**2.1.Culture des micro-organismes**

**a) Richesse du milieu de culture**

 Les micro-organismes ont besoin :

* D'une source d'énergie.
	+ Pour les chimiotrophes, elle provient de la dégradation de composés chimiques (par exemple du glucose)
	+ Pour les phototrophes, de la lumière.
* D'une source de carbone
	+ Pour les autotrophes, il suffit de CO2 atmosphérique (carbone minéral).
	+ Pour les hétérotrophes, elle provient de molécules organiques (CH4, oses...)
* De macroéléments (Ainsi appelés en raison de leur concentration dans le milieu de culture)[C](http://fr.wikipedia.org/wiki/Carbone), [H](http://fr.wikipedia.org/wiki/Hydrog%C3%A8ne), [O](http://fr.wikipedia.org/wiki/Oxyg%C3%A8ne), [N](http://fr.wikipedia.org/wiki/Azote), [S](http://fr.wikipedia.org/wiki/Soufre), [Na](http://fr.wikipedia.org/wiki/Sodium), [Mg](http://fr.wikipedia.org/wiki/Magn%C3%A9sium), [P](http://fr.wikipedia.org/wiki/Phosphore), [K](http://fr.wikipedia.org/wiki/Potassium) **[7].**

 Les éléments carbone, azote, phosphore doivent être présents aux proportions 100/10/1 pour un milieu correct.

* De microéléments

[Cu](http://fr.wikipedia.org/wiki/Cuivre), [Co](http://fr.wikipedia.org/wiki/Cobalt), [Zn](http://fr.wikipedia.org/wiki/Zinc), [Cl](http://fr.wikipedia.org/wiki/Chlore), [Fe](http://fr.wikipedia.org/wiki/Fer)...

* D'une source d'[azote](http://fr.wikipedia.org/wiki/Azote)

D'origine minérale (sel d'ammonium)

* De facteurs de croissance
	+ Pour les auxotrophes, [Vitamines](http://fr.wikipedia.org/wiki/Vitamine), [acides aminés](http://fr.wikipedia.org/wiki/Acides_amin%C3%A9s), bases azotées.
	+ Les bactéries prototrophes sont celles qui n'ont pas besoin de facteur de croissance **[7].**
* De [dioxygène](http://fr.wikipedia.org/wiki/Dioxyg%C3%A8ne) ou oxygène moléculaire

 Pour les [aérobies](http://fr.wikipedia.org/wiki/A%C3%A9robie) strictes le [peroxyde d'oxygène](http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Peroxyde_d%27oxyg%C3%A8ne&action=edit&redlink=1) (H2O2) formé par la réaction entre l'O2 et l'[H2O](http://fr.wikipedia.org/wiki/Eau) les empoisonnent, car ils ne possèdent pas une catalase dégradant H2O2 à l'inverse des individus aérobies.

 Il existe également des micro-organismes aérobies facultatifs capables de se multiplier en présence ou en l'absence d'oxygène grâce à leur capacité à utiliser la fermentation et des bactéries microaérophiles qui ne se développent qu'à une certaine pression en dioxygène.

* De facteurs physico-chimiques:
	+ Pour le *facteur* [*température*](http://fr.wikipedia.org/wiki/Temp%C3%A9rature), on distingue trois catégories de micro-organismes selon leur optimum de croissance. Les [psychrophiles](http://fr.wikipedia.org/wiki/Psychrophile) ont leur optimum à 15 °C, les [mésophiles](http://fr.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9sophile) à 37 °C, les [thermophiles](http://fr.wikipedia.org/wiki/Thermophile) à 65 °C.
	Il faut descendre au-delà de -18 °C pour arrêter toute croissance microbienne. À 3 °C il y a peu de risques lié aux bactéries pathogènes (mésophiles, donc virulentes à la température du corps) ou toxinogènes, seules quelques bactéries vivant à ces températures peuvent être dangereuses (listéria).
	+ Pour le *facteur* [*pH*](http://fr.wikipedia.org/wiki/Potentiel_hydrog%C3%A8ne), on considère que les bactéries préfèrent la neutralité excepté pour les bactéries lactiques. Pour les levures et moisissures, le pH optimum est plus acide. (pH=5) **[7].**

**b) Diversité du milieu de culture**

 On distingue deux sortes de milieux de culture :

* Synthétiques : milieux dont on peut donner la composition chimique complète. Les milieux synthétiques sont utilisés en recherche fondamentale.
* Empiriques : milieux dont on ne connaît que partiellement la composition. **[7]**

 Parmi ces 2 types de milieux, il existe des milieux sélectifs (qui vont permettre de sélectionner le type de micro-organismes qui pourront s'y multiplier). On peut ainsi choisir de ne laisser se développer qu'un genre de bactérie donné (ex: milieu mFC pour les coliformes fécaux ou gélose au sang pour certains pathogènes) ou au contraire de favoriser le développement des levures-moisissures en ajoutant un antibiotique au milieu. La température à laquelle on incubera les milieux inoculés constitue également un facteur de sélection comme mentionné plus haut.

 Les milieux de culture peuvent contenir des extraits de [levure](http://fr.wikipedia.org/wiki/Levure) (cellules de levure déshydratées et lysées) qui fournissent une source d'acides aminés, de vitamines et d'azote, des extraits de malt apportant une source de carbone, des peptones (protéines animales, de poisson, de caséine de lait) source d'azote organique qui intéresse les individus hétérotrophes.

 Ces milieux sont soit liquides, soit solides. Pour solidifier le milieu on utilise fréquemment la gélose ou [agar-agar](http://fr.wikipedia.org/wiki/Agar-agar), un polymère de sucre tiré d'une algue rouge présentant la propriété de former avec l'eau un gel solide si la température est inférieure à 60 °C. **[6]**

**2.2. Stérilisation**

 La [stérilisation](http://fr.wikipedia.org/wiki/St%C3%A9rilisation_%28microbiologie%29) est l'opération qui consiste à éliminer les micro-organismes d'un objet et ce, de manière durable. En microbiologie, le but de la stérilisation est d'une part maîtriser les micro-organismes introduits dans le milieu d'étude, et d'autre part éviter la contamination du milieu extérieur et des personnes (voir aussi l'article sur l'[hygiène](http://fr.wikipedia.org/wiki/Hygi%C3%A8ne)). **[7]**

Il existe trois façons pour stériliser un milieu de culture. Une destruction par la chaleur, par une méthode de filtration ou par l'emploi de radiation et d'agent chimique (gaz).

* + 1. **Chaleur**

 On distingue les procédés à chaleur « sèche » ou « humide ». **[7]**



 **Figure 6 : Zone de stérilité d'un bec Bunsen. [20]**

* Chaleur sèche :
	+ [Bec Bunsen](http://fr.wikipedia.org/wiki/Bec_Bunsen) : tout l'air qui se trouve dans un globe virtuel de 15 cm de rayon de la flamme d'un bec Bunsen **(Figure 6)**, est passé une fois dans la flamme. Ceci crée une enceinte fictive stérile. Les microbiologistes travaillent avec une flamme oxydante qui crépite.
	+ Four Pasteur ou four Poupinel : C'est un four classique utilisé à 180 °C pendant 90 minutes au minimum.
* Chaleur humide :
	+ [Autoclave](http://fr.wikipedia.org/wiki/Autoclave) : cette technique consiste à faire bouillir de l'eau dans une enceinte close pour augmenter la pression et donc dépasser les 100 °C d'ébullition (principe de l'autocuiseur). Ceci est réalisé à 134 °C pendant 18 minutes. **[7]**
		1. **Cas particuliers : la pasteurisation et tyndallisation**

 La [pasteurisation](http://fr.wikipedia.org/wiki/Pasteurisation) est un procédé pour la [conservation des aliments](http://fr.wikipedia.org/wiki/Conservation_des_aliments) par lequel un aliment est chauffé à une température définie pendant une période de temps définie avant d'être refroidi rapidement. Les températures de pasteurisation varient entre 70 °C et 85 °C. Cette technique ne détruit qu'une partie de la flore bactérienne. Ce n'est, en aucun cas, une technique de [stérilisation](http://fr.wikipedia.org/wiki/St%C3%A9rilisation).

 La [tyndallisation](http://fr.wikipedia.org/wiki/Tyndallisation) est une série de chauffages brefs à des températures de 70 °C à intervalles réguliers (3 chauffages d'une heure, 24 h entre 2 chauffages), ceci afin de laisser aux formes résistantes la possibilité de germer pour les tuer au chauffage suivant.

 Par exemple, la destruction des germes pathogènes du lait se fait par un cycle de 63 °C pendant 30 minutes suivie de 73 °C pendant 15 minutes. **[7]**

 **c) Filtration**

 La [filtration](http://fr.wikipedia.org/wiki/Filtration) est une technique qui consiste à faire passer un liquide à travers un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,2 µm ; les micro-organismes sont trop gros pour passer et sont donc retenus par le filtre. Pour forcer ce liquide à traverser le filtre on utilise deux solutions:

* mise en pression du liquide par l'intermédiaire d'un piston.
* aspiration du liquide en créant par exemple une enceinte dépressurisée de l'autre côté du filtre.

 Cette technique est intéressante lors d'utilisation de produits thermolabiles (c'est-à-dire qui ne résistent pas à la chaleur) comme certains acides aminés aromatiques, vitamines, hormones de croissance, acides nucléiques et une bonne partie des antibiotiques. Cependant les filtres de 0.2 µm colmatent vite.

 Dans certains cas le filtre ayant servi à stopper les micro-organismes peut être déposé sur un milieu de culture solide afin de permettre la multiplication des germes, ceci dans le but de procéder à leur dénombrement et à leur identification. **[7]**

* + 1. **Radiation et agent chimique**

 Ces techniques sont utilisées par les industries dont l'alimentaire. Elles sont très pénétrantes, car les radiations et certains gaz traversent le plastique et tuent les micro-organismes.

 Les rayons ultraviolets ne sont cependant pas une bonne technique de stérilisation, car ils sont non pénétrants, donc ils ne passent pas au travers de matériaux comme le plastique et le verre. De plus certains micro-organismes sont capables de réparer les dommages infligés par les ultraviolets si le produit est éclairé après application de rayons ultraviolets; c'est le phénomène dit "de photo-réparation".

 On peut dans certains cas utiliser le [rayonnement gamma](http://fr.wikipedia.org/wiki/Rayon_gamma), beaucoup plus pénétrant et puissant que les ultraviolets. **[7]**

**2.3. Notion de culture pure**

 **a)Technique des stries**

 Elle est basée sur la notion d'UFC (Unité Formant une Colonie). Chaque unité cellulaire (une cellule, un groupe de cellules ou un morceau d'[hyphe](http://fr.wikipedia.org/wiki/Hyphe)) va donner une colonie.

 Sur un milieu de culture, il y a formation d'un monticule de bactéries ou de levures avec une forme particulière (la colonie). La forme de ce monticule est déterminée par l'organisation de la colonie, qui elle-même est déterminée génétiquement.

 Les champignons vont, eux, développer un thalle c'est-à-dire ce que l'on peut par exemple observer sur les confitures ayant "moisi". L'UFC est utilisée aussi pour le dénombrement bactérien en utilisant des cultures sur boîte à partir de tubes préparés par dilutions en cascades de la suspension bactérienne mère. **[7]**

**b)Technique de suspension dilution**

 Cette technique sert à évaluer le nombre de microorganismes qui se trouvent dans un milieu liquide (eau de puits, boissons, eau de piscine...) ou dans un milieu solide (sol, aliments...). Elle peut aussi servir à isoler une [souche pure](http://fr.wikipedia.org/wiki/Souche_pure) à partir d'un mélange.

 Il s'agit simplement d'une suite de [dilutions](http://fr.wikipedia.org/wiki/Dilution) suivie d'un prélèvement d'un [aliquot](http://fr.wikipedia.org/wiki/Aliquot) qui sera étalé sur un milieu de culture qui pourra être sélectif ou non. Il suffira ensuite de compter le nombre de colonies, et connaissant le volume de l'aliquot (en général 1 mL sur une boîte), on en déduira la quantité approximative de bactéries dans le milieu (on considère qu'1 UFC correspond à 1 bactérie). **[1]**