

**UNIVERSITE DE JIJEL**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
**DEPARTEMENT Microbiologie Appliquée et Sciences Alimentaires**  
**MODULE : Formation Technique de Contrôle de Qualité**  
**NIVEAU : 2<sup>ème</sup> Année Master Contrôle de la Qualité des Produits Alimentaires**  
**Enseignante: Dr. BOUSSOUF Lilia**

## **TP N° 01 : Préparation des milieux de culture**

### **PREPARATION A PARTIR DES INGREDIENTS DE BASE**

#### ***Lecture et interprétation de la formule de préparation des trois milieux***

Cette opération, qui précède toute préparation de milieu, est fondamentale. On doit vérifier :

- qu'aucun des constituants n'a été oublié ;
- que la nature et la qualité des produits correspondent à celle indiquées sur le formulaire ;
- que les proportions de chaque constituant correspondant à la quantité totale de milieu prévu ont bien été calculées.

#### ***MILIEU PCA***

##### **Ingrédients Quantités (g/L)**

Peptone	6
Extrait de levure	2,5
Glucose	1
Agar	15
Eau distillée qsp	1000 ml
pH	7,2

#### ***MILIEU Gélose nutritive***

##### **Ingrédients Quantités (g/L)**

Peptone	5
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2.5
Chlorure de sodium	5
Agar	15
Eau distillée qsp	1000 ml
pH	7,3

#### ***MILIEU Bouillon nutritive***

##### **Ingrédients Quantités (g/L)**

Peptone	10
Chlorure de sodium	5
Extrait de viande	10
Eau distillée qsp	1000 ml
pH	7,3

### ***Gélose à l'amidon***

#### **Ingrédients Quantités (g/L)**

Peptones	5
Amidon (1%)	10
Agar	10
Eau distillée qsp	1000 ml

### ***Gélose au lait***

#### **Préparation 1**

Lait écrémé poudre	05g
Eau distillée	50ml

Sterilisation par autoclave à 121°C / 20min

#### **Préparation 2**

Agar	01g
Eau distillée	50ml

Sterilisation par autoclave à 121°C / 20min

La stérilisation des deux préparations se fait séparément, ensuite et au moment de l'utilisation les deux préparations sont mises en surfusion (45°C) et mélangées puis coulées sur boîte pétri. Après séchage, le milieu estensemencé.

### ***Milieu pour la recherche de la lécithinase***

Gélose nutritive	90 ml
Emulsion de jaune d'œuf	10 ml

#### **Préparation de l'émulsion de jaune d'oeuf**

Après avoir flamber la coquille avec de l'alcool pendant 30 secondes, récupérer le jaune d'oeuf et additionner 4 fois le volume en eau distillée stérile, mélanger rigoureusement puis mettre le mélange à l'étuve pendant 2 heures à 30°C et ensuite au réfrigérateur pendant 24 heures.

Au moment de l'utilisation, mettre la gélose nutritive en surfusion (45°C) et ajouter l'émulsion de jaune d'oeuf, après séchage le milieu estensemencé.

#### **Pesée**

Les différents constituants sont ensuite pesés.

#### **Dissolution**

Les formules de préparation indiquent en général si la dissolution des constituants dans l'eau doit se faire à chaud ou à froid. L'ordre dans lequel les ingrédients doivent être mélangés peut également être important. Les milieux gélosés doivent être agités jusqu'à dissolution complète des composants.

#### **Ajustement du pH**

Il est indispensable d'ajuster le pH de tous les milieux de culture avant leur stérilisation. Une variation de pH, même légère, peut modifier et parfois même inhiber la culture des bactéries.

Il faut prévoir, pour les milieux complexes, une acidification sensible, après l'autoclavage. En conséquence, pour obtenir un milieu de culture à un pH voisin de 7,2, cas le plus fréquent, il faut ajuster le pH à 7,4-7,6 lors de la préparation.

La mesure du pH se fait plus souvent par la méthode colorimétrique soit en utilisant des papiers indicateurs, soit en utilisant des réactifs colorés en solution mais l'utilisation du pH mètre est évidemment souhaitable.

### **Répartition**

Les milieux sont le plus souvent répartis avant leur stérilisation. Le matériel nécessaire à cette opération, entonnoir ou doseur automatique.

Les quantités réparties sont en général les suivantes :

- par tube à hémolyse : 1 à 2 ml ;
- par tube à essai de 17 X 170 mm :
  - 5 ml pour les milieux gélosés destinés à être inclinés,
  - 7 ml pour les milieux gélosés en culot, 7 à 8 ml pour les milieux avec à la fois culot et pente,
  - 9 ml pour les milieux liquides ;
- par tubes à essais de 22 X 220 mm : quantité variable suivant les milieux et les techniques envisagés ; de 5 à 20 ml ;
- par flacons :
  - 250 ml pour les milieux gélosés,
  - 300 ml pour les milieux liquides.

La stérilisation dans des tubes préalablement stérilisés en chaleur sèche ou par autoclavage est préférable.

On prendra soin de ne pas faire couler de milieux gélosés sur les parois des tubes.

### **Bouchage**

Les capsules métalliques sont incomplètement vissées avant l'autoclavage et resserrées après stérilisation.

### **Stérilisation**

Elle se fait dans la majorité des cas à l'autoclave. Les conditions d'autoclavage (durée et température) sont indiquées pour chaque formule de préparation et doivent être rigoureusement respectées. Elles dépendent notamment du volume à stériliser.

Après la stérilisation, certains milieux gélosés peuvent être immédiatement inclinés.

### **Contrôle de stérilité**

Les milieux seront maintenus pendant 48 h à l'étuve à 37°C avant leur utilisation.