

Chapitre V.

CROISSANCE BACTERIENNE

Définition

- * **La croissance** = développement ordonné des composants d'un organisme (accroissement de taille et de volume.)
- * **Chez les bactéries, la croissance** se traduit par une **augmentation du nombre d'individus**. L'accroissement est donc synonyme de **multiplication cellulaire**.
- * cet accroissement s'accompagne par :
 - une diminution de la quantité de matières nutritives disponibles
 - une augmentation des déchets dans le milieu
 - modification de certains paramètres du milieu (le pH, le potentiel d'oxydo-réduction, la conductivité, la pression osmotique,

Donc pour se multiplier, une bactérie doit être cultivée sur des Milieux de culture.

Cycle cellulaire bactérien

Un cycle cellulaire bactérien se décompose en trois étapes :

- l'initiation (**B**),
- la réplication de l'ADN chromosomique (**C**))
- la division cellulaire (**D**)

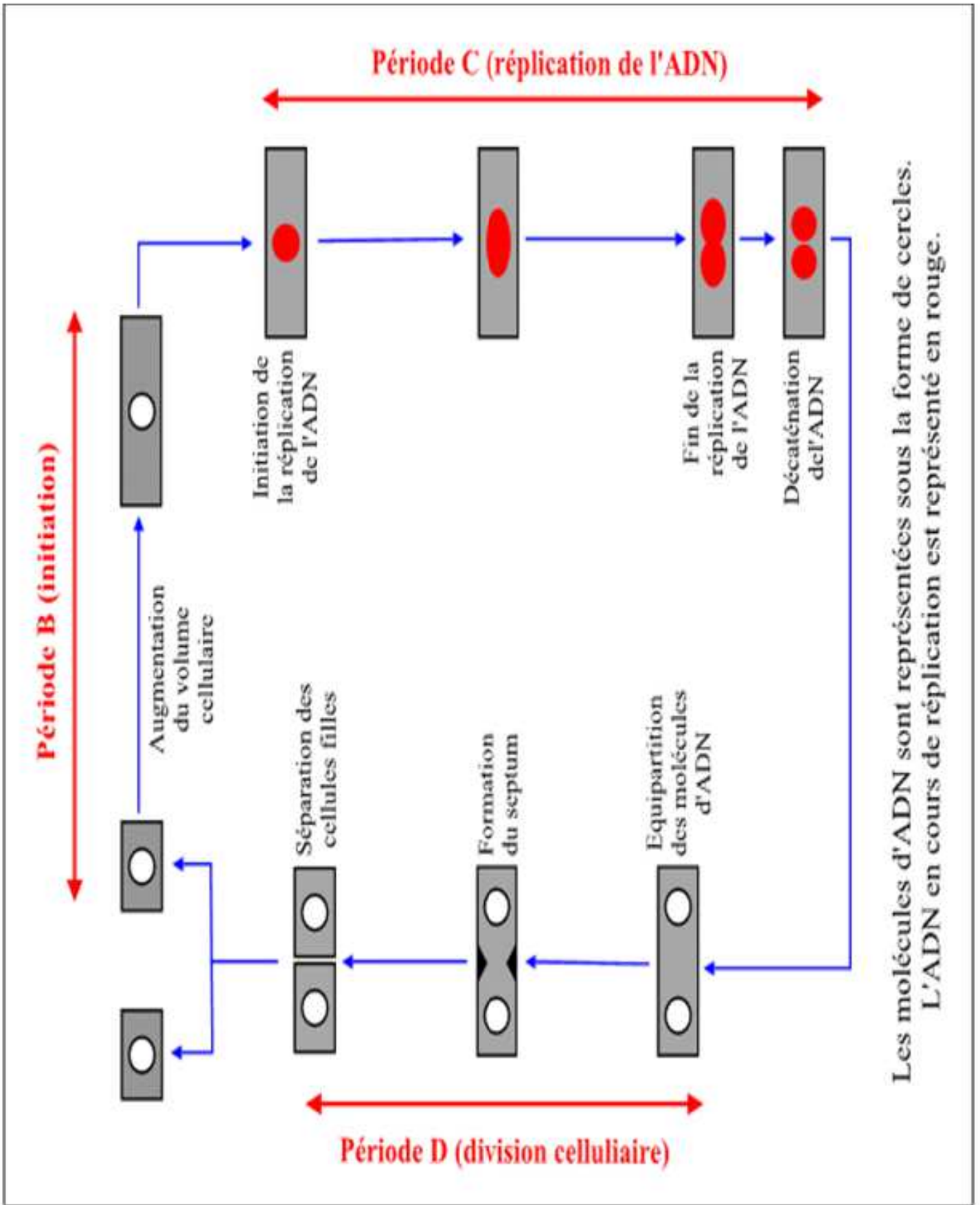
C ne débute qu'à la fin de la période **B** et **D** ne débute que lorsque la réplication de l'ADN chromosomique est terminée .

Chez Escherichia coli ,

* **C**: dure environ **40** min.

* **D**: dure environ **20** min.

* **B**: a une durée variable selon les conditions de culture.



Les molécules d'ADN sont représentées sous la forme de cercles.
 L'ADN en cours de réplication est représenté en rouge.

Méthodes de mesure de la croissance

Les techniques d'étude de la croissance sont nombreuses, ce qui montre qu'aucune n'est parfaite .

Sur un milieu solide: l'étude de la croissance est rendue difficile en raison de l'agrégation des cellules les unes aux autres .

En milieu liquide: les cellules sont dispersées ce qui permet des prises faciles d'échantillons.

La croissance bactérienne peut être appréciée en se basant sur le nombre de cellules ou sur la biomasse. .

A/ Mesure du nombre de bactéries

Mesure du nombre de cellules viables

Lecture au microscope (méthode directe)

Le microscope permet une numération totale des cellules

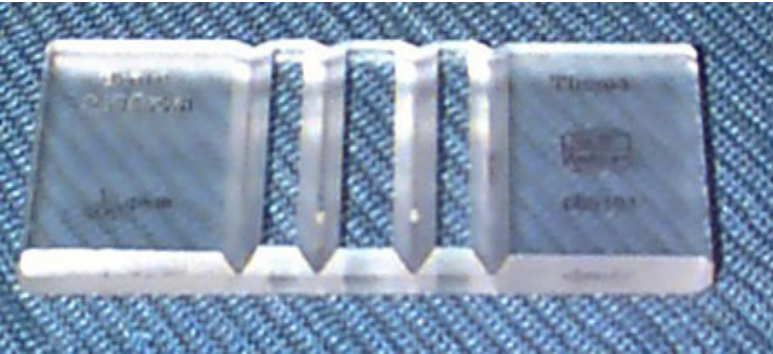
Elle ne permet pas de distinguer facilement les cellules vivantes des cellules mortes.

Le comptage des cellules se fait en utilisant un hématimètre (cellules de Thoma, de Malassez...)

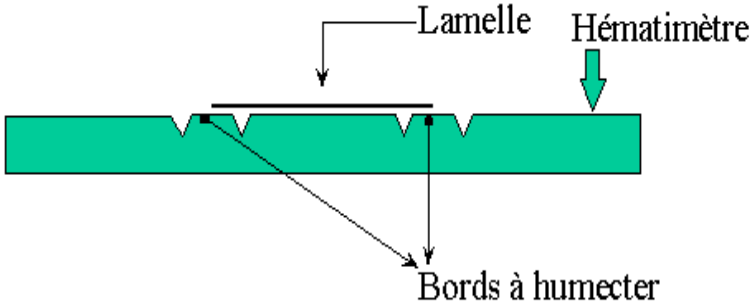
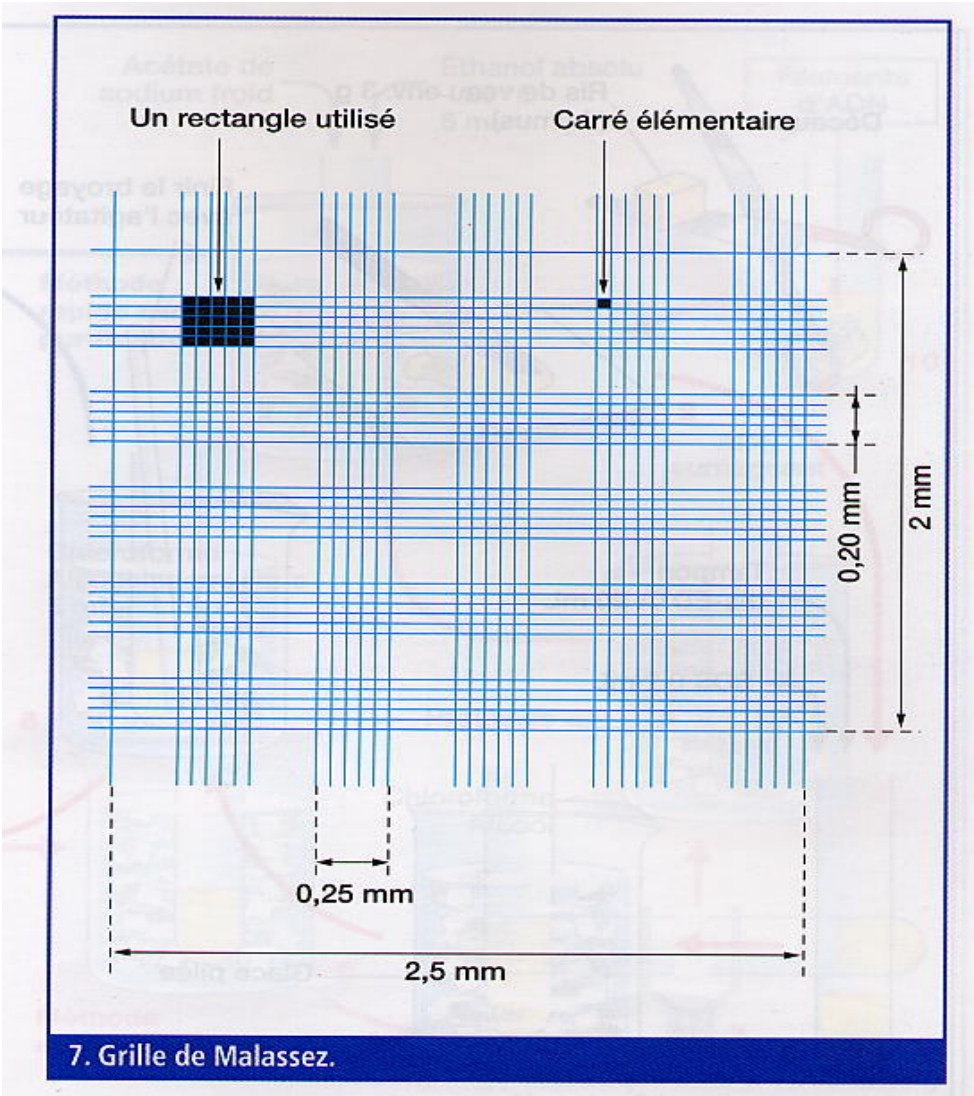
Dispositif électronique (Compteur de particules)

Cellule de Malassez

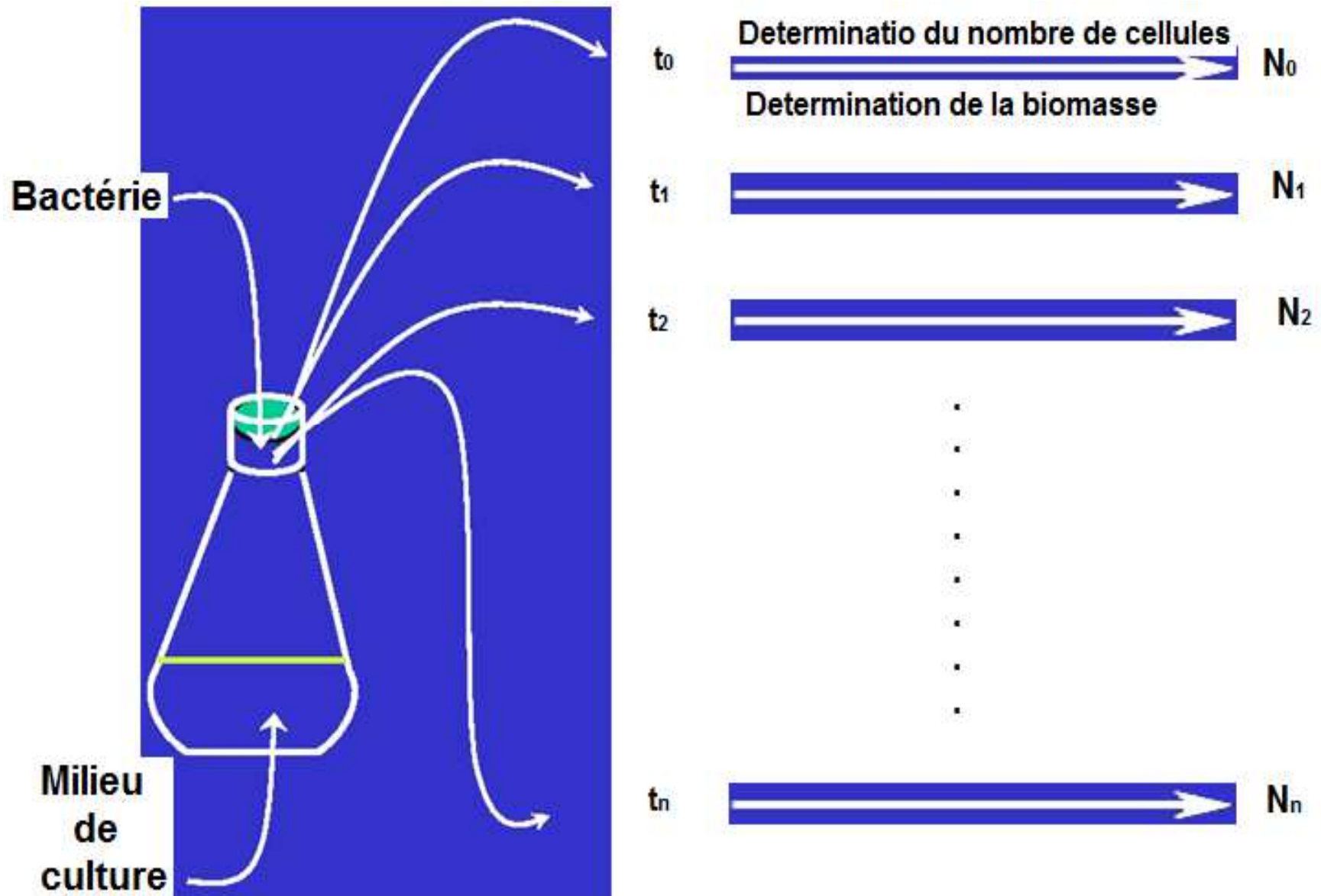
Vue de face



Vue de profil



Méthodes de mesure de la croissance



Dénombrement après culture (méthode indirecte)

Il permet de compter les bactéries viables et cultivables.

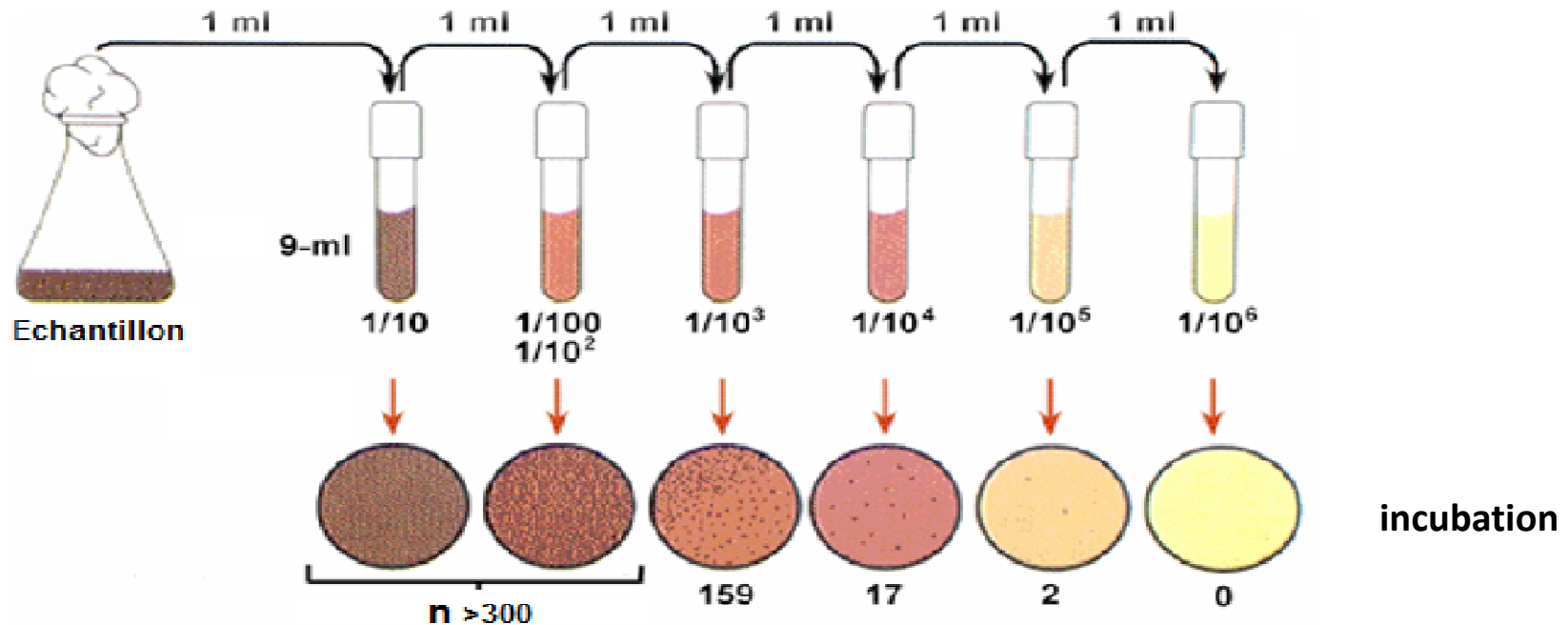
C'est la méthode la plus utilisée, elle se fait de différentes façons.

Culture en boîte de Pétri (cfu)

Méthode du nombre le plus probable (NPP)

Méthode de filtration sur membrane

La Numération sur Gélose en boîte de Pétri (cfu)



Après incubation on compte le nombre des colonies:

$$n = n_1 + n_2 + n_3 / 3$$

(choisir les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies).

On exprime le résultat en UFC/ volume de l'échantillon. (x le facteur de dilution):

$$(N = nx1/v \times 1/d)$$

La Numération par la méthode du nombre le plus probable (NPP)

Ce dénombrement se fait en milieu liquide:

Le calcul du nombre le plus probable utilise des dilutions de l'échantillon et pour l'interprétation fait appel à des calculs de probabilité .

La précision de cette méthode est nettement inférieure à la précédente

Dénombrer les **tubes positifs** pour chaque dilution.

Composer le **nombre caractéristique** formé de trois chiffres (3 dilutions successives).

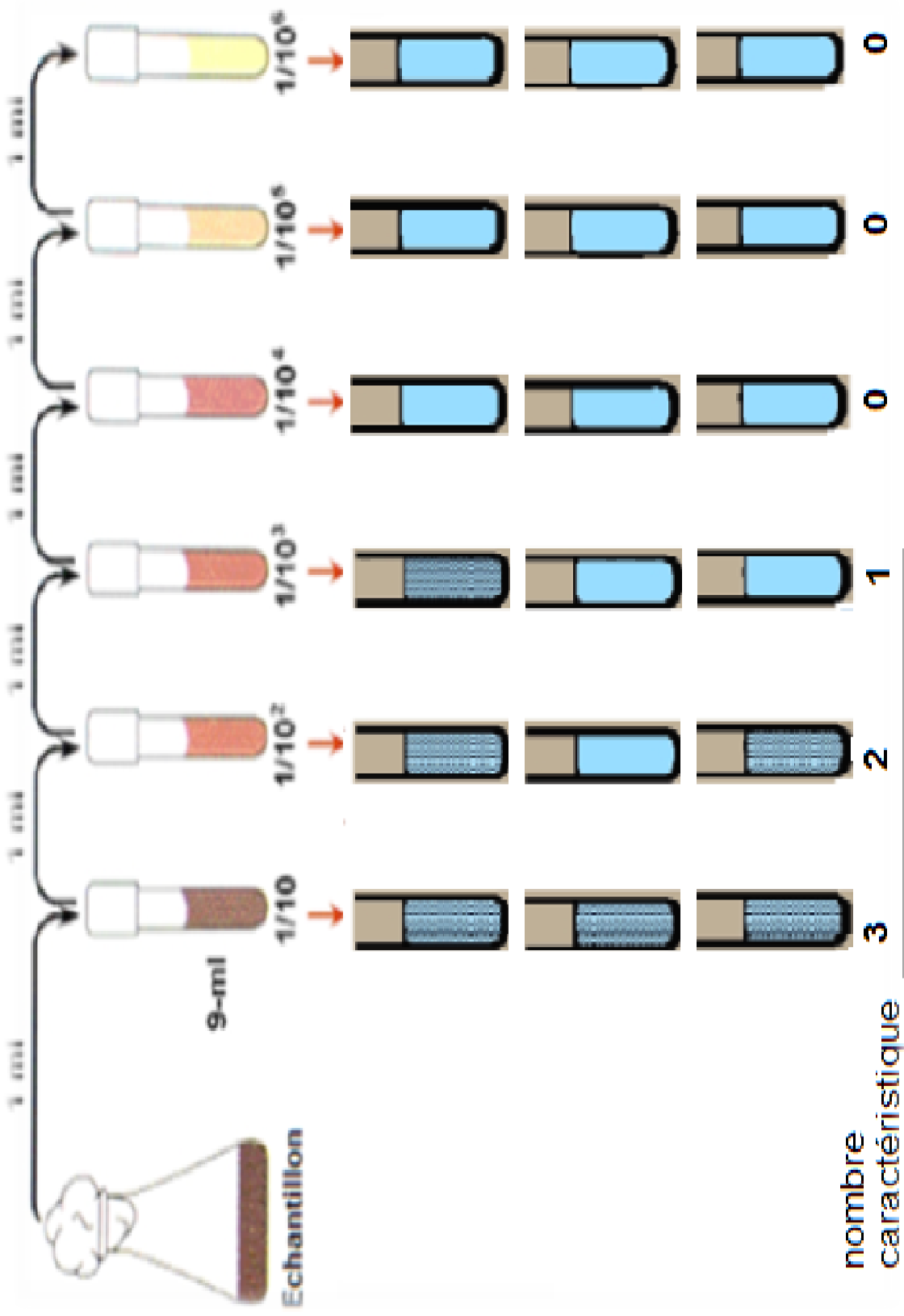
Ce nombre correspond au **NPP (nombre plus probable)** de bactéries dans la 1^{ère} dilution.

Dans ce cas les résultats sont exprimés en **UFT** par ml.

Le nombre final est donné par l'équation suivante : **(N = nx1/v x 1/d)**

(N : nombre d'UFT/ml, n : NPP, v : volumeensemencé, d : 1^{ère} dilution)

Le NPP est donné pour toutes les possibilités du nombre caractéristique dans des tables statistiques (**tables de Mc Grady**) pour trois (3) et cinq (5) tubes.



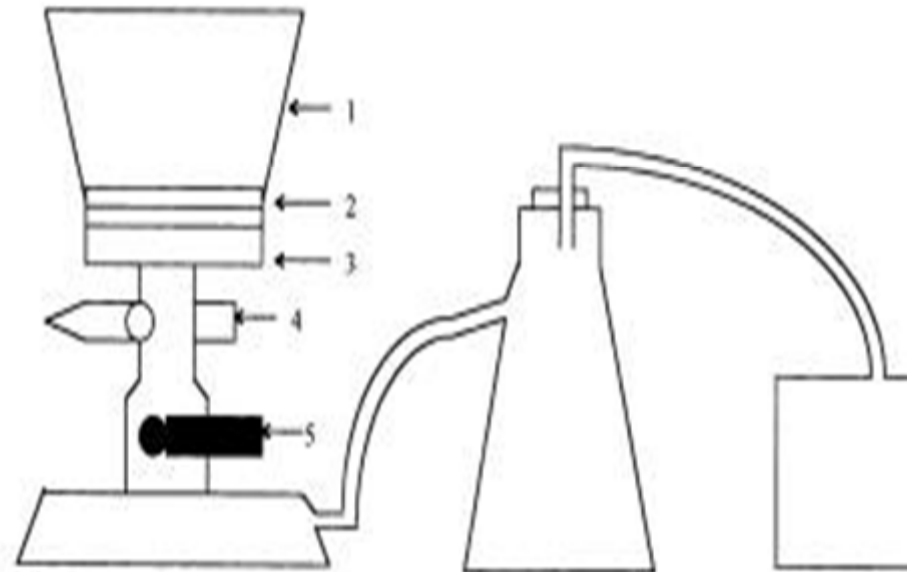
nombre
caractéristique

Méthode de filtration sur membrane

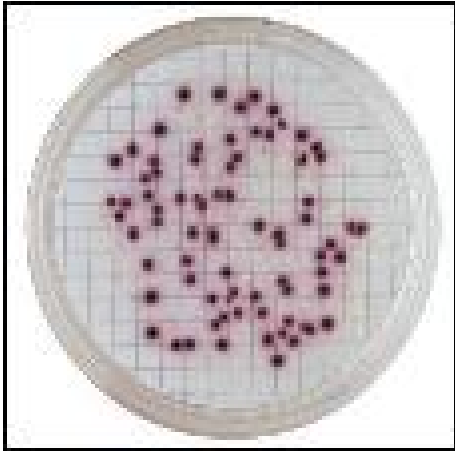
Méthode classique de dénombrement

Elle consiste à filtrer un volume déterminé d'une suspension sur une membrane filtrante de cellulose qui est ensuite déposée sur un Milieu de culture solide.

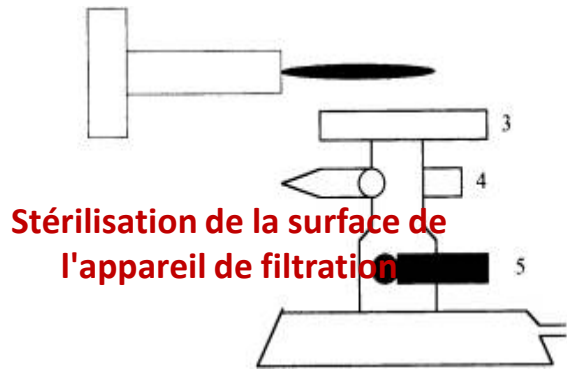
- 1 : entonnoir stérile (250 ml)
- 2 : membrane (0,45µm de porosité)
- 3 : support en acier
- 4 : levier (pour casser le vide)
- 5 : vanne à vide



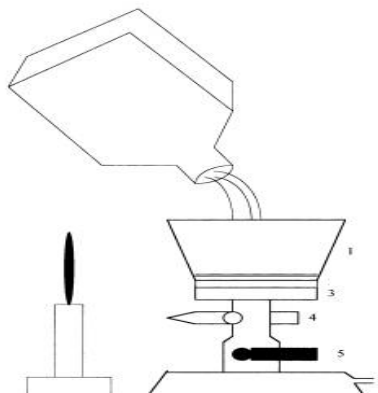
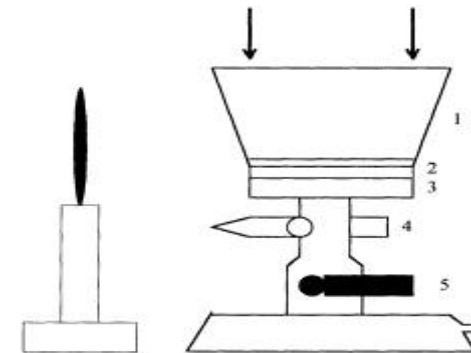
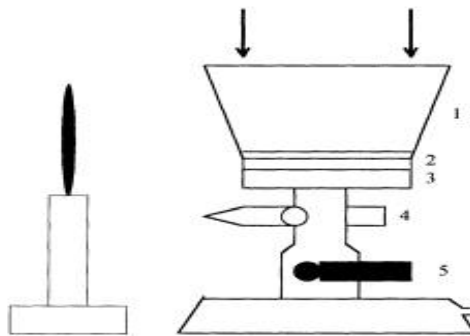
Appareil de filtration



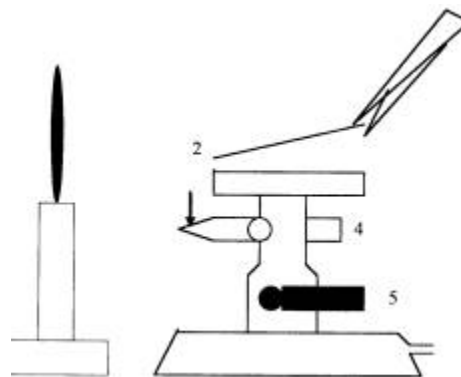
Appareil de filtration



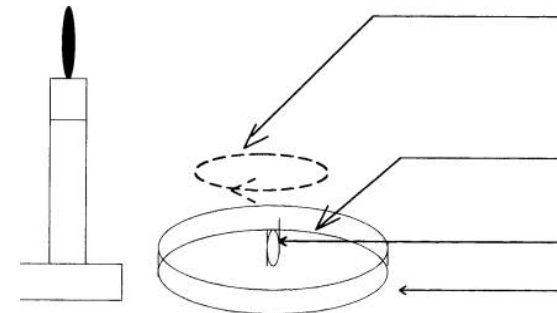
Stérilisation de la surface de l'appareil de filtration



L'échantillon est versé dans l'entonnoir



Récupération de la membrane



Dépôt de la membrane sur gélose

B. Mesure de la biomasse des bactéries

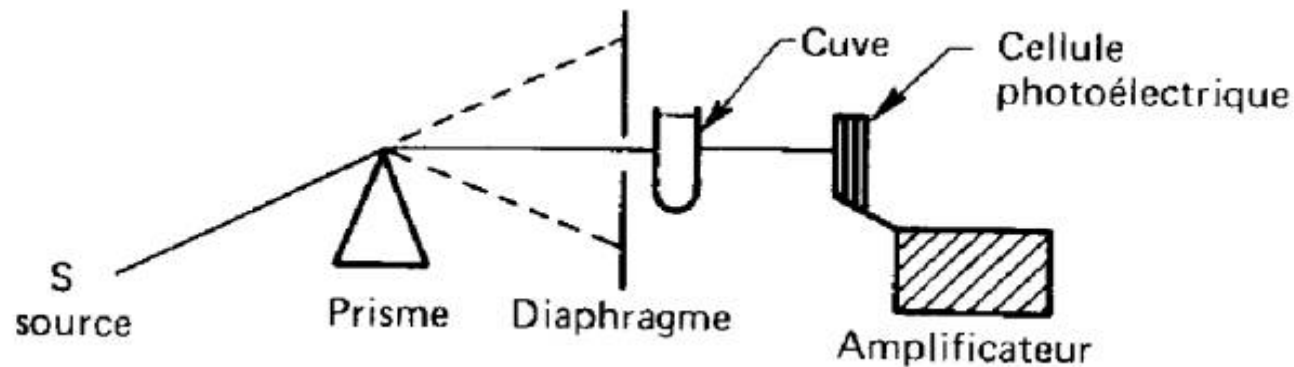
Mesure du trouble (ou absorbance)

Cette méthode consiste à suivre l'évolution de la population bactérienne en mesurant l'absorbance du milieu de culture grâce à un spectrophotomètre.

C'est la méthode la plus utilisée pour évaluer la masse microbienne.

Principe

C'est une méthode optique fondée sur la propriété que présente toute suspension de diffracter une partie de l'intensité d'un faisceau de lumière qui la traverse en ligne droite.



**Il existe une relation exponentielle entre la quantité de substance absorbant la lumière et la quantité de lumière absorbée.
La quantité de substance absorbante dépend de l'épaisseur de la solution traversée et de la concentration .**

La loi de Beer-Lambert exprime cette relation à travers la formule suivante:

$$I = I_0 \cdot 10^{-Klc}$$

I_0 = intensité de la lumière incidente ;
 I = lumière transmise ;
 l = épaisseur traversée (soit souvent 1 cm) ;
 K = une constante caractéristique de la substance.
 c = la concentration en substance.

On appelle absorbance ou densité optique (DO)

$$DO = \log(I / I_0) = K.c$$



il suffit de mesurer la DO pour en déduire la concentration C.

Mesure du poids sec

Les bactéries d'une suspension sont récoltées par centrifugation ou par filtration sur membrane.

Après le culot ou le filtre est desséché à 100-110°C jusqu'à poids Constant et on fait une pesée.

Le poids est généralement exprimé en grammes de matière sèche par litre.

Expression mathématique de la croissance.

A partir d'une unique cellule, on obtient deux cellules filles qui vont chacune donner à leur tour deux autres cellules et ainsi de suite, selon une progression géométrique :

1 cellule ---> 2 cellules ---> 4 cellules ---> 8 cellules ---> 16 cellules..

La croissance d'une bactérie placée dans des conditions favorables est définie par deux paramètres :

Le taux de croissance (μ) = nombre de divisions/ unité de temps.

$$(\mu = n/t = 1/G)$$

Le temps de génération (G) = temps qui sépare deux divisions successives.

$$(G = t/n)$$

Expression mathématique de la croissance

Temps	Nombre de cellules	
t_0	$N_0 = 1 N_0$	$N_0 = 2^0 N_0$
t_1	$N_1 = 2 N_0$	$N_1 = 2^1 N_0$
t_2	$N_2 = (2 \times 2) N_0$	$N_2 = 2^2 N_0$
t_3	$N_3 = (2 \times 2 \times 2) N_0$	$N_3 = 2^3 N_0$
t_n	$N_n = (2 \times 2 \times 2 \times 2 \dots n \text{ fois}) N_0$	$N_n = 2^n N_0$

n = nombre de divisions, $t_1 - t_0 = G$ et X_0 = nombre de cellules à t_0

$$N_n = 2^n N_0$$

(avec $\mu = n/t$ et $n = \mu t$)

$$N_n = 2^{\mu t} N_0$$

La croissance bactérienne est représentée par une courbe: $N = f(t)$

L'expression logarithmique de: $N = 2^{\mu t} N_0$



$$\log N = \log 2^{\mu t} N_0$$



$$\log N = \log 2^{\mu t} + \log N_0$$

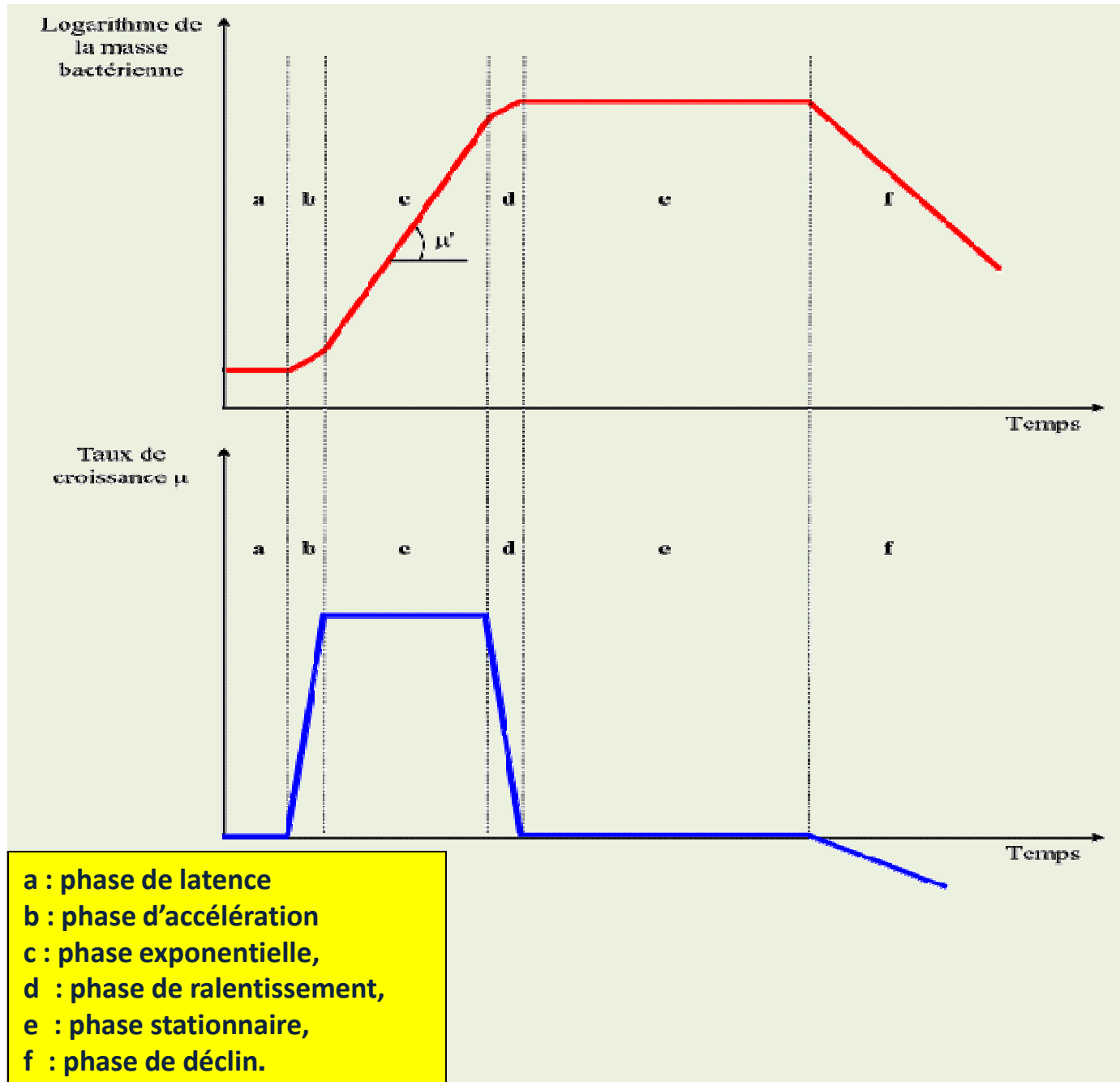
Donc,

$$\log N = \mu t \log 2 + \log N_0$$

$$(t = t_n - t_0)$$

$$\mu = (\log N_n - \log N_0) / (t_n - t_0) \log 2$$

Courbe de croissance en milieu non renouvelé



Phases de la croissance

Phase de latence :

le taux de croissance nul ($\mu = 0$).

Sa durée dépend de l'âge des bactéries, du taux d'inoculum et de la composition du milieu.

C'est le temp necessarie à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat (pas de phase de latence si repiquage sur milieu identique au précédent) .

Phase d'accélération

il se produit une augmentation de la vitesse de croissance.

Phase exponentielle

Le taux de croissance atteint un maximum ($\mu=\max$). Il est influencé par certains facteurs appelés paramètres d'action de la croissance (pH, température, la nature et la concentration des nutriments)

Cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante.

Le temps de doublement des bactéries est le plus court.

La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle).

Phase de ralentissement

La vitesse de croissance régresse.

Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets.

Il existe un début d'autolyse des bactéries.

Phase stationnaire

Le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$).

Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.

Phase de déclin

Le taux de croissance est négatif ($\mu < 0$).

Toutes les ressources nutritives sont épuisées.

Il y a accumulation de métabolites toxiques.

Il se produit une diminution d'organismes viables.

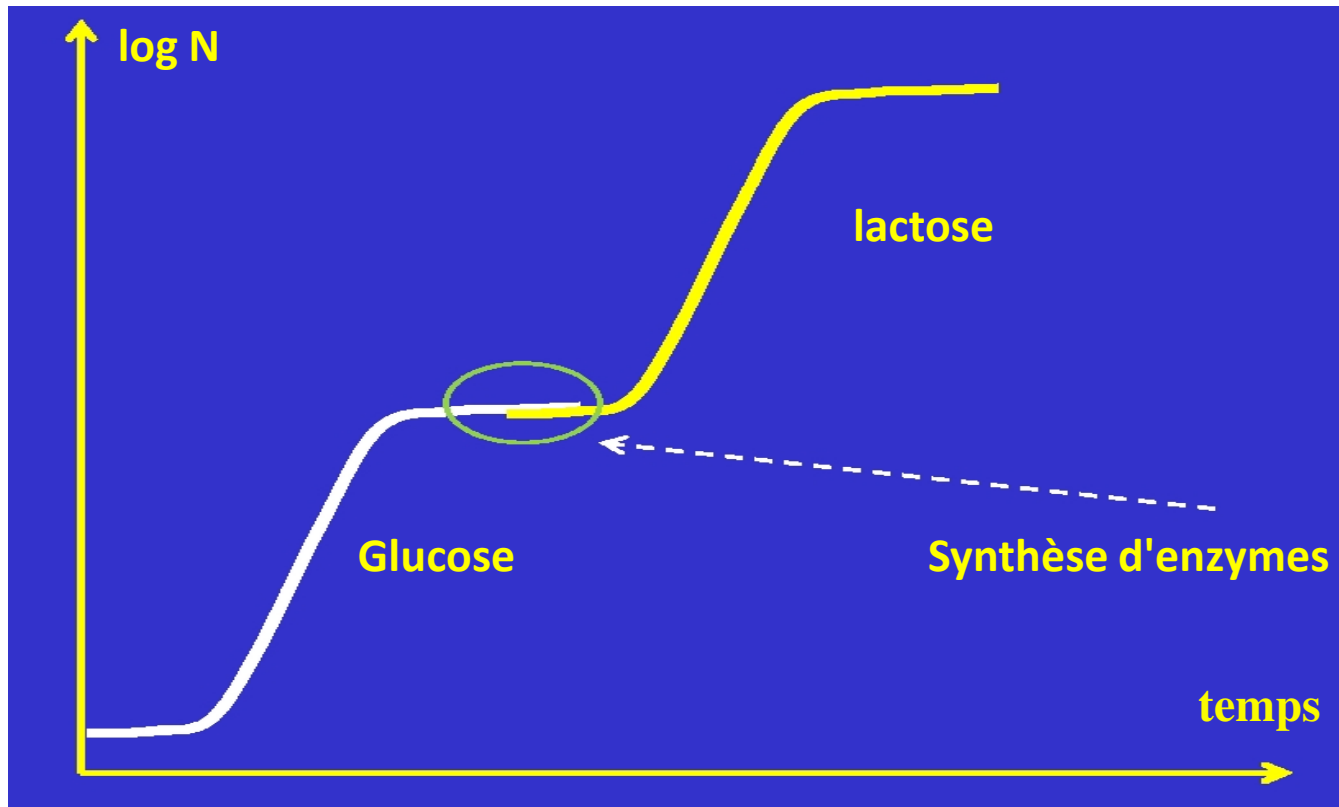
Lyse cellulaire sous l'action des enzymes lytiques endogènes.

Cas particuliers de croissance

Phénomène de diauxie

Croissance dans 1 milieu en présence de 2 substrats carbonées.

Exemple: croissance d'E. coli en présence de glucose et de lactose



La croissance cryptique

Croissance due à l'utilisation des constituants cellulaires comme substrats carbonés.

