

# CHAPITRE 05

## LA CROISSANCE BACTERIENNE



# 1. Définition de la croissance

- ✓ La croissance bactérienne est l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries. L'accroissement est donc synonyme de multiplication cellulaire.
- ✓ Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme, éventuellement toxiques.
- ✓ La croissance peut être étudiée en milieu liquide ou solide.



# La croissance peut être étudiée en milieu liquide ou solide.

- Sur milieu liquide

Observation d'un  
« trouble »



*Avant*

*Après*

- Sur milieu solide

Observation de  
colonies

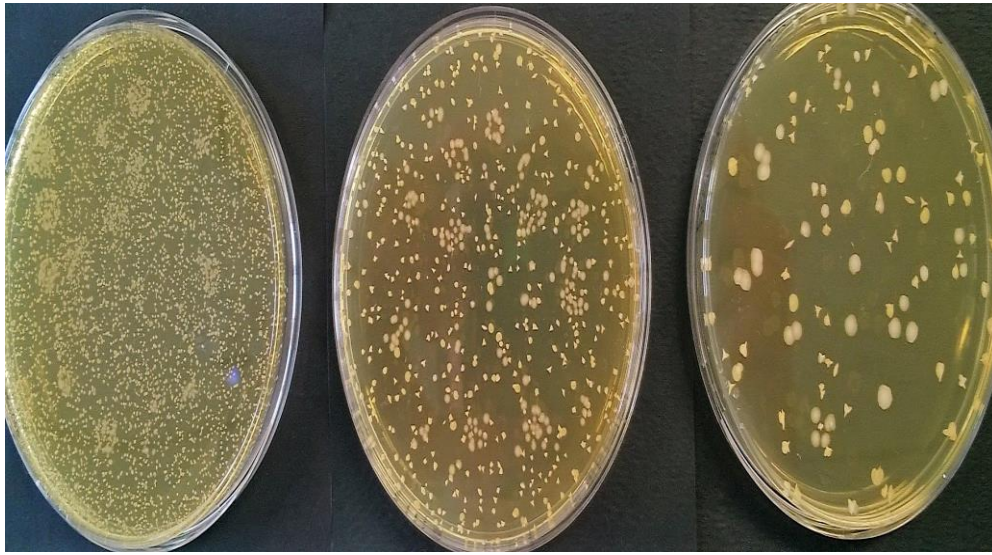


*Avant*



*Après*

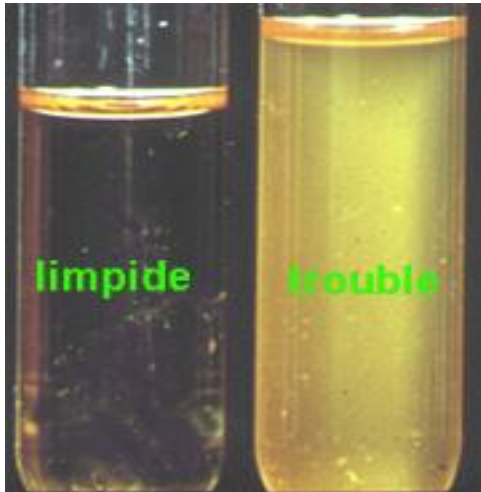




**Bactéries ensemencées en boîtes pétri**



**Champignons ensemencés en boîtes pétri**

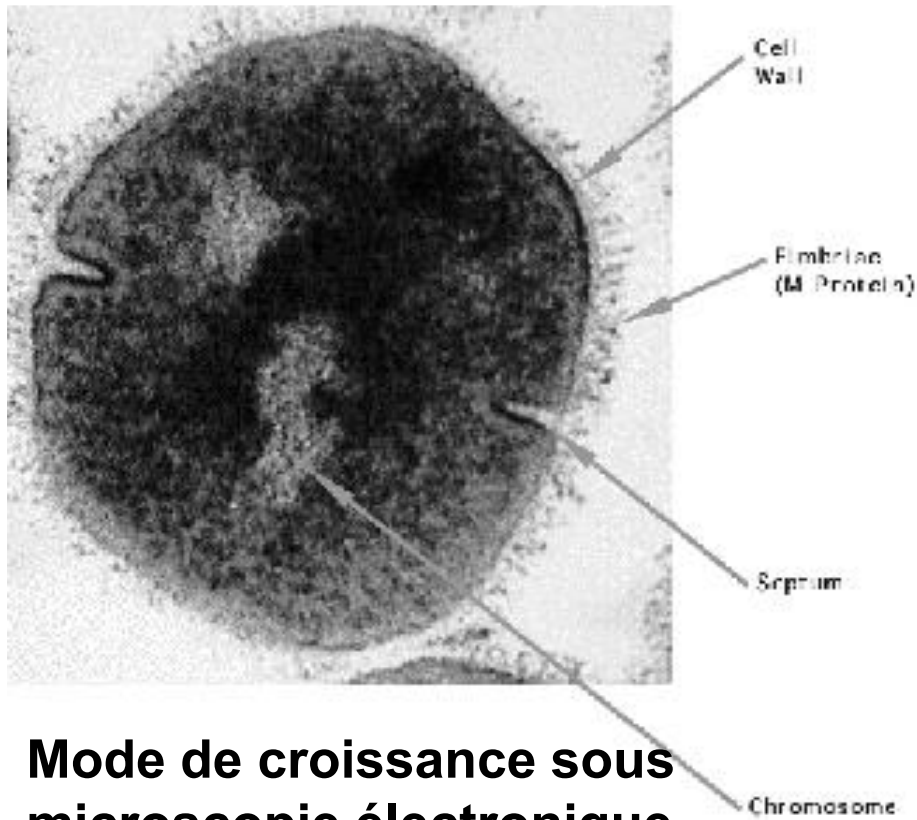


**Bactéries ensemencées en bouillons**



## 2. Mode de division

La division bactérienne s'effectue par: **scissiparité** ou **fission binaire**



**Mode de croissance sous  
microscopie électronique**

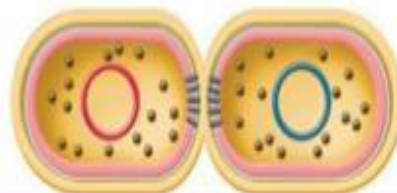


## Fission binaire

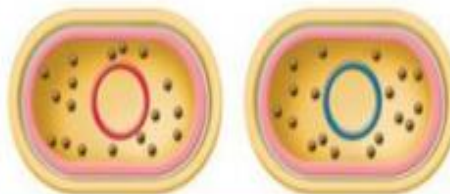
*Nutriments  
(Milieu de culture)*



**Augmentation des  
constituants cellulaires**



**Augmentation du  
nombre de cellules**



**Augmentation de  
la biomasse sèche**

*Déchets métaboliques, toxiques  
(Milieu de culture)*

# 3. Expression mathématique de la croissance

La croissance d'une bactérie est caractérisée par deux constantes:

**1. Le temps de génération** : c'est le temps qui sépare deux divisions successive ou temps nécessaire au doublement de la population.

$$G = t/n$$

t: temps de croissance, n: nombre de divisions (générations)

Ex: chez *E. coli*:  $G = 20\text{mn}$

**2. Le taux de croissance bactérien**: C'est le nombre de divisions par heure

$$T \text{ ou } \mu = n/t = 1/G$$

Ex: chez *E. coli*:  $\mu = 3 \text{ divisions/h}$

1 cellule ---> 2 cellules ---> 4 cellules ---> 8 cellules ---> 16 cellules ---.



Soit une population bactérienne contenant un **nombre initial** de Bactéries  $X_0$

- Après une génération  $\longrightarrow X_1 = 2 X_0$
- Après deux générations  $\longrightarrow X_2 = 2 X_1 = 2 \times 2 X_0 = 2^2 X_0$
- Après trois générations  $\longrightarrow X_3 = 2 X_2 = 2 \times 2 \times 2 X_0 = 2^3 X_0$
- .
- .
- .
- Après n générations  $\longrightarrow X_n = 2^n X_0$

n = nombre de divisions

$X_0$ : nombre initial des bactéries

$X_n$ : nombre final des bactéries

Donc:  $X_n = 2^{\log_2 n + \log_2 X_0}$

$$n = \frac{\text{Log} X_n - \text{Log} X_0}{\text{Log} 2}$$

**Ex :** Si le temps de génération est de **20 minutes**, que l'on part d'une bactérie et que l'on a, en conditions appropriées, une croissance exponentielle pendant une nuit de **8h00** alors on aura  $N = 1 \times 2^{8/0.333} = 2^{24} = 1.6 \cdot 10^7$  cellules.



# 4. Courbe de croissance

Il existe 6 phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance

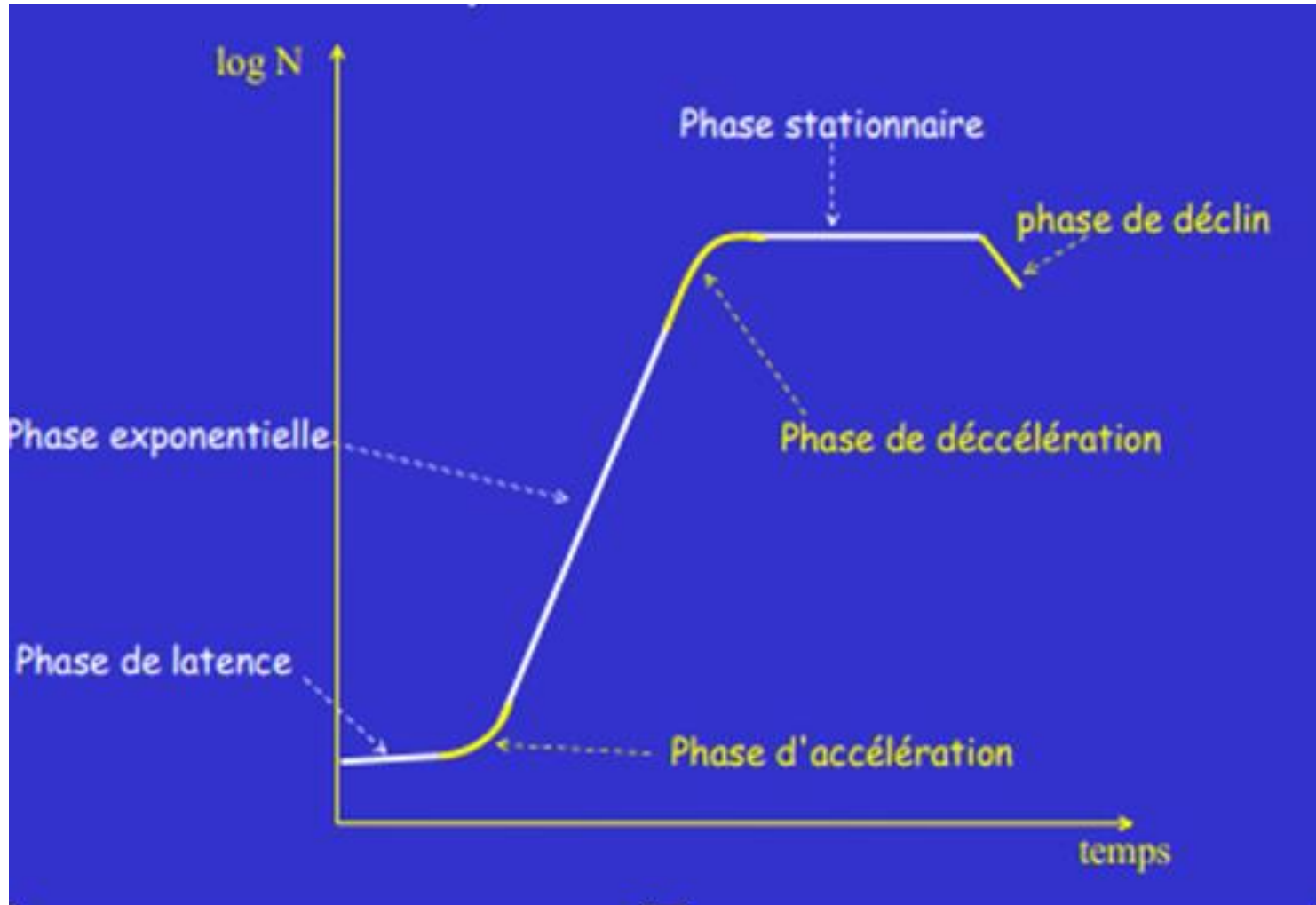
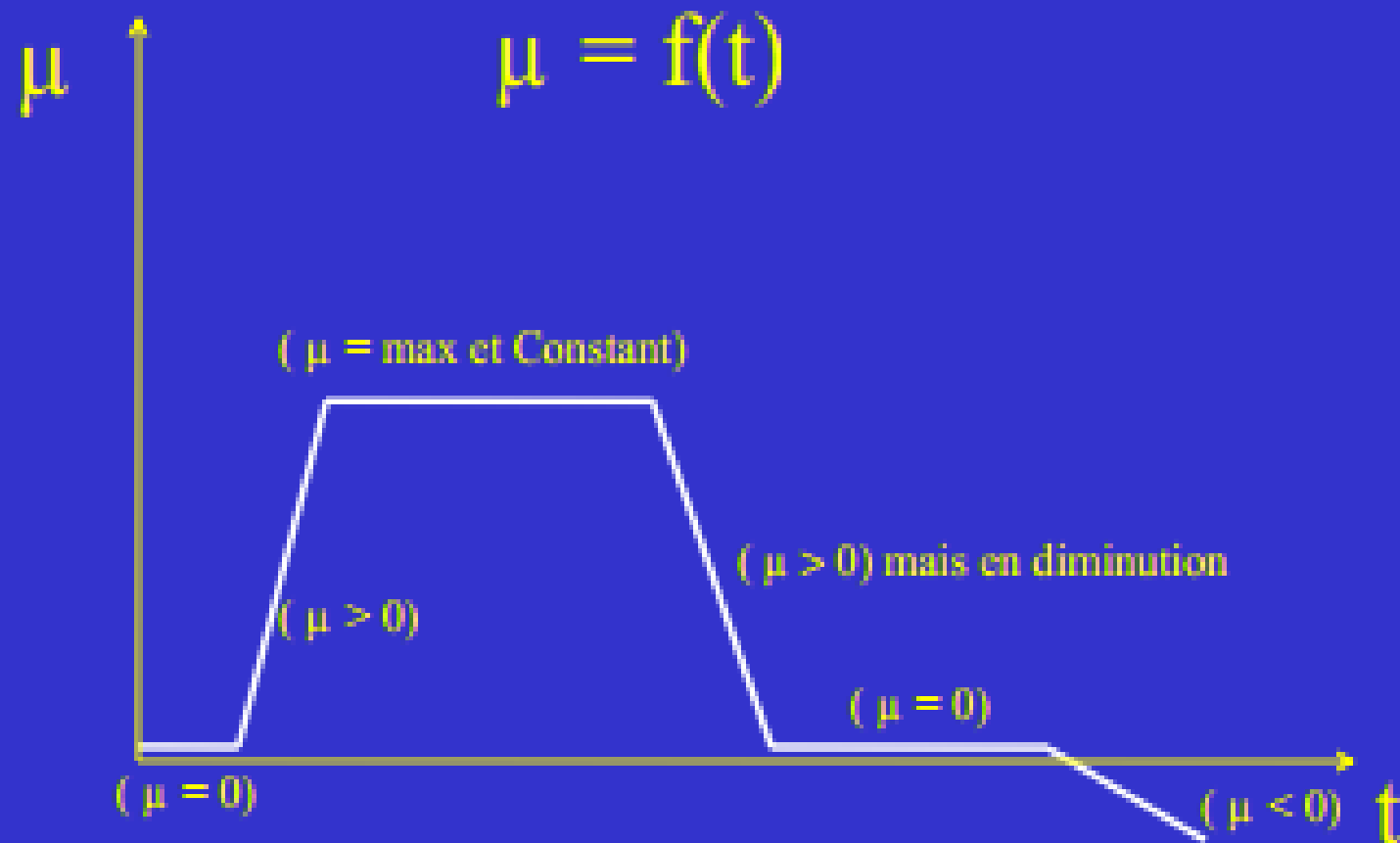


Fig. Les phases de la croissance



## ⑧ Variation de $\mu$ pendant les phases de croissance



# Phase de latence

- ✓ Le taux de croissance nul ( $\mu = 0$ ).
- ✓ Sa durée dépend de l'âge des bactéries, du taux d'inoculum 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).

# Phase d'accélération

Il se produit une augmentation de la vitesse de croissance.



# Phase exponentielle

- ✓ le taux de croissance atteint un maximum ( $\mu=\max$ ). Il est influencé par certains facteurs appelés paramètres d'action de la croissance (pH, température, la nature et la concentration des nutriments);
- ✓ 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).



# 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.

# Phase stationnaire

- ✓ Le taux de croissance devient nul ( $\mu = 0$ );
- ✓ Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.



# Phase stationnaire

- ✓ Le taux de croissance devient nul ( $\mu = 0$ );
- ✓ Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.

# Phase de déclin

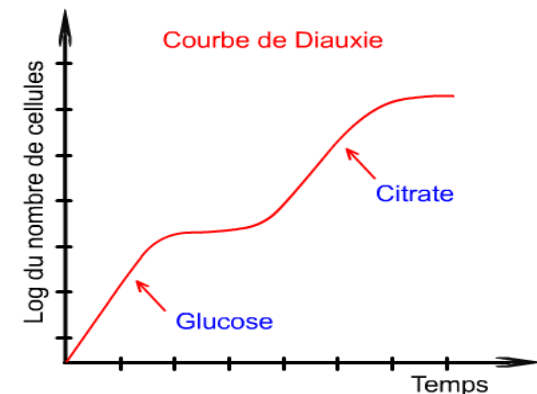
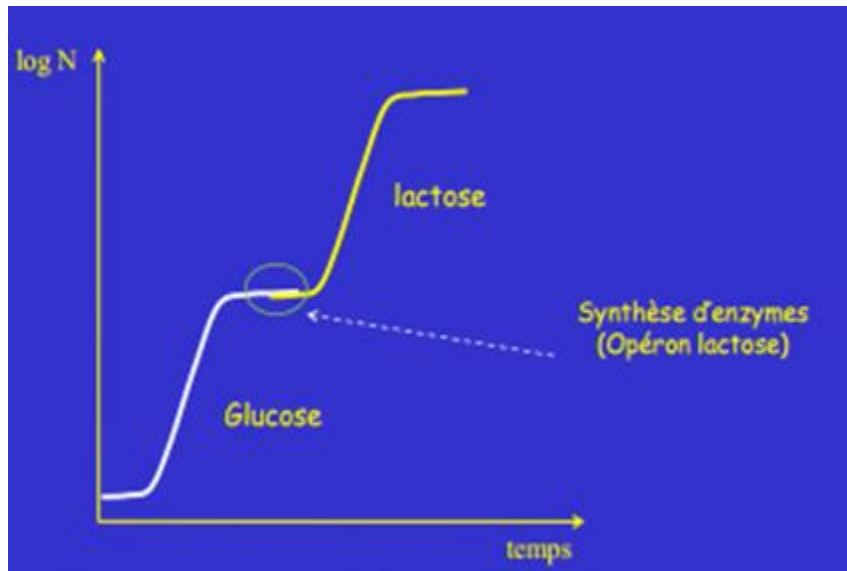
- ✓ Le taux de croissance est négatif ( $\mu < 0$ ):
- ✓ Toutes les ressources nutritives sont épuisées;
- ✓ Il y a accumulation de métabolites toxiques;
- ✓ Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes;
- ✓ Cependant, il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse (croissance cryptique).



# 5. Cas particuliers de la croissance

## 5.1. Phénomène de Diauxie

- ✓ Il s'agit de la croissance des bactérie sur un milieu de culture synthétique contenant deux sources de carbone
- ✓ Deux phases de croissance exponentielle séparées par une phase de latence.
- ✓ Cette croissance est dite biphasique ou "diauxie", ou croissance double,.
- ✓ La 1ère 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.



# 5. Cas particuliers de la croissance

## 5.2. Croissance synchrone

- ✓ On peut amener les bactéries à ce diviser en même moment, ce qui donnerait une croissance synchrone
- ✓ Par choc thermique chez *Salmonella typhimurium*, les bactéries sont incubées alternativement à une température 25°C pendant 28 minutes puis à 37°C pendant 8 minutes



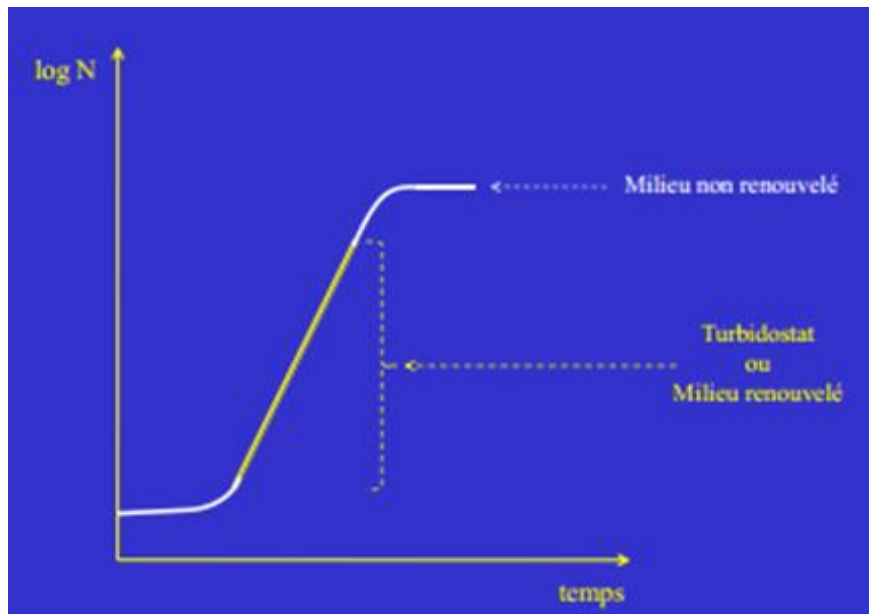
La courbe montre une série de paliers successifs correspond chacun à un doublement



# 5. Cas particuliers de la croissance

## 5.3. Culture continue

- ✓ Dans les conditions habituelle de la croissance, la phase exponentielle ne dure que quelques heures
- ✓ Expérimentalement on peut maintenir une culture en croissance exponentielle pendant plusieurs heures voir plusieurs jours
- ✓ Pour cela il faut renouveler constamment le milieu de culture tout en éliminant les produits résultant du métabolisme cellulaire
- ✓ C'est le principe de fermentations industrielle
- ✓ Le système est donc ouvert et appelé chemostat



Courbe de croissance  
en milieu renouvelé



## Remarque

**Dans les conditions habituelle de la croissance (ni renouvellement de milieu de culture ni élimination des déchets de la croissance), le système de culture est fermé on dit que la culture est discontinue c'est la culture en batch**

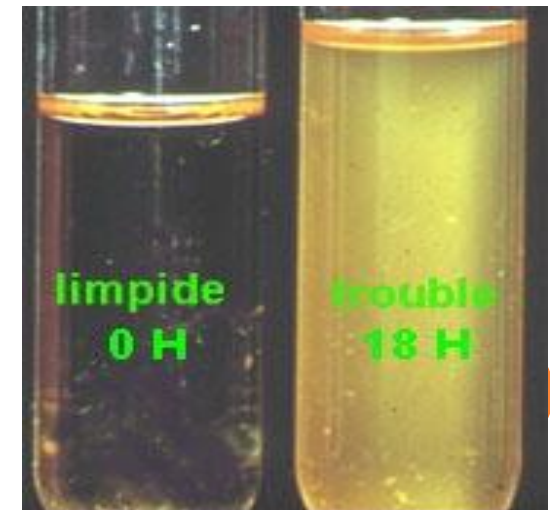
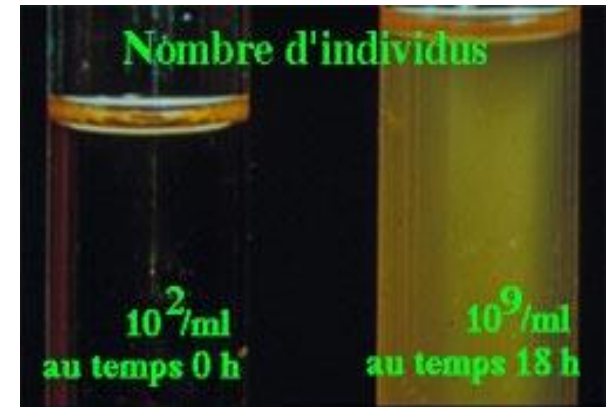


## 6. Mesure de la croissance bactérienne

### 1. Mesure du trouble (ou absorbance)

**Les bactéries troublent les milieux liquides lors de leur croissance**

- Cette méthode consiste à suivre l'évolution de la population bactérienne en mesurant l'absorbance du milieu de culture grâce à un spectrophotomètre;
- C'est la méthode la plus utilisée pour évaluer la masse microbienne;
- C'est une méthode optique fondée sur la propriété que présente toute suspension de diffracter une partie de l'intensité d'un faisceau de lumière qui la traverse en ligne droite.



## 2. Mesure du poids sec

La méthode est réalisée selon les étapes suivantes:

- Les bactéries d'une culture sont récoltées par centrifugation ou par filtration sur membrane (T0h, 2h, 4h, ... d'incubation);
- Le culot bactérien ou le filtre est desséché à 100-110°C jusqu'à avoir un poids constant puis pesée ( peser répétées jusqu'à avoir un poids constant);
- Le poids est généralement exprimé en grammes de matière sèche par litre de culture

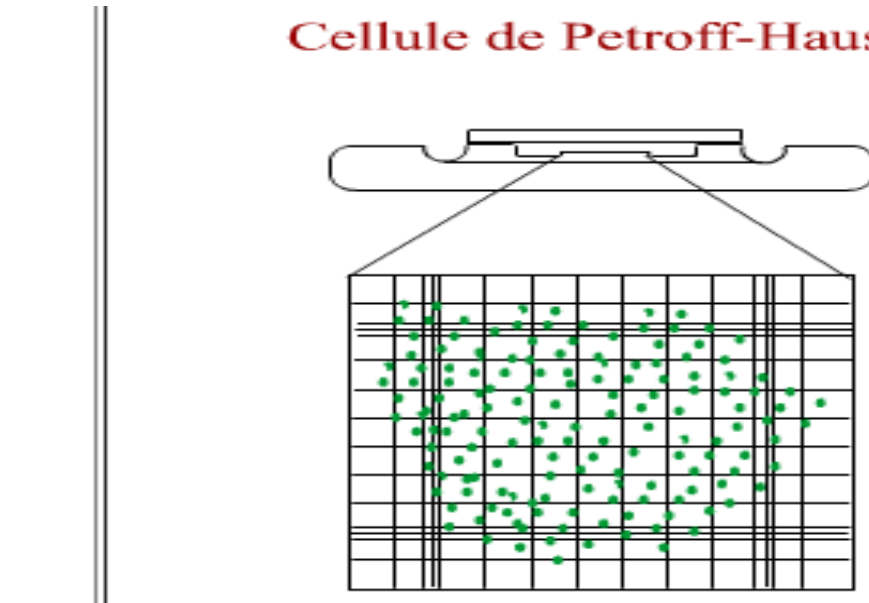


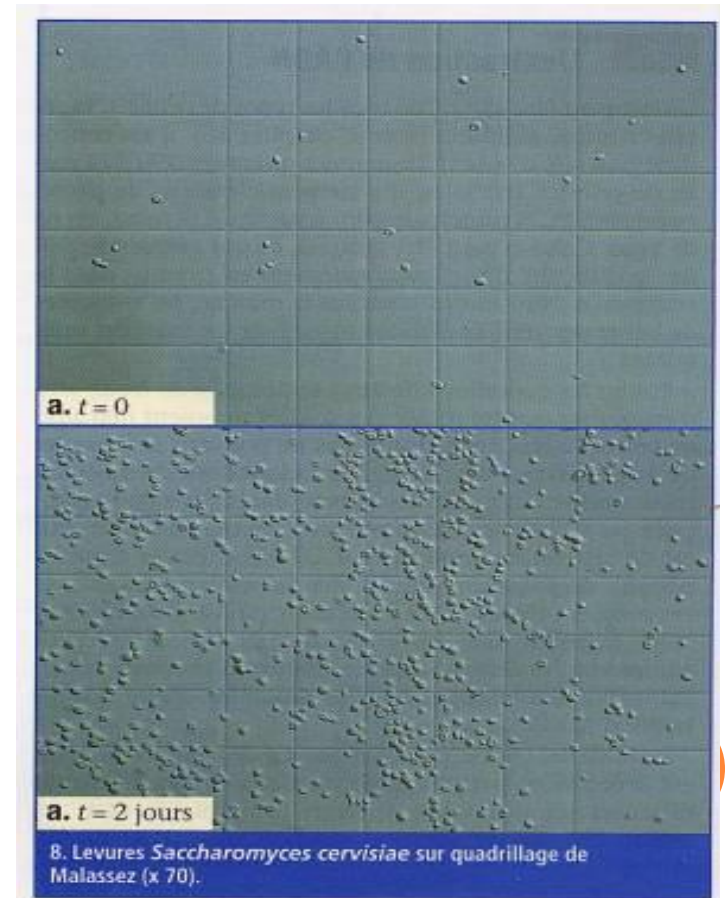
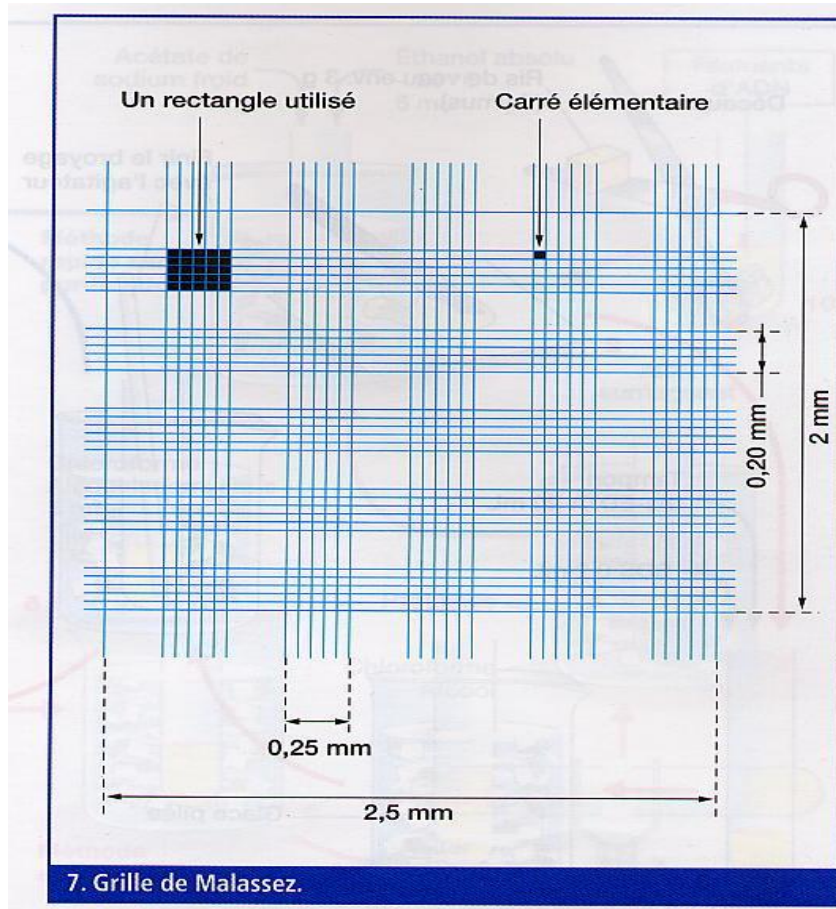
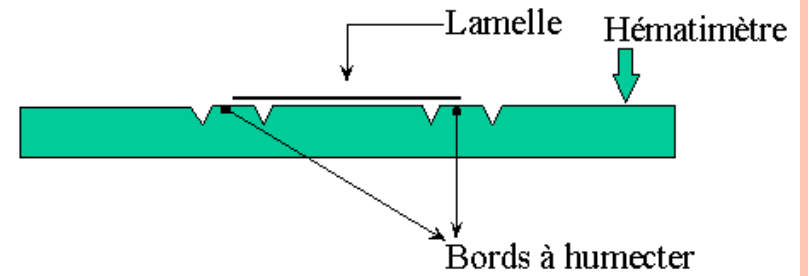
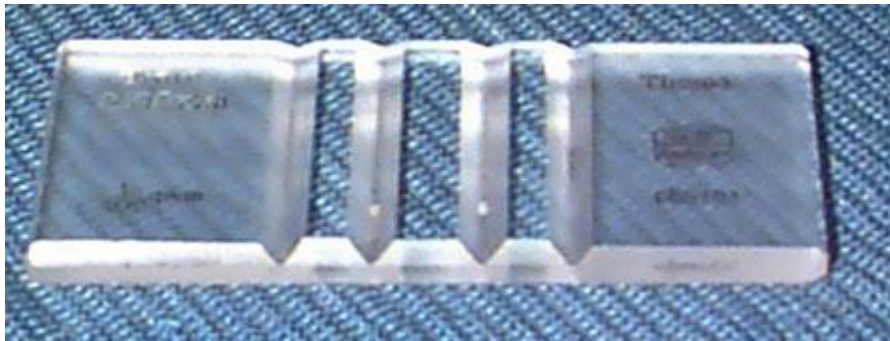
# 3. Mesure du nombre des bactéries

## 3.1. Dénombrement direct (Lecture au microscope )

- Le comptage des bactéries se fait en utilisant un hématimètre (chambre de comptage de Petroff-Hausser, cellules de Thoma, cellules de Malassez...)
- Le microscope permet une numération totale des cellules
- Elle ne permet pas de distinguer facilement les cellules vivantes des cellules mortes.

Cellule de Petroff-Hauser





$$N = nk / v$$

- N: nombre de cellules par litre ou ml
- n: nombre de cellules comptés sur microscope
- k: facteur de dilution
- v: volume de comptage (L ou mL)



## **3.2. Dénombrement indirect (Dénombrement après culture)**

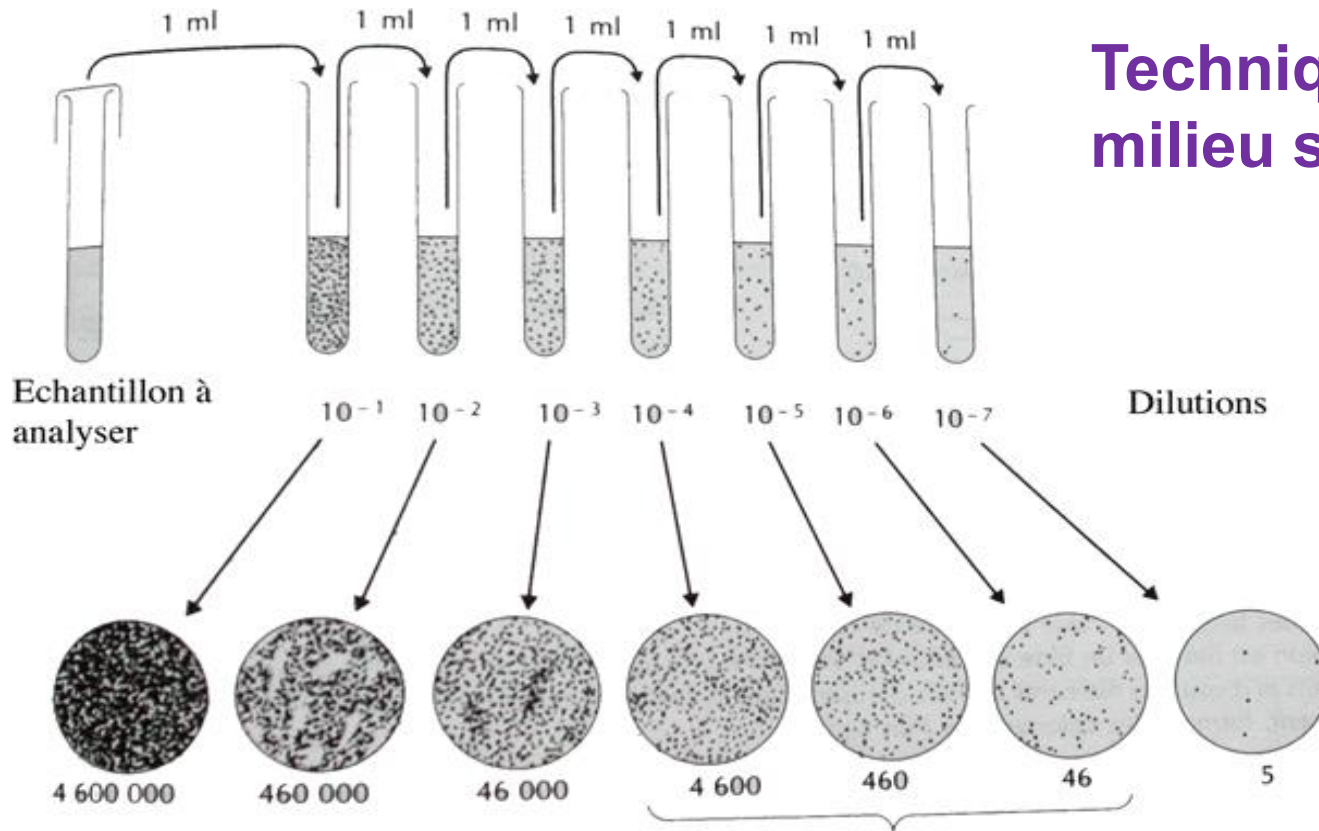
**C'est la méthode la plus utilisée, elle permet de compter les bactéries viables et cultivables;**

**Les techniques les plus utilisées:**

- Culture en boîte de Pétri**
- Méthode du nombre le plus probable (NPP)**
- Méthode de filtration sur membrane**



## a. La Numération sur Gélose en boîte de Pétri



Technique sur milieu solide

- Après incubation on compte le nombre des colonies (choisir les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies).
- Comme une colonie provient d'une seule cellule ou d'un amas de cellules, on exprime le résultat en UFC/ volume de l'échantillon.
- Le résultat final est multiplié par le facteur de dilution).

$$N = \sum C / (n_1 + 0,1n_2) dv$$

- N: nombre totale des colonies
- $n_1$ : nombre de boites de la 1<sup>ère</sup> dilution
- $n_2$ : nombre de boites de la 2<sup>ème</sup> dilution
- d: la dilution la plus faible
- v: volume d'inoculation

### Exemple

Dilution		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>
<i>Coliformes</i>	Boite 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	240	28
	Boite 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	256	24

**Nombre de Coliformes =  $2.49 \cdot 10^9$  UFC/ml**



## b. Numération par le nombre le plus probable

Technique sur  
milieu liquide

- Ce dénombrement se fait en milieu liquide
- Le calcul du nombre le plus probable utilise des dilutions de l'échantillon et pour l'interprétation fait appel à des calculs de probabilité
- La précision de cette méthode est nettement inférieure à la précédente

$$N = \frac{NPP}{V_{ensemencé}} \times Fd$$



## Table de Mac Grady

Dilution utile pour la lecture des résultats

-1    -2    -3  
 Exemple: + + +    + + -    + - -  
                   3        2        1

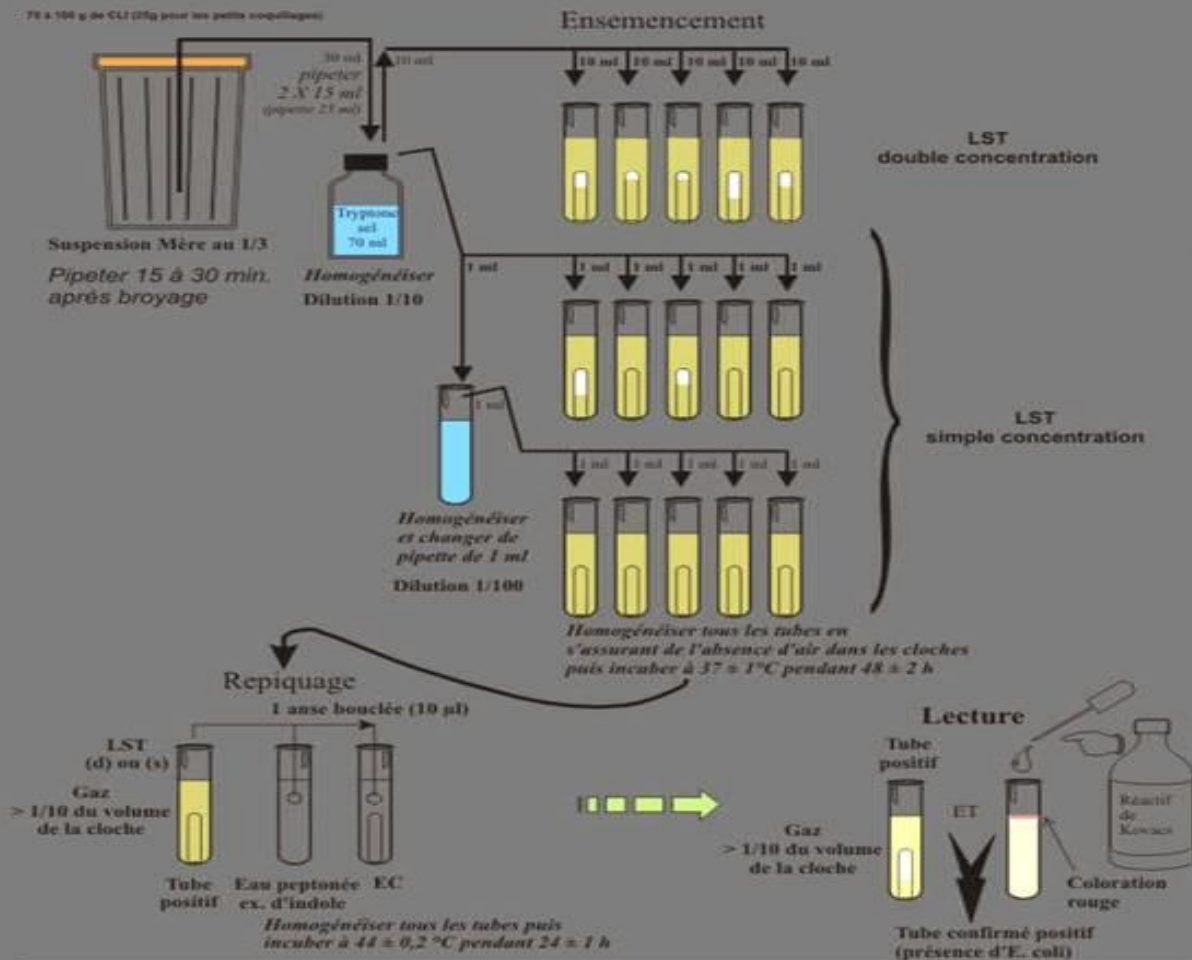
Sur la table 321: NPP= 15

$$N = (NPP / V \text{ ensemencé}) * F \text{ dilution}$$

$$N = (15 / 1) * 10 = 150 \text{ bactéries/ml}$$

Nombre de tubes positifs au niveau des 3 taux de dilution retenus	NPP	Nombre de tubes positifs au niveau des 3 taux de dilution retenus	NPP
000	< 0,3	230	2,9
001	0,3	300	2,3
010	0,3	301	4
020	0,6	302	6
100	0,4	310	4
101	0,7	311	7
110	0,7	322	12
111	1,1	320	9
120	1,1	321	15
121	1,5	322	21
200	0,9	323	29
201	1,4	330	20
210	1,5	331	50
211	2,0	332	110
220	2,1	333	>110
221	2,8		





**Choix des dilutions**

*Noter le nombre de tubes positifs par dilution. Il faudra retenir 3 dilutions consécutives.*

- Cas 1 : Au moins une dilution révèle 5 tubes positifs.
  - Choisir la dilution la plus élevée révélant 5 tubes positifs et les 2 dilutions suivantes.
  - Si toutes les dilutions révèlent 5 tubes positifs, choisir les 3 dilutions les plus élevées.
- Cas 2 : Aucune dilution ne révèle 5 tubes positifs.
  - Choisir les 3 dilutions les plus élevées de la série.
- Cas particulier : plusieurs dilutions choisies ne révèlent pas de tube positif.
  - Retenir la dilution la moins élevée ne contenant pas de tubes positifs ainsi que les 2 dilutions précédentes.

**Détermination du coefficient NPP**

Lire sur la table NPP correspondant au volume de l'inoculum. Seuls les résultats de catégorie 1 et 2 seront acceptés.

**Calcul du NPP**

NPP = coefficient NPP x 1 / première dilution choisie

Si tous les tubes sont négatifs le résultat est : < 18 E. coli / 100 g de CLI

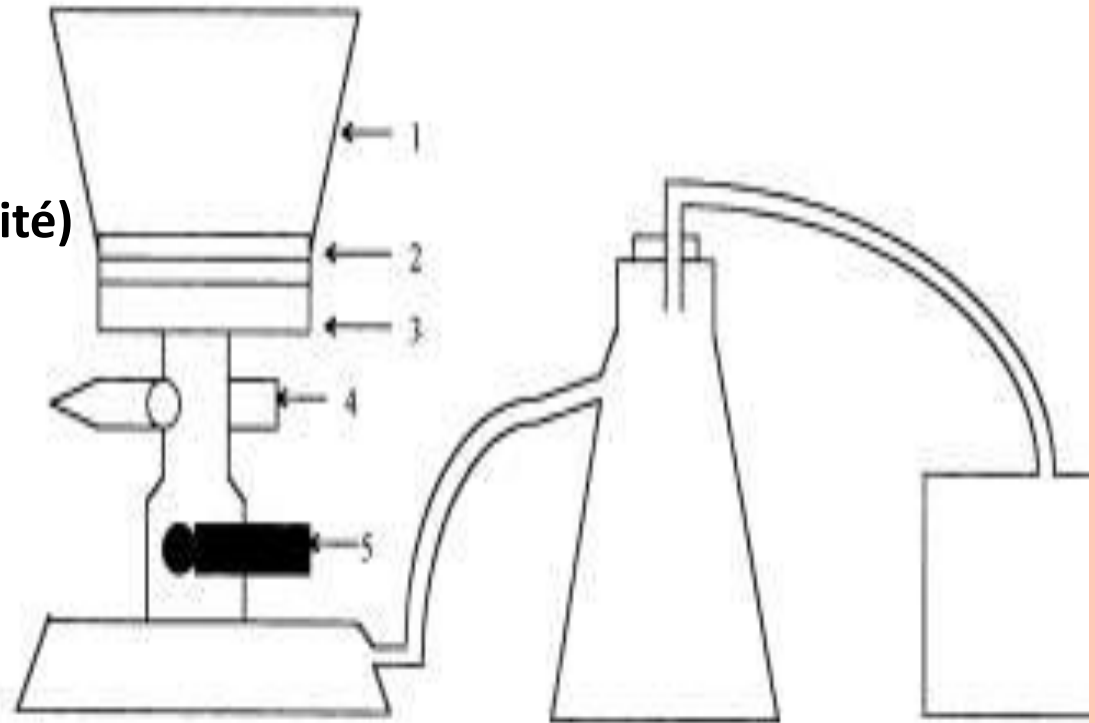
Les résultats > 1000 sont arrondis à la dizaine inférieure si l'unité < 5 et à la dizaine supérieure si l'unité > ou = 5.



## c. Méthode de filtration sur membrane

- Méthode classique de dénombrement
- Elle consiste à filtrer un volume déterminé d'une suspension sur une membrane filtrante de cellulose qui est ensuite déposée sur un Milieu de culture solide.

- 1 : entonnoir stérile (250ml)
- 2 : membrane (0,45gm de porosité)
- 3 : support en acier
- 4 : levier (pour casser le vide)
- 5 : vanne à vide



# 7. Les milieux de culture

Un milieu de culture est **une préparation** au sein de laquelle des **micro-organismes peuvent se multiplier**. Il doit donc satisfaire **les exigences nutritives** du micro-organisme étudié et posséder **les propriétés physico-chimiques** convenant à cette culture

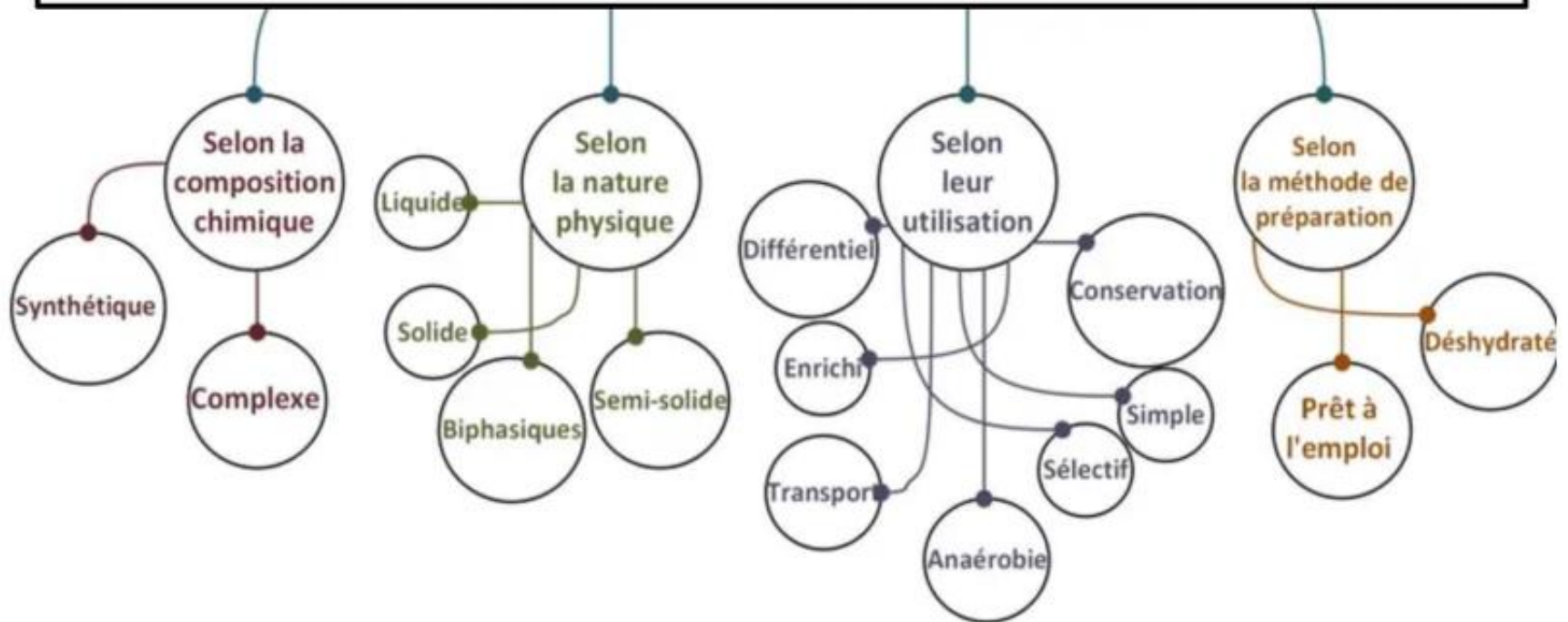
Un milieu de culture est composé:

- ✓ d'un mélange de substrats nutritifs (acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucres, etc),
- ✓ d'un système tampon pour éviter les variations importantes du pH,
- ✓ de sels minéraux et de vitamines.

Il est possible d'ajouter d'autres facteurs de croissance (sang, protéines, hémoglobine, vitamines)



# Classification des milieux de culture

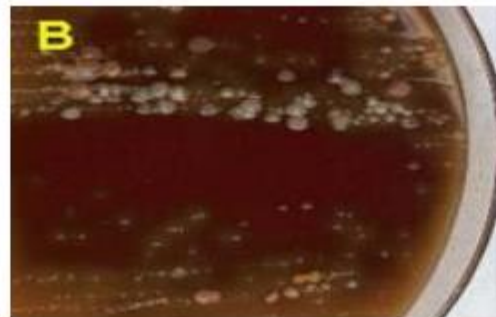


Parmi les milieux de culture, **on distingue les milieux** :

**1.M. d'isolement** qui sont le plus souvent solides (gélifiés) et de composition variable pour permettre le développement de plusieurs espèces bactériennes: **gélose au sang frais, gélose dite au sang cuit**.....

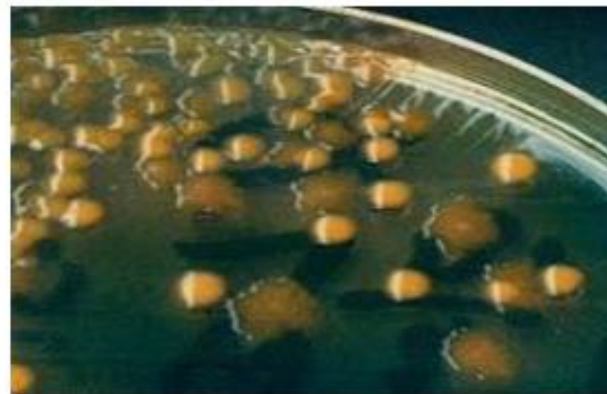
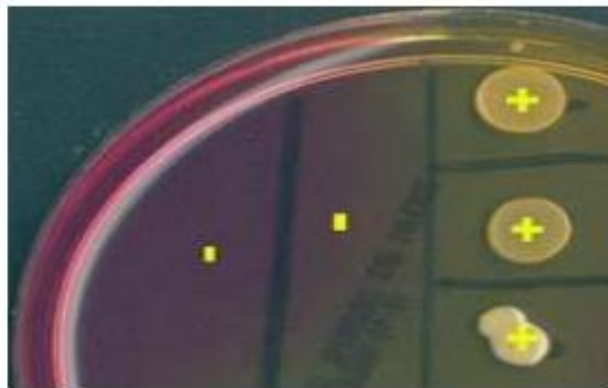
**Ex.** isolement d'une **aspiration bronchique** sur milieu:

- ✓ **gélosé au sang frais (A)**,
- ✓ **au sang cuit (B)** ou
- ✓ **contenant des substrats chromogéniques (C)**

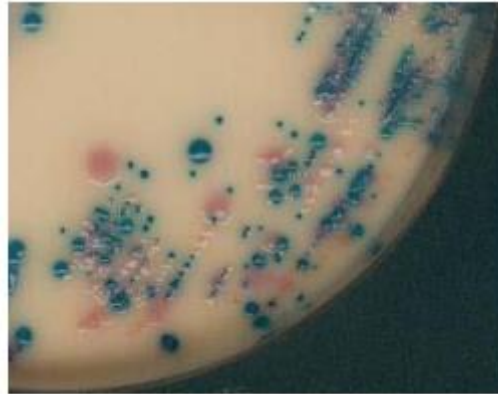


**2. M. sélectifs** qui favorisent artificiellement la croissance d'une espèce au détriment des autres tels le **Milieu de Chapman** (hypersalé + mannitol + indicateur de pH),

**Drigalski** (sels biliaires + cristal violet + lactose + indicateur de pH).....  
**Ex.** culture d'une part sur **le milieu de Chapman (gauche)** de trois souches de ***Staphylococcus aureus*** et d'autre part sur celui de **Drigalski (droite)** de ***E.coli*** et ***Proteus mirabilis***



**3. M. d'identification** permettent au cours de l'isolement ou non de mettre en évidence une ou plusieurs propriétés biochimiques d'une bactérie pour commencer à l'identifier



**4. M. transport et M de conservation:** Milieux destinés pour le transport sans provoquer le stress bactérien et milieux destinés pour la conservation bactérienne tout en maintenant leur viabilité (sous régime du froid,...)



## **B. Apparences des colonies**

**L'aspect des colonies** est le caractère primaire utilisé pour orienter le diagnostic effectué par le bactériologiste. La forme des colonies dépend de :

### **B1. facteurs intrinsèques à la bactérie :**

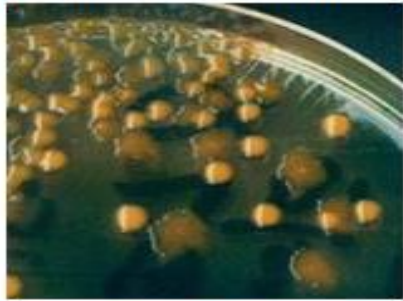
- ✓ mobilité,
- ✓ morphologie : taille, forme, contour, relief, surface
- ✓ production d'une capsule,
- ✓ production de matériel extracellulaire,
- ✓ pigmentation,
- ✓ présence de fimbriae

### **B2. facteurs extrinsèques :**

- ✓ gradients de solutés créés autour de la colonie
- ✓ présence de colorants dans le milieu de culture.



**Ex. Aspects de colonies bactériennes sur le milieu sélectif dénommé Drigalski**



**Autre exemple : Aspects de colonies bactériennes sur le milieu enrichi au sang**



## 8. Facteurs influençant la croissance bactérienne

- A. Composition du milieu de culture
- B. Facteurs physicochimiques de la croissance
- C. Les agents antimicrobiens: les antibiotiques

### A. Composition du milieu de culture

**Le taux de croissance d'une bactérie dépend du milieu de culture**

**EX: *Bacillus subtilis*:  $\mu = 0,3$  divisions /h sur milieu synthétique**

**$\mu = 3$  divisions/h sur bouillon nutritif**

