



Open Archive Toulouse Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of some Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author's version published in: <https://oatao.univ-toulouse.fr/22841>

Official URL : <https://doi.org/10.3166/sda.22.189-198>

To cite this version :

Albasi, Claire  and Tataridis, Panagiotis  and Taillandier, Patricia  and Strehaiano, Pierre  *Un nouvel outil d'étude quantitative des interactions microbiennes en milieu liquide ; application aux bactéries lactiques œnologiques*. (2002) *Sciences des Aliments*, 22 (1-2). 189-198. ISSN 0240-8813

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator:

tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

Un nouvel outil d'étude quantitative des interactions microbiennes en milieu liquide ; application aux bactéries lactiques œnologiques

Claire ALBASI, Panagiotis TATARIDIS, Patricia TAILLANDIER,
Pierre STREHAIANO

SUMMARY **A new tool for the quantification of microbial interactions in liquid medium; application to wine lactic acid bacteria.**

The quantitative measurement of the interactions occurring in mixed cultures of microorganisms needs to know as precisely as possible the cell concentration of each component of the culture. It is often necessary to use very heavy methods, specially if the different components of the population belong to the same species of microorganism. This paper is about a new type of reactor which is specifically engineered to solve this problem. In this reactor the two components of the microbial population are kept separated by a membrane which allows substrates and products to flow freely. This reactor is made of two tanks connected through a bundle of hollow fibers dipping in one of the tanks. The flood of the medium (and thus of the solutes) is obtained by a gas pressure applied alternatively in each tank. By this way, each microbial strain grows in a separate tank but in the same medium (as the other one). So, it is possible to know the cell concentration by one of the classical methods used for pure culture cell count. Firstly the mixing ability of the apparatus was checked: it was shown that the mixing rates of the medium were compatible with the rates of the biological reaction (cell division or budding) and thus the mixing capacity was not limiting for the cell growth. After that the interactions occurring in mixed cultures of lactic acid bacteria (*Enococcus œni*) were studied. The types of interaction previously observed on agar plates were precised and this device allowed to quantify the inhibitory effect of a strain against the other one. It was also possible to measure the influence of such and such a variable as the ratio of the initial concentrations of the strains for example. At last a mathematical modelling to quantify the interactions was developed.

Key-words : *interaction, mixed cultures, membrane reactor, lactic acid bacteria, mathematical modelling.*

INP-ENSICET, laboratoire de génie chimique UMR CNRS 5503, 18, chemin de la Loge, 31078 Toulouse cedex 4, France.

Correspondance
Claire.albasi@ensigct.fr

RÉSUMÉ

Pour la quantification des interactions lors de cultures mixtes, la connaissance de la concentration cellulaire de chacune des composantes de la culture est indispensable. La numération différentielle de ces composantes est délicate et impose souvent le recours à des méthodes complexes. Ce constat nous a conduit à proposer un réacteur spécifique à l'étude des interactions entre micro-organismes en milieu liquide : le principe consiste à maintenir séparées les souches concernées de part et d'autre d'une membrane qui permet par ailleurs le libre échange des substrats et métabolites. Le réacteur est constitué de deux réservoirs connectés par un faisceau de fibres creuses immergé dans l'un d'eux. Le mouvement du milieu et ainsi le mélange des solutés est induit au travers de la membrane par une surpression exercée alternativement dans chacun des réservoirs. Ainsi chacune des souches se développe dans un espace séparé, mais dans un milieu commun, et l'évolution de sa concentration peut être suivie par l'une ou l'autre des méthodes classiques appliquées en culture pure (numération, néphélométrie...). La capacité de mélange a été validée : l'appareillage satisfait aux conditions de mélange requises par les vitesses de réaction microbienne. Par la suite, nous nous sommes intéressés aux interactions lors de cultures mixtes de bactéries lactiques du genre *Enterococcus*. Les interactions observées sur milieu gélosé ont pu être précisées et cet appareillage en a permis une quantification rigoureuse ; il a aussi permis d'évaluer quantitativement l'influence de variables comme le rapport de population au temps initial de la culture. Enfin, un modèle mathématique de quantification de ces interactions est proposé.

Mots clés : *interaction, culture mixte, réacteur à membrane, bactérie lactique, modélisation.*

1 – INTRODUCTION

L'analyse des cultures mixtes en milieu liquide impose la numération différentielle de chacune des composantes de la coculture (coculture d'espèces d'un même genre ou de souches d'une même espèce). Dans la plupart des cas, cette numération passe par l'isolement de colonies et l'identification de ces colonies. Ces études se heurtent donc aux problèmes statistiques classiques de la comparaison d'un pourcentage observé à un pourcentage théorique (SALGADO MANJARREZ *et al.*, 2000) comme à la lourdeur de la mise en œuvre des techniques de caractérisation des souches ou des espèces. Ce travail présente un réacteur à membrane spécialement conçu pour l'analyse quantitative de cultures microbiennes mixtes : les souches ou les espèces distinctes composant la coculture sont maintenues séparées par une membrane qui par ailleurs doit permettre le libre passage des substrats et métabolites, et qui par conséquent permet l'interaction microbienne (MARSHALL *et al.*, 1993). Par ce biais, les souches se développent dans un espace distinct, mais dans un milieu identique et le suivi de leur croissance peut se faire par l'une ou l'autre des techniques usuelles de la microbiologie : numération de la population totale (cellule de Thoma ou de Petit Salumbéni, néphélométrie...) ou numération différentielles des populations viables et totales (numération sur gélose, coloration au bleu de méthylène ou épifluorescence...) (MAYFIELD, 1977).

L'idée d'un tel réacteur n'est pas neuve et New Brunswick Scientific a commercialisé un appareillage appelé EcoGen (TANNENBAUM, 1975) dans lequel différentes souches (ou espèces) étaient cultivées dans des chambres séparées. Ces chambres, au nombre de quatre, communiquaient à travers une membrane plane (type millipore) avec un compartiment central. Les solutés diffusaient à travers ces membranes d'une chambre vers l'autre après passage par le compartiment central. Le défaut majeur de cet appareillage était l'insuffisance du temps de mélange devant la vitesse de réaction biologique (croissance ou consommation de substrat) : de ce fait, la composition du milieu différait d'une chambre à l'autre. Ce réacteur ne convient en fait que pour l'étude de croisances très lentes ou pour une première approche qualitative des interactions. Récemment, PESTCHANKER et ERCOLI (1997) évoquent l'intérêt, pour l'analyse de cultures mixtes, d'un réacteur dans lequel les échanges entre les chambres de culture se feraient par convection (filtration) du milieu. Cependant, ils présentent seulement le modèle mathématique et la simulation de l'interaction : le réacteur (virtuel) n'est pas validé expérimentalement.

Les caractéristiques de mélange de l'appareillage ainsi que sa validation avec des cocultures levuriennes (interaction de type Killer) ont été présentées par ailleurs (SALGADO MANJARREZ *et al.*, 2000). Dans ce travail, nous rappellerons brièvement ces caractéristiques et présenterons les résultats obtenus avec des cocultures de bactéries lactiques *Enococcus oeni*. Les méthodes usuelles de la microbiologie ont permis à quelques auteurs de mettre en évidence des interactions négatives ou positives entre bactéries lactiques œnologiques de l'espèce *Enococcus oeni* (anciennement *Leuconostoc oenos*) et des bactéries de genre et espèces différentes (*Pediococcus* ou *Lactobacillus*) ou entre souches de cette même espèce (COSTELLO *et al.*, 1983 ; EDWARDS *et al.*, 1994 ; LONVAUD-FUNEL et JOYEUX, 1993 ; STRASSER DE SAAD, 1996). Cependant les observations restent très qualitatives et les tentatives d'évaluation quantitative par la mesure des diamètres de zone d'inhibition sur milieu gélosé restent peu convaincantes ; les problèmes liés à la diffusion des molécules de stimulation ou d'inhibition dans les milieux gélosés perturbent très certainement l'analyse des interactions. Il existe cependant une autre possibilité que la coculture pour l'étude des interactions : il s'agit de la mise en culture de la souche « cible » sur un milieu préfermenté par la souche productrice de la molécule (STREHAIANO *et al.*, 1985 ; GILIS *et al.*, 1990). Cette approche est cependant plus laborieuse. En ce qui concerne la modélisation de ces mécanismes d'interaction en culture microbienne, peu de références existent : KIM *et al.* (1988) modélisent la croissance en coculture de *Klebsiella oxytoca* et *Pseudomonas aeruginosa* et Ramon Portugal (1995) développe un modèle pour l'interaction de type Killer chez *Saccharomyces cerevisiae*.

2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Bioréacteur

L'appareillage mis au point et utilisé dans cette étude est représenté *figure 1*. Il est composé de deux récipients (volume de milieu 1,8 L) connectés par un module de fibres creuses. Le flux de milieu d'un réacteur à l'autre (et

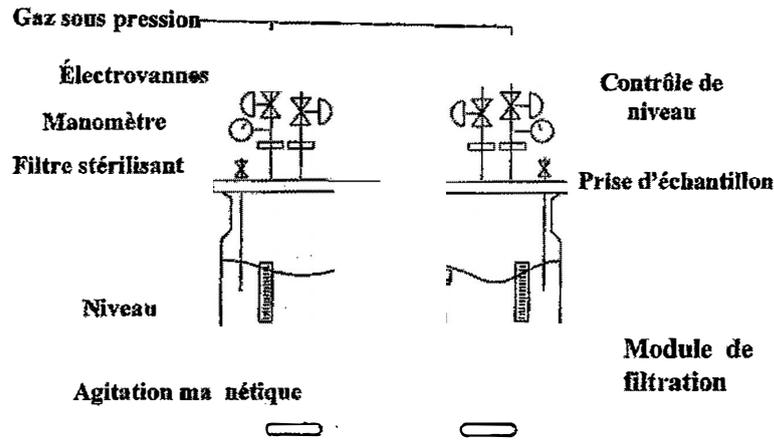


Figure 1
Schéma du bioréacteur
Bioreactor design

donc le mélange) est provoqué par la mise en surpression alternative de l'espace de tête de chacun des récipients. Le gaz (dioxyde de carbone) utilisé pour cette mise en surpression est stérilisé par filtration et un système de vannes contrôle son admission et son expulsion en fonction des niveaux de milieu mesurés et fixés par une sonde conductimétrique. Ainsi, le flux liquide se fait alternativement d'un compartiment à l'autre à travers le module de filtration ce qui permet de maintenir constant le volume moyen dans chaque réservoir et également d'éviter le colmatage de la membrane. Cet appareil a fait l'objet d'un dépôt de brevet (ALBASI *et al.*, 1998). Le module de filtration est fourni par Polymem (Fourquevaux, France) ; il est constitué de fibres en polysulfone de porosité de 0,1 μm et de 0,25 mm de diamètre interne et 0,43 de diamètre externe.

Les performances de mélange du réacteur ont été étudiées par des mesures de flux de solutions salines et validées avec des cultures de souches microbiennes aisément repérables par leur morphologie différentes (levures *Saccharomyces* et *Kluyveromyces*) et sans interaction autre que la compétition pour le substrat (ALBASI *et al.*, 2000).

Ces travaux ont conduit à fixer la surface totale de filtration à 0,1 m^2 , le volume transféré à chaque impulsion à 100 mL et le temps de filtration à 1 minute.

2.2 Souches bactériennes, milieu et conditions de culture

Les souches utilisées sont de l'espèce *Cenococcus ceni*. Elles sont codées DSM 7008, 17 A3, 19 A3 et EQ 77. Ces souches sont conservées sur gélose MRS. Les cultures en milieu liquide se font également sur milieu MRS supplémenté par 6 g/L d'acide malique, à 25 °C. Les levains sont issus d'une préculture conduite sur un milieu identique et sont prélevés au stade de la phase exponentielle de croissance. Le taux d'ensemencement total est de $8 \cdot 10^8$ cellules/mL, la proportion respective de chaque souche varie et sera précisée pour chaque essai. Cette proportion est fixée en tenant compte des vitesses spéci-

riques de croissance de chacune des souches. Ces caractéristiques cinétiques de croissance sont préalablement établies en culture pure. Ces cultures pures serviront de références pour apprécier les interactions.

2.3 Techniques analytiques

La numération cellulaire est suivie par mesure de la densité optique à 600 nm. Une corrélation a été préalablement établie avec la concentration mesurée par comptage sur cellule de Petit Salumbéni. L'erreur est estimée à 8 % (PLIHON *et al.*, 1995).

Le substrat acide malique est dosé par la méthode enzymatique Boeringher Mannheim.

2.4 Traitement des données expérimentales

Afin de pouvoir comparer les cinétiques observées en culture pure et en culture mixte, les croissances sont modélisées par une loi logistique (BAILEY et OLLIS, 1986). Cette loi donne l'expression analytique de la population bactérienne (X , X_0 étant sa valeur initiale) et de la vitesse spécifique de croissance ($\mu = 1/X \cdot dX/dt$) en fonction du temps de culture t

$$X = \frac{X_0 \cdot \exp(\mu_{\max} t)}{1 - \frac{X}{X_0} (1 - \exp(\mu_{\max} t))}$$

L'identification des paramètres du modèle est faite à l'aide du solveur du logiciel Excel (Microsoft). La validité de cette loi a été vérifiée sur chacune des cultures pures de chaque souche. Les données acquises en culture pure sont ensuite utilisées pour simuler la croissance théorique de la souche dans les conditions d'ensemencement utilisées en coculture.

3 – RÉSULTATS

Chacune des quatre souches étudiées est cultivée dans un premier temps en culture pure afin de déterminer ses caractéristiques cinétiques. La culture est considérée comme terminée à l'épuisement du substrat (acide malique) ou à l'arrêt de sa consommation. La loi logistique donne l'expression analytique de la population maximale atteinte ainsi que celle du taux spécifique de croissance en fonction du temps. Les cinétiques ainsi déterminées serviront à établir la croissance qu'aurait la souche dans les conditions de la culture mixte sans mécanisme d'interaction, c'est-à-dire comme si elle était pure. Cette simulation est faite grâce à la loi logistique en considérant le taux d'ensemencement réel X_0 (notée souche pure). Elles seront utilisées comme référence de comparaison avec celles observées en culture mixte.

Les cultures mixtes sont ensuite réalisées avec les souches DSM 7008 et 17 A3. Des essais préalables sur milieu gélosé mettaient en évidence une action

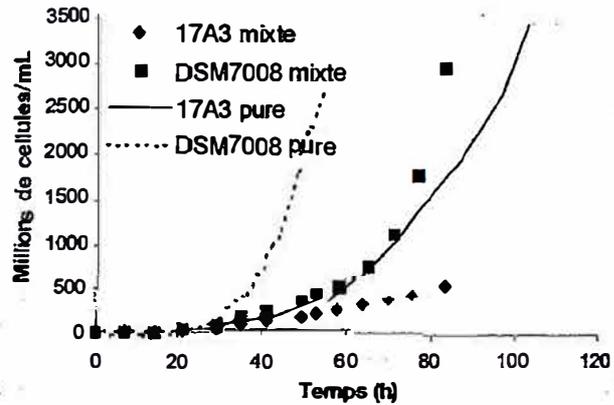


Figure 2

Culture mixte en bioréacteur 10 % DSM 7008 – 90 % 17 A3

En trait continu pour 17 A3 ; en pointillé pour DSM 7008 : les courbes de croissance en culture pure calculées par le modèle donné par la loi logistique.

Mixed culture in the bioreactor: 10% DSM 7008 – 90% 17 A3

Full line for 17 A3, dotted line for DSM 7008: data given by the logistic law modelling for pure cultures.

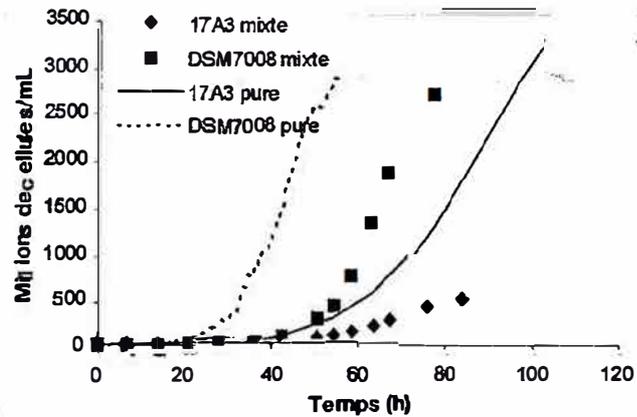


Figure 3

Culture mixte en bioréacteur 20 % DSM 7008 – 80 % 17 A3

En trait continu pour 17 A3, en pointillé pour DSM 7008 : les courbes de croissance en culture pure calculées par le modèle donné par la loi logistique.

Mixed culture in the bioreactor : 20 % DSM 7008 – 80 % 17 A3

Full line for 17 A3, dotted line for DSM 7008: data given by the logistic law modelling for pure cultures.

inhibitrice forte de DSM 7008 sur 17 A3. Les taux d'ensemencement au temps initial sont respectivement de 10 % DSM 7008 ; 90 % 17 A3 pour le premier essai (figure 2) et de 20 % DSM 7008 ; 80 % 17 A3 pour le deuxième essai (figure 3).

Si l'on compare les croissances observées aux modèles issus des cultures pures il apparaît clairement que les croissances de la souche « cible » 17 A3 en coculture sont inférieures à celles attendues en cas de non interaction. Il est clair aussi que la croissance de 17 A3 est encore plus perturbée lorsque le taux d'inoculation de DSM 7008 augmente de 10 à 20 %. Pour le premier essai (*figure 2*) la population maximale 17 A3 atteinte est de 390.10^6 cellules/mL au lieu de $1\ 375.10^6$ cellules/mL en culture pure. Dans le deuxième essai, avec un taux de DSM 7008 initial plus élevé, la population maximale de 17 A3 atteinte n'est que de 315.10^6 cellules/mL.

Par ailleurs, la croissance de la souche inhibitrice DSM 7008 est également perturbée : on observe en effet un allongement net de la phase de latence. Cependant les populations maximales atteintes ne sont pas modifiées. Ce résultat ne peut pas s'expliquer par le taux d'ensemencement très faible de cette souche par rapport à celui de la souche « cible » puisque la simulation par la loi logistique en tient compte. Pour tenter de quantifier cette inhibition de manière synthétique nous pouvons définir un pourcentage d'inhibition. Sur la population maximale ce pourcentage s'écrira :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{X_{\text{pure}} - X_{\text{mixte}}}{X_{\text{pure}}}$$

avec X la valeur de population exprimée en millions de cellules/mL.

Sur les vitesses spécifiques de croissance (μ), ce pourcentage d'inhibition s'écrira :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\mu_{\text{pure}} - \mu_{\text{mixte}}}{\mu_{\text{pure}}}$$

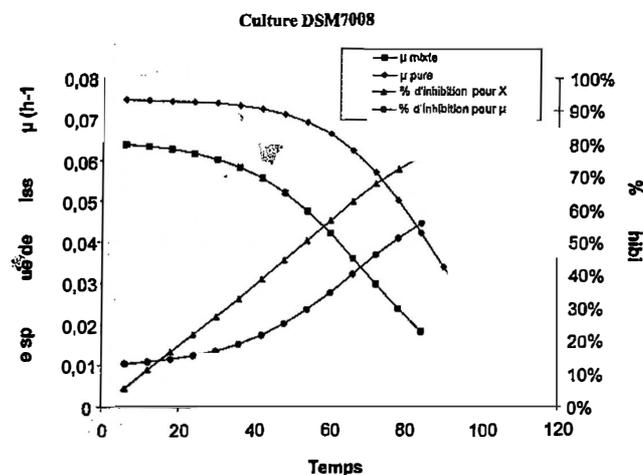


Figure 4

Quantification de l'inhibition

Inhibition measurement

La *figure 4* illustre l'évolution de ces pourcentages d'inhibition avec l'avancement de la culture pour la souche 17 A3 soumise à l'inhibition par DSM 7008 (rapports d'ensemencement de 90 % et 10 % respectivement) Les deux pourcentages d'inhibition augmentent fortement au cours du temps.

En définitive pour ce couple, un taux d'ensemencement de la souche inhibitrice (DSM 7008) de 10 à 20 % est suffisant pour assurer sa domination dans la coculture et l'inhibition forte (72 %) de la souche sensible (cible) 17 A3.

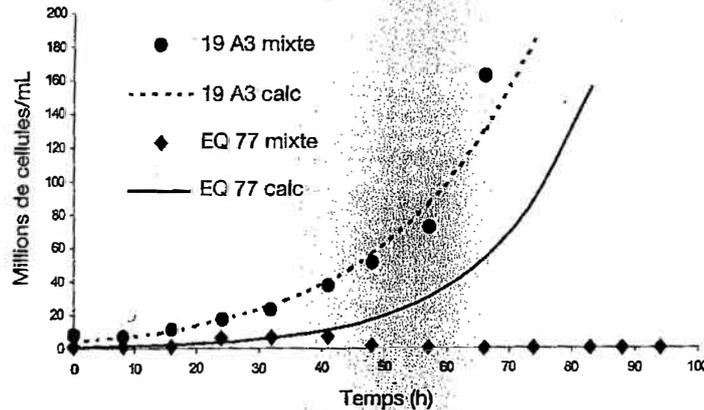


Figure 5
Exemple d'inhibition totale
Example of total inhibition

Un essai de même nature a été fait avec les souches 19 A3 (20 % à l'ensemencement) et EQ 77 (80 % à l'ensemencement). Le test d'inhibition sur milieu gélosé montrait ici encore un fort effet inhibiteur de la souche 19 A3 sur la souche EQ 77. La figure 5 illustre les résultats obtenus en culture mixte. On observe dans ce cas une inhibition totale de la croissance de la souche EQ 77.

4 - DISCUSSION

Pour l'étude des interactions entre souches bactériennes de la même espèce, la méthode classique « croissances sur milieu gélosé et appréciation des inhibitions par l'évaluation des halos de non-croissance autour des spots de la souche inhibitrice » pose fréquemment des problèmes d'interprétation. Des différences dans les vitesses de croissance peuvent être interprétées comme des inhibitions et les comparaisons des potentiels d'inhibition sont délicates ; les tentatives de quantification par mesure des diamètres des zones d'inhibition restent peu convaincantes (TATARIDIS, 2001). Les approches plus rigoureuses par coculture et suivi séparé des composantes de la population se heurtent aux difficultés de mise en œuvre. Les cultures séquentielles ne permettent pas d'avoir une vue dynamique de l'interaction.

La méthode développée ici a permis de préciser pour les quatre souches testées les interactions qualitativement mises en évidence par la méthode classique de culture sur milieu gélosé. Les résultats exposés ici concernaient dans

un cas un couple où l'une des souches exprimait sur milieu gélosé un effet inhibiteur modéré de l'une sur l'autre. Cette inhibition s'est avérée réciproque en milieu liquide mais de nature et d'intensité différentes d'après l'évolution des pourcentages d'inhibition au cours du temps. Dans le cas du couple où, en milieu gélosé, une des deux souches était fortement inhibée par l'autre, cette souche est totalement inhibée en milieu liquide.

Pour d'autres couples où les effets étaient moins marqués, l'utilisation de ce réacteur a permis dans certains cas de mettre en évidence une inhibition très faible, dans d'autres cas une neutralité complète (données non montrées). Un autre intérêt majeur de cette approche est de permettre de modifier les rapports respectifs des souches à l'ensemencement et donc de distinguer l'interaction par inhibition de l'interaction par compétition. En outre, elle permet d'acquérir des premiers éléments d'information relatifs à la nature de l'inhibition selon qu'elle est couplée ou pas à la croissance.

Du point de vue pratique, on peut envisager un classement des souches selon leur capacité à inhiber ou au contraire suivant leur sensibilité. Il est aussi logique que ces interactions puissent jouer un rôle dans les échecs souvent observés lors d'inoculation de vins avec ces bactéries lactiques : la mesure du pouvoir inhibiteur d'une souche vis-à-vis des autres peut donc être un critère de sélection comparable à celui de la possession du facteur *Killer* chez les levures.

5 - CONCLUSIONS

Ce travail présente un nouvel outil pour la caractérisation des interactions de type inhibition pouvant exister entre des souches bactériennes de la même espèce. Le procédé est basé sur la mise en culture des souches interagissantes dans deux réservoirs séparés mais dont l'homogénéité du milieu est assurée par sa circulation à travers un module de filtration. Les comportements observés pour des bactéries lactiques œnologiques par la méthode classique de culture sur milieu gélosé n'ont pas été retrouvés en général. De plus il a été possible de proposer une évaluation quantitative de l'effet inhibiteur et de son évolution au cours de la fermentation comme d'apprécier l'influence des rapports initiaux des populations sur la manifestation de cet effet. Un résultat inattendu a également été observé : dans les essais réalisés il a été remarqué que la croissance de la souche inhibitrice était parfois également affectée. Enfin, il faut noter que ce type d'étude peut être appliquée à d'autres couples de micro-organismes (levures ou bactéries).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALBASI C., RIBA J.P., SALGADO MANJARREZ E., MONNA J.P., ESPENAN J.M., 1998. Brevet n° 98.09563.

ALBASI C., TATARIDIS P., SALGADO MANJARREZ E., TAILLANDIER P., 2001. A new tool for the quantification of microorganisms

- interactions dynamics. *Indust. Eng. Chem. Research*, **40**, 5222-5227.
- BAILEY J.E., OLLIS D.F., 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2^e Ed. Mac Graw Hill. Singapore.
- COSTELO P.J., MORRISON G.J., LEE T.H., FLEET G.H., 1983. Number of species of lactic acid bacteria in wines during vinification. *Food Technol. Austral.*, **35**, 14-18.
- EDWARDS C.G., PETERSON J.C., BOYLSTON T.D., VASILE T.H., 1994. Interaction between *Leuconostoc oenos* and *Pediococcus* spp. during vinification of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**, 49-55.
- GILIS J.F., DELIA-DUPUY M.L., STREHAIANO P., 1996. Qualitative and quantitative study of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos*. *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, **30**, 151-157.
- KIM S.U., KIM D.C., DHURJATI P., 1988. Mathematical modelling for mixed culture growth of two bacterial populations with opposite substrate preferences. *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 144-159.
- LONVAUD FUNEL A., JOYEUX A., 1993. Antagonism between lactic acid bacteria of wines: inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*. *Food Microbiol.*, **10**, 411-419.
- MARSHALL V., 1983. Lactic acid bacteria: starters for flavour. *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**, 327-336.
- MAYFIELD C.I., 1977. A fluorescent staining technique for microscopically counting viable microorganisms in soil. *Can. J. Microbiol.*, **23**, 75-83.
- PESTCHANKER L.J., ERCOLI E.C., 1997. A novel membrane reactor design for controlled studies of interacting populations: simulation of the interaction between microorganism and plant cell suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 609-615.
- PLIHON F., TAILLANDIER P., STREHAIANO P., 1995. A direct and simple method for counting viable chains of *Leuconostoc* in batch cultures. *Biotechnology Technics*, **9**, 451-456.
- RAMON PORTUGAL F., 1995. *Interaction de type Killer entre levures : analyse cinétique et modélisation*. Thèse de Doctorat INP Toulouse.
- SALGADO MANJARREZ E., ALBASI C., RIBA J.P., 2000. A two reservoir hollow fiber bioreactor for the study of mixed population dynamics: design aspect and validation of the approach. *Biotechnol. Bioeng.*, **69**, 401-408.
- STRASSER DE SAAD A.M., PASTERIS S.E., MANCA DE NADRA M.C., 1996. Pediocin N5P from *Pediococcus pentosaceus*. In : *Enologie 95*. 329-331. Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- STREHAIANO P., MOTA M., GOMA G., 1985. Inhibitions non conventionnelle des croisances levuriennes. Effets interspécifiques et essais de levée d'inhibition. *Conn. Vigne Vin*, **19**, 97-107.
- TANNENBAUM, 1975. Multiple diffusion chamber. U.S. Patent n° 3. 893. 891.
- TATARIDIS P., 2001. *Étude des interactions entre micro-organismes du vin. Du qualitatif au quantitatif*. Thèse de Doctorat INP Toulouse.