

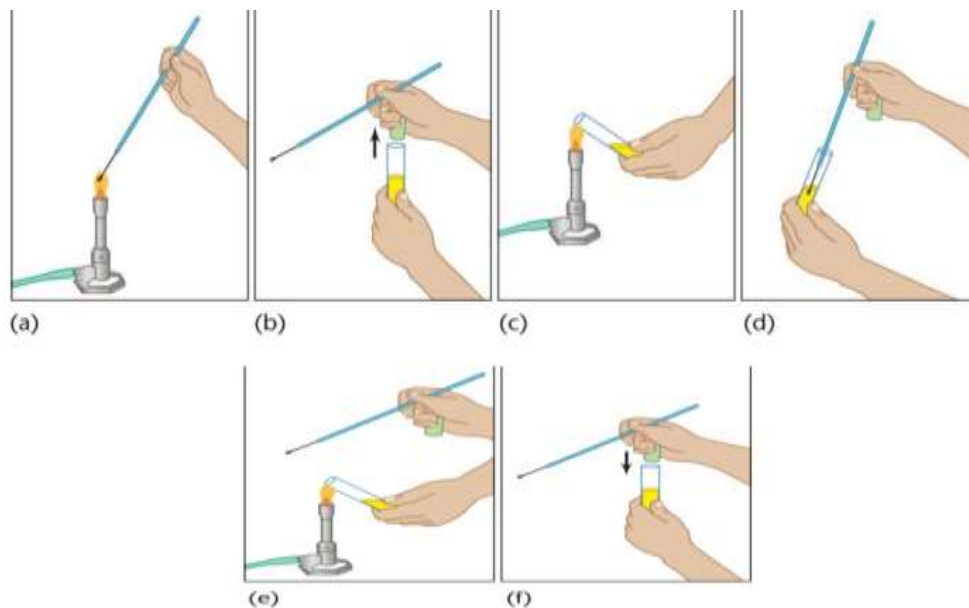
TP 5

Les techniques d'ensemencement

Introduction

L'ensemencement est l'opération qui consiste à déposer dans un milieu de culture stérile des germes prélevés d'une culture mère (milieu naturel ou culture pure) à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette Pasteur.

NB : D'une façon générale et pour un manipulateur droitier, la main droite, qui maintient dans la zone aseptique l'anse de platine ou la pipette Pasteur, ne doit pas se déplacer. Tout le matériel nécessaire : tubes de milieux de cultures, tubes de liquide de dilutions, tubes stériles ou lames, doit être porté par la main gauche vers la main droite.

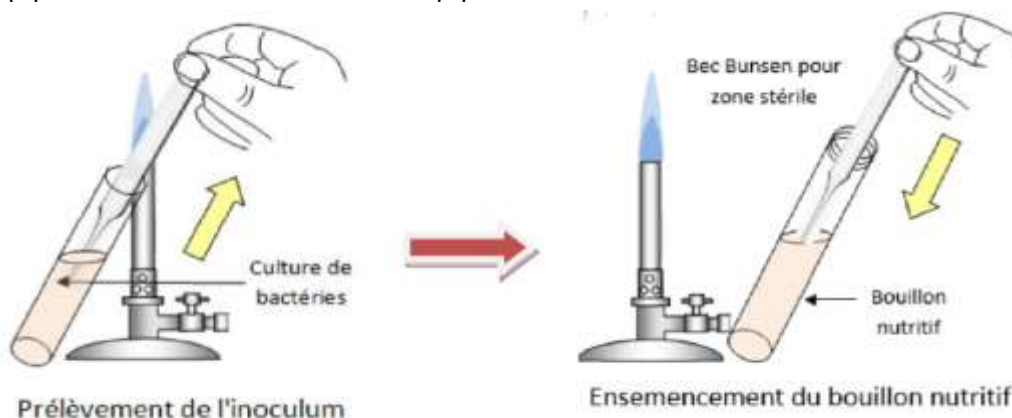


Principales techniques d'ensemencement

En fonction de la présentation des milieux et de leur utilisation, ainsi que de l'objectif recherché, les méthodes d'ensemencement diffèrent.

1- Ensemencement de milieux de culture liquides

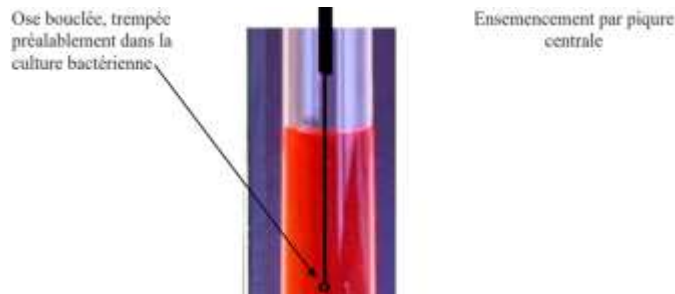
Les milieux de culture liquides sont généralement versés dans des tubes à essai, l'ensemencement de ces derniers se fait par simple dépôt microbien, à partir d'une culture liquide ou solide, à l'aide d'une anse de platine, d'une pipette Pasteur ou même d'une pipette en verre.



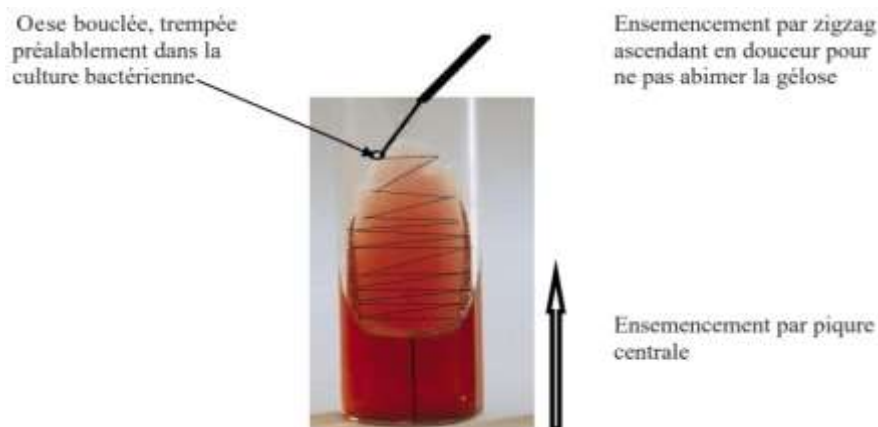
2- Ensemencement de milieux de culture solides

2-1- En tubes

- Gélose plate : Le milieu estensemencé par une piqûre centrale le long de la gélose, à l'aide d'une Oese (anse de platine) à fil droit ou d'une pipette Pasteur.



- Gélose inclinée : Dans ce cas il faut ensemencer 2 endroits de la gélose
 - ✓ Le culot estensemencé par une piqûre centrale.
 - ✓ La pente estensemencée par stries (des mouvements de zigzag) de bas en haut à l'aide d'une pipette Pasteur ou une anse de platine à boucle.



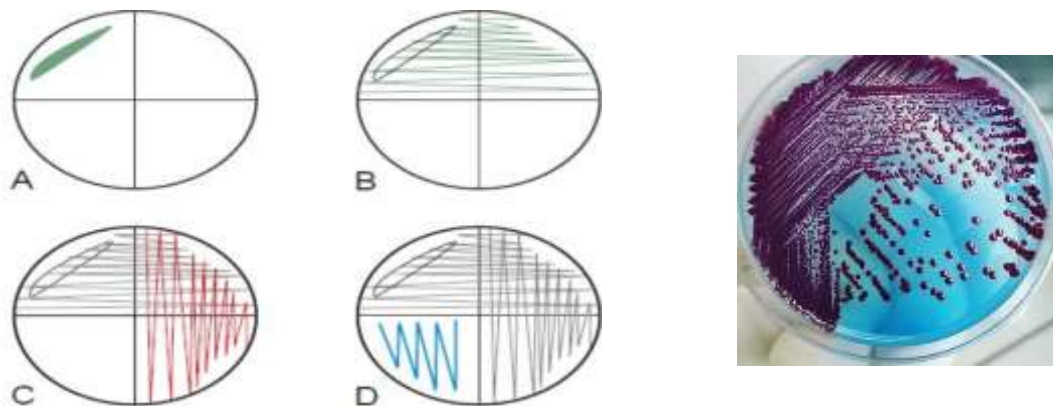
2-2- En boîtes de Pétri

2-2-1- Ensemencement en surface :

Selon l'analyse effectuée, ce type d'ensemencement peut se faire :

- a- Par stries d'épuisement « méthode des cadrans » (utilisé pour la purification, ...)
 - Il faut tenir la boîte par la main gauche et l'anse par la main droite.
 - Déposer la suspension microbienne au bord de la boîte sur le 1er cadran.
 - Tracer à l'aide de l'anneau de l'anse (ou une pipette Pasteur) des stries serrées sur le 1er cadran (de la manière la plus délicate pour ne pas abimer la gélose).
 - Puis Flamber l'öse de l'anse et laisser refroidir.

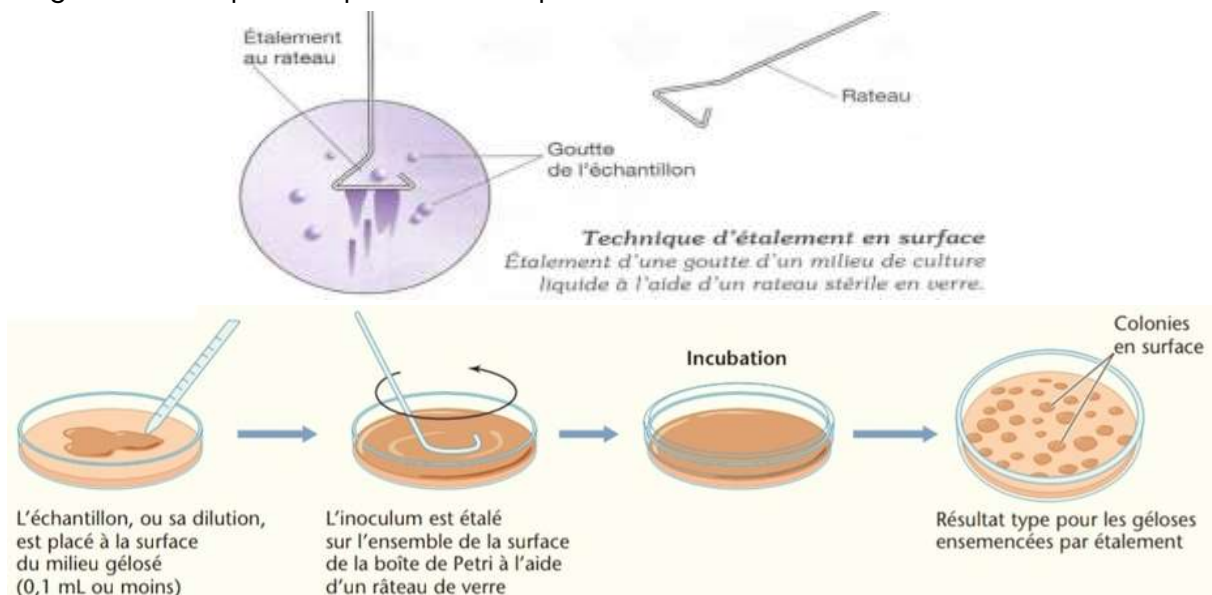
- On retourne la boîte vers le 2ème cadran et on le trace de la même façon du premier.
- On retourne la boîte vers le 3ème cadran, on l'ensemence cette fois-ci par des stries non serrées mais éloignées ne recoupant pas le dépôt précédent.



b- Par inondation (utilisée en antibiogramme): l'ensemencement se fait par des volumes allant de 1 à 5ml de la suspension microbienne à la surface du milieu de culture coulé et solidifié. On recouvre la surface totalement, l'excès est éliminé et jeté dans l'eau de javel.

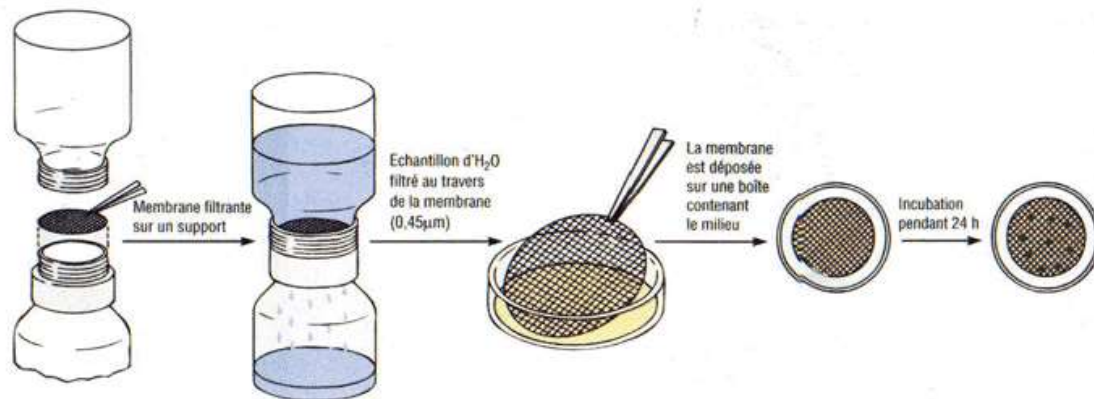
c- Par étalement (utilisé pour le dénombrement microbien)

- Déposer 100 µl de suspension du germe à la surface du milieu de culture coulé et solidifié.
- Constituer un râteau (étaleur) à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Étaler la goutte de suspension par ce râteau, puis incubé.



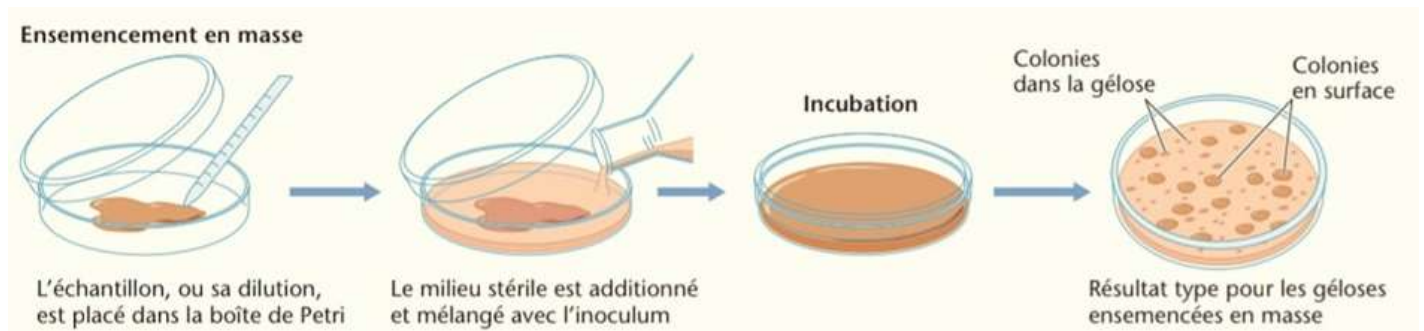
d- Par filtration sur membrane

On filtre un grand volume d'échantillon d'eau et on dépose le filtre sur un milieu de culture coulé et solidifié. Technique pour énumérer des bactéries présentes à des concentrations très faibles dans l'eau



2-2-2- Ensemencement en profondeur :

a- Ensemencement dans la masse : généralement 1ml de la suspension microbienne est déposé, par une pipette en verre stérile, dans la boîte de Pétri vide, ensuite environ 15ml du milieu de culture adéquat, en surfusion (45°C) sont versés par-dessus, mélanger délicatement en dessinant un huit. Laisser solidifier puis incuber.



b- Ensemencement en double couche : on réalise un ensemencement dans la masse comme précédemment, on mélange, on laisse le milieu refroidir et se solidifier et on verse une deuxième couche 5ml du milieu de culture en surfusion (45°C). On crée alors une zone micro-aérobie.

Remarque :

- Tout ensemencement est suivi d'une incubation dans une étuve dont le degré de température et la durée dépendent du microorganisme que l'on veut isoler.

Exemple : Pour *Escherichia coli* et plusieurs autres bactéries est de 37°C pendant 24 heures.

- La croissance microbienne apparaît sous forme de :

- Trouble dans le cas d'un milieu liquide.
- Colonies sur une gélose.