**TP4 : Numération des microorganismes en milieu solide (masse, surface)**

**Objectif**

Il s’agit d’ensemencer et de compter les microorganismes vivants présents dans différents échantillons alimentaires. Aussi d’apprendre les différentes techniques d’ensemencement en milieux solides que ce soit dans la masse ou bien en surface.

**Matériels**

Micropipettes et embouts stériles, pipette Pasteur ; Incubateurs réglés à 30 et à 44 °C, réfrigérateur réglé à 7 °C, compteur de colonies, microscope optique et bac de coloration ; Pissette : eau distillée, eau de javel et alcool ; boîtes de Pétri, milieu de culture : gélose PCA, gélose sélective VRBG, gélose sélective MRS ; Papier hygiénique, bécher, tubes à essai (9ml de TSE) ; Échantillons : lait UHT, lait cru, yaourt.

**Germes aérobies mésophile**

* Préparer des dilutions décimales des échantillons jusqu’à 10-3 ;
* Déposer, à l’aide d’une micropipette, 1 ml de la solution-dilution dans les boites de pétri (2 boites pour chaque dilution à tester) ;
* Verser environ 15 ml de la gélose PCA en surfusion (2 boites pour chaque dilution à tester) ;
* Mélanger chaque boite par mouvement de cinq fois dans un sens : vertical, horaire, horizontal et antihoraire ;
* Laisser solidifier ;
* Incuber les boites renversées pendant 72 h à 30 °C.

**Germes psychrotrophes**

* Verser environ 15 ml de la gélose MRS en surfusion dans les boites de Pétri (2 boites pour chaque dilution à tester) ;
* Laisser solidifier ; Transférer, à l’aide d’une micropipette ou à l’anse calibrée, 0,1 ml de la solution-dilution à la surface de la gélose solidifiée (2 boites pour chaque dilution à tester) ;
* Étaler l'inoculum uniformément sur toute la surface à l'aide d'un étaleur ;
* Incuber 72 h à 7 °C ;
* Compter les colonies dans les boites contenants entre 10 et 300, et le nombre UFC / ml ou par g d’échantillon est calculer de la manière suivante :

N = C / v (n1 + 0.1 n2) d ;

N = C / 2 v d ;

ou N = C / v d.

* Comparer le nombre de germes par millilitre d’échantillon des différents échantillons.