

## Séance N°3 : Cultures bactériennes

### TP N° 1 : Milieux de culture (explication rapide)

Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle des micro-organismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire les exigences nutritives du micro-organisme étudié ce qui implique:

- ✓ couvrir les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance, apporter la source de carbone et d'énergie ;
- ✓ présenter un pH voisin du pH optimal ;

La composition des milieux de culture varie à l'infini. Cependant, on peut grossièrement diviser en deux catégories les milieux nutritifs :

1. Les milieux dits **complexes** sans composition bien définie;
2. Les milieux **synthétiques** de composition déterminée.

Dans les deux cas, les besoins des microorganismes nécessitent l'addition au milieu d'une source de C, N, P, K, Mg plus des oligoéléments : Fe, Mn, Co, Cu, Zn...

Pour prélever et isoler des colonies bactériennes, il est indispensable d'ajouter au milieu nutritif un agent solidifiant : gélatine, **l'agar** ou parfois le silicogel sont communément utilisés.

#### I. MILIEU LIQUIDE

L'exemple choisi est celui d'un milieu complexe utilisé pour la culture de plusieurs espèces de microorganismes, il convient pour les germes ne présentant pas d'exigences particulières.

#### Ex : Bouillon nutritif (1 litre)

Extrait de viande.....5g  
Peptone ..... 10g  
Chlorure de sodium ..... 5g  
L'eau distillée .....1000 ml.

Amené à pH 7,2 avec NaOH.

Après la stérilisation, ce milieu peut servir à l'entretien de très nombreuse souche bactérienne.

#### \* Mode opératoire :

1. Mettre en suspension 4,0 g de milieu déshydraté (lisez la notice) dans 200 mL d'eau distillée ou déminéralisée.
2. Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
3. Répartir en tubes ou en flacon.

4. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.
5. Laisser à refroidir jusqu'à 50°C dans l'autoclave (ne pas les sortir avant car la différence de températures provoquerait une dépression au sein des tubes).

## II. MILIEU SOLIDE

### Ex : Gélose Nutritive (GN) :

Comme par exemple le même milieu liquide BN mais on ajoute un agent solidifiant comme l'agar-agar (20 g pour un litre).

## TP N° 2 : LES METHODES D'ENSEMENCEMENTS OU D'INOCULATIONS

L'ensemencement ou l'inoculation consiste à déposer dans un milieu neuf des germes prélevés dans un milieu de culture mère (l'inoculum). Le transport est en général effectué avec une anse de platine ou avec une pipette Pasteur.

### ➤ L'ENSEMENCEMENT D'UN MILIEU LIQUIDE EN TUBES

Pour inoculer un milieu **liquide** avec un inoculum **liquide**, on trempe simplement la boucle (ou le fil droit) portant l'inoculum dans le milieu ; on l'agite un peu, puis on la retire. L'inoculation peut aussi s'effectuer au moyen d'une pipette Pasteur. Pour un inoculum **solide**, on frotte légèrement la boucle ou le fil droit contre la paroi ultérieure du récipient – pour s'assurer qu'une partie au moins de l'inoculum soit abandonnée quand on retire l'instrument.

### Travail à faire :

Repiquer à l'aide d'une anse de platine de différentes colonies dans des tubes de bouillon nutritifs  
Flamber l'anse après chaque repiquage

Incuber à 37 °C pendant 24 à 48h

Observer les différents aspects de pousse en milieu liquide

### ➤ L'ENSEMENCEMENT D'UN MILIEU SOLIDE

Les milieux solides peuvent être inoculés de diverses manières, en fonction du but poursuivi et selon leur présentation:

#### I. Utilisations des milieux en boîte de Pétri:

**La méthode des stries:** On recourt à l'ensemencement en **stries** ou **striation** quand on veut obtenir des colonies distinctes, bien séparées l'une de l'autre, et qu'on sait que l'inoculum (liquide ou solide) contient un grand nombre de cellules. Dans cette méthode, l'inoculum est progressivement «**épuisé**» de telle sorte que, sur une partie au moins de la surface de la boîte, des cellules soient déposées individuellement et bien séparées. On arrive habituellement à ce résultat dans la troisième, quatrième ou cinquième série de stries. A l'incubation, chacune de ces cellules isolées donne naissance à une colonie distincte.

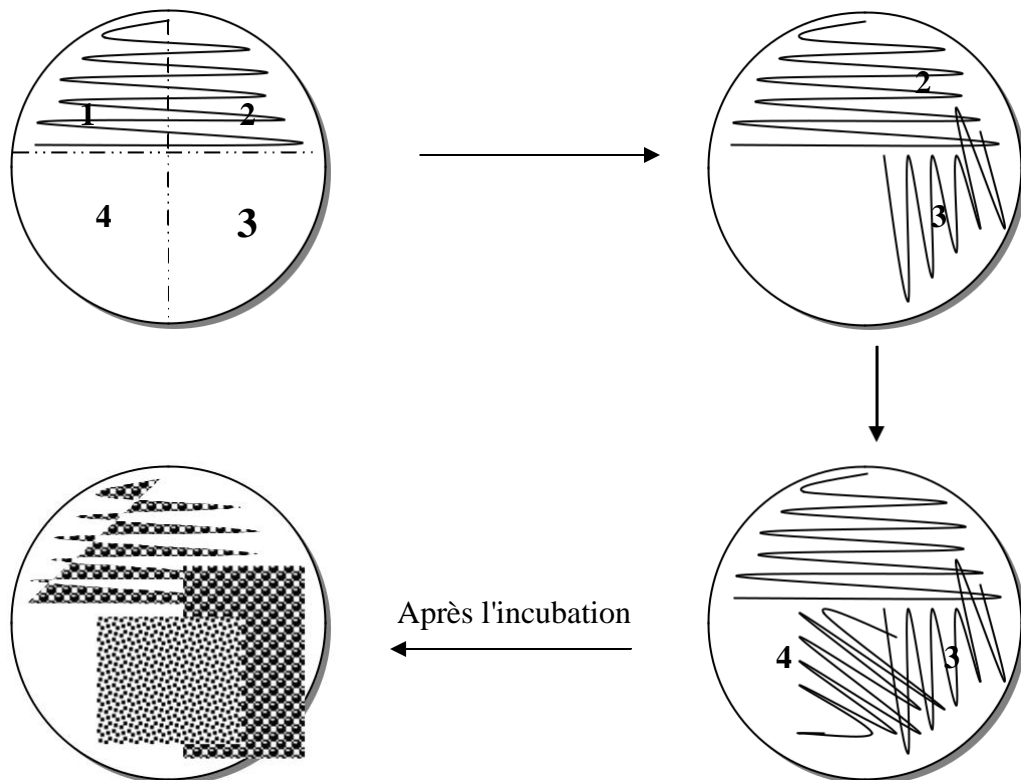
**[Travail à faire]: L'ISOLEMENT BACTERIEN PAR LA METHODE DES STRIES (voir vidéo)**

**Méthode de travail**

Tracer sur le fond extérieur de la boîte de pétri deux diamètres perpendiculaires séparant la boîte en quatre secteurs.

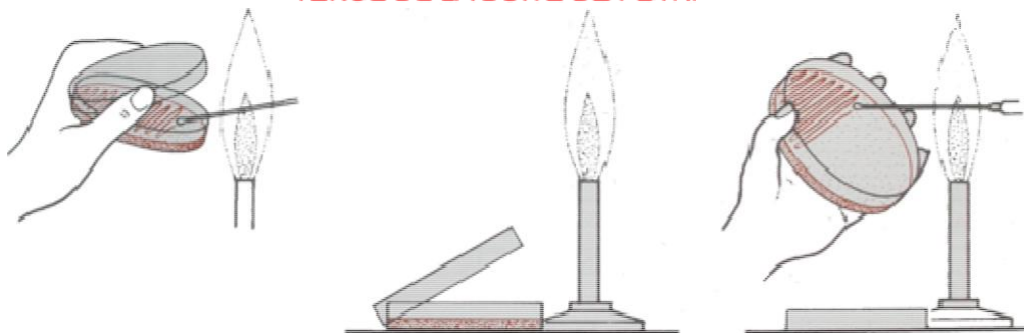
- 1) Stérilisation de l'anse de platine par la flamme de bec Bunsen;
- 2) Prélever à l'anse (stérile) la suspension ou le bouillon dans le cône stérile.
- 3) Réalisation de la première série de stries serrées sur la gélose nutritive : Avec la main gauche maintenir entrouverte la boîte dans le cône stérile et étaler le prélèvement par stries très serrées dans une moitié de quadrant (quadrants 1 et 2)
- 4) Flamber l'anse et laisser refroidir
- 5) Réalisation de la deuxième série de stries serrées: Etaler à nouveau le prélèvement par stries serrées dans la moitié correspondante aux quadrants 2 et 3.
- 6) Flamber l'anse et laisser refroidir.
- 7) Réalisation de la troisième série de stries serrées sur la gélose nutritive : Répéter une dernière fois l'étalement en stries serrées dans la moitié correspondante aux quadrants 3 et 4
- 8) Stérilisation de l'anse;
- 9) **Incubation** dans une étuve thermostaté à 37 °C ou à 40°C pendant 24 h.
- 10) **Lecture** : Apparition des colonies qui au départ sont confluentes (1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> série de stries) puis en puis éparses

**Observer et noter vos observations.**



**Technique d'ensemencement**

## TENUE DE LA BOITE DE PETRI

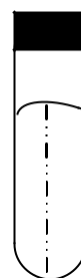


## II. Utilisations des milieux en tubes

1) **Le milieu solide incliné:** la tranche des milieux solides est ensemencée avec l'inoculum selon deux modalités (**fig.1 et 2**).

### Fig. 1

**Ensemencement en strie longitudinale:** Part du fond tube jusqu'à l'extrémité supérieure de la tranche. Ce procédé est utilisé pour la subculture des colonies isolées ou des cultures pures.



### Fig. 2

**Ensemencement en strie transversale:** est utilisé pour l'isolement des diverses espèces constitutives d'un mélange ou pour vérifier la pureté d'une culture. Effectué à l'anse ou à la pipette boutonnée, il consiste à ensemencer le milieu en réalisant des stries transversales du fond du tube vers le sommet de la tranche gélosée.



### [Travail à faire]:

Repiquer différents aspects et formes de colonies sur des tubes de gélose inclinée

Incuber à 37°C pendant 24 h

Observer les différents aspects.