

TP4 : Numération des microorganismes en milieu solide

Objectif : Enseigner les techniques de numération des microorganismes dans un lait UHT en utilisant un milieu solide, par inoculation en masse et en surface.

Matériel et réactifs nécessaires

Matériel :

- Boîtes de Pétri stériles
- Pipettes stériles (1 mL et 10 mL)
- Flacons de dilution stériles contenant 9 mL de solution physiologique (NaCl 0,9 %)
- Spatules stériles (pour inoculation en surface)
- Eau distillée, eau de javel ou alcool 70% pour désinfection

Réactifs :

- Milieu de culture : gélose nutritive (GN) pour la flore totale.
- Échantillon de lait UHT (ouvert depuis 24 heures pour maximiser la probabilité de contamination)
- Solution physiologique stérile (NaCl 0,9 %)

Matériel de laboratoire :

- Étuve à 30°C
- Bec Bunsen
- Bain marie

Étapes expérimentales

I. Préparation des dilutions

- Prélever aseptiquement **1 mL de lait UHT**.
- Transférer dans un tube contenant **9 mL de solution physiologique stérile**.
- Mélanger vigoureusement en vortexant ou par agitation pour avoir la dilution 10^{-1}
- Répéter jusqu'à la dilution 10^{-4} .

II. Inoculation en masse

1. Préparer des boîtes de Pétri stériles.

2. Faire fondre le milieu GN à dans le bain marie et laissez refroidir à environ **45°C** (ne pas dépasser cette température pour éviter de tuer les microorganismes).
3. Prélever **1 mL de chaque dilution** et le mettre dans les boîtes de Pétri.
4. Verser le milieu GN fondu (environ 15-20 mL) dans chaque boîte contenant l'inoculum.
5. Mélanger délicatement en effectuant des mouvements de 8.
6. Laisser solidifier à température ambiante (10 à 15 min).

III. Inoculation en surface

1. Prélever **0,1 mL** de chaque dilution.
2. Déposer cette quantité au centre de la boîte de Pétri déjà solidifié.
3. Étaler l'échantillon avec une spatule stérile en effectuant des mouvements doux et uniformes.
4. Laisser sécher la surface pendant quelques minutes.

IV. Incubation

1. Placer les boîtes de Pétri (en masse et en surface) à l'étuve à **30°C pendant 48 heures**.
2. Disposer les boîtes à l'envers pour éviter la condensation.

Analyse des résultats

1. Après incubation, observer les boîtes et compter les colonies visibles (entre 30 et 300).
2. Calculer la concentration initiale des microorganismes dans l'échantillon selon la formule :

$$N \text{ (UFC / ml)} = \text{Nombre moyen de colonies comptées} / \text{Volume inoculé (ml)} \times \text{Dilution}$$

3. Comparer les résultats obtenus pour les deux méthodes (en masse et en surface) et discuter les différences possibles.