

## Travaux Pratiques 4 : Techniques de culture bactérienne

### -Préparation des milieux de cultures-



**1-Définitions :** Un milieu de culture est une préparation constituée à partir de substances biologiques ou chimiques, reproduisant un environnement favorable pour la culture des micro-organismes. Ces milieux sont utilisés par les microbiologistes pour isoler, produire et identifier les micro-organismes.

### 2-Composition des milieux de culture :

Un milieu de culture doit contenir :

- ✓ **Des nutriments :** couvrant les besoins élémentaires en ions minéraux et facteurs de croissance et des besoins énergétiques apportant la source de carbone et d'énergie ;
- ✓ **Des substances tampons :** pour maintenir un pH plus ou moins constant voisin du pH optimal;
- ✓ **NaCl ou autres minéraux :** pour maintenir l'isotonicité par rapport au milieu intracellulaire c'est-à-dire la pression osmotique (ce qui veut dire présenter une force ionique optimale car il peut être isotonique mais ce n'est pas obligatoire);
- ✓ **Des agents inhibiteurs :** inhibition d'un groupe microbien, sélection des autres;
- ✓ **Des indicateurs :** non toxiques pour les micro-organismes, ils révèlent la présence de produits issus du métabolisme.

### 3- Les différents types des milieux de culture :

Les milieux de culture sont classés selon leurs aspects, leurs utilisations et leurs constituants :

**3-1- Les milieux de culture selon leurs constituants :** Suivant l'origine des constituants d'un milieu de culture on peut distinguer : les milieux synthétiques (ou définis) et les milieux empiriques (ou naturels ou complexes)

**Les milieux synthétiques (ou définis) :** Milieux constitués de substances chimiques pures, leur composition qualitative et quantitative est rigoureusement connue. Ce sont des milieux relativement pauvres. Ils sont utilisés:

- -Pour les micro-organismes autotrophes (Cyanobactéries)
- -Pour étudier les besoins nutritifs d'un micro-organisme
- -Pour les dosages par voie microbiologique: acides aminés, vitamines (dosage de la vitamine B12)
- -Pour la mise en évidence de certains caractères biochimiques (Citrates de Simmons, uréase)

**Les milieux empiriques (ou naturels ou complexes) :** Milieux de composition approximative car ils contiennent des composants indéfinis comme des peptones, des extraits de viande, des extraits de levures, des liquides biologiques. Ce sont des milieux très riches en substances organiques permettant une croissance aisée de nombreux microorganismes. Ces différents composants mal définis vont couvrir les besoins nutritifs ainsi que les besoins en énergie et sont spécifiques pour les micro-organismes chimio-organotrophes, hétérotrophes et auxotrophes.

### 3-2-Les milieux de culture selon leurs usages :

**3-2-1-Les milieux dits "de base" ou usuels :** Un emploi aussi universel que possible, milieu ou milieu qui cultive un maximum de micro-organismes hétérotrophes ne présentant pas d'exigences nutritives particulières. Un micro-organisme cultivé sur ce type de milieu est dit de culture facile ou non exigeant (ce qui ne l'empêche pas d'être éventuellement auxotrophe vis-à-vis de facteurs de croissance apportés par les peptones des milieux ordinaires.

**Exemple :** Gélose ordinaire ou nutritive, Bouillon Trypticase soja.

**3-2-2-Les milieux d'isolement :** Ils sont caractéristiques du micro-organisme recherché et sont solides. Les milieux d'isolement (sélectifs ou non) permettant la mise en évidence d'un caractère biochimique et donc distinguant différentes catégories de micro-organismes sont aussi appelés des milieux différentiels :

- ❖ **Milieux enrichis :** Ils sont obtenus en incorporant à un milieu de base adéquat des liquides ou suspensions riches en molécules organiques diverses : du sang, du sérum, du liquide d'ascite, de l'extrait globulaire, des suppléments poly vitaminiques. Ils

permettent la pousse de nombreux germes exigeants ou très exigeants. Les plus utilisées sont les géloses au sang frais ou au sang cuit, et la gélose chocolat. Par ailleurs, il permet la lecture d'un caractère important lors de la détermination du germe : l'hémolyse. Le sang peut être d'origines diverses : cheval, mouton, lapin, homme, bœuf (attention certains germes présentent un type d'hémolyse sur un sang et un autre type d'hémolyse avec un autre sang). Il est à ajouter à raison de 5 à 10% au milieu de base (Columbia, Trypticase soja, Mueller Hinton, cœur cerveau). Celui-ci ne doit pas contenir de glucose, car il inhibe les hémolysines.

- ❖ **Milieux électifs** : Ils favorisent la croissance d'une (ou de quelques) espèces bactériennes. Ces milieux ne contiennent aucune molécule inhibitrice. Par exemple la gélose Mueller Hinton: milieu riche de référence pour la réalisation d'antibiogramme. Sa composition permet la pousse de nombreux micro-organismes.
- ❖ **Milieux sélectifs** : C'est un milieu de base contenant un ou plusieurs agents sélectifs qui sont des inhibiteurs pour les micro-organismes que l'on désire éliminer (mélange poly-microbien), la sélection peut être chimique ou antibiotique. Ce sont des milieux riches ou non et donnant souvent un ou plusieurs caractères biochimiques d'orientations permettant une identification plus simple des germes. Par exemple la gélose Chapman.

**3-2-3-Les milieux d'enrichissement** : Ce sont des milieux liquides favorisant la croissance du micro-organisme recherché (substrats spécifiques ou molécules à action sélective inhibitrice et/ ou conditions de cultures particulières telle que la température). Après incubation on obtient une culture enrichie en micro-organismes recherchés.

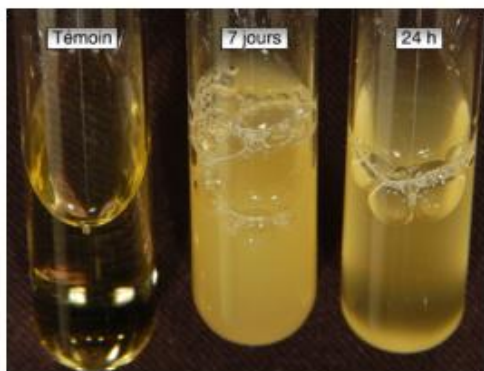
- ✓ *Enrichir, c'est augmenter la représentation (proportion) d'un sous-groupe de micro-organismes dans un ensemble plus vaste.*

**3-2-4-Les milieux d'orientation et d'identification** : Ces milieux permettent la mise en évidence de caractères biochimiques.

**3-2-5-Les milieux de conservation** : Ces milieux permettent la survie des micro-organismes utilisant un métabolisme ralenti. Il s'agit en général de milieux très pauvres.

**3-3-Les milieux de culture selon leurs aspects** : Une autre distinction de milieu se fait par la consistance de ceux-ci. En effet, les micro-organismes se développent parfaitement dans les milieux liquides mais l'isolement bactérien nécessite des milieux solides afin de séparer les différents germes présents dans un prélèvement:

**Les milieux liquides** : Les constituants du milieu liquide sont dilués dans l'eau (bouillon). Les bactéries troublent le milieu formant des agglomérats (Figure 1).



### Milieu liquide (Bouillon nutritif)

Témoin : limpide

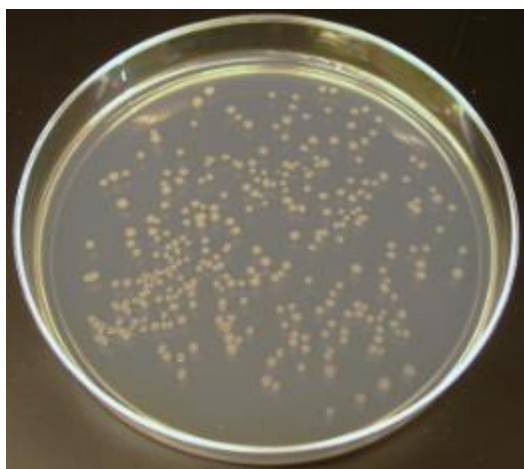
Après 24h et 7jours d'incubation : trouble

**Figure 1** : Croissance bactérienne en milieu liquide

**Les milieux solides** : Ce sont des milieux liquides auxquels on ajoute un élément gélifiant, souvent un polysaccharide.

**-Agar**: polysaccharide sulfaté extrait d'algues rouges, non dégradable, présentant la propriété de former avec l'eau un gel solide à une température inférieure à environ 60°C tout en étant liquéfiable par ébullition, auquel cas, il reste en surfusion (liquide) jusqu'aux environs de 45°C. D'autre part, très peu de microorganismes sont capables d'hydrolyser l'agar, le plus commun (15g/l).

**-Gel de silice**: utilisé pour la culture d'autotrophes (CO<sub>2</sub> source de carbone)



### Milieu solide (Gélose nutritive)

Après 24h d'incubation : Colonies

**Figure 2** : Croissance bactérienne en milieu solide

## 4-Préparation des milieux de cultures :

Les milieux de culture peuvent être :

- Commercialisés : «prêts à l'emploi», «prêts à couler» ou en poudre (mélange complet des constituants de base);
- Préparés en mélangeant les différents composants le constituant (cas des milieux synthétiques).

***Pour préparer un milieu de culture :***

1. Évaluer le volume de milieu nécessaire,
2. Mesurer la masse nécessaire de poudre,
3. Mettre la poudre en suspension dans un volume de diluant inférieur au volume nécessaire, Chauffer pour dissoudre en agitant (à ébullition en général),
4. Ajouter le complément de diluant,
5. Rectifier le pH par addition de NaOH ou HCl à 1 ou 0,1 mol/dm<sup>3</sup> à l'aide d'un pH-mètre, sauf si le fabricant indique le contraire,
6. Conditionner, en prenant garde à la solidification d'un milieu contenant de l'agar et en respectant les contraintes de volumes pour certains milieux.
7. La préparation nécessite une stérilisation : par autoclave (15 à 20 minutes à 120°C) ou par filtration si certains composants sont thermolabiles.