

TP 1 : Préparation des milieux de culture et de d'eau physiologique

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

II.1. Selon la composition

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

II.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

II.3. Selon la consistance

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

III. But du TP

- Connaitre les différents types de milieux de culture utilisés en microbiologie.
- Donner un exemple de de préparation de milieu de culture et de diluant stérile « l'eau physiologique ».

IV. Etapes de préparation d'un milieu de culture

IV.1. Matériel utilisé

- 2 fioles Erlenmeyer de 500 ml
- Éprouvettes de 100 ml,
- Boites 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.

V. Préparation de diluant (eau physiologique)

V.1. Introduction

La solution saline à **0,9 % de NaCl** est communément appelée **eau physiologique** ou **solution physiologique**. Elle contient 9 grammes de chlorure de sodium (NaCl) dissous dans 1 litre d'eau stérile, ce qui donne une concentration de 0,9 % (ou 0,154 M).

L'appellation "physiologique" vient du fait que cette concentration de NaCl est approximativement équivalente à celle des fluides corporels humains, comme le plasma sanguin. Elle est donc souvent utilisée dans diverses applications médicales et biologiques pour éviter la déshydratation ou le choc osmotique des cellules.

Principales utilisations de l'eau physiologique :

1. **Hydratation intraveineuse** : en perfusion pour réhydrater les patients.
2. **Lavage de plaies** : pour nettoyer les plaies sans endommager les tissus.
3. **Rinçage ophtalmique et nasal** : pour les yeux ou le nez.
4. **Dilution de médicaments** : avant leur administration par injection.
5. **Culture cellulaire** : pour maintenir les cellules dans un environnement osmotiquement stable.

Dans les laboratoires, cette solution est aussi couramment utilisée pour des **dilutions** ou des **lavages** d'échantillons, car elle maintient un environnement stable pour les cellules ou les tissus.

V.2. Matériaux et réactifs nécessaires :

- Chlorure de sodium (NaCl) de qualité analytique
- Eau distillée ou déminéralisée
- Balance de précision
- Bécher ou flacon gradué (capacité : 1 L)
- Agitateur magnétique (facultatif)
- Flacons stériles pour le stockage (si nécessaire)
- Autoclave (pour la stérilisation, si nécessaire)

V.3. Protocole de préparation de l'eau physiologique (solution saline à 0,9 % de NaCl pour 1 litre) :

1. Peser le NaCl

Peser **9 g** de chlorure de sodium (NaCl) à l'aide d'une balance de précision.

2. Dissoudre le NaCl

Dans un bécher propre, ajouter environ **800 mL d'eau distillée** ou déminéralisée.
Ajoutez ensuite les **9 g de NaCl** au bécher.

3. Agitation

Mélangez la solution jusqu'à ce que le sel soit complètement dissous.
Vous pouvez utiliser un **agitateur magnétique** pour accélérer le processus de dissolution.

4. Ajuster le volume

Une fois le NaCl complètement dissous, complétez le volume à **1 litre** en ajoutant de l'eau distillée ou déminéralisée.

5. Vérification du pH (facultatif)

Le pH de l'eau physiologique n'a pas besoin d'être ajusté, car il est neutre, mais si vous voulez le mesurer, il devrait être autour de **7**.

6. Stérilisation (si nécessaire)

Si vous prévoyez d'utiliser cette solution pour des applications nécessitant la stérilité (comme en médecine ou pour des expériences biologiques), stérilisez la solution en l'autoclavant à **121 °C pendant 15-20 minutes**.

Si la stérilité n'est pas nécessaire, la solution est prête à l'emploi.

7. Stockage

Conservez la solution dans des **flacons stériles** si vous l'avez stérilisée, ou dans un flacon propre fermé hermétiquement. Elle peut être stockée à température ambiante pour des usages non critiques, mais il est conseillé de l'utiliser rapidement après préparation si elle n'est pas stérilisée.