

Figure 22 : différents constituants de la cellule bactérienne (Gram positive et Gram négative)

3 Principes de la taxonomie chez les bactéries :

3.1 Introduction

La taxonomie est la science des lois de la classification. C'est au 18^{ème} siècle que Linné a proposé pour la première fois les principes d'une classification dite *Naturelle* pour les

organismes du monde animal et végétal. Puis au 19^{ème} Ernest Haeckel classa selon les principes de Linné en troisième règne les protistes. Ses principes veulent que tout individu doive appartenir à une espèce, toute espèce à un genre.....etc. et c'est l'espèce qui détermine la base de la construction.

La science des règles de la classification s'appelle **taxonomie ou taxinomie** (du grec "taxis" = arrangement). La taxinomie permet de nommer les organismes vivants (**la nomenclature**) et de les classer en unités (**taxons**), au sein desquels, ils partagent un grand nombre de caractéristiques communes.

En microbiologie, cela nous permet d'identifier (**l'identification**) les micro-organismes pour mieux les utiliser ou les exploiter (ceux qui sont bénéfiques) ou bien pour mieux s'en protéger et de les contrôler (ceux qui sont pathogènes).

3.2 Classification naturelle

Arrange les organismes en groupes dont les membres ont en commun de nombreuses caractéristiques. Reflète autant que possible la nature biologique des organismes.

Deux méthodes principales de construction :

3.2.1 Caractères phénétiques

Depuis la classification proposée par Cohn en 1872 et jusqu'au début des années soixante, toute la taxonomie bactérienne reposait sur une classification phénétique.

La classification phénétique (ou phénotypique) utilise un nombre de caractères considérés comme importants, ce sont les caractères anatomiques et physiologiques à savoir :

- Aspect morphologique : forme, dimension, présence ou non de capsule, flagelle....
- Aspect structural : présence mucopeptide, de paroi.....
- Aspect tinctoriaux : toutes les types de coloration (Gram, simple...)
- Type trophique : aérobie, phototrophe....etc.
- Métabolismes : glucidique, protidique....

3.2.2 Caractères génétiques

L'information génétique de la bactérie est portée par des *génophores nucléaires* et *plasmidiques* que nous désignons sous le nom de génome. Ces dernières années la classification des bactéries est basée sur la structure de l'ADN qui s'exprime par le *coefficient de Chargaff* qui représente le pourcentage de Guanine et Cytosine en mole dans la molécule d'ADN.

Les critères sont recherchés :

- ✚ La taille du génome.
- ✚ La composition des bases d'ADN sous la forme de pourcentage de G+C (GC%).
- ✚ Le taux d'hybridation ADN/ADN.
- ✚ La séquence de l'ADN qui code pour l'ARN ribosomal 16 S.

a. La taille du génome

Selon les espèces la taille du génome est variable.

b. Composition en base d'ADN (Coefficient de Chargaff) :

Quel que soit l'espèce d'origine, l'ADN contient toujours autant de purine que de pyrimidine soit :

$$(A + G) = (C + T) \text{ ou } (A+G) / (C+T) = 1$$

De plus, il y a autant de thymine que d'adénine $A/T = 1$, autant de guanine que de cytosine $G/C = 1$

Par contre, le rapport $(A+T)/(C+G)$ varie beaucoup : **il est caractéristique de l'espèce.**

Ce coefficient est appelé coefficient de Chargaff. Il peut être calculer suite à un séquençage par la formule suivante $((G+C)/(A+T+G+C)) \times 100$.

-2 bactéries appartenant à la même espèce auront des GC% identiques.

- 2 bactéries dont les GC% diffèrent de plus de 5% appartiennent à des espèces différentes.

- 2 bactéries ayant des GC% identiques n'appartiennent pas forcément à la même espèce (les séquences de bases peuvent être très différentes).

3.3 Classification des bactéries

La classification est la méthode qui permet de classer des objets ou des organismes en groupes apparentés sur la base de critères divers. Les bactéries sont classées et identifiées pour distinguer un organisme d'un autre et de regrouper des organismes similaires selon des critères d'intérêt pour des microbiologistes ou d'autres scientifiques. Le niveau le plus important de ce type de la classification est le niveau de l'espèce. Les unités fondamentales de la classification des bactéries sont *l'espèce* et le *genre*. Nous utiliserons aussi les noms de *souche* pour désigner une culture pure obtenue par isolement d'une seule et même cellule ou d'une colonie. Les espèces typiques sont des espèces bactériennes qui ont des caractères phénétiques et génétiques bien déterminé (collection).

3.3.1 Classification artificielle :

Elle est basée sur une clé qui regroupe un ensemble de bactéries partagent une même propriété phénétique (physiologique ou métabolique) aisément reconnaissable par présence (+) ou absence (-). Cela peut être : la production d'un pigment particulier, une activité enzymatique spécifique... Ce type de taxonomie a un grand intérêt pratique, mais il peut réunir des bactéries par ailleurs très hétérogènes et même génétiquement non apparentées. Le nom du micro-organisme est obtenu par choix successifs dans une base de données en fonction des caractères testés, généralement dans un ordre hiérarchique.

- **Classification de Bergy**

Cette classification est la plus acceptée par tous les microbiologistes. Dans ces premières éditions, en 1936, le « Bergy's manuel of systematic bacteriology », qui a pour objectif initial le regroupement des espèces bactérienne connues de manière facilité l'identification d'organismes inconnus. Dans sa dernière version (1984), le mode de classification retenu est phénétiques et basé sur la détermination des caractères simples tel que : coloration de Gram, réaction avec l'Oxygène, mobilité, sporulation, source d'énergie et de nutriments. La dernière classification de *Bergy* classe les bactéries dans la Classe des Schizomycètes qui se divise en dix ordres puis en familles en tribus en genres et enfin en espèces (10 O.F.T.G.sp).

La classification s'effectue selon :

- ✓ **Leur morphologie macroscopique** (taille, forme, couleur... des colonies sur milieux de culture gélosés)
- ✓ **Leur morphologie microscopique** (bactérie de type coque, bacille, vibrion ; isolés, par deux, en chaînettes...)
- ✓ **Leur mobilité** (mobilité ou immobilité à une température donnée)
- ✓ **La présence de spores** (à l'état frais ou après coloration)
- ✓ **Résultat de la coloration de Gram** (coloration de Gram positive ou négative)
- ✓ **La température de croissance** (4° C, 20° C, 30° C, 37° C...)
- ✓ **Type respiratoire** (aérobie, anaérobie strict, aéro-anaérobie facultatif, microaérophile..).
- ✓ **Besoins nutritionnels** (nécessité de substances particulière pour le développement).

- ✓ **La capacité à utiliser certaines sources de carbone ou d'azote** (on parlera de biotypes ou biovars).

3.4 Nomenclature :

La nomenclature est l'ensemble des règles qui président à l'attribution d'un nom à chaque taxon. Elle désigne, selon des règles par convention, l'espèce par le système de Linné, qui fut la première nomenclature méthodique à être proposée. Ce système a été publié au 18^{ème} siècle dans le domaine de la botanique, il a été appliqué par la suite à la désignation de l'ensemble des espèces biologique dont les microorganismes. C'est un système binominal qui désigne donc l'espèce par deux noms latin : en premier le nom de genre dont seule la première lettre est écrite en majuscule, suivi par l'espèce, le tous souligné ou écrit en caractère italique.

Exemples:

Rangs taxonomique (Taxons)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Règne	Bacteria	Bacteria
Division (Embranchement)	Proteobacteria	Firmicutes
Classe	Gamma Proteobacteria	Bacilli
Ordre	Enterobacteriale	bacillales
Famille	Enterobacteriaceae	staphylococcaceae
Genre	<i>Escherichia</i>	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>coli</i>	<i>auresu</i>
Nom binomial	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

3.5 Les différentes formes des bactéries

3.5.1 Formes des cellules bactériennes : les bactéries sont des organismes unicellulaires de formes variées.

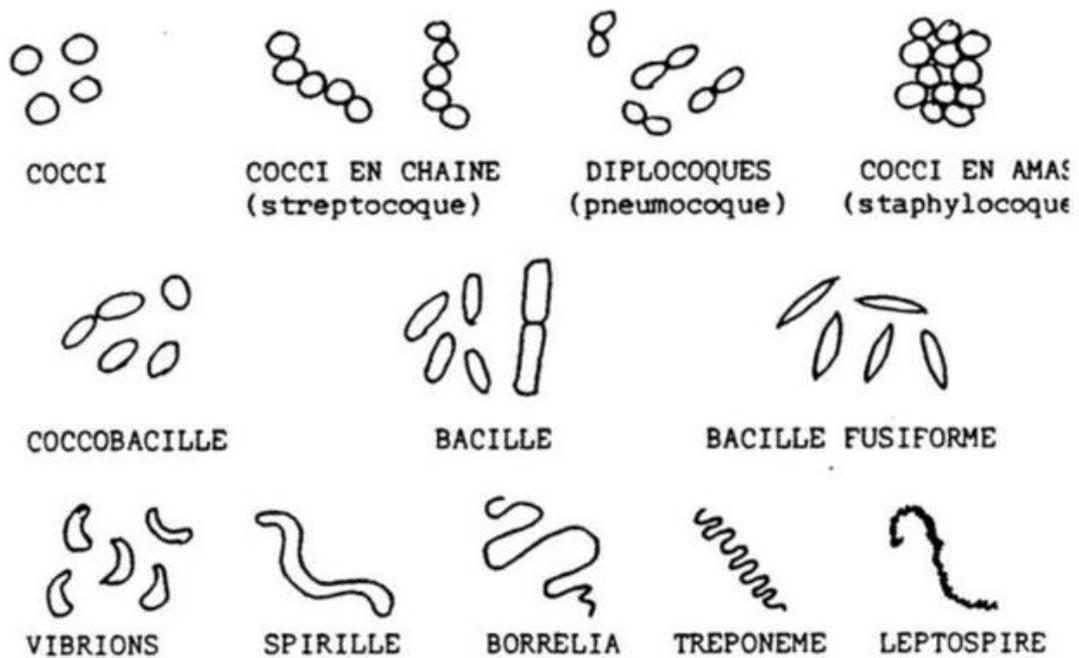
- bactéries de forme arrondies ou cocci, isolées, en chaînette, en amas (nombre variable de cellules) : Staphylocoques, Streptocoques ...
- bactéries de forme allongée ou bacille, isolés, en chaînette ou amas, de longueur et diamètre variables : *E.coli*, *Salmonella*, *Bacillus* etc...
- bactéries de forme spiralée, spirilles, spirochètes, comme *Treponema*.
- un groupe particulier de bactéries de forme filamenteuse se rapprochant des moisissures : les Actinomycètes.

3.5.2 Taille :

Les bactéries les plus petites ont une taille d'environ 0,2 μm (Chlamydia) et les plus longues certains Spirochètes peuvent atteindre 250 μm de long. En moyenne la taille se situe entre 1 et 10 μm .

3.5.3 Associations cellulaires :

Une espèce bactérienne peut apparaître sous forme de cellules isolées séparées ou en groupements caractéristiques variables selon les espèces : **association par paires, en amas réguliers, en chaînette, par quatre (tétrades)**.



Bacterial Morphologies	Example
	<i>Escherichia</i>
	<i>Corynebacterium</i>
	<i>Actinomyces</i>
	<i>Vibrio</i>
	<i>Bacillus</i>
	<i>Spirochaeta</i>
	<i>Staphylococcus</i>

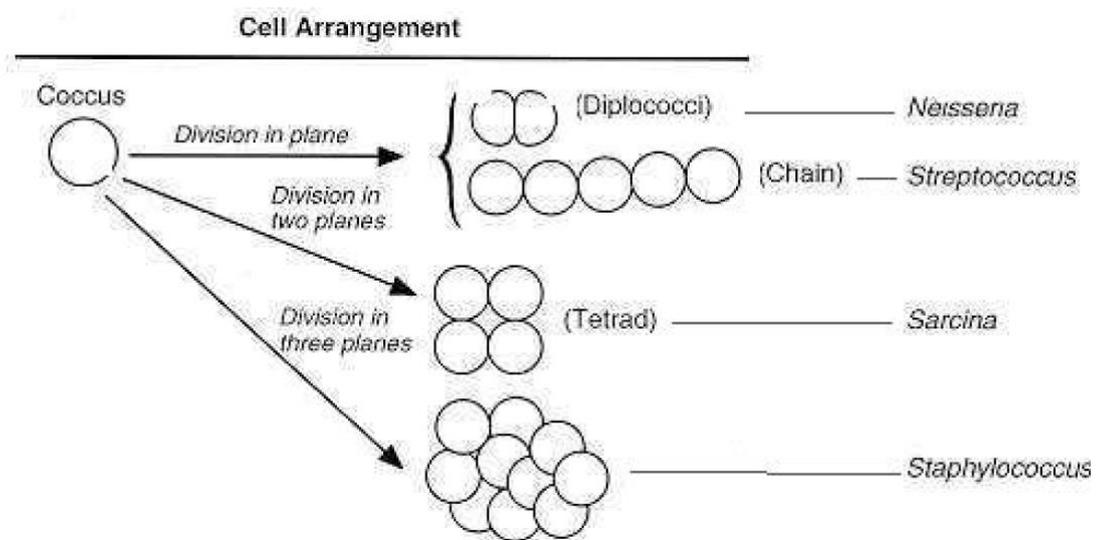


Figure 23 : différentes formes et associations des bactéries

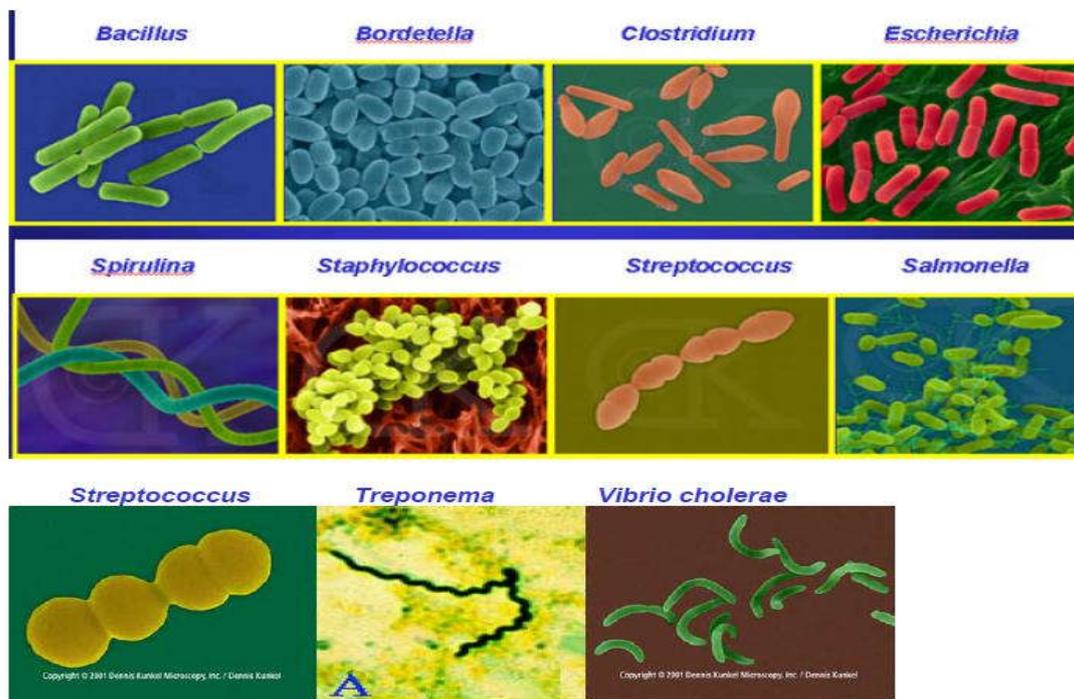


Figure 13 : quelques exemples des bactéries

4 Nutrition Bactérienne

4.1 Introduction : Selon les conditions environnementales, une bactérie existe sous deux états principaux : (i) l'état végétatif durant lequel sont assurées des biosynthèses équilibrées permettant une croissance plus ou moins rapide et (ii) l'état de repos caractérisé par un minimum d'échange avec le milieu extérieur et par une survie sans multiplication. La bactérie croît et se divise en quelque vingt minutes pour donner naissance à deux bactéries filles qui hériteront de la cellule mère, le même potentiel d'activité, pour assurer sa croissance ou sa survie, une bactérie doit trouver dans son environnement de quoi satisfaire ses besoins nutritifs : substances énergétiques permettant à la cellule de réaliser la synthèse de ses constituants et substances élémentaires ou matériaux constitutifs de la cellule les mêmes structures complexes. On classe les besoins nutritifs en 3 grande catégorie : -Besoin constitutif élémentaires. -Besoins énergiques, - Besoin constitutif spécifique.

4.2 L'eau

L'eau représente 70% à 80% du poids cellulaire total. Elle solubilise les nutriments, en assurant leur transport et en assurant les réactions d'hydrolyse, ainsi c'est le solvant de la vie, où se déroulent toutes les réactions métaboliques (catabolisme plus anabolisme).

Un paramètre appelé « activity of water », a_w , ou activité de l'eau) quantifie la disponibilité de l'eau libre, non associée aux nutriments. Elle varie de 0 à 1. On note que dans un nutriment,

une partie de l'eau est plus ou moins liée aux composants (sels, protéines) et elle n'est pas disponible pour les micro-organismes qui ont besoin d'eau libre pour se développer. Certains germes ne se développent que pour une valeur de l' A_w supérieure à 0,97. C'est le cas des *Acinetobacter* spp. ($A_w > 0,99$) ou de *Clostridium botulinum* ($A_w > 0,97$). Les *Salmonella* spp. ou *Escherichia coli* commencent à se multiplier pour une valeur de l' A_w supérieure à 0,95. *Staphylococcus aureus* se multiplie à partir de 0,85 mais la production éventuelle de toxines n'est possible que pour des valeurs supérieures à 0,97. *Listeria monocytogenes* peut supporter une valeur de l' A_w de 0,83 et les bactéries halophiles une valeur de 0,75.

NB : Les endospores peuvent survivre dans un environnement dépourvu d'eau libre.

4.3 Besoin constitutif élémentaire

Ces éléments se divisent en deux : (i) des macroéléments et qui représentent 95% du poids sec bactérien et qui regroupent des éléments majeurs (g/l) qui sont nécessaires en quantité plutôt élevée et qui correspondent au 6^{ème} élément : C, H, O, N, S, P ; Correspondent aux éléments qui rentrent dans la constitution des lipides, acides nucléiques, glucides et protéines, et Eléments mineurs (mg/l) : K, Ca, Mg et Fe ; apparaissent sous la forme de cation dans l'équilibre physico-chimique de la cellule Catalysent souvent des activités enzymatiques. (ii) Micro éléments (g/l) : petites quantités, correspondent aux oligoéléments : Manganèse (Mn) Zinc (Zn), Cobalt (Co), Molybdate (Mo), Nickel (Ni), Cuivre (Cu), (Rôle catalysent des activités enzymatiques).

4.3.1 Source de carbone

Le carbone est un élément très abondant dans la cellule bactérienne et il doit être fourni en grande quantité. Selon la source de carbone on va trouver : des bactéries capables de se développer sur un milieu inorganique contenant du CO_2 comme seule source de carbone (**bactérie autotrophe**) les autres, exigeant au contraire des composés organiques pour se développer et se reproduire sont habituellement nommés **bactéries hétérotrophes**.

- **Carbone minérale (CO_2)** : provient de la respiration, d'éruption volcanique ; utilisent ensuite comme source H_2O et O_2 : **Bactérie autotrophe**, exp : *Anabaena*

- **Carbone organique** : dans des macromolécules tels les glucides, (Macromolécules source d'hydrogène et d'oxygène), très riche en enzymes, ces bactéries savent faire la glycolyse, enzyme très importante pour dégrader la matière organique : **Bactérie hétérotrophe**, exp : *Pseudomonas*, *Rhizobium leguminosarum*.

Remarque : certaines bactéries peuvent être parfois hétérotrophe, parfois autotrophe (appelée autotrophe facultatif), car peuvent vivre dans différents milieux. (exp : les cyanobactéries)

doivent couler en hiver pour survivre et se met au fond de l'eau et devenir Hétérotrophe, en été remonte et redevienne autotrophe).

4.3.2 Source d'azote

Pour synthétiser leurs protéines qui représentent environ 10% de leur poids sec, les bactéries ont toujours besoin de substances azotées. Rare sont les bactéries qui peuvent fixer l'azote sous sa forme moléculaire (azote atmosphérique) : cas des *Rhizobium* qui vivent en symbiose avec les légumineuses, les *Azobacter* et certains *Clostridium*. Au contraire d'autres *Nitrosomonas* et sels d'ammonium. Mais cette source d'azote peut être enfin organique, comme les groupements aminés qui peuvent être incorporé par transamination.

-Pour la majorité des bactéries la source d'azote est constituée par d'autres composés inorganiques (ammoniac, sels d'ammonium, nitrites, nitrates) ou par des sources organiques (groupements amines des composés organiques).

- NO_2^- : chez *Nitrobacter*
- NO_3^- : chez de nombreuses espèces
- Ammoniaque ou sel d'ammonium en solution
- **Azote organique** (acides aminés) : incorporation de NH_3 après désamination ou du radical NH_2 après transamination.
- **La nitrification** = correspond à la transformation des ions ammonium (NH_4^+) en ions nitrate (NO_3^-), comprend 2 étapes réalisées par des bactéries : nitrosation et nitratisation

4.3.3 Soufre et Phosphore

Le soufre nécessaire principalement pour la synthèse de certains acides aminés, Par exemple la méthionine, la cystéine. Les bactéries utilisent surtout le soufre sous la forme de sulfate (SO_4^{2-}). Quelques rares bactéries prélèvent le soufre dans des molécules organiques, ce souvent des bactéries qui servent pour faire des co-enzymes. Le phosphore se trouve dans des protéines dans les phospholipides, surtout prélevé dans l'environnement sous la forme de phosphate.

Si une bactérie se trouve dans un environnement sans phosphate prend du phosphore dans des molécules organiques, toujours de la même façon grâce à l'enzyme phosphatase alcaline

4.3.4 Autres éléments minéraux

Un grand nombre d'éléments chimiques jouent un rôle dans l'équilibre physico-chimique de la cellule, ce sont : le sodium, le potassium, le magnésium et le chlore. D'autre font partie constituante d'enzyme ou de coenzyme : le fer des cytochromes, le magnésium de la chlorophylle. On peut aussi citer d'autre élément comme le calcium, le cobalt, le cuivre, le

Manganèse, le Molybdène et le Vanadium qui jouent un rôle de cofacteurs ou d'activateurs enzymatiques. Ils sont généralement appelés Oligoéléments car ils sont généralement indispensables en quantités infimes ou de traces.

4.4 Besoins énergétiques

Plein de réaction chimique qui ont besoin d'énergie qui provienne soit de l'air lumineuse (bactérie phototrophes) soit de la chimie (bactérie chimiotrophe), apparaissent 4 sous-catégories :

4.4.1 Bactérie phototrophe : utilise la lumière comme source d'énergie et on trouve :

- a. **Photolithotrophe = photoautotrophe** : la source d'électrons est **minérale**, **exp** : les Thiiorhodaceae (bactéries pourpres sulfureuses) ou les Chlorobacteriaceae (les bactéries vertes).
- b. **Photohétérotrophe = photoorganotrophe** Souque de carbone molécule, **exp** : les bactéries pourpres non sulfureuses Athiorhodaceae

4.4.2 Bactérie chimiotrophe : puisent leurs énergies des réactions chimiques

d'oxydoréduction, on trouve :

- a. **Chimioautotrophe = chimiolithotrophe** : les composés (donneurs d'électrons) sont **inorganiques** comme H_2S , H_2 , Fe^{2+} ou NH_3 ..., **exp** : les bactéries des sources chaudes, Comme deuxième exemple, on peut citer les bactéries méthanogènes (Archeae) qui synthétisent le méthane (CH_4) à partir de CO_2 .
- b. **Chimioorganotrophe = Chimioheterotrophe** : Les plus abondantes, Source organique, souvent des bacilles GRAM⁻ (*Eschenchia coli*) Gram + (*Bacillus*).

4.5 Besoin spécifiques (Facteurs de croissance)

En présence d'eau, d'une source d'énergie, d'une source de carbone, d'une source azote et d'éléments minéraux, de nombreuses bactéries sont capables de croître et elles sont qualifiées de **prototrophes**. Les bactéries **auxotrophes** nécessitent, en plus, un ou plusieurs facteurs de croissance qu'elles sont incapables de synthétiser.

Un facteur de croissance ne doit pas être confondu avec un métabolite essentiel. Les facteurs de croissance et les métabolites essentiels sont des composés organiques strictement nécessaires à la nutrition. Toutefois, un métabolite essentiel peut être synthétisé par une bactérie alors qu'un facteur de croissance doit être présent dans l'environnement car la bactérie est incapable de le synthétiser.

Exemple : prenant le cas d'*Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*, les deux ont besoin de La nicotinamide, mais *Escherichia coli* est capable le synthétisé donc est un élément essentiel, alors *Proteus vulgaris* est incapable de le synthétisé donc c'est un facteur de croissance.

Les facteurs de croissance englobent trois catégories de substances : les acides aminés, les bases puriques et pyrimidiques et les vitamines.

- ✓ Le premier de leurs caractères communs est leur action à des concentrations infimes ; elle est de l'ordre de 1 à 24 µg par litre pour les vitamines, de 10 mg par litre pour les bases puriques et de 25 mg par litre pour les acides aminés. Il est impératif de signaler que la croissance d'un microorganisme est relativement proportionnelle à la concentration en facteur de croissance.
- ✓ Le second de leurs caractères est leur étroite spécificité : On devine que les acides aminés sont des facteurs de croissance car ils sont indispensables à la synthèse des protéines ; les bases puriques et pyrimidiques font partie des acides nucléiques et sont ainsi nécessaire à leur élaboration. Les vitamines sont soit des coenzymes soit des précurseurs de coenzymes et leur absence prive les bactéries des fonctions correspondantes.

4.5.1 Syntrophie

Les métabolites essentiels peuvent être retrouvés dans le milieu extracellulaire, soit parce que ces facteurs sont excrétés par les bactéries, soit à cause de la lyse d'une certaine proportion de cellules. Ce phénomène explique que, des bactéries ayant des **exigences nutritives différentes puissent cultiver quand elles sontensemencées ensemble dans un milieu sans facteur de croissance**. Exemple : si on ensemence une gélose trypticase soja avec un mélange de *Haemophilus parainfluenzae* et *Staphylococcus aureus*, on remarque que les colonies de *H. parainfluenzae* ont cultivé à proximité de celles de *S.aureus* (*S. aureus* produit du NAD⁺), le NAD⁺ est un éléments essentiels pour *S.aureus* et un facteur de croissance pour *H. parainfluenzae*, qui est assuré par la bactérie précédente. Ce phénomène est appelé **satellitisme**, il peut être utilisé dans un but diagnostique ou pour faciliter la croissance de bactéries très exigeantes.

Le tableau suivant résume les différents types de trophique :

Type des besoins	Nature des besoins	Type trophique
Source d'énergie	Rayonnement Lumineux	Phototrophe
	Oxydations de compose organiques ou inorganiques	Chimiotrophe
Donneur d'électrons	Minéral	Lithotrophe
	Organique	Organotrophe
Source de carbone	Composé minéral	Autotrophe
	Composé organique	Hétérotrophe
Facteurs de croissance	Aucun besoin	Prototrophe
	Nécessaires	Auxotrophe

4.6 Facteurs environnementaux, physico-chimiques

Les facteurs environnementaux, comme la température, le pH, la salinité, l'osmolarité et l'oxygène influencent et contrôlent la croissance bactérienne. Chaque bactérie possède des valeurs optimales pour chaque facteur et par conséquent, selon les valeurs optimales, on définit différentes catégories de bactéries.

4.6.1 La température

Elle influence profondément la multiplication et le métabolisme bactérien (action sur la vitesse des réactions biochimiques). Selon la température optimale de développement, on distingue généralement trois catégories de microorganismes :

- ✓ **Les psychrophiles** dont la température optimale de croissance est située aux environs de 0°C.
- ✓ **Les germes mésophiles** qui préfèrent une température (moyenne) comprise entre 20 et 40°C.
- ✓ **Les thermophiles** qui se multiplient préférentiellement entre 45 et 65°C.

Cette classification n'a pas de limites strictes, il peut exister des chevauchements entre les trois groupes. Ainsi certains mésophiles peuvent être des thermophiles et inversement. On

peut aussi décrire les **psychrotrophes** qui cultivent habituellement à des températures de réfrigération mais qui préfèrent des températures de 10 à 20 ou même 30°C. Les **thermotrophes** qui se développent visiblement à 50°C mais plus nettement aux températures moyennes de 30°C. Cependant, il est impératif de signaler que la majorité des microorganismes sont mésophiles.

Les hyperthermophiles : ont une température optimale de croissance entre 70 °C et 110°C.

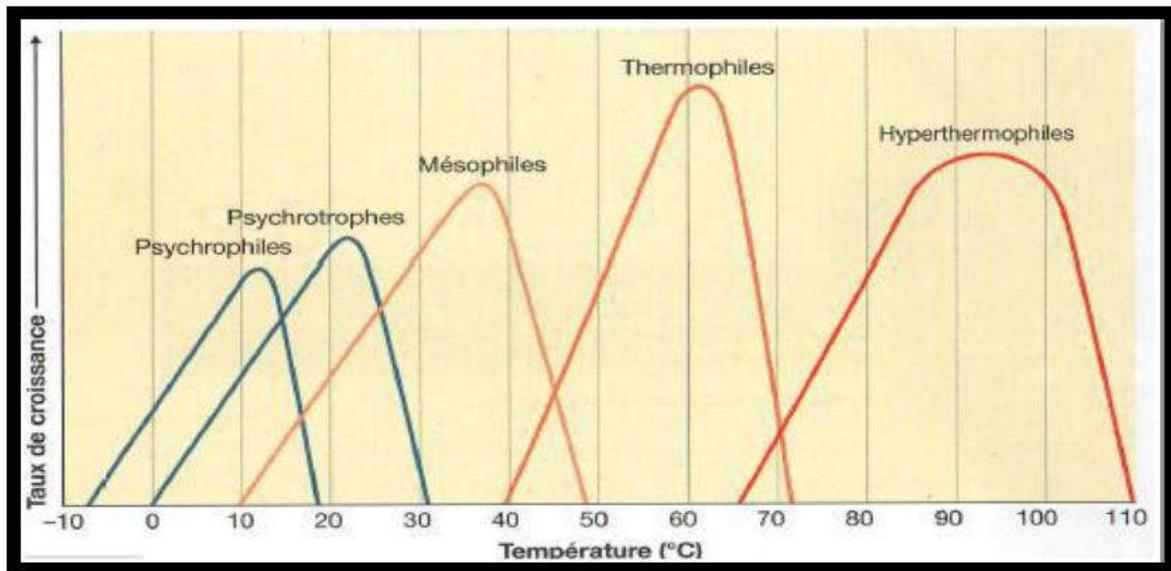


Figure 25 : Taux de croissance en fonction de la température.

4.6.2 Le pH

A l'opposé des moisissures et des levures qui préfèrent pour leur développement un pH acide (3 à 6), La majorité des bactéries se multiplient préférentiellement à des pH voisins de la neutralité (6,5 à 7,5), mais elles sont capables de croître dans une large gamme de pH. Par exemple, *Escherichia coli* peut se multiplier pour des pH compris entre 4,4 et 9,0. Certaines bactéries qualifiées de **acidophiles** préfèrent un pH acide. C'est le cas des *lactobacilles* dont le pH optimal est de 6. *Thermoplasma acidophilum* dont le pH optimal est compris entre 0,8 et 3 et *Thiobacillus thiooxidans* dont le pH optimal de croissance est de 2. Inversement, les bactéries **basophiles (ou alcalophiles)** préfèrent des pH alcalins. Ainsi, le pH optimal est de 9 pour la multiplication de *Vibrio cholerae*.

Au cours des cultures, le métabolisme bactérien engendre des composés acides ou basiques qui seraient susceptibles d'entraver la multiplication bactérienne. Pour éviter ces variations de pH, les milieux de culture sont tamponnés, le plus souvent en utilisant des tampons phosphates. Les tampons les plus utilisés sont K_2HPO_4 et KH_2PO_4 .

4.6.3 Les exigences gazeuses

C'est surtout vis-à-vis de l'oxygène que les exigences gazeuses des bactéries sont précises ; selon ces exigences gazeuses on distingue : certains sont, d'autres sont anaérobies strictes (ne peuvent se multiplier qu'en l'absence d'oxygène libre). **Les anaérobies facultatifs** appelés aussi aéro-anaérobies peuvent croître en absence ou en présence d'oxygène, mais leurs croissances sont maximales en présence de ce dernier (Production d'ATP élevée). En absence d'oxygène, elle utilise la fermentation ou la respiration anaérobie pour produire de l'énergie. C'est le cas *d'E. coli*.

- **Les aérobies stricts** exigent l'oxygène libre pour leur développement
- **Les anaérobies stricts** : n'ont aucune enzyme capable de neutraliser les formes toxiques de l'oxygène. Leur croissance doit se faire dans une atmosphère dépourvue d'oxygène. C'est le cas de *Clostridium*.
- **Les anaérobies aéro-tolérants** : n'utilisent pas l'oxygène pour leur croissance mais ce gaz n'a aucun effet sur elles. C'est le cas des **Lactobacilles**.
- **Les microaérophiles** : qui ont besoin d'oxygène, mais à une proportion inférieure à celle de l'air.
- **Les aérophiles** capables de se développer à la surface des milieux liquides en formant un voile.

4.6.4 La pression osmotique

Les bactéries, à l'exception des *Mycoplasmatales*, sont peu sensibles aux variations de pression osmotique car elles sont protégées par leur paroi. Toutefois, certaines espèces marines sont adaptées à des milieux contenant environ 35 g de NaCl par litre. Lorsque cette concentration est la même dans le milieu et à l'intérieur de la cellule bactérienne, on parle du milieu isotonique. Lorsqu'elle est inférieure ou supérieure on dit que le milieu est hypertonique dans le premier et hypotonique dans le second cas. Selon leur sensibilité à la pression osmotique, on distingue trois groupes de bactéries.

- **Les bactéries non-halophiles** : NaCl est inférieure à 0,2 M.
- **Les espèces halophiles** : NaCl supérieure à 0,2 M pour les moins halophiles à 5,2 M pour les plus halophiles.
- **Les espèces halotolérantes** : Ils tolèrent 7.5 à 15% de NaCl.
- **Les osmophiles** : se multiplient en présence de grandes concentrations de sucre.

5 Croissance Bactérienne

5.1 Introduction

La croissance est un phénomène de grand intérêt biologique dont l'importance écologique et pratique est considérable. Chez les organismes pluricellulaires, la croissance se manifeste par l'augmentation de taille ou de masse. Chez les microorganismes unicellulaires, elle se manifeste par l'augmentation du nombre (multiplication suite à des divisions binaires). Lorsqu'une cellule bactérienne est placée dans un milieu de culture convenable, elle va assurer ses biosynthèses, augmente de taille puis se divise, par fission binaire, en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire

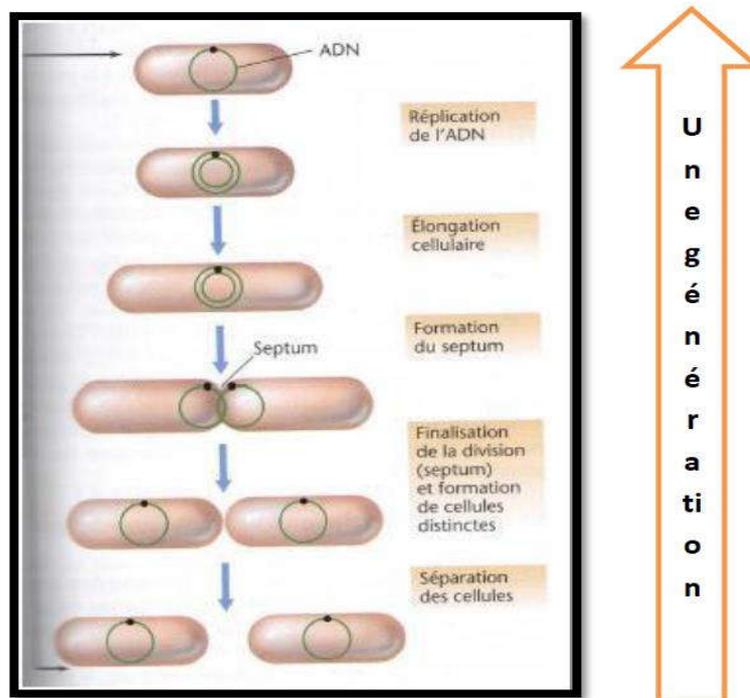


Figure 26 : La division par scissiparité

5.2 Mesure de la croissance

Plusieurs techniques sont utilisées pour analyser, suivre et mesurer la croissance. Chacune a des avantages et des inconvénients. On distingue les méthodes directes et les méthodes indirectes fondées sur la mesure d'un paramètre lié à l'activité métabolique. Certaines distinguent les cellules vivantes des cellules mortes et d'autres, en sont incapables.

5.2.1 Mesure du nombre (dénombrement)

5.2.1.1 Lecture au microscope

Cette technique permet le dénombrement de la totalité des bactéries. Elle se fait au microscope en utilisant des compartiments volumétriques (exp: cellule de Thomas). Récemment, la numération a été automatisée ; elle se fait par des compteurs automatiques de particules. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle ne distingue pas entre les bactéries viables et mortes. Elle n'est donc fiable que dans les conditions où la plupart des bactéries sont vivantes.

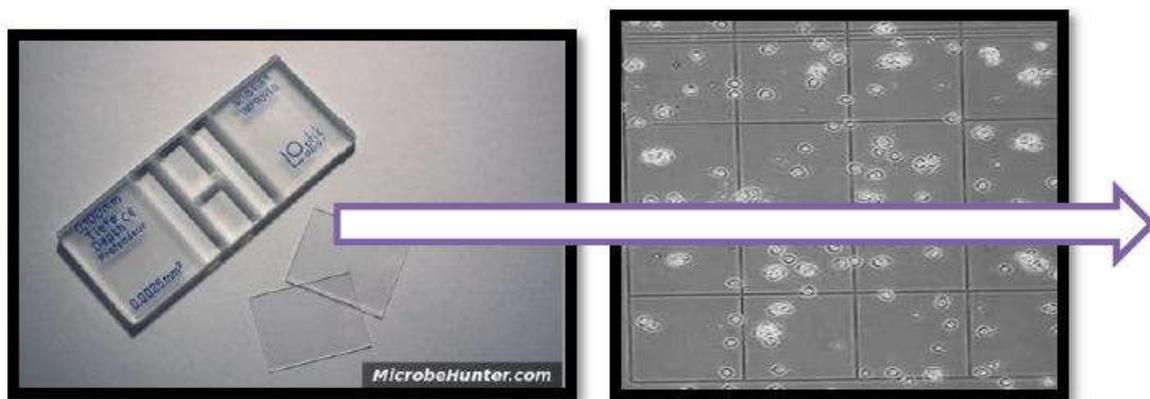


Figure 27 : méthode de comptage au microscope

5.2.1.2 Epifluorescence

Elle distingue les cellules vivantes des cellules mortes. Elles sont colorées par un fluorochrome comme utilise l'acridine orange, un colorant qui se fixe sur l'ADN. En microscopie sous UV, les bactéries vivantes apparaissent vertes alors que les bactéries mortes apparaissent rouges résulte de la combinaison du fluorochrome avec l'ADN dénaturé. Il est important de signaler que ce procédé est d'interaction délicate, car en phase de multiplication ont une des doubles hélices d'ADN ouvertes (réplication).

5.2.1.3 Dénombrement après culture

Cette méthode permet l'appréciation des bactéries viables et cultivables. Après avoir effectué une série de dilutions, une quantité (0,1 ml en général) des dilutions convenables est étalée à la surface d'un milieu gélosé approprié ou incorporé au milieu avant sa solidification. Après incubation, chaque cellule se multiplie pour donner une colonie visible à l'oeil nu. En tenant compte du facteur de dilution, nous pouvons déduire la concentration bactérienne initiale. Ainsi pour rendre la méthode plus rigoureuse, on doit réaliser l'expérience trois fois après

avoir rendu le milieu très homogène par agitation. Parfois, il arrive que plus d'une bactérie donne une seule colonie ; il est donc plus prudent de donner la concentration bactérienne en **unités formant colonies (UFC)**. On peut aussi utiliser la méthode du **nombre le plus probable (NPP ou MPN)** qui se fait traditionnellement pour dénombrer les bactéries dans un milieu liquide (exp : BCPL).

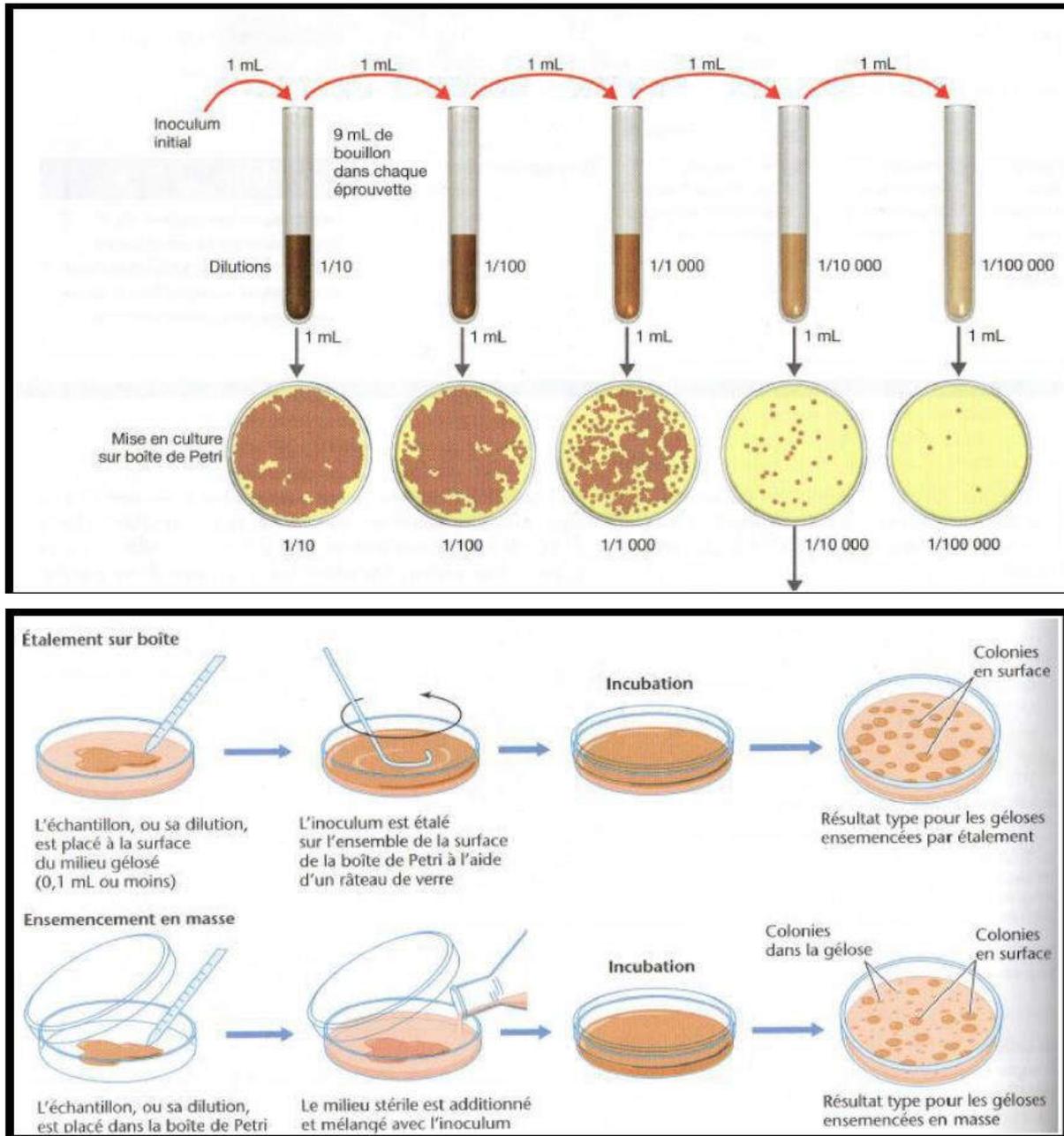


Figure 28 : dénombrement après culture.

5.2.1.4 Mesure par filtration sur membrane :

La méthode de filtration sur membrane consiste à recueillir, identifier et dénombrer, à la surface d'une membrane filtrante stérile, les bactéries recherchées dans un échantillon, utilisée

quand le nombre des bactéries est très bas. Utilisée pour la recherche des coliformes dans l'eau, comme preuve de contamination fécale. On procède par filtration sur membrane de 100 ml d'eau puis la membrane est mise en culture sur boîte de Pétri (Gélose).

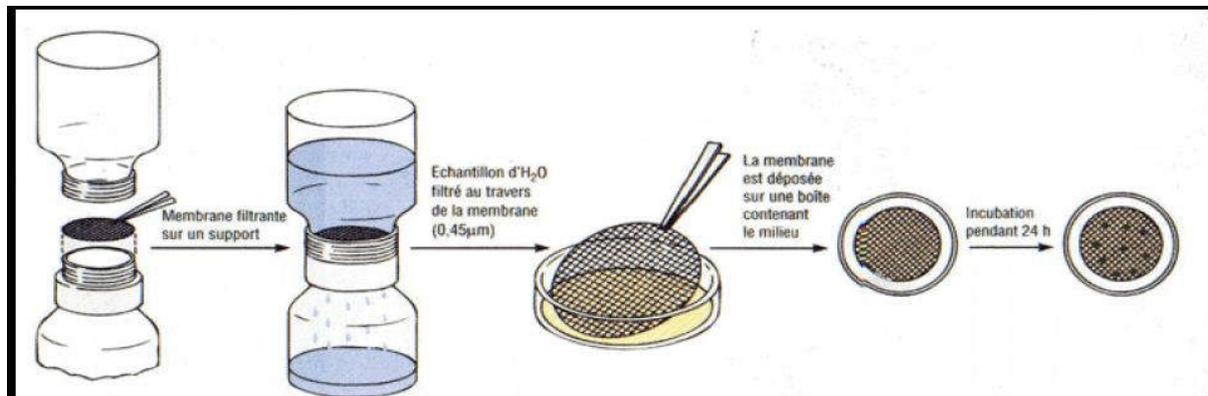


Figure 29 : méthode de filtration sur membrane

5.2.2 Mesure de la masse

5.2.2.1 Détermination du poids sec

Mesure physique directe du poids frais, du poids sec ou du volume cellulaire après centrifugation. C'est la détermination de la masse sèche en récupérant la biomasse par centrifugation, ensuite on sèche à $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ en présence de tampon de sable de Fontainebleau jusqu'à obtenir une masse constante. C'est une méthode rigoureuse mais elle a l'inconvénient d'exiger des suspensions bactériennes très denses et un milieu de culture sans particule, ainsi cette mesure ne permet pas de distinguer entre cellule morte et cellule vivante.

5.2.2.2 Mesure de trouble

Plus une bactérie pousse dans un liquide plus ce dernier devient trouble. Il y a formation d'un voile. On utilise un spectrophotomètre (La mesure de la densité optique) pour mesurer cette turbidimétrie. C'est la technique la plus simple, la plus rapide et la plus utilisée. Elle consiste à mesurer la lumière absorbée par une suspension bactérienne à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 620 nm (longueur d'onde pour laquelle l'absorption de la lumière par les constituants cellulaires est la plus faible). Dans des conditions techniques précises, l'absorbance est proportionnelle à la concentration cellulaire. C'est le procédé le plus simple, le plus rapide et actuellement le plus utilisé pour évaluer la masse microbienne, surtout utilisé dans le cas d'une culture sur un milieu liquide.

5.2.2.3 Mesure de l'activité cellulaire

On mesure un paramètre facilement déterminable et dont la valeur peut être corrélée avec précision à celle de la biomasse. La corrélation ne sera exacte que si l'état physiologique est constant. On peut mesurer soit la consommation d'un substrat présent dans le milieu, soit un constituant cellulaire, soit une molécule excrétée par les cellules, soit encore une variation physico-chimique du milieu.

A. Mesure de la consommation de substrat

Le substrat peut-être une source de carbone, une source d'azote, l'oxygène ou un facteur de croissance. Cette méthode est d'utilisation très limitée et ces résultats ne sont pas très satisfaisants. Sa crédibilité dépend de la précision du dosage, de la présence de substances interférentes et du rapport de la masse cellulaire formé par unité de substance nutritive consommée.

B. Mesure des produits d'excrétion

Au cours de leur développement, les microorganismes rejettent dans le milieu extérieur, les produits de leur métabolisme. Les métabolites primaires (acides aminés, acides organiques) ne sont pas rejetés en quantité notable car la cellule qui les synthétise en a besoin pour sa croissance. Leur mesure n'est pas très significative. Au contraire, certains produits du catabolisme constituent de véritables déchets dont la cellule doit se débarrasser. Leur dosage peut se révéler très utile.

C. Mesure des variations physico-chimiques du milieu

Les variations physico-chimiques du milieu traduisent une évolution de la croissance. Les modifications de pH, de conductivité électrique, de potentiel d'oxydoréduction et d'énergie calorifique libérée par les cellules peuvent être mesurées avec intérêt. Dans ces procédés, on cherche à établir une relation entre la vitesse d'accroissement et la vitesse de variation du paramètre mesuré.

5.3 Constantes et expression de la croissance (paramètre de croissance)

La division cellulaire répond une progression exponentielle à temps régulier. 01 cellule donne 02 cellules, qui donnent 04 cellules, puis 16, puis 32 et ainsi de suite.

La croissance d'une bactérie placée dans des conditions idéales de culture peut être définie par deux constantes principales :

5.3.1 Le temps de génération

Le temps de génération est le temps entre deux divisions successives ou celui nécessaire au doublement 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.

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

$$G = \frac{t_n - t_0}{n}$$

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**.

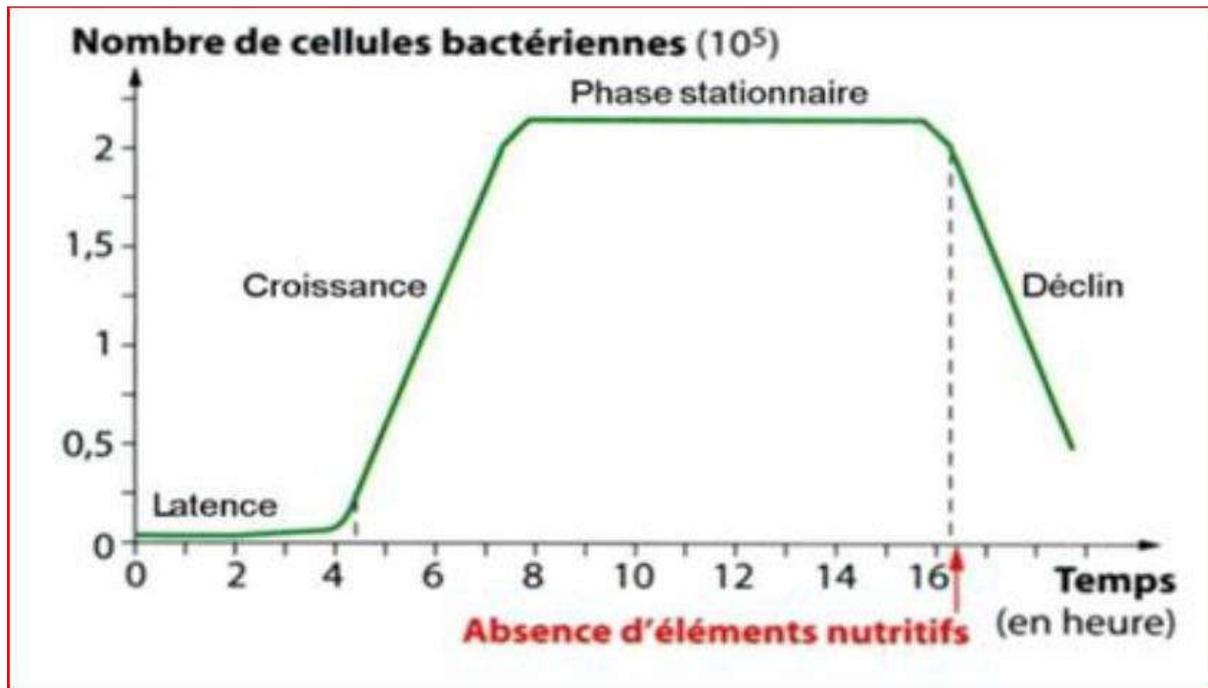


Figure 30 : courbe de croissance de la bactérie

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 croissance 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.

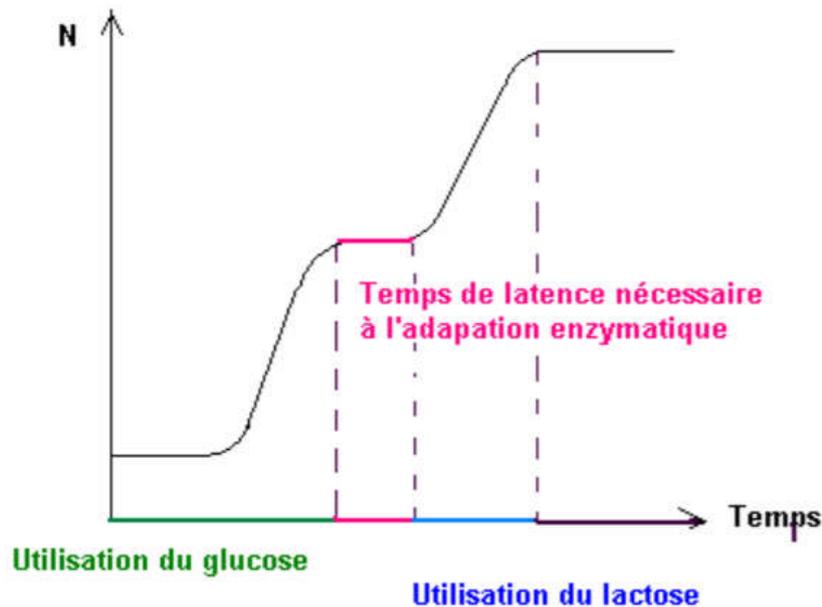


Figure 31 : Phénomène de diauxie (Phase I (Glucose) –Phase II (Lactose))

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 les 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.

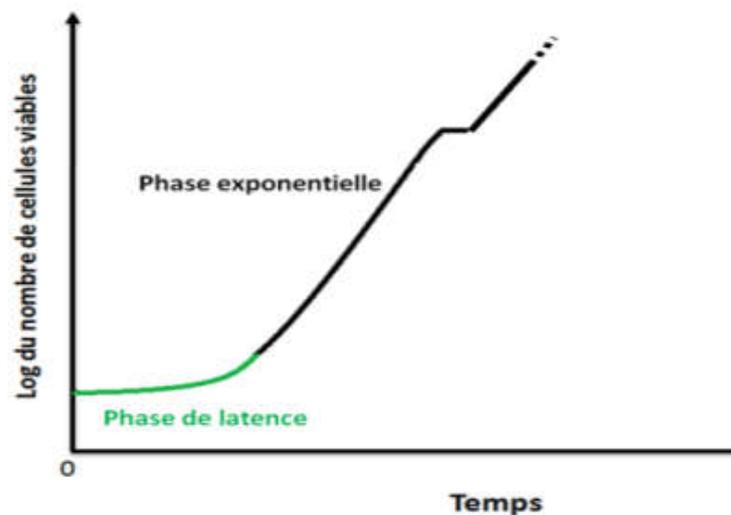


Figure 32 : courbe de croissance continue des bactéries

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.

6.4 Les cultures pures

Les techniques d'études des bactéries exigent toujours de pouvoir avoir des cultures pures afin de pouvoir faire des analyses de son métabolisme. Au cours de l'analyse bactériologique de routine trois types d'analyses doivent être faites.

6.4.1 Méthode de dilution en milieux liquide

Décrite en 1862 par Pasteur et a eu un grand succès en bactériologie (NPP ou colimétrie). Elle consiste à faire des dilutions de la solution mère à analyser et ensemercer des milieux adéquats.

6.4.2 Méthode d'incorporation

On utilise généralement de la gélose ordinaire, où on incorpore une suspension (ou une dilution de la suspension) à la gélose préalablement fondue et refroidie à 45°C. Après homogénéisation le milieu est coulé en boîte Pétri, laissé solidifier et incubé à une température optimale. Cette méthode est utilisée pour les germes anaérobies.

6.4.3 Méthode de stries

C'est la méthode la plus utilisée en microbiologie. Elle consiste à réaliser à l'aide d'une anse de platine bouclée et stérile (contenant de la suspension bactérienne) des stries sur une gélose en la parcourant sur toute la surface et incubé à une température optimale. Elle est adoptée pour les bactéries aérobies.

7 Les agents antimicrobiens

7.1 Introduction

Pour de multiples raisons, il est indispensable de contrôler le développement des microorganismes, pour éviter leurs effets nuisibles sur l'homme et les animaux (bactéries pathogènes par exemple), ou sur les produits de l'activité humaine (altération des aliments, dégradation diverses). Les moyens de lutte sont nombreux et très variés, tels les agents antimicrobiens physiques (température, irradiation et élimination mécanique) et chimiques (antibiotiques, antiseptiques et désinfectant).

Le but essentiel que l'on se propose est quelquefois d'inhiber le développement des microorganismes nuisibles mais le plus souvent de les détruire totalement. On parle communément de stérilisation procédé par lequel on détruit ou élimine d'un objet ou d'un habitat toutes les cellules vivantes, les spores viables et les entités acellulaires (virus, viroïdes, prions), comme l'opération qui a pour objet de tuer tous les microorganismes contenus dans une opération. Le matériel traité est dit stérile lorsque le résultat est acquis, autrement dit