

## TP 3 : Dénombrement direct des microorganismes à l'aide du microscope optique.

### Introduction

Le dénombrement direct des microorganismes à l'aide du microscope optique est une technique couramment utilisée pour évaluer la concentration cellulaire dans divers échantillons. Elle permet d'observer et de quantifier rapidement les cellules vivantes et mortes, offrant ainsi un aperçu précis de la qualité de l'échantillon.

### Objectif

Compter directement le nombre de cellules dans un échantillon à l'aide d'une observation microscopique directe.

### Matériel nécessaire

- Levure boulangère (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Lames de microscope propres
- Pipettes Pasteur ou micropipettes stériles
- Becher
- Spatule
- Papier filtre
- Colorant microbiologique (ex. : bleu de méthylène)
- Fixateur (ex. : méthanol ou formol)
- Microscope optique
- Eau distillée stérile
- L'huile d'immersion
- Bec Bun

### Méthode

- 1. Préparation de la suspension de levure :**
  - Dissolvez une petite quantité de levure boulangère dans de l'eau tiède stérile et mélangez jusqu'à obtenir une suspension homogène.
  - Laissez la suspension reposer quelques minutes pour permettre l'activation des cellules.
- 2. Préparation de la lame :**
  - Délimiter une surface de 1cm<sup>2</sup> sur la lame
  - Déposez une petite goutte de (10µl) de la suspension de levure sur une lame de microscope propre.
  - Étalez la goutte uniformément pour former une fine couche sur la lame.
- 3. Fixation de l'échantillon :**
  - Fixez la préparation en passant rapidement la lame à travers la flamme d'un bec Bunsen (3-4 passages rapides) ou en appliquant du méthanol pendant 1 minute, puis rincez doucement.
- 4. Coloration :**
  - Appliquez quelques gouttes de colorant (ex. : bleu de méthylène) sur la préparation et laissez agir pendant 1 à 2 minutes.
  - Rincez délicatement la lame avec de l'eau distillée et laissez-la sécher.

**5. Observation au microscope :**

- Placez la lame sur la platine du microscope.
- Observez l'échantillon à un grossissement adapté (40x ou 100x avec immersion à l'huile si nécessaire).

**6. Comptage des cellules :**

- Sélectionnez **plusieurs champs de vision** sur la lame en déplaçant légèrement la platine pour observer différentes zones.
- Comptez le nombre de cellules dans chaque champ. Prenez soin de noter le nombre de cellules observées pour chaque champ sélectionné.
- Répétez l'opération pour **5 à 10 champs** afin d'obtenir une moyenne représentative.

**Calcul de la concentration cellulaire :**

- Estimez la concentration totale en cellules en utilisant la formule suivante :

$$\text{Concentration cellulaire} = \frac{\text{nombre moyen de cellules par champ} \times \text{surface du champ}}{\text{volume de l'échantillon sur la lame}}$$

La concentration cellulaire est exprimée en : cellules/cm<sup>2</sup>/μl.