

5.3.1 Le temps de génération

Le temps de génération est le temps entre deux divisions successives ou celui nécessaire au dédoublement 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 **spécifique à chaque espèce** et il dépend des conditions environnementales.

$$G = t/n$$

t= temps (connu)

n= nombre de division

Si on part d'une population initiale N_0 , au bout de **n** divisions, on aura un nombre théorique de bactéries : $N = 2^n \cdot N_0$

(**G**) est de 20 minutes pour *Escherichia coli*, de 1000 minutes pour *Mycobacterium tuberculosis*. en milieu synthétique.

Le temps de génération est **spécifique à chaque espèce** et il dépend des conditions environnementales.

Nombre de génération

$$n = \text{Log}N - \text{Log}N_0 / \log 2$$

Le temps de génération

$$G = (t_n - t_0) / n$$

5.3.2 Le taux de génération

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

$$\mu = n/t \Rightarrow n = \mu t \quad \text{donc nombre de bactérie : } N = 2^{\mu t} N_0$$

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.

5.4 Courbe de croissance

5.4.1 Courbe de croissance en milieu non renouvelé, culture discontinue

Une bactérie déposée sur un milieu nutritif convenable va former une colonie, visible à l'œil nu. Mais après 16 à 24 heures, cette croissance s'interrompt, à cause de l'épuisement des nutriments avec le temps, la croissance en milieu non renouvelé fait apparaître différentes phases caractéristiques : La phase de **latence**, la phase de **croissance exponentielle**, la phase **stationnaire** et la phase de **déclin**.

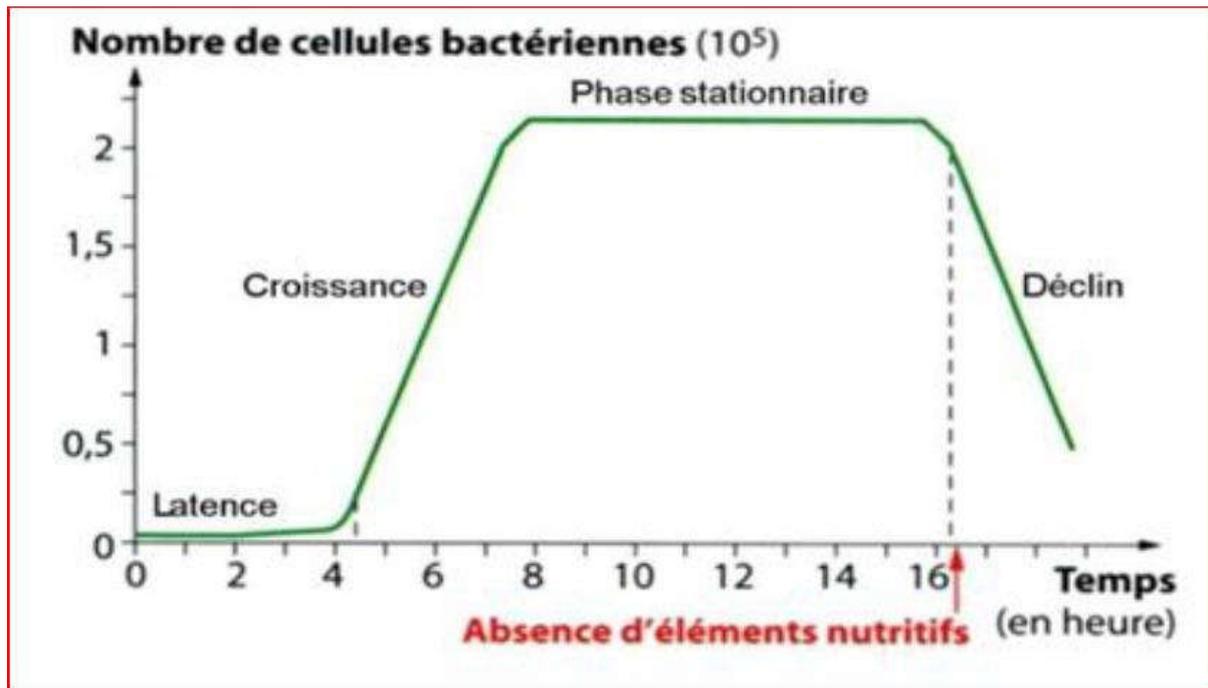


Figure 30 : courbe de croissance de la bactérie

a) Phase de latence

Elle correspond à une période d'adaptation de la bactérie au milieu nutritif proposé et essentiellement à la synthèse des enzymes nécessaires pour métaboliser les nutriments. Cette période au cours de laquelle le taux de croissance est nul est dite phase de latence. Elle est généralement conditionnée par :

- ✓ **L'espèce bactérienne**
- ✓ **La quantité d'inoculum introduit sur le milieu** : 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 exemple.). Plus l'inoculum est important, plus le temps nécessaire à la détoxification est court
- ✓ **L'âge de la culture l'espèce bactérienne** : les "vieilles" bactéries, introduites dans un milieu neuf, doivent d'abord réparer tous les dommages subis ; 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.
- ✓ **L'adaptation des cellules bactériennes au milieu (la composition du milieu)** : les bactéries doivent synthétiser les enzymes adaptées au nouveau milieu de culture

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

Si on inocule le même milieu avec des bactéries prélevées en phase exponentielle, il n'y aura pas de phase de latence.

b) Phase exponentielle

La vitesse de division est constante et maximum. La majorité des bactéries sont dans un bon état physiologique et se divisent de façon exponentielle (les nutriments sont disponibles et les substances toxiques absentes et le pH est optimal). Le taux de croissance atteint un maximum ($\mu = \mu_{\max}$). La presque totalité de la masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle).

c) Phase stationnaire

La vitesse de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets et l'évolution défavorable des conditions physico-chimiques. 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. Le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$).

d) Phase de déclin

Elle correspond à une période où les bactéries ne se divisent plus, meurent et sont lysées par les enzymes qu'elles 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. Le taux de croissance est négatif ($\mu < 0$).

On note qu'on peut ajouter deux autres phases qui sont : **phase d'accélération** et qui se trouve entre fin phase d'adaptation et début de phase exponentielle, et aussi **phase ralentissement (décélération)** qui se trouve entre fin phase d'exponentielle et début phase stationnaire.

5.4.2 Phénomène de diauxie (deux croissances en grec)

Quand un milieu contient plusieurs substrats alimentaires, on peut observer des phases de croissance décalées. Tout se passe comme si les bactéries utilisaient d'abord un premier substrat, probablement celui qui demande le moins de dépenses (énergie, synthèses enzymatiques, déchets, etc.), puis, une fois ce premier substrat épuisé, entamaient la consommation d'un autre substrat alimentaire. Ce phénomène est appelé diauxie, et qui se traduit par une courbe biphasique.

Exemple : 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.

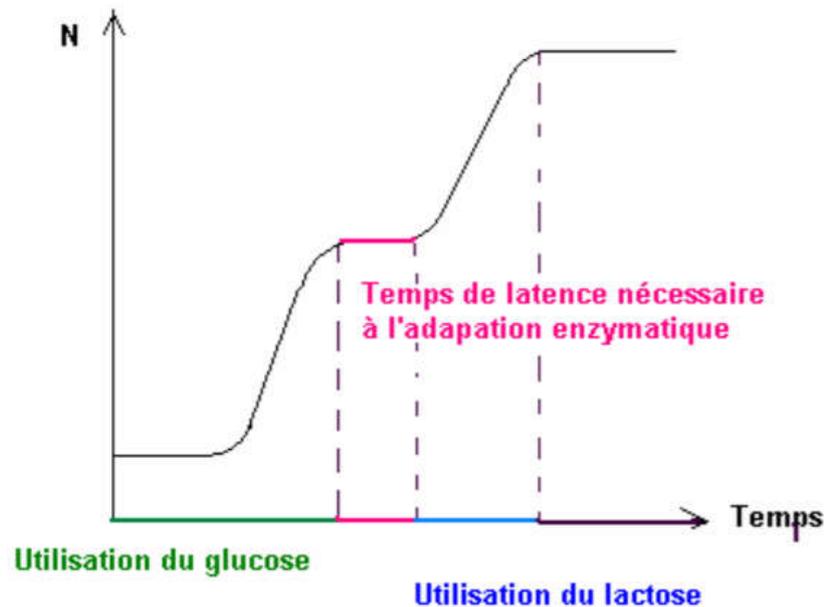


Figure 31 : Phénomène de diauxie (Phase I (Glucose) –Phase II (Lactose))

5.4.3 Facteurs influençant la croissance

En plus des facteurs déjà cités au paragraphe précédent (dans la partie phase de latence), on trouve les facteurs physico-chimiques qui conditionnent la nutrition. Les plus importants sont : **La température**, **Le substrat**, et aussi agents antimicrobiens : les antibiotiques.

5.4.4 Croissance continue

Dans les conditions habituelles de croissance, la phase exponentielle ne peut durer que quelques heures. Expérimentalement, on peut maintenir une culture en croissance exponentielle pendant plusieurs heures voire 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 des fermenteurs industriels.

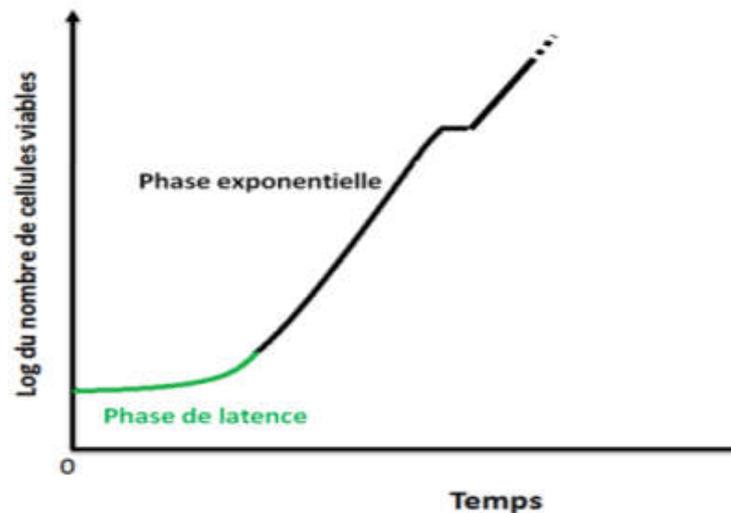


Figure 32 : courbe de croissance continue des bactéries

6 Les milieux de cultures

Un milieu de culture est composé d'un mélange de substrats nutritifs (acides aminés, peptides, 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). 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 :

6.1 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 Petri 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.

6.2 Classification des milieux de culture selon la composition chimique :

6.2.1 Les milieux synthétiques (de composition chimique connue)

On connaît avec exactitude la composition chimique de type de milieu, qualitativement et quantitativement.

6.2.2 Les milieux complexes ou empiriques (de composition chimique mal connue)

Très nutritifs de composition indéfinie. Utilisés pour la culture de nombreux organismes. Employés pour la culture des chimiohétérotrophes.

Ils sont constitués d'extrait de soja, de viande, de levure, digérés par des enzymes. Ils fournissent une source de carbone, d'azote, vitamines B. Exemple : bouillon nutritif.

6.2.3 Les milieux semi-synthétiques

Comme leur nom l'indique c'est **un mélange** de composés chimiques purs et de substances naturelles empiriques.

6.3 Selon le rôle : On peut aussi classer le milieu de culture selon son rôle, on trouvera :

6.3.1 Les milieux sélectifs

Favorisent la croissance de certains micro-organismes particuliers tout en inhibant la croissance d'autres espèces ou isolats. On fait intervenir un pH acide, une concentration de sel élevée.

Exemple : géloses MacConkey, Sélectionne les bactéries Gram-négatives

6.3.2 Les milieux différentiels

Permettent de distinguer différents groupes de bactéries et même d'identifier des microorganismes sur la base de leurs caractéristiques biologiques. Par exemple : **gélose sang** Bactéries hémolytiques versus non hémolytiques. **Gélose MacConkey** Bactéries qui fermentent le lactose versus non fermenteurs.

6.3.3 Les milieux enrichis

Milieux de culture à utilisation générale auxquels on ajoute des nutriments spéciaux afin de favoriser le développement d'hétérotrophes fastidieux Ce sont des milieux utilisés pour l'obtention des bactéries dites *exigeantes* et auxotrophes. Par exemple : les milieux au sang frais.

6.3.4 Les milieux d'identification ou d'isolement :

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.

6.3.5 Les milieux de conservation

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