

TD 4

Milieux de culture

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 de base d'un milieu de culture

II.1. Définition

Un milieu de culture est une préparation utilisée en microbiologie 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).

II.2. Composition

La composition d'un milieu de culture varie en fonction de l'objectif à atteindre et des besoins requis par la bactérie. Pour répondre aux besoins de base, un milieu de culture doit contenir :

- Une source d'eau (eau distillée).
 - Une source de carbone ou l'énergie (Glucose).
 - Une source d'azote et du soufre.
 - Une source de potassium (K) et du phosphore (P).
 - Une source de calcium (Ca) et du magnésium (Mg).
 - Une source d'oligo-éléments (sels de cuivres de zinc, de cobalt...etc.).
 - Un tampon pH pour maintenir la neutralité du milieu ainsi que d'un indicateur coloré de pH ou de réaction d'oxydo-réduction pour permettre de formuler des hypothèses sur le genre bactérien.
- Des 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

III.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 définies, 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 pour l'étude de besoins nutritifs d'un germe. Exemple : Milieu de Ferguson.

III.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 de l'agar-agar à une concentration de 1 à 1.7%.

L'agar-agar est un polymère de sucre extrait d'une algue rouge marine et qui possède la propriété de former avec l'eau un gel solide si la température est inférieure à 60°C (gélification).

Exemple : Milieu de Chapman, TSI, Milieu Hecktoen, Milieu PCA, ...

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, milieu MEVAG.

III.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 pas 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

(Un prélèvement paucibacillaire fait référence à un échantillon biologique contenant un faible nombre de bactéries. Le terme "paucibacillaire" est dérivé du latin "pauci", qui signifie "peu", et "bacillus", qui signifie "bactérie")

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

Ils sont utilisés pour favoriser la croissance d'un seul type de bactéries en utilisant des substances inhibitrices pour supprimer la croissance d'autres genres bactériens. Ces milieux contiennent des molécules qui empêchent la culture de certains micro-organismes. 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*

Remarque :

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

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

e) Milieux électifs

On parle de milieu "électif" lorsqu'il ne contient pas d'agent inhibant mais qu'il favorise la croissance d'un type de germes. Il permet donc la pousse favorable d'un genre bactérien par rapport aux autres sans leur destruction,

Exemple : gélose au sérum coagulé pour les corynébactéries.

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 bactéries 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 (bouillon glucosé tamponné) + 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 fait 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 recours 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 colorées.

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.

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

III.4. Classification selon le mode de stérilisation

Il existe 02 types de milieux

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

Exemple : milieu gélose nutritive, Mueller Hinton en flacons.

- b) Milieux non-autoclavables : Milieux de culture qui contiennent des produits labiles pouvant être détruit par la chaleur, Exemple : Lohenstein-Jensen

III.5. Classification selon la présentation

- a) Les milieux déshydratés : C'est une poudre conditionnée en boites de 250 ou 500g.

- b) Les milieux prêts à l'emploi solides ou liquides :

- 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.
- Milieux liquides en flacons, ex : Bouillon d'hémoculture.
- Milieux liquides en tubes, ex : BGT.
- Milieux liquides en ampoules, ex : AA (acides aminés).