

TP9 Dénombrement des microorganismes : méthode de Breed . DEFT, enseigneur spiral

1. Méthode de Breed

Principe

Cette méthode consiste à déposer un volume connu $V=0,01\text{mL}$ soit $10\mu\text{L}$ de suspension microbienne sur une surface délimitée et à dénombrer au microscope le nombre de cellules présentes par champs et donc dans le volume V .

Technique

- Délimiter sur une lame sur une surface $S = 1\text{cm}^2$ et étaler sur cette surface un volume $V = 10\mu\text{L}$ de suspension à dénombrer. Sécher, colorer (au bleu de méthylène, cristal violet..).
- Dénombrer les micro-organismes dans au moins 10 champs microscopiques, n est le nombre moyen de micro-organismes par champs (il convient de dénombrer un nombre de champs permettant de totaliser au moins 200 cellules)

Si nécessaire, diluer la suspension au préalable (dilution d)

- La surface s a un champ est déterminée au préalable avec une lame micrométrique graduée qui permet de mesurer le diamètre du champ.

*Le micromètre objet comporte 100 graduations espacées de $10\mu\text{m}$ ce qui représente donc 1 mm.
Effectuer la mesure du diamètre avec les 3 objectifs.*

Compte rendu

- 1.1. Calcul de la surface s d'un champ avec les 3 objectifs.
- 1.2. Exprimer N en fonction de S , V , n , s et éventuellement d . N est la, concentration en microorganismes par mL. Application numérique.
- 1.3. Analyse critique de la méthode (intérêts, inconvénients)
- 1.4. Quelle est la limite de détectabilité de la méthode si on considère qu'elle est atteinte pour $n = 1$ (1 microorganisme par champs).

2. Observation et dénombrement par DEFT (Direct Epifluorescent Filter)

Technique

On utilise une culture en milieu liquide d'*E.coli* (estimée à.....) et de *Saccharomyces cerevisiae* (estimée à.....).

- Monter le système de filtration (attention: fragile!) sous vide avec une membrane en polycarbonate
- Filtrer une prise d'essai $V = 1\text{ mL}$ d'échantillon dilué d fois dans de l'eau physiologique.
- Rincer avec quelques mL d'eau distillée
- Mettre en contact pendant 2 minutes la membrane avec 2mL d'acridine orange à $0,1\text{mg/mL}$ en tampon citrate $\text{pH} = 6,6$. Filtrer.
- Laver avec 2,5mL de tampon citrate $\text{pH} = 3$.
- Sécher la membrane; monter sur une lame et observer sous huile au microscope à fluorescence

(objectif 100 pour les bactéries, objectif 10 ou 40 pour les levures)

Attention

- 1) Attention à l'extinction de la fluorescence-» observer rapidement
- 2) L'acridine et le DAPI sont cancérigènes : ne travailler qu'avec des solutions prêtes à l'emploi. Mettre des gants.

Récupérer les déchets qui devront être traités au charbon actif.

- 3) Évaluer au préalable la dilution à effectuer de la culture pour que le comptage soit satisfaisant.

Il faut connaître la surface $S = 3,2\text{ cm}^2$ de la membrane, la surface s d'un champ (à mesurer), le volume V filtré, la concentration microbienne N initiale estimée. On considère que la surface d'un champs est la

même pour le microscope à fluorescence que pour le microscope oculaire testé.

Compte rendu

- 2.1. Expliquer les dilutions de la culture effectuée.
- 2.2. Résultats

3. Ensemenceur spiral

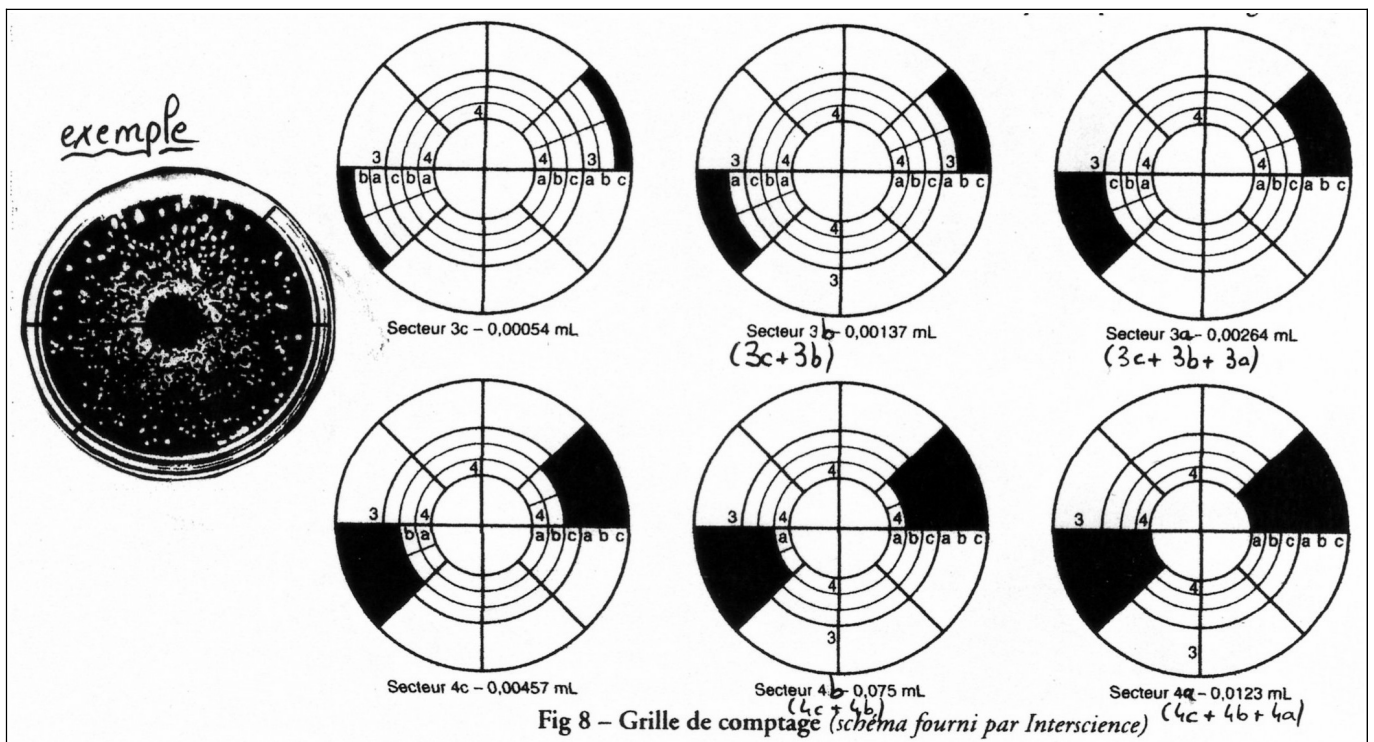
Principe

C'est un système semi-automatique qui consiste à déposer l'inoculum, par l'intermédiaire d'un stilet creux, au centre de la boîte contenant le milieu gélose, puis à déplacer en spirale (spirale d'Aichimède) ce stilet distributeur d'inoculum ; au total, 50µL sont déposés. La densité du dépôt varie dans un rapport de 1 à 10³ ou 10⁴ depuis le centre jusqu'à la périphérie cette décroissance permet la séparation des colonies en périphérie (Fig. 7).

Après incubation, la concentration est déterminée par le rapport entre le nombre de colonies et le volume de l'échantillon contenu dans le secteur de la boîte où le dénombrement a été fait.

Dénombrement

Seuls servent au dénombrement les secteurs où les colonies sont convenablement espacées ; le comptage est réalisé manuellement à l'aide d'une grille qui divise la surface de la boîte en secteurs concentriques de plus ou moins grande surface (Fig. 8).



À chaque surface délimitée par la grille correspond un volume d'échantillon. Afin de compenser toute irrégularité dans la distribution des colonies, les surfaces équivalentes des secteurs opposés sont comptées. On dénombre les colonies du secteur choisi. Si le nombre de colonies du secteur est supérieur à 20, ce nombre est noté pour le volume du secteur. Si le nombre de colonies du secteur choisi est inférieur à 20, on continue sur le secteur suivant et le nombre trouvé correspond au volume des deux secteurs.

EXEMPLES

Si pour le secteur 3c on dénombre N = 28 colonies, ces 28 colonies proviennent de V = 0,54
 Si pour le secteur 3c on dénombre 15 colonies, on poursuit la numération sur le secteur 3b; on dénombre alors 15 + 19 = 34 colonies provenant d'un volume de 1,37µL.

Expression du résultat

Soit n_1 et n_2 colonies dénombrées sur une surface correspondant à V mL, alors N (nombre de microorganismes par mL d'échantillon) s'exprime par :

$$N = (n_1 + n_2) \cdot \frac{1}{V}$$

EXEMPLE

21 et 16 colonies sur secteur 4a de 12,3 μ L :

$$N = 37 \cdot \frac{1}{0,0123}$$
$$N = 3 \cdot 10^3 \text{ colonies/mL}$$

Un compteur laser peut être associé à l'Ensemenceur spiral® et, dans ce cas, le dénombrement se réalise automatiquement par détermination de la surface contenant 100 colonies numérées.