

TP 4

Préparation des milieux de culture

I. Introduction

Les microbiologistes ont utilisé les milieux de culture pour isoler, purifier, repiquer, cultiver, conserver, étudier et identifier les microorganismes. Ces milieux sont des préparations constituées à partir de composés biologiques et/ou chimiques reproduisant un environnement favorable à la croissance de certaines espèces microbiennes. Un milieu de culture doit :

- Offrir sous forme assimilable toutes les substances indispensables pour couvrir les besoins nutritifs du micro-organisme étudié (source de carbone et d'énergie, minéraux, facteurs de croissance,).
- Posséder les propriétés physico-chimiques convenant à une culture optimale (pH, isotonicité, potentiel d'oxydoréduction).

A ce jour, plusieurs centaines de milieux de culture ont été décrits

II. Classification

III.1. Selon la composition

- Milieu complexe empirique (naturel)
- Milieu semi-synthétique
- Milieu synthétique

III.2. Selon l'utilisation

- Milieux usuels ou de base
- Milieux enrichis
- Milieux d'enrichissement
- Milieux sélectifs
- Milieux électifs
- Milieux d'identification
- Milieux de conservation
- Milieux de transport

III.3. Selon la consistance

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

III. But du TP

- Connaître les différents types de milieux de culture utilisés en microbiologie.
- S'initier avec les techniques de préparation des milieux de culture, leur stockage et utilisation.

IV. Mode opératoire

IV.1. Matériel utilisé

- 2 fioles Erlenmeyer de 500 ml
- Éprouvettes de 100 ml,
- Boîtes de pétri,

- Tubes à vis et portoirs
- Balance de précision.
- Verre de montre et spatule
- Agitateur magnétique chauffant.
- Barreaux magnétiques.
- Produits :
 - ✓ Bouillons nutritif (BN) en poudre,
 - ✓ Gélose Nutritive (GN), en poudre,
 - ✓ Eau distillée,
- Autoclave

IV.2. Protocole

- Peser la quantité appropriée de chaque milieu de culture déshydraté pour 250 ml d'eau distillée (en fonction des recommandations fournies par le fabricant)
- Le déshydraté est ajouté à de l'eau distillée dans les fioles Erlenmeyer.
- Agitez vigoureusement le mélange pour favoriser la dissolution du déshydraté dans l'eau.
- Mettre les barreaux magnétiques et continuez à agiter à l'aide de l'agitateur chauffant jusqu'à ce que la poudre soit totalement dissoute dans le diluant.
- Pendant ce processus, assurez-vous de maintenir une ébullition légère (pendant 1 min) en contrôlant la température de l'agitateur (attention au débordement du liquide).
- Une fois le déshydraté dissous, les milieux de culture doivent être stérilisés dans l'autoclave à 121°C pendant 20 min.
- Laissez refroidir les deux préparations à une température inférieure à 60°C, ensuite verser devant un bec Bunsen dans des boîtes de Pétri et des tubes à vis stériles. Laissez solidifier le milieu gélosé.
- N'oubliez pas d'étiqueter clairement chaque contenant avec les informations nécessaires, telles que le type de milieu de culture, la date de préparation et d'autres détails pertinents.
- Conservez les milieux de culture préparés dans des conditions appropriées, généralement à des températures basses, pour garantir leur stabilité et leur durée de conservation.

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.