

Chapitre 10

Conservation des isolements

Des cultures de *Shigella*, *V. cholerae* ou *E. coli* O157 resteront généralement viables pendant plusieurs jours dans un milieu solide à température ambiante (22 à 25°C) jusqu'à ce que le milieu ne sèche ou ne devienne acide. Mais si on veut garder les cultures au-delà de quelques jours, il faut les préparer correctement pour les conserver. Le choix de la méthode de conservation dépend de la durée pendant laquelle on veut garder les organismes ainsi que de l'équipement et des locaux de laboratoire dont on dispose.

A. Conservation de courte durée

La gélose au sang (BAB), la gélose Trypticase-soja (TSA) et la gélose d'infusion de cœur (HIA) sont des bons milieux de conservation des organismes entériques. Il ne faut jamais conserver les souches dans un milieu contenant des hydrates de carbone car les produits acides du métabolisme diminuent rapidement la viabilité. BAB, TSA ou HIA contiennent du NaCl, qui améliore la pousse de *V. cholerae*. Ne pas employer de gélose nutritive car elle n'a pas de sel ajouté.

Préparer le milieu de conservation et placer les tubes encore chauds en position inclinée de façon à obtenir une petite pente et un culot profond. Ensemencer le culot en piquant une ou deux fois puis ensemencer la pente en stries. Incuber une nuit à une température entre 35 et 37°C. Fermer hermétiquement les tubes avec des bouchons de liège trempés dans de la paraffine chaude ou avec des bouchons à vis bien serrés. Conserver à l'obscurité à une température comprise entre 22 à 25°C.

De l'huile minérale stérile peut aussi être utilisée pour prévenir le dessèchement des géloses en pente. Recouvrir les colonies de la pente avec une couche d'huile minérale stérile pour arriver 1 cm au-dessus de l'extrémité de la pente. Repiquer si nécessaire en raclant la culture sous la couche d'huile. Les souches maintenues pures de cette manière survivent généralement pendant plusieurs années.

B. Conservation de longue durée

Les cultures bactériennes peuvent être conservées congelées ou lyophilisées dans diverses suspensions préparées à cet effet. Il existe de nombreuses formulations de suspension mais en général on utilise le lait écrémé, un milieu à base de sérum ou le milieu de polyvinylpyrrolidone (PVP) pour la lyophilisation. Pour la congélation, on utilise un bouillon de lait écrémé ou de sang ou encore un bouillon trypticase-soja avec 15 à 20 % de glycérol.

Méthode de conservation par congélation (conservation à -70°C ou dans l'azote liquide à -196°C)

On peut conserver les souches indéfiniment si elles sont gardées à une température inférieure ou égale à -70°C. La conservation à -20°C n'est pas recommandée pour une période supérieure à 12 ou 18 mois car certains microorganismes perdront leur viabilité à cette température.

- Inoculer la pente d'un milieu TSA ou HIA (ou un autre milieu de culture non inhibiteur avec du sel) et laisser incuber une nuit entre 35 et 37°C.
- Récolter les bactéries sur la pente et faire une suspension dans un milieu de congélation.
- Répartir la suspension dans des cryotubes (tubes de congélation servant à la conservation à des températures très faibles). **Attention** : Ne pas utiliser des ampoules en verre pour congeler dans de l'azote liquide car elles peuvent exploser quand on les retire du container à azote.
- Préparer un bain de carboglace (glace sèche) en plaçant de la carboglace (CO₂ congelé) dans un récipient en métal étanche et assez grand pour contenir un portoir métallique à culture puis ajouter de l'alcool éthylique pour submerger environ la moitié du cryotube. Congeler rapidement la suspension en plaçant les cryotubes fermés dans le bain de carboglace. Transférer ensuite les cryotubes dans le congélateur. S'il n'y a pas de carboglace, un récipient d'alcool peut être placé dans le congélateur pendant une nuit puis utilisé pour congeler rapidement les cryotubes.

Mise en culture des souches congelées

- Placer les cultures congelées sur de la carboglace ou dans un bain d'alcool qui en contient et transférer sous une hotte de laboratoire ou sur un autre espace propre.
- A l'aide d'une anse stérile, racler la partie supérieure de la culture et la transférer dans le milieu en faisant attention à ne pas contaminer le haut ou l'intérieur du tube.
- Refermer la fiole avant que le contenu ne soit décongelé et la remettre au congélateur. Si l'on opère soigneusement, des prélèvements peuvent être effectués à plusieurs reprises à partir du même tube.

Lyophilisation

La plupart des organismes peuvent être conservés après lyophilisation. Pour cela, on retire l'eau des suspensions bactériennes congelées par voie de sublimation sous pression réduite. Il est préférable de conserver à 4°C les tubes lyophilisés.