TD n 06

Dénombrements Bactériens

1- Introduction :

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

2- Méthodes de dénombrement :**2-1 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).

*** 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.**

2-2 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.

- Estimation du nombre le plus probable (MPN).

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).

Exercice I

L'analyse bactériologique d'une urine infectée donne le tableau de résultats suivant, sachant que l'on a ensemencé 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

- 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.

Remarque :

Parmi les boîtes comptables on ne considèrera 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.

Exercice II :

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 été ensemencé 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 volume ensemencé 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		

Remarque :

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.