

1 - DIVISION BACTERIENNE

La bactérie se multiplie par fission binaire : la bactérie grandit puis se divise en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire. Durant la division, l'ADN se duplique ainsi que les autres constituants. Divers systèmes enzymatiques de synthèse et de dégradation participent à la division cellulaire.

2 - DYNAMIQUE DE LA CROISSANCE

La croissance se définit généralement comme le développement ordonné des composants d'un organisme, ce qui se traduit, par exemple, par un accroissement de taille et de volume. La croissance bactérienne s'apparente plutôt à celle de la population, laquelle se traduit par une augmentation du nombre d'individus dans la colonie. L'accroissement est donc synonyme de multiplication cellulaire. Parallèlement, cet accroissement se traduit, pour les individus dans la population, par une diminution de la quantité de matières nutritives disponibles et de leur espace vital, corrélativement, par une augmentation des déchets dans le milieu, lesquels modifient substantiellement le pH, le potentiel d'oxydo-réduction, la conductivité, la pression osmotique, la tension superficielle, la viscosité, etc.

Définition

- a. *Accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme*
- b. *Au niveau cellulaire, la conséquence est la division de la cellule*
- c. *On observe donc chez les organismes*
 1. *Pluricellulaires : une augmentation de la taille de l'individu*
 2. *Unicellulaire : une augmentation de la population*
- d. *Chez les micro-organismes, croissance est synonyme de multiplication*

Pour suivre l'évolution d'une population bactérienne, plusieurs paramètres peuvent être retenus tel que la détermination du nombre de cellules par unités de volume, la mesure de la masse microbienne, la mesure d'un constituant (on choisit un constituant stable et dont la concentration est stable sans les cellules quelle que soit la phase de croissance, sa teneur dans le milieu sera fonction du nombre de bactéries) ou la mesure d'une activité bactérienne.

A. MESURE DU NOMBRE

a- Détermination du nombre de cellule par unité de volume

Il s'agit d'un dénombrement au microscope, on utilise la technique de **Breed** : Un volume connu (0,01 mL) de culture en milieu liquide est étalée sur une lame propre sur une surface d'un centimètre carré, la culture est séchée puis colorée par la méthode de gram (ou au bleu de méthylène). Les bactéries sont comptées dans plusieurs champs microscopiques. Le diamètre d'un champ microscopique est mesuré à l'aide d'un micromètre oculaire.

Ce procédé a pour avantage sa simplicité mais comme inconvénient de compter les bactéries vivantes et mortes (ces dernières n'étant pas significatives).

b- Dénombrement par la méthode des dilutions, incorporation et culture dans un milieu gélosé (voir TP)

Cette méthode se décompose en 3 temps :

❖ Dilution de l'inoculum

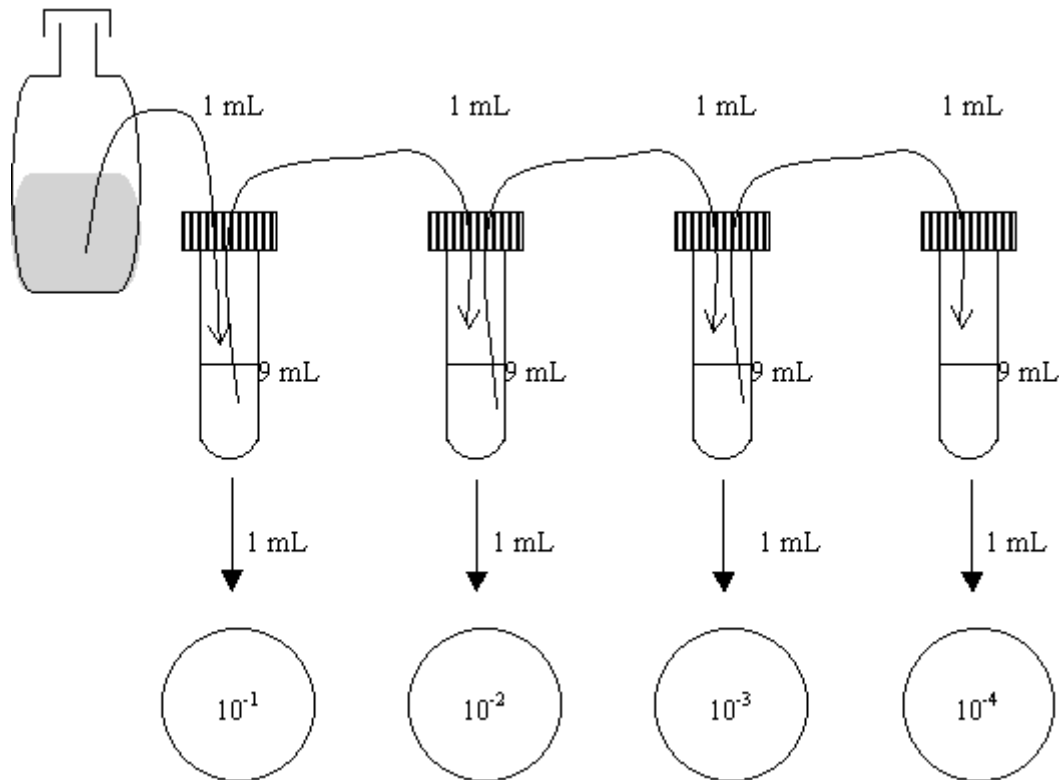
A partir de l'inoculum, on réalise une série de dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} , etc...). On utilise dans ce but, des tubes contenant 9 mL de solution physiologique (liquide de Ringer par exemple) auquel on ajoute 1 mL de chacune des dilutions.

❖ Incorporation en gélose et culture

Dans une série de boîtes de Pétri stériles, on mélange 1 mL de chaque dilution avec le contenu d'un flacon de gélose fondue et refroidie à 40 – 45 °C. On laisse alors solidifier la gélose et les boîtes sont mises à incuber (T= 37 °C ; t= 18 h).

❖ Comptage des colonies

Chaque bactérie vivante (dite revivifiable) donne, en se multipliant, une colonie visible à l'œil nu. Si la culture est très dense, les colonies sont confluentes sans les premières boîtes. On choisit la boîte où le nombre de colonies n est compris entre 30 et 300.



Résultat : $N = \frac{n}{d}$ bactéries (UFC) par mL.

B- Mesure de la masse des cellules bactériennes (biomasse= masse de matière vivante)**a- Mesure directe : détermination de la masse sèche**

La culture est centrifugée, lavée plusieurs fois avec une solution tampon et séchée jusqu'à poids constant. Cette méthode est peu employée car elle présente de nombreux inconvénients, elle est d'ailleurs expérimentale.

b- Mesure indirecte : mesure du trouble

On mesure le pouvoir diffractant du trouble de la suspension. Cette méthode consiste à évaluer la turbidimétrie dans un spectrophotomètre en mesurant la quantité de la lumière diffractée à $\lambda = 650$ nm. Cette méthode suit la loi de **Beer-Lambert** pour de faible importance (au-delà, il faut faire des dilutions).

C- Mesure de l'activité

On peut mesurer soit la consommation d'un substrat présent dans le milieu, soit un constituant cellulaire, soit une molécule excrétée par les cellules, soit encore une variation physico-chimique du milieu.

Les paramètres liés à l'activité cellulaire

1. **Consommation d'un substrat**
2. **Constituant cellulaire : ATP, N, ...**
3. **Apparition de certains métabolites**
4. **Modifications physico-chimiques : pH, potentiel rédox, ...**

4. CINETIQUE : EVALUATION DE LA POPULATION EN FONCTION DU TEMPS**A. Constantes de croissance**

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

* **Le temps de génération (en min)**: est le temps de doublement de la population bactérienne, c'est l'intervalle de temps entre deux divisions successives ou celui nécessaire au doublement de la population:

$$G = \frac{t}{n} \quad \mathbf{t: \text{ temps (connu);}}$$

n: nombre de divisions par génération par unité de temps.

* **Le taux de croissance (en min⁻¹)** : on le définit comme étant le nombre de divisions par unité de temps:

$$\mu = \frac{1}{G} \Rightarrow \mu = \frac{n}{t} \quad \mathbf{t: \text{ temps (connu);}}$$

n: nombre de divisions par génération par unité de temps.

B. Expression mathématique de la croissance:

On mesure la biomasse N à différents temps t . On peut dire que la biomasse varie en fonction du temps et, si f désigne la fonction qui rend compte de cette variation, on a $N = f(t)$. Le mécanisme essentiel de l'accroissement d'une culture bactérienne étant la scissiparité, l'accroissement de la biomasse se fait donc par doublement successif du nombre de bactéries. Si N_0 est le nombre de bactéries au temps t_0 , après 1, 2, 3 et n divisions, on aura :

après 1 génération: $N_1 = 2N_0$

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

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

après n générations: $N_n = 2^n N_0$

Cette opération peut être exprimée en fonction du taux de croissance ($\mu = n/t$ d'où $n = \mu t$):

$$\boxed{N_n = 2^{\mu t} \cdot N_0} \quad \begin{array}{l} N_0 : \text{Concentration initiale} \\ \mu : \text{taux de croissance} \end{array}$$

$$\Rightarrow \text{Ln } N_n = \text{Ln } N_0 + \bar{\mu} t \Rightarrow N_n = N_0 \cdot e^{\mu t}$$

C. La courbe de croissance:

La courbe de croissance d'une bactérie cultivée en milieu liquide non renouvelé peut être reproduite en représentant le nombre de bactérie en fonction de temps. On distingue différentes phases caractérisée par la valeur du taux de croissance: une phase de latence, une phase d'accélération, une phase de développement exponentielle, une phase de ralentissement, une phase stationnaire, une phase de déclin et éventuellement une phase dite de croissance cryptique.

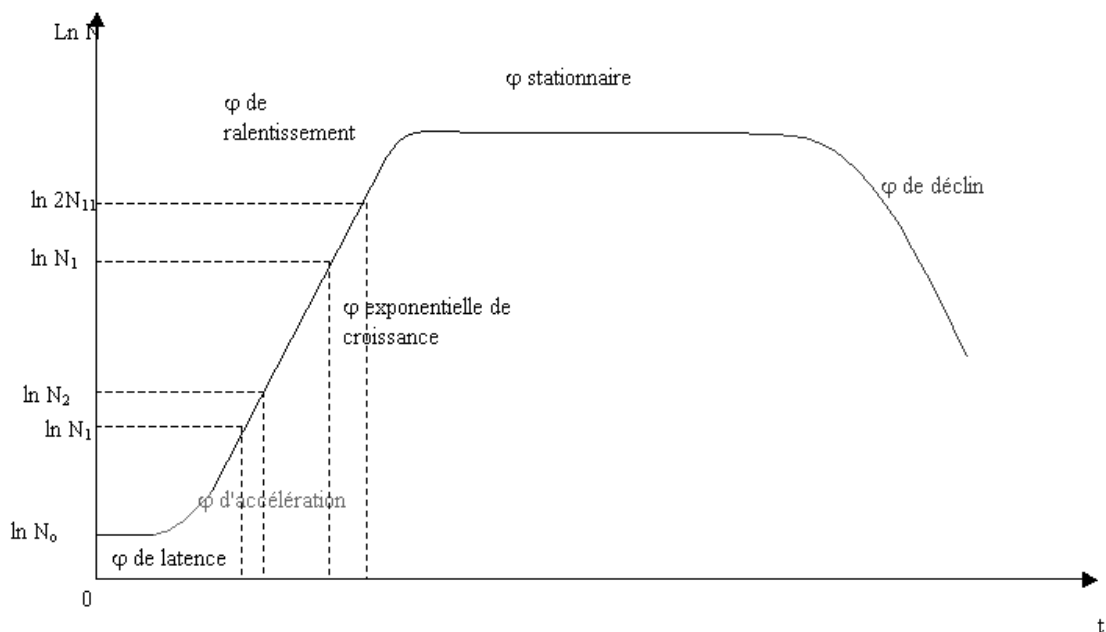


Figure II la courbe de la croissance

1. Phase de latence : le taux de croissance nul ($\mu = 0$). La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat (pas de phase de latence si repiquage sur milieu identique au précédent).

2. Phase d'accélération : il se produit une augmentation de la vitesse de croissance.

3. Croissance exponentielle : le taux de croissance atteint un maximum ($\mu = \mu_{\max}$). 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).

4. 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.

5. Phase maximale stationnaire : le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.

6. 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 et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Cependant, il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse (croissance cryptique).

La phase dite cryptique : Quelques bactéries survivantes entament une nouvelle phase de croissance au dépend des substances nutritives libérées par les cadavres des bactéries dans la population.

Phase	Description	le taux de croissance en h^{-1}
Phase de latence	Elle est facultative. Quand elle existe, elle correspond à une phase d'adaptation des bactéries au milieu. Les bactéries ne se divisent pas (ou trop peu pour mesurer la variation). Elle est absente quand l'inoculum est jeune et que le milieu est le même que le précédent. Cette phase correspond au temps nécessaire aux bactéries pour synthétiser les enzymes nécessaires pour dégrader le milieu et pour ajuster certains paramètres comme le pH.	$\mu = 0$ $(\ln N = \ln N_0)$
Phase d'accélération	Les bactéries se multiplient de plus en plus activement	$\mu \uparrow (G \downarrow)$
Phase exponentielle de croissance	Les bactéries se multiplient à leur rythme le plus élevé. Le \ln de N est directement proportionnel au temps. C'est la phase physiologique (production d'antibiotiques et de toxines. La représentation est une droite d'équation : $\ln N = \ln N_0 + \mu_x(t - t_0)$	$\mu = \mu_{\max}$
Phase de ralentissement	Lorsque les nutriments se raréfient, la croissance ralentit, le phénomène s'accroît plus les nutriments se raréfient.	$\mu \downarrow$ et tend vers 0
Phase stationnaire	La biomasse est stable. Deux explications sont envisageables : - Les bactéries ne se divisent plus ; - Il y a autant de bactéries qui se divisent que de bactéries qui meurent. Elle peut être due à la disparition d'un ou plusieurs nutriments, à l'acidification du milieu et, ou surtout à l'accumulation de déchets toxiques.	$\mu = 0$
Phase de déclin	Les bactéries ne se divisent plus, certaines meurent et sont lysées. Leur nombre N diminue.	$\mu < 0$

D. Facteurs influençant la croissance

Les facteurs physico-chimiques qui conditionnent la nutrition sont les mêmes qui influencent sur la croissance.

Les plus importants sont : La température, Le pH, La concentration en substrat, L'activity water (A_w), ...

5. CROISSANCE EN CULTURE CONTINUE

Il y a maintien d'une croissance exponentielle continue lorsque le milieu de culture est renouvelé régulièrement et que les métabolites sont éliminés en même temps. La valeur μ est maximale et constante.

Ce type de culture permet de nombreuses applications, notamment dans le domaine industriel: production de bactéries (biomasse, levauns...), production de métabolites (vitamines, protéines...).

Deux dispositifs principaux, d'équations et de cinétiques similaires, permettent la croissance de ce type de culture: le **chemostat** et le **turbidostat**.

Chemostat: dans ce type de dispositif, la chambre de culture reçoit un débit constant un de nutriments en quantité limitante. La croissance bactérienne est alors conditionnée par la disponibilité de ce nutriment, régulé par le niveau de son apport dans le milieu.

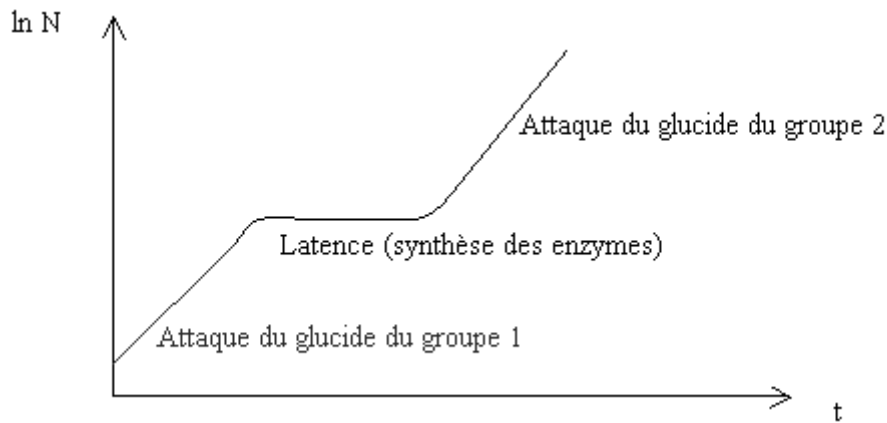
Turibidostat: contrairement au chemostat, l'apport du milieu nutritif n'est pas fixe. Il est constamment ajusté par un mécanisme automatique, basé sur la mesure continue de la **DO** (densité optique) de la culture. Le débit de renouvellement du milieu est donc régulé, de manière un maintenir constante la densité bactérienne à une valeur fixée à l'avance et corrélée au niveau de l'ajout automatique du milieu neuf.

6. CROISSANCE EN CULTURE SYNCHRONE

Les bactéries se multiplient toutes au même moment. La courbe de croissance montre des paliers successifs. Ce type culture permet d'étudier la division cellulaire indépendamment de la croissance.

7. PHENOMENE DE DIAUXIE

Quand on cultive en milieu synthétique contenant 2 substrats carbonés une souche, on peut observer une courbe de croissance diphasique, ce phénomène est la **diauxie**.



A. Principe

1. Croissance sur milieu synthétique (dont la composition chimique est exactement connue), en présence d'aliments carbonés limitants
2. On constate que certains mélanges de glucides donnent une courbe de croissance " classique " (comme s'il n'y avait qu'un seul substrat)
3. D'autres donnent des courbes diphasiques comme si deux phases exponentielles se succédaient séparées par un plateau

B. Résultats et explication

1. Résultats

Liste A : courbe classique	Liste B : courbe diphasique
Glucose / Fructose / Mannose / Mannitol	Arabinose / Maltose / Inositol / Sorbitol

2. Explication

- a. Un mélange de glucides de la liste A donne une courbe classique
- b. Un mélange de glucides de la liste A et de la liste B donne une courbe diphasique
- c. Les enzymes nécessaires sont constitutives pour les glucides de la liste A
- d. Les enzymes nécessaires sont inductives pour les glucides de la liste B
- e. La période de latence correspond au temps nécessaire à la fabrication de l'enzyme
- f. Tant que le premier glucide est présent, il effectue un rôle de répresseur vis à vis de la synthèse des enzymes inductives : c'est la répression catabolique

Culture des bactéries

Notions de bases :

- * Une préparation nutritive destinée à la croissance de microorganisme en laboratoire s'appelle **milieu de culture**.
- * certaines bactéries se développent bien dans presque tous les milieux de culture, tandis que d'autres ont besoin d'un milieu particulier.
- * Il existe des bactéries pour lesquelles on n'a pas encore découvert de milieu artificiel (non vivant) dans lequel elles puissent se développer.
- * Le développement de microbes introduits dans un milieu de culture en vue de leur croissance s'appelle **inoculum** = semence
- * les microbes qui se développent et se multiplient dans un ou sur milieu de culture constituent une **culture**.

Si on désire faire croître un microorganisme donné, par exemple un microbe provenant d'une souche clinique, à quels critères le milieu de culture doit-il satisfaire ?

Premièrement, il doit contenir les nutriments dont le microorganisme qu'on veut faire croître a besoin, soit des ions minéraux, des facteurs organiques de croissance, des sources de carbone et d'énergie. Il doit également présenter des taux adéquats d'humidité et de pH, ainsi qu'une pression osmotique et une concentration en molécule de dioxygène appropriés, ce qui signifie parfois que cette dernière doit être nulle. Il est essentiel que le milieu de culture soit initialement **stérile**, c'est-à-dire qu'il ne contienne aucun microorganisme vivant, de manière que la culture soit constituée uniquement des microbes ajoutés au milieu et de leurs descendants. Enfin, le milieu de croissance doit être incubé à une température appropriée.

Les milieux liquides, appelés couramment **bouillons de culture** sont fort utiles mais, lorsqu'il est préférable de faire croître des bactéries sur un milieu solide, on ajoute au bouillon de culture un agent de solidification tel que l'agar-agar ou **gélose**.

Agar : cette substance extraite de certaines algues marines, possède la propriété de fixer une grande quantité d'eau ; soluble dans l'eau à 100°C. Elle se gélifie à 40°C.

En générale, on place un milieu contenant de l'agar dans une tube à essai ou dans une boîte de pétri.

La gélose est dite **inclinée** si elle s'est solidifiée lorsque le tube était maintenu en position inclinée de manière à agrandir la surface de croissance. Elle dite **profonde** lorsque le tube est maintenue en position verticale et que le contenu se solidifie.

Selon la quantité d'agar ajoutée, les milieux peuvent être **solides** ou **semi solides** (gélouses molles).

Les différents milieux de cultures

- **milieux synthétiques** : on appelle milieu synthétique un milieu de culture dont on connaît exactement la composition chimique, qualitativement et quantitativement.

- **les milieux complexes ou empiriques (milieux naturels)** : pour la majorité des bactéries hétérotrophes. Les milieux complexes sont constitués de nutriments tels que des extraits de levure, de viande, ou de macérations de protéines contenues dans ces extraits ou d'autres sources. Ils contiennent donc des ingrédients dont la composition chimique est indéterminée.

- les milieux sélectifs et les milieux différentiels :

Les milieux sélectifs sont conçus pour inhiber la croissance des bactéries indésirables et stimuler celle des microbes recherchés.

Les milieux différentiels sont conçus pour faciliter la distinction entre les colonies du microbe recherché et les autres colonies qui se développent sur la même boîte de pétri. De plus, les cultures pures de microorganisme ont des réactions caractéristiques reconnaissables sur les milieux différentiels sur boîte.

- **les milieux d'enrichissement** : sert à stimuler la croissance d'un microorganisme donné présent initialement en petite quantité dans un échantillon ou dans un milieu de culture mixte.

Les milieux d'isolement – Milieux d'identification

Les premières sont des milieux solides de composition simple sur lesquels de nombreuses espèces bactériennes peuvent se développer.

Le plus répandu est la **gélose nutritive**.

Les bactéries disséminées à la surface d'une gélose nutritive forment autant de **colonies** qu'il y avait initialement de cellules.

Ces **colonies**, lorsqu'elles sont isolées, permettent de préparer des **cultures pures** ; elles sont le point de départ d'une étude synthétique aboutissant à l'identification.

D'autres milieux sont appelés **milieu d'identification** parce qu'ils servent à mettre en évidence une ou plusieurs propriétés chez une bactérie précédemment isolée. Ils existent en grand nombre : certains permettent de rechercher la fermentation d'un sucre, la production de gaz comme l'hydrogène sulfuré ; d'autres servent à démontrer la présence d'une décarboxylase, d'une gélatinase, d'une nutritase...etc.

Les cultures pures :

Les techniques d'études des bactéries exigent toujours l'obtention de cultures pures. Les produits soumis à l'analyse, produits pathologiques ou substances alimentaires, échantillons de sol ou prélèvement d'air ou d'eau, contiennent la plupart du temps une grande variété de microorganisme. Pour identifier et étudier toutes les différentes espèces, il faut obligatoirement les isoler les unes des autres et cultiver chacune d'elles séparément ; elles donnent alors naissance des populations homogènes, à des cultures pures.

Comment obtenir une culture pure ?