

Corrigé du TD

Dénombrements Bactériens

Introduction :

Dénombrer les bactéries = donner le nombre de bactéries par unité de volume, très souvent par ml de culture analysée.

Différentes applications du dénombrement bactérien :

Ex1 : Contrôle de qualité d'un aliment

Le nombre de bactéries existant dans un échantillon d'un lait est comparé à des seuils à ne pas dépasser (normes de qualité d'un lait).

EX2 : Evaluer la fertilité d'un sol : (en se basant sur son activité microbiologique)

Déterminer le nombre de bactéries par gramme de sol peut renseigner sur sa fertilité, spécialement les bactéries intervenant dans les cycles bio-géo-chimiques du carbone, de l'azote, du soufre, etc...

EX 3 : Diagnostic d'une maladie infectieuse :

Le dénombrement des bactéries dans une urine renseigne sur l'infection urinaire ou pas, grâce à une comparaison à des seuils à ne pas dépasser (Tableau de Merlin)

EX4 : Degré de pollution d'un milieu aquatique :

Le dénombrement certaines bactéries (coliformes fécaux)) renseigne sur la qualité microbiologique du milieu étudié et son degré de pollution.

II. Méthodes de dénombrement :

Méthodes directes :

***Le comptage direct** des cellules se fait au microscope à l'aide d'un hématimètre appelé *Lame de Thoma* (c'est une lame munie au centre d'un quadrillage de dimensions bien déterminées), voir exercice I.

*** Epifluorescence :**

Les bactéries sont colorées par un fluorochrome (Orange d'acridine ou Erythrosine), puis observées au microscope en lumière UV. Cette méthode permet de compter sélectivement les bactéries vivantes fluorescentes à une couleur différente des cellules mortes. **Cette technique a des inconvénients du fait que la couleur des cellules peut changer avec le pH du milieu par exemple.**

***Compteur de particules :**

Cet appareil réalise automatiquement le dénombrement des particules ou cellules en suspension dans une solution, grâce aux modifications de résistances électriques qu'elles provoquent à leur passage à travers un orifice calibré.

Méthodes indirectes : (après culture)

Bactérie + éléments nutritifs (C , N, O₂ , etc...)-----> Biomasse cellulaire + Produits

Le dénombrement se base sur l'évaluation de cette biomasse soit par :

***Mesure de la masse** après culture sur milieu de culture liquide :

La biomasse peut être évaluée par pesée du poids sec après filtration et séchage) ou par mesure de la Densité du trouble (DO au spectrophotomètre)

*** Mesure de l'activité des bactéries**, en suivant la cinétique de disparition d'un substrat ou celle de l'apparition d'un produit final.

***Mesure du nombre de bactéries :**

- Dilution et dénombrement en milieu de culture solide : exercice II
- Estimation du nombre le plus probable (MPN) : exercice III

III. Différence entre les méthodes directes et indirectes :

Méthodes directes : comptent directement les cellules, leur résultat est rapide, mais peuvent compter **aussi bien les cellules mortes que les cellules vivantes**.

Méthodes indirectes : ne comptent que les cellules **viables et cultivables** dans un milieu de culture ; mais demandent du temps (minimum 24h).

Selon le but recherché et la précision du dénombrement requise, on choisit l'une ou l'autre des méthodes.

IV Exercices d'Applications :

Exercice I :

On veut déterminer le nombre de bactéries vivantes dans l'urine d'un malade atteint d'une infection bactérienne et suivant un traitement antibiotique. Les dénombrements avant le traitement ont montré que l'urine du patient contient une concentration de 10^6 cellules bactériennes vivantes par ml d'urine. Après un jour de traitement au Bactrim (triméthoprim + sulphaméthoxazole), le pharmacien biologiste dépose un volume de 0,01 ml à la surface d'une cellule de Thoma. Après 30 minutes de repos permettant la décantation des cellules, la lame est examinée au microscope, au fort grossissement.

Calculer la concentration des cellules par ml dans cette urine sachant qu'on a compté 350 cellules dans 10 petits carrés dans une solution 10 fois plus concentrée de l'urine originale.

Après coloration au bleu de méthylène, le pourcentage de cellules bleues était de 80 %. Quel est la signification de ce résultat pour le comptage des cellules ?

Quel est la signification de ce résultat pour le malade ? Le traitement est-il efficace ?

Rappel : La cellule de Thoma est une lame creuse au centre avec un quadrillage d'environ 400 petits carrés. Chaque petit carré a une surface de $1/400 \text{ mm}^2$. La distance entre la grille et la lamelle est de $1/10 \text{ mm}$.

Résolution de l'exercice I :

a) Volume d'un petit carré := surface x hauteur

$$= 1/400 \times 1/10 = 1/4000 \text{ mm}^3 = 0,25 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3 = 0,25 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3 (\text{ml})$$

Le volume de 10 petits carrés= $0,25 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^3$

Nous avons 350 cellules dans 10 petits carrés

Le nombre total = 350 divisé par $0,25 \cdot 10^{-5}$

= $14 \cdot 10^7$ cellules / ml de l'échantillon analysé.

Puisque l'urine du départ était concentrée 10 fois, donc le nombre de bactéries dans l'urine est : $14 \cdot 10^6$ cellules /ml d'urine.

b) Après coloration au bleu de méthylène, 80% des cellules étaient colorées au bleu. Le colorant utilisé n'étant pas un colorant vital, il ne colore que les cellules mortes.

c) pour le malade, la majorité des cellules sont mortes. Le traitement pendant un seul jour au Bactrim était très efficace.

Exercice II

L'analyse bactériologique d'une urine infectée donne le tableau de résultats suivant, sachant que l'on aensemencé 0,1 ml de chaque dilution par boîte de milieu de culture.

| Dilution | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Essai 1 | inc | 490 | 95 | 2 |
| Essai 2 | inc | 501 | 110 | 0 |
| Essai 3 | inc | 520 | 120 | 5 |

inc : incomptable

- Définissez une colonie.
- Quelle dilution doit-on utiliser pour réaliser le dénombrement ?
- Déterminez le nombre de bactéries par ml d'urine.
- Le dénombrement bactérien sur le même échantillon d'urine, par la méthode directe au microscope optique, a donné $15 \cdot 10^5$ bactéries /ml, comparer les deux résultats et interpréter.

Résolution de l'exercice II :

- une colonie est un ensemble de cellule qui proviennent de la division d'une même cellule mère.
- Si on ensemence un volume connu sur une boîte de gélose nutritive, le nombre de colonies obtenu sur cette boîte après incubation à une température optimale, correspond au nombre de bactéries ensemencé au départ. Si on peut aisément compter le nombre de colonies, on peut déduire le nombre initial de bactéries, connaissant le volume ensemencé.

Ex : si on ensemence 0,1 ml d'une suspension bactérienne sur une boîte de gélose nutritive, et si après incubation à 37°C pendant 24H, on compte 10 colonies, le nombre initial de bactéries est égal à 10×10 (0,1 ml ensemencé) = 100 bactérie/ml de suspension bactérienne.

Comme le nombre de bactéries à compter n'est pas connu au départ, et pour avoir au moins une boîte où on peut aisément compter le nombre de colonies, on procède généralement à une dilution de l'échantillon avant d'ensemencer le milieu de culture.

Une série de dilution de 10 en 10 est généralement préparée. Et chaque dilution estensemencée au niveau d'une boîte de gélose nutritive. Après incubation, on ne considère que les boîtes de GN où on peut compter facilement le nombre de colonies apparues. Pour une même dilution, on refait plusieurs essais, pour avoir un nombre moyen et augmenter la précision du dénombrement. (voir tableau de l'énoncé).

Parmi les boîtes comptables on ne considérera que la boîte qui a donné un nombre de colonies compris entre 30 et 300 colonies.

Si le nombre est inférieur à 30, il n'est pas statistiquement significatif.

Si le nombre est supérieur à 300, on risque de sous estimer le nombre de bactéries du fait qu'il peut y avoir une compétition entre ce grand nombre de bactéries vis à vis des éléments nutritifs disponibles et vis à vis de l'espace et par la suite une inhibition d'une bonne proportion de cellules au niveau de la boîte. Dans notre exemple, la dilution choisie est la dilution 10^{-3} .

c) Le nombre de bactéries= 106 (**moyenne**) x 10 (**volumeensemencé 0,1ml**) x 10^3 (**facteur de dilution**)

$$= 10,6 \times 10^5 \text{ UFC /ml d'urine}$$

L'unité utilisée est l'**Unité Formant Colonie** (U.F.C.) : c'est une unité plus précise que l'unité bactéries/ml dans ce cas. Car on compte le nombre d'unités qui forment des colonies, quelque fois, plusieurs bactéries côte à côte pouvant donner une même colonie. Il est donc plus exact de parler du nombre d'unités formant colonies que de nombre de bactéries.

- c) La différence entre les deux méthodes vient du fait que la méthode directe au microscope compte aussi bien les cellules vivantes et les cellules mortes.

Résolution de Exercice III :

Le dénombrement des bactéries ammonifiantes dans des suspensions de trois sols différents a été réalisé par la méthode du MPN.

A partir de chaque sol une suspension de 1g de sol broyés dans 10 ml d'eau physiologique stérile a été préparée. Des séries de dilutions de 10^{-2} à 10^{-7} ont été préparées dans l'eau physiologique à partir de chaque suspension de sol. Ensuite, 1 ml de chaque dilution préparée (10^{-1} à 10^{-7}) a étéensemencé dans un milieu de culture spécifique, à raison de trois répétitions pour chaque dilution. Après incubation à 28°C pendant 15 jours, les tubes positifs sont détectés par une coloration orange, après addition du réactif de Nessler. Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous :

| Dilution | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Sol 1 | +++ | +++ | +++ | +++ | ++- | +- | --- |
| Sol 2 | +++ | +++ | ++- | --- | --- | --- | --- |
| Sol 3 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

- 1) Calculez pour chaque type de sol, le nombre de germes par gramme de sol .
- 2) quel serait le résultat si le volumeensemencé était de 0,1 ml .

Tableau de Mc Crady (3 tubes par dilution)

| Nombre caractéristique | MPN | Nombre caractéristique | MPN | Nombre caractéristique | MPN |
|------------------------|-----|------------------------|-----|------------------------|-------|
| 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 | | |

Résolution de l'exercice III :

La méthode de dénombrement par MPN sur milieu de culture liquide est utilisée dans le cas où on n'a pas la possibilité d'utiliser le milieu de culture solide.

Trois milieux de culture sont ensemencés par dilution et on considère la présence ou l'absence des bactéries recherchées mises en évidence par des tests spécifiques.

Dans le cas d'échantillons solides, comme le sol, on doit passer par une étape de préparation de l'échantillon (ici broyage de 1g de sol et sa dissolution dans 10 ml d'eau physiologique stérile) avant de passer aux dilutions. Cette étape est à considérer lors des calculs pour ramener au gramme de sol. Cette étape correspond à une sorte de dilution au 1/10 de l'échantillon de sol.

Pour la méthode de **Most Probable Number** (le nombre le plus probable), on se base sur des tables statistiques qui donnent le nombre le plus probable de germes dans un milieu tenant compte du nombre de tubes positifs obtenus dans cette expérience. Le nombre de tubes positifs relevés nous permet de calculer un nombre caractéristique NC. Le NC est un nombre formé de trois chiffres. Le premier chiffre correspond à celui relevé à la plus grande dilution qui donne le maximum de tubes positifs. Cette dilution sera prise en considération pour les calculs. Les deux autres chiffres correspondent aux nombres respectifs de tubes positifs dans les deux dilutions qui suivent.

Selon la table de Mac Grady, à chaque nombre caractéristique correspond un nombre plus probable de germes par le volume ensemencé de la dilution considérée.

EX : le sol 1 : Le nombre caractéristique est 321 à la dilution 10^{-4} .

| Dilution | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Sol 1 | +++ | +++ | +++ | +++ | ++- | +-- | --- |
| Nombre caractéristique | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0 |

Le nombre le plus probable qui lui correspond dans la table de Mac Grady est : 15

Donc le nombre de bactéries = 15×10^4 (Dilution ayant donné 3+) germes/ml

Pour exprimer le résultat par gramme de sol, on considère que la préparation de la suspension initiale (1g dans 10 ml) est équivalente à une dilution au 1/10 du sol étudié. Ainsi le nombre trouvé ci-dessus sera multiplié par 10

Donc Nombre de germes = 15×10^5 germes/g de sol.

Pour le sol 2 : NC = 320 à la dilution 10^{-2}

| Dilution | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Sol 2 | +++ | +++ | ++- | --- | --- | --- | --- |
| Nombre caractéristique | 3 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Le MPN correspondant dans la table de Mac Grady est : 9,5

Le nombre de bactérie= $9,5 \times 10^2 \times 10 = 9,5 \times 10^{+3}$ germes/g de sol

Pour le sol 3 :

| Dilution | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Sol 3 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Nombre caractéristique | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Ce résultat montre que la dilution n'était pas suffisante. Il a fallu diluer davantage l'échantillon jusqu'à ce qu'on trouve des tubes négatifs. Cependant, on peut utiliser ce résultat et considérer que le nombre caractéristique peut être estimé selon trois possibilités :

300 à la dilution 10^{-7} , le MPN = $2,5 \times 10^{+7}$ germes/ml = $2,5 \times 10^{+8}$ germes/g de sol.

ou 330 à la dilution 10^{-6} , le MPN = 25×10^6 germes/ml = $2,5 \times 10^{+8}$ germes /g de sol

ou 333 à la dilution 10^{-5} , le MPN = $140 \times 10^{+5}$ germes/ml = $1,4 \times 10^{+8}$ germes /g de sol

Ainsi les trois chiffres sont considérés valables, et l'on peut utiliser l'une ou l'autre des estimations, les résultats sont assez proches. Mais il faut faire attention à la dilution considérée.

2) Si le volumeensemencé était de 0,1ml au lieu de 1ml, le nombre trouvé doit être multiplié par 10.