**CHAPITRE 4 : Techniques de numération des microorganismes**

La densité microbienne d’un produit peut s’exprimer par le nombre de microorganismes présents par ml ou par gramme.

Il existe de nombreuses techniques de numération :

Les techniques ***directes*** qui s’appliquent aux cellules microbiennes ; Les techniques ***indirectes*** qui s’appliquent aux cultures.

Dans les deux cas, la concentration cellulaire de l’échantillon doit être adéquate, dont il pourra être nécessaire d’effectuer des dilutions (si la concentration est trop forte) ou une concentration (si la concentration est trop faible).

# Numération microscopique

Cette technique est couramment utilisée avec les **levures**, mais elle est plus laborieuse avec les bactéries compte tenu de leur faible taille.

## 1.1.Comptage à l’hématimètre

On utilise une cellule de numération hématimétrique : cellule de Thomas ou Malassez. La cellule de Thomas par exemple est constituée d’une lame de verre épais portant à sa partie supérieure un réseau de lignes gravées perpendiculairement (Figure 01) et qui délimitent 400 carrés de 1/20e mm (0,05 mm) de côté (Figure 02). Une goutte de suspension est placée sur la lame et recouverte d’une lamelle spéciale, qui repose sur deux renflements de la lame, ce qui délimite au-dessus du réseau un espace de 0,1 mm (la profondeur). L’examen s’effectue au grossissement (× 40).



## Figure 01 : Schéma d'une cellule à numération avec deux quadrillages



**Figure 02 : Représentation du quadrillage de la cellule de Thomas**

Le nombre de cellules **n** est compté dans **p** carrés (généralement 100) :

## n= (n1+ n2+ n3+ n4+ …… ni+ np)/p

**n:** moyenne générale des nombres de cellules comptées dans p carrés.

Le volume au-dessus de chaque petit carré est 0,25. 10-6 ml n présent dans 0,25 . 10-6 ml

N est le nombre des cellules présentes dans 1 ml, donc :

## N= n/ 0,25 . 10-6 ml

Le nombre de cellules /ml de la suspension est donc :

## N= 4. 106 n

Si on a utilisé une dilution d : **N= (4. 106 n) / d**

Cette méthode est applicable pour les levures et les spores fongiques, mais imprécise à cause de la difficulté d’évaluer les amas. Dans le cas des bactéries, l’utilisation de l’hématimètre exige des plaques spéciales de faible profondeur car les bactéries sont très petites et sont souvent mobiles.

Pour cette méthode, toutes les cellules sont dénombrées quel que soit leur état physiologique.

En traitant l’échantillon par le bleu de méthylène (colorant vital), il est possible de déterminer le % des cellules viables qui se colorent plus faiblement que les autres.

L’utilisation des colorants fluorescents (acridine, fluorescéine, primuline) est aussi envisagée, mais elle nécessite l’utilisation d’un microscope spécial (microscope à épifluorescence).

La numération peut être rendue sélective en utilisant un anticorps fluorescent spécifique d’une population donnée (un micro-organisme précis).

## 1.2.Numération sur frottis : technique de Breed

Cette technique rapide est utilisée pour l’analyse du lait et ses dérivés. La technique consiste à :

* + - Étaler 0,01ml (10μl) de la suspension, prélevé par une micropipette, sur une lame à l’aide d’une anse sur une surface de 1cm2 (délimitée au marqueur sur l’envers de la lame) ;
		- Fixer le frottis par passages répétés sur la flamme du bec Bunsen, puis le refroidir ;
		- Colorer le frottis pendant 30 secondes par le bleu de méthylène, ou bien par la méthode de Gram ou en utilisant des colorants fluorescents ;
		- Laver à l’eau et sécher le frottis ;
		- Examiner au microscope à l’immersion (en utilisant l’huile de cèdre) au grossissement x100;
		- Compter le nombre de microorganismes dans 10 à 20 champs microscopiques, et faire la moyenne n.

**Le nombre de microorganismes/ ml = n × fm**

**fm :** facteur de multiplication, **fm= 4000/ (3,14 . 16 . d2)**

**d :** dilution utilisée

## 1.3.Numération microscopique directe après filtration

Cette technique est utilisable dans le cas des produits liquides (en brasserie). Le comptage est réalisé après filtration sur membrane du produit, coloration et observation microscopique. Cette technique est rapide (10 à 20 minutes) et sensible (détecter moins de 104 microorganismes / ml).

La détection peut se faire de deux manières :

* Au microscope optique après coloration au bleu de méthylène ou par un mélange fuschine /bleu de méthylène.
* Sous la lumière UV au microscope à fluorescence après coloration à l’aide de colorants fluorescents (fluorescéine, euchrisine, primuline, auramine, acridine orange ou acriflavine) ce qui permet de distinguer entre les cellules mortes et les cellules vivantes. L’observation est faite en utilisant une huile à immersion non fluorescente. Deux combinaisons peuvent être distinguées dans ce cas :

Acridine-ARN émission d’une fluorescence jaune-orangée. Acridine-ADN émission d’une fluorescence verte.

Donc les cellules vivantes se colorent en jaune-orangé puisque elles ont un rapport ARN/ADN élevé, alors que les cellules mortes sont vertes.

On peut réaliser des numérations spécifiques en utilisant des anticorps portant un fluorochrome.

## 1.4.Numération microscopique après culture

Cette numération se fait à partir des cultures sous différentes formes :

## Culture sur lame

Cette technique est utilisée dans l’analyse du lait où une lame est couverte d’une mince couche de gélose nutritive, ensemencée (par 20 à 25 μl/cm2) et incubée en atmosphère humide (boite de Pétri contenant quelques ml d’eau distillée stérile). La lecture se fait à partir de 5 heures d’incubation en examinant au microscope les micro-cultures sur lame.

## Culture sur membrane filtrante

Elle est utilisée pour la numération microbienne à partir des milieux liquides ou pour le contrôle de la contamination de surface de produits solides.

Dans le cas du contrôle de la contamination de surface de produits solides, on distingue deux méthodes :

### Méthode 1 :

* Prélèvement par écouvillonnage, et la suspension est préparée en utilisant un diluant ;
* Filtration de la suspension et la membrane sera déposée à la surface d’un milieu gélosé, et incubée pendant 4 à 6 heures. La numération microscopique se fait directement.

### Méthode 2 :

Le produit est plongé dans une solution stérile (tryptone-sel) et soumis à une agitation pour mettre les microorganismes en suspension ; le liquide est ensuite filtré et la membrane est déposée à la surface d’un milieu gélosé. La numération se fait après 4 à 6 heures d’incubation.

# Numération après culture en milieu solide

## 2.1.Principe

Cette méthode est basée sur le fait qu’une cellule placée sur un milieu solide favorable, donnera naissance à une colonie macroscopiquement visible. Elle ne permet pas de distinguer une cellule d’un amas cellulaire. Pour cette raison, les résultats s’expriment en **UFC** (unités formant colonie). Des dilutions décimales sont effectuées au préalable dans de l’eau physiologique stérile ou autre diluant.

Cette technique est longue (préparation du matériel, manipulation et incubation pendant 24 heures ou plus). 24 heures est le temps nécessaire pour que les colonies atteignent une taille permettant leur dénombrement.

## 2.2.Méthodes d’ensemencement

On distingue deux méthodes d’ensemencement en milieu solide :

## Méthode d'inoculation dans la masse

* Marquer les boîtes de Pétri vides (exemple : 100, 10-1, 10-2, 10-3, 10-4, …)
* Homogénéiser les tubes des dilutions.
* À l’aide des pipettes graduées stériles, 1 ml de chaque dilution est transféré sous forme de gouttes dans le fond des boites de Pétri (deux boites par dilution sont généralement ensemencées, parfois une boite).
* Couler 15 ml de milieu gélosé en surfusion (40 à 45°C) dans chaque boîte de Pétri ; cette addition doit avoir lieu au plus tard 15 minutes après le dépôt des gouttes.
* Mélanger l'inoculum au milieu, par un lent mouvement circulaire horizontal.
* Laisser le milieu prendre en masse : les boîtes sont sur une surface plane, non chaude, dans la zone de stérilité, le couvercle légèrement déplacé (ne pas excéder 10 mm).
* Une fois le milieu solidifié, retourner les boîtes et les incuber dans l'étuve à la température convenable pendant le temps indiqué.

***Remarque :*** une seule pipette graduée peut être utilisée, en commençant par la plus forte dilution jusqu’à la plus faible dilution (de 10-4 à 100).

Après incubation, les colonies peuvent se développer en surface : elles ont un aspect normal, et en profondeur : elles ont un aspect lenticulaire.

Cette méthode convient aux micro-organismes aéro-anaérobies. La faible épaisseur du milieu assure une aérobiose acceptable pour la plupart des microorganismes aérobies, mais certains peuvent être gênés. Ces conditions ne conviennent pas aux microorganismes anaérobies stricts.

Les colonies en profondeur sont déformées et ne peuvent pas s’étaler pour faire l’objet d’une autre analyse (examen microscopique).

Le désavantage de cette méthode est que le mélange de l’échantillon avec la gélose fondue (même ramenée à la température la plus basse : 45°C) peut provoquer un choc thermique à certaines bactéries qui ne sont pas habituées à cette température.

## Méthode d’ensemencement en surface

* Marquer les boîtes du milieu gélosé préalablement coulé (100, 10-1, 10-2, 10-3,…)
* Homogénéiser les tubes des dilutions.
* À l'aide d'une pipette stérile, transférer aseptiquement, 0,1 ml de de chaque dilution à la surface du milieu gélosé (deux boites par dilution sont généralement ensemencées, parfois une boite).
* Étaler l'inoculum, avec soin et rapidement, à la surface du milieu gélosé, à l'aide d'un étaleur stérile (un râteau pouvant être une pipette Pasteur repliée au bec Bunsen).
* Laisser sécher 15 minutes à température du laboratoire.
* Incuber les boîtes retournées à l'étuve, à la température convenable, pendant le temps indiqué.

Cette technique est très favorable aux microorganismes aérobies stricts. Cependant, elle manque de précision du fait de l’adhérence de quelques cellules sur le râteau (elle donne des valeurs inférieures à celles obtenues après inoculation dans la masse) ;

## 2.3.Lecture

La lecture se fait par comptage visuel, ou en utilisant un compteur de colonies. Le comptage se fait par un léger marquage au feutre sur la boite.

## 2.4.Choix des essais servant au calcul

Seuls les essais (boîtes inoculées et incubées) comportant de 15 à 300 colonies sont utilisés. En fait, cette règle subit quelques modifications indiquées dans les normes correspondantes, par exemple :

* le dénombrement de la flore aérobie du lait pasteurisé peut se faire à l'aide d'essais présentant de 10 à 300 colonies ;
* le dénombrement des coliformes du lait pasteurisé se fait à l'aide d'essais présentant moins de 150 colonies.

## 2.4.Calcul du nombre de microorganismes par unité d'échantillon

* + - **Cas général**

On considère deux dilutions successives ayant donné au moins une boîte contenant plus de 15 colonies.

On calcule le nombre N de microorganismes présents dans l'unité de mesure de l'échantillon, selon la formule suivante :

∑c : nombre total de colonies comptées sur les boîtes retenues. **n1 :** nombre de boîtes comptées à la dilution retenue la plus faible **n2 :** nombre de boîtes comptées à la seconde dilution retenue.

**d :** facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages sont réalisés : la dilution la plus faible parmi les deux dilutions retenues.

**V :** volume de prise d'essai inoculé en **ml.**

**VSM :** volume de la suspension mère en **ml.**

**Vpr ou mpr ou Spr :** volume de produit (ml) ou masse de produit (g) ou surface de produit (cm2) ayant constitué la suspension mère.

## Cas particuliers

* Si les deux boîtes de la dilution la plus faible ensemencées par 1 ml d'échantillon contiennent moins de 15 colonies, on fait la moyenne arithmétique des colonies comptées. Soit y cette moyenne :

## N = y micro-organismes par ml d'échantillon.

* Si les deux boîtes de la dilution la plus faible ne contiennent aucune colonie, exprimer le résultat par :

## N = moins de 1 micro-organisme par ml d'échantillon.

* + **Autres méthodes de calcul**
* Si les essais contiennent moins de 10 colonies, le résultat exprimé sera : **N < 10.d**

(d étant le facteur de dilution le plus faible) ;

* Si les essais contiennent plus de 300 colonies, on réalise le dénombrement sur la dilution la plus forte et le résultat exprimé sera accompagné de **« nombre estimé » de… .**

## 2.5.Numération après culture sur membrane filtrante

Cette méthode est particulièrement utilisée pour effectuer des dénombrements dans des liquides alimentaires pour lesquels la concentration en micro-organismes recherchés est relativement faible.

## Principe

La prise d'essai est filtrée à travers une membrane retenant les microorganismes ; cette membrane est ensuite déposée sur un milieu de culture permettant le développement des microorganismes recherchés.

## Technique

L'échantillon, souvent de 100 ml, parfois de 10 ml, est filtré sur une membrane permettant la concentration des micro-organismes présents dans l'échantillon. Le filtre membrane est le plus souvent un mélange d'acétate et de nitrate de cellulose, biologiquement inerte, dont le diamètre des pores est de l’ordre de 0,45μm. La dimension de la membrane est adaptée à la dimension de la boîte de Pétri contenant le milieu. La membrane est ensuite déposée en surface d'un milieu gélosé, et le tout est incubé 18 à 24 heures. Les nutriments du milieu traversent la membrane par capillarité et permettent le développement des bactéries. Le dénombrement est facilité par la présence de quadrillage sur la membrane.

## Exploitation des résultats

Seules les membranes comportant au plus 100 colonies sont utilisables : ceci pour des filtres membranes adaptés à des petites boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre.

La formule permettant le calcul du nombre de microorganismes par unité d'échantillon est la suivante :

**n =** nombre de colonies comptées sur la membrane.

**V =** volume en ml de l'échantillon, ou de sa dilution, filtré.

Si une dilution de l'échantillon a été nécessaire, ce résultat sera multiplié par l'inverse du taux de dilution pratiqué.

# Numération après culture en milieu liquide

## 3.1.Principe

Cette méthode est basée sur le fait qu’après ensemencement d’un milieu liquide, toute croissance microbienne indique la présence d’au moins un germe (UFT : unités formant trouble). Le développement peut être indiqué visuellement par simple trouble du milieu ou par virage de couleur d’un indicateur coloré (ou par dégagement de gaz dans une cloche).

## 3.2.Technique

* Effectuer une série de dilutions décimales.
* Répartir le milieu de culture choisi (selon la population à dénombrer) à raison de 10 ml par tube.
* 2, 3 ou 5 tubes sont ensemencés par 1ml de la suspension mère et de chaque dilution.
* Mettre en incubation.
* Lire les résultats : sont comptés positifs les tubes qui présentent une croissance (ou virage d’un indicateur coloré, dégagement de gaz,…), et négatifs les autres.
* Pour chaque série de tubes issus de la même dilution, compter le nombre de tubes positifs :
	+ 0, 1 ou 2 pour les séries de deux tubes;
	+ 0, 1, 2 ou 3 pour les séries de 3 tubes;
	+ 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 pour les séries de 5 tubes;
* Composer alors un nombre caractéristique (NC), formé par les chiffres correspondant à 3 dilutions successives dont la première dilution utilisée étant la plus forte ayant donné un résultat positif pour tous les tubes.
* Se rapporter aux tables de Mac Grady pour déterminer le nombre le plus probable (NPP) dans 1ml de tube ayant servi à ensemencer les tubes de culture correspondant au premier chiffre du nombre caractéristique.
* Le nombre de microorganismes/ ml ou par g de produit est alors :

**NSM :** le nombre de microorganismes/ ml de la suspension mère.

**NPP :** NPP lu sur la table de Mac Grady.

**d :** dilution correspondant au premier chiffre du nombre caractéristique.

**V :** volume de la prise d’essai.

**VSM :** volume de la suspension mère en **ml.**

**Vpr ou mpr :** volume de produit (ml) ou masse de produit (g) ayant constitué la suspension mère.

La formule devient alors :

**3.2.1. Dénombrement à un seul essai**

Dans ce cas, 1 tube par dilution est ensemencé avec 1 ml d’inoculum. Exemple de résultats obtenus (tableau 2) :



- il y a au moins un micro-organisme dans l’inoculum (1 ml) de la plus grande dilution (10-2 ) présentant encore un trouble : la concentration est donc d’au moins 102 micro-organismes par ml de produit ou de « suspension mère » non dilués ;

 - il y a moins de un micro-organisme dans l’inoculum (1 ml) de la première dilution (10-3 ) ne présentant plus de trouble : la concentration est donc strictement inférieure à 103 micro-organismes par ml de produit ou de « suspension mère » non dilués.

Le résultat peut s’exprimer selon l’intervalle : 102 ≤ N micro-organismes/ml < 103 . La concentration du produit analysé est comprise entre 102 et 103 micro-organismes dans 1 ml.

**3.2.2. Dénombrement à essais multiples «technique du nombre le plus probable NPP»**

Cette méthode repose sur une analyse statistique et fournit par calcul des nombres les plus probables (NPP). Ce dénombrement s’effectue en utilisant les tables de Mac Grady, le nombre caractéristique de la série réalisée est une combinaison de trois chiffres :

* Chaque chiffre correspond au nombre de tubes « positifs » pour une dilution donnée ;
* Les trois chiffres correspondent à trois dilutions successives ;
* Le chiffre des centaines correspond à la plus faible dilution (donc à la plus forte concentration en micro-organismes), celui des dizaines à la dilution intermédiaire et celui des unités à la plus grande dilution.

Parmi les différentes combinaisons, celle correspondant au nombre le plus grand et, si possible, inférieur à 330 est retenue (correspond à une meilleure répartition des micro-organismes dans les dilutions).



**Exemple (tableau 3) :**

cinq dilutions ont été ensemencées à raison de trois essais par dilution ; trois combinaisons (de trois chiffres) sont possibles avec les résultats obtenus. Parmi les trois combinaisons de trois chiffres possibles (332 ; 321 ; 210), laquelle choisir ? Le nombre le plus élevé et inférieur à 330 est sélectionné ; dans cet exemple, il s’agit de 321. Si les dilutions sont insuffisantes, on peut utiliser des nombres caractéristiques comme 333, 332 ou 331.

Le nombre caractéristique de la série est reporté dans une table statistique de Mac Grady (tableau 4). On y lit le Nombre le Plus Probable (NPP) de microorganismes présents dans l’inoculum de la dilution correspondant au chiffre des centaines du nombre caractéristique. Exemple : 321 correspond au NPP de 15. Cela signifie qu’il y a statistiquement quinze bactéries dans l’inoculum de la dilution 10-(n+1) . Le résultat est exprimé selon l’équation :



N : nombre de micro-organismes par ml de produit ;

NPP : nombre lu dans la table ;

K : facteur de dilution (inverse de dilution) correspondant au chiffre des centaines du nombre caractéristique (combinaison retenue) ;

V : volume de l’inoculum (1ml en général).

Si le produit analysé est solide, on prépare une « suspension mère » de produit en introduisant « x » g de produit dans « 9 x » ml de diluant. Cela correspond à une dilution au 1/10 du produit. Le nombre de microorganismes par g de produit analysé est donc N x 10.

D’autres méthodes préconisent le nombre caractéristique le plus faible portant de préférence «0» dans la colonne des unités (par exemple dans ce cas 210).



## 3.3.Choix du nombre caractéristique

Quand il y a plus de trois dilutions (5 séries de 3 tubes dans le tableau ci-après), le nombre caractéristique doit être choisi selon les règles suivantes :

1. Si **toutes** les diluions ont donné un résultat positif pour tous les tubes (3 dans le tableau), on prend les trois dilutions les plus fortes.
2. Si **une** ou **plusieurs** dilutions ont donné un résultat positif pour tous les tubes, on prend la plus forte dilution pour laquelle tous les tubes sont positifs et les deux dilutions suivantes.
3. Si un résultat positif est noté après la dernière dilution, on ajoute la valeur obtenue au dernier chiffre du nombre caractéristique.
4. S'il n'a pas été préparé suffisamment de dilutions au-delà de la dilution la plus forte donnant trois tubes positifs, on choisit alors les trois dilutions les plus fortes.
5. Si chaque dilution présente un résultat positif pour tous les tubes, et les dilutions suivantes donnent un résultat nul, on prend la plus forte dilution ayant donné trois tubes positifs, et les deux précédentes.
6. Si les tubes peu dilués négatifs précédent les tubes positifs (il peut s’agir d’une inhibition due au produit de départ et qui disparaît avec la dilution), on ne tient pas compte alors des tubes négatifs.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Nombre de tubes positifs pour chaquedilution | **NC** |
| **10-1** | **10-2** | **10-3** | **10-4** | **10-5** |
| **(a)** | 3 | 3 | **3** | **3** | **3** | 333 |
| **(b)** | 3 | 3 | **3** | **1** | **0** | 310 |
| 3 | **3** | **2** | **0** | 0 | 320 |
| **3** | **2** | **1** | 0 | 0 | 321 |
| **3** | **0** | **1** | 0 | 0 | 301 |
| **(c)** | 3 | **3** | **2** | **2** | **1** | 323 |
| **3** | **2** | **1** | **1** | 0 | 322 |
| **(d)** | **3** | **3** | **3** | **3** | 1 | 331 |
| **(e)** | 3 | **3** | **3** | **3** | 0 | 333 |
| **(f)** | 0 | 0 | **3** | **3** | **2** | 332 |