

Les cultures bactériennes pures de *Vibrio cholerae* (VC) peuvent être conservées pendant des périodes différentes, en fonction de la méthode choisie de conservation, des équipements disponibles, de l'infrastructure du laboratoire et des analyses qui seront effectuées après conservation. Les isolats doivent être préparés avec rigueur pour la conservation :

1. Sélectionner une colonie VC confirmée et l'inoculer sur un milieu de culture non sélectif fraîchement préparé\*.
2. Incuber à  $35 \pm 2$  °C pendant 18 à 24 heures.
3. Vérifier la pureté de la culture en s'assurant de la présence de colonies individuelles bien isolées, d'aspect homogène, sans contaminants. Faire un test de l'oxydase et une agglutination avec les antisérums spécifiques afin de confirmer l'identification.
4. Indépendamment de la méthode de conservation choisie, travailler en conditions aseptiques. Tous les tubes doivent être clairement identifiés en utilisant des marqueurs indélébiles ou des codes-barres, et consignés dans les registres adéquats.

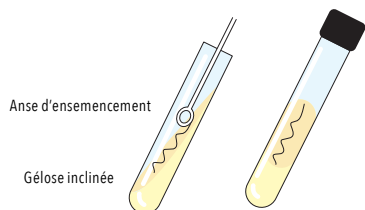
## GELOSES INCLINEES NON SELECTIVES

Jusqu'à 3 mois ‡

**Objectif :** Souches de référence.

**Conditions de stockage :** 22 à 25 °C dans l'obscurité.

**Matériels :** Géloses inclinées non sélectives\*, anse d'ensemencement, bouchons, ruban adhésif ou parafilm, huile minérale.



**Procédure :**

1. Ensemencer à partir d'une boîte de culture pure (18 à 24h) la surface de l'agar à l'aide d'une anse en évitant d'atteindre le fond de la pente où du liquide peut s'accumuler.
2. Fermer le tube sans visser complètement.
3. Incuber à  $35 \pm 2$  °C pendant 18 à 24 heures.
4. Vérifier la croissance.
5. De l'huile minérale stérile peut être utilisée pour prévenir le dessèchement des géloses en pente et augmenter la durée de conservation (à quelques années). Recouvrir les colonies de la pente avec une couche d'huile pour arriver 1 cm au-dessus de l'extrémité de la pente.

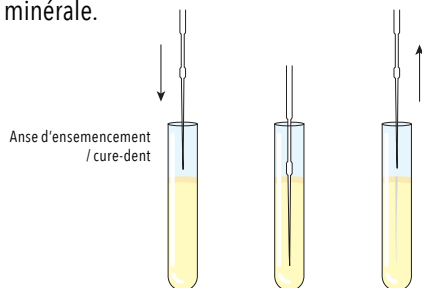
## GELOSES PROFONDES

Jusqu'à 1 an ‡

**Objectif :** Transport d'échantillons et souches de référence.

**Conditions de stockage :** 22 à 25 °C dans l'obscurité.

**Matériels :** Géloses semi-solides non-sélectives\*, anse ou cure-dent stérile, bouchons et ruban adhésif ou parafilm, huile minérale.



**Procédure :**

1. Ensemencer la gélose à partir d'une boîte de culture pure (18 à 24h), insérer une anse fortement chargée ou un cure-dent dans le tube, puis le pousser à travers la gélose jusqu'à environ 1 cm du fond.
2. Enlever l'anse du tube.
3. Fermer le tube sans visser complètement.
4. Incuber à  $35 \pm 2$  °C pendant 18 à 24 heures.
5. Vérifier la croissance.
6. Une couche d'huile minérale peut être ajoutée avant de fermer hermétiquement le tube afin d'éviter le dessèchement.

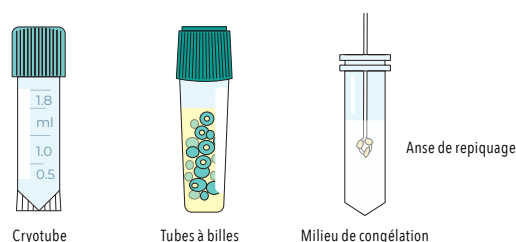
## CONGELATION À ULTRA BASSE TEMPERATURE

Indéfiniment ‡

**Objectif :** Conservation à long terme des souches, maintien du stock pour des activités de recherche.

**Conditions de stockage :**  $\leq -70$  °C.

**Matériels :** Milieu liquide\*\*, solution stock de glycérol stérile, cryotube, boîte à congélation, congélateur  $\leq -70$  °C, en option - tubes à billes, vortex.



**Procédure :**

1. Pour préparer le milieu de congélation, diluer dans un cryotube la solution stock de glycérol avec du milieu liquide pour avoir une concentration finale de 10% de glycérol †.
2. Inoculer une charge importante de culture bactérienne fraîche et pure dans le tube ainsi préparé.  
Si vous utilisez des tubes à billes : suivre les instructions du fabricant. Ajouter la culture bactérienne directement dans le tube à billes.
3. Mélanger ou vortexer correctement.
4. Noter le numéro de la boîte de congélation et la position du cryotube dans la boîte.
5. Placer immédiatement dans le congélateur  $\leq -70$  °C.

\* Gélose non-sélective comme Mueller Hinton (recommandé). Les milieux cœur-cerveille ou Trypto-caséine soja peuvent être aussi utilisés.

\*\* Un milieu de culture liquide approprié tel que le bouillon Trypto-caséine soja, Brucella ou Luria Bertani peut être utilisé.

† Des concentrations plus élevées allant jusqu'à 30% de glycérol ont été rapportées, cependant ATCC recommande une concentration finale de 10% <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/bacteriology-culture-guide>.

‡ Peut dépendre du nombre d'ouvertures des tubes ou du nombre de cycle de décongélation congélation.