

Faculté SNV – Université Blida 1

Niveau: L2 Sciences Agronomiques / Biotechnologie / Ecologie

Cours de microbiologie générale

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للمجلات الجزائرية



Enseignante responsable
Dr. TAFIFET Lamia

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



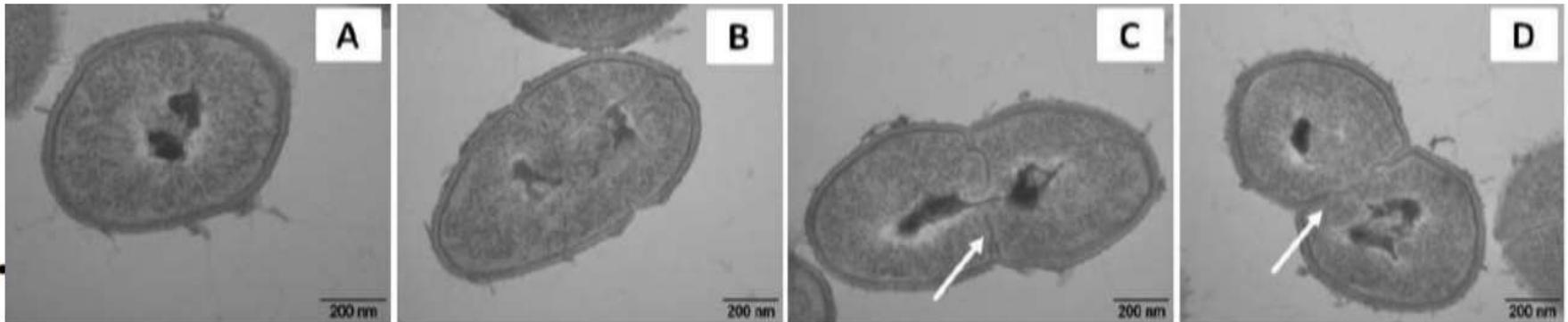
Croissance des
microorganismes

Définition de la croissance microbienne

La croissance microbienne est définie comme une augmentation des constituants cellulaires, et peut se traduire par une augmentation de taille ou du nombre des microorganismes.

La bactérie se reproduit par fission binaire – (1 → 2, 2 → 4...2n)

- Les mesures de la croissance représentent des suivis des changements dans le nombre total de cellules ou de la masse des cellules.



Enterococcus faecalis observées par un microscope électronique à transmission. A: réplication de l'ADN chromosomique, B: Augmentation de la taille et de la quantité des constituants cellulaires, C: Apparition du septum (flèche), D: Septum mis en place (flèche) entre deux cellules filles,

Courbe de croissance :

La culture bactérienne dans un milieu de culture liquide non renouvelé, dans les conditions optimales de croissance ; permet d'obtenir une courbe de croissance qui reflète l'évolution de la concentration cellulaire ou la biomasse en fonction du temps.

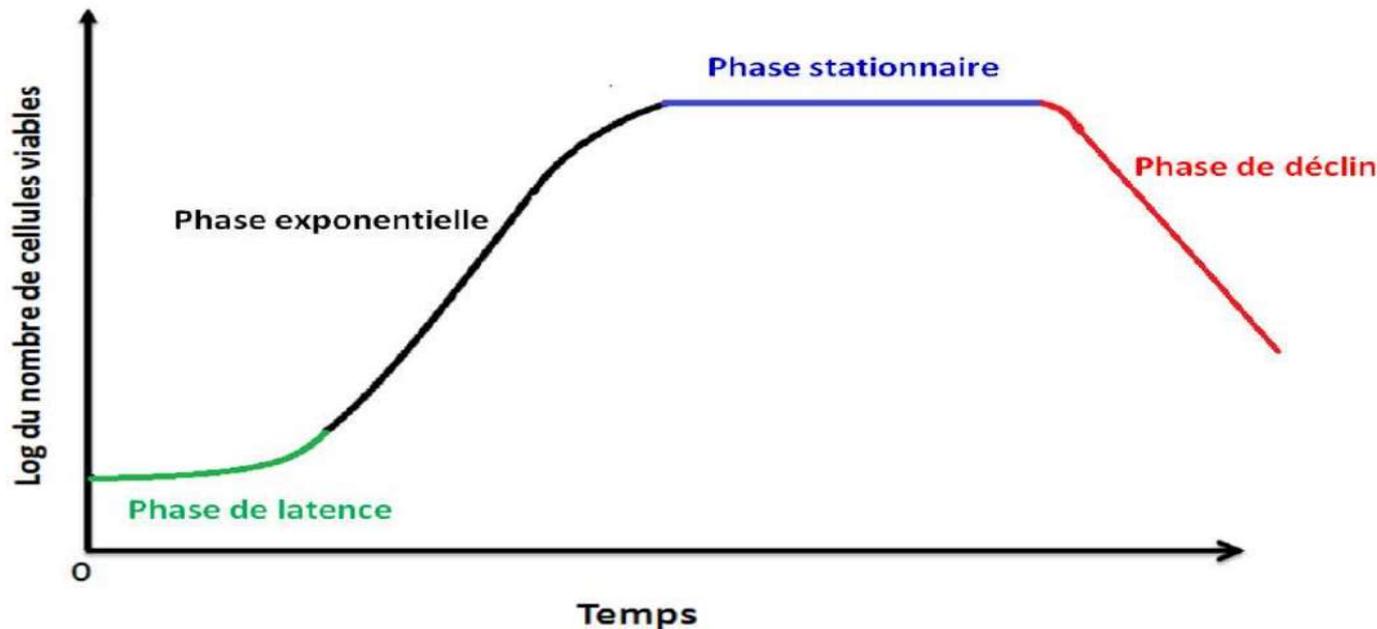
1. La phase de latence

Le taux de croissance est égal à zéro ($\mu = 0$). Les bactéries ne se divisent pas, mais s'adaptent aux conditions de leur milieu environnemental. Elles synthétisent les enzymes nécessaires spécifiques des substrats (nutriments) présents.

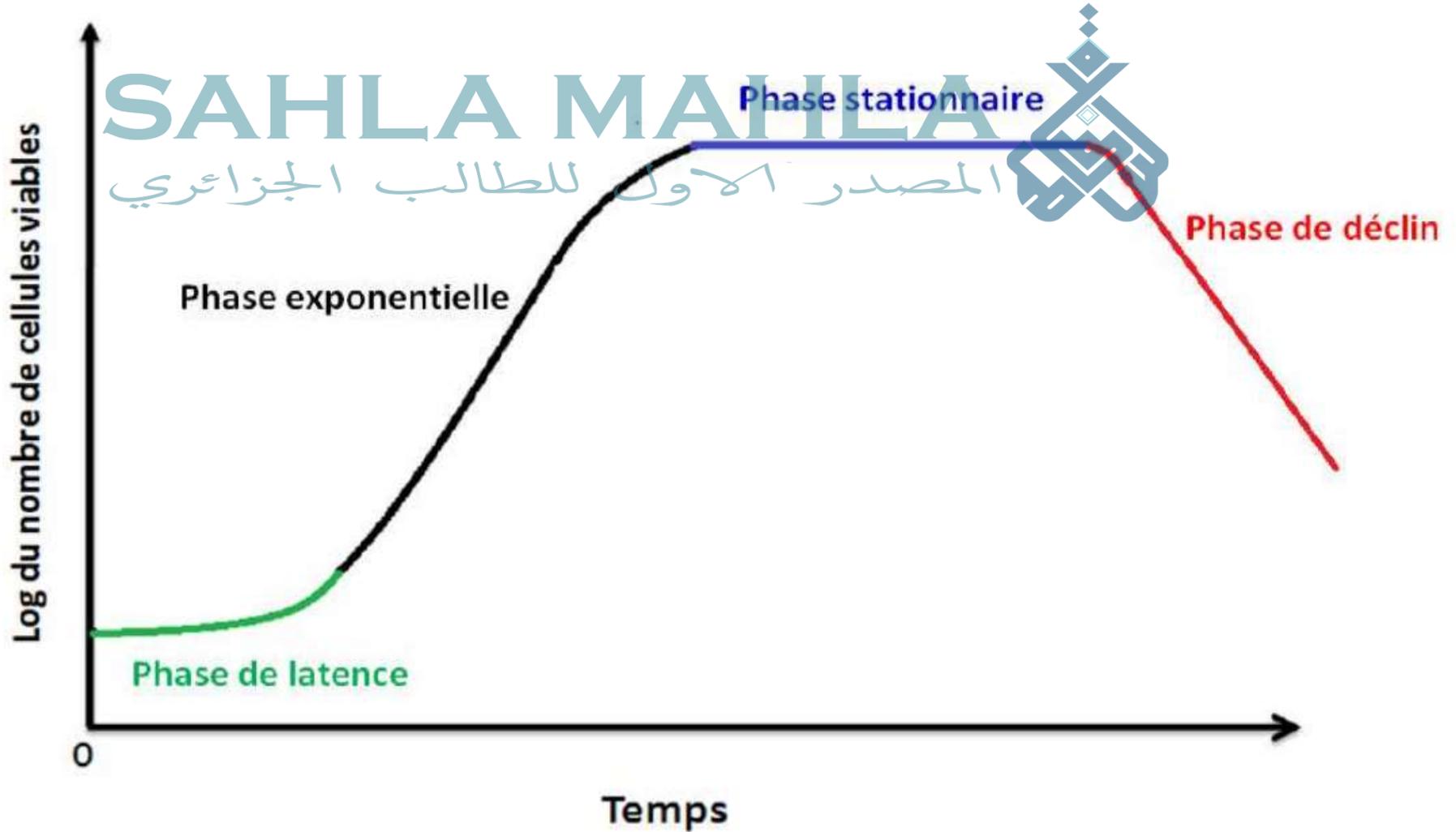
2. La phase de croissance exponentielle (logarithmique)

Les cellules bactériennes se divisent sans arrêt, tant que les nutriments sont disponibles et les substances toxiques absentes et le pH est optimal.

Le taux de croissance est maximal. L'état physiologique est maximal également.



- Développement et division cellulaire à vitesse maximale
- Le nombre et la masse cellulaire doublent à des intervalles réguliers
- Population en équilibre physiologique et biochimique
- Nombre et la masse de cellules augmente par un facteur **exponentiel** (2^n)
 - n = nombre de division ou de générations



3. La phase stationnaire

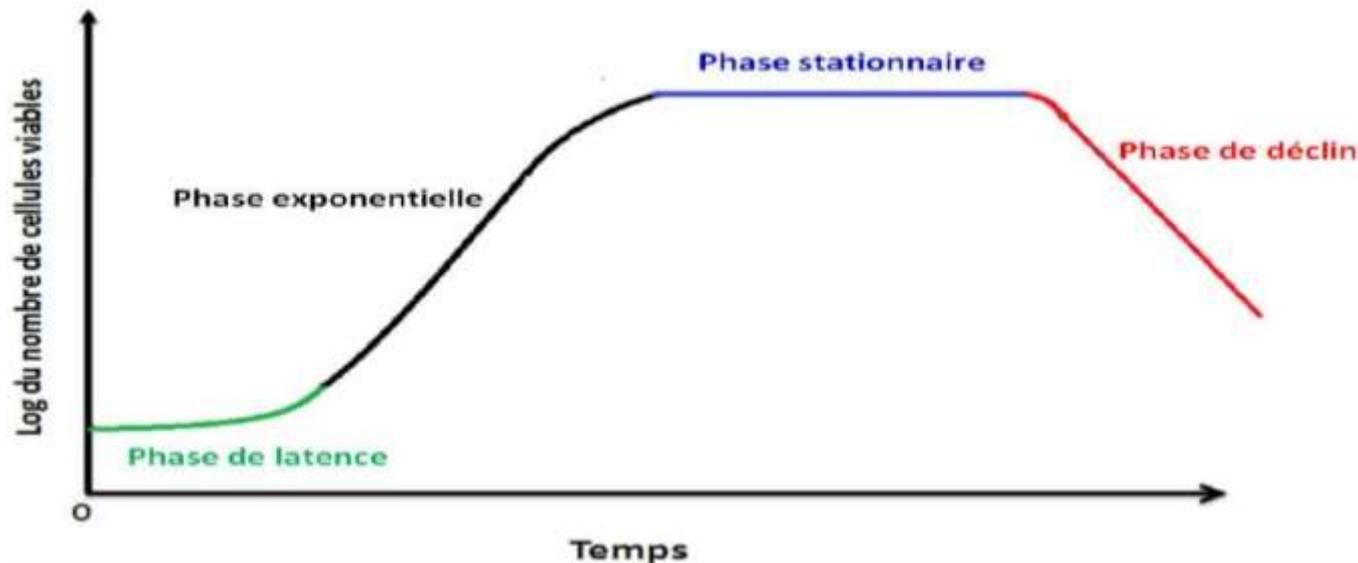
Le taux de croissance est constant, il correspond à un équilibre entre les cellules provenant de la multiplication et le nombre de cellules qui disparaissent par autolyse.

Lorsque la culture est faite dans un flacon ou un tube, à un moment donné, les nutriments s'épuisent, les produits toxiques s'accumulent et le pH change.

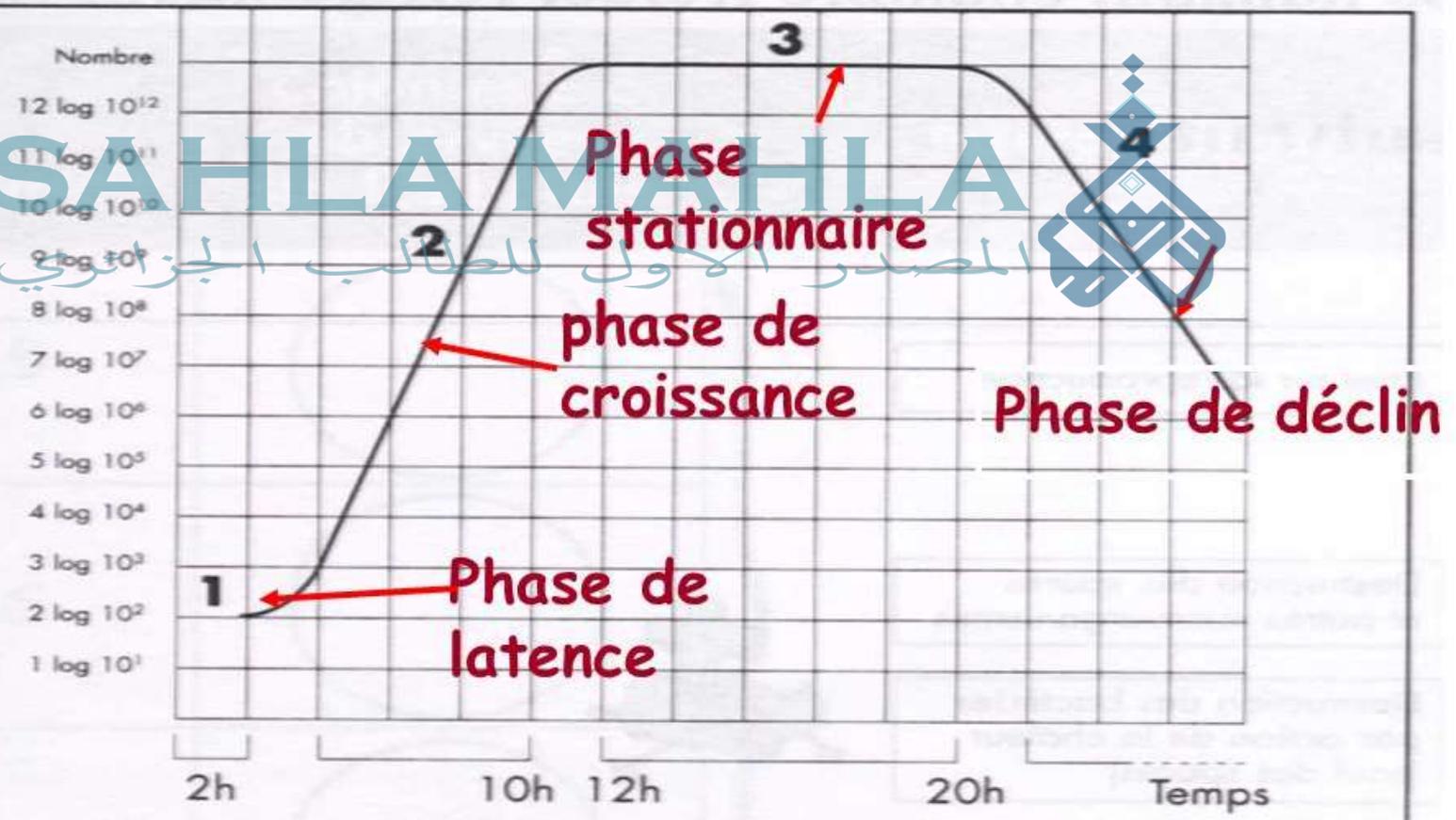
Les cellules se nourrissent du contenu libéré par des cellules mortes. le milieu devient de moins en moins favorable à la croissance (épuiement d'un aliment indispensable ou accumulation des métabolites toxiques).

4. La phase de déclin

Les bactéries ne se divisent plus. Elles meurent par lyse cellulaire. Le taux de croissance est négatif ($\mu < 0$).



SAHLA MAHLA
المصدر الأول للطالب الجزائري



COURBE DE CROISSANCE BACTÉRIENNE
tracée à partir de lait stérile ensemencé avec *Eschérichia coli*
et incubé à 37°C dans un bain d'eau (milieu liquide non renouvelé)

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري

Paramètres de la croissance



Paramètres de croissance

1- Temps de génération

Le temps de génération (G) est le temps nécessaire à une bactérie pour se diviser. Il est calculé comme suit :

G = t/n avec t : temps en minute et n : nombre de divisions.

Par exemple:

- le temps de génération de *E. coli* est 20 minutes (60 mn/ 3 divisions) et
- celui de *Mycobacterium tuberculosis* est de 800 – 900 minutes.

Paramètres de croissance

2- Taux de croissance

Le taux de croissance (μ) est défini par le nombre de divisions par unité de temps (en heure).



Il est calculé comme suit : $\mu = n/t$ avec n : nombre de divisions et $t =$ temps connu en heure.

De ce fait, le taux de croissance *d'E. coli* : $\mu = (3/1) = 3$ et celui de *Mycobacterium tuberculosis* est $\mu = 0,075$.

Division Exponentielle

Temps (h)	Nombre de générations (n)	Nombre de cellules (N)	Temps (h)	Nombre de générations (n)	Nombre de cellules (N)
0	0	1 (2^0)	4.5	9	512 (2^9)
0.5	1	2 (2^1)	5	10	1024 (2^{10})
1	2	4 (2^2)	5.5	11	2048 (2^{11})
1.5	3	8 (2^3)	6	12	4096 (2^{12})
2	4	16 (2^4)	6.5	13	8192 (2^{13})
2.5	5	32 (2^5)	7	14	16384 (2^{14})
3	6	64 (2^6)	7.5	15	32768 (2^{15})
3.5	7	128 (2^7)	8	16	65536 (2^{16})
4	8	256 (2^8)	8.5	17	131072 (2^{17})

Principales techniques de mesure de la croissance

Lors de la croissance bactérienne, le nombre et la masse cellulaire augmente. Il existe plusieurs méthodes qui permettent la mesure et le suivi de ce processus.

- 1. Mesure du nombre : comptage total des particules**
- 2. Dénombrement des bactéries cultivables**
- 3. Mesure de la masse**

I. Mesure du nombre : comptage total des particules

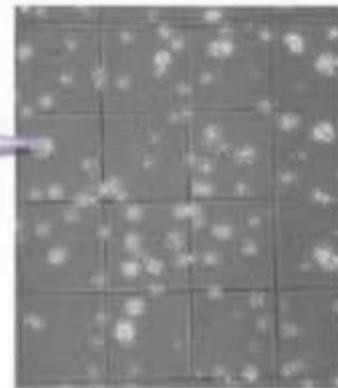
1/ Chambre de comptage de Petroff-Hausser, hémocytomètre, hématimètre

Une technique de comptage direct des bactéries. Elle est plus adaptée pour les microorganismes de grandes tailles (plusieurs μm).

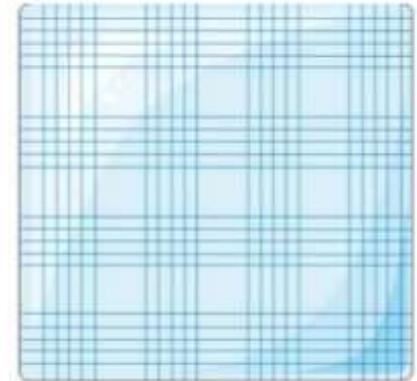
Le comptage se fait sous observation microscopique en utilisant des lames spécifiques ayant des quadrillages et des puits microscopiques permettant de dénombrer le nombre de cellules se trouvant dans une surface et un volume donné
Comptage des cellules vivantes+ des cellules mortes.



Chambre de comptage de Petroff-Hausser



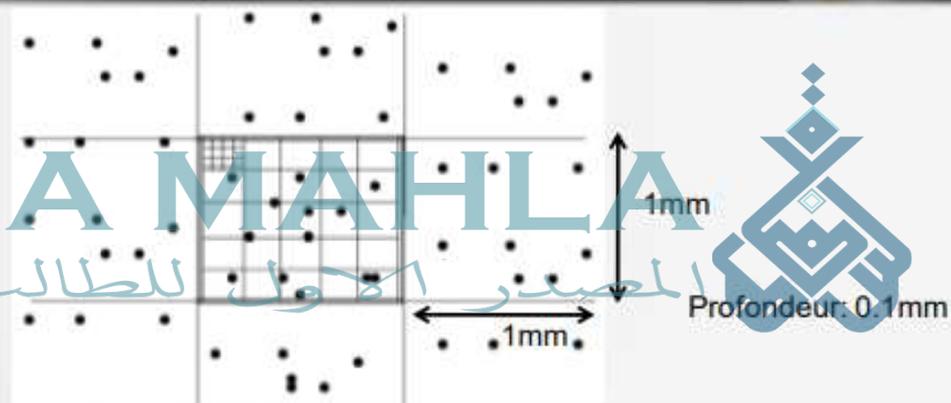
Comptage au microscope



Malassez

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



- Calculer le volume d'un carré:
= $0.1\text{cm} \times 0.1\text{cm} \times 0.01\text{cm} = 1 \times 10^{-4}\text{cm}^3$ ou ml
- Diviser le nb moyen de cellules par le volume d'un carré
– Donc $7 / 1 \times 10^{-4} \text{ ml} = 7 \times 10^4 \text{ cellules/ml}$

Mesure du nombre : comptage total des particules

1/ Chambre de comptage de Petroff-Hausser, hémocytomètres, hématimètre
– rapide, peu sensible, pas de distinction vivante/morte (sauf si coloration) - plus facile si coloration – besoin de concentration importante ($>10^7$ cellules /ml)

2/ Compteurs électriques de particules de type Coulter – pour grands microorganismes (levures non filamenteuses, protozoaires, algues)

- Réalise automatiquement le dénombrement des particules ou cellules en suspension dans une solution d'électrolytes.
- – tube cylindrique (microorifice) – pas de distinction vivante/morte ...



II. Dénombrement des bactéries cultivables

Dénombrement après culture

Le dénombrement après culture est une méthode classique appliquée en routine dans les laboratoires de microbiologie.

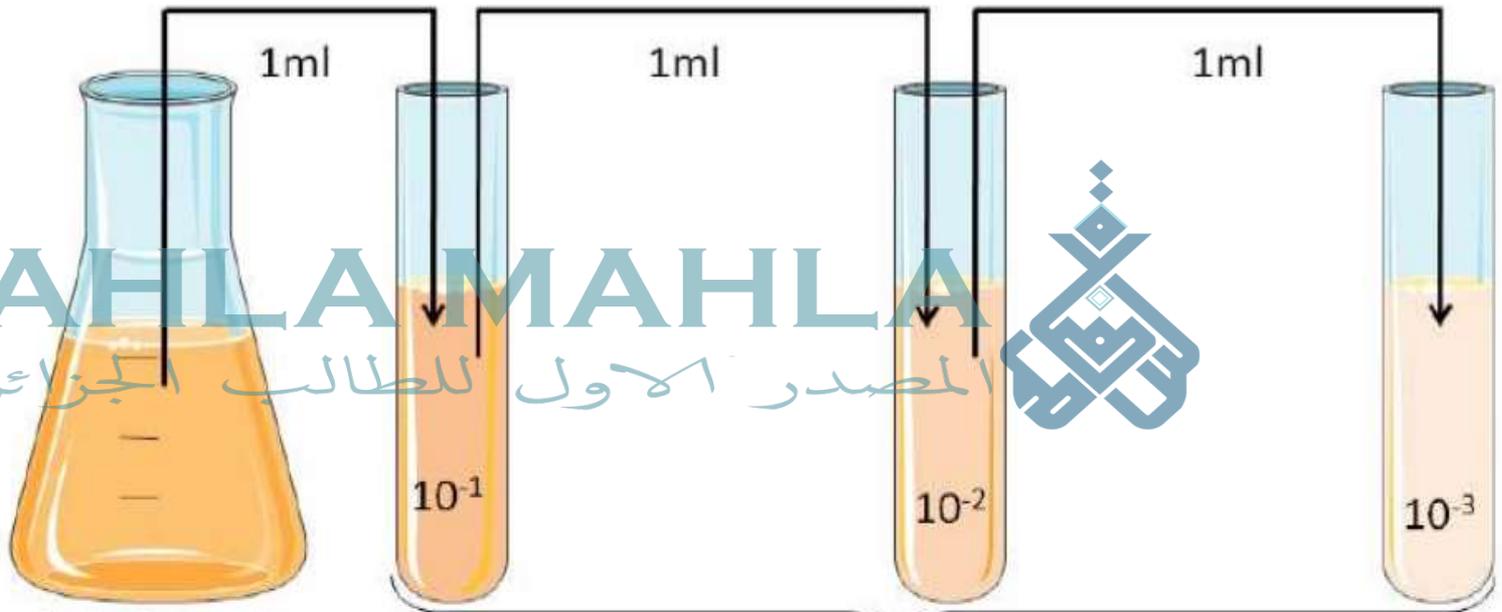
Elle présente l'avantage de dénombrer uniquement les cellules vivantes qui peuvent former des colonies visibles à l'oeil nu.

une série de dilutions est réalisée à partir des échantillons, puisensemencée en surface ou en profondeur sur la gélose, le nombre bactérien unité formant la colonie UFC se traduit par le nombre des colonies obtenues multiplié fois le facteur de dilution.

Le nombre total de bactéries est calculé par le nombre d'UFC multiplié par le volumeensemencé et l'ensemble est divisé par la dilution dans laquelle le nombre d'UFC est calculé.

Dénombrement après culture des bactéries

1- Dilutions décimales



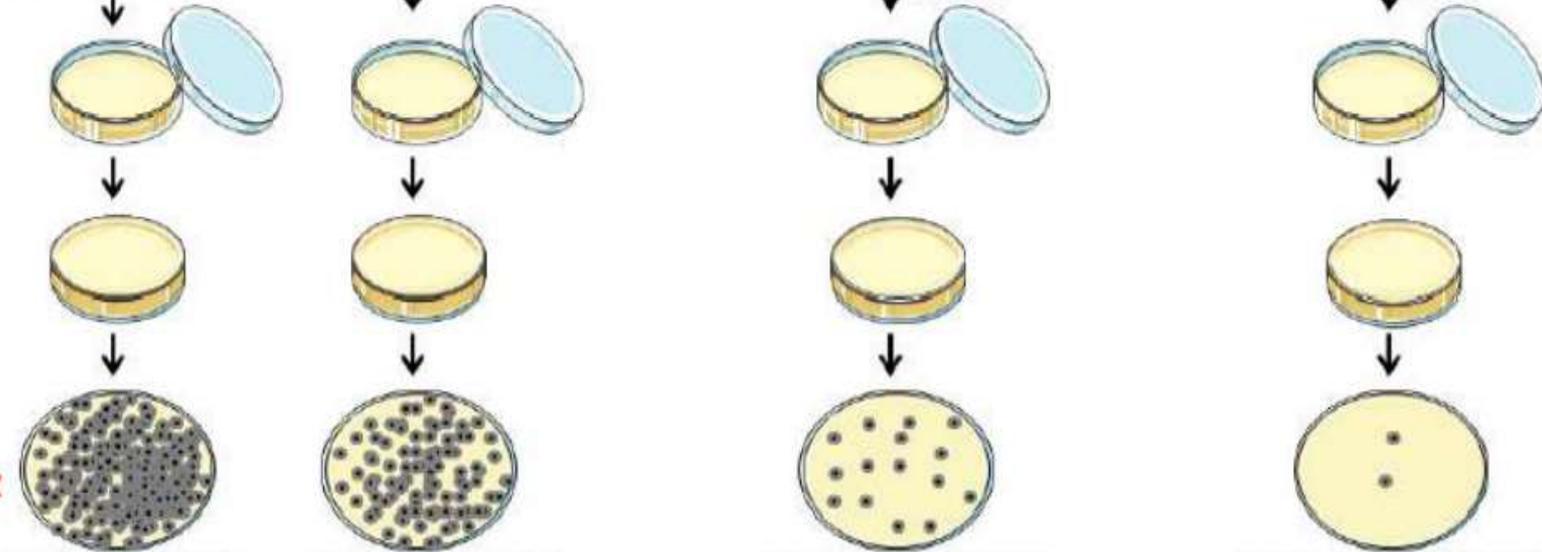
Solution mère (bactéries)

9 ml d'eau physiologique

2- Isolement (en surface ou en masse)

3- Incubation

4- Dénombrement



Nombre x 1

Nombre x 10

Nombre x 100

Nombre x 1000

La numération des cellules viables après culture

Après incubation réalisée dans des conditions convenables, on compte les colonies bactériennes apparues sur ou dans le milieu de culture. L'analyse est réalisée en triple exemplaires et le comptage est effectuée sur les boîtes renfermant entre 30 et 300 colonies. les résultats ne sont pas donnés en nombre de cellules mais en unités formant colonies (UFC ou CFU pour colony forming unit).

Calcul du nombre des microorganismes

$$N = \frac{\Sigma c}{V \times [n1 + (0,1 \times n2)] \times d}$$


المصدر الأول للطالب الجزائري

N : nombre de microorganismes/ml de suspension

Σc : la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de 2 dilutions successives (les boîtes retenues doivent avoir entre 15 et 300 CFU).

V : le volume de l'inoculum ensemencé en ml. (Généralement 1 ml)

n1 : le nombre de boîtes retenues à la première dilution

n2 : le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution

d : la dilution correspondant à la première dilution retenue

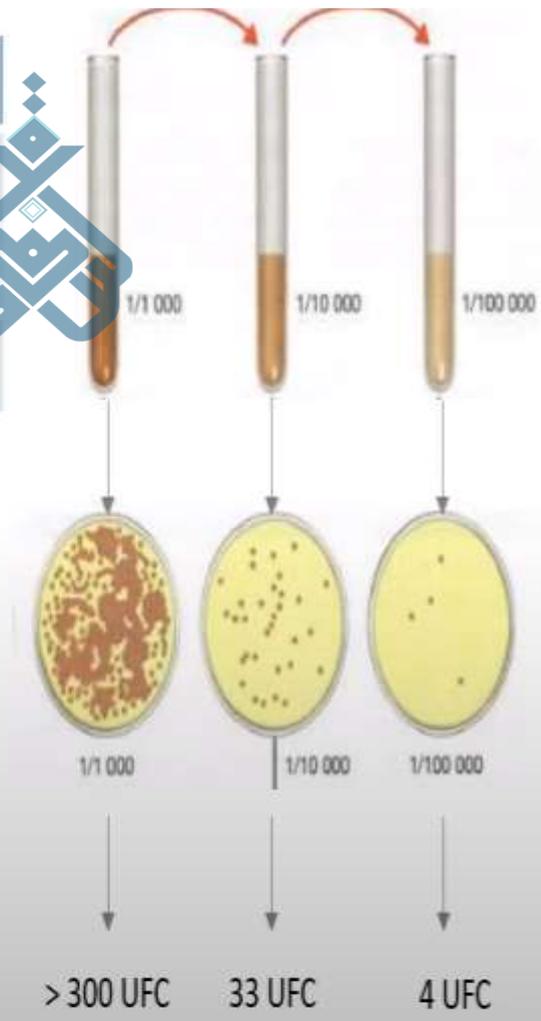
Dilution	1/1000 = 10 ⁻³	1/10 000 = 10 ⁻⁴	1/100 000 = 10 ⁻⁵
Facteur de dilution	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
Nombre d'UFC comptés	> 300	33	4
Boîte exploitable	NON (car > 300)	Oui	NON (car < 15)

Cohérence inter-dilutions ✓

$$C_{N(\text{cellules ; suspension})} = \frac{\text{nombre d'UFC comptées}}{V \text{ d'inoculum déposé}} \times Fd$$

$$= \frac{33}{0,1} \times 10^4 = 3\,300\,000 = 3,3 \cdot 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$$

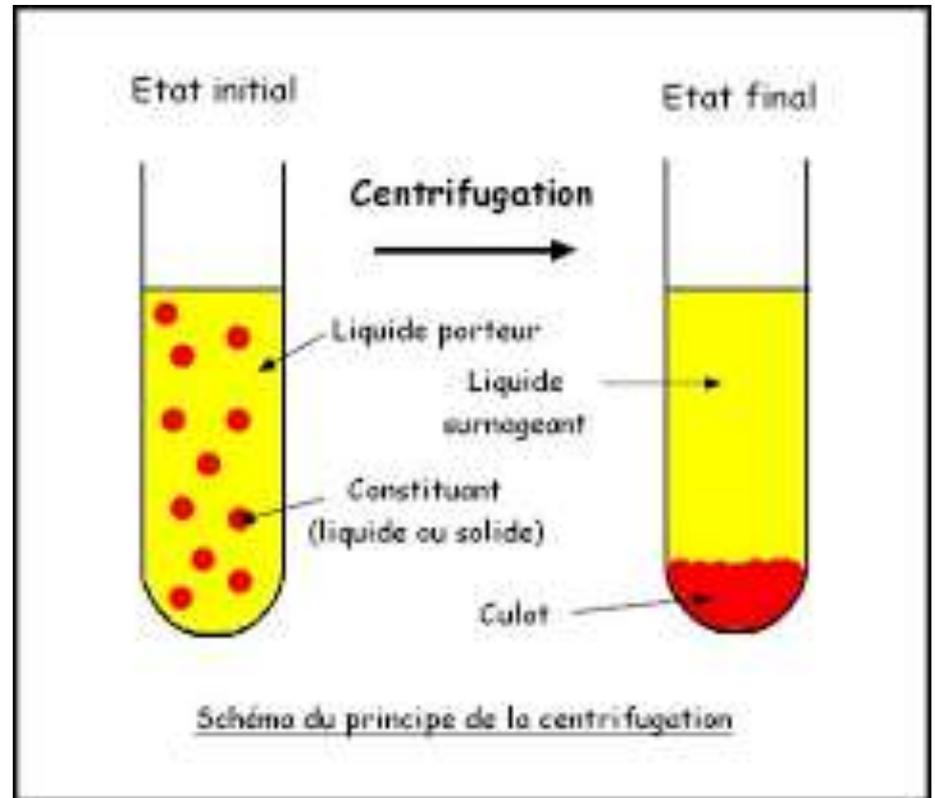
Si 1 seule boîte est exploitable



III/ Mesure de la biomasse :

1/ **Détermination de poids sec** : c'est le poids de la matière sèche obtenu par une simple pesée après séparation des cellules du milieu de culture (centrifugation, filtration fine), puis lavage et séchage de ces cellules.

les bactéries sont tuées, lavées, séchées au four à 105°C puis pesées avec précision en gramme de MS/litre



• 2/ La mesure de la turbidimétrie :

la **spectrophotométrie** (La mesure de la **densité optique**) est utilisée pour mesurer la turbidimétrie, une technique plus simple, plus rapide et plus utilisée.

Elle consiste à mesurer la lumière absorbée par une suspension bactérienne à une longueur d'onde de 620 nm (longueur d'onde pour laquelle l'absorption de la lumière par les constituants cellulaires est la plus faible).

SAHILA MAHILA
المصدر الأول للطالب الجزائري

