

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ahmed DRAÏA - Adrar



Faculté des Sciences et de la Technologie
Département de Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master en :

Filière : Sciences Biologique

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème :

**Recueil des milieux de culture de bactérie
électif ; sélectif et général**

Préparé par :

Mlle :Boukalkola Fouzia

Mlle : Aichaoui djahida

Mlle : Aichaoui ouarda

Membres de jury d'évaluation :

M.	Président	Pr.	Univ. Adrar
M.	Encadreur	Abakhti Abdelkader	Univ. Adrar
Mlle.	Co-encadreur	MCB	Univ. Adrar
M.	Examineur	MAA	Univ. Adrar

Année Universitaire : 2021/2022

شهادة الترخيص بالإيداع

انا الأستاذ(ة):أبختي عبد القادر

المشرف مذكرة الماستر الموسومة بـ : Recuil des milieux de culture des bactéries,, électifs, sélectifs
et générale.

من إنجاز الطالبة:عيشاوي جهيدة، عيشاوي وردة، بوقلقولة فوزية

كلية :العلوم والتكنولوجيا

القسم :علوم الطبيعة والحياة

التخصص :Biochimie appliquée

تاريخ تقييم / مناقشة: 20/06/2022

أشهد ان الطلبة قد قاموا بالتعديلات والتصحيحات المطلوبة من طرف لجنة التقييم / المناقشة، وان المطابقة بين
النسخة الورقية والإلكترونية استوفت جميع شروطها.
ويماكنهم إيداع النسخ الورقية (02) والايكترونية (PDF).

- امضاء المشرف:

أبختي عبد القادر

أدرار في
مساعدة رئيس التقييم
مصلحة البحث البليوغرافي
والتعليم في التسريح
والتخصصي
مكتبة الأرشيف

Dédicace

Je dédie cet travail

A ma maman qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance. A mes frères, mes grands parents et Ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours. A ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité. A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès. A tous ceux que j'aime

Remerciements

On remercie Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mr. abkhti Abdelkader, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles

summer

Introduction.....	I
Chapitre:01	
Milieu de culture	4
Définition	4
1-Les constituants de base des milieux de culture.....	4
Sources de carbone.....	4
Sources d'azote:	6
Sels minéraux	7
Vitamines et facteurs de croissance	9
Précurseurs	9
Besoins inorganiques	10
Autres éléments.....	10
2-Perception du quorum (quorum Sensing ou auto-induction)	10
Exemples.....	11
3-Conditions techniques d'utilisation des milieux de culture	11
Stérilisation de milieux de culture	11
Aspects liés à la croissance des bactéries sur le milieu de culture :	11
Division bactérienne	11
Dynamique de la croissance.....	11
Courbe de croissance	12
Croissance in vitro (milieux liquide et solide	13
Croissance in vivo	13
Croissance en culture continue	14
Croissance en culture synchrone.....	14
Croissance en biofilm.....	14
Effets de carence et de stress Effets de carence et de stress	15
En situation de carence ou de stress.....	15
Conditions favorables à la croissance.....	16

Conditions psycho-chimiques de la croissance	16
Effet de l'oxygène.....	16
Effet du pH.....	18
Effet de la pression osmotique.....	19
Effet de l'eau libre	20
Présence de sels.....	20
Facteurs de croissance.....	20
Produits biologiques.....	21
Composants sélectifs / différentiels	21
La sélectivité	21
La différenciation.....	21

Chapitre:02

2- 1 Historique de gélose	24
Gélose ou agar-	24
Propriétés nutritionnelles	25
Agar en microbiologie	29
La gélose est l'agent de solidification le plus couramment utilisé dans les milieux microbiologiques	29
Les types des milieux de cultures	30
-Mode de présentation des milieux de culture.....	31
. Milieu de culture liquide.....	32
Milieu de culture semi-solide.....	32
Milieu de culture solide	33
Type commercial :	33
Milieux empiriques ou complexes :.....	33
Extrait de levure.....	34
Milieux d'orientation et d'identification ou milieux différentiels.....	35
Milieux synthétiques ou milieux (chimiquement) définis	35
les milieux de base et les additifs ajoutés	37
Classification des milieux de culture	37

Constituants chimiques des milieux de culture	38
Extraits de viandes	38
Classification des milieux de culture selon leur utilisation :	38
1. Milieu de culture simple :	38
2. Milieu de culture enrichi :	38
3. Milieu sélectif et milieu d'enrichissement :	39
4. Milieu différentiel	39
5. Milieu de transport :	40
6. Milieu anaérobie :	40
Classification des milieux de culture selon la méthode de préparation :	41
1. Milieu prêt à l'emploi :	41
2. Milieu préparé à partir de formulations déshydratées :	42
◉ Gélose nutritive ordinaire :	42
Gélose Mueller Hinton.....	43
◉ Bouillon nutritif :	44
Le Bouillon Nutritif	44
◉ Gélose Cled :	45
◉ Gélose Columbia :	45
◉ Milieu Chapman :	46
◉ Milieu Hektoen :	47
◉ Gélose TSI :	48
◉ Identification par microméthode "API" :	48

Chapitre:03

La Co -culture :	50
OPTIMISATION DES MILIEUX DE CULTURE :	51
Techniques D'ensemencement	51
2- Techniques d'isolement :	53
Technique de dilution successive :	53
la culture des bactéries viables non cultivables :	54

Conclusion	56
biographique.....	58

Liste de tableau

Tableau 1 : composition des solutions standard stock	8
Tableau 2 compositions inorganique élémentaire des cellules végétales et sport	9
Tableau 3 Temps de génération in vitro et in vivo de quelques bactéries	14
Tableau 4 pH minimum, optimum et maximum de différentes bactéries (Atlas and Bartha, 1993).	19
Tableau 5 Différentes algues sont utilisées comme matière première dans la production de gélose	25
Tableau 6 principaux fournisseurs de milieux des culture.....	30
Tableau 7 : bactéries décrites comme entrant en état VNC	54

Liste de figure

Figure 1 : courbe de croissance.....	13
Figure 2 Croissance en biofilm.....	15
Figure 3: Action de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la peroxydase.....	17
Figure 4 Gélose ou agar.....	25
Figure 5: milieu de culture liquide.....	32
Figure 6: Milieu de culture solide.....	33
Figure 7: Milieux enrichis.....	39
Figure 8 :Milieu différentiel.....	40
Figure 9 :Milieu de transport.....	40
Figure 10 :Milieu anaérobie.....	41
Figure 11 : Milieu prêt à l'emploi.....	42
Figure 12 : Milieu préparé à partir de formulations déshydratées.....	42
Figure 13 : serratia Gélose nutritive.....	43
Figure 14: serratia sur Mueller Hinton.....	43
Figure 15: Bouillon nutritif.....	44
Figure 16 Gélose <i>Cled S-marcescens</i>	45
Figure 17 Gélose Columbia(Hémolyse bêta).....	46
Figure 18 : Culture de <i>Staphylococcus aureus</i> Fermentation du mannitol 24h à 37°C.....	47
Figure 19 : Escherichia coli su Hektoen	47
Figure 20 Gélose TSI.....	48
Figure 21: Identification par microméthode "API".....	48

Liste de d'abréviation

RCC :Répression catabolique du carbon

ANC :Acide nalixique colistine

BCP :Bromo crésol poupre

UHT :Upérisation à haute température

EMB : Eosin methylenc blue

CLED :Cystine lactose electrolyte déficient

API: Appareils et procédés d'identification

VNC :Viabes non cultuvables

FDA :Diacétate de fluresceine

CMF :Cytométrie en flux

VF :Vainde foie

TSI :Triple sugar iron

Résumer

les microbiologists ont utilisé les milieux de culture pour isoler, purifier, repiquer, cultiver, conserver, étudier et identifier les germes (microorganismes). Ces milieux constitués à partir de composés biologiques et/ou chimiques reproduisant un environnement favorable à la croissance de certaines espèces microbiennes.

La découverte des milieux de culture a permis le développement de la microbiologie au XIXe siècle . La culture bactérienne a été la première méthode développée pour étudier le microbiote humain ,en utilisant un milieu artificiel permettant la croissance et l'isolement des bactéries.Et aussi le rôle de co-culture dans pour étudier les interactions entre les bactéries entre elles

استخدم علماء الأحياء المجهرية وسائط الاستنبات لعزل وتنقية وزراعة فرعية وزراعة وحفظ ودراسة وتحديد الجراثيم (الكائنات الحية الدقيقة). تتكون هذه الوسائط من مركبات بيولوجية و / أو كيميائية تنتج بيئة مواتية لنمو بعض الأنواع الميكروبية.

سمح اكتشاف وسائط الثقافة بتطوير علم الأحياء الدقيقة في القرن التاسع عشر. كانت الزراعة البكتيرية هي الطريقة الأولى التي تم تطويرها لدراسة الكائنات الحية الدقيقة البشرية ، وذلك باستخدام وسط صناعي يسمح بنمو البكتيريا وعزلها ، وكذلك دور الثقافة المشتركة في دراسة التفاعلات بين البكتيريا مع بعضها البعض

microbiologists have used culture media to isolate, purify, subculture, cultivate, preserve, study and identify germs (microorganisms). These media made up of biological and/or chemical compounds reproducing an environment favorable to the growth of certain microbial species.

The discovery of culture media allowed the development of microbiology in the 19th century. Bacterial culture was the first method developed to study the human microbiota, using an artificial medium allowing the growth and isolation of bacteria. And also the role of co-culture in studying the interactions between bacteria with each other

Introduction

Introduction

La bactériologie et la mycologie d'investigation nécessitent l'étude de micro-organismes dans l'environnement du laboratoire. De nombreuses bactéries et champignons peuvent être cultivés sur culture milieu : une substance conçue pour créer des conditions nutritionnelles similaires à l'environnement dans lequel le micro-organisme survit et se reproduit couramment (1). Le milieu de culture est un terme utilisé pour décrire une substance complexe ou synthétique (chimiquement défini) trouvée dans l'un des deux états de la matière: soit le liquide (bouillon) ou solide (comme gélose dans une boîte de Pétri) (2). La culture de micro-organismes sur des milieux de culture dépend d'un certain nombre de facteurs importants, y compris un éventail optimal de nutriments, d'oxygène ou d'autres gaz, humidité, pH et température. Les éléments nutritifs importants comprennent les sources de carbone, Azote, phosphates et soufre inorganiques, métaux traces, eau et vitamines. Chaque Un nutriment est, dans diverses combinaisons, un ingrédient clé des milieux de culture microbiologiques. Les nutriments fonctionnent comme des « facteurs de croissance ». Un facteur de croissance est naturellement substance présente, comme un acide aminé, qui est capable de stimuler la croissance, prolifération et différenciation cellulaire. Malgré l'importance des milieux de culture, il y a eu peu de comptes rendus sur leur Développement et moins qui tentent de lier le développement à la microbiologie laboratoire d'aujourd'hui. L'histoire des médias culturels est une histoire scientifique et sociale importante. L'origine des milieux de culture microbiologiques coïncide avec l'avancement de la bactériologie en tant que discipline scientifique et le développement de Différents médias a évolué en tandem avec les progrès constants de la bactériologie les cent cinquante dernières années. Tant que les milieux de culture microbiologiques restent monnaie courante dans tout laboratoire de microbiologie, les innovations continuent de surgir avec de nouvelles recettes de milieux en cours de formulation pour la sélection de nouvelles souches à l'application de en association avec des méthodes microbiologiques rapides. **Les milieux de cultures** sont indispensables à la multiplication bactérienne, ce qui permet par la suite l'identification ainsi que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques lorsque la bactérie est isolée en culture pure.

Et est une préparation au sein de laquelle des micro-organismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire les exigences nutritives du micro-organisme étudié et posséder les propriétés physico-chimiques convenant à cette culture soit Couvrir les besoins en ions minéraux, en

. Introduction

facteurs de croissance, apporter la source de carbone, d'énergie et d'azote. Et Présenter un pH voisin au pH optimal, une pression osmotique et une viscosité adéquate.

Chapitre : 01

Milieu de culture

Définition

Le milieu de culture est défini comme un support permettant la croissance de cellules de différents types comme les bactéries, les levures, de moisissures afin de les étudier aux laboratoires. En fait, les cellules puisent du milieu les constituants qu'elles utilisent pour accélérer leur développement et croissance en grand nombre. Certains milieux, sont délibérément choisis pour favoriser le développement d'un groupe particulier des microorganismes. Cela dit, il est donc possible de concevoir des milieux et de réunir des conditions optimales ou inhibitrices selon l'objectif présagé ((François et al., 2016)

Le milieu est préparé à partir des ingrédients principalement une base agar ou gélose qui solidifie le milieu, de l'eau pour assurer une solution homogène ainsi que des minéraux et bien d'autres éléments nutritifs. Il est aussi possible d'ajouter un indicateur de pH qui sert un témoin pour l'utilisation des composés carbonés (sucres, acides aminés).

La partie suivante présente les types de milieux de culture selon la connaissance de ces composants de manière qualitative et quantitative.

1-Les constituants de base des milieux de culture

Tout milieu de culture doit exclusivement contenir des éléments indispensables à la croissance des bactérie étudiées et doit assurer au moins la présence d'une source de carbone, d'azote, sels minéraux, et certains facteurs de croissance (vitamines,.....) (François et al., 2016)

Sources de carbone

La majorité des organismes vivants et compris les bactéries peuvent utiliser plusieurs composés comme source de carbone. Ces composés sont soit directement assimilés ou sont dégradés en unités facilement assimilables par les bactéries. Le glucose est une source de préférence pour les bactéries. Certaines observations ont montré que la présence de glucose inhibe l'utilisation des autres sources de carbone disponibles par le phénomène de répression catabolique du carbone (RCC). La présence de plusieurs types de sources de carbone (carbohydrates ; sucres) dans le milieu de culture, mène la bactérie à s'adapter pour n'utiliser qu'une seule source de carbone parmi les sources de carbone disponibles. L'utilisation des

autres sources ne se ferait qu'après l'épuisement de la première source de carbone. Ce phénomène est dû à une régularisation génétique. Le CCR est observé dans la plupart des bactéries hétérotrophes, qui comprennent des bactéries autotrophes facultatives qui répriment les gènes de fixation du CO₂ en présence d'une source de carbone organique (Bowien et Kusian, 2002).

Certaines bactéries pathogènes, comme *Chlamydia trachomatis* et *Mycoplasma pneumonia*, semblent ne pas avoir de CCR, où elles sont adaptées à des milieux hôtes riches en nutriments (Nicholson et coll., 2004 ; Halbedel et coll., 2007).

Un autre phénomène peut être observé chez *Corynebacterium glutamicum*, où la Co-assimilation du glucose et d'autres sources de carbone est faite, mais elle est fortement réglementée (Wendisch et coll., 2000 ; Frunzke et coll., 2008).

Pour certaines bactéries, comme *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* et *Pseudomonas aeruginosa*, le glucose n'est pas une source primaire de carbone, et les gènes d'utilisation du glucose sont réprimés lorsque des sources privilégiées de carbone sont disponibles ; ce phénomène est connu sous le nom de RCC inverse (Collier et coll., 1996 ; Oarce et coll., 2006). Le RCC est l'un des phénomènes réglementaires les plus importants chez de nombreuses bactéries (Moreno et coll., 2001 ; Blencke et coll., 2003 ; Liu et coll., 2005). Le RCC est important pour que les cellules rivalisent avec d'autres organismes dans la nature, où il est crucial de choisir une source de carbone préférée afin d'améliorer le taux de croissance, ce qui se traduit par des taux de survie plus élevés que d'autres organismes. De plus, le RCC joue un rôle crucial dans l'expression des gènes de virulence, qui permettent souvent à l'organisme d'accéder à de nouvelles sources de nutriments. La capacité de choisir la source de carbone appropriée qui permet une croissance plus rapide pourrait être la force motrice de l'évolution du RCC (Gorke et Stulke, 2008).

Dans beaucoup de milieux de culture, le glucose constitue une source majeure de carbone pour stimuler la croissance bactérienne. Elle peut avoir des conséquences néfastes sur la production de métabolites secondaires. On ajoute du glucose au début de la fermentation pendant la phase de croissance afin de maximiser la croissance et non l'approvisionnement pendant la phase de production. Que des quantités minimales non inhibitrices. C'est considéré Le lactose est l'un des sucres lentement métabolisables, il est également n'empêche pas la

production de pénicilline après hydrolyse du lactose dans le galactose et le glucose, elle est la d'eusémie source de Carbon de vitro bactérien. On peut classer le saccharose comme source secondaire ou urgente de Carbon. Et les dextrines sont souvent employés comme source simple de carbone, mais ils peuvent être fournis dans un substrat industriel complexe tel que la mélasse, (pas seulement la source. (Carbone, azotées, des vitamines et des oligo-éléments). Le choix de la source de carbone, qui constitue habituellement le coût principal des matières Premières, dépend des cultures.....

Par exemple: les microbes qui produisent de l'amylase peuvent utiliser l'amidon et les dextrines plutôt que le glucose. *Yarrowia lipolytica*, est capable de dégrader les lipides, les protéines et la paraffine comme une seule source de carbone..

Sources d'azote

La source d'azote est un sel minéral essentiel à la croissance des microorganismes. Les bactéries ont besoin d'azote pour leur métabolisme et pour la synthèse des protéines et les structure bactériennes. Donc les bactéries doivent trouver dans le milieu une source d'approvisionnement en azote. Les sources d'azote sont variées et ce dernier peut se trouver dans plusieurs molécules organiques et mais aussi sous forme atmosphérique moléculaire (minérale) ou inorganique sous forme de nitrates. Dans le milieu de culture l'azote est fourni dans les hydrolysats protéiques (peptones-typotones) (bonnet et al., 2019).

Les acides aminés disponibles dans les hydrolysats protéiques sont la source primordiale d'azote directement assimilable par les bactéries. Les bactéries peuvent utiliser les deux formes d'azote (organique et inorganique) sachant que certaines parmi elles présentent une préférence d'une forme de l'autre.

Les formes inorganiques d'azote comprennent NO_3^- , NH_4^+ , NO_2^- , NH_3 , l'autre forme se rencontre en plus de peptone, dans des extraits de levure et aussi dans la poudre de lactosérum. Ces sources d'azote peuvent être simultanément une source de facteurs de croissance. L'avantage de la présence de ces sources d'azote organique dans le milieu de culture est le fait qu'elles assurent parallèlement des besoins spécifique de certaines bactéries qui requièrent des types particuliers d'acide aminé ou de vitamines. Au fait, les besoins de croissance spécifique sont

ajoutés si nécessaire de manière séparée mais cela engendre des couts supplémentaires exacerbant.

D'autre part, les sources d'azote inorganique (ex. NO_3^- , NO_2^-) remplissent une autre fonction à part celle liée à la nutrition, car elles peuvent aussi être utilisées comme accepteurs finaux des électrons dans le mode métabolique de la respiration anaérobique.(Clarke, 2013).

Certains sels d'ammonium peuvent être utilisés directement par des micro-organismes, tandis que le nitrate ne peut être utilisé qu'après réduction en NH_4^+ (Clarke, 2013) ;Le couple sels d'ammonium de sulfate (NH_4^+SO_4) et le phosphate de d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) est utilisé pour un autre objectif dans les milieux ayant une forte activité acidifiante. Cette source d'azote joue aussi le rôle d'un tampon pour ajuster le pH du milieu (Clarke, 2013)). Les autres sources d'azote incluent l'urée, le maïs, la farine de soja qui sont aussi riches en protéines, acides nucléiques, vitamines,des oligoéléments, des lipides, des sucres, du soufre et du phosphate . Clarke, 2013)

Sels minéraux

Les bactéries présentent des besoins essentiels en sels minéraux pour beaucoup des activités biologiques du métabolisme et de de syntèse. Les sels minéraux chez les bactéries sont présents dans leur biomasse (Mg, P, Cl, Ca, Fe,..). il se rencontrent auss dans les antibiotiques (P, S, Cl...) t sont responsable de la régulation de la pression osmotique (NaCl , KCl). D'autres sont des stabilisateur de pH (CaCO_3) ou des Catalyseurs de réaction (Mg^{+2} , Mn^{+2} , $\text{Fe}^{+2/+3}$, Zn).

Le tableau suivant présente la concentration des sels minéraux dans certains espèces de bactéries.

Tableau 1: composition des solutions standard stock

ELEMENT	VEGETATIVE CELLS	SPORES
	Concentration per 0.1 ml.	
	$\mu\text{g.}$	$\mu\text{g.}$
K.....	313.0	129.0
Ca.....	115.0	766.0
P.....	535.0	230.0
Mg.....	125.0	242.0
Fe.....	3.0	6.0
Al.....	2.1	10.8
Cu.....	1.4	2.6
Mn.....	1.8	3.0
B.....	0.5	0.4

Néanmoins cette composition change en fonction de plusieurs paramètres. L'état physiologique de la bactérie est un facteur qui affecte la disponibilité des minéraux dans la cellule bactérienne. Ainsi, il a été prouvé que le stade de développement des espèces bactériennes modifie la minéralisation de la cellule. Le stade sporale connue une concentration de certains sels minéraux comparativement à la forme végétative (Tableau....)

(Curran et al., 1942)

Tableau 2 compositions inorganique élémentaire des cellules végétales et sport

ORGANISM	T.D.T. OF SPORES AT 115°C.	Fe		Al		Cu		Mn		B		
		Veg.	Sp.	Veg.	Sp.	Veg.	Sp.	Veg.	Sp.	Veg.	Sp.	
		mins.	ppm.	ppm.	ppm.	ppm.	ppm.	ppm.	ppm.	ppm.	ppm.	
<i>B. macerans</i>	3	140	220	390	230	50	260	30	40	5	20	
<i>B. megatherium</i>	3½	160	140	280	130	50	210	40	90			
<i>B. cereus</i>	4½	60	170	30	430	20	150	20	30			
<i>B. albolactis</i>	4½	30	220	trace	660	20	560	10	90	(7)	20	
<i>B. cohaerens</i>	5	560	120	90	300	50	480	40	80	5	10	
<i>B. subtilis</i>	6½	100	120	100	90	80	90	20	60	5	10	
CC.....	8	370	150	480	140	80	120	30	30	13	2	
9499.....	15½	130	380	50	590	60	200	120	80	10	5	
Δ {	7028.....	125	80	270	(40)	180	40	90	30	110	4	3
	1503.....	145	180	80	(450)	120	40	80	30	60		
	26.....	165	150	80	340	100	30	80	30	40		
	1518.....	250	200	130	240	120	40	110	60	70	7	1
<i>Cl. sporogenes</i> *.....		470		171		14		(8)				
<i>Cl. bifermentans</i> *.....		360		140		16		(8)				
Medium		117		15		24		75		148		

Vitamines et facteurs de croissance

Les vitamines sont des composés organiques essentiels pour la croissance des microorganismes ;Ils peuvent être ajouter comme suppléments au milieu de fermentation pour certains microorganismes (bactéries, champignons et levures).Archives Internationales de Physiologie, Volume 57, Issue 3 (1950)

Précurseurs

Les précurseurs sont des molécules intermédiaires qui servent de substrats de départ des réactions au cours de la biosynthèse de métabolites secondaires tels que des antibiotiques.

Ils sont souvent ajoutés de manière contrôlée et sous une forme relativement pure. Par exemples : L'acide phénylacétique est ajouté pour la chaîne latérale dans la production de pénicilline. D-thréonine est utilisé comme précurseur dans la production de L-isoleucine par *Serratia marsescens* .

Eau

L'eau est un composant majeur dans tous les milieux de culture et responsable de toutes les réactions métaboliques des processus de fermentation industrielle (sauf les fermentations sursubstrat solide). Elle fournit également des oligo-éléments nécessaires pour la croissance.

Sa qualité est très importante pour obtenir des cultures optimales et reproductibles (ex: L'eau déminéralisée, déionisée sont obtenues par des techniques de filtrations sur membranes)

Sources d' énergie

Les **bactéries doivent trouver** dans leur environnement les substances nécessaires à leur énergie et à leurs synthèses cellulaires. Les **bactéries phototrophes** utilisent l'énergie lumineuse pour la photosynthèse (synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique). Les **bactéries chimio trophées** puisent leur énergie à partir de composés minéraux ou organiques. Elles utilisent des donneurs et des accepteurs d'électrons (élément minéral bactérie **chimolithotrophe** ; élément organique : **bactérie chimioorganotrophe**).

La grande majorité des bactéries d'intérêt médical sont chimioorganotrophes

Besoins inorganiques

Le phosphore est présent dans les acides nucléiques et est utilisé dans de nombreuses réactions enzymatiques. Il permet la récupération, l'accumulation et la distribution de l'énergie dans la bactérie. Il est incorporé sous forme de phosphate inorganique.

Autres éléments

D'autres éléments jouent un rôle dans le métabolisme bactérien (sodium, potassium, magnésium, chlore) et dans les réactions enzymatiques (calcium, fer, magnésium, manganèse, nickel, sélénium, cuivre, cobalt, vitamines).

Perception du quorum (quorum sensing ou auto-induction)

Les bactéries communiquent entre elles et ont un comportement coopératif. Les bactéries contrôlent leur propre densité de population en percevant le niveau de molécules signaux ou

auto-inducteurs. Par exemple grâce à la perception du quorum, les bactéries atteignent une haute densité de population avant de libérer leurs enzymes.

Exemples

Synthèse et libération de facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*
Stimulation de la sporulation chez *Bacillus*.
Production de toxines et de facteurs de virulence chez *S. aureus*
Maturation du biofilm chez *P. aeruginosa*

Conditions techniques d'utilisation des milieux de culture

Stérilisation de milieux de culture

Un milieu doit être stérile avant d'êtreensemencé par la souche productrice.

Le traitement thermique est le moyen le plus utilisé pour stériliser le milieu; mais il présente l'inconvénient d'altérer et de modifier les qualités du milieu à cause de la dégradation de polymères (protéines, acide nucléiques), des vitamines et d'acides aminés comme le tryptophane et l'asparagine, ce qui entraîne parfois la formation de produits de dégradation toxiques ou inhibiteurs de croissance.

Aspects liés à la croissance des bactéries sur le milieu de culture

Loi de Shelford il y a des limites dans les facteurs environnementaux au-dessous ou au-dessus desquelles un organisme ne peut pas survivre et se développer, quel que soit l'apport en nutriments.

Division bactérienne

La bactérie se multiplie par fission binaire : la bactérie grandit puis se divise en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire. Durant la division, l'ADN se duplique ainsi que les autres constituants. Divers systèmes enzymatiques de synthèse et de dégradation participent à la division cellulaire. (L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

Dynamique de la croissance

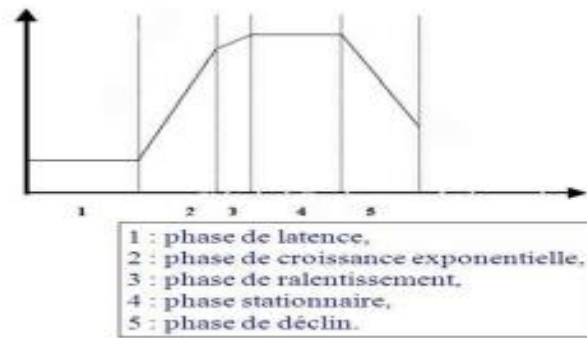
La croissance bactérienne est l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries. Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme, éventuellement toxiques. La croissance peut être étudiée en milieu liquide ou solide. (L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

Courbe de croissance

La croissance d'une bactérie s'étudie en milieu liquide. Il existe 6 phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance.

Phase de latence : le taux de croissance nul ($\mu = 0$). La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat (pas de phase de latence si repiquage sur milieu identique au précédent). **Phase d'accélération** : il se produit une augmentation de la vitesse de croissance. **Croissance exponentielle** : le taux de croissance atteint un maximum ($\mu = \max$). Cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante. Le temps de doublement des bactéries est le plus court. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle). **Phase de ralentissement** : la vitesse de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets. Il existe un début d'autolyse des bactéries. **Phase maximale stationnaire** : le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent. Il se produit une modification de l'expression des gènes. Les bactéries en état de déprivation synthétisent des protéines de manque qui rendent la cellule plus résistante aux dommages : augmentation du pontage du peptidoglycane, fixation des protéines à l'ADN des cellules de manque, chaperones qui empêchent la dégradation protéique et renaturent les protéines endommagées. **Phase de déclin** : le taux de croissance est négatif ($\mu < 0$). Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Cependant, il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse (croissance cryptique). La mort cellulaire est caractérisée par l'absence de réplication irréversible (L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

Figure 1 : courbe de croissances



Croissance in vitro (milieux liquide et solide)

Les bactéries peuvent être cultivées en milieux liquide, solide et semi-liquide. Les milieux liquides sont utilisés pour la culture de bactéries pures. Les milieux solides ou semi-solides, à base d'agar, sont utilisés pour l'isolement de bactéries. Dans ces milieux, ont été ajoutés des nutriments favorisant la croissance des bactéries étudiées.

Croissance in vivo

In vivo, la croissance bactérienne n'est pas similaire à celle observée in vitro. Elle est beaucoup plus ralentie. La phase de latence est beaucoup plus longue. Les bactéries n'ont pas toujours tous les nutriments à leur disposition pour leur croissance. In vivo, les bactéries peuvent être phagocytées par les macrophages et les polynucléaires et être inhibées par les produits antibactériens comme le lysozyme ou le complément ((L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

Tableau 3 Temps de génération in vitro et in vivo de quelques bactéries (L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

Bactéries	TG in vitro (min)	TG in vivo (h)
<i>Escherichia coli</i>	20-40	5
<i>Salmonella Typhimurium</i>	20-40	3-5
<i>Staphylococcus aureus</i>	40	3-5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	4
<i>Vibrio cholerae</i>	20	2-5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	120-240	24-48

Croissance en culture continue

Dans un milieu non renouvelé, la phase exponentielle de croissance ne peut durer que quelques heures. Dans un but industriel, il peut être nécessaire de prolonger cette phase en renouvelant constamment le milieu de culture et en éliminant les produits du métabolisme. Les croissances continues sont obtenues à l'aide de turbidostat, de chémostats, de fermenteurs en continu multi-étages ou d'autres dispositifs industriels. Il y a maintien d'une croissance exponentielle continue lorsque le milieu de culture est renouvelé régulièrement et que les métabolites sont éliminés en même temps. La valeur μ est maximale et constante ((L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

Croissance en culture synchrone

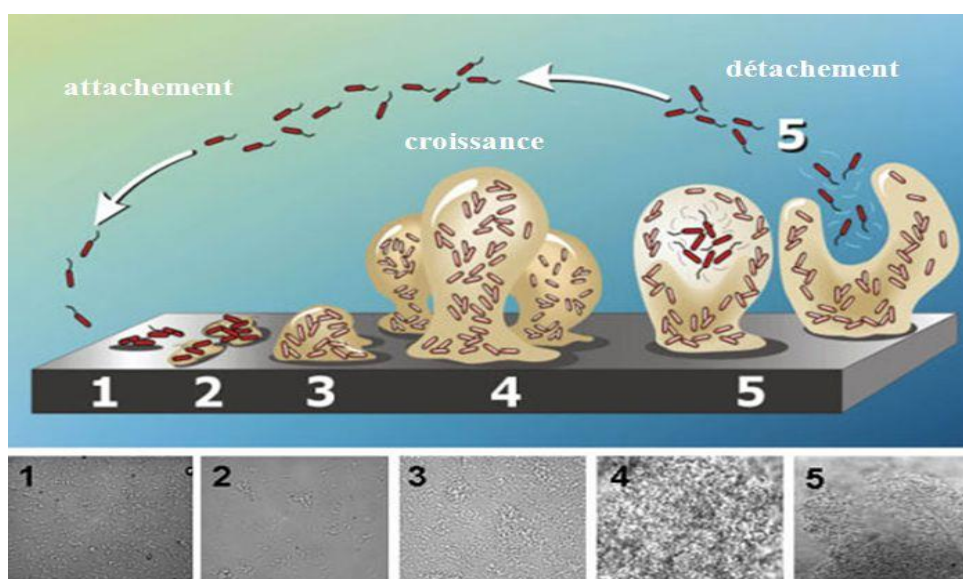
Les bactéries se multiplient toutes au même moment. La courbe de croissance montre des paliers successifs. Ce type de culture permet d'étudier la division cellulaire indépendamment de la croissance.

Croissance en biofilm

Les bactéries peuvent s'attacher aux surfaces, s'associer entre elles et s'entourer d'un polymère organique pour constituer un biofilm. Leur organisation et leur métabolisme

dépendent de la nature de la surface et de l'environnement physico-chimique. Les biofilms intéressent tous les domaines de la microbiologie et de la médecine (matériels d'exploration, matériels implantés, muqueuses lésées). Les biofilms sont caractérisés par une hétérogénéité spatiale : il existe des variations métaboliques importantes à l'intérieur du biofilm et à l'interface milieu liquide/milieu solide. (Das et al., 2013).

Figure 2 Croissance en biofilm Beloin C et coll. 2008. Curr.Top.Microbiol.Immunol.



Effets de carence et de stress Effets de carence et de stress

En situation de carence ou de stress

La bactérie peut adopter deux types de stratégie pour sa survie la bactérie se différencie vers une forme de résistance métaboliquement inactive C'est le cas des Bacillus qui produisent une spore. La bactérie développe des systèmes de régulation pour contrôler cette période de carence en adaptant son métabolisme pour faire un maximum d'économie. C'est le cas d'Escherichia colis. Dans ce type de situation, la bactérie présente les adaptations suivantes

Dégradation de l'ARN cellulaire total, libérant des nucléotides utilisables pour la synthèse de nouveaux ARN ou comme source d'énergie. Dégradation des protéines : libération d'acides aminés réutilisés ou dégradés pour la production d'énergie. Mise en œuvre de systèmes de transport et d'assimilation comme substituts aux éléments manquants qui sont essentiellement les composés azotés, phosphorés, carbonés et le fer. Synthèse de protéines de stress qui protègent la bactérie de la privation de nutriments et d'autres stress (existence de gènes

impliqués dans les phénomènes de carence ou de stress. Perception du quorum (quorum sensing ou auto-induction). Les bactéries communiquent entre elles et ont un comportement coopératif. Les bactéries contrôlent leur propre densité de population en percevant le niveau de molécules signaux ou auto-inducteurs. Par exemple grâce à la perception du quorum, les bactéries atteignent une haute densité de population avant de libérer leurs enzymes. ((L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

Conditions favorables à la croissance

Conditions psycho-chimiques de la croissance

Effet de l'oxygène

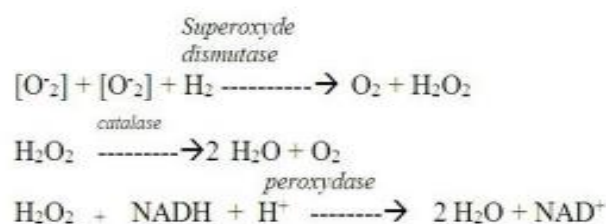
Il existe plusieurs classes de bactéries en fonction de leurs rapports avec l'oxygène.

Les **bactéries aérobies** strictes ne se développent qu'en présence d'air. Leur source principale d'énergie est la respiration. L'oxygène moléculaire, ultime accepteur d'électron, est réduit en eau (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Neisseria*).

Les **bactéries micro aérophiles** se développent mieux ou exclusivement lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air (*Campylobacter*, *Mycobacteriaceae*).

Les **bactéries Aero-anaérobies** facultatives se développent avec ou sans air. C'est le cas de la majorité des bactéries rencontrées en pathologie médicale : les entérobactéries (*Escherichia*, *Salmonella*), les streptocoques, les staphylocoques. L'énergie provient de l'oxydation des substrats et de la voie fermentaire. Les bactéries anaérobies strictes ne se développent qu'en absence totale ou presque d'oxygène qui est le plus souvent toxique. Ces bactéries doivent se cultiver sous atmosphère réductrice. La totalité de l'énergie est produite par fermentation. C'est le cas des bactéries intestinales (*Bactéroïdes*, *Fusobacterium*, *Clostridium*) et de nombreuses bactéries présentes dans les flores normales de l'organisme. La production d'énergie se fait grâce aux cytochromes membranaires couplés à des phosphorylations oxydatives mais en l'absence d'oxygène moléculaire. La toxicité de l'oxygène s'explique par la production de radicaux superoxydes que les bactéries anaérobies ne peuvent pas détruire (absence de superoxyde dismutase) et/ou par l'absence d'une activité enzymatique à type de catalases et de peroxydases.

Figure 3: Action de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la peroxydase



Effet de la température

La température influence la multiplication et le métabolisme. Selon leur température optimale de croissance, on distingue schématiquement diverses catégories de bactéries. Les bactéries mésophiles préfèrent une température moyenne comprise entre 20 et 40 °C. Les psychrotrophes ont une température optimale de multiplication de 20 à 25 °C, mais elles peuvent également cultiver à 0 °C. Les bactéries psychrophiles ont une température optimale de croissance située aux environs de 10 °C, mais elles peuvent cultiver à 0 °C. Les crymophiles peuvent se développer à des températures négatives. Par exemple, *Trichococcus patagoniensis*, isolé en Patagonie des fèces de pingouins, cultive à - 5 °C. Les thermotrophes se développent à 50 °C, mais leur température optimale de croissance est comprise entre 30 et 40 °C. Les thermophiles se multiplient préférentiellement entre 45 et 55 °C. Les hyperthermophiles ont une température optimale de croissance supérieure ou égale à 70 °C. *Methanothermus sociabilis* cultive à 97 °C, *Pyrobaculum Island cum* cultive à 100 °C, *Pyrococcus furiosus* a une température optimale de croissance de 100 °C, *Pyrodictium occultum* a une température optimale de croissance de 105 °C, nous pouvons le classer comme suit Les bactéries peuvent être classées selon leur température optimale de croissance.

- Bactéries mésophiles (Ex. : *Escherichia coli*) : température de croissance proche de celle du corps humain (37°C)
- Bactéries thermophiles (Ex. : *Thermes aquaticus*) : températures de croissance comprises entre 45°C et 70°C
- Bactéries hyperthermophiles (Ex. : *Archaea*) : températures de croissance supérieures à 80°C

- Bactéries psychrophiles (Ex. : *Pseudomonas*) : Températures proches de 0°C (optimum à 10-15°C)
- Bactéries psychotropes (Ex. : *Pseudomonas*) : températures de croissance proches de 0°C avec optimum de croissance proche des bactéries mésophiles

Effet du pH

La majorité des bactéries se multiplient préférentiellement à des pH voisins de la neutralité (6,5 à 7,5), mais elles sont capables de croître dans une large gamme de pH. Par exemple, *Escherichia coli* peut se multiplier pour des pH compris entre 4,4 et 9,0. Certaines bactéries qualifiées d'acidophiles préfèrent un pH acide. C'est le cas des lactobacilles dont le pH optimal est de 6 (Sims et al., 1990). Parmi les bactéries n'ayant pas d'intérêt en biologie vétérinaire, on peut citer *Thermoplasma acidophilum* dont le pH optimal est compris entre 0,8 et 3 et *Thiobacillus thiooxidans* dont le pH optimal de croissance est de 2 et qui peut se multiplier à un pH de 0. Inversement, les bactéries basophiles (ou alcalophiles) préfèrent des pH alcalins. Ainsi, le pH optimal est de 9 pour la multiplication de *Vibrio cholerae*, il est compris entre 8,5 et 9,5 pour *Exiguobacterium aurantiacum* et *Alkaliphilus transvaalensis* est capable de croître à un pH de 12,5. Au cours des cultures, le métabolisme bactérien engendre des composés acides ou basiques qui seraient susceptibles d'entraver la multiplication bactérienne. Pour éviter ces variations de pH, les milieux de culture sont tamponnés, le plus souvent en utilisant des tampons phosphates. Le pH (concentration en ion hydrogène [H⁺]) de l'environnement varie entre 0,5 (sols acides) et 10,5 (eaux alcalines des lacs). Bactéries pathogènes ou liées à l'écosystème humain se développent le plus souvent dans des milieux neutres ou légèrement alcalins. On distingue quelques types comme prochain. Les bactéries neutrophiles se développent pour des pH sont compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7. Et Les bactéries alcalophiles préfèrent les pH alcalins : cas de *Pseudomonas* et *Vibrio*. En plus de Les bactéries acidophiles se multiplient mieux dans des milieux acides : cas des *Lactobacillus*. Pour garder un pH interne neutre, le mécanisme de résistance des bactéries est : - Membrane cytoplasmique devient imperméable aux protons, - Bactéries neutrophiles : échange de potassium contre des protons, - Bactéries alcalophiles : échange d'ions sodium contre des protons, - Production de déchets métaboliques acides ou alcalins.

Tableau 4 pH minimum, optimum et maximum de différentes bactéries (Atlas and Bartha, 1993).

Organismes	pH		
	Minimum	Optimum	Maximum
<i>Escherichia coli</i>	4,4	6,0-7,0	9,0
<i>Proteus vulgaris</i>	4,4	6,0-7,0	8,4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4,4	6,0-7,0	9,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,6	6,6-7,0	8,0
<i>Erwinia carotovora</i>	5,6	7,1	9,3
<i>Clostridium sporogenes</i>	5,5-5,8	6,0-7,6	8,5-9,0
<i>Nitrosomas spp.</i>	7,0-7,6	8,0-8,8	9,4
<i>Nitrobacter spp.</i>	6,6	7,6-8,6	10,0
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	1,0	2,0-2,8	6,0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4,0	4,6-5,8	6,8
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	2,0	3,5	6,0
<i>Thermoplasma acidophilus</i>	1,0	1,5	4,0
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	1,0	2,5	4,0
<i>Bacillus alcalophilus</i>	8,5	9,5	11,5

Effet de la pression osmotique

Les bactéries sont assez tolérantes aux variations des concentrations ioniques. Certaines espèces sont osmotolérantes (staphylocoques, *Vibrio cholerae*). Les bactéries, à l'exception des *Mycoplasma* tales, sont peu sensibles aux variations de pression osmotique car elles sont protégées par leur paroi. Toutefois, certaines espèces marines sont adaptées à des milieux contenant environ 35 g de Na Cl par litre. Selon leur sensibilité à la pression osmotique, on distingue trois groupes de bactéries. . Les bactéries non-halophiles capables de croître dans des milieux dont la concentration en Na Cl est inférieure à 0,2 M... Les espèces halophiles ne pouvant croître que dans des milieux contenant des concentrations en Na Cl supérieures à 0,2 M pour les moins halophiles (*Cobetia marina*) à 5,2 M pour les plus halophiles (*Halococcus morrhuae*, *Halobacterium salinarum*, *Halorubrum sodomense*). . Les espèces halotolérantes comme les *Staphylococcus spp.* Les *Listeria spp.* Ou les *Lactobacillus spp.* La conservation des aliments comme les salaisons ou les confitures fait appel à une augmentation de la pression osmotique. Ces procédés ancestraux de conservation ont recours à l'addition de sel ou de sucre qui limitent la croissance de nombreuses bactéries. Seules les bactéries osmophiles se multiplient en présence de fortes concentrations de sucre et seules les bactéries halophiles se multiplient en présence de fortes concentrations de sel.

Non halophiles : concentration en Na Cl entre 0 et 1 molaires

- Halotolérants : concentration en Na Cl de 0 à 3 molaires.
- Halophiles : concentration en Na Cl de 0,5 à 3,5 molaires
- Halophiles extrêmes : concentration en Na Cl supérieure à 2 molaires

Effet de l'eau libre

La disponibilité de l'eau présente dans l'atmosphère ou dans une substance intervient dans la croissance bactérienne. L'activité de l'eau (A_w) est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un composé. Ainsi, elle est affectée par la présence plus ou moins importante de sels ou de sucres dissous dans l'eau.

Présence de sels

Les **bactéries halophiles** nécessitent du sel (Na Cl) pour leur croissance. Cette concentration peut varier de 1-6% pour les faiblement halophiles jusque 15-30% pour les **bactéries halophiles** extrêmes (Halobacterium). Dans ce cas, la bactérie accumule des quantités importantes de potassium pour rester hypertonique par rapport à son environnement. Les **bactéries halotolérantes** acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance (Ex. : Staphylococcus aureus).

Présence de sucres

Les bactéries osmophiles nécessitent des sucres pour leur croissance. Les bactéries osmotolérantes acceptent des concentrations modérées de sucres mais non obligatoires pour leur croissance. Les bactéries xérophiles peuvent se multiplier en l'absence d'eau dans leur environnement.

Facteurs de croissance

L'incorporation de facteurs de croissance est utilisée pour enrichir les milieux de culture pour réussir la culture du micro-organisme exigeant. Le plus souvent, des mélanges de facteurs de croissance sont utilisés dans les milieux microbiologiques commencé à partir de Hydrolysats qui sont considéré ce sont des peptones obtenues par une action inorganique (Acide

chlorhydrique) sur des protéines. Exemple : hydrolysate acide de caséine. Puis on passe à
Extraits de levures : L'extrait autolytique de levure est considéré comme le principal facteur
d'enrichissement des milieux de culture. Elle est préparée sous forme d'extrait hydrosoluble
de cellules de levure *Saccharomyces cerevisiae* autolysées. Au cours de l'autolyse, les
enzymes digestives endogènes des levures décomposent la teneur en protéines. De plus,
l'extrait de levure fournit une source essentielle de vitamines du complexe B hydrosolubles,
de glucides et d'acide glutamique libre. En raison de sa teneur en glucides, il ne doit pas être
utilisé dans les milieux destinés à l'étude des fermentations sucrées.

Produits biologiques

De nombreux milieux, en particulier ceux utilisés en laboratoire clinique, contiennent des
produits biologiques qui servent de nutriments essentiels pour les micro-organismes
exigeants. **Exemple** : Sang ou des composants sanguins, œufs, lait de vache écrémé, sérum de
cheval ou de bœuf.

Composants sélectifs / différentiels

La sélectivité

Les milieux de culture peuvent contenir des composants sélectifs qui inhibent la croissance
de micro-organismes non ciblés. Ces milieux sont particulièrement utilisés pour l'isolement
de micro-organismes spécifiques à partir de populations mixtes. C'est pourquoi nous venons
Plusieurs techniques sont utilisées pour rendre le milieu sélectif. En ajoutant un composant
toxique : sels biliaires, le sélénite, des concentrations élevées de chlorure. En ajoutant
d'antibiotiques : le cycloheximide, la gentamicine, l'acide nalidixique, la vancomycine. En
utilisant une seule source d'énergie.

La différenciation

Les milieux différentiels permettent de distinguer un type de micro-organisme d'un autre se
développant sur le même milieu. Ils contiennent des composés qui permettent de distinguer
visuellement des groupes de micro-organismes par l'apparence de la colonie ou du milieu
environnant. Certains milieux comprennent des indicateurs qui permettent la détection
visuelle des changements suite à la production d'acide à partir de divers glucides et d'autres
sources de carbone ou sur la décarboxylation d'acides aminés. D'autres milieux comprennent

des colorants chromogéniques qui changent de couleur lorsque des réactions enzymatiques spécifiques se produisent.

Chapitre:02

Historique de gélose

La gélose a pris naissance au Japon en 1658. Elle a d'abord été introduite en Extrême-Orient, puis dans les autres pays producteurs d'algues agar phytiqes. Son utilisation a été introduite en Europe en 1859. La gélose a été décrit pour la première fois pour une utilisation en microbiologie en 1882 par le microbiologiste allemand Walther Hesse, un assistant travaillant dans le laboratoire de Robert Koch, sur la suggestion de sa femme Fanny Hesse. -

<https://microbiologie-clinique.com/gelose-agar-agar.html>

Gélose ou agar-

A rapidement supplanté la gélatine comme base des milieux microbiologiques, en raison de sa température de fusion plus élevée, permettant aux microbes de se développer à des températures plus élevées sans que le milieu ne se liquéfie L'agar c'est un élément neutre qui n'intervient pas normalement dans la croissance des bactéries et dont le rôle c'est de porter la culture des bactéries. C'est un support qui solidifie le milieu par son critère d'absorption d'eau et facilite ainsi le repérage et le marquage des colonies bactériennes développées.

Ce composé est une substance naturelle gélatineuse, obtenus sous forme d'hydro colloïde des espèces d'algues rouges, principalement du **Rhodophycées** (Graileraï, Gelidium).

L'organisation de la gélose est très complexe hétérogène. Elle est faite d'un mélange de deux molécules polysaccharidiques linéaires appelées **agaropectine**, avec des sous-unités de galactose. **L'agar-agar** est d'une excellente transparence, très molle ce qui lui permette de visualiser les bactéries développées dans sa masse ou sur sa surface. L'agar agar durcit plus fermement que la gélatine et peut également résister à des **températures** Très élevées sans fondre. L'agar agar est également exempt de tous les produits d'origine animale, ainsi que du **gluten**, du blé, du maïs, du soja et de la **levure**. Bien qu'il soit riche en **fer**, en **fibres** Et en **calcium**, l'agar-agar ne contient pas de **calories**, de **glucides** Ou de graisses. [Saut de retour à la ligne]

Figure 4 Gélose ou agar












Propriétés nutritionnelles







Les propriétés nutritionnelles uniques de l'agar-agar ont en fait remporté un certain succès lorsqu'elles sont utilisées dans des études sur **l'obésité** Et le diabète de type 2 (mesuré par la **réduction** Du poids corporel moyen, **la glycémie** À jeun et là **pression artérielle**, entre autres facteurs). Comme **l'amidon** Et là **gomme** Xanthane, qui ont également des propriétés similaires à l'agar agar, la poudre et les flocons sont vendus dans la plupart des magasins d'aliments naturels et en ligne. Alors que de plus en plus de personnes commencent à suivre des régimes spéciaux, l'agar agar est plus régulièrement disponible à l'achat dans les supermarchés, souvent dans une section de produits **végétaliens** Ou sans gluten.

Tableau 5 Différentes algues sont utilisées comme matière première dans la production de gélose

Algues	Description
Mousse carraghénane	

<p><i>Gigartina, Chondrus crispus,</i></p>		
<p><i>Chondrus ocellata,</i></p>		
<p><i>Chondrus étoilé</i></p>		
<p><i>Gelidium amansii</i></p>		

<p><i>Gelidium cartilagineum,</i></p>	 A photograph of a dense, branching red alga with a soft, cartilaginous appearance, growing on a rocky substrate.
<p><i>Gelidium corneum,</i></p>	 A photograph of a red alga with a more rigid, branching structure, growing on a rocky surface.
<p><i>Gelidium sesquipedale</i></p>	 A photograph of a red alga with a dense, bushy, branching structure, growing on a rocky substrate.
<p><i>Gelidium subcostatum</i></p>	 A photograph of a red alga with a fan-like, branching structure, shown against a light background.
<p><i>Gigartina étoilé</i></p>	 A photograph of a red alga with a dense, star-like, branching structure, shown against a white background.

<p><i>Gloiapeltis</i></p>	 A photograph showing a dense cluster of brownish-yellow seaweed, identified as Gloiapeltis, growing on a dark, textured rock surface.
<p><i>Gracilaria arcuate</i></p>	 A close-up photograph of Gracilaria arcuate, showing its characteristic thick, reddish-brown, curved stipes.
<p><i>Gracilaria chilensis</i></p>	 A photograph of Gracilaria chilensis, a reddish-brown seaweed with a bushy, branching structure, growing in a shallow, clear water environment.
<p><i>Gracilaria Salicornia</i></p>	 A photograph of Gracilaria Salicornia, a dark, woody seaweed with a complex, branching structure, growing in a shallow, sandy water environment.
<p><i>Gracilaria millardetii</i></p>	 A photograph of Gracilaria millardetii, a dark, woody seaweed with a complex, branching structure, growing in a shallow, sandy water environment.
<p><i>Gracilaria vermiculophylla verruqueuse</i></p>	 A photograph of Gracilaria vermiculophylla verruqueuse, a reddish-pink seaweed with a complex, branching structure, growing in a shallow, clear water environment.



Agar en microbiologie

L'agar-agar est indigeste pour de nombreux organismes, de sorte que la croissance microbienne n'affecte pas le gel utilisé et qu'il reste stable. Une boîte de gélose ou une boîte de Pétri est utilisée pour fournir un milieu de croissance utilisant un mélange de gélose et d'autres nutriments dans lequel des micro-organismes, y compris des bactéries et des champignons, peuvent être cultivés puis identifiés. L'agar-agar est indigeste pour de nombreux organismes, de sorte que la croissance microbienne n'affecte pas le gel utilisé et qu'il reste stable. Une boîte de gélose ou une boîte de Pétri est utilisée pour fournir un milieu de croissance utilisant un mélange de gélose et d'autres nutriments dans lequel des micro-organismes, y compris des bactéries et des champignons, peuvent être cultivés puis identifiés.

La gélose est l'agent de solidification le plus couramment utilisé dans les milieux microbiologiques, L'agar-agar est généralement utilisé à une concentration finale de 1 à 2 % pour solidifier les milieux de culture. De plus petites quantités (0,05-0,5 %) sont utilisées dans les milieux pour les études de motilité (0,5 % p/v) et pour la croissance des anaérobies (0,1 %) et des microaérophiles Les spécifications de la **gélose de qualité bactériologique** comprennent une bonne clarté, une température de gélification contrôlée, une température de fusion contrôlée, de bonnes caractéristiques de diffusion, l'absence d'inhibiteurs bactériens toxiques et l'absence relative de minéraux et de composés métaboliquement utiles. La gélose au sang est un milieu non sélectif qui peut être rendu sélectif pour certains agents pathogènes par l'ajout d'antibiotiques, de produits chimiques ou de colorants.

La gélose est l'agent de solidification le plus couramment utilisé dans les milieux microbiologiques

L'agar-agar est généralement utilisé à une concentration finale de 1 à 2 % pour solidifier les milieux de culture. De plus petites quantités (0,05-0,5 %) sont utilisées dans les milieux pour les études de motilité (0,5 % p/v) et pour la croissance des anaérobies (0,1 %) et des microaérophiles. Les spécifications de la **gélose de qualité bactériologique** comprennent une bonne clarté, une température de gélification contrôlée, une température de fusion contrôlée, de bonnes caractéristiques de diffusion, l'absence d'inhibiteurs bactériens toxiques et l'absence relative de minéraux et de composés métaboliquement utiles.

Les types des milieux de cultures

Certains milieux sont conçus pour connaître parfaitement les besoins élémentaires des bactéries et permettent de mesurer les quantités consommées des substrats existants. Cela oriente les chercheurs dans l'identification des bactéries et constitue une manière pour prévoir le comportement des bactéries en fonction du milieu utilisé pour leur étude. Ainsi les milieux dont la composition est de nature minérale connue en détail et de façon très précise est qualifié un milieu synthétique. Le milieu dont la composition est partiellement connue est nommé semi- synthétique. D'autre part, les milieux issus de l'expérimentation et de l'optimisation par les microbiologistes et qui contiennent des parties organiques d'origine animale ou végétale est nommé empirique. **Les milieux de cultures** : sont indispensables à la multiplication bactérienne, ce qui permet par la suite **l'identification**. Ainsi que l'étude de **la sensibilité aux antibiotiques** lorsque la bactérie est isolée en culture pure.

La plupart de ces **milieux microbiologiques** sont produits par les principaux fournisseurs de milieux déshydratés, notamment , , . Ceux-ci comprennent tous les milieux normalement utilisés dans le laboratoire de diagnostic de microbiologie clinique et pour l'examen de routine des aliments et de l'eau. - <https://microbiologie-clinique.com/milieuxcultures.html>

Tableau 6 principaux fournisseurs de milieux des culture

Fournisseur	Origine	Chiffre d'affaire
Oxide	L'origine d'Oxide remonte au 19 ^{ème} siècle quand la bactériologie a débuté. La société d'origine, Liebig Extract of	Sur l'année 2020 elle réalise un chiffre d'affaires de Le total OXOID HOLDING, SA par action simplifiée à

Chapitre:02 les types Milieux des cultures

	Meat Compagnie (Lemco) fabriquait des extraits de viandes qui pouvaient être aussi utilisés en laboratoire pour faire croître des bactéries. Liebig produisit une version économique et très répandue de cet extrait de viande au début du 20ème siècle sous le nom d'Oxo, devenant quelques années plus tard très populaires sous la forme du cube Oxo.	associé unique au capital de 73 036 282€, a débuté son activité en décembre 1996. l du bilan a diminué de 34,90 % entre 2019 et 2020.
BD Diagnostics et Milipore	BD est un acteur unique des technologies médicales par sa présence auprès de tous les professionnels du soin. Nous accompagnons le quotidien des chercheurs, des soignants et des patients tout au long du parcours de soins, nous aidons à faire face aux défis d'aujourd'hui et à préparer l'avenir.	Chiffre d'affaires (€) 2021 2020 2019 1,35M 1,14 1,05 ds Mds Mds
Himedia	HiMedia est l'un des principaux fabricants de peptones, d'hydrolysats de protéines d'origine animale ainsi que d'origine végétale en Inde. HiMedia, s'appuie sur ses ressources internes et son usine de fabrication de matières premières pour fournir des peptones de haute qualité et d'autres produits de milieux de culture	Malgré un chiffre d'affaires de seulement 13,3 millions d'euros, en chute de 13% sur un an, la marge brute s'établit à 6,4 millions d'euros (+69%).

<http://www.oxid.com/uk/blue/index.asp>

Mode de présentation des milieux de culture

comme a été expliqué précédemment, le milieu de culture constitue le support qui tient la clone bactérienne développée à partir des unités formant colonies dans ce cas il s'agit d'un milieu solide. Dans l'autre cas, les bactéries se trouvent en suspension dans la masse du milieu liquide et peuvent librement circuler si elles sont mobiles. La différence est d'ordre de consistance. Les milieux solides contiennent l'agar qui absorbe une grande quantité d'eau (

-Il existe aussi des bouillons de culture qui possèdent la même fonction, mais ces milieux ne contiennent pas d'agar-agar, ils sont donc totalement liquides.

Mazinga et al. J. Appl. Biosci. 2014. Effet de différentes doses d'agar du milieu de culture sur l'induction de la rhizogénèse chez l'hybride FHIA 01 de bananier en culture vitro

. Milieu de culture liquide

L'agar n'est pas ajouté lors de la préparation du milieu, la croissance se traduit par un trouble, un dépôt ou une voile superficielle. La présence de plus d'un type de bactéries ne peut pas être détectée et les cultures mixtes ne peuvent pas être séparés.

Exemple : bouillon nutritif, bouillon trypticase soja.

Figure 5: milieu de culture liquide



Milieu de culture semi-solide

Contenant 0.5-0.75 % d'agar de consistance molle, il est utilisé pour démontrer la motilité bactérienne.

Exemple : Milieu mannitol mobilité.

Milieu de culture solide

On obtient un milieu solide en ajoutant un agent gélifiant, "l'agar-agar" ou gélose, à un milieu liquide. Il permet l'identification des bactéries en étudiant les caractères des colonies (morphologie, pigmentation, l'hémolyse...) et Les cultures mixtes peuvent être séparées.
Exemple : Gélose nutritive, Gélose trypticase soja, Gélose Cled.

Figure 6: Milieu de culture solide



Type commercial

Milieux empiriques ou complexes

Un milieu naturel est un milieu qui contient (en dehors de l'éventuel gélifiant agar-agar) un ou plusieurs composés naturels dans sa composition. Voici quelques exemples classiques : peptones, extrait de levure, lait, liqueur de maïs, pomme de terre, sang ...Le composé naturel introduit est sujet à des variations naturels dans sa composition quantitative et (parfois) qualitative. Selon les lots, tous les laits de vache n'ont pas la même composition exacte, ni toutes les pommes de terre ...Différents composés naturels très souvent utilisés méritent d'être décrits ici. <http://www.biologiemarine.com/micro/milcult.htm>

Peptone : Les peptones sont obtenues après action de protéases (pepsine, trypsine, papaine) sur un composé naturel de composition essentiellement protéique (viande, caséine de lait...).

Les peptones sont donc riches en aminoacides et peptides.

L'équilibre entre **les (20) aminoacides** présents dépend du type de composé protéique de départ. Selon la pureté et l'origine du composé protéique naturel de départ les charges en sucres, minéraux, coenzymes sont très variables (de nulles à importantes). Il faut se référer aux données des différents fabricants.<http://www.biologiemarine.com/micro/milcult.htm>

Le dictionnaire de l'académie française de 1986 donne une définition très intéressante 19^eSiècle. Emprunté à l'allemand pepton, de même sens, lui-même tiré du grec "pessin" qui signifie "cuire, digérer". Mélange de protéines partiellement hydrolysées par des enzymes digestives telles que la pepsine ou la trypsine, utilisé en microbiologie et dans certaines préparations pharmaceutiques. Peptone de viande de lai, de soja. Heures à une température de 47,8°C. De nombreuses molécules solubles du grain de maïs diffusent dans l'eau, mais l'amidon reste dans le grain de maïs. L'eau de trempage est ensuite généralement évaporée pour former le corn steppe "solide, déshydraté".<http://www.biologiemarine.com/micro/milcult.htm>

Extrait de levure

Il s'agit d'un autolysat de levures (*Saccharomyces cerevisiae*). L'autolyse des levures est déclenchée par choc osmotique et/ou thermique et dure 10 à 60 heures. Le matériel hydrosoluble obtenu est conservé, concentré puis déshydraté. L'extrait de levures est riche en acides aminés, nucléotides, sucres, coenzymes, macro et micronutriments minéraux.

Ex Eau peptone, bouillon nutritif, dont les peptones sont simples, pour les germes hétérotrophes ne présentant pas d'exigence particulière.

- TS, Columbia, Mueller-Hinton : peptones plus riches pour les germes plus exigeants

Milieux enrichis

addition de suspensions riches en molécules organiques (sang, sérum, extrait globulaire ...). Cf plus loin.

Milieux sélectifs

contiennent des molécules empêchant la culture de certains micro-organismes. Ils sont utilisés pour isoler les germes de produits poly-microbiens. 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*.

Rmq

On peut également augmenter la sélectivité des milieux en choisissant des conditions de culture particulières. Ex : la gélose au cétrimide placée à 42°C est plus sélective pour *Pseudomonas aeruginosa*. 2- On parle de milieu "électif" lorsqu'il ne contient pas d'agent inhibant mais qu'il favorise la croissance d'un type de germes. Le principal exemple est la gélose au sérum coagulé pour les corynébactéries.

Milieux d'orientation et d'identification ou milieux différentiels

La plupart des milieux contiennent des éléments permettant de mettre en évidence des caractères biochimiques en vue d'une orientation du diagnostic. La lecture de ces milieux peut **soit se faire directement** virage d'un indicateur de pH indiquant la consommation d'un sucre (milieu BCP pour le lactose chez les Entérobactéries, Chapman pour le mannitol chez les *Staphylococcus* ...) présence d'ions fer III qui révèlent la production d'H₂S par apparition d'un précipité noir (milieu Hajna-Kligler, milieu SS...) **soit se faire après addition de réactifs** addition d'acide sulfanilique et d' α -naphthylamine pour révéler la réduction des nitrates dans le bouillon nitrate - addition de perchlorure de fer pour révéler la présence d'une tryptophane désaminase en milieu Urée-Indole ...

Milieux synthétiques ou milieux (chimiquement) définis

Milieu de culture élaboré à partir d'une formulation de substances chimiques pures et de l'eau bidistillée. Sa composition chimique qualitative et quantitative exacte est donc connue (aux impuretés des produits chimiques purs près. Ce qui peut avoir son importance pour ce qui concerne les micronutriments minéraux). Ces milieux sont utilisés essentiellement pour l'étude de besoins nutritifs d'un germe. Peu sont utilisés couramment : Gélose pour

auxanogramme , Citrate de Simmons, Urée-Indole...Certains milieux, parmi les milieux chimiquement définis, sont parfois qualifié de milieu minimum. **Un milieu minimum** est un milieu synthétique chez lequel on a minimisé le nombre de composants chimiques afin de répondre aux exigences de culture des micro-organismes étudiés mais au plus juste.

-Classiquement, pour les souches chimioorganotrophes, un milieu synthétique minimum sera conçu autour d'un sucre source d'énergie et source de carbone, d'une source minérale d'azote (comme NH_4^+ ou NO_3^-) et de soufre (comme SO_4^{2-}), d'un apport en phosphore sous forme de phosphates, de la série des macronutriments minéraux, des micronutriments minéraux nécessaires et d'un apport - si nécessaire - en métabolites essentiels (briques élémentaires) facteurs de croissance (c'est à dire les coenzymes, bases azotées, acides aminés pour lesquelles les chaînes de biosynthèse à partir des métabolites intermédiaires précurseurs fondamentaux sont non fonctionnelles).

Ces milieux sont utilisés essentiellement pour l'étude de besoins nutritifs d'un germe. Peu sont utilisés couramment : Gélose pour auxanogramme, Citrate de Simmons, Urée-Indole...On les rencontre également pour la culture de micro-organismes autotrophes chimio-lithotrophes telles que les cyanobactéries. Dans ce cas Le carbone est apporté sous forme de carbonate de sodium, l'azote est apporté sous forme de nitrate ou d'ammoniac, Les autres sels minéraux sont les phosphates, sulfates, chlorures ...

Par exemple les souches E. coli "sauvages" (**on rappelle que E. coli est un chimio-organotrophe hétérotrophe classique**) cultivent parfaitement sur le milieu minimum synthétique de composition (finale) suivante

Glucose 3 à 10 g/L

Na_2HPO_4 0 6 g/L

KH_2PO_4 3 g/L

$(\text{NH}_4)_2\text{Cl}$ 1 g/L

NaCl 0,5 g/L

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0147 g/L par litre

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,246 g/L

FeSO₄ 7H₂O 0,5 mg/L

Ajusté à pH 7,2-7,6 avec NaOH

les milieux de base et les additifs ajoutés

Certains milieux nécessitent l'adjonction de produits ne supportant pas l'autoclavage (sang frais, jaune d'œuf, antibiotiques, compléments vitaminiques...). Ces compléments doivent alors être apportés stériles dans la gélose en surfusion. La stérilité des additifs est assurée soit au moment du prélèvement, soit par filtration. Certains milieux nécessitent d'être régénérés avant utilisation : ils sont placés pendant 20 minutes dans un bain-marie bouillant de sorte à chasser l'oxygène dissout (Ex : gélose VF, milieu Hugh-Leifson ...). Les milieux qui doivent être ensemencés en profondeur sont préalablement liquéfiés au bain-marié, puis maintenus en surfusion (45-50°C) en bain thermostaté jusqu'à leur ensemencement. **Extrait globulaire** obtenu par expression d'un caillot de sang au travers d'un linge, il est stérilisé par filtration. Ajouté dans les milieux de base à hauteur de 10%, sa caractéristique fondamentale est sa richesse en hémine (facteur X). **Sérum** obtenu par séparation du coagulum d'un sang normal ou par décantation d'un sang défibriné. Il est stérilisé par filtration ou par tyndallisation. Ajouté à 5-10% dans les milieux, il permet la croissance des germes sérophiles (Gélose au sérum coagulé pour *Corynebacterium*). **Ascite** le liquide est obtenu par ponction stérile chez des individus atteints d'hydropisie (accumulation de sérosité dans une cavité naturelle du corps). Il contient les mêmes éléments que le sérum, mais moins de glucose et d'enzymes pouvant interférer avec les recherches biochimiques réalisées. **Jaune d'œuf** prélevée stérilement, la solution de jaune d'œuf est additionnée aux milieux usuels pour permettre la recherche de la lécithinase (milieu Baird-Parker pour *Staphylococcus aureus*) **Lait** possibilité d'utiliser le lait UHT, qui est stérile. Utilisé pour l'isolement et le dénombrement des bactéries lactiques, pour la recherche de l'hydrolyse de la caséine. <http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A1/microbiologie/milieuxCulture/milieuxCulture.php>

Classification des milieux de culture

Il existe une grande variété de **milieux de culture**, selon leur composition chimique, leur nature physique, leur utilisation ou la méthode de préparation, les **milieux de culture** peuvent être classés en plusieurs groupes.

Constituants chimiques des milieux de culture

La notion de milieu minimum

Un milieu minimum est un milieu comportant les éléments chimiques strictement nécessaires à la croissance bactérienne, sous une forme utilisable par des bactéries n'ayant pas d'exigence particulière : une source de carbone et d'énergie, une source de potassium, de phosphore, d'azote, de soufre, de magnésium, de calcium, de fer, d'oligo-éléments, d'eau et un tampon pH.

Extraits de viandes

est préparé à partir de tissus d'origine animal sélectionnés qui lui confèrent son excellente nutritivité. En association avec des peptones de différentes origines, l'extrait de viande constitue un excellent complément nutritif destiné à l'élaboration de milieux de culture variés. Il est habituellement incorporé à des concentrations allant de 0,2 à 1,0%. Ces infusions contiennent des acides aminés et des peptides de faible poids moléculaire, des glucides, des vitamines, des minéraux et des métaux traces. **Exemple** : Bacot extrait de bœuf déshydraté, Bacot Cœur de Bœuf pour Infusion.

Classification des milieux de culture selon leur utilisation

Milieu de culture simple

Les **milieux de cultures simple**, base, sont ceux qui peuvent être utilisés pour la culture de bactéries non exigeantes. Généralement utilisé dans le diagnostic de routine en laboratoire pour l'isolement primaire des bactéries. Ce type de milieu peut être rendu plus riche, par l'ajout de suppléments, ou sélective, par l'ajout de concentrations variables de chlorure de sodium. -<https://microbiologie-clinique.com/milieucultures.html>

Exemple : Bouillon nutritif, gélose nutritive Et eau peptonée

Milieu de culture enrichi

Ce sont des milieux utilisés pour l'obtention des bactéries dites « exigeantes » en y ajoutant de suppléments sous forme de sang, de sérum, de jaune d'œuf, etc. -<https://microbiologie-clinique.com/milieucultures.html>

Exemple : Gélose au sang frais, gélose au sang cuit.

Figure 7: Milieux enrichis



Milieu sélectif et milieu d'enrichissement

Un **milieu sélectif** est formulé pour inhiber la croissance de certaines espèces bactériennes. Ces milieux peuvent être formulés en ajoutant des réactifs sélectifs supplémentaires, tels qu'une concentration saline élevée pour sélectionner les halophiles, éosine-bleu de méthylène toxique pour les bactéries Gram-positives. -<https://microbiologie-clinique.com/milieucultures.html>

Exemple : Gélose EMB, gélose MacConkey.

Un **milieu d'enrichissement** permet également la croissance d'espèces bactériennes spécifiques, cependant, les milieux d'enrichissement sont complétés par un réactif qui permet, plutôt qu'il n'inhibe, la croissance d'une espèce particulière.

Exemple : Bouillon Sélénite F (sélénite est un inhibiteur pour les coliformes et bénéfique pour la récupération des espèces de Salmonella), gélose Thayer Martin.

Milieu différentiel

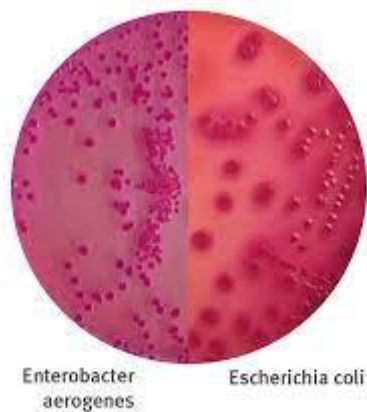
Le milieu de culture dit « **différentiel** » ou « **indicateur** » permet de distinguer deux types de microorganismes se développant dans un même milieu.

Ce type de milieu utilise les caractéristiques biochimiques d'un micro-organisme se développant en présence de nutriments et/ou d'indicateurs spécifiques (tels que le rouge neutre ou le bleu de méthylène) ajoutés au milieu pour indiquer visiblement les

caractéristiques déterminantes d'un micro-organisme. -<https://microbiologie-clinique.com/milieucultures.html>

Exemple : Gélose MacConkey (Par la fermentation du lactose), gélose chapman (par la fermentation du mannitol).

Figure 8 : Milieu différentiel



Milieu de transport

Ces milieux sont utilisés lorsque les spécimens ne peuvent pas être cultivés peu de temps après le prélèvement. Les **milieux de transport** empêchent le dessèchement de l'échantillon et inhibent la prolifération de bactéries indésirables.

Exemple : Gélose Cary-Blair, écouvillons de transport gélosés amies. -<https://microbiologie-clinique.com/milieucultures.html>

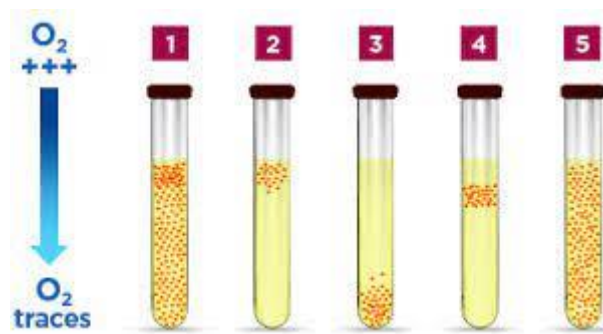
Figure 9 : Milieu de transport



Milieu anaérobie

Les bactéries anaérobies ont besoin d'un potentiel d'oxydo-réduction réduit et de nutriments supplémentaires. De tels milieux peuvent être réduits par des moyens physiques ou chimiques.

Figure 10 : Milieu anaérobie



Exemple : La gélose anaérobie Schaedler, gélose Wilkins-Chalgrin.

Classification des milieux de culture selon la méthode de préparation

Milieu prêt à l'emploi

Milieu de culture prêt à l'emploi est un milieu solide ou liquide fourni en boîtes, flacons, tubes ou autres récipients, sous forme prête à l'emploi ou prête à l'emploi après refusion et supplémentation.

Figure 11: Milieu prêt à l'emploi



Milieu préparé à partir de formulations déshydratées

Un milieu de culture est un milieu sous forme sèche qui nécessite une réhydratation et un traitement avant utilisation, aboutissant soit à un milieu complet, soit à un milieu incomplet auquel des suppléments sont ajoutés avant utilisation.

Figure 12: Milieu préparé à partir de formulations déshydratées



Gélose nutritive ordinaire

Relativement simplifiée, la formulation apporte les éléments nutritifs nécessaires à la croissance d'une grande variété de germes non exigeants, Il est recommandé par l'American Elath Association pour la numération des bactéries dans les eaux.

Figure 13 : serratia Gélose nutritive



La gélose nutritive est dépourvu d'indicateur, d'agent sélectif, d'ingrédients différentiels et de substances enrichissantes, donc utilise pour une meilleure expression de la pigmentation, test biochimique et même pour le stéréotypage.

Gélose Mueller Hinton

La **gélose Mueller–Hinton** est un milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la méthode de diffusion ou de dilution en gélose.

Figure 14: serratia sur Mueller Hinton



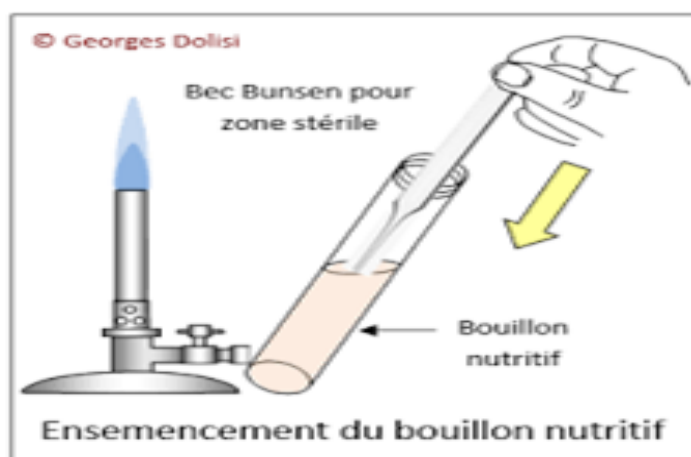
La standardisation du **milieu de Mueller-Hinton** est nécessaire pour obtenir des résultats fiables au niveau de l'antibiogramme. Celle-ci concerne la composition du milieu avec des concentrations limites de CaCl_{2+} , MgCl_{2+} et ZnCl_{2+} .

Elle peut également être additionnée de sang pour réaliser l'antibiogramme des germes fragiles, tels que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria* et *Streptococcus pneumoniae*

Bouillon nutritif

Le **Bouillon Nutritif** est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. Il est recommandé dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

Figure 15: Bouillon nutritif



Le Bouillon Nutritif

Est constitué d'un mélange de Tryptone et d'extrait de viande qui contribue à la croissance des microorganismes. Le chlorure de sodium est destiné au maintien de la pression osmotique.

Gélose Cled

En 1960, Sandys a étudié un moyen permettant d'éviter l'envahissement des boîtes par les *Proteus*, en utilisant un milieu déficient en électrolytes. **La gélose CLED** (Cystine Lactose Electrolyte Deficient) est utilisée pour l'isolement, la numération et la différenciation des microorganismes urinaires.

Figure 16 *Gélose Cled S-marcescens*



La fermentation du lactose en acide est mise en évidence par le virage du vert au jaune de l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol. La cystine favorise la croissance des coliformes donnant habituellement de petites colonies sur d'autres milieux. La déficience en électrolytes réduit l'envahissement du milieu par les *Proteus*.

Gélose Columbia

La **gélose Columbia** est un milieu très nutritif permettant la culture et l'isolement d'une grande variété de microorganismes et plus particulièrement des germes très exigeants (tels que streptocoques et pneumocoques). Par addition de sang, d'agents sélectifs ou

d'accélérateurs de croissance, il est possible de préparer une grande diversité de milieux adaptés à des utilisations spécifiques.

Figure 17 Gélose Columbia(Hémolyse bêta).



Milieu Chapman

Les staphylocoques pathogènes forment des colonies luxuriantes, pigmentées, entourées d'une auréole jaune due à la fermentation du mannitol. Les staphylocoques non pathogènes forment en général de petites colonies rouges qui ne modifient pas la teinte du milieu.

Figure 18 : Culture de **Staphylococcus aureus** Fermentation du mannitol
24h à 37°C



Quelques souches de *Staphylococcus epidermidis* sont capables de fermenter le mannitol.

Milieu Hektoen

La **gélose Hektoen** est un milieu sélectif pour l'isolement et la différenciation des bacilles Gram (-) entéropathogènes, en particulier les *Salmonelles* sp. Et les *Shigella* sp.

Figure 19 : **Escherichia coli** su **Hektoen** .

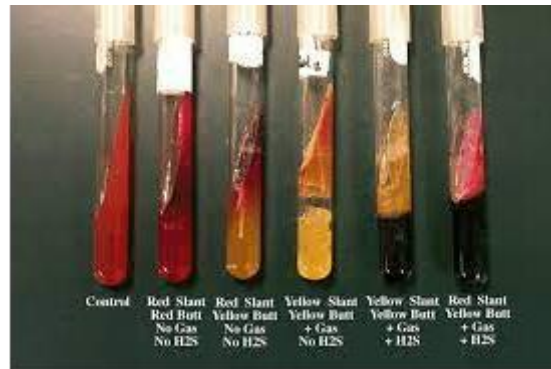


La sélectivité de ce milieu est basée sur la présence de sels biliaires, de bleu de bromothymol et de fuchsine acide. La différenciation est basée sur leur capacité à fermenter différents sucres : le lactose, le saccharose, la salicine.

Gélose TSI

La **gélose TSI** est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose et sur la production de gaz et d'H₂S

Figure 20 Gélose TSI



La **Triple Sugar Iron Agar** contient trois glucides (glucose, **lactose et saccharose**). La fermentation de ces glucides provoque une production d'acide, qui est détectée par l'indicateur au rouge de phénol. Des changements de couleurs en résultent, et le milieu vire au jaune en cas de production d'acide, ou au rouge en cas d'alcalinisation.

Identification par microméthode "API"

Les **galeries Api** utilisent plusieurs types de tests : étude de la fermentation de divers glucides, auxanogramme, recherche directe d'une enzyme.

Figure 21: Identification par microméthode "API"



Chaque tubule contient un substrat différent sur lequel le micro-organisme considéré va réagir. Ils sont remplis d'une suspension bactérienne calibrée (de densité différente selon la galerie).

Chapitre : 03

La Co -culture

Les techniciens microbiologistes ont développé des systèmes de Co-culture pour étudier les interactions entre les bactéries entre elles. , ces systèmes ont eu un intérêt particulier pour faciliter la synthèse de composés nécessitant la présence simultanée de plusieurs espèces. Ces systèmes assurent un degré de contact entre les bactéries et favorisent l'expression des nouveaux caractères.

Certaines propriétés bactériennes ne se manifestent au laboratoire qu'en présence d'autres populations qui leur aident dans la production des métabolites par effet stimulant. Parmi ces caractères c'est la production des molécules antimicrobiennes dont l'apparition est liée à des conditions expérimentales idéales comme la Co-culture.

Il y a aussi la possibilité d'interagir un végétal et une bactérie phytopathogène, pour produire certaines substances d'intérêt, dont la généralisation à l'échelle industriel est envisageable.

Des recherches récentes ont élargi les modèles de Co-culture par la synchronisation de la culture des micro-algues avec les bactéries nitrifiantes dans les stations de l'épuration des eaux usées. Kwon et al (2019) ont investi un système composé de 4 micro-algues (. *C. vulgaris*, *S. quadricauda*, *D. communism* and *C. emersonii*) pour l'approvisionnement des bactéries nitrifiantes aérobiques par l'oxygène nécessaire à l'élimination de la pollution azotée. Ce système a permis de remplacer l'aération artificielle par ces organismes et ont permis de réduire considérablement la consommation de l'énergie liée à l'utilisation des turbines ordinaires.

Dans un autre aspect, l'étude des interactions microbiennes dans le tube digestif a fait l'objet de plusieurs études, et de nombreux modèles simulateurs ont été proposés (kim et all 2010).

Naturellement, les cellules épithéliales entretiennent des relations avec les bactéries commensales. Dans les cas pathologiques, l'équilibre de la flore occupant le milieu intestinal est rompu par la présence des bactéries pathogènes qui viennent pour s'attacher sur la lumière intestinale. Le processus d'attachement est l'étape primaire de la colonisation du lieu infecté. Ce rapport de continuité fait l'objet de plusieurs études pour comprendre ce mécanisme et essayer de cerner ces désordres physiologiques.kim et al(2010) ont critiqué les méthodes de co-culture actuelles car elles ne conviennent pas l'étude de la colonisation des pathogènes

car elles ne permettent pas la co-culture de bactéries et de cellules épithéliales d'une manière qui imite le microenvironnement du tractus gastro-intestinal.

Le modèle de Co-culture microfluidique proposé par kim et al(2010) permet la culture indépendante de cellules et de bactéries, et l'essai de l'effet du microenvironnement commensal sur la colonisation des pathogènes. Il s'agit d'un système actionné de manière pneumatique développé pour former des îlots réversibles qui permettent le développement d'un biofilm bactérien avec la culture d'une monocouche cellulaire épithéliale de la lignée cellulaire HeLa. Cela a permis de suivre de près les événements de l'infection des voies gastro-intestinales.

OPTIMISATION DES MILIEUX DE CULTURE

Du fait de l'explosion du nombre de nouvelles espèces bactériennes découvertes grâce à la technique de culturomics, qui consiste à utiliser un très grand nombre de milieux de culture et de conditions de culture afin d'étendre le répertoire des bactéries, la culture bactérienne a connu un nouvel essor depuis plusieurs années. En effet, suite à la découverte des techniques moléculaires, la culture a été considérée comme dépassée par un grand nombre de microbiologistes. Cependant, de précédentes études ont depuis mis en évidence que les techniques moléculaires et la culture bactérienne sont complémentaires. Le développement de nouveaux milieux et de nouvelles techniques de culture est primordial car cela permettra d'optimiser la croissance de certaines bactéries ou encore d'isoler des bactéries fastidieuses à cultiver. Pour cela, la connaissance de l'environnement naturel de la bactérie et de ses besoins nutritifs apparaît fondamentale pour isoler les bactéries et éviter ainsi qu'elles ne demeurent dans la catégorie des bactéries « incultivées ». De plus, il est également nécessaire de développer des milieux sélectifs afin d'isoler spécifiquement des bactéries.

Techniques D'ensemencement

Les microbes coexistent dans des populations mixtes dans différents environnements

(Naturelles, hospitalières, symbiotiques, etc.) ; des centaines d'espèces bactériennes différentes Coloniser l'intestin humain. 108 peuvent être trouvés sous terre jusqu'à 109

Bactéries Chaque gramme de sol est constitué de plusieurs bactéries et champignons. Une analyse Les échantillons pathologiques provenant de milieux hospitaliers donnent souvent

plusieurs cultures microbiennes. Cela pose un problème aux microbiologistes car on ne peut jamais étudier plus d'une espèce espèces microbiennes, de sorte que chaque espèce microbienne doit être séparée des autres par Les technologies de séparation et de purification, qui reposent également sur la maîtrise de la technologie Base de semis

Termes importants :

Inoculation ou ensemencement en microbiologie

Introduire un inoculum bactérien dans un milieu de Culture stérile (bouillon ou gélose, ect.) À l'aide d'une pipette Pasteur ou d'une anse de platine, ect.

Inoculum : Échantillon ou bien quantité de microorganismes prélevés à partir d'une culture Mère, destinée à ensemencer (inoculé) au sein d'un milieu de culture favorable à sa multiplication.

L'isolement : Consiste à des ensemencements sur des milieux de culture dans un but de séparation de

Façon à obtenir des colonies bien distinctes. Repiquage : réensemencement de culture pure dans un milieu de culture neuf. La différence entre « Espèce » et « souche » : Une souche est une partie d'une espèce bactérienne, mais elle est différente des autres bactéries de la même espèce par une différence mineure, mais identifiable.

Inoculation d'un bouillon de culture

Dissociation en milieu liquide de colonies bactériennes Tourné avec une bague en platine.

Inoculation par stries sur milieu gélosé

Déposer l'inoculum sur le milieu gélosé, puis Essuyez soigneusement le fil de platine ou l'anneau de pipette Pasteur sur la surface de la gélose La méthode est réalisée avec la gélose versée dans une boîte de Pétri ou une gélose inclinée tube à essai.

Inoculation par inondation en nappe) : La surface du milieu gélosé dans la boîte de Pétri est submergée L'inoculum est ensuite réparti uniformément à l'aide d'un épandeur ou d'un râteau stérile, puis Ré-aspirer l'excès d'inoculum et sécher dans une étuve à 37°C pendant quelques minutes. (Par exemple, test Spectre antimicrobien CASFM).

Ensemencement dans la masse Dans cette méthode, l'inoculum est mélangé avec du milieu gélosé, avant que ce dernier ne se solidifie, c'est-à-dire lorsqu'il est en surfusion (T° 48-45°), cette méthode est utilisée pour le dénombrement bactérien.

Ensemencement par spots Dépôt d'un inoculum concentré sur une petite surface (quelques millimètres de diamètre) du milieu, cette technique permet de réaliser plusieurs tests de culture (ex : tester plusieurs souches) sur une même boîte.

Ensemencement par pique centrale : généralement effectuée sur un tube contenant un milieu gélosé En introduisant une pipette Pasteur contenant l'inoculum verticalement dans le fond du tube à essai, par ex. Ensemencement du milieu de migration mannitol.

Ensemencement par écouvillonnage un écouvillon stérile est plongé dans une solution ou une suspension bactérienne, puis inoculé à la surface de la gélose. (par exemple test antibactérien CLSI).

Techniques d'isolement

Technique de dilution successive

L'isolement des bactéries à partir d'une culture gélosée semble parfois difficile à cause de la charge microbienne importante il en résulte une surface de la boîte de pétrie pleine de colonies collées les unes avec les autres cela empêche l'apparition des colonies distinctes facile à réensemencer et donc nécessite.

Des dilutions du produit à analyser. Certaines analyses bactériologiques telles que le dénombrement bactérien recommandent de faire un dénombrement lorsque la boîte de pétrie et chargé avec un nombre approximatif entre 30 et 300 colonies et donc dans le cas où on a un nombre plus important il est recommandé de faire des dilutions successives :

Une solution du produit à analyser est préparée, ensuite des tubes contenant le diluant avec un volume de 9 ml sont préparés également (dans le cas où on veut faire des dilutions de facteur 10) un volume de 1 ml est transféré à partir du produit a analysé vers un premier tube contenant 9 ml du diluant stérile, il en résulte une première dilution de l'ordre 10^{-1} . Après pour établir une autre dilution, on prend 1 ml à partir du tube contenant la dilution 10^{-1} vers un autre tube contenant 9 ml du diluant stérile, la même procédure ce fait pour obtenir une série de dilution de facteur 10 : **10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} ect.**

la culture des bactéries viables non cultivables

L'état viable mais non cultivable (VNC) a été largement étudié chez les bactéries. En revanche, les états VNC chez d'autres micro-organismes, en particulier les eucaryotes, ont reçu beaucoup moins d'attention. Viables et incultivables après stress sulfite à différentes concentrations de SO₂ ont été étudiés par cytométrie en flux (CMF) en utilisant des sondes fluorescentes comme marqueurs de viabilité (diacétate de fluorescéine (FDA)) et par diffusion sur milieu. La capacité des cellules à retrouver leur capacité de culture après suppression du stress en augmentant le pH du milieu a été étudiée. Après l'application du stress, la comparaison entre la population cultivable déterminée sur milieu de culture et la population viable évaluée par FCM met en évidence la présence de cellules viables mais non cultivables. L'augmentation du pH du milieu permet aux cellules de *S.cerevisiae* viables mais non cultivables à redeviennent cultivables. Le temps de génération, de cellules cultivées dans les mêmes conditions que celles rencontrées au moment de la sortie de l'état VNC, est comparé au temps de sortie calculé au cours de la reprise de la cultivabilité. La différence entre ces deux paramètres observés affirme que le temps mis par les cellules pour sortir de l'état VNC n'était pas caractéristique d'une multiplication cellulaire. Finalement nous avons étudié l'implication du SSU1 dans l'état VNC. Les résultats montrent que le SSU1 n'est pas impliqué dans le maintien de l'état VNC chez *S. cerevisiae*

Tableau 7: bactéries décrites comme entrant en état VNC

<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>Aquaspirillum</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>B. pseudomallei</i>	<i>M. luteus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>M. varians</i>	<i>Tenacibaculum</i> sp.
<i>C. jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>C. lari</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>V. campbelli</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pasteurella piscida</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>V. fisheri</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>P. putida</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>V. natriegens</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> (including EHEC)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>V. proteolytica</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>R. meliloti</i>	<i>V. shiloi</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>V. vulnificus</i> (types 1 et 2)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhi</i>	
<i>K. planticola</i>	<i>S. typhimurium</i>	

Tableau 1: Bactéries décrites comme entrant en état VNC (Oliver, 2005)

Conclusion

Conclusion

En somme, il existe donc différents types de milieux avec leurs différents ensemencements, mais ce sont les plus couramment utilisés. En effet, il y a de nombreux types de milieux avec des ensemencements divers. Il existe par exemple différentes galeries API, qui sont plusieurs micro-cupules avec chacune un caractère pouvant permettre l'identification d'une bactérie. Pour pouvoir identifier une bactérie, il faut connaître ses exigences, pour connaître les milieux à ensemer, car parmi les différents milieux solides et liquides, chacun a ses propres propriétés: synthétique, empirique, sélectif,

biographique

biographique

<https://microbiologie-clinique.com/gelose-agar-agar.html>

<https://microbiologie-clinique.com/milieucultures.html>

<http://www.oxid.com/uk/blue/index.asp>

<https://legacy.bd.com/europe/regulatory/documents.asp?i=465>

<https://www.himediastore.com/>

<http://www.biologiemarine.com/micro/milcult.htm>

<http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A1/microbiologie/milieuculture/milieuculture.php>

<https://microbiologie-clinique.com/milieucultures.html>

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02314918>

<https://slideplay.fr/slide/4853975/>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2052297519301192>

(Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2019). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New microbes and new infections*, 34, 100622. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>).

(Kim Gail Clarke, 2 - Microbiology, Editor(s): Kim Gail Clarke,

Bioprocess Engineering, Woodhead Publishing, 2013, Pages 7-24,

ISBN 9781782421672, <https://doi.org/10.1533/9781782421689.7>).

Résumer

les microbiologists ont utilisé les milieux de culture pour isoler, purifier, repiquer, cultiver, conserver, étudier et identifier les germes (microorganismes). Ces milieux constitués à partir de composés biologiques et/ou chimiques reproduisant un environnement favorable à la croissance de certaines espèces microbiennes.

La découverte des milieux de culture a permis le développement de la microbiologie au XIXe siècle . La culture bactérienne a été la première méthode développée pour étudier le microbiote humain en utilisant un milieu artificiel permettant la croissance et l'isolement des bactéries. Et aussi le rôle de co-culture dans pour étudier les interactions entre les bactéries entre elles

Mots clés : micro-organismes, culture, bactéries, micro-organismes.

ملخص:

استخدم علماء الأحياء المجهرية وسائط الاستزراع لعزل وتنقية وزراعة فرعية وزراعة وحفظ ودراسة وتحديد الجراثيم (الكائنات الحية الدقيقة). تتكون هذه الوسائط من مركبات بيولوجية و / أو كيميائية تنتج بيئة مواتية لنمو أنواع ميكروبية معينة. سمح اكتشاف وسائط الثقافة بتطوير علم الأحياء الدقيقة في القرن التاسع عشر. كانت الزراعة البكتيرية هي الطريقة الأولى التي تم تطويرها لدراسة الكائنات الحية الدقيقة البشرية ، باستخدام وسط صناعي يسمح بنمو البكتيريا وعزلها ، وكذلك دور الثقافة المشتركة في دراسة التفاعلات بين البكتيريا مع بعضها البعض. كلمات مفتاحية: الأحياء المجهرية، الاستزراع، الجراثيم، الكائنات الحية الدقيقة.

Abstract

microbiologists have used culture media to isolate, purify, subculture, cultivate, preserve, study and identify germs (microorganisms). These media made up of biological and/or chemical compounds reproducing an environment favorable to the growth of certain microbial species.

The discovery of culture media allowed the development of microbiology in the 19th century. Bacterial culture was the first method developed to study the human microbiota using an artificial medium allowing the growth and isolation of bacteria. And also the role of co-culture in studying the interactions between bacteria with each other

Key words: microorganisms, culture, bacteria, microorganisms.