

DÉNOMBREMENT DE MICROORGANISMES

EXERCICES D'APPLICATION

EXERCICE N°1 : Dénombrement par DEFT

Un laboratoire mesure la flore totale d'une eau destinée à l'industrie électronique par technique DEFT. 10 litres sont filtrés. La surface de filtration est de 3,2 cm².

On observe le filtre sous fluorescence et on compte 15 cellules isolées (fluorescence rouge, morphologie bacillaire) pour 45 champs observés.

Le diamètre d'un champ microscopique est de 0,185 mm.

Calculer la concentration en nombre de cellules de l'eau analysée.

EXERCICE N°2 : Dénombrement de coliformes

Les **coliformes** sont des **entérobactéries fermentant le lactose avec production de gaz à 30°C**.

Les coliformes sont recherchés en microbiologie alimentaire car ils sont le témoin d'une contamination fécale des aliments.

On procède au dénombrement dans la masse des coliformes dans une crème glacée à l'aide d'une gélose au désoxycholate.

La suspension de départ est préparée en incorporant 10 mL de crème dans 90 mL d'eau stérile puis des dilutions en séries sont réalisées et les boîtesensemencées avec 1 mL de dilution.

La composition qualitative de la gélose au désoxycholate est la suivante :

- Peptone
- Lactose
- Citrate de sodium
- Citrate de Fer
- Désoxycholate
- Rouge neutre
- NaCl (5 g.L⁻¹)
- Hydrogénophosphate de sodium
- Agar

Q1. Justifier l'utilisation de ce milieu et préciser l'aspect des colonies de coliformes.

On compte respectivement 120 et 132 colonies pour la dilution 10⁻², 8 et 14 pour la dilution 10⁻³.

Q2. Déterminer le nombre de coliformes par mL de crème.

La même suspension est utilisée pour faire un dénombrement en milieu liquide. On ensemence des bouillons lactosés biliés au vert brillant (+ cloche) avec 1 mL des diverses dilutions (3 tubes par dilution).

La composition qualitative des bouillons BLBVB est la suivante :

- Peptone
- Lactose
- Bile
- Vert brillant

Q3. Justifier l'utilisation de ce milieu et préciser l'aspect d'un tube positif (ensemencé avec au moins un coliforme).

Les résultats obtenus sont les suivants :

Dilution	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Résultat	+++	+++	--+	++-

Q4. Déterminer le nombre de coliformes par mL de crème. Comparer le résultat avec celui de la question 2.

Table de Mac Grady

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						

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.