
GELOSE COLUMBIA (BASE)

CULTURE ET ISOLEMENT DE MICROORGANISMES EXIGEANTS

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose Columbia est un milieu très nutritif permettant la culture et l'isolement d'une grande variété de microorganismes et plus particulièrement des germes très exigeants (tels que streptocoques et pneumocoques), à partir de divers prélèvements d'origine animale. Par addition de sang, d'agents sélectifs ou d'accélérateurs de croissance, il est possible de préparer une grande diversité de milieux adaptés à des utilisations spécifiques.

La formule-type répond notamment à la composition définie dans les Pharmacopées européenne (EP), américaine (USP) et japonaise (JP).

2 HISTORIQUE

Mise au point par Ellner en 1966, la gélose Columbia permet d'obtenir des cultures luxuriantes, des zones hémolytiques parfaitement définies, des colonies et des pigmentations bien caractéristiques.

3 PRINCIPES

Les peptones qui entrent dans la composition du milieu favorisent l'excellente croissance des colonies.

L'extrait de levure est une source du complexe vitaminique B.

L'amidon est un détoxifiant, également source d'énergie.

Le sang de mouton défibriné, qui peut être rajouté au milieu, favorise la détection des réactions hémolytiques et apporte le facteur X (hème) nécessaire à la croissance de nombreuses bactéries, mais ne contient pas le facteur V (nicotinamide adénine dinucléotide), en raison de la présence d'une NAD-ase qui détruit le NAD. *Haemophilus influenzae*, qui requiert à la fois les facteurs X et V, ne pousse pas sur gélose au sang ordinaire.

Avec la base Columbia, il est possible de préparer les milieux suivants :

- Gélose au sang frais : Par addition de 5 ou 10 % de sang de mouton stérile, après autoclavage et refroidissement, le milieu convient à la culture de streptocoques, pneumocoques, staphylocoques, *Listeria*, *Erysipelothrix*. Il peut être rendu sélectif par adjonction de colistine ainsi que d'acide nalidixique pour éviter le développement des microorganismes à Gram négatif et des *Bacillus*.
- Gélose chocolat : Par addition de 10 % de sang de mouton ou de cheval à la gélose Columbia stérile, puis chauffage à 70 °C pendant 5 minutes (obtention d'une teinte chocolat), on obtient un excellent milieu pour la culture des *Haemophilus*, des *Neisseria*, des *Taylorella* ou des *Campylobacter*.
- Milieu de base sans enrichissement : La gélose Columbia permet la culture de *Brucella abortus*, *Yersinia pestis*, *Clostridium perfringens* et de toutes les entérobactéries.

4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu de base :

- Polypeptone 23,0 g
- Amidon de maïs 1,0 g
- Chlorure de sodium 5,0 g
- Agar agar bactériologique 13,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,3 ± 0,2.

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 42,5 g de milieu déshydraté (BK019) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.
- Ajouter stérilement 5 à 7 mL de sang défibriné stérile de mouton par flacon.
- Homogénéiser parfaitement.
- Couler en boîtes de Petri stériles et laisser solidifier sur une surface froide.
- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.

✓ **Reconstitution :**
42,5 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121°C

NOTE :

Pour d'autres applications, utiliser le protocole en vigueur.

6 MODE D'EMPLOI

- Ensemencer l'inoculum de façon à obtenir des colonies bien isolées.
- Incuber à 37 °C pendant 24 à 48 heures dans les conditions optimales de culture des germes ensemencés.

7 LECTURE

Observer la croissance bactérienne.

Hémolyse bêta

Les streptocoques hémolytiques du groupe A de Lancefield apparaissent sous la forme de petites colonies grises, translucides ou opaques entourées d'une zone d'hémolyse de type bêta. D'autres bactéries peuvent présenter le même type d'hémolyse : les *Listeria*, les staphylocoques hémolytiques, *Escherichia coli* et les *Pseudomonas*.

Les staphylocoques donnent des colonies opaques jaune doré ou blanches avec ou sans zone d'hémolyse de type β. Les *Listeria* présentent de petites zones d'hémolyse bêta.

Les *Bacillus cereus* présentent une zone claire autour des colonies.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

Hémolyse alpha

Les pneumocoques apparaissent sous forme de colonies plates, lisses, grisâtres et parfois muqueuses entourées d'une zone d'hémolyse étroite, verdâtre, de type alpha.

CAMP Factor

Les streptocoques du groupe B produisent une substance extracellulaire thermorésistante (CAMP factor) qui provoque un triangle d'hémolyse totale dans la zone d'hémolyse incomplète du staphylocoque, à la jonction des deux cultures.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre beige, fluide et homogène.

Milieu préparé (avec 5 % de sang de mouton défibriné) : gélose rouge, opaque.

Réponse culturale après 48 heures d'incubation à 37 °C, en présence de sang de mouton défibriné à 5 %, méthode qualitative d'ensemencement :

Microorganismes		Croissance	Type d'hémolyse
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC® 19615	Bonne, score 2	bêta
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 6303	Bonne, score 2	alpha
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	Bonne, score 2	bêta
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034	Bonne, score 2	-
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Bonne, score 2	-

9 CONSERVATION

Milieu de base déshydraté : 2-30 °C.

La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.

Milieu de base préparé en flacons (*) : 180 jours à 2-8 °C.

Milieu préparé en boîtes, avec sang de mouton (*) : 30 jours à 2-8 °C.

(*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

10 PRESENTATION

Milieu déshydraté :

Flacon 500 g..... BK019HA

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Neter, E.. 1947. The effect of yeast concentrate on the growth and survival of *Haemophilus influenza* in infusion broth. Journal of Bacteriology, **54** : 70-71.

Thayer, J.D. and Martin, J.E.. 1966. Improved medium selective for cultivation of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. Public Health Report, **81** : 559-562.

Ellner, P.D., Stoessel, C.J., Drakeford, E. and Vasi, F.. 1966. A new culture medium for medical bacteriology. American Journal of Clinical Pathology, **45** : 502-504.

NF V08-405. Décembre 1986. Conserves. Recherche des *Clostridium* thermophiles.

NF U47-108. Décembre 2012. Méthodes d'analyse en santé animale. Isolement et identification de *Taylorella equigenitalis* à partir de prélèvements génitaux d'équidés.

NF EN ISO 10272-1. Juillet 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter* spp. - Partie 1 : méthode de recherche. Modifié par NF EN ISO 10272-1/A1 : 2023.

NF EN ISO 10272-2. Juillet 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter* spp. - Partie 2 : technique par comptage des colonies. Modifié par NF EN ISO 10272-2/A1 : 2023.

NF EN ISO 15213-1. Février 2023. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Clostridium* spp. — Partie 1: Dénombrement des bactéries *Clostridium* spp. sulfitoréductrices par la technique de comptage des colonies.

Pharmacopée Européenne. Chapitre 2.6.13. Contrôle microbiologique des produits non stériles : Recherche de microorganismes spécifiés. Textes harmonisés.

The United States Pharmacopeia. Chapter <62> Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified products.

The Japanese Pharmacopoeia. Chapter 4.05 Microbial Limit Test II. Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified products.

12 AUTRES INFORMATIONS

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : COLUMBIA_V10(fr).

Date création : 01-2003

Date de révision : 11-2023

Motif de révision : Ajout bibliographie

Gélose Columbia (base)

Milieu très nutritif permettant la culture et l'isolement d'une grande variété de microorganismes.

Lecture :

Gélose additionnée de 10 % de sang de mouton stérile.
Incubation 48 heures à 37 °C.



Streptocoque du groupe D

Colonie caractéristique
entourée d'une zone
d'éclaircissement nette
(β -hémolyse)