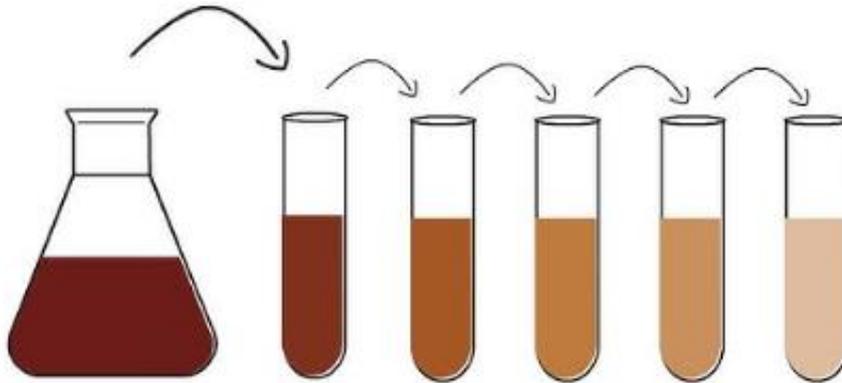


Travaux Pratiques 6 : Techniques de dilution décimale



1-Définitions :

La dilution décimale : La dilution décimale ou dilution en série est une technique qui permet le dénombrement (ou numération) des microorganismes présents dans une préparation initiale (par exemple un produit alimentaire) sur un milieu gélosé par étalement en surface ou ensemencement en profondeur.

2-Objectif :

Le but de ce TP est d'apprendre à effectuer une série de dilution décimale et déterminer par la suite le nombre de microorganismes présents dans une suspension bactérienne.

3-La technique de dilution décimale (ou la dilution au dixième) : La suspension mère est diluée successivement dans un diluant stérile, par exemple eau physiologique ou eau peptonnée. Les étapes de cette technique sont détaillées ci-après et schématisées dans la figure 1 :

1. Préparer le matériel nécessaire à la réalisation de la manipulation.
2. Homogénéiser au vortex le tube de suspension bactérienne.
3. Prélever exactement 1 ml par la micropipette.
4. Introduire le volume prélevé dans le premier tube de diluant : dilution au 1/10 (10^{-1}).
5. Homogénéiser la dilution obtenue au vortex.

6. Répéter l'opération jusqu'à la dilution souhaitée.
- 7.ensemencer en surface ou en profondeur un volume de **1ml** (ou **0.1ml** selon la technique) la gélose PCA (Plate Count Agar).
8. Incuber les boîtes de pétri selon la température optimale du microorganisme à dénombrer pendant 24 à 72 h.

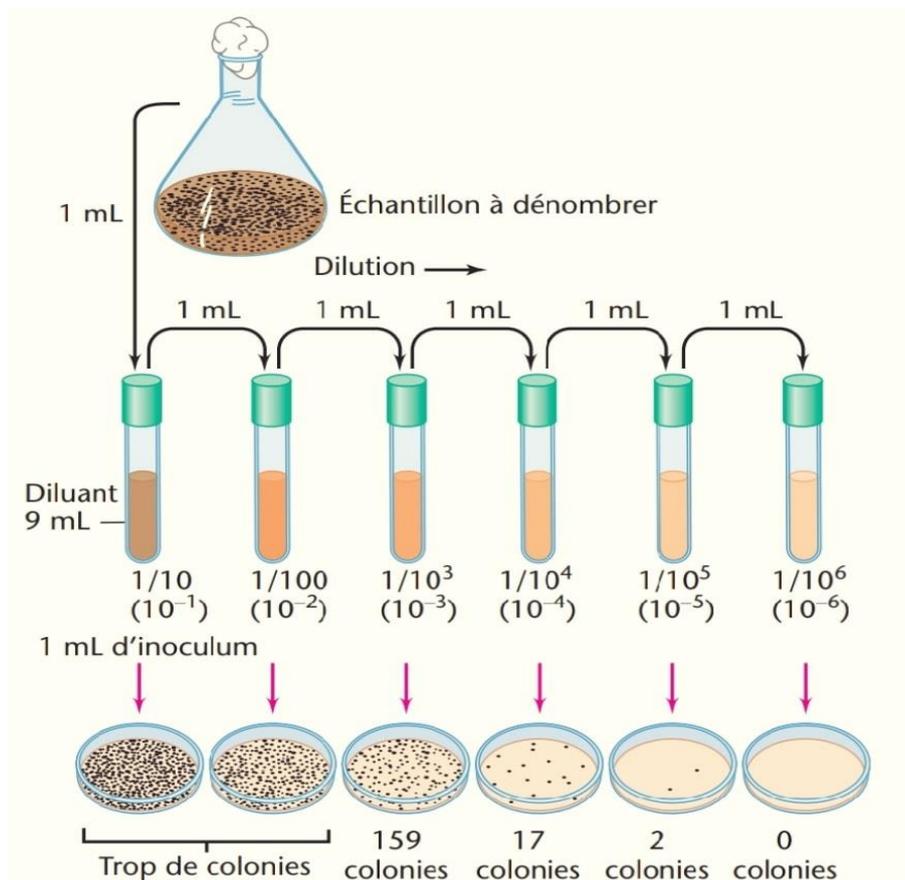


Figure 1 : Schéma de la dilution décimale

Remarque : Plusieurs rapports de dilution sont pratiqués **25/225, 10/90, 5/45, 3/27, 0,5/4,5**, dont le principe est le rapport décimale **1/9** c'est-à-dire une partie de l'échantillon et neuf parties du diluant.

4- Lecture et interprétation : Chaque boîte retenue devra contenir entre **30** et **300** colonies. Le nombre de micro-organismes par ml est calculé à partir des boîtes retenues à l'aide de la formule suivante :

$$N = \frac{\sum c}{V (n_1 + 0,1 n_2) d}$$

N : Nombre d'UFC par gramme ou par millilitre de produit initial.

ΣC : somme totale des colonies comptées.

n1 : nombre de boites comptées dans la première dilution (la plus faible).

n2 : nombre de boites comptées dans la seconde dilution (la plus forte).

d : taux de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

v : le volume de solution déposée.

Les résultats sont exprimés par le nombre d'unité formant une Colonie (**UFC**) par ml.

5- Exemples de calculs :

Exemple 1 :

Numéro de dilution	Volumeensemencé	Nombre de colonies comptées		Formules
		Boite de pétri 1	Boite de pétri 2	
1/10	1ml	321	336	$N = \frac{(249+251+119+103+78+91)}{1[2+0,1(2)] 10^{-2}}$ $N = \frac{891}{(2,2)10^{-2}} \quad N=405.10^2 \text{ UFC/ml}$
1/100	1ml	249	251	
1/1000	1ml	119	103	
1/10000	1ml	78	91	
1/100000	1ml	19	15	

Exemple 2 :

Numéro de dilution	Volumeensemencé	Nombre de colonies comptées		Formules
		Boite de pétri 1	Boite de pétri 2	
1/10	0,1ml	287	250	$N = \frac{(287+250+164+186+39+47)}{0,1[2+0,1(2)] 10^{-1}}$ $N = \frac{964}{(0,22)10^{-1}} \quad N=4381.10^1 \text{ UFC/ml}$
1/100	0,1ml	164	186	
1/1000	0,1ml	39	47	
1/10000	0,1ml	16	22	
1/100000	0,1ml	13	05	