutralité. La fraction de gaz carbonique dans la phase gazeuse a toujours été faible, moins de 5%. Ainsi, il apparaît envisageable d'utiliser une loi de diffusion qui ne tient compte, ni du pH, ni de la composition de la phase gazeuse.

A partir du signal du pH et de la cinétique du pyruvate consommé $\Delta_{Pyr}(t)$, on pourra recalculer $c_{tot}(t)$, puis déterminer sa dérivée, dc_{tot}/dt. On représentera le résultat de ces calculs sous la forme d'une trajectoire dans le plan de phase (c_{tot};dc_{tot}/dt), que l'on interprétera à la lumière de l'équation décrivant la variation de c_{tot}

$$\frac{dc_{tot}}{dt} \propto c_f D + P_c - c_{tot}(D+K_c) .$$

Celle-ci se réduit en une équation différentielle linéaire lorsque P_c est constant, à laquelle correspond une trajectoire rectiligne dans le plan de phase. Les figures 3 et 4 présentent un exemple de ce traitement des données lors d'un essai effectué dans du milieu de Schlegel fortement aéré (2 l/h, 1500 r.p.m.), en l'absence de cellules (P_c=0) et de pyruvate ($\Delta_{Pyr}(t)$=0), le fermenteur ne fonctionnant pas en continu (D=0). On peut dès lors s'attendre à ce que c_{tot} ne varie que du fait de la diffusion

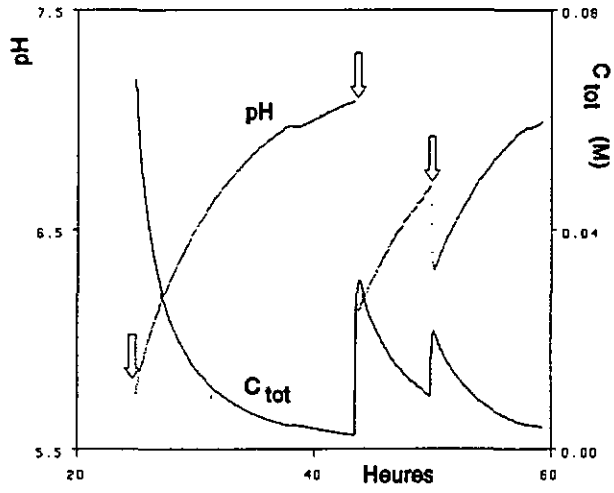


Figure 2 Effet sur le pH de 3 injections (⇓) de gaz carbonique dans un fermenteur et calcul de l'évolution c_{tot}.

$$\frac{dc_{tot}}{dt} = -Diff_c \propto -K_c c_{tot} .$$

Au début de l'essai, puis ensuite à deux reprises, du gaz carbonique a été injecté dans le fermenteur, provoquant une rapide chute du pH. Suite à ces injections, le pH s'est mis à augmenter progressivement, au fur et à mesure que le gaz carbonique diffusait vers la phase gazeuse. On a recalculé l'évolution de c_{tot} à partir du signal du pH et de la composition du milieu (figure 2). Ensuite on a déterminé la dérivée dc_{tot}/dt et tracer dans le plan (c_{tot};dc_{tot}/dt)

les trois trajectoires correspondant aux trois phases de baisse de $c_{tot}(t)$ (figure 3). La plus longue de ces trajectoires est légèrement incurvéee, ce qui prouve que la diffusion n'est pas simplement proportionnelle à c_{tot}. Cependant, dans cet exemple la variation du pH atteint 1.5 unité, soit beaucoup plus que ce que l'on a observé dans les cultures. Il s'en suit que lorsque l'on considérera de plus petites variations du pH (+/-0.1 unités) et donc de c_{tot} (+/-5mM), la courbure des trajectoires deviendra trop faible pour être perceptible. Notre approximation empirique, $Diff_c \approx K_c c_{tot}$, pourra dès lors être utilisée.

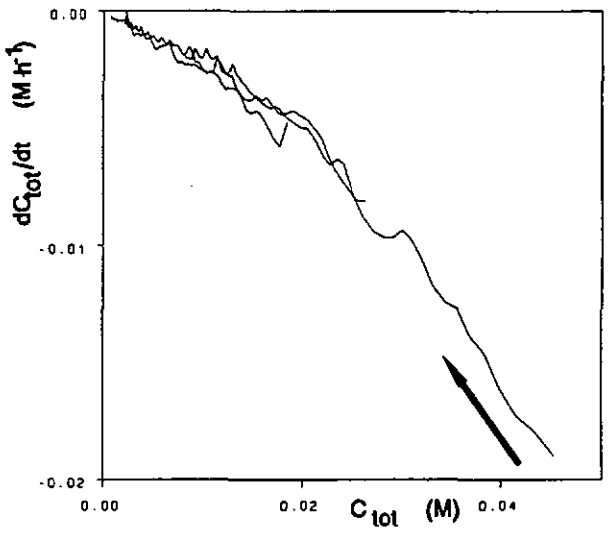


Figure 3 Plan de phase (c_{tot};dc_{tot}/dt) pour les 3 cinétiques décroissantes de c_{tot} de la figure 3.

L'interprétation des trajectoires non-rectilignes dans le plan (c_{tot};dc_{tot}/dt) provoquées par la variation de $P_c(t)$ nécessitera une analyse plus détaillée et l'évaluation de modèles simples quant à l'évolution supposée de $P_c(t)$. Enfin, lors des transitions, une attention particulière devra être portée à la formulation de $\Delta_{Pyr}(t)$ et les différentes situations envisagées seront présentées cas par cas.

LES GAZ

Les analyses de consommation de gaz, l'interprétation des mesures d'oxygène dissous et la dynamique des transitions des cultures limitées par un gaz nécessitent une bonne compréhension du comportement d'un mélange de gaz dans un fermenteur. Les caractéristiques de nos mini-fermenteurs ainsi que la nature des gaz utilisés exercent une profonde influence sur la dynamique de ce système. On s'intéressera en particulier au cas de la croissance hétérotrophe limitée par le pyruvate et au cas de la croissance autotrophe limitée par l'hydrogène. Les "faibles" densités de biomasse observées, ainsi que la "faible" efficacité de l'agitation mise en oeuvre nous place dans une situation quelque peu différente de celle que l'on observe dans des fermenteurs de laboratoire standard tel le Biostat. Cette différence mérite qu'on lui porte attention et permettra également de présenter un exemple de dynamique hiérarchisée temporellement.

Lois et définitions. A la précision où nous travaillons, la loi des gaz parfaits suffit pour décrire la phase gazeuse des fermenteurs, soit

$$pV = nRT$$

où p est la pression ($[p] = Pa = N \cdot m^{-2}$), V le volume ($[V] = m^3$), n le nombre de moles, R la constante des gaz ($R = 8.314\ J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$) et T la température ($[T] = K$). A 27°C (300 K) et 1 atmosphère (101300 Pa), 1 mole de gaz parfait occupe 24.6 l (0.0246 m^3).

Dans un mélange de plusieurs gaz parfaits, chacun contribue à la pression totale proportionnellement à la fraction molaire qu'il représente. Il s'agit de la loi de Dalton qui s'exprime par

$$\frac{p_x}{p_{tot}} = \frac{n_x}{n_{tot}} = f_x$$

où p_x est la pression partielle exercée par le $x^{ième}$ gaz du mélange, p_{tot} la pression totale, n_x le nombre de moles du $x^{ième}$ gaz, n_{tot} le nombre total de moles et f_x la fraction molaire occupée par le $x^{ième}$ gaz dans le mélange.

La solubilité d'un gaz s'exprime par son coefficient de Bunsen α en ml de gaz dissous, en équilibre sous une atmosphère de celui-ci, par ml de solvant, réduit à 0°C et 760 mm Hg. Pour l'eau à 25°C les valeurs suivantes sont à prendre en considération (Bernard & Basnot, 1984)

	H_2	O_2	N_2	CO_2
α [ml/ml]	0.018	0.028	0.014	0.759

Dans un milieu de culture, ces coefficients vont prendre des valeurs inférieures à celles déterminées pour l'eau pure du fait de l'augmentation de la salinité. Le pH joue un rôle prépondérant quant à la solubilité du gaz carbonique.

Le transfert d'un gaz de la phase gazeuse à la phase liquide (ou réciproquement) dépend de la géométrie et des propriétés physico-chimiques de l'interface gaz-liquide. Ce transfert est habituellement décrit par une équation dérivée de la loi de Fick

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C^* - C_L)$$

où C_L est la concentration du gaz dans la phase liquide, C^* la concentration de gaz qui serait dissoute à l'équilibre, "a" la surface de l'interface, et K_L un coefficient (Stanbury & Whitaker, 1984). Le coefficient de transfert, K_La, dépend de l'efficacité de l'agitation, de la présence de bulles et de leur taille, et donc de la tension superficielle du liquide (effet sur la taille des bulles), etc. K_La est donc susceptible de varier d'un fermenteur à l'autre ou dans un même fermenteur au cours d'une expérience.

Flux dans les fermenteurs. Soit X^g le nombre de moles du $x^{ième}$ gaz du mélange présent dans la phase gazeuse et X^l le nombre de mole de ce gaz en solution; six flux (débits molaires exprimés en $mol \cdot h^{-1}$) sont à prendre en compte et sont représentés sur la figure 1: Entrée In^g_x et sortie Out^g_x de la phase gazeuse, entrée In^l_x et sortie Out^l_x de la phase liquide, transfert Δ_x d'une phase dans l'autre et consommation Q_x par litre de culture. Ce qui nous conduit au système d'équations

$$\frac{dX^g}{dt} = In_x^g - Out_x^g - \Delta_x$$
$$\frac{dX^l}{dt} = In_x^l - Out_x^l + \Delta_x - V^l Q_x .$$

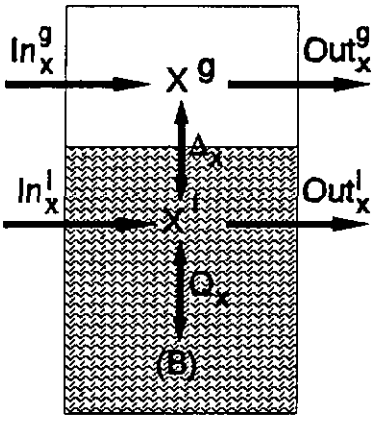


Figure 1 Flux molaire d'un gaz dans un fermenteur.

Dans la phase gazeuse, la loi des gaz parfaits et la loi de Dalton permettent d'introduire la fraction molaire du $x^{ième}$ gaz

$$f_x^g = \frac{X^g RT}{PV^g}$$

où V^g est le volume de la phase gazeuse. De même, on définit formellement une fraction molaire dans la phase liquide au moyen de

$$f_x^l = \frac{X^l}{V^l [x]^*}$$

où V^l est le volume de la phase liquide et $[x]^*$ la concentration ($mol \cdot l^{-1}$) d'une solution du $x^{ième}$ gaz en équilibre sous une atmosphère de celui-ci. Ainsi qu'elles ont été définies, ces fractions molaires sont proportionnelles aux pressions partielles existant à l'interface des deux phases et le transfert d'une phase dans l'autre peut être introduit au moyen de

$$\Delta_x = K_x (f_x^g - f_x^l)$$

où K_x est un coefficient de transfert molaire, $[K_x] = mol \cdot h^{-1}$. Ses unités sont différentes de celles de K_La, $[K_La] = h^{-1}$. Ce dernier est utilisé par les ingénieurs parce qu'il permet de comparer l'efficacité de l'agitation dans des fermenteurs différents. Nous avons préféré introduire ici un coefficient de transfert molaire parce qu'il va nous permettre de comparer différents flux au sein d'un unique fermenteur.

En introduisant les débits molaires totaux à l'entrée In^g_{tot} et à la sortie Out^g_{tot} de la phase gazeuse, ainsi que la fraction (constante) du $x^{ième}$ gaz dans l'apport de gaz f^{in}_x, on peut reformuler le système d'équation décrivant le comportement d'un gaz avec des fractions molaires,

$$\frac{PV^g}{RT}\frac{df_x^g}{dt} = In_{tot}^g f_x^{in} - Out_{tot}^g f_x^g - K_x(f_x^g - f_x^l)$$

$$V^l[x]^*\frac{df_x^l}{dt} = In_x^l - Out_x^l + K_x(f_x^g - f_x^l) - V^l Q_x.$$

Si l'on voulais décrire complètement la dynamique d'un fermenteur comprenant un mélange de n gaz, on devrait considérer un système de 2·n équations (sans tenir compte de la chimie du gaz carbonique en solution). Cependant, comme le volume, la pression et la température de la phase gazeuse sont maintenus constants, il y a conservation du nombre total de moles dans cette phase, soit

$$\sum_{i=1}^{n} f_i^g = 1$$

qui permet d'ôter un degré de liberté au système.

Analyses des gaz à l'état stationnaire. Les formules qui suivent sont bien connues (van der Aar et al. 1990) et nous ne les développerons pas en détail. Il est toutefois intéressant de rappeler les hypothèses qui y conduisent.

L'oxygène est relativement peu soluble et son apport à la phase liquide par transfert de la phase gazeuse est beaucoup plus important que son apport par l'arrivée de milieu. L'entrée et la sortie de l'oxygène sous forme dissoute seront dorénavant négligées. Il en ira de même pour l'azote et l'hydrogène. En revanche, il serait illicite d'appliquer cette simplification au gaz carbonique, très soluble.

L'azote n'étant ni consommé, ni produit, son transfert à la phase liquide est négligeable, et à l'état stationnaire (uniquement) on peut appliquer la conservation du flux d'azote dans la phase gazeuse (les indices suivant sont dorénavant utilisés: n, azote; o, oxygène; h, hydrogène; c, gaz carbonique)

$$In_{tot}^g f_n^{in} = Out_{tot}^g f_n^g.$$

Connaissant la fraction d'azote à l'entrée et à la sortie, on peut déduire le flux total à l'entrée du flux total à la sortie.

A l'état stationnaire toujours, l'oxygène transféré à la phase liquide va être quasi

complètement consommé. Le transfert est donc quasi égal à la consommation. Il s'ensuit

$$V^l[O_2]^*\frac{df_o^l}{dt} = 0 \quad \text{donc} \quad \Delta_o = V^l Q_o,$$

$$\frac{pV^g}{RT}\frac{df_o^g}{dt} = 0 \quad \text{donc} \quad Q_o = \frac{\Delta_o}{V^l} = \frac{In_{tot}^g f_o^{in} - Out_{tot}^g f_o^g}{V^l}.$$

La consommation d'oxygène par la culture se détermine facilement de la composition des gaz et de la connaissance d'au moins un des deux flux totaux. On détermine la consommation de l'hydrogène par un raisonnement similaire. En revanche, il faudrait *a priori* prendre en compte le gaz carbonique dissous pour calculer sa production ou sa consommation. Pourtant, van der Aar et al. négligent le gaz carbonique dissous dans leur calcul. Mais, ces auteurs emploient un flux total de gaz voisin de 100 $l \cdot h^{-1}$ dans un fermenteur de même dimension que les nôtres, et ce flux influence fortement la répartition du gaz carbonique entre les deux phases. Comme nous avons utilisé des flux de gaz totaux de l'ordre du litre par heure, nous ne pouvons pas appliquer une pareille simplification.

L'oxygène durant la croissance hétérotrophe. Les électrodes à oxygène fournissent une mesure de la pression partielle, proportionnelle à f_o^l. Il est à noter que cette valeur, mesurée dans le milieu de culture, serait légèrement supérieure à celle qui existe à la surface des bactéries (Kalina, 1988)... du moins en début d'expérience, parce que si un voile bactérien se développe sur la membrane de l'électrode, cette valeur devrait plutôt être légèrement inférieure.

On a fourni aux cultures hétérotrophes des mélanges de gaz ne contenant que de l'oxygène et de l'azote, le plus souvent de l'air. Le système d'équation décrivant l'oxygène se récrit maintenant quelque peu simplifié

$$\frac{pV^g}{RT}\frac{df_o^g}{dt} = In_{tot}^g f_o^{in} - Out_{tot}^g f_o^g - K_o(f_o^g - f_o^l)$$

$$V^l[O_2]^*\frac{df_o^l}{dt} = K_o(f_o^g - f_o^l) - V^l Q_o$$

et on tire de la seconde équation une relation permettant de déterminer expérimentalement K_o à l'état stationnaire

$$K_o = \frac{V^l Q_o}{\bar{f}_o^g - \bar{f}_o^l}.$$

Les électrodes fournissent une estimation de f^l_o, les analyses chomatographiques permettent de déterminer les autres grandeurs, ce qui nous a permis d'évaluer K_o dans les mini-fermenteurs

$$K_o = 50 \pm 15 \text{ mmole } O_2 \cdot h^{-1}$$

Le volume de chaque culture et la disposition particulière des électrodes provoquent des variations non négligeables de l'efficacité de l'agitation et donc du coefficient de transfert molaire pour chaque fermenteur. Le flux total de gaz traversant chaque fermenteur exerce également un effet non négligeable (Stanbury & Whitaker, 1984). Cependant, pour un fermenteur et une expérience donnés, la constance du volume, la stabilité de l'apport de gaz, et surtout la constance de la vitesse d'agitation assurent la régularité du transfert, ainsi que l'atteste la stabilité des signaux des électrodes à oxygène durant plusieurs jours dans des cultures à l'état stationnaire.

La biomasse dans les mini-fermenteurs n'est cultivée qu'à de "faibles" densités (<0.5 g·l^{-1}). Sa demande en oxygène demeure modeste et ce n'est qu'en choisissant des apports de gaz de l'ordre de grandeur des consommations, que l'on peut effectuer des mesures significatives avec les électrodes à oxygène et le chromatographe. Empiriquement, nous avons toujours réglé le flux et la composition du gaz à l'entrée, de sorte que la biomasse consomme entre le quart et la moitié de l'oxygène lui parvenant. Pour des cultures d'environ 800 ml, les flux de gaz totaux utilisés ont varié entre 150 et 2500 ml·h^{-1}, soit entre 5 et 100 mmole·h^{-1}; ils sont donc du même ordre de grandeur que K_o. De plus, comme on n'a voulu observer uniquement la croissance hétérotrophe limitée par le substrat organique, et en aucun cas une croissance limitée par l'oxygène, les conditions expérimentales ont toujours été fixées de sorte que les fractions d'oxygène dans les deux phases, f^l_o et f^g_o, et à l'entrée, f^{in}_o, soient également du même ordre de grandeur. En pratique f^l_o a été maintenu dans la fourchette 0.05-0.15; f^{in}_o compris entre 0.2-0.3 et f^g_o prenant une valeur intermédiaire aux précédentes. Au vu de la structure du système d'équations différentielles pour l'oxygène et de la <u>similitude des ordres de grandeur</u>, tant des flux, que des fractions, on doit s'attendre à ce que les deux constantes placées devant les différentielles exercent une profonde influence sur la dynamique

du système. Si l'on admet, en première approximation, que les volumes des phases gazeuse et liquide sont identiques, le rapport de ces deux constantes est égal au coefficient de Bunsen

$$\frac{V^l [O_2]^*}{\frac{PV^g}{RT}} \approx \alpha_o = 0.028.$$

Le transfert de quelques micromoles d'oxygène d'une phase dans l'autre fera varier dix à cent fois plus f^l_o que f^g_o, si l'on néglige tous les autres flux.

La dynamique va pouvoir être séparée en deux composantes, l'une lente et l'autre rapide. La transformation du système d'équations dans une de ses formes canoniques qui permet de justifier cette subdivision est donnée en complément à la fin du chapitre. Le mouvement rapide ne concernera que la phase liquide. La concentration de l'oxygène dans la phase gazeuse sera alors momentanément considérée comme une constante $\overline{f}^g_o$. La dynamique de l'oxygène dissous est alors décrite par l'approximation

$$\frac{df^l_o}{dt} \approx \frac{K_o(\overline{f}^g_o - f^l_o) - V^l Q_o}{V^l [O_2]^*}$$

qui tend très rapidement vers la solution quasi-stationnaire

$$\overline{f}^l_o = \overline{f}^g_o - \frac{V^l Q_o}{K_o}$$

qui met en évidence qu'une différence de pression partielle doit s'observer entre les deux phases (K_o n'étant pas excessivement plus grand que $V^l Q_o$).

La figure 2 présente les cinétiques de l'oxygène dissous pour deux expériences identiques, l'une réalisée dans le Biostat, l'autre dans un mini-fermenteur. Il s'agit de l'injection d'une petite quantité du facteur limitant sur une culture à l'état stationnaire. Cette injection provoque une période de croissance non-limitée durant laquelle la consommation d'oxygène est brusquement augmentée. Dans le fermenteur Biostat, ces modifications brutales de la consommation se manifestent par des changements de pente du signal de l'électrode. Dans les mini-fermenteurs, un mouvement rapide vient se surajouter au changement de pente; en quelque sorte, l'oxygène dissous "saute" vers un nouvel état quasi-stationnaire.

Comme le mouvement rapide ne concerne que la phase liquide, il ne pourra se manifester que si Q_o varie soudainement. L'apparition de ce mouvement rapide constitue la signature caractéristique d'une variation brutale de l'activité respiratoire. En aucun cas, ce mouvement rapide ne peut être provoqué par une modification soudaine de la composition de l'apport de gaz dans la phase gazeuse.

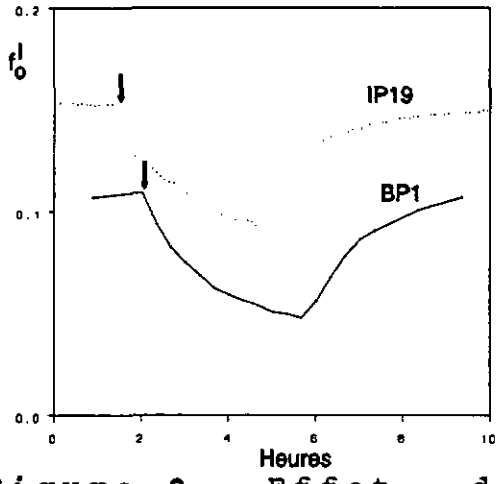


Figure 2 Effet de l'injection (⇓) d'une solution concentrée du facteur limitant sur une culture à l'état stationnaire, dans le Biostat (BP1) et dans un mini-fermenteur (IP19).

L'équation décrivant le mouvement lent dans la phase gazeuse s'obtient en substituant la solution quasi-stationnaire du mouvement rapide dans le terme de transfert

$$\frac{PV^g}{RT}\frac{d\bar{f}_o^g}{dt} = In_{tot}^g f_o^{in} - Out_{tot}^g \bar{f}_o^g - V^l Q_o .$$

Out^g_{tot} se déduit de la conservation du nombre de moles dans la phase gazeuse

$$Out_{tot}^g = In_{tot}^g - V^l Q_o - \Delta_c$$

où Δ_c représente le transfert du gaz carbonique. Δ_c est de signe négatif dans le cas présent puisque le gaz carbonique est produit en phase liquide et transféré vers la phase gazeuse. Finalement, on obtient la description du mouvement lent dans la phase liquide, en différenciant la solution quasi-stationnaire pour la phase liquide et en y introduisant l'expression de la phase gazeuse, soit, après quelques réarrangements

$$\frac{d\bar{f}_o^l}{dt} = \frac{RT}{PV^g}\left(In_{tot}^g f_o^{in} - \left(In_{tot}^g - V^l Q_o - \Delta_c\right)\left(\bar{f}_o^l + \frac{V^l Q_o}{K_o}\right) - V^l Q_o \right) - \frac{V^l}{K_o}\frac{dQ_o}{dt} .$$

Cette dernière équation comporte deux fonctions du temps Q_o et Δ_c. Le terme exprimant leur somme peut être simplifié au moyen de

$$V^l Q_o + \Delta_c = \alpha V^l Q_o$$

avec α constant positif. Cette simplification sous-entend qu'une part constante des moles

d'oxygène retirées de la phase gazeuse par le transfert est compensée par du gaz carbonique.

Du fait de la complexité et du nombre de paramètres de l'équation décrivant le mouvement lent en phase liquide, le traitement quantitatif des signaux mesurés au moyen des électrodes à oxygène est délicat. On a néanmoins essayé d'appliquer ce modèle à des données expérimentales pour vérifier le bien-fondé des hypothèses qui y conduisent. La figure 3 présente la cinétique de l'oxygène dissous durant la croissance exponentielle non-limitée du début d'une expérience et un ajustement obtenu avec ce modèle en décrivant la consommation par une fonction exponentielle

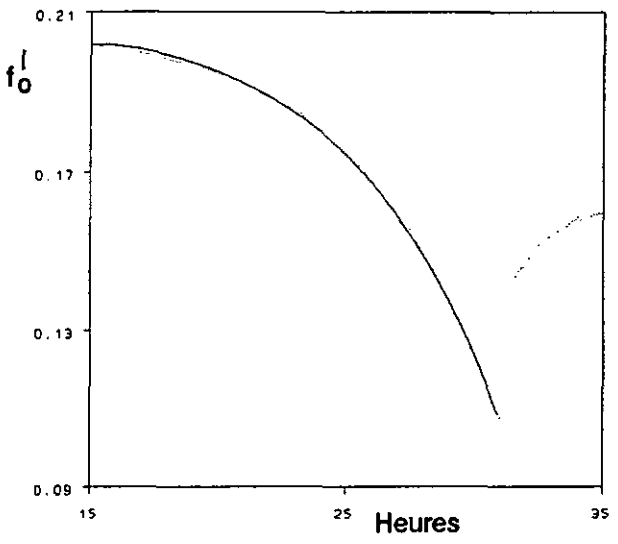


Figure 3 Cinétique de l'oxygène dissous pendant et après la croissance exponentielle non-limitée (...) et ajustement du modèle (——). IP13, paramètres du modèle dans le texte.

$$V^l Q_o(t) = Ae^{Bt}.$$

L'ajustement obtenu avec les valeurs $A=1.546\cdot10^{-4}$, $B=1.747\cdot10^{-1}$, $RT/PV^g=21.39$, $\alpha=0.8115$, $K_o=0.049$ et $In_{tot}^g=0.0336$ est excellent. De plus, ces valeurs sont en bon accord ($\pm20\%$) avec celles déterminée indépendamment sur le système expérimental. On remarquera également (figure 3) un bel exemple de mouvement rapide survenant lors de l'apparition de la limitation par le substrat à la fin de la phase de croissance non-limitée. La fraction d'oxygène remonte soudainement de 0.03 et ce en moins de deux minutes, comme il a été observé sur l'affichage de l'amplificateurs de l'électrode.

Pour Q_o constant, l'équation différentielle du mouvement lent se réduit à une équation différentielle linéaire du premier ordre. Dès lors comme pour l'évaluation de c_{tot}, il pourra être intéressant de construire le plan de phase (f^l_o;df^l_o/dt) afin d'estimer si la consommation d'oxygène par litre de culture demeure constante durant une phase de transition.

L'hydrogène durant la croissance autotrophe. La dynamique des gaz durant la croissance autotrophe est *a priori* plus compliquée qu'en hétérotrophie puisque quatre gaz entrent en

jeux, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote et le gaz carbonique. Cependant, la limitation des cultures par l'hydrogène va exercer une forte contrainte sur la dynamique du système et on pourra effectuer un certain nombre de simplifications et de prédictions.

Kodama et al. (1976) ont déterminé les coefficients de transfert volumétrique de l'hydrogène et de l'oxygène dans un fermenteur de laboratoire. Ces auteurs parviennent à la conclusion, plutôt inattendue, que ces coefficients sont très proches, et même identiques pour les plus faibles vitesses d'agitation qu'ils ont utilisées. Ce résultat a été confirmé récemment par L. Egger dans les mini-fermenteurs (comm. pers.) et donnerait tort à Bongers (1970b) qui avait postulé que le coefficient de transfert de l'hydrogène valait quatre à cinq fois celui de l'oxygène. Comme des coefficients de transfert volumétrique sont proportionnels à des coefficients de transfert molaire, nous postulerons l'égalité des coefficients de transfert molaire de l'hydrogène et de l'oxygène

$$K_h = K_o .$$

Il s'en suit que, si dans la phase liquide la réaction

$$2H_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O$$

se déroule et qu'elle se trouve limitée par le transfert de l'hydrogène ($f_h^l = 0$), il existe une et une seule fraction d'hydrogène dans la phase gazeuse qui permette à cette réaction de se dérouler à vitesse constante

$$\Delta_h = 2\Delta_o$$

$$K_h(f_h^g - f_h^l) = 2K_o(f_o^g - f_o^l)$$

$$\text{donc} \quad f_h^g = 2(f_o^g - f_o^l) \quad \text{si} \quad f_h^l = 0$$

et cette fraction d'hydrogène dans la phase gazeuse sera d'autant plus grande que le coefficient de transfert est petit. On doit donc s'attendre à retrouver une fraction d'hydrogène non négligeable à la sortie des cultures limitées par l'hydrogène. Cette particularité ne va pas sans soulever le problème de l'identification et de l'unicité du facteur limitant. Dès lors, on cherchera à vérifier l'adéquation du comportement de la culture et du signal d'oxygène aux propriétés que nous allons évoquer ci-dessous. Par ailleurs, on constate l'importance de la constance du coefficient de transfert et donc la régularité de l'agitation de la culture.

Lorsqu'une culture continue est limitée par l'hydrogène pour des taux de dilution pas trop

voisins du taux de lessivage, la concentration résiduelle en hydrogène dissous est de l'ordre de grandeur de la constante d'affinité de la bactérie. Chez les hydrogénobactéries, ces constantes d'affinités ont été estimées de l'ordre de grandeur du micromolaire. Siegel & Olis (1984) ont trouvé une constante d'affinité valant 4.6 μM chez *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17707. Schuler & Conrad (1990) ont déterminé cette constante chez une souche voisine de *Pseudomonas palleronii* et ont trouvé une valeur légèrement inférieure au micromolaire (0.75 μM) et des valeurs comparables ont été trouvées chez *Paracoccus denitrificans* (0.89 μM, Schuler & Conrad, 1990; 1.10 μM Häring & Conrad, 1991). *A. autotrophicum* possède certainement une constante d'affinité de cet ordre de grandeur. Celle-ci correspondrait à f^l_h voisin de 10^{-3}. Par ailleurs, Conrad et al. (1983) ont démontré l'existence d'une concentration seuil ("threshold") d'hydrogène au-dessous de laquelle les hydrogénobactéries connues se montrent incapables de consommer l'hydrogène. Cette concentration vaut 1.9 nM chez *A. autotrophicum*. Elle est donc bien inférieure à la constante d'affinité et par conséquent n'a pas besoin d'être prise en compte.

Toutes les cultures continues limitées par l'hydrogène ont été réalisées avec des fractions d'hydrogène dans l'apport de gaz supérieures à $f^{in}_h=0.35$. Il s'ensuit qu'une fois la limitation par l'hydrogène établie, le transfert peut s'exprimer simplifié au moyen de

$$\Delta_h = K_h(f_h^g - f_h^l) \approx K_h f_h^g$$

et la consommation d'hydrogène exprimée au moyen de

$$Q_h = \frac{\Delta_h}{V^l} \approx \frac{K_h f_h^g}{V^l}.$$

Une fois la limitation par l'hydrogène établie, la consommation de l'hydrogène par la culture va être déterminée par le transfert. Comme ce déterminisme de consommation est exogène, cela exclut d'emblée toute possibilité de modification brutale du taux de consommation de l'hydrogène et il ne pourra donc pas exister de mouvement rapide pour l'hydrogène (du moins pour la croissance strictement autotrophe). La variation de l'hydrogène dans la phase gazeuse peut donc se récrire simplifiée

$$\frac{PV^g}{RT}\frac{df_h^g}{dt} \approx In^g_{tot} f_h^{in} - Out^g_{tot} f_h^g - V^l Q_h.$$

Soit R_q, le rapport du taux de consommation de l'hydrogène sur celui de l'oxygène, *a priori*

compris entre 2 et 3 et susceptible de se modifier en fonction des conditions de croissance. Une modification instantanée de ce rapport devrait produire un mouvement rapide de l'oxygène dissous. Toutefois, on simplifiera le problème en décrivant le comportement de l'oxygène avec l'hypothèse de quasi-stationnarité dans la phase liquide

$$Q_o \propto \frac{\Delta_o}{V^l} = \frac{Q_h}{R_q}$$

et la variation de l'oxygène se ramène à

$$\frac{PV^g}{RT}\frac{df_o^g}{dt} = In_{tot}^g f_o^{in} - Out_{tot}^g f_o^g - \frac{V^l Q_h}{R_q}.$$

Enfin la variation de l'azote s'exprime par

$$\frac{PV^g}{RT}\frac{df_n^g}{dt} = In_{tot}^g f_n^{in} - Out_{tot}^g f_n^g.$$

Pour encore davantage simplifier le problème, on ne tiendra plus compte du gaz carbonique. Cette simplification est licite pour la série d'expériences LempD. En effet, nous sommes parvenus à fournir à la culture du bicarbonate par le milieu et une fraction de gaz carbonique dans la phase gazeuse dans un rapport qui permet au gaz carbonique de ressortir en phase gazeuse à une fraction très proche de sa fraction à l'entrée. Les consommations de gaz carbonique par la croissance et pour tamponner le milieu sont à peu près compensées par la différence des flux totaux à l'entrée et à la sortie.

Le système de trois équations différentielles que l'on vient de construire serait bien commode à manier si Out_{tot}^g ne dépendait pas à la fois de In_{tot}^g et des consommations des gaz. Or la conservation du nombre de moles dans la phase gazeuse s'exprime ici par

$$\frac{df_h^g}{dt} + \frac{df_o^g}{dt} + \frac{df_n^g}{dt} = 0$$

et en calculant cette somme, on obtient une expression pour Out_{tot}^g

$$Out_{tot}^g = In_{tot}^g - (1 + \frac{1}{R_q}) V^l Q_h.$$

Dès lors, on peut étudier numériquement ce système d'équations différentielles, en gardant en mémoire que la consommation d'hydrogène est proportionnelle à f_h^g.

La figure 4 présente une simulation du comportement de la phase gazeuse d'une culture où la limitation en hydrogène est supposée apparaître au temps zéro. Cette simulation à été réalisée avec des valeurs de paramètre correspondant à celles déterminées pour l'expérience EP59, l'incertitude sur le volume de la phase gazeuse est toutefois importante, $RT/PV^g=24.6\ mol^{-1}$, $In^g_{tot}=0.0225\ mol\cdot h^{-1}$, $f^{in}_h=0.35$, $f^{in}_o=0.16$, $f^{in}_n=0.49$, $K_h=K_n=0.05\ mol\cdot h^{-1}$, $R_q=2.4$ (constant). Les conditions initiales ont été choisies arbitrairement. On observe sur la figure 4 que la fraction d'hydrogène atteint une valeur (quasi) stationnaire avant la cinquième heure alors que les fractions d'oxygène et d'azote ne parviennent pas à se stabiliser avant la dixième heure. Par conséquent, le taux de consommation de l'hydrogène par la culture, proportionnel à f^g_h, pourra être considéré comme constant avant que la phase gazeuse ne parvienne à l'état stationnaire! Il n'est donc pas impossible que la biomasse atteigne un état stationnaire avant que le signal d'oxygène ne se soit stabilisé. Dans le chapitre consacré à l'établissement de la limitation par l'hydrogène, on présentera un exemple expérimental mettant en évidence ce curieux phénomène. Enfin, la fraction d'hydrogène à la sortie est constamment supérieure à 0.1, une valeur élevée comme signalé précédemment.

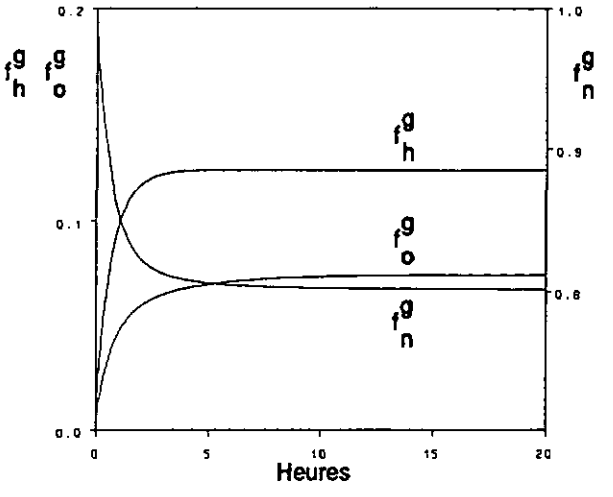


Figure 4 Simulation de l'évolution de la phase gazeuse d'une culture limitée en hydrogène.

La figure 5 présente l'effet de la variation soudaine de R_q sur la composition d'une phase gazeuse. A l'exception de R_q, les conditions de cette simulation sont les mêmes que pour celle de la figure précédente. La variation de la fraction d'hydrogène est insignifiante, la consommation d'hydrogène par la culture demeure donc quasi constante. En revanche les fractions d'oxygène et d'azote se modifient conjointement, mettant en évidence la modification de R_q. Sur cette figure nous avons recalculé la fraction d'oxygène dissoute, f^l_o, au moyen de

$$f_o^l \approx f_o^g - \frac{V^l Q_o}{K_o} = f_o^g - \frac{f_h^g}{R_q},$$

le mouvement rapide de l'oxygène est à nouveau négligé. La variation relative de l'oxygène est de 19% dans la phase gazeuse et de 82% dans la phase liquide! Le signal des électrodes à oxygène est donc extrêmement sensible à toute variation du rapport hydrogène sur oxygène consommé.

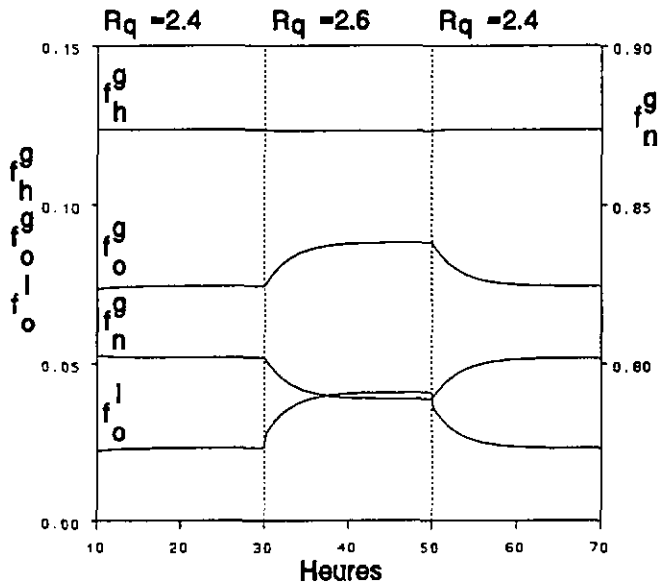


Figure 5 Simulation de la phase gazeuse d'une culture continue autotrophe. Modification soudaine de R_q, le rapport hydrogène sur oxygène consommé.

Des observations qui précèdent découle la stratégie que l'on devra mettre en oeuvre pour observer des transitions limitées par l'hydrogène. Une fois un état stationnaire atteint, tant par la biomasse que par la phase gazeuse, on pourra modifier le taux de dilution sans que la fraction d'hydrogène dans la phase gazeuse, et donc la consommation d'hydrogène par la culture, ne varie significativement, puisque le taux de dilution n'apparaît pas dans les formules considérées. Durant ces transitions, le seul paramètre que l'on peut espérer voir se modifier sera le rapport hydrogène sur oxygène consommé et cette modification sera mise en évidence avec une grande sensibilité par les électrodes à oxygène. L'obtention d'un état stationnaire dans la phase gazeuse pourra prendre beaucoup de temps, mais une fois atteint, la fraction d'hydrogène demeurera quasi constante quelles que soient les modifications apportées au taux de dilution.

Quelques heures après l'établissement de la limitation par l'hydrogène, la quantité de celui-ci transférée à la culture deviendra constante. On pourra dès lors considérer que la culture se comporte comme si le substrat limitant provenait par l'apport de milieu à une concentration hypothétique S_f définie pour un taux de dilution donné par

$$S_f = \frac{\Delta_h}{V_l D}.$$

Ainsi, il n'y aura plus besoin de considérer explicitement la dynamique des gaz pour interpréter la cinétique de la biomasse durant les transitions limitées par l'hydrogène. On parvient donc à la conclusion que tous les développements effectués pour l'autotrophie sont de peu d'utilité pratique. Ainsi, les transitions limitées par l'hydrogène pourront être étudiées dans le même cadre théorique que celles limitées par le pyruvate, ce qui procure finalement une simplification appréciable du problème.

Complément. La subdivision de la dynamique de l'oxygène dissous en un mouvement rapide et en un mouvement lent est possible du fait de la structure des équations et des valeurs des paramètres utilisés dans nos mini-fermenteurs. Afin de mettre en évidence ces propriétés, on va transformer le système d'équations différentielles dans une de ses formes canoniques. Rappellons que le comportement de l'oxygène dissous est décrit par

$$\frac{pV^g}{RT}\frac{df_o^g}{dt} = In_{tot}^g f_o^{in} - Out_{tot}^g(t) f_o^g - K_o(f_o^g - f_o^l)$$

$$V^l[O_2]^* \frac{df_o^l}{dt} = K_o(f_o^g - f_o^l) - V^l Q_o(t).$$

Les deux variables dépendantes sont déjà exprimées sans dimension, on les transformera tout de même au moyen de

$$x = \frac{In_{tot}^g f_o^{in}}{K_o} f_o^g \quad \text{et} \quad y = \frac{In_{tot}^g f_o^{in}}{K_o} f_o^l.$$

En introduisant un nouveau temps sans dimension

$$\tau = \frac{RTK_o}{pV^g} t,$$

le coefficient de Bunsen pour l'oxygène

$$\frac{RTV^l[O_2]^*}{pV^g} = \frac{V^l}{V^g}\alpha_o,$$

et les deux fonctions

$$A(\tau) = 1 + \frac{Out^{g}_{tot}\left(\frac{pV^{g}}{RTK_{o}}\tau\right)}{K_{o}} \quad \text{et} \quad B(\tau) = \frac{V^{l}Q_{o}\left(\frac{pV^{g}}{RTK_{o}}\tau\right)}{In^{g}_{tot}f^{in}_{o}}.$$

on parvient à récrire le système d'équations sans dimension

$$\frac{dx}{d\tau} = 1 - A(\tau)x + y$$

$$\alpha_{o}\frac{V^{l}}{V^{g}}\frac{dy}{d\tau} = x - y - B(\tau).$$

Le tableau suivant présente des valeurs caractéristiques de x, y, A et B calculés pour des états stationnaires hétérotrophes. Ces valeurs sont tout à fait représentatives des conditions expérimentales dans les mini-fermenteurs

Expérience	D (h^{-1})	$\tilde{x}$	$\tilde{y}$	$\tilde{A}$	$\tilde{B}$
EP28	0.058	2.76	2.49	1.27	0.26
EP33	0.114	1.77	1.46	1.39	0.31
EP38	0.159	1.45	1.09	1.44	0.36
EP43	0.216	1.25	0.63	1.30	0.61
EP48	0.292	1.03	0.53	1.48	0.49

$\tilde{x}$, $\tilde{y}$, $\tilde{A}$ sont du même ordre de grandeur et voisin de l'unité, $\tilde{B}$ est légèrement plus petit. En dehors des états stationnaires, x et y varieront d'au plus 50% puisque l'oxygène n'est jamais limitant, la variation de $A(\tau)$ est plus faible (une partie de l'oxygène consommé est remplacé par du gaz carbonique). Enfin $B(\tau)$ pourra prendre des valeurs nettement supérieures et se rapprocher de l'unité, par exemple lors d'une dé-limitation. V^{l}/V^{g} est voisin de 1 et α_{o} est inférieur à 0.028 du fait de la salinité du milieu. Nous avons donc affaire à un système d'équations différentielles dont tous les termes sont de l'ordre de grandeur de l'unité à l'exception d'un facteur voisin de 10^{-2} placé devant l'une des différentielles. On peut donc lui associer une dynamique hierarchisée au sens d'un théorème dû à Tikhonov qu'on trouvera exposé et discuté notament par Heinecken et al. (1967) et appliqué par Reich et Sel'kov (1974, 1975).

BASES THEORIQUES I: DEFINITIONS ET GENERALITES

Nous supposons que le lecteur est déjà familiarisé avec les modèles de culture continue et en particulier avec le modèle de Monod (1950).

Croissance et consommation. Le taux de croissance r d'une culture de microorganismes de densité X est défini par

$$r = \frac{1}{X}\frac{dX_p}{dt}$$

où dX_p/dt est le taux de production de biomasse par la croissance. En culture continue, la variation de la biomasse est décrite par

$$\frac{dX}{dt} = (r-D)X$$

où D est le taux de dilution.

On restreindra l'emploi du terme limitation aux seules limitations par un ou des facteurs exogènes. Ce qui exclut, par définition, les "limitations endogènes", comme par exemple celles liées aux activités spécifiques de systèmes enzymatiques. Nous appellerons croissance exponentielle le mode de croissance typique des microorganismes placés dans un environnement non-limitant et dans lequel r prend une valeur constante caractéristique r_{exp}, le taux de croissance exponentielle. Un autre mode de croissance à taux constant est la croissance stationnaire en culture continue (steady-state), pour lequel r est égal au taux de dilution D. Ces deux modes de croissance à taux constant correspondent à des situations physiologiques profondément différentes puisque la croissance exponentielle, telle que nous la définissons, est non-limitée, tandis que la croissance stationnaire est forcément limitée par au moins un facteur exogène. La constance du taux de croissance doit être considérée comme un épiphénomène caractéristique de plusieurs types distincts d'interaction entre le milieu et la biomasse. De nombreux auteurs ont affirmé que la croissance stationnaire (limitée) est un mode de croissance exponentielle; cette affirmation peut être exacte algébriquement, mais nous semble extrêmement critiquable dans une perspective physiologique ou écologique.

La croissance limitée résulte de la raréfaction d'une ou de plusieurs substances dans le voisinage de la bactérie. Expérimentalement, en plaçant un organisme, dont on connaît les besoins nutritifs, dans un milieu de composition connue, on parvient à limiter sa croissance par un facteur choisi. L'unicité de cette limitation doit être prouvée, par exemple, en comparant différentes expériences ou différentes phases d'une expérience où toutes les conditions sont maintenues similaires, à l'exception de la concentration du facteur limitant supposé, et en démontrant l'existence d'une proportionnalité entre l'apport de facteur limitant et la production de biomasse. Cependant, cette démonstration expérimentale se complique lors de l'apparition d'une double limitation, ou encore lorsque le substrat utilisé est toxique. Une étude plus détaillée portant sur la stoechiométrie de la croissance et la modification de la composition du milieu est alors nécessaire. 4Théoriquement, on considérera un substrat comme limitant si une petite variation de sa concentration provoque une variation significative de sa consommation. Cette définition (restrictive) sera utilisée dans tout le chapitre suivant.

On définit le taux de consommation q d'un substrat par unité de biomasse au moyen de

$$q = -\frac{1}{X}\frac{dS_q}{dt}$$

où dS_q/dt est le taux de variation du substrat dû à la consommation. La variation de la concentration du substrat S en culture continue est décrite par l'équation différentielle

$$\frac{dS}{dt} = (S_f - S)D - qX$$

où S_f est la concentration du substrat dans l'apport de milieu.

Les taux de croissance et de consommation sont reliés entre eux par le rendement Y

$$Y = \frac{r}{q} = -\frac{dX_p}{dS_q}.$$

Le taux de croissance, le taux de consommation et le rendement peuvent être calculés directement d'après des mesures expérimentales de la biomasse et du substrat. On parvient ainsi à établir une description phénoménologique de la croissance. Toutefois, on ne se satisfera pas d'une telle approche uniquement descriptive et l'on va envisager les déterminismes probables de la consommation et de la croissance. C'est-à-dire que l'on

cherchera à formuler explicitement les interactions entre les différentes variables du système en partant d'hypothèses aussi générales que possible. Auparavant, on discutera brièvement du modèle de Monod et de ses fondements.

L'approche selon Monod. Monod (1942) a introduit le déterminisme de la croissance comme étant une fonction du substrat (éventuellement) limitant au moyen de la relation

$$r(S) = r_{exp}\frac{S}{K_S+S}.$$

Il a postulé que le rendement de la croissance était une constante, Y_{exp}. Le déterminisme de la consommation devient alors également une fonction du substrat

$$q(S) = \frac{r(S)}{Y_{exp}} = q_{exp}\frac{S}{K_s+S}$$

où $q_{exp}=r_{exp}/Y_{exp}$ est le taux de consommation durant la croissance exponentielle.

Cette façon de formuler le déterminisme de la croissance comme étant une fonction du substrat, puis ensuite seulement le déterminisme de la consommation, a été reprise par la plupart des auteurs. Par exemple, lors de la construction de modèles décrivant des situations plus complexes, substrats toxiques ou double limitation. On fera une discussion critique de ces deux cas particuliers dans le chapitre bases théoriques III: compléments.

La similitude entre la fonction de Michaelis-Menten et celle de Monod a suggéré qu'il pourrait exister une réaction enzymatique unique dans les voies métaboliques qui serait limitative et qui donc déterminerait la croissance (bottlneck reaction). Cette idée a été développée et raffinée par différents auteurs, ce qui les a conduits à proposer des modifications de la fonction hyperbolique rectangulaire d'origine (Pirt, 1990). Mais, que la croissance soit déterminée en toutes circonstances par une unique activité enzymatique nous apparaît comme un concept douteux. Les développements récents de la théorie du contrôle métabolique tendent d'ailleurs à prouver le contraire (Kell & Westerhof, 1989).

En se basant sur des considérations thermodynamiques, Westerhoff et al. (1982) ont proposé que le taux de croissance dépende de la concentration du substrat suivant une relation logarithmique. Cette prédiction a été confirmée expérimentalement chez *Escherichia coli* pour différents sucres, (T.Egli, comm. pers.). Pour le même système expérimental une autre

hypothèse doit être mentionnée: la limitation de la consommation par la diffusion du substrat au voisinage de la bactérie et à travers les porines (Koch, 1982; Koch & Wang, 1982), explication qui ne présuppose pas une limitation d'origine métabolique, mais physique.

Le taux de croissance du modèle de Monod tend asymptotiquement vers r_{exp} lorsque la concentration du substrat devient très grande. En revanche, une fonction logarithmique ne possède pas d'asymptote horizontale et ne peut donc décrire une véritable croissance exponentielle à taux constant. Le modèle de Blackman, qui introduit une discontinuité dans la dérivée de r(S), permet de séparer clairement la croissance limitée de la croissance non-limitée (Dabes et al., 1973).

De très nombreuses publications ont été consacrées à la mesure des constantes d'affinité (revue par Owens & Legan, 1987). Toutefois, certains auteurs ont rapporté que ces "constantes" sont susceptibles d'évoluer au fil du temps en chemostat (Höfle, 1983; Hazeu et al., 1986).

Konak (1974) et Lobry et al. (1992) ont tenté de démontrer théoriquement le bien-fondé de la fonction hyperbolique rectangulaire du modèle de Monod et sont même parvenus à mettre en évidence l'interdépendance des valeurs de r_{exp} et de K_S. Plus précisément, Konak parvient à la conclusion que

$$K_S = k/r_{exp},$$

alors que Lobry et al. parviennent à la conclusion opposée

$$K_S = r_{exp}/k',$$

où k et k' sont des constantes! (sans commentaire).

Nous avons désigné par approche selon Monod la méthode consistant à définir d'abord le déterminisme de la croissance comme une fonction de la concentration du substrat, puis ensuite seulement à introduire le déterminisme de la consommation (généralement à l'aide d'une hypothèse sur le rendement). Ce faisant, on place au centre du débat la relation entre la concentration du substrat limitant et le taux de croissance, relation qui fait encore et

toujours l'objet de nombreuses controverses. Actuellement, aucun modèle, ni aucune équation ne semble faire l'unanimité et nous ne souhaitons pas débattre plus avant de ce sujet. Un des buts de ce travail est de montrer que ce problème peut être abordé différemment, si l'on considère que la consommation précède la croissance. Ce postulat trivial et naïf n'en est pas moins essentiel pour aborder les transitions. Par conséquent on s'intéressera d'abord au déterminisme de la consommation en tant que fonction du substrat, et seulement ensuite au déterminisme de la croissance qui sera, entre autre, fonction de la consommation.

BASES THEORIQUES II: LES TRANSITIONS

Le travail de Minkevich et Utkina (1979) représente une importante contribution théorique à l'étude de la dynamique des cultures continues et se fonde sur la hiérarchisation de cette dynamique en deux composantes temporelles. Nous avons adopté une approche similaire, mais en développant un formalisme quelque peu différent, et en mettant en lumière certains aspects de cette théorie jusqu'ici passé inaperçus.

Déterminisme de la consommation. La fonction taux de consommation sera formulée explicitement au moyen de

$$q = q_{exp}\delta\varphi(\sigma)$$

où, q_{exp} est une constante représentant le taux de consommation d'une unité de biomasse durant la croissance exponentielle, δ correspond à l'activité spécifique du système de consommation et $\varphi(\sigma)$ est une "fonction de saturation". Cette dernière exprime la façon dont le système de consommation dépend de la concentration normalisée du substrat, $\sigma = S/K_s$, K_s étant une constante d'affinité. On se contentera de considérer une fonction de saturation définie génériquement. Soit, une fonction monotone croissante avec les propriétés

$$\varphi(1) = \frac{1}{2}, \quad \lim_{\sigma\to\infty}\varphi(\sigma) = 1, \quad \frac{\partial\varphi}{\partial\sigma} > 0.$$

La fonction "hyperbolique rectangulaire"

$$\varphi(\sigma) = \frac{\sigma}{1+\sigma}$$

possède ces propriétés. Elle correspond à la fonction introduite par Michaelis-Menten pour les cinétiques enzymatiques et à celle réintroduite par Monod pour les cinétiques de croissance microbienne. De nombreuses autres expressions explicites de la fonction de saturation ont été proposées et possèdent les propriétés susmentionnées. Button (1985) passe en revue différents modèles de consommation qui, pour la plupart, se conforment aux propriétés considérées. Notre définition générale de la consommation se rapproche de celle

envisagée par Butler & Wolkowicz (1985), mais s'en distingue par l'introduction du terme δ et par l'abandon du concept d'inhibition de la consommation par le substrat aux concentrations élevées de celui-ci. La plupart des expressions utilisées (implicitement) pour décrire la consommation de substrats toxiques ne sont donc apparemment pas prises en compte par notre approche. On reviendra sur ce point dans le chapitre suivant.

Par définition durant la croissance exponentielle, on fixera

$$q = q_{exp}, \quad \delta = 1, \quad \varphi(\sigma) = 1.$$

Le terme δ a été défini comme étant proportionnel à l'activité spécifique du système de consommation. A la fin de ce travail on reviendra sur cette grandeur et l'on discutera plus en détail de sa signification.

Déterminisme de la croissance. Un taux de croissance sans unités μ, est défini au moyen de

$$\mu = \frac{r}{r_{exp}},$$

et prend la valeur 1 durant la croissance exponentielle.

Pour des modèles non-structurés, on appelle déterminisme de la croissance l'expression explicite que l'on donne à la fonction

$$\mu = \mu(\delta, \varphi)$$

Pour les modèles structurés, le déterminisme de la croissance est plus délicat à définir. En général, il dépend à la fois du taux de consommation et de l'"état" de la biomasse, ou encore de sa composition.

Forme canonique. Nous restreindrons momentanément notre approche aux seuls modèles non-structurés qui s'expriment tous sous la forme d'un système de deux équations différentielles

$$\frac{dX}{dt} = (r-D)X$$

$$\frac{dS}{dt} = (S_f-S)D-qX$$

et que nous allons transformer dans une de ses formes canoniques au moyen de

$$\tau = r_{exp}t, \quad \sigma = \frac{S}{K_s}, \quad \chi = \frac{q_{exp}X}{r_{exp}S_f},$$

$$\rho = \frac{D}{r_{exp}}, \quad \epsilon = \frac{K_s}{S_f},$$

$$\delta\varphi(\sigma) = \frac{q}{q_{exp}}, \quad \mu = \frac{r}{r_{exp}}.$$

Le système d'équations est ainsi reformulé

$$\frac{d\chi}{d\tau} = (\mu-\rho)\chi,$$

$$\epsilon\frac{d\sigma}{d\tau} = (1-\epsilon\sigma)\rho - \delta\varphi(\sigma)\chi.$$

Ce système d'équations différentielles sera applicable aux cultures continues limitées par le pyruvate, mais également aux cultures limitées par l'hydrogène dès que le flux d'hydrogène transféré à la culture aura pris une valeur constante (*cf* chapitre des gaz).

En introduisant une contrainte supplémentaire sur le déterminisme de la croissance

$$\frac{\partial\mu}{\partial\varphi} > 0,$$

on a montré que ce système d'équations différentielles n'admet que des solutions stationnaires asymptotiquement stables, au sens de Liapounov (Jordan & Smith, 1986), pour des biomasses non-nulles. La démonstration est donnée à la fin du chapitre suivant.

Dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées, les ordres de grandeur suivants sont à considérer pour les deux paramètres essentiels

$$0.05 \leq \rho \leq 0.95, \quad 10^{-5} \leq \epsilon \leq 10^{-2}$$

La constante d'affinité d'*A. autotrophicum* pour le pyruvate a été estimée de l'ordre de grandeur du micromolaire (L. Egger, comm. pers.), alors que sa concentration dans l'apport de milieu est généralement voisine de dix millimolaire. La situation de limitation par l'hydrogène a déjà été évoquée dans le chapitre consacré aux gaz.

Croissances non-limitées. La croissance non-limitée apparaît lorsque

$$\sigma > 1 \quad \Leftrightarrow \quad \varphi(\sigma) \approx 1$$

qui permet de simplifier la variation du substrat

$$\frac{d\sigma}{d\tau} \approx \left(\frac{1}{\epsilon}-\sigma\right)\rho - \frac{\delta\chi}{\epsilon}$$

Si $\delta=1$ et si χ est une fonction exponentielle du temps, on obtient la loi de disparition du substrat durant la croissance exponentielle. Pour δ différent de l'unité et χ non-exponentielle, on devra considérer d'autres cinétiques de disparition du substrat. Toutefois, on admettra que la croissance non-limitée est asymptotiquement exponentielle et que δ doit tendre vers 1, quand bien même, sa convergence n'est pas *a priori* forcément monotone. La croissance exponentielle est donc supposée exister et être observable après un temps d'adaptation suffisant.

Croissances initialement limitées. Dans les calculs effectués à l'état stationnaire, il est fréquent d'utiliser la simplification

$$S_f - \tilde{S} \approx S_f \quad \Leftrightarrow \quad 1 - \epsilon\tilde{\sigma} \approx 1$$

pour autant que le taux de dilution ne soit pas trop proche du taux de lessivage. On va généraliser cette simplification aux situations de croissance non-stationnaire et on parviendra à subdiviser le plan (ρ,χ) en quatre domaines munis de propriétés différentes vis-à-vis des transitions possibles.

Lorsque le substrat est initialement limitant avec σ de l'ordre de grandeur de l'unité, la dynamique du substrat peut parfois être subdivisée en deux mouvements, l'un rapide, l'autre lent. La validité de cette hiérarchisation de la dynamique du substrat sera soumise à des

conditions que l'on exposera plus loin. Introduisons le nouveau temps caractéristique

$$\tau^* = \frac{\tau}{\epsilon}$$

qui permet de décrire des phénomènes de deux à cinq ordres de grandeur plus rapides que l'accroissement de la biomasse (qui correspond au temps caractéristique $\tau = r_{exp}t$). Sur cette nouvelle échelle temporelle, la variation de la biomasse peut être négligée, et la biomasse sera considérée comme une constante $\overline{\chi}$. On postulera que la variation de δ est également négligeable et l'on considérera δ constant. La variation du substrat se récrit

$$\frac{d\sigma}{d\tau^*} = (1-\epsilon\sigma)\rho - \delta\varphi(\sigma)\overline{\chi}$$

et peut être simplifiée en faisant tendre ϵ vers zéro

$$\frac{d\sigma}{d\tau^*} = \rho - \delta\varphi(\sigma)\overline{\chi}$$

Pour être intégrée, cette équation simplifiée demanderait l'introduction d'une formulation explicite de la fonction de saturation $\varphi(\sigma)$. Contentons-nous d'observer que la solution quasi-stationnaire de cette équation $(\overline{\chi};\overline{\sigma})$ satisfait

$$\rho = \delta\varphi(\overline{\sigma})\overline{\chi}$$

et que cette solution quasi-stationnaire constitue un attracteur stable du fait de la valeur positive attribuée à la dérivée partielle $\partial\varphi/\partial\sigma$.

Le prélèvement d'un échantillon dans une culture équivaut à soumettre instantanément la culture contenue dans l'échantillon à un taux de dilution nul. Le mouvement rapide qui s'ensuit va amener le substrat à disparaître, de cent à cent-mille fois plus rapidement que le temps de génération de la culture. D'où la quasi impossibilité technique de mesurer les concentrations de substrats résiduels dans des cultures de densité élevée. Une bonne méthode expérimentale permettant de déterminer le substrat résiduel repose sur l'utilisation de cultures de très faible densité, c'est-à-dire en choisissant S_f proche de K_s. ϵ est alors suffisamment proche de l'unité pour faire disparaître la hiérarchisation de la dynamique et par là-même le mouvement rapide.

Revenons à l'échelle temporelle caractéristique de la croissance, pour laquelle la variation du substrat

$$\epsilon \frac{d\sigma}{d\tau} = (1-\epsilon\sigma)\rho - \delta\varphi(\sigma)\chi$$

peut également être simplifiée en faisant tendre ϵ vers zéro. La variation de σ est alors négligée par rapport aux autres termes, elle n'est pas pour autant nulle (le même type d'approximation est effectué dans le modèle de Michaelis-Menten, Reich & Sel'kov 1974). On obtient

$$\rho - \delta\varphi(\sigma)\chi = 0.$$

Ainsi l'équation différentielle se réduit à une équation algébrique, à laquelle satisfait la solution quasi-stationnaire du mouvement rapide. Cette équation algébrique peut encore être récrite sous la forme

$$\delta\varphi(\sigma) = \frac{\rho}{\chi}.$$

qui permettra de remplacer l'expression de la consommation, $\delta\varphi(\sigma)$ par ρ/χ dans les expressions du déterminisme de la croissance. Ceci constitue une simplification très appréciable puisque tant l'expression explicite de la fonction de saturation que la valeur de δ n'auront plus besoin d'être connues. Mais, cette subdivision de la dynamique en deux composantes temporelles ne sera applicable que si les trois conditions suivantes sont respectées: ϵ suffisamment petit, σ initialement de l'ordre de grandeur de l'unité, et surtout

$$\chi > \frac{\rho}{\delta} \quad \text{puisque} \quad \varphi(\sigma) < 1 \quad \text{par définition.}$$

Ce dernier critère va fixer la limite inférieure de ce que l'on appellera le <u>domaine I</u> du plan (ρ,χ). Trois autres domaines vont pouvoir être définis au-dessous de cette limite.

Quand le critère d'appartenance au domaine I n'est pas satisfait, c'est-à-dire lorsque $\chi < \rho/\delta$, mais que le substrat est de l'ordre de grandeur de l'unité, sa concentration doit augmenter

$$\epsilon \frac{d\sigma}{d\tau} = (1-\epsilon\sigma)\rho - \delta\varphi(\sigma)\chi \approx \rho - \delta\varphi(\sigma)\chi > 0 \quad \text{puisque} \quad \rho > \delta\varphi(\sigma)\chi.$$

Cette situation va très certainement conduire le système vers un mode de croissance non-

limité. *A fortiori* une transition initialement non-limitée ne peut voir apparaître la limitation (avec σ de l'ordre de grandeur de l'unité) dans ce domaine.

Si la limite inférieure du domaine I constitue la première condition qui délimite le domaine II, une autre condition, à savoir ρ pas trop voisin du taux de lessivage, doit être introduite. En effet, tant les données expérimentales que l'étude des modèles classiques montrent que la concentration du substrat à l'état stationnaire s'élève fortement lorsque le taux de dilution s'aproche du taux de lessivage, ou, dans la notation sans dimension,

$$\tilde{\sigma} \to \frac{1}{\epsilon} \quad \text{lorsque} \quad \rho \to \rho_{wo}$$

où ρ_{wo} est le taux de dilution pour lequel la culture est lessivée ($\rho_{wo} \simeq 1$). On va donc borner le domaine II par un taux de dilution critique, ρ_{cr}, un peu inférieur à ρ_{wo}, et au-dessus duquel la propriété σ stationnaire de l'ordre de grandeur de l'unité ne sera plus applicable. Pour un modèle donné, on peut généralement définir ρ_{cr} en fonction de la biomasse stationnaire et de ϵ.

La définition du domaine III découle des observations qui précèdent. C'est le domaine du plan (ρ,χ) compris entre les taux de dilution ρ_{cr} et ρ_{wo}, pour des biomasses inférieures à ρ/δ. La dynamique du système dans ce domaine est compliquée et le concept de limitation devient ambigu: la concentration du substrat stationnaire est beaucoup plus grande que la constante d'affinité de la bactérie et simultanément une éventuelle variation de la concentration du substrat limitant n'a que peu d'effet sur le taux de consommation. En fait, tant l'expression explicite de la fonction de consommation que celle du déterminisme de la croissance serait nécessaire pour prédire le comportement de la culture. De plus, ce domaine est difficile à étudier expérimentalement, les mesures de biomasse pouvant être fortement influencées par la croissance sur les parois (Topiwala & Hamer, 1971) et les contraintes techniques relatives à la stabilisation des flux y rendent les expériences *a priori* difficilement reproductibles. Perram (1973) a étudié théoriquement les temps de relaxation de culture continue au voisinage du taux de lessivage. Ils peuvent être excessivement longs, de beaucoup supérieurs à ce que l'on observe pour des taux de dilution "moyens". Comme ce domaine III ne nous intéressera pas expérimentalement, nous renvoyons le lecteur à l'article de Perram pour tout complément d'information.

Enfin, pour être complet, on doit définir un domaine IV pour les taux de dilution supérieurs à ρ_{wo}, domaine dans lequel la limitation par le substrat doit disparaître rapidement et le taux de dilution élevé entraîner le lessivage de la biomasse.

Le plan (ρ,χ). La figure 1 présente un exemple de subdivision du plan (ρ,χ) en ses quatre domaines, d'après une distribution de la biomasse stationnaire obtenue en considérant un déterminisme de croissance de la forme

$$\mu = \varphi,$$

et qui n'est autre que celui du modèle de Monod (rendement constant et égal à 1 dans la notation sans dimension, ainsi que δ constant et égal à 1). De plus pour calculer cet exemple, on a choisi $\varphi(\sigma)$ hyperbolique et $\epsilon=10^{-3}$. Le taux de dilution critique est défini ici comme celui pour lequel la biomasse stationnaire est égale au taux de dilution (sans dimensions). Pour cette exemple, les deux taux de dilution caractéristiques ne dépendent que de ϵ et prennent les valeurs

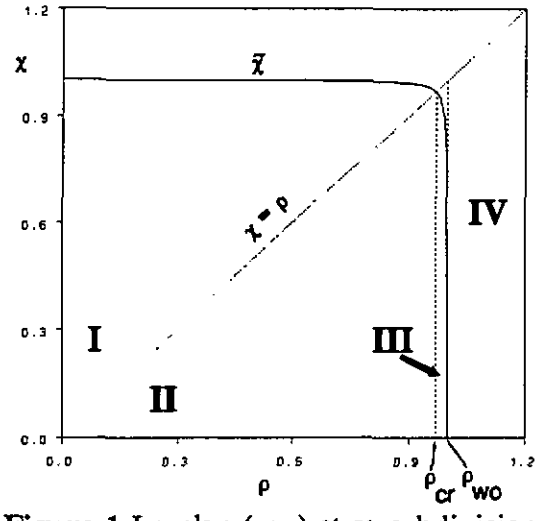


Figure 1 Le plan $(\rho;\chi)$ et sa subdivision en quatre domaines. Biomasse stationnaire du modèle de Monod (———).

$$\rho_{cr} = 1+\frac{\epsilon}{2}-\sqrt{\epsilon^2+4\epsilon} \quad \text{et} \quad \rho_{wo} = \frac{1}{1+\epsilon}$$

Domaine	Critère sur χ	Critère sur ρ	Propriétés
I	$\chi > \rho/\delta$		Transitions limitées, jusqu'à l'état stationnaire si $\rho<\rho_{cr}$,
II	$\chi < \rho/\delta$	$\rho < \rho_{cr}$	Transitions rapidement non-limitées. Pas d'état stationnaire dans ce domaine.
III	$\chi < \rho/\delta$	$\rho_{cr} < \rho < \rho_{wo}$	Transitions dépendant de l'expression explicite de la fonction de saturation
IV	$\chi < \rho/\delta$	$\rho_{wo} < \rho$	Lessivage de la culture

Le tableau ci-dessus résume les définitions des quatre domaines et les propriétés que l'on

peut attendre de la dynamique de la culture, étant entendu que le substrat est initialement limitant et de l'ordre de grandeur de la constante d'affinité

Approximation de la biomasse stationnaire. La biomasse stationnaire s'exprime par

$$\tilde{\chi} = \frac{\rho}{\delta\varphi(\tilde{\sigma})}(1-\epsilon\tilde{\sigma})$$

Il est souhaitable d'introduire ici une approximation de la biomasse stationnaire χ_∞ définie par

$$\chi_\infty = \frac{\rho}{\delta\varphi(\tilde{\sigma})} \quad \Leftrightarrow \quad \chi_\infty(1-\epsilon\tilde{\sigma}) = \tilde{\chi}$$

et qui représente la biomasse stationnaire qui serait formée si tout le substrat était consommé. Dans le domaine I, χ_∞ est expérimentalement non distinguable de χ stationnaire pour ϵ suffisamment petit. Par ailleurs, χ_∞, est défini comme un taux de dilution divisé par un taux de consommation stationnaire, ce qui n'est rien d'autre que le rendement de la croissance stationnaire. Toutefois, cette égalité entre le rendement et χ_∞ est strictement limitée au cas où le facteur limitant parvient à la culture par l'apport de milieu. Le cas de la limitation par l'hydrogène est différent; néanmoins, la propriété $\chi_\infty=1$ pour $\rho=1$ demeure valable et permet de construire $\chi_\infty(\rho)$ même si le substrat limitant est un gaz.

Quelques transitions. Nous allons dorénavant restreindre notre approche aux seuls domaines I et II, et dans la mesure où l'on ne travaillera pas à des taux de dilution trop voisins du taux de lessivage, on pourra confondre la biomasse stationnaire avec χ_∞. Pour un taux de dilution donné (ρ constant), les transitions se dérouleront sur une ligne verticale dans le plan $(\rho;\chi)$. Trois genres de transitions seront considérés, qui résultent tous d'une modification ponctuelle des conditions de culture: (1) la modification du taux de dilution, (2) la modification de la concentration du facteur limitant dans l'apport de milieu et (3) la suppression de la limitation par injection dans la culture d'une solution concentrée de facteur limitant.

La modification du taux de dilution peut être interprétée dans le plan (ρ,χ) comme un déplacement horizontal de la biomasse initiale. La figure 2 présente ce plan et une distribution arbitraire de la biomasse stationnaire χ_∞, ainsi que la séparation entre les domaines I et II pour $\delta=1$. La flèche noire allant vers la gauche correspond à l'abaissement soudain du taux de dilution appliqué sur une culture à l'état stationnaire. La transition qui

s'ensuit (flèche blanche) tendra "vers le bas" sur un nouvel état stationnaire. Dans la mesure où cette transition se déroule uniquement dans le domaine I, elle sera continuellement limitée. L'augmentation du taux de dilution déplace la biomasse initiale vers la droite et dans l'exemple présenté devrait engendrer une transition limitée "vers le haut". En considérant une augmentation du taux de dilution supérieure à celle présentée on pourrait déplacer la biomasse jusque dans le domaine II, où alors une transition momentanément non-limitée devrait se produire.

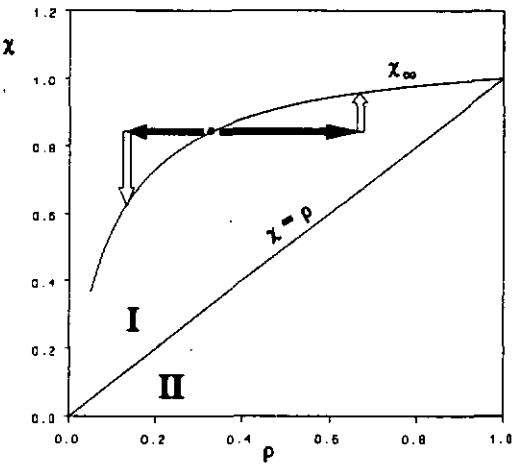


Figure 2 Effet du changement du taux de dilution (⇐,⇒) dans le plan ($\rho;\chi$) et localisation des transitions qui s'ensuivent (⇓, ⇑).

La modification de la concentration du facteur limitant dans l'apport de milieu affecte le calcul de la biomasse sans dimension. Par exemple, l'augmentation soudaine de la concentration du facteur limitant dans l'apport de milieu redéfinit instantanément une biomasse avec une valeur inférieure. La figure 3 présente le plan ($\rho;\chi$) et une distribution arbitraire des biomasses stationnaires χ_∞. En admettant une augmentation de 50% de la concentration du facteur limitant sur des cultures initialement à l'état stationnaire, la distribution des biomasses initiales après le changement χ_0 doit être exprimée par

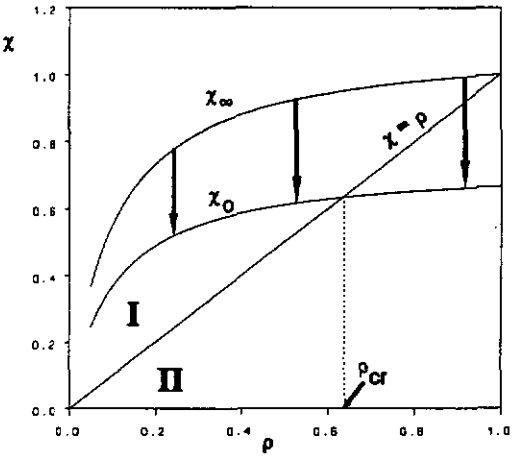


Figure 3 Effet de l'augmentation de 50% de la concentration du facteur limitant dans l'apport de milieu sur la distribution des biomasses initiales.

$$\chi_0 = \frac{2}{3}\chi_\infty$$

où χ_∞ et χ_0 sont calculés avec la concentration du facteur limitant après le changement. Ces transitions seront continuellement limitées pour les faibles taux de dilution et momentanément non-limitées pour les plus hauts taux de dilution. On peut d'ailleurs définir facilement le taux de dilution critique ρ_{cr} au-dessous duquel les transitions demeurent continuellement limitées

$$\rho_{cr} = \delta\chi_0$$

et qui dépend à la fois de δ et de l'augmentation de la concentration du facteur limitant considérée qui affecte le calcul de χ_0.

Le plan $(\rho;\chi)$ n'est pas utilisable pour classer les transitions résultant de la suppression de la limitation par injection dans la culture d'une solution concentrée du facteur limitant, puisque la condition σ initialement limitant n'est plus réalisée. On mentionnera cependant que la réapparition ultérieure de la limitation ne pourra se produire que dans le domaine I. Pour traiter ce type de transitions on s'intéressera en particulier aux taux initiaux de croissance, μ^0, que l'on aura intérêt à représenter dans le plan: $(\rho;\mu^0)$.

Variation de δ. Jusqu'ici nous avons toujours négligé la variation du terme δ en considérant celui-ci égal à 1. Or ce terme δ apparaît dans l'expression de la séparation entre les domaines I et II d'équation $\chi=\rho/\delta$. On supposera que l'on puisse mesurer la valeur de δ pour des cultures à l'état stationnaire, et que l'on puisse ainsi construire la distribution de δ en fonction du taux de dilution. Par exemple, considérons une distribution, $\delta(\rho)$, sur une droite de pente k et d'équation

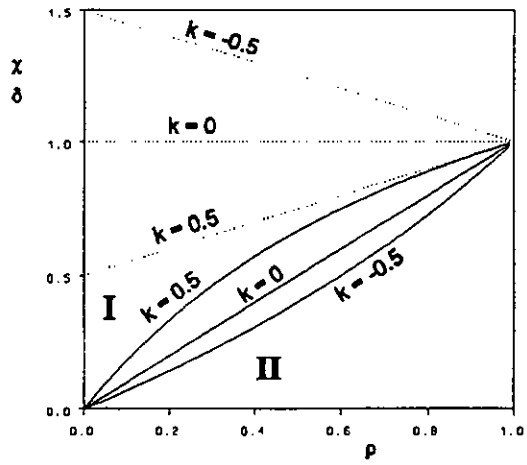


Figure 4 Effet de la variation de δ (...) sur la localisation de la séparation entre les domaines I et II (———).

$$\delta(\rho) = 1-k(1-\rho)$$

afin de vérifier $\delta=1$ en $\rho=1$. On peut alors recalculer la distribution des biomasses qui forme la séparation entre les domaines I et II et qui est fonction de ρ

$$\chi(\rho) = \frac{\rho}{\delta(\rho)} = \frac{\rho}{1+k(1-\rho)}$$

La figure 4 présente les distributions de δ pour trois valeurs de k, ainsi que les déplacements de la séparation entre les domaines I et II qui en résultent. Lorsque δ est plus grand que 1, la séparation entre les domaines I et II est déplacée vers des taux de dilution supérieurs. En particulier, pour les transitions obtenues par augmentation de la concentration du facteur limitant dans l'apport de milieu, on observera une augmentation du taux de dilution critique

défini précédemment.

La distribution de la biomasse stationnaire χ_∞ doit se trouver entièrement comprise dans le domaine I. Pour ρ donné, il existera une valeur minimale de δ telle que la biomasse stationnaire soit à la limite inférieure du domaine I. Il existe donc une distribution des valeurs minimales, $\delta_{min}(\rho)$ au-dessus de laquelle doit se trouver δ pour assurer l'existence d'un état stationnaire avec une biomasse, χ_∞, non-nulle

$$\delta_{min}(\rho) = \frac{\rho}{\chi_\infty}$$

et au-dessous de laquelle la biomasse est lessivée. Il est à noter qu'en $\rho=1$, $\delta_{min}=1$ qui fixe le taux de croissance exponentielle $\mu=1$. Le lecteur se reportera à Pagni (1986) pour des exemples de simulations de ces phénomènes et une brève discussion des implications biologiques de ces observations.

En résumé, δ détermine la position de la séparation entre les domaines I et II. Le rôle joué par δ est toujours négligeable dans le domaine I, alors qu'il est essentiel pour comprendre la dynamique de la croissance dans le domaine II.

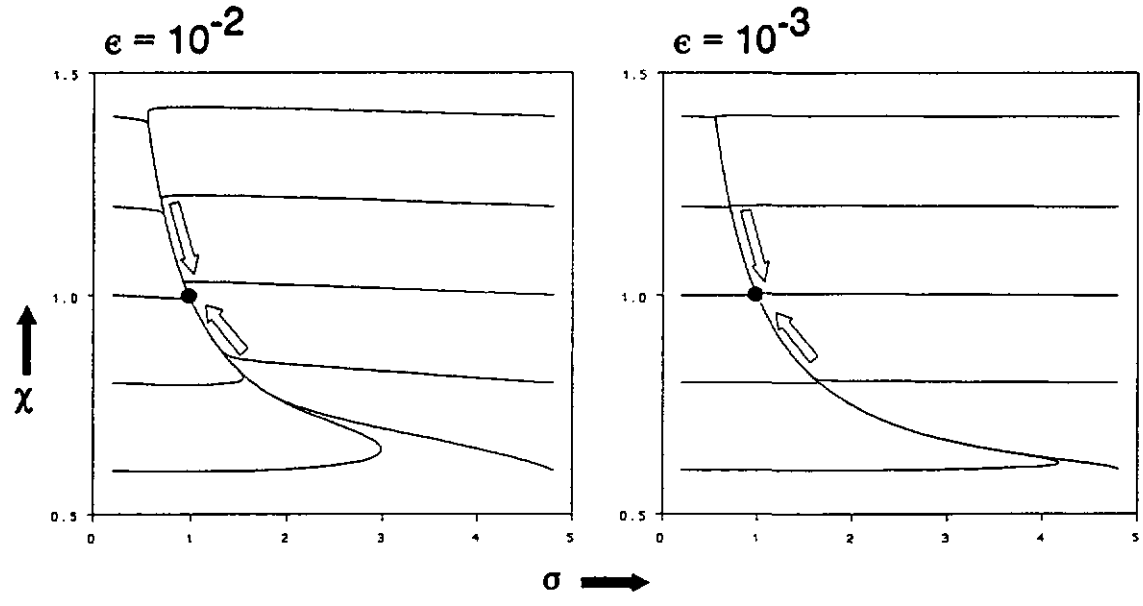


Figure 5 Espace de phase $(\sigma;\chi)$ du modèle de Monod et dix trajectoires menant à l'état stationnaire (●) pour $\delta = 1$, $\rho = 0.5$, $\varphi(\sigma)$ hyperbolique et deux valeurs de ϵ.

Les modèles de Monod et de Pirt. Le déterminisme de croissance le plus simple est celui

proposé par Monod et que avons déjà introduit dans la notation sans dimension par $\mu=\varphi$ et $\delta=1$. Le taux de croissance est égal à la consommation, le rendement est donc constant (et vaut 1 dans la notation sans dimension). La figure 5 présente le plan de phase $(\sigma;\chi)$ et différentes trajectoires résultant de l'intégration numérique du modèle de Monod, avec une fonction de saturation hyperbolique. On remarquera les trajectoires initiales quasi horizontales qui correspondent aux mouvements rapides du substrat, et les trajectoires quasi hyperboliques où se déroule le mouvement lent. La séparation du système en deux composantes temporelles est d'autant mieux marquée que ϵ est petit. La nature quasi-hyperbolique des trajectoires du mouvement lent est liée au choix arbitraire de l'expression explicite de la fonction de saturation.

En utilisant l'approximation qui relie la fonction de saturation à la biomasse, $\delta\varphi(\sigma)=\rho/\chi$, applicable dans le domaine I si le substrat est initialement limitant, on peut récrire la variation de la biomasse

$$\frac{d\chi}{d\tau} = (\delta\varphi(\sigma)-\rho)\chi \sim \left(\frac{\rho}{\chi}-\rho\right)\chi = \rho(1-\chi)$$

et résoudre cette équation différentielle

$$\chi(\tau)=\chi_\infty+(\chi(0)-\chi_\infty)\,e^{-\rho\tau} \quad \text{où} \quad \chi_\infty = 1$$

La figure 5 présente un exemple de comparaison entre cette solution et des intégrations numériques du modèle complet pour différentes valeurs de ϵ. L'erreur commise est de l'ordre de grandeur de ϵ. Pour ϵ inférieur à 10^{-2}, les solutions complètes et la prédiction simplifiée se confondent par rapport aux erreurs expérimentales.

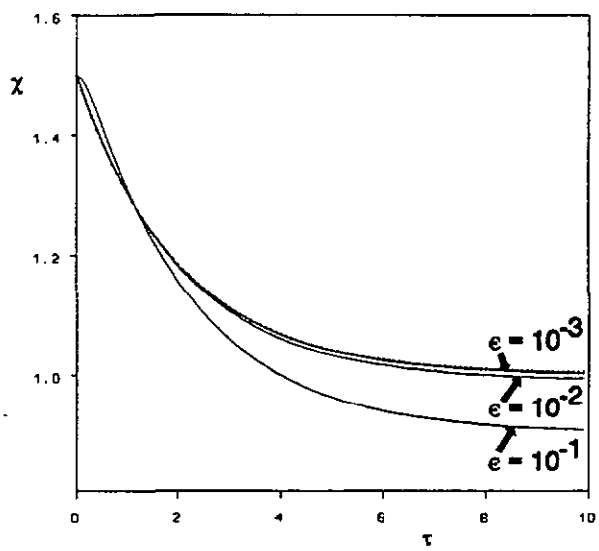


Figure 6 Comparaison entre l'intégration numérique du modèle de Monod (————) avec $\rho = 0.5$ et différentes valeurs de ϵ et l'approximation de la transition (....).

Il est envisagé depuis longtemps (Duclaux, 1898) qu'une partie du substrat consommé sert au maintien de la biomasse, c'est-à-dire qu'une certaine quantité du substrat

consommé est utilisée indépendamment du taux de croissance. La formulation de ce concept la plus largement utilisée est celle introduite par Pirt (1965)

$$q = \frac{D}{Y_{max}} + m$$

où Y_{max} est appelé "vrai" rendement de croissance et m coefficient de maintenance. Une formulation plus ancienne du même concept est celle introduite par Herbert (1958)

$$r = r_g \varphi(\sigma) - r_e$$

où r_g est un "taux de croissance" et r_e le taux (constant) du métabolisme endogène. La formulation de Herbert nous semble préférable, puisqu'elle introduit le concept de maintenance dans le déterminisme de la croissance et non dans celui de la consommation. Mais, comme discuté par Esener et al. (1983) et par Beeftink et al.(1990), ces deux approches sont équivalentes dans la mesure où elles conduisent à la même dépendance du rendement de croissance sur le taux de croissance. Comme l'usage du modèle de Pirt s'est davantage répandu parmi les microbiologistes, nous nous limiterons à utiliser ce formalisme.

Le modèle de Pirt n'a d'abord été appliqué qu'à des états stationnaires. Plus récemment, il a été utilisé pour traiter des "transitions" dans des cultures en "fed batch" et dans des fermenteurs à recyclage de biomasse (van Verseveld et al., 1984), bien que la validité de cette relation fût citée préalablement comme sujette à caution en dehors des états stationnaires (Esener et al., 1983)! Afin de tester le modèle de Pirt durant les transitions en culture continue, on introduira le déterminisme de la croissance de ce modèle dans la notation sans dimension au moyen de

$$\mu = (1+\xi)\delta\varphi(\sigma) - \xi \quad \text{avec} \quad \xi = \frac{Y_{max} m}{r_{exp}}$$

Comme précédemment on peut reformuler la variation de la biomasse limitée dans le domaine I

$$\frac{d\chi}{d\tau} = ((1+\xi)\delta\varphi(\sigma) - \xi - \rho)\chi \sim \left((1+\xi)\frac{\rho}{\chi} - \xi - \rho\right)\chi = \rho(1+\xi) - (\rho+\xi)\chi$$

et résoudre cette équation différentielle

$$\chi(\tau) = \chi_\infty + (\chi(0) - \chi_\infty)\, e^{-(\rho+\xi)\tau} \quad \text{avec} \quad \chi_\infty = \rho \frac{1+\xi}{\rho+\xi}$$

Les modèles de Monod et de Pirt conduisent tous deux à une description des transitions limitées au moyen de cinétique de 1er ordre. Celles-ci peuvent se récrire dans les unités habituelles

$$X(t) = X_\infty + (X_0 - X_\infty)\, e^{-R\cdot t}$$

et se distinguent par l'expression de la biomasse stationnaire

$$\text{Monod:} \quad X_\infty = \frac{S_f D}{Y_{exp}}, \qquad \text{Pirt:} \quad X_\infty = \frac{S_f D}{\frac{D}{Y_{max}} + m}$$

et surtout par l'exposant de l'exponentielle, que l'on appellera le taux de relaxation R

$$\text{Monod:} \quad R = D, \qquad \text{Pirt:} \quad R = D + Y_{max} m$$

Les taux de relaxation prédits par le modèle de Pirt sont systématiquement plus grands que ceux prédits par le modèle de Monod.

Pour conclure ce chapitre, on citera une des conclusions de Minkevich & Utkina: *"(...) The second result (which is, in our opinion, more interesting) consists of clearly identifying two scales of transient rates. The existence of time hierachy is often associated with the concept that processes occuring with considerably different rate have a different material basis (e.g., the action of enzyme, population growth, and mutations). In the present example of time hierarchy on one structured level-population, existence of rapide and slow transients and the line of slow movement on the phase plane make the picture of continuous culture dynamics more clear and simple. New regularities became apparent, which should direct further culture investigation and control"*

BASES THEORIQUES III: COMPLEMENTS

Ce chapitre est destiné à compléter la partie théorique de ce travail et ne concerne pas directement les expériences reportées plus loin. Nous présenterons certaines propriétés intéressantes d'un modèle structuré extrêmement simple: le modèle de Nyholm. On discutera ensuite de la croissance sur un substrat toxique ainsi que de la double limitation, qui sont deux exemples caractéristiques pour lesquels l'approche "selon Monod" conduit à des prédictions douteuses. Enfin, on donnera la démonstration de la stabilité des états stationnaires du modèle non-structuré considéré jusqu'ici.

Le modèle de Nyholm. Ce modèle (Nyholm, 1976) est parmi les plus simple des modèles structurés. Il a été formulé pour la limitation de la croissance par un élément trace, oligo-élément ou vitamine. Il s'apparente fortement aux modèles incluant un quota cellulaire ("cell quota"). Un unique compartiment est introduit dans la biomasse pour représenter le pool de l'élément trace considéré. Ce compartiment va déterminer la croissance et, simultanément, il va être utilisé par celle-ci. La biomasse elle-même est supposée se composer d'une part constante de cet élément trace (part structurelle), mais qui n'apparaît pas explicitement dans le modèle. On désignera par Z la concentration par unité de biomasse du pool de l'élément trace considéré, dont la variation s'exprime par

$$\frac{dZ}{dt} = (\theta+1)\,\delta\varphi(\sigma) - \theta Z - \mu Z .$$

Le compartiment Z est rempli par la consommation de l'élément trace considéré, il est utilisé par la croissance proportionnellement à sa concentration et à une constante θ, *a priori* de l'ordre de grandeur de l'unité, enfin il subit la dilution par la croissance $-\mu Z$ (Fredrickson, 1976). La constante $\theta+1$ placée devant le terme de consommation a été choisie de sorte que le modèle permette une croissance exponentielle non-limitée pour laquelle

$$\delta = 1, \quad \varphi(\sigma) \approx 1, \quad \mu = 1 \quad \text{et donc} \quad Z = 1$$

ce qui permet de considérer une expression particulièrement simple du déterminisme de la croissance

$$\mu = Z.$$

Nous parvenons donc à un système de trois équations différentielles: les variation de χ et de σ présentées précédemment et celle de Z que l'on vient d'introduire. Le déterminisme de la croissance est plus complexe que ceux envisagés auparavant, puisque le taux de croissance dépend de Z, lui-même dépendant de la consommation et de la croissance. Les solutions stationnaires de ce système prennent les valeurs

$$\tilde{\chi} = \frac{\theta+1}{\theta+\rho}(1-\epsilon\tilde{\sigma}), \quad \tilde{Z} = \rho \quad \text{et} \quad \varphi(\tilde{\sigma}) = \rho\frac{\theta+\rho}{\theta+1}.$$

On voit apparaître la caractéristique principale de la limitation par un élément trace, à savoir que la biomasse stationnaire approximée χ_∞ est située sur une branche d'hyperbole décroissante en fonction de ρ

$$\chi_\infty = \frac{\theta+1}{\theta+\rho}$$

Nous avons précédemment signalé que θ était postulé de l'ordre de grandeur de l'unité (il n'est pas intéressant de considérer un flux sur Z très important: les comportements du modèle de Nyholm tendraient alors vers ceux du modèle de Monod). Donc, le temps caractéristique de la variation de Z est du même ordre de grandeur que celui de la variation de la biomasse et par conséquent les mouvement rapides du système complet ne concernent à nouveau que le substrat. Il s'ensuit que la variation de la biomasse limitée dans le domaine I du plan $(\rho;\chi)$, et celle de Z, s'écrivent sous forme d'un système de deux équations différentielles

$$\frac{d\chi}{d\tau} = (Z-\rho)\chi$$

$$\frac{dZ}{d\tau} = (\theta+1)\frac{\rho}{\chi} - \theta Z - Z^2$$

qui peut être résolu. Les transitions limitées sont alors décrites par

$$\chi(\tau) = \chi_\infty + (\chi_0-\chi_\infty)e^{-\rho\tau} + \frac{Z_0\chi_0-\tilde{Z}\chi_\infty}{\theta}e^{-\rho\tau}(1-e^{-\theta\tau})$$

avec Z_0 la valeur initiale de Z. Ainsi, le comportement de la biomasse va dépendre de son état physiologique initial Z_0, comme il est montré sur la figure 7. Pour des petites valeurs de Z_0, il apparaît une phase de "latence" en début de transition. Pour des valeurs de Z_0

proches de l'unité, la biomasse est particulièrement bien préconditionnée et débute sa transition avec un taux de croissance proche du taux exponentiel. Le déterminisme de la croissance n'est plus seulement fonction de l'environnement (φ), mais également de l'"état", ou encore de la composition de la biomasse (Z_0). C'est là une particularité essentielle des modèles structurés. Expérimentalement, l'apparition de phases de latence devrait nous conduire à en chercher l'explication dans la structure ou dans l'"état" de la biomasse.

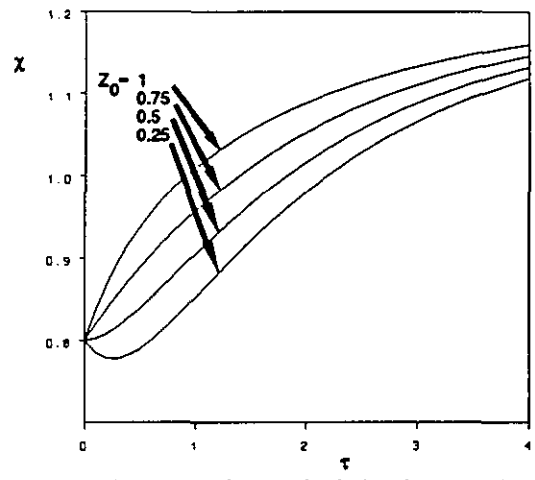


Figure 7 Transitions limitée du modèle de Nyholm, $\rho = 0.5$, $\theta = 2$.

Inhibitions par le substrat. Lorsque l'on exprime le taux de croissance comme une fonction de la concentration du substrat, on confond les déterminismes de croissance et de consommation. Mais la description de la croissance n'est alors pas encore complète et une deuxième hypothèse doit être formulée soit sur la consommation soit sur le rendement.

Un certain nombre de modèles ont été proposé pour la croissance sur des substrats toxiques, par exemple selon Edwards (1970)

$$r = r_{ref} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$$

avec r_{ref} un taux de croissance de référence, K_s une constante d'affinité et K_i une constante d'inhibition. En suivant l'approche selon Monod, le rendement de croissance est postulé constant. Ce faisant, on admet implicitement que le taux de consommation dépend de la concentration du substrat d'une façon analogue à celle introduite pour le taux de croissance. L'inhibition par le substrat est alors implicitement postulée comme affectant le système de consommation.

On peut émettre d'autres hypothèses quant au rendement ou à la consommation, sans violer la formulation d'Edwards pour le taux de croissance. Supposons que la consommation du substrat n'est justement pas inhibée par des concentrations élevées de celui-ci et qu'une expression du type Michaelis-Menten décrive effectivement la consommation

$$q = q_{ref}\frac{S}{K_s+S}.$$

Il s'ensuit que le rendement de la croissance va implicitement dépendre de la concentration du substrat

$$Y = \frac{r}{q} \quad \text{donc} \quad Y = Y_{ref}\frac{K_s+S}{K_s+S+\frac{S^2}{K_i}}$$

qui est une fonction décroissante en S et qui reflète l'intoxication des cellules par le substrat consommé, ou par l'un de ses métabolites.

Le méthanol est typiquement un substrat toxique à concentration élevée. Brooke et al. (1989) présentent les conséquences d'une injection de méthanol sur une culture continue stationnaire limitée par celui-ci. Le méthanol est alors rapidement consommé et la culture s'auto-empoisonne du fait de l'excrétion de formaldéhyde. De toute évidence, dans cet exemple, la consommation n'est pas inhibée par le substrat.

La toxicité du substrat peut donc affecter sa consommation ou au contraire le rendement de la croissance, c'est évident. Mais, à notre connaissance, ce point n'a jamais été clairement discuté dans la littérature consacrée à la modélisation de ce sujet: la toxicité est toujours implicitement supposée affecter la consommation.

Doubles limitations. On retrouve les mêmes conséquences malheureuses de l'ordre dans lequel on formule les hypothèses sur les déterminismes dans la littérature concernant la modélisation de la double limitation. La nature des substrats considérés exerce une profonde influence sur la nature des doubles limitations. On ne s'intéresse ici qu'au cas des substrats "entièrement complémentaires" d'après la terminologie de Pavlou & Fredrickson (1989), c'est-à-dire de nutriments qui ne peuvent être substitués l'un à l'autre.

Bader et al. (1975) et Bader (1978) discutent des conditions nécessaires pour l'obtention de cultures continues doublement limitées, par exemple par le glucose et l'ammonium. Ils introduisent explicitement un déterminisme de croissance égal au produit de deux fonctions de saturation

$$r = r_{exp} \frac{S_1}{K_{S1}+S_1} \frac{S_2}{K_{S2}+S_2}$$

et admettent ensuite que le rendement de croissance sur chacun des substrats est constant. Ils introduisent alors chaque taux de consommation comme étant égal au taux de croissance divisé par le rendement sur le substrat considéré. On ne peut pas être plus conforme à l'esprit du modèle de Monod. Malheureusement, les déterminismes de consommation ainsi implicitement définis sont plutôt curieux: le taux de consommation de chaque substrat est proportionnel au produit de deux fonctions de saturation et la consommation d'un substrat dépend de la concentration de l'autre substrat, et réciproquement.

Sur cette base théorique, Bader et al. parviennent à la conclusion que des cultures doublement limitées ne peuvent exister que dans une fourchette dramatiquement étroite de rapports de concentration des facteurs limitants dans l'apport de milieu. Or, les expériences de doubles limitations reportées à ce jour ont toutes montré que cette fourchette peut être très large (ethanol:ammonium, Krynitskaya et al., 1985; methanol:ammonium, Gräzer-Lampart et al., 1986, Duchars & Attwood, 1989; glucose:ammonium, Rutgers et al., 1990; méthanol,glucose:ammonium, Egli & Quayle, 1986). L'"erreur" commise par les premiers auteurs réside à nouveau dans une formulation implicite des déterminismes de consommation.

Si l'on reconsidère le problème en introduisant d'abord des déterminismes de consommation "simples" où la consommation d'un substrat ne dépend que de sa propre concentration et ensuite un déterminisme de croissance qui est proportionnel au produit des deux taux de consommation, ont parvient à des conclusions beaucoup plus compatibles avec les observations expérimentales. En effet, la double limitation peut alors s'observer dans une large fourchette de taux de dilution que l'on peut démontrer obéissant à

$$\gamma_q \rho < \gamma_s < \frac{\gamma_q}{\rho} \quad \text{avec} \quad \gamma_q = \frac{q_{exp2}}{q_{exp1}} \quad \text{et} \quad \gamma_s = \frac{S_{f2}}{S_{f1}}$$

et qui est d'autant plus large que le taux de dilution est faible. Le développement de ce modèle ne sera pas présenté ici car hors du cadre de ce travail.

Cette exemple illustre une fois encore la nécessité de séparer clairement les déterminismes de consommation et de croissance. Il met bien en évidence les risques d'une approche "selon Monod" même pour des modèles comportant une biomasse non-structurée.

La stabilité de l'état stationnaire. La stabilité des états stationnaires de très nombreux modèles de culture continue a déjà été étudiée (Bazin, 1981; Mac Donald, 1982). La plupart de ces modèles ne comportent qu'un unique point stationnaire stable, ce qui est conforme à la majorité des observations expérimentales. Deux exceptions sont cependant à mentionner. D'une part, certaines situations de double limitation (glucose:oxygène ou ammonium:oxygène) semblent conduire à des cycles limites avec des périodicités de quelques minutes (Harrison & Pirt, 1967). D'autre part, des cultures de *Saccharomyces cerevisiae* limitées par le glucose sont connues pour parfois exhiber des oscillations entretenues; l'explication et la modélisation de ce phénomène impliquent la prise en compte du cycle cellulaire, constitué de phases nettement différentiées (Heinzle et al., 1982; Strässle et al. 1988; Cazzador, 1991). L'apparition d'oscillations autonomes ne semble pas avoir été observée chez les procaryotes où les différentes phases du cycle cellulaire sont probablement moins nettement différentiées.

Nous démontrerons ici la stabilité de l'état stationnaire du système d'équation caractéristique de la classe de modèles non-structurés que nous considérons

$$\frac{d\chi}{d\tau} = (\mu-\rho)\chi$$

$$\epsilon\frac{d\sigma}{d\tau} = (1-\epsilon\sigma)\rho-\delta\varphi(\sigma)\chi.$$

La stabilité des solutions stationnaires non nulles

$$\tilde{\chi} > 0 \quad \text{et} \quad \frac{1}{\epsilon} > \tilde{\sigma} > 0$$

se démontre par la méthode de linéarisation du système d'équations différentielles autour de l'état stationnaire (méthode de Lyapounov). Soit le Jacobien associé à ce système d'équations dont on cherche les valeurs propres λ

$$\begin{vmatrix} -\lambda & \frac{\partial\mu}{\partial\sigma}\tilde{\chi} \\ -\frac{\delta\varphi(\tilde{\sigma})}{\epsilon} & -\rho-\frac{\delta\frac{\partial\varphi}{\partial\sigma}\tilde{\chi}}{\epsilon}-\lambda \end{vmatrix} = 0$$

et qui sont solutions du polynôme caractéristique

$$\lambda^2 + \left(\rho + \frac{\delta \frac{\partial \varphi}{\partial \sigma} \tilde{\chi}}{\epsilon}\right)\lambda + \frac{\delta \varphi(\tilde{\sigma}) \frac{\partial \mu}{\partial \sigma} \tilde{\chi}}{\epsilon} = 0$$

Le point stationnaire sera un attracteur stable si les valeurs propres ont des parties réelles négatives. A la résolution de cette équation du second degré, on préférera la méthode de Routh-Hurwitz (d'après Rapp, 1980), qui prédit que les valeurs propres auront des parties réelles négatives si d'une part

$$\rho + \frac{\delta \frac{\partial \varphi}{\partial \sigma} \tilde{\chi}}{\epsilon} > 0$$

qui est vrai du fait de la définition $\varphi(\sigma)$, et d'autre part si

$$\left(\rho + \frac{\delta \frac{\partial \varphi}{\partial \sigma} \tilde{\chi}}{\epsilon}\right)\left(\frac{\delta \varphi(\tilde{\sigma}) \frac{\partial \mu}{\partial \sigma} \tilde{\chi}}{\epsilon}\right) > 0$$

qui sera vérifié pour peu que

$$\frac{\partial \mu}{\partial \sigma} = \frac{\partial \mu}{\partial \varphi}\frac{\partial \varphi}{\partial \sigma} > 0 \quad \text{donc} \quad \frac{\partial \mu}{\partial \varphi} > 0 \quad \text{puisque} \quad \frac{\partial \varphi}{\partial \sigma} > 0 \text{ par définition.}$$

On retrouve donc la condition supplémentaire que nous avons introduite pour le déterminisme de la croissance.

Il est à noter que le modèle de Monod n'admet que des valeurs propres réelles négatives. L'une d'elles vaut $-\rho$ et est égale au facteur de convergence des transitions limitées. Cette coïncidence ne se retrouve pas pour le modèle de Pirt. D'ailleurs, ce dernier modèle peut prendre des valeurs propres ayant une partie imaginaire non-nulle (Ivanitskaya et al., 1988) pour des taux de dilution très faibles et des valeurs de ϵ suffisamment grandes. Une étude numérique préalable a montré que les oscillations amorties qui en résulteraient ne peuvent en aucun cas se manifester dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées.

LA CROISSANCE EXPONENTIELLE HETEROTROPHE

Le taux de croissance. La croissance exponentielle de la biomasse en culture continue est décrite par

$$\frac{dX}{dt} = (r_{exp}-D)X \quad \text{donc} \quad X(t) = X_0 e^{(r_{exp}-D)t} \quad \text{où} \quad X_0 = X(0).$$

La figure 1 présente un (bel) exemple d'adéquation de ce modèle local à des données expérimentales et suffit à confirmer l'existence d'un mode de croissance exponentielle chez *A. autotrophicum* avec le pyruvate comme substrat.

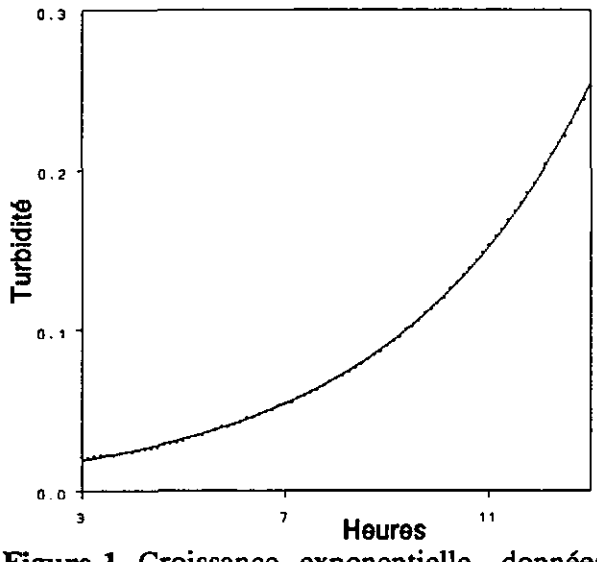


Figure 1 Croissance exponentielle, données expérimentales (+++) et ajustement (———). EP21, D = 0.05 h^{-1},

La figure 2 présente une sélection de valeurs du taux de croissance exponentielle obtenues sur près de dix ans d'expériences. La mesure du taux de croissance exponentielle n'est apparement pas reproductible et nous pensons que les variations observées ne peuvent pas être mises au seul compte des erreurs expérimentales. La tendance à l'augmentation de r_{exp} pourrait refléter l'adaptation de notre souche aux conditions du laboratoire; il faut néanmoins rappeler qu'*A. autotrophicum* a toujours été maintenu sur des milieux de culture autotrophe!

Dans chaque série d'expériences réalisées en parallèle dans les mini-fermenteurs, des valeurs de r_{exp} très proches ont été obtenues quel que soit le fermenteur considéré. Par exemple, dans la série d'expériences CIMPF, on a obtenu les valeurs IP5: $r_{exp}=0.349h^{-1}$, IP6: $r_{exp}=0.347h^{-1}$, IP7: $r_{exp}=0.344h^{-1}$; et dans la série d'expériences CIMPG on a obtenu un autre ensemble de valeurs IP8: $r_{exp}=0.332h^{-1}$, IP13: $r_{exp}=0.325h^{-1}$, IP15: $r_{exp}=0.328h^{-1}$.

Dans la série d'expériences LEMPC, nous avons eu la possibilité d'estimer r_{exp} à quatre reprises dans un même fermenteur. D'abord, lorsqu'on a lancé la culture: $r_{exp}=0.329h^{-1}$ et 50 h plus tard durant une transition non-limitée: $r=0.332h^{-1}$. Ensuite, (80 h plus tard) cette culture a subi une panne d'agitation, qui l'a privée d'oxygène durant une douzaine d'heures et qui a causé le lessivage de la biomasse. Une fois la panne réparée, la culture a redémarré en croissance exponentielle avec $r_{exp}=0.309h^{-1}$ et la même transition que précédemment a été répétée: $r=0.308h^{-1}$. Ainsi, les cellules semblent susceptibles d'être reconditionnées suivant les circonstances de croissance auxquelles elles sont confrontées. Dans cette perspective, la comparaison de résultats quantitatifs provenant d'expériences différentes doit être évitée. Mais, grâce au parallélisme de notre système de culture, on peut espérer circonvenir ce problème délicat.

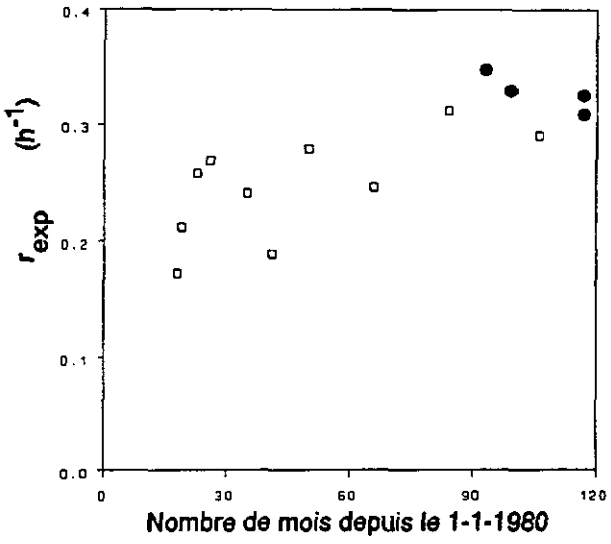


Figure 2 Différentes valeurs du taux de croissance exponentielle obtenues dans le Biostat (□) et dans les mini-fermenteurs (●).

Taux de consommation et rendement. On rappellera que la variation du substrat s'exprime par

$$\frac{dS}{dt} = (S_f - S)D - q_{exp}X_0 e^{(r_{exp}-D)t}$$

qui admet

$$S(t) = S_f + e^{-Dt}\left(S_0 - S_f + \frac{X_0 q_{exp}}{r_{exp}}(1-e^{r_{exp}t})\right) \quad \text{où} \quad S_0 = S(0)$$

et qui peut être ajustée par régression non-linéaire sur la cinétique de disparition du substrat. Les valeurs des paramètres ont été déterminées à deux reprises pour le pyruvate (Pagni 1986, Pagni et al. 1992). Le tableau suivant résume les valeurs précédemment obtenues. La conversion des unités de turbidité [DO, 436 nm, 1cm de chemin optique] en unités de poids sec [$g \cdot l^{-1}$] a été réalisée à l'aide de la relation donnée dans les annexes.

	MP2	BP1
r_{exp} h^{-1}	0.246	0.310
q_{exp} $mol \cdot DO^{-1} \cdot h^{-1}$	$1.72 \cdot 10^{-3}$	$1.75 \cdot 10^{-3}$
Y_{exp} $DO \cdot mol^{-1}$	143	177
turbidité/PS $DO \cdot mol^{-1}$	4.34	4.52
q_{exp} $mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	$7.5 \cdot 10^{-3}$	$7.9 \cdot 10^{-3}$
Y_{exp} $g \cdot mol^{-1}$	32.8	39.2

La comparaison de ces deux résultats est peu satisfaisante. Mais, comme signalé précédemment, les concentrations de pyruvate sont sous-évaluées et par conséquent, q_{exp} l'est certainement aussi.

Lorsque l'on inocule un fermenteur, on statisfait souvent à la condition initiale, $S_0 = S_f$, qui permet de simplifier la cinétique de disparition du substrat

$$S(t) = S_f + e^{-Dt}\left(\frac{X_0 q_{exp}}{r_{exp}}(1-e^{r_{exp}t})\right).$$

Si la croissance exponentielle débute dès l'inoculation, elle se poursuivra jusqu'à l'apparition de la limitation en

$$t = t_{fin} \quad \text{avec} \quad S(t_{fin}) \approx 0.$$

Comme S_f, D, r_{exp}, t_{fin} et X_0 sont connus avec une bonne précision, on peut déterminer q_{exp} d'après t_{fin}

$$q_{exp} = \frac{r_{exp}}{X_0} \cdot \frac{-S_f}{e^{-Dt_{fin}}(1-e^{r_{exp}t_{fin}})}.$$

Cette méthode a été appliquée aux expériences dans lesquelles aucune phase de latence n'était détectable après l'inoculation. On est parvenu ainsi à une série d'estimations de q_{exp} toutes voisines de

$$q_{exp} = 8.5 \cdot 10^{-3} \ mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1},$$

qui est significativement plus grand que les valeurs obtenues à partir des cinétiques de disparition du substrat. Cette dernière valeur est en très bonne accord avec celle que l'on peut extrapoler des données stationnaires (*cf* annexes).

La production de gaz carbonique. Celle-ci devrait être proportionnelle à la production de biomasse, donc exponentielle. Pour les expériences que nous considérons, on pourra appliquer la simplification $S_f = S_0$ et on tire $\Delta_{Pyr}(t)$ de la cinétique de disparition du substrat

$$\Delta_{Pyr}(t) = S_f - S(t) = e^{-Dt}\left(\frac{q_{exp}X_0}{r_{exp}}(e^{r_{exp}t}-1)\right),$$

on a calculé le paramètre $q_{exp}X_0/r_{exp}$ comme précédemment d'après les valeurs de D, r_{exp}, S_f et t_{fin}.

La figure 3 présente le plan de phase (c_{tot};dc_{tot}/dt) et trois trajectoires. La distribution des points sur une droite est conforme à l'hypothèse d'une augmentation exponentielle de la production de gaz carbonique par la culture. L'intersection des trajectoires avec l'abscisse se situe au voisinage de 1.5 mM c_{tot} pour IP8 et IP13, ce qui est conforme avec nos hypothèses sur le milieu minéral de base. La valeur inférieure observée pour EP31 est à mettre sur le compte des imprécisions dans la calibration de l'électrode.

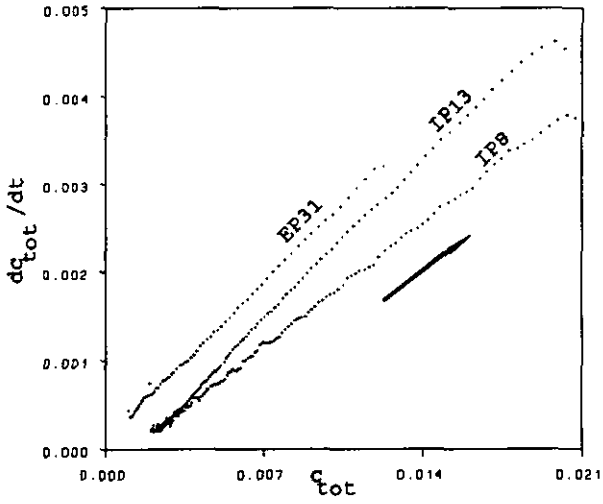


Figure 3 Le plan (c_{tot};dc_{tot}/dt) durant la croissance exponentielle.IP8: D=0.049h-1, Sf=13.3 mM. IP13: D=0.106h-1 Sf=13.3mM. EP31:D=0.049 h-1, Sf=7.89 mM

L'adéquation du modèle développé pour les gaz durant la croissance exponentielle a déjà été démontrée précédemment.

LA CROISSANCE STATIONNAIRE ET LES TRANSITIONS LIMITEES EN HETEROTROPHIE

L'essentiel des résultats concernant la description de la croissance limitée par le pyruvate, qu'elle soit stationnaire ou transitoire, se trouve dans l'article reproduit dans les annexes (page 24) et soumis pour publication en décembre 1992. Nous y renvoyons le lecteur. On ne donnera ici que quelques observations complémentaires qui viennent étayer la description de ces transitions.

Evolution du rendement. Les cinétiques du rendement et de la biomasse durant les transitions limitées constituent deux approches descriptives différentes du même signal expérimental. Bien que ces deux approches fassent théoriquement double emploi, leur utilisation conjointe se justifie parce que les erreurs de mesure s'y propagent différemment.

On rappelera que la consommation du pyruvate durant la croissance limitée peut être décrite par l'approximation

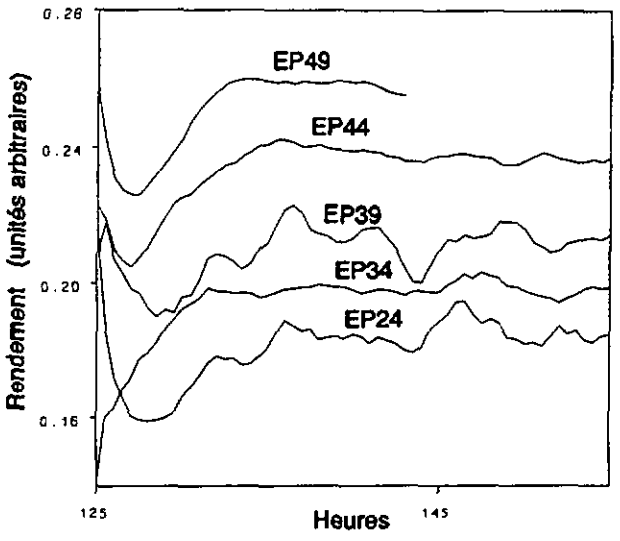
$$\delta\varphi(\sigma) \approx \frac{\rho}{\chi} \quad \Leftrightarrow \quad q_{Pyr} \approx \frac{S_f D}{X}$$

qui permet de calculer l'évolution du rendement durant les transitions

$$Y_{Pyr} = \frac{r}{q_{Pyr}} \approx \frac{\frac{1}{X}\frac{dX}{dt}+D}{\frac{S_f D}{X}} = \frac{1}{S_f}\left(\frac{1}{D}\frac{dX}{dt}+X\right).$$

La figure 1 présente les rendements calculés, après lissage des mesures de la turbidité, pour cinq transitions "vers le bas" résultant de la baisse, à 124.9 h, de la concentration du pyruvate dans l'apport de milieu de 12 à 8 mM. Le rendement est exprimé en unités arbitraires parce que déterminé d'après la turbidité et non pas d'après le poids sec. Trois phases peuvent être distinguées sur ces cinétiques: (1) une à deux heures de chute rapide du rendement; (2) cinq à dix heures d'augmentation du rendement d'autant plus rapide que le taux de dilution est élevé; (3) stabilisation du rendement au voisinage de sa valeur

stationnaire, bien avant que la biomasse n'y parvienne. La phase (1) étant absente de EP34, il ne doit s'agir que d'un "effet de bord" du lissage; la chute initiale serait pratiquement instantanée.



F i g u r e 1 Baisse soudaine de la concentration du pyruvate dans l'apport de milieu. EP24:0.060h^{-1}, EP34:0.114h^{-1}, EP39:0.159h^{-1}, EP44:0.216h^{-1}, EP49:0.292h^{-1}.

Les transitions prédites par le modèle de Pirt QLIN et par le modèle YLIN ont été calculées pour les mêmes transitions que celles présentées sur la figure 1. Les cinétiques du rendement pour ces deux modèles ont été déterminées avec le même algorithme que précédemment. Comme il apparaît sur la figure 2, aucun des deux modèles ne correspond précisément aux données expérimentales. Toutefois, le modèle YLIN s'en rapproche davantage: la remontée du rendement est d'autant plus rapide que le taux de dilution est élevé, et le rendement se stabilise à une valeur constante bien avant que la biomasse ne parviennent à l'état stationnaire. On observera également sur la figure 2 l'effet de bord précédemment mentionné et qui n'est donc qu'un artefact de l'algorithme utilisé pour le lissage.

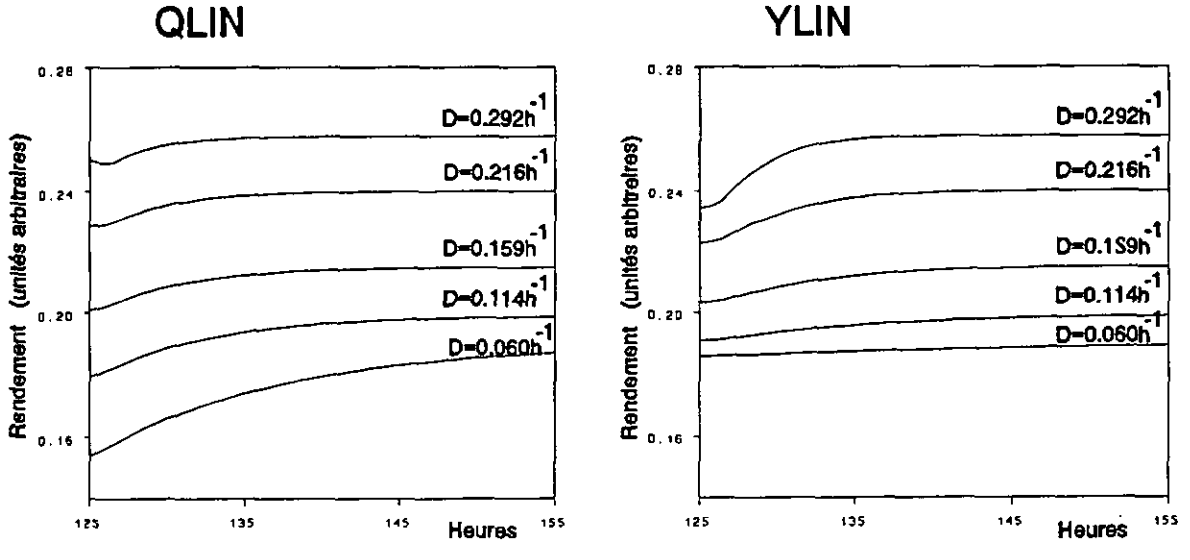


Figure 2 Evolution des rendements après la baisse de la concentration du pyruvate dans l'apport de milieu.

Production de gaz carbonique. Comme les cinétiques du rendement sont calculées d'après les mesures de turbidité et que le rapport turbidité sur poids sec n'est pas constant, on s'est intéressé à l'évolution du signal du pH durant ces transitions pour confirmer que la baisse du rendement correspond effectivement à une augmentation de l'activité catabolique.

Afin d'estimer la production de gaz carbonique (cf chapitre sur le pH), on introduira la variation du sodium provenant du pyruvate au moyen de

$$\Delta_{Pyr}(t) = Pyr_f - (Pyr_0 - Pyr_f)e^{-Dt}$$

avec $Pyr_0=12$, $Pyr_f=8$ mM et D dépendant du fermenteur considéré. Ensuite, à partir du signal du pH, on a calculé c_{tot}, puis sa dérivée. La figure 3 présente le plan (c_{tot};dc_{tot}/dt) et les trajectoires correspondant aux transitions dont l'évolution des rendements est présentée sur la figure 1. Les trajectoires pour chaque fermenteur vont de droite à gauche et il y a huit points par heures. Toutes ces trajectoires sont incurvées durant les premières heures et tendent ensuite vers l'état stationnaire, approximativement sur une droite. La courbure des premières heures est d'autant plus prononcée que le taux de dilution est grand et elle indique (voir ci-dessous) que la production de CO_2 par la culture est augmentée au début de la transition, alors que la consommation du pyruvate par litre de culture demeure constante par hypothèse. Afin de démontrer que les trajectoires observées correspondent bien à une surproduction initiale de gaz carbonique, on a évalué un modèle simple. On rappellera tout d'abord que c_{tot} est supposé varier selon

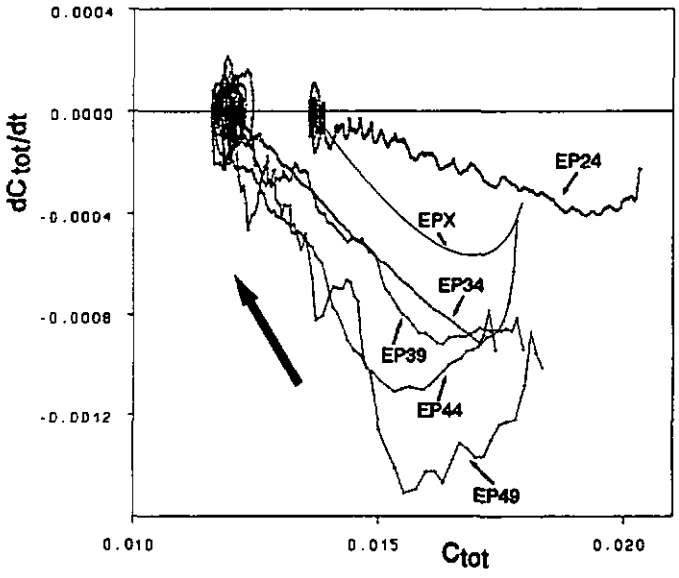


Figure 3 Idem figure 2, EPX:simulation (voir texte).

$$\frac{dc_{tot}}{dt} = c_f D + P_c(t) - c_{tot}(D+K_c)$$

où $P_c(t)$ est la production de c_{tot} par litre de culture. La fonction suivante est un exemple, parmi d'autres, qui décrit une surproduction initiale de c_{tot}, suivie de sa stabilisation à une

valeur constante

$$P_c(t) = P_{c\infty} + (P_{c0} - P_{c\infty})\, e^{-fact \cdot t} \quad \text{où} \quad P_{c0} > P_{c\infty}.$$

En choisissant $P_{c0}=0.005$, $P_{c\infty}=0.004$, fact=0.4, $c_f=0.001$, $K_c=0.2$, D=0.1, $c_{tot}(0)=0.018$, on a recalculé la production de c_{tot}, puis sa cinétique dans le fermenteur et enfin sa dérivée. La courbe EPX de la figure 3 correspond à cette simulation. D'autres fonctions de production de c_{tot}, décrivant toutes une surproduction initiale, ont également été évaluées et ont toutes procuré des trajectoires initialement incurvées, puis tendant asymptotiquement vers une droite. Ces essais ont également montré qu'une interprétation quantitative des trajectoires expérimentales n'est pas envisageable.

Nous avons considéré que la surproduction initiale de c_{tot} devait être causée par une baisse du rendement de croissance, c'est-à-dire par une augmentation de la fraction du pyruvate catabolisé. Une explication alternative doit être évoquée: la production de gaz carbonique due à l'oxydation de substances endogènes, réserve carbonée ou matériel cellulaire. Or, une telle contribution est certainement négligeable, pour les deux raisons suivantes. D'une part, le PHB, qui est la seule réserve carbonée connue chez *A. autrophicum*, n'est pas détectable dans les cultures stationnaires limitées par le pyruvate. D'autre part, nous avons observé l'absence de surproduction de c_{tot} suite à l'arrêt soudain de la pompe d'amenée de milieu ou, en tout cas, une surproduction bien moindre que celle que l'on vient de mettre en évidence. La figure 4 montre le plan (c_{tot};dc_{tot}/dt) et deux trajectoires calculées après l'arrêt de la pompe, avec $\Delta_{Pyr}=13.3$ mM constant et D=0. La trajectoire de IP24 présente bien une légère courbure, mais qui dure moins de 30 min et dont l'amplitude est bien inférieure à celles observées précédemment.

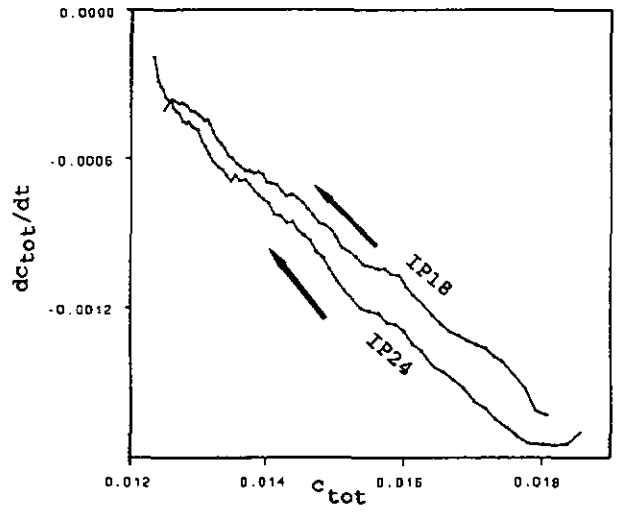


Figure 4 Effet d'une panne d'amenée de milieu sur deux cultures précédemment à l'état stationnaire, IP18: $D=0.160h^{-1}$, IP24: $D=0.200h^{-1}$.

Fin de la croissance exponentielle. La croissance exponentielle prend fin brutalement lors de l'apparition de la limitation. Comme la concentration initiale du substrat est voisine de sa

concentration dans l'apport de milieu et que l'inoculum ne représente que quelques pour-cent de la biomasse finale, la biomasse à la fin de la croissance exponentielle possède une densité supérieure à sa densité stationnaire. Il s'en suit une transition limitée "vers le bas". Celle-ci est particulièrement intéressante puisque la biomasse initiale est préconditionnée dans l'état physiologique de la croissance exponentielle. Malheureusement, dans l'installation de mini-fermenteur, un artefact fausse les mesures de turbidité du début de cette transition. Comme on peut l'observer sur la figure 5, la fin de la croissance exponentielle se détecte aux brusques changements des signaux du pH et de l'oxygène dissous. Mais ensuite, il apparait un pic, parfois immense, dans les mesures de turbidité. La figure 5 présente l'observation la plus spectaculaire de cet artefact. L'explication réside très certainement dans la variation de l'hydrophobicité des cellules en fonction du taux de croissance: durant la croissance exponentielle, les cellules sont hydrophobes et ont tendance à s'accrocher aux parois de la tuyauterie, puis, suite à l'apparition de la limitation, les cellules privées de substrat voient leur hydrophobicité diminuer et se détachent de la tuyauterie. Ainsi, la culture arrivant au spectrophotomètre a une turbidité momentanément supérieure à celle du fermenteur. Ce phénomène n'a été observé qu'après des périodes de croissance non-limitée suffisamment longues (plus de 24 h).

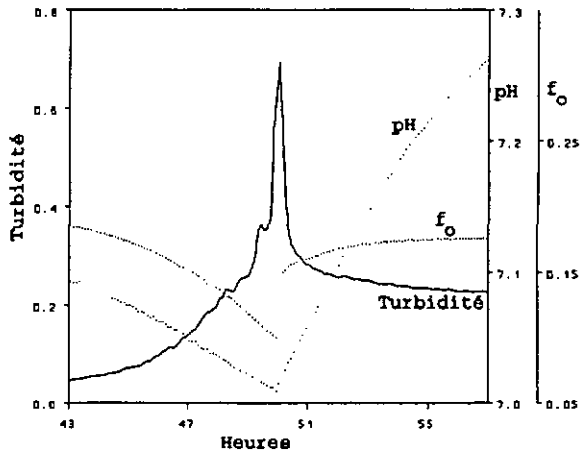


Figure 5 Artefact dans la mesure de la turbidité suivant la fin de la croissance exponentielle IP22: D=0.049h^{-1}.

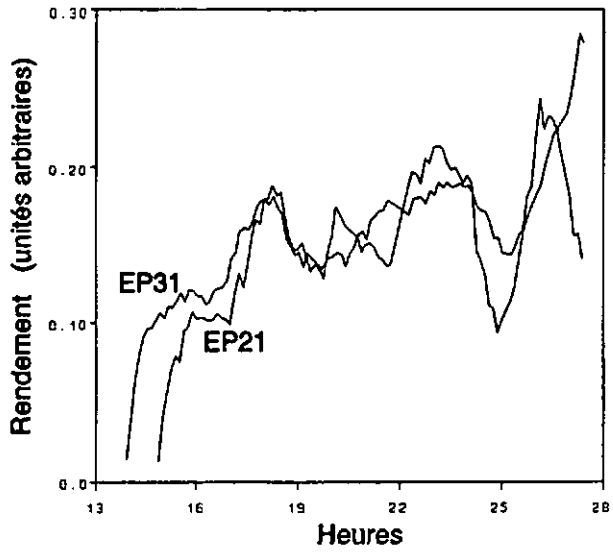


Figure 6 Transitions suivant la fin de la croissance exponentielle. EP21: D=0.05h^{-1}. EP31: D=0.048 h^{-1}.

Dans les expériences EP21 et EP31, cet artefact est à peine détectable et nous avons pu calculer l'évolution du rendement sur ces transitions (figure 6). Une nette augmentation du

rendement s'observe au début de la transition, suivie par sa stabilisation autour d'une valeur constante. Afin d'évaluer la production de c_{tot}, on a formulé l'hypothèse que la consommation de pyruvate par la culture est constante dès l'apparition de la limitation (Δ_{Pyr} constant). La figure 7 présente trois exemples de trajectoire dans le plan (c_{tot};dc_{tot}/dt). Les courbures initiales sont fortement marquées, en particulier pour les deux courbes correspondant aux changements de taux de croissance les plus importants, de $r_{exp}=0.325h^{-1}$ initial à $D=0.048h^{-1}$ final. Le décalage des courbes sur l'abscisse provient des différentes concentrations de pyruvate dans l'apport de milieu. Les différences d'échelles sur l'ordonnée reflètent les différents flux de gaz mis en oeuvre et la dérive des électrodes.

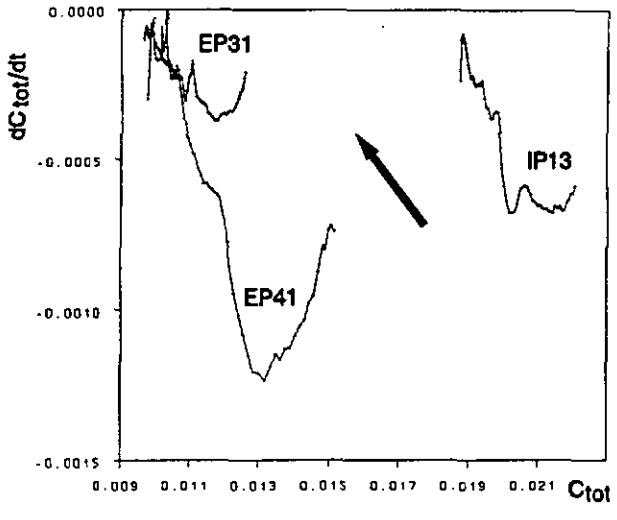


Figure 7 Transitions suivant la fin de la croissance exponentielle. EP31 et EP41: $S_f=7.98mM$, $D=0.048h^{-1}$. IP13: $S_f=13.3mM$, $D=0.106h^{-1}$.

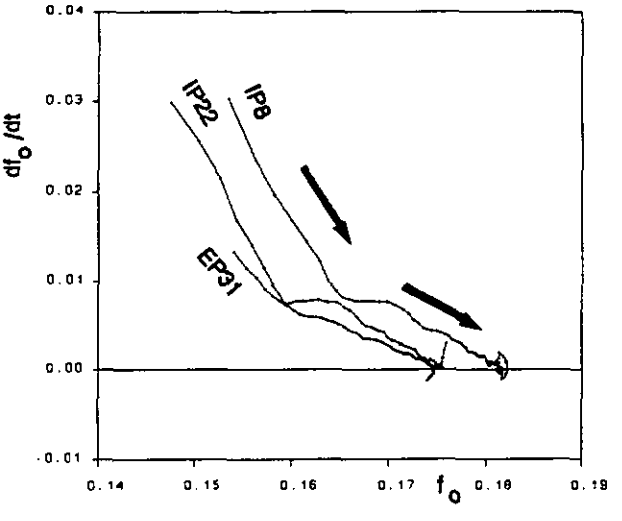


Figure 8 Transition suivant la fin de la croissance exponentielle. IP8: $D=0.049h^{-1}$, IP22: $D=0.049^{-1}$, EP31: $D=0.048h^{-1}$.

La fraction du pyruvate catabolisé augmente momentanément au début de toutes les transitions présentées ici. On devrait donc s'attendre à une augmentation conjointe de l'oxygène consommé par la culture. La figure 8 présente le plan (f_o,df_o/dt) et les trajectoires de l'oxygène durant trois transitions suivant la fin de la croissance exponentielle. Une première phase correspondant à une consommation d'oxygène augmentée s'y détecte nettement, suivie par la relaxation vers l'état stationnaire. A nouveau, il faut comparer ces trajectoires avec celles recalculées après un arrêt soudain de la pompe d'amenée de milieu: la figure 9 présente ces trajectoires qui sont pratiquement rectilignes. Toutes nos observations précédentes sont ainsi confirmées, les fluctuations observées sur les signaux du pH et de l'oxygène dissous résultent d'une baisse

momentanée du rendement de croissance sur le pyruvate et non pas de l'oxydation de matériel cellulaire. Ces effets transitoires sont plus prononcés sur les signaux provenant du pH et c'est pourquoi nous n'avons pas présenté précédemment le traitement des signaux de l'oxygène après la baisse de la concentration du pyruvate dans l'apport de substrat.

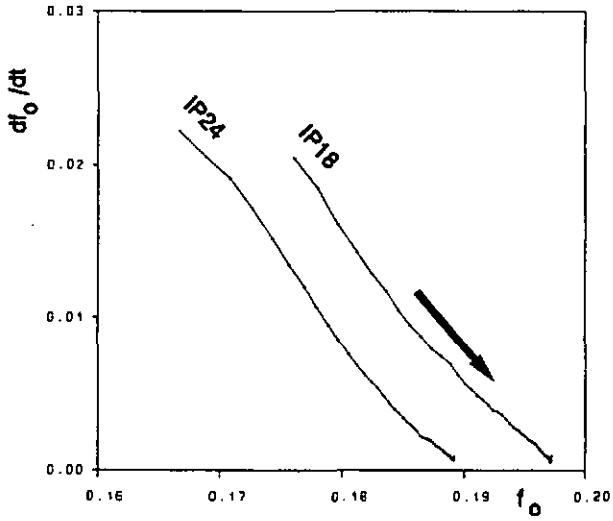


Figure 9 Effet d'une panne d'amenée de milieu sur deux cultures précédemment à l'état stationnaire, IP18: $D=0.160h^{-1}$, IP24: $D=0.200h^{-1}$.

La transition limitée suivant la fin de la croissance exponentielle n'est qu'un cas particulier parmi les transitions comportant une modification du taux de croissance entre les états initiaux et finaux (changement du taux de dilution). Mais ce cas particulier met en jeu les plus importantes variations possibles du taux de croissance. Les changements du taux de dilution ne produisent que de plus petites variations des paramètres du système et sont très difficiles à étudier quantitativement en hétérotrophie.

LES TRANSITIONS NON-LIMITEES EN HETEROTROPHIE

Les plus importants résultats concernant la croissance non-limitée ont été publiés dans le *Journal of General Microbiology* en 1992. Cet article se trouve reproduit dans les annexes de ce travail (page 58) et nous y renvoyons le lecteur. Nous allons considérer ci-dessous d'autres situations durant lesquelles du PHB est synthétisé et d'autres transitions momentanément non-limitées.

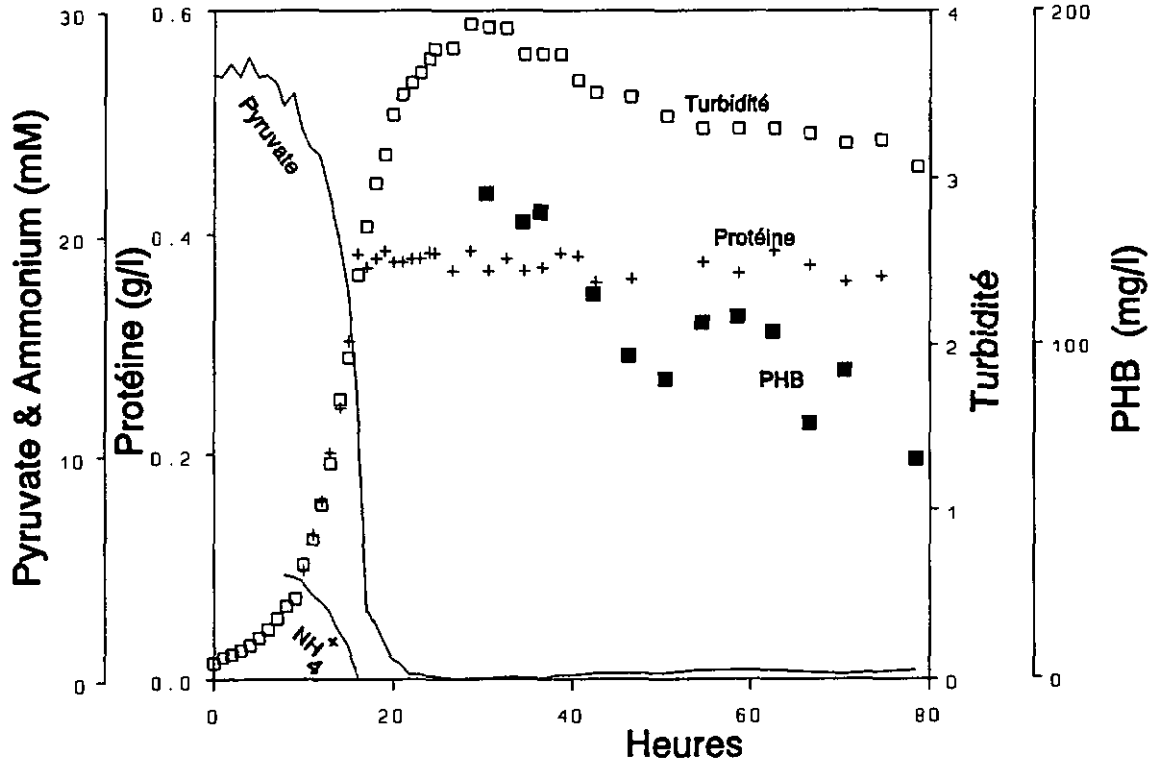


Figure 1 Limitation par l'azote, IP1: $D=0.1h^{-1}$.

Limitation par l'azote. L'expérience IP1 a été réalisée dans le Biostat afin de produire des cellules contenant du PHB. On a recouru à la méthode usuelle de limitation par l'azote, en utilisant un milieu minéral de base appauvri en ammonium (5.6 mM), mais riche en pyruvate (28.4 mM). Comme il est montré sur la figure 1, tant la turbidité que les protéines augmentent d'abord exponentiellement. Dès l'apparition de la limitation par l'azote, la teneur en protéine de la culture prend une valeur constante, tandis que la turbidité continue d'augmenter d'au moins 40% en une douzaine d'heures. On remarquera le changement de

signe de la courbure de la cinétique de disparition du pyruvate, qui est localisé à l'instant de l'apparition de la limitation par l'ammonium. Il n'y a pas de PHB dans les cellules durant la croissance exponentielle et le PHB doit être synthétisé dès l'apparition de la limitation (pas de mesures) pour atteindre un maximum estimé à 15-20% du poids sec en moins de 12h. Le PHB dans la culture et la turbidité se mettent ensuite à diminuer durant 50 h au moins. La figure 2 présente l'évolution du rapport PHB sur turbidité, que l'on peut considérer en première approximation comme proportionnel à la teneur en PHB de la biomasse. Ce rapport diminue constamment, mais moins rapidement que ne causerait la seule dilution interne. Le PHB continue donc d'être synthétisé, mais à un taux décroissant. La teneur en PHB ne serait pas encore parvenue à sa valeur stationnaire à la fin de l'expérience. Plusieurs points restent dans l'ombre dans cette expérience: Le pyruvate devient-il limitant aux environs de 28 h? Une concentration minimale de 100μM a été mesurée. La concentration résiduelle tend ensuite à s'élever et le pyruvate n'est certainement plus limitant vers 80 h. Des granules métachromatiques (polyphosphates) ont été observées dans les cellules à 80 h. Une synthèse de polyphosphates succède-t-elle à la synthèse du PHB, la synthèse de l'un est-elle liée à la dégradation de l'autre? Quoi qu'il en soit, plus de 60 h après l'apparition de la limitation, l'état stationnaire n'est pas atteint, tant par la turbidité que par le PHB.

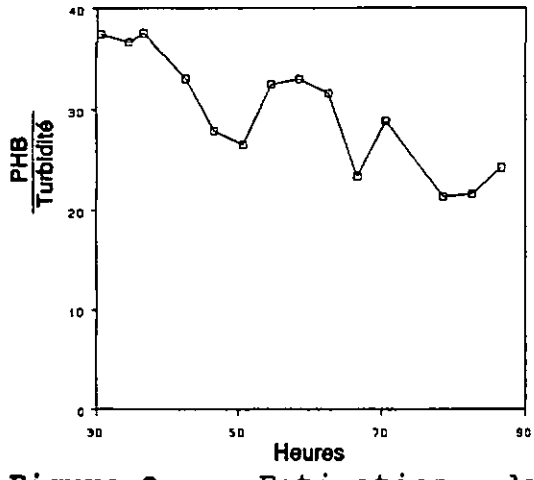


Figure 2 Estimation de l'évolution de la teneur en PHB. IP1, D=0.1h^{-1},

Haywood et al. (1989) ont réalisé une expérience similaire de limitation par l'ammonium avec *Alcaligenes eutrophus* NCIB 11599, au même taux de dilution (0.1 h^{-1}), mais avec le glucose comme source de carbone. Dès l'apparition de la limitation, *A.eutrophus* se met à accumuler du PHB qui finit par représenter 40% du poids sec après une vingtaine d'heures. Ensuite, tant la densité de la culture que la teneur en PHB cessent de varier, et demeurent ainsi à l'état stationnaire durant les 24 h qui suivent. Qui plus est, ces auteurs prouvent que le "turnover" du PHB est nul. C'est-à-dire que si *A. eutrophus* synthétise continuellement du PHB à un taux constant, en revanche, *A. eutrophus* se montre incapable de le dépolymériser dans ces conditions. Un comportement identique a été décrit chez *Azotobacter beijerinckii* suite à l'apparition d'une limitation par l'oxygène (Carter & Dawes, 1979): le contenu en

PHB augmente et atteint une valeur maximale après 30 h, puis s'y maintient durant les 40 h qui suivent.

Le rôle joué par le PHB et les conditions de sa synthèse ne sont certainement pas semblables chez tous les microorganismes. Pour *Alcaligenes eutrophus* ou *Azotobacter beijerinckii*, l'influence de l'environnement semble prédominante: un équilibre s'établit "rapidement" entre les substrats consommés et la composition de la biomasse; l'accumulation du PHB reflète le déficit en azote ou en oxygène. En revanche, chez *A. autrophicum*, la synthèse du PHB semble être contrôlée à la fois par l'environnement et par l'histoire de la culture. L'apparition d'une limitation par l'azote déclenche la synthèse du PHB à un taux maximal, mais ensuite, ce taux de synthèse diminue progressivement. L'accumulation de PHB est alors révélateur du stress subi par la culture, aussi bien que du déficit en azote. En d'autres termes, la synthèse du PHB correspond à un métabolisme de débordement (overflow) qui se manifeste surtout au début des transitions.

Le déterminisme de la synthèse du PHB reste difficile à comprendre en dehors de quelques cas particuliers. Heinzle & Lafferty (1980) ont proposé un modèle de croissance pour *A. eutrophus* qui décrit la synthèse de PHB lors d'une limitation par l'ammonium. Ce modèle décrit correctement les différentes observations expérimentales à la disposition des auteurs, mais, de par sa structure, ce modèle ne peut admettre un phénomène de débordement comme observé ici.

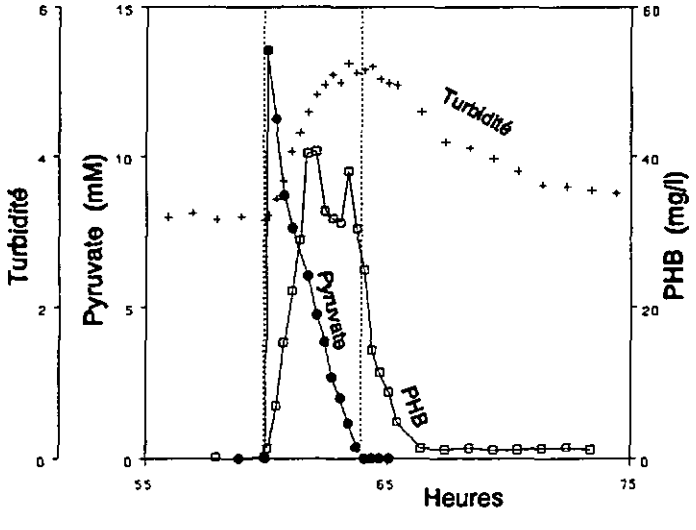


Figure 3 Evolution de la turbidité (+), du pyuvate (●) et du PHB(□). BP1: $D=0.134h^{-1}$.

Injection de pyruvate et croissance non-limitée. La figure 3 présente les cinétiques de la turbidité, du PHB et du pyruvate lors d'une expérience d'injection du facteur limitant. Dans cette expérience, la phase non-limitée est particulièrement longue (3.5 h). La réponse linéaire des deux premières heures a déjà été abondamment discutée; rappelons seulement que le PHB

s'accumule à peu près linéairement. Ensuite, alors que la culture est toujours non-limitée, le taux de synthèse du PHB diminue soudainement, sans toutefois cesser. L'accroissement de la turbidité présente également un ralentissement, quoique moins prononcé. Un parallèle peut être tiré entre la dé-limitation soudaine et l'expérience de limitation par l'azote: dans les deux situations, on observe une réponse primaire conduisant à une rapide accumulation de PHB, et une réponse secondaire où la synthèse du PHB diminue fortement sans toutefois cesser. Suite à la réapparition de la limitation par le pyruvate, le PHB est rapidement dégradé (figure 3). Les quelques mesures à notre disposition ne permettent pas un traitement quantitatif de cette cinétique de dégradation.

La figure 4 présente une expérience de dé-limitation réalisée dans l'installation de mini-fermenteurs. La brève phase de croissance linéaire non-limitée est suivie par une longue transition limitée "vers le bas". On remarquera notamment que la cinétique du pH durant cette transition présente un point d'inflexion. Connaissant la concentration du sodium apporté avec le pyruvate dans l'amenée de milieu, ainsi que sa concentration ajoutée lors de l'injection, on a calculé l'évolution de c_{tot} durant ces transitions "vers le bas" qui font suite à la réapparition de la limitation. Ainsi qu'il apparaît très clairement sur la figure 5 pour l'expérience IP25, les trajectoires comportent trois phases. Sachant que du PHB doit se trouver dans les cellules lors de la réapparition de la limitation, la première phase doit correspondre à la surproduction momentanée de c_{tot} causée par la dégradation du PHB. Cette première phase est partout présente sauf pour IP19, mais comme cette transition fait suite à la plus longue phase non-limitée considérée ici (~3h), il est probable que le PHB ait déjà fortement diminué dans cette culture lors de la réapparition de la limitation. Cette première phase de surproduction de c_{tot} est dans tous les cas quasi linéaire dans le plan $(c_{tot};dc_{tot}/dt)$. Par hypothèse, cela équivaut à une production constante de c_{tot} par l'ensemble de la culture. Or, la consommation du pyruvate est également constante pour l'ensemble de la culture. Il

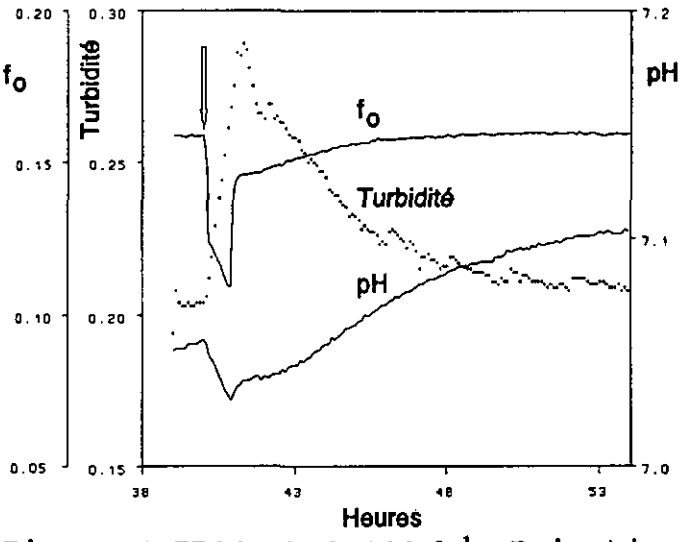


Figure 4 IP14, D=0.109 h^{-1}. Injection (flèche) de 1 ml Pyruvate 3M dans...

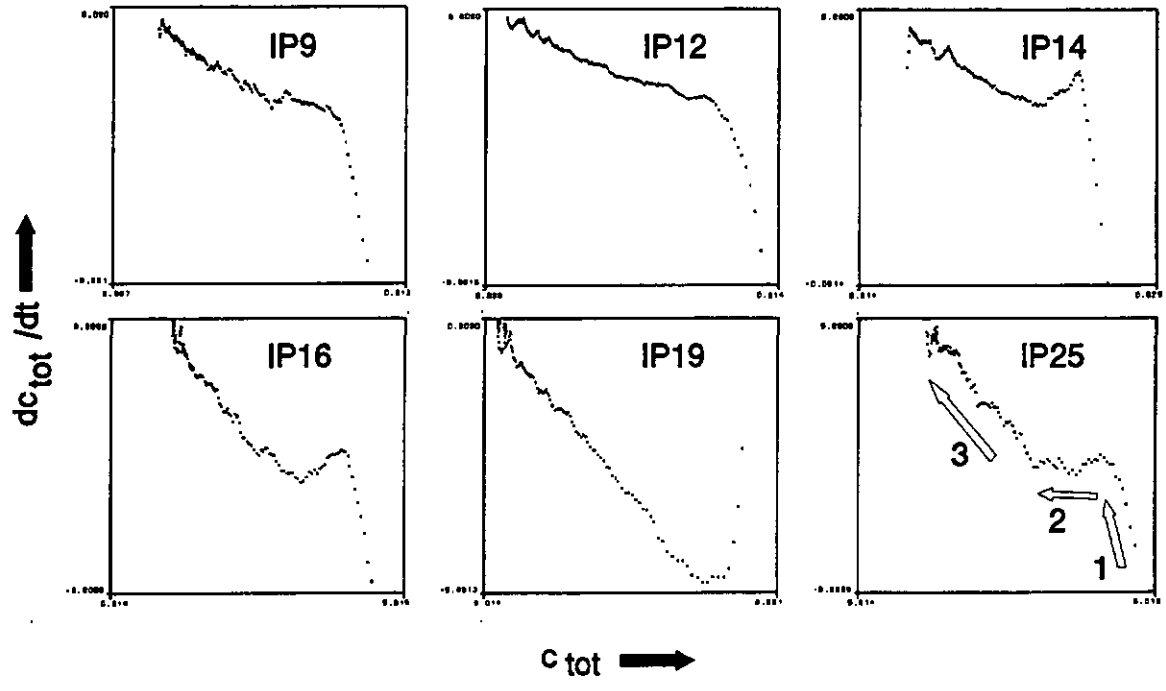


Figure 5 Plan (c_{tot};dc_{tot}/dt) reconstruit dès la réapparition de la limitation après l'injection de 1 ou 2 ml (IP19) de pyruvate 3M dans environ 0.8 l de culture à différents taux de dilution. IP9: 0.049h^{-1}; IP12: 0.051h^{-1}; IP14: 0.109h^{-1}; IP16: 0.160h^{-1}; IP19: 0.160h^{-1}; IP25: 0.205h^{-1}.

s'ensuit que la vitesse de dégradation du PHB serait constante (et non pas proportionnelle à sa concentration, par exemple). Les phases 2 et 3 pourraient correspondre aux trajectoires précédemment décrites pour les transitions limitées "vers le bas", et impliqueraient une augmentation de la fraction du pyruvate catabolisé durant la deuxième phase. Une explication alternative est cependant à considérer. L'observation microscopique révèle que le nombre de granules de PHB par cellule à la fin de la croissance linéaire est faible, en général inférieur à quatre. Si la division des cellules est un phénomène de peu d'importance durant la courte croissance linéaire, il n'en va pas de même durant la longue transition "vers le bas" qui lui fait suite. La ségrégation de deux ou trois granules entre deux cellules filles ne doit être que rarement équitable. Trois phases pourraient ainsi se succéder: (1) culture homogène où toutes les cellules possèdent des granules; (2) culture hétérogène puisque seule une partie des cellules possède encore des granules; (3) culture redevenue homogène car tous les granules ont été dégradés.

Augmentation de la concentration du substrat dans l'apport de milieu. Nous n'avons précédemment considéré que les transitions dont le caractère continuellement limité était évident. Il nous reste donc à présenter les transitions effectuées aux taux de dilution les plus élevés où l'on peut espérer observer une phase dé-limitée.

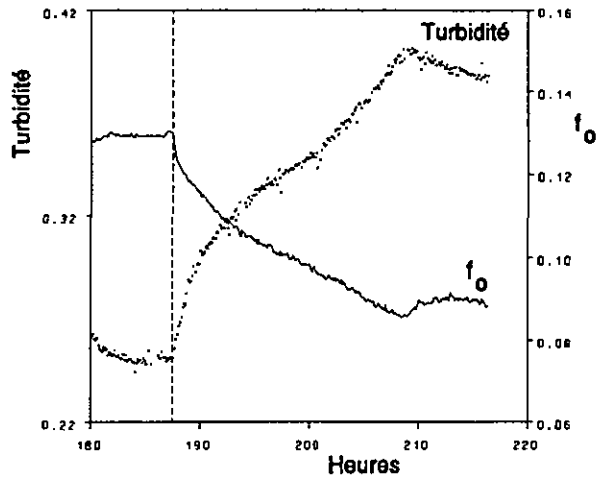


Figure 6 Augmentation soudaine de la concentration du pyruvate dans l'apport de milieu. EP50:0.292 h^{-1}.

La figure 6 présente une transition "vers le haut" résultant d'une augmentation de la concentration du pyruvate dans l'apport de milieu de 8 à 12 mM. Le taux de dilution est assez proche du lessivage ($D=0.292\ h^{-1}$ pour $r_{exp}=0.309\ h^{-1}$, d'où $\rho=0.94$) et cette transition est dé-limitée comme l'atteste l'apparition de pyruvate dans le milieu (figure 7). La turbidité présente un épaulement caractéristique de ce type de transition. Le signal de l'oxygène dissous est également typique, il débute par un mouvement rapide (*cf.* dé-limitation soudaine), puis est courbé vers le haut (*cf.* croissance linéaire) pour ensuite se courber très légèrement vers le bas (*cf.* croissance exponentielle). La concentration maximale de pyruvate mesurée dans le milieu demeure faible et certainement inférieure à

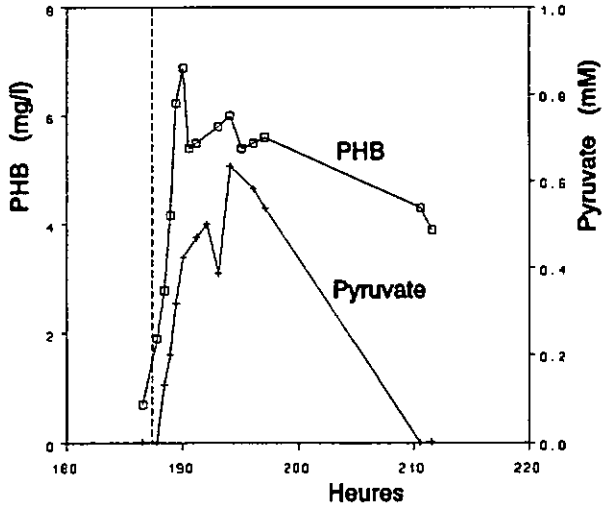


Figure 7 Augmentation soudaine de la concentration du pyruvate dans l'apport de milieu. EP50:0.292 h^{-1}.

sa concentration effective dans la culture. D'après les signaux de la turbidité et de l'oxygène dissous, le pyruvate devrait redevenir limitant aux alentours de 209h. Ainsi, la cinétique du pyruvate serait assez correctement décrite par la courbe tracée sur la figure 8, malgré les 10h durant lesquelles manquent les mesures. La cinétique du PHB correspond à celle précédemment observée lors de l'injection du substrat limitant: une première phase de courte durée caractérisée par un fort taux de synthèse, suivie par une deuxième phase où le PHB

est toujours synthétisé, mais à un taux nettement inférieur. Il faut noter que la quantité de PHB à 190h ne correspond qu'à environ 2% du poids sec. Le PHB ne peut donc expliquer à lui seul l'épaulement sur le signal de la turbidité. Il ne reste plus que 1% de PHB dans les cellules lorsque la limitation par le pyruvate réapparaît.

On ne peut pas calculer l'évolution du rendement durant des transitions "vers le haut" momentanément non-limitée, puisqu'on ignore la quantité exacte de pyruvate consommé. Pour la même raison, il n'est pas envisageable de construire le plan (c_{tot};dc_{tot}/dt). En revanche, on peut suivre l'évolution du taux de croissance au moyen de

$$r = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt} + D$$

ainsi qu'il est présenté pour dix transitions "vers le haut" sur la figure 8.

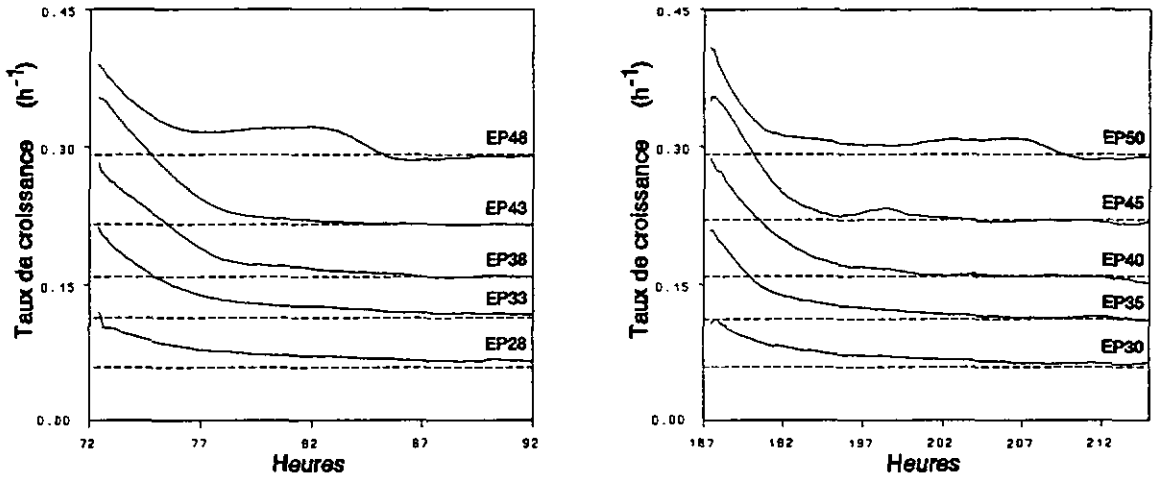


Figure 8 Evolution des taux de croissance (——), et taux de dilution (---), suite à l'augmentation de la concentration du pyruvate dans l'apport de milieu de 8 à 12 mM.

L'évolution du taux de croissance est monotone décroissante pour toutes les transitions qui ont été précédemment décrites comme continuellement limitées (EP28, EP30, EP33, EP35, EP38, EP40). Pour les transitions nettement dé-limitées (EP48 et EP50), le taux de croissance initial est plus élevé que le taux de la croissance exponentielle. Ce taux de croissance baisse et se stabilise momentanément sur un plateau qui correspond environ au taux de croissance exponentiel. On pourrait alors considérer que les cellules réalisent une croissance exponentielle, si la présence de PHB en quantité décroissante n'allait à l'encontre de la définition d'une croissance balancée. Les transitions EP43 et EP45 possèdent un taux

de croissance initial légèrement supérieur à r_{exp}, mais, elles sont dépourvues de plateau. Ni pyruvate, ni PHB n'ont été détectés en quantité significative durant ces transitions.

Jusqu'ici, nous avons toujours négligé l'activité spécifique du (des) système(s) responsable(s) de la consommation en admettant implicitement $\delta = 1$ dans la description de la consommation

$$q = q_{exp} \delta \varphi(\sigma) .$$

Nous étions autorisés à cette simplification dans la mesure où le rôle joué par δ est négligeable pour la description des transitions continuellement limitées. Mais, la valeur de δ affecte, d'une part, la localisation de la séparation entre les domaines I et II d'équation $\rho = \delta\chi$ et, d'autre part, la cinétique de la croissance non-limitée. A l'évidence, δ ne peut plus être négligé ici.

Si l'on autorise δ à varier et en particulier à prendre des valeurs supérieures à 1, le taux de consommation pourra momentanément dépasser q_{exp} sans que le système de consommation ne soit saturé. Dans la notation sans dimension, cette situation s'observe lorsque

$$\delta > 1 \quad \text{et} \quad \varphi(\sigma) < 1 \quad \text{donc} \quad \frac{1}{\delta} < \frac{\rho}{\chi} < 1,$$

ce qui revient à abaisser la séparation entre les domaines I et II du plan $(\rho;\chi)$ en dessous de $\chi = \rho$.

Lorsque l'on effectue une augmentation soudaine de la concentration de pyruvate dans l'apport de milieu de S_{f0} à $S_{f\infty}$, le taux de consommation instantané juste après ce changement, q^0, peut être estimé au moyen de

$$q^0 \propto \frac{S_{f\infty} D}{\tilde{X}_0} \quad \text{où} \quad \tilde{X}_0 = S_{f0}(Y_0 + WD)$$

en supposant que la transition demeure continuellement limitée. On peut alors calculer le taux de croissance initial r^0 qui correspond à la consommation q^0

$$r^0 = \frac{Y_0 q^0}{1 - W q^0} = \frac{Y_0 D \frac{S_{f\infty}}{S_{f0}}}{Y_0 - WD\left(\frac{S_{f\infty}}{S_{f0}} - 1\right)}$$

et qui sera éventuellement plus grand que r_{exp}. Par ailleurs, si la transition résultant du changement de concentration est dé-limitée, le système se retrouvera dans une situation identique à celle créée lors de l'injection d'une solution concentrée du facteur limitant. Une réponse linéaire est à attendre au taux de croissance initial r^0_{lin} empiriquement décrit par Pagni et al. (1992)

$$r^0_{lin} = 0.55 - 0.61D$$

Les taux de croissance initiaux des transitions "vers le haut" observées aux plus haut taux de dilution ont été estimés et sont présentés sur la figure 10, (●). Les taux de croissance initiaux des réponses linéaires (□) et les deux prédictions considérées ici ont également été représentés. Trois groupes de points expérimentaux ont été retenus.

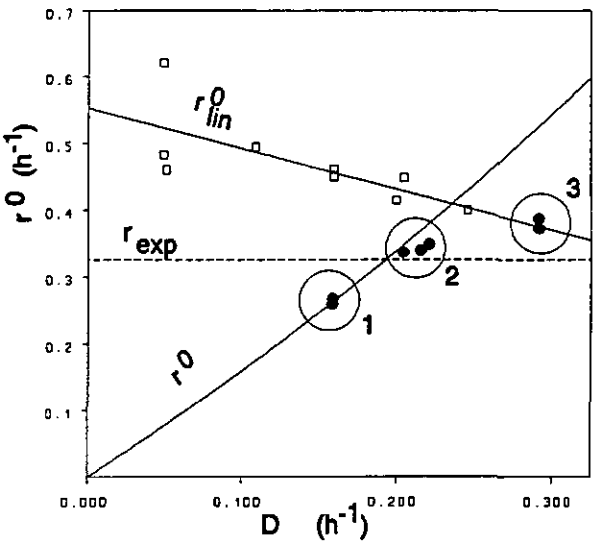


Figure 9 Taux initiaux de croissance lors de l'injection du facteur limitant (□) et de l'augmentation de sa concentration dans l'apport (●).

Le premier de ces groupes de points (EP38, EP40; D=0.159h^{-1}) correspond aux transitions qui étaient le plus sujettes à caution lors de la description des transitions limitées. Ces taux initiaux de croissance se placent sur la prédiction, r^0, confirmant ainsi leur appartenance aux transitions limitées.

Le deuxième groupe de points (IP27: D=0.205h^{-1}; EP43: D=0.216h^{-1}; EP45: D=0.221 h^{-1}) se compose des transitions dont le taux de croissance initial est légèrement supérieur à r_{exp}. Or, tous ces points viennent s'inscrire au voisinage de la prédiction r^0. Ce sont donc des transitions limitées avec un taux de consommation initial supérieur à q_{exp}.

Le troisième groupe de points (EP48, EP50: D=0.292h^{-1}) correspond aux transitions

effectivement dé-limitées et durant lesquelles une synthèse de PHB a été observée. Ces transitions viennent se placer sur la droite caractérisant les réponses linéaires. Ces transitions débutent donc par des réponses linéaires mais qui sont très peu "spectaculaires" puisque obtenues à un taux de dilution proche de r_{exp}.

L'intersection des prédictions r^0 et r^0_{lin} se situe à un taux de dilution critique D_{cr} qui, dans le cas présent, prend la valeur

$$D_{cr} = 0.234\ h^{-1}.$$

A partir du taux de consommation initial qui lui est associé, on détermine la valeur de δ qui lui correspond

$$q_{max} = q_{exp}\delta = 9.9 \cdot mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1} \quad <=> \quad \delta(D_{cr}) = 1.17,$$

qui n'est pas tellement plus grand que l'unité. Pagni et al. (1992) ont montré que, durant la croissance linéaire à $D=0.1\ h^{-1}$, le taux de consommation initial est pratiquement égal à q_{exp}, ce qui sous-entendrait que δ demeure égal à 1. Ce résultat est en apparente contradiction avec l'observation que l'on vient de faire. Mais, d'une part les taux de dilution ne sont pas les mêmes, et d'autre part Pagni et al. (1992) utilisent des $mol \cdot OD^{-1} \cdot h^{-1}$ comme unité de consommation, alors qu'ici on a utilisé implicitement des $mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$.

LA CROISSANCE AUTOTROPHE

Croissance exponentielle. La croissance exponentielle autotrophe a été observée à de nombreuses reprises dans les deux installations de fermenteur. Aragno et Schlegel (1982b) ont déterminé un taux de croissance exponentielle autotrophe valant 0.173 h^{-1}. Ce taux correspond bien aux mesures obtenues dans les mini-fermenteurs, toutes voisines de 0.18 h^{-1}. En hétérotrophie, nous avions constaté une tendance à l'augmentation du taux de croissance exponentielle au fil des années. Ici, une pareille tendance n'a pas été remarquée, ce qui est d'autant plus étonnant que notre souche a toujours été maintenue dans des conditions de croissance autotrophe. Chez *Alcaligenes eutrophus*, le temps de génération en croissance autotrophe non-limitée a été signalé comme diminuant de 5 à 1.5 h en quelques années et Probst (1980) explique ce phénomène en invoquant l'amélioration des conditions de culture. A notre avis, la sélection d'une souche possédant un taux de croissance augmenté devrait plutôt être considérée chez *A. eutrophus*. Et l'absence d'une telle sélection chez *A. autotrophicum* est à relever

Préparation des cultures limitées par l'hydrogène. Pour des raisons analytiques, il est souhaitable d'utiliser un mélange de gaz riche en hydrogène et en oxygène. Mais, ce mélange doit simultanément permettre le maintien d'une faible pression partielle en oxygène dissous dans la phase liquide, f^l_o inférieur à 0.05. En effet, la synthèse de l'hydrogénase chez *A. autotrophicum* est inhibée au niveau de la transcription par des pressions partielles en oxygène plus élevées (Aragno & Schlegel, 1978b). Avec la série d'expériences LempD, nous sommes parvenu à remplir ces conditions avec un mélange de gaz de composition

f^{in}_h	f^{in}_o	f^{in}_n	f^{in}_c
0.347	0.155	0.448	0.050

qui permet de maintenir f^l_o dans la fourchette 0.03-0.05 lorsque les cultures ont atteint l'état stationnaire. Cependant, du fait dc la toxicité de l'oxygène pour le métabolisme autotrophe, il est impossible de lancer les cultures avec le mélange de gaz final. Pour contourner ce problème, on a commencé par limiter les cultures par l'oxygène et ensuite on a augmenté par

palier la teneur en oxygène de l'apport jusqu'à l'obtention de la limitation par l'hydrogène avec le mélange décrit ci-dessus. Ces augmentations par palier de la richesse en oxygène ont été faites très progressivement. D'une part, les capacités oxydatives des cultures étaient rapidement saturées, en particulier pour les faibles densités de biomasse et pour les taux de dilution proche du lessivage. D'autre part, il était impératif de tenir compte des différences de composition qui existaient entre l'apport de gaz et la phase gazeuse; une augmentation soudaine de l'apport en oxygène provoquait une élévation brutale de la consommation d'hydrogène, avec un facteur stoechiométrique supérieur à 2, et cet augmentation du volume de gaz consommé risquait de mettre la phase gazeuse en dépression.

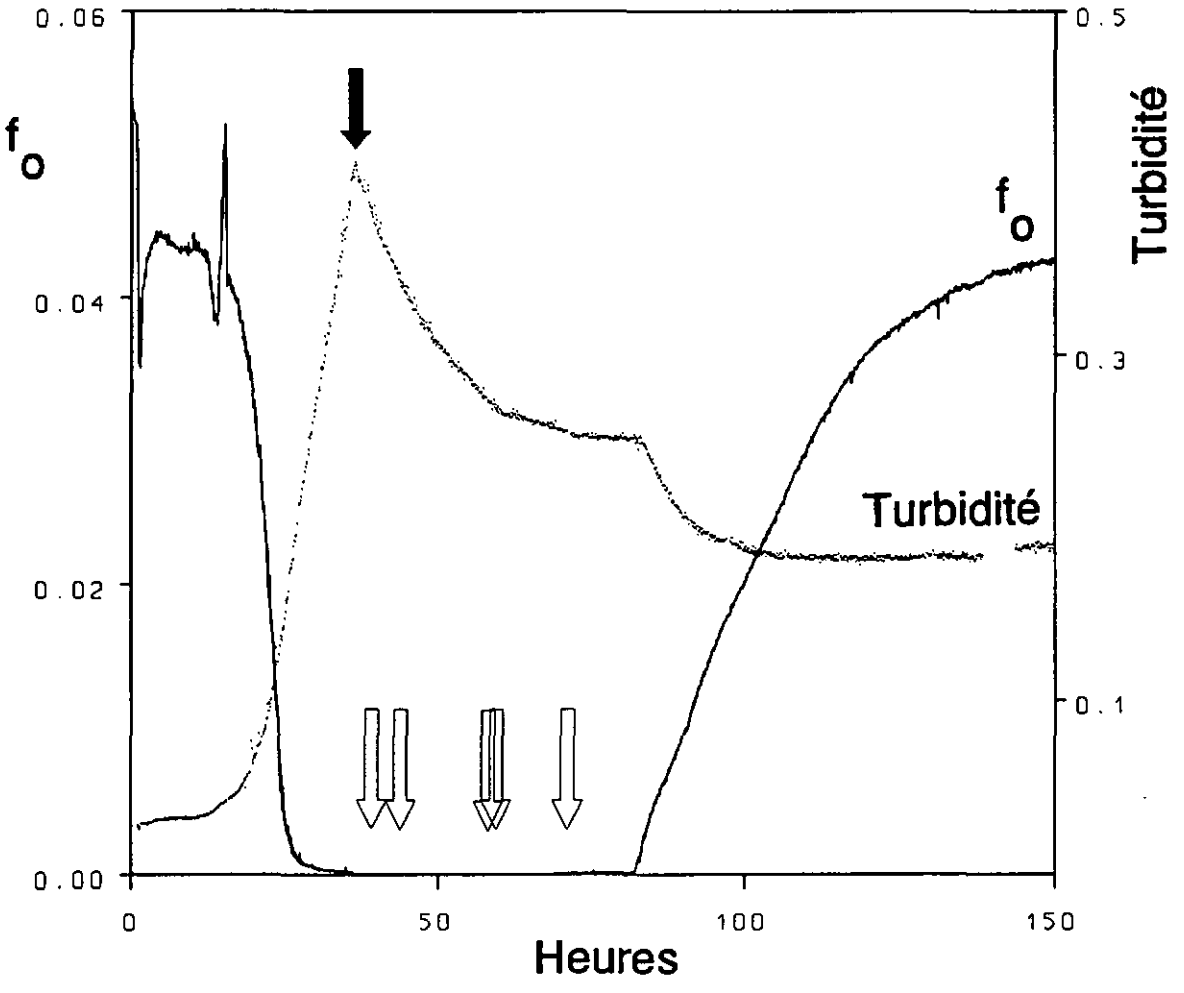


Figure 1 Etablissement de la limitation par l'hydrogène. EP51: D=0.022h^{-1} puis (flèche noire) 0.031h^{-1}. Augmentations de la teneur en oxygène dans l'apport de gaz (flèches blanches).

La figure 1 présente les cinétiques de la turbidité et de l'oxygène dissous durant l'expérience EP51. Dans ce fermenteur, le temps de résidence de la phase gazeuse était d'une dizaine

d'heures environ, et le taux de dilution était faible D = 0.022, puis 0.031 h^{-1}. Au moment de l'inoculation, l'apport de gaz comportait 4.5% d'oxygène et 50% d'hydrogène. Après une latence d'une dizaine d'heures, on a observé une courte phase de croissance exponentielle, avant que la culture ne soit limitée par l'oxygène. Ensuite, la teneur en oxygène de l'apport de gaz a été augmenté par palier (flèches blanches), ce qui a simultanément diminué l'apport en hydrogène. Or, du fait du long temps de résidence de la phase gazeuse, celle-ci est devenue plus riche en hydrogène que l'apport. Les augmentations successives de la teneur en oxygène, même si elles ont légèrement influencé la cinétique de la biomasse, n'ont pas suffi pas à lever la limitation par l'oxygène. Tandis que la composition de la phase gazeuse se rapprochait de sa composition finale, l'oxygène devint soudainement non-limitant. La culture se retrouva alors limitée par l'hydrogène. Comme la fraction de ce gaz tendait vers sa valeur stationnaire en diminuant, il y avait davantage d'hydrogène disponible au début de cette transition limitée et la biomasse a tendu "à la baisse" vers son état stationnaire. Finalement, on a observé que la biomasse atteignait un régime stationnaire bien avant le signal d'oxygène. Il s'agit probablement d'une manifestation du phénomène auparavant mis en évidence avec une simulation (fin du chapitre des gaz).

La figure 2 présente l'expérience EP69 où l'on a observé un comportement du système bien différent, parce que le temps de résidence des gaz dans la phase gazeuse était beaucoup plus faible, environ une demi-heure, et le taux de dilution plus élevé, D=0.116 h^{-1}. Le début de l'expérience est identique, mais ensuite, à chaque augmentation de la tenenur en oxygène de l'apport de gaz, on a observé une croissance momentanément non-limitée. Finalement, après 71h, la biomasse n'est définitivement plus limitée par l'oxygène, et tend "à la hausse" vers un état stationnaire limité par l'hydrogène.

D'après les données de M. Fasnacht et notre expérience de la culture d'*A. autotrophicum* dans le milieu de Schlegel, seuls deux facteurs, autres que l'hydrogène, pouvaient éventuellement limiter la croissance autotrophe: un oligo-élément ou le gaz carbonique. C'est pourquoi, nous avons injecté une solution concentrée d'oligo-éléments (SL6 10X) afin de doubler leurs concentrations finales, ou du bicarbonate de sodium à 10 mM final, dans des cultures stationnaires limitées par l'hydrogène. Dans aucunes de ces circonstances n'a été observé de reprise de la croissance, ni de variation du signal de l'oxygène dissous, que ce soit au plus faible ou au plus fort taux de dilution (0.031 et 0.148 h^{-1}). Un unique essai d'injection d'hydrogène a eu pour conséquence la reprise immédiate de la croissance.

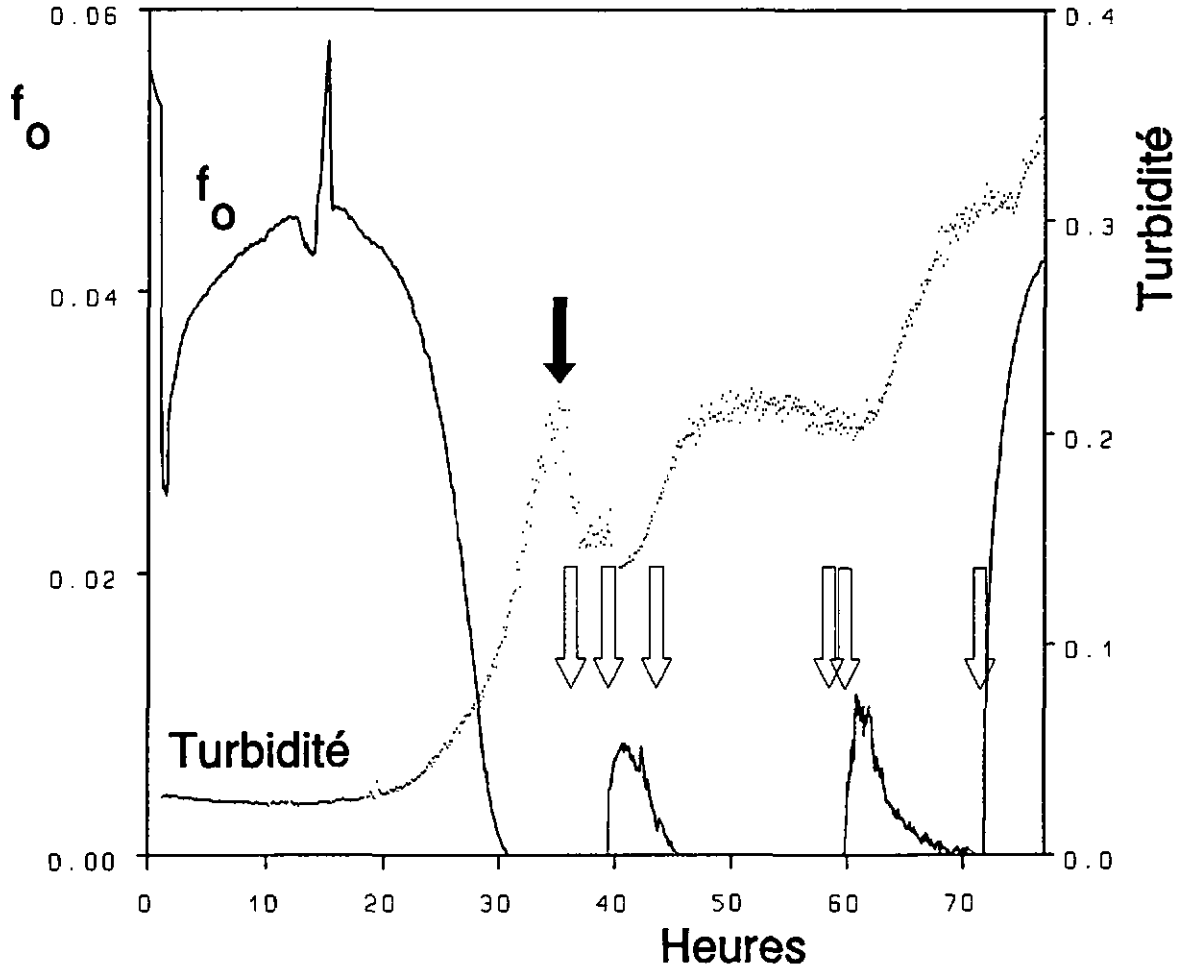


Figure 2 Etablissement de la limitation par l'hydrogène. EP69: D=0.020 h^{-1} puis (flèche noire) 0.116h^{-1}. Augmentations de la teneur en oxygène dans l'apport de gaz (flèches blanches).

La distribution des états stationnaires limités par l'hydrogène. En reprenant le formalisme introduit au chapitre des gaz, on a considéré le système d'équations suivant pour décrire la croissance limitée par l'hydrogène

$$\frac{dX}{dt} = (r-D)X$$

$$V^l[H_2]^*\frac{df_h^l}{dt} \simeq \Delta_h - V^l q_h X$$

où Δ_h est le flux molaire d'hydrogène transféré dans la culture. Comme il a été mentionné précédemment, ce flux peut être considéré comme constant dans un fermenteur donné, un certain temps après l'apparition de la limitation, et *a fortiori* pour l'état stationnaire. La sortie de l'hydrogène dissous n'a pas été prise en compte ($-Df_h = 0$) et c'est pourquoi on utilisera l'indice ∞ pour désigner l'approximation de la biomasse stationnaire

$$X_\infty = \frac{\Delta_h}{V^1 q_h}.$$

Pour les deux modèles du taux de consommation QLIN et YLIN, on a calculé la distributions théorique de la biomasse stationnaire

$$\text{QLIN:} \quad q_h = \frac{D}{Y_{max}} + m \quad \text{donc} \quad X_\infty = \frac{\Delta_h Y_{max}}{V^1 (D + Y_{max} m)},$$

$$\text{YLIN:} \quad q_h = \frac{D}{Y_0 + ZD} \quad \text{donc} \quad X_\infty = \frac{\Delta_h (Y_0 + ZD)}{V^1 D}.$$

Pour Δ_h et V^1 constants, ces deux distributions correspondent à des branches d'hyperbole décroissante en fonction de D, et on peut observer une telle distribution sur les données expérimentales de Morinaga et al. (1978). Par ailleurs, il est à noter que Δ_h constant est lié à la simplification, $f'_h=0$, qui n'est applicable que pour les taux de dilution pas trop voisins du lessivage.

Il nous a semblé souhaitable d'obtenir des biomasses stationnaires de densité comparable dans des fermenteurs soumis à des taux de dilution différents. Par conséquent, il a fallut choisir un flux total de gaz dans chaque fermenteur qui contrebalance la tendance à une distribution hyperbolique des états stationnaires. D'où de très grandes différences dans les temps de résidence des phases gazeuses, comme évoqué précédemment.

Composition de la biomasse et excrétions. A l'état stationnaire, la composition élémentaire de la biomasse a été déterminée en supposant à nouveau 5% de cendre dans le poids sec. On a obtenu, en première approximation

$$CH_2O_{0.4}N_{0.24},$$

qui est proche de la composition élémentaire hétérotrophe. Mais, contrairement à cette dernière, cette composition varie avec le taux de dilution. En particulier, le contenu en carbone diminue selon

$$\%C = 48.5 - 23.4D,$$

et il n'y aurait donc plus que 44.5% de carbone dans la biomasse durant la croissance exponentielle. Cette tendance à la baisse se retrouve lorsque l'on détermine le degré de réduction de la biomasse

$$\gamma'_X = 4.38 - 2.45 \cdot D.$$

La plupart des auteurs considèrent que la composition de la biomasse est indépendante du taux de dilution. Une telle modification de la composition peut pourtant être suspectée sur les figures de Gräzer-Lampart et al. (1986) chez *Hyphomicrobium* ZV620 limité par le méthanol. Le PHB n'a jamais pu être détecté dans des cellules provenant de cultures limitées par l'hydrogène. La même observation a été faite chez *Alcaligenes eutrophus* dans des conditions de culture similaires (Siegel & Ollis, 1984). La variation du contenu en carbone d'*A. autotrophicum* ne serait donc pas causée par une accumulation de réserve carbonée aux faibles taux de croissance.

La figure 3 présente le rapport de la turbidité sur le poids sec qui peut être décrit par

$$\frac{\text{Turbité}}{\text{Poids sec}} = 0.829 + 0.332 \cdot D.$$

Ce rapport est *grosso modo* le même que celui obtenu en hétérotrophie. La pente de cette relation est plus faible, mais cette différence n'est probablement pas statistiquement significative. Les cellules observées au microscope sont plus petites et surtout plus courtes en autotrophie qu'en hétérotrophie.

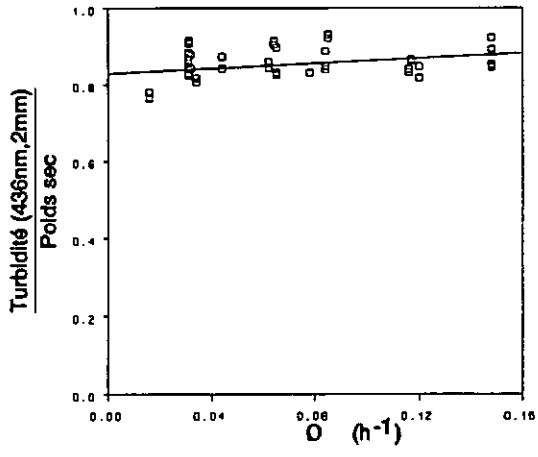


Figure 3 Rapport turbidité (436nm, 2mm chemin optique) sur poids sec.

Les protéines dosées dans le surnageant ne sont pas détectables: moins de 1% des protéines synthétisées sont excrétées. Le carbone organique total du surnageant correspond à moins de 2% du carbone organique représenté par la biomasse. *A. autotrophicum* n'excrète donc que peu métabolites durant la croissance stationnaire limitée par l'hydrogène. L'excrétion de métabolites en quantité non-négligeable durant la croissance limitée par l'énergie a été observée chez des organismes autotrophes obligatoires (Cohen et al. 1979).

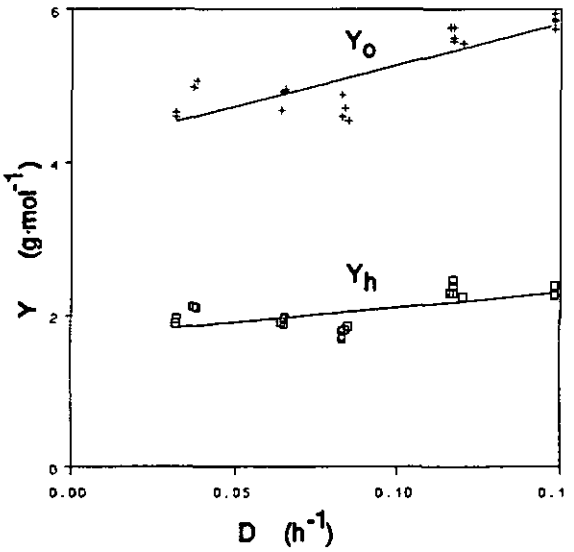


Figure 4 Rendement de croissance stationnaire sur l'hydrogène (□) et l'oxygène(+).

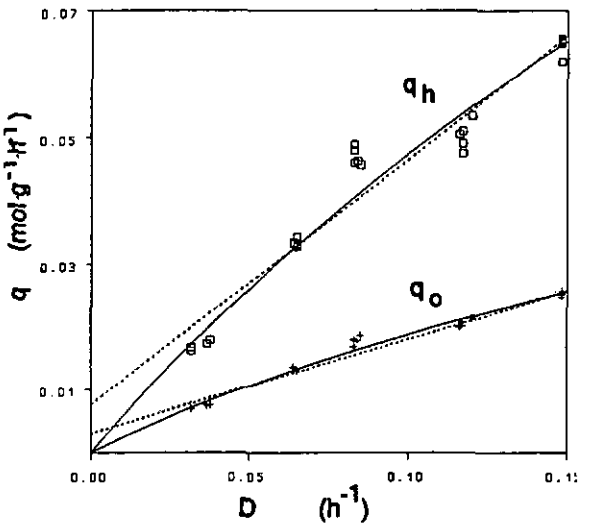


Figure 5 Taux de consommation de l'hydrogène (□) et de l'oxygène (+), prédictions d'après les rendements (————) et régressions linéaires (....).

Rendements et consommations. La figure 4 présente les rendements de croissance stationnaire sur l'hydrogène et sur l'oxygène et les deux droites de régression qui leur sont associées (modèle YLIN)

$$Y = Y_0 + ZD,$$

Hydrogène: $Y_{0,h} = 1.72\ g \cdot mol^{-1}$ $Z_h = 3.85\ g \cdot h \cdot mol^{-1}$,

Oxygène: $Y_{0,o} = 4.19\ g \cdot mol^{-1}$ $Z_o = 10.8\ g \cdot h \cdot mol^{-1}$.

La distribution des résiduels n'est malheureusement pas satisfaisante.

La figure 5 présente les taux de consommation expérimentaux, les régressions linéaires correspondant au modèle de Pirt (modèle QLIN) et les consommation selon YLIN recalculés d'après les rendements et qui procurent une meilleure description des petits taux de dilution.

Les valeurs suivantes ont été obtenues pour le modèle de Pirt

$$q = \frac{D}{Y_{max}} + m$$

Hydrogène: $Y_{max,h} = 2.57\ g \cdot mol^{-1}$ $m_h = 7.8 \cdot 10^{-3}\ mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$

Oxygène: $Y_{max,o} = 6.49\ g \cdot mol^{-1}$ $m_o = 3.2 \cdot 10^{-3}\ mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$

$$\frac{Y_{max,o}}{Y_{max,h}} = 2.53$$

Chez *Alcaligenes eutrophus* H20, les valeurs suivantes ont été obtenues (Bongers, 1970a)

$$Y_{max,h} = 6.2\text{-}6.6\ g \cdot mol^{-1} \quad m_h = 6\text{-}8 \cdot 10^{-3}\ mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1},$$

chez *A. eutrophus* H16 (Jüttner 1977)

$$Y_{max,h} = 3.86\ g \cdot mol^{-1} \quad m_h = 90 \cdot 10^{-3}\ mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$$

$$Y_{max,o} = 16.83\ g \cdot mol^{-1} \quad m_o = 34 \cdot 10^{-3}\ mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$$

$$\frac{Y_{max,o}}{Y_{max,h}} = 4.36$$

et chez *A. eutrophus* ATCC17707 (Siegel & Ollis, 1984)

$$Y_{max,h} = 4.5\ g \cdot mol^{-1} \quad m_h = 2.5 \cdot 10^{-2}\ mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$$

Les valeurs de $Y_{max,h}$ chez *A. eutrophus* sont systématiquement plus grandes que celles que nous avons obtenues, de même que le rapport $Y_{max,o}/Y_{max,h}$. Ceci provient très certainement de la présence supplémentaire d'une hydrogénase soluble capable de réduire le NAD^+ chez *A. eutrophus*. Les rendements différents chez les différentes souches d'*A. eutrophus* dépendent certainement autant des conditions expérimentales que des souches elle-mêmes. Bien que Siegel & Ollis (1984) utilisent un spectromètre de masse pour leurs analyses de gaz, leurs données expérimentales sont moins bien allignées que les nôtres, mais, comme ces auteurs le soulignent si justement, la difficulté principale de ce type d'expérience réside dans la stabilisation de la distribution des gaz.

Fixation du gaz carbonique. En autotrophie, les flux en $C\text{-}mol \cdot h^{-1}$ de la biomasse et du carbone sont identiques s'il n'y a pas d'excrétion de métabolites

$$\Phi_X = \Phi_C.$$

En introduisant les degrés de réduction généralisés de l'hydrogène et de l'oxygène

$$\gamma'_H = 2 \quad \text{et} \quad \gamma'_O = -4$$

on parvient à formuler une relation de balance pour la croissance autotrophe (d'après Roels, 1980)

$$-\gamma'_X\Phi_X + \gamma'_H\Phi_H + \gamma'_O\Phi_O = 0.$$

On en tire une expression permettant de prédire le rendement de croissance sur le gaz carbonique à partir des deux rendements déjà connus

$$\Phi_C = \frac{\gamma'_H\Phi_H+\gamma'_O\Phi_O}{\gamma'_X} \quad \text{donc} \quad Y_C = \frac{4.38-2.45\cdot D}{\frac{2}{Y_H}-\frac{4}{Y_O}}.$$

Par ailleurs, étant donné que la biomasse est composée d'une fraction connue de carbone (de poids moléculaire 12), on devrait théoriquement obtenir un rendement de

$$Y_C = \frac{12}{\%C/100} = \frac{12\cdot 100}{48.5-23.4\cdot D}$$

La figure 4 présente les rendements sur le gaz carbonique, prédits d'après l'analyse de la composition de la biomasse et d'après les rendements sur l'hydrogène et l'oxygène selon le modèle de Pirt et selon le modèle YLIN. La distribution des rendements d'après la composition est supérieure aux deux autres d'environ un cinquième. Il y donc une imprécision de 20% sur le bilan en carbone du système. Les prédictions d'après Pirt et d'après YLIN se distinguent aux faibles taux de croissance: l'allure générale du nouveau modèle est conforme à l'allure générale de la prédiction selon la composition. En revanche, pour expliquer la chute du rendement selon Pirt aux bas taux de dilution, il faudrait admettre

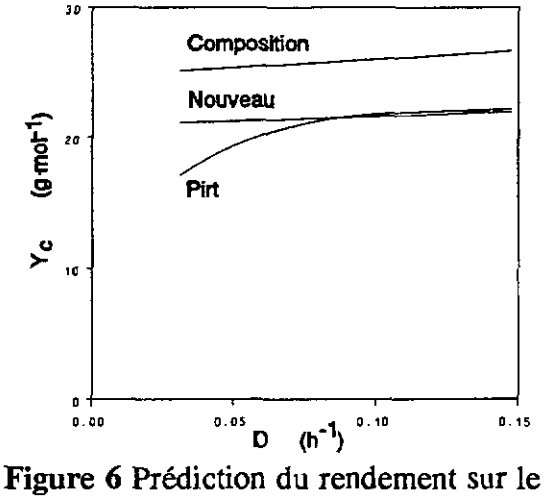


Figure 6 Prédiction du rendement sur le gaz carbonique. Explication dans le texte.

qu'une part non négligeable du gaz carbonique fixé est ensuite excrétée dans le milieu sous forme de composé organique, ce qui n'a pas été observé.

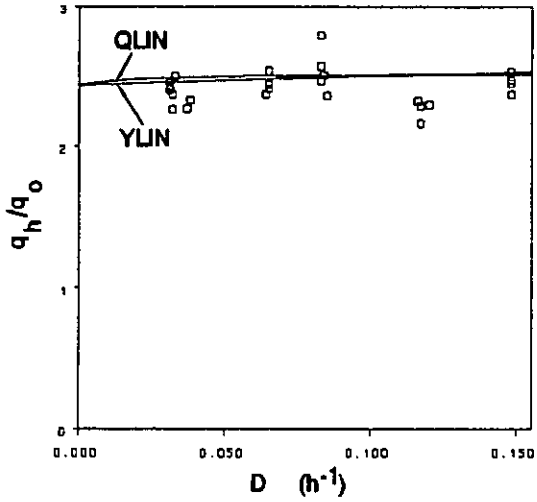


Figure 7 LempD, rapports hydrogène sur oxygène consommé et prédictions d'après les rendements.

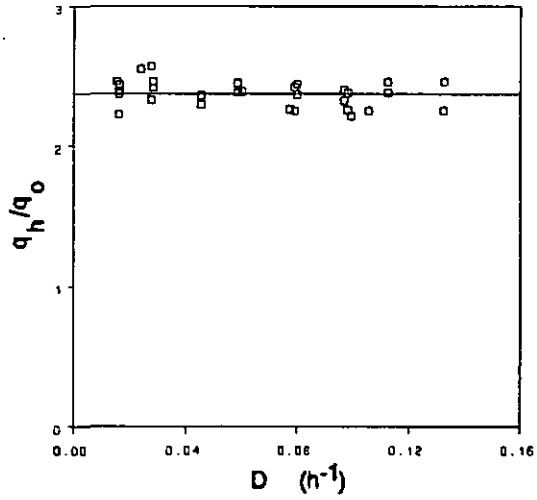


Figure 8 LempA, rapports hydrogène sur oxygène consommé et valeur moyenne.

Rapport hydrogène sur oxygène consommé. Le calcul du rapport des taux de consommation tend à amplifier les erreurs commises lors des analyses de composition des gaz. En revanche, ce calcul est totalement indépendant des erreurs commises tant sur les flux totaux de gaz que sur les biomasses stationnaires ou encore sur les compositions élémentaires. La figure 5 présente les rapports obtenus expérimentalement ainsi que les prédictions provenant des deux modèles de consommations. L'adéquation des modèles aux données expérimentales est satisfaisante. Le rapport des taux de consommation est quasi constant sur l'ensemble des taux de dilution considérés. Cette particularité inattendue ne permet pas pour autant de trancher en faveur de l'un ou de l'autre modèle. Toutefois, le modèle de Pirt pris dans son sens premier devrait admettre un rapport tendant vers 2 lorsque le taux de dilution tend vers zéro, ce qui n'est manifestement pas le cas. La majorité des données de la série d'expériences LempA ne sont pas utilisables, à l'exception des rapports des taux de consommation qui sont présentés sur la figure 6. La constance de ce rapport est confirmée et même étendue à des taux de dilution inférieurs à ceux précédemment considérés. La valeur moyenne du rapport pour LempD (2.5) est un peu supérieur à celle de LempA (2.38). La calibration du chromatographe en serait la cause.

Transitions limitees par l'hydrogene. Il a été montré dans le chapitre consacré aux gaz que les transitions provoquées par la modification soudaine du taux de dilution sont les plus simples à étudier; le transfert molaire de l'hydrogène demeure pratiquement constant durant ces transitions.

L'approximation de la biomasse stationnaire sans dimension χ_∞ s'obtient en divisant la distribution de la biomasse stationnaire du modèle YLIN (par exemple)

$$X_\infty = \frac{\Delta_h (Y_0 + ZD)}{V^{-1} D}$$

par la biomasse de référence

$$X_{ref} = \frac{\Delta_h (Y_0 + Zr_{exp})}{V^{-1} r_{exp}}$$

ce qui procure après quelques réarrangements

$$\chi_\infty(\rho) = \frac{\zeta + (1-\zeta)\rho}{\rho} \quad \text{où} \quad \zeta = \frac{Y_0}{Y_0 + Zr_{exp}},$$

qui est une branche d'hyperbole décroissante. Cette distribution ne comporte que des biomasses stationnaires χ_∞ supérieures à l'unité pour des taux de dilution inférieurs au lessivage. La figure 9 présente cette distribution dans le plan $(\rho;\chi)$, ainsi que la localisation de deux transitions qui résultent d'une augmentation (1), puis d'une diminution (2), du taux de dilution. Ces transitions seront continuellement limitées par l'hydrogène puisqu'elles se déroulent uniquement dans le domaine I du plan $(\rho;\chi)$. Il faut souligner que, contrairement à l'hétérotrophie, une augmentation du taux de dilution engendre une transition "vers le bas" et qu'une importante variation de la biomasse peut être provoquée par une petite variation du taux de dilution.

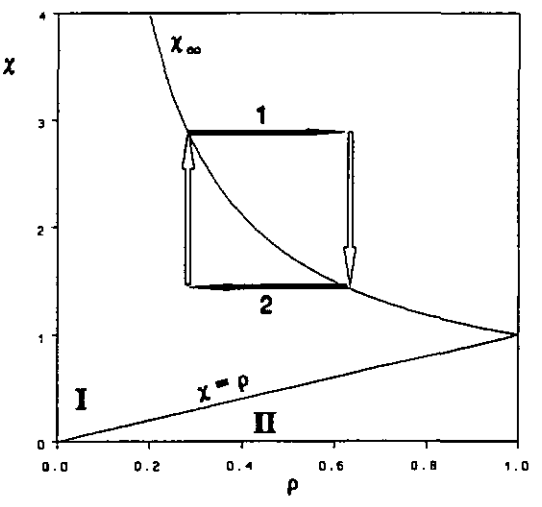


Figure 9 Effet du changement du taux de dilution (⇐,⇒) dans le plan $(\rho;\chi)$ et localisation des transitions qui s'ensuivent (⇓,⇑).

La figure 10 montre un exemple de transition "vers le haut" obtenue en diminuant le taux

de dilution. L'oxygène dissous demeure remarquablement constant durant cette transition, exception faite des inévitables fluctuations parasites circadiennes liées aux variations de la température du laboratoire. L'oxygène dissous fluctue autour de f'_o=0.038, alors qu'il est apporté à la culture dans une proportion beaucoup plus importante, f^{in}_o=0.155. Il a été établi, lors de la description du comportement des gaz, qu'une petite variation du rapport hydrogène sur oxygène consommé devait provoquer une importante variation du signal d'oxygène dissous. Par conséquent, le rapport hydrogène sur oxygène consommé demeure constant durant toute la transition présenté sur la figure 10.

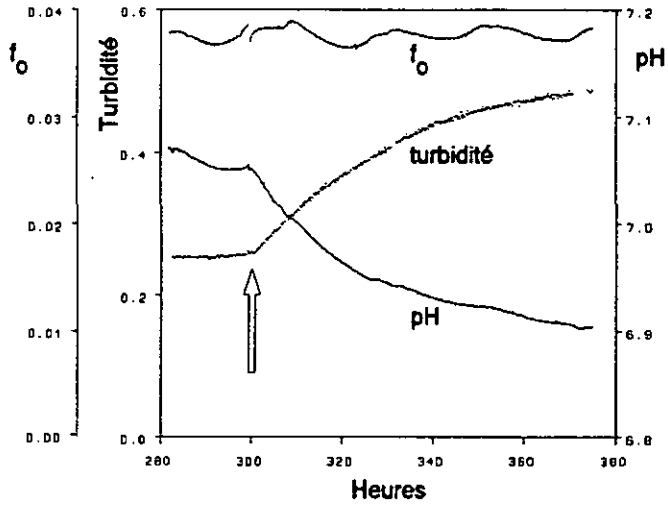


Figure 10 EP64. Baisse soudaine du taux de dilution (⇑) de 0.064 à 0.034 h^{-1}.

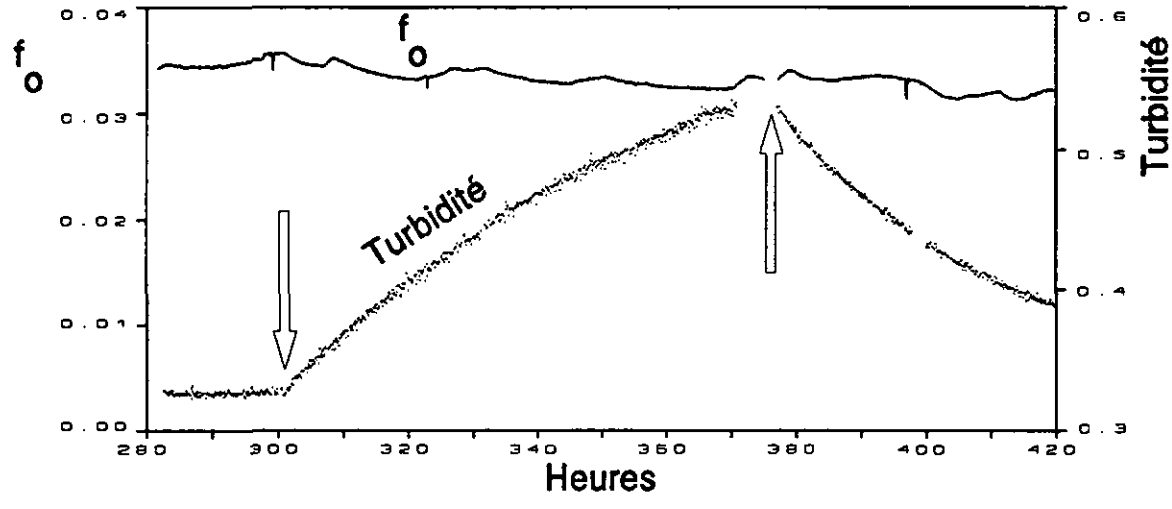


Figure 11 EP59 et EP60. Baisse soudaine du taux de dilution (⇓) de 0.032 à 0.017 h^{-1}, puis augmentation (⇑) de 0.017 à 0.032 h^{-1}.

La figure 11 présente deux transitions obtenues suite à deux changements successifs du taux de dilution. La constance du signal d'oxygène dissous apparaît de nouveau clairement. On remarquera pourtant que le signal d'oxygène diminue très lentement et régulièrement. En effet, la dérive de l'électrode devient perceptible sur 140 h d'expérience

La constance de l'oxygène dissous, et donc du rapport des taux de consommation, a été observée à tous les taux de dilution hormis ceux qui étaient le plus proche du lessivage (EP75: 0.148h^{-1}, EP76: 0.153h^{-1}). Pour ces derniers, il est probable que la pression partielle de l'hydrogène en solution ne puisse plus être négligée, et la constance du transfert de l'hydrogène n'est plus assurée.

A la fin du chapitre consacré au gaz, nous avons montré que les transitions limitées par l'hydrogène, qui résultaient d'un changement du taux de dilution, pouvaient être traitée avec la même théorie que les transitions hétérotrophes. Nous avons donc effectué des régressions non-linéaires sur les données expérimentales avec des cinétique de 1^{er} ordre, afin de déterminer les taux de relaxation des transitions. La figure 12 présente deux exemples de ces ajustements. La distribution des erreurs est très satisfaisante, mais, comme la courbure est peu marquée, une incertitude importante demeure sur la valeur du taux de relaxation. La figure 13 présente les taux de relaxation obtenus pour 12 transitions "vers le haut" et 8 transitions "vers le bas". La prédiction des taux de relaxation selon Monod

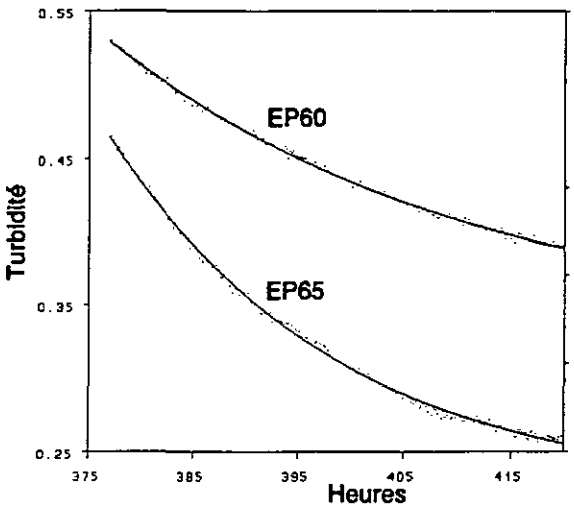


Figure 12 Ajustement d'une cinétique de 1^{er} ordre sur deux transitions "vers le bas"; EP60:0.032h^{-1}, EP65:0.065h^{-1}.

$$R_{Monod} = D$$

y est représentée pour mémoire. La prédiction selon Pirt (R_{QLIN}) a été déduite des valeurs obtenues précédement. Enfin, on a représenté l'approximation des taux de relaxation de YLIN

$$D + \frac{Z_h}{Y_{O,h}} D^2 .$$

Cette dernière prédiction est la plus conforme aux observations expérimentales: les facteurs de convergence étant proches de D dans les petits taux de dilution et supérieurs à la prédiction selon Pirt pour les taux de dilution élevés. De plus, les taux de relaxation des tansitions "vers le haut" sont en moyenne plus élevés que ceux des transitions "vers le bas"

pour un même taux de dilution. Une prédiction plus élaborée selon YLIN

$$R_{YLIN}^{UP} \quad et \quad R_{YLIN}^{DOWN}$$

n'est pas présentée, parce que la dispersion des points expérimentaux est trop forte pour justifier ce raffinement. D'ailleurs, les taux de relaxation des transitions observées ne devraient pas être distribué uniformément, puisque nous avons effectué des variations du taux de dilution de 30 à 50% et que la prédiction du taux de relaxation dépend de l'amplitude de ces variations.

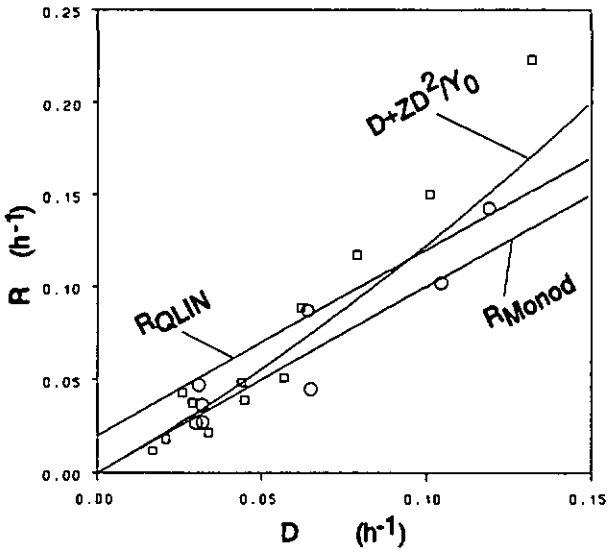


Figure 13 Taux de relaxation de différentes transitions " vers le haut" (□) et "vers le bas" (○). Explications dans le texte.

La description de la croissance autotrophe limitée par l'hydrogène est rendue difficile par les contraintes liées à la stabilisation des flux de gaz et par les faibles taux de dilution utilisés. Les résultats présentés ici suggèrent néanmoins que le modèle YLIN permet une desciption plus cohérente que le modèle de Pirt. De meilleure données expérimentales seront nécessaires pour trancher définitivement entre ces deux modèles.

DISCUSSIONS I: LES MODELES NON-STRUCTURES

Le modèle de Pirt a été énormément employé pour décrire les cultures limitées par un substrat organique ou par un donneur d'électrons inorganique. Il peut être considéré comme le modèle en vigueur dans les années septante et quatre-vingt. Cependant, rares sont les données expérimentales de qualité suffisante pour réellement prouver son bien-fondé, comme par exemple chez *Klebsiella pneumoniae* NCTC 418 limité par le glucose ou par le gluconate (Neijssel & Tempest, 1976). D'ailleurs, Pirt lui-même (1965) a présenté un exemple où son modèle ne s'appliquait pas. Le succès du modèle de Pirt s'explique certainement en partie par sa formulation, laquelle procure un sens biologique à chacun de ses termes: "vrai" rendement de croissance et coefficient de "maintenance". On pourrait tout aussi bien considérer que le modèle de Pirt correspond aux deux premiers termes du développement en série de Taylor d'une fonction, dont l'expression exacte demeure inconnue.

En considérant un modèle non-structuré qui admet que le rendement varie linéairement avec le taux de croissance (le modèle YLIN), les données hétérotrophes ont été mieux décrites qu'en utilisant le modèle de Pirt. Grâce à ce nouveau modèle, le comportement des cultures durant les transitions limitées devint déductible de la seule connaissance des états stationnaires. Toutefois, la description obtenue avec le modèle de Pirt était déjà très acceptable en soit. Nous aurions pu nous en contenter et nous aurions finit par rejoindre les nombreux auteurs qui ont insisté sur l'insuffisante complexité des modèles non-structurés pour décrire les transitions (Esener et al., 1983; Ataai & Shuler, 1985; Chu & Papoustaki, 1987).

Le modèle YLIN a d'abord été utilisé par Hempfling & Vishniac (1967) chez *Thiobacillus neapolitanus* X limité par le thiosulfate, dans un but uniquement descriptif. Ces résultats ont ensuite été confirmés par Kuenen (1979), qui a également démontré que la variation de la composition de la biomasse avec le taux de dilution ne présentait aucune différence significative avec ce qui est communément observé chez les bactéries se conformant au modèle de Pirt: baisse des protéines et augmentation des acides nucléiques avec le taux de croissance (Esener et al., 1982; Wanner & Egli, 1990). Les résultats publiés par Wood &

Kelly (1986) chez *Thiobacillus tepidarius* limité par le thiosulfate, ou par le sulfure, nous laissent supposer que cette bactérie possède également une variation linéaire du rendement, bien que ces auteurs utilisent le modèle de Pirt pour traiter leurs données. La même remarque peut être formulée pour un article concernant *Azotobacter vinelandii* (Aiba et al. 1967). La variation linéaire du rendement pourrait être particulièrement répandue chez les bactéries sulfo-oxydantes. D'ailleurs, *A. autotrophicum* oxyde le thiosulfate (Friedrich & Mitrenga, 1981) et se montrerait capable de croissance avec ce substrat (T. Beffa, comm. pers.). Il n'y a malheureusement aucune base conceptuelle pour le modèle YLIN et Kuenen ne laisse planer aucun doute à ce sujet: "*We have been unable to find an explanation for this pheomenon*".

Il existe certainement d'autres types de distribution des taux de consommation stationnaire. Une distribution qui présente une courbure positive se détecte sur une figure de Gräzer-Lampart et al. (1986) chez *Hyphomicrobium* ZV620 limité par le méthanol.

Nous nous sommes refusés à considérer l'extension du modèle de Pirt (1982) qui consiste à ajouter un second terme de maintenance dépendant linéairement du taux de croissance. L'introduction de ce degré de liberté supplémentaire rend impossible l'identification des paramètres sur un unique ensemble de mesures de consommation. On serait ainsi amené à prendre en compte soit une biomasse structurée, soit des flux non-limitants.

Il n'y a aucun intérêt à considérer un terme de maintenance dépendant non-linéairement du taux de croissance. En effet, n'importe quel distribution des consommations stationnaires peut être subdivisé en un terme constant, un terme proportionnel à D et un reste non-linéaire. Ainsi, généraliser le modèle de Pirt par l'introduction d'un terme de maintenance non-linéaire lui fait perdre toute signification: il n'est plus falsifiable, pour utiliser une terminologie popperienne.

DISCUSSION II: UN MODELE COMPARTIMENTAL

On qualifie de compartimental un modèles dans lequel la biomasse est subdivisée en macro-compartiments dont la somme est égale à la biomasse totale (le modèle de Nyholm est un modèle structuré, mais non pas compartimental). On a choisi de dénommer "KG" le modèle que nous allons présenter, parce qu'il est difficile d'en attribuer la paternité à un unique auteur.

Formulation du modèle KG. Ce modèle résulte des modifications et des améliorations successives apportées au modèle bicompartimental de Williams (1967), par Roels & Kossen (1978) et par Roels (1980). Esener et al. (1982) en font une excellente présentation. Tous les auteurs cités ont utilisé des variables extensives, ce qui leurs épargne l'introduction des termes de dilution par la croissance. Nous avons préféré reformuler le modèle avec des variables exprimées par unité de biomasse. Ces dernières sont indépendantes de l'appareillage de culture utilisé et permettent de mettre en évidence la conservation de la masse.

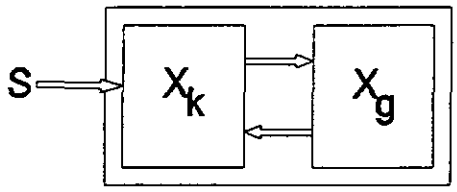


Figure 1 Structure du modèle KG.

La biomasse totale X est subdivisée en deux compartiments X_K et X_G

$$X = X_K + X_G,$$

où X_K représente les monomères, les ARN et les hydrates de carbone, et X_G les protéines, les lipides et l'ADN. On regroupe ainsi dans le compartiment X_K, les masses de tous les composants cellulaires dont le taux de renouvellement (turnover) est important et dans le compartiment X_G les masses des composants dont le taux de renouvellement est faible ou nul. On introduit deux fractions K et G, qui permettent de caractériser la composition de la biomasse

$$K = \frac{X_K}{X} \quad \text{et} \quad G = \frac{X_G}{X}$$

et qui possèdent la propriété

$$K+G = 1 \quad \text{donc} \quad \frac{dK}{dt}+\frac{dG}{dt} = 0,$$

qui enlève un degré de liberté au modèle.

La variation du compartiment K est décrite par

$$\frac{dK}{dt} = C\varphi(\sigma) - k_K KG + k_G G - rK.$$

Le compartiment K se remplit proportionnellement à la consommation et à une constante C que l'on déterminera ultérieurement. Il est consommé pour fournir le compartiment G en fonction du produit K·G, proportionnellement à une constante k_K. Le compartiment G fournit le compartiment K proportionnellement à une constante k_G. Il existe donc un échange de matière entre les deux compartiments, d'où résultera une perte de masse assimilable à un taux de maintenance dépendant de la composition de la biomasse. Enfin, on a pris en compte la dilution de K par la croissance: -rK.

La variation du compartiment G est décrite par

$$\frac{dG}{dt} = Y_{KG} k_K KG - k_G G - rG$$

où Y_{KG} représente le rendement (sans unités) de la conversion de K en G. Ce rendement doit être plus petit que 1. La conversion de G en K possède un rendement postulé égal à 1. De cette dernière équation, on tire les valeurs stationnaires de K et de G

$$\tilde{K} = \frac{D+k_G}{Y_{KG}k_K} \quad \text{et} \quad \tilde{G} = 1-\tilde{K}.$$

Comme la somme des différentielles de K et de G est égale à zéro

$$\frac{dK}{dt}+\frac{dG}{dt} = C\varphi(\sigma) - k_K(1-Y_{KG})KG - r = 0,$$

il faut fixer la valeur de la constante C selon

$$C = r_{exp}+k_K(1-Y_{KG})K_{exp}G_{exp} \quad \text{avec} \quad K_{exp} = \frac{r_{exp}+k_G}{Y_{kg}k_K} \quad \text{et} \quad G_{exp} = 1-K_{exp}$$

pour que le modèle admette une croissance exponentielle au taux r_{exp} dans un milieu non-limitant $\varphi(\sigma)=1$. La constante C est donc plus grand que r_{exp}, et non pas égal à r_{exp} comme Jöbses et al. (1984) le postule faussement.

Etats stationnaires. La distribution des taux de consommation stationnaires en fonction du taux de dilution s'exprime par

$$q = q_{exp}\varphi(\sigma) = q_{exp}\frac{D+k_K(1-Y_{KG})\tilde{K}(1-\tilde{K})}{C}.$$

Comme K stationnaire est une fonction linéaire croissante de D, le taux de consommation en fonction de D est décrit par une branche de parabole tournée vers le bas (le développement de cette expression est laissé au lecteur). La figure 3 présente l'ajustement de cette parabole aux données de consommation hétérotrophe: k_K=1.89, k_G= $1.3\cdot10^{-2}$, Y_{KG}=0.5 et $q_{exp}=8.25\cdot10^{-3}$ mol·g^{-1}·h^{-1}; r_{exp} a été fixé à 0.325 h^{-1} (d'où C=0.542). La figure 3 présente également les distributions de K et de G stationnaires, ainsi que le rendement stationnaire déduit de la consommation. La distribution des rendements apparaît quasi rectiligne pour les taux de dilution moyens à élevés, mais il chute brusquement lorsque le taux de dilution tend vers zéro. Le compartiment K tend vers 0.011 lorsque le taux de croissance tend vers zéro, ce qui est une valeur trop faible pour correspondre au pool des ARN aux faibles taux de dilution. La même observation à été effectuée par Esener et al.

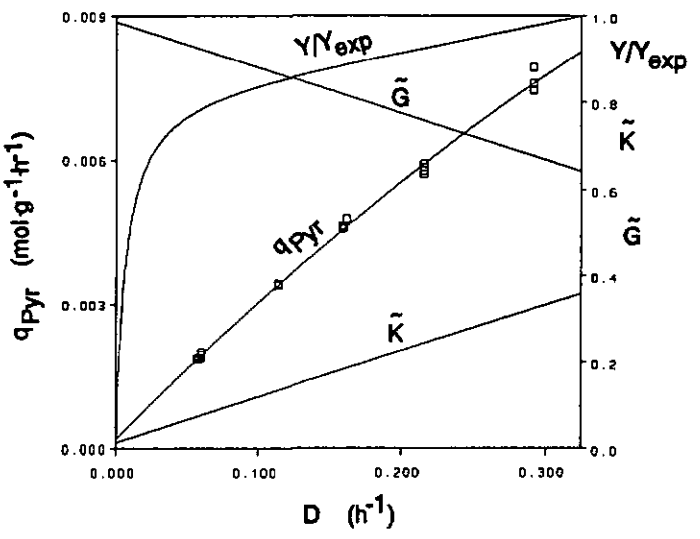


Figure 2 Application du modèle KG à l'état stationnaire hétérotrophe.

(1982) avec les données très complètes à leur disposition chez *Klebsiella aerogenes*.

Transitions. Nous avons effectué l'intégration numérique du modèle KG dans les conditions des transitions expérimentales hétérotrophes. Ensuite, une cinétique de 1er ordre a été ajustée sur les résultats de ces simulations. Une fois encore, nous avons obtenu des ajustements très satisfaisants. La figure 3 présente les taux de relaxations ainsi calculés pour le modèle KG (R_{KG}) et, pour les prédictions selon Monod (R_{Monod}), Pirt (R_{QLIN}) et l'approximation parabolique de R du modèle YLIN. Trois points sont à retenir (1) Le modèle KG présente des taux de relaxation pour les transitions "vers le haut" confondus avec ceux des transitions "vers le bas". (2) Pour les faibles taux de dilution, la prédiction est satisfaisante, puisque proche de celle selon Monod. (3) Pour les taux de dilution élevés, les taux de relaxation sont supérieurs à la prédiction selon Pirt mais nettement inférieurs à celle selon YLIN. Le modèle KG ne procure donc pas une aussi bonne prédiction des transitions limitées que le modèle YLIN.

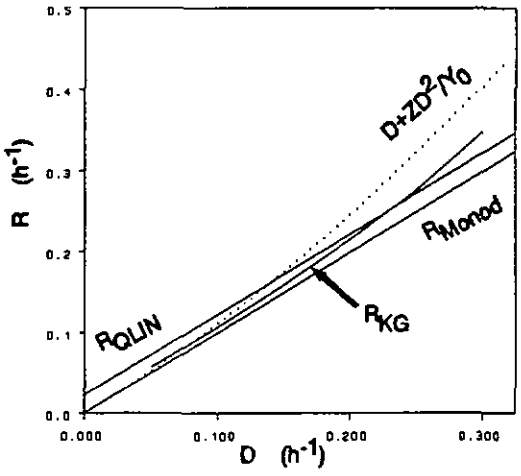


Figure 3 Taux de relaxation de différents modèles.

Esener et al. estiment les paramètres du modèle d'après des cinétiques de culture en fed batch, et parviennent ensuite à la constatation que le taux de croissance non-limitée, déterminé d'après une simulation, est proche du taux exponentiel déterminé expérimentalement. Pourtant, le modèle KG procure l'expression analytique du taux de croissance

$$\frac{dK}{dt}+\frac{dG}{dt} = 0 \quad donc \quad r=C\varphi(\sigma)-k_K(1-Y_{KG})KG,$$

prédiction qui n'est pas restreinte aux seules croissances à taux constant. Le taux instantané de croissance dépend donc à la fois du taux de consommation et de la composition de la biomasse. En particulier, lorsque l'on injecte une solution concentrée du facteur limitant dans une culture à l'état stationnaire, on obtient la distribution des taux initiaux de croissance

$$r^0_{sat} = C - k_K(1-Y_{KG})\tilde{K}(D)\,(1-\tilde{K}(D))\,.$$

Si on considère une augmentation de 50% de la concentration du substrat limitant dans l'apport de milieu, le taux de consommation prend la valeur initiale

$$q^0 = \frac{3 \cdot D}{2 \cdot Y(D)},$$

qui permet de déterminer le taux de croissance initial r^0_{lim} de la transition limitée. La figure 4 présente ces taux de croissance initiaux en fonction de D. r^0_{sat} possède une valeur supérieure à r_{exp} pour les taux de dilution inférieurs au lessivage et il existe également des valeurs de r^0_{lim} supérieures à r_{exp}. La similitude de cette figure avec celle présentée à la fin du chapitre consacré à la croissance non-limitée est le principal intérêt de l'exposition du modèle KG.

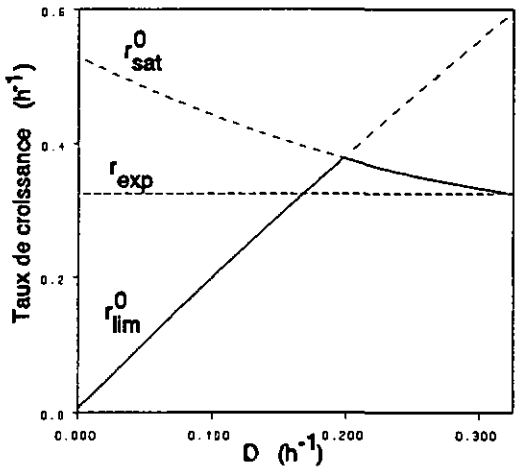


Figure 4 Taux initiaux de croissance.

Il n'a pas été nécessaire de supposer que δ soit plus grand que 1, pour obtenir des taux de croissance supérieurs à r_{exp}. Ici, le gain de taux de croissance est à mettre au compte d'une augmentation du rendement, et non pas de la consommation. Par conséquent, le taux de dilution critique auquel se déroule le passage de la limitation à la non-limitation est nettement plus petit que ce qu'indique les données expérimentales. Le modèle KG présente donc des comportements qui sont qualitativement assez proches de ceux que l'on a observé, mais qui reflètent mal la réalité d'un point de vue quantitatif. Nous avons tenté de modifier ce modèle pour lui faire gagner en pouvoir descriptif, sans y parvenir de façon vraiment convaincante. Harder (1979) a proposé une version améliorée du modèle, en introduisant deux compartiments supplémentaires et en modifiant la description des flux, en particulier celui de K sur G. Il s'agit certainement de la bonne approche pour généraliser le modèle; malheureusement, elle conduit à un système d'équations qui n'est plus étudiable que numériquement.

DISCUSSION III: CROISSANCES LIMITEE ET NON-LIMITEE

Le paramètre δ a été introduit dans la formulation du déterminisme de la consommation comme étant proportionnel à l'activité spécifique du système de consommation. Mais, nous n'avons en fait jamais précisé ce qu'était ce "système de consommation". Il pourrait tout aussi bien s'agir: d'une unique perméase; d'une voie métabolique; ou de l'ensemble du métabolisme, comme la théorie du contrôle métabolique le suggérerait. Une seule situation est sans ambiguïté: lors de l'induction *de novo* d'un enzyme qui est le seul à faire défaut pour que la croissance sur un substrat soit possible, δ doit être proportionnel à l'activité spécifique de cet enzyme durant les premières heures de l'induction.

Höfle (1983) a étudié l'évolution de différents paramètres biologiques dans des cultures continues de très longue durée, plus de 300 temps de génération avec *Cytophaga johnsonae* limité par le glucose. Si des paramètres comme la biomasse stationnaire et la composition élémentaire ne fluctuent que fort peu, il n'en va pas de même du taux potentiel (maximal) de consommation du glucose. Ce taux augmente d'un facteur 25 en 300 temps de génération! Or, il paraît improbable que le métabolisme d'un organisme puisse effectivement supporter une pareille augmentation de la consommation. Höfle a justement observé que ce phénomène va de pair avec une diminution, allant jusqu'à 90%, du nombre de colonies formées sur agar (CFU). Cette diminution apparente de la vitalité ne peut pas être expliquée par l'allongement des cellules ou par leur agrégation. De plus, la viabilité des cellules dans le chémostat ne semble que faiblement varier d'après des mesures d'ATP.

Théoriquement, nous avons montré que δ ne jouait aucun rôle dans le domaine I du plan $(\rho;\chi)$, c'est-à-dire, lorsque le système de consommation n'est pas saturé. Dans la mesure où le modèle YLIN semble aussi bien décrire les états stationnaires que les transitions continuellement limitées, on peut affirmer que la croissance est complètement déterminée par le taux de consommation. En d'autres termes, la biomasse semble disposer d'un excédent de tous ses composants catalytiques. La variation du rendement avec le taux de croissance ne dépendrait que de l'efficacité du couplage entre les différents flux et seules des considérations de nature thermodynamique permettraient d'expliquer la variation du rendement.

Lorsque le système de consommation est brusquement saturé, la réponse (linéaire) qui s'ensuit a été démontrée comme dépendant du préconditionnement de la biomasse. Il existe donc un ensemble de facteurs internes qui détermine la nature et surtout l'amplitude de cette réponse. Certains composants catalytiques du métabolisme pourraient alors être saturés, et par conséquent, il serait logique de les identifier comme ce qui détermine la valeur de δ. Pour peu que ces composants soient situés "en aval" du point de départ de la synthèse du PHB (acétyl-CoA), on ferait d'une pierre deux coups, puisqu'ainsi on justifierait que la synthèse de PHB soit la signature caractéristique d'une délimitation soudaine.

D'après deux publications récentes (Jensen & Pedersen, 1990; Marr, 1991), il semblerait que les taux de synthèse des macromolécules (ARN, ADN, protéines) soient déterminés par la taille du pool des monomères ou, en d'autre termes, tant les polymérases que les ribosomes ne sont jamais saturés en nucléotides, respectivement en tRNA chargés. Comme ces travaux se basent sur des connaissances acquises chez *Escherichia coli*, qui est une bactérie aux taux de croissance particulièrement élevés, ils peuvent vraisemblablement être extrapolés aux organismes dont les taux de croissance sont plus faibles. D'après ces données, on peut supposer que le taux de croissance serait déterminé par la partie du métabolisme qui synthétise les monomères et que δ serait à situer à l'entrée de ces voies métaboliques.

Nous devons bien avouer que si l'introduction de δ est souhaitable d'un point de vue théorique, et nécessaire pour décrire certaines expériences, elle soulève une quantité de problèmes auxquels il est difficile d'apporter une réponse. Il se cache là-dessous un problème fondamental pour la compréhension de l'intégration du métabolisme microbien.

DISCUSSION IV: ASPECTS ECOPHYSIOLOGIQUES

Nous avons commencé ce travail en évoquant que les apports de substrats n'étaient jamais constants ou continus dans les environnements "naturels". Nous allons reprendre cette idée pour montrer comment différentes stratégies d'exploitation de l'environnement par les microorganismes peuvent être envisagées. Auparavant, on présentera quelques résultats expérimentaux obtenus chez des organismes dont les taux de croissance maximaux sont nettement supérieurs à ceux d'*A. autotrophicum*.

On commencera par mentionner le travail de Crabbendam et al. (1985) sur *Clostridium butyricum* en culture continue avec le glucose comme seule source de carbone et d'énergie. Chez cet organisme à métabolisme fermentatif, la distribution des taux de consommation se conforme à Pirt. Les taux potentiels (maximaux) de consommation du glucose sont distribués sur une droite à peu près parallèle à la distribution des taux de consommation et qui lui est supérieure d'environ 30 % au plus haut taux de dilution reporté (0.35 h^{-1}). Ainsi, chez cet organisme, δ varierait fortement avec le taux de croissance, ce qui rapprocherait la séparation entre les domaines I et II de la distribution des biomasses stationnaires. Crabbendam et al. signalent l'existence d'une latence (lag) de 10 à 20 minutes dans l'augmentation du taux de croissance suite à une délimitation soudaine. Cette latence est accompagnée d'une chute du rendement qui compense l'augmentation instantanée, quoique modérée, de la consommation du substrat. *Clostridium butyricum* possède assurément une régulation du métabolisme qui doit lui permettre, avant toute chose, de conserver une balance redox (NAD^+/NADH) à peu près stable. L'excrétion sous forme de produits de fermentation de l'excès soudain de consommation constitue un mécanisme protecteur hautement efficace qui assure le maintien de la pression osmotique à l'intérieur de la cellule. Le taux de consommation maximal de cet organisme avoisine 16 $mmol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ de glucose, ce qui représente un flux de carbone au niveau du pyruvate quatre fois plus important que chez *A. autotrophicum*. Le flux excédentaire est d'abord complètement catabolisé, puis ensuite progressivement dirigé vers les voies anaboliques, ce qui provoque le redémarrage de la croissance.

Un autre aspect intéressant du travail de Crabbendam et al. est qu'il met en évidence que

Clostridium butyricum et *Klebsiella aerogenes* partagent nombre de mécanismes de régulation. *K. aerogenes*, quoiqu'aérobie facultatif, présente le même type de réponse lors de la suppression de la limitation dans une culture aérobie auparavant limitée par le glucose: apparition d'une latence et excrétion d'une partie du glucose consommé sous forme de produits de fermentation. En revanche, chez *K. aerogenes*, le taux potentiel de consommation du glucose est quasi identique au taux exponentiel à n'importe quel taux de dilution (O'Brien et al. 1980). La possession d'un métabolisme respiratoire permet à *K. aerogenes* de se débarrasser beaucoup plus facilement de l'excédent de pouvoir réducteur. Il en résulte néanmoins une surproduction momentanée d'ATP, qui doit être dissipée, probablement à l'aide d'un cycle futile (Neijssel & Tempest, 1976). Il n'en reste pas moins que l'on observe un découplage momentané entre anabolisme et catabolisme, qui laisse le temps à la cellule de s'adapter aux nouvelles conditions de croissance. Que ce soit par des expériences de délimitation, ou par des expériences de "shift up", il a été montré qu'*Escherichia coli* exhibe également un temps de latence avant que sa biomasse ne se mette à augmenter (Mateles et al. 1965; Jensen & Pedersen, 1990; Marr, 1991).

Toutes les observations de délimitation soudaine chez *A. autotrophicum* ont mis en évidence une reprise immédiate de la croissance à un taux supérieur à celui de la croissance exponentielle. La différence entre notre organisme et ceux cités précédemment est encore plus frappante si l'on considère qu'un temps de latence de 10 min chez une entérobactérie correspond à environ un quart de son temps de doublement (croissance exponentielle dans un milieu minéral ne contenant qu'un sucre); alors que chez *A. autotrophicum*, s'il existe une latence, elle est inférieure à 3 min, soit moins d'un centième du temps de génération! Notre organisme semble donc toujours avoir à sa disposition un potentiel de synthèse qui excède ses besoins actuels.

Westerhoff et al. (1982) concluent de leur étude sur la thermodynamique de la croissance microbienne que les microorganismes maximisent leurs taux de croissance. Or, les études expérimentales sur lesquelles se basent ces travaux (en fait, la majorité des études qui portent sur la physiologie de la croissance) concernent justement des espèces de bactéries à croissance rapide. Il s'agit d'organismes que, d'un point de vue écologique, on doit considérer comme des zymogènes ou, si l'on préfère, appliquant une stratégie r (Andrews & Harris, 1986). Les *Bacillus*, et les *Clostridium* pratiquent assurément le même type de stratégie. En revanche, au vu de son modeste taux de croissance exponentielle, nous pensons

qu'*A. autotrophicum* pourrait appartenir à un type d'organisme plus autochtone, ou appliquant une stratégie K. Le fait de prétendre qu'*A. autotrophicum* soit un autochtone au même titre que certains oligotrophes serait exagéré. Nous allons cependant montrer qu'*A. autotrophicum* possède un caractère autochtone marqué lorsqu'on le compare à *Escherichia coli*, par exemple. Le fait qu'*A. autotrophicum* ait été isolé à l'aide d'une technique de filtration sur membrane (et jamais autrement) ne peut que renforcer cette idée.

On admettra qu'une bactérie maximise ses chances de dispersion et de survie à long terme, si elle arrive à constituer la plus grande population possible au terme d'une période de croissance, dont la durée et les modalités sont fixées par l'environnement. Il doit exister une relation d'optimalité entre la répartition temporelle des apports de nutriments dans un environnement et la stratégie à utiliser pour les exploiter. En partant de cette idée, on peut tenter de décrire l'environnement dans lequel les zymogènes devraient dominer et celui qui conviendrait le mieux aux autochtones. Il est à noter que s'il existe énormément de publications consacrées à la modélisation de la croissance des microorganismes, il n'y en a que fort peu qui concernent leur environnement, par exemple Parnas & Cohen (1976).

Dans l'environnement des zymogènes, les nutriments ne sont présents que de temps à autre, mais alors à profusion, ce qui doit leur assurer une croissance essentiellement non-limitée. A la fin d'une période de croissance, les organismes les plus nombreux seront ceux qui se seront multipliés le plus rapidement. Par ailleurs, le taux maximal de croissance qui pourra être atteint sera d'autant plus élevé que le métabolisme sera finement adapté aux conditions offertes par l'environnement à ce moment-là. Et, l'adaptation du métabolisme aux conditions de l'environnement va requérir un certain temps. Si la période durant laquelle le substrat est disponible en excès est suffisamment longue, la perte de temps causée par l'adaptation sera compensée par le gain ultérieur en production de biomasse. Par ailleurs, un taux de croissance élevé ne peut être que la conséquence d'un taux de consommation élevé, et si l'anabolisme ne peut assimiler tous les métabolites produits par le catabolisme, le risque d'autodestruction rapide du métabolisme n'est pas négligeable, par exemple par choc osmotique. Le découplage de l'anabolisme et du catabolisme à l'aide d'un cycle futile représente alors une protection très efficace et la chute momentanée du rendement qui en résulte ne porte pas à conséquence dans un environnement riche en nutriments.

Dans l'environnement des autochtones, les nutriments sont rarement présents à des

concentrations saturantes. Ils parviennent aux cellules de façon plus ou moins aléatoire ou périodique, mais certainement plus régulièrement à long terme que dans l'environnement des zymogènes. La croissance sera principalement une croissance limitée, encore que, de temps à autre, de courtes phases délimitées puissent se produire. Or, si la croissance limitée est le mode de croissance dominant, le taux de croissance sera déterminé par l'environnement, et un taux de croissance (potentiel) maximisé ne présente aucunement un avantage. A long terme, dans ce genre de milieu, les organismes qui profiteront le plus rapidement de chaque petit apport de substrats finiront par constituer les populations les plus importantes. Une telle stratégie de "ramasse miettes", doublée de capacités physiologiques comme la mixotrophie, devrait permettre une exploitation maximale du milieu. Dans un tel environnement, *A. autotrophicum* posséderait encore 2 atouts supplémentaires: les transitions "vers le haut" systématiquement plus rapides que les transitions "vers le bas" et la réponse linéaire instantanée avec accumulation de réserve qui est idéale pour profiter des courtes périodes de dé-limitation.

Nous avons fait une distinction entre l'environnement des zymogènes et celui des autochtones d'après la façon dont les substrats parviennent aux microorganismes: rarement mais en grande quantité chez les zymogènes, fréquemment mais par petite quantités chez les autochtones. Le flux moyen de nutriments à travers ces deux types d'environnement peut très bien être identique et cette manière de voir ne signifie aucunement que l'environnement des autochtones doive être plus pauvre que celui des zymogènes.

Nous avons brièvement évoqué la notion de stratégie r et K, en y opposant la maximisation du taux de croissance à la minimisation du temps de réponse. Nous avons volontairement passé sous silence le rôle que l'on attribue habituellement aux constantes d'affinité lorsqu'on établit une distinction entre ces stratégies. En effet, nous pensons que l'importance qui leur est accordée est complètement surévaluée. Il ne fait pourtant aucun doute que dans le chémostat les organismes ayant les plus petites constantes d'affinité sont sélectionnés. Il faut mentionner une fois encore le travail de Höfle, qui a montré qu'en 300 générations, la concentration du substrat résiduel, et par conséquent la "constante" d'affinité de *Cytophaga johnsonae*, diminue d'un facteur 35 (trente-cinq!). Si la constante d'affinité était effectivement le critère majeur dans la compétition entre les microorganismes, il y a fort à parier que toutes les bactéries possèderaient des constantes d'affinité voisines des limites imposées par la physique (limitation de la consommation par la diffusion). Mais le chémostat

est un milieu parfaitement homogène et à ce titre fort éloigné des milieux naturels. Dans un milieu hétérogène, les différents organismes ne sont pas "mélangés" constamment; ils occuperaient plutôt chacun un emplacement différent. Sur ces échelles microscopiques, la diffusion est le principal convoyeur de substrat et il ne fait aucun doute que les organismes placés le plus près de la source d'où diffusent les nutriments en consommeront la majeure partie, même si leur constante d'affinité n'est pas particulièrement petite.

CONCLUSIONS

(1) OBSERVATION DE LA CROISSANCE STATIONNAIRE

(1.1) Le rendement de la croissance stationnaire sur le pyruvate en fonction du taux de dilution est plus correctement décrit par une droite que par une branche d'hyperbole. Corollaire: la distribution des taux de consommation présente une légère courbure négative.

(1.2) En autotrophie, le rapport du taux de consommation de l'hydrogène sur celui de l'oxygène est pratiquement constant quel que soit le taux de dilution.

(2) OBSERVATION DES TRANSITIONS LIMITEES

(2.1) Les transitions continuellement limitées par le substrat sont correctement décrites par des cinétiques de 1er ordre, que ce soit en hétérotophie ou en autotrophie.

(2.2) Aux faibles taux de dilution, les taux de relaxation des cinétique de 1er ordre sont proches du taux de dilution. Ils sont nettement plus grands que le taux de dilution, aux taux de dilution élevés.

(2.3) Que ce soit en hétérotrophie, où le substrat limitant est apporté par la phase liquide, ou en autotrophie, où il provient de la phase gazeuse, les taux de relaxation des transitions "vers le haut" sont supérieurs à ceux des transitions "vers le bas" au même taux de dilution.

(2.4) En autotrophie, la constance du rapport d'utilisation des gaz est préservée durant les transitions limitées.

(2.5) Le taux de croissance initial des transitions limitées peut parfois être plus grand que le taux de croissance exponentielle.

(3) OBSERVATION DES TRANSITIONS NON-LIMITEES

(3.1) Lorsqu'une culture est soudainement dé-limitée, son taux de croissance initial dépasse le taux de croissance caractéristique de la croissance exponentielle non-limitée. L'accroissement de la biomasse peut alors être décrit par un modèle local linéaire.

(3.2) Durant cette croissance linéaire, on observe une accumulation linéaire de PHB.

(3.3) L'accumulation linéaire de PHB et la croissance linéaire prennent fin spontanément après une à trois heures. La phase de croissance non-limitée qui fait suite conduit la biomasse vers un mode de croissance exponentielle non-limitée.

(4) MODELISATION DE LA CROISSANCE LIMITEE

(4.1) A partir d'un modèle non-structuré dans lequel le rendement est une fonction linéaire du taux de croissance, on parvient à décrire toutes les particularités observées de la croissance continuellement limitée, qu'elle soit stationnaire ou transitoire. La croissance limitée qui fait suite à une réponse linéaire constitue probablement une exception.

(5) MODELISATION DE LA CROISSANCE NON-LIMITEE

(5.1) La réponse linéaire est une situation caractéristique dans laquelle le préconditionnement de la biomasse détermine l'amplitude de la réponse. Il serait donc nécessaire de recourir à un modèle structuré pour simuler ce phénomène.

(5.2) Pourtant, le modèle local de la croissance linéaire permet de relativement bien décrire l'accumulation de la biomasse et la cinétique de disparition du substrat.

(6) CONSIDERATIONS THEORIQUES

(6.1) La consommation précède définitivement la croissance. Ceci nous a conduit à porter un regard très critique sur l'approche "selon Monod".

(6.2) L'introduction d'une fonction de saturation générique permet de complètement relativiser le rôle de son expression explicite dans la dynamique de la croissance microbienne.

(6.3) Le taux de consommation du facteur limitant est une fonction monotone croissante du taux de dilution. Cette relation est difficile à connaître expérimentalement avec une précision supérieure au terme de degré 2 de son développement en série de Taylor. Pour la plupart des microorganismes la description selon Pirt (1965) procure des ajustements "présentables". On devrait cependant privilégier l'étude de la distribution des rendements de croissance, beaucoup plus discriminatoire.

(6.4) Nous avons choisi de classer les différents types de croissance en distinguant d'abord la croissance limitée de la croissance non-limitée. Sur ce point, nous nous sommes nettement distancés des auteurs qui établissent d'abord une distinction entre croissances à taux constant et non-constant.

(6.5) Malheureusement, la distinction entre croissances limitée et non-limitée utilise une grandeur, l'activité spécifique du système de consommations, qui est difficile à identifier.

(6.6) Qu'un modèle non-structuré puisse décrire toutes les situations de croissance transitoire continuellement limitée, sur la base de la seule connaissance des états stationnaires, est un résultat inattendu. Ce résultat peut-t-il se généraliser à d'autres organismes et en particulier à ceux qui possèdent d'autres types de distribution des rendements? Il faut probablement tenir compte de l'écophysiologie des organismes considérés pour répondre à cette question.

(6.7) Nous avons très brièvement évoqué les stratégies d'adaptation d'un microorganismes à un environnement hétérogène et fluctuant. Cette problématique mériterait d'être développée tant du point de vue théorique qu'expérimental.

LITTERATURE CITEE

van der Aar P.C., Stouthamer A.H. & Verseveld H.W. (1990). Possible misconceptions about O_2 consumption and CO_2 production measurements in stirred microbial cultures. *Journal of Microbiological Methods*, **9**, 281-286.

Aiba S., Nagai S., Nishizawa Y. & Onodera M., (1967). Energetic and nucleic analyses of a chemostatic culture of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of general and Applied Microbiology*, **13**, 73-83.

Andrews J.H. & Harris R.F., (1986). r- and K-selection and microbial ecology. *Advances in Microbial Ecology*, **9**, 99-147.

Aragno M. & Schlegel H.G., (1978a). *Aquaspirillum autotrophicum*, a new species of hydrogen-oxidizing, facultatively autotrophic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **28**, 112-116.

Aragno M. & Schlegel H.G., (1978b). Physiological characterization of the hydrogen bacterium *Aquaspirillum autotrophicum*. *Archives of Microbiology*, **163**, 221-229.

Aragno, M., & Schlegel, H.G., (1981). The hydrogen-oxidizing bacteria. **In** *The prokaryotes, a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*, pp 865-893. Edited by M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows & H.G. Schlegel. Berlin/Heidelberg/New York: Spinger-Verlag

Ataai M.M. & Shuler M.L., (1985). Simulation of CFSTR through development of a mathematical model for anaerobic growth of *Escherichia coli* cell population. *Biotechnology & Bioengineering*, **27**, 1051-1055.

Auger P., (1989). *Dynamics and thermodynamics in hierarchically organized systems.* International series on systems science and engineering, Edt Klir G.J., Pergammon Press, (England).

Bader F.G., Meyer J.S., Frederickson A.G. & Tsuchiya H.M., (1975). Comments on microbial growth rate. *Biotechnology and Bioengineering*, **17**, 279-283.

Bader F.G., (1978). Analysis of double-substrate limited growth- *Biotechnology and Bioengineering*, **20**, 183-202.

Bazin M.J., (1981). Theory of continuous culture. **in:** Continuous Culture of Cells, **I**, 27-62. Edt: Calcott P.H., CRC Press inc., Boca Raton, Florida.

Beeftink H.H., van der Heijden R.T.J.M. & Heijnen J.J., (1990). Maintenance requirements: energy supply from simultaneous endogenous respiration and substrate consumption. *FEMS*

Microbiology Ecology, **73**, 203-210.

Bernard M. & Basnot F., (1984). *Usuel de chimie générale et Minérale*. Edt: Dunot-Bordas, Paris.

Bongers L., (1970a). Energy Generation and Utilization in Hydrogen Bacteria. *Journal of Bacteriology*, **104**, 145-151.

Bongers L., (1970b). Some aspects of continuous cultures of hydrogen bacteria. *Developpement in Industrial Microbiology*, **11**, 241-254.

Brooke, A.G., Watling, E.M., Attwood, M.M., & Tempest, D.W., (1989). Environmental control of metabolic fluxes in thermotolerant methylotrophic *Bacillus* strains. *Archives of Microbiology*, **151**, 268-273.

Bryers J.D., (1988). Effects of cell recycle on microbial cell viability and metabolism. *Journal of Parenteral Science & Technology*, **42**, 40-46.

Bulthuis B.A., Koningstein G.M., Stouthamer A.H. & van Verseveld H.W., (1989). A comparision between aerobic growth of *Bacillus licheniformis* in continuous culture and partial-recycling fermentor, with contributions to the discussion on maintenance energy demand. *Archives of Microbiology*, **152**, 499-507.

Butler G.J. & Wolkowicz G.S.K., (1985). A mathematical model of the chemostat with a general class of functions describing nutrient uptake. *SIAM Journal of applied mathematics*, **1**, 138-151.

Button D.K., (1985). Kinetics of nutrient-limited transport and microbial growth. *Microbiological Reviews*, **49**, 270-297.

Carter I.S. & Dawes E.A., (1979). Effect of oxygen concentration and growth rate on glucose metabolism, poly-ß-hydroxybutyrate biosynthesis and respiration of *Azotobacter beijerinckii*. *Journal of General Microbiology*, **110**, 393-400.

Cazzador L., (1991). Analysis of oscillations in yeast continuous cultures by a new simplified model. *Bulletin of Mathematical Biology*, **53**, 685-700.

Chesbro W., Arbige M. & Eifert R., (1990). When nutrient limitation places bacteria in the domains of slow growth: metabolic, morphologic and cell cycle behavior. *FEMS Microbiology Ecology*, **74**, 103-120.

Chu I.M. & Papoutsakis T., (1987). Growth dynamics of a methylotroph (*Methylomonas* L3) in continuous culture. II. Growth inhibition and comparison against an unstructured model. *Biotechnology and Bioengineering*, **29**, 65-71.

Cohen Y., de Jonge I. & Kuenen J.G., (1979). Excretion of glycolate by *Thiobacillus neapolitanus* grown in continuous culture. *Archives of Microbiology*, **122**, 189-194.

Comby S., (1989). Analyse de la croissance bactérienne en présence de concentrations subinhibitricesd'antibiotiques. Thèse de Doctorat, Faculté de Médecine, Lyon Sud.

Conrad R., Aragno M. & Seiler W., (1983). The inability of hydrogen bacteria to utilize atmospheric hydogen is due to threshold and affinity for hydrogen. *FEMS Microbiology Letters*, **18**, 207-210.

Cordier J.-L., Butsch B.M., Birou B. & von Stockar U., (1987). The relationship between elemental composition and heat of combustion microbial biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **25**, 305-312.

Cormann A., Carret G., Pavé A., Flandrois J.P. & Couix C., (1986). Bacterial growth measurement using an automated system: mathematical modelling and analysis of growth kinetics. *Annales de l'institut Pasteur/Microbiologie*, **137B**, 133-143.

Crabbendam P.M., Neijssel O.M. & Tempest D.W., (1985). Metabolic and energetics aspects of the growth of *Clostridium botulinicum* on glucose in chemostat cultures. *Archives of Microbiology*, **142**, 375-382.

Czok R. & Lamprecht W., (1974). Pyruvate, Phosphoenolpyruvate and D-Glycerate-2-phosphate. **In** *Methods of Enzymatic Analysis*, vol 3, pp 1446-1451. Edt: Bergmeyer H.U. Verlag Chemie, Weinheim; Academic Press Inc. New York.

Dabes J.N., Finn R.K. & Wilke C.R., (1973). Equations of substrate-limited growth: the case for Blackmann kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, **15**, 1159-1177.

Dawson R.M.C., Elliott D.C, Elliott W.H. & Jones K.M., (1989). Data for biochemical research, 3rd edition. Edt: Clarendon Press, Oxford, UK.

Mac Donald N., (1982). Time delays in chemostat models. **in:** Microbial Population Dynamics, 33-53. Edt: Bazin M.S., CRC Press, Boca Raton, Florida.

Duchars M.G. & Attwood M.M., (1989). The inluence of C:N ratio in the growth medium on the cellular composition and regulation of enzyme activity in *Hyphomicrobium* X. *Journal of General Microbiology*, **135**, 787-793.

Duclaux E., (1898). Traitée de Microbiologie **1**, 208. Edt: Masson, Paris.

Dvorak I. & Siska J., (1989). Analysis of metabolic systems with complex slow and fast dynamics. *Bulletin of Mathematical Biology*, **51**, 255-274.

Edwards V.H., (1970). The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, **12**, 679-673

Egli T. & Quayle J.R., (1986). Influence of the carbon:nitrogen ratio of the growth medium on the cellular composition and the ability of the methylotrohpic yeast *Hansenula polymorpha* to utilize mixed carbon sources. *Journal of General Microbiology*, **132**, 1779-1788.

Esener A.A., Roels J.A. & Kossen N.W.F., (1983). Theory and applications of unstructured growth models: kinetic and energetic aspects. *Biotechnology and Bioengineering*, **25**, 2803-2841.

Esener A.A., Veerman T., Roels J.A. & Kossen N.W.F., (1982). Modeling of bacterial growth; formulation and evaluation of a structured model. *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 1749-1764.

Fasnacht M., (1988). Etude physiologique de la mixotrophie chez l'hydogénobactérie *Aquaspirillum autotrophicum*. Thèse de Doctorat, Université de Neuchâtel.

Fredrickson A.G., (1976). Formulation of structured growth model. *Biotechnology and Bioengineering*, **18**, 1481-1486.

Friedrich C.G. & Mitrenga G., (1981). Oxidation of thiosulfate by *Paracoccus denitrifians* and other hydrogen bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **10**, 209-212.

Gräzer-Lampart S.D., Egli T. & Hamer G. (1986). Growth of *Hyphomicrobium* in the chemostat: regulation of NH_4^+-assimilating enzymes and cellular composition.

Handbook of Chemistry and Physics, 60th edition (1979). Edt: Weast R.C., CRC Press, Boca Raton, Florida.

Harder A., (1979). Structured model of bacterial growth and tests with activated sludge in a one-stage and two-stage chemostat. Doctoral thesis, Wageningen.

Häring V. & Conrad R., (1991). Kinetics of H_2 oxidation in respiring and denitrifying *Paracoccus denitrificans*. *FEMS Microbiology Letters*, **78**, 259-264.

Harrison D.E.F. & Pirt S.J., (1967). The influence of dissolved oyxygen concentration on the respiration and glucose metabolism of *Klebsiella aerogenes* during growth. *Journal of General Microbiology*, **46**, 193-211.

Harrison D.E.F. & Maitra P.K., (1969). Control of respiration and metabolism in growing *Klebsiella aerogenes*. *Biochemical Journal*, **112**, 647-656.

Haywood G.W., Anderson A.J. & Dawes E.A., (1989). The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters*, **57**, 1-6.

Hazeu W., Bijleveld W., Grotenhuis J.T., Kakes E. & Kuenen J.G., (1986). Kinetics and energetics of reduced sulfur oxidation by chemostat cultures of *Thiobacillus ferooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **52**, 507-518.

Heineken F.G., Tsuchiya H.M. & Aris R., (1967). On the mathematical status of the pseudo-steady state hypothesis of biochemical kinetics. *Mathematical Biosciences*, **1**, 95-113.

Heinrich R. & Sonntag I., (1982). Dynamics of non-linear biochemical systems and the evolutionary significance of time hierarchy. *BioSystems*, **15**, 301-316.

Heinzle E., Dunn I.J., Furukawa K. & Tanner R.D., (1982). Modelling of sustained oscillations observed in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **in:** 1st IFAC Workshop on Modelling and Control of Biotechnological Processes, IFAC, Helsinki. 57-65.

Heinzle E. & Lafferty R.M., (1980). A kinetic model for growth and Synthesis of poly-ß-hydroxybutyric acid (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H16. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **11**, 8-16.

Hempfling W.P. & Vishniac W., (1967). Yield coefficients of *Thiobacillus neapolitanus* in continuous culture. *Journal of Bacteriology*, **93**, 874-878.

Herbert D., (1958). *Some principles of continuous culture*. **in** Almqvist & Wiksell, Recent Progress in Microbiology, 381-396. Edt: Tunevall, Stockolm.

Höfle M.G., (1983). Long-term changes in chemostat cultures of *Cytophaga johnsonae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**, 1045-1053.

Holmberg A., (1982). On the practical identifiability of microbial growth models incorporating Michaelis-Menten type nonlinearities. *Mathematical Biosciences*, **62**, 23-43.

Ivanitskaya J.G., Petrikevich S.B. & Bazykin A.D., (1989). Oscillations in continuous cultures microorganisms: criteria of utility of mathematical models. *Biotechnology and Bioengineering*, **33**, 1162-1166.

Jensen K.F., & Pedersen S., (1990). Metabolic growth rate control in *Escherichia coli* may be a consequence of the subsaturation of the macromolecular biosynthetic apparatus wiht substrates and catalytic components. *Microbiological Reviews*, **54**, 89-100.

Jolivet E. (1983). Introduction aux modèles mathématiques en biologie. Edt: Masson, Paris.

Jüttner R., (1977). Autotrophe Massenkultur von *Alcaligenes eutrophus* Stamm H16-PHB^{-4} im Chemostaten. Ph. D. thesis, Université de Göttingen, RFA.

Jöbses I.M.L., Egberts G.T.C., van Baalen A. & Roels J.A., (1984). Mathematical modelling of growth and substrate conversion of *Zymomonas mobilis* at 30 and 35°C. *Biotechnology and Bioengineering*, **27**, 984-995.

Jordan D.W. & Smith P., (1986), Nonlinear ordinary differential equations. Edt: Clarendon Press, Oxford.

Kalina V., (1988). *Elements for a Generalized Model in the Conception of novel reactors*. **in** Proceedings of the 8th International Biotechnology Symposium, Paris. Edt: Duran G., Bobichon L., Florent J. & Société française de microbiologie.

Kärst U. & Friedrich C.G., (1984). Mixotrophic capabilities of *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of General Microbiology*, **130**, 1987-1994.

Kawabata N. & Nakagawa K., (1989). Determination of microbial cell concentration based on total cellular C analysis. *Journal of Microbiological Methods*, **9**, 337-344.

Kell D.B. & Westerhoff H.V., (1989). *Metabolic control analysis: theory and practice.* **in:** Hamer G., Egli T. & Snozzi M. Mixed and multiple substrates and feedstocks. Proceedings of the Discussion Meeting Organized by the Microbial Physiology Working Party of the European Federation of Biotechnology, Weinfelden. Edt: Hartung-Gorre-Verlag, Konstanz.

Koch A.L., (1982). Multistep kinetics: choice of models for the growth of bacteria. *Journal of Theoretical biology*, **98**, 401-407.

Koch A.L. & Wang C.H, (1982). How close to the theoretical diffusion limit do bacterial uptake systems function? *Archives of Microbiology*, **131**, 36-42.

Kodama T., Goto E. & Minoda Y., (1976). Determination of Dissolved Hydrogen Concentration and $[K_La]_{H2}$ in submerged Culture Vessels. *Agricultural and Biological Chemistry*, **40**, 2373-2377.

Konak A.R., (1974). Derivation of a generalised monod equation and its application. *Journal of applied Chemisty Biotechnology*, **24**, 453-455.

Krynitskaya A.Y., Minkevich I.G. & Eroshin V.K., (1985). Effect of double nutrient limitation by organic substrate and ammonium on the growth of *Candida valida* in a chemostat. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 23, 163-168. Traduction anglaise: 1987, Plenum Publishing Corporation.

Kuenen J.G., (1979). Growth yields and "maintenance energy requirement" in *Thiobacillus* species under energy limitation. *Archives of Microbiology*, **122**, 183-188.

Lawrence J.V. & Maier S., (1977). Correction for the inherent error in optical density readings. *Applied and Environmental Microbiology*, 33, 482-484.

Lobry J.R., Flandrois J.P., Carret G. & Pave A., (1992). Monod's bacterial growth model revisited. *Bulletin of Mathematical Biology*, 1, 117-122.

Marr A.G., (1991). Growth rate of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, **55**, 316-333.

Mateles R.I., Ryu D.Y. & Yasuda T., (1965). Measurment of unsteady state growth rates of micro-organisms. *Nature*, **208**, 263-265.

the Merck Index, (1976). An encyclopedia of chemicals and drugs, 9th edition. Edt: M. Windholz, Merck & Co., Rahway, NJ, USA.

Minkevich I.G. & Eroshin V.K. (1973). Folia Microbiol. (Prague) **18**, 376.

Minkevich I.G. & Utkina L.I., (1979). Time scale in the dynamics of continuous cultivation of microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, **21**, 357-392.

Monod J., (1942). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Actualités scientifiques et industrielles. Edt: Hermann, Paris.

Monod J., (1950). La technique de culture continue, théorie et application. *Annales de l'Institut Pasteur*, **79**, 390-410.

Moreira A.R., van Dedem G. & Mo-Young M., (1979). Process modeling based on biochemical mechanisms of microbial growth. *Biotechnology and Bioengineering*, **9**, 179-293.

Morinaga Y., Yamanaka S., Ishizaki A. & Hirose Y., (1978). Growth characteristics and cell composition of *Alcaligines eutrophus* in chemostat culture. *Agricultural and Biological Chemistry*, **42**, 439-444.

Neijssel O.M. & Tempest D.W., (1976). The role of energy-spilling reactions in the growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in aerobic chemostat culture. Archives of Microbiology, **110**, 305-311.

Noorman H.J., Baksteen J., Heijnen J.J. & Luyben K.C.A.M., (1991). The bioreactor overflow device: an undesired selective separator in continuous culture? *Journal of General Microbiology*, **137**, 2171-2177.

Nyholm N., (1976). A mathematical model for microbial growth under limitation by conservative substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, **18**, 1043-1056.

O'Brien R.W., Neijssel O.M. & Tempest D.W., (1980). Glucose- phosphoenolpyruvate-phosphotransferase activity and glucose uptake rate of *Klebsiella aerogenes* growing in chemostat culture. *Journal of General Microbiology*, **116**, 305-314.

Owens J.D. & Legan J.D., (1987). Determination of the Monod substrate saturation constant for microbial growth. *FEMS Microbiology Review*, **46**, 419-432.

Pagni M., (1986). Du comportement mixotrophe d'*Aquaspirillum autotrophicum*. Travail de Licence, Université de Neuchâtel.

Pagni M., Beffa T., Isch C. & Aragno M., (1992). Linear growth and poly(ß-hydroxybutyrate) synthesis in response to pulse-wise addition of the growth-limiting substrate to steady state heterotrophic continuous cultures of *Aquaspirillum autotrophicum*. *Journal of General Microbiology*, (sous presse).

Palsson B.O. & Joshi A., (1987). On the dynamic order of structured *Escherichia coli* growth model. *Biotechnology and Bioengineering*, **29**, 789-792.

Parnas H. & Cohen D., (1976). The optimal strategy for the metabolism of reserve materials

in micro-organism. *Journal of Theoretical Biology*, **56**, 19-55.

Pavlou S. & Fredrickson A.G., (1989). Growth of microbial populations in nonminimal media: some considerations for modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, **34**, 971-989.

Peretti S.W. & Bailey J.E., (1985). Mechanistically detailed model of cellular metabolism for glucose-limited growth of *Escherichia coli* B/r-A. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**, 1672-1689.

Perram J.W., (1973). Relaxation times in bacteriological culture and the approach of steady state. *Journal of Theoretical Biology*, **38**, 571-578.

Perret C.J., (1960). A new kinetic model of a growing bacterial population. *Journal of General Microbiology*, **22**, 589-617.

Pierucci O., (1978). Dimensions of *Escherichia coli* at various growth rates: models for envelope growth. *Journal of Bacteriology*, **135**, 559-574.

Pirt, S.J., (1965). The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proceeding of the Royal Society London*, **163B**, 224-231.

Pirt S.J., (1982). Maintenance energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth. *Archives of Microbiology*, **133**, 300-302.

Pirt S.J., (1990). *The dynamics of microbial processes: a personal view.* **in** Poole R.K., Bazin M.J. & Keevil C.W. Microbial Growth Dynamics: Edt Oxford University Press, Oxford.

Probst I., (1980). *Respiration in Hyddrogen Bacteria.* **in** Diversity of Bacterial Respiratory Systems, Vol II, pp 159-181. Edt: Knowles C.J., CRC Press inc., Boca Raton, Florida.

Rapp P.E., (1980). *Biological Application of Control Theory.* **in** Mathematical Models in Molecular and Cellular Biology, pp 146-247. Edt Segel L.A., Cambridge University Press, Cambridge.

Reich J.G. & Sel'kov E.E., (1974). Mathematical analysis of metabolic networks. *FEBS Letters Supplement*, **40**, 119-127.

Reich J.G. & Sel'kov E.E., (1975). The hierachy, equilibrum and non-equilibrum in metabolic systems. *BioSystems*, 7,39-50.

Robinson J.A., (1985). Determining microbial kinetic parameters using nonlinear regression analysis. *Advances in Microbial Ecology*, **8**, 61-114.

Roels J.A., (1980). Application of Macroscopic Principle to Microbial Metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, **22**, 2457-2514.

Roels I.A. & Kossen N.W.F., (1978). On the modelling of growth metabolism. *Progress in Industrial Microbiology*, **14**, 95-203.

Rutgers M., Balk P.A. & van Dam K., (1990). Quantification of multiple-substrate controlled growth - simultaneous ammonium and glucose limitation in chemostat cultures of *Klebsiella pneumoniae*. *Archives of Microbiology*, **153**, 478-484.

Schlegel, H.G., Kaltwasser, H., & Gottschalk, G., (1961). Ein submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bacterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Archives of Microbiology*, **38**, 209-222.

Schmidt K., Liaanen-Jensen S. & Schlegel H.G. (1963). Die Carotenoide der Thiorhodaceae. *Archives of Microbiology*, **46**, 117-126.

Schuler S. & Conrad R., (1990). Soils contain two different activities for oxydation of hydrogen. *FEMS Microbiology Ecology*, **73**, 77-84.

Schuster S. & Heinrich R., (1987). Time hierarchy in enzymatic reaction chains resulting from optimality principles. *Journal of Theoretical Biology*, **129**, 189-209.

Shu J. & Shuler M.L., (1989). Mathematical model for the growth of a single cell of *E. coli* on a glucose/glutamine/ammonium medium. *Biotechnology and Bioegineering*, **33**, 1117-1126.

Siegel R.S. & Olis D.F., (1984). Kinetics of growth of the hydrogen-oxidizing bacterium *Alcaligenes eutrophus* (ATCC1707) in chemostat culture. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**, 764-770.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.I. & Klenk D.C, (1985). Measurement of protein using bicinconinic acid. *Analytical biochemistry*, **150**, 76-85.

Stanbury P.F. & Whitaker A., (1984). *Principles of Fermentation Technology*. Edt: Pergamon Press, Oxford.

Storer F.F. & Gaudy A.F., (1969). Computational analysis of transient response to quantitative shock loadings of heterogeneous populations in continuous culture. *Environmental Science and Technology*, **3**, 143-149.

Strässle C., Sonnleitner B. & Fiechter A., (1988). A predictive model for the spontaneous synchronization of *Saccharomyces cervisiae* grown in continuous cultures. I. Concept. *Journal of Biotechnology*, **7**, 299-318.

Stumm W. & Morgan J.J., (1981). Aquatic chemistry, 2nd edition. Edt: Iohn Wiley & Sons inc., USA.

Topiwala H.W. & Hamer G., (1971). Effects of wall growth in steady-state continuous-

cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, **13**, 919-924.

Veldekamp H., (1977). Ecological studies with the chemostat. *Advances in Microbial Ecology*, **1**, 59-94.

van Verseveld H.W., Chesbro W.R., Braster M. & Stouthamer A.H., (1984). Eubacteria have 3 growth modes keyed to nutrient flow. Consequences for the concept of maintenance and maximal growth yield. *Archives of Microbiology*, **137**, 176-184.

van Verseveld H.W., Dehollander J.A., Frankema J., Braster M., Leeuwerik F.J. & Stouthamer A.H., (1986). Modeling of microbial substrate conversion, growth and product formation in a recycling fermentor. *Antonie van Leeuwenhoek*, **52**, 325-342.

Vila J.P., (1982). *Méthode d'identification des modèles dynamiques*. in Modèles dynamiques déterministes en biologie. Lebreton J.D. et Millier C. Edt: Masson, Paris.

Wanner U. & Egli T., (1990). Dynamics of microbial growth and cell composition in batch culture. *FEMS Microbiology Reviews*, **75**, 19-44.

Williams F.M., (1967). A model of cell growth dynamics. *Journal of theoretical biology*, **15**, 190-207.

Westerhoff H., Lolkema J.S., Otto R. & Hellingwerf K.J., (1982). Thermodynamics of growth, non-equilibrium thermodynamics of bacterial growth, the phenomenological and the mosaic approach. *Biochemica Biophysica Acta*, **683**, 181-220.

Wood A.P. & Don Kelly P., (1986). Chemolithotrophic metabolism of the newly-isolated moderately thermophilic, obligately autotrophic *Thiobacillus tepidarus*. *Archives of Microbiology*, **144**, 71-77.

LISTES DES SYMBOLES UTILISES

Le premier tableaux contient principalement des symboles désignés avec des lettres latines et qui décrivent des grandeurs avec unités. Le second tableau présente les indices les plus fréquemment utilisés. Le troisième tableau présente les grandeurs sans unités, désignées par des lettres grecques. Les symboles qui n'apparaissent qu'une seule fois dans le texte ne sont pas inclus dans ces tableaux.

Symbole	Unités	Signification
D	h^{-1}	Taux de dilution
f^g		Fraction molaire occupée par un gaz dans la phase gazeuse ou encore rapport de la pression partielle à la pression totale $f_x^g = \frac{p_x}{p_{tot}}$
f^l		Fraction de la saturation d'un gaz dans la phase liquide, par exemple pour l'oxygène $f_o^l = \frac{[O_2]}{[O_2]^*}$
R	h^{-1}	Taux de relaxation des cinétiques de 1er ordre
K	$mol \cdot h^{-1}$	Coefficient de transfert molaire d'un gaz de la phase gazeuse à la phase liquide, par exemple pour l'oxygène $\Delta_o = K_o(f_o^g - f_o^l)$
K_s	$mol \cdot l^{-1}$	Constante d'affinité (rarement utilisée)
m	$mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	Coefficient de maintenance dans le modèle de Pirt $q = \frac{D}{Y_{max}} + m$
p	Pa	Pression
P_c	$mol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$	Taux de production de gaz carbonique (d'une culture)
Q	$mol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$	Taux de consommation (d'une culture) $Q = qX$
q	$mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	Taux de consommation (par unité de biomasse)

Symbole	Unités	Signification
r	h^{-1}	Taux de croissance
S	$mol \cdot l^{-1}$	Concentration du substrat dans la culture
S_f	$mol \cdot l^{-1}$	Concentration du substrat dans l'apport de milieu
t	h	Temps
T	K	Température
V^g	m^3	Volume de la phase gazeuse d'un fermenteur
V^l	l	Volume de la phase liquide d'un fermenteur
Z	$g \cdot h \cdot mol^{-1}$	Facteur de pente apparaissant dans le modèle YLIN $Y = Y_0 + Zr$
X	$g \cdot l^{-1}$	Densité de biomasse
Y	$g \cdot mol^{-1}$	Rendement
Y_{max}	$g \cdot mol^{-1}$	"Vrai" rendement maximum (modèle de Pirt)
Y_0	$g \cdot mol^{-1}$	Rendement extrapolé à un taux de croissance nul (modèle YLIN)
$[]^*$	$mol \cdot l^{-1}$	Concentration d'un gaz en équilibre sous une atmosphère de celui-ci
Δ	$mol \cdot h^{-1}$	Flux molaire d'un gaz d'une phase dans l'autre.
Δ_{Pyr}	$mol \cdot l^{-1}$	$\Delta_{Pyr} = [Na^+]_{Pyr} - [Pyr^-]$ A l'état stationnaire, correspond au pyruvate consommé.
Φ	$mol \cdot h^{-1}$ ou $C\text{-}mol \cdot h^{-1}$	Flux molaire
γ'		Degré de réduction généralisé

Indice	Signification
C	carbone
exp	se rapporte à la croissance exponentielle
H	hydrogène
Lin	se rapporte à la croissance linéaire
N	azote
O	oxygène
Pyr	pyruvate
tot	représente une espèce chimique, le plus souvent le carbone inorganique total

$$c_{tot} = [HCO_3^-] + [H_2CO_3^*]$$

X	biomasse
∞	désigne l'approximation de la biomasses stationnaire qui correspond à la biomasse qui serait formée si tout le substrat disponible était consommé.

$$\tilde{\chi} = \chi_\infty(1-\epsilon\tilde{\sigma})$$

Symbole	Définition	Remarques
δ	$\delta\varphi(\sigma)=q/q_{exp}$	paramètre défini comme proportionnel à l'activité spécifique potentielle du système de consommation
ϵ	K_s/S_f	possède généralement une très petite valeur.
$\varphi(\sigma)$	$\delta\varphi(\sigma)=q/q_{exp}$	fonction de saturation
μ	r/r_{exp}	taux de croissance
ρ	D/r_{exp}	taux de dilution
σ	S/K_s	concentration du substrat
τ	$r_{exp}t$	temps caractéristique de la croissance
τ^*	τ/ϵ	temps caractéristique du mouvement rapide du substrat
χ	$q_{exp}X/(S_f r_{exp})$	biomasse
ξ	$Y_{max}m/r_{exp}$	coefficient du modèle QPIRT
ζ	$Y_0/(Y_0+Wr_{exp})$	coefficient du modèle YLIN

LES MINI-FERMENTEURS

Introduction. Dans la conception de ces nouveaux fermenteurs, on a cherché à minimiser autant que possible les source de perturbation des cultures. En particulier, on a soigneusement évité toute variation de leurs volumes qui résulterait de prélèvements effectués directement dans les fermenteurs. De tel prélèvements sont praticables sur des cultures à l'état stationnaire, et ne portent pas trop à conséquence puisque ces cultures y retournent rapidement, en quelques heures. En revanche, durant les transitions, de telles prélèvements affectent définitivement la dynamique du système et ont été proscrites. L'acquisition des données a été en grande partie automatisée et permet d'atteindre des fréquences de mesure inaccessibles manuellement, mais, nécessaires pour mettre en évidence des comportements transitoires de courte durée. La construction en parallèle a permis d'utiliser une partie des appareillages et des instruments analytiques à un seul exemplaire. Mais, cette solution économique a posé un problème supplémentaire, il a fallu parvenir à réguler très efficacement des flux en parallèle.

Les fermenteurs. Chaque fermenteur est réalisé à partir d'un réacteur de chimie en verre d'un volume de 1.5 litre et d'un couvercle en verre pourvu de six cols à pas de vis (système SVL). La cuve et le couvercle sont maintenus ensemble par un collier de serrage métallique, l'étanchéité de la fermeture étant assurée par un joint torique. La culture est thermostatisée à l'aide d'un manteau externe où circule de l'eau à température constante. L'agitation de la culture est réalisée au moyen d'un barreau magnétique ovale (SEMADENI, 50x19mm) entraîné magnétiquement par un agitateur de grande puissance (Heidolf, MR 2000) qui peut atteindre 1500 tours par minute. La vitesse d'agitation est maintenue constante grâce à l'électronique de l'appareil. Les obstacles constitués par les électrodes et les canules plongées dans la cuve suffisent à créer une agitation turbulente avec recirculation continuelle de la phase gazeuse dans la phase liquide. L'efficacité du brassage dépend, entre autre, de la tension superficielle du liquide. Plus celle-ci est faible, plus les bulles sont petites et restent longtemps dans la phase liquide. Ainsi le milieu de culture de Schlegel est beaucoup plus efficacement agité que l'eau distillée. C'est pourquoi, le volume de la culture doit être déterminé dans les réelles conditions expérimentales. Sinon, d'importantes erreurs peuvent

être commises lors du calcul du taux de dilution. D'ailleur, les taux de dilution déterminés dans le fermenteur Biostat et reportés par Fasnacht (1988) et Pagni (1986), ainsi que toutes les expériences jusqu'à IP4 sont probablement entachés d'une erreur systématique, les calibrations ayant été effectuées préalablement avec de l'eau distillée.

Chaque couvercle de fermenteur comporte une électrode pour la mesure du pH, une électrode pour la mesure de l'oxygène dissous (détails plus loin), et quatre canules permettant l'injection des gaz, l'apport de milieu, la sortie des gaz et le prélèvement en continu du surplus de culture. Sur la sortie des gaz est installé un condenseur. Un des cols est muni d'un septum et permet d'inoculer la culture ou d'injecter différentes substances à l'aide de seringue. La figure 1 présente une vue schématique d'une cuve et des flux qui la parcourent. Les numéros de cette figure correspondent aux flux suivants. (1), entrée de l'eau de thermostatisation dans le manteau; (2) sortie de l'eau de thermostatisation du manteau; (3), apport du milieu frais dans la culture; (4), entrée des gaz; (5), sortie par le haut du trop-plein de culture; (6), sortie des gaz par le condenseur; (7), entrée d'eau froide dans le condenseur; (8), sortie de l'eau du condenseur. Sur cette même figure on remarquera encore l'emplacement de: (A), les joints en silicone qui assurent la fixation et l'étanchéité du manteau de thermostatisation ainsi que des condenseurs; (B), le joint torique assurant l'étanchéité du fermenteur; (C), le barreau magnétique pour l'agitation.

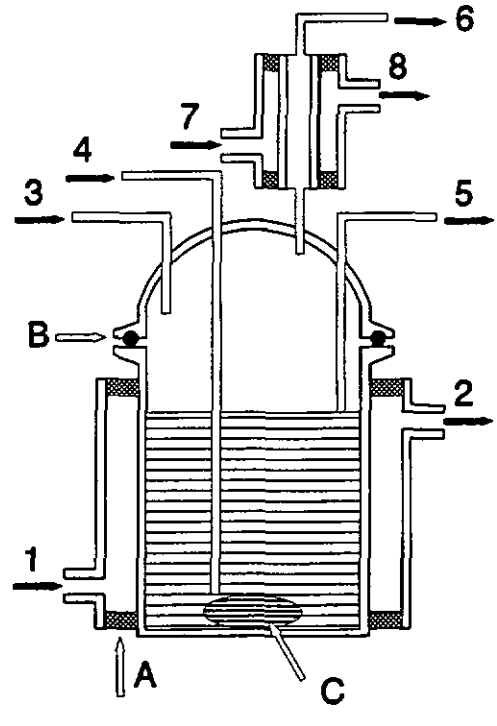


Figure 1 Vue schématique d'un fermenteur.

Réalisation des manteaux de thermostatisation. Les réacteurs de chimie à manteau de thermostatisation en verre existant sur le marché sont caractérisés par le fait que le manteau enveloppe le fond du réacteur. Cette construction ne comporte qu'un seul anneau d'attache reliant la cuve et l'extérieur du manteau et évite l'apparition de contraintes mécaniques sur le verre. Cependant, cette configuration éloigne le fond de la cuve de l'agitateur magnétique de plusieurs centimètres, et ne permet donc pas d'assurer la stabilité du barreau magnétique

tournant rapidement dans un milieu turbulent. Il nous fallait donc limiter le manteau aux côtés de la cuve, ce qui impliquait deux anneaux d'attache, et la construction de joints suffisamment élastiques, pour absorber les contraintes mécaniques.

Nous avons fait exécuter des cylindres en verre de la hauteur des cuves et d'un diamètre quelque peu supérieur (+3cm). Ces cylindres ont été munis de deux raccords latéraux à pas de vis, qui permettent le branchement rapide du manteau sur la circulation d'eau. Pour la réalisation des joints, la méthode suivante à été mise au point:

Le cylindre extérieur et la cuve sont maintenus fixement dans leurs positions définitives par une forme en bois. Quelques centimètres d'agar en surfusion, à 3% au moins, sont coulés dans la forme en bois, puis laissés gélifier afin de rendre étanche le fond du manteau. Ensuite, l'intérieur de celui-ci est rempli d'agar jusqu'à cinq millimètres du bord supérieur du cylindre extérieur. Une fois l'agar solidifié, la rigole formée par le cylindre extérieur, la surface de l'agar et la paroi du réacteur est soigneusement dégraissée et séchée. Du mastic de silicone (Gomastit 402, transparent, qualité pour aquarium) alors pâteux est injecté dans cette rigole. Après polymérisation, on retourne le fermenteur et on enlève une partie de l'agar du fond du manteau (maintenant en haut). On coule à nouveau de l'agar jusqu'à cinq millimètres du bord supérieur et l'on procède comme précédemment. Finalement, l'agar est liquéfié en passant le fermenteur dans un four à micro-onde et s'écoule par les raccords latéraux. Les joints ainsi réalisés sont réguliers, très résistants, parfaitement étanches et supportent très bien les chocs thermiques répétés (autoclave). Les condenseurs sont également pourvu d'un manteau où circule l'eau de refroidissement et sont construits sur le même principe.

Circulation de l'eau de thermostatisation. La figure 2 présente un schéma du circuit de thermostatisation. Les numéros qui suivent s'y rapportent. (1), L'eau du circuit est maintenue à 27°C par un bain thermostatisé (Haake D-1-19), muni d'un serpentin de refroidissement et d'une pompe refoulante,(2); cette dernière envoie l'eau dans un circuit, (3), parvenant à la base des manteaux des fermenteurs, (4), qui sont traversés simultanément et en parallèle par un courant ascendant. Chaque manteau est muni de deux vannes à boisseau, qui permettent de le court-circuiter rapidement. La collecte de l'eau sortant de chaque manteau se situe sur une branche légèrement ascendante (5) qui permet aux bulles d'air de s'échapper. Cette configuration permet de comparer le circuit à une série de vases communicants, l'eau

ne pouvant ressortir d'un manteau que si tous les autres sont remplis. Finalement, l'eau retourne vers le bain thermostatisé, (6). Afin d'assurer des débits comparables dans tous les manteaux, les circuits d'alimentation de chaque cuve sont de longueurs identiques. Un tube vertical, (7), situé juste après la pompe et ouvert sur l'extérieur, (8), indique la pression régnant dans le circuit. Ce baromètre rudimentaire fonctionne également comme "soupape" et renvoie l'eau directement dans le bain en cas de surpression. Enfin, lorsque le système de thermostatisation est désactivé, de l'air pénètre dans le circuit, via (9), et le purge complètement.

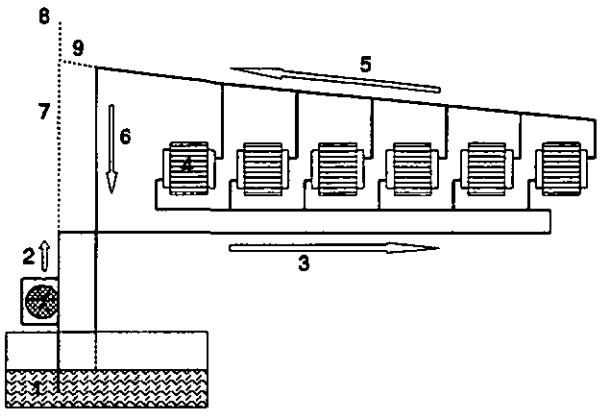


Figure 2 Le circuit de thérmostatisation.

Circulation du milieu de culture. La figure 3 présente un schéma du circuit de milieu de culture. Les numéros qui suivent s'y rapportent. Ce circuit a été réalisé avec des tuyaux en silicone et des raccords en acier et en polypropylène. Le milieu de culture stérilisé par filtration (Braun Meslungen, Sterilfilter Typ 140; filtre amiante Seitz, k140mm) est stocké dans un bidon en polypropylène de 50 litres (1) (Semadeni, Art 1.0972), muni d'un dispositif de remplissage (connecteur pour cathéter Luer Lock), d'une ouverture sur l'atmosphère extérieure, via un filtre stérilisable hydrophobe (Gelmann N°4210), et d'un tuyau plongeant au fond du récipient.

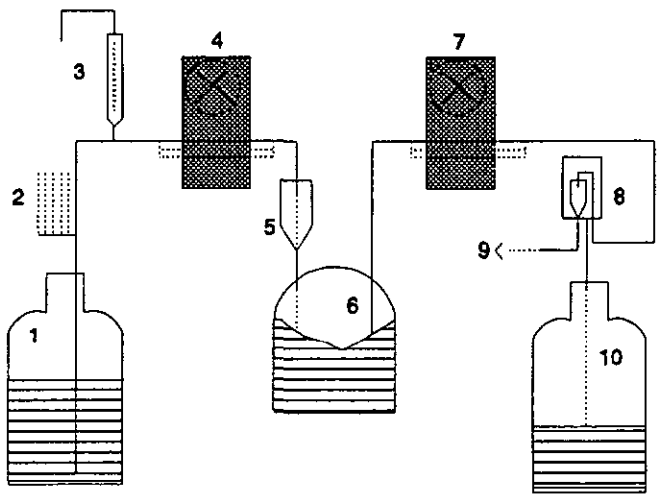


Figure 3 Amenée de milieu frais et trop plein.

Le tuyau provenant de la réserve de milieu amène le liquide vers un premier embranchement (2), où il se divise en six, soit un tuyau par fermenteur. Sur chacun de ceux-ci est installé un débitmètre (3) constitué d'une pipette enzymatique graduée de 2 ml, munis de deux pinces et d'un filtre hydrophobe pour l'air. La mesure du débit s'effectue en aspirant du milieu dans la pipette, puis en déterminant le temps nécessaire à ce que la pompe vide le volume gradué.

Chacun des six tuyaux d'alimentation se subdivise à nouveau en plusieurs tuyaux qui passent par une pompe péristaltique multicanaux (Ismatec,IPN-16) (4). Le nombre de tuyaux par fermenteur ainsi que leurs diamètres vont permettre de fixer un débit différent pour chaque fermenteur. Après la pompe péristaltique, les tuyaux d'une même cuve sont réunis en un seul, qui conduit le milieu jusqu'au fermenteur. Avant son injection, le milieu passe par un dispositif anti-retour (5) destiné à éviter la remontée des bactéries dans la tuyauterie.

Le volume de la culture est maintenu constant au moyen d'un tube vertical (6). Lorsque le niveau de la culture atteint le bas de ce tube, le liquide est aspirée grâce à une pompe péristaltique située en contrebas (7). Cette pompe péristaltique est "câblée" pour chaque cuve de la même façon que la pompe d'amenée de milieu (4), mais, fonctionne plus rapidement (+30%) et donc retire continuellement un mélange de culture et de gaz du fermenteur. Le débit de cette pompe importe peu, pourvu qu'il soit supérieur à celui de la pompe d'arrivée de milieu et inférieur à la somme des entrées de liquide et de gaz dans le fermenteur. Le mélange, culture et gaz, parvient ensuite dans un dispositif de prélèvement (8), qui sera décrit plus loin, et qui permettra d'envoyer périodiquement des échantillons de culture vers le spectrophotomètre (9). Finalement, l'excédent de culture se déverse dans un trop-plein constitué d'une autre bonbonne de 50 litres (10).

Préparation et circulation des gaz. Afin de pouvoir contrôler précisément l'apport de gaz aux cultures et interpréter les mesures d'oxygène dissous, il faut pouvoir maintenir les trois conditions suivantes: constance de la composition du mélange de gaz injecté, constance du débit pour chaque fermenteur, constance de la pression dans les fermenteurs...et la distribution d'un mélange de gaz en parallèle dans six fermenteurs rend ce problème passablement épineux. Une première solution aurait pu consister à mesurer et à contrôler les flux grâce à des débitmètres massiques et à un système "on-line" d'analyse de composition. Mais, cette solution onéreuse dépassait très largement notre budget, et nous avons dû fabriquer un système hydraulique de régulation des flux de gaz.

L'incomparable avantage de l'utilisation d'une colonne d'eau pour réguler des pressions est que sa hauteur peut demeurer constante durant des semaines, moyennant l'emploi d'une pompe qui compense l'évaporation et les variations de charge. Une colonne d'eau bien construite a typiquement une fluctuation de hauteur de $\pm$1mm, ce qui pour une hauteur de 1 m ne représente que 0.1% de variation. On peut ainsi parvenir à une étonnante précision

et à une excellente stabilité à long terme avec un dispositif d'apparence rudimentaire. Il est à noter que les éléments métalliques, tel les détendeurs, sont bien plus sensibles aux variations de température que les colonnes d'eau. Tout le circuit des gaz a été réalisé avec des tubes de verre, de cuivre ou de néoprène gainé de caoutchouc, le silicone a évidemment été proscrit.

La figure 4 présente un schéma de l'appareillage de préparation des mélanges de gaz. Les numéros qui suivent s'y rapportent. Les gaz proviennent de bouteilles (Carbagas, H_2, O_2, N_2, CO_2, air comprimé) et sont délivrés par des détendeurs à double paliers (1) (L'air liquide, type GA2). Chacun des gaz est ensuite maintenu à pression constante grâce à un tube de 1.2 m plongé dans l'eau (2) et qui laissent fuir, bulle à bulle, un excédent de gaz, qui est ensuite évacué sur l'extérieur (3). Les gaz ainsi maintenus à pressions constantes parviennent à des débitmètres à pointeau (4) (Brooks instrument, type 8940) qui fixent leurs débits. Les différents gaz sont ensuite mélangés (5), et l'on obtient un mélange de la composition souhaitée. Ce mélange est alors distribué par six vannes à pointeau (6), vers chacun des fermenteurs. La pression amont des vannes à pointeau est maintenue constante grâce à une colonne d'eau par où s'échappe un excédent de gaz (7).

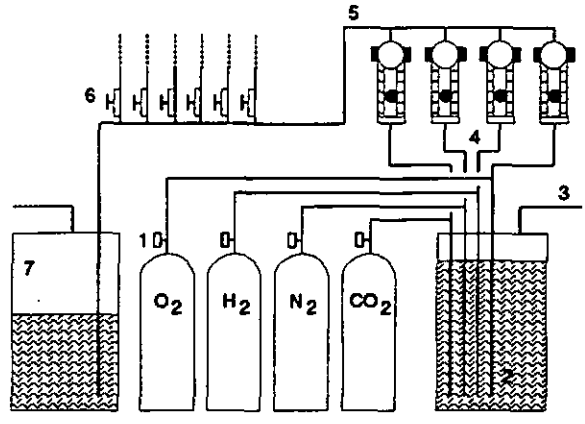


Figure 4 Fabrication des mélanges de gaz.

Le maintient d'un débit constant à l'injection dans chaque fermenteur est le problème central dans le cadre d'une distribution en parallèle; le débit s'écoulant à travers une vanne à pointeau dépend de plusieurs facteurs; de la nature du gaz, de l'ouverture de la vanne et surtout de la différence des pressions existant de part et d'autre de la vanne. La pression en amont des vannes est déjà fixée à une valeur constante et il va "suffire" de fixer les pressions en aval pour stabiliser les flux. Or, il faut une certaine surpression pour injecter le gaz dans le fermenteur et cette surpression peut varier au cours des cultures. Comme l'injection se fait dans la phase liquide de la culture, il faut déplacer une certaine colonne de liquide et la hauteur de cette dernière varie très rapidement et continuellement du fait de l'agitation turbulente du milieu. Par ailleurs, les gaz sont stérilisés avant l'injection en passant à travers

un filtre hydrophobe, et ce filtre présente une résistance variable suivant son humidité et son encrassement. C'est pourquoi, nous avons construit un dispositif hydraulique qui maintient la pression constante en aval de la vanne à pointeau (et donc le débit) et qui passivement ajuste la surpression nécessaire à l'injection du gaz dans le fermenteur.

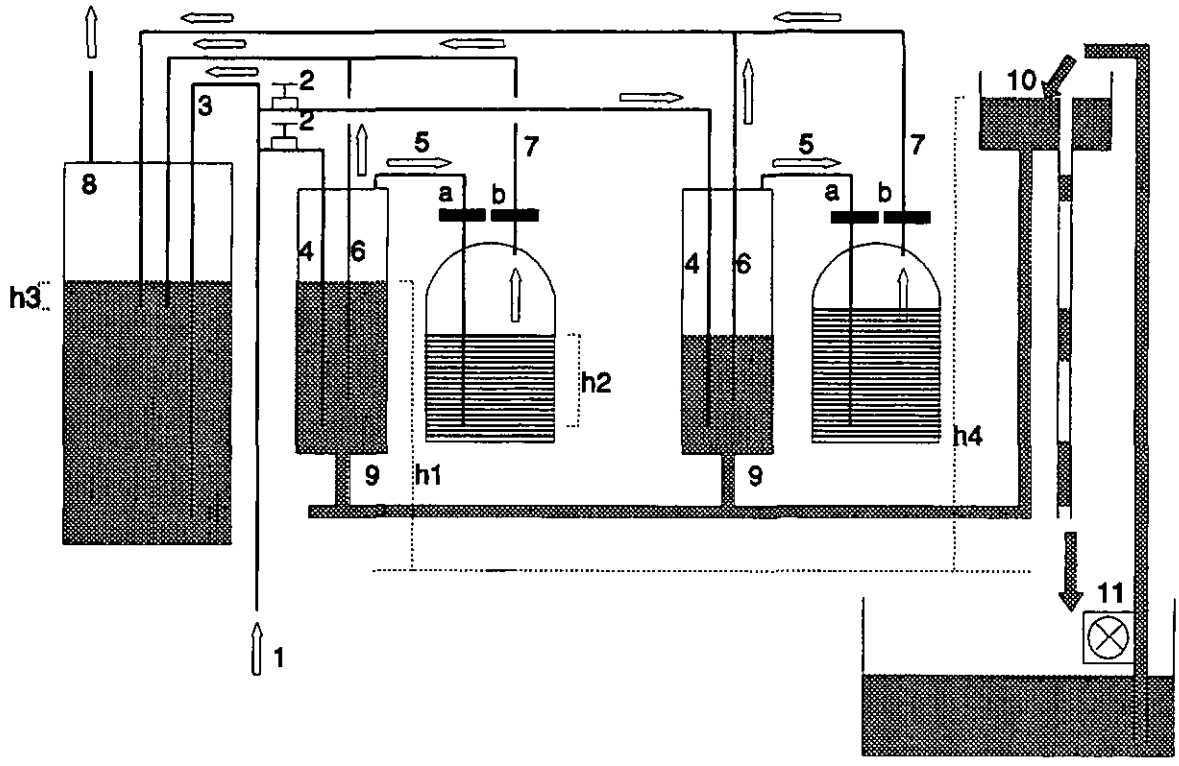


Figure 5 Régulation de la distribution des gaz et stabilisation des pressions pour deux fermenteurs.

La figure 5 présente une vue schématique du dispositif d'alimentation en gaz des fermenteurs, seuls deux fermenteurs y sont représentés. Les chiffres qui suivent se rapportent à cette figure. Le mélange de gaz (1) parvient en amont des vannes à pointeau (2) et est maintenu à pression constante (3). Le gaz qui passe par chacune de ces vannes est conduit dans un "régulateurs de pression" (4,6,9). Là, le gaz est contraint à s'échapper sous une colonne d'eau (4), remonte dans la phase gazeuse du régulateur de pression et est injecté dans la culture (5) à travers un filtre hydrophobe (a). La phase gazeuse du régulateur est donc en légère surpression. Par mesure de sécurité le régulateur est muni d'une sortie d'évacuation (6) en cas de trop forte surpression, qui ferait par trop baisser le niveau de liquide dans le régulateur (voir plus bas). Les phases liquides des différents régulateurs communiquent entre elles (9) et sont reliées à un dispositif (10) dont le niveau est maintenu constant grâce à une

pompe (11) et à un trop plein. En vertu de la répartition de la pression dans un système de tube en U, la pression aval des vannes à pointeau est maintenue constante quelque soit le niveau d'eau dans le régulateur.

Les gaz ressortent des cultures à travers un filtre hydrophobe, (b), puis à travers une colonne d'eau de hauteur maintenue constante (quelques centimètres) (7); les gaz sont finalement évacués à l'extérieur (8). Les cultures sont ainsi maintenues en très légère surpression, ce qui diminue quelque peu les risques de contamination, mais surtout permet de s'assurer à tout moment de l'étanchéité du circuit de gaz, vu les risques potentiels que représentent les gaz explosifs (mélange hydrogène-oxygène).

Les niveaux d'eau dans les régulateurs de pression varient en fonction des différences de charge existant dans le circuit. Le principe du tube en U nous permet de poser l'égalité des hauteurs dans ses deux branches, toujours d'après la figure 5:

$$h1 + h2 + h3 + h(a) + h(b) = h4$$

où h1 est la hauteur de la colonne d'eau dans le régulateur, h2 la hauteur dans la culture, h3 la colonne d'eau à la sortie, h(a) et h(b) les hauteurs de liquide que l'on peut associer aux résistances à l'écoulement dans les filtres hydrophobes, et le membre de droite, h4, correspond à la hauteur maintenue constante par le dispositif à niveau constant. L'augmentation du niveau de la culture, h2, et l'encrassement inévitable des filtres, h(a) et h(b) seront compensés par la baisse du niveau dans le régulateur, h1, ce qui entraînera par la même une augmentation de la pression dans la phase gazeuse du régulateur.

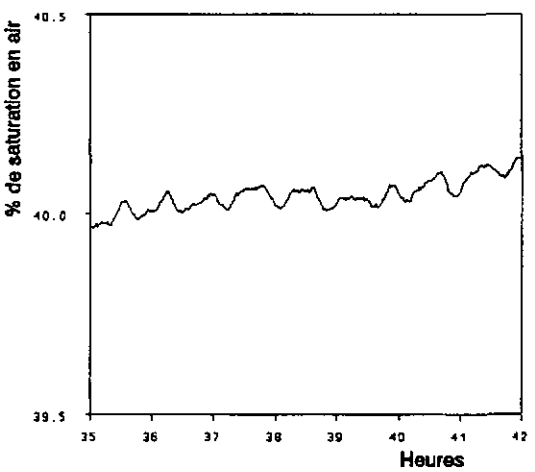


Figure 6 Signal de l'oxygène dissous dans une culture au voisinage de l'état stationnaire.

La réalisation de ce circuit de distribution des gaz est peu coûteuse. Ses performances sont excellentes à en juger par la stabilité des signaux des électrodes à oxygène obtenus durant les états stationnaires. La figure 6 présente le signal de l'oxygène dissous (très fortement

agrandi) d'une culture hétérotrophe au voisinage de l'état stationnaire. Le signal est globalement stable sur sept heures. L'amplitude des inévitables fluctuations périodiques correspond à environ 5/10'000 de la teneur en oxygène dans l'apport de gaz, ici de l'air. Ces fluctuations sont en phases dans les différents fermenteurs et correlées avec le fonctionnement intermittent du chauffage du laboratoire; une origine biologique nous semble à exclure.

Mesure automatisée de la turbidité. Un certain nombre d'appareils permettant de mesurer la turbidité "on-line" ont été décrits. Ils consistent soit en une sonde plongée dans la culture, soit en une chambre de mesure située sur une boucle extérieure où la culture circule continuellement (Bongers, 1970b). Tout ces dispositifs souffrent de deux défauts majeurs. Comme ils sont placés en contact direct avec la culture, ils doivent demeurer stériles et, en pratique, tant le nettoyage de la cellule de mesure que le suivi de la dérive de la ligne de base ne peuvent pas être effectués *in situ*. De plus, ces dispositifs ne suivent l'évolution de la turbidité que dans une seule culture à la fois, ce qui n'est pas applicable à nos six fermenteurs... pour cause de surcoût prohibitif. C'est pourquoi il nous a semblé préférable de procéder à la mesure de la turbidité avec un unique spectrophotomètre situé en dehors de l'aire stérile.

Pour déterminer la turbidité d'une culture, il suffit de placer un échantillon de celle-ci dans la cuvette d'un spectrophotomètre et de procéder à la mesure, la grosse difficulté étant de l'y amener automatiquement, et qui plus est lorsqu'il peut provenir de six cultures différentes. Nous avons installé, sur chacune des sorties des fermenteurs, un dispositif de prélèvement qui, à l'aide d'une électrovanne, va pouvoir injecter un petit volume de culture vers un dispositif de collecte à six entrées qui finalement conduira l'échantillon vers la cellule du spectrophotomètre.

La figure 7 présente le schéma d'un dispositif de prélèvement. Les numéros entre parenthèses qui suivent s'y rapportent. La pièce centrale de ce dispositif de prélèvement est constituée d'un flacon septé de 150 ml, (1), orienté le septum en bas (2), et d'une électrovanne "trois voies" (8) (Sirai, ELW6). Le septum a été découpé dans une plaque de silicone de 4 mm d'épaisseur afin de lui assurer une rigidité suffisante. Le mélange de culture et de gaz (3) provenant des fermenteurs est conduit à travers la voie normalement ouverte de l'électrovanne, traverse le septum du flacon et arrive dans une pointe de pipette en polypropylène (4) ("tips" de pipette automatique de 5 ml). Là, les gaz et la culture se

séparent, puis ressortent par un trou latéral (5) dont la position détermine le volume de culture maintenu constamment dans la pointe de pipette (environ 2 ml). L'arrivée du mélange se fait au dessous du niveau de l'ouverture latérale afin de brasser et de renouveler continuellement l'échantillon. L'excédent de culture qui sort par le trou latéral s'écoule sur le septum, puis est chassé vers le trop-plein (6) par un courant d'air stérile qui est continuellement injecté dans le flacon et qui maintient celui-ci en légère surpression (7).

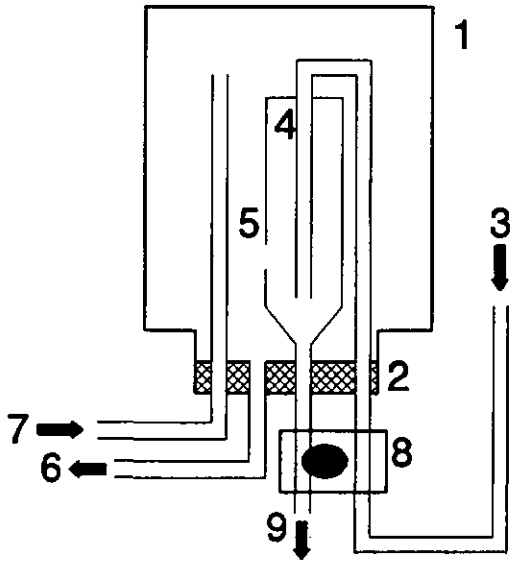


Figure 7 Dispositif de prélèvement.

Au début d'un cycle de mesure, l'électrovanne est activée, ce qui ferme l'entrée du mélange de culture et de gaz et simultanément ouvre le tuyau sortant de la pointe de la pipette (9). Comme le flacon septé se trouve sous pression, l'échantillon est injecté dans le tuyau. A sa suite, passe de l'air stérile qui va vider le tuyau. Ainsi, lorsque l'électrovanne se referme, le tuyau a été purgé par de l'air, ce qui assure qu'aucune culture ne stagne dans la tuyauterie jusqu'au prélèvement suivant. Il est donc essentiel que l'entrée du mélange de culture et de gaz soit fermée durant le prélèvement, sinon on ne pourrait parvenir à vider complètement le tuyau de prélèvement. Le polypropylène et le silicone étant des matériaux de nature hydrophobe, le volume contenu entre le bas de la pipette et l'électrovanne ne se remplit pas de liquide. Il n'y a donc aucun volume mort dans ce dispositif de prélèvement, ce qui nous autorise à travailler avec des échantillons d'aussi petit volume.

La figure 8 présente un schéma du dispositif de collecte des échantillons et de lecture de la turbidité. Les numéros qui suivent s'y rapportent. Chacun des six tuyaux (1) provenant des dispositifs de prélèvement débouche par des capillaires dans une pipette collectrice en verre, (2), (réalisée à partir d'une éprouvette de 18 mm de diamètre). Trois autres tuyaux parviennent également à cette pipette. Le premier passe par une électrovanne normalement fermée (8) et permet d'injecter de l'eau pour le rinçage. Le second (4) fait communiquer la pipette collectrice avec l'atmosphère et le troisième (5) permet de mettre l'éprouvette sous (légère) pression; ces deux derniers tuyaux passent par une électrovanne "trois voies" (3),

normalement ouverte sur l'atmosphère. Le bas de la pipette collectrice est relié à la cuvette du spectrophotomètre, (7) (Spectrophotomètre: Philips PU8600; Cuvette: HELMA, 170.004-QS, 2 mm de chemin optique!) par un tube en verre muni d'une chicane (6) qui ralentit la vitesse d'écoulement de l'échantillon. Finalement, la sortie sur l'extérieur se fait au-dessus du spectrophotomètre, la cuvette étant ainsi située au bas d'un tube en U de 15 cm de haut.

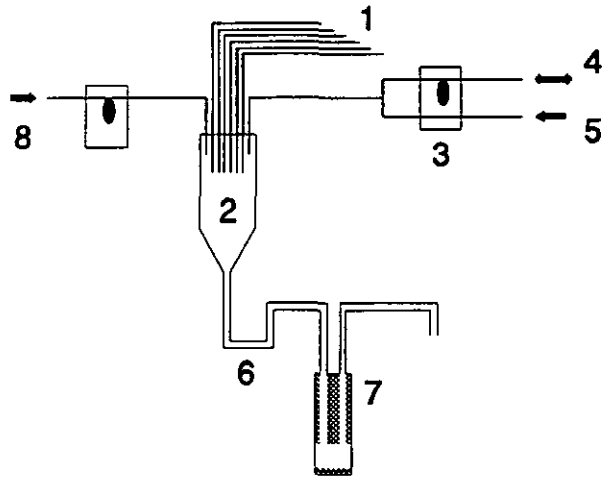


Figure 8 Dispositif de collecte.

Lors d'une mesure, l'échantillon de culture éjecté d'un des dispositifs de prélèvement va s'accumuler dans le bas de la pipette collectrice, alors en communication avec l'extérieur (via 4). Ensuite, la pression est momentanément élevée dans la pipette collectrice, en activant l'électrovanne trois voies (3,5), ce qui pousse l'échantillon dans le tube en U vers la cuvette du spectrophotomètre. Après les quelques secondes nécessaire à l'écoulement de l'échantillon, puis à ce que les inévitables petites bulles remontent du bas du tube en U, on peut effectuer la lecture de la turbidité. Ensuite, on procède de même, en remplaçant l'échantillon de culture par de l'eau propre (8), afin de rincer la pipette collectrice et la cuvette du spectrophotomètre et éviter que des cellules ne stagnent et encrassent le dispositif. Une bulle d'air s'intercale spontanément entre chaque passage de liquide dans le tube en U prévenant le mélange des différents échantillons.

Tout ce dispositif de prélèvement doit être réglé assez finement. Les caractéristiques de la tuyauterie (longueurs et diamètres) jouent un rôle non négligeable. Toutes les pressions sont maintenues constantes par des colonnes d'eau. L'eau de rinçage, stockée dans un flacon en polypropylène, est pompée continuellement par une pompe péristaltique vers un récipient à niveau constant. Une fois toutes les pressions stabilisées, les temps d'activation des électrovannes sont déterminés par tâtonnements successifs. Il nous est apparu préférable de procéder relativement lentement aux différentes opérations, afin de diminuer les éclaboussures et la formation de bulles. Finalement, nous sommes parvenu à effectuer un cycle complet, mesure et rinçage, en 55 secondes. Les temps d'écoulement des liquides sont

utilisables pour effectuer les autres mesures plus courtes, pH et oxygène dissous.

La dérive de la ligne de base du spectrophotomètre est inévitable. Cette dérive peut néanmoins être suivie en effectuant périodiquement des mesures d'absorbance sur de l'eau propre. Les mesures de turbidité devront être prétraitées pour leur soustraire la ligne de base (voir plus loin).

Notre méthode de mesure de la turbidité nous permet d'obtenir des signaux d'une qualité comparable à celle obtenue avec des appareilles du commerce... sur quelques heures (Corman et al., 1986). Mais, comme notre mesure est effectuée en dehors de l'aire stérile et que la dérive du spectrophotomètre est continuellement enregistrée, on est parvenu à reconstruire l'évolution de la turbidité avec une qualité constante jusqu'à six cent heures d'expérience.

Noorman et al. (1991) ont montré que la turbidité mesurée à la sortie de cultures continues munies de trop-plein vertical comme décrit ici, pouvait ne pas correspondre à la turbidité effective de la culture. La turbidité mesurée est inférieure si les cellules tendent à sédimenter et supérieure si elles tendent à flotter. Ils présentent un exemple de ce phénomène chez *Acinetobacter calcolaceticus*, une bactérie dont les cultures se recouvrent d'une fine couche de mousse à la surface (*sic*), malgré la présence d'huile de silicone. Nous ne pensons pas que ce phénomène viennent fausser nos mesures, d'une part, parce que *A. autotrophicum* ne mousse absolument pas, et d'autre part, parce que les vérifications effectuées en fin d'expérience ont toutes montré que la turbidité dans la culture correspondait à celle mesurée automatiquement à sa surface.

Mesure du pH. Dans chaque cuve est installée une électrode autoclavable permettant de mesurer le pH (Ingold, 465-35-K9/250). Les six électrodes sont branchées sur un multiplexeur (switchbox Orion, modèle 607), lui-même relié à un pH-mètre (Orion, EA940). Il s'agissait à l'époque du seul couple multiplexeur pH-mètre équipé d'une interface RS232. Il faut malheureusement signaler que l'électronique de cette interface est capricieuse et que les diagrammes de câblage électrique fournis par le fabricant sont inexacts. Le multiplexeur et le pH-mètre sont reliés entre eux par une interface RS232 qui se poursuit jusqu'à un ordinateur personnel. La mise à une terre commune des différentes électrodes diminue le bruit de fond des mesures. Ce pH-mètre est doté d'un système de mesure du pH effectuant

une intégration du signal jusqu'à l'obtention d'une mesure stabilisée. Il s'en suit que le temps de mesure est fortement variable, ce qui complique singulièrement les problèmes d'interfaçage. De plus, lorsque des cultures sont dans des phases de transitions, le signal du pH évolue continûment et il n'y a pas lieu d'espérer une mesure stabilisée! C'est pourquoi nous avons finalement préféré effectuer la mesure directement en millivolts sans aucune option d'intégration, pour ensuite convertir cette tension en unités de pH au niveau de l'ordinateur. Ainsi, le temps consacré à une mesure devient constant, ce qui simplifie grandement la programmation. Les constantes de calibration peuvent être sauvées sur disquette. En 12 secondes, on effectue 15 mesures de la tension et on en prend la moyenne pour calculer le pH. Des mesures successives dans un milieu tamponné ont montré que l'erreur de mesure est inférieure au millième de pH. Il est dès lors possible d'étudier la cinétique de la variation du pH sur moins de 0.1 unité.

Malgré la très bonne précision de la mesure du pH, il est difficile d'envisager son traitement quantitatif du fait de l'inévitable dérive des électrodes. Les deux causes principales de ce malheureux phénomène sont les conséquences du choc thermique provenant de la stérilisation et l'encrassement des membranes de verre des électrodes par des protéines ou des microorganismes. Les manipulations que l'on devrait effectuer pour prélever un échantillon, mesurer son pH en dehors du fermenteur et recalibrer l'électrode en cours d'expérience ne permettraient certainement pas d'obtenir un résultat exact au-delà de la première décimale. En revanche, en considérant la chimie acide-base du milieu de culture, on montrera comment on peut envisager un traitement semi-quantitatif des mesures de pH, qui sera finalement fort utile.

Mesure de l'oxygène dissous. La pression partielle en oxygène dissous est mesurée dans chaque cuve au moyen d'une électrode autoclavable (Ingold, ref:322-756-702, 320mm/k19mm). Ces électrodes effectuent une mesure ampérométrique et doivent disposer d'amplificateurs conçus spécialement à cet effet (Ingold, type 170) pour amplifier le signal et fournir finalement des courants compris entre 4 et 20 mA. Les sorties des six différents amplificateurs sont envoyées sur une carte d'un multiplexeur (carte: Hewlett Packard, 44421A; "DataLogger": Hewlett Packard, 3497A). Sur cette carte a été ajoutée une résistance de précision (512 kΩ) qui permet de court-circuiter les sorties des amplificateurs et un multimètre (Schlumberger, Solartron 7150) peut venir lire la tension aux bornes de cette résistance. On effectue ainsi une mesure de tension plutôt que de courant, ce qui

procure un net gain de précision. Les constantes de calibration stockées dans le PC permettent de convertir les tensions mesurées en pression partielle en oxygène dissous. La précision est excellente. Le multimètre et le multiplexeur sont situés sur une interface IEEE488.

L'interprétation des mesures d'oxygène dissous dans les mini-fermenteurs va nécessiter que l'on s'intéresse plus loin à la dynamique des gaz dans l'installation.

Stérilisation. L'installation peut se démonter en neuf sous-ensembles stérilisables séparément. Il s'agit:

-De la bonbonne de réserve de milieu frais,
-De la tuyauterie d'amenée de milieu, comportant les débitmètres,
-Des six fermenteurs, y compris les dispositifs de prélèvement,
-De la bonbonne de trop-plein et de la tuyauterie qui y conduit.

Toutes ces différentes parties sont reliées entre elles par des raccords Luer Lock pour cathéter. Ces raccords métalliques peuvent être flambés lors des connexions, du moins lorsqu'il n'y a pas d'hydrogène dans l'installation.

Seul le dispositif de collecte de la mesure de la turbidité n'est pas prévu pour être stérilisé. Cependant, comme les différences de pression sont strictement maintenues dans la tuyauterie, il n'y a quasi aucun risque de voir un contaminant "remonter les tuyaux"; en tout cas, nous ne l'avons jamais observé. Une attention particulière est cependant de mise, quant à l'ordre dans lequel l'installation est mise sous pression et les connexions effectuées.

Faut-il un fermenteur témoin? Initialement, nous avions prévu de garder un des six fermenteurs non-inoculé, afin qu'il puisse servir de témoin. Cependant nous nous sommes rapidement rendu compte de son inutilité. En effet, s'il est très séduisant d'évaluer la dérive d'une électrode par rapport à un témoin, il faut remarquer que ce dernier n'est pas placé dans les mêmes conditions de travail, du fait de l'absence de biomasse et, en fin de compte, il est peu probable que l'électrode témoin présente la même dérive liée au colmatage des membranes. D'autre part, en ce qui concerne la mesure de la turbidité, il est à noter qu'une fois que toutes les cultures sont limitées, seuls les "échantillons" provenant du témoin

contiendront assez de substrat pour permettre aux microorganismes de se développer dans le dispositif de collecte et par conséquent d'encrasser le système de mesure de la turbidité. Il est donc hautement préférable d'évaluer la dérive du spectrophotomètre avec de l'eau propre. Le fermenteur témoin est inutile et source de problèmes supplémentaires.

Electricité et informatique. Tous les appareils de mesures ont été installés sur la même ligne électrique afin de bénéficier d'une phase et d'une terre communes. Cette ligne électrique a été protégée des coupures de courant par un système de batterie (Stabiline PSP552006-2, Superior Electric) qui s'enclenche automatiquement en cas de chute de tension, son autonomie est d'environ 20 minutes. Cet appareil est également équipé d'un filtre anti-parasite.

Un PC (Supra, XT88) a été équipé de trois interfaces pour l'acquisition des données, soit deux interfaces sérielles RS-232 et une interface IEEE-488 (carte Keithley, PC488). Le programme d'acquisition de données à été écrit en pascal (TURBO PASCAL Version 4.0). L'établissement de la communication sur chacune des interfaces sérielles a été passablement délicat, vu notre manque d'expérience; il fallu d'abord construire les bons câbles (!) et à cette fin nous avons dû utiliser un analyseur de signaux. Ensuite, nous avons recouru aux interruptions du BIOS pour écrire les routines de communication dont le protocole est évidemment différent pour chaque appareil. L'interface IEEE488 est livrée avec du software qui se compose de code machine (fichier .OBJ) et d'une UNIT turbo pascal, ce qui simplifie grandement la programmation.

Nous nous contenterons de présenter ici quelques principes de fonctionnement du programme. Il y a trois mesures (pH, pO_2 et turbidité) que l'on peut effectuer individuellement dans chacun des fermenteurs ou encore sous forme d'une mesure combinée de ces trois paramètres (plus rapide). On peut également réinitialiser périodiquement les instruments de mesure. On appelle configuration de mesure la description de toutes les mesures que le programme effectue cycliquement. Cette configuration peut être modifiée interactivement à tout moment. A chaque possibilité de mesure sont rattachées les valeurs de trois champs. Le premier indique si la mesure est active, c'est-à-dire si l'on désire bien mesurer tel paramètre durant l'expérience. Le second indique la fréquence à laquelle les mesures doivent être effectuées. Le troisième indique le décalage initial entre les différentes mesures, de sorte qu'elles ne s'effectuent pas toutes en même temps(!). Le programme sauve

toujours sur disque la configuration active qui est chargée par défaut lorsqu'on le lance. D'autres configurations peuvent être sauvées ou chargées suivant les besoins, par exemple pour calibrer l'installation.

Le programme possède deux modes de fonctionnement. Dans le mode MANUEL, aucune mesure n'est effectuée, mais les fonctions de modification de la configuration et de calibration sont disponibles. Dans le mode AUTOMATIQUE, le programme effectue les mesures conformément à la configuration en cours et aux valeurs de calibration. Un fichier conserve sur disque le mode dans lequel le programme fonctionne. Un autre fichier conserve les valeurs de calibration permettant de convertir les tensions électriques lues sur les électrodes en unités de pH et d'oxygène dissous respectivement. Le calcul de ces paramètres est effectué par les routines de calibration du programme.

Durant l'acquisition des données, les mesures sont immédiatement sauvées sur disque. En cas de panne, seule la mesure en cours est perdue. Le programme garde en mémoire les cent dernières mesures effectuées pour chaque canal, et il est possible de visualiser graphiquement l'évolution de ces signaux. Un autre programme permet de transformer les fichiers de résultats dans un format compatible avec nos programmes de traitement de données.

Une installation comme celle qui vient d'être décrite permet d'acquérir une énorme quantité de données. Par exemple, en 150 heures d'expérience, on peut obtenir jusqu'à 27'000 mesures. Nous possédons à ce jour un total d'environ 3.8 mégabytes de fichier source, ce qui correspond très grossièrement à 250'000 mesures expérimentales. Il s'ensuit qu'il faut disposer de programmes de traitement de données capables de faire face à cette avalanche de chiffres. Et, faute de trouver le programme qui satisfaisait tous nos besoins, nous l'avons écrit.

Prétraitement des mesures de turbidité. Dans un premier temps, nous avons piloté le spectrophotomètre en lui faisant effectuer automatiquement un cycle de nettoyage toutes les heures avec une solution d'alcool acide. Mais, ce cycle de nettoyage s'est révélé avoir un effet perturbateur sur les mesures qui le suivaient. Un dépôt absorbant la lumière (bactéries, substances organiques?) semble se reformer sur les parois de la cuvette dans la demi-heure qui suit le nettoyage. Ensuite, la cuvette ne s'encrasse plus que très lentement (0.02 OD par jour pour des cultures autotrophes, un peu plus en hétérotrophie). Il nous est donc finalement

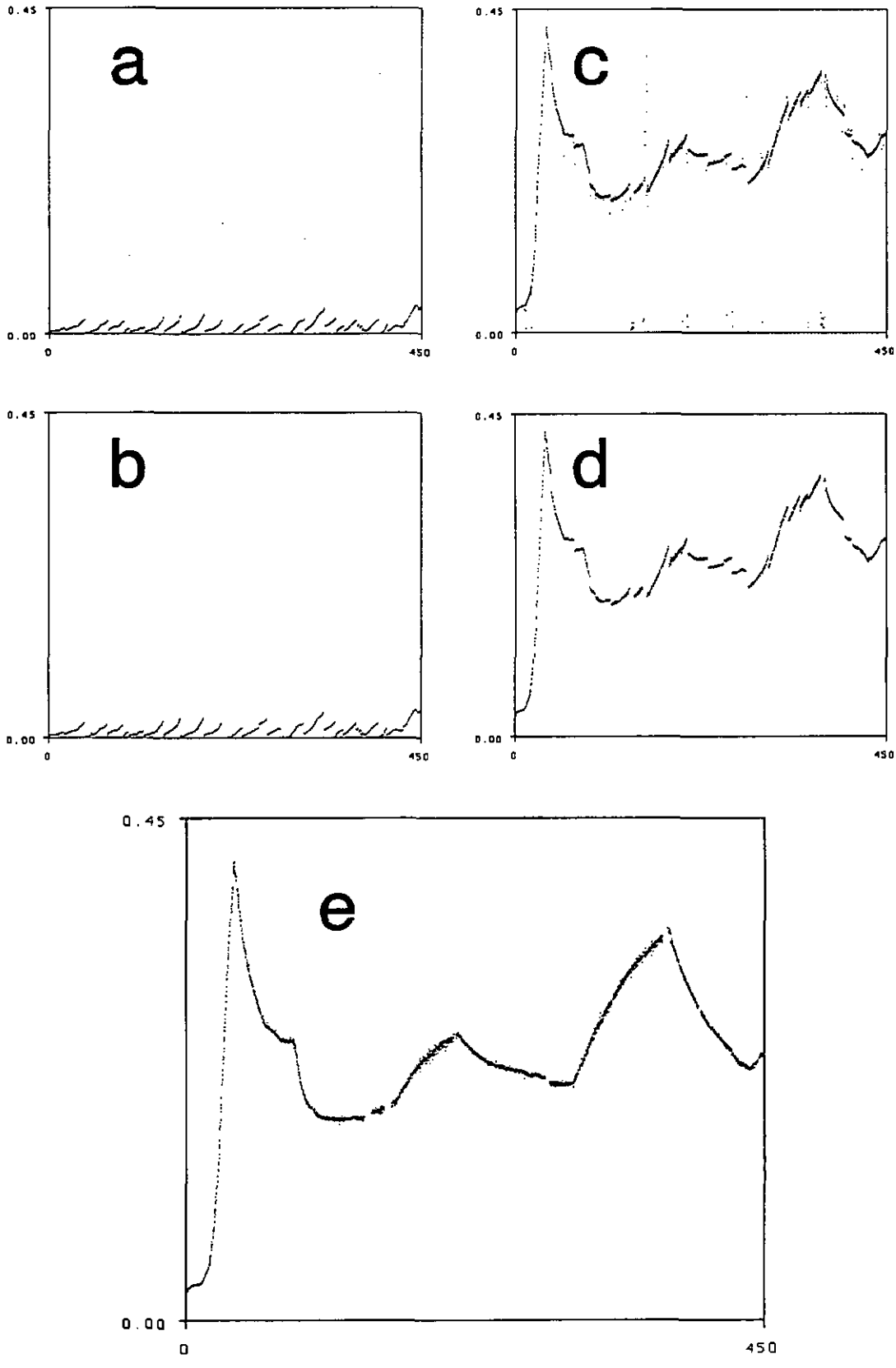


Figure 9 Prétraitement des mesures de la turbidité du fermenteur 1 au début de l'expérience LempD. Explications dans le texte.

apparu grandement préférable de ne plus nettoyer la cuvette automatiquement mais manuellement une fois par jour, et de suivre son encrassement en effectuant de fréquentes mesures avec de l'eau pure. Il a fallu ensuite soustraire cette ligne de base des mesures de turbidité. La figure 9 présente une illustration des opérations que l'on a dû effectuer. Dans le signal de l'eau pure (a) on commence par supprimer les quelques points complètement faux liés au nettoyage de la cuvette. Le même traitement est réservé au signal brut de la turbidité (c), mais ici le nombre de points à supprimer est plus élevé du fait des manipulations volontaires et involontaires du système de collecte. Les courbes nettoyées (b & d) n'ont ni le même nombre de points, ni la même répartition des points sur l'abscisse. Afin de pouvoir soustraire l'une à l'autre, il faut interpoler la ligne de base et la reconstruire pour les valeurs en abscisse de la turbidité. Les courbes sont alors soustraites sans problème (e).

Une expérience comme LempD, comporte six courbes de turbidité de 5500 points chacune, plus les 5000 points de la ligne de base. Une fois chargées en mémoire, ces courbes occupent plus de 100 kilobytes chacune. La suppression des fausses mesures s'apparente alors au onzième des travaux d'Hercule... si elle doit être effectuée dans un tableur! Nous avons préféré utiliser un "éditeur graphique de courbe" (home made) doté d'une gomme et d'un zoom. Les fausses mesures sont rapidement repérées et gommées sur le graphique, et ensuite il n'y plus qu'à sauver le fichier corrigé.

Les expériences complètes ont été découpées en expériences ne comportant plus que quelques centaines de points, et qui correspondent chacune à une transition isolée. Ce découpage facilite la recherche des données et surtout diminue le temps d'accès aux fichiers. La liste de toutes les expériences, ainsi qu'un résumé de leur contenu figure en annexe.

Journal of General Microbiology (1992), **138**, 429–436. *Printed in Great Britain*

Linear growth and poly(β-hydroxybutyrate) synthesis in response to pulse-wise addition of the growth-limiting substrate to steady-state heterotrophic continuous cultures of *Aquaspirillum autotrophicum*

MARCO PAGNI,* TRELLO BEFFA, CÉDRIC ISCH and MICHEL ARAGNO

Laborotoire de Microbiologie de l'Université de Neuchâtel, Chantemerle 22, 2007 Neuchâtel, Switzerland

(*Received 4 April 1991; revised 3 September 1991; accepted 31 October 1991*)

Heterotrophic pyruvate-limited steady-state continuous cultures of the bacterium *Aquaspirillum autotrophicum* were perturbed with a pulse injection of a small volume of concentrated pyruvate solution. These cultures exhibited an instantaneous change in the growth dynamics, turning from steady state to apparently linear growth. These transient growth-responses had no lag phase and were clearly distinct from unlimited exponential growth according to the initial rates of increase of biomass and substrate disappearance kinetics. A linear accumulation with time of poly(β-hydroxybutyrate) was observed within the cells. Slopes of these linear responses were negatively correlated with the dilution rate. Physiological bases of linear growth are discussed in the light of the models of H. E. Kubitschek. Poly(β-hydroxybutyrate) synthesis in the absence of exogenous limitation may serve to protect the cells against a transient metabolic overflow.

Introduction

Continuous culture is most often used to study steady-state growth physiology. However, only part of the regulatory characteristics of the metabolism are then expressed. Such studies cannot account for most of the growth responses in natural environments, which are essentially a succession of transitions. Several standard transitions can be studied with continuous cultures; a typical example is represented by the instantaneous suppression of the limitation by a pulse of the limiting substrate. Such experiments have been reported by Harisson & Maitra (1969) with *Klebsiella aerogenes* and more recently by Brooke *et al.* (1989) with a thermophilic *Bacillus* strain.

The facultatively autotrophic bacterium *Aquaspirillum autotrophicum* was chosen as model organism. Apart from its ability to grow autotrophically under $H_2/O_2/CO_2$ mixtures, it can grow heterotrophically under air with a variety of organic acids (Aragno & Schlegel, 1978*a*, *b*), as well as mixotrophically (Fasnacht, 1988). It is therefore a valuable organism to study various types of transitions with regard to energy and carbon metabolism. Moreover, it forms homogeneous suspensions in culture, and does not excrete polysaccharides. Poly(β-hydroxybutyrate), PHB, is synthesized as a reserve material under nitrogen limitation (Walther-Mauruschat *et al.*, 1977).

Pulse experiments similar to those described above were undertaken in two different types of continuous culture apparatus. One was designed for on-line turbidimetric measurements at short intervals (6 min), requiring relatively low biomass densities; this allowed a description of transient kinetics with satisfactory accuracy on a 1 h scale. The other apparatus was used to sample cultures for chemical analysis, thus needing higher biomass densities.

Methods

Organism and culture conditions. Aquaspirillum autotrophicum strain SA32 (DSM 732, ATCC 29984, Aragno & Schlegel 1978*a*) was precultivated in the basal mineral medium described by Schlegel *et al.* (1961) and Aragno & Schlegel (1981) with 0·5% sodium pyruvate added. The temperature was maintained at 27 °C throughout the experiments.

For turbidimetric observation of growth kinetics, cells were grown in six 'home-made' fermenters running in parallel. Each fermenter had a working volume of 800 ml and was stirred at 1500 r.p.m. with a large magnetic stirrer. The feed medium consisted of the basal medium with only half the phosphate concentration and with the addition of sodium pyruvate at a final concentration of 7·5 mM. For pulse experiments, 1 or 2 ml sterile 3 M-sodium pyruvate was injected directly into the culture.

* Author for correspondence. Tel. 38 256434; fax 38 242695; email mbpagni@cnedcu51.bitnet.

Abbreviation: PHB, poly(β-hydroxybutyrate).

0001-6860 © 1992 SGM

The partial pressure of dissolved oxygen and the pH were followed with immersed electrodes. Feed medium and thermostatization were common to all fermenters; these differed only in their dilution rate and in their air inflow rate. Optical density at 436 nm was measured automatically every 6 min in each fermenter, with an accuracy of more than 1%, with a PU8620 Philips spectrophotometer and a HELMA 170.004-QS flow-cell with a 2 mm optical path.

For experiments in which samples had to be collected for chemical analyses, cells were grown in a Biostat-S fermenter with a working volume of 3·4 l stirred at 800 r.p.m. Sodium pyruvate was added to the basal mineral medium at 22·26 mM final concentration. Sterile 3 M-sodium pyruvate (15 ml) was injected for pulse experiments. Sampling was usually performed with an automatic collecter, but, during transitions, samples were collected in a large precooled glass beaker and continuously stirred on an ice bed until the temperature fell to 1 °C (less than 30 s). Optical density was measured with a Zeiss PM4 photometer at 436 nm with an optical path of 1 cm.

PHB determination. The PHB assay was a combination of the methods of Law & Slepecky (1961) and of Poindexter & Eley (1983): cells from a 5 ml culture sample were collected by centrifugation (8000 *g*, 10 min, 4 °C), and washed with 10 mM-Tris/HCl/saline (NaCl 0·9%, w/v) buffer pH 7·0. The pellet was suspended in 5 ml 0·5% (w/v) sodium hypochlorite and left for 1 h at 37 °C to allow total lysis of the cells. The PHB granules were then collected by centrifugation (4000 *g*, 10 min, 4 °C), washed successively in distilled water, acetone and ethanol, and finally dissolved in hot chloroform. After the chloroform-insoluble part had been discarded, the chloroform was evaporated and the residue was hydrolysed and dehydrated with concentrated sulphuric acid to obtain crotonic acid, which can be quantified by its absorbance at 235 nm, according to Zevenhuizen (1974). A complete absorbance spectrum was measured for each sample using sulphuric acid as a blank.

Pyruvate determination. Pyruvate concentration in the culture supernatant was measured by spectrophotometric analysis of NADH oxidation at 340 nm in the presence of lactate dehydrogenase (Czok & Lamprecht, 1974). This method permits detection of pyruvate concentrations as low as 3 μM.

Determination of respiratory activities. Cells were washed by centrifugation in potassium phosphate buffer, pH 7·0, and the respiratory activities were determined polarographically at 28 °C using a Clark-type oxygen electrode (Hansatech. CBH2 Box, adjustable volume) with a chart recorder. Oxygen concentration in the experimental system was calibrated using the method of Robinson & Cooper (1970) and the respiratory activities were determined as previously described (Beffa *et al.*, 1988). The reaction mixture (1 ml final vol.) contained only the mineral basal medium for the determination of endogenous respiratory activity, and the same medium supplemented with 25 mM-pyruvate (final concentration) for the measurement of total respiratory activity. The measurements were performed with 0·2 to 0·4 mg dry wt cells ml^{-1} and are expressed in nmol O_2 consumed (ml culture)$^{-1}$ min^{-1}.

Other methods. Total polyphosphates (acid soluble plus insoluble) were determined from 5 ml of washed cells according to Poindexter & Eley (1983) and Clark *et al.* (1986). Dry weight was measured after drying washed cells for 48 h at 100 °C. Total protein was estimated with the bicinchoninic acid method (P. K. Smith *et al.*, 1985). Non-linear fitting of the models to the experimental data was performed by standard algorithms of minimization.

Results

The term 'exponential' will be restricted to qualify unlimited balanced growth at a constant rate. It will never be used for exogeneously limited growth at steady state. The subscript 'exp' will therefore qualify all parameters related to this kind of growth, such as the exponential growth rate μ_{exp} (often referred to as μ_{max}).

Observation of transitions

Similar experiments were undertaken in both fermenter installations. Each continuous culture was inoculated with an exponentially growing preculture of *A. autotrophicum* on pyruvate. After an initial exponential growth phase at rate $\mu_{exp} \approx 0{\cdot}32\ h^{-1}$ (see below, Fig. 3), the culture became limited in pyruvate and relaxed to a pyruvate-limited steady state. Then a given volume of concentrated pyruvate solution was injected into the culture. The volume added had a negligible influence, except on the pyruvate concentration. The growth dynamics changed immediately, turning from steady state to apparently linear growth (Fig. 1). Despite the fact that the characteristic exponential curvature is only faintly marked on an hour scale, the precision of biomass measurements was sufficient to reveal the absence of any positive curvature. This typical growth response appeared in all experiments for dilution rates ranging from 0·049 to 0·246 h^{-1}, lasted for at least 1 h and was observed for up to 3 h depending on the injected volume and dilution rate. The pyruvate pulse and the reappearance of pyruvate limitation were both correlated with sudden changes in pH and oxygen signals. The aspect of linear growth termination depended on the particular experimental conditions. It was either sudden and correlated with the reappearance of pyruvate limitation for all transitions lasting less than 2 h, or progressive, before the reappearance of limitation (see below, Fig. 4). Finally, each culture relaxed back to its previously observed steady state.

The intersection of the regression lines fitting steady state and linear growth is located very close to the injection time. This was observed in all experiments and is fully correlated both with sudden changes in dissolved oxygen and in pH values. Experimental conditions do not permit the demonstration of the simultaneity of the onset of linear growth and pyruvate injection with an accuracy of more than 30 s. Changes in oxygen concentration on the other hand, can be determined in a matter of seconds.

Modificotions of cell composition

Table 1 summarizes some relevant measurements made during a linear growth response. Only negligible PHB concentrations were detected in cultures at steady state, whereas PHB accumulated linearly during the transitions (Fig. 2). During the linear growth response, small

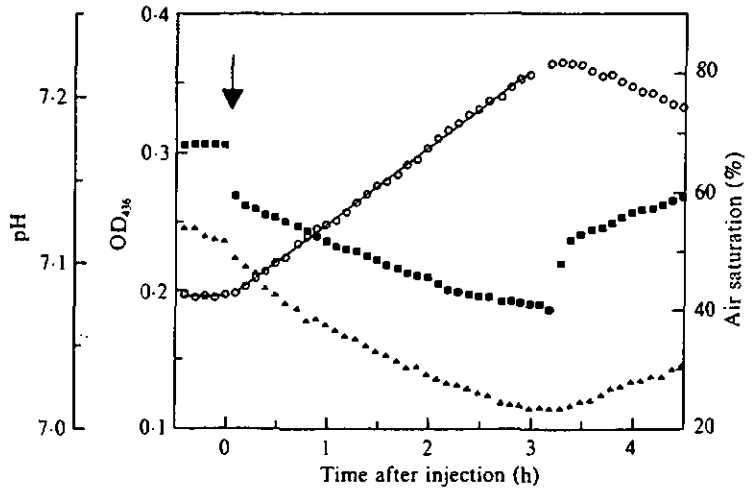


Fig. 1. Characteristic linear growth response after the injection (arrow) of 2 ml pyruvate (3 M) into a 0·8 l pyruvate-limited culture at steady state ($D = 0{\cdot}160\ h^{-1}$, $S_f = 7{\cdot}5$ mM). ○, OD_{436} with 2 mm optical path; ▲, pH; ■, percentage air saturation.

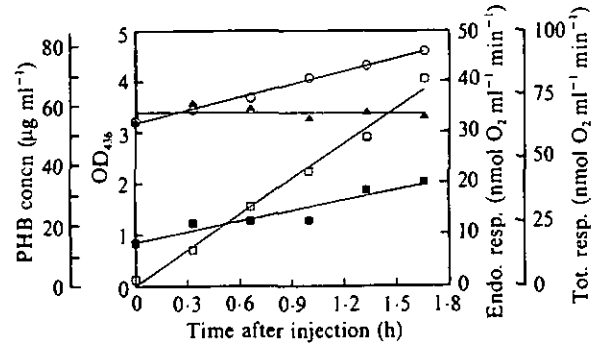


Fig. 2. Production of PHB (□), OD_{436} with 1 cm optical path (○), endogenous respiration (■) and total respiration (▲) after the injection of 15 ml pyruvate (3 M) into a 3·4 l pyruvate-limited culture at steady state ($D = 0{\cdot}134\ h^{-1}$, $S_f = 22{\cdot}26$ mM).

inclusions, probably of PHB, were observed in cells under phase-contrast microscopy, whereas these inclusions were not visible in cells from cultures at steady state. The ratio of dry weight to optical density appeared almost constant, with or without the presence of PHB inclusions, but this apparent constancy could be restricted to PHB contents of less than 10% (w/w). Correlated with PHB synthesis, the endogenous respiration rate increased while the total respiration rate showed no significant variation. The total polyphosphate content during the transitions remained below the detection limit of the method used. Polyphosphate accumulation does not seem to play any role here. However, volutin inclusions have been observed in *A. autotrophicum* under other growth conditions (Walter-Mauruschat *et al.*, 1977).

Table 1. *Measurement of relevant physiological parameters after a pyruvate pulse*

Pyruvate (15 ml; 3 M) was injected into a 3·4 l culture at steady state ($D = 0{\cdot}134\ h^{-1}$, $S_f = 22{\cdot}26$ mM, Biostat fermenter). Values at 0 h correspond to the steady state.

Measurement	Unit	Time after injection (h): 0	1	2
Turbidity	DD_{436} (1 cm optical path)	3·197	4·017	4·894
Dry wt	mg ml⁻¹	0·670	0·845	1·019
Turbidity/dry wt	OD mg⁻¹	4·77	4·75	4·80
PHB	μg ml⁻¹	<0·2	37·5	69·2
PHB/dry wt	%mg mg⁻¹	<0·03	4·4	6·8
Protein	mg ml⁻¹	0·50	0·57	0·64
Protein/dry wt	%mg mg⁻¹	75	67	63
Polyphosphate	μg ml⁻¹	<0·2	<0·2	<0·2
Endo. resp.	nmol O_2 ml⁻¹ min⁻¹	8·4	12·6	21·3
Tot. resp.	nmol O_2 ml⁻¹ min⁻¹	64·1	65·5	70·4

Table 2. *Determination of q_{exp} at the start-up of an experiment with the Biostat fermenter and determination of q^0_{lin} later in the same experiment after a pyruvate pulse*

Pyruvate (15 ml; 3 M) was injected into a 3·4 l culture at steady state ($D = 0{\cdot}134\ h^{-1}$, $S_f = 22{\cdot}26$ mM. The fixed values were obtained from culture conditions and from biomass growth kinetics. The fitted values were computed on the pyruvate disappearance kinetics.

Biomass kinetics:	Exponential	Linear
Model used:	$S_{exp}(t)$ (eq. 2)	$S_{lin}(t)$ (eq. 6)
Fixed values:	$S_f = 22{\cdot}26$ mM $D = 0{\cdot}134\ h^{-1}$ $\mu_{exp} = 0{\cdot}310\ h^{-1}$ $X_0 = 0{\cdot}043$ OD	$S_f = 22{\cdot}26$ mM $D = 0{\cdot}134\ h^{-1}$ $X_{stat} = 3{\cdot}207$ OD
Fitted values:	$S_0 = 22{\cdot}02$ mM $q_{exp} = 1{\cdot}75$ mM $OD^{-1}\ h^{-1}$	$S_0 = 12{\cdot}41$ mM $q^0_{lin} = 1{\cdot}76$ mM $OD^{-1}\ h^{-1}$
Residual square sum:	RSS = 5·71 25 data points Fig. 3	RSS = 3·17 11 data points Fig. 4

Kinetics of substrate disappearance

During steady state, the residual pyruvate concentration was undetectable by the assay used, so the affinity constant of *A. autotrophicum* for pyruvate is certainly within the micromolar range. In turn, during exponential or linear growth, pyruvate concentrations in the millimolar range were recorded. As a consequence, it was postulated that the pyruvate uptake system(s) was (were) saturated during both types of growth.

During start-up exponential growth in continuous culture, the evolution of the substrate concentration S_{exp} is described by the following differential equation

$$\frac{dS_{exp}}{dt} = (S_f - S_{exp})D - q_{exp}X_0 e^{(\mu_{exp} - D)t} \qquad (1)$$

where μ_{exp} is the exponential growth rate, D the dilution rate, S_f the substrate concentration in the feed, q_{exp} the constant substrate consumption rate per biomass unit and X_0 the initial biomass. This differential equation can be resolved into

$$S_{exp}(t) = S_f + e^{-Dt}\left[S_0 - S_f + \frac{X_0 q_{exp}}{\mu_{exp}}(1 - e^{\mu_{exp}t})\right] \qquad (2)$$

with S_0 as the initial substrate concentration.

Linear growth is biomass accumulation at a constant rate, because a linear function of time is the primitive of a constant function. A simple hypothesis for linear growth could involve a constant consumption rate for the whole culture and a constant growth yield. Then, the following equation would describe the substrate-disappearance kinetics during linear growth

$$\frac{dS_{lin}}{dt} = (S_f - S_{lin})D - Q^{whole}_{lin} \qquad (3)$$

where Q^{whole}_{lin} is the constant consumption rate by volume unit of the whole culture. In fact, the physiology underlying this hypothesis is more complicated than it appears, because of the consumption rate per biomass unit, which has to decrease with time, and because of the ambiguous meaning of a constant growth yield during a growth which is known to be unbalanced. Formally, a consumption rate per biomass unit, q^0_{lin}, can be defined at the beginning of linear growth when the biomass is equal to the steady state biomass X_{SS}

$$q^0_{lin} = \frac{Q^{whole}_{lin}}{X_{SS}} \qquad (4)$$

so the differential equation (3) can be rewritten

$$\frac{dS_{lin}}{dt} = (S_f - S_{lin})D - q^0_{lin}X_{SS} \qquad (5)$$

and admits the solution

$$S_{lin}(t) = S_f - \frac{q^0_{lin}X_{SS}}{D} + e^{-Dt}\left(S_0 - S_f + \frac{q^0_{lin}X_{SS}}{D}\right) \qquad (6)$$

$S_{exp}(t)$ and $S_{lin}(t)$ can easily be distinguished graphically, because of the negative curvature of $S_{exp}(t)$

$$\frac{d^2S_{exp}}{dt^2} = -(S_f - S_{exp})D^2 - q_{exp}X_0(\mu_{exp} - 2D)\cdot e^{(\mu_{exp} - D)t} < 0\ \forall t,\ t \geq 0$$

$$\text{if } S_{exp}(0) < S_f + q_{exp}X_0\frac{2D - \mu_{exp}}{D^2} \qquad (7)$$

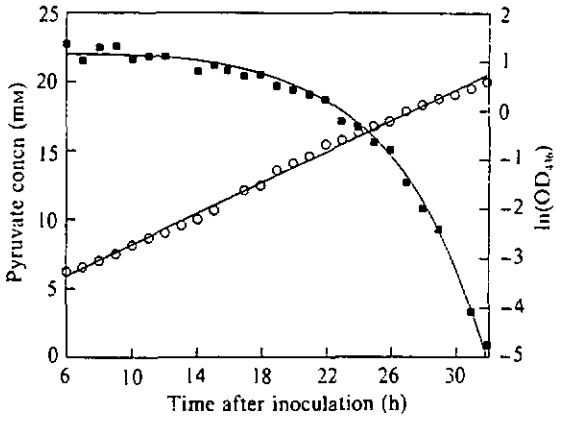


Fig. 3.

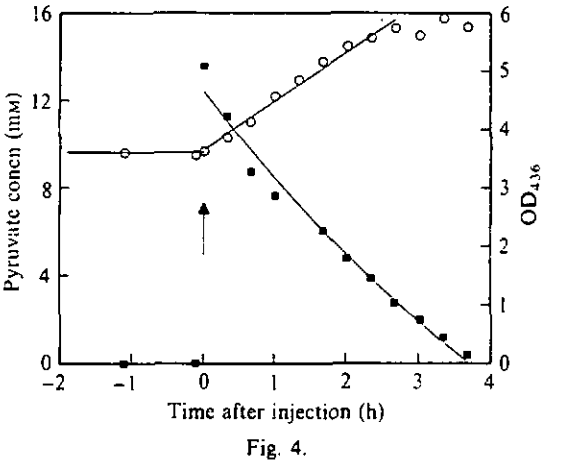


Fig. 4.

Fig. 3. $\ln(OD_{436})$ with 1 cm optical path (○) and pyruvate concentration (■) during the exponential growth at start-up of a continuous culture ($D = 0{\cdot}134\ h^{-1}$, $S_f = 22{\cdot}26$ mM). Data fitted with model $S_{exp}(t)$ (eq. 2).

Fig. 4. OD_{436} with 1 cm optical path (○) and pyruvate concentration (■) before and after the injection (arrow) of 15 ml pyruvate (3 M) into a 3·4 l pyruvate-limited culture at steady state ($D = 0{\cdot}134\ h^{-1}$, $S_f = 22{\cdot}26$ mM). Data fitted with model $S_{lin}(t)$ (eq. 6).

prevailing at least at the start-up of the culture [$S_{exp}(0)$ close to S_f and X_0 small] against the slight positive curvature of $S_{lin}(t)$

$$\frac{d^2S_{lin}}{dt^2} = D[Q_{lin}^{whole} - D(S_f - S_{lin})] > 0 \text{ as } Q_{lin}^{whole} > DS_f \quad (8)$$

Kinetic data of pyruvate disappearance were recorded during both exponential and linear growth and both models were fitted to the data. The values obtained for the parameters are shown in Table 2, and the fits of the models to experimental data are presented in Figs 3 and 4. The hypotheses underlying the two sets of substrate-consumption kinetics appeared to be satisfied for the respective growth behaviours. Cross-testing of the models did not yield acceptable fits because of tbe opposing curvatures. Fig. 4 shows a case where linear growth ended before pyruvate had become limiting again. Nevertheless, the hypothesis of a constant consumption rate for the whole culture still appeared valid up to the reappearance of pyruvate-limitation. The two consumption rates per biomass unit are strikingly close

$q_{exp} = 1{\cdot}75$ mmol $OD^{-1}\ h^{-1}$ and

$q_{lin}^0 = 1{\cdot}76$ mmol $OD^{-1}\ h^{-1}$

The growth at steady state seems to have only a negligible influence on the constancy of the (maximal) uptake rate of the saturated consumption system. This apparent constancy was verified by the data from the automated turbidity-measuring system. Admitting the same substrate disappearance kinetics, the solution equations, $S_{exp}(t)$ and $S_{lin}(t)$, were rearranged in order to relate the consumption rates with the time required for substrate disappearance. The respective consumption rate was then evaluated for each pulse experiment. The constancy of the maximal potential consumption rate of pyruvate was roughly confirmed in the range of observed dilution rates (0·049 to 0·246 h^{-1}).

Effects of dilution rate

The steady state optical density, X_{SS}, and the slope, $\Delta X/\Delta dt$, of the linear response were recorded at different dilution rates in the parallel fermenter installation in order to compute the initial linear growth rate

$$\mu_{lin}^0 = \frac{1}{X_{SS}} \frac{\Delta X}{\Delta t} + D \quad (9)$$

This initial linear growth rate was taken into account instead of the slope alone, because while the potential maximal consumption rate appeared constant, the steady state biomass varied according to the dependence of growth yield on dilution rate (Pirt 1965; Esener *et al.*, 1983). Fig. 5 shows the μ_{lin}^0 distribution against the dilution rate. A negative regression correlates both parameters satisfactorily

$$\mu_{lin}^0 = 0{\cdot}55 - 0{\cdot}61D \quad (10)$$

showing that the initial linear growth rate is always greater than the exponential growth rate ($\mu_{exp} = 0{\cdot}32\ h^{-1}$) at any observed dilution rate. Biomass linear over-production is proportional to the difference between the conditioning dilution rate and the maximal growth rate, or, from another point of view, to the sudden over-consumption of substrate. Moreover, the intercept of the regression line with μ_{exp} is close to the washout dilution

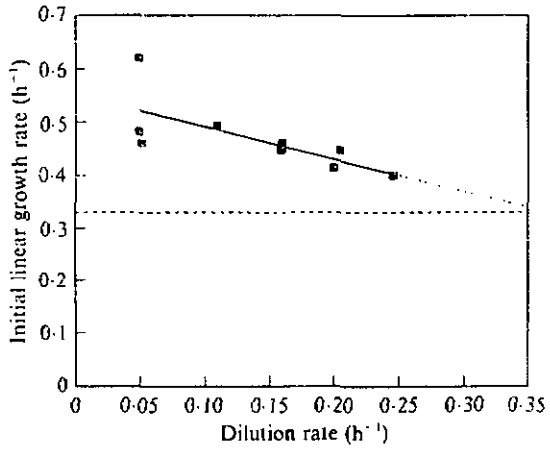


Fig. 5. Initial linear growth rate, μ_{lin}^{0}, plotted against the dilution rate (■) for ten pulse experiments computed from data obtained with the small fermenters (example shown in Fig. 1). ——, Regression line; – – –, (non-limited) exponential growth rate.

rate; this implies that no linear response would be expected if extra substrate were injected into an already (non-limited) exponentially growing culture. Therefore, in these cells PHB accumulation is not to be expected in significant amounts, just as was observed.

Discussion

Pyruvate as sole limiting factor

It was assumed that pyruvate was the sole limiting factor at steady state according to the following experimental evidence. (*a*) Steady-state pyruvate concentration is not detectable for any tested feed concentration. (*b*) Schlegel's medium allows *A. autotrophicum* to grow up to 2·5 mg dry wt ml^{-1}, twice the highest biomass recorded here; ammonium then becomes limiting, provided carbon and energy are in excess (Fasnacht 1988, and personal observations). (*c*) After several successive pulse experiments, the pyruvate feed concentration was increased; the culture then grew up to a new steady state with a biomass concentration higher than recorded during the pulse experiments. (*d*) The characteristic linear response was observed under various dissolved oxygen partial pressures ranging from 16 to 60% air saturation, depending on air inflow rates, while oxygen limitation was observed only below 3% air saturation in other experiments. (*e*) The characteristic transitions were similar in both basal and half-phosphate concentration media.

Linear growth kinetics

The growth kinetics following a pyruvate pulse are clearly non-exponential: the initial transient growth rate is distinctly higher than the exponential one (Fig. 5). This growth is unbalanced, as revealed by the accumulation of PHB and by the decrease in the protein fraction of the biomass (Table 1). PHB accumulation is related to an increase in endogenous respiration. However, PHB does not account for the total increase in biomass: in 2 h, the dry biomass increased by 349 μg ml^{-1}, whereas only 69·2 μg PHB ml^{-1} accumulated. Simultaneously, the protein content of the culture increased by 140 μg ml^{-1}. Clearly, both phenomena (PHB and protein synthesis) participate in the biomass increase.

Despite the complexity of such unbalanced growth, a simple linear growth model for total biomass suffices to describe the observed kinetics of growth and substrate disappearance. It should therefore be considered as a useful local description. Its adequacy is certainly restricted to the accuracy of the measurements which is probably not the case for true exponential growth. The effect of the dilution rate, which should give a slight negative curvature to the kinetics of biomass accumulation at a constant rate, is actually negligible.

In his work on growth kinetics of single cells or synchronized cultures of *Escherichia coli*, Kubitschek (1990) has proposed a linear growth model as a general model for dry weight increase during one cell cycle. The macromolecular (cytoplasmic) fraction accumulates exponentially (Ecker & Kokaisl, 1969), but as shown by Kubitschek & Pai (1988) the precursor-pool sizes vary with a maximum at mid-cycle and a minimum at division time, so the total weight increase, macromolecules plus precursors, remains linear. This linear growth pattern is explained by the constancy of uptake during the cell cycle, the proteins responsible for consumption (periplasmic binding-proteins and membrane-bound proteins) being synthesized only near division time (reviewed in Kubitschek, 1990). The linear biomass increase and the constant substrate consumption-rate for the whole culture are consistent with our observations during the pulse experiments. Therefore, pulsing the culture with the limiting factor appears to induce a coordinated behaviour of the cell population. In *A. autotrophicum*, cell numbers are poorly correlated to biomass parameters during transient growth, which is not surprising for an elongated organism subject to variation in cell length. Thus we could not introduce with sufficient accuracy the cell numbers as a parameter for a short (2 h) period. Even if our results cannot be used as experimental evidence for Kubitschek's model, this model does allow prediction of biomass behaviour consistent with our observations.

Role of PHB

The role traditionally attributed to PHB is that of a reserve material, which is synthesized during growth limited by a non-carbon compound (reviewed in Ander-

son & Dawes, 1990). Senior & Dawes (1971) have also proposed that PHB can be viewed as a sink of reducing power. However, it has to be pointed out that during our pulse experiments, PHB was shown to be synthesized, although in small amounts, under a complete lack of exogenous limitation. This accumulation was apparently linear (Fig. 2). Such behaviour has to be considered in the light of other similar delimitation experiments. I. W. Smith *et al.* (1954) showed that *Klebsiella aerogenes* transferred from a phosphate-limiting to a non-limiting medium transiently synthesized polyphosphate inclusions. With a glucose-limited continuous culture of the same organism, Harisson & Maitra (1969) showed that a pulse of glucose causes a transient excretion of pyruvate and another unidentified substance. Moreover, one of their figures presents a transient linear excess production of CO_2 and slightly positively curved glucose disappearance kinetics; a linear growth pattern can be suspected from these data. A methanol pulse on a methanol-limited continuous culture of a thermophilic *Bacillus* strain resulted in a rapid excretion of formaldehyde into the medium (Brooke *et al.*, 1989); despite the subsequent autopoisoning of the cells, formaldehyde accumulation appeared strikingly linear. Excretion or accumulation of 'byproducts' (polyphosphate, pyruvate, formaldehyde or PHB) during unbalanced growth is certainly of major importance for actual survival, because the cells are temporarily incapable of metabolizing all the consumed substrate. Importance of overflow metabolism for cell survival can be compared with the need for efficient uptake-regulation in yeasts: with a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for maltose uptake-regulation, Entian & Loureiro-Dias (1990) showed that a maltose pulse results in cell autopoisoning caused by intracellular glucose accumulation. The fact that exponential growth metabolism cannot be achieved instantaneously by a previously slow-growing culture is underlined here by the governing role of dilution rate in culture conditioning (Fig. 5). Many different hypotheses can be formulated in order to identify the nature of the bottleneck involved, ribosome concentration or nitrogen-uptake regulation, for example, admitting such a bottleneck really does exist. But more generally, as the macromolecular composition depends on the growth rate (discussed by Esener *et al.*, 1982, and Wanner & Egli, 1990), a certain lag-time is undoubtedly necessary to adapt the macromolecular composition to the new environmental and growth conditions.

A. autotrophicum temporarily 'wastes' the over-consumed substrate by synthesizing PHB, which could be considered as a sink protecting the cell against a transient metabolic overflow. The classical role of PHB as a 'strategic' reserve for future survival remains of first ecological significance, but it is secondary for actual cell survival.

The research reported here was supported by grant 3.645-87 of the Swiss National Science Foundation. We are grateful to Monica Fischer and Catherine Fischer who corrected the manuscript and to Sebastien David for his technical assistance.

References

ANDERSON, A. J. & DAWES, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalcanoates. *Microbiological Reviews* **54**, 450–472.

ARAGNO, M. & SCHLEGEL, H. G. (1978*a*). *Aquaspirillum autotrophicum*, a new species of hydrogen-oxidizing, facultatively autotrophic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**, 112–116.

ARAGNO, M. & SCHLEGEL, H. G. (1978*b*). Physiological characterization of the hydrogen bacteria *Aquaspirillum autotrophicum*. *Archives of Microbiology* **116**, 221–229.

ARAGNO, M. & SCHLEGEL, H. G. (1981). The hydrogen-oxidizing bacteria. In *The Prokaryotes: a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, pp. 865–893. Edited by M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows & H. G. Schlegel. Berlin/Heidelberg/New York: Springer-Verlag.

BEFFA, T., PEZET, R. & TURIAN, G. (1988). Endogenous elemental sulfur production from L-cysteine in dormant α-spore of *Phomopsis viticola*. *Current Microbiology* **17**, 259–263.

BROOKE, A. G., WATLING, E. M., ATTWOOD, M. M. & TEMPEST, D. W. (1989). Environmental control of metabolic fluxes in thermotolerant methylotrophic *Bacillus* strains. *Archives of Microbiology* **151**, 268–273.

CLARK, J. E., BEEGEN, H. & WOOD, H. G. (1986). Isolation of intact chains of polyphosphate from "*Propionibacterium shermanii*" grown on glucose or lactate. *Journal of Bacteriology* **168**, 1212–1219.

CZOK, R. & LAMPRECHT, W. (1974). Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 3, pp. 1446–1451. Edited by H. U. Bergmeyer. New York: Academic Press.

ECKER, R. E. & KOKAISL, G. (1969). Synthesis of protein, ribonucleic acid, and ribosomes by individual bacterial cells in balanced growth. *Journal of Bacteriology* **3**, 1219–1226.

ENTIAN, K.-D. & LOUREIRO-DIAS, M. C. (1990). Misregulation of maltose uptake in a glucose repression defective mutant of *Soccharomyces cerevisiae* leads to glucose poisoning. *Journal of General Microbiology* **136**, 855–860.

ESENER, A. A., VEERMAN, T., ROELS, J. A. & KOSSEN, N. W. F. (1982). Modeling of bacterial growth; formulation and evaluation of a structured model. *Biotechnology and Bioengineering* **24**, 1749–1764.

ESENER, A. A., ROELS J. A. & KOSSEN, N. W. F. (1983). Theory and applications of unstructured growth models: kinetic and energetics aspects. *Biotechnology and Bioengineering* **25**, 2803–2841.

FASNACHT, M. (1988). *Étude physiologique de la mixotrophie chez l'hydrogénobacterie Aquaspirillum autotrophicum*. PhD thesis, Université de Neuchâtel, Switzerland.

HARISSON, D. E. F. & MAITRA, P. K. (1969). Control of respiration and metabolism in growing *Klebsiella aerogenes*: the role of adenine nucleotides. *Biochemical Journal* **112**, 647–656.

KUBITSCHEK, H. E. (1990). Cell growth and abrupt doubling of membrane proteins in *Escherichia coli* during the division cycle. *Journal of General Microbiology* **136**, 599–606.

KUBITSCHEK, H. E. & PAI, S. R. (1988). Variation in precursor pool size during the division cycle of *Escherichia coli*: further evidence for linear cell growth. *Journal of Bacteriology* **170**, 431–435.

LAW, J. H. & SLEPECKY, R. A. (1961). Assay of poly-β-hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology* **82**, 33–36.

PIRT, S. J. (1965). The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proceeding of the Royal Society London* **163B**, 224–231.

POINDEXTER, J. S. & ELEY, L. F. (1983). Combined procedure for assay of poly-β-hydroxybutyric acid and inorganic polyphosphate. *Journal of Microbiological Methods* **1**, 1–17.

ROBINSON, J. & COOPER, J. M. (1970). Method of determining oxygen concentration in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Analytical Biochemistry* **33**, 390–399.

SCHLEGEL, H. G., KALTWASSER, H. & GOTTSCHALK, G. (1961). Ein submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bacterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Archives of Microbiology* **38**, 209–222.

SENIOR, P. J. & DAWES, E. A. (1971). Poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal* **125**, 55–66.

SMITH, I. W., WILKINSON, J. F. & DUGUID, J. P. (1954). Volutin production in *Aerobacter aerogenes* due to nutrient imbalance. *Journal of Bacteriology* **68**, 450–463.

SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analyticol Biochemistry* **150**, 76–85.

WALTER-MAURUSCHAT, A., ARAGNO, M., MAYER, M. & SCHLEGEL, H. G. (1977). Micromorphology of Gram-negative hydrogen bacteria. II. Cell envelope, membranes and cytoplasmic inclusions. *Archives of Microbiology* **114**, 101–110.

WANNER, U. & EGLI, T. (1990). Dynamics of microbial growth and cell composition in batch culture. *FEMS Microbiology Reviews* **75**, 19–44.

ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. (1974). Spectrophotometric assay of long-chain unsaturated and hydroxy fatty acids in concentrated sulfuric acid. *Analytical Biochemistry* **58**, 146–154.

Antonie van Leeuwenhoek 68: 181–189, 1995.
© 1995 *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.*

The relationship between kinetics of substrate-limited transitions and steady-state growth in continuous cultures of *Aquaspirillum autotrophicum* limited by pyruvate

Marco Pagni*, Louis Egger & Michel Aragno
*Laboratoire de Microbiologie, Rue Emile-Argand 11, 2007 Neuchâtel, Switzerland; *Corresponding author's present address: Institut de Génétique et de Biologie Microbiennes, Rue César-Roux 19, 1007 Lausanne, Switzerland*

Received 8 November 1994; accepted 2 March 1995

Key words: Aquaspirillum, growth kinetics

Abstract

Heterotrophic growth at steady state and during transient states caused by the sudden change of the concentration of the limiting factor in the feed medium was investigated experimentally for continuous cultures of *Aquaspirillum autotrophicum* limited by pyruvate. A model for describing the growth at steady state was selected from three unstructured models after statistical tests of the data. This model postulates that the growth yield increases linearly with the growth rate. Growth during transitions where the substrate remained limiting at all times was fitted with first-order kinetics. Theoretical predictions of these kinetics were derived from the unstructured models used to describe steady state. The predicted rate coefficients of the transients were compared to the experimental coefficients. It appeared that the model which best described steady-state growth also provided the best predictions for growth during the transient state. It is a widespread opinion that unstructured models are adequate to describe growth under steady-state conditions but not to predict transitions in continuous culture. However, for the particular case studied here, no higher degree of complexity was required to describe transitions, provided the growth of the culture was always limited by the substrate.

Introduction

A description of microbial growth in a changing environment is important both from the ecological and from the physiological point of view, because growth in natural environments consists of a succession of transients (Münster 1993) and most microorganisms are probably adapted to these fluctuating conditions. Quantitative investigation of transient growth dates back to the sixties (Mateles et al. 1965; Storer & Gaudy 1969), but the subject attracted only sporadic interest, because of technical and theoretical difficulties. The rather recent development of automatic data acquisition is now allowing more reliable pictures of transient kinetics to emerge (Strässle et al. 1989). Nevertheless, the mathematical description of transient kinetics remains difficult, because it most often involves a system of nonlinear differential equations. Their solutions for transient states are generally not analytical but numerical. We believe that this lack of analytical solutions is a severe "limiting factor" to the understanding of transient growth conditions in microbial populations.

The difficulty in modeling transitions was often regarded as a consequence of the bacteria's growth physiology, which was thought to be more complex during transitions than during growth at a constant rate. According to this view, transient kinetics ought to account for details of metabolic regulation as well as for the interactions between major cellular components. Consequently, many authors have claimed that models with unstructured biomass were suitable only for the description of steady-state data and not for the prediction of transient behaviors (Esener et al. 1983, Ataai & Schuler 1985, Chu & Papoutsakis 1987, van Dam & Jansen 1991). This raises the question

of how much the actual transition kinetics differ from kinetics deduced theoretically from the sole knowledge of steady states. In this article we attempt to answer this question for *Aquaspirillum autotrophicum* growing under pyruvate limitation, during the transitions caused by the sudden change of the concentration of pyruvate in the feed medium. However, only transitions where the substrate always remained limiting were considered. The behavior of *A. autotrophicum* when suddenly de-limited have already been exposed elsewhere (Pagni et al. 1992).

A. autotrophicum, a facultative hydrogen-oxidizing bacterium, was isolated from the water of a small lake (Aragno & Schlegel, 1978a & b). Its maximum growth rate in heterotrophic minimal medium is about 0.3 h^{-1}. It excretes only negligible amounts of metabolites, polysaccharides or proteins, and does not stick to culture vessels. It is therefore a valuable organism for the study of growth kinetics in homogeneous culture. *A. autotrophicum* belongs to a group of freshwater bacteria less frequently studied than fast growing copiotrophs *e.g. Enterobacteriaceae* or *Bacillus* so the choice of this organism may provide a new insight on the various growth strategies of bacteria.

Theory

Substrate consumption

In continuous culture, substrate kinetics S(t) can be described according to Monod (1950)

$$\frac{dS}{dt} = (S_f - S)D - qX \qquad (1)$$

where S_f is the constant substrate concentration in the feed medium [mole · l^{-1}], D the constant dilution rate [h^{-1}], q the specific consumption rate [mole · g^{-1} · h^{-1}] and X the biomass density [g · l^{-1}]. At steady state dS/dt = 0, and the consumption rate is

$$q = \frac{(S_f - S)D}{X}. \qquad (2)$$

But the consumption rate can also be estimated with

$$q \simeq \frac{S_f D}{X} \qquad (3)$$

provided S is sufficiently small compared with S_f. It should be kept in mind that S is difficult to determine accurately in practice, excepted when particular experimental conditions are chosen involving low S_f (Rutgers et al. 1990, Egli et al. 1993). For a non-toxic substrate, conditions for using (3) are satisfied when (i), S_f is of several orders of magnitude greater than K_S (the apparent whole-cell substrate affinity) and (ii), the dilution rate is not close to the washout rate.

Equation (3) is also applicable during transitions in continuous culture, as long as S remains several orders of magnitude smaller than S_f. The theoretical justification of this assumption comes from the possible time-scaling of the transient processes in continuous culture, as analyzed by Minkevich & Utkina (1979). This allows to derive equation (3) from (1) under a quasi steady-state hypothesis, similar in many respects to the derivation of the Michaelis-Menten equation for enzyme kinetics (Heineken et al. 1967, Reich & Sel'kov 1974).

Biomass growth

Kinetics of the biomass in continuous culture are solutions of the differential equation

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D)X \qquad (4)$$

where μ is the specific growth rate [h^{-1}]. When the limiting substrate is the energy source, a possible relationship relating the growth rate to the consumption rate, usually written according to Pirt (1965), is

$$q = m + \frac{\mu}{Y_{max}} \qquad (5)$$

where the constant m is called the maintenance coefficient and Y_{max} the true growth yield. This particular growth model will be referred to as QLIN.

It has been proposed that the maintenance coefficient is not constant but dependent on growth rate (Neijssel & Tempest 1976a, Pirt 1982). Because a single set of growth-rate/consumption-rate data will be considered below, a maintenance term linearly dependent on growth rate cannot be envisaged. This contribution to maintenance is possibly already included in the "true" growth yield. In turn, nonlinear dependence of maintenance on growth rate may be envisaged, for example with the addition of a quadratic term to Pirt's relationship. Accordingly, a possible generalization of QLIN is a second degree polynomial

$$q = m + \frac{\mu}{Y_{max}} + A\mu^2 \qquad (6)$$

where A is the additional parameter. This particular growth model will be referred to as QQUAD.

A growth model that does not result from the addition of one or more extra terms to Pirt's relationship (5) was considered by Hempfling and Vishniac (1967), and later by Kuenen (1979). These authors studied thiosulfate-limited chemostat cultures of *Thiobacillus versutus* (formerly *Thiobacillus* A2) and came to the conclusion that the variation of the yield Y [g · mole^{-1}] with growth rate was conveniently described with

$$Y = Y_0 + Z\mu, \tag{7}$$

where the coefficient Y_0 is a yield extrapolated to zero growth rate and Z is a slope coefficient. As $\mu = qY$, this implies

$$\mu = \frac{Y_0 q}{1 - Zq}. \tag{8}$$

This model will be referred to as YLIN. It comprises two parameters, like QLIN, and YLIN equates QLIN at any growth rates only if

$$m = Z = 0 \tag{9}$$

which implies a constant growth yield.

Material and methods

Aquaspirillum autotrophicum strain SA32 (DSM 732, ATCC 29984) was precultivated in batch culture in a minimal mineral medium (Aragno & Schlegel 1991) with 0.5% sodium pyruvate added. The feed medium of the continuous cultures was the same mineral medium with sodium pyruvate at final concentrations of 8 or 12 mM respectively. Continuous cultures were made in six home-made fermentors running in parallel. Inoculum, feed medium, gas composition (air) and temperature control at 28 °C were common to all fermentors, which differed only by their dilution rates. When cultures had reached steady state, the pyruvate concentration in the feed was switched from 8 to 12 mM, which caused up-transitions, or from 12 to 8 mM, which caused down-transitions. The transitions were followed until new steady states were reached in all vessels.

Optical density (OD) at 436 nm was measured automatically every 8 minutes in the overflow of each fermentor with a PU8620 Philips spectrophotometer and a HELMA 170.004-QS flow-cell with a 2 mm optical path. The baseline drift of the spectrophotometer was monitored every 8 min and the measurements corrected accordingly.

Culture supernatant was prepared by centrifuging the culture samples for 10 min at 8'000 g. Dry weight (DW), proteins, pyruvate, and poly(ß-hydroxybutyrate) were assayed as described before (Pagni et al. 1992). Affinity for pyruvate was estimated with a Clark-type electrode following the method used by Pronk et al. (1990). Elemental composition was determined with a CHN EA1108-Elemental analyzer (Carlo Erba Instruments); a 5% ash content was assumed in the calculation (Cordier et al. 1987). Dissolved organic carbon in the supernatant was estimated with a Xertex Dohrmann DC-180 analyzer.

Equations were fitted to experimental data with the NLIN procedure of the SAS statistical software package for VAX computers. The program allowed the computation of the standard errors of the parameter estimates and of the 95% confidence limits of the mean predicted values. For discrimination between competing models an F-test was used (Robinson 1985; Zwietering et al. 1990).

Results

Description of the experimental steady states

Steady states were observed at dilution rates ranging from 0.057 to 0.292 h^{-1}, between 18 and 91% of the non-limited exponential specific growth rate. Lower dilution rates were not considered because the substrate addition would then become dropwise (Neijssel & Tempest 1976b). For each dilution rate steady states were established twice with 8 mM pyruvate in the feed medium and twice with 12 mM. Pyruvate was never detectable in the supernatant with the enzymatic assay used ($< 3\mu$M). Other evidence that pyruvate was the sole limiting factor in our culture conditions has been listed elsewhere (Pagni et al. 1992). The affinity constant for pyruvate was estimated to be in the μM range.

At all dilution rates the elemental composition of the biomass was $CH_{1.9}O_{0.42}N_{0.24}$ and it did not change with the growth rate. This composition is similar to that reported for other bacteria (Cordier et al. 1987). The protein content decreased with the dilution rate from 62% DW at D = 0.057h^{-1} to 52% DW at D = 0.292h^{-1}. No poly(ß-hydroxybutyrate) was ever detected in the cells (< 0.1%DW). At all dilution rates tested, less than 1% of the total protein in the culture was detected in the supernatant and less than 2% of the organic car-

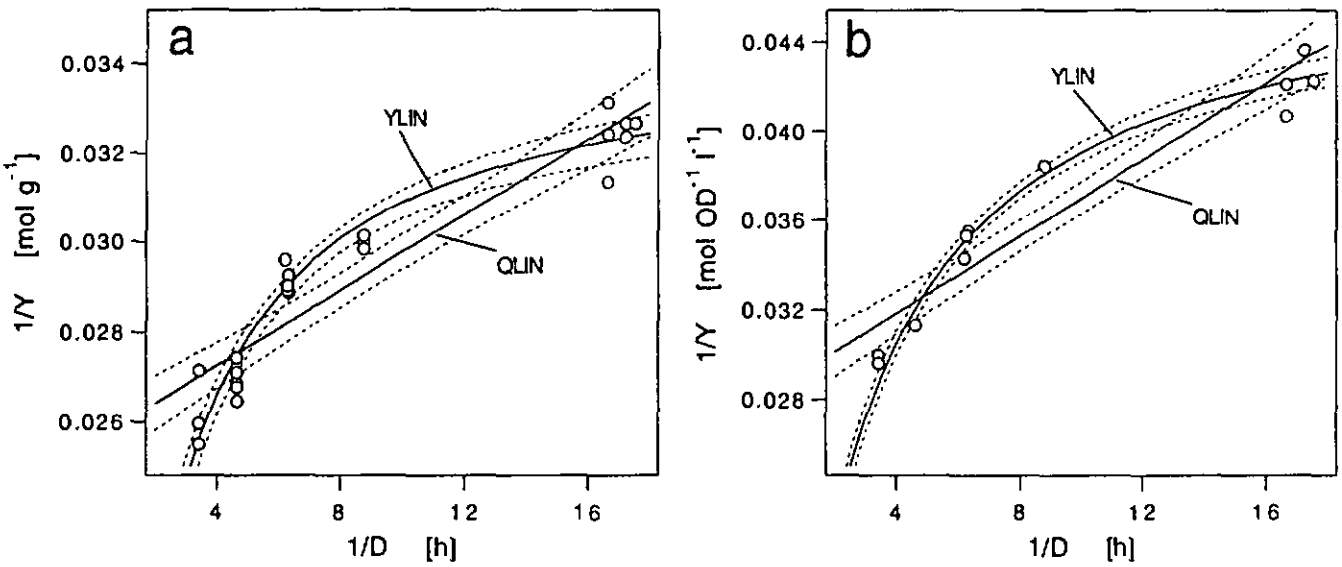


Fig. 1. Inverse of the growth yield at steady-state, as a function of the inverse of the dilution rate. Yields were calculated with DW ($g \cdot l^{-1}$) for biomass (a), and with OD (436nm, 2mm optical path) for biomass (b). Experimental data (o), fitted with the equations for models QLIN and YLIN in the (1/D;1/Y) plane (Table 1) (—), and the 95% confidence limits of their mean expected values (· · ·).

Table 1. The nine equations used to fit the steady-state data. They correspond to the three models considered and to the three representation of the data

Growth model	Representation of the data (D;q)	(D;Y)	$(\frac{1}{D};\frac{1}{Y})$
QLIN	$q = m + \frac{D}{Y_{max}}$	$Y = \frac{Y_{max} D}{Y_{max} m + D}$	$\{\frac{1}{Y}\} = m\{\frac{1}{D}\} + \frac{1}{Y_{max}}$
QQUAD	$q = m + \frac{D}{Y_{max}} + AD^2$	$Y = \frac{Y_{max} D}{Y_{max} m + D + Y_{max} AD^2}$	$\{\frac{1}{Y}\} = m\{\frac{1}{D}\} + \frac{1}{Y_{max}} + \frac{A}{\{\frac{1}{D}\}}$
YLIN	$q = \frac{D}{Y_0 + ZD}$	$Y = Y_0 + ZD$	$\{\frac{1}{Y}\} = \frac{\{\frac{1}{D}\}}{Y_0\{\frac{1}{D}\} + Z}$

bon from pyruvate was retrieved as dissolved organic carbon in the supernatant.

To choose a model that describes the growth at steady state, the experimental data were presented in the planes (D;q), (D;Y) or (1/D;1/Y). Nine equations (Table 1) corresponding to the three growth models (QLIN, QQUAD and YLIN) and rewritten to conform to the three planes were used to fit the data. Steady-state biomass was measured as DW as well as OD. Because the ratio of OD to DW slightly increased with the dilution rate, the procedure of model identification was duplicated. The results are given in Table 2. For a given biomass unit, the values obtained for Y_{max} and Y_0 are quite independent of the data representation. In contrast, the values obtained for m were the most affected by the representation chosen. The residual squares sum of YLIN was smaller than that of QLIN in all cases. With two exceptions, the residual squares sum of QQUAD were the smallest. This could be expected since model QQUAD contains an extra parameter. The hypothesis that the reduction of the residual squares sum is significant was tested using the F-test at a 5% level of statistical significance. The hypothesis was accepted for QLIN compared to QQUAD (f_{QLIN}, Table 2), but was rejected when YLIN was compared to QQUAD (f_{YLIN}, Table 2). Thus, the description with YLIN appears the most adequate for the data available, making the description with QQUAD unnecessarily complex.

Figure 1 presents the plane (1/D;1/Y), where QLIN and YLIN differ the most according to the F-test. The 95% confidence limits of the mean predicted values of

Table 2. Results of the steady-state analysis. The data from 22 steady-states established independently have been fitted with the nine equations of Table 1, with both DW or OD for biomass.

A. Biomass as DW ($g \cdot l^{-1}$)

	parameter estimated value[1] ± standard error[2]				residual squares sum			F-test[3]	
	Y_{max}	m	Y_0	Z					
data plane	$g \cdot mol^{-1}$	$mmol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	$g \cdot mol^{-1}$	$g \cdot h \cdot mol^{-1}$	QLIN	YLIN	QQUAD	f_{QLIN}	f_{YLIN}
(D;q)	40.6 ± 0.6	0.55 ± 0.07	29.8 ± 0.6	30.1 ± 2.9	$4.13 \cdot 10^{-7}$	$2.95 \cdot 10^{-7}$	$2.65 \cdot 10^{-7}$	10.6	2.1
(D;Y)	39.4 ± 0.6	0.44 ± 0.04	29.1 ± 0.4	33.7 ± 2.1	22.1	11.7	10.4	21.2	2.3
(1/D;1/Y)	39.1 ± 0.5	0.42 ± 0.03	28.9 ± 0.3	34.7 ± 2.0	$1.43 \cdot 10^{-5}$	$7.34 \cdot 10^{-6}$	$6.59 \cdot 10^{-6}$	22.2	2.2

B. Biomass as OD_{436} (2mm optical path)

	parameter estimated value ± standard error				residual squares sum			F-test	
	Y_{max}	m	Y_0	Z					
data plane	$OD \cdot l \cdot mol^{-1}$	$mmol \cdot OO^{-1} \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$	$OD \cdot l \cdot mol^{-1}$	$OD \cdot l \cdot h \cdot mol^{-1}$	QLIN	YLIN	QQUAD	f_{QLIN}	f_{YLIN}
(D;q)	37.8 ± 0.8	1.13 ± 0.10	21.5 ± 0.5	43.9 ± 2.3	$9.00 \cdot 10^{-7}$	$3.90 \cdot 10^{-7}$	$3.54 \cdot 10^{-7}$	29.3	1.9
(D;Y)	36.2 ± 0.8	0.96 ± 0.08	21.0 ± 0.3	46.4 ± 1.9	31.15	9.37	9.84	41.8	−0.9
(1/D;1/Y)	35.2 ± 0.8	0.86 ± 0.06	20.8 ± 0.3	47.9 ± 1.8	$4.98 \cdot 10^{-5}$	$1.28 \cdot 10^{-5}$	$1.49 \cdot 10^{-5}$	44.5	−2.6

[1] values obtained for model QQUAD are not reported.
[2] standard errors are approximate for models nonlinear in parameters.
[3] the residual squares sum of QLIN and YLIN have been compared to the residual squares sum of QQUAD; the table F-value is 4.38 at a 5% level of statistical significance.

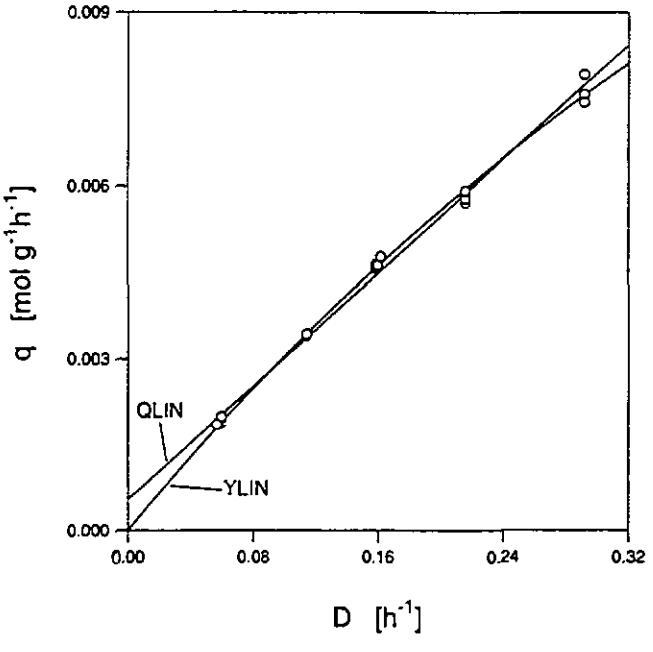


Fig. 2. Specific consumption rate at steady-state, calculated with DW for biomass. Experimental data (o), fitted with the equations for QLIN (Pirt's relationship) and YLIN in the (D;q) plane (Table 1) (—). The models are almost impossible to discriminate with this representation of the data.

both models are plotted. Most data points are contained within the confidence limits of YLIN. The plane (D;q) with biomass as DW is presented in Figure 2, where the models are almost impossible to discriminate even though the description with YLIN was somewhat better (Table 2). Moreover, with this representation, the 95% confidence limits of both equations widely overlapped at all dilution rates tested (not shown).

Description of continuously-limited transitions

Figure 3 shows six examples of transitions resulting from a sudden decrease of the pyruvate concentration in the feed from 12 to 8 mM (down-transition), or from a sudden increase from 8 to 12 mM (up-transition). The decrease or the increase of the biomass began as soon as the culture conditions were modified: no lag was observed at any dilution rate.

All down-transitions were continuously limited by pyruvate. Similarly, all up-transitions obtained at dilution rates smaller than 0.16 h^{-1}, were most probably limited by pyruvate at all times. Limitation by pyruvate was indicated by the following observations: (i) pyruvate was never detected in the supernatant; (ii) the consumption rates estimated by (3) at startup of the transition always remained smaller than the maximal (potential) consumption rate of the suddenly saturated uptake-system (8.75 mM · OD^{-1} · h^{-1}, OD_{436} and 2mm optical path; Pagni et al. 1992); (iii) poly(ß-hydroxybutyrate) was never detected in the biomass

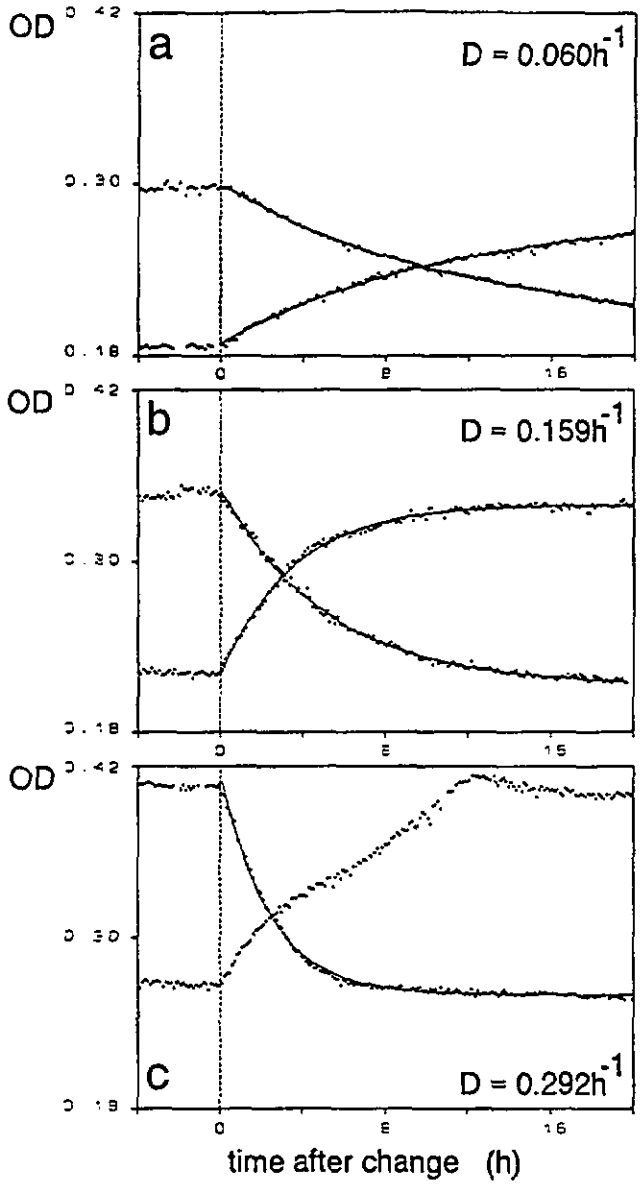


Fig. 3. Up-transitions provoked by the replacement of a 8mM pyruvate feed medium by a 12mM feed medium, and down-transitions provoked by the reverse replacement, at three different dilution rates. Experimental OD (436nm, 2mm optical path) (•), fitted with first order kinetics (eq. 10) (—). The substrate was continuously limiting during these transitions with the noticeable exception of the up-transition at $D = 0.292h^{-1}$ presented for comparison (Fig. 4c).

(transient accumulation of this polymer is a sign for a sudden relief from the limitation by pyruvate in *A. autotrophicum*; Pagni et al. 1992). Conversely, during up-transitions at dilution rates higher than $0.16\,h^{-1}$, the limitation was temporarily suppressed: pyruvate was detected in the supernatant up to 600 μM; about 2% DW poly(ß-hydroxybutyrate) was measured 3 hours after change; the patterns observed for the biomass increases were distinctly different (see Fig. 3c).

Preliminary investigations on the kinetics of the continuously-limited transitions revealed that they could be fitted with "first-order kinetics"

$$\frac{dX}{dt} = -R(X - X_\infty) \quad \text{or } X(t) = X_\infty + (X_0 - X_\infty)e^{Rt} \tag{10}$$

where $X_0 = X(0)$ is the initial biomass, X_∞ the final biomass approached asymptotically and R a rate coefficient [h^{-1}]. Figure 3 shows examples of this model fitted to the experimental data. The residuals were randomly distributed in most cases. Unexpectedly, an empirical relationship with a single parameter R characterizing the transient regime can model any transition from the set of fourteen that were retained as continuously-limited.

Prediction of continuously-limited transitions

In the QLIN model (5), the consumption rate was replaced by its approximation for substrate-limited growth $q = S_fD/X$ (3), therefore, the biomass during transitions must satisfy

$$\frac{dX}{dt} = Y_{max}S_fD - (Y_{max}m + D)X, \tag{11}$$

which admits the solution

$$X(t) = X_\infty + (X_0 - X_\infty)e^{-R_{QLIN}t} \tag{12}$$

where

$$X_\infty = \frac{Y_{max}S_fD}{Y_{max}m + D} \text{ and } R_{QLIN} = Y_{max}m + D. \tag{13}$$

The form of this equation is similar to that of equation (10). The rate coefficient predicted, R_{QLIN}, is a linear, non-proportional function of the dilution rate.

The approximation of the consumption rate (3) was substituted into YLIN (8), and the equation for biomass was rewritten as

$$\frac{dX}{dt} = \frac{Y_0S_fDX}{X - ZS_fD} - DX. \tag{14}$$

After integrating this equation, its solution must satisfy

$$\left(\frac{X(t)}{X_0}\right)^{\frac{ZD}{Y_0}}\left(\frac{X(t) - X_\infty}{X_0 - X_\infty}\right) = e^{-\left(D + \frac{ZD^2}{Y_0}\right)t} \tag{15}$$

with

$$X_\infty = (Y_0 + ZD)S_f. \tag{16}$$

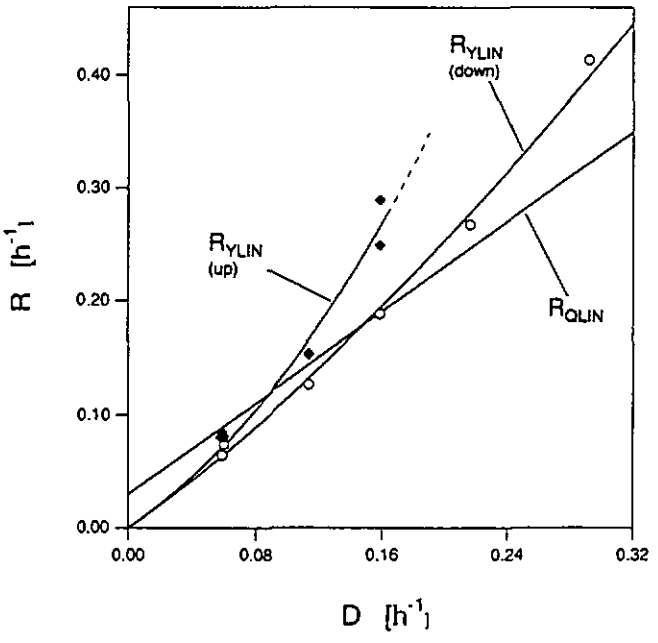


Fig. 4. Rate coefficients of transitions plotted as a function of the dilution rate. Rates obtained from eight experimental up-transitions (♦) and six down-transitions (o) through fitting with first order kinetics (eq.10); predictions of these rates from the models QLIN (R_{QLIN}, eq.13) and YLIN (R_{YLIN} with X_0/X_∞ = 8/12 for up-transition and X_0/X_∞ = 12/8 down-transition, eq.21), computed with parameter values taken from steady-states analysis.

This implicit solution does not correspond to the first order kinetics (10) proposed to describe transitions. But within the range of experimental conditions investigated here, computed explicit solutions of (15) resembled first-order kinetics: the discrepancy between numerical solutions of (15) and first-order kinetics (10) fitted to them were far lower than the actual experimental precision. This suggests that if (15) provides the appropriate description of the transitions, then they must be adjustable with (10) as well.

That equation (15) implies a first order kinetics can be shown as follows. If the term $(X(t)/X_0)^{ZD/Y_0}$ of (15) is set to 1, the solution simplifies to first order kinetics with rate

$$D + \frac{ZD^2}{Y_0}, \qquad (17)$$

which is a second-degree polynomial in D. It has no constant term whereas R_{QLIN} does. A better approximation was found when the term $(X(t)/X_0)^{ZD/Y_0}$ of (15) was rewritten

$$e^{\frac{ZD}{Y_0}(\ln(X(t))-\ln(X_0))}, \qquad (18)$$

ln(X(t)) was replaced with its Taylor series development at t = 0

$$\ln(X(t)) = \ln(X(0)) + \tfrac{t}{X(0)}\tfrac{dX}{dt}|_{t=0} + \cdots, \qquad (19)$$

where dX/dt at t = 0 is given by (14)

$$\ln(X(t)) = \ln(X_0) + \left(\frac{Y_0 S_f D}{X_0 - Z S_f D} - D\right) t + \ldots . \qquad (20)$$

Substituting (20) simplified to the first order into (18) and the result back into (15) yielded, after some rearrangement, first-order kinetics with rate

$$R_{YLIN} = D + \frac{ZD^2}{(Y_0 + ZD)\dfrac{X_0}{X_\infty} - ZD} \qquad (21)$$

which depends both on D and X_0/X_∞, and simplifies to (17) when X_0/X_∞ is set to 1. The rate coefficient of up-transitions ($X_0/X_\infty < 1$) is greater than the one of down-transitions ($X_0/X_\infty > 1$) at any fixed dilution rate.

Figure 4 presents the 14 experimental rates, as well as the predictions R_{QLIN} (13) and R_{YLIN} (21) computed using the parameter values from Table 2, plane (1/D;1/Y) and OD as biomass. It is important to note that these predictions were not fitted to the experimental R, but deduced from the steady-state description. At low dilution rates, all the experimental R are lower than the prediction R_{QLIN} and at high dilution rates they are all above it. Moreover, all experimental R of up-transitions are greater than those of down-transitions at the corresponding dilution rates. The prediction R_{QLIN} is thus obviously incorrect. In return, prediction R_{YLIN} (21) is acceptable, qualitatively as well as quantitatively, for the whole set of transitions.

Discussion

The steady-state data were fitted with different models linking the consumption rate to the growth rate. The model best adapted to our experimental data was selected considering the distribution of the residuals, the result of an F-test and the reliability of the picture provided with both OD and DW as biomass. According to this model, the growth yield is a linear non-proportional function of the growth rate (referred to

as the YLIN model), that appears clearly superior to Pirt's relationship for the available data (model QLIN). Biomass kinetics during continuously-limited transitions were empirically modeled as first-order kinetics, a rate coefficient R was thus associated to each experimental transition. Predictions of R from models QLIN and YLIN were constructed theoretically, postulating that the relationship linking the consumption rate to the growth rate remained valid during transient states. These predictions differed qualitatively. With QLIN, R is a linear non-proportional function of D, identical for up and down-transitions for any fixed D, whereas with YLIN, R is a quadratic function of D in first approximation, and R is greater for up-transitions than for down-transitions for any fixed D. The experimental R were compared with the predictions from both models computed with the parameter values determined at steady state. Model YLIN gave satisfactory predictions of the transitions investigated, both qualitatively and quantitatively. Thus, model YLIN appeared adequate to describe both steady states and the transient states investigated. No further information was needed to account for the transient dynamics.

The representation of the steady-state data in the (D;q) plane with biomass as DW has often been used. In our particular case, it was the least discriminating representation of data on which to test the models. If our treatment of the data had been limited to this plane, a growth model other than QLIN would probably not have been considered and a different conclusion would have been reached.

Our results are in contradiction with the widespread opinion that transient kinetics cannot be deduced exclusively from steady-state information and using an unstructured model. We must however point out that our investigations were restricted to transitions with an identical initial and final physiological state of the culture, no new biochemical pathway had to be induced. Moreover, the organism we chose excretes only negligible amounts of organic carbon and we only considered transitions where the substrate was continuously limiting. We have presented elsewhere some unusual aspects of the non-limited growth of *A. autotrophicum* (Pagni et al. 1992), that demonstrate the governing influence of the physiological state of the culture on its behavior at start-up of a suddenly non-limited transition. Thus, it has already been recognized that the non-limited transient growth of *A. autotrophicum* cannot be described with unstructured models at all.

During growth on very high extracellular substrate concentration, intracellular metabolic steps may become growth limiting; during growth on very low concentrations, the flux of carbon sources through the transport systems automatically limits growth rate (Lengeler 1993). In the latter case, diffusion of the substrate in the environment surrounding the cell may become the (abiotic) growth-limiting factor (Koch & Wang 1982). However, following Monod (1942), the growth rate was introduced as a function of the substrate concentration in many growth models, thus obscuring the distinction between consumption, which depends on substrate concentration, and growth, which depends on the flow of substrate into the biomass. A different point of view was adopted by Blackman (1905) when he postulated a clear distinction between growth limited by the substrate and non-limited growth. According to this view, Dabes et al. (1973) wrote:

> the maximum growth rate is not just some fictional condition approached asymptotically at high substrate concentrations. Rather, there exist two distinct regimes; one in which external substrate level limits μ, and another in which the level of some internal pacemaker enzyme limits μ.

A physiological situation similar to the results reported here is that which cells encounter in a recycling fermentor where the substrate provision rate always limits growth. Accordingly, results paralleling our observations were reported for *Escherichia coli* and *Paracoccus denitrificans*: the yields determined during the first 10 to 30 hours of transient and limited growth in the recycling mode were identical to the yields measured at steady state at comparable growth rates (van Verseveld et al. 1984). Unfortunately reports on transient kinetics of microbial culture in the chemostat seldom mention the status of limitation of the substrate.

Acknowledgements

We are thankful to Dr. Th. Egli of EAWAG for his constructive criticism of the manuscript and to Thomas Junier and Catherine Fisher for their help with the English. This research was supported by the Swiss National Science Foundation, grants 3.645–87 and 31–28597.90.

References

Aragno M & Schlegel HG (1978a) *Aquaspirillum autotrophicum*, a new species of hydrogen-oxidizing, facultatively autotrophic bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 28: 112–116

Aragno M & Schlegel HG (1978b) Physiological characterization of the hydrogen bacterium *Aquaspirillum autotrophicum*. Arch. Microbiol. 116: 221–229

Aragno M & Schlegel HG (1991) The hydrogen-oxidizing (Knallgas) bacteria. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W & Schleifer KH (Ed) The Prokaryotes, a Handbook on Biology of Bacteria, Vol. 1 (pp 344–384). Springer Verlag, New York

Ataai MM & Shuler ML (1985) Simulation of CFSTR through development of a mathematical model for anaerobic growth of *Escherichia coli* cell population. Biotechnol. Bioeng. 27: 1051–1055

Blackman FF (1905) Optima and limiting factors. Annals of Botany 19: 281–295

Chu IM & Papoutsakis T (1987) Growth dynamics of a methylotroph (*Methylomonas* L3) in continuous culture. II. Growth inhibition and comparison against an unstructured model. Biotechnol. Bioeng. 29: 65–71

Cordier J-L, Butsch BM, Birou B & von Stockar U (1987) The relationship between elemental composition and heat of combustion of microbial biomass. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 305–312

Dabes JN, Finn RK & Wilke CR (1973) Equations of substrate-limited growth: the case for Blackmann kinetics. Biotechnol. Bioeng. 15: 1159–1177

van Dam K & Jansen N (1991) Quantification of control of microbial metabolism by substrates and enzymes. Antonie van Leeuwenhoek 60: 209–223

Egli T, Lendenmann U & Snozzi M (1993) Kinetics of microbial growth with mixtures of carbon sources. Antonie van Leeuwenhoek 63: 289–298

Esener AA, Roels JA & Kossen NWF (1983) Theory and applications of unstructured growth models: kinetic and energetic aspects. Biotechnol. Bioeng. 25: 2803–2841

Heineken FG, Tsuchiya HM & Aris R (1967) On the mathematical status of the pseudo-steady state hypothesis of biochemical kinetics. Math. Biosci. 1: 95–113

Hempfling WP & Vishniac W (1967) Yield coefficients of *Thiobacillus neapolitanus* in continuous culture. J. Bacteriol. 93: 874–878

Koch AL & Wang CH (1982) How close to the theoretical diffusion limit do bacterial uptake systems function? Arch. Microbiol. 131: 36–42

Kuenen JG (1979) Growth yields and "maintenance energy requirement" in *Thiobacillus* species under energy limitation. Arch. Microbiol. 122: 183–188

Lengeler JW (1993) Carbohydrate transport in bacteria under environmental conditions, a black box? Antonie van Leeuwenhoek 63: 275–288

Mateles RI, Ryu DY & Yasuda T (1965) Measurement of unsteady-state growth of micro-organisms. Nature 208: 263–265

Minkevich IG & Utkina LI (1979) Time scale in the dynamics of continuous cultivation of microorganisms. Biotechnol. Bioeng. 21: 357–391

Monod J (1942) Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann & Cie., Paris

Monod J (1950) La technique de culture continue, théorie et application. Ann. Inst. Past. 79: 390–410

Münster U (1993) Concentrations and fluxes of organic carbon substrates in the aquatic environment. Antonie van Leeuwenhoek 63: 243–274

Neijssel OM & Tempest DW (1976a) Bioenergetics aspects of aerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC418 in carbon-limited and carbon-sufficient chemostat cultures. Arch. Microbiol. 107: 215–221

Neijssel DM & Tempest DW (1976b) The role of energy-spilling reactions in the growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in aerobic chemostat culture. Arch. Microbiol. 110: 305–311

Pagni M, Beffa T, Isch C & Aragno M (1992) Linear growth and poly(ß-hydroxybutyrate) synthesis in response to pulse-wise addition of the growth-limiting substrate to steady state heterotrophic continuous cultures of *Aquaspirillum autotrophicum*. J. Gen. Microbiol. 138: 429–436

Pirt SJ (1965) The maintenance energy of bacteria in growing cultures. Proc. Roy. Soc. 163B: 224–231

Pirt SJ (1982) Maintenance energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth. Arch. Microbiol. 133: 300–302

Pronk JT, de Bruijn P, van Dijken JP, Bos P & Kuenen JG (1990) Energetics of mixotrophic and autotrophic-C1-metabolism by *Thiobacillus acidophilus*. Arch. Microbiol. 154: 576–583

Reich JG & Sel'kov EE (1974) Mathematical analysis of metabolic networks. FEBS Lett. Suppl. 40: 119–127

Robinson JA (1985) Determining microbial kinetic parameters using nonlinear regression analysis. Adv. Microb. Ecol. 8: 61–114

Rutgers M, Balk PA & van Dam K (1990) Quantification of multiple-substrate controlled growth – simultaneous ammonium and glucose limitation in chemostat cultures of *Klebsiella pneumoniae*. Arch. Microbiol. 153: 478–484

Storer FF & Gaudy AF (1969) Computational analysis of transient response to quantitative shock loadings of heterogeneous populations in continuous culture. Environmental Science & Technology 3: 143–149

Strässle C, Sonnleitner B & Fiechter A (1989) A predictive model for the spontaneous synchronization of *Saccharomyces cerevisiae* grown in continuous culture. II experimental verification. J. Biotechnol. 9: 191–208

van Verseveld HW, Chesbro WR, Braster M & Stouthamer AH (1984) Eubacteria have 3 growth modes keyed to nutrient flow. Consequences for the concept of maintenance and maximal growth yield. Arch. Microbiol. 137: 176–184

Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM & van't Riet K. (1990) Modeling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1875–1881