**I- Etude de la cinétique de la croissance microbienne**

 Les microorganismes sont capables d’effectuer une grande diversité de réactions biochimiques, qui se traduisent par la dégradation, la transformation et/ou la production de substances organiques ou minérales, qui induisent et favorisent la croissance cellulaire. Cette dernière, peut se définir au niveau de l’individu ou au niveau de la population. Au niveau de l’individu, elle se manifeste par l’accroissement de la taille, du volume et de la masse, tandis qu’au niveau de la population, elle se traduit par l’augmentation du nombre d’individus, et ceci, par division cellulaire (multiplication cellulaire).

Lors de la division cellulaire, la cellule croît en volume, puis quand elle atteint une taille suffisante (adulte), elle se divise en deux cellules filles ; les constituants cellulaires seront répartis entre elles, mais les mécanismes de multiplication varient avec les espèces :

* Les bactéries se divisent par ***scissiparité***: après doublement de la masse cellulaire, la bactérie mère donne naissance à deux bactéries filles identiques, le temps moyen entre deux divisions, dit *temps de génération*, variant de 15 à 60 min ;
* Les levuresse divisent par ***bourgeonnement***: une cellule donne naissance à une excroissance qui grossit jusqu’à ce que la séparation entre la cellule mère et la cellule fille intervienne ; le temps de génération varie de 45 à 120 min ;
* Les champignons filamenteuxse multiplient grâce à des excroissances cellulaires apicales donnant lieu à la formation de structures ramifiées, dites *mycéliums*, prenant la forme macroscopique d’agrégats sphériques de 0.1 à 10 mm de diamètre ; le temps de génération varie de 4 à 8 heures.

 Les trois mécanismes précédents respectent la conservation et la transmission du patrimoine génétique des cellules mères aux cellules filles. Il s’agit d’une **division cellulaire asexuée**, qui est la voie prédominante de multiplication chez les microorganismes en phase de croissance.

Le plus souvent pour simplifier, la croissance est assimilée à la multiplication cellulaire conduisant à la synthèse de biomasse bactérienne. La croissance est alors définie par l'augmentation de la biomasse sèche. L'étude de la **croissance bactérienne** consiste en la détermination des paramètres de croissance pour une souche bactérienne donnée.

**I-1 Conditions de croissances**

 Pour assurer sa croissance ou sa survie, une bactérie doit trouver dans son environnement de quoi satisfaire ses besoins nutritifs : besoin en eau, une source d'énergie, une source de carbone, une source d'azote et d'éléments minéraux, permettant à la cellule de réaliser la synthèse de ses constituants élémentaires et/ou ses matériaux constitutifs.

 Ces besoins élémentaires sont suffisants pour permettre la nutrition des bactéries qualifiées de **prototrophes**. Certaines bactéries qualifiées d'**auxotrophes** nécessitent, en plus des besoins élémentaires, la présence de facteurs de croissance.

 À cela s'ajoutent des conditions physico-chimiques qui doivent être assurées (température, pH, composition et proportions des gaz ambiants…etc.).

**I-1.1 Besoins nutritifs des microorganismes**

1. **Besoin en eau**

 L'eau représente 80 à 90 % du poids cellulaire. Elle joue un rôle fondamental en solubilisant les nutriments, en assurant leur transport et en assurant les réactions d'hydrolyse.

 Un paramètre noté Aw (Activity of water, activité de l'eau) quantifie la disponibilité de l'eau.

 Dans un nutriment, une partie de l'eau est plus ou moins liée aux composants (sels, protéines) et elle n'est pas disponible pour les microorganismes qui ont besoin d'eau libre pour se développer. Les bactéries exigent un certain seuil d'humidité et pour des Aw faibles, leur croissance est ralentie.

1. **Source d'énergie**

 Selon la source d'énergie, les bactéries se divisent en **phototrophes** et **chimiotrophes**. La source d'énergie des bactéries phototrophes est la lumière. Les bactéries **chimiotrophes** puisent leur énergie à partir de composés minéraux ou organiques. Si le donneur d'électrons est un composé minéral, les bactéries sont dites **chimiolithotrophes,** mais si le donneur d'électrons est de nature organique, les bactéries sont dites **chimio-organotrophes**.

1. **Sources de carbone**

 Le carbone est l'un des éléments les plus abondants des microorganismes. Les sources de carbone sont très variées et peuvent être minérales ou organiques. Le plus simple des composés est l'anhydride carbonique (CO2), qui peut être utilisé par les bactéries dites **autotrophes** qui sont notamment photo- ou chimiolithotrophes**,** pour la synthèse de certains métabolites essentiels qui feraient intervenir une réaction de carboxylation, sans que la présence de matière organique préformée soit nécessaire à leur croissance. Certaines bactéries sont strictement **autotrophes** et leur croissance peut même être inhibée en présence de matières organiques préformées.

 Pour d'autres bactéries, au contraire, la présence de matières organiques est indispensable à leur croissance : ce sont les bactéries **hétérotrophes**. C'est le cas notamment des bactéries **photo-**et **chimio-organotrophes**. La complexité des substrats organiques indispensables à la croissance de ces bactéries hétérotrophes est variable.

    Le dioxyde de carbone (CO2) est la seule source de carbone pour les bactéries **autotrophes**. Les bactéries **hétérotrophes** utilisent facultativement le dioxyde de carbone. Elles dégradent une grande quantité de substances hydrocarbonées (alcool, acide acétique, acide lactique, polysaccharides et divers sucres).

Le dioxyde de carbone seul ne permet pas la survie des hétérotrophes, mais il joue cependant un rôle important chez ces bactéries. En effet, la croissance de nombreuses espèces bactériennes hétérotrophes est impossible en l'absence de dioxyde de carbone, et une atmosphère enrichie en dioxyde de carbone (un taux de 5 à 10 %) favorise la croissance de certaines espèces comme les ***Brucella*** spp*,* ***Campylobacter*** spp.

Il est à signaler que la liste des substrats carbonés utilisables par une souche bactérienne comme unique source de carbone et d'énergie constitue l**'auxanogramme** de la souche. Les techniques auxanographiques, généralement réalisées en milieu liquide et en utilisant des **microméthodes** (systèmes API20), sont utilisées pour l'identification des souches et pour des enquêtes épidémiologiques. La bactérie à étudier est placée dans un milieu dépourvu de toute source de carbone autre que celle apportée par le nutriment dont on veut étudier l'assimilation. Selon que la bactérie est capable ou non d'assimiler le nutriment qui lui est proposé, on observera une culture (**présence d'un trouble**) ou une absence de culture (**le milieu reste limpide**).

1. **Source d'azote**

 Les bactéries ont besoin de substances azotées pour synthétiser leurs protéines. La provenance de cet azote peut se faire par fixation directe de l'azote atmosphérique ou par incorporation de composés azotés (réactions de désamination et de transamination).

 Les besoins en azote des bactéries sont généralement assurés par les produits de dégradation des substrats organiques sous forme ammoniacale.

 Quelques espèces sont capables de fixer directement l'azote de l'air (N2) ou d'assimiler les nitrates et les nitrites. Pour la majorité des bactéries, au contraire, sont totalement incapables de synthétiser les substances azotées indispensables à leur structure, et leur croissance exige l'apport, dans les milieux de culture, de substrats préformés tels que des acides aminés ou de l’azote organique comme **l’azote** de *corn-steep* (eau de trempage du maïs fermenté) ou lesfarines végétales (soja, coton...), ou bien par d’autres composés inorganiques (ammoniac, sels d'ammonium, nitrites, nitrates).

1. **Éléments minéraux**

Les bactéries ont besoin d'ions minéraux indispensables à leur croissance, les plus importants sont :

* **Le soufre** : Il est présent dans certains acides aminés (cystéine et méthionine), les groupements thiols et les ponts S-S, et également dans les centres (Fe-S) des ferrédoxines et dans certains cofacteurs comme le coenzyme A.

Il est le plus souvent incorporé sous forme de sulfate ou de composés organiques soufrés. Pour certaines bactéries, le soufre doit être apporté sous forme organique (méthionine, cystéine, biotine, thiamine).

* **Le phosphore** : Il est nécessaire en tant que constituant des acides nucléiques, de l'ATP et de nombreuses coenzymes. Le plus souvent est incorporé dans les milieux de croissances, sous forme de phosphate inorganique (minérale) ou organique.

 Certains éléments comme le sodium, le potassium, le magnésium et le chlore jouent un rôle dans l'équilibre physico-chimique de la cellule. D'autres éléments comme le fer, le manganèse, le molybdène, le calcium, le vanadium ou le cobalt sont des oligoéléments nécessaires à des concentrations très faibles.

Dans l'organisme, le fer est lié à la **transferrine** ou à **la lactoferrine** et il n'est pas directement disponible pour les bactéries. Aussi, pour assurer leur multiplication, les bactéries pathogènes ont développé des mécanismes leur permettant de capter le fer chélaté à la transferrine et à la lactoferrine.

1. **Facteur de croissance**

 Contrairement aux bactéries prototrophes, les auxotrophes nécessitent, en plus d'une source d'eau, d'énergie, de carbone, d'azote et d'éléments minéraux, un ou plusieurs facteurs de croissance qu'elles sont incapables de synthétiser.

 Un facteur de croissance ne doit pas être confondu avec un métabolite essentiel. Les facteurs de croissance et les métabolites essentiels sont des composés organiques strictement nécessaires à la nutrition. Toutefois, un métabolite essentiel peut être synthétisé par une bactérie alors qu'un facteur de croissance doit être présent dans l'environnement car la bactérie est incapable de le synthétiser.

 Dans un milieu contenant du glucose, une source d'azote et des sels minéraux, une bactérie telle que *Escherichia* *coli* est capable de se multiplier alors que ce n'est pas le cas pour *Proteus* *vulgaris*.

 La croissance de *Proteus* *vulgaris* exige l'adjonction supplémentaire de **nicotinamide**. Cette substance est indispensable pour la croissance de ces deux espèces, mais contrairement à *Proteus* *vulgaris*, *Escherichia* *coli* est capable d'en assurer la synthèse. Le nicotinamide est un métabolite essentiel pour ces deux espèces, mais il n'est un facteur de croissance que pour *Proteus* *vulgaris*. La notion de facteur de croissance est relative à **un genre**, à **une espèce** voire même à **une souche**.

Il est à noter que**,** les facteurs de croissance sont des bases puriques ou pyrimidiques, des acides gras, des acides aminés, des vitamines (coenzymes, précurseurs de coenzymes, groupements prosthétiques de diverses enzymes) ou divers composés comme l'hème et ses dérivés.

 Les besoins quantitatifs en facteurs de croissance sont de l'ordre de 10 µg/mL pour les bases puriques ou pyrimidiques, les acides gras ou les acides aminés et de l'ordre de moins de 1 µg/mL pour les vitamines.

 Les besoins en facteur de croissance peuvent parfois être satisfaits par la présence d'une autre bactérie. Ce mécanisme d'interaction métabolique, qualifié de **syntrophie**, se traduit sur un milieu solide par la présence de colonies satellites (bactérie auxotrophe) se développant au voisinage de la bactérie productrice du facteur de croissance.

La croissance d'une bactérie auxotrophe peut être proportionnelle, dans certaines limites, à la concentration d'un facteur de croissance ce qui permet un dosage des facteurs de croissance par voie microbiologique. Un exemple classique est le dosage microbiologique de la vitamine B12 en utilisant une souche de *Lactobacillus* *leichmannii* ou la souche *Escherichia* *coli* 113, auxotrophes pour la vitamine B12.

 Un anti-métabolite est un analogue structural d'un facteur de croissance, capable d'entrer en compétition avec ce dernier et d'inhiber la croissance d'une souche auxotrophe. Ainsi, le para-aminobenzène sulfanylamide (ou PAS) est une molécule proche de l'acide para-aminobenzoïque (ou PAB) et il peut jouer le rôle d'un anti-métabolite empêchant la croissance des bactéries auxotrophes pour le PAB.

Les différents types nutritionnels ou trophiques des microorganismes sont résumés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau I** : Différents types nutritionnels ou trophiques des microorganismes.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Classe du besoin | Nature du besoin | Type trophique |
| Source d'énergie | Rayonnement lumineux | Phototrophe |
| Oxydation de composés organiques ou inorganiques | Chimiotrophe |
| Donneur d'électrons | Minéral | Lithotrophe |
| Organique | Organotrophe |
| Source de carbone | Composé minéral tel : CO2,  | Autotrophe |
| Composé organique tel les sucres,  | Hétérotrophe |
| Facteurs de croissance | Non nécessaires | Prototrophe |
| Nécessaires | Auxotrophe |

Dans le cas des fermentations industrielles, le choix des nutriments pour une espèce donnée, voire l’adaptation génétique d’une espèce à un nutriment donné, joue un rôle prépondérant dans l’économie du procédé : en effet, le coût du nutriment peut aller jusqu’à 50 % du prix de revient d’une production, même de haute valeur ajoutée (antibiotique par exemple). Il est donc nécessaire de conjuguer faible coût, disponibilité et facilité d’emploi pour les éléments essentiels de la nutrition bactérienne.

**I-1.2 Facteurs physico-chimiques intervenant dans la croissance bactérienne**

 L'utilisation des nutriments par les bactéries dépend des conditions d'environnement susceptibles d'inhiber ou de favoriser le développement bactérien, entre autres :

1. **Effet de l'oxygène**

Il existe plusieurs classes de bactéries en fonction de leurs rapports avec l'oxygène.

* **Les bactéries aérobies** **strictes** ne se développent qu'en présence d'air. Leur source principale d'énergie est la respiration. L'oxygène moléculaire, ultime accepteur d'électrons, est réduit en eau (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Neisseria*).
* **Les bactéries microaérophiles** se développent mieux ou exclusivement lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air (*Campylobacter*, *Mycobacteriaceae*).
* **Les bactéries aéro-anaérobies facultatives** se développent avec ou sans air. C'est le cas de la majorité des bactéries rencontrées en pathologie médicale : les entérobactéries (*Escherichia*, *Salmonella*), les streptocoques, les staphylocoques. L'énergie provient de l'oxydation des substrats et de la voie fermentaire.
* **Les bactéries anaérobies strictes** ne se développent qu'en absence totale ou presque d'oxygène qui est le plus souvent toxique. Ces bactéries doivent se cultiver sous atmosphère réductrice. La totalité de l'énergie est produite par fermentation.
1. **Effet de la température**

Les bactéries peuvent être classées selon leur température optimale de croissance en :

* **Bactéries mésophiles** : leur température de croissance est proche de celle du corps humain (37°C) (Ex. : *Escherichia coli*).
* **Bactéries thermophiles** : leur température de croissance optimale est comprise entre 45°C et 70°C (Ex. : *Thermus aquaticus*).
* **Bactéries hyperthermophiles** : leur température de croissance optimale est supérieure à 80°C (Ex. : *Archaea*).
* **Bactéries psychrophiles** : leur température optimale est proche de 0°C avec un optimum de 10-15°C (Ex. : *Psychrobacter*).
* **Bactéries psychrotrophes** : leur température de croissance est proche de 0°C avec optimum de croissance proche des bactéries mésophiles (Ex. : *Pseudomonas*).

L’effet de la température sur la croissance des bactéries est illustré dans la **figure 1.**



**Figure 1** : Courbes de croissance des microorganismes en fonction de la température.

1. **Effet du pH**

 Les bactéries sont généralement tolérantes à des variations de pH entre 6 et 9, grâce à la régulation exercée par leur membrane cytoplasmique à l'encontre des ions H+. Dans les cultures en milieux non tamponnés, les alcalins libérés à partir notamment des réactions de décarboxylation des acides aminés ou les acides libérés par dégradation des carbohydrates peuvent modifier le pH dans des conditions tel que le milieu devient toxique pour les bactéries.

 Les bactéries pathogènes ou liées à l'écosystème humain se développent le plus souvent dans des milieux neutres ou légèrement alcalins. Les bactéries distinguées sont :

* ***Neutrophiles*** qui se développent aux pH compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7. La plupart des bactéries médicalement importantes sont ainsi.
* ***Alcalophiles*** qui préfèrent les pH alcalins : cas de *Pseudomona*s et *Vibrio*, donc milieux de culture particuliers.
* ***Acidophiles*** qui se multiplient mieux dans des milieux acides : cas des *Lactobacillus*.

Il est à noter qu’au cours des cultures, le métabolisme bactérien engendre des composés acides ou basiques qui seraient susceptibles d'entraver la multiplication bactérienne. Pour éviter ces variations de pH, les milieux de culture sont tamponnés, le plus souvent en utilisant des tampons phosphates.

1. **Effet de l'eau libre**

 L'activité de l'eau se définit comme le rapport de la pression de vapeur saturante du milieu à la pression de vapeur saturante de l'eau pure à la même température. Ce rapport, inférieur ou égal à 1, peut être assimilé à l'humidité relative du milieu. La disponibilité de l'eau présente dans l'atmosphère ou dans une substance intervient dans la croissance bactérienne. Les bactéries exigent un certain seuil d'humidité et pour des Aw faibles, leur croissance est ralentie.

 Certains germes ne se développent que pour une valeur de l'Aw supérieure à 0,97. C'est le cas des *Acinetobacter* spp. (Aw > 0,99) ou du *Clostridium* *botulinum* (Aw > 0,97). Les *Salmonella* spp., et *Escherichia* *coli* commencent à se multiplier pour une valeur de l'Aw supérieure à 0,95.

 Le *Staphylococcus* *aureus* se multiplie à partir de 0,85, mais la production éventuelle de toxines n'est possible que pour des valeurs supérieures à 0,97.

La bactérie *Listeria* *monocytogenes* peut supporter une valeur de l'Aw de 0,83, alors que les bactéries halophiles croissent même à une valeur de Aw dans les environs de 0,75.

 Le degré d'humidité des aliments a une influence sur leur conservation et leur séchage est un procédé de conservation fondé en partie sur la diminution de l'Aw. L'activité de l'eau (Aw) est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un composé. Ainsi, elle est affectée par la présence plus ou moins importante de sels ou de sucres dissous dans l'eau.

* **Présence de sels**

 Les bactéries halophiles nécessitent du sel (NaCl) pour leur croissance. Cette concentration peut varier de 1-6% pour les faiblement halophiles, de 15 à 30% pour les bactéries halophiles extrêmes..(Ex. ::*Halobacterium*).

Les bactéries halotolérantes acceptent des concentrations modérées de sels, mais non obligatoires pour leur croissance (Ex. : *Staphylococcus aureus*).

* **Présence de sucres**

 Les bactéries osmophiles nécessitent des sucres pour leur croissance. Les osmotolérantes acceptent des concentrations modérées de sucres, mais non obligatoires pour leur croissance. Enfin les bactéries xérophiles peuvent se multiplier en l'absence d'eau dans leur environnement.

1. **Effet de la pression osmotique**

Les bactéries, à l'exception des *Mycoplasmatales*, sont peu sensibles aux variations de la pression osmotique car elles sont protégées par leur paroi. Toutefois, certaines espèces marines sont adaptées à des milieux contenant environ 35 g de NaCl par litre.

Selon leur sensibilité à la pression osmotique, trois groupes de bactéries sont distinguées :

* Les bactéries non-halophiles capables de croître dans des milieux dont la concentration en NaCl est inférieure à 0,2 M.
* Les espèces halophiles ne pouvant croître que dans des milieux contenant des concentrations en NaCl supérieures à 0,2 M pour les moins halophiles (*Cobetia* *marina*) et à 5,2 M pour les plus halophiles (*Halococcus* *morrhuae*, *Halobacterium* *salinarum*, *Halorubrum* *sodomense*).
* Les espèces halotolérantes, acceptent des concentrations modérées de sels, mais non obligatoires pour leur croissance, comme les *Staphylococcus* spp., les *Listeria* spp ou les *Lactobacillus* spp.

Il est à préciser quela conservation des aliments comme les salaisons ou les confitures fait appel à une augmentation de la pression osmotique. Ces procédés ancestraux de conservation ont recours à l'addition de sel ou de sucre qui limitent la croissance de nombreuses bactéries. Seules les bactéries osmophiles se multiplient en présence de fortes concentrations de sucres et seules les bactéries halophiles se multiplient en présence de fortes concentrations de sels.

**I-2 Méthodes d'étude de la croissance**

 Les techniques permettant l'étude de la croissance sont nombreuses, mais aucune n'est parfaite. Les facteurs qui influencent le choix d’une méthode sont d’une part, les propriétés de la biomasse (taille des cellules, isolées ou pas, caractère filamenteux, etc.) et les caractéristiques du milieu (degré de viscosité, les matières en suspension) et d’autre part, le degré de précision et de sensibilité requise et aussi la rapidité recherchée.

Sur un milieu solide, l'étude de la croissance est rendue difficile en raison notamment de l'agrégation des cellules les unes aux autres. En milieu liquide, les cellules sont dispersées (ou si elles sont agrégées, il est possible de les disperser par agitation) ce qui permet des prises d'échantillons. La croissance peut alors être appréciée en se basant sur le nombre de cellules ou sur la masse cellulaire, qui sont rapportés par unité de volume de culture.

**I-2.1 Numération des cellules**

1. **Méthodes de comptage**

 La façon la plus simple d'étudier la croissance bactérienne est de mesurer le nombre de bactéries à intervalles de temps réguliers dans une culture. Ces méthodes présentent l’avantage de la rapidité et de la simplicité de mise en œuvre.

1. **Détection et dénombrement direct au microscopique**

 L’avantage est que le matériel nécessaire n'est pas très important et qu'on peut faire des colorations différentielles, des observations morphologiques et visualiser les groupements. Ce type de dénombrement permet, grâce à une coloration (au Bleu de Méthylène ou au colorant de Newton), de différencier si on le souhaite les bactéries mortes des bactéries vivantes. L'inconvénient est que la méthode est lente, peu sensible, peu exacte (manque de précision) et fatigante pour l'observateur. Le dénombrement des cellules d’un volume donné peut être déterminé à l’état frais en utilisant habituellement une cellule hématimétrique. Les plus utilisés sont MALASSEZ, THOMA et NAGEOTTE. Ces hématimètres diffèrent par leur quadrillage, mais tous permettent d’énumérer, dans un volume précis et connu, tous les éléments visibles à l’objectif 40.

Elle consiste à déposer, entre hématimètre et lamelle, une goutte de l’échantillon, dilué ou non, puis à compter dans le quadrillage (volume précis) les éléments voulus. Le résultat obtenu est extrapolé en éléments par litre.

Pour obtenir une numération proche de la réalité, il est important de :

* Ne pas rayer le quadrillage lors du nettoyage de l’hématimètre,
* Bien monter la lamelle sur l’hématimètre,
* Déposer la goutte de l’échantillon à énumérer correctement (décrit ci-dessous),
* Bien laisser sédimenter les particules à énumérer avant le comptage.

Cette méthode nécessite un matériel composé de : Hématimètre (MALASSEZ, THOMA, NAGEOTTE), lamelle en verre épais pour hématimètre, chambre humide, pipette Pasteur, nécessaire à dilution

* **Mode opératoire**

Préparation de l’hématimètre

* Coller la lamelle sur l’hématimètre, en humectant les deux bords de celui-ci avec un petit chiffon humide propre et essoré.
* Faire glisser la lamelle sur la largeur de l’hématimètre et vérifier la bonne adhésion " hématimètre - lamelle ».
* Entre hématimètre et lamelle, laisser rentrer, par capillarité, une goutte de l'échantillon à énumérer grâce à la pipette pasteur. La goutte ne doit pas déborder dans les rigoles de l'hématimètre et la goutte doit recouvrir complètement et d'un seul coup toute la surface quadrillée de l'hématimètre.
* Laisser reposer l'hématimètre à plat, pendant 10 minutes afin de laisser les éléments sédimenter.

Et on compte :

* Tous les éléments situés à l'intérieur des lignes délimitant cette surface,
* Et, pour les éléments situés sur les lignes, on compte soit ceux qui sont sur la ligne de gauche et pas ceux qui sont sur la ligne de droite, soit l'inverse
* Et, soit ceux qui sont sur la ligne du haut et pas ceux qui sont sur la ligne du bas, soit l'inverse.

|  |  |
| --- | --- |
| *http://www.bioltrop.fr/14-techhemato/cellule.gif**Cellule* | *http://www.bioltrop.fr/14-techhemato/nageotte.gif**Nageotte* |
| *http://www.bioltrop.fr/14-techhemato/malassez.gifMalassez* | *http://www.bioltrop.fr/14-techhemato/thoma.gif**Thomas* |

**Figure 2 :** Différents hématimètres utilisés dans le comptage des cellules.

**MALASSEZ**

* **1** Rectangle = **0,01** mm3.
* **1** Bande = **0,1** mm3.
* La cellule = **1** mm3 .

**NAGEOTTE**

* **1** Rectangle = **1,25** mm3.
* La cellule = **50** mm3.

On compte quatre bandes, on trouve x éléments. On a : nombre éléments par mm3 = x / 5

**THOMAS**

* **1** Carré = 0,004 mm3.
* La cellule = 0,1 mm3.
1. **Comptage électronique**

 DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique) : Coloration des cellules par un fluorochrome de type acridine orangé (substance oncogène). Ce fluorochrome va se fixer entre les bases azotées des acides nucléiques cellulaires, ce qui permet d'observer sous lumière UV, (Ultraviolet), et d'avoir une fluorescence des acides nucléiques. Les observations seront :

* Cellule à prédominance verte chargée en ADN (Acide Désoxyribo Nucléique) ⇒ cellule morte.
* Cellule à prédominance rouge chargée en ARN (Acide Ribonucléique) ⇒ Cellule vivante.
1. **Techniques nécessitant une culture** **(Techniques de UFC)**

On considère qu'une seule bactérie va donner une seule colonie sur un milieu de culture, on va donc compter les colonies présentes sur une culture de bactéries connaissant le volume de suspension bactérienne étalée sur le milieu ou présent dans le milieu.

 La numération des cellules viables après culture est une technique de référence et d'usage courant. Un volume fixe d'une suspension bactérienne parfaitement homogène et de ses dilutions est étalé sur un milieu gélosé ou incorporé à un milieu gélosé en surfusion. Dans ces conditions, seules les cellules viables donnent une colonie. Après incubation réalisée dans des conditions convenables, on compte les colonies bactériennes apparues sur ou dans le milieu de culture.

L'analyse est réalisée en triple exemplaire et le comptage est effectué sur les boîtes renfermant entre 30 et 300 colonies. On ne peut cependant pas être sûr qu'une colonie résulte du développement d'une seule bactérie. En effet, les amas ou les agglomérats bactériens donnent une seule colonie et plusieurs bactéries déposées par hasard à proximité les unes des autres peuvent également donner naissance à une seule colonie. Aussi, les résultats ne sont pas donnés en nombre de cellules, mais en unités formant colonies (UFC pour : unité formant colonie ou CFU pour colony forming unit).

**Remarque**

 NPP : Nombre le Plus Probable de cellules viables par tube, s'appuie sur des tables statistiques de tests de croissance (tables de Mac Grady).

**I-2.2. Détermination de la biomasse microbienne**

De très nombreuses techniques permettent de mesurer la biomasse : détermination du poids sec, mesure de la densité optique, mesure d'un ou de plusieurs constituants cellulaires, mesure de la consommation d'un substrat, mesure des produits d'excrétion, mesure des variations physico-chimiques induites par la croissance, etc.

1. **Détermination de la masse sèche**

 La biomasse est récupérée par centrifugation, lavée afin d’éliminer le milieu de culture retenu entre les cellules, puis séchée à 105 °C en présence de sable de **Fontaine bleu** jusqu'à l’obtention d’une masse constante. C’est la méthode la plus rigoureuse, mais elle s’applique qu’aux suspensions assez danse et dans lesquelles les microorganismes sont les seules particules en suspension. L’inconvénient de cette méthode réside dans l’incompatibilité de distinguer la biomasse vivante de la biomasse morte.

1. **Mesure de la densité optique : turbidimétrie**

 La mesure de la densité optique est la technique la plus simple, la plus rapide et la plus utilisée. Elle consiste à mesurer la lumière absorbée par une suspension bactérienne à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de **650 *nm*** (longueur d'onde pour laquelle l'absorption de la lumière par les constituants cellulaires est la plus importante). Dans des conditions techniques précises, l'absorbance est proportionnelle à la concentration cellulaire. La turbidité étant inversement proportionnelle à la surface de la particule. Pour que la turbidité soit une mesure précise de la masse bactérienne, il faut que la surface cellulaire moyenne reste constante au cours de la mesure. Cette situation ne se produit qu'au cours de la phase active de croissance (phase exponentielle,) et toute mesure effectuée sur des cellules au repos est erronée.

L’inconvénient major de cette technique est la présence de particules en suspension autres que les cellules qui perturbent l’absorbance, mais on peut toutefois homogénéiser la suspension dans des conditions standardisées avant de faire la mesure. Cette technique se prête bien à une détermination en ligne au cours de la fermentation, grâce à la mise au point de bio-photomètres stérilisablés fonctionnant en continu.

Il est à noter que la mesure de la densité optique à une sensibilité modérée (il faut au moins 107 bactéries/mL, pour pouvoir mesurer une densité optique). Elle est inutilisable avec des milieux très colorés et ne s’applique pas aux filamenteux. De plus, elle est incapable de différencier les cellules vivantes des cellules mortes.

**I-2. 3 Autres méthodes**

 Leur principe consiste à remplacer la détermination de la biomasse microbienne elle-même par celle d’un paramètre facilement déterminable et dont la valeur peut être corrélée avec précision à celle de la biomasse, tel qu’un constituant qu’elle renferme (protéine, acides nucléique, ATP, etc.).

* 1. **Dosage de protéines (l’azote total)**

La multiplication cellulaire est étroitement dépendante de la synthèse protéique. La méthode la plus utilisée est celle de Kjeldahl, qui consiste tout d’abord à une minéralisation suivie de distillation et d’une titration avec de la soude. D’autres méthodes telles que celle de Bradford et de Lowry peuvent être utilisées.

* 1. **Dosage des constituants du milieu de culture**

La croissance microbienne a pour effet de modifier considérablement la composition du milieu dans lequel elle se déroule. Parallèlement à l’apparition de la biomasse, on assiste à la disparition du substrat, à la consommation d’oxygène, à la modification de la température et à l’apparition de nouvelles substances (produits et sous-produits).

L’étude de la variation de ces paramètres permet de suivre l’évolution de la biomasse, que l’on peut ramener tout d’abord à un dosage de substrat, et par suite à la culture microbienne (en se basant sur la réaction chimique ou enzymatique)

Par ailleurs**,** le microcalorimétrie dynamique permet de relier le dégagement de la chaleur accompagnant tout développement microbien à la biomasse cellulaire présente et à son métabolisme. Elle permet de mesurer des échanges thermiques entre le milieu de fermentation et le milieu extérieur avec un seuil de détection de 1 à10 µW. Cette technique peut être utilisée en ligne sur un fermenteur (en pleine production).

**I-3 Courbe de croissance microbienne**

 Lorsqu’un *inoculum* bactérien est placé dans une enceinte contenant un milieu nutritif *non renouvelé*, et dans les conditions favorables, l’étude du développement microbienne, en fonction du temps (t), consiste de suivre l’évolution de la concentration cellulaire (X/v) [nombre de cellules par unité de volume de culture] ou concentration en biomasse microbienne (m/v) [masse en gramme de matière sèche cellulaire par unité de volume] selon le type de microorganisme et le type de méthode choisie.

 La cinétique de la croissance peut être divisée en six phases successives : I : latence ; II : accélération de croissance ; III : croissance exponentielle ; IV : décélération de croissance ; V : phase stationnaire ; VI : déclin. Ces différentes phases constituent la courbe de croissance de microorganismes (Figure **3**).



 **Figure 3** : Courbe de la croissance d’un microorganisme (En milieu non renouvelé)

* 1. **La phase de latence**

 Elle suit immédiatement l’ensemencement du microorganisme dans le milieu de culture. Il s’agit d’une période d’adaptation aux conditions du milieu (nature du substrat, conditions physicochimiques) au cours de laquelle la cellule synthétise en particulier les enzymes qui lui sont nécessaires pour métaboliser le substrat présent. Durant cette phase, la masse bactérienne reste identique à la masse initiale.

 Le **temps de** **latence** est très variable et dépend à la fois de la nature du milieu ainsi que de la nature et de la taille de l'inoculum bactérien.

 Un inoculum bactérien prélevé en phase exponentielle de croissance et ensemencé dans un milieu neuf identique se multiplie sans aucune phase de latence. En revanche, si le même inoculum est placé dans un milieu différent on observe une phase de latence (période d'adaptation enzymatique durant laquelle les bactéries synthétisent de nouvelles enzymes leur permettant d’utiliser.de.nouveaux…nutriments).
 L'ensemencement d'un inoculum important réduit la durée de la phase de latence par des mécanismes mal connus. On peut supposer qu'un grand nombre de bactéries est apte à neutraliser rapidement un effet toxique du milieu.

 L'âge des bactéries a une influence sur la durée de la latence qui peut être très courte lorsque des cellules jeunes sont introduites dans un milieu neuf. En effet, un inoculum âgé peut contenir de nombreuses cellules mortes, de plus, dans un inoculum âgé, les bactéries sont dans un état physiologique peu favorable et il leur faut du temps pour restaurer leurs systèmes enzymatiques mis au repos.

Il faut noter que,l’abaissement du temps de latence est très recherché dans certaines applications technologiques, qui souvent obtenu en adaptant l’inoculum sur le même milieu en effectuant une pré-culture, ou même en augmentant sa taille. Cependant, l’effet inverse est souvent recherché au cours des opérations de stabilisations (réfrigération, déshydratation, etc.).

* 1. **La phase d’accélération de croissance**

 À la suite de la phase de latence survient une phase d’accélération au cours de laquelle la multiplication cellulaire démarre avec une vitesse de croissance de plus en plus grande. Elle se caractérise par une augmentation de plus en plus rapide de la masse. Le taux de croissance devient supérieur à zéro et il augmente progressivement.

* 1. **La phase de croissance exponentielle**

 Les bactéries se multiplient sans entrave ; le **taux de croissance** est maximum et constant. Ce paramètre est une caractéristique d'un microorganisme donné qui est lui-même sous la dépendance des conditions de l’environnement comme la nature et la concentration des nutriments, le pH et la température. Ces facteurs ont une grande influence. C'est ainsi que pour *Escherichia Coli* le taux de croissance est de 0,5 à 18°C et de 3,3 à 40°C. Durant cette phase, la masse microbienne augmente de façon exponentielle.

* 1. **La phase de décélération de croissance**

 Durant cette phase, la vitesse de croissance se ralentit progressivement et le taux de croissance devient nul. Cela correspond, d’un point de vue biochimique, à l’épuisement du milieu de culture du fait de la disparition d’un ou plusieurs composés nécessaires à la croissance et, aussi dans plusieurs cas à l’accumulation de produits inhibiteurs (éthanol, les toxines, etc.), résultant du métabolisme microbien.

Le changement de certains paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH et le potentiel redox, durant la croissance microbienne peut aussi inhiber la croissance du microorganisme.

* 1. **La phase stationnaire**

 La concentration bactérienne est maximale et constante et le taux de croissance (µ) est égal à zéro. Les bactéries peuvent continuer à se diviser, mais le taux de division est alors égal au taux de mortalité. Cette phase résulte, d’une part de l’épuisement du milieu et de l'accumulation de déchets toxiques, d’autre part de l’apparition de métabolites bactériens *bactériostatiques* (c’est-à-dire inhibant la croissance des bactéries sans les tuer), voire bactéricides. Durant cette phase les bactéries en ayant la capacité peuvent sporuler.

Il est à préciser que les rendements sont calculés au cours de cette phase.

* 1. **La phase de déclin**

 Pendant cette dernière phase, les bactéries ne se reproduisent plus. Beaucoup d'entre elles meurent et sont décomposées plus ou moins rapidement par les enzymes libérées au moment de leur mort. Ce processus d'autodigestion constitue l'autolyse. Le taux de mortalité peut être constant comme le taux de croissance. Il est alors représenté par une droite, le nombre de cellules étant proportionnel au temps. La pente de cette droite dépend de l'espèce bactérienne ainsi que des conditions de l'environnement.

 Cependant, il peut se produire assez fréquemment des déviations de l'ordre exponentiel de déclin en raison de divers degrés de résistance des cellules. Dans certains cas aussi des bactéries peuvent survivre et se multiplier aux dépens des nutriments libérés par la décomposition des autres cellules.

* **Phénomène de diauxie**

 Le phénomène de diauxie, mis en évidence par Monod, se traduit par une courbe de croissance diphasique. Il est observé dans des milieux synthétiques contenant au moins deux sources de carbone et il est lié à un mécanisme de répression catabolique. Par exemple, dans un milieu contenant du glucose et du lactose, certaines espèces vont dans un premier temps utiliser le glucose grâce à des enzymes constitutives. La dégradation du lactose est sous la dépendance d'enzymes inductibles dont l'induction est réprimée en présence de glucose. Lorsque le glucose sera épuisé, les bactéries utiliseront le lactose et donneront une nouvelle phase de croissance exponentielle après un temps de latence intermédiaire.

Il est à mentionner que,dans un milieu non renouvelé, la phase exponentielle de croissance ne peut durer que quelques heures. Dans un but industriel, il peut être nécessaire de prolonger cette phase en renouvelant constamment le milieu de culture et en éliminant les produits du métabolisme. Les croissances continues sont obtenues à l'aide de **turbidostat**, de **chémostats**, de fermenteurs en continu multi-étages ou d'autres dispositifs industriels.

**I-4 Facteurs affectant le taux de croissance**

Le taux de croissance est un paramètre caractéristique d’une espèce (ou d’un biotype). De façon générale, les bactéries se développent plus vite que les microorganismes eucaryotes (levures et moisissures). Le taux de croissance maximum (µmax) est une donnée théorique difficile à connaitre et atteindre, car elle correspond à des conditions idéales dont on n’est jamais sûr qu’elles soient atteintes. Différents facteurs sont susceptibles de modifier l’allure de la courbe de croissance, et le taux de croissance réel dépend de nombreux facteurs.

* 1. **Action de la température**

 La température exerce une influence déterminante sur l’ensemble de l’activité cellulaire des microorganismes. Aux basses températures, elle peut être totalement bloquée. La croissance est accélérée par une augmentation de la température. Toutefois, à partir d’une certaine température, certains constituants (enzymes, acide nucléique) ou structures cellulaires (enveloppes) peuvent subir des altérations ou dénaturations. La croissance cellulaire s’en trouve perturbée et si la vitesse de croissance reste élevée, la concentration cellulaire n’atteint pas sa valeur maximale. La destruction thermique des cellules l’emportant sur la croissance.

 La croissance cellulaire peut être assimilée à une réaction complexe suivant la **loi d’Arrhenius,** donnée par la relation suivante :

**ln X = -**$∆H$ **/ RT**

Ou encore **log x = -**$ ∆H$**/2,3 RT**

Avec :

$∆H$ : est l’énergie d’activation de la croissance (variation de l’enthalpie) ;

**R** : est la constante des gaz parfaits ;

**T** : est la température absolue en Calvin **∂(K)=273+x °C** .

 La représentation graphique du taux de croissance en fonction de la température (ou même 1/T) montre clairement que le taux de croissance augmente avec l’élévation de la température jusqu'à atteindre une valeur maximale µmax relative (qui correspond à la température optimale de croissance), au-dessus, ce taux diminue progressivement.

Le coefficient **Q10** représente le facteur d’augmentation de taux de croissance pour une élévation de la température de 10°C. Pour de nombreuses bactéries, ce coefficient varie de 1,5 à 2, cas d’E*. coli* que le taux de croissance double en passant de 25°C 35°C.

* 1. **Action du substrat**

 Si on ensemence un microorganisme dans un milieu de culture, contenant en quantité suffisante tous les composés dont il a besoin sauf un, la croissance ne peut avoir lieu. En revanches, lorsqu’on commence à lui fournir ce composé en quantités faibles et variables d’un essai à l’autre, le taux de croissance augmente avec l’augmentation de la concentration et atteint la valeur maximale pour une concentration de **SMAX**.

Pour toutes les concentrations supérieures à SMAX, le taux de croissance n’augmente pas et reste égal au taux de croissance maximal (cela explique pourquoi le taux de croissance reste constant en valeur max en phase exponentielle, et aussi le ralentissement progressif en phase décélération). Ce phénomène a été étudié par MONOD qui déduit que : même dans les conditions, de cultures les plus favorables, le taux de croissance est très affecté par la nature et la concentration du substrat.

* **Nature du substrat**

 Un milieu contenant un substrat facilement catabolisable donnera une croissance plus rapide qu’un milieu contenant des substrats plus complexes, qui nécessitent d’être dépolymérisés.

De même, un milieu riche dans lequel des métabolites directement utilisables pour l’anabolisme sont présents et assimilables donnera une croissance plus rapide qu’un milieu où les cellules doivent effectuer la synthèse de ses constituants. De plus, la variation de la composition et de la valeur nutritionnelle et énergétique des divers substrats utilisables donneront des valeurs de taux de croissance différentes.

* **Concentration en substrat**

La concentration en substrat constitue un facteur limitant à la vitesse de croissance et ainsi au taux de croissance. Cet effet peut être résumé par la loi de MONOD donnant la variation de taux de croissance en fonction de la concentration de substrat :

μ = μmax *S* / *KS* + *S*

Avec

μmax : taux de croissance maximal sans facteur limitant (phase exponentielle) .

 *KS:* **constante de saturation** (ayant la dimension d’une concentration en substrat limitant donnant un taux de croissance égal à la moitié de µ**max**).

La constante (*KS*)est inversement proportionnelle à l’affinité du microorganisme pour son substrat ; elle est analogue à la constante (*Km*) de Michaelis-Menten.

Il faut préciser que la valeur de la constante (*KS*)varied’une souche microbienne à une autre. Pour les substrats glucidiques, elle est généralement comprise entre 1 à 100mg/l, alors que pour les composés azotés, elle est souvent beaucoup plus faible.

Il est à signaler qu’une augmentation importante de la concentration en substrat dans le milieu provoque une diminution du taux de croissance, ce qui peut être dû a l’augmentation de la pression osmotique du milieu ou même effet de l’ antagonisme d’utilisation. Ce qui nous pousse à parler de concentration d’inhibition (*Ki*). Cet effet peut être pris en compte par l’équation :

μ = μmax *S* / *KS* + *S+Ki*S2

Avec :

***Ki***: étant une concentration relative au microorganisme et au substrat considéré dans un milieu de culture donné et pour des conditions environnantes définies.

* 1. **Action de l’oxygène**

En fermentation industrielle, l’oxygène provient principalement de l’air qui est injecté dans le réacteur, et contrairement aux autres substrats qui peuvent être en quantité suffisante, l’oxygène se limite à la quantité dissoute, qui est non seulement faible, mais aussi rapidement épuisée. Et on peut considérer que le cas d’une croissance rapide, la teneur en oxygène du milieu devient nulle et par conséquent la vitesse et le taux de croissance sera en fonction de la vitesse de dissolution de l’oxygène dans le milieu. Ainsi deux notions fondamentales apparaissent ; la capacité de transfert d’oxygène de réacteur et la demande en oxygène de la culture. Cette dernière mesure les besoins en consommation d’oxygène de la culture, et s’exprime en *mmol/l /h* ou *mol/m3/h.* Cette donnée est déterminée au laboratoire ( Tableau II).

**Tableau** **II**: Besoin en oxygène de quelques microorganismes utilisés dans l’industrie fermentaire.

|  |  |
| --- | --- |
| **Microorganismes** | **Besoin en O2**(*mmol /l /h)* |
| *Escherichia coli* (production d’acides aminés : tryptophane-tyrosine-phénylalanine et d’enzyme : chymosine) | 5 à 8 |
| *Streptomyceace sp.* (Antibiotiques) | 10 |
| *Aspergillus niger* (Production d’acide citrique) | 28 |
| *Saccharomyces cerevisiae* (Biomasse, Ethanol) | 12 |
| *Saccharomycopsis lipotica* (Production de lipases) | 30 |
| *Acétobacter sp.* (Production d’acide Acétique) | 24 |

**I-5 Modélisation mathématique de la croissance microbienne en milieu non renouvelé**

 Au temps (t0), on inocule un milieu de culture de volume (V) et de concentration en substrat (S) avec une pré-culture qui donne une concentration(X0) en biomasse. Les divers paramètres caractérisant l’évolution de l’activité microbienne sont habituellement classés en paramètres d’état et en paramètres cinétiques (vitesse et taux). Ces paramètres donnent des renseignements sur l’état de la culture et le degré d’avancement des réactions.

1. **Paramètres d’état**
* Pour la biomasse on caractérise : la biomasse initiale (X0) ou (Xi) et la biomasse finale (Xf), qui sont exprimées en g de matière sèche /L ou en nombre de cellules/mL de milieu de culture.
* Pour le substrat on caractérise : le substrat initial (S0) ou (Si) et le substrat final (Sf), qui sont exprimées en g/L. C’est à mentionner que, le substrat résiduel (Sr), peut être également caractérisé.
* Pour le produit on caractérise : le produit initial(P0) qui est le plus souvent inexistant, et le produit final (Pf) ainsi que le produit intracellulaire (Pintr) et le produit extracellulaire (Pextr), qui sont exprimés en g/L.

1. **Paramètres cinétiques (dérivés)**

Ce sont les vitesses cinétiques d’apparition de biomasse et de produit, et de consommation (utilisation) du substrat.

* Vitesse d’apparition de biomasse (Vx ou rx), elle nous renseigne sur l’évolution de la biomasse au cours de temps.

On peut l’exprimé par : **Vx=** *d*X/*d*t. [g/L/h]

* Vitesse de consommation de substrat (VS ou rS), elle nous renseigne sur l’évolution de la concentration en substrat au cours de temps.

On peut l’exprimé par : VS **= -***d*S/*d*t. [g/L/h]

* Vitesse d’apparition de produit (VP ou rp), elle nous renseigne sur l’évolution de l’apparition du produit au cours de temps.

 On peut l’exprimer par : VP **=** *d*P/*d*t. [g/L/h]

* **Quelques caractérisations**
* **Taux de croissance**

Le taux de croissance µ (h-1) mesure l’accroissement de la population microbienne au cours d’une période de temps (*t*) donnée et dans des conditions déterminées, on a :

  

X : symbolise la biomasse (exprimée en g /L ou en nombre de cellules).

* **Coefficient métabolique ou taux de conversion** *(q)*

Le coefficient métabolique q mesure la vitesse de consommation du substrat par la biomasse à un instant (t)de la fermentation. Ce taux caractérise l’intensité de l’activité catalytique.



* **Taux de production (**Þ) ou µp

Ce taux mesure la vitesse de production du produit par la biomasse à un instant (t)de la fermentation.



 **I-6 Productivité**

 La productivité(Q) est la quantité de produit (Qp) ou de biomasse (Qx) produite par unité de volume de culture et de temps. Elle est exprimée en g/l/h, et est donnée par :

 $Qp=\frac{∆P}{∆t}=\frac{Pf-Pi}{tf-ti}$ Et $Qx=\frac{∆x}{∆t}=\frac{Xf-xi}{tf-ti}$

 Selon l’intervalle de temps choisi, une productivité maximale et une productivité optimale peuvent être définies

**I-7 Rendements**

**I-7.1 Rendement réel (R**  /s et **r**  /s**)**

Le rendement permet de connaitre le degré d’efficacité d’un bioréacteur, en comparant la production à la consommation. À tout instant de la production, un rendement instantané (rx/s) en biomasse ou en produit (rp/s) peut être calculé. Il représente la quantité produite par gramme de substrat consommé pendant un intervalle de temps très court (*d*t).

Le rendement global (R x/s ou R p/s) s’applique à l’ensemble de la culture.

**I-7.2 Rendement théorique (Y /s)**

 En plus, de l’utilisation du substrat pour la production de la biomasse et de produit, les microorganismes l’utilisent aussi pour survenir aux besoins de maintenance c’est-à-dire pour assurer le turnover chimique des composants cellulaires (renouvellement cellulaire), assurer le transport membranaire, pour maintenir une pression osmotique interne correcte, pour pouvoir se déplacer. Il faut donc ajouter *à l’utilisation de substrat* une quantité (*m*)tel que :

S = S*x* + S*p* +S*m*

La maintenance existe chez tous les microorganismes, mais à des taux différents. Ce taux est très négligeable chez les microorganismes qui se développent rapidement, mais il est très prononcé chez ceux à temps de génération supérieur à 4heures, qui est d’environ de 10 à 20% (espèces productrices de l’éthanol). De ce fait, la maintenance est considérée comme une perte de rendement.

**I-7.3 Variation du rendement avec la maintenance**

*Exemple cas de levure (production de biomasse)*

Dans ce cas, on considère que la production du produit est nulle. Le substrat est alors utilisé pour la production de la biomasse et pour les besoins de la maintenance.

Alors on peut écrire*:*

S = S x + S *m alors Vs = Vs*x*+Vsm …………………….****.(1)***

Le rendement théorique***:*****Yx/s**= dx /-dsx = Vx/*Vs*x

*Vs*x= Vx/ Yx/s …*………………….****.(2)***

Les besoins en maintenance dépendent de concentration en biomasse, ce qui fait :

*Vsm = m .* x ***……..(3)***

En remplaçant dans les trois équations, on trouve que :

*Vs = m.* x + Vx/ Yx/s ………………………………………***(4 )***

Le rendement réel (R x/s ) = Vx/*Vs* = *(d*X/*d*t) / *m .* x + Vx/ Yx/s

 = µ.x / *m .* x + (µ.x / Yx/s )

 = µ / [ (µ/ Yx/s )+ *m]*

Alors le rendement réel sera donné par l’équation finale :

**R x/s = µ / [(µ/ Yx/s )+ m]**