# TECHNIQUES DE CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUES CHAPITRE 4

## 4. Techniques classiques de numérations

Le terme numération signifie « dénombrement» d'une flore. Il signifie que l'analyse microbiologique doit permettre de quantifier dans l'échantillon une flore particulière. Le résultat d'une telle analyse quantitative est rendu sous forme d'une concentration en micro-organismes (appartenant à une flore particulière) par unité de masse ou de volume d'échantillon (germes ou unités formant colonies (UFC)/ml ou gramme d'échantillon).

### 4.1. Numération microscopique

Il s'agit d'un dénombrement par observation directe ; la numération cellulaire est réalisée par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale ou cellule de numération ou hématimètre (Cellule de Thoma et la Cellule de Malassez, la plus courante).

**Inconvénient** : de cette méthode n'est pas capable de différentier les germes vivants par rapport aux germes morts.

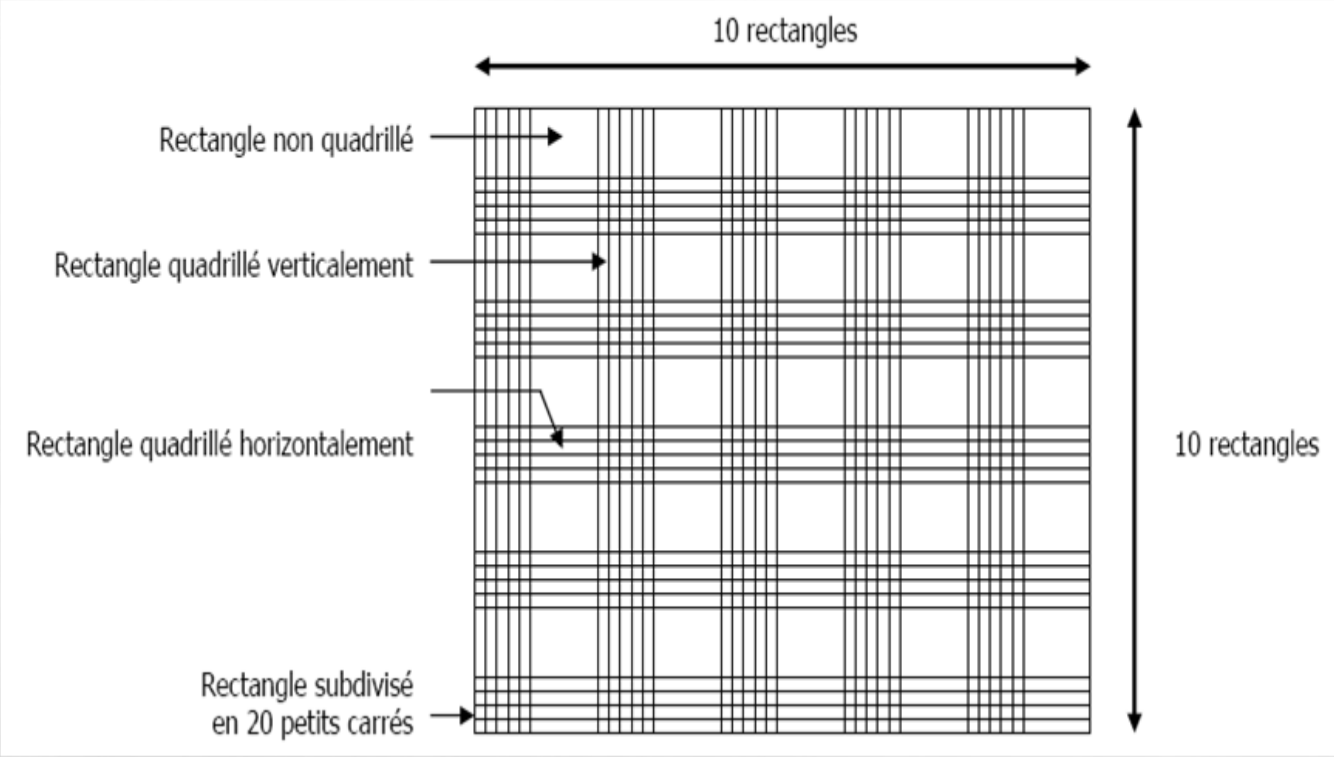
Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée. N = (n /V) x f -n : nombre de cellules comptées -V : volume de comptage -f : facteur de dilution -N : nombre de cellules par litre

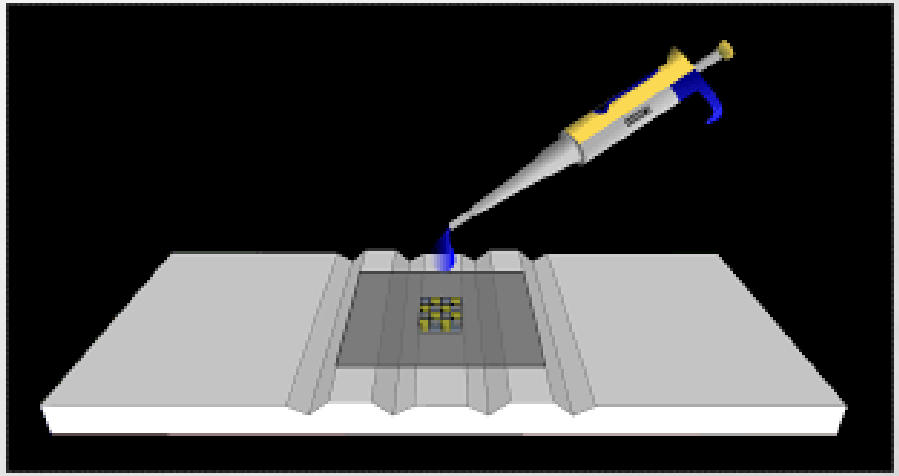
# Comptage des cellules sur Malassez :

Une cellule de numération est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu.

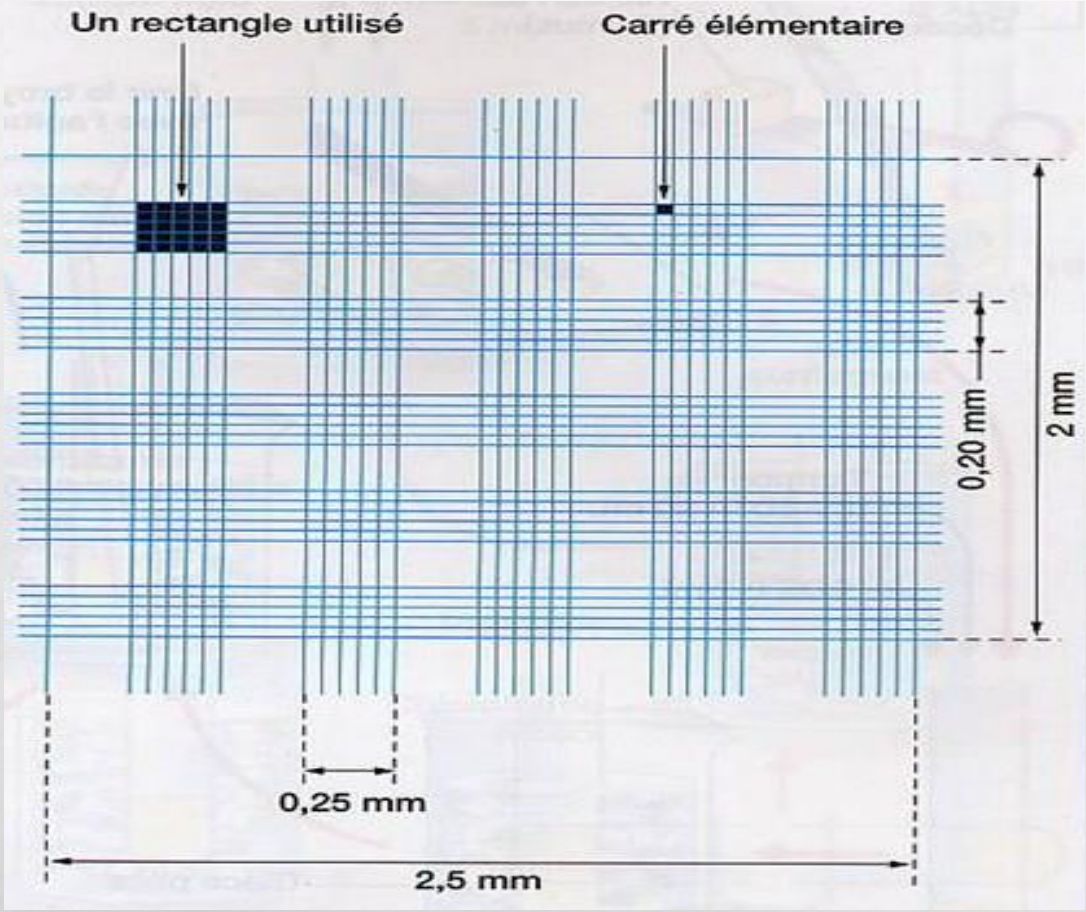
C'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage.

La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles :



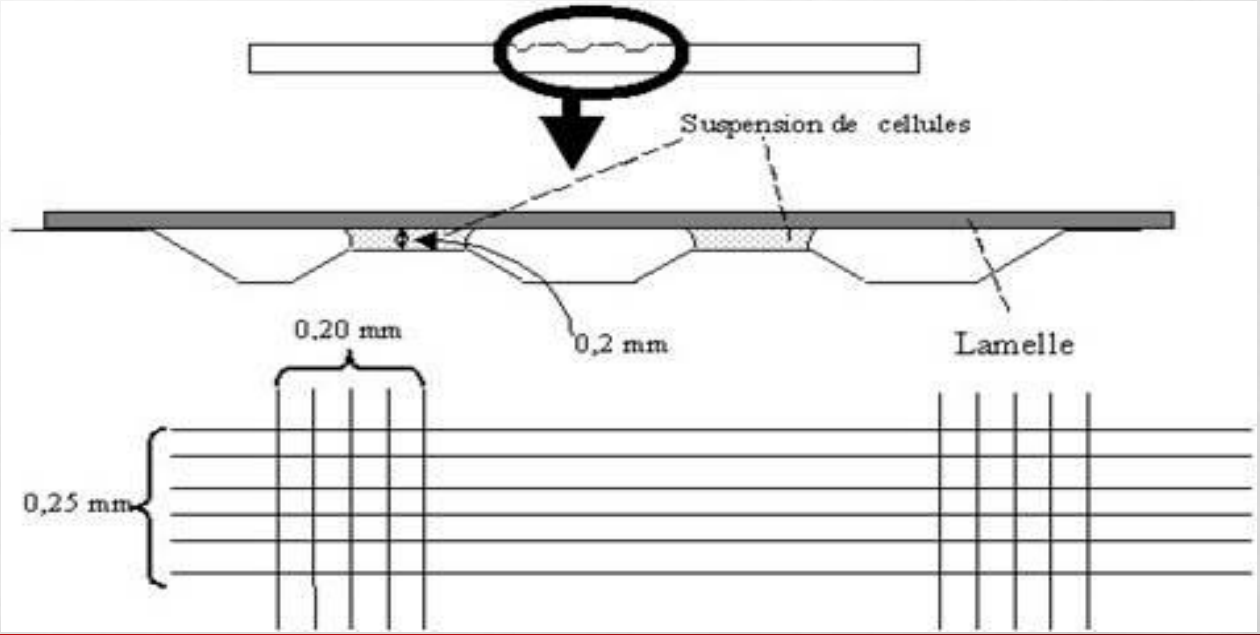



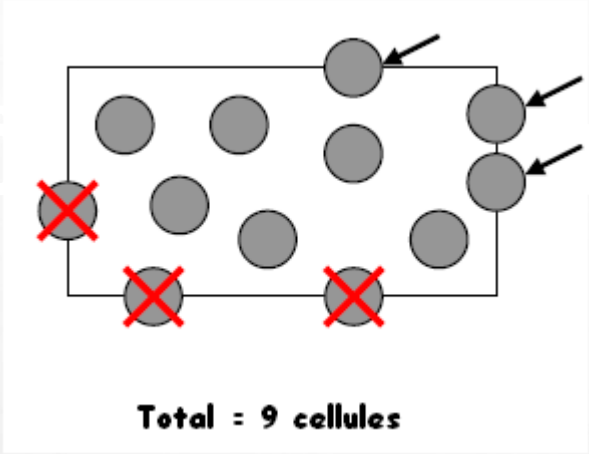
Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve donc 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.




- le volume correspondant au quadrillage total est égal à 1 mm3 (= 100x2,5 x 0,2 x 0,20)

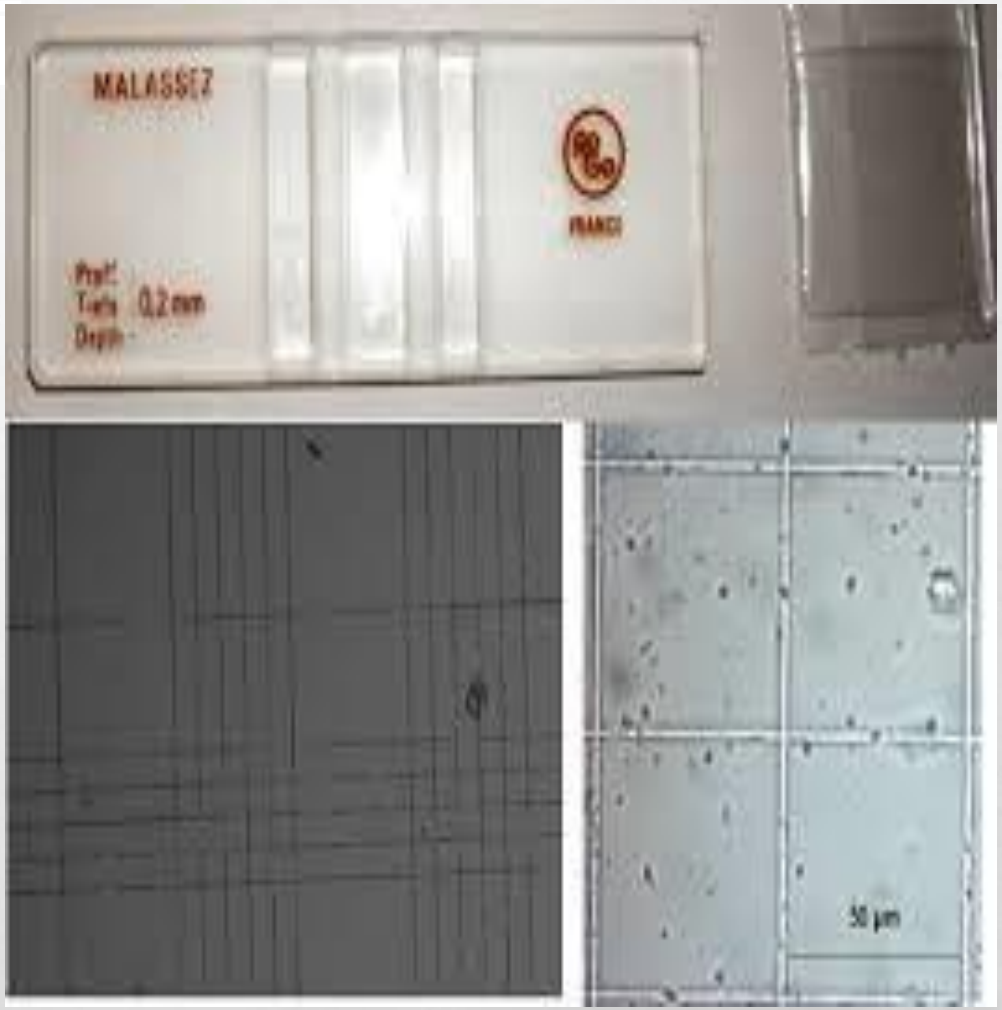
- chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit 0,01 mm3





**Total = 9 cellules**

| Rectangle compté | Nombre de cellules comptabilisées | Calculs |
|---|---|---|
| Rectangle 1 | 20 cellules | Moyenne par rectangle : (20+14+10+23+16+8+19+14+21+15)/10= **16 cellules**<br><br>Nombre de cellules dans 1 $mm^3$ : 16 x 100 = **$1,6.10^3.mm^{-3}$** |
| Rectangle 2 | 14 cellules | |
| Rectangle 3 | 10 cellules | |
| Rectangle 4 | 23 cellules | |
| Rectangle 5 | 16 cellules | |
| Rectangle 6 | 8 cellules | |
| Rectangle 7 | 19 cellules | |
| Rectangle 8 | 14 cellules | |
| Rectangle 9 | 21 cellules | |
| Rectangle 10 | 15 cellules | |



## 4.2. Numération en milieu solide :

Cette méthodologie est le plus fréquemment réalisée dans des boîtes de Pétri. Elle repose sur le principe que toute bactérie vivante introduite dans la masse ou en surface d'un milieu gélosé favorable donne en principe naissance après incubation à une colonie macroscopique. Le nombre total de colonies correspond alors au nombre d'UFC présents dans l'inoculum.

### 4.2.1. Technique de numération dans la masse de la gélose

**Principe** : 1 ml du liquide dans lequel on veut connaître le nombre de micro-organismes est introduit au centre de la boîte de Pétri vide et stérile PUIS 15 ml de gélose liquéfiée et maintenue en surfusion à 45 ±1°C est posée sur l'échantillon. Les essais sont pratiqués en duplicata (ou triplicata si possible) pour chaque dilution.

### 4.2.2. Technique de numération en surface de la gélose

100 à 500 microlitres du milieu à analyser sont déposés à la surface de la gélose et immédiatement répartis de façon uniforme au moyen d'une pipette râteau. Après la période d'incubation nécessaire, procéder au comptage des colonies pour chaque boîte contenant moins de 300 colonies.

Le calcul de la concentration en micro-organismes [N] présents dans l'échantillon

$$N = \frac{\sum C}{v\left(n_1 + 0{,}1 n_2\right) d}$$

## 4.2.3. Dénombrement après filtration sur membrane

Cas de certains produits liquides (eau, solutés pharmaceutiques buvables ou injectables...), les microorganismes sont à une concentration très faible (voire nulle si le produit est stérile).

Cette méthode consiste à faire passer un certain volume d'échantillon (ou de ses dilutions) au travers d'une membrane filtrante dont la porosité moyenne de 0,45 µm ou 0,22 µm sur laquelle sont retenus les microorganismes recherchés. Le filtre est alors posé sur la surface d'un milieu gélosé, face portant les micro-organismes vers le haut. Après incubation, les colonies formées à la surface du filtre sont comptées.

Le nombre de colonies présentes sur la membrane permet de **calculer** la concentration bactérienne N en nombre d'Unités Formant Colonie (UFC) par ml selon la formule : N (UFC/ml) = n/v
Où n : nombre d'UFC sur la membrane, V : volume de produit filtré en ml.

## 4.3. Numération en milieu liquide

- Il s'agit de la numération des microorganismes sur la base du trouble développé.

- Cette méthode présente certains avantages tels que la possibilité d'étudier un caractère biochimique du germe difficilement mis en évidence sur milieu gélosé comme la production de gaz (cloche) ou encore d'effectuer facilement la numération avec une phase de revivification.

La lecture des tubes contenant le milieu liquide et ensemencés avec l'inoculum est de type binaire :

- Résultat négatif si absence de trouble et/ou de modification du milieu
- Résultat positif si présence de trouble et/ou de modification du milieu.

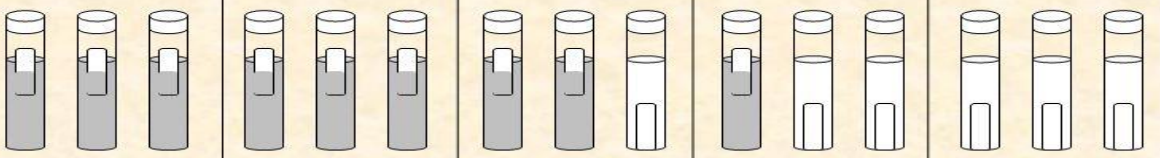
## 4.3.1. Dénombrement à essais multiples «technique du nombre le plus probable NPP»

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 ;

**Exemple** : 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.

③ Regrouper en nombre de 3 chiffres la suite de chiffres obtenue en commençant par le chiffre obtenu par la plus faible dilution.

| Dilutions | $10^{0}$ | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Aspect des tubes (BLBVB + cloche) |  | | | | |
| Résultats | + + + | + + + | + + - | + - - | - - - |
| Nombre de résultats + | 3 | 3 | 2 | 1 | 0 |
| Regroupement | 332 | 321 | 210 | - | - |

I. Principe II. Technique III. Lecture

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).

- choix de la dilution : $10^{-1}$
- Détermination du NPP : regroupement choisi = 321 et dans la table de Mac Grady le NPP correspondant à 321 est 15
- Calcul :

$$N = \frac{NPP}{V_{ensemence}} \times Fd$$

$$N = \frac{15}{1} \times 10^1 = 150 = 1.5.10^2 coliformes / mL$$

## 5. Autres méthodes d'évaluation de flores microbiennes

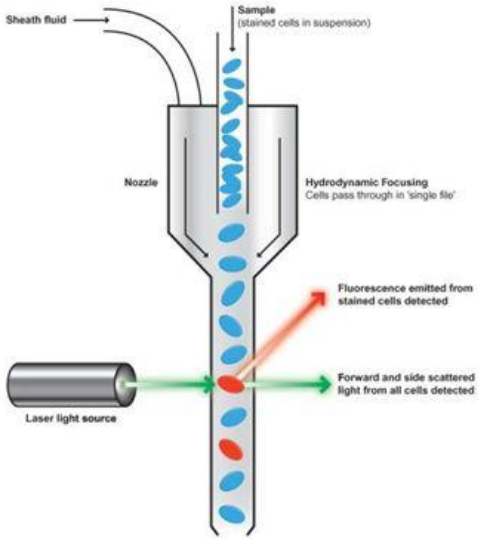
### 5.1. Spectrophotométrie

Le trouble d'une suspension microbienne (bactéries, levures) est proportionnel à la biomasse présente dans la suspension. Cette technique ne distingue pas la biomasse morte de la vivante, mais son intérêt principal est sa rapidité et sa facilité d'application.
La mesure peut se faire à l'aide d'un 20 spectrophotomètre en assimilant l'absorbance mesurée entre 600 et 650 nm à celle du trouble

### 5.2. Cytométrie de flux

Il s'agit d'une alternative rapide (24 h). La technique est basée sur le marquage fluorescent des organismes viables présents dans le produit. L'échantillon à analyser est envoyé dans une veine liquide. Un rayon laser permet d'activer la fluorescence des bactéries vivantes. Un système optique permet de détecter et de mesurer l'émission de fluorescence. La comptabilisation des signaux détectés pour un volume d'échantillon donné permet de connaître le nombre de bactéries vivantes par unité de masse ou de volume de l'échantillon à analyser.

# 5.2. Cytométrie de flux

## Principe

- Propulsion des cellules une à une à grande vitesse dans un flux hydrodynamique
- Passage devant une source lumineuse (Laser)
- Récupération de la fluorescence issu d'un immunomarquage le plus souvent
- Adaptée aux cellules en suspensions et donc à L'analyse de liquides biologiques :
  - Sang
  - Lavage broncho-alvéolaire
  - ascite ou épanchement pleural
  - Liquide céphalorachidien
  - aspiration médullaire
- Possibilité tout de même d'analyser des cellules tissulaires après dissociation