

Milieux d'isolements sélectifs et/ou différentiels

1. Préalable

Discuter dans le compte-rendu la notion de sélection au sens général biologique du terme. Définir le terme « milieu sélectif » au sens le plus courant des laboratoires de microbiologie.

2. Souches disponibles

- Souche pure *E. coli* K12 (bacille Gram négatif) (groupe 1) (aérobie-anaérobie facultatif) (les *E. coli* du groupe 1 sont des commensaux de la flore intestinale des animaux et de l'homme. Attention il existe des souches particulières entéropathogènes classées dans le groupe 2).
- Souche pure *Bacillus subtilis* (bacille Gram positif) (groupe 1) (aérobie-anaérobie facultatif) (saprophyte du sol).
- Souche pure *Pseudomonas aeruginosa* (bacille Gram négatif) (groupe 2) (aérobie strict) (saprophyte de l'eau, des sols, de la surface des végétaux ... retrouvé au niveau digestif chez de nombreux animaux et l'homme) (pathogène opportuniste : infections respiratoires, digestives, de la peau, infections nosocomiales).
- Souche pure *Enterococcus faecalis* (coques Gram positif) (groupe 2) (anaérobie aérotolérant) (espèce ubiquiste présente dans l'intestin de l'homme et des animaux, dans les eaux usées, dans l'eau douce, dans l'eau de mer, dans le sol et sur les végétaux) (espèce peu pathogène mais pathogène opportuniste responsable de septicémies, d'endocardites, d'infections urinaires, de surinfections des plaies, d'infections nosocomiales).
- Souche pure *Salmonella enteritidis* (bacilles Gram négatif) (aérobie-anaérobie facultatif) (groupe 2 - transmission par ingestion) (espèce pathogène stricte : toxi-infection alimentaire grave) (habitat = intestin d'animaux comme les oiseaux et transit par les excréments puis l'eau ... où les bactéries survivent longtemps).

Toutes les souches sont disponibles en bouillon et isolées sur milieu nutritif agarosé.

Question : Peut-on utiliser les souches proposées dans un laboratoire de classe 2 mais sans travailler sous poste de sécurité microbiologique de classe 2. A quelles conditions ?

3. Milieux disponibles

Par étudiant : une boîte de Pétri de milieu NT ; une de milieu ND-0,01 ; une de milieu ND-0,1 ; une de milieu ND-1 ; une de milieu NA, une de milieu de Drigalski (voir aussi le §4) ; une de milieu BEA (voir aussi le §4).

Par binôme : une boîte de Pétri de milieu NT ; une de milieu ND-0,01 ; une de milieu ND-0,1 ; une de milieu ND-1 ; une de milieu NA ; une de milieu de Drigalski (voir aussi le §4) ; une de milieu BEA (voir aussi le §4).

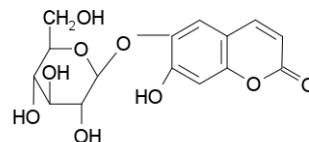
<p><u>Milieu agarosé nutritif témoin (NT) :</u> peptone 15,0 g extrait de viande 3,0 g extrait de levures 3,0 g agar-agar 12,0 g qsp 1 litre pH = 7,4 - 7,5</p> <p>Disponible coulé en boîtes de Pétri (24 boîtes)</p>	<p><u>Milieux agarosés ND-0,01 ND-0,1 et ND-1 :</u></p> <p><u>ND-0,01.</u> Ajouter 0,33 mL de SDS (lauryl sulfate de sodium) à 10% à 300 mL de milieu NT en surfusion. Répartir en 16 boîtes de Pétri.</p> <p><u>ND-0,1.</u> Ajouter 3,3 mL de SDS à 10% à 300 mL de milieu NT en surfusion. Répartir en 16 boîtes de Pétri.</p> <p><u>ND-1.</u> Ajouter 33 mL de SDS à 10% à 300 mL de milieu NT en surfusion. Répartir en 16 boîtes de Pétri.</p>	<p><u>Milieu agarosé NA :</u></p> <p>Ajouter 10 mL de solution d'azoture de sodium à 7,5 g/L (stérilisée par filtration, 14 mL) à 300 mL de milieu NT en surfusion. Répartir en 16 boîtes de Pétri.</p> <p>Attention, la solution d'azoture de sodium est toxique => gérée par l'enseignant, manipulation sous son contrôle direct, après discussion de la gestion du risque associé et de la gestion de la sécurité liée. Voir aussi le §4.</p>
--	---	---

4. Données utiles

- Le mot peptone désigne le produit d'une réaction d'hydrolyse d'un extrait protéique naturel. Cette hydrolyse peut être chimique (hydrolyse acide) ou enzymatique. Le taux d'hydrolyse dépend des substrats (protéines du lait, de viande animale, de soja ...), des agents hydrolysant et des conditions opératoires. Les espèces moléculaires produites vont de l'acide aminé seul jusqu'à des peptides de plusieurs dizaine d'acides aminés. Les applications industrielles des peptones sont multiples : milieux de culture pour la microbiologie, la cosmétique, l'agroalimentaire, la nutrition animale ...
- Peptones are excellent natural sources of amino acids, peptides and proteins in growth media. They are most often obtained by enzymatic digestion or acid hydrolysis of natural products, such as animal tissues, milk, plants or microbial cultures. The number of available peptones and extract is enormous, and can promote and sustain the growth of most organisms. *Tryptose* (*Peptone* from protein mixture, tryptic digest).
(D'après catalogue Sigma-Aldrich en ligne).

- Désoxycholate de sodium : détergent anionique, présent naturellement dans la bile.
- Lauryl sulfate de sodium = sodium dodécylsulfate = SDS = détergent anionique (très utilisé en biochimie mais aussi dans les pâtes dentifrices, certains nettoyants ménagers ...)
- cristal violet = colorant (avec une structure détergente cationique). Toxicité aiguë, orale (Catégorie 4), H302. Irritation cutanée (Catégorie 2), H315. Lésions oculaires graves (Catégorie 1), H318. Cancérogénicité (Catégorie 2), H351. Toxicité aiguë pour le milieu aquatique (Catégorie 1), H400. Toxicité chronique pour le milieu aquatique (Catégorie 1), H410. Éviter de manipuler la poudre. Ne pas manipuler la poudre avant d'avoir pris connaissance des risques et des mesures de sécurité nécessaires.
- bleu de bromothymol : indicateur coloré de pH :
- azoture de sodium (NaN_3) : composé chimique explosif, inhibiteur de la plupart des chaînes respiratoires. Toxicité aiguë, Orale (Catégorie 2), H300. Toxicité aiguë pour le milieu aquatique (Catégorie 1), H400. Toxicité chronique pour le milieu aquatique (Catégorie 1), H410. Éviter de manipuler la poudre. Ne pas manipuler avant d'avoir pris connaissance des risques et des mesures de sécurité nécessaires. L'azoture de sodium est connu comme bloquant de certains complexes de chaînes respiratoires et d'enzymes à activité ATPasiques, notamment dans les systèmes de sécrétion de protéines.

- esculine : 7-hydroxycoumarine-6- β -D-glucopyranoside (du glucose lié en configuration β osidique à de la 6,7-dihydroxycoumarine). L'hydrolyse par une β -glucosidase conduit à du glucose et de la 6,7-dihydroxycoumarine (esculétine) qui a la propriété de précipiter avec les sels ferriques en un précipité noir. Produit naturel chez le marronnier, produit toxique par ingestion (voir http://www.cbif.gc.ca/pls/pp/ppack.info?p_psn=137&p_type=all&p_sci=sci&p_x=px&p_lang=fr)



- Chercher de la documentation sur les 3 milieux proposés ci-dessous (via internet, dans des catalogues ...)

<p>Milieu de Drigalski : peptone 15,0 g extrait de viande 3,0 g extrait de levures 3,0 g lactose 15,0 g désoxycholate de sodium 1,0 g cristal violet 0,005 g bleu de bromothymol 0,080 g thiosulfate de sodium 1,0 g agar-agar 11,0 g qsp 1 litre pH = 7,4 - 7,5</p>	<p>Milieu au lauryl sulfate : Tryptose 20,0 g Lactose 5,0 g K_2HPO_4 2,75 g KH_2PO_4 2,75 g NaCl 5,0 g Lauryl sulfate de sodium 0,1 g qsp 1 litre</p>	<p>Milieu BEA (bile-esculine-azide) : Peptone 17,0 Peptone pepsique de viande 3,0 g Extrait de levure 5,0 g Esculine 1 g Citrate de fer ammoniacal 0,5 g Citrate de sodium 1g Bile de boeuf déshydratée (ou désoxycholate de sodium) 10 g Azoture de sodium 0,25 g Chlorure de sodium 5g Agar-agar 12,0 g qsp 1 litre</p>
--	---	---

5. Travail pratique à réaliser

Travail personnel. Utiliser la série des 8 milieux disponibles. A l'aide d'un feutre, diviser chaque boîte de Pétri en 5 secteurs. Ensemencer, en strie, chaque souche disponible au centre d'un secteur de chaque boîte de milieu (les différentes souches ne doivent absolument pas entrer en contact). Incuber.

Note technique : si les milieux ont été fraîchement coulés, il faut absolument « sécher » la surface quelques minutes. Faute de quoi les stries inoculum couleront en surface des boîtes et se mélangeront. Il est possible de vérifier cet effet dégradant de la manipulation en ne séchant pas une boîte fraîchement coulée avant inoculation (édifiant...).

Travail de groupe. Réaliser un mélange volume à volume de 2 souches parmi les 5 disponibles. Observer le mélange sur un frottis coloré « au Gram ». Isoler sur la série des 8 milieux disponibles.. Il s'agit de réaliser un mélange qui vous paraît pertinent pour illustrer les notions de milieux d'isolement sélectif et/ou différentiel. Incuber. Il est évidemment conseillé de bien observer les colonies des souches pures isolées de départ, de réaliser éventuellement des frottis colorés au Gram sur les souches pures de départ et d'utiliser éventuellement des colorations de Gram pour la lecture des résultats.

Compte-rendu : ensemble des observations et résultats. Analyses, conclusions (il s'agit d'illustrer la notion de de milieux d'isolement sélectif et/ou différentiel).

Bibliographie :

- Euzéby, Dictionnaire de bactériologie vétérinaire sur www.bacterio.cict.fr/bacdico/
- Arrêté du 18 juillet 1994 modifié par les arrêtés du 17 avril 1997 et du 30 juin 1998, document fixant la liste des agents pathogènes et les classant au sein des groupes 2,3 et 4.
- Donald B. et al. ; Proc. Nati. Acad. Sci. USA Vol.87, pp.8227-8231, November1990
- Y Fortin et al. ;1990, J. Bacteriol. 172(11):6607

