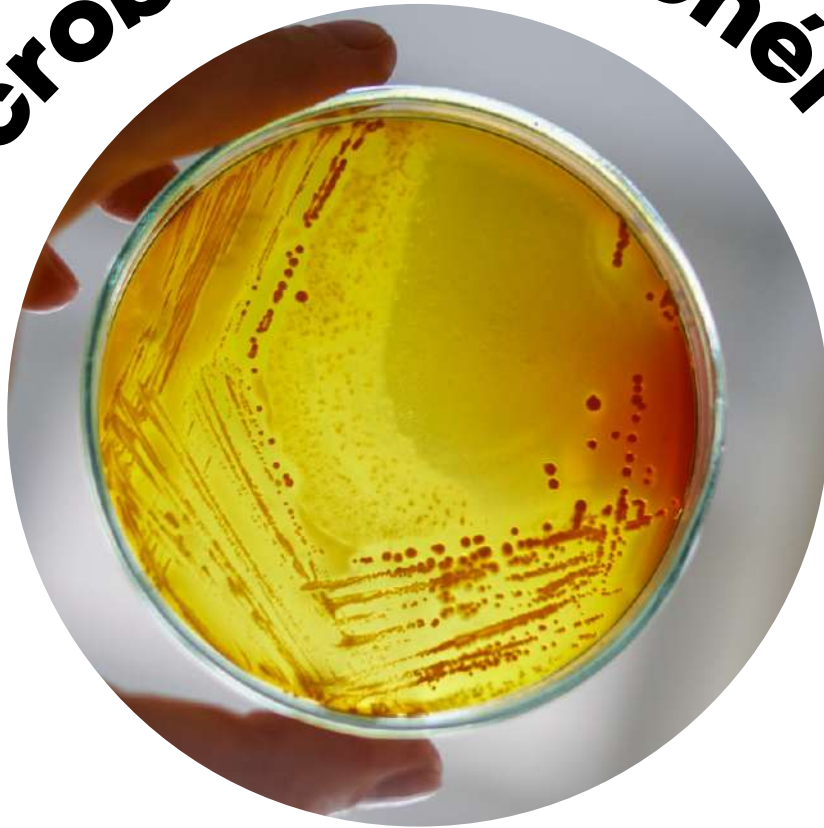


Microbiologie Générale



SCIENCES DE LA
VIE



Shop



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



Etudier



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



Emploi



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE



Nutrition et Croissance des microorganismes



S. Bury-Moné

Bât 400

Institut de Génétique et Microbiologie

sburymone@igmors.u-psud.fr

"L'étude de la croissance d'une culture bactérienne ne constitue pas un thème spécialisé ou une branche de la recherche ; c'est la méthode de base de la microbiologie".

Jacques Monod

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.

Accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme.

Si le microorganisme est coenocytique (multinucléé), il y a division nucléaire sans division cellulaire concomittante et la croissance conduit à une augmentation de la taille et non du nombre de cellules.

Sommaire

1. La nutrition des bactéries
2. Les milieux de culture
3. Les conditions physico-chimiques propices à la croissance
4. Méthodes de mesure de la croissance
5. Cinétique de la croissance
6. Conservation des souches
7. Moyens de contrôle de la croissance microbienne :
antiseptie, désinfection et stérilisation

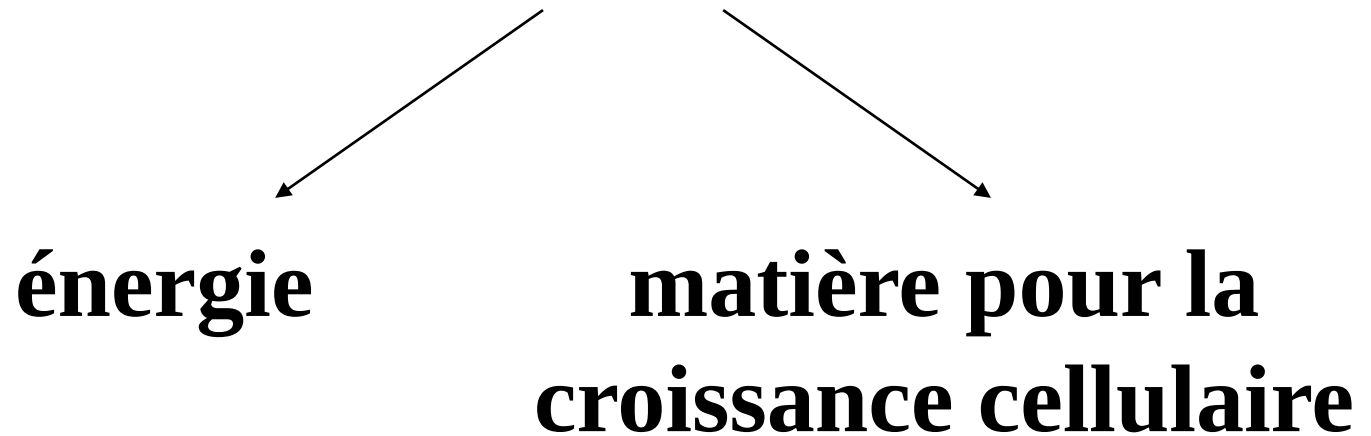
Sommaire

- 1. La nutrition des bactéries**
2. Les milieux de culture
3. Les conditions physico-chimiques propices à la croissance
4. Méthodes de mesure de la croissance
5. Cinétique de la croissance
6. Conservation des souches
7. Moyens de contrôle de la croissance microbienne :
antiseptie, désinfection et stérilisation

Une définition de la nutrition

Ensemble des facteurs qui permettent aux organismes de se nourrir à partir de l'environnement. Cela comprend les éléments répondant aux besoins nutritifs (substances nécessaires pour fournir l'énergie et la matière pour la construction), les modes de captation et de transport de ceux-ci et les conditions physico-chimiques propices à leur utilisation.

besoins vitaux de la cellule



Vision d'ensemble du métabolisme énergétique

Sources d'énergie

Extracellulaires :

- lumineuse
- chimique

Intracellulaires :

- glycogène
- polyhydroxybutyrate
- volutine (polyPi)
- cyanophicine (Asp/Arg)
- soufre...

Vecteurs d'énergie

Travail

Chimique
Osmotique
Mécanique

Couplage

chimio- / chimique
osmo- / osmotique
mécano- / mécanique

Molécules à haut potentiel énergétique

ex : glucose-6-P
ATP

fermentation

ATP
synthase

transports
actifs

réductions

oxydations (ex : glycolyse,
fermentations)

Gradient osmotique

ex : gradient de H^+

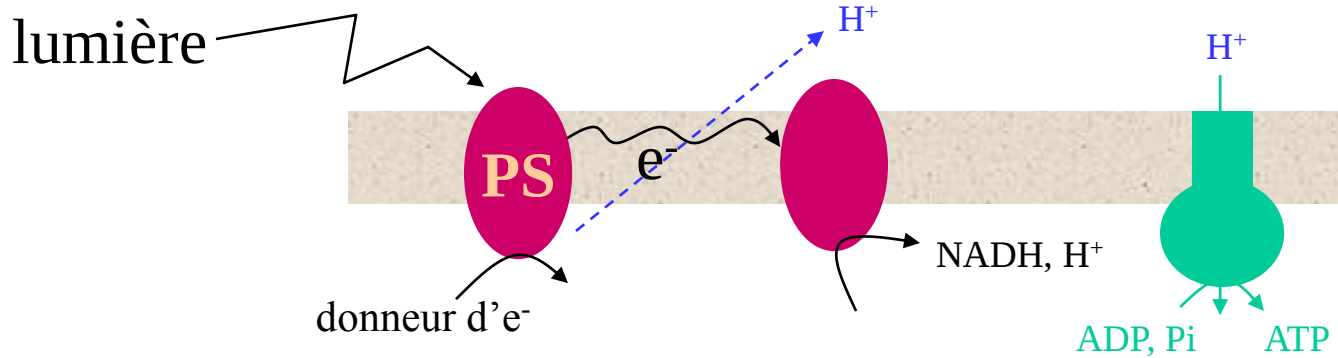
Respiration
Photosynthèse

Pouvoir réducteur

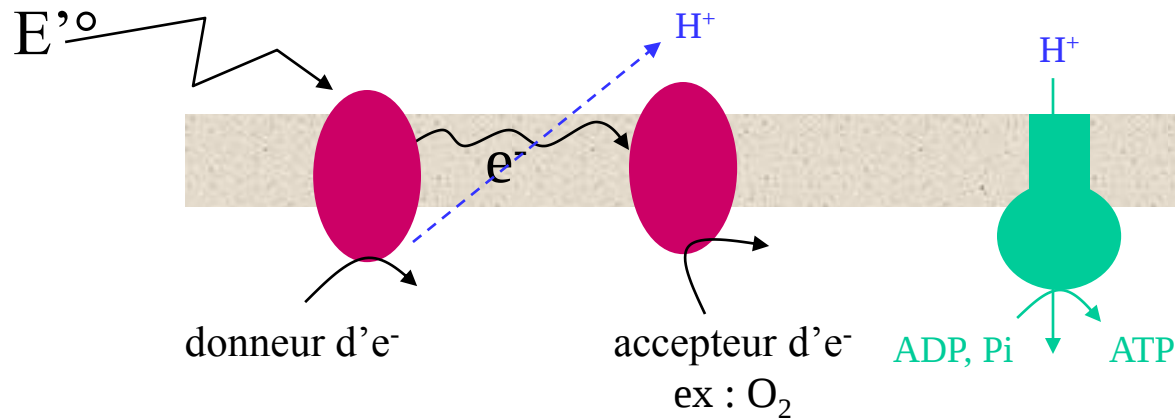
ex : $NADH, H^+$

Formation d'ATP

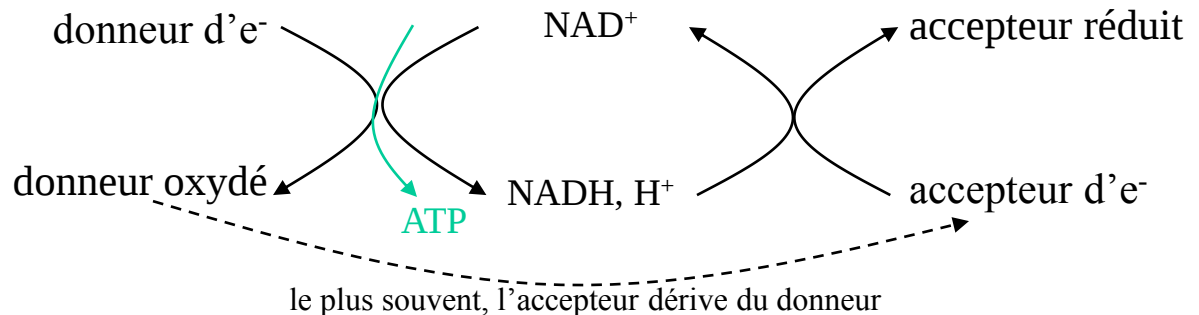
- lors de la photosynthèse = photophosphorylation



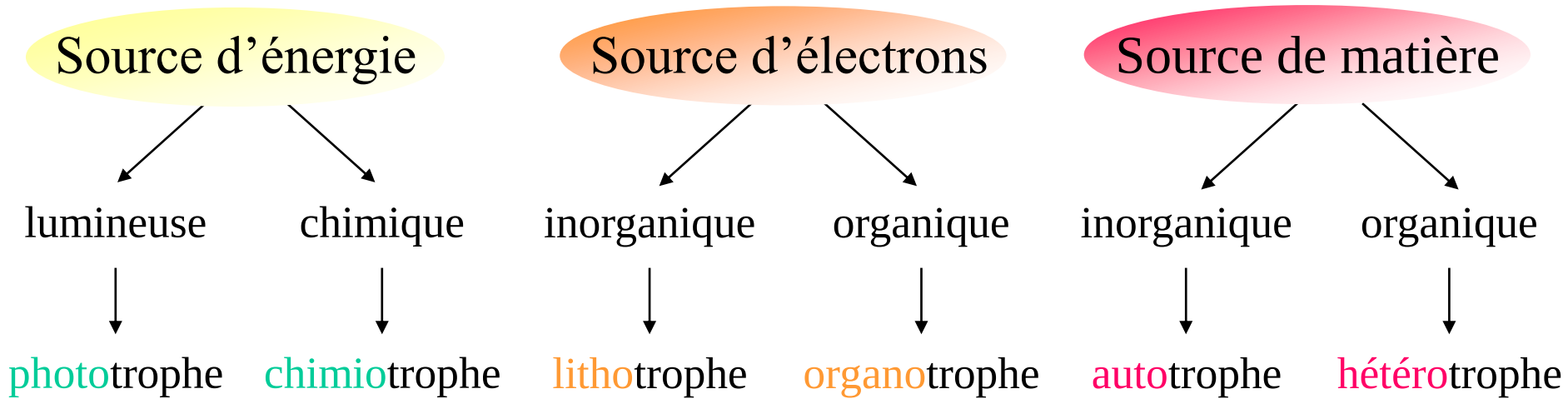
- lors de la respiration = phosphorylation oxydative



- lors d'une fermentation = phosphorylation au niveau du substrat



Les types trophiques



Types majoritaires : photolithoautotrophe, photoorganohétérotrophe, chimiolithoautotrophe, chimioorganohétérotrophe

Types minoritaires (mixotrophes) : photolithohétérotrophe, photoorganoautotrophe, chimiolithohétérotrophe, chimioorganoautotrophe

Photolithoautotrophe	Algues, bactéries photosynthétiques sulfureuses (pourpres et vertes)
Photoorganohétérotrophe	Bactéries photosynthétiques non sulfureuses (pourpres et vertes), Héliobactéries
Chimiolithoautotrophe	Bactéries nitrifiantes, bactéries thiotrophes oxydant le soufre, bactéries oxydant le fer...
Chimioorganohétérotrophe	Protozoaires, mycètes, bactéries pathogènes...

95% du poids sec d'une cellule est composé de quelques éléments majeurs : **C, O, H, N, S, P**, K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} et Fe^{2+} ...

Composition élémentaire caractéristique des cellules bactériennes :

C (50%)

O (20%)

N (14%)

H (8%)

P (3%)

S, Na et K (1% chacun)

Ca , Mg (0,5% chacun)

Fe (0,2%)

les oligoéléments (0,2% cumulé)

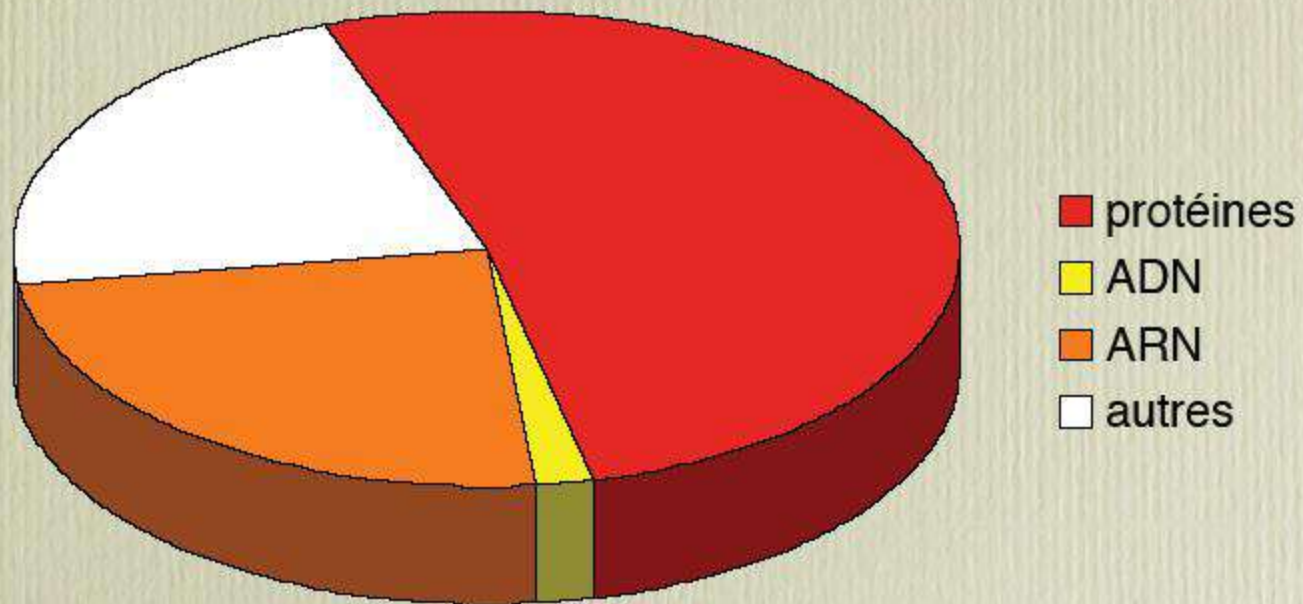
La cellule a besoin d'environ 30 éléments.

Macro-, micro-éléments, oligoéléments (éléments traces : Co, Zn, Mo, Cu, Mn, Ni, W, Se...)

Composition du colibacille

Poids sec : 500 femtogrammes

Volume : 2 femtolitres



Sources de matière	Nom du métabolisme	Forme assimilée dans la matière vivante	Interconversions
Pour le carbone CO ₂	C-Autotrophie	Glycéraldéhyde phosphate, acétylCoA, glyoxylate	Métabolisme carboné (e.g. cycle de Krebs)
CO	Carboxydotrophie	(via CO ₂)	
CH ₄	Méthanotrophie	formaldéhyde	
Autres composés organiques	C-Hétérotrophie diverses	divers	
Pour l'azote NH ₄ ⁺	Assimilation de l'ammoniac (via GOGAT ou GDH puis GS – ou Asp synthase ou Asp-NH ₄ ⁺ lyase ou carbamoyl-P synthase)	Glu, Gln, Asp, carbamoylP	Aminotransférases (surtout à Glu) et amidotransférase
N ₂	Diazotrophie	(via NH ₄ ⁺)	
NO ₃ ⁻	Nitralotrophie	(via NO ₂ ⁻ puis NH ₄ ⁺)	
Autres composés organiques azotés	N-hétérotrophie diverses	divers	
Pour le soufre SO ₄ ²⁻ , HS ⁻ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	Sulfatoréduction assimilatrice	Cys	Interconversion Cys/Met, PAPS
Composés organiques soufrés	S-hétérotrophie diverses	Divers	

Besoins spécifiques

- **liés à des caractéristiques structurales particulières** Ex : les diatomées requièrent de l'acide silicique (H_4SiO_4) pour construire leur paroi de silice
- **liés à l'absence de certaines enzymes** – Notions de **facteurs de croissance**, i.e. substances organiques indispensables que la bactérie est incapable de synthétiser. **Auxotrophie** (par opposition à prototrophie). 3 principales classes : (1) acides aminés, (2) purines, pyrimidines, (3) vitamines (ex : *Enterococcus faecalis* a besoin de 8 vitamines pour croître). Autres : par exemple, hème/*Haemophilus influenzae* , cholestérol/mycoplasmes, *Shigella*/NAD...

Sommaire

1. La nutrition des bactéries
- 2. Les milieux de culture**
3. Les conditions physico-chimiques propices à la croissance
4. Méthodes de mesure de la croissance
5. Cinétique de la croissance
6. Conservation des souches
7. Moyens de contrôle de la croissance microbienne :
antiseptie, désinfection et stérilisation

Fonction détermine composition

Utilisation : culture de microorganismes, isolement, identification, mesure de viabilité dans certaines conditions (e.g. sensibilité aux ATB), sélections de mutants, analyse de prélèvements (eau, nourriture)...

Texture :

- milieux **liquides**
- milieux **solides**

Définition (connaissance) du milieu :

- milieux **synthétiques** (= définis) – cas particulier du milieu **minimum**
- milieux **complexes** (= empiriques)

Notion de milieu **enrichi**

Favorisant la croissance d'un microorganisme : milieux **sélectifs**

Permettant de distinguer phénotypiquement des groupes : milieux **différentiels**

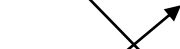
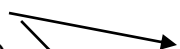
Exemples de milieux synthétiques

Milieu	Quantité (g/l)
BG-11 pour Cyanobactéries	
NaNO ₃	1,5
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,04
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036
Acide citrique	0,006
Citrate ferrico-ammonique	0,006
EDTA (sels de Na ₂ Mg)	0,001
Na ₂ CO ₃	0,02
Solution d'oligoéléments (H ₃ BO ₃ , MnCl ₂ .4H ₂ O, ZnSO ₄ .7H ₂ O, Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O, CuSO ₄ .5H ₂ O et Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O)	1,0 ml/l
pH final 7,4	
Milieu pour <i>Escherichia coli</i>	
Glucose	1,0
Na ₂ HPO ₄	16,4
KH ₂ PO ₄	1,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	200,0 mg
CaCl ₂	10,0 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 mg
pH final 6,8-7,0	

Exemples de milieux complexes

Milieu	Quantité (g/l)
Bouillon nutritif Peptone (hydrolysate de gélatine) Extrait de boeuf	5 3
Bouillon au soja Tryptone (hydrolysate pancréatique de caséine) Peptone (hydrolysate de soja) Glucose Chlorure de sodium Phosphate dipotassique	17 3 2.5 5 2.5
Gélose MacConkey Hydrolysate pancréatique de gélatine Hydrolysate pancréatique de caséine Hydrolysate pepsique de tissus animaux Lactose Sels biliaires Chlorure de sodium Rouge neutre Crystal violet Agar	17 1,5 1,5 10 1.5 5 0,03 0,001 13,5

Milieu
différentiel
(lac⁺ = rose)



Milieu sélectif



Sommaire

1. La nutrition des bactéries
2. Les milieux de culture
- 3. Les conditions physico-chimiques propices à la croissance**
4. Méthodes de mesure de la croissance
5. Cinétique de la croissance
6. Conservation des souches
7. Moyens de contrôle de la croissance microbienne :
antiseptie, désinfection et stérilisation

Vue d'ensemble

disponibilité en eau
(Aw), pH, température,
concentration en
dioxygène, pression,
radiations, lumière...

Paramètres	Comportement	Microorganismes représentatifs
Solutés et activité de l'eau Osmotolérant	Se développe dans une large gamme d'activité de l'eau ou de concentration osmotique	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Saccharomyces rouxii</i>
Halophile	Exige pour pousser des concentrations élevées en chlorure de sodium souvent en dessus de 0,2M	<i>Halobacterium</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Ectothiorhodospira</i>
pH Acidophile Neutrophile Alcalophile	Croissance optimale aux pH 0-5,5 Croissance optimale aux pH 5,5-8 Croissance optimale aux pH 8-11,5	<i>Sulfolobus</i> , <i>Picrophilus</i> , <i>Ferroplasma</i> <i>Escherichia coli</i> , <i>Euglena</i> , <i>Paramecium</i> <i>Bacillus</i> , <i>alcalophilus</i> , <i>Natronobacterium</i>
Température Psychrophile Psychrotrophe Mésophile Thermophile Hyperthermophile	Se développe bien à 0°C, température optimale <15°C Peut se développer à 0-7°C, température optimale 20-30°C, et maximale 35°C Température optimale 20-45°C Peut se développer à 55°C et même plus, température optimale souvent entre 55-65°C Température optimale de croissance de 80°C à environ 113°C	<i>Bacillus psychrophilus</i> , <i>Chlamydomonas nivalis</i> , <i>Methanogenium</i> <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Escherichia coli</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Thermus aquaticus</i> , <i>Cyanidium caldarium</i> , <i>Chaetomium thermophile</i> <i>Sulfolobus</i> , <i>Pyrococcus</i> , <i>Pyrodictium</i>
Concentration en oxygène Aérobie obligatoire/stricte (AS) Microaérophile Aérobie anaérobie facultative (AAF) Anaérobie aérotoleurante (AAT) Anaérobie obligatoire/stricte (ANAS)	Croissance dépendante de O ₂ (besoin, utilisation et résistance à O ₂) Croissance dépendante de O ₂ (besoin et utilisation de O ₂) mais sensibilité à O ₂ – besoin d'une pO ₂ entre 2-10% O ₂ n'est pas indispensable à la croissance, mais celle-ci est meilleure en sa présence (utilisation et résistance à O ₂) Tolère l'oxygène mais ne l'utilise pas ou quasiment pas (résistance à O ₂ sans utilisation ni besoin) Ne tolère pas une exposition prolongée au O ₂ (pas d'utilisation, ni besoin, ni résistance à O ₂)	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Mycobacterium</i> , la plupart des algues, mycètes et protozoaires <i>Campylobacter</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Spirillum volutans</i> , <i>Treponema pallidum</i> <i>Escherichia</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , la plupart des bactéries lactiques <i>Clostridium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Methanobacterium</i> , <i>Treponema agilis</i> , <i>Bifidobacterium</i>
Pression Barotolérant Barophile	Supportent une croissance sous pression Croissance plus rapide sous haute pression hydrostatique	<i>Photobacterium profundum</i> , <i>Shewanella benthica</i> , <i>Methanococcus jannaschii</i>

Activité de l'eau

Définition :

activité de l'eau = $1/100$ de l'humidité relative de la solution (quand elle est exprimée en %), ou = rapport de la pression de la vapeur de la solution (P_{sol}) à celle de l'eau pure (P_{eau}) i.e. la concentration de vapeur d'eau en équilibre avec l'échantillon. Si une solution a une pression osmotique élevée, son aw est faible.

Activité de l'eau (aw)	Environnement	Procaryotes	Mycètes	Algues
1,00 – 0,95	Sang, eau de mer, viande, légumes, fruits, pain – produits contenant 40% sucre ou 7% sel	La plupart des G-non halophiles	Certaines levures	
0,95 – 0,91	Certains fromages (cheddar, munster), jambon – produits contenant jusqu'à 55% de sucre ou 12% de sel	La plupart des bacilles G+	Basidiomycètes	La plupart des algues
0,91 – 0,87	Salami, flans, fromages secs, margarine – produits contenant jusqu'à 65% de sucre ou 15% de sel	La plupart des coques, <i>Bacillus</i>	Beaucoup de levures, <i>Fusarium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , levures ascomycètes	
0,87-0,80	Salami, nombreux jus de fruits concentrés, lait sucré concentré, sirop de chocolat, farines	<i>Staphylococcus aureus</i>	Beaucoup de moisissures, la plupart des <i>Saccharomyces</i>	
0,80 – 0,75	Confiture, pâte d'amande, lacs salés, poissons salés	La plupart des bactéries halophiles, <i>Halobacterium</i>	<i>Penicillium</i> , <i>Aspergilli</i> micotoxique	<i>Dunaliella</i>
0,75 – 0,65	Nougats, sucre brut, noix, flocons d'avoine avec 10% d'eau		Moisissure xérophile (<i>Aspergillus chevaliers</i> , <i>A. candidus</i> , <i>Wallemia sebi</i>), <i>Saccharomyces bisporus</i> ,	
0,65-0,60	Fruits séchés avec 15-20% d'eau, caramel, miel		Levures osmophiles (<i>Saccharomyces rouxii</i>), certaines moisissures (<i>Aspergillus echinulatus</i> , <i>Monascus bisporus</i>)	
0,5 0,4 0,3 0,2	Pâtes alimentaires avec 12% d'eau – épices avec 10% d'eau Eufs en poudre avec 5% d'eau Biscuits, croûtes de pain Poudre de lait avec 2-3% d'eau	Pas de croissance microbiologique élevée		

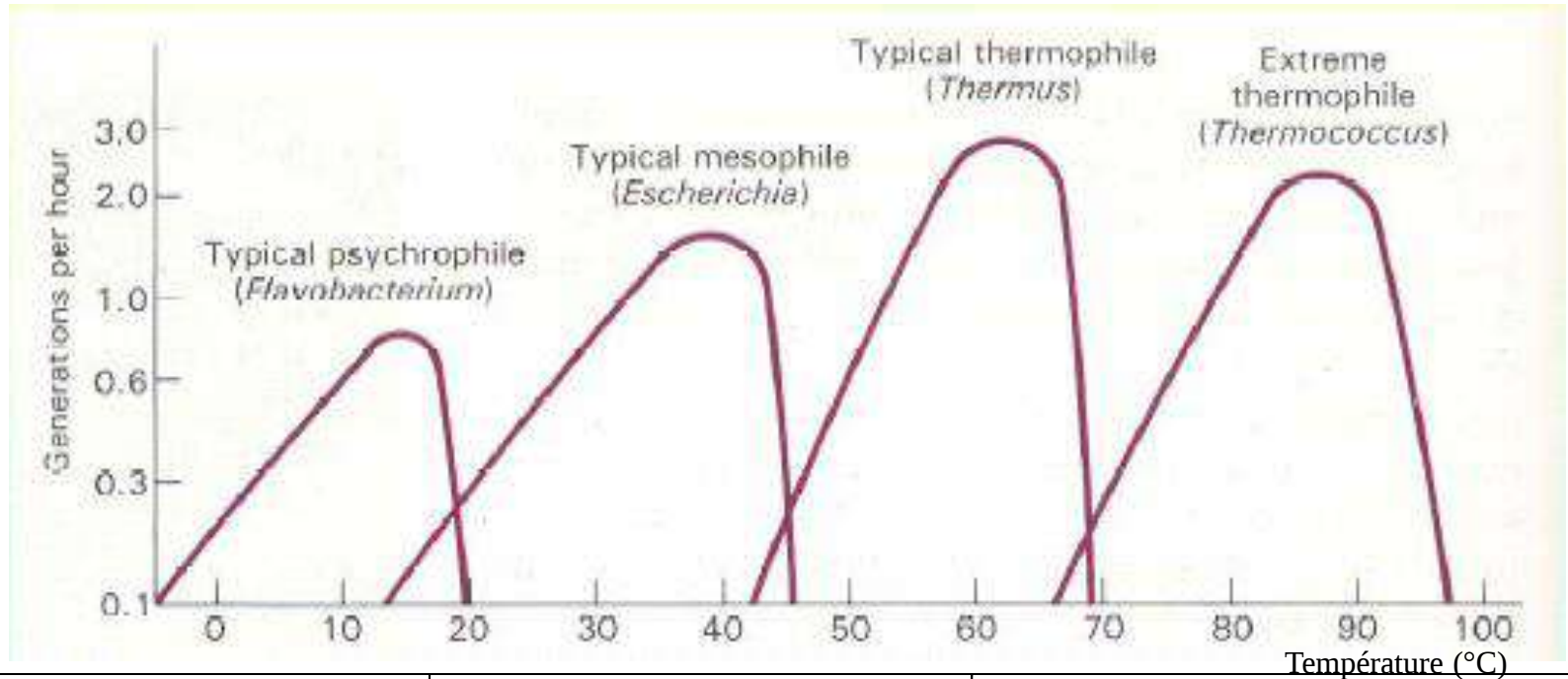
Le pH

pH		
Acidophile	Croissance optimale aux pH 0-5,5	<i>Sulfolobus, Picrophilus, Ferroplasma</i>
Neutrophile	Croissance optimale aux pH 5,5-8	<i>Escherichia coli, Euglena, Paramecium</i>
Alcalophile	Croissance optimale aux pH 8-11,5	<i>Bacillus, alcalophilus, Natronobacterium</i>

Espèces	pH minimal	pH optimal	pH maximal
<i>Bacillus</i>	5-6	6,8-7,5	9,5-11
<i>Clostridium perfringens</i>	5,5	6-7,6	8,5
<i>Escherichia coli</i>	4,3	6-8	9
<i>Lactobacillus</i>	4-4,5	5,5-6	7
Levures	1,5-3,5	4-6,5	8-8,5
Moisissures	1,5-3,5	4,5-6,8	8-11
Thiobacilli acidophiles	0	3-5	7

pH	[H ⁺] (Molarité)		Exemples d'environnement	Exemples de micro-organismes
0	10 ⁻⁰ (1,0)	Augmentation de l'acidité 	Acide nitrique concentré	<i>Ferroplasma</i> <i>Picrophilus oshimae</i> <i>Dunaliella acidophila</i>
1	10 ⁻¹		Contenu gastrique, sources thermales acides	
2	10 ⁻²		Jus de citron Drainage acide des mines	<i>Cyanidium caldarium</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
3	10 ⁻³		Vinaigre, « ginger ale » Ananas	
4	10 ⁻⁴		Tomates, jus d'orange Sol très acide	
5	10 ⁻⁵		Fromage, chou Pain	<i>Physarum polycephalum</i> <i>Acanthamoeba castellanii</i>
6	10 ⁻⁶	Neutralité 	Boeuf, poulet Eau de pluie Lait	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Euglena gracilis</i> , <i>Paramecium bursaria</i>
7	10 ⁻⁷		Eau pure, salive Sang, bile	<i>Staphylococcus aureus</i>
8	10 ⁻⁸		Eau de mer	<i>Nitrosomonas</i> spp.
9	10 ⁻⁹		Sol très alcalin Lacs alcalins	
10	10 ⁻¹⁰		Savon	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Bacillus alcalophilus</i>
11	10 ⁻¹¹		Ammoniaque (usage domestique)	
12	10 ⁻¹²		Solution saturée d'hydroxyde de calcium	
13	10 ⁻¹³		Chaux Déboucheur d'évier	
14	10 ⁻¹⁴	Augmentation de l'alcalinité		

La température

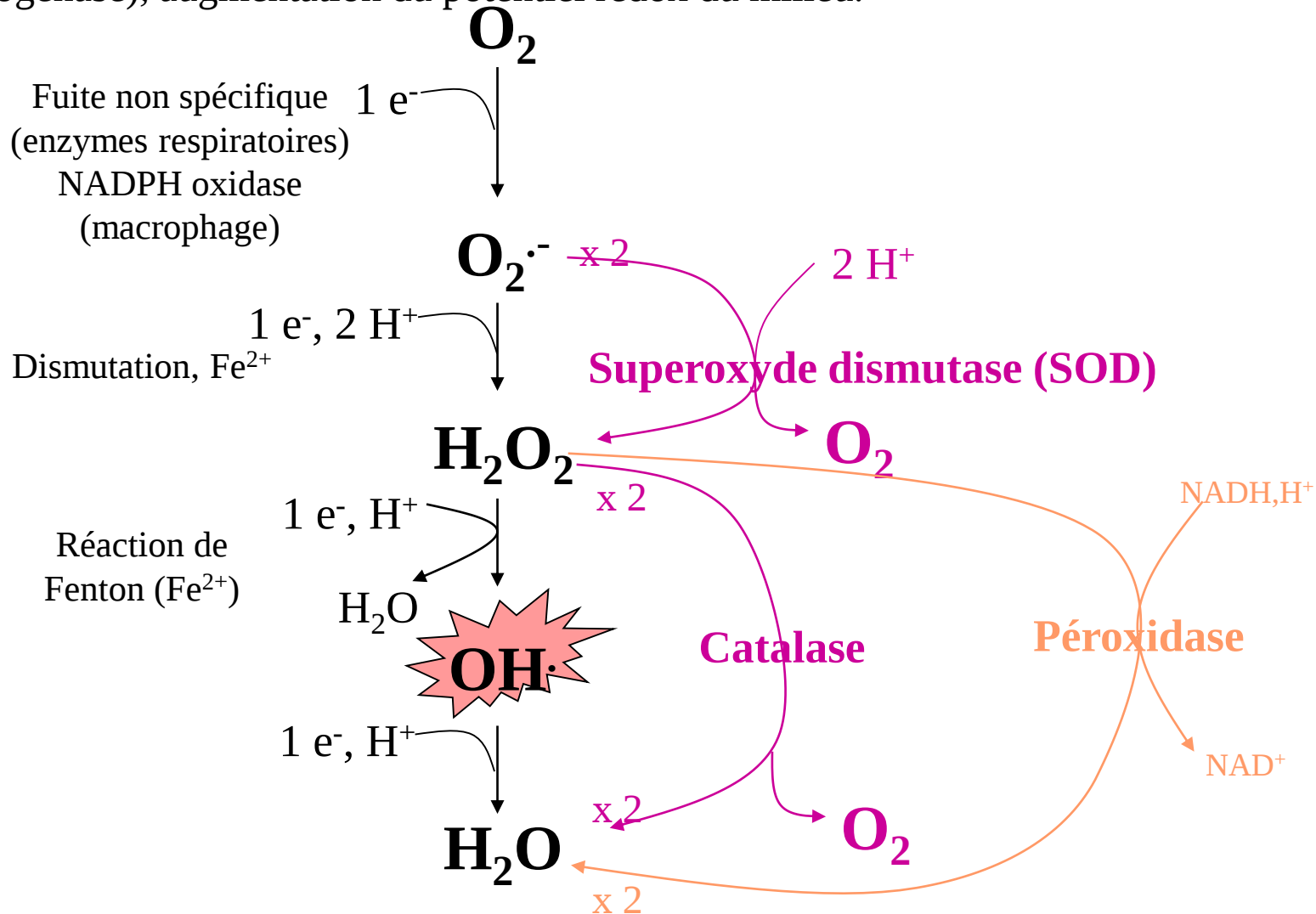


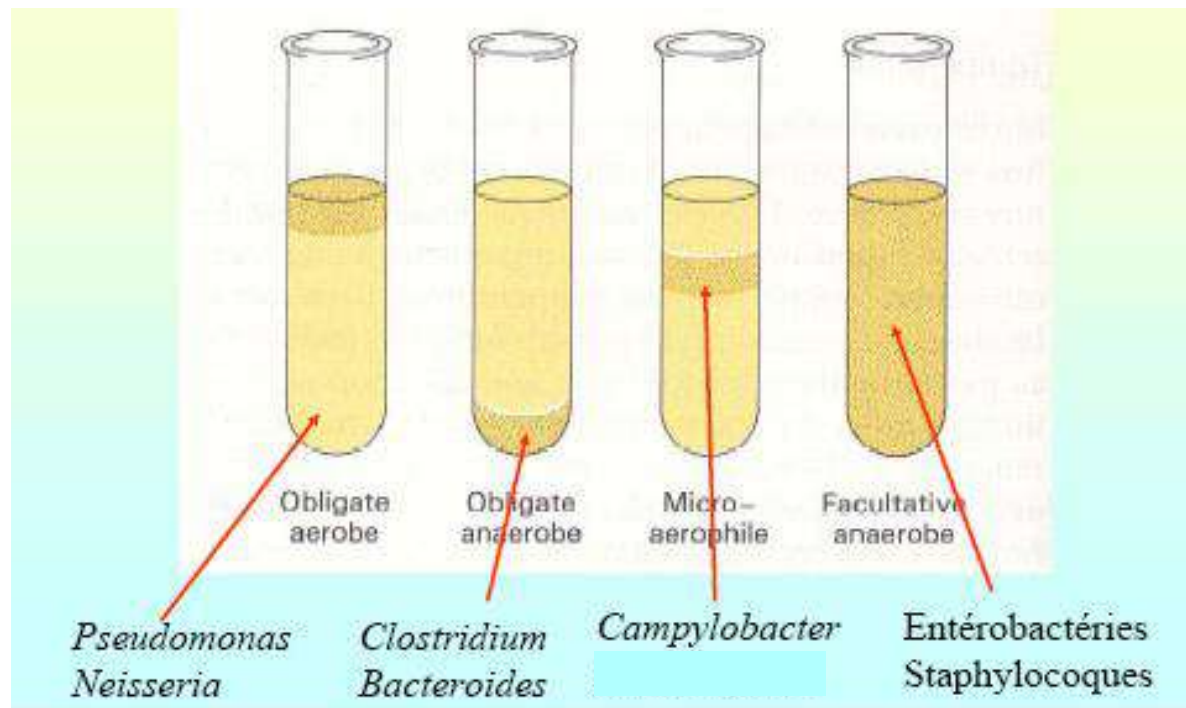
Température		
Psychrophile	Se développe bien à 0°C, température optimale <15°C	<i>Bacillus psychrophilus</i> , <i>Chlamydomonas nivalis</i> , <i>Methanogenium</i>
Psychrotrophe	Peut se développer à 0-7°C, température optimale 20-30°C, et maximale 35°C	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Mésophile	Température optimale 20-45°C	<i>Escherichia coli</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i>
Thermophile	Peut se développer à 55°C et même plus, température optimale souvent entre 55-65°C	<i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Thermus aquaticus</i> , <i>Cyanidium caldarium</i> , <i>Chaetomium thermophile</i>
Hyperthermophile	Température optimale de croissance de 80°C à environ 113°C	<i>Sulfolobus</i> , <i>Pyrococcus</i> , <i>Pyrodictium</i>

Le dioxygène

Bienfaits : oxydation (accepteur terminal d'électron), oxygénation, production de lumière...

Méfais : dérivés toxiques de l'oxygène (fuite de la chaîne respiratoire, macrophage ayant NADPH oxydase), réaction direct avec des composés cellulaires (dont enzymes sensibles comme la nitrogénase), augmentation du potentiel redox du milieu.





Concentration en oxygène		
Aérobie obligatoire/stricte (AS)	Croissance dépendante de O ₂ (besoin, utilisation et résistance à O ₂)	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Mycobacterium</i> , la plupart des algues, mycètes et protozoaires
Microaérophile	Croissance dépendante de O ₂ (besoin et utilisation de O ₂) mais sensibilité à O ₂ – besoin d'une pO ₂ entre 2-10%	<i>Campylobacter</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Spirillum volutans</i> , <i>Treponema pallidum</i>
Aérobie anaérobie facultative (AAF)	O ₂ n'est pas indispensable à la croissance, mais celle-ci est meilleure en sa présence (utilisation et résistance à O ₂)	<i>Escherichia</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Anaérobie aérotolérante (AAT)	Tolère l'oxygène mais ne l'utilise pas ou quasiment pas (résistance à O ₂ sans utilisation ni besoin)	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , la plupart des bactéries lactiques
Anaérobie obligatoire/stricte (ANAS)	Ne tolère pas une exposition prolongée au O ₂ (pas d'utilisation, ni besoin, ni résistance à O ₂)	<i>Clostridium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Methanobacterium</i> , <i>Treponema agilis</i> , <i>Bifidobacterium</i>

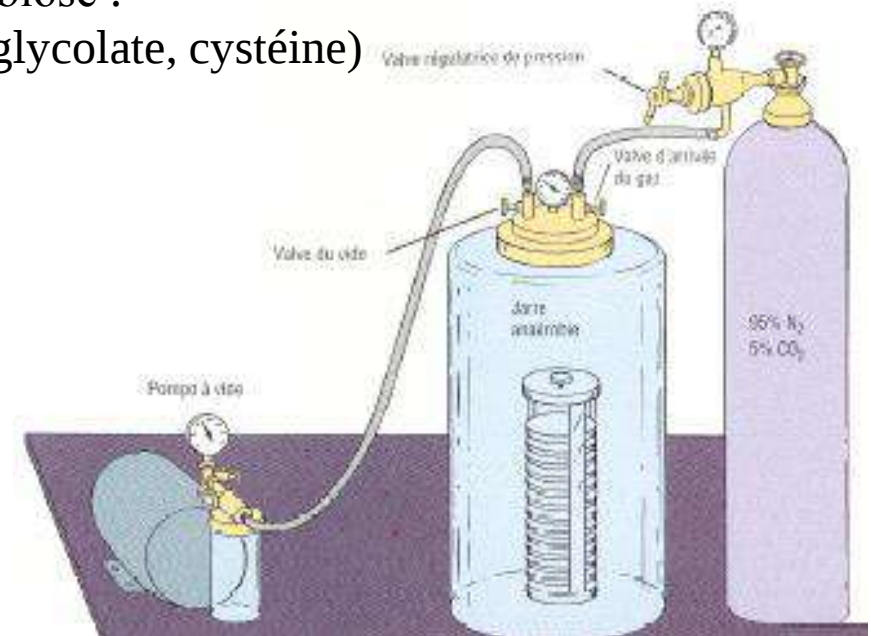
L'**anaérobiose** peut être créée assez facilement et rapidement par action des bactéries aérobies et maintenues à des tailles aussi petites que quelques cellules (biofilm) ou pores de la peau jusqu'à des tailles immenses (hypolimnion de la mère noire..).

Importance qualitative du métabolisme anaérobie (cycle de la matière)

La flore ANAS est la flore majoritaire du colon (la bactérie ANAF dominante qu'est *E. coli* représente moins de 0,1% de ces bactéries à ce niveau).

Méthodes pour créer en laboratoire l'anaérobiose :

- milieu bouilli avec agents réducteurs (thioglycolate, cystéine)
- pompe à vide/injection d'azote et CO₂
- jarre Gas Pak, ou sacs en plastique



Paramètres biologiques

Nature du microorganisme

(exigences, vitesses de croissance, stabilité, lysogénie), nature de la production (exigences, moment), interaction entre les microorganismes (e.g. *quorum sensing*, compétition...)

Paramètres physico-chimiques

pH, température, pO_2 , potentiel redox du milieu, concentration en substrat et produits, force ionique, viscosité, agitation...

Loi du minimum Liebig = la biomasse totale d'un microorganisme sera déterminée par l'élément nutritif présent en moindre quantité par rapport aux exigences de l'organisme.

Loi de tolérance de Shelford = il y a des limites dans les facteurs environnementaux au-dessous et au-dessus desquelles un organisme ne peut survivre et se développer quelque soit l'apport en nutriment.

Sommaire

1. La nutrition des bactéries
2. Les milieux de culture
3. Les conditions physico-chimiques propices à la croissance
- 4. Méthodes de mesure de la croissance**
5. Cinétique de la croissance
6. Conservation des souches
7. Moyens de contrôle de la croissance microbienne :
antiseptie, désinfection et stérilisation

Principales techniques

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

Mesure du nombre : comptage total des particules

- **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) – éventuellement associé à un marquage fluorescence (épifluorescence – ex : acridine orange ou DAPI – ADN – avec orangé d'acridine, on peut en théorie distinguer les bactéries vivantes qui sont vertes, et les bactéries mortes qui sont rouges en fonction du degré d'ouverture de la chaîne d'ADN)
- **Compteurs électriques de particules de type Coulter** – pour grands microorganismes (levures non filamenteuses, protozoaires, algues) – tube cylindrique (microorifice) – déplacement de volume de solution conductrice égal à son propre volume - chaque fois qu'une cellule passe au travers du système, la résistance augmente, la cellule est comptée. Problèmes d'interférence dues aux débris, filaments, pas de distinction vivante/morte ...

Dénombrement des bactéries cultivables

Dénombrement des CFU (unités formant colonies) sur un milieu solide le plus souvent – méthode précise mais longue et problème si les amas de cellules ne sont pas dissociés

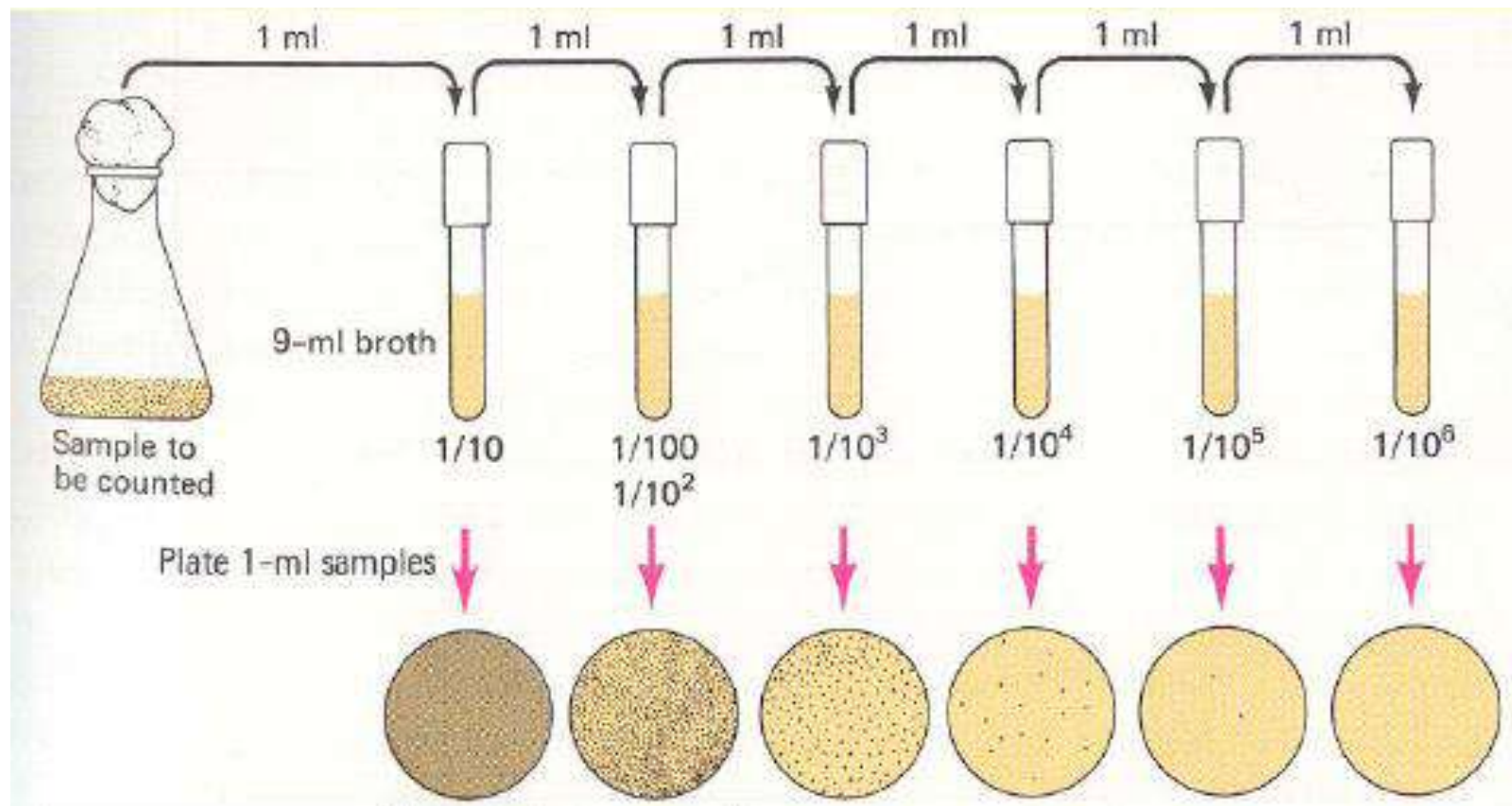
- **Dilutions en série suivies du dépôt d'un volume connu sur boîte :**

- **Comptage en surface** (rateaux, billes - stériles) : facile, problème si certaines cellules ont une faible tolérance au dioxygène, ou s'il y a des « envahisseurs ». Il faut compter entre 30 et 300 colonies sur une boîte

- **Comptage en profondeur** (mélange dans une gélose en surfusion) : colonies plus difficiles à compter, la chaleur peut tuer des cellules. Il faut compter entre 30 et 300 colonies sur une boîte

- **NPP** (nombre le plus probable) : inoculation d'un volume fixe de suspension initiale et de ses dilutions en milieu liquide. Le tube qui donnera une culture après inoculation contiendra au moins 1 bactérie viable. En inoculant ainsi 3, 5 ou même 10 tubes par dilution, on augmente la précision des résultats qui sont fournis par des tables statistiques (tables de Mac Crady). Le nombre de culture positives considérées dans 3 dilutions successives donne le NPP.

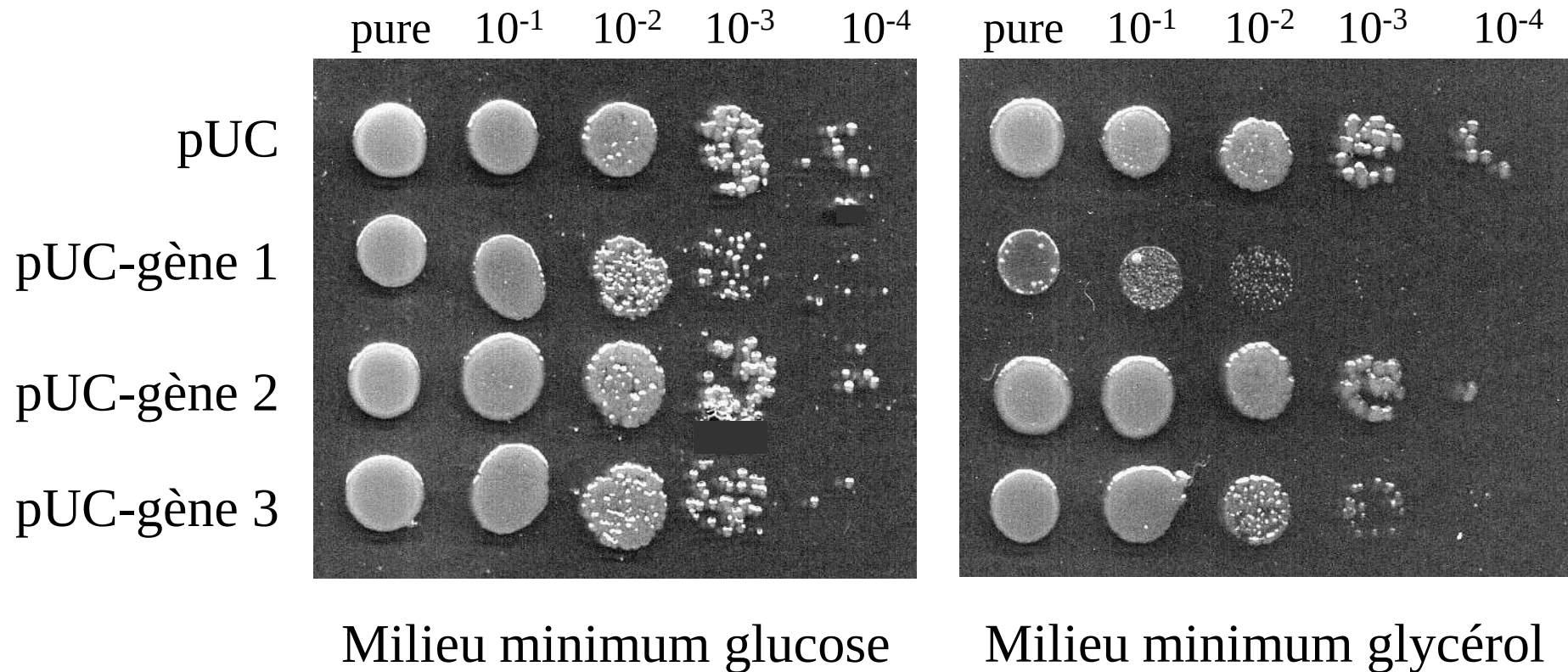
- **Membrane filtrante** : par exemple, après filtration d'un échantillon - Il faut compter entre 30 et 300 colonies sur une boîte



Analyse de la croissance sur boîte

Exemple : *Escherichia coli* sur milieu minimum à 42°C

Culture liquide en LB + Amp de nuit à 30°C (DO 4) diluée à DO 0,3 – dépôt de 5 µl – incubation 24 ou 48h



Mesure de la masse

- **directe** : détermination du poids sec des organismes - culture/centrifugation/lavage/séchage à 100-110°C dans un four/pesées - e.g. croissance des mycètes – méthode longue et peu sensible/précise, pas de distinction entre les vivantes et les mortes.
- **Approches optiques** : il faut que la concentration en bactéries atteigne au moins $10^7/\text{ml}$ afin que le milieu commence à apparaître trouble.
 - **détermination visuelle de la turbidité** : turbidimétrie - estimation d'une concentration particulière par l'évaluation (macroscopique, à l'oeil) d'un trouble et par comparaison avec une gamme étalon (ex: étalon de Mac Farland) - peu précise – donne un ordre de grandeur :
 - Pas de trouble = moins de 10^7 bactéries/ml
 - Trouble léger = $10^7 - 10^8/\text{ml}$
 - Trouble important = $10^8 - 10^9/\text{ml}$
 - Trouble très important = plus de $10^9/\text{ml}$ (les cultures atteignent rarement plus de $10^{10}/\text{ml}$)
- Utilisation éventuelle d'une **gamme standard de McFarland** : 0,5 Mc farland = $10^7 - 10^8$ CFU/ml -

0,5 Mc Farland Standard	
Barium Chloride, 0,048M solution	0,5 ml
Sulfuric Acid, 0,18M solution	99,5 ml
O.D at 625 nm	0,08-0,1
1,0 Mc Farland Standard	
Barium Chloride, 0,048M solution	1,0 ml
Sulfuric Acid, 0,18M solution	99,0 ml
O.D. at 625 nm	0,16-0,2
2,0 Mc Farland Standard	
Barium Chloride, 0,048M solution	2,0 ml
Sulfuric Acid, 0,18M solution	98,0 ml
O.D. at 625 nm	0,32-0,4
3,0 Mc Farland Standard	
Barium Chloride, 0,048M solution	3,0 ml
Sulfuric Acid, 0,18M solution	97,0 ml
O.D. at 625 nm	0,48-0,6
4,0 Mc Farland Standard	
Barium Chloride, 0,048M solution	4,0 ml
Sulfuric Acid, 0,18M solution	96,0 ml
O.D. at 625 nm	0,64-0,8
5,0 Mc Farland Standard	
Barium Chloride, 0,048M solution	5,0 ml
Sulfuric Acid, 0,18M solution	95,0 ml
O.D. at 625 nm	0,8-1,0

Mesure de la masse

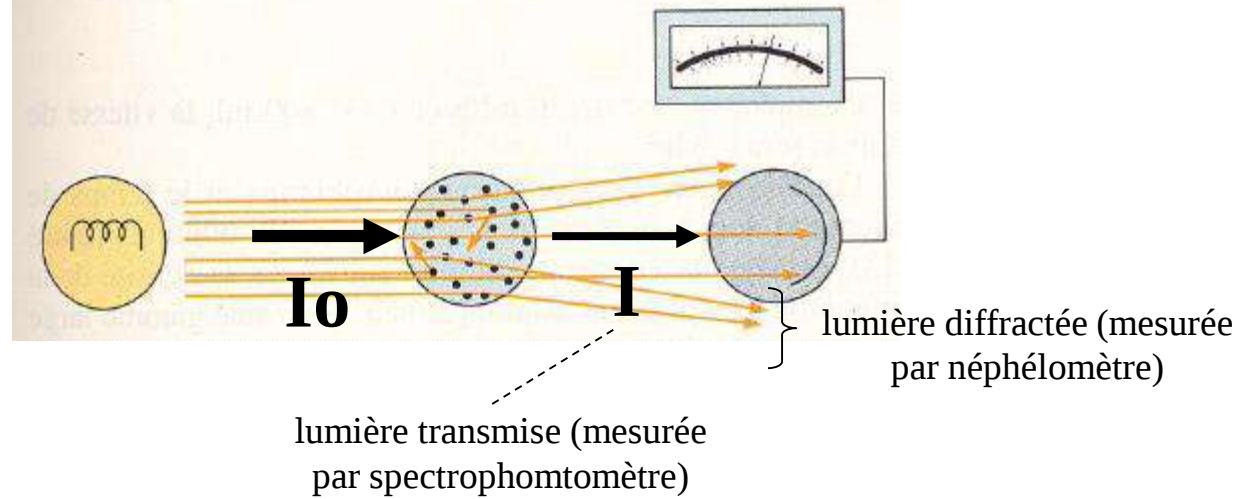
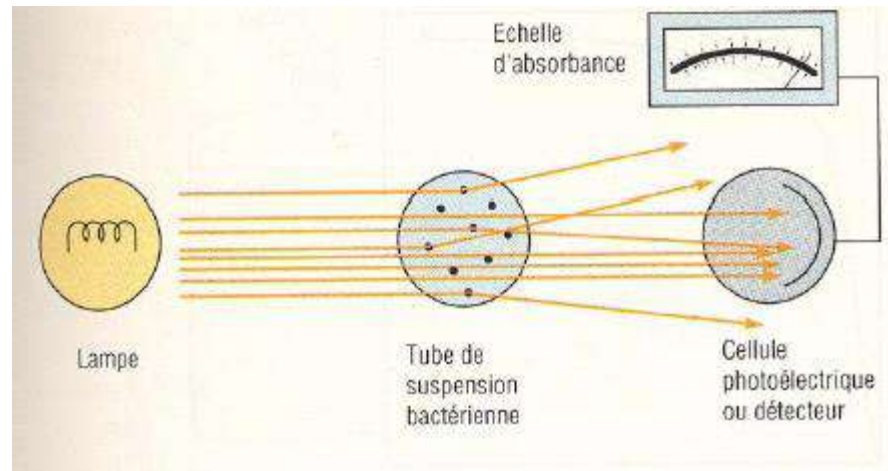
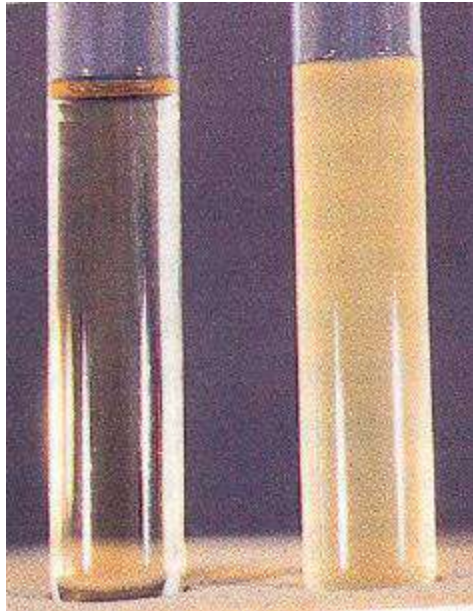
-Directe

-Approches optiques

- **détermination visuelle de la turbidité**
- **Mesure de l'opacimétrie ou de la néphélométrie** : l'importance de la diffraction de la lumière est mesurée par un spectrophotomètre (opacimétrie) ou un néphélomètre à des longueurs d'ondes autour de 600 nm (pour minimiser l'absorbance du milieu). Dédié à la mesure de particules d'une taille typiquement comprise entre 0.05 μm et 5 μm . Méthode précise, simple, rapide mais ne distingue pas cellules vivantes et mortes, peu sensible (il faut plus de 10^6 bactéries/ml), problème des milieux très colorés ou très troubles – faire attention de bien être dans la gamme de linéarité sinon il faut diluer la solution (en général au delà de DO 0,7). Pour de faibles concentrations, l'intensité transmise peut être déterminée par la loi de Beer-Lambert.

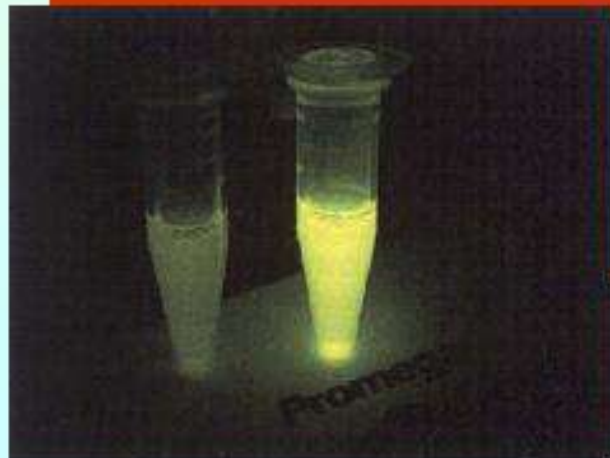
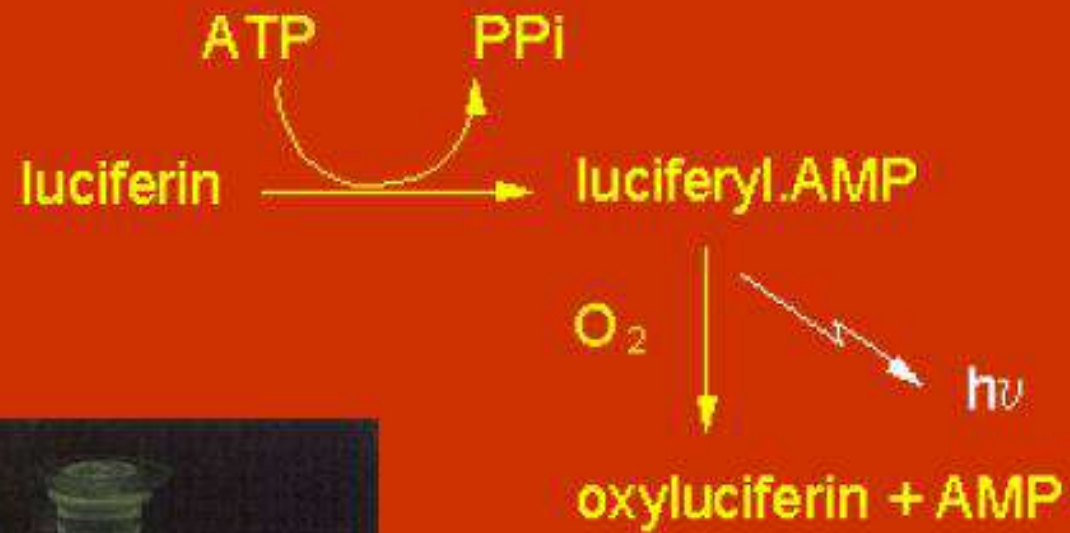
Loi de Beer-Lambert : $A = D.O = \log (I_0 / I) = \varepsilon l C$

où A est l'absorbance, D.O la densité optique, I_0 l'intensité lumineuse incidente, I l'intensité lumineuse transmise, ε le coefficient d'extinction molaire caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée en $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, l l'épaisseur traversée en cm et C la concentration en mol.L^{-1} .

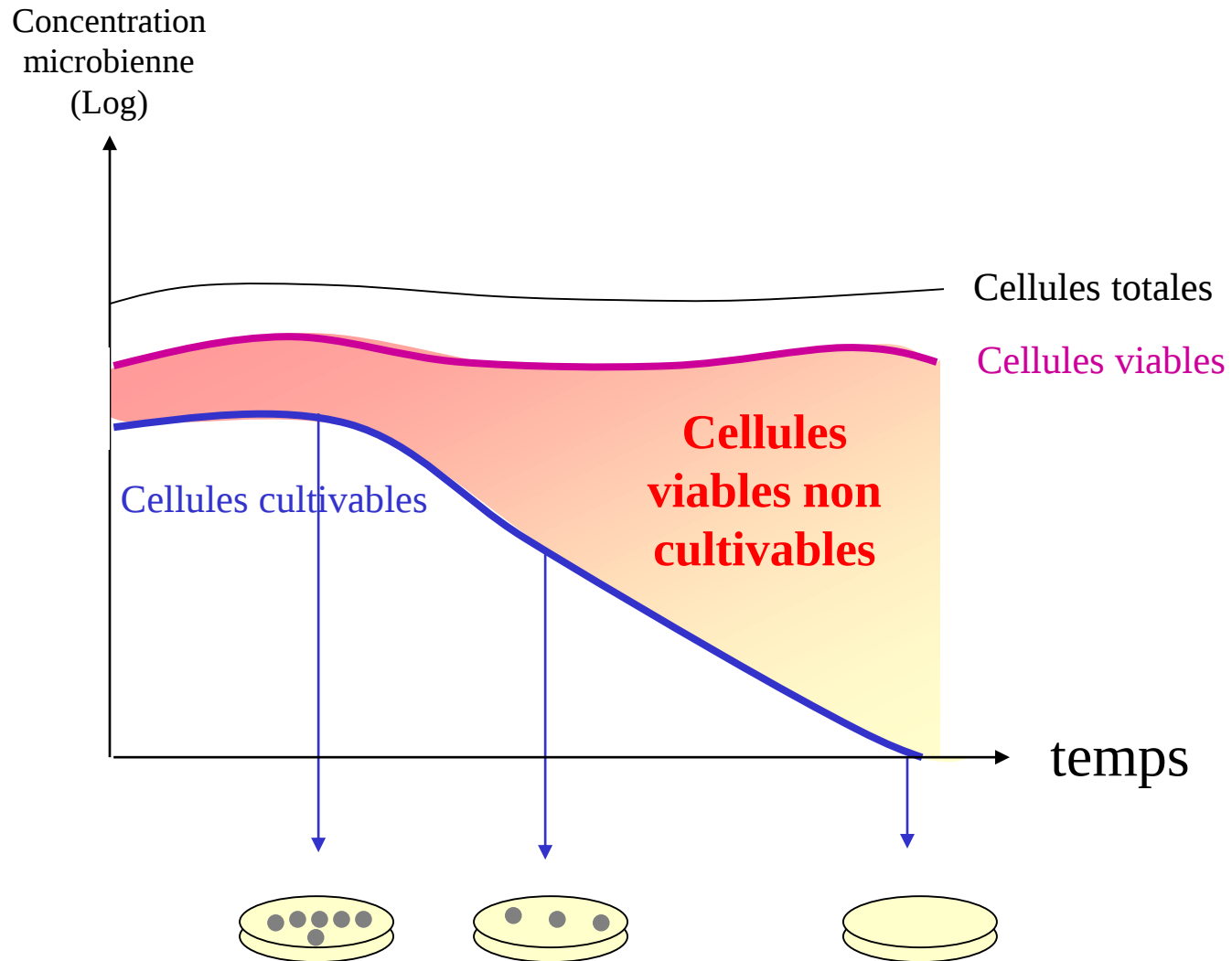


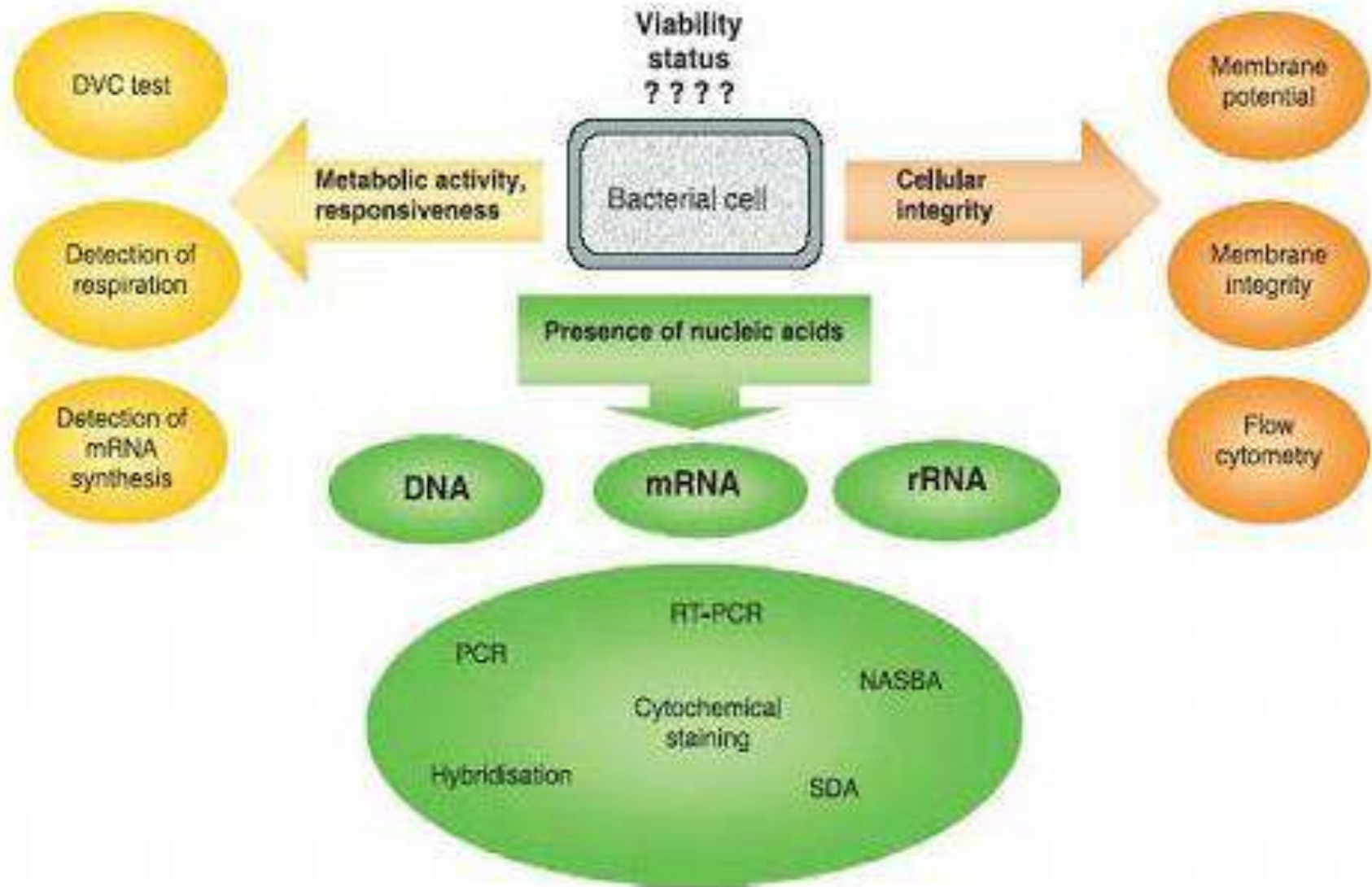
Mesure de l'activité

- **consommation de substrat**
- **mesure de constituants cellulaires** : le constituant idéal devrait être ubiquiste, disparaître rapidement des cellules mortes, absent du milieu, constant.
 - dosage de l'azote cellulaire (Kjeldal, Bradford)
 - nucléotides tels **ATP**, FAD, FMN (ex : ATP par luciférase de luciole dépendante de l'ATP – on peut détecter 10^4 bactéries/ml)
- **mesure des produits d'excrétions** (ex : $^{14}\text{CO}_2$)
- **mesure des variations physico-chimiques** du milieu (ex : pH, potentiel redox, conductivité/impédance, chaleur)



Notion de cellule viable non cultivable





Les méthodes d'estimation de la viabilité des bactéries présentes dans un échantillon (Keer & Birch, 2003)

Méthodes plus particulièrement utilisées pour l'étude des VNC : de nombreuses méthodes de coloration sont maintenant disponibles comme des mesures de :

- potentiel de membrane (Rhodamine 123 et DiBAC4)
- d'intégrité membranaire (SYTO 9/propidium iodide)
- de présence d'ADN et ARN (SYTO dyes).
- d'activité respiratoire(CTC)
- d'utilisation de substrats (essais DVC assay)

Sommaire

1. La nutrition des bactéries
2. Les milieux de culture
3. Les conditions physico-chimiques propices à la croissance
4. Méthodes de mesure de la croissance
- 5. Cinétique de la croissance**
6. Conservation des souches
7. Moyens de contrôle de la croissance microbienne :
antiseptie, désinfection et stérilisation

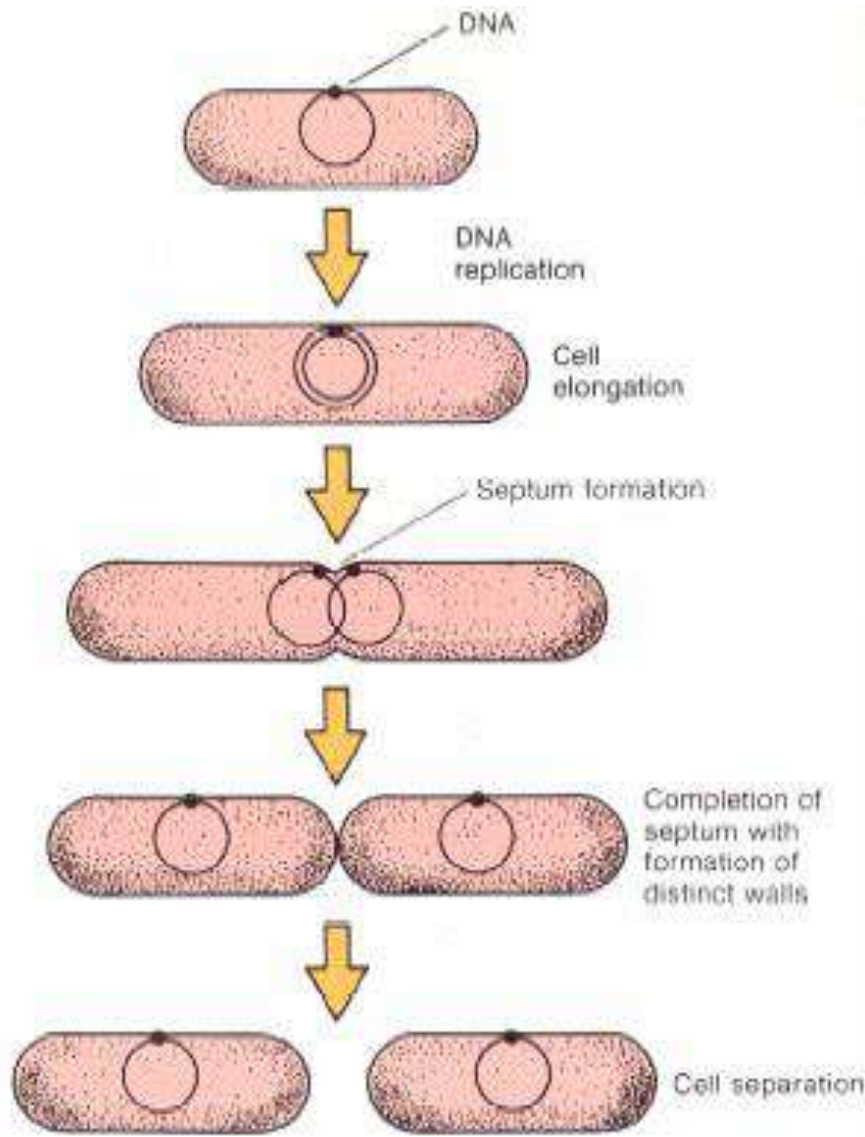
Définition de la croissance microbienne

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.

Accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme.

Si le microorganisme est coenocytique (multinucléé), il y a division nucléaire sans division cellulaire concomittante et la croissance conduit à une augmentation de la taille et non du nombre de cellules.

Division par scissiparité d'une bactérie telle que *Escherichia coli*

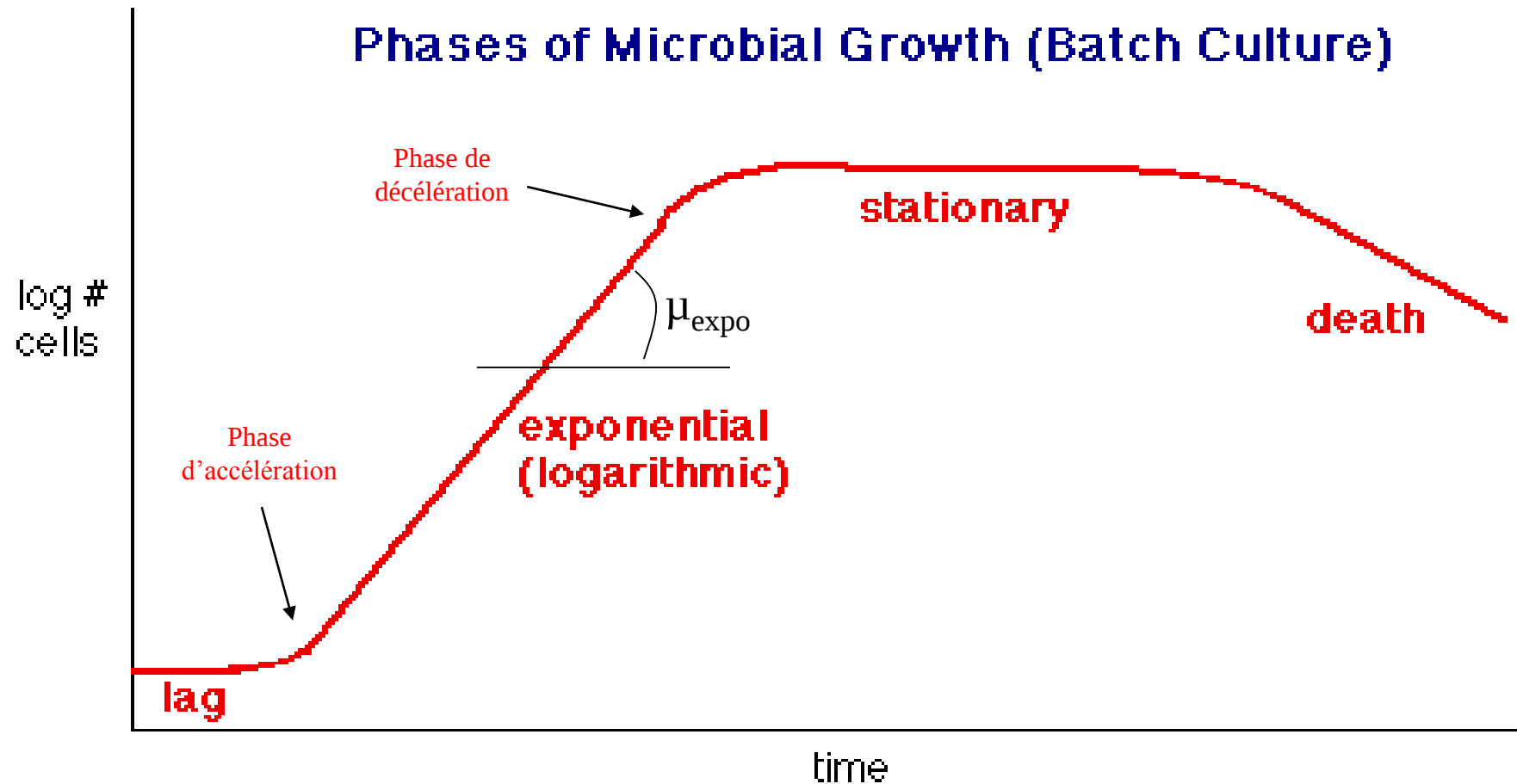


# of generations	# of bacteria	$\log_2 N$	$\log_{10} N$
0	1 or 2^0	0	0
1	2 or 2^1	1	.301
2	4 or 2^2	2	.602
3	8 or 2^3	3	.903
4	16 or 2^4	4	...
5	32 or 2^5	5	...
n	2^n	n	.301n

$$n = \frac{\log_{10} N_f - \log_{10} N_o}{.301}$$

où n est le nombre de génération, N_f la concentration finale en cellules, N_o la concentration initiale en cellules, et 0,301 un facteur permettant de convertir le $\log_2$ en $\log_{10}$ [i.e. $\log_{10}(2) = 0,301$]

Phases of Microbial Growth (Batch Culture)



Paramètres d'action de la croissance :

- **temps de génération** = temps nécessaire pour un doublement de la population
- **taux de croissance** (μ)

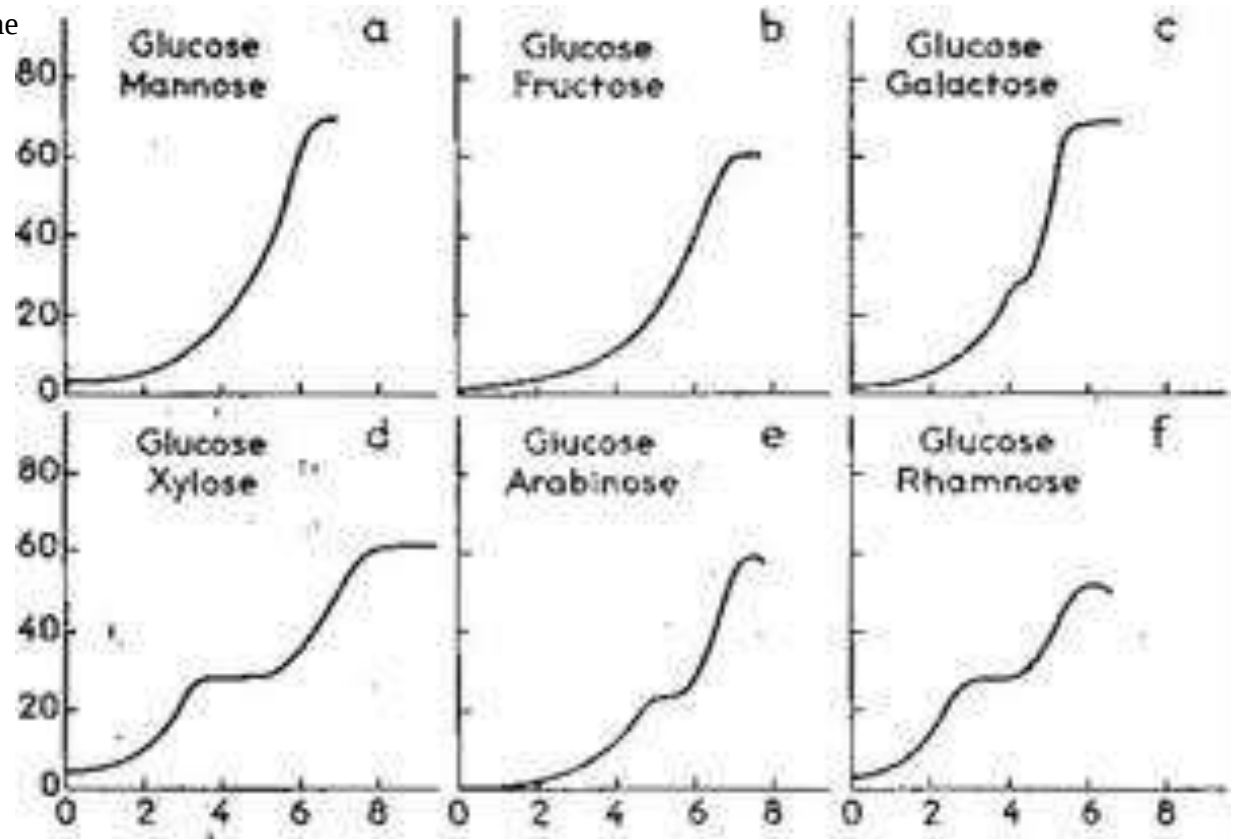
Microorganisme	Température (°C)	Temps de génération (heures)
Bactéries		
<i>Beneckeia natriegens</i>	37	0,16
<i>Escherichia coli</i>	40	0,35
<i>Bacillus subtilis</i>	40	0,43
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	0,47
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	25	env 5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	37	env 12
<i>Treponema pallidum</i>	37	env 33
Algues		
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	25	env 6
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	25	env 8
<i>Ceratium tripos</i>	20	env 83
Protozoaires		
<i>Tetrahymena geleii</i>	24	2-4
<i>Leishmania donovani</i>	26	10-12
<i>Paramecium caudatum</i>	26	env 10
<i>Giardia lamblia</i>	37	18
Mycètes		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	2
<i>Monilinia fructicola</i>	25	30

Quelques temps de génération de microorganisme (en milieu adapté)

Croissance de *Escherichia coli* en présence de différents couples de glucides utilisés comme seule source de carbone dans un milieu synthétique

Concentration
bactérienne

Pas de diauxie	Diauxie
Glucose	Galactose
Mannose	Arabinose
Fructose	Xylose
Mannitol	Rhamnose
	Sorbitol
	Dulcitol
	Maltose
	Lactose



temps

D'après J. Monod, 1964

Sommaire

1. La nutrition des bactéries
2. Les milieux de culture
3. Les conditions physico-chimiques propices à la croissance
4. Méthodes de mesure de la croissance
5. Cinétique de la croissance
- 6. Conservation des souches**
7. Moyens de contrôle de la croissance microbienne :
antiseptie, désinfection et stérilisation

Collection de souches

Pour l'enseignement, le contrôle, la recherche ou l'industrie. Il est ainsi nécessaire de préserver les souches types, les souches de référence et toutes les souches présentant un intérêt pour l'industrie, la médecine, l'agriculture ou pour toute autre activité scientifique.

Les premières collections de cultures ont été constituées en 1890 par le Tchèque Frantisek Kral (1846-1991) et en 1891 par le Français Jean Binot (1867-1909) qui créa la Collection de l'Institut Pasteur (CIP). En 1904, le CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*) a été établi à Baarn aux Pays Bas. Ultérieurement, de nombreuses collections ont vu le jour si bien qu'à la date du 07 novembre 2003, 470 collections de cultures (bactéries, virus, levures, cellules...), réparties dans 62 pays, étaient inscrites au WDCM (*World Data Centre for Microorganisms*).

Quelques exemples :

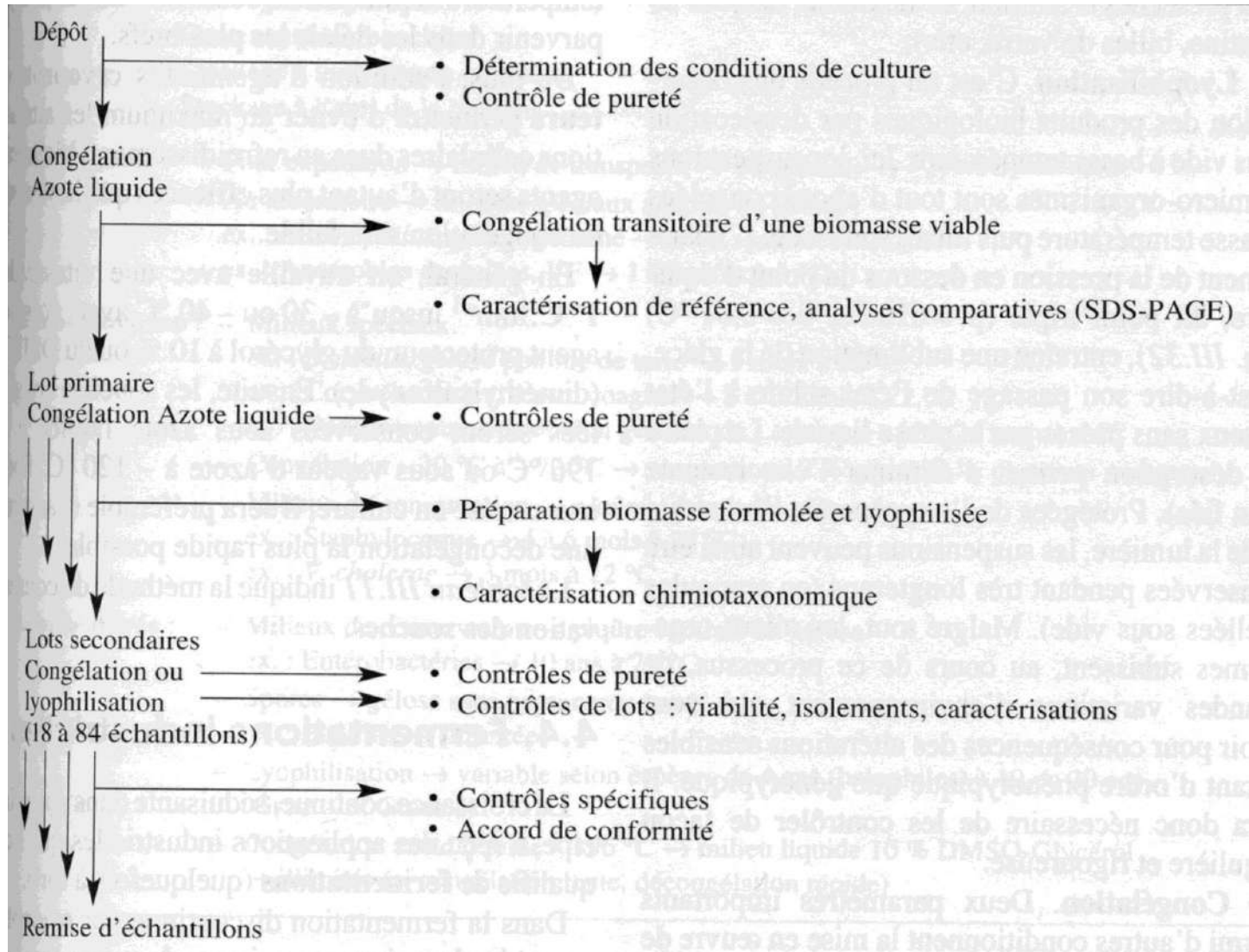
ATCC (*american type culture collection*)

NCTC (*national collection of type cultures* – Angleterre)

DSM (*deutsche sammlung von micro-organismen und zellkulturen*)

CIP (collection de l'Institut Pasteur)

Schéma suivi lors de l'incorporation d'une souche dans une collection officielle



Les techniques de conservation

Déterminer **en fonction du microorganisme** le milieu le plus convenable (pas trop riche), **la température la plus favorable et la durée de vie du stockage**. Le stockage se fait en général **à l'abri de la lumière** et dans un **contenant bien bouché**. Des repiquages successifs des réserves sont parfois nécessaires (**entretien de la collection**). Il faut maintenir les microorganismes dans un état physiologique et métaboliquement réduit.
Problème d'instabilité génétique éventuelle des souches...

- sur boîte de culture ou en milieu liquide à 4°C : en général, peu efficace, possibilité de mutation
- **conservation sur milieu solide** (gélose nutritive inclinée ensemencée en plusieurs points, ou gélose nutritive en culot ensemencée par piquê central = « *stab* ») conservée bien fermée (pour éviter la dessiccation) à l'abri de la lumière, **à la température du laboratoire ou 4°C**. Des champignons filamenteux ont ainsi pu être conservés plus de 25 ans !
- **congélation / cryoconservation** : il convient de congeler à la température la plus basse (souvent -80°C pour les bactéries, -196°C en azote liquide ou -120°C en vapeur d'azote pour les lignées cellulaires animales). Nécessité d'ajouter des agents cryoprotecteurs (10% glycérol ou diméthylsulfoxyde = DMSO). Ils sont d'autant plus efficaces que la vitesse de congélation sera faible, c'est pourquoi (surtout pour les cultures fragiles comme cellules animales) on utilise l'adage « **congélation lente, décongélation rapide** ».
- **dessiccation** :
 - **simple** – déshydratation par chaleur sèche ou produits chimiques (anhydre phosphorique) des microorganismes déposés sur des supports inertes
 - **lyophilisation** : dessiccation sous vide à basse température de suspensions de microorganismes d'abord congelés. L'abaissement de la pression en dessous du point d'équilibre, dit point triple (610 Pa ; 0,01°C) entraîne une sublimation de la glace (passage état solide à gazeux). Conservation à température ambiante très longue en ampoule scellée sous vide.

Durée	Milieu	Conservation	Exemples
Courte	Milieu de transport (VF* ou spécial) Milieu spéciaux adaptés au germe utilisé au laboratoire, par exemple : - gélose gélatine - VF	3 jours à température ambiante 1 à 2 semaines à 37°C 1 à 2 mois à 4°C	<i>Haemophilus</i> Anaérobies sporulées
Moyenne	Milieu spéciaux adaptés au germe utilisé au laboratoire, par exemple : - gélose pomme de terre - sérum coagulé - macération gélatine de Legroux Suspension glycérol 10% Piqûre centrale en gélose (<i>stab</i>)	3 mois à 22°C 8-12 mois à 22°C 12-24 mois à 4°C plusieurs mois à -20°C ou -70°C 4 à 6 mois à 22°C 3 mois à 22°C	<i>Brucella</i> Corynébactéries <i>Pseudomonas</i> Staphylocoques <i>Vibrio cholerae</i>
Longue	Piqûre centrale en gélose (<i>stab</i>) Gélose sans peptone ou terre Lyophilisation Milieu liquide 10% DMSO ou glycérol	10 ans à 22°C illimité 4 ans 10-20 ans illimitée à -196°C (azote liquide)	Entérobactéries Spores de <i>Bacillus</i> Espèces halophiles Nombreuses espèces

*VF = milieu viande/foie

Récupérer une souche après lyophilisation :

Ampoules



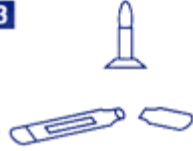
1

Désinfecter l'extérieur de l'ampoule avec un coton imbibé d'alcool et limer tout autour de l'étranglement.



2

Provoquer un choc thermique en appliquant une pipette Pasteur coupée court et chauffée sur le trait de lime.



3

Ouvrir l'ampoule dans les conditions d'asepsie usuelles.



4

Réhydrater le lyophilisat par environ 0,2 ml de bouillon.



5

Ensemencer un milieu approprié, selon les données du catalogue.

Flacons



- Retirer la languette d'aluminium.
- Retirer le bouchon dans les conditions d'asepsie usuelles.
- Reprendre par environ 0,2 ml de bouillon.
- Ensemencer un milieu approprié, selon les données du catalogue.

Sommaire

1. La nutrition des bactéries
2. Les milieux de culture
3. Les conditions physico-chimiques propices à la croissance
4. Méthodes de mesure de la croissance
5. Cinétique de la croissance
6. Conservation des souches
7. **Moyens de contrôle de la croissance microbienne :
antiseptie, désinfection et stérilisation**

Définitions

AFNOR : association française de normalisation

antiseptie : opération au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables sur un **tissu vivant**, utilisant un produit pouvant justifier *in vitro* de la réduction de 99,999% de la flore – usage local uniquement car trop toxique pour l'organisme.

désinfection : opération au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables sur une **surface inerte**, utilisant un produit pouvant justifier *in vitro* de la réduction de 99,999% de la flore.

décontamination : terme assez proche de celui de désinfection mais diffère de celui-ci en cela que la décontamination n'implique pas obligatoirement l'élimination des microorganismes (il peut y avoir juste inhibition) et s'applique aussi bien aux supports inertes que vivants.

stérilisation : tue tous les microorganismes (et leurs spores) contenus dans une préparation

aseptie : ensemble des mesures (désinfections, décontamination, stérilisation) propres à empêcher tout apport exogène de microorganismes dans un environnement (e.g. bloc opératoire).

L'action antimicrobienne dépend :

- du **microorganisme lui-même** (sensibilité, antibiogramme, concentration)
- de l'**agent microbien** (intensité pour les agents physiques, concentration pour les agents chimiques, temps de contact, stabilité chimique, solubilité)
- de l'**environnement** où se situe l'action (température, pH, turbidité, dureté de l'eau)

Les agents antimicrobiens du moins au plus spécifiques

agents stérilisants (tuent tout) – chaleur, radiations

désinfectants – lysol, NH_3

antiseptiques – peut être utilisé localement sur un tissu vivant mais pas ou peu ingéré (alcool, iode) car actifs à forte concentration

agents thérapeutiques (action ciblée) – peuvent être ingérés – antibiotiques et sulfamides (antimétabolites) car actifs à faible concentration

Action antimicrobienne via la **chaleur** : humide ou sèche

- **autoclavage** : stérilisation à 120°C pendant 15-20 min pour 1L (en fonction du volume) dans une enceinte métallique hermétiquement close dans laquelle on chauffe de l'eau sous pression pour faire agir de la vapeur d'eau saturée.

- **tyndallisation** : milieu chauffé à 60°C ou 70°C pendant 30 minutes ou 1 heure, 3 fois de suite à 24 heures d'intervalle. Action stérilisante – pour les produits altérés par l'autoclavage

- **pasteurisation** : détruire par la chaleur la quasi-totalité de la flore banale, pathogène si elle existe (notamment bacille tuberculeux) tout en laissant intact les équilibres chimiques ainsi que les éléments biochimiques (vitamines notamment) du produit traité (lait, vin, bière, jus de fruits...). Remarque : ce n'est pas une méthode de stérilisation.

- **pasteurisation basse température** : 60°C pendant 30 min, 71°C 15 secondes – conservation au froid, à consommer

rapidement

- **pasteurisation haute-température** : 90°C pendant 30'' puis refroidissement – procédé proche : **ébullition**

- **pasteurisation UHT** (ultra haute température) : 140°C pendant quelques secondes puis refroidissement brutal.

Conservation sous vide à température ambiante sur de longues périodes. Il reste les spores des bactéries thermophiles.

- **chaleur sèche** : stérilisation au four électrique ou à gaz (four Pasteur, Poupinel) à 180°C durant 30 minutes, 170°C durant 1 heure ou 160°C durant 2 heures.

Action antimicrobienne via les **radiations** : dommages des acides nucléiques essentiellement

- **rayons UV** : les plus utilisés malgré leur faible rendement
- **rayons X et γ** : les plus efficaces – considérés comme un moyen idéal de stérilisation à froid – installations coûteuses
- **radiations soniques**

Action antimicrobienne de la **pression** :

- **ultrapression, pascalisation** (ex : confitures pasteurisées à basse température puis traitées 10-30 min à 3500-6000 bars)
- **pression osmotique** : addition de sucre ou de sel
- **séchage**

Filtration : 0,2 ou 0,45 μm

Agents chimiques :

- **pouvoir oxydant et dénaturation des protéines** : oxydation des groupements SH libres (eau oxygénée, iode, chlore et ses dérivés dont l'hypochlorite de sodium alias « eau de javel »), association aux groupements SH (métaux lourds), coagulation des protéines (alcool), réduction des protéines (aldéhydes)
- **altération de la membrane plasmique** (composés phénoliques, savons, détergents dont les ammoniums quaternaires, alcools)
- **action sur le métabolisme** : poisons respiratoires (cyanures, fluorures), réaction avec les acides nucléiques (bleu de méthylène, violet de gentiane, aldéhydes)...
- **agents alkylants** : par exemple, oxyde d'éthylène gazeux (à 60°C) $\text{CH}_2=\text{CH}_2$

3 niveaux de classification :

- **haut niveau** : efficace contre toutes les formes de vie (dont spores). Ex : oxyde d'éthylène, glutaraldéhyde 2% - peut nécessiter 10 h d'action pour tuer les spores
- **niveau intermédiaire** : ne fonctionnent pas contre les spores mais agissent sur le bacille tuberculeux et des virus assez résistants (hépatites, rhinovirus)
- **bas niveau** : inactifs contre les spores, le bacille tuberculeux ou des virus nus – très utilisés, économiques, peu toxiques pour l'homme (lysol, détergents, mercuriels...)

Composés	Bactéries G+	Bactéries G-	Mycobac-téries	Spores	Champignons	Virus
Alcool 70°	++	++	0	+	+	+
Aldéhydes	+++	+++	++	+	+++	++
Ammoniums IV	+++	+ (sauf <i>Pseudomonas</i>)	0	0	+	+
Carbanilides	+	0			0	
Chlorhexidine	+++	++	0	0	+	0
Chlore	+++	+++	++	++	++	++
Hexachlorophène	+++	+	0	0	+	0
Iode	+++	+++	++	++	++	++
Mercuriels	++	++	0	0	+	
Phénoliques	variable	variable	variable	variable	variable	variable

Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

