

La croissance bactérienne

1° Mesure de croissance :

Il existe différentes méthodes de mesure de la croissance microbienne.

On utilise des méthodes de quantification des bactéries ou des levures : en fonction du temps, on suit l'évolution du nombre de micro-organisme par unité de volume du milieu.

Les conditions expérimentales de mesure de la croissance nécessitent:

- Une population homogène.
- Des paramètres physico-chimiques optimum.
- Une certaine quantité de nutriments.

1.1. Mesure du nombre de cellules :

1.1.1. Méthodes directes, détermination du nombre de cellules par unité de volume :

1.1.1.1. Numération directe au microscope optique :

La méthode est utilisée couramment pour les microbes de grandes tailles. Pour cela, on utilise un hématimètre.

Pour les bactéries de plus petites tailles, on utilise des grossissements forts, ce qui réduit la profondeur du champ donc, on utilise une chambre de comptage spéciale dont la profondeur de la cuvette est dix fois plus faible que celle d'un hématimètre.

Il y a une autre possibilité pour dénombrer les bactéries de petites tailles, c'est la technique de Breed.

- **Inconvénients :**
 - La suspension doit être dense.
 - C'est une technique longue et fastidieuse.
 - Si les bactéries sont mobiles, il faut ajouter du formol à 10%.
 - Si les bactéries forment des amas, on compte difficilement.
- **Avantages :**
 - Peu cher.
 - Apporte des informations sur la morphologie des cellules.

1.1.1.2. Numération au microscope optique à épi fluorescence :

Il détecte la fluorescence des cellules qui sont marquées par un fluorochrome.

L'acridine orange se fixe à l'ADN :

- Lorsque l'ADN est sous forme double brin : fluorescence verte.
 - Lorsque l'ADN est sous forme simple brin : fluorescence orange.
-
- **Avantages :**
 - Permet de différencier les cellules mortes des cellules vivantes.
 - **Inconvénients :**
 - Long et fastidieux.
 - Onéreux.
 - Le marquage est transitoire.
 - Les cellules en cours de division apparaissent orange.
 - Difficulté de comptage si les bactéries forment des amas.

1.1.2. Méthodes indirectes, dénombrements après culture :

Le dénombrement des micro-organismes viables après culture est peu utilisé. Il peut s'agir de dénombrement en milieu liquide ou en milieu solide. Dans la plupart des cas, une série de dilution au 10^{ème} de l'échantillon à analyser, est réalisée.

L'avantage est que l'on compte que les cellules vivantes et le principale inconvénient est le temps d'incubation.

La principale méthode parfois utilisée est le dénombrement en milieu solide. Ce type de dénombrement repose sur le principe, que chaque bactérie, après incubation, donne naissance à une colonie repérable macroscopiquement. Cependant, les bactéries ou les levures formant des groupements en suspension ne donneront qu'une seule colonie, c'est pourquoi, on n'exprime pas le résultat en nombre de cellules mais en unité formant colonie (UFC) par unité de volume.

1.1.2.1. Dénombrement dans la masse :

Après incubation, le nombre de colonies apparues dans la gélose peut être compté et représente le nombre d'UFC présents dans l'inoculum. Cette opération doit être effectuée en double essai avec les différentes dilutions de l'échantillon à analyser.

L'objectif est d'obtenir un nombre de colonie compris entre :

- 15 et 150 dans le cas d'un milieu sélectif ou contenant un indicateur coloré de pH.
- 30 à 300 dans le cas d'un milieu non sélectif.

1.1.2.2. Dénombrement en surface :

• Etalement en surface de la gélose :

On utilise une gélose solide coulée en boîte de Pétri. On étale 0,1 mL de suspension ou de sa dilution à la surface de la gélose à l'aide de bille de verre ou d'un râteau.

• Culture sur membrane filtrante :

Cette technique a pour but de concentrer les micro-organismes présents dans un grand volume de liquide. Les éléments du milieu gélosé vont diffuser vers les bactéries pour permettre leur croissance.

Après incubation, les colonies apparues sont comptées, il ne faut pas que le nombre de colonie soit supérieur à 100.

• Avantages :

- Permet d'analyser des produits solides et liquides.
- Relativement fiables.
- Permet la culture de tous les micro-organismes étudiés.

• Inconvénients :

- Ne permet pas d'analyser des volumes importants de liquides.
- Nécessite 24h au minimum d'incubation.

1.2. Mesure du trouble de la solution :

C'est la turbidimétrie, procédé simple, rapide et actuellement très utilisé.

Cette technique permet d'évaluer la concentration cellulaire en utilisant un spectrophotomètre à 650 nm.

Plus il y a de micro-organismes, plus la lumière est réfléchiée et plus l'intensité du faisceau restant est faible, plus la valeur d'absorbance est grande.

- **Avantages :**

- Peu onéreux.
- Rapide.

- **Inconvénients :**

- Pas applicable pour les milieux de culture très colorés.
- Ne permet pas de différencier les cellules mortes des vivantes.
- Faire des dilutions si $A > 0,8$.

1.3. Détermination du poids sec :

Les micro-organismes sont récoltés par centrifugation ou par filtration sur membrane.

Après lavage soigneux à l'aide d'un tampon approprié, le culot, ou le filtre, est desséchée à environ 100°C.

On laisse refroidir à température ambiante puis les micro-organismes sont pesés. On exprime le résultat en gramme de matière sèche par litre.

- **Avantages :**

- Pas cher.

- **Inconvénients :**

- Pas de distinction entre cellules mortes et cellules vivantes.
- Technique délicate et les différentes peuvent conduire à des pertes de matières cellulaires.

1.4. Mesure des constituants cellulaires :

La propriété du constituant cellulaire recherché est qu'il :

- Doit être retrouvé uniquement dans les cellules et pas dans le milieu de culture.
- Doit se retrouver à un taux constants dans les cellules quelque soit leur état physiologique.
- Le constituant cellulaire idéal pour ce type de mesures devrait disparaître des cellules après leur mort afin de distinguer les cellules vivantes des mortes.

1.5. Mesure de l'activité cellulaire :

1.5.1. Mesure de la consommation de substrat :

La quantité de substrat consommé dans un milieu pendant un temps donné va refléter la quantité de germes présents.

L'avantage est que l'on compte les cellules vivantes et l'inconvénient est que c'est peu fiable.

1.5.2. Mesure des variations physico-chimiques du milieu :

Les variations physico-chimiques du milieu traduisent une évolution de la croissance.

2° Etude de la croissance en milieu non renouvelé :

On étudie la croissance des bactéries dans un erlenmeyer contenant un bouillon nutritif et on n'ajoute aucune substance nutritive au cours de l'expérience.

2.1. Courbe de croissance :

On étudie la croissance d'une souche d'*Acinetobacter*. Pour cela, on ensemence un bouillon avec 10^{-5} bactéries. Le milieu est agité et toutes les heures, on prélève un échantillon sur lequel on réalise le comptage des bactéries. On détermine donc N, le nombre de cellules bactériennes.

2.2.1. Courbe $n = f(t)$:

2.2.1.1. Commentaire :

Après la phase de latence, pendant laquelle il n'y a aucune croissance, on observe une augmentation du nombre de cellules en fonction du temps : phase de croissance. Puis, la croissance s'arrête : phase stationnaire, N reste constant en fonction du temps. Ensuite, le nombre de cellules chute en fonction du temps : phase de déclin.

2.2.1.2. Interprétation :

- **Phase de latence :**

Elle correspond au temps nécessaire pour les bactéries présentes dans l'inoculum pour mettre en place tous les systèmes enzymatiques qu'elles ont besoins pour leur croissance. Ces systèmes étaient soit inactif, soit absent, c'est-à-dire que soit la bactérie ne se multiplie pas, soit la bactérie ne dispose pas de systèmes enzymatiques nécessaires au catabolisme des substrats du milieu de culture. Les bactéries nécessitent du temps pour induire l'expression de nouvelles enzymes.

- **Phase de croissance :**

Les bactéries se multiplient grâce à leurs équipements enzymatiques.

- **Phase stationnaire :**

Différents facteurs permettent d'expliquer l'existence de cette phase. Il n'y a plus de substrat car la quantité est limitée. La production de déchets qui ne pas éliminé.

- **Phase de déclin :**

Les cellules sont mortes car il n'y a plus de nutriments, plus de multiplication, il y a lyse des cellules par des déchets ou des enzymes libérées.

2.2.2. Courbe $\ln N = f(t)$:

Le graphe $\ln N = f(t)$, permet une exploitation beaucoup plus précise de la phase de croissance car elle est ici linéaire. Cette courbe permet de déterminer plus précisément les paramètres de la croissance. On distingue six phases :

- **Phase de latence :**

Pas de croissance, $\ln N$ est constant.

- **phase d'accélération de la croissance :**

Le nombre de divisions commence à augmenter, $\ln N$ augmente.

- **phase exponentielle :**

Les cellules se divisent à une vitesse maximum, $\ln N$ augmente linéairement.

- **phase de ralentissement de la croissance :**

La division cellulaire ralentit, $\ln N$ augmente faiblement.

- **phase stationnaire :**

La croissance s'arrête, $\ln N$ est maximum et constant.

- **phase de déclin :**

$\ln N$ diminue.

2.2. Les paramètres de la croissance :

2.2.1. Définition :

2.2.1.1. Le temps de génération :

C'est le temps nécessaire au doublement de la population en minutes ou en heures. On définit le nombre de division par :

$$G = \frac{t}{n}$$

Si N_0 = inoculum, alors $N = 2n \times N_0$.

2.2.1.2. Le taux supérieur de la croissance ou vitesse spécifique de la croissance, μ :

Il correspond à la pente de la phase exponentielle de croissance de la courbe $\ln N = f(t)$.

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

2.2.1.3. Le taux horaire de la croissance, r :

Parfois, on utilise X pour N .

Si au temps t , Z et si au temps $t + 1$, $X + 1$, alors, $r = (X + 1) / X$.

2.2.2. Détermination des paramètres de la croissance :

2.2.2.1. G :

Graphiquement, on choisit une valeur de $\ln N$ pendant la phase exponentiel et un $\ln N$ du double de ce N . On reporte les deux valeurs sur l'axe des abscisses et on lit directement la valeur de G . Par le calcul, $\mu = \ln 2 / G$.

2.2.2.2. μ :

Graphiquement, $\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$. Par le calcul, $\mu = \ln 2 / G$.

2.2.2.3. Durée de la phase de latence, t_L :

Elle est comprise entre 3 et 4 heures. Comme on n'a pas de valeur intermédiaire pour déterminé le moment précis à partir duquel $\ln N$ commence à augmenter, on procède graphiquement :

- On trace la droite horizontale passant de $\ln 0$.
- On prolonge la phase exponentielle.
- L'abscisse du point d'intersection des deux points donne la durée de la phase de latence.

2.3. Physiologie des phases :

2.3.1. Phase de latence :

La vitesse de croissance est nulle, le nombre de bactérie restent égal à celui de l'inoculum. Durant cette phase, les bactéries se préparent à la croissance, c'est une phase d'adaptation. La durée dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu.

2.3.2. Phase d'accélération :

$\ln N$ commence à augmenter mais pas de façon linéaire. Certaines bactéries commencent à se diviser mais pas toutes.

2.3.3. Phase exponentielle :

Pendant cette phase, les bactéries se multiplient et la vitesse spécifique de croissance est maximale et constante. C'est uniquement pendant cette phase que l'on peut déterminer les paramètres μ et G de la croissance.

2.3.4. Phase de décélération :

Ln N continue d'augmenter mais de façon moins importante. Les micro-organismes se divisent moins. La croissance ralentit. A ce stade, les micro-organismes sont très nombreux dans le milieu. De plus le catabolisme des micro-organismes produit des déchets qui s'accumulent dans le milieu.

2.3.5. Phase stationnaire :

Durant cette phase, la croissance s'arrête, le nombre de bactéries reste constant et maximal. Cette phase peut correspondre à différents états physiologiques :

- Cette phase peut être un équilibre entre le nombre de cellule qui se multiplient et les cellules qui meurt et sont autolysées.
- Les bactéries restent vivantes mais ne se multiplient plus.

2.3.6. Phase de déclin :

Ln N diminue de manière constante. Le nombre de micro-organismes diminue. Il n'y a plus du tout de division cellulaire et les micro-organismes meurent. Il y a une autodestruction des cellules.

3° Le phénomène de diauxie :

Dans le milieu synthétique contenant un mélange d deux substrats carbonés, on peut observer une courbe anormale diphasique. Ce phénomène a été décrit par Monod sous le nom de diauxie.

4° Les facteurs influençant la croissance :

4.1. La composition influençant la croissance :

Les substances chimiques qui composent un milieu peuvent avoir 3 types d'effets sur la croissance :

- Stimuler la croissance.
- Inhiber la croissance.
- Arrêter définitivement la croissance.

4.2. Nature et concentration des substrats :

La vitesse spécifique de croissance d'une espèce dépend étroitement du milieu dans lequel on la cultive.

4.3. La température :

Pour une espèce donnée, on peut définir une température optimale de croissance. Selon la valeur optimale de la température, on définit différentes catégories définies dans le cours nutrition. Dans les conditions expérimentales optimales de milieu, on peut observer trois types de courbes de croissance correspondant aux trois principales catégories de micro-organismes :

- Mésophiles.
- Thermophiles.
- Psychrophiles.

4.4. La pH :

Comme pour la température, on peut définir un pH optimal de croissance.

4.5. La disponibilité en eau :

Les micro-organismes exigent un certain taux d'humidité pour leur croissance. L' A_w quantifie la disponibilité de l'eau. Sa valeur est comprise entre 0 et 1.

5° La croissance synchrone et asynchrone :

Dans une population bactérienne, toutes les cellules ne se divisent pas rigoureusement au même moment, la courbe de croissance obtenue est donc une évaluation moyenne de l'évolution de la population bactérienne (croissance asynchrone).

Si toutes les cellules se divisaient au même instant, la courbe de croissance montrerait des paliers successifs exprimant le doublement de la population (croissance synchrone).