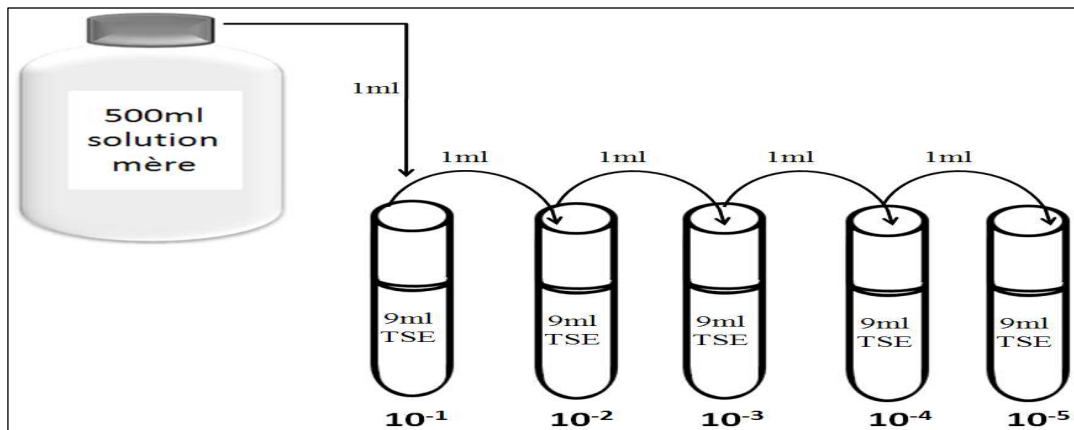


TP1 Numération microbiologique en milieu solide (en masse et en surface)

But : L'objectif principal est de maîtriser la technique d'ensemencement et numération dans les 2 techniques (masse et surface).

Dilution :

A Partir de la SM, on transfère 1ml à l'aide d'une pipette graduée et stérile dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml de TSE : cette dilution sera alors la dilution 10^{-1} . Après agitation, on introduit 1ml de la dilution 10^{-1} dans un autre tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml du même diluant : cette dilution sera alors 10^{-2} et on continue de la même manière jusqu'à la dilution 10^{-5}



1-Numération en masse, (Exemple de dénombrement de la flore totale aérobie mésophile)

Ensemencement

- A partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-5} , on porte aseptiquement 1 ml de chaque dilution en double dans deux boîtes de Pétri stérile ;
- On coule dans chaque boîte 15 ml de gélose PCA préalablement fondue (au bain Marie) et ramenée à 47°C ;
- On fait ensuite des mouvements circulaires en forme de 8 pour bien mélanger l'inoculum et la gélose ;
- On laisse solidifier sur paillasse ;
- Et on ajoute environ 4ml de gélose PCA sur toutes les boîtes afin d'éviter une éventuelle contamination ;

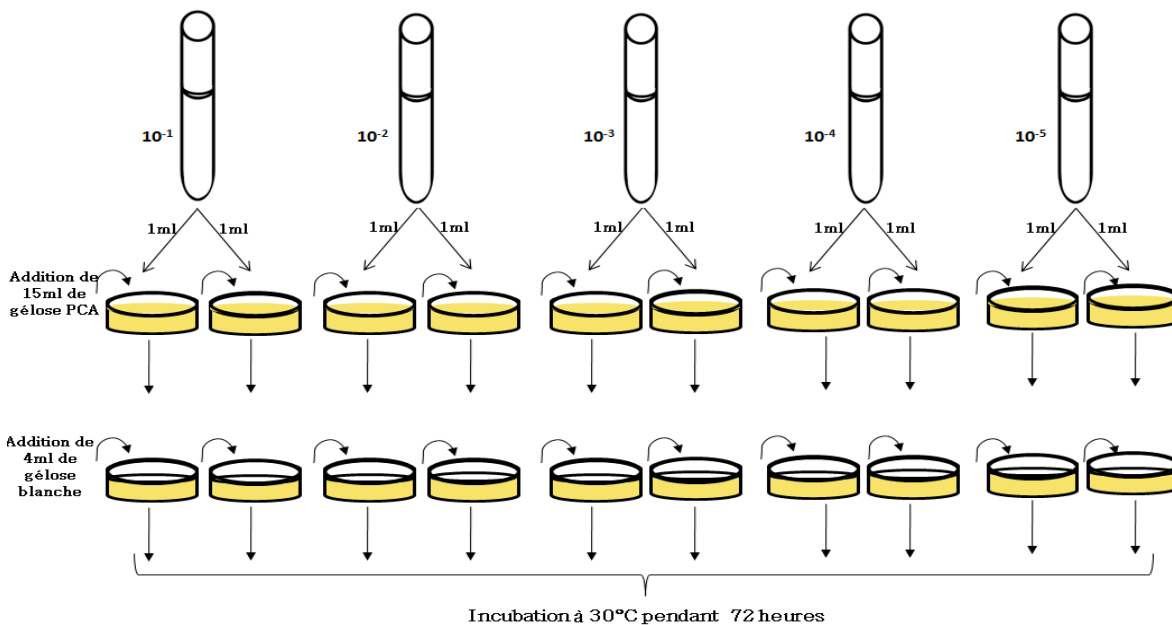
- L'ensemencement de la gélose PCA est réalisé en masse.

Incubation

Les boîtes de Pétri sont incubées couvercle en bas pendant 72h à 30°C

Lecture

- Les colonies de FAMT sont en masse et ont une forme lenticulaire ; On fait 3 lectures :
 - La première après 24h ;
 - La deuxième après 48h ;
 - La dernière après 72h.



2- Numération en surface (exemple de dénombrement des staphylocoques)

Préparation du milieu

- Au moment de l'emploi on fait fondre un flacon de 225 ml de gélose Baird Parker, on le refroidi ensuite dans un bain d'eau à 45°C, puis on ajoute 15 ml d'une solution de jaune d'œuf au tellurite de potassium.

- On mélange soigneusement et aseptiquement, puis on répartit le milieu en boites de Pétri à raison de 15 à 18 ml par boite.

- On laisse solidifier les boites sur paillasse

Ensemencement

- L'ensemencement est réalisé en surface à partir d'un inoculum de 0,1 ml des dilutions retenues, l'inoculum doit être étalé de façon uniforme dans les boites de Pétri (contenant la gélose de Baird Parker préalablement coulée et séchée) à l'aide d'une pipette râteau.

Incubation

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture

Seront considérées comme positives, les boites contenant des colonies caractéristiques à savoir des colonies noires, brillantes, convexes entourées d'une zone de transparence qui peut être translucide.

Prenant en compte les boites de deux dilutions successives, à la condition qu'elles contiennent moins de 300 et plus 15 colonies :

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + n_2 \cdot 0,1) d \cdot V}$$

ΣC : $C_1 + C_2$

C_1 : Nombre de colonies de la 1^{ère} dilution ;

C_2 : Nombre de colonies de la 2^{ème} dilution ;

d : Taux de dilution de la première boite retenue ;

N : Nombre de microorganisme/ml.

n_1 et n_2 : nombre de boite de la première et deuxième dilution retenues.

V : volume de l'inoculum utilisé.

TP2 Numération en milieu liquide (exemple de dénombrement de streptocoques fécaux)

La technique en milieu liquide fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

- Le test de présomption : réservé à la recherche des Streptocoques sur milieu de Rothe,
- Le test de confirmation : réservé à la confirmation proprement dite sur milieu Eva-Litsky des tubes trouvés positifs au niveau des tests de présomption.

Test de présomption

- On prépare dans un portoir une série de tubes contenant le milieu sélectif de Rothe à raison de trois tubes par dilution. (pour les dilutions voir TP1).
- A partir des dilutions décimales 10^{-3} à 10^{-1} , on porte aseptiquement 1 ml dans chacun des trois tubes correspondant à une dilution donnée.
- On mélange bien le milieu et l'inoculum.

Incubation

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture

Sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien.

Il n'y a aucun dénombrement à faire à ce niveau.

Test de confirmation

- Chaque tube de Rothe trouvé positif lors du test de présomption fera l'objet d'un repiquage à l'aide d'une pipette pasteur dans un tube de milieu Eva-Litsky.
- On mélange bien le milieu et l'inoculum.

Incubation

L'incubation se fait à 37°C, pendant 24 heures.

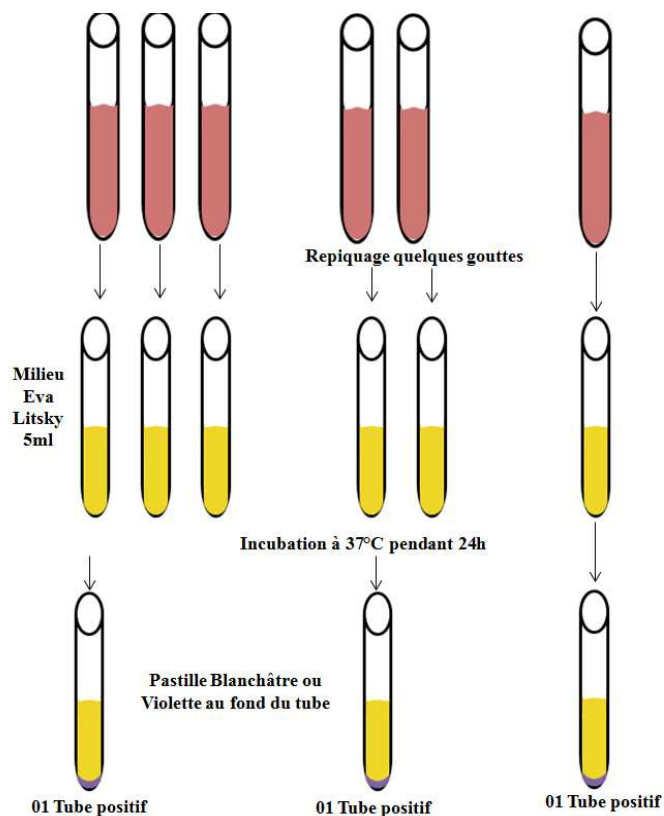
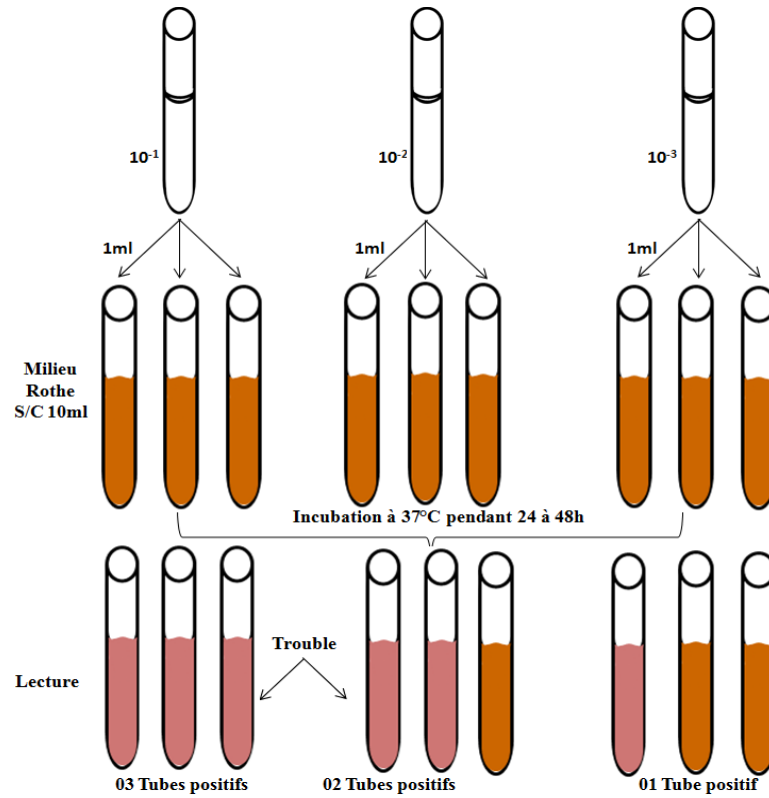
Lecture

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un trouble microbien

- Une pastille violette au fond du tube

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table de Mac Grady en tenant compte uniquement des tubes d'Eva-Litsky positifs ou négatifs.



Donc d'après cette lecture le nombre caractéristique est 111, on doit trouver le nombre de cellules d'après la table de MAC GRADY, on trouve 1.1, ce chiffre doit multiplier. 10 (l'inverse de la première dilution), le nombre de cellules dans ce cas est 11.

Table de Mac Grady.

2 TUBES / DILUTION

3 TUBES / DILUTION

Nombre caractéristique	Nombre de cellule	Nombre caractéristique	Nombre de cellule
000	0.0	000	0.0
001	8.5	001	0.3
010	0.5	010	0.3
011	0.9	011	0.6
020	0.9	020	0.6
100	0.6	100	0.4
101	1.2	101	0.7
110	1.3	102	1.1
111	2.0	110	0.7
120	2.0	111	1.1
121	3.0	120	1.1
200	2.5	121	1.5
201	2.0	130	1.6
210	6.0	200	0.9
211	13.0	201	1.4
212	20.0	202	2.0
220	25.0	210	1.5
221	10.0	211	2.0
222	110.0	212	3.0
		222	3.5
		223	4.0
		230	3.0
		231	3.5
		232	4.0
		300	2.5
		301	4.0
		302	6.5
		310	4.5
		311	7.5
		312	11.5
		313	16.0
		320	9.5
		321	15.0
		322	20.0
		323	30.0
		330	25.0
		331	45.0
		332	110.0
		333	140.00

