

TP n°2 : Techniques d'ensemencement et d'isolement des microorganismes

1. Principe

L'examen microscopique tout seul n'est pas suffisant pour caractériser et identifier un germe. Pour cela, il est nécessaire d'ensemencer le microorganisme sur des milieux de culture.

-Ensemencer : consiste à déposer un microorganisme dans un milieu de culture neuve et stérile.

-Milieu de culture : est une préparation permettant aux microorganismes de se multiplier rapidement en grand nombre. Il doit donc satisfaire les exigences nutritives du germe étudié. (apporte la source : d'eau, de carbone et d'énergie, d'azote, de phosphore, d'ions minéraux, de facteurs de croissance, pH voisin du pH optimal,...).

-Selon leurs consistances les milieux de culture se divisent en deux types :

➔ **Le milieu de culture liquide** = le bouillon

➔ **Le milieu de culture solide** = le bouillon + **agar-agar (gélose)**

-L'agar-agar ou la gélose : est un polysaccharide extrait de la paroi cellulaire d'algues rouges possédant des propriétés permettant son utilisation pour solidifier (gélifier) les milieux de culture des germes :

- **La gélose se dissout dans l'eau à 90°C, reste en surfusion jusqu'à 45°C, puis à températures basses forme un gel transparent plus ou moins solide selon la concentration dans l'eau.**
- **Elle n'est pas dégradée par les microorganismes.**

Les germes se développent parfaitement **dans les milieux de culture liquide** sous forme d'un mélange. Ce qui implique **l'impossibilité de séparer les microorganismes.**

Par contre, les milieux de culture solides permettent **une croissance des germes** avec **fixation** sous forme des **colonies microbiennes séparées**, ce qui facilite leur isolement et par conséquent leur purification et identification. Les milieux de culture solides sont utilisés alors **pour l'isolement microbien.**

-Colonie microbienne : ensemble de cellules identiques issues de la même cellule microbienne mère.

- Isoler : consiste à séparer les divers microorganismes d'un mélange poly microbien.

- Souche pure ne donnera qu'un type de colonies par boîte de Pétri .

2. Outils d'ensemencement

Anse de platine, Pipettes Pasteur, ...

3. Techniques d'ensemencement

Avant toute manipulation, il faut rassembler tout le matériel dont on a besoin. On l'organise de façon à les avoir dans la zone stérile (à proximité du bec).

Selon l'objectif visé, on utilisera différentes techniques :

3.1. Ensemencement dans le tube

a) Ensemencement dans le tube de bouillon

-**Devant le bec**, prendre le tube contenant les microorganismes dans la main gauche, déboucher le et garder le bouchon dans la main droite, ensuite flamber l'ouverture du tube.

-Stériliser l'anse dans la flamme du bec et la laisser refroidir.

-Plonger l'anse dans la suspension bactérienne réalisée à partir d'une colonie que l'on veut identifier ou confirmer.

-Prendre une goutte de la suspension.

-On la retire sans toucher les parois du tube, l'anneau de l'anse contient une bulle de suspension avec des germes, c'est l'**inoculum**.

-Ensuite reflamber l'ouverture du tube et remettre le bouchon.

-On plonge ensuite l'anse dans le tube de bouillon neuf et stérile (après flambage de son col).

-On l'agite sur toute la hauteur afin de répartir la suspension dans tout le milieu.

-Reflamber l'ouverture du tube ensemencé et refermer le.

-Repasser le fil de platine à la flamme en le portant au rouge.

-Incuber le tube ensemencé dans l'étuve.

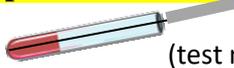
Remarque :

- On prendra en garde à conserver **tout les objets dans la zone stérile** du bec bunsen et de ne jamais les faire entrer en contact avec la paillasse.
- Les **bouchons** des tubes seront passés à la flamme du bec avant et après toute manipulation, tout comme les instruments.
- Dans le cas d'utiliser une **Pipette Pasteur** :
 - La pipette est passée rapidement dans la flamme.
 - A l'aide d'une pince stérile, sectionner la pipette à la pointe scellée.
 - Aspirer le bouillon de culture.
 - Ensemencer dans les tubes sans souffler.
 - La pipette Pasteur ne sert qu'une seule fois.

b) Ensemencement dans le tube étroit de gélose en culot

Il est ensemencé grâce à une pipette Pasteur en réalisant un **mouvement hélicoïdal** du fond vers la surface, la suspension bactérienne est libérée progressivement. (test type respiratoire)

c) Ensemencement dans le tube de gélose en culot

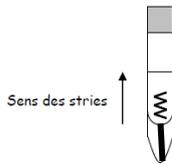
L'ensemencement se fait par **piqure centrale** à l'aide d'une **pipette Pasteur boutonnée**, après avoir préalablement chargé celle-ci de suspension bactérienne.  (test métabolique)

d) Ensemencement dans le tube de gélose inclinée (pente)

On utilise **l'anse chargée** de suspension selon le procédé décrit pour le milieu liquide. On réalise des **stries espacées** sur toute la longueur de la pente en commençant par le fond du tube et en remontant. (conservation du microorganisme)

e) Ensemencement dans le tube de gélose semi-inclinée (culot + pente)

Le culot est classiquement ensemencé par **piqure centrale** par **pipette Pasteur boutonnée** et la **pente par stries** selon le principe de la gélose inclinée. (test type respiratoire)



3.2. Ensemencement dans la boîte de Pétri (contient le milieu de culture solide)

a) Ensemencement en masse (en profondeur)

- Incorporer 1 ml de suspension microbienne dans la boîte de Pétri vide.
- Faire couler le milieu de culture en surfusion (45°C).
- Faire homogénéiser les **germes avec toute la masse du milieu**.
- Laisser solidifier puis incubé.

b) Ensemencement en double couche

- Faire couler **une première couche 15ml** du milieu de culture et laisser solidifier.
- Déposer 1 ml de la suspension des **germes** et ensemencer par étalement.
- Couvrir d'une **deuxième couche 5ml** du milieu de culture en surfusion (45°C).
- Laisser solidifier puis incubé.

On crée alors une zone micro aérobie (isolement des anaérobies facultatifs).

c) Ensemencement en surface

c-1. Par inondation (utilisée en antibiogramme)

- Deux millilitres de suspension microbienne sont déposés 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.
- Déposer un ou plusieurs disques d'antibiotiques à la surface puis incubé.

c-2. 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.
- Etaler la goutte de suspension par ce râteau, puis incubé.

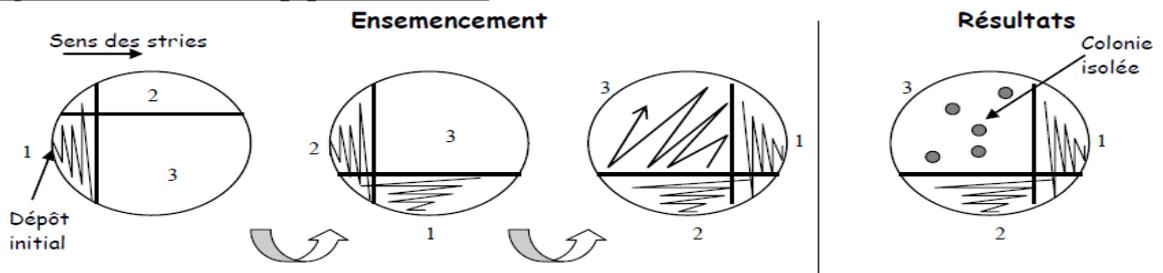
c-3. Par stries d'épuisement « méthode des cadrans » (utilisé pour la purification, ...)

- Faites charger l'öse (anneau) de l'anse de Platine comme décrit précédemment en **titre 2-a**.
- Il faut tenir la boîte par la main gauche et l'an par la main droite.
- Déposer la suspension microbienne au bord de la boîte sur le 1^{er} cadran.

Selon le schéma ci-dessous :

- Tracer à **l'aide de l'anneau** de l'anse des **stries serrées** sur le 1^{er} 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 2^{ème} cadran et on le trace de la même façon du premier.
- On retourne la boîte vers le 3^{ème} cadran, on l'ensemence cette fois-ci par des **stries non serrées** mais éloignées ne recoupant pas le dépôt précédent.

(On peut également utiliser la pipette Pasteur)



d) Ensemencement 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**

4. Incubation

-On place les boîtes et les tubes dans une étuve qui va réguler et maintenir la température à la valeur favorable à leur croissance durant toute la période nécessaire. La **température optimale** pour :

- * Les moisissures et levures est de 30°C;
- * Pour *Escherichia coli* et plusieurs autres bactéries est de 37°C.

-Le **temps d'incubation** est variable d'un germe à l'autre.

- * variant de 24h à 72h pour la majorité des bactéries et levures,
- * une semaine pour les moisissures
- * et de 10 à 15 jours pour les actinomycètes.