**TP3 : Numération directe des microorganismes par techniques microscopiques**

1. **Objectif**

Il s’agit de dénombrer les microorganismes, de différents échantillons alimentaires, directement au moyen de lames et de microscopie optique à fond clair.

1. **Matériels**

Micropipettes et embouts stériles ; Microscope optique et bac de coloration ; Pissette : eau distillée, eau de javel et alcool ; Réactifs : bleu de méthylène et l’huile d’immersion ; Papier-filtre, papier hygiénique, lame en verre, bécher ; Échantillons : lait UHT, lait cru, yaourt, levure panaire.

1. **Comptage sur lame au microscope**

* Délimiter une surface S de 1cm2 sur la lame ;
* Réaliser une série de dilution de l’échantillon de départ, ceci au moyen de micropipette munie d’un embout stérile ;
* Préparer, pour chaque dilution, une solution v/v (1ml de la dilution + 1ml du colorant (bleu de méthylène), dans des tubes à essai ;
* Homogénéiser et attendre 10 minutes ;
* Déposer un volume v = 0,01ml (soit 10μl) de la solution-dilution de l’échantillon coloré au centre de la lame, prélevé avec micropipette munie d’un embout stérile ;
* Étaler de manière uniforme sur la surface précisément délimitée ;
* Recouvrir la lame par une lamelle placée à 45°, puis lâchée (cela permet d’éviter la formation de bulles d’air) ;
* observer au microscope au grandissement ×100.
* Effectuer la numération en calculant le nombre de germes colorés n présents sur 10 champs microscopiques (la surface d’un champ est donnée 10-4 cm2 )
* Exprimer le nombre de germes par millilitre N, qui est en fonction de S, V, n, s et éventuellement d, en appliquant la formule de calcul suivante : N= n x S / s x v.
* Interprétation Comparer le nombre de germes par millilitre ou par gramme des différents échantillons.

1. **Gestion des déchets** :

* Matériel non contaminé : papier, etc. dans la poubelle ;
* Matériel contaminé : embouts, pipettes Pasteur, lames, etc. dans les béchers remplit de l’eau de javel.
* Entretien des microscopes et rangement des paillasses en fin de séance.