***Unité 4 :***

***Techniques d’estimation des populations microbienne***

* ***Techniques de dilution***
* ***Techniques de concentration***
* ***Numération après culture en milieu solide***
* ***Numération après culture en milieu liquide***
* ***Numération par microscopie***

*Il est souvent utile d'estimer le niveau d’une population microbienne, soit globalement, soit pour un groupe microbien donné. Les facteurs qui influencent le choix d’une méthode sont :*

* *Les prophètes de la biomasse (taille des cellules, cellules isolées ou non, caractère filamenteux, etc.),*
* *Les caractéristiques du milieu (visqueux ou non, chargé en matière en suspension, etc.).*
* *La précision désirée.*
* *La sensibilité requise.*
* *La vitesse de mesure souhaitée.*

*Deux grandeurs permettent de définir ou d'estimer une population microbienne : la masse cellulaire ou quantité de biomasse et le nombre de cellules (ou d'individus). Toutes deux sont rapportées à l'unité de volume du milieu : concentration en biomasse et concentration cellulaire. Ces deux paramètres varient lors de la croissance cellulaire : la masse cellulaire augmente de façon continue alors que le nombre de cellule augmente au moins en théorie de façon séquentielle. En réalité, en dehors des cultures à divisions synchrones, on peut considérer que le nombre de cellules augmente de façon continue au niveau d'une population de grande taille.*

*La densité microbienne d'un produit peut s'exprimer par le nombre de micro-organismes présents par mL ou par gr. On peut la définir comme la moyenne du nombre de germes de toutes les fractions élémentaires du produit représentant habituellement 1 mL ou 1 gr.*

*Il existe de nombreuses techniques de numération mais aucune n'est vraiment parfaite. Certaines ne permettent pas de différencier les germes vivants des germes morts, d'autres s'avèrent incapables de compter individuellement les cellules micro- biennes lorsque celles-ci sont associées (amas : Staphylococcus, Micrococcus ; chaînes : Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, levures à pseudomycélium, etc.). On distingue les techniques directes qui s'appliquent aux cellules microbiennes et les techniques indirectos, qui s'appliquent aux cultures qui en sont issues. Dans les deux cas, la numération n'est possible que si la concentration cellulaire de l'échantillon à analyser est adéquate. Il pourra être nécessaire d'effectuer des dilutions si la concentration est trop forte ou au contraire une concentration si elle est trop faible.*

***1.1 Techniques de dilution***

***Technique de base***

*On distingue deux types de séries de dilutions :*

*- Les séries linéaires, dont les termes sont en progression arithmétique ; par exemple, les dilutions 0,8/0,6/0,4/0,2 et qui sont peu utilisés.*

*- Les séries logarithmiques dont les termes sont en progression géométrique ; par exemple les dilutions décimales: 0,1 (10-1) ; 0,01 (10-2) ; 0,001 (10-3) ; 0,0001 (10-4), etc.*

*Les dilutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques. Leur mode de préparation est minutieux. On prépare autant de tubes qu'il y a de dilutions à effectuer en prenant des tubes stériles dans lesquels on pipette aseptiquement 9 mL de liquide diluant. Ceci permet d'obtenir une précision maximale. On se contente parfois de mettre 9 ou 10 mL d’eau physiologique ou de milieu dans les tubes en admettant que le volume tombera ou restera à 9 mL pendant l'autoclavage. Après l'avoir homogénéisée soigneusement, on prélève 1 mL dans la suspension de départ à l’aide d'une pipette de 1 mL et on le porte dans le premier tube de dilution (10-1) La pipette ne doit entrer en contact ni avec les parois des tubes, ni avec le liquide diluant. Avec une nouvelle pipette de 1 mL, on homogénéise par aspirations et soufflages le contenu de ce tube 10-1 (par ailleurs agité à la main) et on ensemence le tube 10-2 et ainsi de suite en changeant à chaque fois de pipette pour ne pas perturber les dilutions ; si une partie de la dilution prélevée doit être utilisée, on peut utiliser la même pipette à cette fin au même moment. On peut naturellement utiliser des volumes différents en respectant le facteur de dilution souhaité. Selon la nature du produit ou du germe, il est nécessaire, par sécurité, d'utiliser une propipette ou une poire en caoutchouc.*

 ***Techniques particulières***

* *Dilueurs automatiques*

*II existe divers appareils, dont certains assurent d'autres fonctions comme la préparation (broyage, homogénéisation) de l'échantillon : Gravimat (Intersciences), Dilumat (AES), Dilueur Hach (Prolabo), etc. L'avantage de ces appareils est un gain de temps et de matériel. Il est cependant nécessaire de n'utiliser que des matériaux stérilisables et de bien veiller à l'asepsie des manipulations.*

* *Utilisation de pipettes automatiques*

*Les pipettes automatiques à embout (cône) stérile à usage unique sont utilisables. Des précautions doivent être prises afin de ne pas souiller l'extrémité du corps de l'appareil au cours du prélèvement : il faut éviter de relâcher trop brusquement le bouton poussoir de la pipette, ce qui peut entraîner la projection de gouttelettes. Les pipettes automatiquessont utilisées pour l'inoculation des microplaques.*

***Choix dudiluant***

*Le diluant doit être « neutre » vis-à-vis des microorganismes : il ne doit pas être trop riche et permettre leur croissance et il ne doit pas non plus les inhiber ou les tuer (par exemple par modification brutale de pression osmotique). Certains germes sont très sensibles à l'eau distillée (staphylocoques), d'autres aux solutions salines comme l'eau physiologique ou le milieu de Ringer (Escherichia coli) : cependant cette action dénaturante n'intervient qu'après plusieurs heures. Ces problèmes peuvent être évités en utilisant un milieu adéquat (tryptone-sel) et surtout en limitant le temps de contact avec le diluant. Les techniques de revivification seront traitées dans un chapitre ultérieur.*

***1.2 Techniques de concentration***

*Il existe différentes méthodes qui permettent de séparer et d'isoler des bactéries à partir d'un grand volume de milieu. Quelle que soit la méthode de détection, y compris s'il s'agit d'une méthode « rapide », elle nécessite habituellement une étape de concentration ou d'enrichissement qui doit être la plus brève possible. La concentration proprement dite ne modifie pas le nombre de germes en valeur absolue mais elle permet leur localisation dans un petit volume. Ces techniques sont souvent nécessaires pour la mise en évidence des germes pathogènes.*

*On dispose de diverses solutions :*

*- L'enrichissement par culture qui modifie le nombre de cellules et n'est utilisable que pour une détection dans un volume donné.*

*- La séparation physique ou physico-chimique non spécifiques : filtration, centrifugation floculation-décantation (après enrichissement éventuel).*

*- La séparation par interaction de surface : interaction hydrophile-hydrophobe, interaction de charge, anticorps, lectine (après enrichissement éventuel). Dans le cas d'utilisation de ligands, ceux-ci sont souvent lié à un support : sépharose, agarose, polystyrène, latex, membranes, éléments magnétiques. Après capture et libération, il est possible de poursuivre l'analyse.*

***Parmi les différentes méthodes de concentration :***

* *Filtration.*
* *Centrifugation.*
* *Précipitation, décantation.*
* *Utilisation d'anticorps.*
* *Utilisation de lectines.*
* *Utilisation de supports magnétiques.*
* *Utilisation du spectre ultrasonique.*

***1.3 Numération après culture en milieu solide***

*Cette méthode est basée sur le fait qu'une cellule, placée sur un milieu solide favorable, donnera naissance à une colonie macroscopiquement visible. Cette technique ne permet pas de distinguer une cellule d'un amas cellulaire, toutes deux donnantes naissances à une seule colonie. Pour cette raison, les résultats s'expriment en unités formant colonie (UFC). Des dilutions décimales sont effectuées au préalable dans de l'eau physiologique.*

*Cette technique est longue à mettre en œuvre (préparation du matériel et manipulation proprement dite) et ne fournit les résultats au mieux que 24 heures après le début de l'incubation, temps nécessaire pour que les colonies atteignent une taille permettant leur dénombrement. Afin de réduire les coûts et le temps de réponse de la méthode, il est possible de travailler avec de petites quantités de gélose et de procéder à l'interprétation par observation microscopique après 3 à 4 heures d'incubation.*

***Technique classique en boîte de Pétri***

*- Techniques d'ensemencement*

*- Inoculation dans la masse*

*Dans cette technique 1 ml de chaque dilution est placé dans des boîtes de Pétri en utilisant une pipette propre que l'on peut réutiliser si on effectue les prélèvements en parlant du tube le plus dilué et en remontant vers le plus concentré. Ensuite 10 à 15 mL de milieu gélosé à 2 % en surfusion (40 à 45 °C) sont coulés dans la boîte et mélangés uniformément avec l'inoculum par un lent mouvement circulaire horizontal. Les colonies peuvent se développer en surface et en profondeur. Ce type de numération convient parfaitement aux germes aéro-anaérobies ; la faible épaisseur du milieu assure une aérobiose acceptable pour la plupart des germes aérobies mais certains peuvent être gênés ; ces conditions ne conviennent pas pour les germes anaérobies stricts (si l'incubation a lieu à l'air). Une meilleure anaérobiose peut être obtenue en coulant une nouvelle couche de milieu vierge sur la couche précédente solidifiée (numération en double couche): les germes anaérobies sont favorisés au détriment des aérobies stricts. L'inoculation dans la masse est peu adaptée à une numération sélective basée sur des caracteres coloniaux : les colonies qui se développent dans la masse sont déformées alors que celles qui le font en surface pourront s'étaler. Par ailleurs le prélèvement d'une colonie (par exemple pour un contrôle microscopique) est difficile voire impossible.*

*- Inoculation en surface*

*Dans cette technique, 0,1 mL de chaque dilution est déposé à la surface d'un milieu gélose coulé en boite de Pétri puis étalé à l'aide d'un râteau étaleur que l’on passe à la surface de la gélose pendant que l'on imprime à la boîte un mouvement circulaire horizontal. On peut utiliser le même râteau étaleur si l'on part de la suspension la plus diluée. Cette méthode peut manquer de précision, du fait de l'adhérence de quelques cellules sur le râteau : elle conduit à des valeurs inférieures à celles obtenues après inoculation dans la masse. Elle est cependant bien adaptée à des germes très aérobies qui ne peuvent se développer ou se développent mal dans la masse.il existe des variantes de la technique : 1 mL peut être étalé à la surface d'un milieu gélose coulé en boites de Pétri de grande taille (boite de 140 mm contenant 28 ml de milieu) ou étalé après répartition sous forme de trois fractions sensiblement égales à la surface de trois boîtes ordinaires.*

*- Inoculation « contact »*

*Pour réaliser des contrôles de surface, on peut utiliser des géloses coulées en boîte de Pétri qui remplissent totalement la boîte en formant un ménisque : Hygicount (AES), Count Tact (Bioméneux), etc. L'ensemencement est réalisé en appliquant directement la gélose sur la surface en exerçant une pression modérée de 10 secondes.*

*- Ensemencement « spirale »*

*Cette méthode basée sur l'épuisement de l'échantillon évite les dilutions. Une goutte de milieu (50 µL) est déposée à la surface d'une gélose en boîte de Pétri en rotation. L'aiguille s'écarte progressivement du centre vers la périphérie donnant un dépôt en spirale : appareils Spiral (Interscience). Wasp, Autoplate (AES), Rotary plater (Denley/ OSI), appareil Bioblock, etc. Le comptage s'effectue à l'œil ou à l'aide d'un compteur électronique spécial qui peut être relié à un ordinateur : Laser CCL 500 (Interscience), Protos (AES), etc.*

*- Lecture et interprétation des résultats*

*- Interprétation «classique»*

*La lecture s'effectue par comptage visuel. Dans tous les cas, seules les boîtes contenant 20 à 300 colonies sont utilisées. Le comptage des colonies peut être facilité par un léger marquage au feutre sur la boite. Le nombre de colonies obtenu pour une boîte permet de remonter à la concentration microbienne de départ :*

*- Lorsqu'aucune boîte ne présente de colonies, on conclut « moins de 1 germe par gramme ou par mL » lorsque l'on travaille directement à partir du produit, ou « moins de 1.10x germes » si l'on travaille à partir d'une dilution 10-x. il ne faut pas oublier, le cas échéant, le facteur de dilutionpouvant intervenir lors de la fabrication d'une suspension mère à partir du produit brut.*

*- Lorsque le nombre de colonies est, pour toutes les dilutions, inférieur à 20, on conclut « moins de 20 germes par gramme ou par mL » lorsque l'on travaille directement à partir du produit, ou « moins de 20.10x germes » si l’on travaille à partir d'une dilution, 10x étant l'inverse du taux de dilution le plus grand contenant 1 germe.*

*- Lorsque le nombre de colonies est compris entre 20 et 300, on calcule pour chaque dilution ayant donné ce résultat, le nombre moyen de colonies, en effectuant la moyenne du nombre trouvé pour chaque boîte de la même dilution. On arrondit de manière à n'avoir que deux chiffres significatifs et on multiplie par l'inverse du taux de dilution. On effectue ensuite la moyenne des valeurs provenant des diverses dilutions utilisables si leur rapport n'excède pas deux, sinon on prend le nombre le plus faible. Le résultat est exprimé par « X germes par gramme ou par mL ».*

*Lorsqu'on utilise les valeurs pour deux dilutions successives, on peut utiliser la formule : N = ∑C/1,1 d, avec c nombre de colonies des boîtes et d taux de la première dilution.*

* *Lorsque le nombre de colonies est supérieur à 300, on exprime le résultat par « plus de 300.10x germes par gramme ou par mL », 10x étant l'inverse de la plus forte dilution concernée.*

***Comptage automatique***

*Les premiers compteurs utilisés ont été des systèmes à loupe avec marqueur enregistreur. Il existe actuellement divers appareils automatiques basés sur l'utilisation d'un balayage lumineux (dont des systèmes laser) ou l'analyse d'image : Biotran Clll (New Brunswick), Biomatic (Foss electric), BACC630 (3M), Colony counter (Fisher/ OSI), Spiral. Scan 500, CCL 500 (Intersciences), Protos (AES), Casba (Spiral Biotech), etc.*

***1.4 Numération après culture en milieu liquide***

*Principe*

*Celle méthode est basée sur le fait qu'après ensemencement d'un milieu liquide, toute croissance microbienne indique la présence d'au moins un germe (UFT : Unité Formant Trouble). Le développement peut être apprécié visuellement, par turbidimétrie, par virage d'un colorant, etc. Bien que moins précise, elle présente divers avantages sur la technique en milieu solide :*

* *à composition de milieu identique, elle facilite le développement des micro-organismes.*
* *Elle permet d'analyser des quantités élevées de produits, ce qui est important pour la recherche des germes pathogènes.*
* *Elle permet d'étudier plusieurs caractères à la fois (croissance, modification de pH, production de gaz. etc.).*

***1.5 Numération par microscopie***

*On peut déterminer le nombre total de cellules par numération sous le microscope. Cette technique est couramment utilisée avec les levures mais elle est plus laborieuse avec les bactéries compte tenu de leur faible taille. Lorsque les micro-organismes sont mobiles, il faut pratiquer une fixation ou les mettre en suspension dans un milieu visqueux.*

***Parmi les techniques de numération par microscopie on trouve :***

* *Comptage à l'hématimètre.*
* *Numération sur frottis.*
* *Numération microscopique directe après filtration : DEFT (direct epifluorescence filter technique).*
* *Numération microscopique après culture.*