

Viabank™



Il est souvent nécessaire de préserver les micro-organismes pour une étude ultérieure. Cela peut être fait dans un cadre de recherche, d'investigations cliniques, d'épidémiologie, d'hygiène, ou à des fins commerciales. Une conservation efficace nécessite que les organismes restent viables, non exposés aux contaminations et ne subissent aucune modification du génotype ou du phénotype. Dans l'idéal, l'organisme devrait être facile à récupérer et à ramener vers son état originel.

Viabank™ est un système de cryoprotection pratique et facile à utiliser pour le stockage des micro-organismes. La culture à conserver est ajoutée à la solution de cryoconservation d'un flacon contenant (environ) 25 billes en verre coloré. Après avoir procédé au mélange, l'excès de liquide est éliminé

puis le flacon conservé dans un congélateur. Lorsque la récupération de l'organisme est nécessaire, les billes sont retirées du flacon puis utilisées pour établir une nouvelle culture.

Préparation des organismes

Il faut laisser les cultures atteindre la fin de la phase de croissance bactérienne ou la phase stationnaire avant de les prélever₁. Pour les bouillons de cultures, il faut centrifuger, prélever le culot puis l'ajouter au flacon Viabank™. Pour les cultures sur géloses, utiliser une oese stérile (e.g. Microloop®) pour collecter plusieurs colonies de l'organisme (suffisamment pour atteindre un standard de 3 à 4 McFarland) puis placer le prélèvement dans le flacon Viabank™. Le flacon est ensuite fermé solidement puis retourné plusieurs fois afin de permettre une répartition homogène des organismes dans la suspension.

Laisser la suspension s'équilibrer à la température ambiante pendant un minimum de 15 minutes, mais pas plus de 45-60 minutes₂. Après ce délai, l'excédent de liquide est retiré du flacon en essayant de laisser le minimum de solution au contact des billes. Les flacons Viabank™ sont maintenant prêts pour la congélation.

Ce qui se passe pendant la congélation.

Lors de la congélation des cellules, la glace se forme d'abord à l'extérieur, puis à l'intérieur de la cellule₃. Lorsque la glace se forme au-dehors, la concentration des solutés augmente et provoque une sortie d'eau hors de la cellule. À ce stade, si le refroidissement est trop lent, la cellule peut se déshydrater, mais s'il est trop rapide un excès de glace intracellulaire peut se former. Des études suggèrent que la vitesse de congélation idéale pour les bactéries est de -1°C par minute₄.

La méthode de congélation & les températures

La méthode de congélation est laissée au choix de l'utilisateur mais va directement déterminer la longueur de temps pendant laquelle les organismes peuvent être stockés en toute sécurité. La vitesse de refroidissement idéale des bactéries est de -1°C par minute mais la plupart des organismes non-fastidieux résistent quand même à un refroidissement plus brutal, et peuvent être congelés en plaçant les flacons dans le fond d'un congélateur mécanique à $-60^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$ pendant 1 heure₃.

Pour un stockage à très long terme, des températures inférieures à -130 °C sont nécessaires, température en-dessous de laquelle la formation des cristaux de glace s'interrompt. Au-dessus de 130 °C, les cristaux de glace continuent à croître et à se former^{6,7}. Toutefois, pour la plupart des bactéries non-fastidieuses, -80 °C est suffisant pour un stockage jusqu'à 5 ans. (La phase vapeur d'un congélateur à azote liquide se situe à -170 °C).

Le stockage à -20 °C n'est pas idéal. Certains micro-organismes peuvent survivre pendant 1 à 2 ans, mais difficilement pour la plupart en raison de la formation des cristaux de glace¹ et les fluctuations d'électrolytes⁸. Les congélateurs avec système d'auto-décongélation sont à proscrire en raison des fluctuations répétées de température qui risquent d'endommager ou détruire les organismes⁵. En cas de stockage à -20 °C, il est important de vérifier la viabilité des souches périodiquement. Avec Viabank™ cette étape est facile à réaliser, tout simplement en retirant puis en testant une seule bille du flacon.

Références

1. Heckley, R. J., 1978. Preservation of microorganisms. *Advances in Applied Microbiology* **24**: 1-53.
2. Simione, F. P., 1992, *Cryopreservation Manual*, Nalge Company, Rochester, New York.
3. Anon., 2006, Cryogenic Preservation of Bacteria. *ATCC@ Connection*, **26**: 1 & 4.
4. Mazur, P., Leibo, S., & Chu, E., 1972, A two-factor hypothesis of freezing injury, *Experimental Cell Research*, **71**: 345
5. Reimer, L. G., & Carroll, K. C., 2003, Procedures for the Storage of Microorganisms. In *Manual of Clinical Microbiology 8th Edition*, ASM Press, Washington DC., 67-73
6. Meryman, H., 1966. Review of biological freezing. In *Cryobiology*, Academic Press, New York, 1
7. Mazur, P., 1966, Physical & chemical analysis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing. In *Cryobiology*, Academic Press, New York, 214
8. Gherna, R. L., 1981, Preservation In *Manual of Methods for General Bacteriology*. ASM Press, Washington DC, 208-217
9. Feltham, R.K.A., Power, A.K., Pell, P.H.A., Sneath, P.H.A., *A simple method for storage of bacteria at -70°C*. *J. Appl. Bacteriol.*, 1978, **44**, 313-316
10. White, D.J., Sands, R.L., *Storage of bacteria at -70°C* *Medical Laboratory Sciences*, 1985, **42**, 289-290
11. Nagel, J.G., Kunz, L.J., Simplified storage and retrieval of stock cultures, *Applied Microbiology*, 1972, **23(4)**, 837-838

Medical Wire & Equipment Co. (Bath) Ltd.
Corsham, SN13 9RT England
www.mwe.co.uk