

Chapitre 5 : Croissance Bactérienne

La croissance se définit comme l'accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme. Chez les organismes pluricellulaires, elle conduit à une augmentation de taille ou de masse, par contre chez les microorganismes, elle aboutit à une augmentation du nombre d'individus. Ainsi, cet accroissement est synonyme de multiplication puisque la majorité des bactéries donne après 20 minutes deux cellules filles qui se ressemblent entre elles et ressemblent à leur cellule mère. La croissance est un phénomène de grand intérêt biologique dont l'importance écologique et pratique est considérable.

1- Mesure de la croissance

Les techniques de mesure de la croissance sont basées sur l'évaluation du nombre de microbes ou de leur masse par unité de volume ou de poids du milieu. Il faut immédiatement remarquer que ces deux grandeurs sont difficilement comparables. En effet, l'augmentation du nombre de microbes est un phénomène discontinu, tandis que l'accroissement de la masse est un processus continu en fonction de temps. Ainsi la plus part des méthodes permettent une estimation **directe** du nombre ou de la masse microbienne. Dans certains cas, on a reconnu à des méthodes **indirectes** fondées sur la mesure d'un paramètre lié à l'activité métabolique.

1.1- Mesure du nombre (Mesure directe)

1.1.1-Mesure directe du nombre de cellules sous microscope :

La méthode est pratiquée couramment pour les microbes de grandes tailles (plusieurs μm) comme les levures. On utilise un hématimètre (cellule de Thoma, de Malassez... (**Fig.1**)), autrement dit une lame porte-objet dont l'une des faces est creusée d'une cavité de profondeur connue (0,1-0,2 mm) et dont le fond porte des quadrillages de surface également connue. La suspension microbienne est placée dans cette cuvette puis recouverte d'une lamelle. Des volumes précis sont ainsi délimités au niveau des quadrillages dans lesquels les cellules sont comptées au microscope. Pour les bactéries de petites tailles, on utilise des grossissements beaucoup plus forts ce qui réduit notablement la profondeur et le diamètre du champ. Ainsi on a souvent recours aux cellules Petroff-Hausser (**Fig.2**).

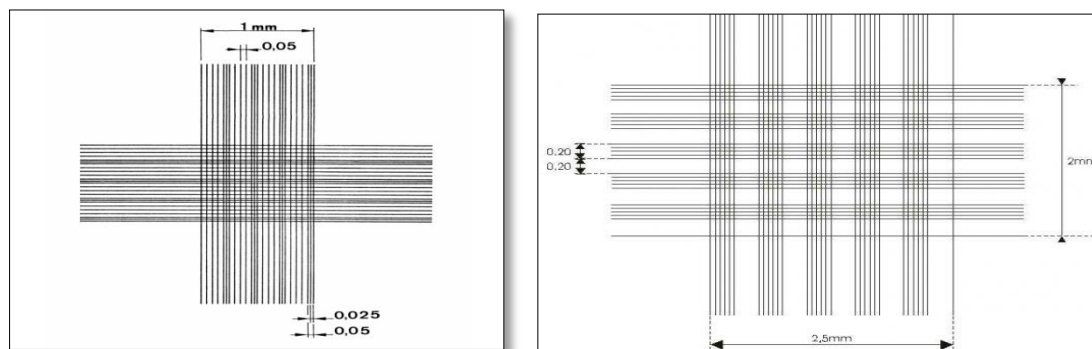


Figure 1 : Cellule de Thoma (à gauche), et cellule de Malassez (à droite).

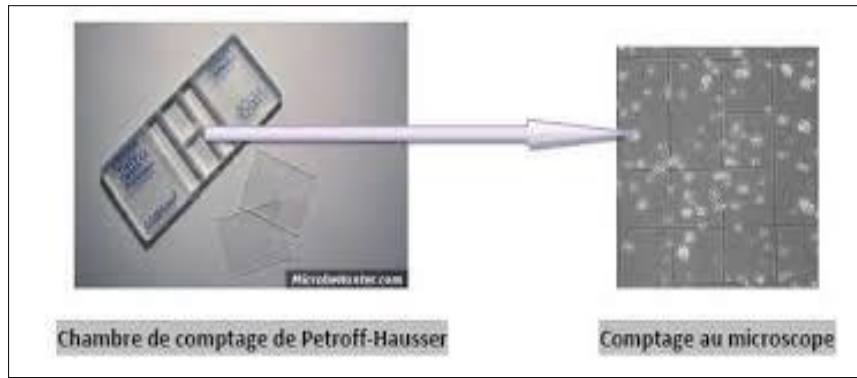


Figure 2 : cellules Petroff-Hausser.

1.1.2- Epifluorescence

Les bactéries sont colorées par un fluorochrome comme l'orangé d'acridine, puis examinées en lumière ultraviolette. On peut compter sélectivement les bactéries vivantes qui fluorescent dans le vert et les bactéries mortes dont la fluorescence rouge résulte de la combinaison du fluorochrome avec l'ADN dénaturé. Il est important de signaler que ce procédé est d'interaction délicate, car en phase de multiplication ont une des doubles hélices d'ADN ouvertes (réplication).

1.1.3- Compteur des particules

Cet appareil réalise automatiquement le dénombrement des particules ou des cellules en suspension dans une solution d'électrolytes. Le dispositif de mesure est constitué par un tube cylindrique percé d'un micro-orifice de part et d'autre duquel sont disposées deux électrodes reliées à un générateur de courant électrique. Lorsque la cellule traverse l'orifice, elle déplace un volume, de solutions conductrices égales à son propre volume produisant une augmentation momentanée de la résistance. Au-dessus d'un certain seuil, cette résistance se traduit par une impulsion qui est enregistrée par un compteur électronique. Le nombre d'impulsion enregistrées pendant un temps est égal au nombre de particules ayant traversé l'orifice pendant le même temps.

1.1.4- Dénombrement après culture

Le dénombrement de bactéries viables est une méthode communément utilisée. Plusieurs modalités techniques peuvent être proposées. La plus habituelle est la culture en boîte de Pétri. Un volume fixe de la suspension brute ou de dilution 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 de cellules microbiennes présentes dans le volume analysé de la suspension. Ainsi pour rendre la méthode plus rigoureuse, on doit réaliser l'expérience trois fois après avoir rendu le milieu très homogène par agitation. Il faut noter que les chaînettes, les amas ou les agglomérats microbiens, ne donnent qu'une seule colonie. C'est pourquoi, on devrait exprimer les résultats non pas en nombre de cellules mais en **unité formant une colonie (UFC)**. On peut aussi utiliser la méthode du **nombre le plus probable (NPP ou MPN)** qui se fait traditionnellement pour dénombrer les bactéries dans un milieu liquide (BCPL).

1.2- Mesure de la masse (mesure indirecte)

1.2.1- Détermination du poids sec

Les microorganismes sont récoltés par centrifugation ou par filtration sur membrane. Après un lavage approprié par un tampon, récupéré le culot ou le filtre desséché à 100-110°C jusqu'à poids constant que

l'ont exprimé généralement en grammes de matières sèches par litre. Cette mesure ne permet pas de distinguer entre cellule morte et cellule vivante.

1.2.2- Mesure de trouble

C'est le procédé le plus simple, le plus rapide et actuellement le plus utilisé pour évaluer la masse microbienne. Il s'agit d'une méthode optique générale, appelée opacimétrie, 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 (notion d'absorbance).

1.3- 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.

1.3.1- Mesure de la consommation de substrat :

Le substrat peut-être une source de carbone, une source d'azote, l'oxygène ou un facteur de croissance. Cette méthode est d'utilisation très limitée et ces résultats ne sont pas très satisfaisants. Sa crédibilité dépend de la précision du dosage, de la présence de substances interférentes et du rapport de la masse cellulaire formée par unité de substance nutritive consommée.

1.3.2- Mesure des constituants cellulaires

Le constituant cellulaire idéal devrait être ; Ubiquiste et disparaître rapidement des cellules après leur mort.

Être absent du milieu ou tout au moins ne pas être associé à des éléments figurés abiotiques qui ne peuvent pas être séparés des cellules. Être dans les cellules en concentration à peu près constante quel que soit leur état physiologique. Ainsi cette technique est applicable aux protéines, à l'ADN, à l'ATP et aux FAD et FMN.

1.3.3- Mesure des produits d'excrétion

Au cours de leur développement, les microorganismes rejettent dans le milieu extérieur, les produits de leur métabolisme. Les métabolites primaires (acides aminés, acides organiques) ne sont pas rejetés en quantité notable car la cellule qui les synthétise en a besoin pour sa croissance. Leur mesure n'est pas très significative. Au contraire, certains produits du catabolisme constituent de véritables déchets dont la cellule doit se débarrasser. Leur dosage peut se révéler très utile.

1.3.4- Mesure des variations physico-chimiques du milieu

Les variations physico-chimiques du milieu traduisent une évolution de la croissance. Les modifications de pH, de conductivité électrique, de potentiel d'oxydoréduction et d'énergie calorifique libérée par les cellules peuvent être mesurées avec intérêt. Dans ces procédés, on cherche à établir une relation entre la vitesse d'accroissement et la vitesse de variation du paramètre mesuré.

pH : l'acidification du milieu est synonyme de dégradation de sucre.

Impédance : c'est la résistance au flux d'un courant alternatif. Au cours de l'accroissement les microbes transforment certaines molécules électriquement neutres du milieu (glucose...) en molécules chargés (acides organiques...), ce qui augmente la conductivité et diminue l'impédance.

Potentiel d'oxydoréduction : la baisse du potentiel redox dans les cultures microbiennes résulte de la raréfaction du milieu en oxygène dissous et de son enrichissement en substances réductrices.

Production de chaleur : toutes les réactions chimiques s'accompagnent d'une variation d'enthalpie. Cette dernière se traduit au cours de la croissance microbienne par un dégagement de chaleur lié à la dégradation des substrats énergétiques.

2- Paramètre de croissance

Ces paramètres sont appelés également **constantes et expression de la croissance**

La croissance d'une bactérie placée dans des conditions idéales de culture peut être définie par deux constantes principales :

2.1- Le temps de génération

Le temps de génération est le temps entre deux divisions successives ou celui nécessaire au doublement de la population. Si on part d'une cellule bactérienne unique, son accroissement se fait selon une progression géométrique : 1 puis 2, puis 4, puis 8, puis 16...etc. Le temps de génération (G) est le temps nécessaire à une bactérie de produire deux bactéries ou à huit bactéries pour donner seize.

$$G = t/n$$

t = temps (connu)

n = nombre de division

Avec *E.coli* il est d'environ 20 minutes. Pour *Mycobacterium tuberculosis* il est d'environ 800 à 900 minutes en milieu synthétique.

2.2- Le taux de génération

On le définit généralement comme étant le nombre de division par unité de temps. $\mu = n/t$

C'est donc l'inverse du temps de génération. Si on prend par exemple *E.coli* qui se divise tous les vingt minutes, en 1 heure, unité de temps généralement adoptée, le taux de croissance est de $3/1=3$. Pour *Mycobacterium tuberculosis*, il est de 0.075.

3- La courbe de croissance

Après 16 à 24 heures de culture, la croissance des bactéries s'arrête. Si le taux de croissance restait continuellement constant et maximal, la masse microbienne obtenue, en 48 heures seulement, serait de l'ordre de 4000 fois le poids du globe terrestre. Il est donc heureux que cette croissance limitée par l'épuisement du substrat ou par l'accumulation des déchets toxiques, ne puisse se poursuivre indéfiniment. La courbe de croissance d'une bactérie en milieu liquide présente quatre phases plus ou moins distinctes (**Fig.3**) :

- ✓ **La phase de latence** où le taux de croissance est nul ($\mu=0$).
- ✓ **La phase exponentielle** où le taux de croissance est constant et maximal ($\mu=c^{te}$).
- ✓ **La phase maximale stationnaire** au cours de laquelle $\mu=0$.
- ✓ **La phase de déclin** où le taux de croissance diminue ($\mu<0$).

NB. On parle aussi de **phase d'accélération** entre 1 et 2 et **phase de ralentissement** entre 2 et 3.

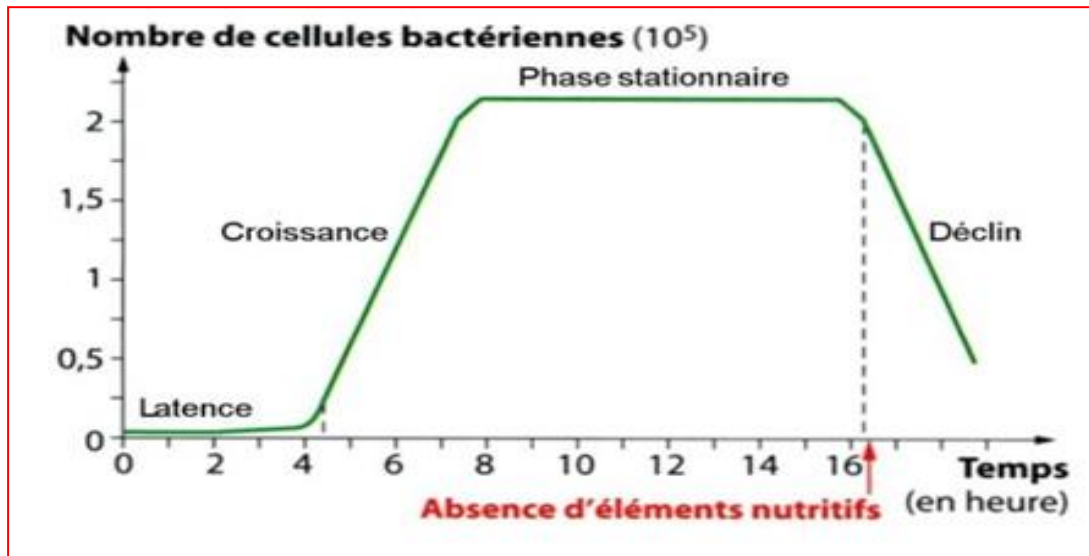


Figure 3 : La courbe de croissance

3.1- Phase de latence

Ensemençons un milieu convenable avec une petite quantité de culture microbienne. On observe qu'il faut normalement 2 à 3 heures pour observer un développement. Cette période au cours de laquelle le taux de croissance est nul est dite phase de latence. Elle est généralement conditionnée par :

- ✓ L'âge de la culture
- ✓ L'adaptation des cellules bactériennes au milieu.

NB : on peut aussi attribuer ce retard au transfert des bactéries d'un milieu vers un autre neuf mais différent.

3.2- Phase exponentielle

Elle suit la phase de latence. C'est la phase physiologique par excellence, car les bactéries se multiplient sans entrave. Le taux de croissance est maximal et constant ce qui revient à dire que le temps de génération est minimal. Elle se traduit sur la figure par une droite très caractérisée par sa pente.

3.3- Phase stationnaire

La phase exponentielle ne dure que quelques heures et le milieu devient de moins en moins favorable à la croissance des bactéries. Le nombre de cellule viable reste constant. Il peut correspondre à un équilibre entre le nombre des cellules vivantes et le nombre des cellules mortes. Sur la figure, elle se traduit par un plateau.

3.4- Phase de déclin

Au cours de cette dernière phase, les bactéries ne se divisent plus. Un grand nombre meurt et sont lysées par les enzymes que les bactéries libèrent. Le taux de mortalité peut être constant comme le taux de

croissance. Le nombre de cellules détruites étant proportionnel au temps et l'inclinaison de la droite dépend de l'espèce bactérienne et des conditions d'environnement.

4- Facteurs influençant la croissance

Les facteurs physico-chimiques qui conditionnent la nutrition sont les mêmes qui influent sur la croissance. Les plus importants sont :

4.1- La température

On peut observer trois types de courbes qui correspondent aux trois catégories de microorganismes déjà définies.

4.2- Le substrat

Le taux de croissance d'une espèce bactérienne dépend étroitement du milieu dans lequel on la cultive, autrement dit du substrat. Ce cas peut être bien expliqué en étudiant la culture d'une bactérie dans un milieu contenant un facteur limitant et les autres éléments sont très abondants. Ainsi le taux de croissance augmente progressivement jusqu'à une valeur fixe qui correspond au temps exponentiel puis la courbe tend vers une asymptote (Fig.4).

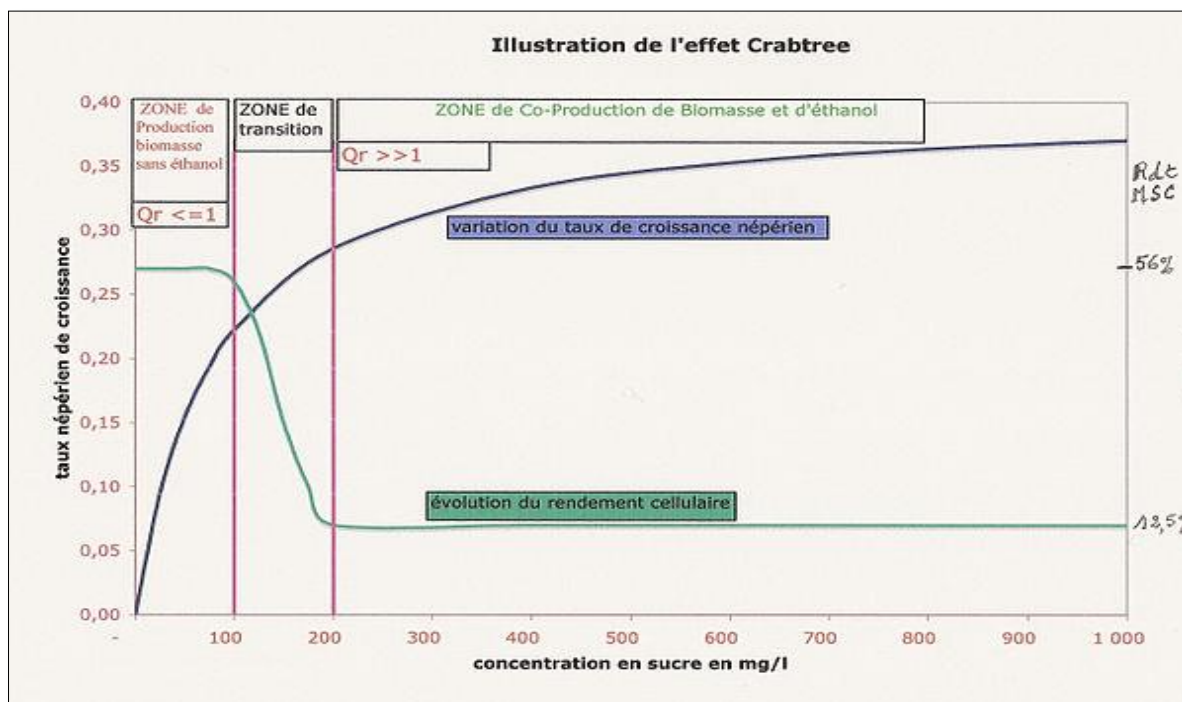


Figure 4 : La croissance des bactéries en fonction de substrat.

5- Culture bactérienne

L'étude des bactéries a connu son plein développement à partir du moment où furent mises au point les méthodes pour les isoler et les cultiver. Une préparation nutritive qu'on prépare au laboratoire pour cultiver les micro-organismes est appelé **milieu de culture**. Les bactéries introduites dans le milieu de culture constituent **l'inoculum**. De très nombreux milieux de culture sont utilisés en bactériologie. Ils peuvent être classés selon de nombreux critères :

5.1- Classification des milieux de culture selon la consistance :

- **Milieux liquides** qu'on appelle bouillons de culture.
- **Les milieux solides** peuvent être préparés sur boîte de Pétri ou en tube (gélose inclinée, gélose profonde). Selon la quantité d'agar rajoutée, on a des géloses solides (1,5%) et des géloses molles (0,75%).

Les bactéries se développent sous forme de colonies, dont la forme, la couleur, l'odeur, dépendent à la fois de l'espèce et du milieu utilisé.

L'agar fond lorsqu'on la réchauffe à 100°C et se solidifie lorsqu'elle se refroidit (dès 40°C). Généralement, on prépare les boîtes de Pétri avec une gélose stabilisée à 50°C.

5.2- Classification des milieux de culture selon la composition chimique

Leur composition varie à l'infini. Elle est choisie en fonction de but que l'on veut atteindre et des besoins que requiert la bactérie.

5.2.1- Milieux synthétiques, milieux empiriques

Généralement les bactéries sont divisées en deux grands groupes, les autotrophes qui ont un équipement enzymatique très diversifié et qui peuvent synthétiser un grand nombre de composés chimiques et les hétérotrophes dont la croissance exige la présence de substances qu'elles ne peuvent pas synthétiser. Les milieux nécessaires à leur isolement sont dits synthétiques (de composition chimique connue) ou empirique (de composition chimique mal connue).

5.2.2- Milieux sélectifs ou d'enrichissement

Il est possible de favoriser la multiplication d'une bactérie par rapport à d'autres dans un même milieu de culture en ajoutant soit un inhibiteur de croissance pour les autres germes soit un facteur de croissance dans le milieu (milieu sélectif).

5.2.3- Milieux d'isolement, milieux d'identification

On parle généralement de milieux usuels pour isoler et faire germer une bactérie sur un milieu. Le plus connu est la gélose nutritive (gélose ordinaire) qui est composée d'un mélange de bouillon nutritif et de l'agar-agar.

5.2.4- Les milieux d'identification

Utilisés dans la mise en évidence des caractères biochimiques des bactéries dans l'identification différentielle.

5.2.5- Les milieux de conservation

Ce sont des milieux pauvres au sein desquels les bactéries survivent dans un état de vie ralentie.

6- Les agents antimicrobiens

Pour des raisons multiples, il est apparu utile et dans certains cas de contrôler la croissance des microorganismes. La première est qu'un certain nombre de bactéries sont des agents pathogènes pour

l'homme et l'animal. Il fallait tout naturellement de protéger de leurs effets néfastes, donc rechercher et sélectionner les moyens de lutte les plus efficaces.

Le but essentiel que l'on se propose est quelquefois d'inhiber le développement des microorganismes nuisibles mais le plus souvent de les détruire totalement. On parle communément de stérilisation comme l'opération qui a pour objet de tuer tous les microorganismes contenus dans une opération. Le matériel traité est dit stérile lorsque le résultat est acquis, autrement dit lorsqu'aucun microorganisme n'est revivifiable ou capable de se développer. La mort ou l'inactivation pour une bactérie est bien une perte irréversible de son pouvoir de reproduction (croissance et division), les agents utilisés pour assurer la stérilisation sont de trois type : **physique, chimique et chimiothérapeutiques** :

Désinfectants : on donne le nom de désinfectants aux agents chimiques capables de détruire les germes pathogènes dans les milieux extérieur à l'homme : l'eau, l'air, le sol ou encore les objets et les matériaux les plus divers. Ces substances peuvent être utilisées aux concentrations plus ou moins élevées avec des temps de contact prolongés.

Antiseptiques : un milieu est dit septique lorsqu'à son niveau, des microorganismes pathogènes peuvent être présents et même de développer. Il est aseptique dans le cas contraire. Des conditions rigoureuses d'asepsie sont fréquemment requises au cours de certaines opérations. Les agents antiseptiques sont des substances chimiques capables de détruire les microorganismes ou d'arrêter leur développement ou leur action. Leur usage est corporal ces substances tuent ou prévient la croissance des bactéries, champignons et virus sur les surfaces internes ou externes de l'organisme.

Les désinfectants et les antiseptiques en raison de leurs toxicités ne peuvent pas être administrés à l'homme par voie générale.

Stérilisation : C'est une opération qui a pour objet de tuer tous les micro-organismes d'une préparation. Le matériel traité est dit stérile quand le résultat est acquis, c'est-à-dire qu'aucun micro- organisme n'est capable de se développer.

Antibiotiques : ce sont des substances chimiques naturelles ou synthétiques qui ont un pouvoir destructeur sur les bactéries. Ce sont dépourvues de toxicité pour les autres cellules, humaines ou animale. Ces agents qualifiés de chimiothérapeutes comprennent les sulfamides et les antibiotiques. Les premiers sont des produits chimiques obtenus par synthèse. Les seconds sont aussi des dérivés chimiques, mais élaborés par des microorganismes vivants (champignons et bactéries). Deux autres propriétés tendent à mieux les définir ; ils agissent à des concentrations très faibles de l'ordre de $\mu\text{g/ml}$ *in vitro* ; ils inhibent la croissance microbienne en interférant dans le métabolisme cellulaire. Les unes et les autres de ces substances ont une action plus ou moins totale. On dit qu'elles sont bactériostatiques ou fongistatiques lorsqu'elles empêchent la multiplication d'une bactérie ou d'un champignon. Elles sont bactéricides ou fongicides lorsqu'elles détruisent totalement les bactéries ou les champignons.

7. L'antibiogramme

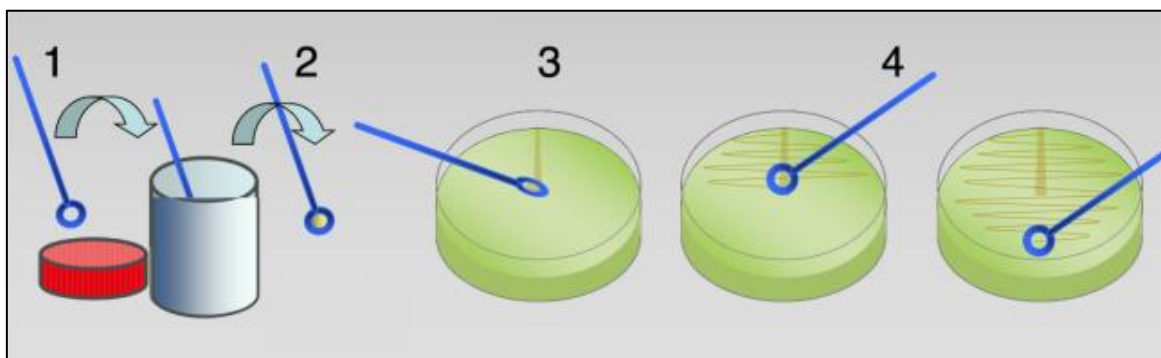
Un antibiotique est une substance active sur les bactéries. L'action peut être bactéricide ou bactériostatique. Elle diffère selon la molécule, la bactérie elle-même, son état physiologique et son environnement.

7.1 But :

Il permet d'étudier la sensibilité des bactéries isolées, aux antibiotiques. Pour cela, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu Muller Hinton. C'est une technique très utilisée aux laboratoires et basée sur la diffusion d'un disque en papier buvard imprégné de différentes concentrations d'antibiotiques. Cette diffusion repose sur la détermination du diamètre de la zone d'inhibition, qui varie en fonction du pouvoir de diffusion de l'antibiotique et la vitesse de la croissance de la bactérie.

7.2 Technique :

- Une colonie prélevée à partir du milieu gélosé, est mise à l'aide d'une anse de platine (ou pipette Pasteur) en suspension dans l'eau physiologique stérile.
- Ensemencer par des stries serrées la gélose du Muller Hinton, à l'aide de l'anse de platine ou à l'aide d'un écouvillon (ensemencement par écouvillonnage).



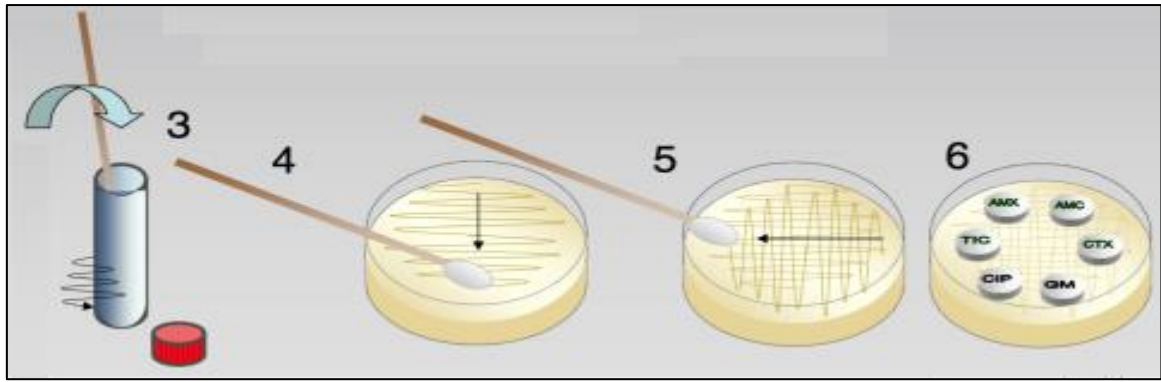
- Déposer les disques d'antibiotiques légèrement à la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile.



- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.

7.3 Lecture :

Après incubation, on mesure avec précision, le diamètre des zones d'inhibition de chaque antibiotique à l'aide d'une règle, cette distance millimétrique est ensuite traduite à l'aide d'un tableau contenant toute les valeurs critiques selon les cas : sensible, intermédiaire ou résistante.



7.4 Exemple :

