

Travaux Pratiques 5 : Techniques de culture bactérienne

-Techniques d'ensemencement-



1-Définitions :

Ensemencement : consiste à déposer dans un milieu neuf des micro-organismes prélevés dans un milieu de culture mère. Le transport est en général effectué avec une anse de platine ou une pipette Pasteur.

Isolement : séparer les divers micro-organismes contenus dans le prélèvement initial. Un isolement peut être envisagé aussi pour purifier une souche contaminée ou contrôler sa pureté.

2-Les techniques d'ensemencement :

2-1-Ensemencement des milieux liquides : L'utilisation d'un bouillon permet une pousse rapide et homogène des bactéries. Cependant, il a des désavantages. En effet, s'il y a plusieurs espèces bactériennes dans un prélèvement ou une contamination extérieure, il est impossible de différencier les différentes espèces bactériennes puisque les cellules se trouvent en milieu liquide donc mélangées. La technique d'ensemencement d'un bouillon est par contre très simple (Figure 1) :

1. Stériliser l'instrument servant à prendre la souche bactérienne d'origine (pipette dans le cas de bouillon, anse dans le cas d'une colonie) ;
2. Prélever la souche à ensemer ;
3. Stériliser l'ouverture du flacon de bouillon stérile ;
4. Ensemer le bouillon à l'aide du prélèvement effectué précédemment ;
5. Stériliser l'ouverture du flacon de bouillon ;
6. Stériliser l'instrument ;
7. Il ne reste plus qu'à incuber dans les conditions optimales. - Après l'incubation, la croissance bactérienne se traduit par un trouble

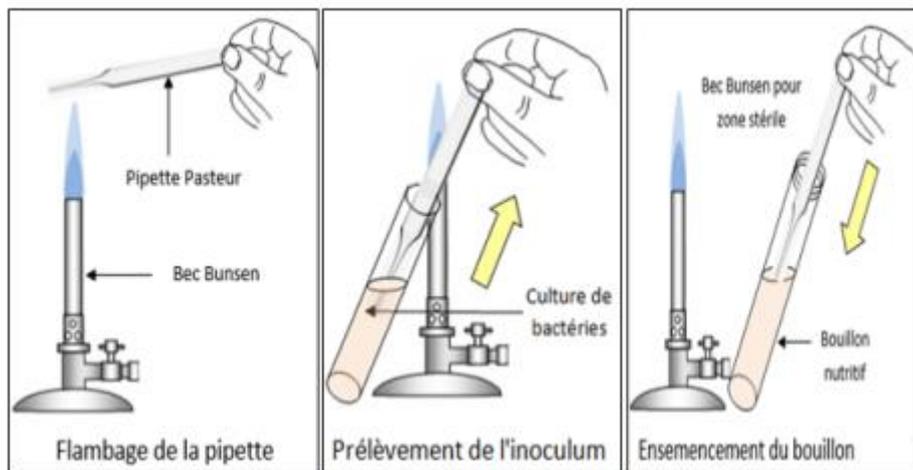


Figure 1 : Ensemencement d'un milieu liquide

2-2-Ensemencement des milieux solides en boîtes de pétri : Les milieux gélosés sont ensemencés après liquéfaction préalable et refroidissement.

2-2-1- Ensemencement en surface par stries : méthode d'épuisement ou méthode des quadrants : C'est le type de base des ensemencements. En effet, il permet s'il est bien réalisé, d'obtenir des colonies isolées, donc d'obtenir des cultures pures d'une espèce bactérienne. Le principe de ce type d'ensemencement est d'épuiser un dépôt initial en faisant des étalements successifs dans différentes directions (d'où le nom de la technique : épuisement par la méthode des quadrants). Cette technique est pratiquée sur boîte de pétri à partir d'un milieu solide ou liquide (Figure 2):

1. Dépôt initial de la souche près d'un bord d'une boîte de gélose adaptée à l'espèce désirée ; Étalement de ce dépôt en réalisant des stries serrées sur environ 1/3 de la boîte ;
2. Stérilisation de l'instrument d'étalement ;
3. Étalement d'une partie des stries précédentes, après avoir fait tourner la boîte d'environ 50° ; Répétition des deux étapes précédentes 2 fois ;
4. Faire un Z final vers le centre de la gélose ;

5. Il ne reste plus qu'à incuber dans les conditions optimales.

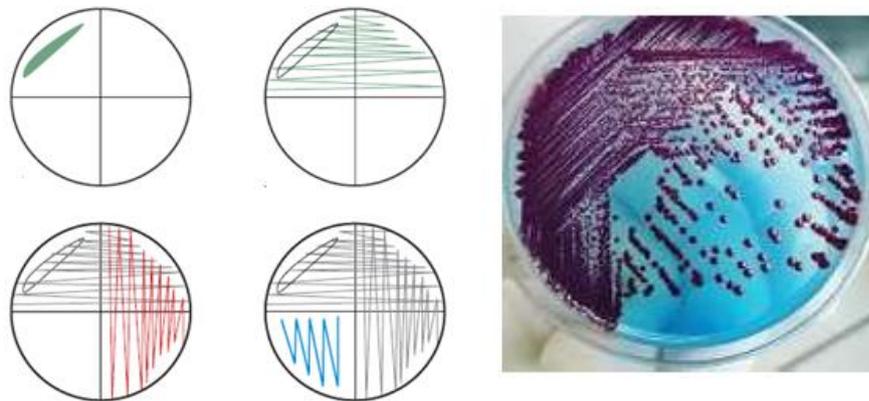


Figure 2 : Ensemencement en surface par quadrants

2-2-2-Ensemencement en surface par étalement ou en râteau : Cette technique permet d'obtenir une répartition régulière de la culture bactérienne sur boîte de pétri (Figure 3). En effet, elle permet, après un étalement par un râteau, d'évaluer le nombre de colonies par ml de suspension c'est-à-dire réaliser un dénombrement bactérien par la méthode de dilution.

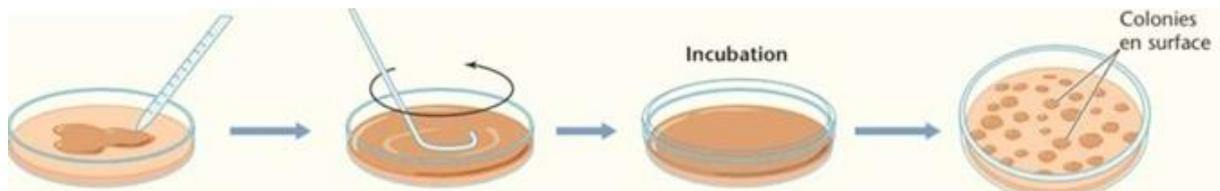


Figure 3 : Ensemencement en surface par râteau

2-2-3-Ensemencement en masse ou en profondeur : C'est le plus souvent réalisé afin de dénombrer des micro-organismes. Un volume de 1 ml d'inoculum est dispersé dans le fond d'une boîte de Pétri, et environ 15ml milieu de culture gélosé en surfusion (à 45°C) est ensuite coulé par-dessus (Figure 4). Mélanger délicatement en dessinant un 8, laisser solidifier puis incuber. Les micro-organismes se développent dans la masse du milieu gélosé, on obtient donc des colonies dans la masse de la gélose.

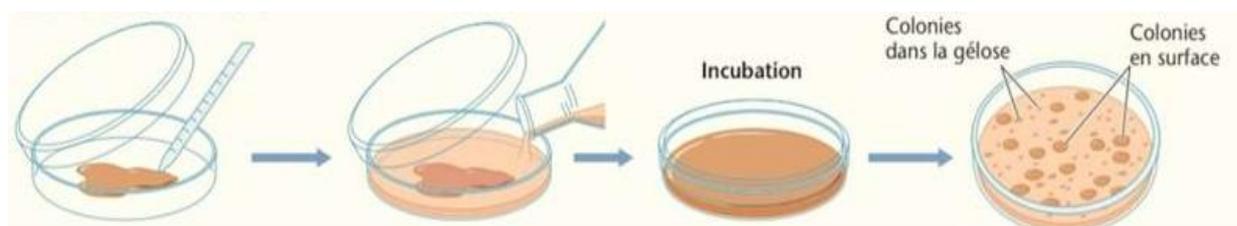


Figure 4 : Ensemencement en masse

2-3-Ensemencement des milieux solides en tubes : La plupart des ensemencements solides en tubes, se font par des stries en surface le long de la gélose comme le cas de la gélose inclinée. Pour certains milieux soit il suffit juste d'une piqûre centrale dans la gélose comme le cas de l'ensemencement du milieu mannitol mobilité. Certains milieux, on les ensemence avec une piqûre centrale, et on remonte ensuite en tournant dans tout le tube comme le milieu Viande Foie pour la mise en évidence de type respiratoire (Figure 5).

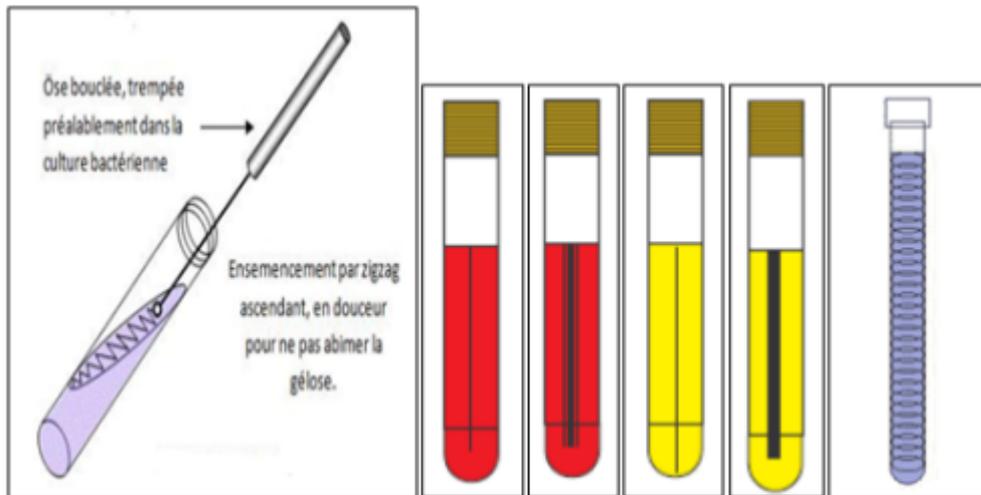


Figure 5 : Ensemencement des milieux gélosés en tube : Ensemencement par stries sur gélose inclinée, ensemencement par piqûre centrale : mobilité négative mannitol négatif, mobilité positive mannitol négatif, mobilité négative mannitol positif, mobilité positive mannitol positif, ensemence avec une piqûre centrale, et on remonte en spirales (VF).