

## TP1 : Dénombrement des germes totaux « FAMT » à partir d'un échantillon solide sur un milieu solide.

« FAMT : Flore Aérobie Mésophile Totale ».

### ✚ Objectif :

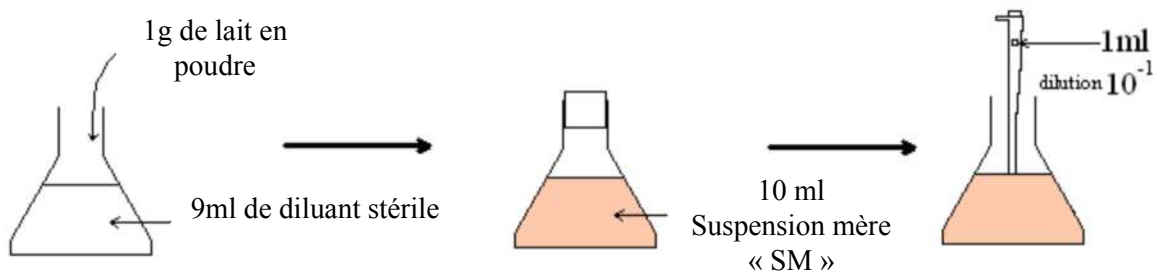
- Le dénombrement de germes totaux dans un produit alimentaire permet de juger la qualité sanitaire de ce produit (Indicateur d'hygiène : témoin d'un défaut de production ou de conservation).
- Ce nombre de germes totaux pourra représenter l'état de fraîcheur ou l'état de décomposition du produit.

### ✚ Produit analysé : Lait en poudre.

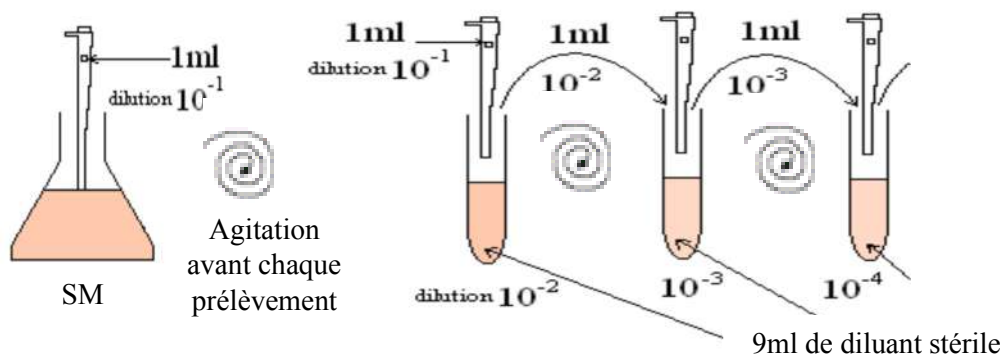
- 10g du lait en poudre sont additionnés de 90ml de diluant Trypton-sel. Agiter 10 minutes à 45°C.
- Flore aérobie totale (1ml :  $10^{-4}$ ).
- Norme : Germes totaux  $m = 5 \times 10^4$  UFC/g.

### ✚ Mode opératoire :

#### 1- Préparation de la suspension mère



#### 2- Préparation des dilutions décimales $10^{-2}$ , $10^{-3}$ et $10^{-4}$



### 3- Ensemencement en milieu solide

Milieu de culture : Gélose PCA « Plate Count Agar » :

Milieu Peptone-Extrait de levure

- Peptone.....6g
- Extrait de levure.....3g
- Gélose.....15g
- Eau distillée.....1000ml
- pH final .....7,2

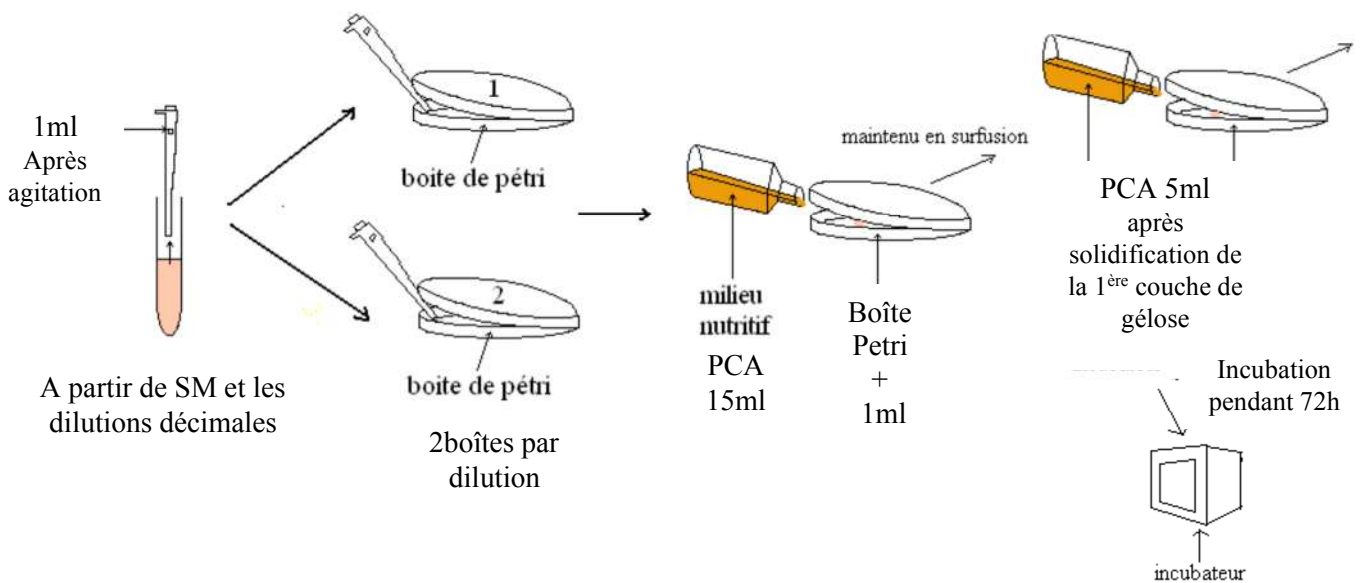
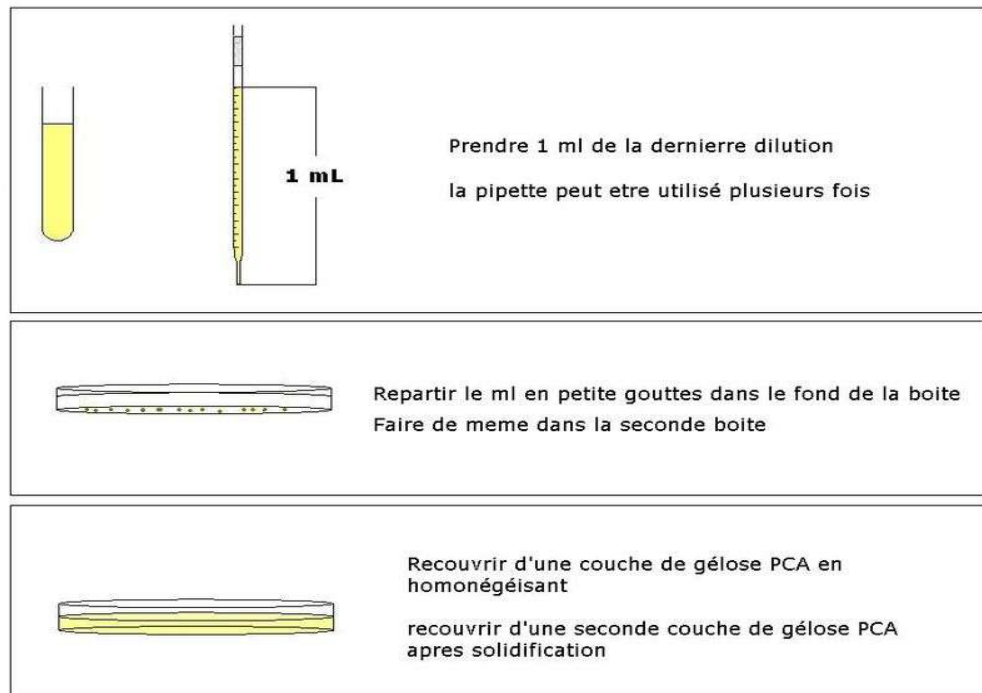
#### **A- Ensemencement dans la masse de la gélose**

- 1- Préparation du milieu de culture,
- 2- A partir de la suspension mère et les dilutions décimales,

**Prélever** un volume précis de **1 ml** à l'aide d'une micropipette de 1 ml stérile après agitation, puis **déposer** ce volume goutte par goutte sur une boîte de Petri vide (2boites par dilution) et **couler 15 ml** de milieu gélosé maintenu en surfusion mais légèrement refroidie (à une température pour laquelle permettant la survie des micro-organismes et pour laquelle la gélose ne prend pas en masse environ 45 °C). Homogénéiser en gardant à la boîte de Petri fermée des mouvements circulaires (en dessinant des 8 sur la paillasse). Laisser refroidir la gélose sans la bouger.

- 3- Après la solidification du milieu de culture, couler à la surface de la gélose une couche mince de la gélose (**5ml**), « Technique de la double couche ».
- 4- Laisser refroidir les boîtes jusqu'à la solidification complète.

5- Retourne les boîtes et les incubent à l'incubateur à 30°C pendant 72 heures.



6- Lecture des résultats chaque 24h (24h, 48h, 72h).

7- Dénombrer le nombre des colonies dans chaque boîtes « un nombre compris entre 30 et 300 colonies, Aspect lenticulaire », choisir la dilution.

8- Calculer et interpréter les résultats.

**Exemple :****Lecture des résultats**

	SM « 10 <sup>-1</sup> »	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
<b>Boîte 1</b>	Indénombrable	295	34	3
<b>Boîte 2</b>	Indénombrable	280	31	4

Nous considérons que vous avez obtenu les résultats suivants pour l'analyse de 1 g du lait en poudre.

**Remarque :** Il est impossible de compter une boîte contenant plus de 300 colonies. Le risque d'erreur est trop important donc elles sont écartées. Les boîtes contenant moins de 30 colonies sont elles aussi écartées, les colonies sont trop rares et peuvent induire en erreur.

La formule mathématique suivante peut être utilisée:

- $N$  : Nombre d'UFC par gramme ou par ml de produit initial
  - $\sum \text{colonies}$  : Somme des colonies des boîtes interprétables
  - $V_{mL}$  : volume de solution déposée (1ml)
  - $n_1$  : nombre de boîtes considéré à la première dilution retenue
  - $n_2$  : nombre de boîte considéré à la seconde dilution retenue
  - $d_1$  : facteur de la première dilution retenue
- $$N = \frac{\sum \text{colonies}}{V_{mL} \times (n_1 + 0.1n_2) \times d_1}$$

Application numérique :

$$N = \frac{295 + 280 + 34 + 31}{1 \times (2 + 0.1 \times 2) \times 10^{-2}}$$

$$N = \frac{640}{(2.2) \times 10^{-2}}$$

$N = 2,9 \times 10^4$  UFC par gramme de lait en poudre.

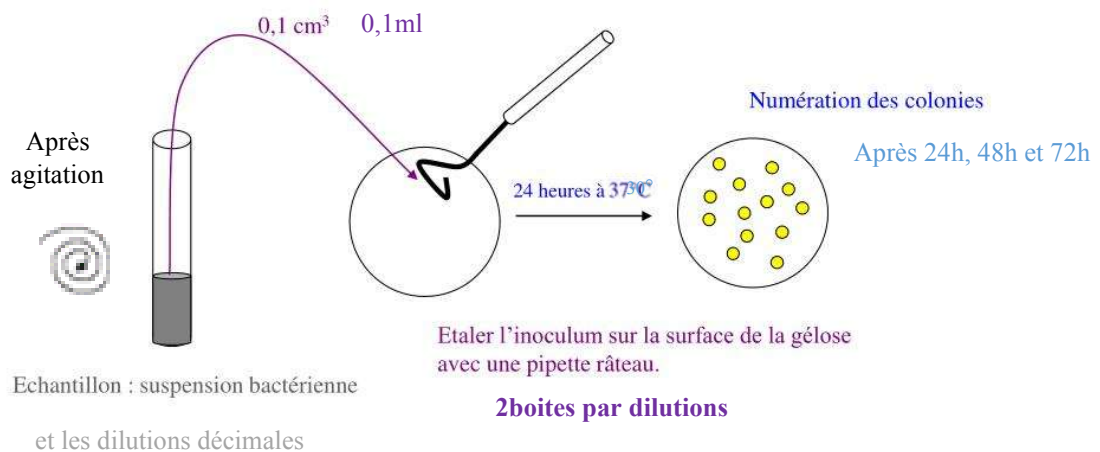
**Interprétation des résultats :**

- ✓ Si le nombre des colonies  $< m = 5 \times 10^4$  UFC/g ; le produit est satisfaisants « acceptable sans réserve » (le cas de notre exemple)
- ✓ Si le nombre des colonies entre  $m$  et  $M$  le produit est acceptable mais avec une limite ; il faut confirmer les résultats.
- ✓ Si le nombre des colonies  $> M = 5 \times 10^5$  ; le produit est inacceptable (la qualité microbiologique est inacceptable), le produit est dégradé, décomposé et impropre à la consommation (le produit est rejeté).

## B- Ensemencement en surface de la gélose :

- 1- Préparer le milieu de culture PCA « Plate Count Agar » ;
- 2- Couler les boîtes Petri avec le milieu de culture PCA (2boîtes par dilution) ;
- 3- Laisser refroidir le milieu de culture jusqu'à la solidification complète ;
- 4- Déposer 0,1ml (à partir de SM et les dilutions décimales) sur la gélose sèche ;
- 5- Étaler l'inoculum à l'aide d'une pipette râteau stérile ;( Attention à ne pas trop étaler cependant le volume sur la paroi de la boîte ce qui gênera pour la suite des analyses au dénombrement des UFC).
- 6- Retourner les boîtes et les incuber à l'incubateur à 30°C pendant 72h ;

### TECHNIQUE DE DENOMBREMENT EN SURFACE



- 7- La lecture des résultats se fait chaque 24h (24h, 48h et 72h) ;
- 8- Dénombrer les colonies et calculer le nombre de UFC/g ; « **Remarque** : Aspect des colonies : aspect macroscopique classique et caractéristique » ;
- 9- Interpréter les résultats de dénombrement de FAMT.

**Remarque** : pour le calcul et l'interprétation des résultats de dénombrement est le même principe comme la méthode de dénombrement des colonies dans la masse sauf que le volume utilisé  $v = 0,1\text{ml}$ .

$$N = \frac{\sum \text{colonies}}{V_{mL} \times (n_1 + 0.1n_2) \times d_1}$$