|  |
| --- |
| Milieux de culture et Techniques d’ensemencement |

I-Introduction :

Avec la découverte des milieux de culture, on est passé du simple examen microscopique à l’isolement des bactéries sur des milieux permettant leur croissance et par la suite leur identification biochimique et enfin l’étude de leur sensibilité aux antibiotiques.

II-Définition et composition d’un milieu de culture :

Les milieux de culture utilisés en bactériologie sont des milieux contenant les éléments nécessaires et en quantité suffisante à la survie et à la multiplication des bactéries, ils doivent par ailleurs posséder les propriétés physico-chimiques convenant à une culture optimale (pH, Isotonie, Potentiel d’oxydoréduction).

La composition d’un milieu de culture varie, elle est choisie en fonction du bute à atteindre et des besoins requis par la bactérie, un milieu minimum doit comporter obligatoirement :

-Une source d’eau (eau distillée).

-Une source de carbone ou l’énergie (Glucose).

-Une source d’azote et soufre.

-Une source de potassium (K) et phosphore (P).

-Une source de calcium (Ca) et magnésium (Mg).

-Une source d’oligo-éléments (sels de cuivres de zinc, de cobalt…etc.).

-Un tampon pH pour maintenir la neutralité du milieu

-Les facteurs de croissance et des Vitamines peuvent être rajoutées aux bactéries auxotrophe.

III-Classification des milieux de culture :

Il existe différentes classifications des milieux de culture :

1)-Classification selon la composition :

a-Milieu complexe empirique (naturel) :

La composition de ce milieu n’est pas bien définie, c’est le milieu naturel de la bactérie.

On retrouve des extraits de viande, des extraits de levure, les peptones. Exemple : Milieu cœur cervelle BHIB (Brain Heart Infusion Broth).

b-Milieu semi-synthétique :

Au milieu complexe sont rajoutées des substances chimiques bien définit, ceci concerne les produits ayant un intérêt pour la bactérie, comme les facteurs de croissance, Exemple : Gélose enrichie au sang de mouton.

c-Milieu synthétique :

La composition est parfaitement définie tant en quantité qu’en qualité,

Ce sont des milieux utilisés dans la mise en évidence d’une réaction enzymatique précise, Exemple : Milieu de Ferguson.

2)-Classification selon la consistance :

a-Milieu liquide :

Exemple : Milieu de Clark et Lubs, Bouillon d’enrichissement.

b-Milieu solide ou gélosé :

C’est un milieu liquide solidifié par addition d’agar à une concentration de 1 à 1.7%

Agar : Substance extraite d’algues marines et qui possède la propriété de fixer une grande quantité d’eau d’où la gélification.

 Exemple : Milieu de Chapman, TSI.

c-Milieu semi-liquide, semi-solide, ou faiblement gélosé :

La concentration en Agar est plus faible que celle du milieu gélosé, elle est comprise entre 0,05- 0,075%

Exemple : Milieu Mannitol mobilité, MEVAG.

3)-Classification selon l’utilisation :

a-Milieux usuels ou de base :

Permettent la culture de bactéries non exigeantes

Exemple : Gélose nutritive et bouillon nutritif.

b-Milieux enrichis :

Contiennent les composants indispensables aux bactéries mais qu’elles ne peuvent synthétiser, on parle de bactéries exigeantes.

 Exemple : Gélose au sang simple, ou additionnée aux vitamines.

c-Milieux d’enrichissement :

Permettent de favoriser une croissance bactérienne à partir du prélèvement pauci-bacillaire

Il s’agit de milieux liquides riches permettant le développement d’un maximum de bactéries.

Exemple : Bouillon pour hémoculture, BGT (Bouillon Glucosé Tamponné).

d-Milieux sélectifs :

Permettent la pousse d’un seul type bactérien, pour cela on utilise des inhibiteurs pour réprimer les autres genres, ex : Gélose Hektoen qui permet la culture des BGN, bacilles Gram négatives non exigeantes, la gélose contient la bile inhibitrice des BGP.

e-Milieux électifs :

Permet la pousse favorable d’un genre bactérien par rapport aux autres sans leur destruction,

Exemple : Eau peptonée alcaline (EPA), dont l’alcalinité favorise la pousse du vibrio (germe responsable du cholera) (préfère un milieu alcalin).

f-Milieux d’identification :

Permettent l’étude du métabolisme biochimique des bactéries,

Exemple : TSI (Tri Sugar Iron.), Milieu de Ferguson.

g-Milieux de conservation :

Selon leur composition, on peut conserver aussi bien les bactéries non exigeantes que les bactéries exigeantes :

-Pour les non-exigeantes on utilise un milieu solide qui est une gélose profonde en capillaires que l’on conserve à température ambiante.

-Pour les bactéries exigeantes, on utilise un milieu liquide qui est du BGT + Glycérol que l’on congèle à -80°C.

h-Milieux de transport :

Il existe plusieurs types en fonction de la bactérie à transporter et de sa fragilité,

Exemple : TGV (milieu de transport de germes vivants)

 Milieu au charbon pour les bactéries fragiles.

i-Milieux pour antibiogramme :

Exemple : Mueller Hinton simple ou enrichi au sang,

Dont la composition est proche de celle des liquides biologiques, de ce faite l’activité des antibiotiques in vivo est comparable à celle obtenue in vitro après diffusion sur la gélose.

j-Milieux chromogènes ou milieux différentiels :

Permettent l’identification directe de certaines espèces bactériennes sans avoir recourt à une galerie biochimique ou l’orientation vers certains groupes bactériens, la gélose renferme des substrats incolores dont la dégradation par les enzymes respectives apportées par des bactéries conduit à des colonies colorés.

Exemple : Milieu uriselect (BioMérieux), qui contient de l’urée comme substrat pour l’uréase (enzyme apportée par le proteus)

Remarque : Ces milieux peuvent également détecter certains mécanismes de résistance aux antibiotiques en renfermant dans leur composition un antibiotique spécifique du mécanisme recherché à une concentration supérieure à la concentration minimale inhibitrice (Cantibiotique > Cmin inhibitrice).

Exemple : bêta-Lactamase à spectre élargi (BLSE) ou encore *Staphylococcus aureus* résistant à la Méticilline (MRSA).

4)-Classification selon le mode de stérilisation :

Il existe 02 types de milieu :

-Milieux autoclavables : milieu de culture dont les composants ne sont pas détruit par la chaleur,

Exemple : milieu gélose nutritive, Mueller Hinton en flacons.

-Milieux non-autoclavables : Milieux de culture qui contiennent des produits labiles pouvant être détruit par la chaleur,

 Exemple : Loweinstein-Jensen (cultiver les mycobactéries -> Tuberculose).

IV-Présentation des milieux de culture :

1)-Les milieux déshydratés :

-C’est une poudre conditionnée en boites de 250 ou 500g.

2)-Les milieux solides :

-Gélose en flacons

-Gélose en boites de pétri

-Gélose en tube incliné, ex : Citrate de Simmons.

-Gélose en culot et pente inclinée, ex : TSI

-Gélose profonde, ex : MEVAG

-Gélose profonde en capillaire, ex : VF (viande foie) ou milieu de conservation.

3)-Les milieux liquides :

-Milieux liquides en flacons, ex : Bouillon d’hémoculture.

-Milieux liquides en tubes, ex : BGT.

-Milieux liquides en ampoules, ex : AA (acides aminés).

V-Techniques de préparation des milieux de culture :

La préparation d’un milieu de culture peut se faire soit à partir d’une poudre lyophilisée, soit directement à partir d’une gélose de base en flacons que l’on peut couler telle quelle, ou l’enrichir en facteurs de croissance avant de la conditionner en boites de pétri.

1)-Milieu déshydraté :

-Peser la quantité adéquate de poudre du milieu à préparer, et la diluer dans de l’eau distillée stérile dans une fiole jaugée.

-Conditionner le mélange liquide en flacons en verre stérile ensuite les fermer afin de les autoclaver.

-Apres le cycle de stérilisation, le milieu liquide est coulé en boites de pétri sur une hauteur de 4mm et laisser solidifier sur paillasse, l’ajout de facteurs de croissance (sang et complexe multivitaminé) au milieu de base doit se faire après le cycle de stérilisation dans des conditions d’asepsie rigoureuses.

2)-Milieu gélosé en flacons :

-Mettre le flacon de gélose, ex : gélose nutritive ou Columbia, dans un bain marie bouillant (100°C) jusqu’à fusion complète.

-Laisser refroidir le flacon à l’air libre ou sous un robinet d’eau froide,

-Couler dans des boites de pétri de 90mm de diamètre, sur une hauteur (épaisseur) toujours de 4mm.

-Laisser solidifier la gélose

-Conserver les boites à 4°C en les mettant en réfrigérateur.

(!) - Si le milieu préparé doit être enrichi en sang, on peut utiliser du sang (de mouton ou de cheval) selon les étapes suivantes :

-Faire fondre la gélose au bain marie bouillante ex : Gélose nutritive ou Columbia ou Muller Hinton (antibiogramme)

-Laisser refroidir à 45°C à l’air libre dans un bain marie réglable.

-Additionner 12,5ml de sang dans le flacon de 250ml de gélose.

-Homogénéiser délicatement jusqu’à obtention d’une couleur rouge sang pour une GSF.

-Sinon il faut remettre le flacon dans le bain marie en surveillant le virage de la couleur rouge vers le marron chocolat (GSC) ensuite

-Couler en boite de pétri comme précédemment

-Laisser solidifier la gélose

-Conserver à +4°C.

VI-Contrôle de qualité des milieux de culture :

-C’est une étape réalisée juste après la préparation des milieux de culture,

-Avant de les conserver au réfrigérateur à +4°C il faut réaliser 02 tests :

-Test de stérilité : incuber les boites dans une étuve à 35°C pendant 18 à 24h, même haut de là, l’absence de culture bactérienne valide le test

-Test de fertilité : Ensemencer sur les milieux préparés une souche qui croit habituellement (souche de contrôle) et incuber pendant 18 à 24h il ne faut pas dépasser ce délai (sinon le milieu ne sera pas bon), à 35°C une culture positive de cette même souche valide le test.

VII-Ensemencement et techniques d’ensemencement :

Schéma : 1ere variante : But : 4eme quadrant : Distinguer les colonies en

appréciant leur aspect.

 (1), (2)=Stries très serrées.

🡪(Incubation)🡪 (3), (4)= aérées.

L’ensemencement doit être effectué dans des conditions d’asepsie rigoureuses à partir d’un prélèvement d’une colonie ou d’un bouillon bactérien avec une anse de platine ou une pipette de pasteur, peut être réalisé sur un milieu liquide ou solide.

1)-Ensemencement sur un milieu solide :

a)-Milieu en boite de pétri :

Il existe plusieurs techniques d’ensemencement sur boites :

1ere-Isolement ou épuisement :

-c’est la technique des 4 quadrants qui consiste à disperser le microorganisme à la surface d’un milieu solide afin d’obtenir des colonies séparées, ainsi permet de retrouver tous les microorganismes d’un mélange, mais aussi de vérifier la pureté d’une souche bactérienne.

-Technique :

sur boite de pétri préalablement séchée sur laquelle on a dessiné des quadrants, déposer le produit à analyser sur le 1er quadrant, réaliser des stries très serrées ensuite passer au 2eme sans toucher le 1er, ou stériliser la pipette ou l’anse et reprendre du 1er quadrant, les stries doivent être toujours serrées ensuite passer au 3eme et au 4eme quadrant en desserrant légèrement les stries, la culture se traduit par des colonies sur les stries.

-Sur ce milieu, on pourra définir l’aspect des colonies mais aussi la présence ou non de l’hémolyse complète ou incomplète lorsqu’il s’agit d’une GSF.

2eme variante :



2eme-Beurrage :

-Technique d’écouvillonnage qui consiste à réaliser un ensemencement très riche (pour les bactéries exigeantes et fragiles).

3eme-Antibiogramme :

-à partir d’une suspension bactérienne d’une opacité ou densité optique bien définie, on réalise des stries serrées à l’aide d’un écouvillon.

4eme-Dénombrement :

-Ensemencement par étalement au râteau d’un volume connu d’une suspension bactérienne.

b)-Milieu incliné en pente :

Ensemencer toujours du bas en haut par des stries serrées,

Résultat : la culture se traduit par apparition de colonies ou virage de la couleur de l’indicateur pH.

c)-Milieu en culot :

Ensemencement par piqure centrale, même résultat

d)-Milieu en culot + pente :

Commencer par ensemencer la pente par des stries serrées ensuite culot par piqûre centrale, même résultat.

e)-Milieu d’ensemencement en masse :

Se réalise en tube ou en boite, consiste à déposer le produit à analyser (eau ou nutriments) et rajouter la gélose dessus refroidie à 45°C, laisser se solidifier et incuber.

Technique surtout utilisée en bactériologie alimentaire et contrôle des eaux, le lendemain il y aura apparition des colonies lenticulaires à l’intérieure de la gélose

2)-Ensemencement sur milieu liquide :

On peut ensemencer un milieu liquide :

-soit à partir d’un produit liquide, on met quelques gouttes dans le milieu à ensemencer avec pipette de pasteur,

-soit à partir d’un produit solide, écraser la colonie prélevée à l’aide d’une anse de platine ou pipette de pasteur sur la paroi du tube, pour obtenir une suspension homogène.

VIII-Culture cellulaire :

Certaines bactéries sont à multiplication intracellulaire et nécessitent pour leur culture des milieux à base de cellules dans lesquelles on rajoute des facteurs de croissance et indicateurs de pH, ensuite on injecte la bactérie qui va se multiplier dans les cellules et la croissance bactérienne est mise en évidence par des techniques colorimétrique ou immunologique,

Exemple : MGG ou immunologique avec des Anticorps monoclonaux marqués par une enzyme ou immunofluorescence ex : Chlamydia.