

Université Saad DAHLAB - Blida

Département des Sciences Vétérinaires

Module Microbiologie Générale (2^e année)

Dr AKLOUL K.

CHAPITRE 3 PHYSIOLOGIE MICROBIENNE

La croissance microbienne est définie comme une augmentation des constituants cellulaires, et peut se traduire par une augmentation de taille (cas des moisissures) ou du nombre (cas des bactéries) des micro-organismes.

Les micro-organismes ont **besoin d'eau, d'une source d'énergie, d'azote, des sels minéraux, éventuellement de l'oxygène et/ou des facteurs de croissance** pour leur développement. Ainsi, les aliments se présentent comme un milieu favorable pour le développement des germes microbiens.

Le développement des micro-organismes est aussi dicté par d'autres paramètres qui sont liés aux **caractéristiques physico-chimiques de l'aliment** (pH, A_w , potentiel d'oxydoréduction...). Ces paramètres ont un effet sélectif sur la flore microbienne d'un aliment ; ils favorisent ou inhibent le développement de tels ou tels micro-organismes.

1. Besoins nutritifs

La nutrition doit être satisfaite par deux types de substances : les substances élémentaires c'est-à-dire les matériaux constitutifs de la cellule (carbonés, azotés, minéraux...) et les substances énergétiques permettant à la cellule de réaliser la synthèse de ses propres constituants.

Les microorganismes se multiplient à partir des nutriments présents dans ces milieux de culture. Ils ont tous des besoins communs (eau, source d'énergie, de carbone, d'azote et d'éléments minéraux). Beaucoup dans ces conditions peuvent croître et se multiplier. D'autres en sont incapables : un constituant essentiel indispensable à la vie cellulaire leur fait défaut. Ce constituant doit être fourni pour assurer leur développement : on l'appelle facteur de croissance.

A- Besoins énergétiques et élémentaires

a) Source d'énergie

Selon le type d'énergie utilisée, on distingue deux catégories de microorganismes :

- les phototrophes qui puisent leur énergie dans le rayonnement lumineux
- les chimiotrophes qui utilisent l'énergie de l'oxydation des produits chimiques organiques (chimioorganotrophes) ou minéraux (chimiolithotrophes).

b) Source de carbone

Le carbone constitue un des éléments les plus abondants de la bactérie ; il doit être fourni en quantité.

Les bactéries autotrophes utilisent exclusivement le dioxyde de carbone (CO₂) comme source de carbone, alors que les bactéries dites hétérotrophes utilisent le carbone de substances organiques diverses comme un alcool, l'acide acétique, l'acide lactique, des sucres divers,

c) Source d'azote

Pour synthétiser leurs protéines qui représentent 10 % de leur poids sec, les microorganismes ont besoin de substances azotées.

L'azote est assimilé sous sa forme la plus simple c-à-d l'azote moléculaire.

Des composés inorganiques (nitrites, nitrates, ammoniac, sels d'ammonium) ou organiques (groupements amines des composés organiques) peuvent être utilisés.

d) Source de soufre et de phosphore

Le soufre est présent dans certains acides aminés et donc dans les protéines sous forme de groupements thiol (-SH) Le phosphore fait partie des acides nucléiques, de nombreux coenzymes et de l'ATP.

e) Autres éléments minéraux

Les autres éléments nécessaires à la vie bactérienne sont les ions comme le sodium, le potassium, le magnésium, le chlore ; divers oligo-éléments comme le manganèse, le nickel, le zinc, le sélénium, ... ;

Eléments Chimiques	Exemples d'utilisation
Carbone	<ul style="list-style-type: none">• Constituant de toute molécule organique• Synthèse des glucides pour les autotrophes• Métabolisme énergétique (respiration ou fermentation) pour les hétérotrophes
Hydrogène	<ul style="list-style-type: none">• Constituant de toute molécule organique• Agent de diverses réactions de réduction
Oxygène	<ul style="list-style-type: none">• Produit terminal des réactions photosynthétiques pour les autotrophes• Accepteur d'électrons des réactions du métabolisme énergétique chez les hétérotrophes aérobies
Phosphore	<ul style="list-style-type: none">• Synthèse des acides nucléiques• Coenzyme des transporteurs d'hydrogène• Composés énergétiques de transfert (ATP)
Azote	<ul style="list-style-type: none">• Synthèse des acides nucléiques• Synthèse des protéines• Oxydé sous forme de nitrates au cours de la nitrification avant d'être assimilable
Soufre	<ul style="list-style-type: none">• Source d'énergie SH₂ pour quelques chimiotrophes• Accepteur d'électrons dans les chaînes respiratoires anaérobies• Biosynthèse des acides aminés soufrés
Magnésium	<ul style="list-style-type: none">• Métabolisme de l'ATP• Élément capital de la molécule de chlorophylle
Fer	<ul style="list-style-type: none">• Transporteur d'électrons dans les cytochromes de la chaîne respiratoire aérobie
Calcium	<ul style="list-style-type: none">• Associé à l'acide dipicolinique, constituant majeur de l'enveloppe des endospores

Rôles de certains éléments chimiques chez la cellule bactérienne

B- Besoins spécifiques – Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des substances organiques indispensables à la croissance et que la bactérie est incapable de synthétiser.

Les microorganismes prototrophes ne nécessitent pas de facteurs de croissance, les éléments habituels déjà cités leur suffisent, alors que les auxotrophes les exigent.

Les facteurs de croissance englobent trois catégories de substances :

- Acides aminés (nécessaires pour l'élaboration des protéines cellulaires)
Ex : Acide glutamique, alanine
- Bases puriques et pyrimidiques (entrant notamment dans la composition des acides nucléiques et de l'ATP) Ex : adénine pour certains Lactobacillus, uracile pour certains Streptococcus
- Vitamines : petites molécules organiques servant de coenzymes ou de précurseurs de coenzymes. Ex : nicotinamide pour Proteus vulgaris et certaines souches de Staphylococcus aureus, thiamine (vit B1) pour certaines souches de Staphylococcus aureus.

Tableau – Principaux facteurs de croissance microbiens.

Facteurs de croissance		Fonction ou coenzyme	Organismes auxotrophes
Bases puriques ou pyrimidiques	Adénine	constituants des ac. nucléiques	<i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i>
	Guanine		
	Uracile Thymine		
Acides aminés	Acide glutamique	constituants des protéines	<i>L. arabinosus</i>
	Lysine		
	Arginine		<i>S. typhi</i>
	Tryptophane Tyrosine		
Vitamines	B ₁ - Thiamine	cocarboxylase (TPP)	<i>St. aureus</i> <i>L. fermenti</i>
	B ₂ - Riboflavine	FMN, FAD	<i>L. casei</i> <i>Str. hemolyticus</i> <i>Cl. tetani</i>
	B ₅ - Acide pantothénique	coenzyme A	<i>Lactobacillus</i> <i>Pr. morgani</i> <i>Zymomonas mobilis</i>
	B ₆ - Pyridoxal	pyridoxal-phosphate	<i>L. casei</i> <i>Str. faecalis</i>
	B ₁₂ - Cobalamines		<i>L. lactis</i> <i>L. lichmanii</i> <i>Euglena gracilis</i> <i>Ochromonas sp.</i>
	PP - nicotinamide	pyridine-nucléotides	<i>Y. pestis</i>

Facteurs de croissance		Fonction ou coenzyme	Organismes auxotrophes
Vitamines	Acide nicotinique	pyridine-nucléotides	<i>Pr. vulgaris</i> <i>L. arabinosus</i>
	Acide pimélique	biotine	<i>Alphtheriae</i>
	Acide folique	formylations	<i>Easei</i> <i>Stecallis</i>
	Acide para-amino-benzoïque	acide folique	<i>Cl. acetobutylicum</i> <i>Cl. tetanomorphum</i> <i>Acetobacter suboxydans</i>
	Acide lipoiq	transporteur d'électrons	<i>L. casei</i> <i>L. delbrückii</i> <i>Cl. tetani</i>
	Biotine	« coenzyme R » (carboxylations)	<i>L. arabinosus</i> <i>Rhizobium trifolii</i> Streptocoques <i>Sc. cerevisiae</i> et autres levures
	Choline	synthèse des phospholipides	Pneumocoque type III
	Hème (facteur «X »)	synthèse des hémoprotéines	<i>H. influenzae</i> <i>H. canis</i>
	K ₃ - Ménadiol	transporteur d'électrons	<i>M. paratuberculosis</i>

Un facteur de croissance nécessaire à une souche microbienne peut donc être secrété dans un milieu par une autre souche, c'est le phénomène de syntrophisme

On définit la Syntrophie comme une interaction métabolique entre 2 espèces microbiennes, l'une des 2 espèces fournissant un facteur de croissance donné (ou autre nutriment) à une autre espèce.

C- Facteurs physiques

Plusieurs facteurs environnementaux vont conditionner la croissance bactérienne :

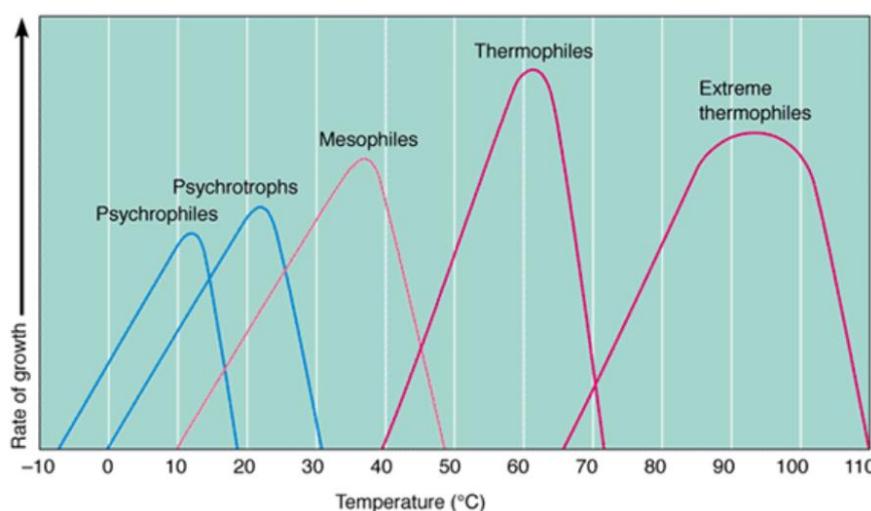
a) **Température** Chaque micro-organisme a un domaine de température optimale favorisant son développement. En fonction de leur température optimale de croissance, on classe les micro-organismes en plusieurs groupes dont les noms reflètent les divers domaines de tolérance thermique.

- **Psychrophiles et psychrotrophes** Les **psychrophiles** (ex : *Listeria monocytogenes*) sont des micro-organismes qui se développent à des températures allant de **0 à 20°C avec un optimum à 15°C**. Ce sont des micro-organismes adaptés au froid. Les micro-organismes appartenant au groupe des **psychrotrophes** sont capables de se développer de **0 à 35°C avec un optimum de croissance de 20 à 35°C**. C'est un groupe intermédiaire entre les psychrophiles et les mésophiles, et il est responsable des altérations microbiennes des aliments réfrigérés.

Le groupe des psychrotrophes est représenté par des nombreuses bactéries dont les principaux genres sont *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Erwinia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus* et *Streptomyces*. Notons aussi que les levures et moisissures sont pour la plupart psychrotrophes.

- **Mésophiles** Se multiplient à des températures allant de **20 à 40°C avec un optimum à 37°C**. On les retrouve sur les aliments conservés à température ambiante ou dans les aliments réfrigérés lorsque la chaîne du froid a été rompue. Ce sont des espèces communes et des espèces pathogènes pour l'homme et l'animal ; ils sont pour la plupart des saprophytes naturels. (Ex : *Escherichia coli*, *Salmonelles*, *Staphylocoques*, *Campylobacter*...)

c) **Thermophiles** Les **thermophiles** sont les micro-organismes qui se développent dans des températures allant de **40 à 65°C avec un optimum à 55°C**. On les retrouve dans le sol, l'eau et même dans les sources thermales. En milieux alimentaires, ils sont représentés surtout dans les genres bactéries *Bacillus* et *Clostridium* et certaines moisissures *Aspergillus*, *Cladosporium*.



b) Le pH

Les micro-organismes peuvent se développer sur une large gamme de pH allant de 2 à 11. En fonction de leur pH optimum de croissance, on classe des micro-organismes en 3 groupes :

- Acidophiles : pH optimum de croissance entre 0 et 5,5 (ex : Lactobacillus)
- Neutrophiles : entre 5,5 et 8 (ex : E.coli)
- Alcalophiles : entre 8 et 11,5 (ex : Pseudomonas)

Les bactéries, d'une manière générale, se développent mieux sur des milieux dont le pH est proche de la neutralité (6 à 7,5). Certaines bactéries, comme les bactéries lactiques et les bactéries acétiques, peuvent se développer même à des pH < 4.

Les levures et les moisissures sont généralement acido-résistants ; leur pH optimum de croissance se situe entre 4 et 6 avec des valeurs extrêmes de 2 à 9 pour les levures et de 2 à 11 pour les moisissures.

Micro-organismes	pH min	pH optimum	pH max
Bactéries	4,5	6,5 à 7,5	9
Bactéries acétiques	4	5,4 à 6,3	9,2
<i>Bactéries lactiques</i>	3,2	5,5 à 6,5	10,5
<i>Pseudomonas</i>	5,6	6,6 à 7	8
<i>Entérobactéries</i>	5,6	6,5 à 7,5	9
<i>S. typhi</i>	4 – 4,5	6,5 à 7,2	8 – 9,6
<i>E. coli</i>	4,3	6 à 8	9
<i>Staphylococcus</i>	4,2	6,8 à 7,5	9,3
<i>Clostridium</i>	4,6 – 5		9
<i>C. botulinum</i>	4,8		8,2
<i>C. perfringens</i>	5,5	6 à 7,6	9,4 – 10
<i>Bacillus</i>	5 – 6	6,8 à 7,5	9,4 – 10
Levures	1,5 – 3,5	4 à 6,5	8 – 8,5
Moisissures	1,5 – 3,5	4,5 à 6,8	8 – 11

c) Exigences gazeuses (surtout vis-à-vis de l'oxygène)

On distingue :

1. Les bactéries **aérobies strictes** (*Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*) : nécessitant une teneur en oxygène moléculaire suffisante pour pouvoir se multiplier,
2. Les bactéries **micro-aérophiles** (*Lactobacillus*, *Campylobacter*) se développant uniquement lorsque la teneur en oxygène moléculaire est réduite,
3. Les bactéries **aéro-anaérobies facultatives** (exemple : *Escherichia coli*) dont la croissance n'est pas affectée par la concentration en oxygène moléculaire,
4. Les bactéries **anaérobies strictes** ne se développant qu'en absence d'oxygène (exemple : *Clostridium*).

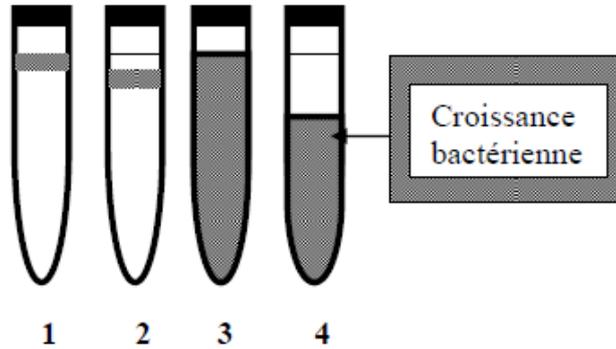


Figure Représentation schématique des différents modes respiratoires dans le monde bactérien.

d) Activité de l'eau (Activity Water)

L'activité de l'eau (A_w) indique la disponibilité de l'eau d'un milieu pour des réactions biochimiques. Elle correspond au rapport entre la pression de vapeur d'eau de l'aliment (pression de vapeur d'eau à la surface du produit) et la pression de vapeur de l'eau pure à la même température.

Les bactéries ne peuvent se développer sur les produits alimentaires ayant une A_w inférieur à 0,90. Les moisissures et les levures sont inhibées respectivement vers une A_w de 0,7 et 0,8 sauf certaines moisissures et levures osmophiles qui peuvent se développer jusqu'à des A_w de 0,6.

Micro-organismes	A_w
Bactéries	0,91
Clostridium botulinum E	0,97
<i>C. botulinum A, B</i>	0,95
<i>C. perfringens</i>	0,97
<i>Escherichia coli</i>	0,95
<i>Salmonella sp</i>	0,95
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86
Bactéries halophiles	0,75
Levures	0,87
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,9 – 0,94
Levures osmophiles	0,62
Moisissures	0,7
Fusarium	0,9
<i>Mucor</i>	0,8 – 0,9
<i>Aspergillus clavatus</i>	0,85
<i>Aspergillus flavus</i>	0,78
<i>Penicillium expansum</i>	0,85
Moisissures xérophiles	0,7

Les produits alimentaires frais (fruits, légumes, viandes...) ont généralement une A_w de 0,97 à 0,99. Ils sont donc un milieu favorable pour le développement de tous les micro-organismes. Sur les produits alimentaires ayant une faible A_w , comme le pain et pâtisseries, on constate généralement le développement des moisissures.

Sur les préparations très salées (anchois salés, ...), on peut assister au développement des bactéries halophiles (halobacterium, halococcus). Ces dernières se développent même à des A_w de 0,75 et exigent des concentrations en NaCl de 12 à 15%.

Dans un aliment, une A_w de 0,7 est considérée comme une limite inférieure présentant toutes les garanties de stabilité microbienne

2. Croissance bactérienne

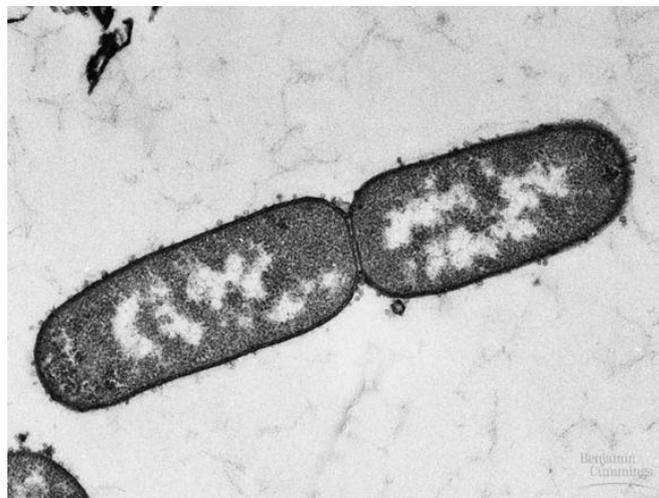
La croissance bactérienne est un accroissement ordonné et coordonné de tous les composants de la bactérie. Le nombre de bactéries augmente entraînant un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et un enrichissement du milieu en sous-produits du métabolisme.

Les bactéries sont des organismes asexués dont la reproduction a lieu par division cellulaire ou **reproduction binaire** encore appelée **scissiparité**.

La reproduction se fait selon trois phases :

- Allongement de la bactérie,
- Duplication des constituants,
- Séparation (septum transversal de division)

Une bactérie mère va donc engendrer deux bactéries filles identiques qui pourront à leur tour se diviser par scissiparité. L'ensemble des bactéries issues d'une même cellule mère formera une colonie bactérienne



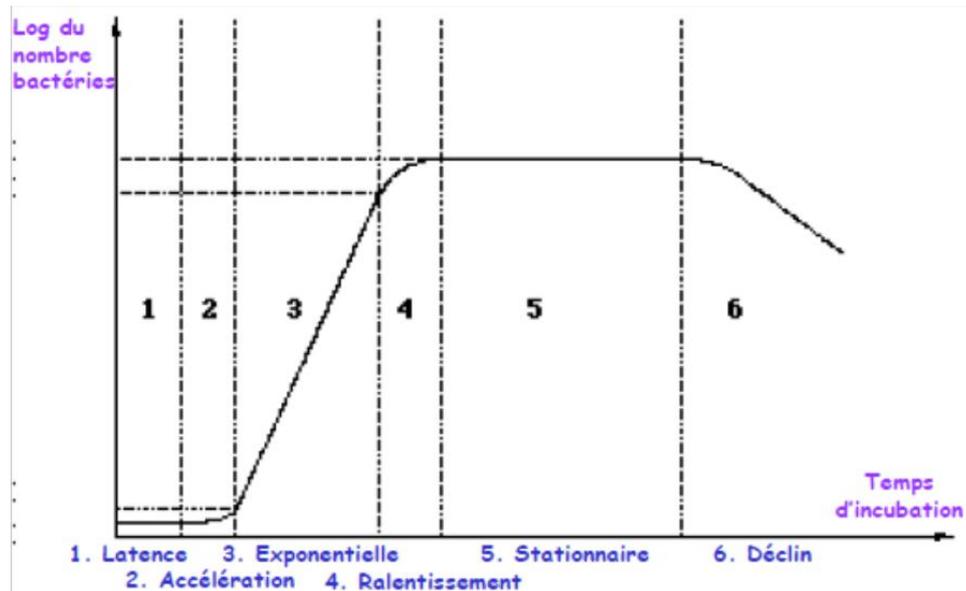
a) **Constantes de la croissance**

Temps de Génération G = Temps que met une bactérie mère pour se dédoubler en deux bactéries filles ou temps nécessaire au dédoublement de la population

Taux de Croissance r = Nombre de générations par unité de temps. Soit Δt la durée pendant laquelle la bactérie se multiplie n fois : $r = n / \Delta t = 1 / G$

b) Dynamique de la croissance bactérienne

La croissance bactérienne est un phénomène dynamique qui comporte six phases représentées schématiquement dans la figure suivante.



- Phase 1 : **phase de latence** : la croissance est nulle, il y a accoutumance des bactéries à l'environnement (phase d'adaptation).
- Phase 2 : **phase d'accélération** avec augmentation de la vitesse de croissance,
- Phase 3 : **phase de croissance exponentielle** durant laquelle le taux de croissance est maximal,
- Phase 4 : **phase de ralentissement** : la vitesse de croissance diminue, il y a épuisement des nutriments du milieu de culture et accumulation des déchets,
- Phase 5 : **phase stationnaire** : il y a un arrêt de la reproduction due à un facteur limitant dans l'environnement, le taux de croissance est nul et le taux de division égale le taux d'autolyse,
- Phase 6 : **phase de déclin** : les ressources sont épuisées et le nombre de bactéries diminue.

Remarque : On observe parfois un redémarrage de la multiplication bactérienne pendant un temps très court lors de la phase de déclin, c'est la croissance cryptique. Cette phase est présente quand les bactéries exploitent les substances nutritives libérées par les cadavres des bactéries dans la colonie.

c) Mesure de croissance

Il existe différentes méthodes de mesure de la croissance microbienne.

c.1. Mesure du nombre de cellules :

- Numération directe au microscope optique :

La méthode est utilisée couramment pour les microbes de grandes tailles. Pour cela, on utilise un hématimètre (cellule de Thoma, deMalassez)

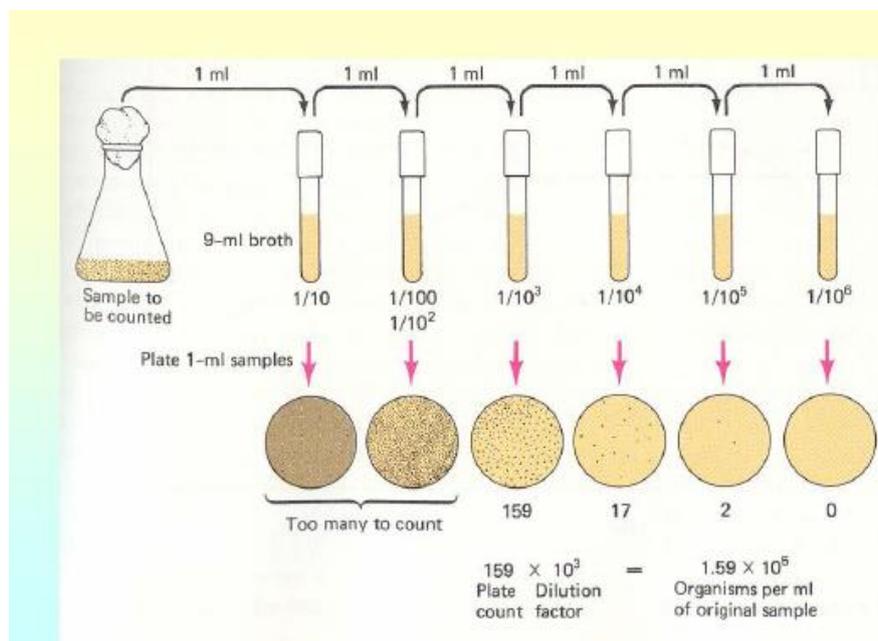
- Numération au microscope optique à épi fluorescence :

Il détecte la fluorescence des cellules qui sont marquées par un fluorochrome.

L'acridine orange se fixe à l'ADN :

Lorsque l'ADN est sous forme double brin : fluorescence verte, s'il est sous forme de simple brin : fluorescence orange.

- Dénombrement après culture



c2. Mesure de la masse

- Détermination du poids sec

Les micro-organismes sont récoltés par centrifugation ou par filtration sur membrane.

Après lavage soigneux à l'aide d'un tampon approprié, le culot, ou le filtre, est desséchée à environ 100°C. On laisse refroidir à température ambiante puis les micro-organismes sont pesés. On exprime le résultat en gramme de matière sèche par litre.

- **Mesure du trouble** (C'est la turbidimétrie, procédé simple, rapide et actuellement qui permet d'évaluer la concentration cellulaire en utilisant un spectrophotomètre à 650 nm.

Plus il y a de micro-organismes, plus la lumière est réfléchiée et plus l'intensité du faisceau restant est faible, plus la valeur d'absorbance est grande.

c3 Mesure de l'activité cellulaire :

- Mesure de la consommation de substrat :

La quantité de substrat consommé dans un milieu pendant un temps donné va refléter la quantité de germes présents.

- Mesure des variations physico-chimiques du milieu :

Les variations physico-chimiques du milieu traduisent une évolution de la croissance.

d) Milieux de culture

On distingue également les milieux de culture selon leur fonction :

- les **milieux d'isolement** permettant la croissance de plusieurs espèces bactériennes,
- les **milieux d'enrichissement** permettant de favoriser la croissance d'une espèce en faible quantité dans un échantillon,
- les **milieux enrichis** permettant la croissance des bactéries exigeantes,
- les **milieux sélectifs** favorisant la croissance d'un type bactérien particulier tout en inhibant celle des autres types bactériens (exemple des milieux sélectifs pour les bactéries à Gram positif contenant des antibiotiques inhibiteurs des bactéries à Gram négatif).

Ces milieux peuvent se présenter sous forme **liquide** : bouillons de culture en tubes ou en flacons (exemple des flacons d'hémoculture). La croissance bactérienne peut alors être objectivée par un trouble du bouillon après incubation de 2 à 15 jours à 37° C le plus souvent. Les **milieux solides** sont le plus souvent des milieux gélosés en boîte de Pétri. Après incubation de 24 à 72 heures à 37° C, la croissance bactérienne est objectivée par la mise en évidence de colonies bactériennes à la surface du milieu gélosé.

