

TP MGF : ÉTUDE COMPARATIVE DE MÉTHODES DE DÉNOMBREMENT DE LEVURES

1. BUTS

On cherche à **déterminer la concentration en nombre de levures de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) d'une suspension** par comptage d'unités formant colonies (UFC) sur milieu solide.

On étudie également la **correspondance entre le trouble dû à la biomasse (atténuation à $\lambda = 600$ nm) et la concentration en nombre de levures.**

2. MÉTHODES

2.1. DÉNOMBREMENT DES LEVURES EN LAME DE KOVA

À partir de la suspension de levures à disposition :

- En tube à hémolyse, réaliser une dilution $d = \frac{1}{4}$ avec du bleu de Funk, pour un volume total de 1 mL.
- Réaliser un dénombrement des levures viables en lame de Kova sur 9 petits carrés (1 case).

2.2. DÉNOMBREMENT DES LEVURES EN MILIEU SOLIDE

À partir de la suspension de levures à disposition :

- Réaliser des dilutions en série au $1/10^{\text{ème}}$ de la suspension de levures (10^{-1} à 10^{-6}).
- Réaliser une numération en milieu solide sur **3 dilutions successives choisies d'après les résultats du comptage en lame de Kova**, en choisissant un des deux protocoles suivants :
 - **Dénombrement en surface :**
 - Couler 20 mL de gélose Sabouraud stérile en surfusion dans 6 boîtes de Pétri et laisser solidifier.
 - Déposer **0,1 mL** de chaque dilution choisie sur une gélose et répartir soigneusement (2 essais par dilution préalablement choisie).
 - **Dénombrement dans la masse :**
 - Déposer **1 mL** de chaque dilution choisie dans une boîte de Pétri vide et stérile (2 essais par dilution préalablement choisie).
 - Ajouter 20 mL de gélose Sabouraud stérile en surfusion dans chaque boîte de Pétri.
 - Agiter soigneusement et délicatement.
 - Laisser solidifier.
- Incuber à l'étuve pendant 48 heures à 30°C.

Composition de la gélose Sabouraud (pour 1 L de milieu) :

- Peptone pepsique de viande	10,0 g
- Glucose	20,0 g
- Chloramphénicol	0,5 g
- Agar	15,0 g
<i>pH</i> du milieu à 25°C : 5,7 ± 0,2	

2.3. OPACIMÉTRIE

À partir de la suspension de levures à disposition :

- Réaliser, à l'aide de micropipettes, des dilutions de la suspension en eau physiologique stérile dans des tubes à essai selon le tableau suivant. **On veillera à agiter soigneusement la suspension mère.**

N° tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Suspension mère, en mL	5	4	3,5	3	2,5	2	1,5	1	0,5	0,4	0,2	0,1
Eau physiologique stérile, en mL	0	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	4,6	4,8	4,9

- Bien agiter avant tout prélèvement.
→ Mesurer l'atténuation à $\lambda = 600 \text{ nm}$ (D_{600}) pour chaque dilution.
Réaliser le témoin de compensation avec de l'eau physiologique stérile dans les mêmes conditions de mesure.

Remarques :

- Toutes les mesures doivent être faites sur le même spectrophotomètre.
- Ne transvaser les dilutions dans les cuves qu'au moment de faire la lecture : les levures sédimentent rapidement et attendre le même temps entre l'agitation et la lecture.
- Réaliser les transvasements de culture à l'aide d'une pipette Pasteur et couvrir les cuves de parafilm.
- Ne pas poser de cuves sur les appareils.
- Élimination des déchets : jeter l'ensemble « cuve + parafilm » dans un sac autoclavable ou un bain d'eau de Javel.

**TP MGF : ÉTUDE COMPARATIVE DE MÉTHODES
DE DÉNOMBREMENT DE LEVURES****COMPTE RENDU****NOM** :**PRÉNOM** :**1. DÉNOMBREMENT DES LEVURES EN LAME DE KOVA****Q1.** Résultats bruts :

Petits Carrés	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total
Cellules mortes (bleues)										
Cellules viables (blanches)										

Q2. Déterminer C_N (levures viables ; suspension mère) (raisonnement et équation aux grandeurs exigés) :**Q3.** Calculer C_N (levures viables ; suspension mère).

2. DÉNOMBREMENT DES LEVURES EN MILIEU SOLIDE

Q4. Justifier le choix du milieu utilisé.

Q5. Expliquer le choix des dilutions utilisées pour l'ensemencement des milieux.

Q6. Compléter le tableau de résultats :

	Dilution	Dilution	Dilution
Boîte n°1			
Boîte n°2			

Q7. Déterminer C_N (UFC ; suspension mère) (équations aux grandeurs et aux valeurs exigées).

3. OPACIMÉTRIE

Q8. Rappeler par un schéma le principe de la mesure opacimétrique.

Q9. Compléter le tableau de résultats :

N° tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Suspension mère, en mL	5	4	3,5	3	2,5	2	1,5	1	0,5	0,4	0,2	0,1
Eau physiologique stérile, en mL	0	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	4,6	4,8	4,9
Dilution, notée d												
Atténuation D_{600}												

Q10. Tracer la représentation graphique $D_{600} = f(d)$.

Q11. Commenter l'allure de la représentation graphique et déterminer les limites de linéarité.

Q12. Déterminer le coefficient directeur k de la partie linéaire, puis donner l'équation de droite correspondante.

On appelle **coefficient de correspondance** entre C_N (levures viables ; suspension mère) (évaluée par comptage en lame de Kova) et D_{600} , la valeur α telle que :

$$C_N \text{ (levures viables ; suspension mère)} = \alpha \cdot D_{600}$$

Q13. Déterminer α , exprimé en levures viables·mL⁻¹·unité de D_{600} ⁻¹.

On appelle **coefficient de correspondance** entre $C_{N(\text{UFC ; suspension mère})}$ et D_{600} , la valeur α' telle que :

$$C_{N(\text{UFC ; suspension mère})} = \alpha' \cdot D_{600}$$

Q14. Déterminer α' , exprimé en $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{unité de } D_{600}^{-1}$.

**TP MGF : ÉTUDE COMPARATIVE DE MÉTHODES
DE DÉNOMBREMENT DE LEVURES**

DOSSIER SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

Fiche n°1 : Dénombrement en milieu solide

FICHE N°1 : DÉNOMBREMENT EN MILIEU SOLIDE

1. PRINCIPE GÉNÉRAL DU DÉNOMBREMENT EN MILIEU SOLIDE

Le principe de dénombrement en milieu solide est simple :

On compte les colonies issues de micro-organismes de l'inoculum placé dans ou sur une gélose appropriée.

On considère grossièrement qu'une colonie obtenue dans ou sur la gélose est issue d'un micro-organisme présent dans l'inoculum.

En pratique, on exprime le résultat du dénombrement en **Unité Formant Colonie (UFC) par g ou mL ou cm² de produit initial**, exprimé **en puissance de 10 et avec deux chiffres significatifs**.

On considère que dans une gélose on peut compter, pour des raisons statistiques et pratiques, que les boîtes **contenant entre 15 et 300 colonies**.

Il est donc nécessaire de procéder à des dilutions du produit de départ pour pouvoir réaliser le dénombrement.

Les deux principales techniques de dénombrement en milieu solide sont :

- **le dénombrement en surface.**
- **Le dénombrement en masse.**

2. TECHNIQUES DE DÉNOMBREMENT EN MILIEU SOLIDE

Ces techniques nécessitent au préalable des dilutions successives du produit initial à analyser.

DÉNOMBREMENT EN SURFACE	DÉNOMBREMENT EN MASSE
<ul style="list-style-type: none"> → Homogénéiser les tubes de suspension mère et de dilution. → Transférer aseptiquement, en double essai, 0,1 mL des dilutions choisies à la surface de chacune des boîtes de gélose coulée et séchée. → Étaler l'inoculum à la surface de la gélose à l'aide d'une pipette « rateau », ou de billes de verres stériles agitées énergiquement (mouvements de translation et de rotation) puis éliminées. → Laisser sécher 15 minutes à température ambiante. → Incuber, boîtes renversées. 	<ul style="list-style-type: none"> → Homogénéiser les tubes de suspension mère et de dilution. → Transférer aseptiquement, en double essai, 1 mL des dilutions choisies dans le fond de chacune des boîtes de Pétri. → Couler, dans la zone d'asepsie, 15 mL de milieu maintenu en surfusion dans chaque boîte de Pétri. → Mélanger l'inoculum déposé et le milieu coulé, par rotation délicate dans les deux sens. → Laisser le milieu prendre en masse : boîtes sur une surface plane, non chaude, dans la zone d'asepsie, le couvercle légèrement déplacé. → Une fois le milieu pris en masse, incuber, boîtes renversées.

3. RÉSULTATS

Seules les boîtes contenant de **15 à 300 colonies**, issues de deux dilutions successives, sont dénombrées avec précision.

Les autres boîtes sont examinées pour vérifier la cohérence de la manipulation :

- **cohérence inter-dilution** : on vérifie à l'œil nu si la densité entre les boîtes de dilutions différentes respecte bien le facteur de dilution.
- **cohérence intra-dilution** : le dénombrement entre les deux boîtes d'une même dilution doit être semblable.

Après avoir effectué le dénombrement sur les boîtes comptables, on applique la formule de calcul de la norme AFNOR / ISO 7218 :

$$C_{N(\text{micro-organismes; produit analysé})} = \frac{\Sigma c}{(n_1 + 0,1 n_2) \times d} \times \frac{1}{V_{\text{inoculum}}} \times \frac{V_{\text{suspension mère}}}{m_{\text{produit analysé}} \text{ ou } V_{\text{produit analysé}} \text{ ou } S_{\text{produit analysé}}}$$

Avec : - $C_{N(\text{micro-organismes ; produit analysé})}$: concentration en micro-organismes, en UFC.g⁻¹, ou UFC.mL⁻¹, ou UFC.cm⁻² de produit analysé.

- Σc : nombre total de colonies comptées sur les boîtes retenues.
- n_1 : nombre de boîtes comptées à la dilution retenue la plus faible.
- n_2 : nombre de boîtes comptées à la seconde dilution retenue.
- d : dilution à partir duquel les premiers comptages sont réalisés : dilution la plus faible.
- V_{inoculum} : volume de l'inoculum, en mL (1 mL ou 0,1 mL selon la technique réalisée).
- $V_{\text{suspension mère}}$: volume de la suspension mère du produit, en mL.
- $m_{\text{produit analysé}}$, ou $V_{\text{produit analysé}}$, ou $S_{\text{produit analysé}}$: masse (g), volume (mL) ou surface (cm²) de produit analysé ayant constitué la solution mère.

Le résultat $C_{N(\text{micro-organismes ; produit analysé})}$ est exprimé en puissance de 10 avec deux chiffres significatifs.

Cas particuliers : estimation des petits nombres

- Aucune colonie apparue même à la plus petite dilution d :
Exprimer le résultat comme suit : « moins de x micro-organismes par g ou par mL.. ».
- Aucune boîte ne contient au moins 15 colonies :
Faire la moyenne arithmétique des colonies comptées sur les 2 boîtes de la plus petite dilution d et tenir compte de cette dilution.
Bien préciser dans l'expression du résultat qu'il s'agit alors d'une estimation en rédigeant ainsi :
« nombre estimé de micro-organismes par mL = ... »

Les tableaux ci-après peuvent aussi être utilisés :

Dénombrement à partir de 2 boîtes de Pétri					
Nombre total de colonies comptées sur 2 boîtes	Nombre de micro-organismes	Limite de confiance à 95%		Erreur en % par rapport à la limite	
		basse	haute	basse	haute
1	1	<1	3	-97	+457
2	1	<1	4	-88	+261
3	2	<1	4	-79	+192
4	2	1	5	-73	+156
5	2	1	6	-68	+133
6	3	1	6	-63	+118
7	4	2	7	-60	+106
8	4	2	8	-57	+97
9	4	2	9	-54	+90
10	5	2	9	-52	+84
11	6	3	10	-50	+79
12	6	3	10	-48	+75
13	6	3	11	-47	+71
14	7	4	12	-45	+68
15	8	4	12	-44	+65
16	8	5	13	-43	+62
17	8	5	14	-42	+60
18	9	5	14	-41	+58
19	10	6	15	-40	+56
20	10	6	15	-39	+54
21	10	6	16	-38	+53
22	11	7	17	-37	+51
23	12	7	17	-36	+50
24	12	8	18	-36	+49
25	12	8	18	-35	+48
26	13	8	19	-35	+47
27	14	9	20	-34	+46
28	14	9	20	-34	+45
29	14	9	21	-33	+44
30	15	10	21	-32	+43

Dénombrement à partir d'une seule boîte de Pétri				
Nombre de colonies comptées	Limite de confiance à 95%		Erreur en % par rapport à la limite	
	basse	haute	basse	haute
1	<1	6	-97	+457
2	<1	7	-88	+261
3	<1	9	-79	+192
4	1	10	-73	+156
5	2	12	-68	+133
6	2	13	-63	+118
7	3	14	-60	+106
8	3	16	-57	+97
9	4	17	-54	+90
10	5	18	-52	+84
11	6	20	-50	+79
12	6	21	-48	+75
13	7	22	-47	+71
14	8	24	-45	+68
15	8	25	-44	+65