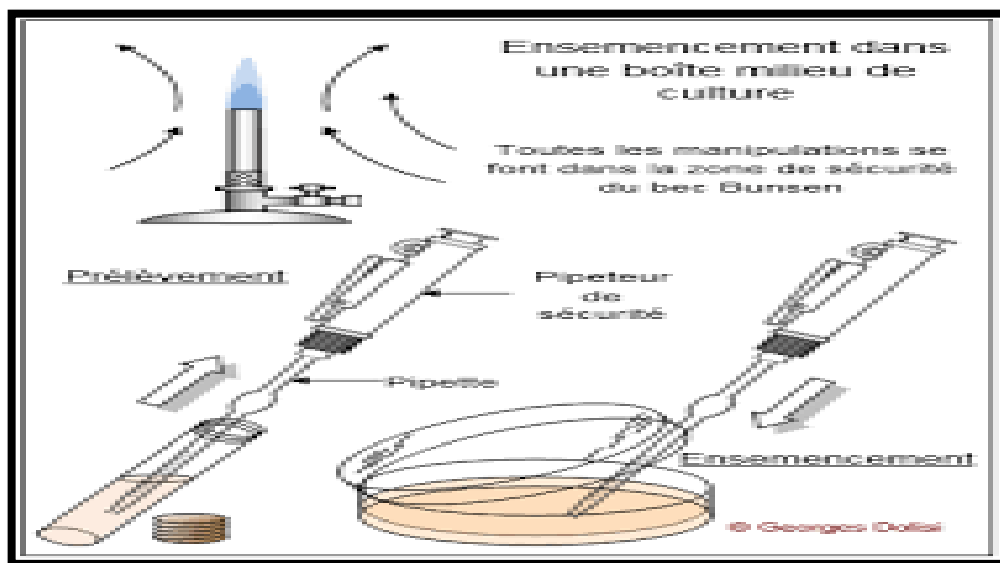


UNIVERSITE DE MOULAY TAHAR SAIDA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATUR ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
TRAVAUX PRATIQUES
DE MICROBIOLOGIE
Niveau 2^{eme} année licence.



TD N°3 : Méthodes d'ensemencement ;

Préparé par : M . Hansal Nabila.

2019-2020

L'ENSEMENCEMENT C'EST QUOI ?

En microbiologie : l'ensemencement est l'étape de transport entre votre milieu (substance alimentaire ou biologique ou culture bactérienne) et votre nouveau milieu de culture. à l'aide d'une « pipette Pasteur » ou anse de platine ou écouvillonnage.

- **Nous vous rappelons quelques règles élémentaires concernant l'ensemencement :**
 - - Travailler en zone stérile La désinfection de vos paillasse
 - - Le pipetage à la bouche est strictement interdit (risques de contamination bactériologique)
 - - La pipette Pasteur ne sert qu'une fois seulement
 - Tester la stérilité de boîtes coulées : incuber les boîtes dans une étuve à 35°C pendant 18 à 24h, même haut de là, l'absence de culture bactérienne valide le test.
 - L'ensemencement doit être effectué dans des conditions d'asepsie rigoureuses à partir d'un prélèvement d'une colonie ou d'un bouillon bactérien avec une anse de platine ou une pipette de pasteur, peut être réalisé sur un milieu liquide ou solide.

Ensemencement sur un milieu solide

a)-Milieu en boîte de pétri :

Il existe plusieurs techniques d'ensemencement sur boîtes :

1er Isolement ou épuisement :

-C'est la technique des 4 quadrants qui consiste à disperser le microorganisme à la surface d'un milieu solide afin d'obtenir des colonies séparées, ainsi permet de retrouver tous les microorganismes d'un mélange, mais aussi de vérifier la pureté d'une souche bactérienne.

Technique :

Sur boîte de pétri préalablement séchée sur laquelle on a dessiné des quadrants, déposer le produit à analyser sur le 1^{er} quadrant, réaliser des stries très serrées ensuite passer au 2^e sans toucher le 1^{er}, ou stériliser la pipette ou l'anse et reprendre du 1^{er} quadrant, les stries doivent être toujours serrées ensuite passer au 3^e et au 4^e quadrant en desserrant légèrement les stries, la culture se traduit par des colonies sur les stries.

-Sur ce milieu, on pourra définir l'aspect des colonies, mais aussi la présence ou non de l'hémolyse complète ou incomplète lorsqu'il s'agit d'une GSF.

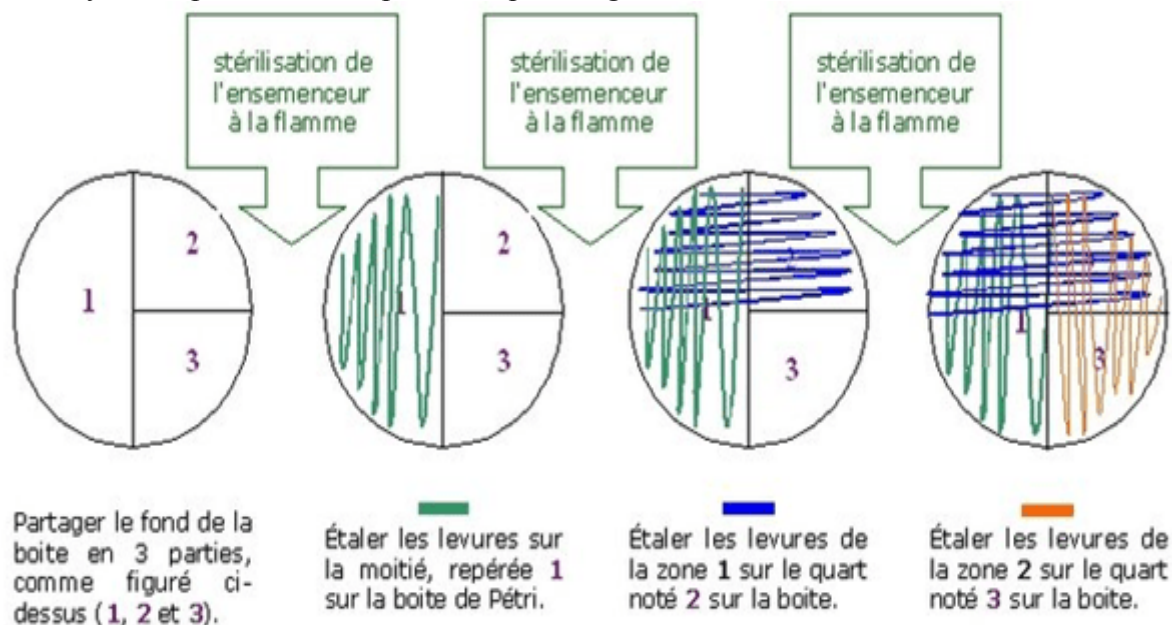
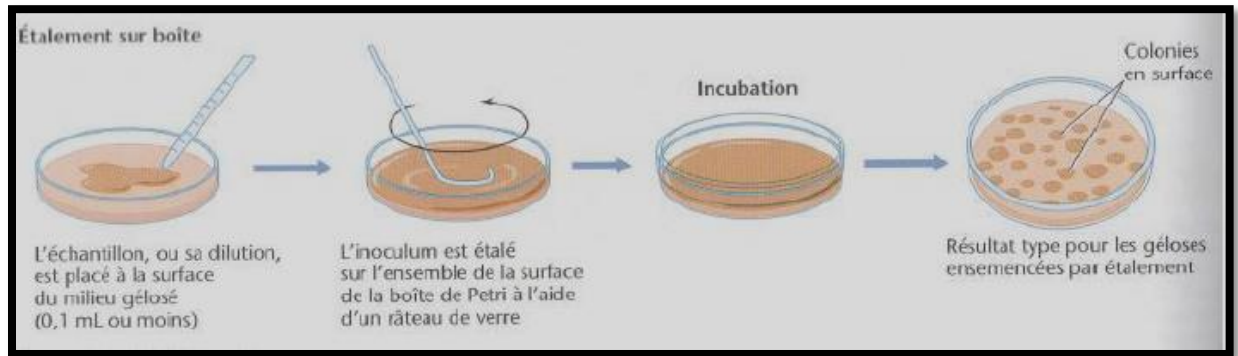


Figure 2. 2e variante d'ensemencement

2ème-Beurrage :

-Technique d'écouvillonnage qui consiste à réaliser un ensemencement très riche (pour les bactéries exigeantes et fragiles ou pour les tests d'antibiogramme).

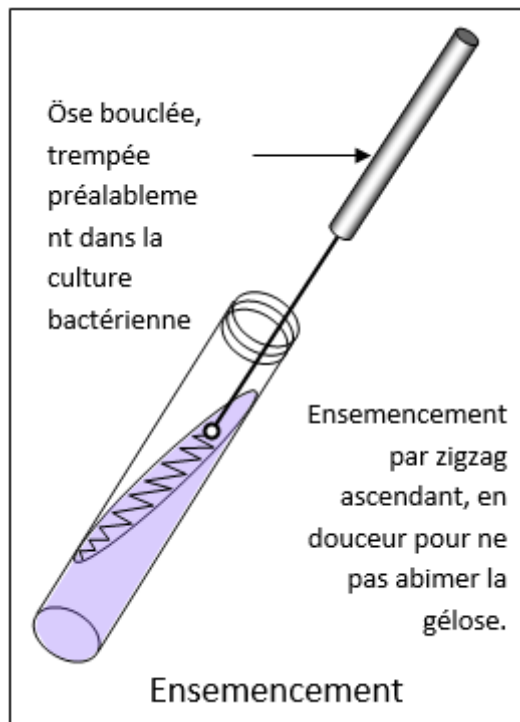
**3ème-Dénombrement :**

-Ensemencement par étalement au râteau d'un volume connu d'une suspension bactérienne.

b)-Milieu incliné en pente :

Ensemencer toujours du bas en haut par des stries serrées,

Résultat : la culture se traduit par apparition de colonies ou virage de la couleur de l'indicateur pH.

**c)-Milieu en culot :**

Ensemencement par piqure centrale, même résultat

Ose bouclée, trempée
préalablement dans la
culture bactérienne

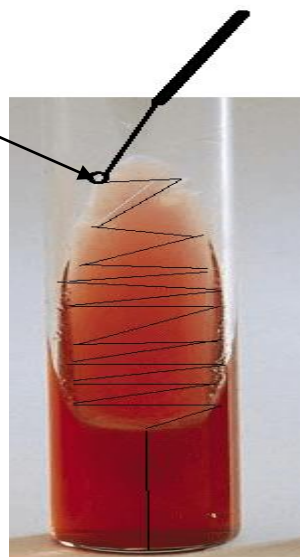


Ensemencement par piqure
centrale

d)-Milieu en culot + pente :

Commencer par ensemencer la pente par des stries serrées ensuite culot par piqure
centrale, même résultat.

Ose bouclée, trempée
préalablement dans la
culture bactérienne



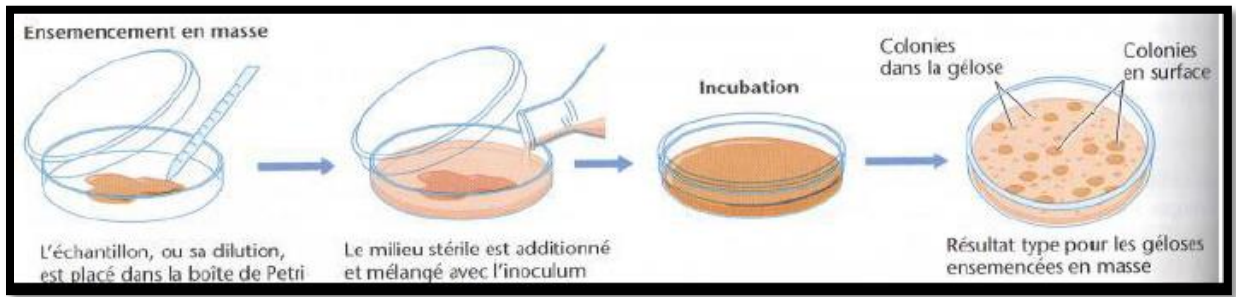
Ensemencement par zigzag
ascendant en douceur pour
ne pas abimer la gélose

Ensemencement par piqure
centrale

e)-Milieu d'ensemencement en masse :

Se réalise en tube ou en boîte, consiste à déposer le produit à analyser (eau ou nutriments)
et rajouter la gélose dessus refroidie à 45°C, laisser se solidifier et incubé.

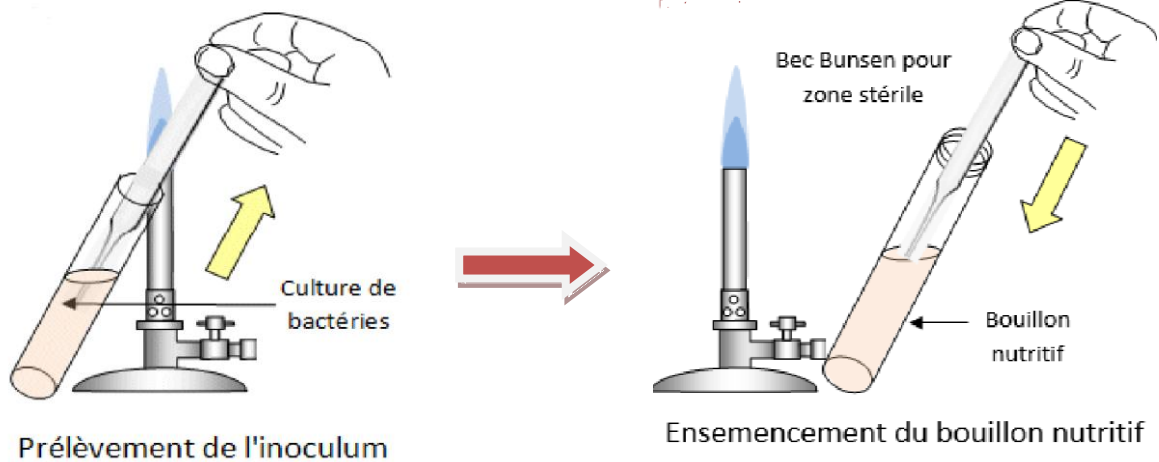
Technique surtout utilisée en bactériologie alimentaire et contrôle des eaux, le lendemain
il y aura apparition des colonies lenticulaires à l'intérieur de la gélose



Ensemencement sur milieu liquide

On peut ensemencer un milieu liquide :

-soit à partir d'un produit liquide, on met quelques gouttes dans le milieu à ensemencer avec pipette de pasteur,



-soit à partir d'un produit solide, écraser la colonie prélevée à l'aide d'une anse de platine ou pipette de pasteur sur la paroi du tube, pour obtenir une suspension homogène.

