

DÉNOMBREMENT DE MICRO-ORGANISMES

.....

.....

.....

.....

.....

On distinguera :

-
-
-

1. MÉTHODES DE MESURE DU NOMBRE DE CELLULES

1.1. DÉNOMBREMENT DIRECT AU MICROSCOPE

1.1.1. MÉTHODE DE BREED (COMPTAGE SUR LAME)

.....

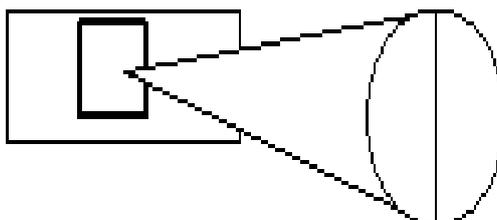
.....

.....

.....

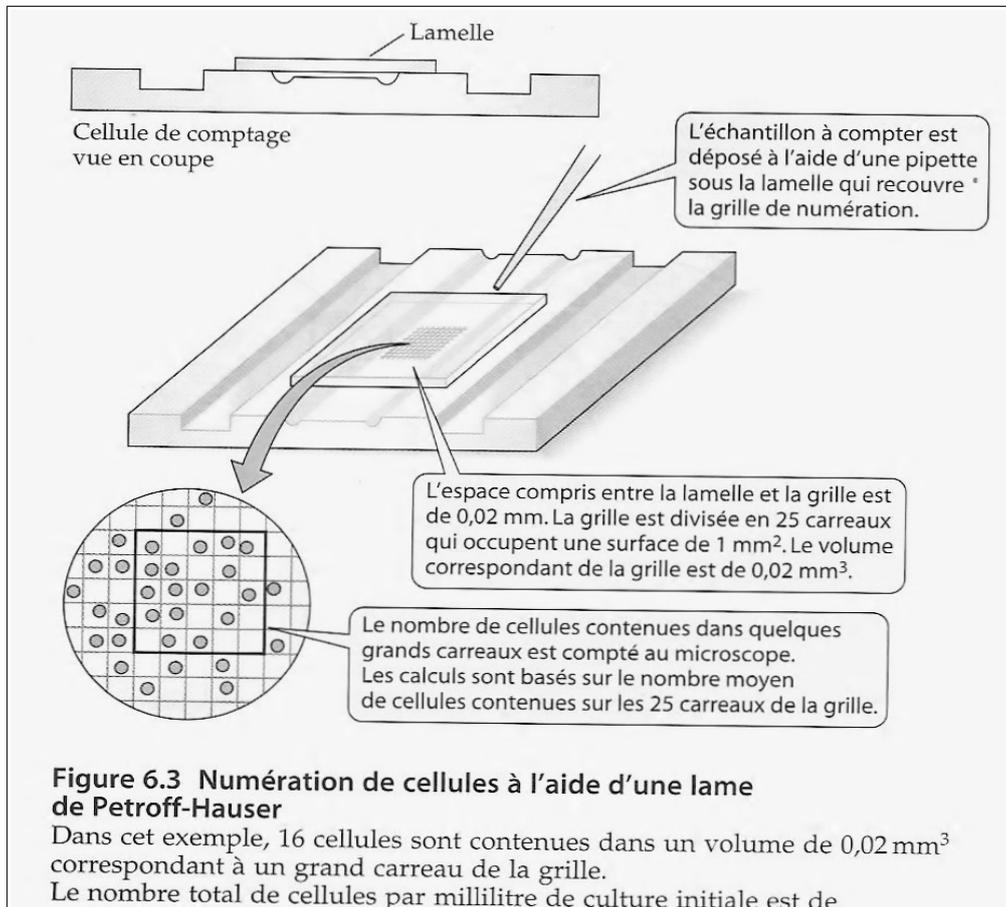
.....

.....



1.1.2. MÉTHODE EN HÉMATIMÈTRE

Document n°1 : numération de cellule à l'aide d'un hématimètre



1.1.3. DEFT : DIRECT EPIFLUORESCENCE TECHNIQUE

La technique historique utilise l'**acridine orange**, colorant **fluorochrome métachromatique** (plusieurs couleurs d'émission de fluorescence sont possibles).

L'acridine pénètre dans les bactéries et s'**intercale aux acides nucléiques** qui acquièrent ainsi une fluorescence. **Les ARN fluorescent en rouge orangé, les ADN bicaténaires en vert.**

Ainsi, des **cellules en croissance** qui ont un **rapport ARN/ADN élevé** auront une **fluorescence rouge** tandis que des **cellules inactives ou mortes** qui ont un **rapport ARN/ADN très faible** (puisque [ARN] \approx 0 très rapidement dès qu'une cellule est inactive) auront une **fluorescence verte**.

Évolutions de la technique :

On utilise maintenant d'autres colorants fluorescents métachromatiques minimisant les « interférences ».

Le **DAPI** (4'6-diamidino-2-phenylindole) est actuellement très utilisé à la place de l'acridine. Les complexes DAPI-ADN sont connus pour leur **fluorescence bleu très intense**. Le DAPI peut se lier à d'autres molécules que l'ADN mais la fluorescence est alors réputée jaune.

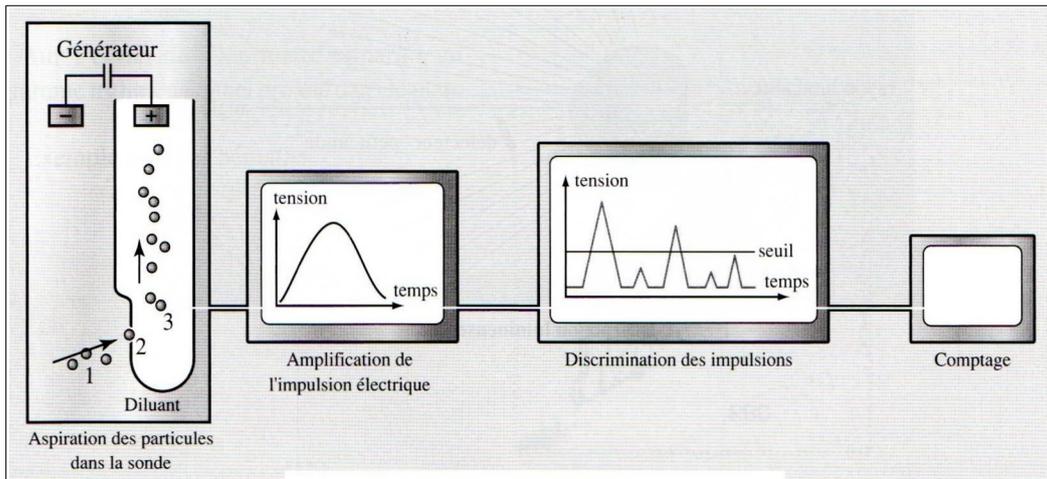
On peut également utiliser des marqueurs plus sophistiqués :

- **accepteurs synthétiques des chaînes respiratoires** qui ne fluorescent qu'une fois réduits : on marque ainsi les seules cellules qui respirent activement.
- **esters fluorogéniques** dont le fluorochrome n'exprime de fluorescence qu'après libération par une estérase cellulaire : on marque ainsi les seules cellules qui présentent une « activité métabolique ». Exemple : fluorescéine diacétate.

1.2. DÉNOMBREMENT EN COMPTEUR DE PARTICULES

1.2.1. COMPTEUR COULTER

Document n°3 : schéma simplifié d'un compteur Coulter



Le compteur de type Coulter est surtout **utilisé pour les micro-organismes de grande taille** (protozoaires, algues, levures).

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Remarque :

Ce système est également utilisé en hématologie pour le comptage des cellules sanguines.

1.2.2. CYTOMÉTRIE DE FLUX

La cytométrie de flux est une technique permettant de dénombrer les micro-organismes après marquage par un composé fluorescent.

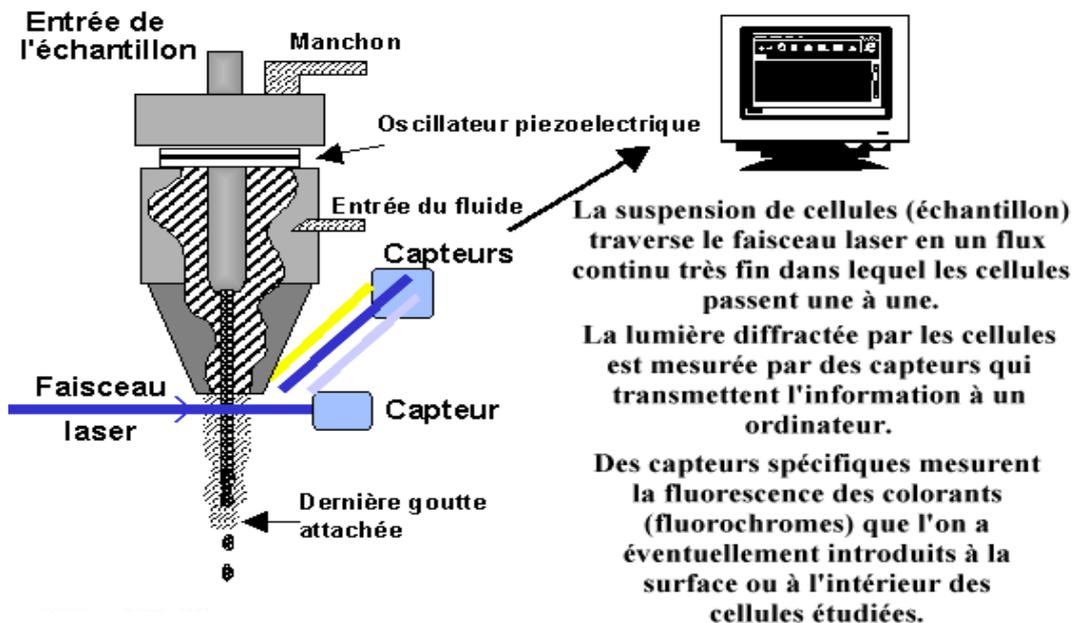
.....

.....

.....

.....

Document n°4 : schéma simplifié du principe de la cytométrie de flux



1.3. DÉNOMBREMENT EN MILIEU SOLIDE

1.3.1. PRINCIPE GÉNÉRAL DU DÉNOMBREMENT EN MILIEU SOLIDE

.....

.....

.....

.....

.....

Ces techniques de dénombrement sont lourdes à mettre en pratique (nombre de boîtes, dilutions), et nécessitent un temps d'incubation. C'est bien souvent la méthode de référence.

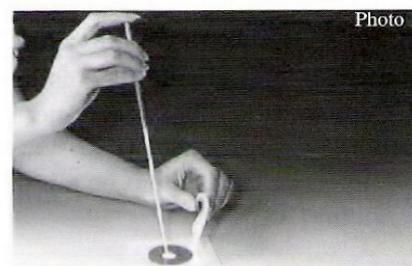
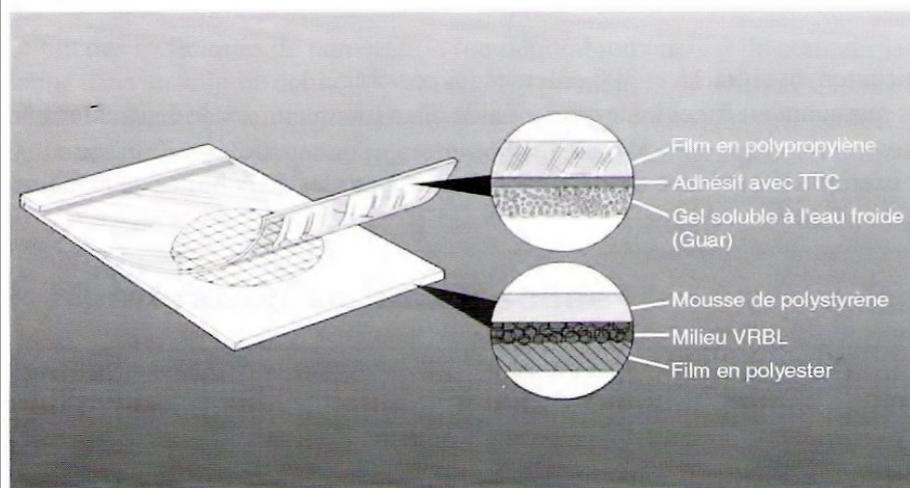
→ Voir TP

1.3.2. UTILISATION DE DISPOSITIFS SPÉCIAUX

1.3.2.1. PÉTRIFILM®

Document n°5 : description du dispositif Pétrifilm®

Depuis quelques années, la société 3M Santé propose des milieux solides conditionnés de façon astucieuse. Le milieu déshydraté est placé sur un film de polyéthylène. Une deuxième feuille séparée vient le recouvrir, porteuse d'un gel soluble à l'eau froide. L'ensemencement par 1 cm³ de dilution provoque la solubilisation des constituants, puis le durcissement de l'ensemble. Les colonies pourront apparaître après incubation. Les gaz produits peuvent être piégés entre les deux supports.



• Mode d'utilisation

Placer le Petrifilm™ sur une surface plane, soulever le film supérieur et déposer 1 mL de l'échantillon à contrôler au centre de la dépression du film inférieur (*photo 1*).

Recouvrir avec le film supérieur, étaler l'échantillon avec le diffuseur plastique (face lisse vers le bas) en exerçant une légère pression (*photo 2*). L'eau contenue dans l'échantillon réhydrate les composants et forme, entre les 2 films, une gélose de 20 cm². Cette gélification est obtenue en 2 minutes.

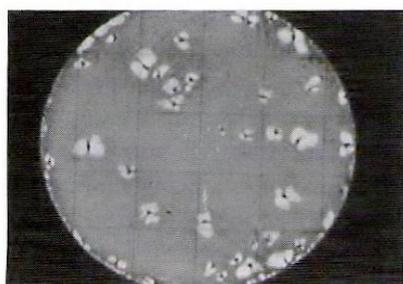
Incuber à 30 °C ou 44 °C pour les coliformes thermotolérants (sans empiler plus de 20 unités).

Mettre un bœcher d'eau dans l'étuve pour toutes les températures supérieures à 37 °C. Après 24 heures, procéder au dénombrement. Le Petrifilm™ se conserve 1 an à 4 °C, dans son emballage d'origine ou 1 mois à température ambiante (après ouverture).

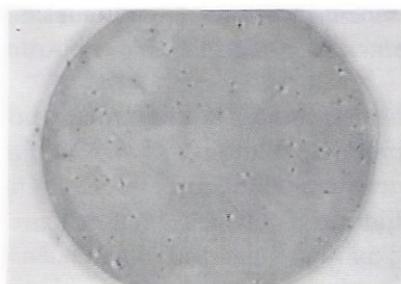
• Interprétation

Après incubation, les coliformes forment des colonies rouges avec des bulles de gaz (fermentation du lactose).

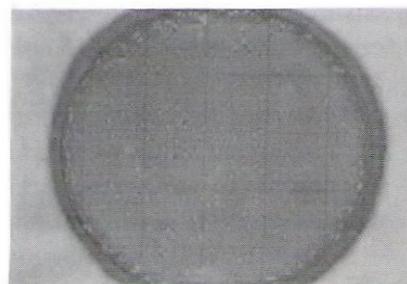
Pour isoler les colonies destinées à une identification, soulever le film supérieur et prélever sur le gel.



40 coliformes



38 formes et nombreuses autres colonies visibles n'ayant pas de bulles de gaz



Incomptable

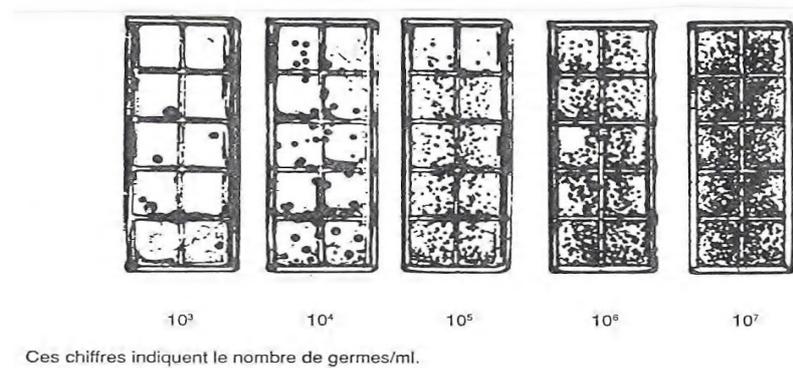
1.3.2.2. LAME IMMERGÉE

On utilise une lame munie d'un quadrillage en relief et recouverte de gélose sur les deux faces : une sélective d'un côté et une non sélective de l'autre.

La lame est immergée dans la suspension à dénombrer puis incubée.

La détermination de la quantité de micro-organismes s'effectue en comparant la densité de colonies à un abaque.

Document n°6 : exemple d'abaque pour lame immergée



1.3.2.3. DÉNOMBREMENT APRÈS FILTRATION

Document n°7 : Principe du dénombrement après filtration

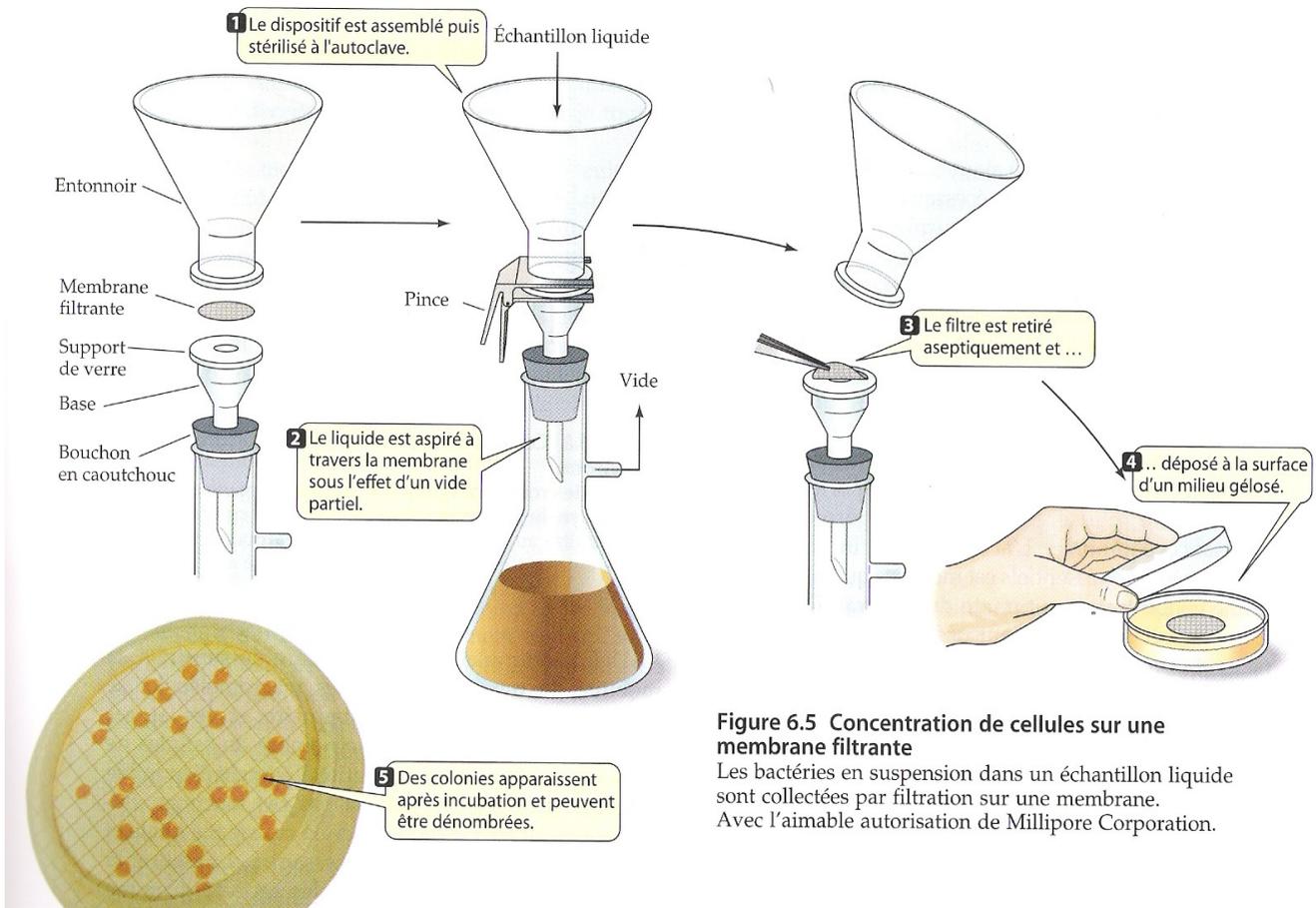


Figure 6.5 Concentration de cellules sur une membrane filtrante

Les bactéries en suspension dans un échantillon liquide sont collectées par filtration sur une membrane. Avec l'aimable autorisation de Millipore Corporation.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

1.4. DÉNOMBREMENT EN MILIEU LIQUIDE

1.4.1. PRINCIPE GÉNÉRAL DU DÉNOMBREMENT EN MILIEU LIQUIDE

On ne peut pas compter de colonies dans un milieu liquide.
La seule manière de savoir si un micro-organisme est présent ou non dans l'inoculum est de **mettre en évidence un de ses caractères** (fermentation d'un glucide par exemple par virage d'un indicateur coloré de pH), **et/ou par le trouble du milieu**.

Un tube stérile estensemencé avec un volume déterminé d'inoculum (produit pur ou dilution), et on observe, après incubation, si le caractère recherché est apparu ou non :

– **Résultats + :**

.....

.....

.....

.....

– **Résultats - :**

.....

.....

.....

.....

1.4.2. EXEMPLES ET INTERPRÉTATIONS

Dans les dénombrement en milieux liquides à un seul essai par dilution, le résultat final est en général un ensemble de valeurs comprises entre le résultat positif et le résultat négatif.

Cela entraîne une forte incertitude et une interprétation prudente.

Exemple n°1 :

1 mL de la dilution...	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Résultat	+	+	+	+	-

Conclusion :

Exemple n°2 :

1 mL de la dilution...	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Résultat	+	+	+	+	+

Conclusion :

Exemple n°3 :

1 mL de la dilution...	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Résultat	-	-	-	-	-

Conclusion :

Pour améliorer la précision des résultats, on peut utiliser plusieurs tubes par dilution réalisée.

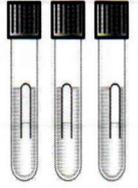
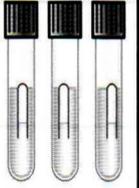
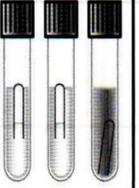
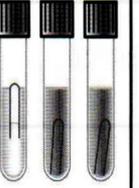
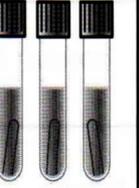
1.4.3. UTILISATION DE PLUSIEURS TUBES PAR DILUTION : MÉTHODE DU NOMBRE LE PLUS PROBABLE (NPP)

La méthode du nombre le plus probable (NPP) utilise 3 (ou 5) essais par dilution.

L'interprétation consiste à comparer les les 3 essais d'une dilution et leurs résultats.

Il s'agit d'une interprétation probabiliste :

- 1) Après incubation des tubes, noter pour chaque essai si le résultat est + ou -.
- 2) À chaque dilution, affecter un chiffre égal au nombre de tubes ayant un résultat +.

Exemple : Dénombrement des Coliformes en BLBVB + cloche à 30 °C Tube + = tube présentant de la culture et du gaz					
Dilutions	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Groupement des résultats	+++	+++	++-	+--	---
Nombre correspondant	3	3	2	1	0

- 3) Grouper en nombre de 3 chiffres la suite des chiffres obtenu, en commençant par le chiffre obtenu pour la plus faible dilution.
Dans l'exemple :
- 4) Choisir le nombre le plus grand possible, et si possible inférieur à 330 (cela correspond à une meilleure répartition dans les dilutions).
- 5) Lire la valeur correspondante n dans la table suivante :

Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilution retenus			NPP	Limites de confiance				Catégories *	
3 tubes 1 mL	3 tubes 0,1 mL	3 tubes 0,01 mL		à 95%		à 99%		1	2
0	0	0	<0,3						
0	0	1	0,3	<0,1	1,7	<0,1	2,3		
0	1	0	0,3	<0,1	1,7	<0,1	2,3		X
0	2	0	0,6	0,2	2,3	0,1	2,9		
1	0	0	0,4	0,1	2,1	<0,1	2,8	X	
1	0	1	0,7	0,2	2,7	0,1	3,5		X
1	1	0	0,7	0,2	2,8	0,1	3,6	X	
1	1	1	1,1	0,4	3,4	0,2	4,3		
1	2	0	1,1	0,4	3,5	0,2	4,4		X
1	2	1	1,5	0,6	4,1	0,4	5,1		
1	3	0	1,6	0,6	4,2	0,4	5,2		
2	0	0	0,9	0,2	3,8	0,1	5,0	X	
2	0	1	1,4	0,5	4,8	0,3	6,2		X
2	1	0	1,5	0,5	5,0	0,3	6,5	X	
2	1	1	2,0	0,8	6,1	0,5	7,7		X
2	2	0	2,1	0,8	6,3	0,5	8,0	X	
2	2	1	2,8	1,1	7,5	0,7	9,3		
2	3	0	2,9	1,2	7,8	0,8	9,7		
3	0	0	2,3	0,7	12,9	0,4	17,7	X	
3	0	1	4	1	18	1	23	X	
3	0	2	6	2	23	1	29		
3	1	0	4	2	21	1	29	X	
3	1	1	7	2	28	2	37	X	
3	1	2	12	4	35	2	45		
3	2	0	9	3	39	2	52	X	
3	2	1	15	5	51	3	65	X	
3	2	2	21	8	64	5	82		X
3	2	3	29	12	80	8	99		
3	3	0	20	10	140	<10	190	X	
3	3	1	50	20	240	10	320	X	
3	3	2	110	30	480	20	640	X	
3	3	3	>110					X	

J.C. de Man European J Appl. Microbiol. 1,67 - 78 (1975)

(*) catégorie 1 : combinaisons de tubes les plus fréquentes correspondant à 95% des cas
catégorie 2 : combinaisons de tubes moins fréquentes que celles de la catégorie 1 et correspondant à seulement 4% des cas (dans 99% des cas la combinaison obtenue appartiendra donc à la catégorie 1 ou 2)
L'obtention de combinaisons hors catégorie doit inciter à considérer le résultat avec circonspection. En effet un tel résultat peut être dû soit à une erreur, soit à une imperfection de la technique; soit encore à la présence d'une substance bactériostatique dans l'échantillon.

6) En déduire la concentration concentration C_N (micro-organismes ; suspension) :

Dans l'exemple :

2. MESURE DE LA BIOMASSE

2.1. DÉTERMINATION DE LA MASSE SÈCHE

.....

.....

.....

.....

.....

2.2. MESURE DU TROUBLE : PHOTOMÉTRIE DES MILIEUX TROUBLES

Les **suspensions cellulaires** et les **solutions colloïdales** (avec des particules) présentent des interactions complexes avec la lumière, conduisant à la vision d'un **trouble**.

Chaque particule en suspension se comporte comme une source secondaire de lumière : c'est la **diffusion**. L'étude de cette diffusion et les applications analytiques constituent la **photométrie des milieux troubles**.

La photométrie des milieux troubles regroupent trois méthodes :

-
-
-

2.2.1. INTERACTIONS DE LA LUMIÈRE AVEC LES MILIEUX TROUBLES

Lorsqu'un faisceau lumineux rencontre un milieu trouble, une partie de la lumière est **transmise** tandis qu'une partie est **diffusée** par les particules en suspension.

2.2.2. PRINCIPE DES MÉTHODES PHOTOMÉTRIQUES EN MILIEUX TROUBLES

2.2.2.1. LA TURBIDIMÉTRIE

.....

.....

Cette méthode n'est plus employée, mais le terme est parfois encore utilisé pour désigner des méthodes opacimétriques.

2.2.2.2. L'OPACIMÉTRIE

.....
.....
.....

On utilise cette méthode pour **déterminer la concentration cellulaire** d'une suspension de micro-organismes.

Dans certaines conditions, il existe une relation de proportionnalité entre l'atténuation D_λ , mesurée à une longueur d'onde λ , et la concentration en nombre de cellules de la suspension :

Les conditions de cette proportionnalité sont :

-
-
-

.....
.....

2.2.2.3. LA NÉPHÉLÉMÉTRIE

.....
.....

La néphélémétrie est une méthode de mesure extrêmement sensible, mais de mise en œuvre délicate.

2.2.3. BILAN

3. MÉTHODES INDIRECTES DE DÉNOMBREMENT

3.1. DOSAGE DE CONSTITUANTS CELLULAIRES : EXEMPLE DE L'ATP-MÉTRIE

Le constituant cellulaire idéal devrait être présent à concentration à peu près constante dans toutes les cellules et disparaître rapidement après leur mort.

Les mesures les plus généralement effectuées sont celles de l'ATP, des protéines, de l'ARN et de l'ADN. On peut également doser certaines enzymes, telles les phosphatases.

L'ATP étant une molécule présente dans toutes les cellules vivantes, il est un **indicateur de la présence d'organismes vivants**.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Les photons sont dénombrés par des **luminomètres** dont les photomultiplicateurs **très sensibles** permettent de **doser jusqu'à 10^{-13} g.L⁻¹ d'ATP** soit **environ 200 bactéries**.

Il s'agit donc d'une méthode beaucoup plus sensible que le dosage fluorimétrique de l'ATP dont le seuil est de l'ordre du $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Notons que la teneur en ATP d'un micro-organisme dépend de l'état physiologique et de l'espèce et que la concentration d'ATP ne peut fournir qu'un ordre de grandeur pour une population mixte.

3.2. DOSAGE DE CONSTITUANTS DU MILIEU DE CULTURE

.....

.....

.....

.....

3.3. IMPÉDANCEMÉTRIE

Principe du Bactometer de BioMérieux

L'automate Bactometer est composé d'un BPU (Bactometer Processing Unit), d'un ordinateur et d'une imprimante.

L'analyse des échantillons est réalisée dans des modules dont le BPU assure simultanément l'incubation et la lecture (toutes les 6 minutes). L'ordinateur effectue un contrôle permanent des opérations en cours, un traitement et une interprétation des résultats, ainsi que la sauvegarde et la transmission de ceux-ci. Le terminal assure une visualisation rapide de l'ensemble des résultats à tout moment.

Évolutif, Bactometer permet de traiter de 1 à 512 échantillons simultanément.



Le module Bactometer

Les modules sont des cellules de mesure stériles à usage unique. Ils sont composés de 16 cuvettes indépendantes au fond desquelles sont fixées les électrodes de mesure. Ces modules sont utilisés avec des milieux de culture spécialement conçus pour la détection des micro-organismes par impédancemétrie.

L'impédancemétrie est le principe du test Bactometer : les molécules du milieu de culture (protéines, hydrates de carbone...) électriquement neutres ou faiblement ionisées, sont transformées, sous l'action des micro-organismes, en plusieurs molécules de mobilité et de charge électrique plus élevées (acides aminés, lactate...). Ces modifications peuvent être mesurées entre deux électrodes plongées dans le milieu de culture.

L'impédancemétrie permet de détecter de faibles variations électriques et de déceler la présence de micro-organismes bien avant qu'une colonie ne soit visible en culture.

3.4. MODIFICATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DU MILIEU

3.4.1. MODIFICATION DE pH

3.4.2. MODIFICATION DU POTENTIEL RÉDOX

.....

.....

On peut l'évaluer grâce à des indicateurs redox tels le **bleu de méthylène**. Le temps nécessaire au virage de l'indicateur est inversement proportionnel au nombre de micro-organismes présents (méthode peu sensible).

3.4.3. PRODUCTION DE CHALEUR

.....

.....

.....

.....

.....