

Travaux pratiques de microbiologie générale

TPN° 3. Techniques d'ensemencement

Lors d'un examen bactériologique, la mise en culture est toujours nécessaire. En effet, bien souvent les micro-organismes, peu nombreux, n'ont pu être décelés lors de l'examen microscopique. Si le prélèvement contient plusieurs espèces bactériennes, culture et isolement sont indispensables. Enfin, c'est à partir de cultures que les divers caractères métaboliques peuvent être déterminés permettant ainsi l'identification des diverses bactéries.

Techniques générales de culture

L'ensemencement, c'est-à-dire le transport des bactéries dans un milieu de culture neuf, doit être fait dans des conditions d'asepsie totale. Les cultures sont faites en milieux liquides ou en milieux solides.

1. Cultures en milieux liquides

1.1. Culture à partir d'un prélèvement liquide : (manipulation)

L'oese flambée et refroidie est introduite aseptiquement dans le prélèvement puis enfoncée stérilement dans le milieu à ensemercer.

1.2. Culture à partir d'un prélèvement en milieu solide

Après avoir chargé l'oese de semence, elle est introduite dans le tube à ensemercer, amenée juste au contact du liquide ; gratter l'anse sur la paroi du tube afin d'obtenir une suspension épaisse et bien homogène, celle-ci est ensuite mélangée à la totalité du milieu de culture.

Après ensemencement, le bouillon est incubé à 37°C. Après 24 à 48 heures d'incubation, observer la présence ou l'absence d'un dépôt, son aspect, sa couleur ainsi que la présence d'un voile.

2. Culture en milieux solides

2.1. Culture en tubes

- Milieux solidifiés inclinés : (manipulation)

Ensemencement en stries transversales :

A partir de 0.5 – 1 cm du bas de la pente, décrire avec l'oese chargée de semence des stries parallèles et serrées sur la gélose sans l'érailler. Sans stériliser l'oese, refaire l'opération dans deux autres tubes. Incuber 24- 48h à 37°C.

Il y a également des ensemencements sur pente : en nappe, en touches, en strie médiane.

- Milieux en culot:

Ensemencement en piqûre: (manipulation)

Le fil métallique (platine ou nichrome) parfaitement droit et chargé de semence sert à faire une piqûre centrale. Le tube est ensuite incubé 24 -48h à 37°C

2.2. Cultures en boîte de Pétri par la méthode de stries

- Ensemencement en stries parallèles

L'inoculum, prélevé à partir d'un bouillon de culture, est déposé sur un point périphérique de la plaque gélosée. La gouttelette de culture est disséminée sur toute la gélose en décrivant des stries parallèles. La boîte est ensuite incubée 24-48h à 37°C.

- Ensemencement par la méthode des quadrants: (manipulation)

L'inoculum, prélevé à partir d'un bouillon de culture, est déposé à la périphérie de la gélose. Il est ensuite disséminé par des stries parallèles sur une moitié de la boîte, faire tourner la boîte d'un quart de tour et ensemercer par des stries perpendiculaires aux premières stries; après un autre quart de tour de la boîte, ensemercer le dernier quadrant.

Les boîtes de Pétri sont toujours incubées renversées. Il y a évidemment d'autres méthodes d'ensemencement par quadrants ; et d'autres méthodes d'ensemencement de milieux en boîtes (ensemencement en nape, par piqure, en masse, par touche,...).

D'autres techniques d'ensemencement permettent de visualiser les colonies qui seront ensuite dénombrées

-Ensemencement par étalement ou en surface

A partir d'une dilution (10^{-6}) prendre 0.1 ml et les répartir en gouttes à la surface de la gélose, étaler l'échantillon sur la surface du milieu à l'aide d'un râteau (étaloir), en verre stérile. Le milieu est ensuite incubé 24 – 48h à 37°C. Dénombrer les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies.

- Ensemencement par incorporation

A partir de la dilution 10^{-5} transvaser stérilement 1 ml dans une boîte de Pétri vide et stérile ; verser dessus le contenu d'un tube de gélose en surfusion (à 45°C-50°C) ; mélanger milieu et inoculum par des mouvements circulaires de sens opposés, laisser refroidir, donc solidifier le milieu avant d'incuber la boîte renversée 24 – 48h à 37°C. Dénombrer les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies à la surface et dans la masse de la gélose