

Culture des champignons

Les champignons ont besoin d'une source d'énergie, une source d'azote, quelques minéraux, et parfois des vitamines. Certaines moisissures sont plutôt spécifiques à la source de ces matériaux et doivent les avoir dans le milieu. De nombreux champignons peuvent répondre à tous leurs besoins nutritionnels à partir de matières.

1. Milieux de culture

Les besoins du champignon sont fournis sous une forme de carbone organique pour l'énergie, une source d'azote pour les protéines et la synthèse de la vitamine, et plusieurs minéraux. La substance sur laquelle un champignon est cultivé au laboratoire est appelée *un milieu*, la moisissure poussant sur ce milieu forme *une culture*. Les milieux de culture peuvent être **solides** ou **liquides**, en fonction du type d'informations l'on souhaite obtenir. Pour buts d'identification, les milieux de culture solides sont généralement plus utiles, car ils permettent au champignon de sporuler plus facilement.

1.1. Les milieux solides

La plupart des milieux de culture sont préparés en dissolvant les nutriments nécessaires dans de l'eau, pour obtenir une solution équilibrée fournissant tous les besoins du champignon pour sa croissance. La préparation du milieu solide consiste à dissoudre un agent de solidification, l'agar-agar.

1.2. Les milieux liquides

Les milieux liquides sont utilisés pour des travaux de laboratoire quand toute la colonie doit être récupérée pour la pesée ou pour extraction chimique. Ils sont également utiles lorsque le milieu de culture doit être analysé pour les modifications chimiques. Les levures sont particulièrement adaptées aux milieux liquides.

2. Composition du milieu de culture

La plupart des milieux de culture s'inscrivent dans l'une des trois catégories : (1) **synthétiques**, (2) **semi-synthétiques**, et (3) **naturels**.

- 2.1. **Les milieux synthétiques** sont composés d'ingrédients à composition chimique connue et de concentration connue. Ces milieux sont utiles dans les études physiologiques ou descriptives. Peu de champignons montrent leur meilleure croissance sur le milieu synthétique. Cependant, plusieurs produisent des structures de sporulation.
- 2.2. **Les milieux semi-synthétiques** ressemblent aux milieux synthétiques contenant un ensemble connu d'ingrédients, mais au moins une partie des ingrédients sont de composition inconnue ou variable. Les milieux semi-synthétiques sont largement utilisés dans les travaux de routine et offrent une relation entre les milieux synthétique et les milieux naturels.
- 2.3. **Les milieux naturels** sont partiellement ou totalement composés de substances naturels, tels que les des plantes ou des animaux. Une tranche de pomme de terre est un milieu de culture naturel, comme un morceau de viande ou de pain. Les milieux naturels sont souvent bons et permettent la sporulation des champignons qui pourraient autrement rester stériles. Leur inconvénient majeur est qu'ils peuvent varier considérablement et donc ne donnent pas de résultats expérimentaux fiables.

3. Exemples de milieux

3.1. Milieux synthétiques

3.1.1. Agar à la Solution de Czapek (Czapek's Solution Agar)

Saccharose	30 g
NaNO ₃	3.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
Agar	15 g
Eau distillée	qsp1000 ml

L'Agar à la Solution de Czapek est un milieu synthétique largement utilisé dans les laboratoires de mycologie. Beaucoup de moisissures produisent des colonies très caractéristiques sur ce milieu et peuvent aussi exsuder des substances pigmentées. La croissance aérienne est souvent supprimée et la sporulation peut être améliorée. L'addition d'agar à ce milieu, le rend en réalité semi-synthétique.

3.2. Milieux semi-synthétique

3.2.1. Milieu de Leonian Modifié

Maltose	6.25 g
Extrait de malt	6.25 g
KH ₂ PO ₄	1.25 g
Extrait de levure	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.625 g
Peptone	0.625 g
Agar	20 g
Eau distillée	qsp1000 ml

C'est un bon milieu d'usage général qui donnera une bonne croissance avec la plupart des champignons. Certains champignons, comme de nombreuses formes mycorhiziennes, ne poussent pas sur le milieu Agar de Leonian parce qu'ils sont incapables d'utiliser le maltose comme source d'énergie.

3.2.2. Potato Dextrose Agar

Pommes de terre (tranches)	500 g
Glucose 20 g	
Agar	15 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

Chauffer les pommes de terre à 60°C pendant 1 heure et filtrer à travers une mousseline. Compléter le volume à 1000 ml et ajouter les autres ingrédients. Cuire 1 heure, puis stériliser.

Potato Dextrose Agar, ou PDA est une ancienne formule utilisée par les pathologistes des végétaux et de nombreux mycologues pour usage général au laboratoire. C'est un bon milieu pour tout usage.

3.2.3. Gélose Sabouraud

Glucose	40 g
Peptone	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

C'est le milieu standard utilisé en mycologie médicale. Ce n'est probablement pas mieux pour ces champignons que Leonian's agar ou le PDA mais est tout simplement le choix traditionnel et donc le milieu qui doit être utilisé si les colonies sont à comparer avec ceux décrites par les pathologistes médicaux. Il peut être utilisé comme milieu général de laboratoire à la place des milieux Leonian ou PDA.

3.2.4. Gélose Rose Bengale de Martin

Glucose	10 g
Peptone	5 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g

Streptomycine	30 mg
Rose bengale	30 mg
Agar	15 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

Dix millilitres d'une solution mère de 3,3 g / l de rose Bengale sont ajoutés au milieu après que les autres ingrédients (sauf la streptomycine) sont dissous. Après stérilisation, la streptomycine est ajoutée dans le milieu refroidi.

Ce milieu est utile dans les techniques de culture en boîte lorsque le but est de ralentir la croissance de colonies dans une culture mixte. Il ralentit la croissance des bactéries et certains autres organismes de sorte qu'ils ne couvrent pas les isolats du matériel naturel.

3.3. Milieux naturels

3.3.1. V-8 Agar

Jus de légumes V-8	200 ml
CaCO ₃	3 g
Agar	20 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

Le jus V-8 utilisé dans ce milieu contient probablement beaucoup de nutriments que les champignons peuvent utiliser. C'est un milieu qui est utilisé couramment en phytopathologie et semble être un bon complément aux milieux de Leonian ou PDA. Les champignons qui ne sporulent sur ces milieux sporulent souvent abondamment sur V-8, ou vice versa.

4. Préparation des milieux

4.1. Préparation

Les milieux de culture ne sont pas difficiles à préparer. Il est souvent plus facile de dissoudre l'agar séparément dans de l'eau chaude, puis ajouter les autres ingrédients. L'agar est mis habituellement dans un flacon d'eau, puis inondé d'eau bouillante. Après une heure de chauffage, la gélose sera dissoute et la solution est limpide.

Une fois que l'agar est dissous le reste des ingrédients est ajouté puis agiter jusqu'à dissolution complète.

Lorsque le milieu est complètement mélangé, il est alors préparé pour la stérilisation : Il est réparti dans des flacons ou des tubes selon l'utilisation.

4.2. Stérilisation

Au laboratoire, la stérilisation est le plus souvent effectuée dans un stérilisateur appelé autoclave à 121 °C pendant 20 minutes. (Il est préférable que les flacons soient remplis à moitié plein pour éviter toute explosion par ébullition à la fin de l'autoclavage).

5. Culture

5.1. Technique stérile

Une fois que les boîtes ou les tubes de gélose stérile sont préparés, la culture des champignons peut être réalisée. Par exemple, on veut transférer un champignon d'une culture en boîte vers un milieu en boîte stérile. Il faut mettre en considération que l'air et tous les outils qui y sont exposés sont contaminés par les spores des moisissures et que celles-ci germent et se développent si elles sont introduites dans le milieu stérile. Les mesures prises pour éviter cette contamination constituent ce qu'on appelle la *technique stérile*.

Les étapes à suivre, pour le transfert de la culture au milieu stérile, sont:

- a) Flamber l'aiguille d'inoculation (dans une flamme chaude : fig A).

- b) La laisser refroidir pendant environ 15 secondes. (l'aiguille chaude tue le champignon transféré).
 - c) Ouvrir la boîte de Pétri contenant la culture juste assez pour permettre l'entrée de l'aiguille.
 - d) A l'aide de l'aiguille stérile, couper une petite partie (un bloc 2 mm²) de la marge de la colonie. Le transfert est effectué sur les marges de la culture ; elles forment généralement les parties les plus actives. Le transfert des parties centrales fortement sporulés provoque la dispersion des spores dans l'air (Figure B).
 - e) Transférer la partie coupée à la boîte stérile, s'assurer que le couvercle est ouvert seulement assez pour introduire l'aiguille et faire le transfert. Placez le bloc au centre, retirez l'aiguille et la flamber (Figures C, D).
 - f) Fermez le couvercle ; étiqueter la boîte par un marqueur (nom de la culture et date).
 - g) Laisser la culture se développer dans un endroit protégé (moins de mouvements d'air).
- Le transfert de boîtes aux tubes, des tubes aux boîtes ou de tubes aux tubes se fait d'une manière similaire. Lors de l'utilisation des tubes, toujours flamber l'ouverture pour tuer les spores de moisissures de l'air. Ne jamais mettre les bouchons ou couvercles sur la table car ils risquent d'être contaminés.
 - La paillasse doit être propre et peut être nettoyée avec de l'eau, de l'alcool, de l'eau de Javel ou d'autres désinfectants.

5.2. Elimination des cultures

Puisque certaines moisissures peuvent causer des maladies humaines, il est dangereux de jeter ou laver les tubes et les boîtes contenant les cultures vivantes. Il est préférable de les stériliser comme avant, puis procéder à leur élimination. Les boîtes en plastique fondront dans le stérilisateur (autoclave) et il est nécessaire de les maintenir dans une casserole ou un panier.

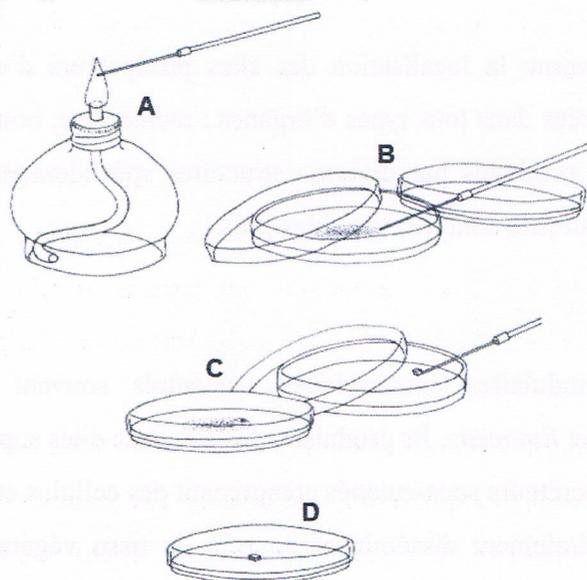


Fig. 22 Les étapes de la technique stérile. L'aiguille est flambée (A). Un petit morceau (bloc) de colonie est retiré de la culture (B) et est transférée dans un nouveau milieu (C), ce qui donne un milieu contenant un morceau de la vieille culture en son centre (D).