

INTERROGATION ORALE

Les milieux de culture des micro-organismes

À l'aide des documents joints, présenter l'intérêt, la composition et l'utilisation des milieux de culture.

Document n°1 : Choix d'un milieu de culture en fonction du type de prélèvement

Prélèvement contaminé par une flore endogène

Exemple : Selles



Milieux sélectifs :
gélose SS, Hektoen...

Prélèvement théoriquement stérile

Exemples : urine, LCR



Milieu non sélectif :
BCP, CLED

Milieu enrichi :
gélose au sang cuit

Document n° 2 : Caractéristiques du milieu de Drigalski

Milieu utilisé pour la recherche et le dénombrement des entérobactéries et des coliformes pour les analyses d'hygiène alimentaire et les analyses médicales (recherche des entérobactéries dans les selles, les urines...). Ce milieu s'ensemence par étalement en surface d'un volume d'inoculum précis pour un dénombrement ou en strie et par quadrant pour un isolement.

Composition pour 1 L :	- Tryptone	15,0 g
	- Extrait de viande	3,0 g
	- Extrait autolytique de levure	3,0 g
	- Désoxycholate de sodium	1,0 g
	- Thiosulfate de sodium	1,0 g
	- Lactose	15,0 g
	- Cristal violet	5,0 mg
	- Bleu de bromothymol	80,0 mg
	- Agar agar bactériologique	11,0 g
	pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2.	

Document n°3 : La microgalerie API *Candida*

API *Candida* est un système standardisé pour l'identification en 18-24 heures des levures, notamment les plus fréquemment rencontrées en microbiologie clinique.



GLU : utilisation du glucose
GAL : utilisation du galactose
SAC : utilisation du saccharose
TRE : utilisation du trehalose
RAF : utilisation du raffinose

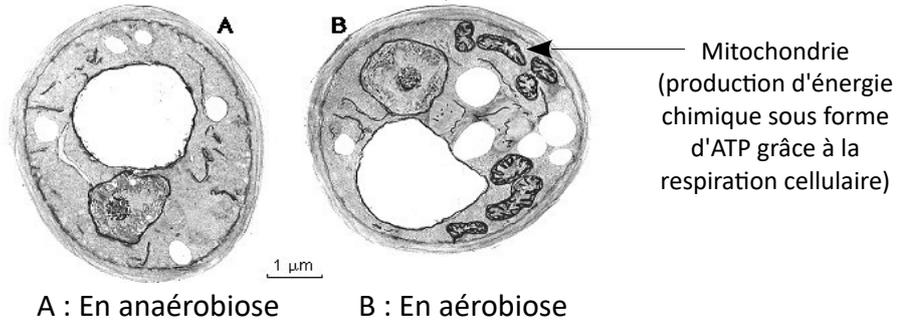
MAL : recherche de la maltosidase
AMY : recherche de l'amylase
XYL : recherche de la xylosidase
URE : recherche de l'uréase
NAG : recherche de la glucosaminidase
GAL : recherche de la galactosidase

INTERROGATION ORALE

Milieux sélectifs et/ou différentiels

Développer ces notions en incluant dans votre présentation les éléments présentés dans l'annexe ci-dessous.

Document n°1 : Cellules de levure observées au microscope électronique



Document n°2 : Caractéristiques de la gélose Sabouraud-Chloramphénicol

Pour 1 litre de milieu :	
- Peptone pepsique de viande	10,0 g
- Glucose	20,0 g
- Chloramphénicol	0,5 g
- Agar agar bactériologique	15,0 g
pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 5,7 ± 0,2.	

Document n°3 : La microgalerie API *Candida*

API *Candida* est un système standardisé pour l'identification en 18-24 heures des levures, notamment les plus fréquemment rencontrées en microbiologie clinique.

a) Exemples de résultats



- | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| GLU : utilisation du glucose | MAL : recherche de la maltosidase |
| GAL : utilisation du galactose | AMY : recherche de l'amylase |
| SAC : utilisation du saccharose | XYL : recherche de la xylosidase |
| TRE : utilisation du trehalose | URE : recherche de l'uréase |
| RAF : utilisation du raffinose | NAG : recherche de la glucosaminidase |
| | GAL : recherche de la galactosidase |

b) Extrait du tableau d'identification de la galerie API *Candida*

API CANDIDA V2.1	GLU	GAL	SAC	TRE	RAF	βMAL	αAMY	βXYL	βGUR	URE	βNAG	βGAL
<i>Candida albicans</i>	100	100	100	90	3	3	90	0	0	0	99	0
<i>Candida famata</i>	100	70	96	93	1	1	0	1	0	0	0	5
<i>Candida glabrata</i>	100	1	0	100	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida guilliermondii</i> **	100	100	100	35	99	93	0	99	0	0	0	0
<i>Candida kefyr</i>	100	100	100	3	100	0	0	88	0	0	0	100

INTERROGATION ORALE

Procédure de recherche du genre *Salmonella* dans les denrées alimentaires

À travers l'étude des documents, expliquer le principe et l'intérêt des différentes étapes de cette recherche.

Document n°1 : Exemple de démarche

- 1) Placer 10 g de produit à analyser dans 90 mL d'eau peptonée tamponnée. Incuber 24 heures à 37°C.
- 2) Ensemencer 10 mL de bouillon sélénite avec 0,1 mL de la culture. Incuber 24 heures à 37°C.
- 3) À partir du bouillon d'enrichissement, ensemencer par stries une gélose VB-RP et une gélose Rambach.
- 4) À partir des colonies suspectes, réaliser un test rapide de recherche de l'uréase.
- 5) Si suspicion de *Salmonella*, ré-isoler sur gélose ordinaire et incuber 24 heures à 37°C.
Ensemencer une galerie d'identification biochimique et incuber 24 heures à 37°C.
- 6) Procéder éventuellement à une identification immunologique.

Document n°2 : Composition des milieux de culture

Gélose VB-RP (en g.L⁻¹)

	Peptones	10
	Extrait de viande	5
	Extrait de levure	1
	Lactose	10
	Saccharose	12
	Hydrogénophosphate de sodium	1
	Dihydrogénophosphate de potassium	0,6
	Vert brillant	0,005
∅ rouge en milieu basique	Rouge de phénol	0,090
	Agar	15
	pH	= 6,9

Gélose Rambach

Peptone	8 g
NaCl	5 g
Désoxycholate de sodium	1 g
Mélange chromogène	1.5 g
Propylène glycol	10.5 g
Agar-agar	15 g

Le mélange chromogène contient :

- Un indicateur de pH qui vire au rouge en milieu acide.
- Un substrat chromogène de la β -galactosidase qui génère un composé bleu après hydrolyse.

Document n°3 : Utilisation de quelques molécules par différentes entérobactéries

	Lactose	Arabinose	Saccharose	Propylène glycol
<i>Salmonella</i>	-	+	-	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	+
<i>Morganella</i>	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	+	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-

Document n°4 : Extrait d'un tableau de lecture de la galerie miniaturisée d'identification API 20 E

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0	22	97	97	4	65	0
<i>Salmonelle paratyphi A</i>	0	1	0	99	0	5	0
<i>Salmonella spp</i>	3	69	96	95	75	85	0
<i>Salmonella typhi</i>	0	2	99	0	0	8	0

INTERROGATION ORALE

La recherche de *Salmonella*

À travers l'étude des documents, expliquer le principe et l'intérêt des différentes étapes de cette recherche.

Document n°1 : Exemple de démarche

- 1) Pré-enrichissement :**
Placer 10 g de produit à analyser dans 90 mL d'eau peptonée tamponnée. Incuber 24 heures à 37°C.
- 2) Enrichissement :**
Ensemencer 10 mL de bouillon au vert de malachite et chlorure de magnésium avec 0,1 mL de la culture de pré-enrichissement.
Incuber 24 heures à 37°C.
- 3) Isolement :**
À partir du bouillon d'enrichissement, ensemencer par stries une gélose VB-RP et une gélose Hektoen.
- 4) Purification et identification biochimique et immunologique :**
Isoler sur gélose ordinaire chaque colonie suspecte (jusqu'à 5) et incuber 24 heures à 37°C.
Pour chaque colonie réisolée, ensemencer une galerie pour l'identification biochimique et incuber 24 heures à 37°C.
Identifier la souche du point de vue biochimique et procéder si nécessaire à une identification immunologique.

Doc n°2 : Milieux d'enrichissement pour *Salmonella*

Doc n°3 : Milieux d'isolement pour *Salmonella*

	Bouillon au vert malachite et au chlorure de magnésium	Bouillon sélénite-cystine
Tryptone	4,5 g	5 g
L-cystine		10 mg
Extrait de viande		
Extrait de levure		
Peptone		
Lactose		4 g
Vert brillant	–	–
Oxalate de vert malachite	36 mg ⁽²⁾	(sélénite)
	(MgCl ₂ , 6 H ₂ O)	
NaCl	7,2 g	
KH ₂ PO ₄	1,5 g	
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O		9,9 g
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	36 g ⁽²⁾	
NaHSeO ₃ (sélénite)		4 g
Iode		
IK (iodure)		
Na ₂ S ₂ O ₃		
CaCO ₃		
qsp	1 dm ³	1 dm ³

	Gélose SS	Gélose DCL	Gélose DCLS	Gélose Hektoen	Gélose VB et RP
Peptone	5 g	5 g	10 g	12 g	10 g
Extrait de viande	5 g	5 g			
Extrait de levure				3 g	3 g
Lactose	10 g	10 g	5 g	12 g	10 g
Saccharose			5 g	12 g	10 g
Salicine				2 g	
Citrate de sodium	10 g	8,5 g	10,5 g		
Citrate de fer III	1 g	1 g		1,5 g	
Fer III	présence	présence		présence	
Désoxycholate	8,5 g	5 g	2,5 g	9 g	
Vert brillant	0,3 mg				5 mg
Fuchsine				40 mg	
	RN	RN	RN	BBT	RP
	25 mg	20 mg	30 mg	65 mg	90 mg
pH final	7,3	7,3	7,2	7,5	6,9
NaCl				5 g	
K ₂ HPO ₄					1 g
NaH ₂ PO ₄					0,6g
Na ₂ S ₂ O ₃	8,5 g	5,4 g	5 g	5 g	
	15 g	12 g	12 g	13,5 g	12 g
qsp	1 dm ³				

Document n°4 : Caractères biochimiques de *Salmonella*

Caractères	% de +
Formation d'acide à partir du glucose en TSI	100
Formation de gaz en TSI	91,9
Lactose TSI	0,8
Saccharose TSI	0,5
Sulfure d'hydrogène TSI	91,6
Uréase (Christensen)	0
Lysine décarboxylase	94,6
β-galactosidase	1,5
VP	0
Indole	1,1
TDA (PDA)	0
Malonate	0 - 20
Gélatinase	0
Mannitol	98
Mobilité	96
Culture en KCN	0
Remarque <i>Salmonella Arizonae</i> est ONPG+ à 98 % et parfois lactose+. Le caractère gélatinase est parfois donné positif pour les <i>Salmonella</i> mais reste à 0 % en API 20 E.	

INTERROGATION ORALE

Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

À travers l'étude des documents, expliquer le principe et l'intérêt des différentes étapes de cette recherche.

Document n°1 : Exemple de démarche

- 1) Placer 10 g de produit à analyser dans 90 mL d'eau physiologique.
- 2) Étaler 0,1 mL de la dilution en surface d'un milieu Baird-Parker.
- 3) À partir de chaque colonie suspecte, ensemercer un bouillon cœur-cerveille et incuber 24 h à 37°C.
- 4) Procéder à une recherche de thermonucléase ou à un test rapide de recherche du récepteur au fibrinogène (agglutination sur lame).

Document n°2 : Caractéristiques de la gélose Baird-Parker

Milieu utilisé en microbiologie alimentaire pour l'isolement et la numération des bactéries du genre *Staphylococcus*.

Pour une recherche à partir d'un bouillon d'enrichissement, on réalise un isolement classique.

Pour une numération de *Staphylococcus aureus*, on étale en surface du milieu 0,1 mL du produit pur ou dilué.

Staphylococcus aureus donne des colonies brillantes de 0,5 à 2 mm de diamètre :

- noires → tellurite +.
- éventuellement entourées d'un liseré blanc opaque → lécithinase +.
- entourées d'un halo clair → protéinase +.

Composition pour 1L :

Tryptone Bacto	10,0 g
Extrait de bœuf Bacto	5,0
Extrait de levure Bacto	1,0
Chlorure de lithium	5,0
Glycine	12,0
Pyruvate de sodium	10,0
Tellurite de potassium	0,1
Gélose	20,0
Emulsion de jaune d'œuf	50,0 mL
pH 6,8 ± 0,3	



Nb : La réduction du tellurite génère des tellures noirs Colonies de *Staphylococcus aureus* sur Baird-Parker

Document n°3 : Recherche de la thermonucléase de *S. aureus* sur gélose à l'ADN au bleu de toluidine.

1 : Puits ensemençé par une suspension de *Staphylococcus aureus* non chauffée.

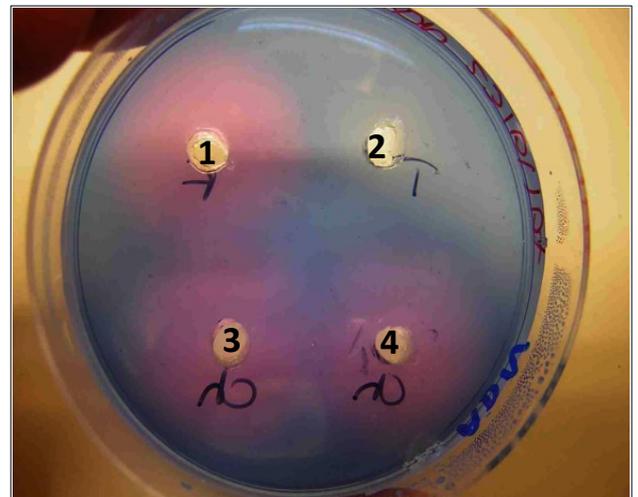
2 : Puits ensemençé avec du milieu de culture stérile.

3 et 4 : Puits ensemençés par une suspension bactérienne pure chauffée 15 minutes à 100°C.

La thermonucléase est une enzyme thermorésistante qui hydrolyse l'ADN.

L'espèce *Staphylococcus aureus* est pourvue de cette enzyme.

La gélose à l'ADN contient de l'ADN qui apparaît bleu, alors que les produits d'hydrolyse de l'ADN donne un halo de couleur rose.



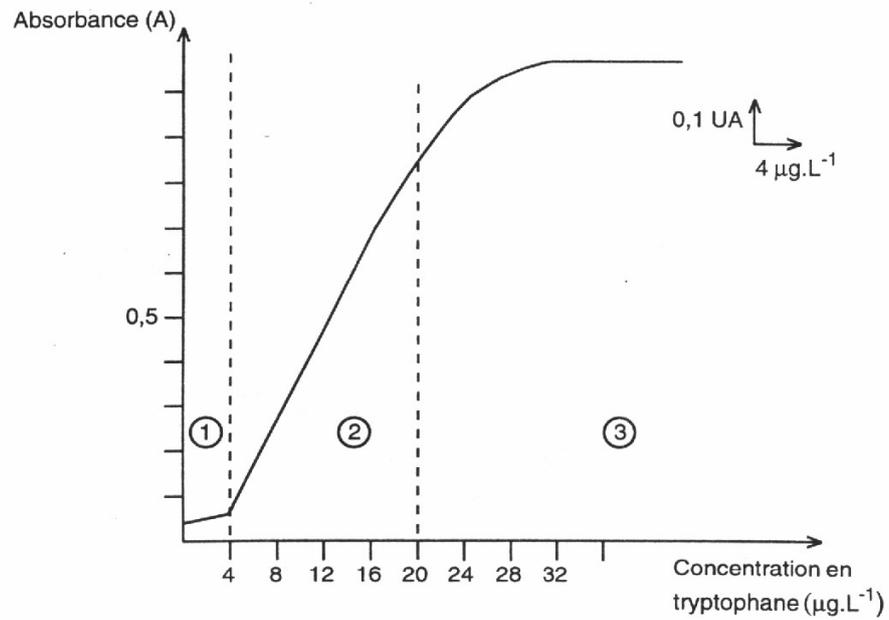
INTERROGATION ORALE**Notion de milieu minimum**

Après avoir présenter les différents types trophiques des micro-organismes et leurs caractéristiques, analyser la composition du milieu minimum proposé, afin d'en déduire les micro-organismes qui pourrait cultiver sur ce milieu.

Chlorure d'ammonium	1 g
Monohydrogénophosphate de potassium	1 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Sulfate de fer	0,01 g
Chlorure de calcium	0,01 g
Eau distillée	qsp 1 L

INTERROGATION ORALE**Les facteurs de croissance**

Après avoir défini les facteurs de croissance, présenter la méthode de dosage microbiologique de ceux-ci en s'appuyant sur le document ci après.



INTERROGATION ORALE

Dégager, à partir de l'étude des exigences nutritionnelles minimales d'un micro-organisme, les notions d'autotrophie, d'hétérotrophie, de facteur de croissance et de facteur limitant.

INTERROGATION ORALE

Les milieux sélectifs et/ou différentiels

Développer ces notions en incluant dans la présentation le milieu proposé ci-dessous.

Peptone
Extrait de viande
Lactose
Citrate de sodium
Citrate de fer III
Sels biliaires
Vert brillant
Rouge neutre
Thiosulfate de sodium
Agar

INTERROGATION ORALE

Identification bactérienne et milieux de culture

À l'aide du document, préciser la notion de milieu sélectif et discuter de l'importance de l'utilisation de ce type de milieu pour l'identification bactérienne.

HEKTOEN REF 54386
REF 63894
REF 64284

MILIEU D' ISOLEMENT SELECTIF DES SALMONELLA SP. ET SHIGELLA SP.

1- APPLICATION
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.

2- PRINCIPE
La sélectivité de ce milieu est basée sur la présence de sels biliaires, de bleu de bromothymol et de fuchsine acide (inhibition des bactéries à Gram (+), des *E. coli* et dans une moindre mesure, des *Proteus* et des *Citrobacter*). La qualité nutritive des peptones et des sucres neutralise l'effet inhibiteur des sels biliaires vis à vis de certaines bactéries délicates et permet une bonne culture des *Shigella*. La différenciation des entérobactéries est basée sur leur capacité à fermenter différents sucres : le lactose, le saccharose, la salicine. Deux indicateurs permettent de visualiser la réaction : le bleu de bromothymol qui vire au **jaune** en présence d'acide et la fuchsine qui se colore en **rouge** en présence d'aldéhyde. Une différenciation supplémentaire reposant sur la production d'hydrogène sulfuré est possible grâce à la présence de thiosulfate de sodium et de citrate de fer. Elle se traduit par des colonies à **centre noir**, coloration due à la formation de sulfure de fer.

4- COMPOSITION THEORIQUE (en g/l d'eau distillée)
Le milieu Hektoen est préparé selon la formule décrite par S. Kings et al (1).

Protéose peptone	12
Extrait de levure	3
Chlorure de sodium	5
Thiosulfate de sodium	5
Sels biliaires	9
Citrate de fer ammoniacal	1,5
Salicine	2
Lactose	12
Saccharose	12
Fuchsine acide	0,1
Bleu de bromothymol	0,065
Agar	14
pH final	7,5 ± 0,2

Lecture :
La fermentation d'au moins un des sucres se traduit par une coloration "saumon" des colonies. L'absence de fermentation se traduit par une coloration bleue ou verte des colonies.
La production d'hydrogène sulfuré (H₂S) est caractérisée par des colonies à centre noir.

- Colonies "saumon" : *Escherichia*, *Levinea*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Yersinia*.
- Colonies "saumon" à centre noir : *Proteus vulgaris*.
- Colonies bleues-vertes ou vertes : suspicion de *Shigella* ou de *Salmonella* à différencier de *Proteus morgani* ou *rettgeri* de *Providencia*, *Hafnia*, *Levinea*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* (le test de l'oxydase permet de différencier les *Pseudomonas*).
- Colonies bleues-vertes ou vertes à centre noir : suspicion de *Salmonella* ou de *Proteus mirabilis* (la recherche de l'uréase permet de différencier *P. mirabilis*).

INTERROGATION ORALE

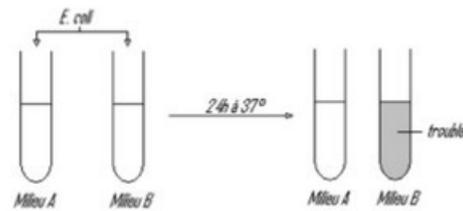
Milieux de culture et besoins nutritionnels

Après avoir proposé une classification des milieux de culture en fonction de leur composition, analyser les expériences suivantes :

▪ Expérience 1 :

Milieu minimum : minéraux + eau.

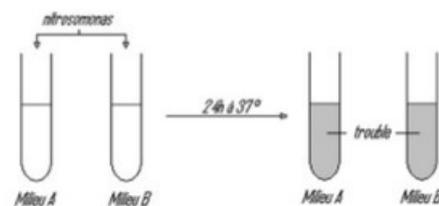
- Milieu A : milieu minimum.
- Milieu B : milieu minimum + glucose.



▪ Expérience 2 :

Milieu minimum : minéraux + eau.

- Milieu A : milieu minimum.
- Milieu B : milieu minimum + glucose.



Note : la présence d'un trouble indique une croissance bactérienne.

INTERROGATION ORALE

Milieux de culture

Milieux de culture : classification, préparations et utilisations

Réf.	Désignation	Applications	Tests pharmaceutiques	Tests cosmétiques	Eaux usées	Industrie bière	Produits céréaliers	Agro-alimentaire	Produits laitiers	Eaux et boissons	Agro alimentaire viète
777166	Gélose acétamide	Pour la confirmation de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
777170	Gélose aéromonas (ryan)	Pour l'isolement sélectif de <i>Aeromonas hydrophila</i>									
777169	Gélose différentiel acétate	Pour différenciation des espèces de <i>Shigella</i> , <i>E.coli</i> et de coliformes sans fermentation									
777243	Base Gélose ENDO	Pour la détermination de coliformes									
777244	Base Gélose ENDO LES	Pour la détection et numération de coliformes dans l'eau après filtration									
777310	Base Gélose mei chromogenic	Milieu pour détecter et dénombrer les enterococci dans l'eau via la technique de filtration sur membrane en une étape									
777255	Base gelsoe g.c.	Pour l'isolement et la culture de <i>Gonococci</i>									
777253	Bouillon (base) fecal coliforms	Pour la détection et numération de coliformes fécaux par le filtre à haute température									
777247	Bouillon e.s.t.y. bouillon	Milieu sélectif pour la culture de <i>Streptococcus thermophilus</i> dans le yaourth									
777250	Bouillon e.v.a bouillon	Pour la confirmation de <i>Enterococci</i> et la détection de feces dans l'eau (ethyl violet azide bouillon)									
777257	Bouillon giolitti - cantoni	Pour la détection de <i>Staphylococcus aureus</i> dans les échantillons alimentaires									
777258	Bouillon giolitti - cantoni (iso 5944/6888)	Pour la détection de <i>Staphylococcus aureus</i> dans les échantillons alimentaires									

SIMMONS CITRATE

61834

64834

GÉLOSE / MILIEU DE DIFFÉRENCIATION DES ENTÉROBACTÉRIES

1- APPLICATION

La gélose Simmons citrate (milieu minéral minimum au citrate de sodium) est utilisé pour la différenciation des bacilles Gram négatifs. Il permet la recherche du citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie pour les bactéries. Ce milieu contribue à la mise en évidence des caractères d'identification des Entérobactéries.

3- PRÉSENTATION

- Milieu prêt à l'emploi
 - 25 tubes inclinés de 7 ml code 61834
- Milieu déshydraté
 - flacon de 500 g code 64834

Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.

Mettre **21 grammes** de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée stérile. Chauffer lentement en agitant fréquemment, puis porter à ébullition pendant 1 minute. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Répartir en tubes ou en flacons. Refroidir les tubes en position inclinée pour obtenir une pente longue sans culot.

LOWENSTEIN-JENSEN

REF 55244 – 69675

MILIEU D'ISOLEMENT DES MYCOBACTERIES

1- APPLICATION

La gélose Löwenstein-Jensen est un milieu sélectif parfaitement adaptée pour l'isolement, le dénombrement et la différenciation des mycobactéries.

Ce milieu peut être utilisé pour :

- La primoculture et l'isolement, à partir de produits pathologiques, de *M. tuberculosis* et de mycobactéries atypiques.
- La mesure de la sensibilité des mycobactéries aux antibiotiques spécifiques. Pour cette utilisation, le milieu est préalablement imprégné dans la masse d'antibiotiques à des taux croissants (avant coagulation du milieu par chauffage à 85°C).
- La subculture et la conservation des souches bacillaires
- La réalisation, in situ, des réactions biochimiques et enzymatiques utilisées pour la différenciation du type mycobactérien.

4- COMPOSITION THEORIQUE (EN G/L D'EAU DISTILLÉE)

La gélose Löwenstein-Jensen est préparée selon la formule décrite par Löwenstein (1) et modifiée par Jensen (2).

- Milieu déshydraté :

Phosphate monopotassique	2,4
Sulfate de magnésium	0,24
Citrate de magnésium	0,6
Asparagine anhydre	3,6
Fécule de pomme de terre	30
Vert de malachite	0,4
- Milieu prêt à l'emploi :

Base milieu déshydraté	
Suspension d'oeufs	1.000 ml

Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.

- Mettre **37,2 grammes** de milieu déshydraté dans 600ml d'eau distillée froide stérile contenant 12ml de glycérol pour bactériologie. Ne pas mettre de glycérol si l'on veut préparer le milieu Löwenstein-Jensen non glycérolé.
- Mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Chauffer lentement en agitant constamment, puis porter 1 à 2 minutes à ébullition. Si nécessaire, ajuster le pH à 6,6. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.
- Préparer stérilement 1000 ml d'une suspension très homogène d'oeufs frais entiers. Laver et désinfecter soigneusement les oeufs avant de les casser.
- Eviter d'inclure des bulles d'air durant la casse et l'homogénéisation.
- Mélanger aseptiquement et parfaitement 600 ml de base stérile et refroidie à 45-50°C et les 1000 ml d'oeufs entiers, toujours en évitant d'inclure des bulles d'air.
- Répartir stérilement le milieu complet en tubes stériles (de préférence bouchés à vis).
- Coaguler en position inclinée, au bain-marie ou à l'autoclave à 85°C pendant 45 minutes. Les tubes doivent être stockés à +4°C et à l'obscurité, en évitant toute dessiccation.