**TD2 : Les milieux de culture**

1. **Définition :**

Un milieu de culture : est une préparation stérile, solide, semi solide ou liquide au sein de laquelle des microorganismes peuvent se multiplier. Il doit donc comporter tous les éléments nutritifs et les conditions physico-chimiques nécessaires au développement des germes.

Un bon milieu de culture doit :

* Etre stérile
* Etre nutritif : contient quantitativement et qualitativement les aliments exigés pour la croissance et l’entretien des microorganismes.
* Contenir l’eau nécessaire au métabolisme microbien.
* Avoir un pH
* Présenter une force ionique optimale.
1. **Termes fréquemment utilisés :**

**Ensemencer**: Déposer dans un milieu de culture stérile des germes prélevés à partir d’une culture mère.

 **Culture :** Une population microbienne en croissance active dans un milieu nutritif

 **Agar agar ou gélose** : Une substance extraite des algues marines rouges. C’est un polysaccharide complexe commercialisé sous forme de poudre ou de granulés. Il se liquéfié à 100°C et qui se solidifie à moins de 60°C. il n’est pas une source nutritive pour les microorganismes.

**Peptone**: ce sont des hydrolases enzymatiques de protéines animales ou végétales riches en acides aminés et en peptides.

**Extrait de viande** : Ce sont des extraits aqueux de viande bovine. Ils donnent les sels minéraux, des vitamines, des protéines et des glucides.

**Extrait de levure** : c’estt une source d’acides aminés et de vitamines.

1. **Qualités exigibles d’un milieu de culture :**

Un milieu de culture doit satisfaire les exigences nutritives du microorganisme étudué, ce qui implique :

* 1. **Les besoins nutritifs :** Un milieu de culture doit couvrir les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance, apporter la source de carbone et d’énergie. Ces besoins nutritifs sont de deux types :
1. **Les besoins élémentaires** : selon leur nature, on définit différentes catégories de bactéries : Ce sont les types trophiques.
* **Source de carbone**

 Les exigences nutritionnelles en carbone conduisent au classement des micro-organismes en deux grandes catégories :

- **Les autotrophes :** sont capables de se développer en milieu minéral (inorganique) en utilisant le dioxyde de carbone (CO2) ou les ions hydrogénocarbonates (HCO3-) comme seule source de carbone pour synthétiser leurs constituants carbonés ;

- **Les hétérotrophes**, exigent des molécules organiques (sucres et dérivés, acides organiques, peptides et acides aminés…), pour leur croissance. Certains micro-organismes sont capables d’assimiler de nombreuses substances organiques différentes, tandis que d’autres ont des capacités métaboliques restreintes à quelques substrats (voir un seul).

* **Source d’énergie**

Il existe seulement deux sources d’énergie disponibles pour les êtres-vivants :

- **l’énergie lumineuse**, transformée en ATP par **les phototrophes**, grâce à des pigments (chlorophylles, bactériochlorophylles, carotènes…) ;

- **l’énergie chimique,** provenant de l’oxydation de molécules minérales **(chimiolithotrophes)** ou organiques **(chimioorganotrophes).**

* **Source d’azote**

Les micro-organismes peuvent puiser l’azote dans des molécules organiques (acides aminés, basesazotées) ou plus généralement dans des composés minéraux :

- **les ions ammoniums,** **NH4+** ;

- **les ions nitrates, NO3-** (grâce à nitrate réductase B dite assimilatrice) ;

- **l’azote atmosphérique, N2** (grâce à la nitrogènase, présente chez Rhizobium et Azotobacter).

* **Source de soufre et de phosphore**

 Les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) peuvent fournir le soufre aux micro-organismes. Dans de nombreux milieux de culture, le soufre est fourni sous forme d’ions sulfates (SO42-), réduits en sulfites (SO32-) puis en sulfures (H2S). H2S est ensuite incorporé à la sérine pour former la cystéine.

Le phosphore entre généralement dans la cellule sous la forme d’ions phosphates (PO43-).

**B. Besoins en facteurs de croissance**

*E. coli* est capable de se développer dans un milieu minéral additionné de glucose : elle peut donc synthétiser tous ses constituants carbonés à partir d’une seule source de carbone (le glucose par exemple).

*Proteus vulgaris* n’a pas cette capacité : il ne peut se développer dans un tel milieu que si de l’acide nicotinique lui est fourni en petite quantité. *Proteus vulgaris* est **auxotrophe** pour l’acide nicotinique, qui représente un facteur de croissance pour cette espèce bactérienne. E. coli est dite **prototrophe**, car elle n’exige pas de facteur de croissance.

Un facteur de croissance est une molécule organique qu’un micro-organisme doit puiser dans son milieu car il ne peut pas le synthétiser. Les facteurs de croissance sont répartis en trois classes :

- **les acides aminés**, nécessaires à la synthèse des protéines ;

- **les bases azotées** (purines et pyrimidines), nécessaires à la synthèse des acides nucléiques ;

- **les vitamines, coenzymes (ou leurs précurseurs)** indispensables pour de nombreuses réactions.

 **Récapitulatif des différents types trophiques**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Classe du besoin |  Nature du besoin |  Type trophique |
| Source d’énergie | * Lumineuse
* Chimique
 |  Phototrophe Chimiotrophe |
| Donneur d’électron(Substrat énergétique) | * Minéral
* Organique
 |  Lithotrophe Organotrophe |
|  Source de carbone | * CO2 (minérale)
* Organique
 |  Autotrophe Hétérotrophe |
| Facteurs de croissance | * Non indispensable
* Indispensable
 |  Prototrophe Auxotrophe  |

* 1. **Les conditions physiques :**

Ce sont des facteurs qui conditionnent l’environnement des microorganismes : Eau, Température, pH, la pression osmotique, oxygène. Ils peuvent favoriser, empêcher ou inhiber la croissance et la nutrition de ces microorganismes.

1. **Le taux d’humidité** :
* Il est apporté par l’eau distillée
* L’eau représente 80% des constituants cellulaires, elle présente une grande affinité aux nutriments (sucre, sels) et participe aux réactions d’hydrolyse, elle est indispensable au developpement.
1. **La température** :

Elle influence le métabolisme et la croissance des microorganismes. Selon leurs températures optimales, les microorganismes sont dits :

* **Psychrophile**s : optimum entre 10 et 15°C (proche de 0°C)
* **Mésophiles**: entre 20 et 40°C (majorité des bactéries)
* **Thermophiles** : entre 45 et 70°C (*Bacillus, Clostridium*)
* **Thermophiles extrêmes** : supérieures à 80°C
1. **Le pH**

C’est la mesure de l’activité des ions hydrogène d’une solution. Le pH a une grande incidence sur l’équilibre ionique du milieu (perméabilité cellulaire et la disponibilité en nutriments). Selon leur pH optimal de croissance, on distingue des bactéries :

* **Acidophiles** : entre 1 et 5,5 (*Lactobacillus*)
* **Neutrophiles** : entre 5,5 et 8,5 avec un optimum de 7 (La majorité des bactéries)
* **Basophiles ou alcalophiles** : entre 8,5 et 11.5 (*Vibrio*).
1. **La pression osmotique :**

 C’est la force qui attire l’eau au travers de la membrane qui sépare deux milieux liquides. Le créateur de cette force c’est le sel (NaCl) qui attire l’eau. Tous les microorganismes sont sensibles à l’osmolarité du milieu environnant, selon cette sensibilité on distingue les :

* **Halophiles**: (2,8<NaCl<6,2 M)
* **Non halophiles** : NaCl inférieur à 0,2M
* **Halotolérants** : Hautes concentrations en sel
1. **La classification des milieux de culture :**

 Les milieux sont classés :

 1. **Selon la croissance :**

* **Les milieux liquides (bouillons)** :
* Ne contiennent pas un agent solidifiant (0% d’agar agar ou gélose)
* Ils permettent la culture en suspension
* La croissance se traduit par la transformation d’un milieu limpide (non inoculé) en milieu inoculé turbide(trouble). Exple : Bouillon nutritif
* **Les milieux solides (gélosés)** :
* C’est des milieux liquides auxquels on ajoute un agent de solidification tel que l’agar agar (1.5-2%).
* Les milieux solides peuvent étre conditionnés en boites de Pétri ou en tube à essai (gélose en culot, gélose en pente).
* La croissance se fait par l’apparition des colonies. Exple : Gélose nutritive.
* **Les milieux semi solides :**

C’est des géloses molles, ont une teneur de 0.5 à 0.75% d’agar et présentent une consistance intermédiaire. Exple :Gélose viande foie.

**2. Selon la composition** :

* **Les milieux complexes (naturels ou empiriques)**

Ce sont des milieux de composition complexe mal définie. Ils sont constitués d’un produit naturel : peptones, extrait de viande, extrait de levure, lait…etc

Exemple : Bouillon nutritif pour bactéries.



* **Les milieux synthétiques ou définis :**

Ce sont des milieux dont on connait exactement la composition chimique, tant d’un point de vue qualitatif que quantitatif. Ils sont utilisés dans la recherche d’une réaction enzymatique précise. Ce sont les milieux les plus couramment utilisés.

Exemple : Milieu citrate de Simmons, milieu urée indole…..etc



**3. Selon l’utilisation :**

1. **Les milieux de base ou milieux usuels :**

Ce sont des milieux ou on cultive un maximum de microorganismes hétérotrophes ne présentant pas d’exigences nutritives particulières. Exemple : La gélose nutritive pour les bactéries, le milieu Sabouraud pour les levures et moisissures.

1. **Les milieux d’isolement :**

Ce sont des milieux servant à séparer les bactéries contenues dans un échantillon polymicrobien pour pouvoir à la suite les étudier séparément. Ces milieux peuvent être

 **B.1. Milieux d’enrichissement :**

C’est des milieux enrichis d’une substance biologique (sang frais, sérum, jaune d’œuf… etc) ou de suppléments polyvitaminiques, favorisant la croissance de certains germes que l’on désire isoler.

Exemple : la gélose au sang (milieu enrichi du sang pour les bactéries à Gram positif tels Streptocoque)

 **B.2. Milieux sélectifs :**

Des milieux contenant des agents sélectifs appelés inhibiteurs ( sel ,colorant,antibiotique) ou de conditions de culture défavorables qui empeche la culture des germessauf celui qu’on étude.

Exemple : Gélose Chapman pour Gram+, gélose MacConkey (pour les Gram-)



**B.3. Milieux différentiels :**

Des milieux facilitant la distinction entre un groupe particulier de microbes recherchés et les autres présents sur le méme milieu. Exemple :

* Gélose au sang différencie entre les bactéries hémolytiques et non hémolytiques
* Gélose MacConkey différencie entre les bactéries fermentant le lactose et celles qui ne le fermentent pas
* Gélose Chapman différencie entre les bactéries fermentant le mannitol et celles qui ne le fermentent pas.



**B.4. Milieux électifs :**

Un milieu électif est un milieu sur lequel on observe une culture abondante et rapide de certaines bactéries alors que la plupart des autres espèces s’y développent peu et lentement.

Exemple : Milieu de Loeffler au sérum coagulé ( Croissance rapide des bacilles diphtériques, les autres bactéries sont à croissance lente.

1. **Les milieux d’identification :**

Ils permettent de mettre en évidence une ou plusieurs propriétés d’une bactérie pour l’identifier : fermentation d’un sucre, production de gaz, présence des enzymes.

Exemple : Gélose viande foie permet l’identification du type respiratoire des bactéries.

1. **Les milieux de conservation :**

Ce sont des milieux pauvres qui maintiennent les microorganismes dans un état de vie ralentie. Les milieux adoptés est la gélose inclinée, ou gélose nutritive en culot.