

## La culture des levures

*Cultiver des levures exige du matériel, des milieux adaptés et un minimum de technique.*

### MATÉRIEL

- boîtes de Pétri stériles, en plastique ou en verre, diamètre 90 mm environ ;
- becs Bunsen ;
- manches Pasteur avec anse ou pipettes Pasteur stériles ;
- bains thermostatés à 50°C et 100°C ;
- portoirs pour tubes à essai ;
- microscopes avec objectif à immersion si possible ;
- verres de montre, lames propres, lamelles ;
- colorant : bleu de méthylène ou violet de gentiane filtré ;
- bacs à coloration (mettre un peu d'eau et d'eau de Javel au fond) et supports pour lames ;
- pipettes stériles de 5 ml ;
- tubes à essai contenant 5 ml de liquide physiologique stérile.

### MILIEUX

#### Milieu solide

*Pour la mise en culture des souches de référence et leur isolement : la gélose de Sabouraud.*

Ce milieu est distribué par divers fabricants mais il peut être préparé à partir d'éléments séparés.

● Composition :	peptone	10 g
	glucose	20 g
	agar	15 g
	eau distillée	1000 mL

Ajuster le pH à 6, répartir en tubes à essai de 18, à raison de 15 mL par tube et stériliser à l'autoclave 20 min à 120°C.

Au moment de l'utilisation, les tubes de milieu sont mis à fondre au bain bouillant (100°C), puis maintenus en surfusion dans un bain thermostaté à 50°C. Le milieu est coulé stérilement à raison d'un tube par boîte de Pétri stérile. Ces boîtes sont maintenues pour solidification et refroidissement dans un environnement stérile, entrouvertes, autour d'un bec Bunsen. Elles sont ensuite stockées couvercle en bas avant d'être utilisées.

### Milieu liquide

*Pour l'étude de la dégradation des sucres.*

- Composition :   Extrait de levure   5 g  
                          Eau distillée       1000 mL

Faire dissoudre et répartir en tubes à essai de 16 contenant une cloche de Durham à raison de 9 mL par tube. Stériliser à l'autoclave 20 min à 120°C (Remarque : la cloche se remplit lors de l'autoclavage).

Au moment de l'emploi, ajouter stérilement 1 mL d'une solution stérile de sucre à 20%. Les sucres utilisés peuvent être : glucose, saccharose, maltose... Les solutions peuvent être stérilisées par tyndallisation.

### Milieu pour la mise en suspension des souches isolées

- Composition :   tryptone               1 g  
                          NaCl                   8,5 g  
                          Eau distillée       1000 mL

Après dissolution, ajuster le pH à 7 et répartir dans des tubes de 16 à raison de 5 mL par tube. Stériliser à l'autoclave 20 min à 120°C.

## SOUCHES

- Souches de référence :   *Saccharomyces cerevisiae* ;  
                                  *Saccharomyces carlsbergensis* ;  
                                  *Rhodotorula rubra* ;  
                                  *Yarrowia lipolytica*...

voir : *Collection nationale de cultures de microorganismes*, Institut Pasteur, 25 Rue du Dr-Roux 75724 Paris cedex 15.

- Souche isolée à partir d'un jus de raisin fermenté (moût).

## CONDITIONS DE TRAVAIL

- pas de courants d'air (portes et fenêtres fermées) ;
- blouse (propre) obligatoire ;
- paillasse désinfectée à l'eau de Javel ;
- becs de gaz allumés ;
- manipulateurs assis (en face des becs) ;
- manipulations réalisées dans une zone de 20 cm de rayon autour du bec Bunsen allumé (flamme bleue) : zone stérile ;
- le manipulateur ne parle pas, ne souffle pas (pour refroidir un objet par exemple), les cheveux longs sont attachés, seules les mains entrent dans la zone stérile, sans appui sur la paillasse.

## La culture des levures (suite)

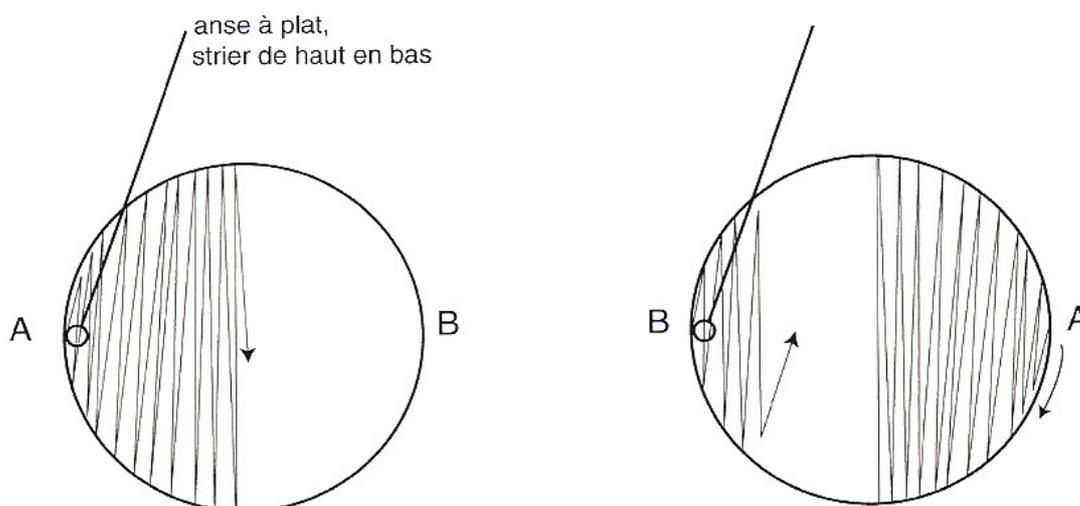
### MISE EN CULTURE

#### Souches de référence

On dispose d'échantillons qui sont des souches pures cultivées en milieu liquide (milieu de Sabouraud sans l'agar).

Après avoir stérilisé l'anse en la portant au rouge dans la flamme du bec Bunsen et attendu qu'elle refroidisse dans la zone stérile, sans l'agiter ni la poser sur la paille, prélever une anse de souche échantillon stérilement et ensemercer par stries, sans entamer la gélose, une boîte de Pétri contenant le milieu de Sabouraud gélosé, par la technique suivante :

- marquer sur la tranche du couvercle, sans ouvrir la boîte, les références de la souche étudiée, celles du manipulateur, la date de la mise en culture ;
- à l'aide d'un crayon feutre, partager la boîte en deux moitiés, en faisant un trait sur le fond ;
- déposer le contenu de l'anse (*inoculum*) sur le milieu gélosé, en A, puis l'étaler en faisant une strie en zig-zag, sans revenir en arrière, jusqu'au trait de séparation, retirer l'anse, mais la garder dans la zone stérile ;
- tourner la boîte d'un demi-tour et recommencer à strier avec l'anse à partir du point B sur la 2<sup>me</sup> moitié ;
- retirer l'anse, la flamber soigneusement, refermer la boîte, la retourner, la placer à l'étuve à 30°C pour une durée minimale de 48 h.



Mise en culture et isolement d'une souche de levure à partir d'un moût de raisin.

#### Mise en culture et isolement d'une souche de levure à partir d'un moût de raisin

A partir d'un moût de 3 ou 4 jours, prélever stérilement une anse et ensemercer, selon la technique décrite ci-dessus, une boîte de milieu de Sabouraud (si nécessaire passer par l'intermédiaire d'une subculture en milieu liquide).

Incuber également au moins 48 h à 30°C.

**OBSERVATIONS****Macroscopiques**

On observe à l'œil nu les colonies isolées de levures des souches de référence, les décrire (taille, couleur, contour, relief, surface...). Essayer de repérer des colonies ayant un aspect identique à partir de la culture de moût de raisin.

**Microscopiques**

Observer entre lame et lamelle une goutte d'échantillon des souches pures de départ, du moût de raisin.

- Déposer une goutte d'eau stérile sur une lame propre, prélever avec l'anse stérile une petite quantité de culture en touchant juste une colonie repérée précédemment, la mettre en suspension dans la goutte d'eau, observer entre lame et lamelle.

- Déposer sur une lame propre une ou deux anses d'eau stérile, prélever comme ci-dessus une petite quantité de culture, mettre en suspension dans l'eau, puis étaler par frottements sur 1 à 2 cm<sup>2</sup>. Laisser sécher. Fixer en passant rapidement 3 fois dans la flamme du bec, après avoir repéré le dessus de la lame. Colorer au dessus du bac à coloration en recouvrant le frottis de bleu de méthylène pendant 5 à 6 mn ou de violet de gentiane pendant 2 mn. Rincer à l'eau, sécher, observer (grossissement 400 ou mieux 1000 en immersion).

- Comparer les résultats des observations de la souche isolée à partir du moût avec ceux obtenus à partir des souches de référence.

