

IV. La croissance bactérienne

La croissance est définie comme étant l'accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme.

Chez les organismes pluricellulaires, elle conduit à une augmentation de la taille.

Chez les organismes unicellulaires, elle aboutit au contraire à une augmentation du nombre de cellules.

I - Paramètre de mesure de la croissance bactérienne

La croissance peut être définie par deux paramètres de grandeur:

1 - Concentration cellulaire: c'est le nombre de cellules bactériennes par unité de volume. Cette grandeur exprime le nombre total de bactéries (mortes ou vivantes) ou uniquement le nombre de bactéries vivantes.

2 - Densité microbienne: c'est la masse cellulaire par unité de volume. Cette grandeur est mesurée généralement par l'opacité du milieu de culture contenant des cellules bactériennes en pleine croissance.

Ces 2 paramètres sont très distincts:

- L'augmentation du nombre de cellules bactériennes est un phénomène discontinu donnant une courbe en escalier (1¢ 2¢ 4¢ 8,, 16 32,, ,, 64 « etc.).
- L'accroissement de la masse bactérienne est un processus en fonction du temps (Phénomène continu).

II - Méthodes permettant de mesurer la croissance bactérienne

A - Méthodes déterminant la concentration cellulaire

Elles permettent de compter le nombre total de cellules bactériennes (mortes ou vivantes) ou uniquement les cellules vivantes.

1 - Nombre total de cellules: le nombre total de cellules bactériennes peut être déterminé au microscope optique en utilisant une lame de verre à la surface de laquelle a été aménagée plusieurs

cavités de capacités connues (exemple: Hématimètre de *Malassez* ou cellule de *Thoma*). Cette méthode a l'inconvénient de tenir compte même des cellules mortes (n'interviennent pas dans la croissance) et l'erreur peut être grande car les cellules mortes peuvent parfois atteindre 30% du nombre total. De plus, elle nécessite l'utilisation d'objectifs à fort grossissements, donc à faible profondeur de champ. Ceci en raison de la petite taille des cellules bactériennes. La mobilité des bactéries et parfois même le mouvement brownien rendent la méthode difficilement utilisable. Cette méthode est surtout utilisée pour les levures ou pour les spores et les champignons de taille plus grande que les cellules bactériennes.

2 - Nombre de cellules visibles: exemple de la méthode des suspensions dilutions

B - Méthodes déterminant la densité microbienne

1^{ère} Méthode: la détermination du poids sec des bactéries. Cette méthode est imprécise et ne s'applique que lorsque la masse cellulaire est importante. Elle est souvent utilisée dans le cas des champignons.

2^{ème} Méthode: turbidimétrie ou opacimétrie. Cette méthode consiste à mesurer le trouble microbien en milieu liquide, par mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les suspensions bactériennes suivent quantitativement la loi de *Beer Lambert*. La densité optique est fonction linéaire de la densité microbienne, mais jusqu'à un certain seuil variant entre 0,2 et 0,3 mg/ml, correspondant à environ 10^7 UFC/ml. Dès que la DO dépasse 0,6, il faut diluer la culture bactérienne et refaire la lecture en tenant en compte le facteur de dilution. On peut rencontrer un seul désavantage lorsque la bactérie secrète un pigment diffusible dans le milieu de culture.

III - Expression de la croissance bactérienne

La croissance d'une bactérie placée dans les conditions idéales de culture peut être définie par 2 constantes:

- Temps de génération
- Le taux de croissance

1 - Le temps de génération: c'est le temps nécessaire à une bactérie pour donner 2 bactéries. Il peut être également défini par le temps nécessaire au doublement d'une population bactérienne. Le temps de génération "G" est donné par la formule suivante:

$$t = \text{temps (minutes)} \quad \boxed{G = t/n} \quad n = \text{nombre de divisions.}$$

Exemple: pour *E. coli* on a 3 divisions donc $n = 3$. Si ces 3 divisions s'effectuent en 1 heure de temps ($t = 1\text{h} = 60\text{mn}$) donc, $G = 20\text{mn}$.

$G = 800$ à 900mn pour *Mycobacterium tuberculosis* en milieu synthétique. Le temps de génération suivant les espèces bactériennes et également en fonction des conditions de culture.

$G = 10\text{mn}$ pour *Vibrio parahaemolyticus*.

2 - Le taux de croissance: il est défini comme étant le nombre de divisions par unité de temps. Il est calculé selon la formule suivante:

$$\mu = n/t$$

Exemple: $\mu = 3$ pour *E. coli* ; $\mu = 6$ pour *V. parahaemolyticus*.

3 - Expression mathématique de la croissance: si on considère une population de concentration N_0 , elle augmente à chaque génération de la façon suivante:

Après 1 génération: $N_1 = 2N_0$

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

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

n générations: $N_n = 2 \times \dots \times 2N_0 = 2^nN_0$

$$N_n = 2^n N_0$$

Cette équation peut être exprimée en fonction du taux de croissance :

$\mu = n/t$ donc $n = \mu t$

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

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

$$\mu = \frac{\log N_n - \log N_0}{\Delta t \cdot \log_2}$$

IV- Croissance en milieu non renouvelé

La courbe de croissance d'une bactérie (Fig. 12) peut être reproduite en représentant le nombre ou la masse bactérienne, ou la DO en fonction du temps. On distingue 6 phases caractéristiques par la valeur du taux de croissance (μ), c'est à dire le nombre de divisions par unité de temps.

- 1 - La phase de latence (caractérisée par $\mu=0$);
- 2 - La phase transition (μ augment);
- 3 - La phase exponentielle ou logarithmique ($\mu = \text{constant} = \text{max}$);
- 4 - La phase de ralentissement (μ diminue);
- 5 - La phase stationnaire ($\mu = \text{constant} = 0$);
- 6 - La phase de déclin ($\mu < 0$).

1 - Phase de latence

Lorsqu'on ensemence une petite quantité de culture bactérienne dans un milieu neuf, on constate que la croissance ne commence pas immédiatement. Il faut attendre 2 à 3 heures pour remarquer un trouble visible. Cette période où $\mu = 0$ s'appelle phase de latence. Elle peut être due soit à l'âge de l'inoculum, soit à une adaptation enzymatique de la bactérie ou les 2 phénomènes à la fois.

1.1 - Age de l'inoculum

La phase de latence est observée lorsqu'on ensemence dans un milieu neuf, des bactéries provenant d'une culture âgée poussant dans un milieu identique au milieu neuf. La phase de latence due à l'âge de l'inoculum s'explique par le temps nécessaire à la restauration du nombre de ribosomes qui a considérablement diminué avec l'âge, et à la reconstitution des systèmes enzymatiques qui ont subi des altérations.

1.2 - Adaptation enzymatique

Si l'ensemencement d'une colonie jeune de bactérie se fait dans des bouillons nutritifs de compositions différentes, on peut observer une phase de latence. Cette phase est due à une

adaptation enzymatique nécessaire à la synthèse d'une ou de plusieurs enzymes que la bactérie utilise pour métaboliser le ou les nouveaux substrats.

Exemple: bactérie en phase exponentielle poussant sur milieu contenant du glucose:

- Ensemencement dans un milieu neuf + glucose → pas phase latence.
- Ensemencement dans un milieu neuf + xylose → phase de latence due au temps nécessaire à la synthèse d'enzymes dégradant la xylose.

2 - Phase de transition

Cette phase dépend, comme la précédente, à l'âge de la bactérie et à l'adaptation enzymatique. La phase d'accélération est caractérisée par le début des divisions bactériennes. Le taux de croissance augmente progressivement.

Remarque: les phases de latence et d'accélération sont facultatives et peuvent être éliminées si on ensemence une culture bactérienne déjà en phase exponentielle dans les mêmes conditions de culture.

3 - Phase exponentielle (ou logarithmique)

Cette phase traduit les capacités maximales de la synthèse de la bactérie (synthèse d'enzymes nécessaires aux réactions cataboliques, elles-mêmes nécessaires à la synthèse des différents constituants cellulaires). Cette phase, encore appelée phase physiologique, est caractérisée par un taux de croissance maximum et constant. Donc par un temps de génération minimum.

Exemple: elles durent quelques heures (22^h chez certaines bactéries du genre *Pseudomonas* et environ 44^h et chez *E. coli*).

La phase exponentielle se maintient jusqu'à épuisement des éléments nutritifs. Elle se traduit sur la courbe par une droite dont la pente est déterminée par le taux de croissance, lui-même sous la dépendance des conditions d'environnement comme la température, le pH, la nature et la concentration des éléments nutritifs.

Phénomène de diauxie: Si on ensemence une cellule de *E. coli* dans un milieu contenant le glucose et le lactose, on constate que la courbe de croissance comporte 2 phases exponentielles séparées par un palier. L'analyse du milieu montre que la fin de la première phase exponentielle correspond à l'épuisement complet du glucose et que le lactose est exclusivement consommé pendant la seconde phase exponentielle (Fig. 1). La croissance totale est la somme des croissances partielles qu'on aurait obtenue à partir des concentrations de chacun des 2 sucres pris isolément. Ce phénomène s'explique par le fait que le glucose réprime la synthèse de la β -galactosidase, et doit être consommé complètement avant que l'enzyme puisse être formée pendant la phase intermédiaire de latence; et que la croissance puisse reprendre au dépend du lactose.

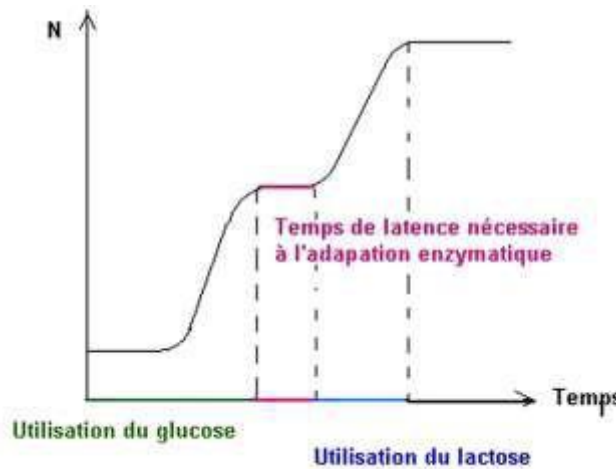


Fig. 1 : Phénomène de diauxie dans un bouillon contenant le glucose et le lactose.

Le même phénomène de diauxie s'observe avec le mélange glucose-galactose ou glucose-xylose. Par contre, il ne s'observe pas en utilisant le mélange glucose-fructose ou glucose-mannose.

4 - Phase de ralentissement

Cette phase s'explique par l'épuisement des éléments nutritifs dans le milieu de culture. Donc, une diminution du taux de croissance et du nombre de divisions.

5 - Phase stationnaire

Elle dure plusieurs heures. Le taux de croissance est nul mais le nombre de cellules bactériennes est maximum et constant, on remarque un arrêt de divisions par manque de substance nutritives. Cet arrêt de divisions peut parfois être provoqué par l'accumulation de certains éléments toxiques provenant des métabolismes bactériens au cours de la phase exponentielle (production d'exotoxines). Cet arrêt de croissance peut aussi être dû au pH qui devient trop acide (dégradation et libération d'acides organiques abaissant le pH, donc inhibition de la croissance aux bas pH). C'est au cours de cette phase que les *Bacillaceae* commencent à sporuler.

6 - Phase de déclin

Au cours de cette phase, le nombre de cellules bactériennes diminue par autolyse (sécrétion d'enzymes lytiques endogènes). Ceci entraîne la libération à partir de cellule lysée de protéines, de sucres, de bases puriques et pyrimidiques, du phosphore, et d'autres éléments qui vont permettre à certaines bactéries, encore vivantes, de les utiliser et de se diviser de nouveau. Ce phénomène est désigné par le terme de "cannibalisme" ou encore "croissance cryptique".

Si le taux de croissance est inférieur à zéro, on parle plutôt de taux de mortalité. Ce taux peut être constant ou non.

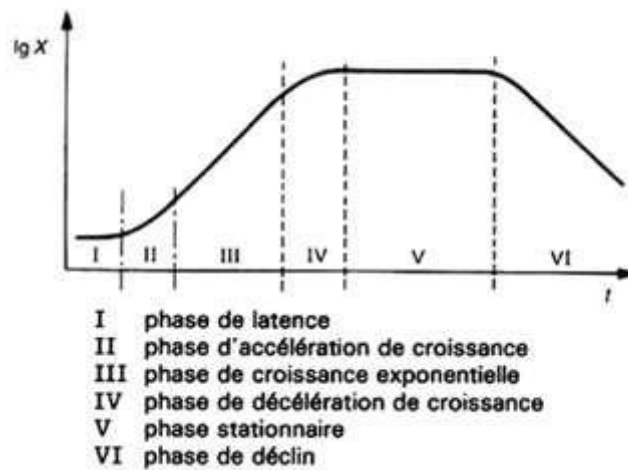


Fig.2 : Courbe de croissance théorique d'une bactérie en milieu non renouvelé.

V - Croissance en milieu renouvelé (croissance en culture continue)

La phase exponentielle de croissance ne peut durer que quelques heures en milieu non renouvelé. Or, il est possible de maintenir les microorganismes indéfiniment en phase exponentielle de croissance si le milieu où se multiplient les bactéries est constamment renouvelé, en même temps que les produits de métabolisme sont éliminés.

Le dispositif comprend un récipient de croissance muni d'un siphon trop-plein et un système assurant l'admission continue de milieu neuf.

Après ensemencement, les microorganismes se multiplient jusqu'à un taux
limite correspondant à la concentration limite d'un facteur nutritif x introduit dans le milieu.

La culture reçoit alors du milieu neuf, à un taux constant: **le volume de milieu frais introduit chasse, par le trop-plein, le volume de culture microbienne.** Le système est donc autorégulé.

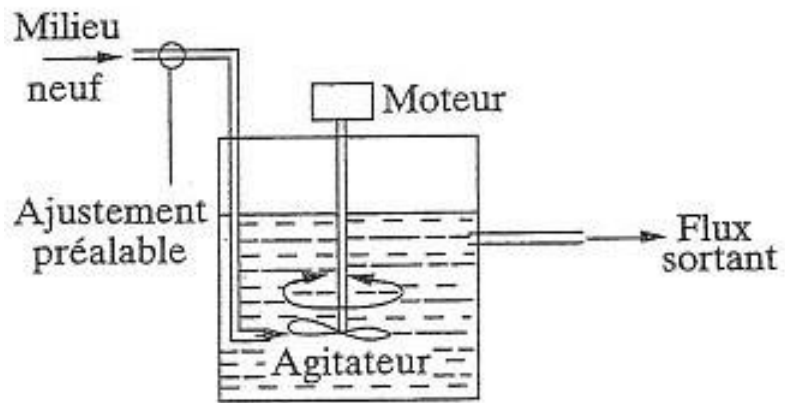


Fig.3 : croissance en culture continue (chemostat)

VI - Croissance en milieu discontinue (croissance en culture batch)

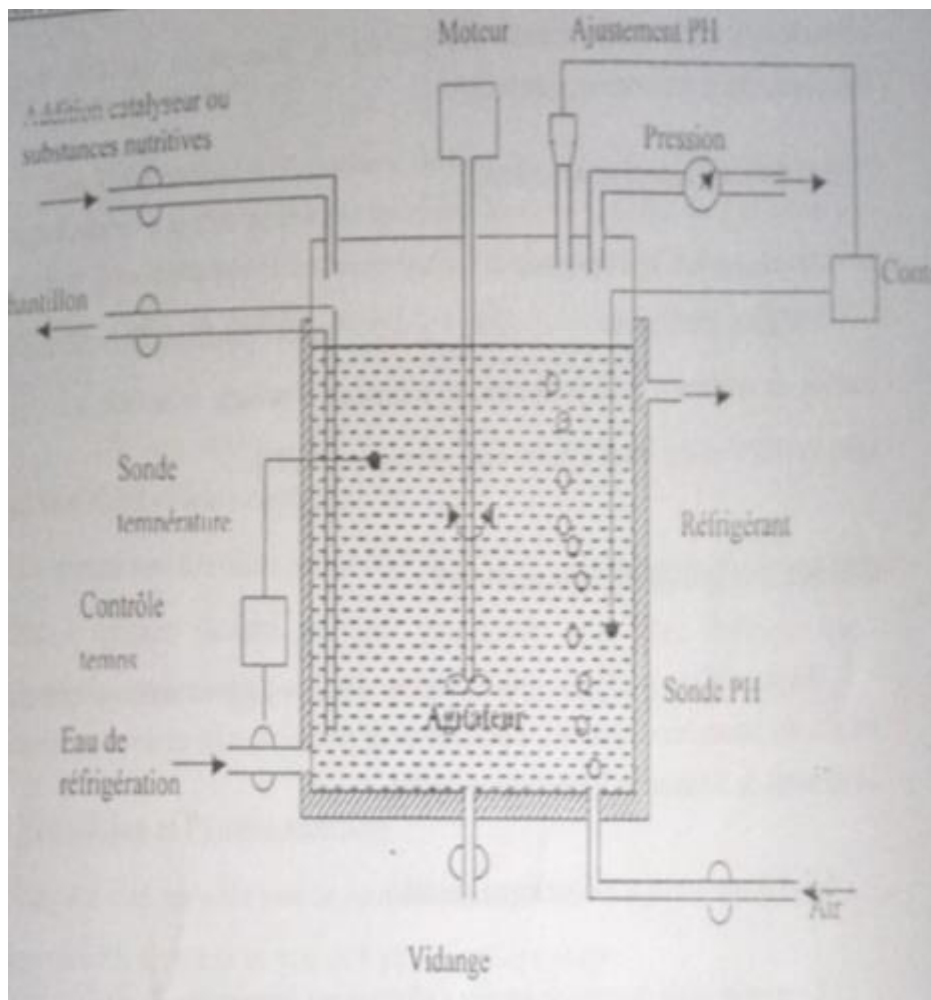


Fig 4 : culture discontinue (batch)

Le fermenteur est un système clos, fermé. Au temps zéro de la fermentation, la solution de nutriment stérile est inoculée avec des micro-organismes (bactéries, levures). L'incubation se réalise dans des conditions d'agitation, de température, de pression partielle en oxygène et de régulation de PH. Au cours de l'incubation, la quantité de micro-organismes dans le fermenteur, la concentration en biomasse, en substrat et en produit varie constamment, conséquence du métabolisme microbien. On peut observer 4 phases de croissances:

une phase de latence

une phase exponentielle de croissance

une phase stationnaire

une phase de mortalité