



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université de Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences
de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire : Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

MEMOIRE

Présenté par

M^{elle} LOTMANI Nabila Feryel

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Biochimie

**Contribution à l'optimisation des milieux de culture pour
l'isolement des bactéries marines**

Soutenu le 25 juin 2023, devant le jury composé de :

| | | | |
|------------|------------------------|------------|-----------------------|
| Présidente | Boucherit-Otmani Zahia | Professeur | Université de Tlemcen |
| Encadreur | Kazi Tani Zahira Zakia | MCA | Université de Tlemcen |
| Examineur | Seghir Abdelfettah | MCA | Université de Tlemcen |

Année universitaire 2022/2023

Dédicace

Je dédie ce travail

A

Mes très chers et adorables parents,

Pour leurs encouragements, leur amour, leur soutien moral et leurs prières tout
au long de mon parcours.

Mes chers frères

Ma chère sœur

Mon fiancé Mahieddine

A toute ma famille et tous mes amis.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques » de l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.

Je remercie très chaleureusement mon encadreur, M^{me} Baba Ahmed-Kazi Tani Zahira Zakia, Maître de conférences classe A au département de Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, pour avoir accepté la charge de m'encadrer, pour son soutien permanent ainsi que son aide et ses conseils fructueux.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à Madame Boucherit-Otmani Zahia, Professeur au département de Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Ma profonde reconnaissance s'adresse également à Monsieur Seghir Abdelfettah, Maître de conférences classe A au département de Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Je remercie également les techniciennes et les doctorants du laboratoire «Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques», particulièrement Fatima et Kawther pour leurs aides et conseils.

الملخص

تركز هذه الدراسة على تحسين وسائط الزراعة للبكتيريا البحرية. تم زراعة ثلاثة سلالات على خمس أوساط مختلفة (وسط كلوريد الأمونيوم NH_4Cl ، وسط الجلوكوز، مرق المغذيات BN، مرق تسريب قلب الدماغ BHIB، مرق الصويا Trypic TSB) لتحديد الوسط الأنسب لنمو البكتيريا عن طريق قياس الكثافة البصرية. تظهر النتائج أن الوسائط التي تحتوي على كلوريد الأمونيوم المضاف والجلوكوز هي الأنسب لنمو البكتيريا البحرية. **الكلمات المفتاحية:** إعلام الثقافة - البكتيريا البحرية - النمو البكتيري.

Résumé

Le présent travail a porté sur l'optimisation des milieux de culture pour les bactéries marines. Trois souches sont cultivées sur cinq milieux de culture différents (milieu additionnée de chlorure d'ammonium NH_4Cl , milieu additionnée de glucose, Bouillon nutritif BN, Brain Heart Infusion Broth BHIB, Trypic soy Broth TSB) pour déterminer le milieu de culture adéquat a une meilleure croissance bactérienne par la mesure de densité optique. Les résultats obtenus montrent que les milieux additionnés de chlorure d'ammonium et de glucose sont les milieux les plus adéquats à la culture des bactéries marines.

Mots clés : milieux de culture - bactéries marines - croissance bactérienne.

Abstract

This work has focused on optimizing culture media for marine bacteria. Three strains are grown on five different growing media (medium with NH_4Cl ammonium chloride added, medium with glucose added, BN Nutrient Broth, Brain Heart Infusion Broth BHIB, Trypic soy Broth TSB) to determine the appropriate culture medium for better bacterial growth by measuring optical density. The results obtained show that the media containing ammonium chloride and glucose are the most suitable for growing marine bacteria.

Keywords: culture media - marine bacteria - bacterial growth

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| Première partie : synthèse bibliographique | 1 |
| Deuxième partie : Matériel et méthodes | 5 |
| 1. Souches bactériennes..... | 5 |
| 2. Milieux de culture..... | 5 |
| 3. Croissance bactérienne | 6 |
| 3.1. Précultures..... | 6 |
| 3.2. Mesure de la densité optique (DO)..... | 6 |
| Troisième partie : Résultats et discussion..... | 7 |
| Quatrième partie : Conclusion | 10 |
| Cinquième partie : Référence bibliographiques | 11 |
| Sixième partie : Annexes | 13 |

Liste des tableaux et des figures

| | |
|---|----------|
| Tableau 1. Composition des milieux de culture..... | 5 |
| Tableau 2. Les densités optiques enregistrées en phase de latence et au plateau cinétique..... | 7 |
| Figure1. Courbe de croissance bactérienne | 2 |
| Figure 2. Echelle de pH reliés à quelques environnements..... | 3 |

Liste des abréviations

ASW : Artificial Sea Water (l'eau de mer artificiel).

NH₄Cl : Chlorure d'ammonium.

BN : Bouillon nutritif.

BHIB: Brain Heart Infusion Broth.

TSB: Tryptic soy Broth.

DO: Densité optique.

Première partie

Synthèse bibliographique

Les bactéries marines sont des microorganismes présents dans toutes les mers et les océans du globe (**Doberva, 2016**). Ces bactéries sont une composante importante de la zone pélagique du fait de leur biomasse d'une part, et de leur rôle dans le recyclage des nutriments et de décomposition de la matière organique d'autre part (**Khelloufi, 2014**).

Les bactéries marines aident à nettoyer l'océan. Certaines aident également à décomposer les animaux morts. Cependant, les chercheurs portent un intérêt croissant à l'application dans la production de biopolymères bactériens. En effet, les polysaccharides bactériens d'origine marine sont probablement source potentielle de découvertes de nouvelles molécules dans les années à venir en particulier pour des applications dans le domaine de la cosmétique (**Borel, 2018**).

L'étude des bactéries marines dans un laboratoire nécessite de reproduire leurs conditions de vie dans leur habitat naturel. Pour survivre, les bactéries ont besoin d'une source d'azote, de carbone, de phosphore, de soufre ainsi que de sels inorganiques. Il existe de nombreux milieux de culture pour cultiver les bactéries (**Kui, 2022**).

Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle des microorganismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire les exigences nutritives du microorganisme étudié ce qui implique (**Meyer et coll., 2004**) :

- Couvrir les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance, apporter la source de carbone et d'énergie.
- Présenter un pH voisin du pH optimal.
- Présenter une force ionique optimale (le milieu peut être isotonique mais ce n'est pas obligatoire).

Les bactéries peuvent être cultivées en milieux liquide, solide et semi-solide. Les milieux liquides sont utilisés pour la culture de bactéries, les milieux solides ou semi-solides, sont utilisés pour l'isolement des bactéries. Dans ces milieux, ont été ajoutés des nutriments favorisant la croissance des bactéries étudiées (**Boukalkola et coll., 2022**).

La croissance bactérienne est l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie (**Prescott, 1993**). La mesure de la croissance bactérienne peut être effectuée selon plusieurs critères, tels que la turbidimétrie (mesure d'une absorbance), le poids sec, le dénombrement de bactéries viables cultivables, le dénombrement de bactéries totales (**Rubio, 2002**). La croissance d'une bactérie s'étudie en milieu liquide (**Hamadouche, 2003**).

La croissance bactérienne se décompose en quatre phases principales : (a) une phase de latence pendant laquelle les bactéries s'adaptent à leur nouvel environnement ; (b) une phase exponentielle où le taux de croissance spécifique d'une souche dans un milieu de culture donné est représenté par la pente de la courbe de croissance ; (c) une phase stationnaire qui souvent témoigne d'un équilibre entre la multiplication et la mortalité des cellules ; (d) une phase de lyse ou de mort cellulaire (Figure 1) (**Cunin, 1993**).

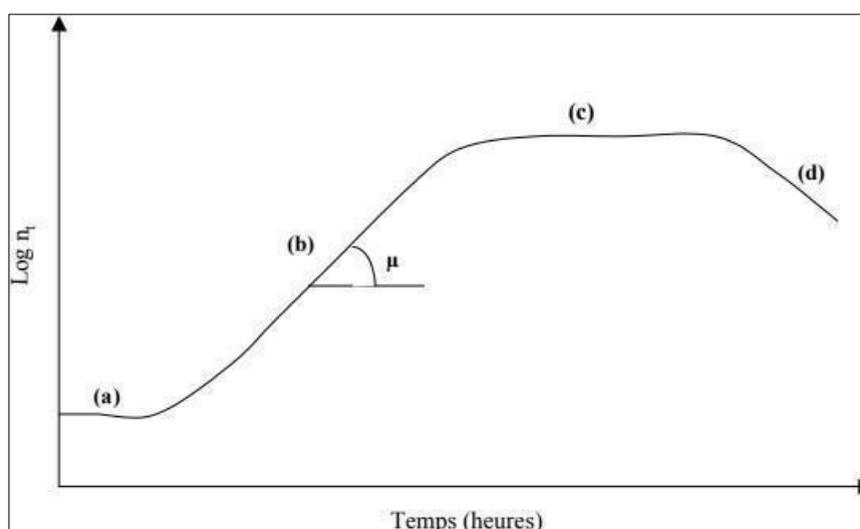


Figure1. Courbe de croissance bactérienne (**Cunin, 1993**)

Plusieurs facteurs influencent la croissance bactérienne, comme l'apport en nutriments (**Brian-jaisson, 2014**). La présence de certains composés est essentielle pour la croissance bactérienne et ceux-ci doivent donc être présents dans le milieu de culture comme de l'eau, des sources d'azote, de carbone, de phosphore et de soufre (**Madigan et coll., 2000**). Les facteurs physico-chimiques tels que la température, le pH et la pression osmotique sont également importantes.

Rubio (2002) a classé les bactéries en quatre grandes catégories selon leur température de croissance : les mésophiles (10°C à 45°C), les psychrophiles (-10°C à 20°C), les thermophiles (55°C à 65°C) et les hyper-thermophiles (80°C à 110°C) .

La majorité des bactéries se développent à pH neutre, cependant, certains microorganismes nécessitent un milieu acide (bactéries acidophiles) ou basique (bactéries alcalophiles) pour leur croissance (Figure 2) (**Brian-jaisson, 2014**).

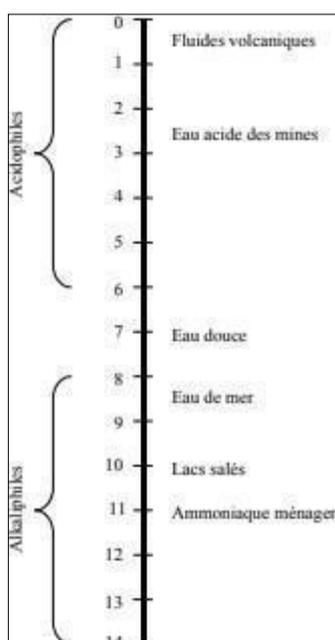


Figure 2. Echelle de pH reliés à quelques environnements (**Brian-jaisson, 2014**)

La pression osmotique joue également un rôle important. Les bactéries peuvent là aussi être classées (**Madigan et coll., 2000**) :

- Les bactéries non-halophiles (pas besoin de NaCl pour leur croissance).
- Les bactéries halophiles (besoin de 0,1% de NaCl).
- Les bactéries halophiles modérées (besoin de 2 à 20% de NaCl).
- Les bactéries halophiles extrêmes (besoin de 5 à 36% de NaCl).

Afin de promouvoir l'étude des bactéries marines au niveau du laboratoire de recherche «Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique», nous nous sommes proposé de faire un travail sur l'optimisation des milieux de culture qui est un élément essentiel pour maximiser la croissance et l'activité métabolique des bactéries marines. Parmi les stratégies examinées, nous avons opté pour l'utilisation de divers milieux de culture comprenant différentes sources nutritives.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Ce travail est réalisé au laboratoire «Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique LapSab » de l'Université Aboubekr Belkaid-Tlemcen.

1. Souches bactériennes

Le matériel biologique est constitué d'une collection de bactéries d'origine marines isolées le 3 décembre 2022 au niveau la plage de Tafsout (Honaine), wilaya de Tlemcen. Ces bactéries sont entretenues par repiquage régulier et conservées à 4°C au laboratoire LapSab.

2. Milieux de culture

Différents milieux de culture sont utilisés pour ce travail (Tableau 1). La composition de l'eau de mer artificielle (ASW) utilisée pour la préparation de ces milieux est présentée en annexe 1.

Milieu 1 : Milieu solide au chlorure d'ammonium (NH₄Cl) (**Joint et coll., 2010**)

Milieu 2 : Milieu liquide au chlorure d'ammonium (NH₄Cl) (**Joint et coll., 2010**)

Milieu 3 : Milieu additionnée de Glucose

Milieu 4 : Bouillon nutritif (BN)

Milieu 5 : Milieu Brain Heart Infusion Broth (BHIB)

Milieu 6 : Milieu Trypic soy Broth (TSB) (**Benladghem et coll., 2020 modifiée**)

Le pH de tous les milieux est ajusté à 7.6 au moyen de NaOH 1N.

Tableau 1. Composition des milieux de culture

| | Milieu 1 | Milieu 2 | Milieu 3 | Milieu 4 | Milieu 5 | Milieu 6 |
|--------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Agar | 15g | -- | -- | -- | -- | -- |
| Peptone | 0,25g | 0,25g | 0,5g | 0,20g | -- | -- |
| Extrait de levure | 0,05g | 0,05g | 0,01g | -- | -- | -- |
| NH₄Cl | 0,0534g | 0,0534g | -- | -- | -- | -- |
| Glucose | -- | -- | 0,1g | -- | -- | -- |
| Bouillon nutritif | -- | -- | -- | 1,3g | -- | -- |
| BHIB | -- | -- | -- | -- | 3,7g | -- |
| TSB | -- | -- | -- | -- | -- | 3g |
| Eau distillé | -- | -- | -- | 25ml | 25ml | 25ml |
| ASW | 100ml | 100ml | 100ml | 75ml | 75ml | 75ml |

3. Croissance bactérienne

Plusieurs expériences de croissance bactérienne sont réalisées sur cinq différents milieux de culture afin de déterminer les paramètres de prolifération des bactéries marines, en particulier le temps de latence et le nombre de bactéries au plateau cinétique.

3.1. Précultures

A partir d'une culture de 24H sur milieu solide au chlorure d'ammonium (milieu 1), prélever une colonie bien isolée et ensemercer 2ml de chaque milieu liquide (milieux 2 à 6). Incuber à 22C° sous agitation pendant 6H puis à l'étuve pendant 18H.

3.2. Mesure de la densité optique (DO)

Les précultures sont ajustées à 620nm à 0,5 Mac Farland (10^8 UFC/ml), puis diluées au 1/10^{ème} dans l'eau de mer artificielle (ASW). Le nombre de bactéries en phase de latence est estimé par mesure de la densité optique de T=1h jusqu'à T=4h et au plateau cinétique de T=22h jusqu'à T=24h.

Troisième partie

Résultats et discussion

Un travail sur l'optimisation des milieux de culture pour les bactéries marines est réalisé avec trois souches appartenant au laboratoire LapSab. Les précultures sont préparées en milieu solide additionné de NH₄CL (Milieu 1). Le nombre de bactéries en phase de latence et au plateau cinétique est estimé par mesure de la densité optique sur cinq milieux de culture différents (Tableau 2)

Tableau 2. Les densités optiques enregistrées en phase de latence et au plateau cinétique

| | | Latence | | | | Plateau cinétique | | |
|-----------------|----|---------|------|------|------|-------------------|------|------|
| | | 1h | 2h | 3h | 4h | 22h | 23h | 24h |
| Milieu 2 | A1 | 0,3 | 0,3 | 0,41 | 0,5 | 1,21 | 1,22 | 1,22 |
| | A2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,67 | 0,68 | 0,69 |
| | A3 | 0,22 | 0,3 | 0,39 | 0,45 | 1,14 | 1,16 | 1,17 |
| Milieu 3 | A1 | 0,59 | 0,59 | 0,59 | 0,59 | 1,21 | 1,22 | 1,22 |
| | A2 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 1,13 | 1,2 | 1,24 |
| | A3 | 0,34 | 0,34 | 0,51 | 0,6 | 1,48 | 1,5 | 1,52 |
| Milieu 4 | A1 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 |
| | A2 | 0,25 | 0,26 | 0,26 | 0,26 | 0,26 | 0,26 | 0,26 |
| | A3 | 0,3 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 |
| Milieu 5 | A1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| | A2 | 0,44 | 0,44 | 0,44 | 0,44 | 0,44 | 0,44 | 0,44 |
| | A3 | 0,09 | 0,16 | 0,18 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,42 |
| Milieu 6 | A1 | 0,2 | 0,2 | 0,52 | 0,72 | 1,11 | 1,11 | 0,9 |
| | A2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| | A3 | 0,38 | 0,4 | 0,61 | 0,61 | 0,65 | 0,65 | 0,43 |

1. Culture en Milieu 2 (additionné de Chlorure d'ammonium NH₄Cl)

L'étude de la croissance des trois souches (A1, A2 et A3) en milieu 2 montre un trouble important à l'œil nu. Pour la souche A1, on observe un temps de latence de 2h et une absorbance égale à 1,20 au plateau cinétique. Pour la souche A2, un temps de latence de 4h et une absorbance de 0,68 au plateau cinétique. En ce qui concerne la souche A3, un temps de latence de 1h et une absorbance égale à 1,17 au plateau cinétique. Ces résultats sont probablement dus au fait que le milieu de culture additionné de Chlorure d'ammonium NH₄Cl et préparé avec de l'eau de mer artificielle (ASW) soit un milieu riche en éléments nutritifs nécessaires à la croissance des bactéries marines (utilisation de NH₄Cl comme source d'azote).

2. Culture en Milieu 3 (additionnée de Glucose)

Pour les deux souches A1 et A2, on observe des temps de latence de 4h et des absorbances au plateau cinétique égales à 1,22 et 1,20 respectivement. En ce qui concerne la souche A3, un temps de latence de 2h et une absorbance équivalente à 1,52 au plateau cinétique. Ces résultats sont probablement dus au fait que le milieu additionné de Glucose soit un milieu qui contient des éléments nutritifs indispensables à la croissance des bactéries marines (utilisation de Glucose comme source de carbone).

3. Culture en Milieu 4 (Bouillon nutritif)

L'étude de la croissance des trois souches (A1, A2 et A3) en milieu 4 ne montre aucun trouble à l'œil nu. Les valeurs d'absorbance enregistrées restent inchangées au bout de 24H d'incubation. Ces résultats sont probablement dus au fait que le bouillon nutritif préparé avec de l'eau de mer artificielle (ASW) ne soit pas un milieu riche pour la culture des bactéries marines.

4. Culture en milieu 5 (Brain Heart Infusion Broth)

L'étude de la croissance des trois souches (A1, A2 et A3) en milieu 5, montre que les deux souches (A1 et A2) ne présentent aucun trouble alors que pour la souche A3, un léger trouble est observé. Pour les deux souches A1 et A2, les absorbances restent inchangées après 24H d'incubation tandis que pour la souche A3, on observe un temps de latence de 1h et une absorbance égale à 0,25 au plateau cinétique. Ces résultats sont probablement dus au fait que le Brain Heart Infusion Broth (BHIB) ne soit pas un milieu adéquat pour la croissance des bactéries marines.

5. Culture en milieu 6 (Tryptic soy Broth)

Un faible trouble est observé à l'œil nu pour les souches A1 et A3 en milieu 6, alors qu'aucune croissance n'est observée pour la souche A2. Les résultats obtenus montrent un temps de latence de 2h pour la souche A1 avec une absorbance de 1,11 au plateau cinétique et pour la souche A3, un temps de latence de 1h et une absorbance égale à 0,65 au plateau cinétique. En ce qui concerne la souche A2, après 24h d'incubation, les absorbances restent inchangées. Ces résultats sont probablement dus au fait que le Tryptic soy Broth (TSB) soit un milieu pauvre en nutriments nécessaires à la croissance des bactéries marines.

Les expériences réalisées montrent que les trois souches ont un comportement différent vis-à-vis des milieux de culture utilisés. En effet, il semble que les souches A1 et A3 soient plus tolérantes en ce qui concerne des carences en matières organiques que la souche A2 qui est plus exigeante. Les résultats obtenus montrent que les souches de bactéries marines testées peuvent être maintenues en quantités suffisantes pendant un temps correct (d'au moins 24h) dans les milieux additionnés de Chlorure d'ammonium NH_4Cl et de glucose (milieux 2 et 3). Il en ressort que les milieux 2 et 3 présentent un intérêt en adéquation avec les besoins nutritifs des bactéries marines.

Quatrième partie

Conclusion

L'optimisation des milieux de culture est un élément essentiel pour maximiser la croissance et l'activité métabolique des bactéries marines. Ce processus implique une compréhension approfondie de l'exigence nutritionnelle spécifique des bactéries marines.

Il en ressort de ce travail que les milieux additionnés de Chlorure d'ammonium NH_4Cl et de glucose (milieux 2 et 3) présentent un intérêt en adéquation avec les besoins nutritifs des bactéries marines.

Néanmoins, il convient de noter que l'optimisation des milieux de culture pour les bactéries marines est un domaine en constante évolution et requiert des recherches continues.

Pour compléter ce travail, il serait intéressant de prendre en compte plusieurs facteurs tels que le pH, la température, les conditions d'oxygénation et les facteurs de croissance.

Cinquième partie

Références

Bibliographiques

Boukalkola, F., Aichaoui, D., Aichaoui, O. (2022) Recueil des milieux de culture de bactéries électif ; sélectif et général. Université Ahmed DRAIA - Adrar.

Benladghem, Z., Seddiki, S, L., Mahdad, Y, M. (2020) Identification of bacterial biofilms on desalination reverse osmosis membranes from the mediterranean sea.

Cunin, R., (1993) Introduction à la génétique bactérienne, ed. Vigot, Paris.

Florence, Brian-Jaisson., (2014) Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. Toulon.

Iris, Borel., (2018) Techniques de l'ingénieur. Des molécules extraites de bactéries marines pour la cosmétique. [En ligne].

Jessica, Kui., (2002) Elaboration d'un bioréacteur tubulaire à base d'hydrogel pour la culture de bactéries. Sorbonne université.

Joint, I., Mühling, M., Querellou, J. (2010) Culturing marine bacteria-an essential prerequisite for biodiscovery. Microbial biotechnology, 3(5), 564-575.

Khelloufi, N., (2014) Isolement de bactéries productrices d'enzymes d'intérêt agricole, à partir d'algues marines. Université A/MIRA - Bejaïa.

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., (2000) Biology of microorganisms, 9th edition. Prentice Hall Inc.

Margot, Doberva., (2016) Le quorum sensing bactérien dans l'environnement marin: diversité moléculaire et génétique des auto-inducteurs. Ecosystèmes. Pierre et Marie Curie - Paris VI.

Meyer, A., Deiana, J., Bernard, A., (2004) Cours de microbiologie général : avec problèmes exercices corrigés.

Nora, Hamadouche., (2003) Interaction des bactéries marines responsable de la formation des biosalissures avec des matériaux biospécifique. Paris XIII.

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. (1993) Microbiology. 2nd Edition, Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, 588-591.

Rubio. C., (2002) Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. Paris 6, Paris.

Thao V. Nguyen., (2006) Preparation of Artificial Sea Water (ASW) for culturing Marine Bacteria, Aquaculture Biotechnology Group, School of Science, Auckland University of Technology (AUT).

Sixième partie

Annexe

Annexe 1. Composition de l'eau de mer artificielle (ASW)

| Ingrédients | Quantité (g/l) |
|--------------------|----------------|
| NaCl | 28.3g |
| MgCl ₂ | 5.8g |
| MgSo ₄ | 3.6g |
| CaCl ₂ | 1,11g |
| KCl | 0.77g |
| NaHCO ₃ | 0.2g |