

**Spécialité:** 3<sup>ème</sup> année microbiologie  
**Module:** Microbiologie de l'environnement  
**TP1.**

**Recherche et dénombrement des Coliformes en milieu liquide dans l'eau du robinet.**

**Objectif :** Il s'agit de répondre à l'un des critères microbiologiques relatifs à l'eau de distribution traitée (Arrêt du 27 mai 1998) :

- Coliformes totaux à 37°C → Absence 100/ml.
- Coliformes fécaux à 44°C → Absence 100/ml.

Les coliformes se présentent sous forme de bacilles à Gram négatif, non sporogènes, oxydase négative, aéro-anaérobies facultatifs, capables de croître en présence de sels biliaires et capables de fermenter le lactose avec production d'acides et de gaz, en 24 à 48 heures à 37°C.

Les coliformes sont considérés comme indice de contamination fécale.

La recherche et le dénombrement des coliformes peuvent se faire selon deux méthodes au choix :

- Soit en milieu liquide sur **BCPL** (Bouillon Lactosé au Pourpre de Bromcrésol) par la technique du NPP (Nombre le Plus Probable).
- Soit par filtration sur membrane à 0,45µ en milieu solide

**Technique en milieu liquide sur BCPL**

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

- Le test de présomption: réservé à la recherche des Coliformes totaux.
- Le test de confirmation: encore appelé test de Mac Kenzie et réservé à la recherche des coliformes fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption.

**Mode opératoire**

✓ **Prélèvement :**

Nettoyer le robinet avec un tissu propre, laisser couler l'eau pendant 1 à 2 min. Stériliser à la flamme (briquet) l'embouchure du robinet, laisser couler l'eau pendant 1 à 2 min.

Remplir le flacon en laissant un peu d'air. Boucher avec du coton cardé et conserver au réfrigérateur.ensemencer le plus vite possible.

**1<sup>ère</sup> journée :**

➤ **Test de présomption**

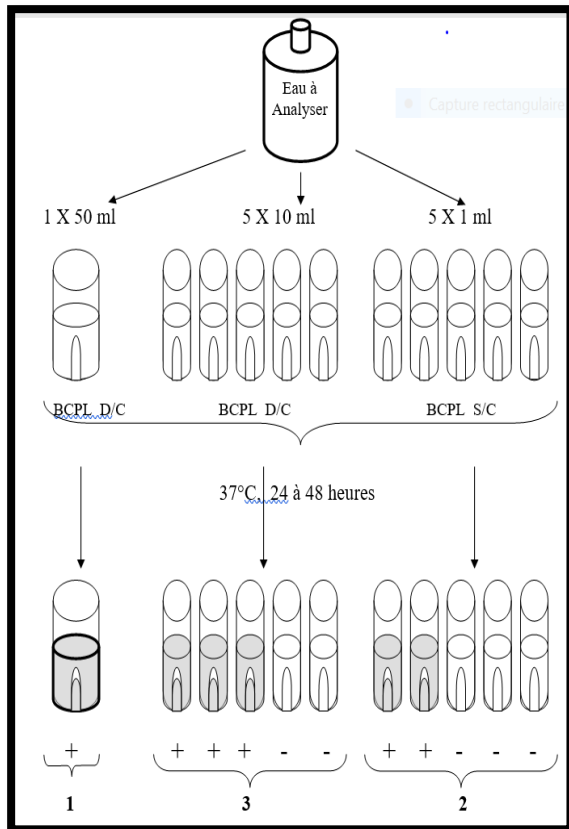
A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement:

- 50 ml dans un flacon contenant 50 ml de milieu **BCPL** D/C muni d'une cloche de Durham
- 5 fois 10 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu **BCPL** D/C muni d'une cloche de Durham
- 5 fois 1 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu **BCPL** S/C muni d'une cloche de Durham.

Chassez le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum.

**Incubation :**

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



### Lecture :

Les résultats sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un dégagement gazeux (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche),
- Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).

Ces deux caractères étant témoins de la fermentation du lactose dans les conditions opératoires décrites.

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table de Mac Grady.

Inoculum	Test de présomption	Nombre caractéristique
1 X 50 ml	+	<b>1</b>
5 X 10 ml	+	<b>3</b>
	+	
	+	
	-	
5 X 1 ml	-	<b>2</b>
	+	
	+	
	-	
	-	

Le nombre caractéristique est donc « **132** » ; ce qui correspond sur la table de Mac Grady au nombre 14. On considère alors qu'il y a 14 Coliformes par 100 ml d'eau à analyser.

### 2<sup>ème</sup> journée :

#### ➤ *Test de confirmation ou test de Mac Kenzie.*

Le test de confirmation ou test de Mac Kenzie est basé sur la recherche de coliformes thermotolérants parmi lesquels on redoute surtout la présence d'*Escherichia coli*.

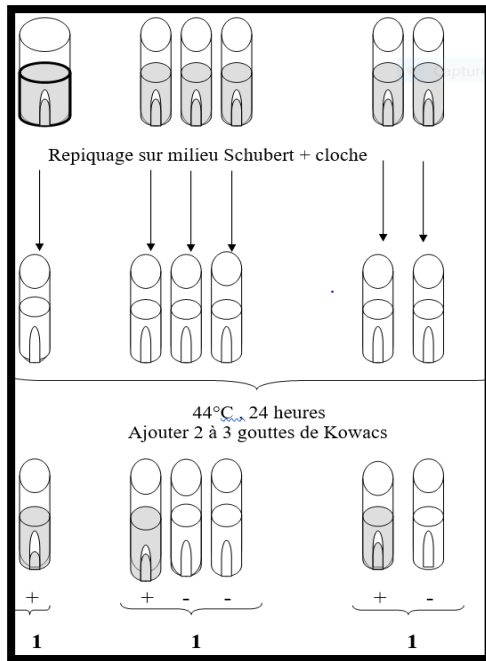
Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une oese bouclée dans:

- Un tube de **VBL** (Bouillon lactosé bilié au vert brillant) muni d'une cloche,
- Un tube d'**eau peptonée** exempte d'indole.

Chasser le gaz présent éventuellement dans les Cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum.

### Incubation :

L'incubation se fait cette fois-ci au bain marie à 44°C pendant 24 heures.



### Lecture :

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

- Un dégagement gazeux dans les tubes de VBL,
- Un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *Escherichia Coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs dans le tube d'eau peptonée exempte d'indole.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table de Mac Grady en tenant compte du fait que *Escherichia Coli* est à la fois producteur de gaz et d'indole à 44°C.

En reprenant l'exemple précédent relatif au dénombrement des coliformes totaux, cela suppose que nous avons 6 tubes à repiquer à savoir :

- le flacon de BCPL D/C,
- 3 tubes sur 5 de BCPL D/C, et
- 2 tubes sur 5 de BCPL S/C.

Inoculum	Test de présomption	Nbre Caractéristique	Test de confirmation		Nbre Caractéristique
			Gaz	Indole	
1 X 50 ml	+	<b>1</b>	+	+	<b>1</b>
5 X 10 ml	+	<b>3</b>	+	-	<b>1</b>
	+		+	+	
	+		-	+	
	-				
	-				
5 X 1 ml	+	<b>2</b>	-	+	<b>1</b>
	+		+	+	
	-				
	-				
	-				

Le nombre caractéristique relatif au dénombrement des Coliformes fécaux est donc « **111** », ce qui correspond sur la table du NPP au chiffre 5.

Le résultat final est donc :

14 Coliformes totaux dans 100 ml d'eau à analyser  
5 Coliformes fécaux dans 100 ml d'eau à analyser

1 X 50 ml	5 X 10 ml	5 X 1 ml	Nombre caractéristique	Limites de confiance	
				Inférieure	Supérieure
0	0	0	<1		
0	0	1	1	<0,5	4
0	0	2	2	<0,5	6
0	1	0	1	<0,5	4
0	1	1	2	<0,5	6
0	1	2	3	<0,5	8
0	2	0	2	<0,5	6
0	2	1	3	<0,5	8
0	2	2	4	<0,5	11
0	3	0	3	<0,5	8
0	3	1	5	<0,5	13
0	4	0	5	<0,5	13
1	0	0	1	<0,5	4
1	0	1	3	<0,5	8
1	0	2	4	<0,5	11
1	0	3	6	<0,5	15
1	1	0	3	<0,5	8
1	1	1	5	<0,5	13
1	1	2	7	1	17
1	1	3	9	2	21
1	2	0	5	<0,5	13
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	2	3	12	3	28
1	3	0	8	2	19
1	3	1	11	3	26
1	3	2	14	4	34
1	3	3	18	5	53
1	3	4	21	6	66
1	4	0	13	4	31
1	4	1	17	5	47
1	4	2	22	7	59
1	4	3	28	9	85
1	4	4	35	12	100
1	4	5	43	15	120
1	5	0	24	8	75
1	5	1	35	12	100
1	5	2	54	18	140
1	5	3	92	27	220
1	5	4	160	39	450
1	5	5	>240		

**Spécialité:** 3<sup>ème</sup> année microbiologie  
**Module:** Microbiologie de l'environnement

**TP 2.**

**Recherche et dénombrement de la flore totale aérobie mésophile et des champignons à partir du sol**

**Objectif**

Le but de ce TP est la recherche ainsi que le dénombrement des bactéries (FTAM) et des champignons présents dans le sol en utilisant la technique des dilutions

**Mode opératoire**

**1. Prélèvement**

Une quantité de sol est prélevé et mis dans un sac propre

**2. Préparation des dilutions décimales**

- Peser 1g du sol et le mettre dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile ceci correspond à la dilution mère ( $10^{-1}$ )
- Agiter pendant quelque seconde puis transférer de ce tube 1 ml et le déposer dans un deuxième tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile identifié comme le tube  $10^{-2}$
- Refaire l'opération pour obtenir les dilutions  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ .
- En commençant par la dilution la plus faible ( $10^{-5}$ ), pipeter 1 ml sur chacun des 2 boites de Pétri contenant le milieu Plate count agar (PCA) et le milieu Potato Dextrose Agar (PDA), étalez avec un étaloir sur toute la surface des géloses.
- Répétez cette étape pour la dilution  $10^{-4}$

**3. Incubation**

Incuber les boites à une température de 28 à 30°C pendant 24 heures pour les bactéries et 48 à 72 heures pour les champignons.

**4. Lecture**

Comptez les colonies dans chaque boite, et calculez ensuite le nombre de colonies par gramme de sol en utilisant la formule suivante :

$$\text{Nombre de colonies par gramme} = \frac{\text{Nombre de colonies}}{\text{Volume inoculé}} \times \frac{1}{\text{Facteur de dilution}}$$

**Spécialité:** 3<sup>ème</sup> année microbiologie  
**Module:** Microbiologie de l'environnement  
**TP3.**

**Recherche et dénombrement de la flore totale aérobie mésophile et des champignons dans l'air du laboratoire**

**Objectif**

Le but de ce TP est la recherche des bactéries (FTAM) et des champignons présents dans l'air confiné du laboratoire de microbiologie par les techniques des écouvillons et de sédimentation.

**Mode opératoire**

**1. Technique des écouvillons**

- Prendre un écouvillon stérile et le faire passer sur la surface de la paillasse
- Faire l'ensemencement sur boîte de Pétri contenant du Plate Count Agar (PCA) et du Potato Dextrose Agar (PDA)

**2. Technique de sédimentation**

- Prendre 4 boîtes de Pétri contenant du PCA, déposez 3 d'entre elles sur une paillasse du laboratoire et les ouvrir pendant 30, 15 et 5 min chacune loin du bec Bunsen. La quatrième boîte est ouverte devant le bec Bunsen pendant 30 min.

**3. Incubation**

- Incuber toutes les boîtes à 28 à 30°C pendant 24 heures pour les bactéries et 48 à 72 heures pour les champignons.

**4. Lecture**

- Compter et décrire les colonies bactériennes et fongiques obtenus sur les géloses et interprétez vos résultats