

TD 5 : Dénombrement des microorganismes

Le **dénombrement microbien**, ou numération, a pour but de déterminer la concentration en bactérie ou moisissures dans un échantillon + afin de contrôler la qualité des produits. Le dénombrement peut s'effectuer sur différents types de milieux. La numération sur milieu pris en masse peut être réalisée en surface ou dans la masse. La numération sur milieu liquide se fait par incubation de germe dans un milieu qui ne prend pas en masse. Cette technique de d'analyse permet d'avoir en 24 à 72h des résultats exploitable et très utilisé.

I- Recherche et dénombrement des germes revivifiables à 37 °C et à 22 °C (germes totaux) :

Il s'agit d'une technique de numération des microorganismes après incorporation de volumes déterminés d'échantillon ou de ces dilutions dans un milieu gélosé.

• Définition des germes totaux :

Microorganismes revivifiables nommés également mésophile aérobies sont toute bactérie, levure ou moisissure, capable de former des colonies dans un milieu spécifié à des températures optimales de croissance (après 24 h à 37 °C et 72 h à 22 °C). Ce dénombrement est souvent considéré comme accessoire par rapport aux autres dénombrements réalisés dans le contrôle bactériologique des eaux des aliments ou des produits.

• Mode opératoire :

A partir de l'échantillon à analyser, et des dilutions décimales 10^{-1} et 10^{-2} , porter aseptiquement 2 fois 1 ml (20 gouttes par pipette Pasteur) dans deux boites de Pétrie vides, numérotées et préparées à cet usage comme l'indique le schéma.

Compléter ensuite chacune des boites avec environ 20 ml de gélose TGEA fondue puis refroidie à $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Le temps qui s'écoule entre le moment où l'on a distribué l'inoculum dans la boite et celui où le milieu est coulé ne doit pas excéder 15 minutes. Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » sur une surface horizontale pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose. Laisser solidifier les boites sur la paille.

• Incubation :

Les boites seront partagées en deux séries distinctes :

- La première série sera incubée, couvercle en bas à $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pendant 72 ± 3 heures.
- La seconde sera incubée couvercle en bas à $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ pendant $24 \pm 1\text{ °C}$ heures.

• Lecture :

Examiner les boites dès que possible après la période d'incubation, Les germes revivifiables se présentent dans les deux cas sous forme de colonies lenticulaires poussant en masse, ne dénombrer que les boites contenant entre 15 et 300 colonies.

• **Interprétation :**

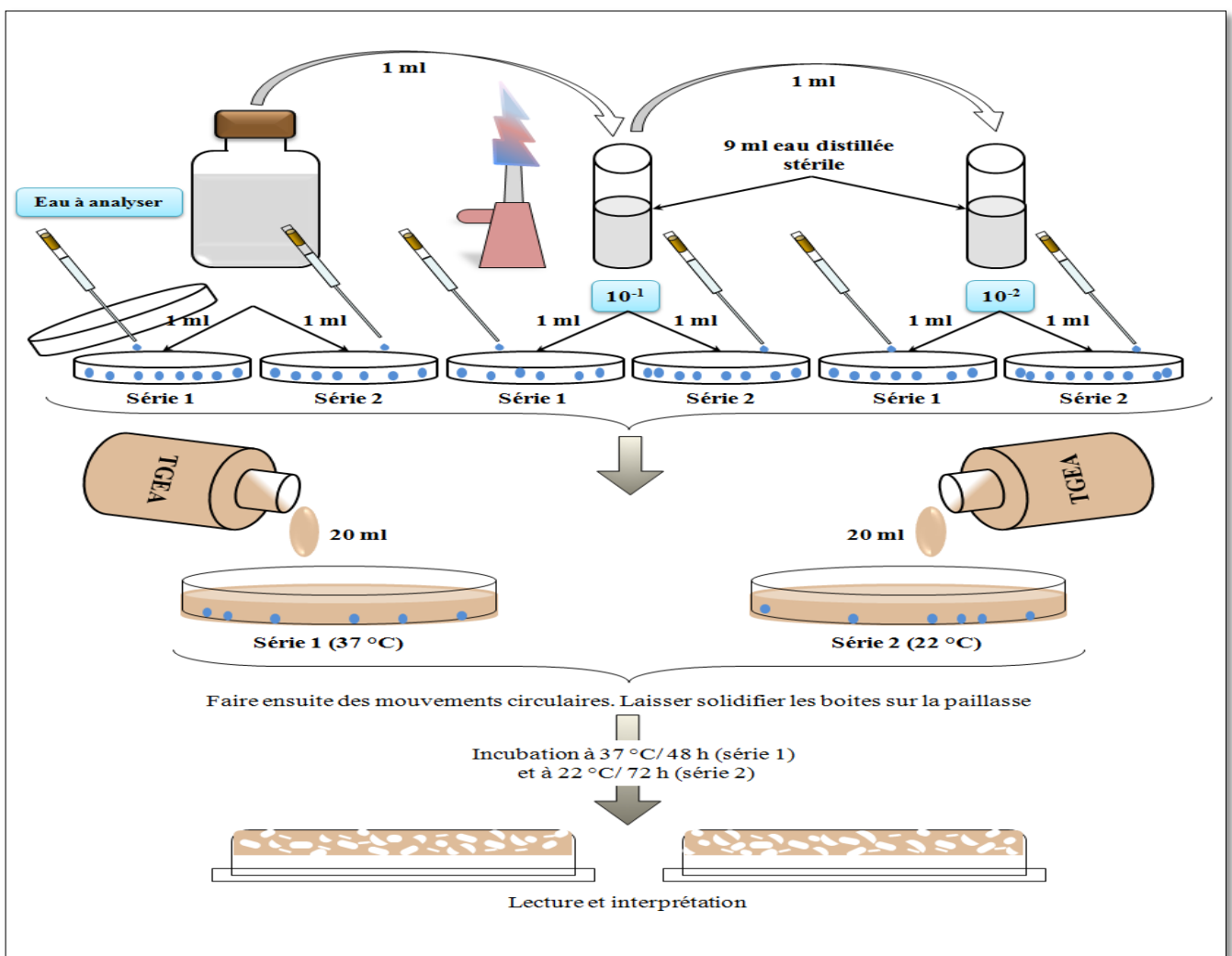
Calculer la valeur du nombre N de microorganismes revivifiabiles à 22 °C ± 2 °C à part et celle du nombre N de microorganismes revivifiabiles à 37 °C ± 2 °C à part, en tenant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum c}{1.1 \times d}$$

Où :

$\sum c$: est la somme des colonies dénombrées sur deux boites de dilutions successives retenues.

d : est le taux de dilution correspondant à la dernière dilution.



II- Recherche et dénombrement des coliformes (indicateurs de contamination fécale)

Les coliformes sont des bacilles à Gram négatifs, aérobies ou anaérobies facultatif, non sporulés, capables de se multiplier en présence de sels biliaires et capables de fermenter le lactose avec production d'acides et de gaz en 24 à 48 heures à une température comprise entre 36 et 37°C.

Le dénombrement des coliformes à 37 °C est souvent désigné sous l'expression de « dénombrement des coliformes totaux ». Les coliformes totaux comprennent entre autres les genres : *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Serratia*. Des membres de ces groupes sont naturellement présents dans l'environnement et sont d'origine fécale, tandis que d'autres se trouvent exclusivement dans l'environnement. Les coliformes totaux sont utilisés comme indicateur de pollution d'origine organique.

- **Mode opératoire :**

La recherche et le dénombrement des coliformes par la méthode du nombre le plus probable (NPP) appelée aussi la colimétrie. Cette méthode est une estimation statistique du nombre de microorganismes supposés distribués dans l'échantillon de manière parfaitement aléatoire. Elle utilise des milieux de culture liquide en tubes à essais inoculés par des échantillons de l'échantillon à analyser.

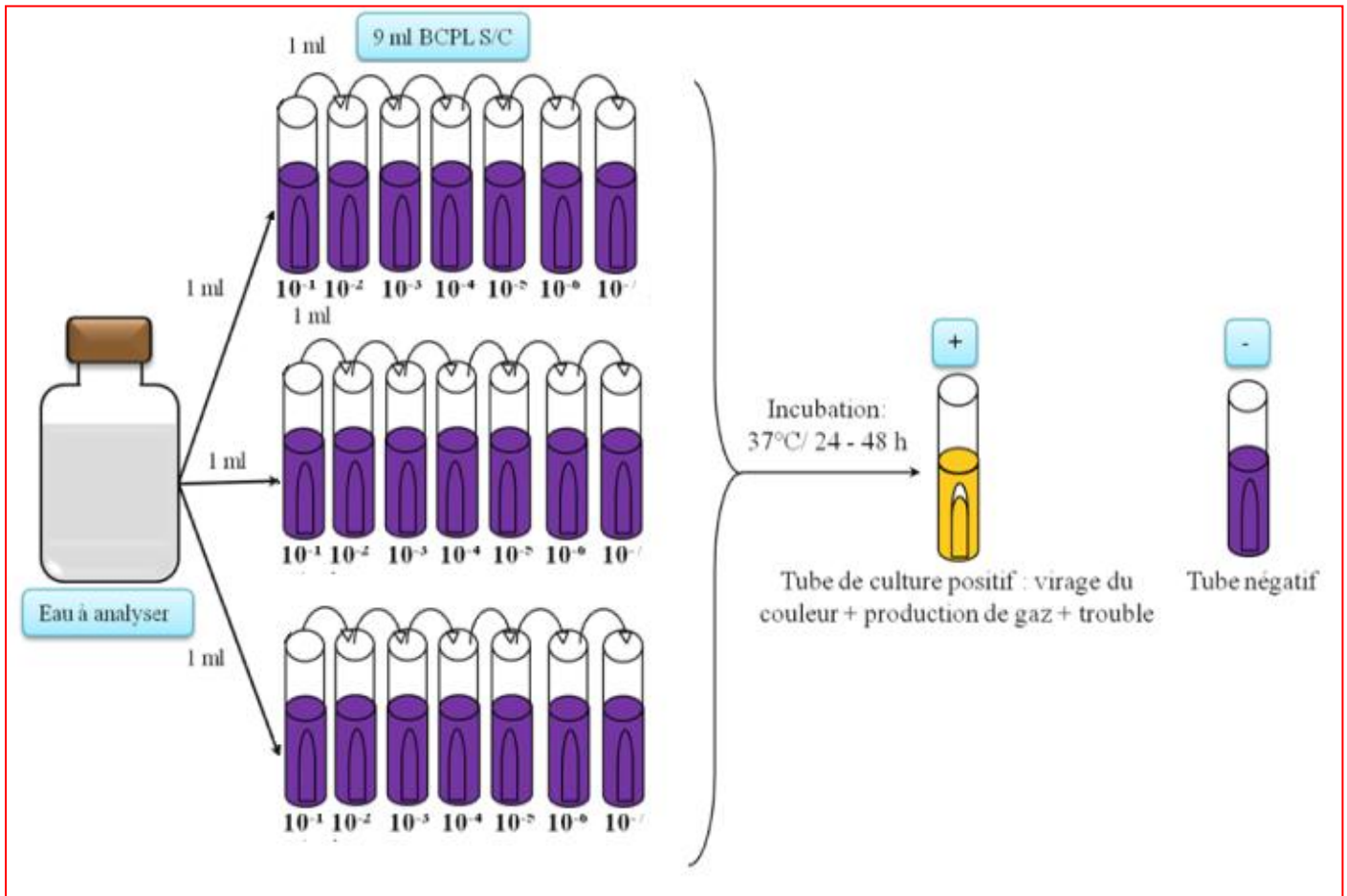
Il est effectué en utilisant le bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol simple concentration (BCPL). Tous les tubes sont munis d'une cloche de Durham pour déceler le dégagement éventuel du gaz dans le milieu. Avant chaque prélèvement, homogénéiser l'échantillon et les tubes de BCPL ensemencés (les dilutions) afin d'obtenir une répartition homogène des microorganismes.

On prend 1 ml de l'échantillon à analyser à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et on l'introduit au tube 10^{-1} contenant 9 ml de BCPL. Après avoir bien homogénéisé la dilution 10^{-1} nous avons réalisé sept dilutions décimales successives (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) avec trois répétitions par dilution. Les dilutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques.

- Nous prélevons 1 ml de la dilution 10^{-1} précédente et l'ajouter à un tube contenant 9 ml de BCPL, pour obtenir la dilution 10^{-2} .
- Refaire la technique pour les 5 tubes restants de BCPL afin d'obtenir 7 tubes de BCPL, et refaire la même opération pour les 2 autres séries.
- L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.
- **Lecture :** Seront considérés positifs les tubes où il se produit simultanément:
 - Un dégagement de gaz (supérieur au $1/10^{\text{ème}}$ de la hauteur de la cloche).

- Un trouble microbien accompagné d'un virage de la couleur du milieu vers le jaune ce qui indique une fermentation du lactose du milieu (La production d'acide suite à la fermentation du lactose ce qui entraîne le virage du bromocrésol pourpre au jaune).

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table du NPP pour obtenir le nombre le plus probable de coliformes totaux présents dans 1 ml d'échantillon à analyser.



Technique de NPP sur BCPL

Exemple

Après incubation on fait la lecture des 3 séries un tube de BCPL avec un virage au jaune et un dégagement de gaz est considéré comme tube +

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Série 1	+	+	+	-	-	-	-
Série 2	+	+	-	-	-	-	-
Série 3	+	+	+	+	-	-	-
	3	3	2	1	0	0	0

- On prend les 3 numéros avant l'apparition de 0 dans notre cas on a 321.
- 321 sur le table de Mac Grady donne un numéro de 15.0
- Résultat de dénombrement $15 \cdot 10^4$ coliforme/ml

Table de Mac Grady

3 tubes par dilution					
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	0.7	221	3.0	321	15.0
102	1.1	222	3.5	322	20.0
110	0.7	223	4.0	323	30.0
111	1.1	230	3.0	330	25.0
120	1.1	231	3.5	331	45.0
121	1.5	232	4.0	332	110.0
130	1.6	300	2.5	333	140.0
200	0.9	301	4.0		

On peut refaire la technique de NPP on utilisant un autre milieu de culture pour le dénombrement d'un autre type des microorganismes tel que l'utilisation du milieu Roth pour le dénombrement des streptocoques...etc.