

## TECHNIQUES DE DÉNOMBREMENT

Le but des techniques de numération (ou dénombrement) est de déterminer la concentration en bactéries contenues dans une préparation initiale. Elles nécessitent une ou plusieurs dilutions décimales (au dixième).

Elles peuvent se réaliser :

- en milieu solide :
  - en surface
  - ou dans la masse
- et en milieu liquide.

### 1. Principe des dilutions

#### 1.1. Dilution décimale ou au dixième : 1/10 ou $10^{-1}$

##### 1.1.1. Matériel

- Un tube de diluant de 9 mL (eau distillée, en général, sauf indication contraire : eau physiologique, eau peptonée, tryptone-sel,...)
- Une pipette stérile en plastique de 1 mL (ou pipette automatique P1000 avec cônes stériles)
- Un vortex (facultatif)

##### 1.1.2. Réalisation

- Homogénéiser la suspension microbienne à prélever (agitation par mouvements circulaires pendant 10 secondes environ ou à l'aide d'un vortex).
- Ouvrir et flamber l'ouverture du tube.
- Prélever 1 mL de suspension à l'aide de la pipette plastique stérile (ou pipette automatique). Ne pas introduire la pipette dans la suspension de plus de 1 cm.
- Flamber et refermer le tube. Il est conseillé de replacer le tube sur le portoir à une place montrant qu'il a déjà été prélevé (en retrait par exemple).
- Ouvrir le tube de 9 mL de diluant, flamber l'ouverture, y introduire le volume prélevé (sur la paroi sans toucher le liquide). Éviter tout contact entre la pipette contenant l'inoculum et le diluant stérile.
- Flamber et refermer le tube, jeter la pipette souillée dans le bac à eau de Javel.

#### 1.2. Dilution d'un aliment

Si le produit est solide, on ne peut pas pipeter. L'analyse comprend alors obligatoirement la réalisation d'une suspension de l'aliment broyé dans un diluant (voir TP sur l'analyse complète d'un aliment).

On s'arrange pour que cette préparation corresponde à une dilution au  $1/10^{\text{ème}}$  de l'aliment.

Pour cela, on broie, par exemple, 10 g d'aliment (de densité approximée à 1 g/mL : 10 mL d'aliment a une masse d'environ 10 g) dans 90 mL de diluant (eau peptonée par exemple).

#### 1.3. Dilutions en série ou successives $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-5}$ , ...

Chaque dilution nécessite un tube de diluant de 9 mL et d'une pipette stérile de 1 mL.

Ainsi, la réalisation d'une gamme de dilutions jusqu'à  $10^{-5}$  nécessite : 5 tubes et 5 pipettes.

La dilution suivante s'effectue comme la dilution décrite au paragraphe « 1.1.2. Réalisation » mais en partant du tube de la dilution précédente.

Exemple : la dilution  $10^{-5}$  sera effectuée en prenant 1 mL de la dilution  $10^{-4}$  préalablement homogénéisée qui sera introduit dans un tube contenant 9 mL de diluant.

## 2. Numération en milieu solide

### 2.1. Principe général

Les bactéries à dénombrer présentes dans l'inoculum sont introduites soit à la surface, soit dans la masse d'un milieu gélosé. Chaque bactérie isolée donne naissance à une colonie ou UFC pour « unité formant colonie ». En effet, plusieurs bactéries peuvent être à l'origine de la formation d'une seule colonie qui ne peut plus être qualifiée de colonie (pas de clone) mais alors d'UFC.

### 2.2. Techniques

#### 2.2.1. En surface

##### a. Matériel :

##### • Gélose coulée

La gélose est fournie pré-coulée ou à couler.

Cette technique en surface est utilisée, par exemple, pour le dénombrement des staphylocoques sur Baird Parker ou des levures sur gélose OGA.

##### • Nombre de boîtes :

Une ou deux boîtes sontensemencées par dilution.

##### • Une pipette en plastique stérile de 1 mL :

Il ne faut qu'une seule pipette de 1 mL pour ensemenecer toutes les boîtes si elles sontensemencées de la dilution la plus grande à la dilution la plus petite (du plus diluée au plus concentrée). Exemple :  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  puis  $10^{-1}$ .

##### b. Ensemencement en surface

Le dénombrement en surface s'effectue sur 0,1 mL de dilution.

- Homogénéiser la dilution à prélever (la plus grande).
- Prélever un volume précis au dixième de millilitre à l'aide d'une pipette stérile de 1 mL et déposer 0,1 mL de la dilution au centre de la surface de la gélose.
- Étaler à l'aide d'une pipette râteau, d'un étaleur plastique ou de billes de verre le volume sur toute la gélose.

### 2.2.2. Dans la masse avec ou sans double couche

#### a. Matériel :

##### • Gélose maintenue en surfusion :

Les milieux gélés adéquats sont liquéfiés et maintenus en surfusion à 65 °C.

On compte 15 mL pour la 1<sup>ère</sup> couche et 5 mL pour la 2<sup>nd</sup>e couche (20 mL par boîte).

##### • Nombre de boîtes de Pétri stériles :

Une à deux boîtes sontensemencées par dilution.

##### • Une pipette en plastique stérile de 1 mL :

Il ne faut qu'une seule pipette de 1 mL pour ensemenecer toutes les boîtes si elles sontensemencées de la dilution la plus grande à la dilution la plus petite (du plus diluée au plus concentrée). Exemple : 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup> puis 10<sup>-1</sup>.

#### b. Ensemencement dans la masse

Le dénombrement dans la masse s'effectue sur 1 mL de dilution.

- Homogénéiser la dilution à prélever (la plus grande).

- Prélever 1 mL et déposer la dilution dans le fond de la boîte en la répartissant en gouttes.

- Couler aseptiquement environ 15 mL de milieu gélé maintenu en surfusion mais légèrement refroidie (à une température pour laquelle le tube peut être tenu dans la main sans se brûler, permettant la survie des micro-organismes et pour laquelle la gélose ne prend pas en masse : environ 45°C).

- Homogénéiser en imprimant à la boîte de Pétri fermée des mouvements circulaires (en dessinant des 8 sur la paillasse).

- Laisser refroidir la gélose sans la bouger.

#### c. Réalisation de la double couche

Dans certains cas, quand une bactérie peut donner des colonies envahissantes, on peut recouvrir le milieu solidifié d'une couche de ce même milieu ou de gélose blanche. La quantité utilisée pour une double couche est d'environ 5 mL.

#### d. Incubation

La température d'incubation sera indiquée sur le compte-rendu ou sur un papier placé sur les boîtes et est variable suivant les micro-organismes à dénombrer (exemple : coliformes totaux à 30°C, coliformes thermotolérants à 44°C).

### 2.3. Lecture et interprétation

Le comptage des UFC ne doit pas être réalisé au hasard. Il est conseillé de délimiter des ensembles au marqueur sur le fond de la boîte de Pétri toutes les 20 UFC comptées par exemple.

Il faut que le nombre d'UFC soit significatif (15).

Il ne faut pas que le nombre d'UFC soit trop important (< 300 ou < 150 en cas d'agent de différenciation des colonies).

Les résultats seront rendus en écriture scientifique avec deux chiffres significatifs.

Volume de l'inoculum : 1 mL	Nombre d'UFC	
	1 <sup>ère</sup> boîte	2 <sup>ème</sup> boîte
Produit pur : 10 <sup>0</sup>	> 300	> 300
Dilution 10 <sup>-1</sup>	304	287
Dilution 10 <sup>-2</sup>	26	38
Dilution 10 <sup>-3</sup>	6	2

Cohérence intra-dilutions.

Cohérence inter-dilutions (on attend un facteur 10).

On prend LA dilution pour laquelle il y a le moins d'incertitude.

On tient compte ici de la dilution 10<sup>-1</sup> : donc 295 bactéries par mL à 10<sup>-1</sup>.

La concentration bactérienne dans le produit pur est de 3,0.10<sup>3</sup> bactéries par mL.

## 3. Numération en milieu liquide

### 3.1. Principe général

La seule manière de savoir si un micro-organisme est présent ou non dans l'inoculum par les techniques en milieu liquide sera de le mettre en évidence par un de ses caractères (par exemple : trouble et production de gaz en BLBVB).

Un tube stérile estensemencé par un volume d'inoculum (produit pur ou dilution).

Après incubation, si le caractère recherché est apparu (trouble, virage, gaz) le résultat est positif. Dans le cas contraire, il est rendu négatif.

#### 3.1.1. Résultat positif

Rendre : il y a au moins 1 micro-organisme recherché dans le volume initial d'inoculum (produit pur ou dilution).

#### 3.1.2. Résultat négatif

Rendre : il y a moins de 1 micro-organisme recherché dans le volume initial d'inoculum (produit pur ou dilution).

#### 3.1.3. Interprétation dans le cas d'un tube par dilution

##### a. Résultats positifs et négatifs observés

Volume de l'inoculum : 1 mL	Produit pur 10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Résultat	+	+	+	+	-	-	-

- Au moins 1 micro-organisme dans 1 mL de la dilution 10<sup>-3</sup>.

- Au moins 10<sup>3</sup> micro-organismes dans 1 mL de produit pur.

- Moins de 1 micro-organisme dans 1 mL de la dilution  $10^{-4}$ .  
Moins de  $10^4$  micro-organismes dans 1 mL de produit pur.

Conclusion :

Concentration en micro-organismes dans le produit pur comprise entre  $10^3$  et  $10^4$  micro-organismes par mL.

$$10^3 \leq [N] < 10^4 \text{ micro-organismes par mL.}$$

#### b. Que des résultats positifs observés

Volume de l'inoculum : 1 mL	Produit pur $10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
Résultat	+	+	+	+	+	+	+

Au moins 1 micro-organisme dans 1 mL de la dilution  $10^{-6}$ .  
Au moins  $10^6$  micro-organismes dans 1 mL de produit pur.

Conclusion :

Concentration en micro-organismes dans le produit pur supérieure ou égale à  $10^6$  micro-organismes par mL.

$$[N] \geq 10^6 \text{ micro-organismes par mL}$$

#### c. Que des résultats négatifs observés

Volume de l'inoculum : 1 mL	Produit pur $10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
Résultat	-	-	-	-	-	-	-

Moins de 1 micro-organisme dans 1 mL de la dilution  $10^0$ .  
Moins de 1 micro-organisme dans 1 mL de produit pur.

Conclusion :

Concentration en micro-organismes dans le produit pur strictement inférieure 1 micro-organisme par mL.

$$[N] < 1 \text{ micro-organisme par mL}$$

L'utilisation de cette méthode avec un tube par dilution entraîne une forte incertitude que des méthodes statistiques tentent de pallier par des essais multiples (2 ou 3 tubes par dilution).

### 3.2. Interprétation statistique : méthode du NPP (table de Mac Grady)

Chaque essai doit être doublée ou triplée : ensemencement de 2 ou 3 tubes pour chaque dilution.

La méthode du Nombre le Plus Probable ou NPP, dérivée des études de MacGrady, consiste à interpréter les résultats en comparant les trois essais et leurs résultats. Il s'agit d'une interprétation probabiliste.

- Après incubation, noter pour chaque essai si le résultat est positif ou négatif.
- Pour chaque dilution, affecter un chiffre égal à la somme des tubes positifs.

#### 3.2.1. Exemple avec 2 tubes par dilution

Dilution	$10^0$		$10^{-1}$		$10^{-2}$		$10^{-3}$		$10^{-4}$	
Résultats	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Chiffre attribué à chaque dilution	2		2		2		1		0	

• Choisir le nombre le plus grand possible et si possible inférieur à 220 (meilleure répartition dans les dilutions).

• Lire le NPP dans la table de Mac Grady pour 2 tubes par dilution.

• En déduire la concentration en micro-organismes par mL de produit pur [N] :

$$[N] = \frac{NPP}{V_{inoculum}} \times F_d$$

Dans le cas de l'exemple, on choisit 210 (car  $< 220$ ) pour la dilution  $10^{-2}$ .  
Dans la table de Mac Grady, le NNP correspondant à 210 est 6,0.

$$[N] = 6,0 \cdot 10^2 \text{ micro-organismes par mL.}$$

Conclusion :

La concentration est évaluée à 150 micro-organismes par 1 mL de produit pur.

#### 3.2.2. Exemple avec 3 tubes par dilution

	$10^0$			$10^{-1}$			$10^{-2}$			$10^{-3}$			$10^{-4}$		
Résultats	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Chiffre attribué à chaque dilution	3			3			2			1			0		

• Choisir le nombre le plus grand possible et si possible inférieur à 330 (meilleure répartition dans les dilutions).

• Lire le NPP dans la table de Mac Grady pour 3 tubes par dilution.

• En déduire la concentration en micro-organismes par mL de produit pur [N] :

$$[N] = \frac{NPP}{V_{inoculum}} \times F_d$$

Dans le cas de l'exemple, on choisit 321 (car  $< 330$ ) pour la dilution  $10^{-1}$ . Dans la table de Mac Grady, le NNP correspondant à 321 est 15.

$$[N] = 15 \cdot 10^1 = 1,5 \cdot 10^2 \text{ micro-organismes par mL.}$$

Ce résultat est une évaluation de la concentration en micro-organismes présent dans 1 mL de produit pur.

# Bon courage



## LIENS UTILES 🙌

### Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

