

CROISSANCE BACTERIENNE

I. Introduction

Chez les organismes pluricellulaires, la croissance se manifeste par l'augmentation de taille ou de masse. Chez les microorganismes unicellulaires, elle se manifeste par l'augmentation du nombre (multiplication suite à des divisions binaires). Lorsqu'une cellule bactérienne est placée dans un milieu de culture convenable, elle va assurer ses biosynthèses, augmente de taille puis se divise, par fission binaire, en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire (figure 1).

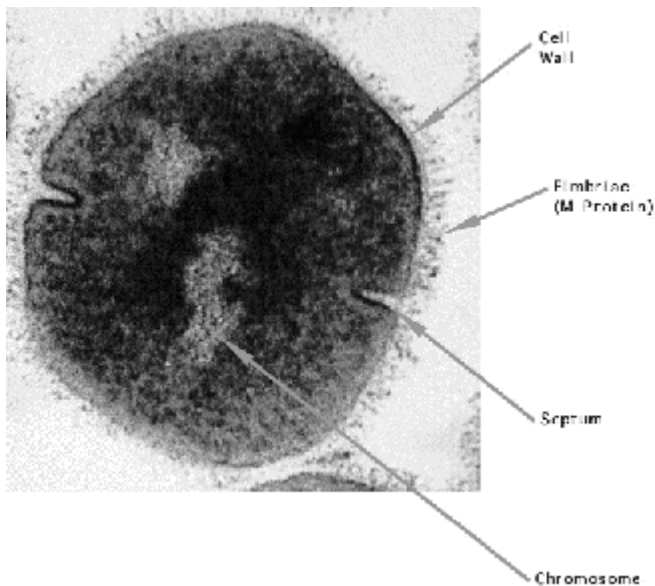


Figure 1 : Bactérie en division (début de formation du septum)

II. Mesure de la croissance bactérienne (voir TD)

L'estimation de la croissance bactérienne peut être faite par des numérations ou par des mesures de masse.

II.1. Méthodes de numération (dénombrement)

II.1.1. Numération totale directe

Cette technique permet le dénombrement de la totalité des bactéries. Elle se fait au microscope en utilisant des compartiments volumétriques (ex.: cellule de Thomas). Récemment, la numération a été automatisée; elle se fait par des compteurs automatiques de particules. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle ne distingue pas entre les bactéries viables et mortes. Elle n'est donc fiable que dans les conditions où la plupart des bactéries sont vivantes.

II.1.2. Numération indirecte des cellules viables

Cette méthode permet l'appréciation des bactéries viables et cultivables. Après avoir effectué une série de dilutions, une aliquote (0,1 ml en général) des dilutions convenables est étalée à la surface d'un milieu gélosé approprié. Après incubation, chaque cellule se multiplie pour donner une colonie visible à l'oeil nu. En tenant compte du facteur de dilution, nous pouvons déduire la concentration bactérienne initiale. Parfois, il arrive que plus d'une bactérie donne une seule colonie; il est donc plus prudent de donner la concentration bactérienne en unités formant colonies (UFC) par millilitre.

Notez qu'il existe une autre technique statistique semi-quantitative dite du "nombre le plus probable" (Most Probable Number : MPN).

II.2. Méthodes d'estimation de la masse bactérienne

On peut utiliser des méthodes directes ou indirectes.

1. Mesure physique directe du poids frais, du poids sec ou du volume cellulaire après centrifugation.

2. Mesure chimique directe de quelques constituants cellulaires, tels que l'azote total, les protéines totales ou encore l'ADN total.

3. Mesure indirecte de l'activité métabolique, en appréciant, par exemple la production ou la consommation d'O₂ ou de CO₂.

4. Mesure de la turbidité (densité optique) d'une culture bactérienne à l'aide d'un spectrophotomètre.

Si la technique est bien maîtrisée, on peut avoir des estimations correctes de la croissance bactérienne. C'est la technique la plus employée car la plus simple, la plus rapide et la moins coûteuse. Son inconvénient majeur est sa sensibilité relativement modérée; il faut des concentrations d'au moins 10⁷ bactéries / ml pour avoir des densités optiques mesurables.

III. Aspects théoriques de la croissance

Théoriquement, une bactérie, placée dans un milieu convenable peut se multiplier indéfiniment, par fission binaire (figure 2). La croissance se fait selon une progression géométrique : 1, 2, 4, 8, etc... ou 2⁰, 2¹, 2², 2³,2ⁿ (où n = nombre de générations). Il s'agit d'une croissance exponentielle, mais, en réalité, cette allure exponentielle ne représente qu'une petite partie de la multiplication bactérienne (figure 6).

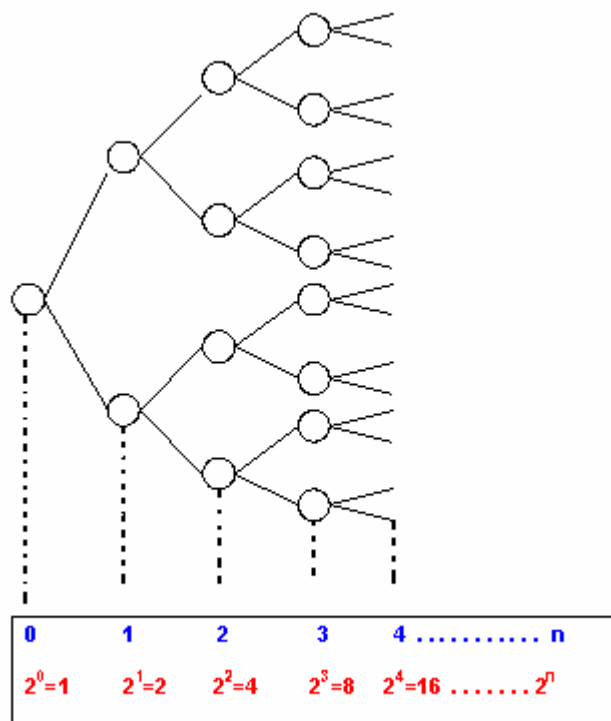


Figure 2 : Aspects théoriques de la croissance

Si on part d'une population initiale N₀, au bout de n divisions, on aura un nombre théorique de bactéries:

$$N = 2^n N_0 \quad (1).$$

Le temps qui sépare deux divisions successives (ou temps nécessaire au doublement d'une population) est appelé **temps de génération θ** .

$$\theta = t / n \quad (2)$$

Le taux de croissance (μ) exprime la vitesse de multiplication des bactéries; c'est le nombre de divisions effectuées par unité de temps.

$$\mu = n / t \Rightarrow n = \mu t \quad (3)$$

$$(1) \text{ et } (3) \Rightarrow N = 2^{\mu t} N_0 \quad (4)$$

Il s'agit d'une fonction exponentielle (figure 4).



Figure 4 : Représentation schématique de la fonction (4)

Pour la simplifier (linéarisation), on va lui faire subir une transformation logarithmique (figure 5):

$$\log N = \mu t \log 2 + \log N_0 \quad (5) \quad (Y = aX + b)$$

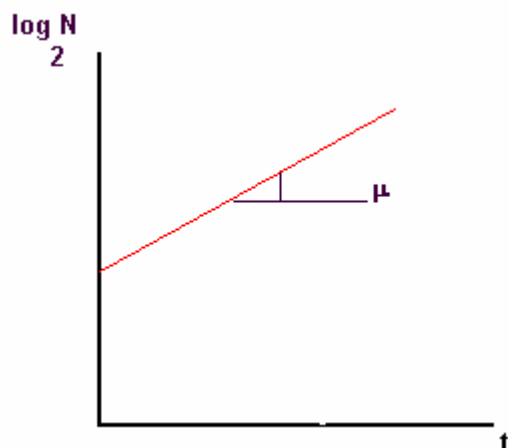


Figure 5 : Représentation schématique de la fonction (5)

Si on travaille dans la base 2, $\log_2 2 = 1$, donc

$\log_2 N = \mu t + \log_2 N_0 \quad (6)$, la pente représente le taux de croissance.

IV. Aspects expérimentaux de la croissance

IV.1. Courbe expérimentale de croissance

On ensemence un milieu de culture favorable et on assure le suivi de la croissance bactérienne en réalisant des dénombrements bactériens à des intervalles de temps réguliers.

On obtient la courbe suivante (figure 6).

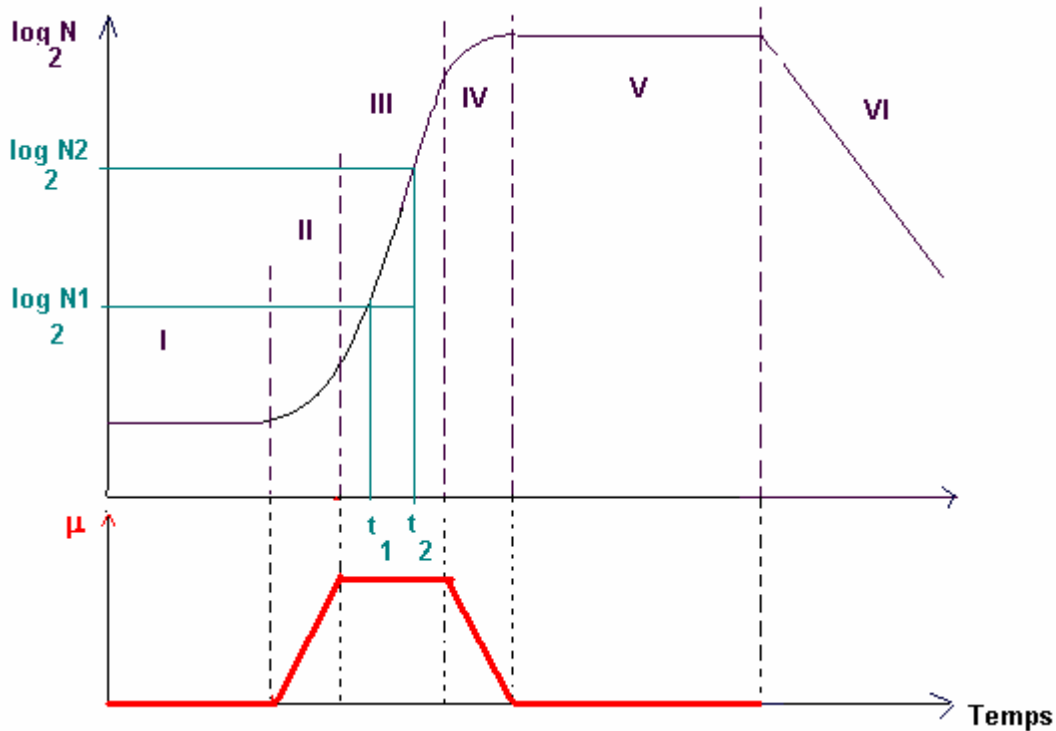


Figure 6 : Courbe expérimentale de croissance montrant les différentes phases de croissance distinctes par μ

En nous appuyant sur le taux de croissance, la figure ci-dessus nous permet de distinguer 6 phases de croissance:

I : Phase de latence où le taux de croissance est nul. La durée de cette phase dépend de plusieurs facteurs :

- **l'importance de l'inoculum** : les bactéries doivent d'abord détoxifier le milieu en le débarrassant des traces d'éléments toxiques qui contaminent, en général, les milieux de culture (métaux lourds par ex.). Plus l'inoculum est important, plus le temps nécessaire à la détoxification est court.

- **l'âge des bactéries** : les "vieilles" bactéries, introduites dans un milieu neuf, doivent d'abord réparer tous les dommages subies ; elles doivent donc restaurer leur état physiologique normal avant de commencer à se multiplier. Donc, plus la culture ayant servi d'inoculum est vieille, plus la durée de cette phase est longue.

- **la composition du milieu** : les bactéries doivent synthétiser les enzymes adaptées au nouveau milieu de culture. La diauxie illustre clairement cette adaptation (figure 7).

II : Phase d'accélération pendant laquelle la vitesse de croissance augmente.

III : Phase de croissance **exponentielle** où la vitesse de division est constante et maximum. La majorité des bactéries sont dans un bon état physiologique et se divisent de façon exponentielle. Le temps de génération des bactéries pendant cette phase est le plus court. La presque totalité de la masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle).

IV : Phase de **ralentissement** (décélération) où μ diminue.

V : Phase **stationnaire** : Il y a une compensation entre les bactéries qui meurent, par autolyse, et celles qui continuent à se multiplier. Cette phase est déclenchée par **l'épuisement** du milieu, particulièrement le **facteur limitant*** (voir définition plus loin), et **l'accumulation de déchets toxiques** (ex.: acides organiques) libérés dans le milieu par les bactéries.

VI : Phase de **déclin** ($\mu < 0$) : le nombre de bactéries viables diminue durant cette phase. Ceci est dû à une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes (autolyse).

* Un facteur limitant est un facteur indispensable à la croissance bactérienne qui s'épuise le premier dans le milieu.

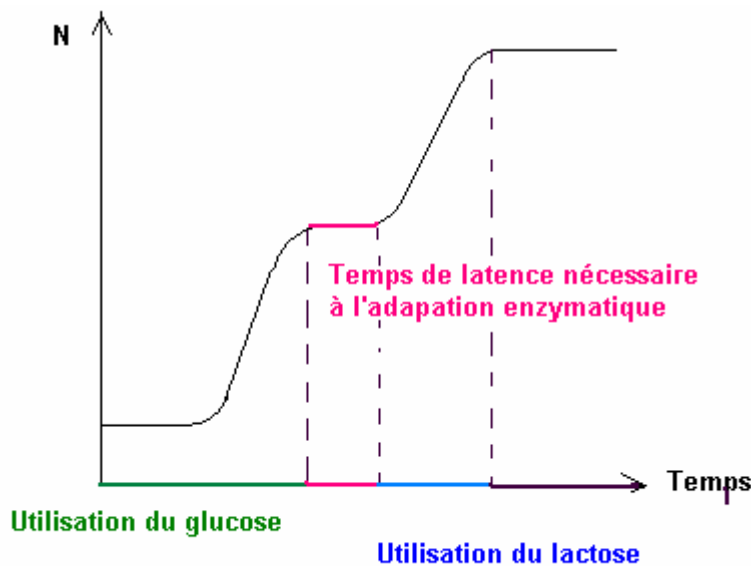


Figure 7 : Diauxie (glucose + lactose)

Lorsque des bactéries sont cultivées en présence de glucose et de lactose, elles commencent par l'utilisation du glucose jusqu'à son épuisement. On observe ensuite un temps de latence, durant lequel les bactéries vont synthétiser les enzymes nécessaires à l'utilisation du lactose, avant la reprise de la multiplication bactérienne.

IV.2. Détermination graphique du taux de croissance

D'après la courbe de la figure 6, le taux de croissance maximum peut être déterminé graphiquement, durant la phase exponentielle de croissance, comme suit:

$$\mu = (\log_2 N_2 - \log_2 N_1) / t_2 - t_1$$

Le taux de croissance est très variable selon les espèces et les conditions de culture.

Le temps de génération peut être déterminé comme suit : $\theta = 1 / \mu$; des exemples sont donnés dans le tableau suivant (tableau 1).

Tableau 1 : Exemples de temps de génération

	Température (°C)	Temps de génération (h)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	60	0,14
<i>Escherichia coli</i>	40	0,35
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	37	6

En plus des conditions physico-chimiques déjà étudiées dans le chapitre "Métabolisme-Nutrition", plusieurs autres facteurs peuvent avoir un effet sur la vitesse de croissance des bactéries. Les antibiotiques, par ex., peuvent, selon la concentration utilisée, avoir un effet bactériostatique (inhibition partielle ou totale de la multiplication) ou bactéricide (mort des bactéries).