

# **Chapitre 5**

## **Croissance bactérienne**

## Chapitre 5

### Croissance bactérienne

#### 1. Introduction

Chez les microorganismes unicellulaires, la croissance conduit à une augmentation du nombre d'individus c'est donc l'équivalent d'une multiplication. Le milieu liquide constitue le milieu favorable à l'étude de la croissance bactérienne (figure 49).

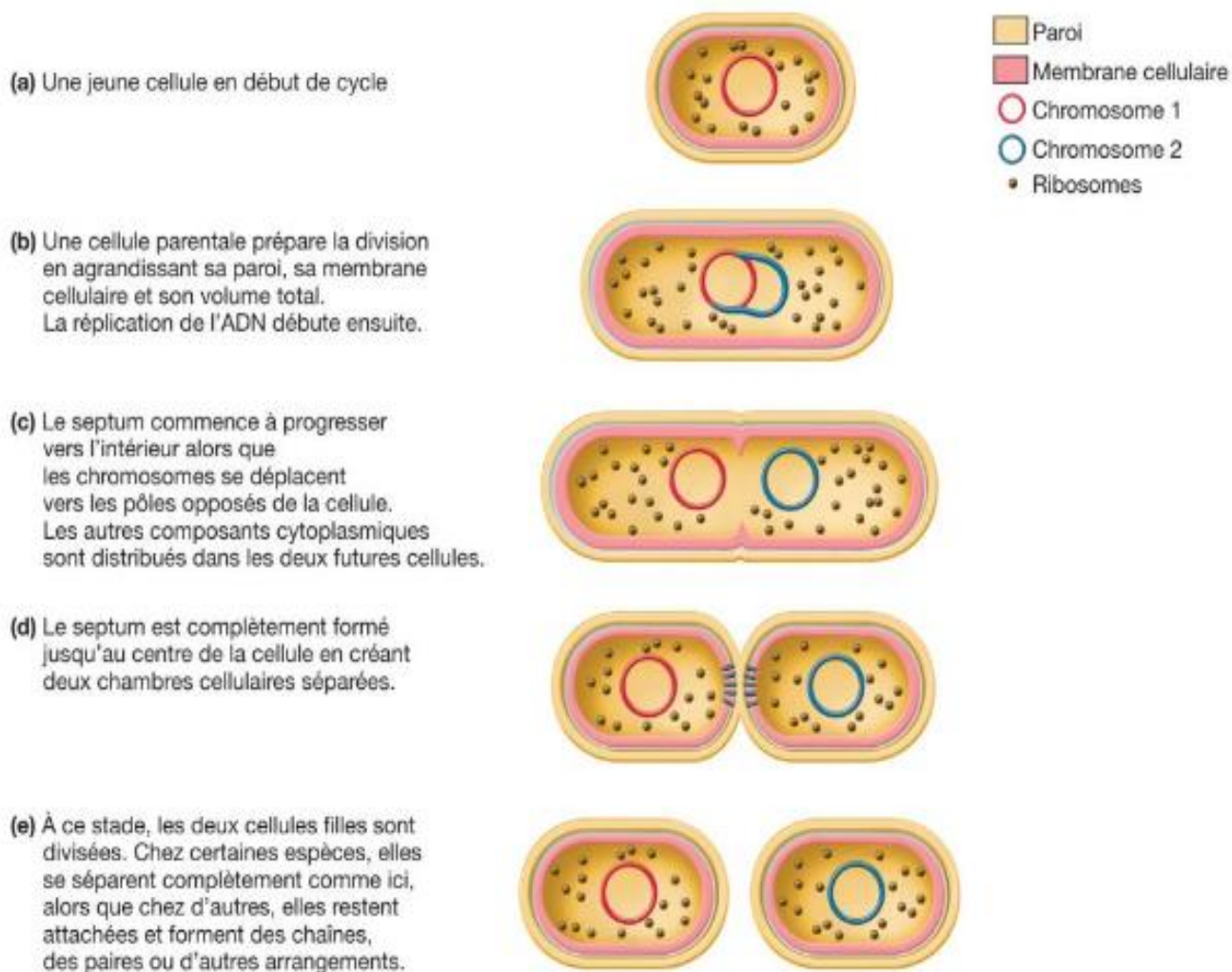


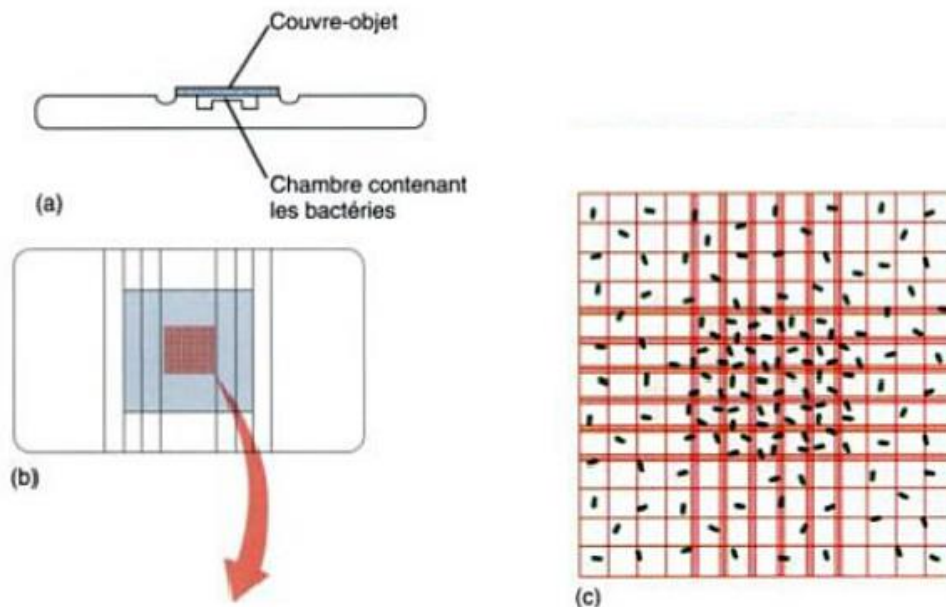
Figure 49 : La division par scissiparité (Prescott *et al.*, 2018)

## 5.1. Méthodes de mesure de la croissance bactérienne

Les techniques de mesure de la croissance sont basées sur l'évaluation du nombre de bactéries ou de leur masse par unité de volume ou de poids du milieu. On peut dans certains cas utiliser des méthodes indirectes en mesurant un paramètre lié à l'activité métabolique : consommation d'un substrat, une molécule excrétée dans le milieu, etc...

### 5.1.1. Mesure du nombre de cellules

C'est la détermination de la concentration cellulaire exprimée en nombre de bactéries par unité de volume elle s'effectue par **lecture au microscope** (numération totale), c'est une technique couramment utilisée pour les bactéries, les levures et les spores de mycètes. On se sert d'un hématimètre de Malassez ou de la cellule de Thoma. Il s'agit d'une lame en verre dont l'une des faces est creusée d'une cavité de profondeur connue et dont le fond porte des quadrillages de surface également connue. La suspension bactérienne est placée dans la cuvette puis recouverte d'une lamelle. Des volumes précis sont ainsi délimités au niveau des quadrillages dans lesquels les cellules sont comptées au microscope. Le nombre de microorganisme dans un échantillon est calculé en tenant compte du volume de la chambre et de la dilution de l'échantillon. Pour obtenir des résultats fiables la population microbienne doit être suffisamment dense. On note aussi que cette méthode prend en compte toutes les cellules aussi bien mortes ou vivantes.



Exp : Profondeur :  $P = 0,1 \text{ mm}$

Côté:  $a = 0,2 \text{ mm}$

volume=  $V = a^2p = 0,2 \times 0,2 \times 0,1 = 4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$

$$= 4 \times 10^{-6} \text{ ml}$$

Moyenne = 50 bactéries dans  $4 \times 10^{-6}$  ml

donc

On a 50 bactéries  $\longrightarrow 4 \times 10^{-6}$  ml

X cellules dans  $\longrightarrow 1$  ml

$$X = 50 \times 1 / 4 \times 10^{-6} \text{ ml} = 12,5 \times 10^6 \text{ cellules /ml}$$

### 5.1.2. Dénombrement après culture (numération viable)

**5.1.2.1. Dénombrement en milieu solide** : le dénombrement des bactéries viables est une méthode communément utilisée. Un volume fixe (0,1 à 1 ml) de la culture mère ou des dilutions décimales (préparées à partir de la solution mère) est étalé à la surface d'un milieu gélosé ou incorporé au milieu avant sa solidification. Après incubation à une température convenable, le nombre de colonies apparues correspond au nombre d'unités formant une colonie (UFC) présentes dans le volume analysé de la suspension.

La suspension doit être homogène et ceci par agitation mécanique.

➤ **Expression des résultats :**

$$N = \frac{\sum C_n}{(n_1 \times v_1)d_1 + (n_2 \times v_2)d_2 + \dots + (n_n \times v_n)d_n}$$

$C_n$  : nombre de colonies comptées sur les boîtes retenues

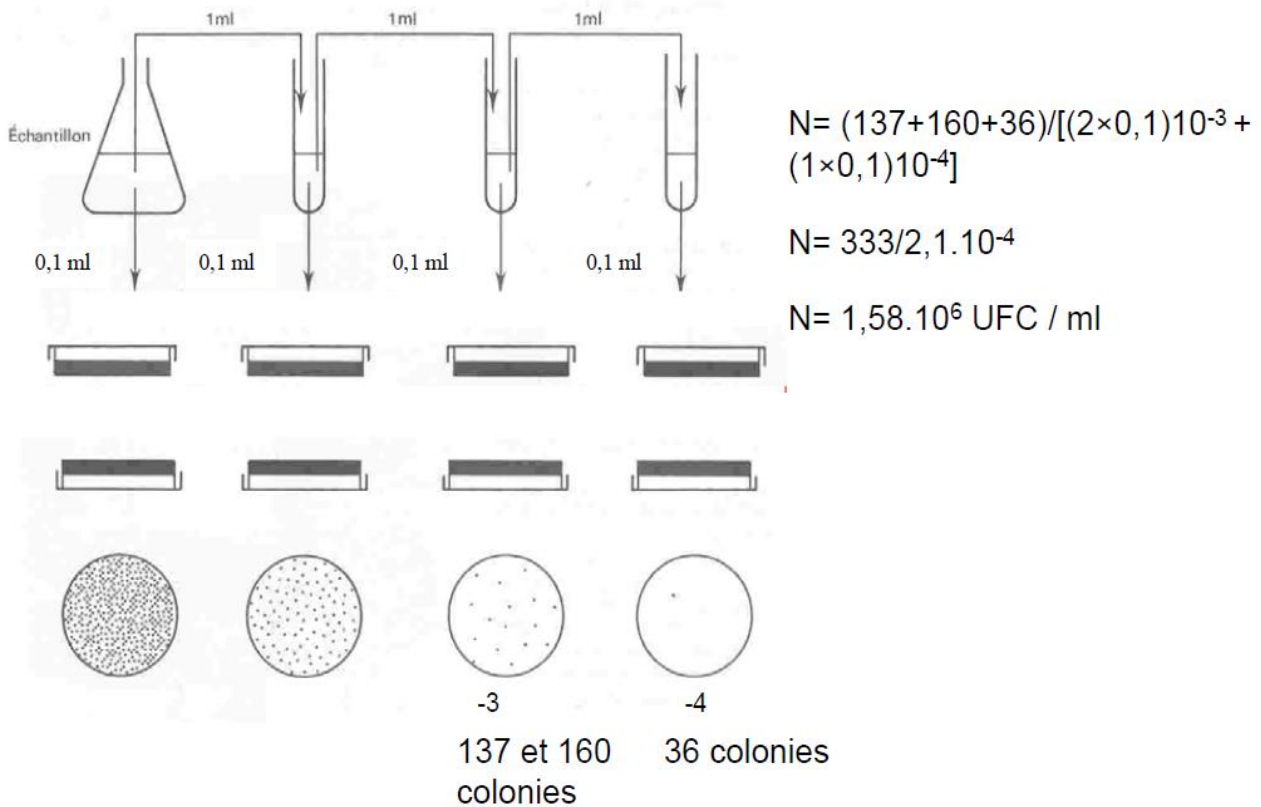
$n_n$  : nombre de boîtes retenues de la n-ième dilution

$v_n$  : volume de l'inoculum de la n-ième dilution

$d_n$  : valeur de la n-ième dilution

Le nombre de colonies retenues après lecture des boîtes devra être compris entre 30 et 300. Il est impossible de compter une boîte contenant plus de 300 colonies. Le risque d'erreur est trop important donc elles sont écartées. Les boîtes contenant moins de 30 colonies sont elles aussi écartées, les colonies sont trop rares et peuvent induire en erreur.

Exemple :

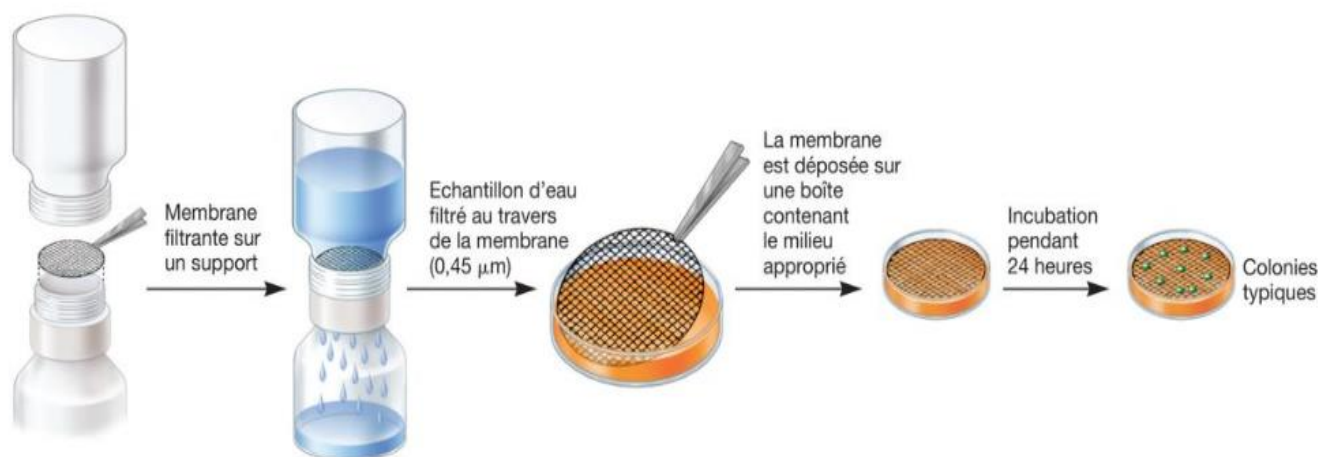


### 5.1.1.2. Mesure par filtration sur membrane

Très utiles lorsque le nombre des bactéries est très bas ,

Principe :

- Passage d'un grand volume à travers un filtre dont les pores ont un diamètre inférieur à la taille des bactéries (figure 50).
- Toutes les bactéries du volume filtré sont retenues sur le filtre
- Dépôt du filtre à la surface d'un milieu gélosé adéquat
  - Après incubation, comptage des colonies qui, si elles ne sont pas trop nombreuses proviennent chacune d'1 ufc
- Calcul de la concentration dans le produit filtré.



**Figure 50** : Le procédé de filtration sur membrane (Prescott *et al.*, 2018)

**5.1.1.3. Dénombrement en milieu liquide ( Méthode du nombre le plus probable (NPP ou MPN** Most Probable Number en anglais), méthode statistique utilisée pour le dénombrement de microorganismes en milieu liquide.

Si les conditions optimales de croissance sont réunies, un seul micro-organisme présent dans l'inoculum introduit dans un milieu liquide se développe en y créant un trouble (et une modification visible du milieu si celui-ci est discriminatif). La lecture des tubes contenant le milieu liquide et ensemencés avec l'inoculum est donc de type binaire :

- résultat négatif si absence de trouble et de modification du milieu : il y avait moins de un micro-organisme présent dans l'inoculum introduit dans le milieu liquide
- résultat positif si présence de trouble (et de modification du milieu si celui-ci est discriminant) : il y avait au moins un micro-organisme présent dans l'inoculum introduit dans le milieu liquide.

On ensemence donc une série de tubes avec un volume donné du produit à analyser ou ses dilutions, à raison de 1, 2, 3, 5 tubes par dilution testée. Connaissant le nombre de résultats positifs obtenus dans la série de tubes, on peut déterminer le nombre caractéristique

#### **Mise en place du nombre caractéristique**

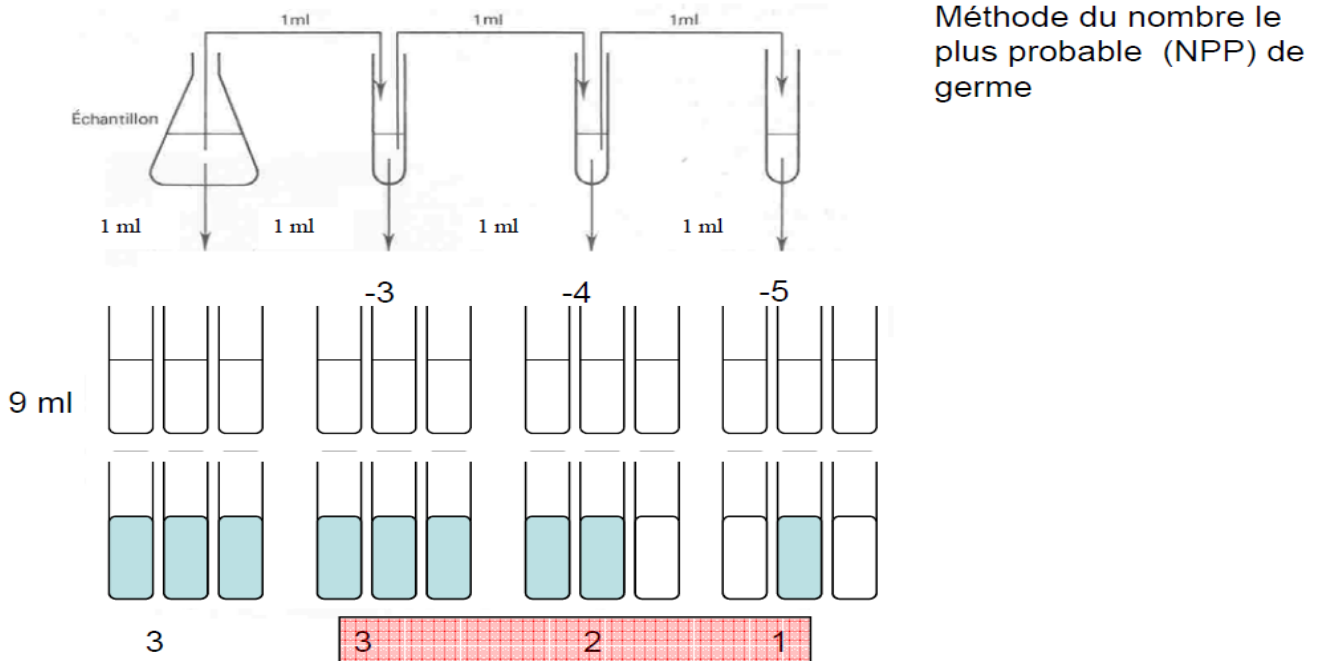
Le nombre caractéristique de la série réalisée est une combinaison de trois chiffres :

- chaque chiffre correspond au nombre de tubes « positifs » pour une dilution donnée ;
- les trois chiffres correspondent à trois dilutions successives ;

--le chiffre des centaines correspond à la plus faible dilution (donc à la plus forte concentration en micro-organismes), celui des dizaines à la dilution intermédiaire et celui des unités à la plus grande dilution.

--On reporte le nombre caractéristique de la série dans la table statistique de Mac Grady

Exemple :



**Exemple :** 321 correspond au NPP de 15. Cela signifie qu'il y a statistiquement quinze bactéries dans l'inoculum de la dilution  $10^{-3}$

**Expression du résultat**

$$N = \frac{NPP \times k}{V}$$

N : nombre de micro-organismes par ml de produit analysé ou de suspension mère.

NPP : le nombre lu dans la table de Mac Grady.

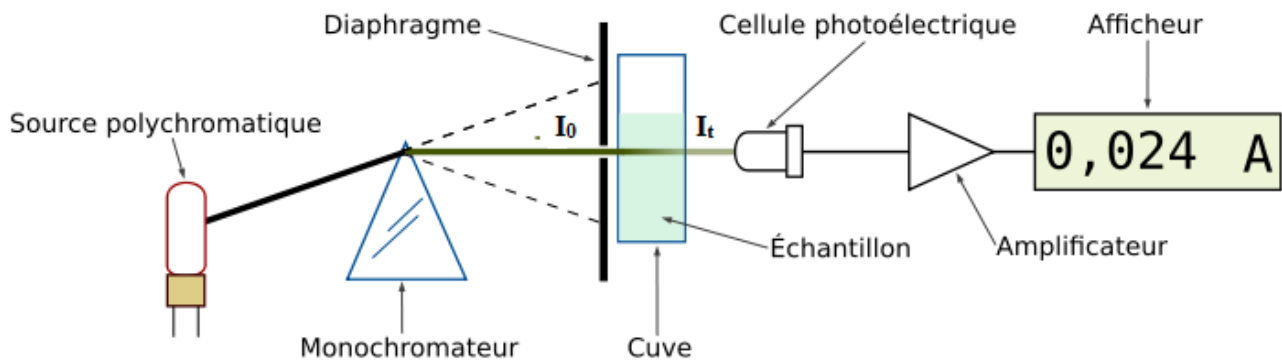
K : facteur de dilution correspondant au chiffre des centaines du nombre caractéristique.

V : volume de l'inoculum (1ml en général)

## 5.1.2. Mesure de la masse

**5.1.2.1. Détermination du poids sec :** les microorganismes sont récoltés par centrifugation ou par filtration sur membrane d'un volume fixe. Après lavage soigneux, le culot ou le filtre est séché à 100-110 °C jusqu'à poids constant que l'on exprime généralement en gramme de matière sèche/ litre. Cette méthode est très longue et peu sensible. Elle est utilisée surtout pour les levures et les mycètes.

**5.1.2.2. Mesure du trouble :** c'est le procédé le plus utilisé pour évaluer la masse microbienne. Il s'agit d'une méthode optique générale, basée sur la propriété que présente toute solution d'absorber une partie de l'intensité d'un faisceau de lumière qui la traverse en ligne droite (figure 51). Des appareils spéciaux, comme le spectrophotomètre qui donne directement la valeur de cette absorbance à une longueur d'onde de 650 nm. Dans le cas où la valeur de la DO dépasse 0,6 on doit diluer l'échantillon analysé pour rester dans le domaine linéaire de la loi de Beer Lambert.



**Figure 51:** Détermination de la masse microbienne par mesure de l'absorption de la lumière (Prescott *et al.*, 2018)

Loi de Beer Lambert :  $DO = \text{Log } I_0 / I_t = K \cdot C \cdot l$

DO = Densité optique = A = absorbance

$I_0$  = intensité de lumière incidente

$I_t$  = intensité de lumière transmise

K = coefficient d'extinction

L = le trajet optique = 1 cm.

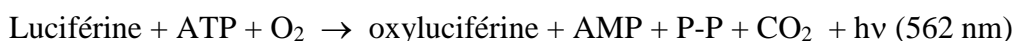
C = la concentration en cellules

Cette méthode ne peut pas être utilisée dans le cas de bactéries productrices de pigments diffusibles.

### 5.1.3. Mesure indirecte par l'activité métabolique

On peut suivre la variation du pH, la consommation d'oxygène, de l'ATP par le test de la luciférase.

L'ATP-métrie correspond à la réaction suivante.



Conséquence : concentration en ATP est proportionnelle à l'intensité de la lumière émise

### *Relation concentration en ATP et concentration en bactéries*

- Toute cellule vivante produit et consomme de l'ATP
- Pas de fabrication d'ATP par les bactéries ou cellules mortes.
- Quantité d'ATP par cellule quasi constante dans une bactérie vivante, donc concentration en ATP proportionnelle à la concentration en cellules

#### Conséquence

Suivi de la variation de la concentration en ATP permet de suivre la variation de la concentration en bactéries

## **5.2. Paramètres de la croissance en discontinue (ou en BATCH)**

Dans la culture en milieu batch les éléments nutritifs ne sont pas renouvelés, la phase de croissance ne dure que quelques heures.

La croissance d'une bactérie placée dans des conditions idéales de culture peut être définie par deux constantes : le temps de génération et le taux de croissance.

### **5.2.1. Temps de génération (G) :**

C'est l'intervalle de temps entre deux divisions successives ou celui nécessaire au dédoublement de la population. Si nous partons d'une cellule bactérienne unique, son accroissement se fait selon une progression géométrique :  $1 \rightarrow 2 \rightarrow 4 \rightarrow 8$ , etc.

Le temps de génération (G) est donc le temps nécessaire au doublement de la population en minutes ou en heures.

$$\mathbf{G = t / n}$$

t = temps (connu)

n = nombre de divisions

### **5.2.2. Taux de croissance ( $\mu$ ):**

On le définit comme étant le nombre de divisions par unité de temps :

$$\mathbf{\mu = n/t}$$

t = temps (connu)

n = nombre de divisions

### 5.2.3. Expressions mathématique de la croissance

Si on a une population bactérienne à une concentration initiale  $N_0$  elle augmente à chaque génération de la façon suivante :

Après 1 génération :  $N_1 = 2N_0$

2 générations :  $N_2 = 2N_1 = 2 \times 2N_0 = 2^2 N_0$

3 générations :  $N_3 = 2N_2 = 2 \times 2 \times 2N_0 = 2^3 N_0$

n générations :  $N_n = 2^n \times N_0 \dots\dots\dots(1)$

On a  $\mu = n / t$  donc  $n = \mu t \dots\dots\dots(2)$

Si on remplace la formule 2 dans la formule 1 on trouve :

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

$$2^{\mu t} = N_n / N_0 \dots\dots\dots(3)$$

Si On prend la forme logarithmique à base de 2 de la formule 3 :

$$\text{Log}_2 2^{\mu t} = \text{Log}_2 N_n / N_0$$

$$\mu t = \text{Log}_2 N_n / N_0$$

$$\mu t = \text{Log}_2 N_n - \text{Log}_2 N_0$$

$$\text{Log}_2 N_n = \mu t + \text{Log}_2 N_0$$

$y = ax + b$  —> fonction d'une droite , pente de la droite  $\mu$

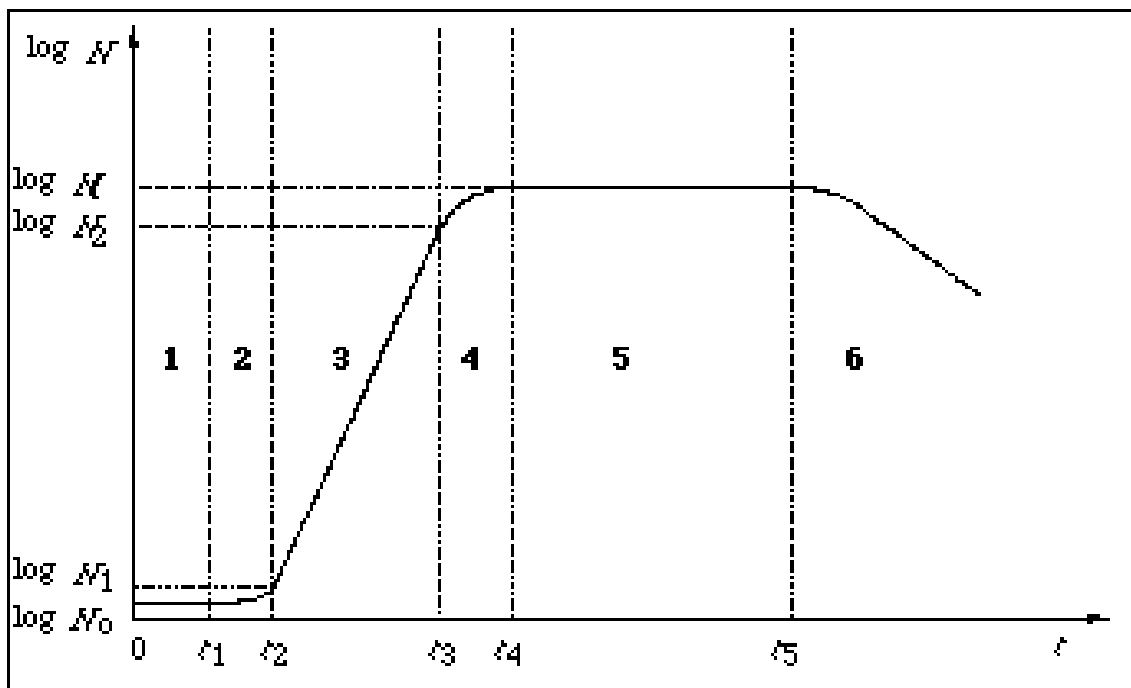
$$\text{Log}_2 N_n - \text{Log}_2 N_0$$

$$\mu = \frac{\text{Log}_2 N_n - \text{Log}_2 N_0}{t_n - t_0}$$

### 5.3. Courbe de croissance (culture discontinue)

La représentation graphique de la croissance s'effectue en coordonnées semilogarithmique. Le nombre ou la masse bactérienne étant traduit en nombre logarithmique sur l'ordonnée, le temps en nombre arithmétique sur l'abscisse (figure 52).

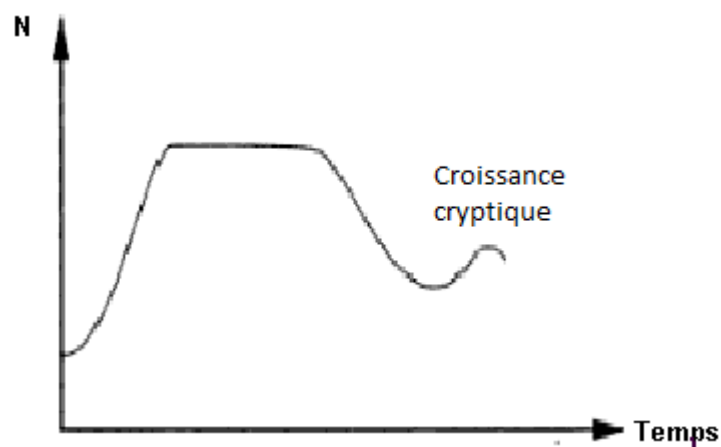
Le graphe  $\log N = f(t)$ , permet une exploitation précise de la phase de croissance car elle est linéaire. Cette courbe permet de déterminer plus précisément les paramètres de la croissance. On distingue six phases :



**Figure 52 :** Courbe de croissance (culture discontinue)

Phase	Nom	Signification physiologique
1	<b>Phase de latence</b>	la croissance n'a pas encore débutée, la bactérie s'adapte au milieu dans lequel elle se trouve (synthèse d'enzymes métaboliques par exemple).  La durée de cette phase varie selon le germe étudié, la concentration de l'inoculum, l'état physiologique de la souche (âge), la composition du milieu ... <b><math>N=N_0</math> et <math>\mu=0</math>.</b>
2	<b>Phase d'accélération</b>	$N$ commence à augmenter mais pas de façon linéaire. Certaines bactéries commencent à se diviser mais pas toutes. <b><math>N</math> et <math>\mu</math> augmentent</b>
3	<b>Phase exponentielle de croissance</b>	Chaque cellule se divise pour former deux cellules qui vont à leur tour se diviser pour produire plus de cellules. <b>La vitesse de</b>

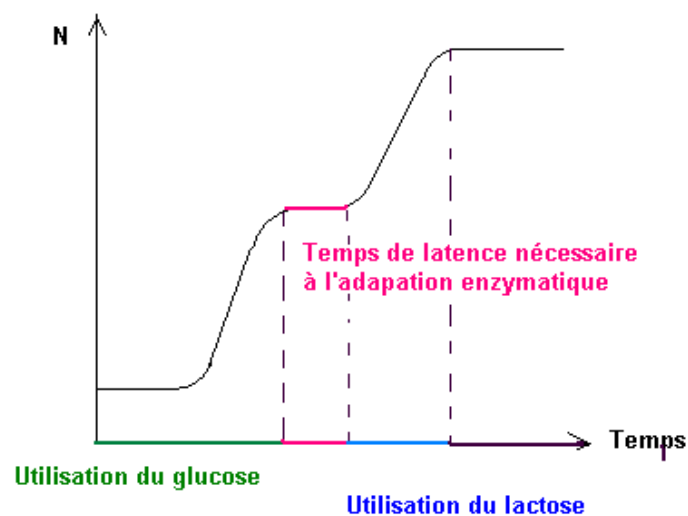
		<p><b>division est maximale et constante. Donc l'activité physiologique est maximale.</b></p> <p>Cette phase dure jusqu'à épuisement des éléments nutritifs du milieu</p> <p><b>. (<math>\mu</math> maximale et constante elle est déterminée par la pente de la droite, G diminue et N augmente</b></p>
4	<b>Phase de ralentissement</b>	<p>La vitesse de croissance diminue. N continue à augmenter mais certaines bactéries ont stoppé leur développement (<b><math>\mu</math> diminue, G augmente et N augmente faiblement.</b></p>
5	<b>Phase stationnaire</b>	<p>Le milieu n'est plus favorable à la croissance et la population reste constante. Deux possibilités :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>_ l'un des nutriments essentiels à la croissance s'épuise dans le milieu</li> <li>_ un ou plusieurs déchets issus du métabolisme s'accumulent dans le milieu et inhibent la croissance.</li> </ul> <p><b>(N maximal et constant, <math>\mu=0</math>, G augmente).</b></p>
6	<b>Phase de déclin</b>	<p><b>N diminue, <math>\mu</math> est négative <math>\mu &lt; 0</math>.</b> Les bactéries ne se divisent plus et sont lysées.</p> <p>Dans certains cas, les bactéries survivantes peuvent débuter une nouvelle phase de croissance aux dépens des substances libérées par la lyse. Le phénomène est connu sous le nom de croissance cryptique ou phénomène de cannibalisme..</p>



**Figure 53 :** Phénomène croissance cryptique

Dans certains cas, les bactéries survivantes peuvent débiter une nouvelle phase de croissance aux dépens des substances libérées par la lyse. Le phénomène est connu sous le nom de croissance cryptique ou phénomène de cannibalisme (figure 52).

Dans d'autres conditions (figure 53), on peut observer des courbes de croissance plus complexes, avec souvent deux phases de croissance exponentielle séparées par une phase de latence. Cette croissance biphasique ou "*diauxie*", ou *croissance double*, est observée avec certaines bactéries poussant dans un milieu contenant un mélange de deux substrats carbonés. La première phase de croissance correspond à l'utilisation exclusive d'un des composés, elle est suivie d'une période d'adaptation et d'une deuxième phase de croissance où le deuxième composé est métabolisé



**Figure 54 :** Phénomène de diauxie ou croissance biphasique.

Ce phénomène a été remarqué chez *E. coli* cultivé sur un milieu contenant du glucose et du lactose. Le glucose est utilisé lors de la première phase exponentielle et le lactose durant la deuxième phase exponentielle. Ce phénomène est expliqué par l'inhibition de la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase par le glucose et ce n'est qu'après épuisement total du glucose que la synthèse de l'enzyme peut avoir lieu durant la deuxième phase de latence.

Les sucres sont classés en deux groupes G1 (utilisé durant la première phase exponentielle) et G2 (utilisé durant la deuxième phase exponentielle) :

G1 : glucose, saccharose, fructose et mannose.

G2 : maltose, sorbitol, arabinose et inositol.