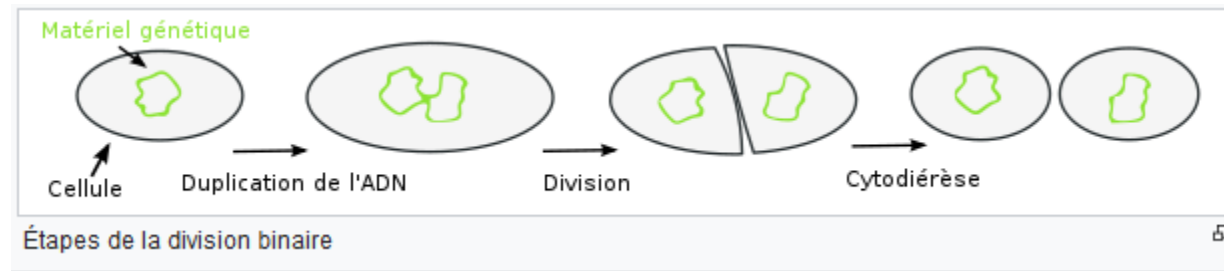


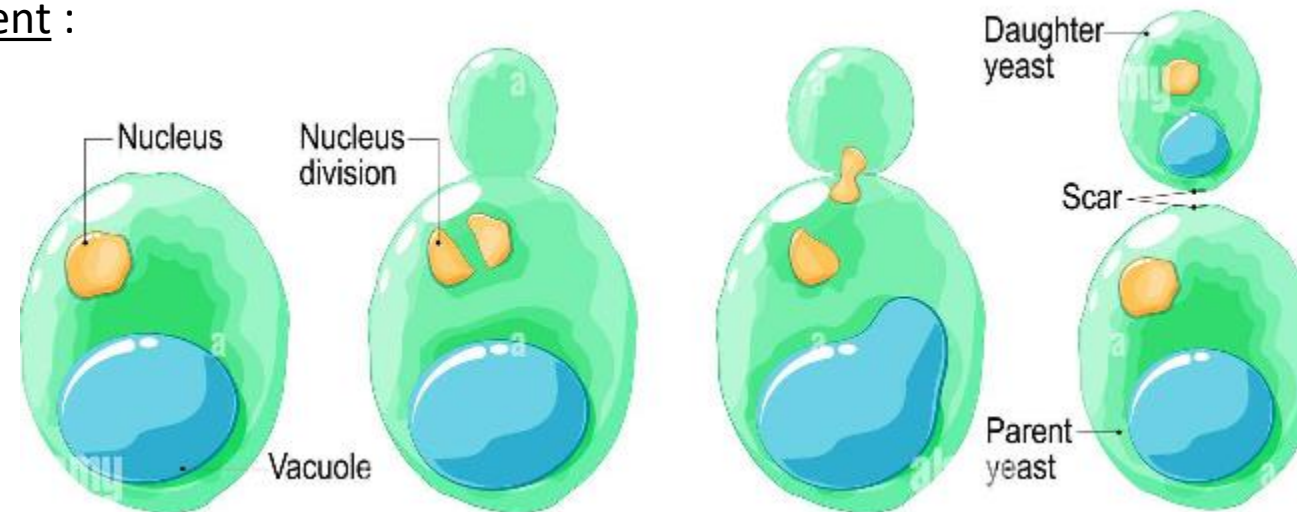
Culture des micro-organismes en milieu liquide non renouvelé

Les microorganismes se divisent selon deux principaux mécanismes : la **scissiparité** et le **bourgeonnement**.

✓ Division par scissiparité :



✓ Division par bourgeonnement :



Chez les micro-organismes unicellulaires, la **croissance** est définie comme une augmentation du nombre de cellules dans une population.

1. Méthodes d'étude de la croissance des micro-organismes

→ Voir TP

Pour suivre la croissance des microorganismes, on utilise principalement l'opacimétrie avec lecture de l'atténuation D à $\lambda = 600-650 \text{ nm}$.

Les principales autres méthodes d'étude de la croissance des microorganismes sont : **le dénombrement en hématimètre, la détermination du poids sec, le compteur de particules, l'ATP-métrie, l'impédancemétrie.**

On utilise moins le dénombrement après culture.

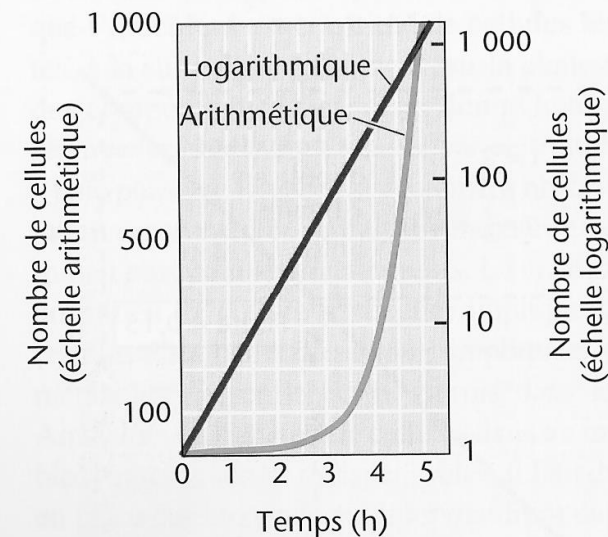
2. Accroissement d'une population de micro-organismes

2.1. Croissance exponentielle

Soit une étude réalisée à partir d'une cellule unique dont la division requiert 30 minutes :

Temps (h)	Nombre total de cellules	Temps (h)	Nombre total de cellules
0	1	4	256 (2^8)
0,5	2	4,5	512 (2^9)
1	4	5	1 024 (2^{10})
1,5	8	5,5	2 048 (2^{11})
2	16	6	4 096 (2^{12})
2,5	32	.	.
3	64	.	.
3,5	128	10	1 048 576 (2^{19})

(a)



(b)

2. Accroissement d'une population de microorganismes

2.1. Croissance exponentielle

La population augmente de façon exponentielle avec le temps : l'accroissement du nombre de cellules est faible au départ mais augmente continuellement.

On a :
$$N = N_0 \cdot 2^n$$

avec : - N_0 : nombre initial de cellules,
- N : nombre de cellules après n générations,
- n : nombre de générations.

Quand on représente l'évolution de la population en fonction du temps, on obtient graphiquement :

- une courbe exponentielle sur une échelle arithmétique.
- une droite sur une échelle semi-logarithmique.

Les populations de microorganismes ne se développent pas en permanence selon un mode exponentiel.

Exemple : Calculer la masse théorique d'une population bactérienne dont la croissance en phase exponentielle dure 48 heures à partir d'une seule cellule dont le temps de génération est de 20 minutes, sachant que la cellule de départ a une masse égale à 10^{-15} kg.

Donnée : masse de la Terre = $6,0 \cdot 10^{24}$ kg.

48 heures = 144 générations.

$N = 1 \times 2^{144} = 2,2 \cdot 10^{43}$ bactéries

BIARDEAU Sébastien *$m_{totale} = 2,2 \cdot 10^{43} \times 10^{-15} = 2,2 \cdot 10^{28}$ kg !!!*

2. Accroissement d'une population de micro-organismes

2.2. Paramètres d'état de la croissance

Soit X la concentration en biomasse mesurée à l'instant t .

2.2.1 Vitesse de croissance r_x

La vitesse de croissance r_x à l'instant t est : $r_x = \frac{dX}{dt} = X'$

r_x s'exprime en « **concentration de biomasse·temps⁻¹** », par exemple en **g·L⁻¹·h⁻¹**.

Graphiquement, la valeur de r_x à l'instant t correspond au coefficient directeur de la tangente à la courbe $X = f(\text{temps})$ à l'instant t .

2.2.2 Vitesse spécifique de croissance μ_x

La vitesse spécifique de croissance μ_x à l'instant t est la vitesse de croissance rapportée à l'unité de biomasse :

$$\mu_x = \frac{r_x}{X} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

μ_x s'exprime en **unité de temps⁻¹**, par exemple en **h⁻¹** ou en **min⁻¹**.

μ_x permet de **comparer les cinétiques de croissance de populations de concentrations initiales différentes**.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot X' = \log_e(X)'$$

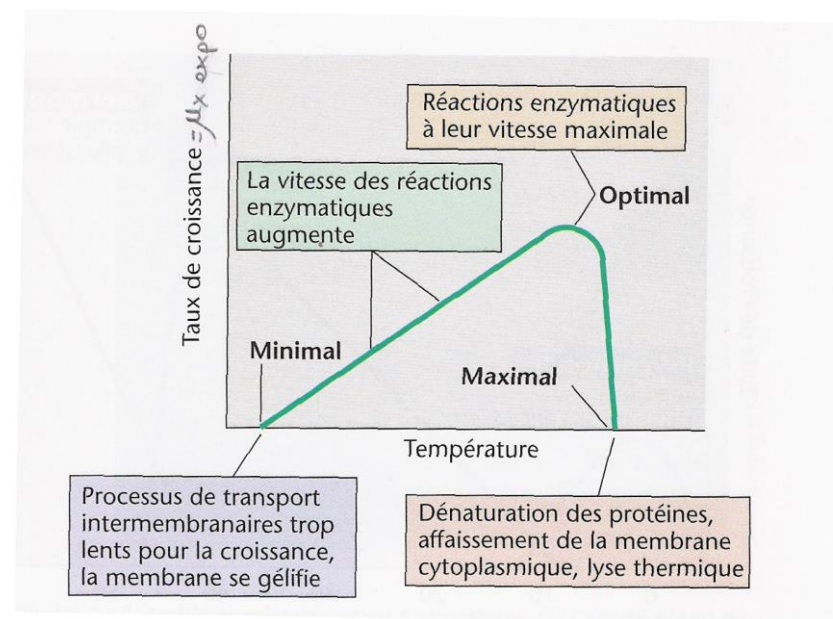
Graphiquement, la valeur de μ_x à l'instant t correspond au coefficient directeur de la tangente à la courbe $\log_e(X) = f(\text{temps})$ à l'instant t .

2. Accroissement d'une population de microorganismes

2.3. Influence des conditions de milieu et d'environnement : les variables d'action

Variables d'action = paramètres qui influencent les cinétiques de croissance et font varier les paramètres d'état de la croissance.

2.3.1. Température



Sur la courbe courbe $\mu_{X \text{ expo}} = f(\text{température})$:

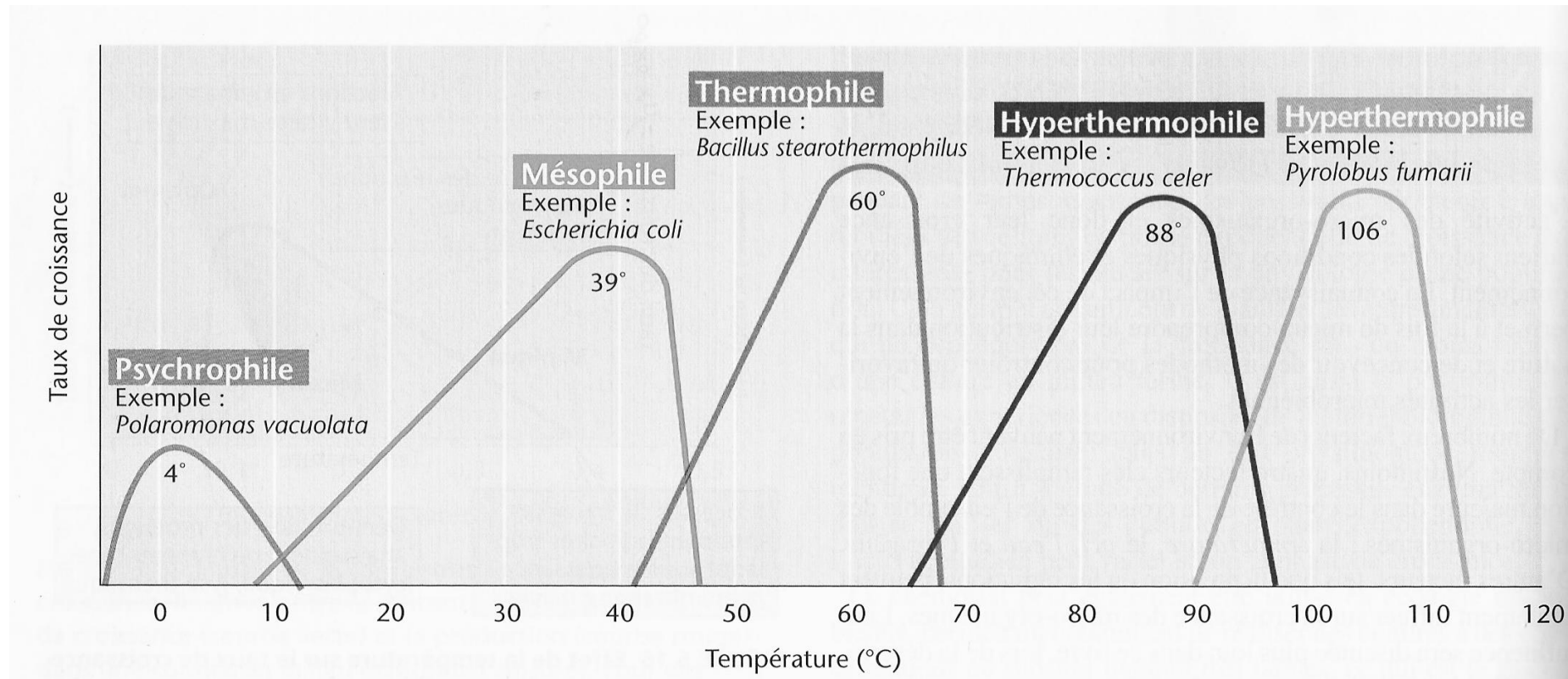
- θ_{\min} : Température en dessous de laquelle il n'y a pas de croissance → problème de fluidité des lipides membranaires.
- θ_{\max} : Température au dessus de laquelle il n'y a pas de croissance → dénaturation d'une ou de plusieurs protéines essentielles.
- θ_{optimale} : Température pour laquelle la croissance est la plus rapide (toujours plus proche de θ_{\max} que de θ_{\min}).

2. Accroissement d'une population de microorganismes

2.3. Influence des conditions de milieu et d'environnement : les variables d'action

2.3.1. Température

On peut ainsi classer les micro-organismes en fonction de leur **température optimale de croissance** :



2. Accroissement d'une population de microorganismes

2.3. Influence des conditions de milieu et d'environnement : les variables d'action

2.3.1. Température

Tableau récapitulatif :

	θ_{\min} (°C)	θ_{\max} (°C)	θ_{optimale} (°C)	Exemple
Micro-organismes psychrophiles	≈ -5	≈ 12	≈ 4	<i>Polaromonas vacuolata</i>
Micro-organismes mésophiles	≈ 8	≈ 47	≈ 37	<i>Escherichia coli</i>
Micro-organismes thermophiles	≈ 40	≈ 68	≈ 60	<i>Bacillus steraothermophilus</i>
Micro-organismes hyperthermophiles	≈ 65	≈ 98	≈ 90	<i>Thermococcus celer</i>
Micro-organismes hyperthermophiles extrêmes	≈ 90	≈ 115	≈ 105	<i>Pyrococcus furiosus</i>

2. Accroissement d'une population de microorganismes

2.3. Influence des conditions de milieu et d'environnement : les variables d'action

2.3.2. pH

Comme pour la température, on distingue :

- pH_{\min} : pH au dessous duquel il n'y a pas de croissance
- pH_{\max} : pH au dessus duquel il n'y a pas de croissance
- pH_{optimal} : pH pour lequel la croissance est la plus rapide.

Le pH intervient sur :

- **la disponibilité de certains nutriments** (ions métalliques par exemple).
- **l'activité métabolique** (vitesse de catalyse des enzymes, synthèse d'ATP).

On peut ainsi **classer les micro-organismes** en fonction de leur **pH optimal de croissance** :

- **micro-organismes acidophiles** : pH optimal de croissance acide ($pH < 7$).
- **micro-organismes neutrophiles** : pH optimal de croissance proche de la neutralité ($pH \approx 7$).
- **micro-organismes alcalophiles** : pH optimal de croissance basique/alcalin ($pH > 7$).

2. Accroissement d'une population de microorganismes

2.3. Influence des conditions de milieu et d'environnement : les variables d'action

2.3.3. Pression osmotique – Activity of water A_w

La disponibilité en eau est un facteur influençant fortement la croissance : elle dépend de la présence d'eau mais aussi de la concentrations en solutés (qui « retiennent » les molécules d'eau et les rendent donc moins disponibles pour les microorganismes).

Elle peut être évaluée par le paramètre activité de l'eau notée A_w .

$$A_w = \frac{\text{pression de vapeur saturante du milieu}}{\text{pression de vapeur saturante de l'eau pure}}$$

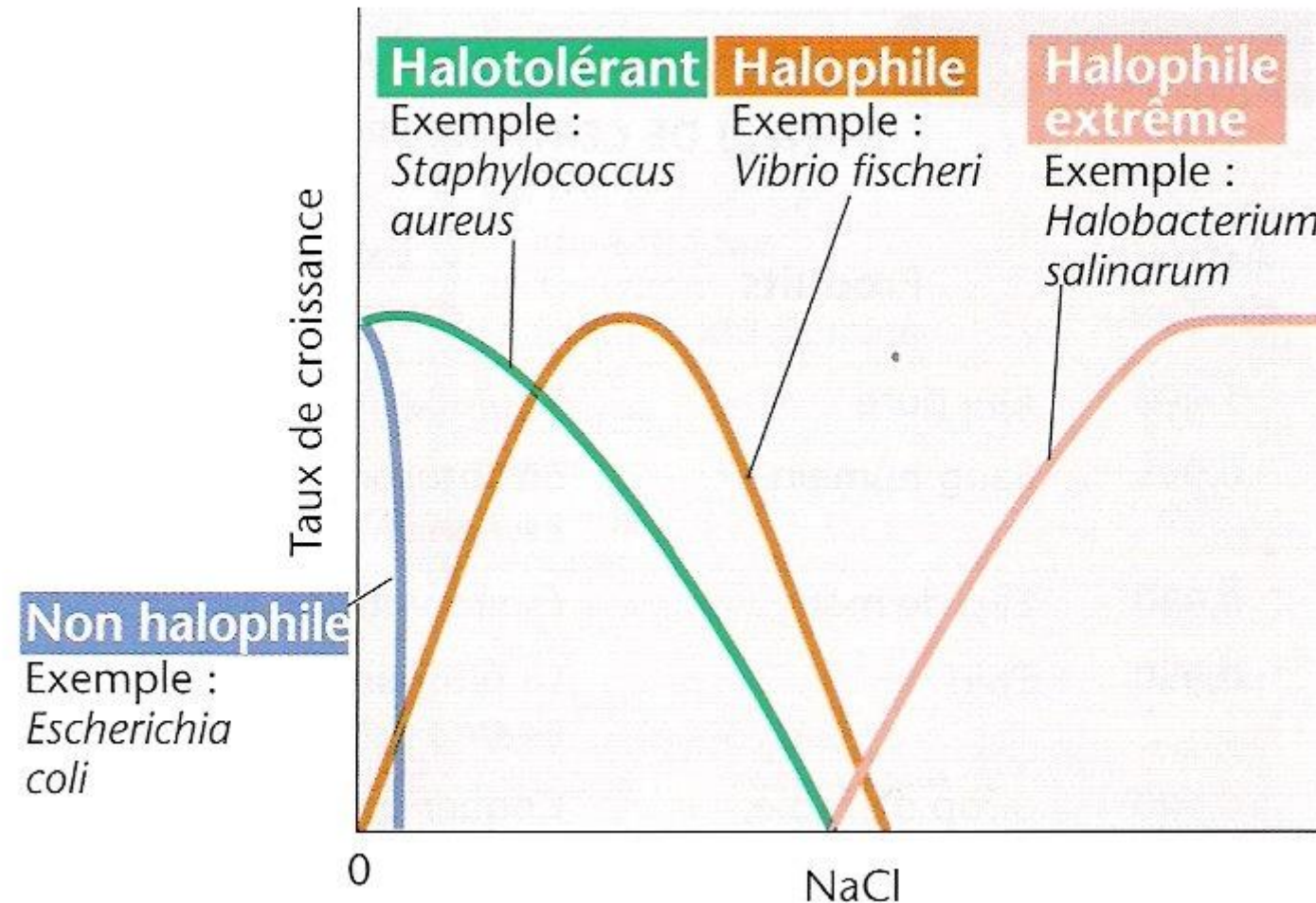
A_w est comprise **entre 0 et 1**, 1 correspondant à l'eau pure soit la disponibilité en eau la meilleure.

Valeurs d'Aw pour quelques solutions de NaCl et de saccharose

Aw à 25 °C	NaCl en g/100g d'eau	Saccharose en g/100g d'eau
0,99	1,75	11
0,96	7,01	25
0,94	10,34	93
0,92	13,50	120
0,90	16,50	144
0,85	23,60	208

Aw de quelques micro-organismes et aliments

Micro-organismes	Aliments
<i>Acinetobacter</i> (0,99)	Viandes (0,99)
<i>Cl. botulinum</i> (0,97)	Raisin (0,986)
<i>Ps. fluorescens</i> (0,957)	Pommes (0,98)
<i>E. coli</i> (0,95)	Cerises (0,977)
<i>Salmonella spp</i> (0,95)	Confiture (0,75-0,80)
<i>St. aureus</i> (0,86)	Céréales (< 0,70)
Bactéries halophiles (0,75)	Chocolat (< 0,60)
<i>Sc. cerevisiae</i> (0,90-0,94)	
Levures halophiles (0,62)	
<i>Fusarium</i> (0,90)	
<i>Mucor</i> (0,80-0,90)	
<i>Aspergillus flavus</i> (0,78)	



On appelle :

- **xérophiles** les espèces résistantes à la dessiccation relative du milieu.
- **halophiles** les espèces qui nécessitent NaCl en concentration élevée pour leur croissance.

2. Accroissement d'une population de micro-organismes

2.3. Influence des conditions de milieu et d'environnement : les variables d'action

2.3.4. Nature et concentration du substrat

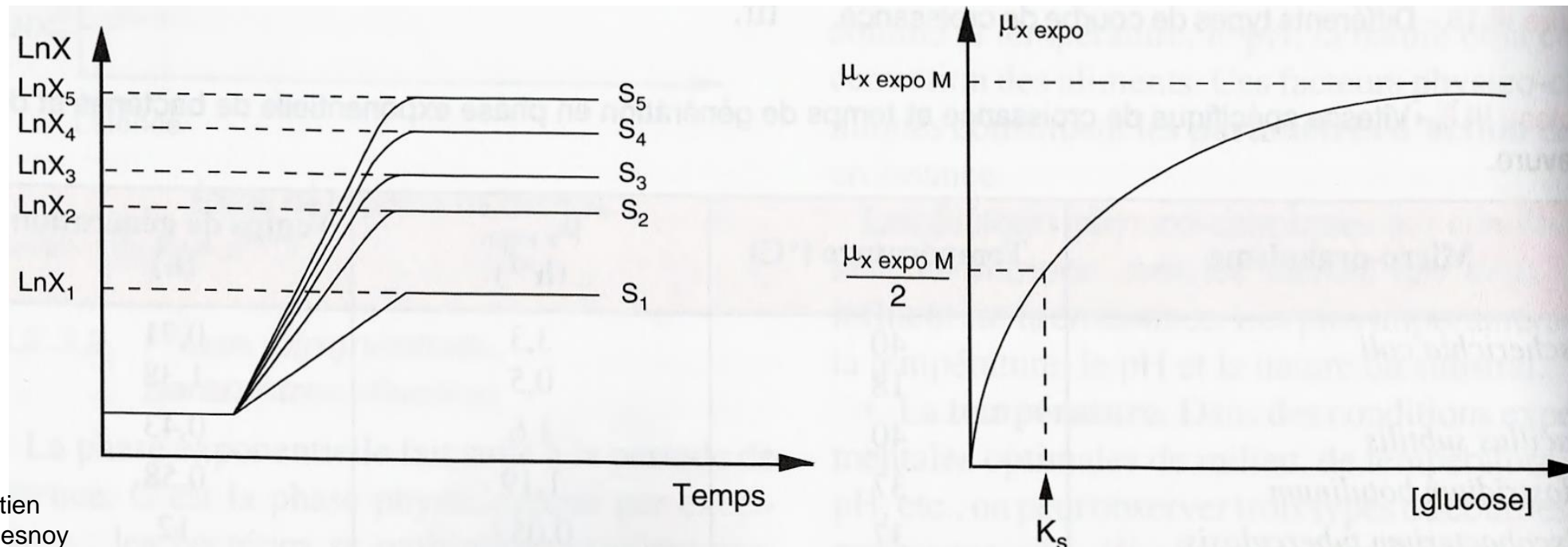
Pour une espèce donnée, $\mu_{x \text{ expo}}$ dépend du substrat (source de carbone et/ou d'énergie) utilisé par le micro-organisme.

Exemple : - Pour *Bacillus subtilis* : $\mu_{x \text{ expo}} = 0,3 \text{ h}^{-1}$ si le citrate est l'unique source de carbone.

- Pour *Bacillus subtilis* : $\mu_{x \text{ expo}} = 2 \text{ h}^{-1}$ si le glucose est l'unique source de carbone.

Il existe une dépendance de $\mu_{x \text{ expo}}$ vis-à-vis de la concentration en substrat.

Dans un milieu synthétique avec une seule source de carbone, en phase exponentielle de croissance on obtient:



On peut alors établir l'équation de MONOD :

$$\mu_{X \text{ expo}} = \frac{\mu_{X \text{ expo max}} \times [S]}{K_S + [S]}$$

Avec : K_S = constante de saturation.

K_S exprime l'« affinité » de l'organisme pour le substrat : plus K_S est grande, plus l'affinité du micro-organisme vis-à-vis du substrat est faible, et inversement.

Exemples : K_S vis-à-vis du glucose : - *Escherichia coli* : $K_S = 4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

- *Saccharomyces cerevisiae* : $K_S = 25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

D'après la courbe $\mu_{X \text{ expo}} = f([\text{substrat}])$, on remarque que la concentration en substrat est limitante tant qu'on n'est pas proche de $\mu_{X \text{ expo max}}$.

Au delà d'une valeur seuil de concentration $\mu_{X \text{ expo}} \approx \mu_{X \text{ expo max}}$ et le substrat n'est plus le facteur limitant.

Remarque : À forte concentration, un substrat peut devenir inhibiteur.

2. Accroissement d'une population de micro-organismes

2.3. Influence des conditions de milieu et d'environnement : les variables d'action

2.3.5. Aération

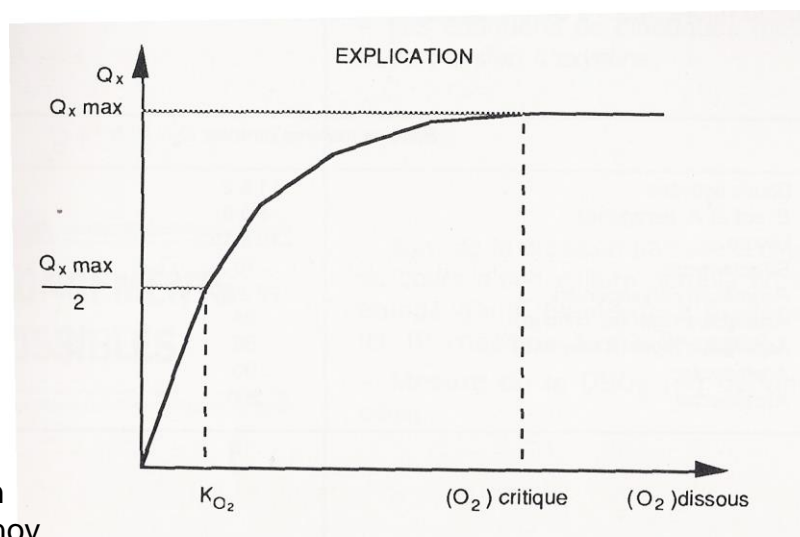
2.3.5.1. Disponibilité en O₂

La plupart des niches environnementales sont exposées au O₂.

On distingue différents types respiratoire vis-à-vis du O₂ chez les micro-organismes :

- micro-organisme **aérobie stricte** (AS) : croissance en présence obligatoire de O₂.
- micro-organisme **aéro-anaérobie facultatif** (AanF) : croissance en présence ou non de O₂.
- micro-organisme **micro-aérophile** : croissance en présence d'une teneur faible en O₂.
- micro-organisme **anaérobie stricte** (AnS) : croissance en absence totale de O₂.

Pour les micro-organismes aérobies strictes, le taux de croissance $\mu_{X_{\text{expo}}}$ ou $Q_{X_{\text{expo}}}$ est fonction des conditions d'aération :



Remarque : Au-delà d'une certaine concentration, l'O₂ est toxique pour de nombreux micro-organismes aérobies strictes.

2. Accroissement d'une population de micro-organismes

2.3. Influence des conditions de milieu et d'environnement : les variables d'action

2.3.5. Aération

2.3.5.2. Disponibilité en CO₂

Pratiquement tous les micro-organismes ont **besoin de CO₂ pour leur croissance**.

Cependant, la quantité nécessaire pour une croissance optimale est variable.

La teneur atmosphérique en CO₂ (0,03 %) satisfait la plupart des autotrophes et hétérotrophes, mais pour une croissance optimale des autotrophes il est nécessaire d'enrichir en CO₂.

3. Culture en milieu non renouvelé = culture en batch = culture en discontinu

La culture en milieu non renouvelé, ou culture en batch, correspond à des cultures en flacons ou en bioréacteurs avec un milieu et des conditions favorables à la croissance du micro-organisme.

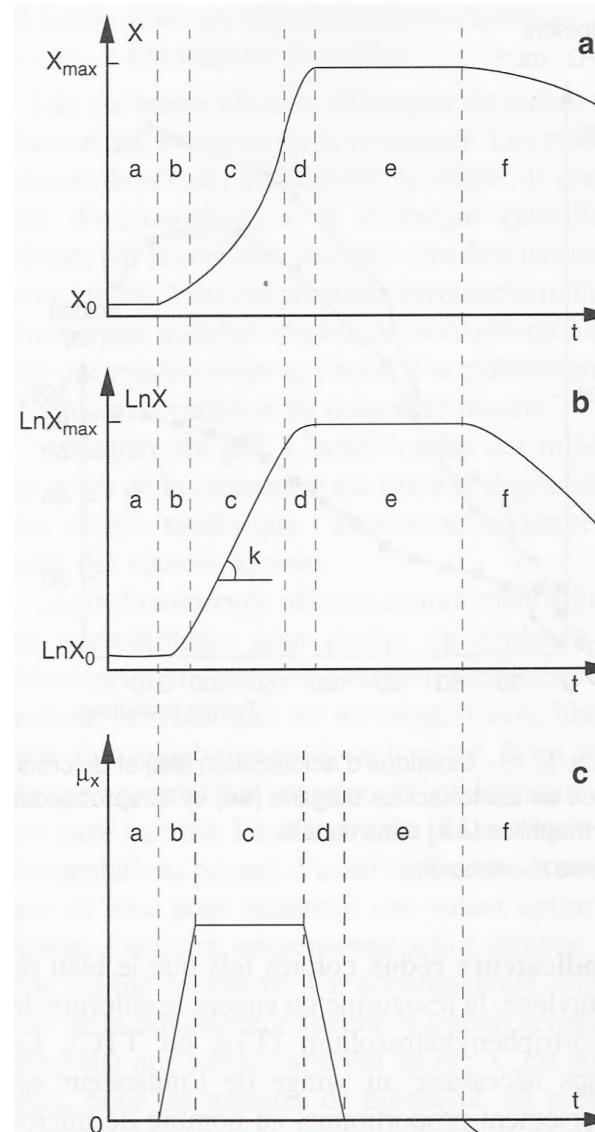
Il n'y a pas d'addition d'éléments, donc la culture se développe jusqu'à ce qu'une carence ou une modification du milieu bloque la croissance : la culture est en discontinu.

→ Voir TP

Il existe également la culture en **milieux renouvelés** : fed-batch, turbidostat, chemostat.

3. Culture en milieu non renouvelé = culture en batch = culture en discontinu

3.1. Étude d'une cinétique de croissance en milieu non renouvelé



a) La phase de latence :

Phase de début de croissance pendant laquelle la **biomasse n'évolue pas** : $\mu_x = 0$.

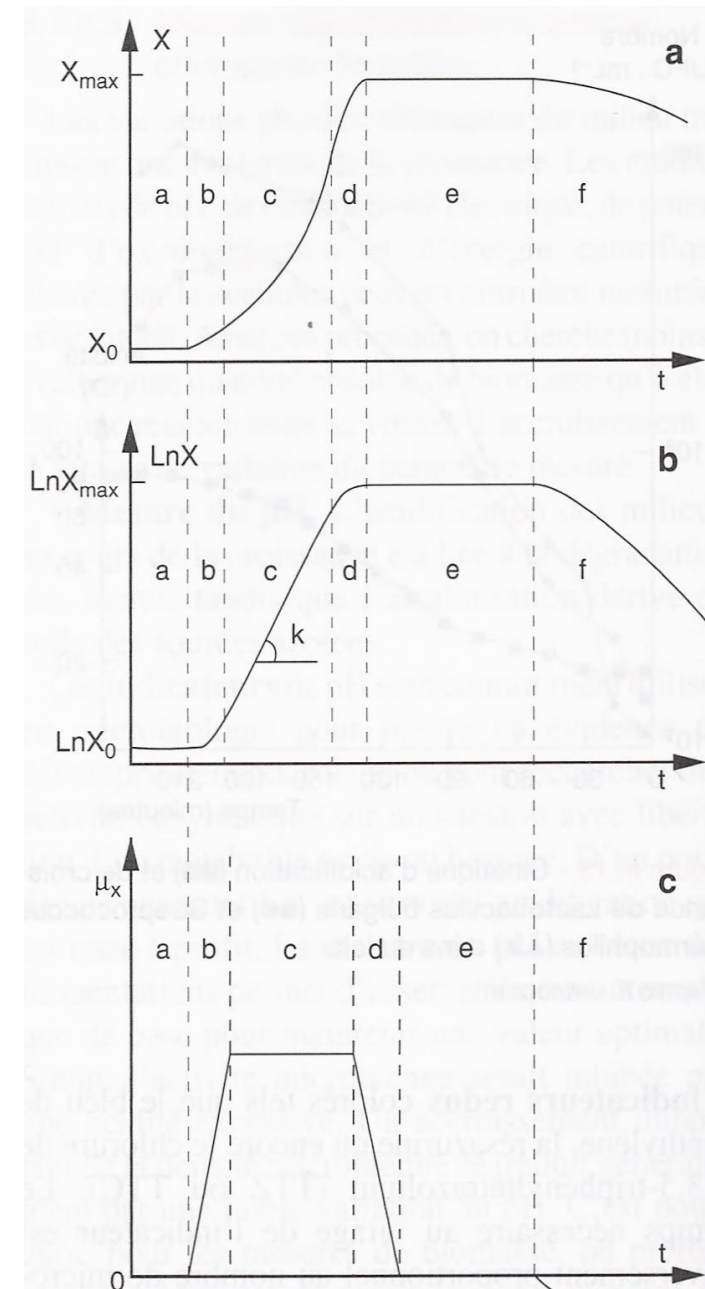
Phase plus ou moins longue selon la culture et le milieu.

La phase de latence **correspond au temps nécessaire pour synthétiser les enzymes indispensables à l'adaptation au nouveau milieu avant de pouvoir se diviser.**

En revanche, si le milieu et l'environnement sont identiques à ceux de l'inoculum, la phase de latence sera brève voire inexistante.

b) La phase d'accélération :

Pendant cette phase X et μ_x augmentent



c) : Phase exponentielle de croissance :

Pendant cette phase de croissance, on détermine les **paramètres d'état de la croissance** :

- **le taux de croissance (népérien) $\mu_{X\text{-expo}}$** :

μ_x est constante et maximale. On la note $\mu_{X\text{-expo}}$ et on l'appelle taux de croissance.

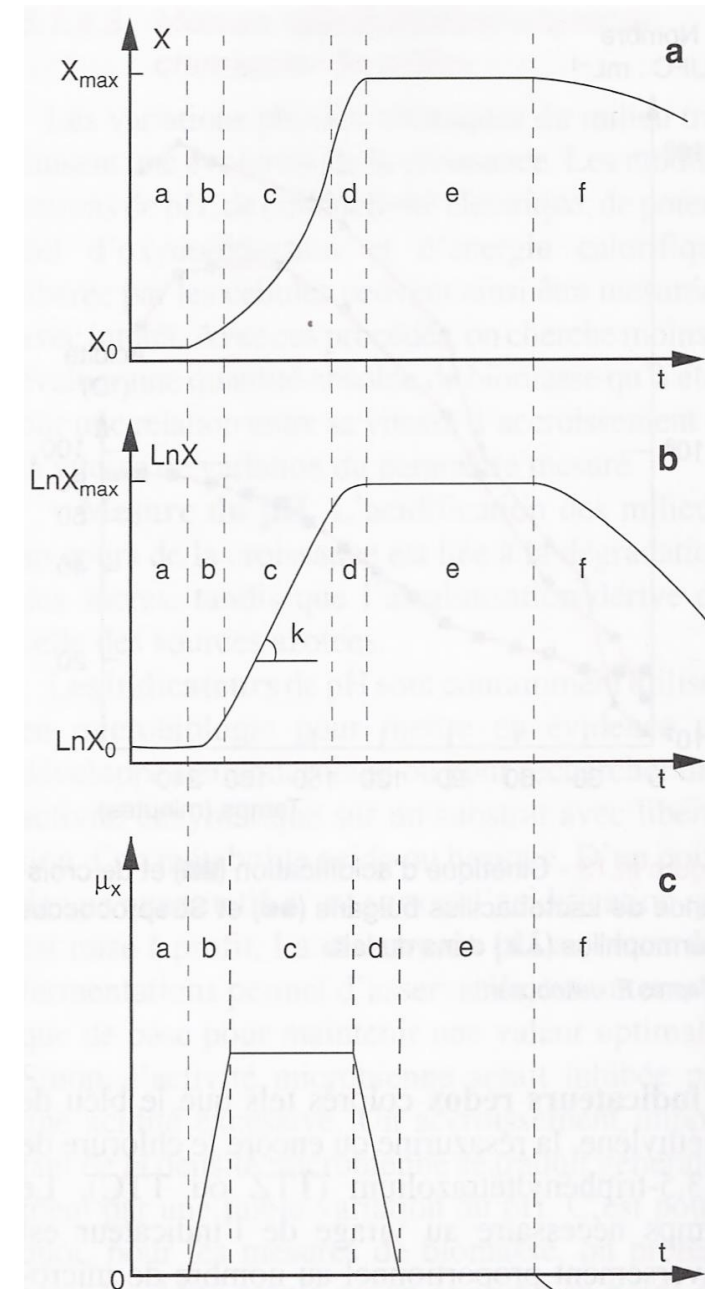
En intégrant l'expression de $\mu_{X\text{-expo}}$ entre les temps t_1 et t_2 pris dans la phase exponentielle ($t_2 > t_1$), on obtient :

$$\log_e(X_2) - \log_e(X_1) = \mu_{X\text{-expo}} \cdot (t_2 - t_1)$$

$$\text{donc } X_2 = X_1 \cdot e^{\mu_{X\text{-expo}} \cdot (t_2 - t_1)}$$

D'où :

$$\mu_{X\text{-expo}} = \frac{\log_e(X_2) - \log_e(X_1)}{t_2 - t_1}$$



c) : Phase exponentielle de croissance :

Pendant cette phase de croissance, on détermine les **paramètres d'état de la croissance** :

- Le temps de génération G :

G correspond au temps nécessaire pour doubler la biomasse.

Donc : si $t_2 - t_1 = G$ alors $X_2 = 2X_1$:

$$\log_e(X_2) = \log_e(X_1) + \mu_{X \text{ expo}} \cdot (t_2 - t_1)$$

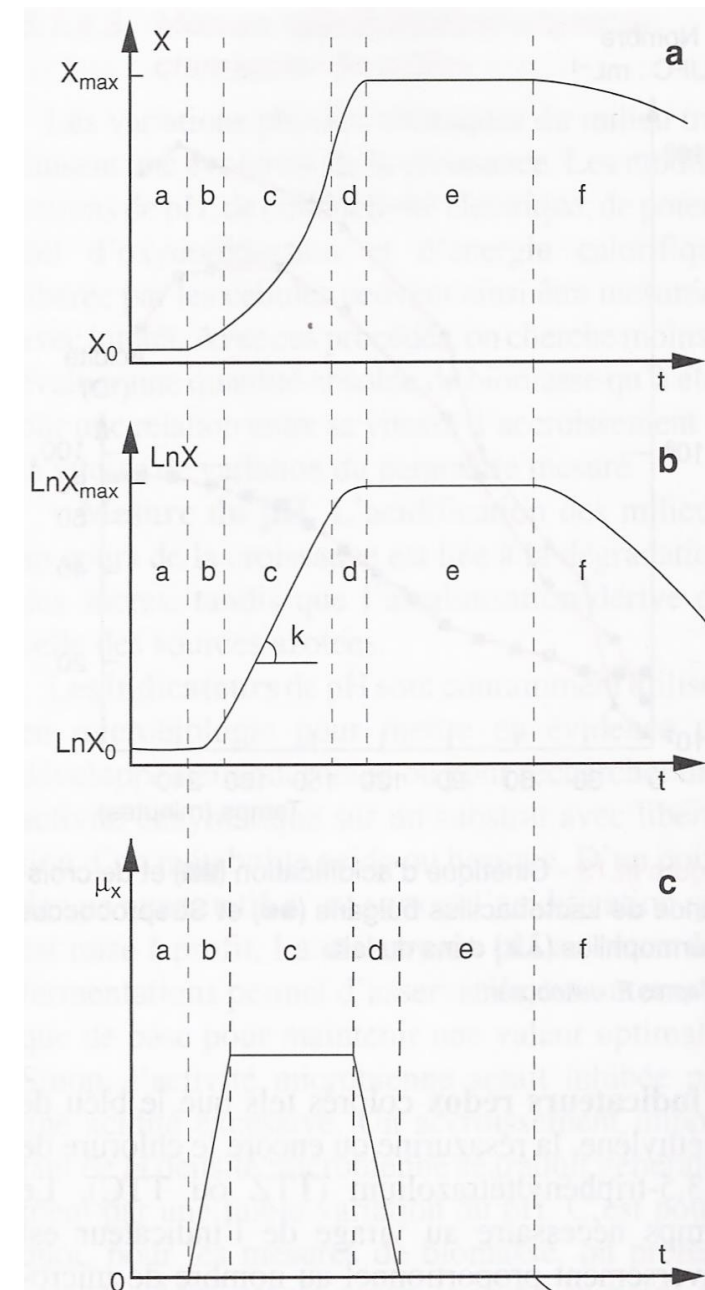
$$\Leftrightarrow \log_e(2X_1) = \log_e(X_1) + \mu_{X \text{ expo}} \cdot G$$

$$\Leftrightarrow \log_e(2X_1) - \log_e(X_1) = \mu_{X \text{ expo}} \cdot G$$

$$\Leftrightarrow \log_e(2) = \mu_{X \text{ expo}} \cdot G$$

D'où :

$$G = \frac{\log_e(2)}{\mu_{X \text{ expo}}}$$



c) : Phase exponentielle de croissance

Pendant cette phase de croissance, on détermine les **paramètres d'état de la croissance** :

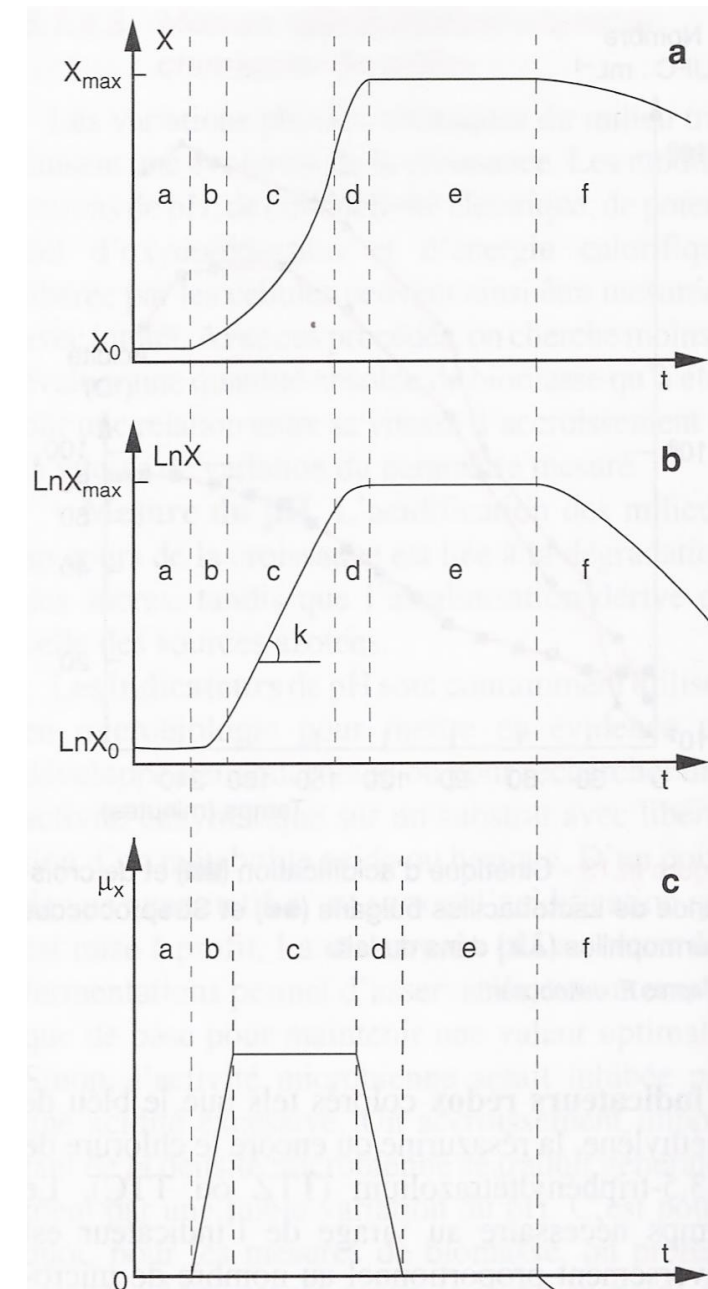
- Le taux horaire de croissance *THC* :

Le taux horaire de croissance est le facteur relatif d'accroissement de la biomasse pour une durée de 1 heure pendant la phase exponentielle de croissance.

$$THC = \frac{X_2}{X_1} = e^{\mu_{X \text{ expo}} \cdot \Delta t}$$

avec $\Delta t = 1$ heure, ou 60 minutes, et pris dans la phase exponentielle

Exemple : Pour $\mu_{X \text{ expo}} = 0,0347 \text{ min}^{-1}$; soit $G = 20$ minutes : on a $THC = 8$ (en 1 heure la biomasse est multipliée par $2 \times 2 \times 2 = 8$). En 2 heures de phase exponentielle, la biomasse serait multipliée par $8 \times 8 = 64$.



c) : Phase exponentielle de croissance :

Pendant cette phase de croissance, on détermine les **paramètres d'état de la croissance** :

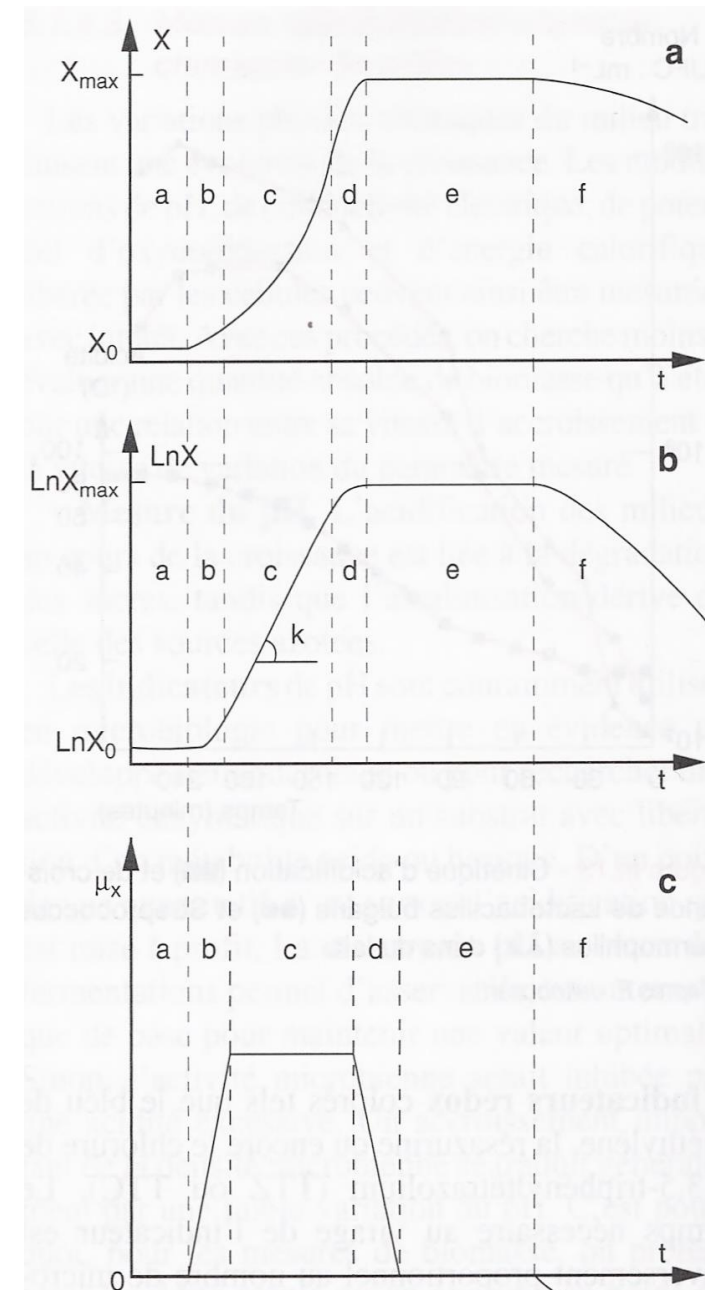
- La fréquence de division k :

La fréquence de division correspond au nombre de divisions par unité de temps.

$$k = \frac{1}{G}$$

Exemples :

$\mu_{X \text{ expo}}$	G	THC	k
0,0347 min ⁻¹ = 2,08 h ⁻¹	20 minutes = 0,33 heure	8 (= 2 x 2 x2)	3 divisions par heure
0,01166 min ⁻¹ = 0,693 h ⁻¹	60 minutes = 1 heure	2	1 division par heure



d) : Phase de ralentissement :

Pendant cette phase, on a une diminution de μ_x .

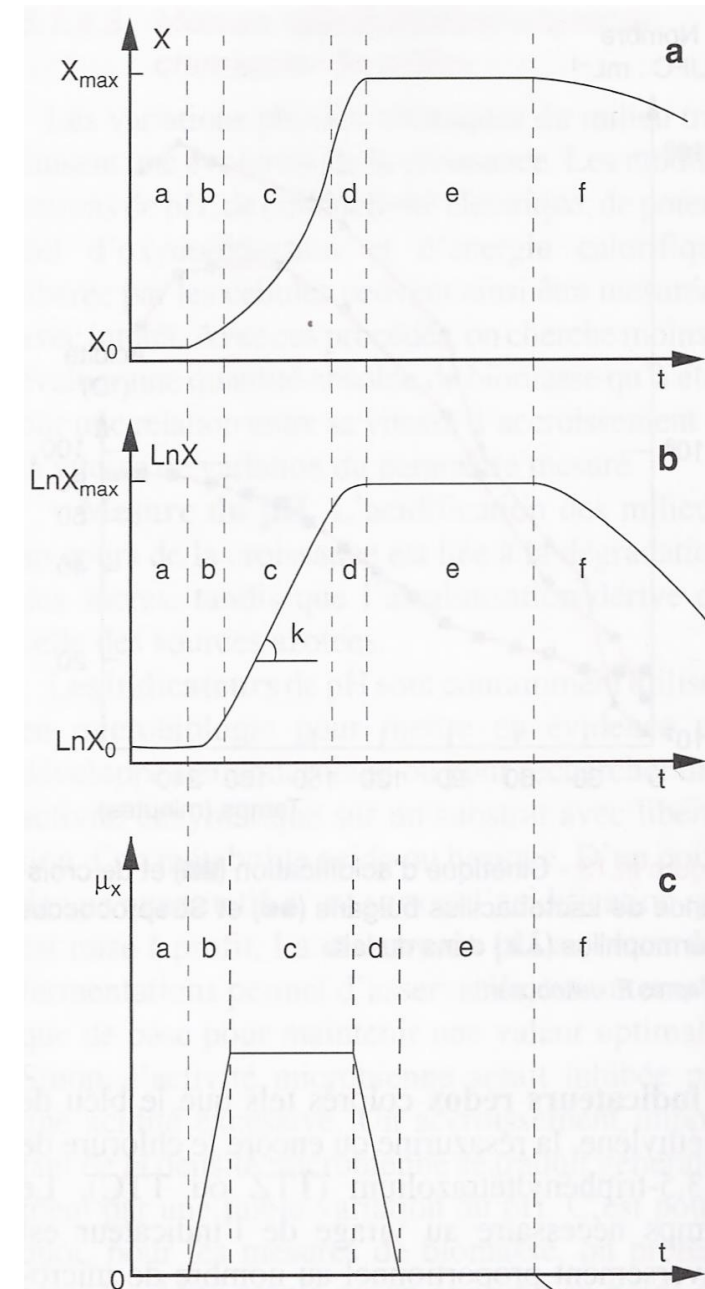
e) Phase stationnaire :

Dans la phase stationnaire $\mu_x = 0$.

Explications :

- soit un équilibre entre multiplication de certaines cellules et la mort d'autres cellules.
- soit persistance de cellules vivantes, métaboliquement actives, en l'absence de tout développement.

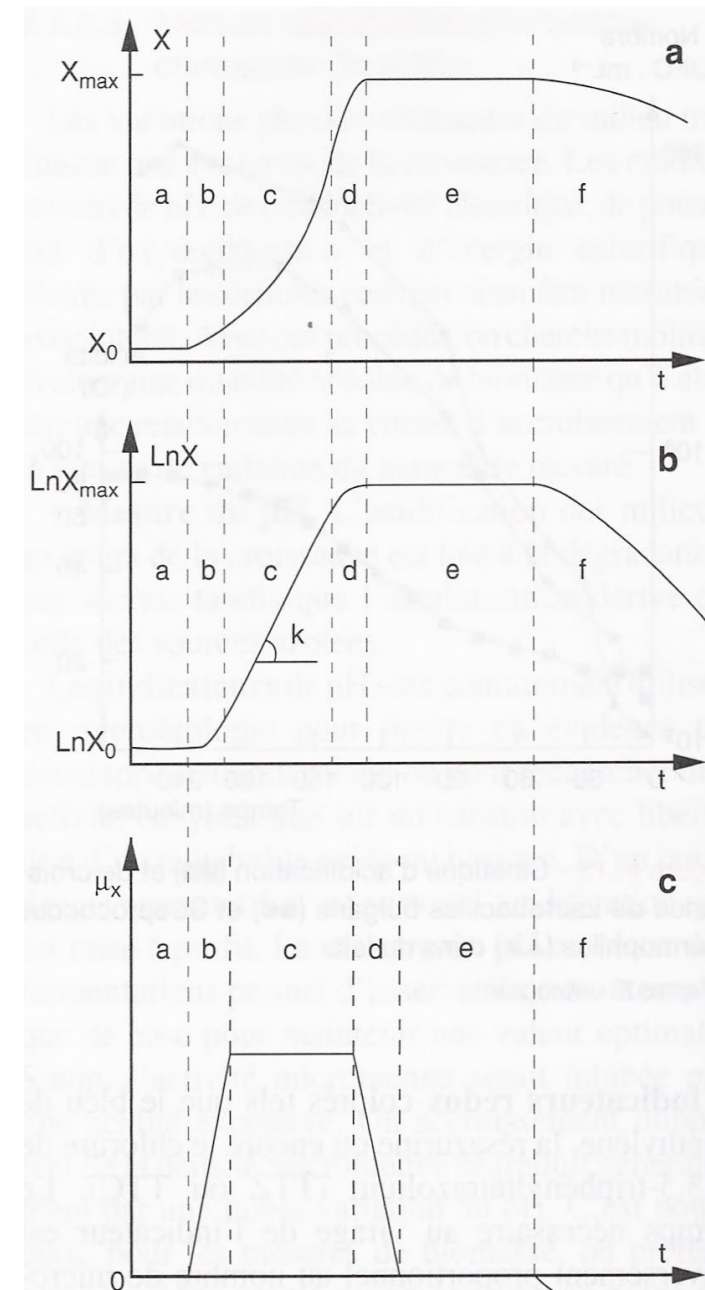
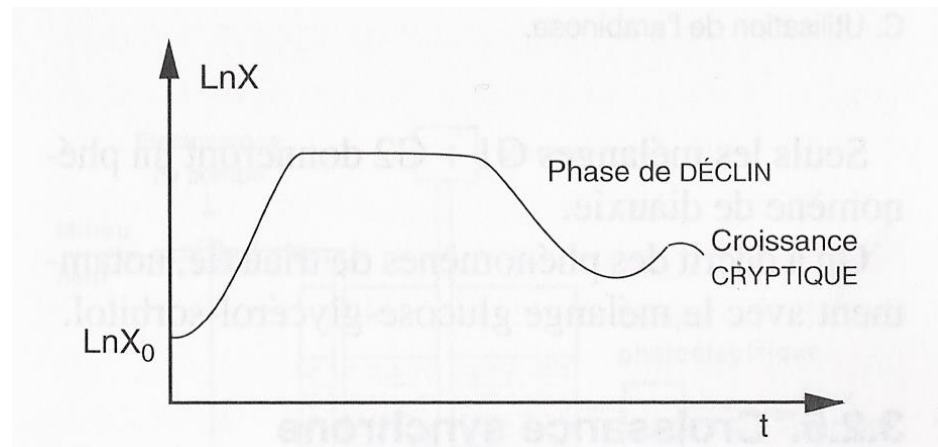
Un nutriment essentiel du milieu de culture est épuisé ou changement des conditions de culture.



f) : Phase de déclin :

Le taux de cellules lysées devient supérieur au taux de croissance.

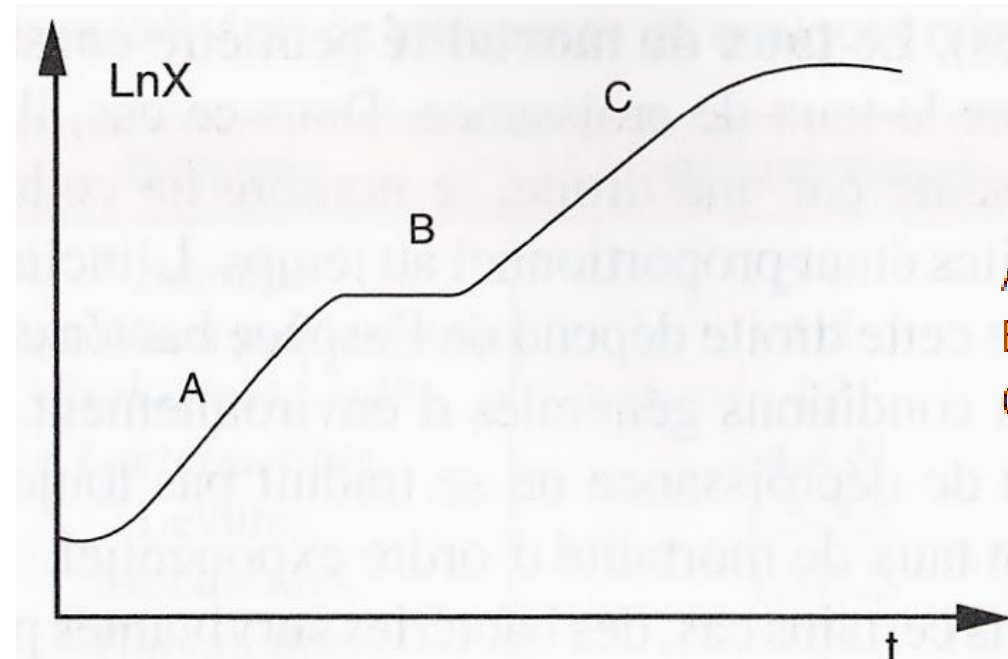
Dans certains cas, certaines cellules peuvent amorcer une nouvelle phase de multiplication aux dépens de substances libérées par la lyse : on parle alors de **croissance cryptique**.



3. Culture en milieu non renouvelé = culture en batch = culture en discontinu

3.2. Phénomène de diauxie

Le phénomène de **diauxie** s'observe dans un milieu contenant deux sources de carbone.



- A : Utilisation du fructose seul
- B : Phase d'adaptation à l'arabinose
- C : Utilisation de l'arabinose

On observe deux phases exponentielles de croissance séparées par une courte phase stationnaire qui correspondent chacune à l'utilisation d'une des deux sources de carbone.

La phase stationnaire intermédiaire correspond à l'épuisement de la première source de carbone et dure le temps nécessaire aux cellules pour produire les enzymes permettant la dégradation de la seconde source de carbone.

En général, ces enzymes ne sont pas produites pendant la première phase exponentielle parce que la première source de carbone est un inhibiteur de la synthèse de ces enzymes : on parle alors de **répression catabolique**.

3. Culture en milieu non renouvelé = culture en batch = culture en discontinu

3.3. bactériostase et bactéricidie

Une substance bactéricide est une substance tuant les bactéries.

La bactéricidie correspond à la mort des bactéries.

Une substance bactériostatique est une substance qui stoppe la croissance bactérienne.

La bactériostase correspond à l'arrêt de la multiplication des bactéries.

Remarque :

Il existe de telles substances spécifiques des mycètes (fongicides, fongistatiques).

Pour ces substances, on définit :

- **la concentration minimale inhibitrice, ou CMI :**

Concentration de la substance anti-microbienne la plus faible pour laquelle la croissance du microorganisme n'est plus visible. Il n'y a plus de croissance de la population, mais il y a 100 % de survivants.

- **La concentration minimale bactéricide, ou CMB :**

Concentration de la substance antibactérienne la plus faible permettant d'atteindre un taux de survie égal à 0,01 %, soit 1 survivant pour 10 000 bactéries.

En suivi de croissance en milieu non renouvelé on obtient les résultats suivants :

