

MILIEUX DE CULTURE

Introduction

Un milieu de culture doit satisfaire à toutes les exigences nutritives des micro-organismes :

- apport de la source d'énergie, de carbone, d'azote;
- besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance;
- pH et force ionique voisins des valeurs optimum.

Il peut se présenter sous forme liquide ou solide, par addition :

- d'agar ou gélose (intérêt : fusion au delà de 80°C, mais possibilité de le maintenir en surfusion à 45°C, température compatible avec l'incorporation de micro-organismes ; pas d'hydrolyse de l'agar par les μ -org),

C'est un polymère sulfaté composé de D- et L-galactose. Il est produit par les Rhodophycées (algues rouges)

- de gélatine (hydrolysable par certains germes, utilisation historique),
- œuf entier coagulé (milieu de Jensen pour *Mycobactéries*).
- Gel de silice, utilisé pour la croissance des bactéries autotrophes sur milieu solide (si on veut exclure toute molécule organique).

1. Préparation des milieux

1) Considérations générales :

La plupart des milieux se présentent sous forme déshydratée, ce qui assure une composition constante, un stockage facile et une préparation simplifiée.

Lors de la reconstitution des milieux, la poudre est mélangée au volume d'eau préconisé, **homogénéisée, puis dissoute totalement par chauffage (l'ébullition ne doit pas dépasser 1 à 2 minutes)**. Après refroidissement à 50-60°C, le milieu est distribué dans d'autres récipients (tubes à essais) en vue d'être stérilisé.

La stérilisation se fait par autoclavage. Le temps et la température peuvent varier d'un milieu à l'autre (tenir compte également du conditionnement, de préférence des petits volumes). En **général une stérilisation de 15-20 minutes à 120°C est préconisée**.

Les milieux sont ensuite laissés à refroidir jusqu'à 50°C dans l'autoclave (ne pas les sortir avant car la différence de températures provoquerait une dépression au sein des tubes).

Ils peuvent ensuite être conservés tels quels après refroidissement en position verticale, ou inclinés en pente ou pente et culot, ou distribués en boîte de pétri.

2) Cas particuliers :

Certains milieux nécessitent **l'adjonction de produits** ne supportant pas l'autoclavage (sang frais, jaune d'œuf, antibiotiques, compléments vitaminiques...). Ces compléments doivent alors être apportés stériles dans la gélose en surfusion. La stérilité des additifs est assurée soit au moment du prélèvement, soit par filtration.

Certains milieux nécessitent d'être **régénérés** avant utilisation : ils sont placés pendant 20 minutes dans un bain-marié bouillant de sorte à chasser l'oxygène dissout (Ex : gélose VF, milieu Hugh-Leifson ...).

Les milieux qui doivent être **ensemencés en profondeur** sont préalablement liquéfiés au bain-marié, puis maintenus en **surfusion** (45-50°C) en bain thermostaté jusqu'à leur ensemencement.

2. Différents types de milieux

1) Milieux synthétiques ou définis :

Composition connue exactement qualitativement et quantitativement. Ces milieux sont utilisés essentiellement pour l'étude de besoins nutritifs d'un germe.

Peu sont utilisés couramment : **Gélose pour auxanogramme , Citrate de Simmons, Urée-Indole ...**

On les rencontre également pour la culture de micro-organismes autotrophes chimio-lithotrophes telles que les cyanobactéries.

Dans ce cas :

- le carbone est apporté sous forme de carbonate de sodium,
- l'azote est apporté sous forme de nitrate ou d'ammoniac,

- les autres sels minéraux sont les phosphates, sulfates, chlorures ...

2) Milieux empiriques ou complexes:

Composition connue partiellement car utilisation de matières premières +/- complexes : sérum, sang, peptone (hydrolysats pepsiques ou trypsiques de matière organique - foie, viande, soja, caséine ...- constituent la source azotée)

Milieux usuels : composition et préparation simple, peu coûteux et convenant à un grand nombre de germes. Ex :

- **Eau peptonée, bouillon nutritif**, dont les peptones sont simples, pour les germes hétérotrophes ne présentant pas d'exigence particulière.

- **TS, Columbia, Mueller-Hinton** : peptones plus riches pour les germes plus exigeants

Milieu enrichi : addition de suspensions riches en molécules organiques (sang, sérum, extrait globulaire ...). Cf plus loin.

Milieux sélectifs : contiennent des molécules empêchant la culture de certains micro-organismes. Ils sont utilisés pour isoler les germes de produits poly-microbiens. La nature des inhibiteurs est variable, il peut s'agir :

- de NaCl : milieu de **Chapman** à 75‰ pour *Staphylococcus*, **bouillon hypersalé** à 65‰ pour *Enterococcus*.

- de sels biliaires (désoxycholate) : **Mac Conkey, Hektoen** pour *Enterobacteriaceae*

- d'antibiotiques: **gélose au sang + ANC** (acide nalidixique, colistine) pour les *Streptococcus*.

- d'antiseptiques : **gélose au cétrimide** pour *Pseudomonas*

Rmq :

1- On peut également augmenter la sélectivité des milieux en choisissant des conditions de culture particulières.

Ex : la **gélose au cétrimide** placée à 42°C est plus sélective pour *Pseudomonas aeruginosa*.

2- On parle de milieu "électif" lorsqu'il ne contient pas d'agent inhibant mais qu'il favorise la croissance d'un type de germes.

Le principal exemple est la **gélose au sérum coagulé** pour les corynébactéries.

Milieux d'orientation et d'identification ou milieux différentiels: la plupart des milieux contiennent des éléments permettant de mettre en évidence des caractères biochimiques en vue d'une orientation du diagnostic.

La lecture de ces milieux peut :

- soit se faire directement :

- virage d'un indicateur de pH indiquant la consommation d'un sucre (milieu **BCP** pour le lactose chez les Entérobactéries, **Chapman** pour le mannitol chez les *Staphylococcus* ...)

- présence d'ions fer III qui révèlent la production d'H₂S par apparition d'un précipité noir (milieu **Hajna-Kligler**, milieu SS...)

- soit se faire après addition de réactifs :

- addition d'acide sulfanilique et d' α -naphtylamine pour révéler la réduction des nitrates dans le **bouillon nitrate**

- addition de perchlorure de fer pour révéler la présence d'une tryptophane désaminase en milieu **Urée-Indole** ...

3. Les milieux enrichis

1) Milieux au sang:

- **Milieu au sang frais** : addition du sang défibriné stérile dans la gélose en surfusion (~ 5%). Utilisation de sang de mouton (indispensable pour le test de Camp) ou de cheval (permet une meilleure expression de l'hémolyse de certains *Streptococcus* du groupe D).

Intérêt : - apport de facteurs de croissance,

- activités peroxydase et catalase qui favorisent la croissance des germes qui en sont dépourvus (*Streptococcaceae*),

- neutralisation de certains inhibiteurs contenus dans les peptones,

- lecture des caractères d'hémolyse dus à la présence de lécithinase (= acétylcholine-

estérase).

On parle d'hémolyse alpha (α) lorsqu'elle est incomplète (zone verdâtre autour de la colonie), bêta (β) lorsqu'elle est totale, ou de souche non-hémolytique.

Limites : présence de transferrine qui peut mobiliser tout le fer disponible et empêcher la croissance de certains μ -org.

- **Milieu au sang cuit** : préparation idem sang frais + chauffage 10 min à 75°C.

- **Gélose chocolat** : autoclavage d'un milieu de base + hémoglobine (milieu moins riche que le précédent, souvent ajout de compléments poly-vitaminiques)

Intérêts : - la cuisson permet de libérer certains facteurs de croissance (telle que l'hémine = précurseur de coenzyme, transporteur d'électrons des cytochromes; NAD)

- destruction de certains inhibiteurs
- libération du fer III de la transferrine

2) Autres additifs:

- **Extrait globulaire** : obtenu par expression d'un caillot de sang au travers d'un linge, il est stérilisé par filtration. Ajouté dans les milieux de base à hauteur de 10%, sa caractéristique fondamentale est sa richesse en hémine (facteur X).

- **Sérum** : obtenu par séparation du coagulum d'un sang normal ou par décantation d'un sang défibriné. Il est stérilisé par filtration ou par tyndallisation. Ajouté à 5-10% dans les milieux, il permet la croissance des germes sérophiles (**Gélose au sérum coagulé** pour *Corynebacterium*)

- **Ascite** : le liquide est obtenu par ponction stérile chez des individus atteints d'hydropisie (accumulation de sérosité dans une cavité naturelle du corps). Il contient les mêmes éléments que le sérum, mais moins de glucose et d'enzymes pouvant interférer avec les recherches biochimiques réalisées.

- **Jaune d'oeuf** : prélevée stérilement, la solution de jaune d'oeuf est additionnée aux milieux usuels pour permettre la recherche de la lécithinase (**milieu Baird-Parker** pour *Staphylococcus aureus*)

- **Lait** : possibilité d'utiliser le lait UHT, qui est stérile. Utilisé pour l'isolement et le dénombrement des bactéries lactiques, pour la recherche de l'hydrolyse de la caséine.

4. Les micro-méthodes : galeries miniaturisées

Avec la multiplication des analyses bactériologiques, se sont développés des systèmes permettant d'associer rapidité, reproductibilité et faible coût : les macro-galeries classiques ont été progressivement miniaturisées. On distingue deux catégories de dispositifs :

- certains proposent un assemblage de milieux classiques prêts à l'emploi disposés en mini tubes ou en compartiments juxtaposés dans un même conditionnement.

Dans ce cas l'ensemencement se fait dans les mêmes conditions que pour la galerie classique, les temps d'incubation et la lecture sont équivalents. Ex : **Galeries Pasteur, Entérotube Roche**

- d'autres proposent un assemblage de cupules contenant des substrats déshydratés qui sont régénérés avec la suspension de la bactérie à étudier.

Ces dispositifs nécessitent de travailler en conditions standardisées : densité et quantité de l'inoculum, atmosphère d'incubation ...

La réduction du temps d'incubation est possible grâce au travail avec des inoculum plus denses ou à l'utilisation de substrats artificiels (réactions plus sensibles).

Ex : **Galeries API, Rapid**

BIBLIOGRAPHIE

Le laboratoire de bactériologie médicale (MARCHAL N., BOURDON J.L, BIMET F.)

Microbiologie technique : 1-Dictionnaire des techniques (JOFFIN J.N., LEYRAL 6.)

Microbiologie (PRESCOTT, HARLEY, KLEIN)