

## CHAPITRE 4 : Techniques de numération des microorganismes

### Introduction

La numération des micro-organismes est essentielle pour évaluer la concentration microbienne dans différents types d'échantillons, allant des aliments aux échantillons d'eau, afin d'assurer leur sécurité et leur conformité aux normes. Ce chapitre couvre les techniques de numération microscopique et les méthodes après culture en milieu solide et liquide.

### 1. Techniques de numération microscopique

Les techniques de numération microscopique permettent de compter les micro-organismes directement sans les cultiver, ce qui réduit le temps nécessaire pour obtenir les résultats.

#### 1.1 Comptage à l'hématimètre

- **Principe** : L'hématimètre est une lame spécialement conçue avec une grille de comptage divisée en carrés de dimensions connues. L'échantillon liquide est déposé sur la lame, et le nombre de cellules dans plusieurs carrés est compté pour estimer la concentration.
- **Procédure** :
  1. Préparer l'échantillon avec une dilution adaptée.
  2. Remplir l'hématimètre avec l'échantillon et couvrir avec une lamelle.
  3. Observer au microscope et compter les cellules dans des carrés sélectionnés.
- **Calcul** :  $N = \text{nombre de cellules comptées} \times \text{facteur de dilution} / \text{volume de la chambre}$
- **Avantages** : Méthode rapide, équipement simple.
- **Inconvénients** : Ne permet pas de différencier les cellules vivantes des mortes.

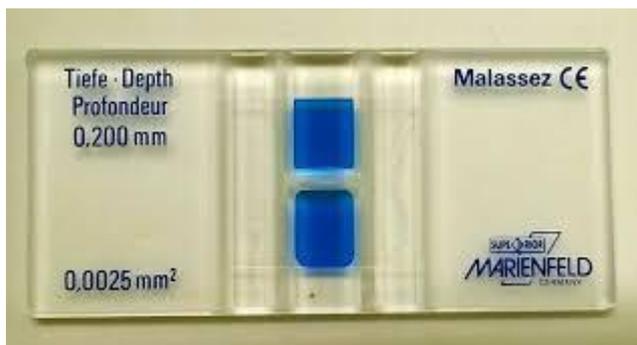


Figure 1 : cellule de Malassez.

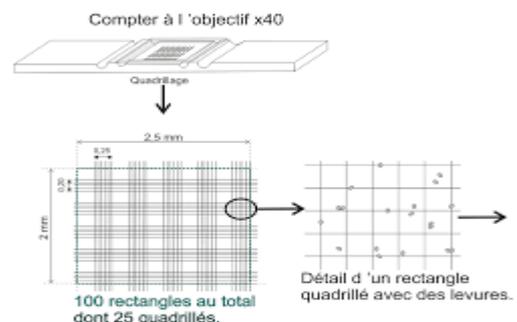


Figure 2 : le comptage cellulaire

## 1.2 Numération sur frottis (technique de Breed)

- **Principe** : Utilisée pour les échantillons denses comme le lait, cette technique consiste à étaler un échantillon sur une lame de microscope, le fixer, le colorer, et compter les cellules colorées.
- **Procédure** :
  1. Étaler une fine couche de l'échantillon sur la lame.
  2. Fixer à la chaleur et colorer (ex. bleu de méthylène).
  3. Observer au microscope à immersion et compter les cellules.
- **Avantages** : Permet d'évaluer des échantillons riches en bactéries.
- **Inconvénients** : Méthode subjective, difficulté à obtenir des résultats reproductibles.

## 1.3 Numération directe après filtration

- **Principe** : Cette méthode implique la filtration de l'échantillon à travers une membrane pour concentrer les micro-organismes, suivie d'une coloration et d'un comptage au microscope.
- **Procédure** :
  1. Filtrer l'échantillon à travers une membrane de porosité fine.
  2. Colorer la membrane avec une teinture (ex. DAPI pour les bactéries).
  3. Observer la membrane au microscope et compter les cellules colorées.
- **Applications** : Contrôle de la qualité de l'eau.
- **Avantages** : Efficace pour les échantillons dilués.
- **Inconvénients** : Nécessite un équipement de filtration et des colorants.



Figure 3 : Filtration sur membrane microbiologique

## 2. Numération après culture en milieu solide

Cette méthode permet de compter uniquement les micro-organismes viables qui forment des colonies après une période d'incubation.

### 2.1 Principe

Les micro-organismes cultivés sur un milieu solide forment des colonies visibles à l'œil nu. Chaque colonie provient théoriquement d'une cellule viable, permettant ainsi de dénombrer les unités formant colonies (CFU).

### 2.2 Méthodes d'ensemencement

#### a) Méthode d'inoculation dans la masse

- **Description** : L'échantillon dilué est mélangé avec de l'agar fondu (température de 45-50 °C) puis versé dans une boîte de Pétri. Après solidification et incubation, les colonies se développent à l'intérieur de la masse d'agar et à sa surface.
- **Avantages** : Permet de dénombrer à la fois les colonies internes (anaérobies stricts et anaérobies facultatifs) et les colonies en surface (microorganismes aérobies).
- **Inconvénients** : Certaines colonies peuvent être cachées à l'intérieur.

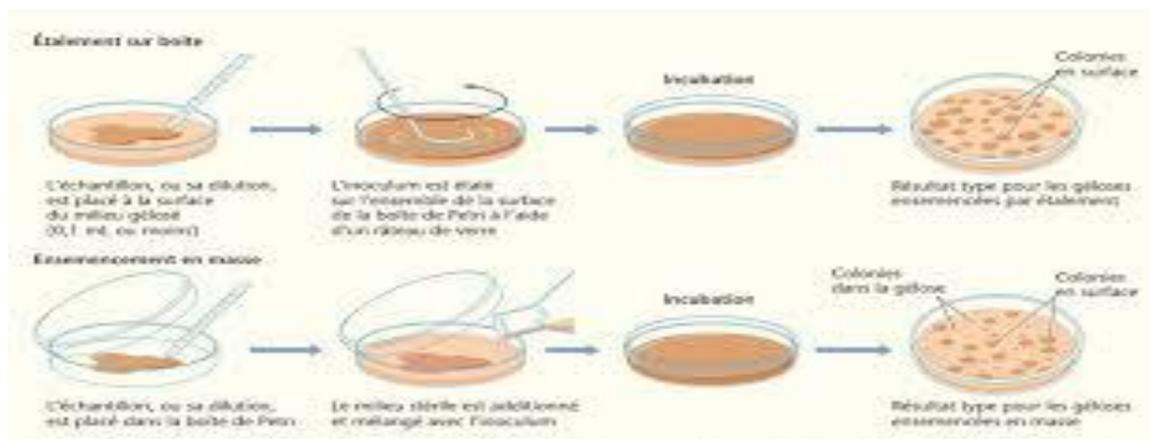


Figure 4 : Ensemencement dans la masse.

**b) Méthode d'ensemencement en surface**

- **Description** : L'échantillon est étalé sur la surface de l'agar pré-solidifié à l'aide d'une spatule stérile (spatule de Drigalski).
- **Avantages** : Convient pour l'isolement et le comptage des colonies de surface (aérobie).
- **Inconvénients** : Peut ne pas convenir pour les échantillons fortement dilués.

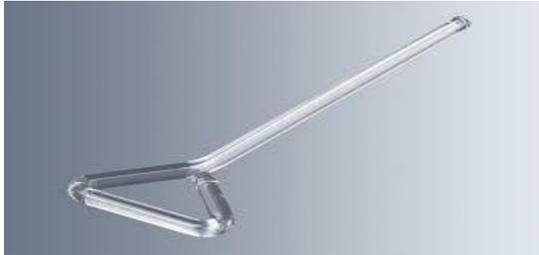


Figure 5 : Spatule de Drigalski

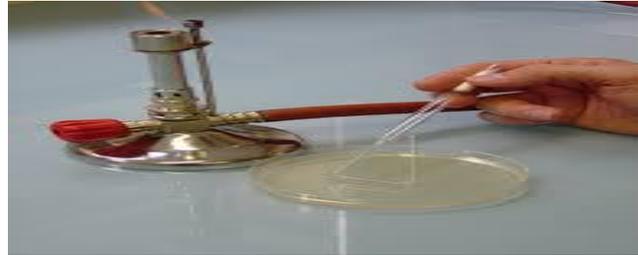


Figure 6 : Ensemencement en surface

**2.3 Lecture et interprétation des résultats**

- **Lecture** : Compter les colonies sur des boîtes présentant 30 à 300 colonies pour minimiser les erreurs de dénombrement.
- **Précautions** : Choisir des boîtes bien dispersées pour éviter les colonies fusionnées.

**2.4 Calcul du nombre de micro-organismes par unité d'échantillon**

- **Formule** :  $N = \text{nombre de colonies} \times \text{facteur de dilution inverse} / \text{volume inoculé}$
- **Exemple** : Si 50 colonies sont observées sur une boîte avec une dilution de  $10^{-2}$  et un volume de 1 ml, le calcul serait :  $50 \times 100 / 1 = 5000 \text{ CFU/mL}$ .

**3. Numération après culture en milieu liquide**

Cette méthode est utile pour les échantillons où il est difficile de cultiver des colonies individuelles sur un milieu solide.

**3.1 Dénombrement à un seul essai**

Cette méthode est simple et rapide, car elle ne nécessite pas plusieurs dilutions ou répétitions. Elle donne une estimation directe à partir d'une seule mesure.

- **Principe** : Observer la croissance en mesurant la turbidité du milieu avec un spectrophotomètre.
- **Procédure** : Incuber un volume connu de l'échantillon dans un bouillon stérile (milieu de culture) et observer la formation de turbidité.
- **Avantages** : Simple est souvent utilisée pour un dépistage rapide.
- **Inconvénients** : Moins précis que les méthodes de numération directe.

### 3.2 Dénombrement à essais multiples – NPP

Le dénombrement à essais multiples ou méthode du Nombre le Plus Probable (**NPP**) est une technique statistique utilisée pour estimer la concentration de micro-organismes présents dans un échantillon lorsqu'un dénombrement direct est difficile ou impossible.

#### **Principe :**

Le NPP repose sur la probabilité de trouver des micro-organismes dans des dilutions successives de l'échantillon. Cette méthode est particulièrement utile pour estimer la concentration de micro-organismes en faible quantité. L'objectif est de déterminer la concentration initiale par une analyse statistique basée sur la présence ou l'absence de croissance dans un ensemble de dilutions.

#### **Procédure :**

##### **1. Préparation des dilutions :**

- Préparer une série de dilutions décimales de l'échantillon dans un diluant stérile.
- En général, 3 à 5 dilutions sont préparées, chacune répartie en plusieurs tubes (généralement trois tubes par dilution).

##### **2. Inoculation des milieux :**

- Inoculer chaque tube de la série avec un volume déterminé de l'échantillon dilué.
- Le choix du volume peut varier, mais il est généralement compris entre 1 et 10 mL.

##### **3. Incubation :**

- Incuber les tubes à une température appropriée et pendant une durée spécifique, en fonction du type de micro-organismes recherchés.

- Observer les tubes après incubation pour détecter la présence de croissance (indiquée par des signes comme la turbidité ou un changement de couleur lié à l'acidité).



Figure 7 : Dénombrement à essai multiple.

#### 4. Interprétation des résultats :

- Noter le nombre de tubes positifs (présence de croissance) pour chaque série de dilution.
- Utiliser les résultats obtenus (ex. 3 tubes positifs sur 5 à une dilution donnée) pour consulter une table de NPP standard qui donne une estimation statistique de la concentration initiale de micro-organismes dans l'échantillon.

Se reporter au table de Mac Grady pour 3 tubes de dilution afin de trouver le NPP correspondant au nombre 322: le NPP est 21

Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilutions retenus			NPP	Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilutions retenus			NPP
0	0	0	< 0,3	2	2	1	2,8
0	0	1	0,3	2	3	0	2,9
0	1	0	0,3	3	0	0	2,3
0	2	0	0,6	3	0	1	4
1	0	0	0,4	3	0	2	6
1	0	1	0,7	3	1	0	4
1	1	0	0,7	3	1	1	7
1	1	1	1,1	3	1	2	12
1	2	0	1,1	3	2	0	9
1	2	1	1,5	3	2	1	15
1	3	0	1,6	3	2	2	21
2	0	0	0,9	3	3	0	29
2	0	1	1,4	3	3	0	20
2	1	0	1,5	3	3	1	50
2	1	1	2,0	3	3	2	110
2	2	0	2,1	3	3	3	> 110

Figure 8 : Exemple de table de Mac Grady.

### **Applications :**

- Analyse des échantillons d'eau potable : Vérification de la présence de coliformes ou autres indicateurs de contamination microbiologique.
- Industrie alimentaire : Contrôle de la qualité microbiologique des produits alimentaires où le dénombrement direct est peu pratique, comme dans des matrices liquides ou semi-solides.

### **Avantages et limites :**

- Avantages : Simple à mettre en œuvre, nécessite peu de matériel spécialisé et permet de travailler avec de faibles niveaux de contamination.
- Limites : L'estimation obtenue est approximative et dépend de la précision de la table de NPP utilisée. Elle demande également un temps d'incubation qui peut être relativement long.