

Milieux de sélection

Introduction

Les milieux de culture de bactérie font souvent l'objet d'étude en microbiologie. On observe l'évolution d'une population de bactéries dans une boîte de pétri, rempli d'un milieu gélatineux nommé "gélose" (Agar en anglais).

La Gélose standard générique est la **Gélose nutritive**. Elle n'opère pas de sélection dans les micro-organismes. Elle est faite , à un **pH de $7,0 \pm 0,2$** , de :

- Extrait de viande : 1,0 g/L
- Extrait de levure : 2,5 g/L
- Peptone : 5,0 g/L
- Chlorure de sodium : 5,0 g/L
- Agar-agar : 15,0 g/L
par litre de gélose.

Il est possible de travailler sur des **milieux sélectifs** permettant de sélectionner un ou plusieurs types de microorganismes selon différents facteurs en déclinant cette gélose standard. On dit d'un milieu qu'il est sélectif lorsque les besoins nutritifs et les conditions de développement propres à un micro-organisme sont respectés pour que celle-ci vive.

Ainsi, il existe de nombreux milieux où ces conditions (pH, température d'incubation, source nutritive...) diffèrent afin d'avoir un panel de milieux de sélection intéressant.

Quelques types de milieux sélectifs gélosés

Géloses spécialisés pour les bactéries en général

Gélose MacConkey

Ce milieu permet de sélectionner des **bacilles Gram-négatif**, qui deviennent rose si elles fermentent le lactose. Les conditions de culture de ce milieu sont un **pH à $7,1 \pm 0,2$** et une température à **25°C**. La composition du milieu pour 1L est la suivante:

- 17,0 g de peptone pancréatique de gélatine
- 1,5 g de tryptone
- 1,5 g de peptone pepsidique de viande
- 10,0 g de lactose
- 1,5 g de sels biliaires
- 5,0 g de chlorure de sodium
- 30,0 mg de rouge neutre
- 1,0 mg de cristal violet
- 13,5 g d'agar agar bactériologique

Gélose XLD

Ce milieu permet de sélectionner les **agents pathogènes entériques Gram-négatifs** et particulièrement **les salmonelles et les shigelles**. Les conditions de culture de ce milieu sont un **pH à 7,4 ±0,2** et une température à **25°C**. La composition du milieu pour 1L est la suivante:

- 3,0 g d'extrait autolytique de levure
- 5,0 g de L-lysine
- 7,5 g de lactose
- 7,5 g de saccharose
- 3,5 g de xylose
- 2,5 g de désoxycholate de sodium
- 5,0 g de chlorure de sodium
- 6,8 g de thiosulfate de sodium
- 0,8 g de citrate d'ammonium ferrique
- 80,0 mg de rouge de phénol pour la coloration
- 13,5 g d'agar agar

Gélose Drigalski

Ce milieu permet de sélectionner des **bacilles à Gram-négatif non exigeants**. Les conditions de culture de ce milieu sont un **pH à 7,4 ±0,2** et une température d'incubation à **25°C**. La composition du milieu pour 1L est la suivante:

- 15,0 g de peptone
- 3,0 g d'extrait de viande
- 3,0 g d'extrait autolytique de levure
- 1,0 g de désoxycholate de sodium
- 1,0 g de thiosulfate de sodium
- 15,0 g de lactose
- 5,0 mg de cristal violet
- 80,0 mg de bleu de bromothymol
- 11,0 g d'agar agar bactériologique

Les bactéries lactose-positif présentent des colonies de couleur jaune et celles lactose-négatif donnent des colonies de couleur bleu-vert.

Gélose TCBS

Ce milieu permet de sélectionner des bactéries du genre **Vibrio**. Les conditions de culture de ce milieu sont un **pH à 8,6 ± 0,2** et une température d'incubation à **50°C**. La composition du milieu pour 1L est la suivante:

- 20,0 g de saccharose
- 10,0 g de citrate de sodium
- 10,0 g de dipeptone
- 10,0 g de thiosulfate de sodium
- 10,0 g de chlorure de sodium
- 5,0 g d'extrait de levure
- 5,0 g d'oxbile (Oxgall)
- 3,0 g cholate de sodium
- 1,0 g citrate ferrique
- 40,0 mg de bleu de bromothymol
- 40,0 mg de thymol bleu
- 15,0 g d'agar agar

Lorsque les colonies deviennent jaunes, le milieu s'est acidifié par fermentation du saccharose (saccharose+), à l'inverse, sans fermentation, elles deviennent vertes ou bleues (saccharose-).

Gélose de Chapman ou gélose au sel de mannitol / Mannitol salt agar

Ce milieu permet de sélectionner des **staphylocoques**. Les conditions de culture de ce milieu sont un **pH à 7,4 ± 0,2** et une température à **25°C**. La composition du milieu pour 1L est la suivante:

- 5,0 g de peptone pepsique de viande
- 1,0 g d'extrait de viande
- 75,0 g de chlorure de sodium
- 10,0 g de mannitol
- 25,0 mg de rouge de phénol
- 15 g d'agar agar bactériologique
- 5,0 g de tryptone

Le milieu devient jaune, quand il s'acidifie signifiant que les bactéries ont fermenté le mannitol (mannitol+). En l'absence de fermentation, le milieu reste rouge (mannitol-).

Gélose au sang / Blood Agar

Ce milieu permet de sélectionner de **toutes les bactéries non exigeantes, les corynébactéries et quelques bactéries exigeantes**. Les conditions de culture de ce milieu sont un **pH à 7,3 ± 0,2** et une température à **25°C**. La composition du milieu pour 1L est la suivante:

- 12,0 g de digestion pancréatique de caséine

- 5,0 g de digestion peptidique de tissu animal
- 3,0 g d'extrait de levure
- 3,0 g d'extrait de boeuf
- 1,0 g de fécule de maïs
- 5,0 g de chlorure de sodium
- 14 g de gélose
- 50,0 ml de sang de mouton défibriné

En cas d'hémolyse complète, le milieu est totalement transparent mais est légèrement trouble quand l'hémolyse est partielle. Le milieu reprend sa couleur initiale (jaune clair), quand la digestion de l'hémoglobine est complète, mais devient verdâtre quand elle est incomplète.

Cas des Géloses Chocolat / Chocolate Agar

*En plus des globules rouges cuits qui libèrent des substances nutritives, la gélose chocolatée renferme souvent quelques additifs exigés par certaines bactéries exigeantes comme les *Neisseria*, *Haemophilus* et *Streptococcus pneumoniae*. On y ajoute aussi des antibiotiques destinés à interdire la croissance de certains organismes, afin de mieux sélectionner les colonies à faire pousser.*

*Elle est tout particulièrement adaptée pour l'analyse des **sécrétions bronchopulmonaires**, des **prélèvements ORL**, des **liquides céphalorachidiens**, des **hémocultures**.*

Gélose au sang cuit

La gélose au sang cuit est le premier milieu apparu pour la culture des microorganismes exigeants. À la base riche (milieu Columbia par exemple) est ajouté du sang frais (cheval-mouton) puis le milieu est chauffé avec agitation dans un bain d'eau vers 80 °C jusqu'à l'obtention d'une couleur chocolat. Il peut alors être coulé en boîte. Ce milieu équivaut à la gélose Chocolat supplémentée.

Gélose chocolat

La gélose Chocolat est obtenue d'une façon comparable avec chauffage en ajoutant à la base non du sang mais une solution d'hémoglobine. Ce milieu est commercialisé en flacon prêt à l'emploi. Les conditions de culture de ce milieu sont un **pH à 7,2 ±0,2**. La composition de l'ensemble est la suivante :

- 7,5 g de Peptone tryptique de caséine
- 7,5 g de Peptone pepsique de viande
- 1,0 g d'Amidon de maïs
- 4,0 g d'Hydrogénophosphate de potassium
- 1,0 g de Dihydrogénophosphate de potassium
- 5,0 g de Chlorure de sodium
- 10,0 g d'Hémoglobine
- 15,0 g d'Agar

Gélose chocolat supplémentée

Le supplément de la gélose, commercialisé par exemple sous le nom de Polyvitex par la marque bioMérieux, est ajouté à la gélose Chocolat en surfusion à 50°C : 1,0 mL de Polyvitex pour 100 mL de milieu.

Composition du supplément « Polyvitex » :

- 25,0 g de Chlorhydrate de cystéine
- 1,10 g de L-cystine
- 0,03 g de Chlorhydrate de guanine
- 0,003 g de Chlorhydrate de thiamine
- 0,1 g de Thiamine pyro-phosphate
- 0,25 g de NAD
- 0,02 g de Nitrate ferrique
- 0,02 g de Acide para-amino-benzoïque
- 1,0 g de Adénine
- 10,0 g de L-glutamine
- 0,01 g de Vitamine B12
- 100 g de Glucose

Gélose Mueller-Hinton

Ce milieu permet d'étudier la **sensibilité aux antibiotiques des bactéries peu exigeantes**. Les conditions de culture de ce milieu sont un **pH à 7,3 ± 0,2** et une température à **25°C**. La composition du milieu pour 1L est la suivante:

- 17,5 g d'hydrolysate acide de caséine (peptone)
- 2,0 g d'extrait de viande
- 1,5 g d'amidon soluble
- 17,0 g d'agar agar bactériologique

Géloses spécialisés pour les fonges (champignons)

Gélose Sabouraud

Ce milieu permet de sélectionner des **fungi** et particulièrement des **levures, des dermatophytes et autres champignons pathogènes ou non**. Les conditions de culture de ce milieu sont un **pH à 5,6 ± 0,2** et une température à **25°C**. La composition du milieu pour 1L est la suivante:

- 40,0 g de dextrose monohydraté
- 5,0 g de digestat pancréatique de tissus d'animaux
- 5,0g de digestat pancréatique de caséine
- 15,0 g d'agar agar bactériologique

Gélose dextrosée à la pomme de terre / Potato dextrose agar (PDA)

Ce milieu permet d'étudier la **sensibilité aux antibiotiques des bactéries peu exigeantes**. Les conditions de culture de ce milieu sont un **pH à $5,6 \pm 0,2$** et une température à **25°C**. La composition du milieu pour 1L est la suivante:

- 4,0 g d'extrait de pomme de terre
- 20 g de dextrose
- 15 g d'agar

Géloses spécialisés pour la Mousse

Gélose Knop

Le milieu Hoagland & Knop a été spécialement formulé pour les cultures de cellules, de tissus et d'organes végétaux. Le nitrate de potassium et le nitrate de calcium sont les sources de nitrate. La gélose est incorporée au milieu pour fournir une base ferme aux explants. Pour 1L de solution on a :

- Nitrate de Potassium 610.00 mg
- Nitrate de calcium 660.11 mg
- Sulphate de magnesium 239.29 mg
- Ammonium phosphate monobasique 120.00 mg
- Sulphate de manganese.H₂O 2.27 mg
- Acide Borique 0.50 mg
- Acide molybdique (sel de sodium).2H₂O 0.25 mg
- Sulphate de zinc.7H₂O 0.50 mg
- Sulphate de cuivre .5H₂O 0.025 mg
- Ferric tartarate 2.00 mg
- Agar 8000.00 mg

Géloses spécialisés pour les Levures

YEPD / YPD (yeast extract peptone dextrose)

Cette gélose contient 1 % d'extrait de levure, 2 % de peptone et 2 % de glucose dans de l'eau distillée. Il peut être préparé sous forme de bouillon ou transformé en gel d'agar en ajoutant 1,5 à 2 % d'agar.

Pour plus de milieux solides, voici quelques documentations :

Listes : <https://microbiologiemedicale.fr/gelose-chocolat-enrichie/> ;
https://en.wikipedia.org/wiki/Agar_plate

Les milieux sélectifs liquides

Taha SEBAI : 20/11/2024

Les milieux liquides se distinguent des milieux solides (gélifiés) par l'absence de gélose, ce qui lui permet de garder son apparence liquide. On les retrouve souvent sous le nom de « bouillons de culture ».

Ces milieux de cultures permettent une meilleur croissance des micro-organismes, notamment les micro-organismes unicellulaires (levures, bactéries).

Bouillon SELENITE CYSTINE

Le bouillon Sélénite Cystine est utilisé pour l'enrichissement sélectif de Salmonella dans l'eau ou les denrées alimentaires ainsi que dans les produits pharmaceutiques.

Voici ci-dessous un pdf de la fiche technique du bouillon :

https://www.humeau.com/media/blfa_files/__TC_395-oeelenite-cystine_FR_030315_74703139502.pdf

Bouillon dextrose Sabouraud

"Le bouillon de Sabouraud Dextrose **est recommandé pour la recherche de Candida albicans dans les produits non stériles**, selon la pharmacopée harmonisée. Il est également utilisé comme milieu nutritif pour la croissance des levures et des moisissures."

Bouillon dextrose Sabouraud - Milieux sélectifs liquides pour la microbiologie

Encore une fois, Humeau propose une fiche technique très complète par Indicia Production:

https://www.humeau.com/media/blfa_files/__TC_360-oeabouraud-bouillon_FR_030315_74703136002.pdf

Bouillon Lauryl sulfate

"Le bouillon laurylsulfate-Tryptose est un **milieu d'enrichissement sélectif utilisé pour la recherche et le dénombrement des Escherichia coli et des coliformes dans les eaux et les produits alimentaires.**"

Laurylsulfate-

Cette fois-ci aussi, une fiche technique assez complète est disponible sur internet :

https://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_bouillon-lauryl-sulfate-dble-concentration-bm09808-50x10ml-77000980802.pdf

Certains milieux de culture comme le milieu Sabouraud, ou le milieu MacConkey se font aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. La principale différence est l'ajout d'agar, permettant la solidification du milieu.

sources :

<https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/concepts-equipements-et-biosecurite-42164210/fermentation-en-milieu-solide-fms-bio620/fermentation-en-milieu-solide-versus-fermentation-en-milieu-liquide-bio620v2niv10003.html#:~:text=La%20fermentation%20en%20milieu%20liquide,bien%20adapt%C3%A9e%20aux%20organismes%20myc%C3%A9liens.>

<https://www.humeau.com/microbiologie/milieux-de-culture/milieux-de-culture-prets-a-l-emploi/milieux-de-culture-prets-a-l-emploi-liquide.html#:~:text=Qu'est%2Dce%20qu'un%20milieu%20de%20culture%20liquide,la%20croissance%20des%20micro%2Dorganismes.>

<https://kgabin.fr/articles.php?lng=fr&pg=1615&mnuid=5077&tconfig=0#z2>

<https://www.humeau.com/columbia-sang-mouton-5-gelose-lf-11025-20-btes-90mm-245314.html?srsId=AfmBOOpYJl1yuQixNh1R2Y6BKRCji-KFeyNAinaUX7p-ISQc8n8fB9CC>

<https://www.diagnocine.com/Product/Hoagland-Knop-Medium-w-Agar-wo-Vitamins/71736?srsId=AfmBOOpunAgYZaT296frT133kB9KCfz0MTHOY1udyQec5uZjyuQmTM9a>