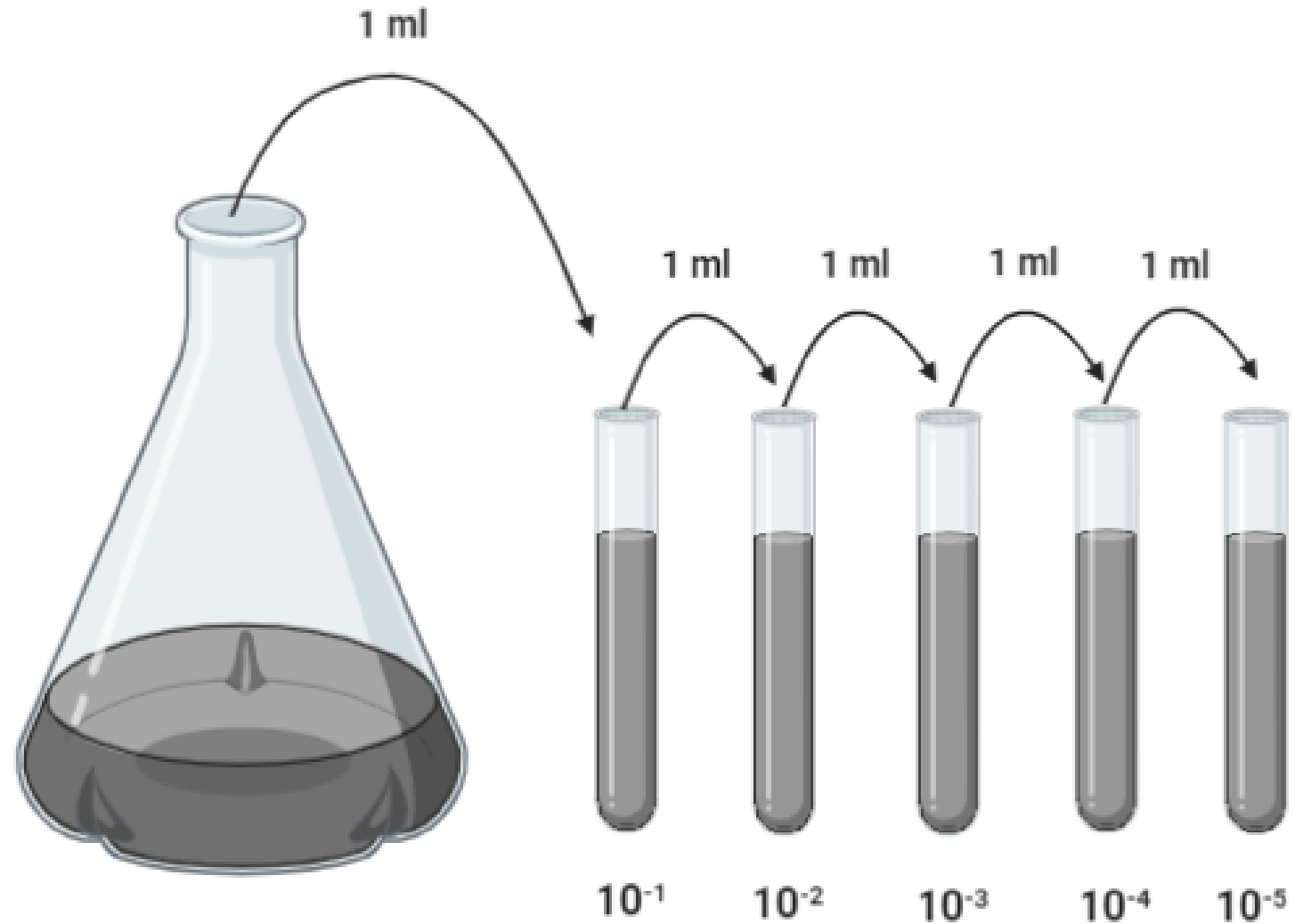


Principales techniques de numération des microorganismes

Techniques de numération

Techniques de dilution

Pour réduire la charge microbienne. Si le produit est solide, on ne peut pas le pipeter. L'analyse comprend obligatoirement la réalisation d'une suspension de l'aliment broyé dans un liquide qui le diluera. On s'arrange toujours pour que la dilution soit alors 1/10.



Techniques de numération directe au microscope

Comptage direct au microscope en cellules de comptage

Effectuer le dénombrement sur une dizaine de carrés ou rectangles unitaires.

Pour obtenir un résultat statistique satisfaisant, on compte au moins 10 et au plus 100 cellules par unité de surface « rectangle » sur une dizaine de carrés.

La moyenne est ensuite effectuée, et on calcule la concentration en microorganismes de la suspension par la formule suivante :

$$N = \frac{n_{\text{moy}} \cdot n \cdot 10^3}{V_{\text{tot}}}$$

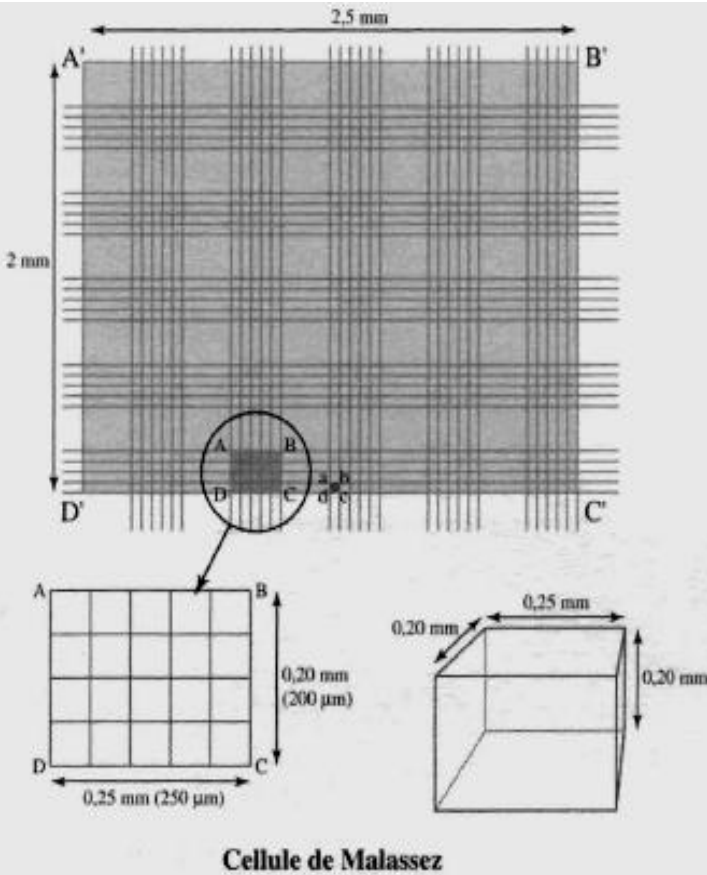
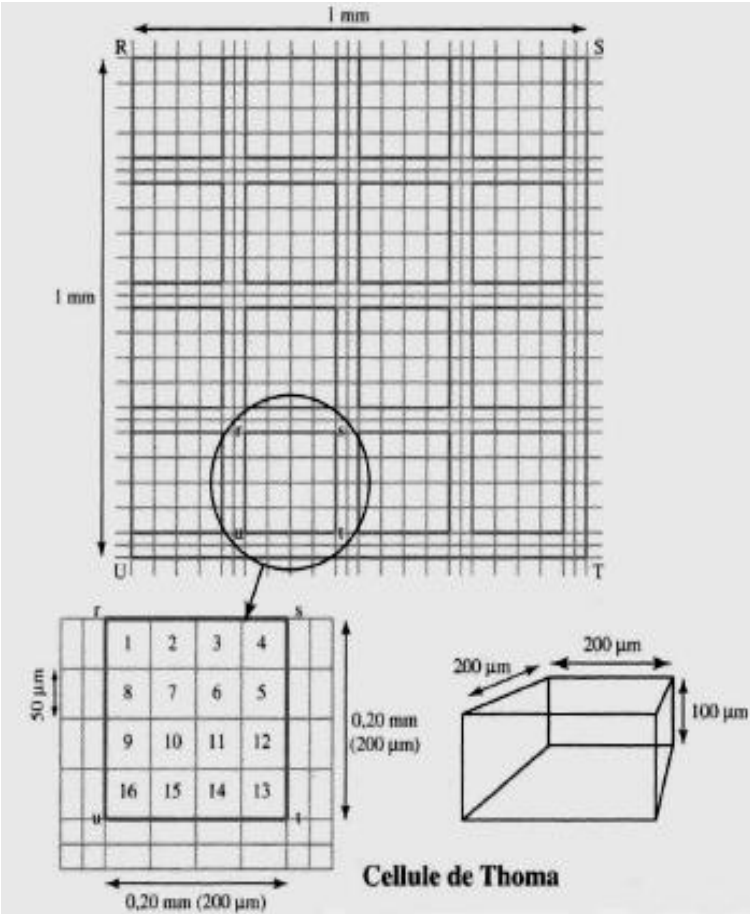
n_{moy} : nombre moyen de cellules par rectangle.

n : nombre de volumes unitaires contenus dans le volume total de la cellule correspondant aux «rectangles » ou « aux carrés » du quadrillage.

$V_{\text{tot}} = p \times s$: volume total de la cellule de comptage (mm³).

N : nombre de microorganismes par mL.

	p (mm)	s _{tot} (mm ²)	V _{tot} (mm ³)	n	Seuil (unités/rnL)
Cellule de Malassez (rectangles)	0.2	5	1	100	10 ⁵
Cellule de Thoma (carrés)	0.1	1	0.1	16	10 ⁶



Méthode de Breed : DMC (*Direct Microscopic Count*)

Cette méthode consiste à déposer un volume connu $V = 0,01 \text{ ml}$, soit $10 \mu\text{L}$, de suspension prélevée à l'anse calibrée sur une surface délimitée de la lame et de réaliser un frottis ($S_{\text{frottis}} = 1 \text{ cm}^2$).

Pour le mode opératoire, Après fixation et coloration, différentielle ou non, du frottis (Gram ou bleu de méthylène), on ajoute de l'huile à immersion ; la lame est observée à l'objectif x 100. Le nombre de bactéries par champ est compté sur un nombre de champs compris entre 20 et 50. Il faut déterminer la surface réelle d'un champ microscopique. On peut utiliser une lame micrométrique qui permet de mesurer le diamètre D du champ microscopique à l'objectif 100 (D en cm de l'ordre de $0,13 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$ à $0,21 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$). On détermine le nombre moyen de microorganismes par champ (n_{moy}). Le résultat peut s'exprimer à partir de la formule suivante :

$$N = \frac{n_{\text{moy}} \cdot S_{\text{frottis}}}{V \cdot S_{\text{champs}}}$$

n_{moy} : nombre moyen de cellules par champ (microorganismes).

S_{frottis} : surface d'étalement du frottis (cm^2) ; $S_{\text{frottis}} = 1 \text{ cm}^2$.

S_{champs} : $\frac{\pi \cdot D^2}{4}$ exprimé en cm^2 , D est le diamètre du champs (cm).

V : volume de prélèvement.

N : concentration en microorganismes/ml.

Méthode par cytométrie sur filtre (CSF) et observation par épifluorescence DEFT (*Direct Epifluorescent filter technique*) :

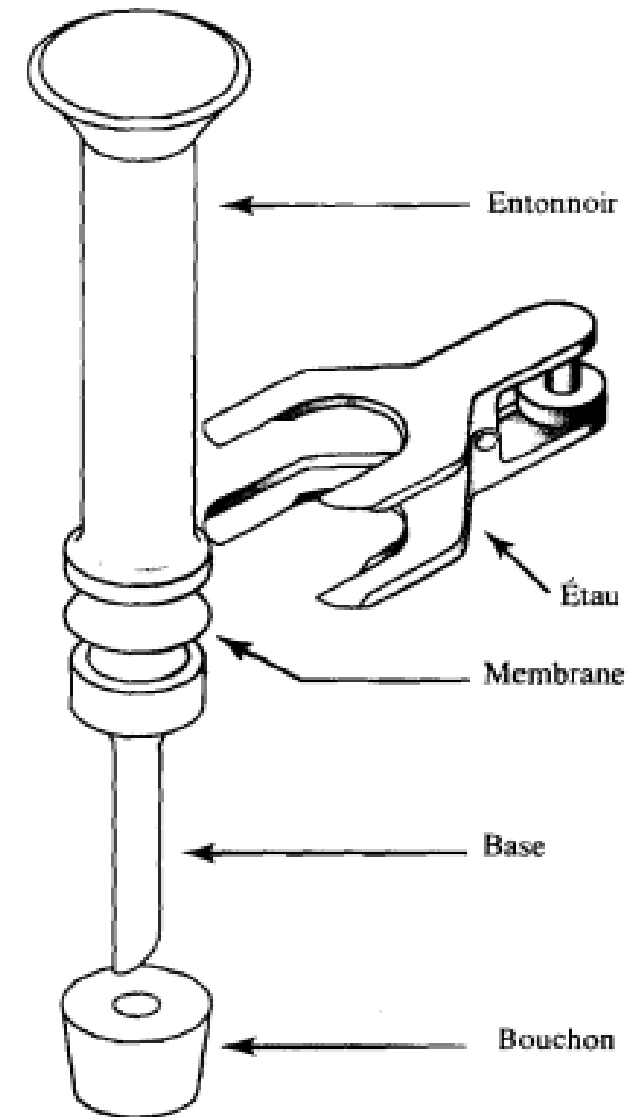
Pour être appliquée à une observation microscopique directe, on utilise aujourd'hui des membranes filtrantes planes microporeuses en **polycarbonate**.

Ils permettent d'observer au microscope les bactéries retenues à la surface de ces membranes, car ces bactéries se trouvent toutes sur le même plan focal. Cette filtration nécessite un appareillage de filtration sous vide particulier car les filtres commercialisés sont de 2 cm de diamètre.

Pour améliorer le contraste qui permet une bonne lecture « à l'œil », **des techniques de coloration** par un **fluorochrome**, **l'acridine orange**, suivies d'observation à l'aide d'un microscope à **épifluorescence**, ont été mises au point. L'acridine orange donne de bons résultats quant à la sensibilité du comptage, elle est de 6 000 microorganismes par gramme d'aliment. Ce fluorochrome excité à 490 nm (couleur bleue) permet de distinguer les cellules mortes ou inactives : la structure secondaire des acides nucléiques modifie la longueur d'onde d'émission du fluorochrome lorsqu'il s'intercale entre les bases azotées.

Les ADN bicaténaire fluorescent **en vert** et sont majoritaires dans les cellules inactives ou mortes : le rapport ARN/ADN est faible ;

Les ARN monocaténaire fluorescent **en orange** et sont majoritaires dans les cellules en croissance : le rapport ARN/ADN est élevé.



Mode opératoire :

- Une prise d'essai (V ml) d'une dilution convenable de l'échantillon, réalisée en fonction de la richesse de la suspension à analyser, est filtrée sur une membrane de surface totale S_{membrane} adaptée au système de filtration. La filtration est effectuée sous vide.
- Mettre en contact pendant 2 minutes la solution d'acridine orange à 0,25 mg/L en tampon pH6,6, puis effectuer une percolation à travers la membrane.
- Laver avec un tampon citrate à pH3 (et à l'isopropanol si l'échantillon a été prétraité au triton X100).
- Sécher la membrane.
- Sur une lame propre, déposer une goutte d'huile à immersion, puis la membrane, puis une goutte d'huile à immersion, et enfin une lamelle.
- Observer sous huile à l'objectif x100.

Pour donner le nombre des bactéries ou des levures on applique la formule suivante :

$$N = \frac{n_{\text{moy}} \cdot S_{\text{membrane}}}{V_{\text{tot}} \cdot S_{\text{champs}}}$$

n_{moy} : nombre moyen de cellules par champ (microorganismes).

S_{membrane} : surface de la membrane de filtration (cm^2) = 3.2 cm^2 .

V_{tot} : volume d'échantillon filtré (ml).

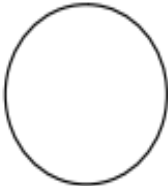
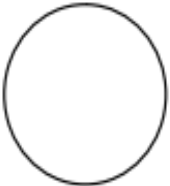
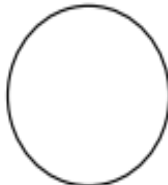
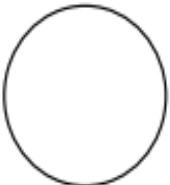
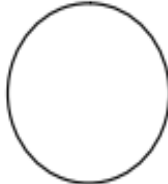
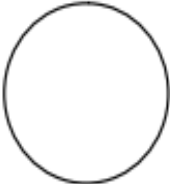
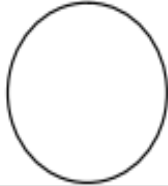
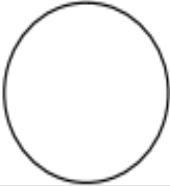
S_{champs} : $\frac{\pi \cdot D^2}{4}$ exprimé en cm^2 , D est le diamètre réel du champ (cm).

N : concentration en microorganismes/ml.

Techniques de numération après cultures des microorganismes (indirecte)

Examiner les boîtes et choisir celles contenant **entre 15 (30) et 300 colonies**, compter avec soin les colonies en les marquant au fur et à mesure, à l’aide d’un marqueur, sur le font extérieur de la boîte.

Dans le cas d’un produit solide, le broyage ou la mise en suspension initiale est considérée comme une dilution dont il faut tenir compte. Si par exemple **10 g** de produit ont été mis en suspension dans **90 ml**, on considère que **1 ml** de cette suspension correspond à **0,1 g** de produit.

Inoculum 1cm ³ (1ml) de chaque dilution	1 ^{re} boîte	2 ^e boîte	Nombre de colonies		moyenne	Nombre de bactéries/cm ³
produit pure 10 ⁰			1 ^{re} boîte	2 ^e boîte		Résultats non interprétables.
			Trop nombreuses			
dilution 10 ⁻¹			304	287	295 soit=300	300 x(10 ¹)=300 300x10=300
Dilution10 ⁻²			26	38	32 soit 30	30x(10 ²)=300 30x100=300
Dilution10 ⁻³			6	2	-	Résultats non interprétables. (colonies rares)

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

C : somme des colonies comptées sur toutes les boites retenues.

N : le nombre de microorganismes présent dans l'unité de mesure (ml).

n_1 : le nombre de boites retenues dans la première dilution.

n_2 : le nombre de boites retenues dans la deuxième dilution.

d : le taux de dilution de la première dilution.

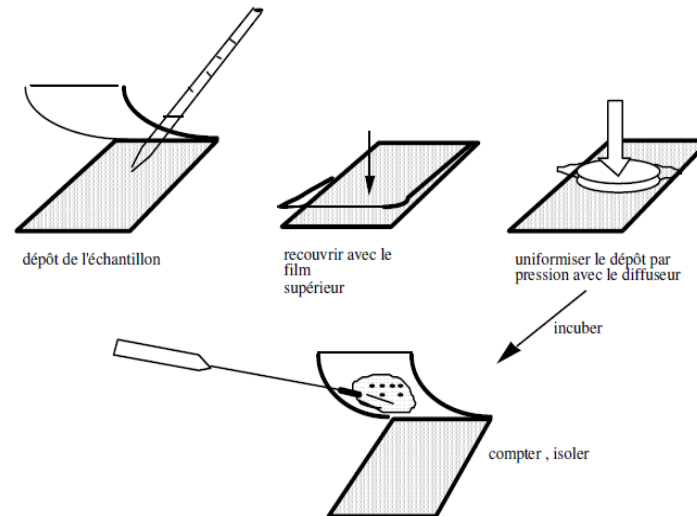
Petrifilm Système 3M

Le Petrifilm est constitué d'un film rigide quadrillé, dessinant des carrés de 1 cm² de surface, qui sert de support à un milieu gélifié approprié. Il existe plusieurs applications, chacune différant par le milieu supporté par le film inférieur. Le milieu est protégé par un film souple, qui est soulevé lors de l'inoculation ; l'inoculum (1 ml) est déposé au centre du film rigide quadrillé. Le film souple protecteur est rabattu et un diffuseur est appliqué sur le tout pour que l'inoculum soit réparti sur toute la surface du quadrillage, soit 20 cm².

Les deux films sont perméables à l'oxygène. Après l'incubation, le dénombrement des colonies obtenues se fait à l'œil nu et se trouve facilité par le quadrillage ; on dénombre les films comprenant entre 30 et 300 colonies.

Le système Petrifilm est disponible pour :

- La flore totale ;
- Les levures et les moisissures ;
- E. coli;
- Les coliformes.



Techniques de dénombrement sur milieux liquides (indirecte)

Méthode de Mac Grady, technique du nombre le plus probable (NPP)

	<div>1ml 10⁰</div> <div></div>	<div>1ml 10⁻¹</div> <div></div>	<div>1ml 10⁻²</div> <div></div>	<div>1ml 10⁻³</div> <div></div>	<div></div> <div></div>
OBSERVATION (méthode en triple essai)					
DILUTIONS	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
GROUPEMENT DES RESULTATS	+ + +	+ + +	+ + -	+ - -	- - -
NOMBRE CORRESPONDANT	3	3	2	1	0

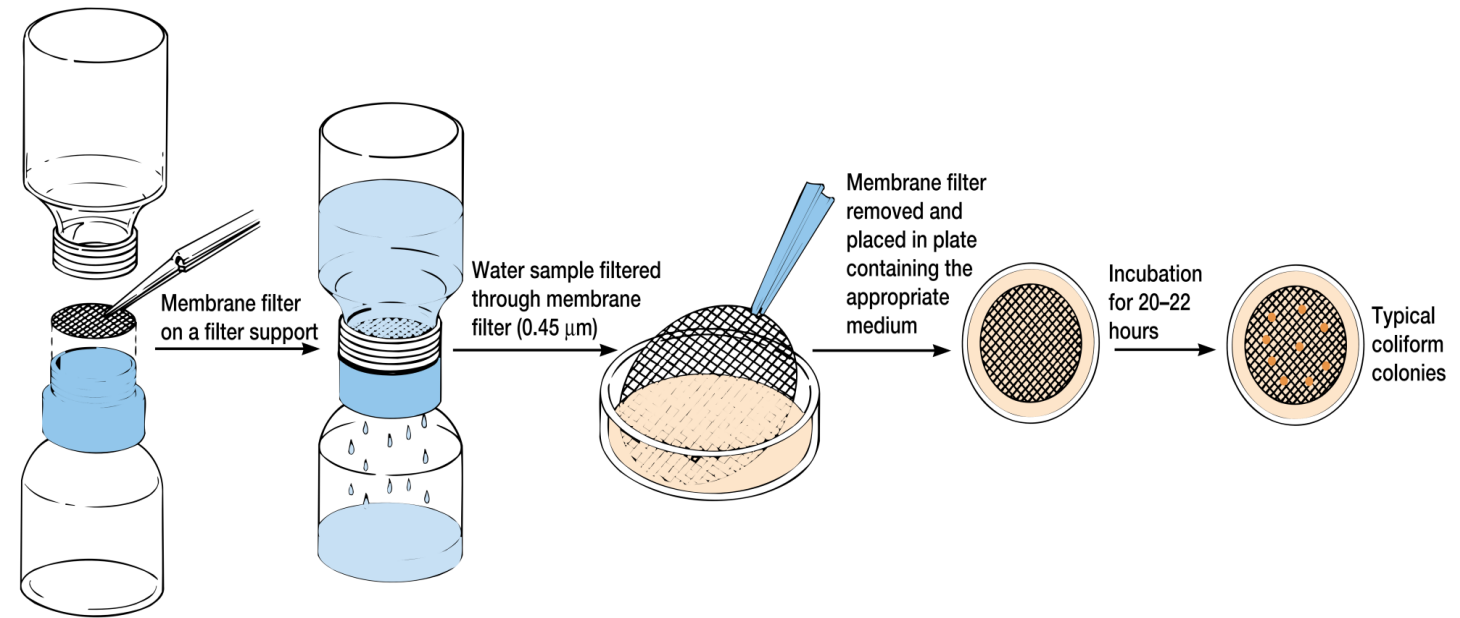
Après le choix du chiffre, lire la valeur de n correspondante dans une table de calcul de NPP. Le chiffre des centaines (**1** dans le cas de **110**) correspond à la dilution à considérer pour donner le NPN par ml de produit En déduire :

$$C \text{ bactéries} = \frac{n}{\text{valeur de la dilution correspondant au premier chiffre}}$$

Techniques de dénombrement par filtration

Cette méthode consiste à faire passer un certain volume d'échantillon ou de ses dilutions au travers d'une membrane filtrante (par exemple une membrane Millipore ou Sartorius ou ...de 47 mm de diamètre et dont la porosité moyenne est de 0,45 µm à 0,22 µm) sur laquelle sont retenus les microorganismes recherchés.

Le filtre est alors posé sur la surface d'un milieu de numération imbibant un filtre adéquat ou sur un milieu gélosé spécifique du germe à rechercher, face portant les micro-organismes vers le haut. Après incubation, comme dans le cas de la numération en milieu gélosé, on compte les colonies formées à la surface du filtre.



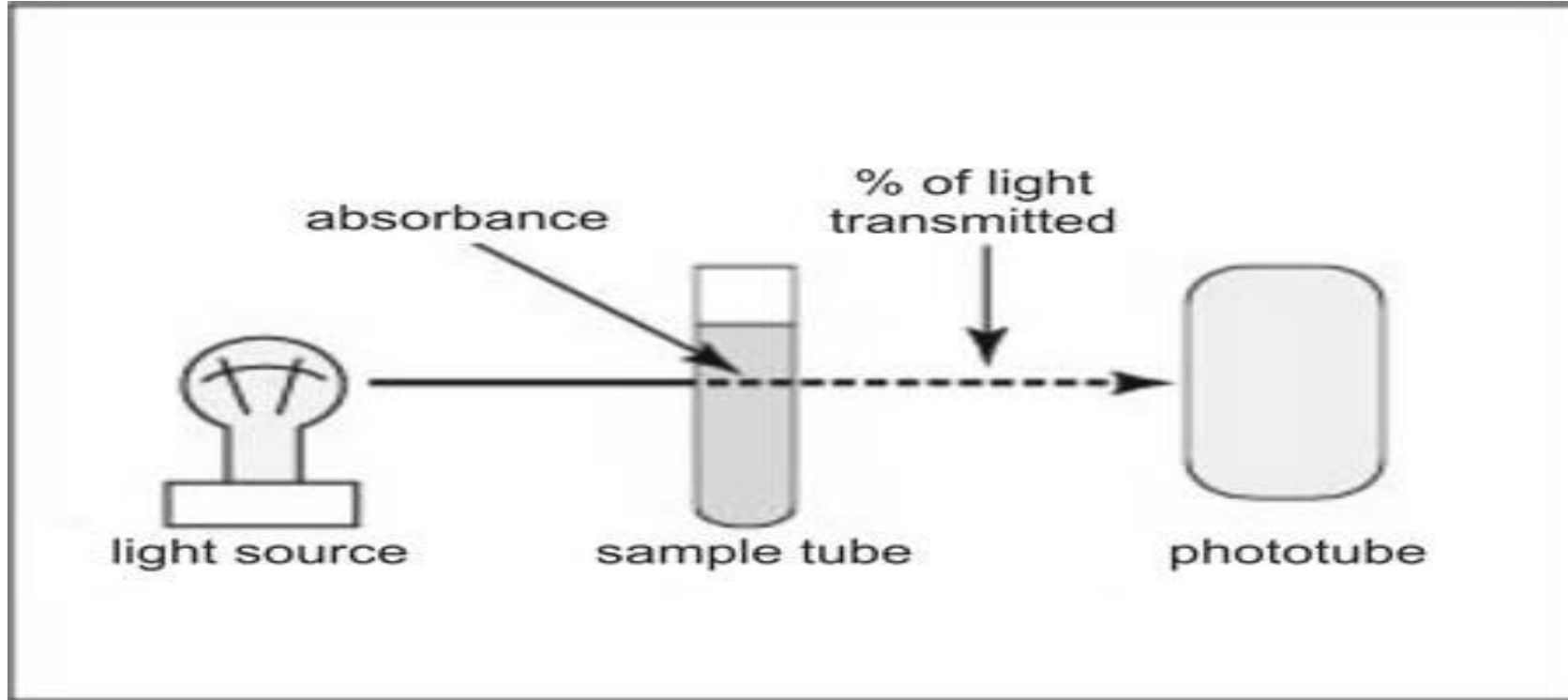
La formule permettant le calcul du nombre de microorganismes par unité d'échantillon est la suivante : $N = n \cdot \frac{1}{V}$

n = nombre de colonies identifiées et comptées sur la membrane.

V = volume en ml de l'échantillon, ou de sa dilution, filtré.

Si une dilution de l'échantillon a été nécessaire, ce résultat sera multiplié par l'inverse du taux de dilution pratiqué.

Mesure de trouble



C'est le procédé le plus simple le plus rapide et actuellement le plus utilisé pour évaluer la masse microbienne. Il s'agit d'une méthode optique générale appelée **turbidimétrie** fondée sur la propriété que présente toute suspension de diffracter d'une partie de l'intensité d'un faisceau de lumière qui la traverse en ligne droite.

L'absorbance est proportionnelle à la concentration cellulaire. Les mesures sont effectués à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 650 nm pour laquelle une absorption de la lumière par les constituants cellulaires est la plus faible.

Méthodes automatisées

Cytométrie en flux (CMF)

La cytométrie en flux (CMF) est une méthode d'analyse qui permet, à grande vitesse, de caractériser et compter des cellules (ou des particules) en suspension dans un flux liquidien. L'interaction de ces éléments avec la **lumière émise** par une ou plusieurs sources lumineuses (**lasers** en général) permet de caractériser les cellules selon différents critères tels que la **taille** ou la **granularité**, détectés grâce à la diffusion de la lumière, ou l'expression de molécules de surface (souvent nommées CD pour **cluster of differentiation**) généralement révélées par un composé **fluorescent** couplé à un **anticorps monoclonal** dirigé contre le CD d'intérêt.

Un cytomètre de flux comporte plusieurs systèmes :

Un système fluidique pour introduire, canaliser les cellules et les amener au niveau du laser. Les cellules en suspension sont introduites dans une veine liquide sous pression (liquide de gaine) qui aura pour effet d'aligner et espacer les cellules en vue de l'analyse ;

Un système optique qui se compose de lasers et de filtres pour exciter, détecter et amplifier les différents signaux émis (miroirs dichroïques, photomultiplicateurs) ;

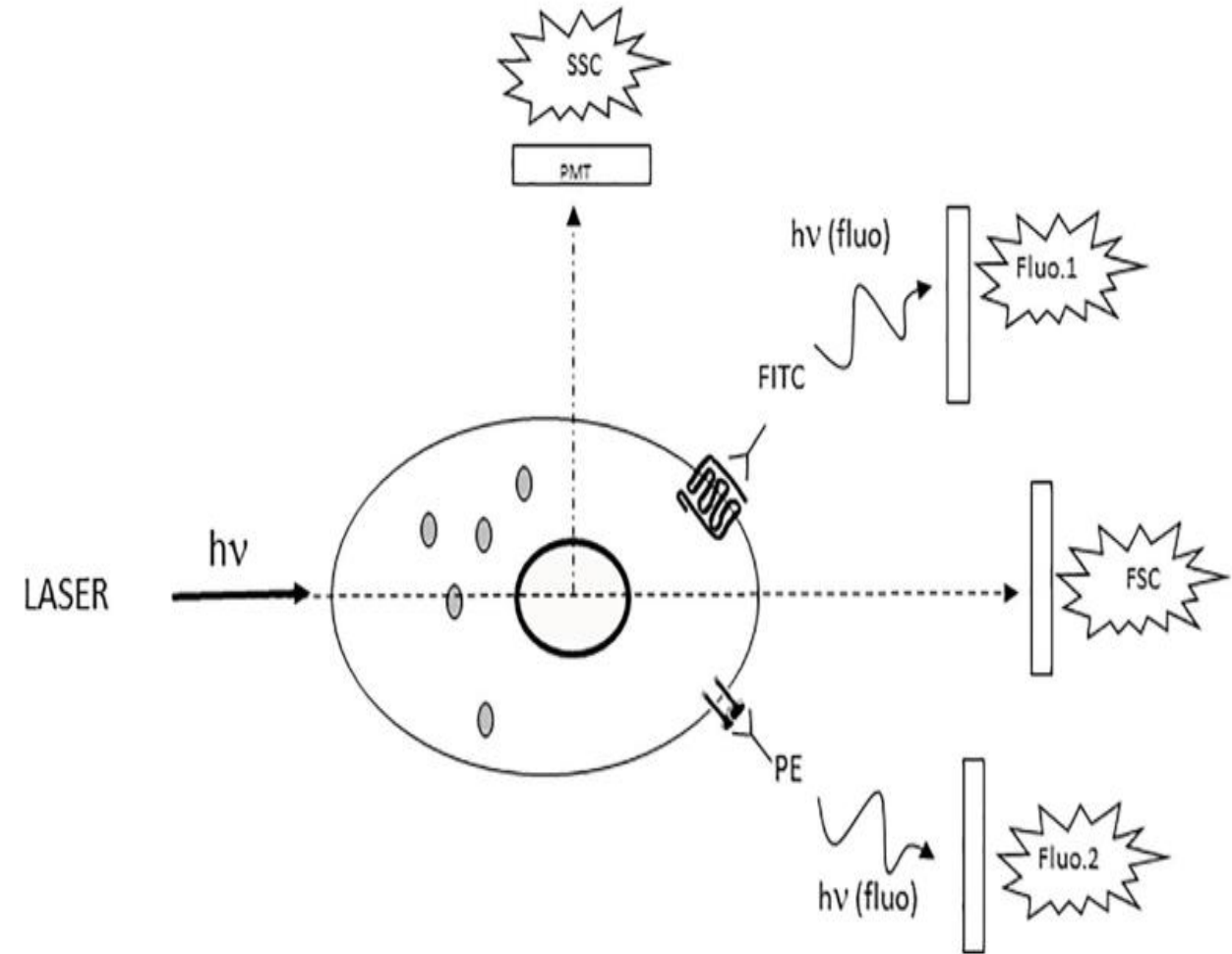
Un système électronique pour convertir les signaux optiques (photons) en des signaux électroniques (volts). Les signaux sont ainsi récoltés par des photomultiplicateurs, afin d'être amplifiés, numérisés et stockés dans un ordinateur ;

Un système informatique pour visualiser ces signaux.

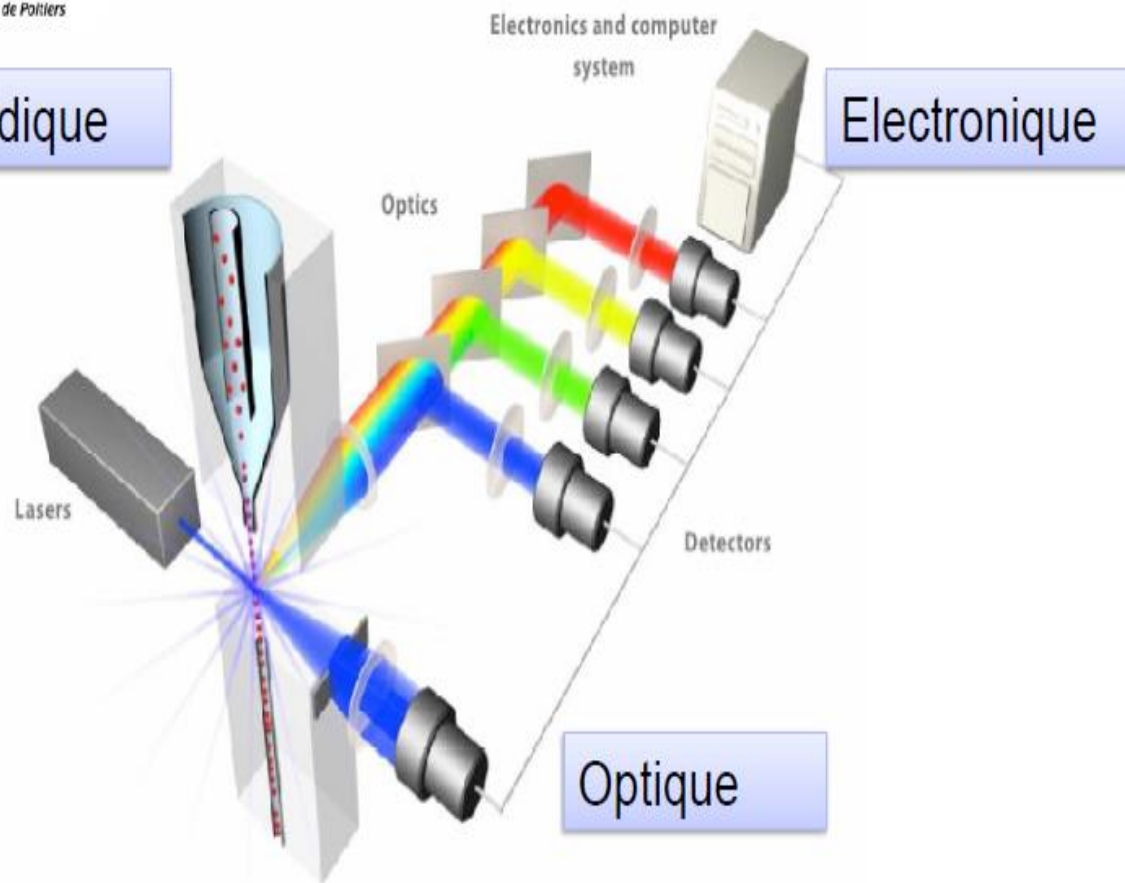
Principe général de la cytométrie en flux. Les cellules en suspension dans un flux liquidien passent une à une dans un faisceau laser.

La lumière du laser va également exciter des fluorochromes préalablement couplés à des anticorps monoclonaux capables de reconnaître et fixer certaines protéines. Sachant que les fluorochromes réémettent la lumière à différentes longueurs d'onde (loi de Stoke), un même laser peut activer jusqu'à cinq fluorochromes qui donneront cinq informations différentes.

Un système de filtre optique et de photomultiplicateur va permettre de collecter la lumière propre à chaque fluorochrome et de la quantifier.



Fluidique



BD FACSVerse



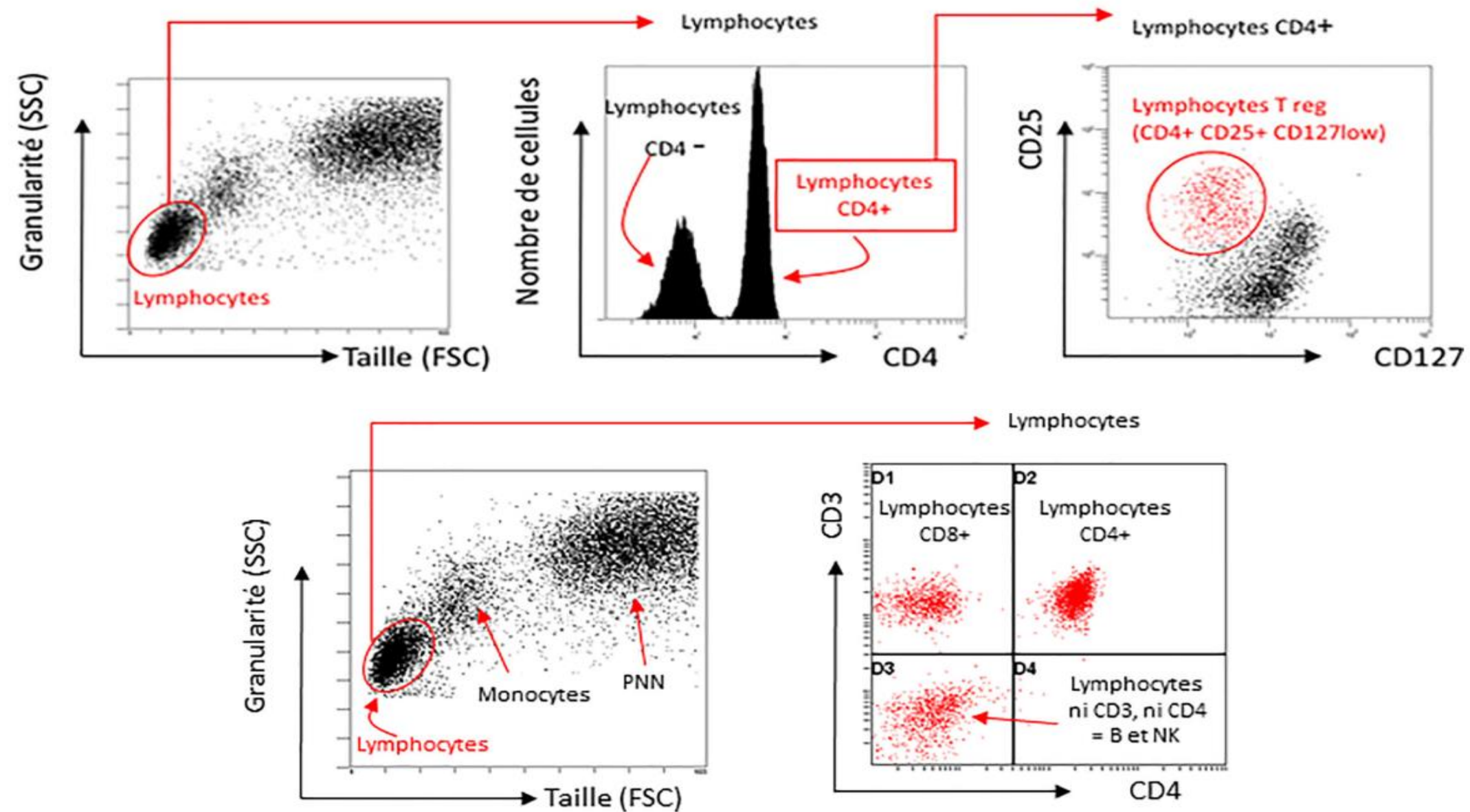
BD FACS Aria III

Les marqueurs fluorescents utilisés sont de deux catégories :

1. Marqueurs de viabilité des cellules. Ce sont des substrats **non fluorescents** qui, après avoir traversé la membrane, libèrent sous l'action d'une enzyme active du métabolisme cellulaire un composé **fluorescent** qui reste dans le cytoplasme. Ces substrats fluorogènes enzymatiques doivent être adaptés aux microorganismes recherchés, ils ne colorent que des cellules vivantes ;
2. Marqueurs spécifiques de la population que l'on souhaite dénombrer (par exemple : flore totale, coliformes, levures). Ce sont alors des anticorps monoclonaux ou des sondes nucléiques. Cette technique est utilisée pour le dénombrement des cellules somatiques dans le lait cru, ainsi que pour le dénombrement et le tri de la flore spécifique du yaourt à l'aide des sondes spécifiques.

Représentation graphique des résultats

Lors d'une analyse en CMF, plusieurs histogrammes peuvent être créés :

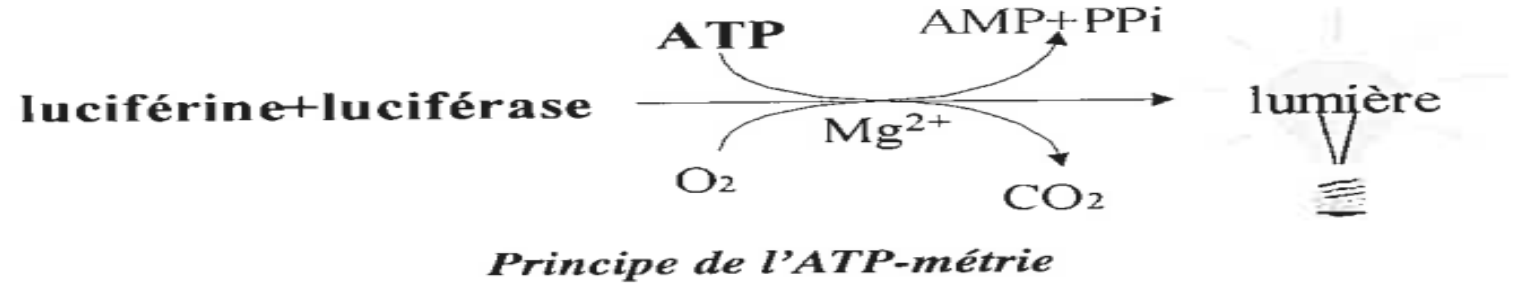


2. Dosage de l'ATP (ATP métrie)

La quantité de lumière émise à l'issue de la réaction est proportionnelle à la concentration d'ATP présente dans le milieu réactionnel à l'instant zéro.

Si le milieu à analyser renferme des cellules non microbiennes (ainsi dans le lait cru, par exemple, il y a présence de cellules épithéliales, de leucocytes), il sera nécessaire de réaliser une extraction sélective de l'ATP parasite de ces cellules grâce à des perméabilisant membranaires, puis de la détruire par hydrolyse (ATPase).

Figure 2 : **L'ATP-MÉTRIE UTILISE LA BIOLUMINESCENCE**



mesure rapide de la concentration de la biomasse active



En présence de **Mg²⁺**, d'**ATP** et d'oxygène, la **luciférine** est oxydée sous l'action de la luciférase en **oxylucif rine** avec production de **lumière**.

Extraction:

- Provoquer la rupture des enveloppes cellulaires pour libérer l'**ATP** dans le milieu, de manière quantitative et reproductible ;
- Inhiber rapidement les **ATPases** et toutes les enzymes extracellulaires.

La quantité de lumière émise à l'issue de la réaction est proportionnelle à la concentration d'ATP présente dans le milieu réactionnel à l'instant zéro.

Elle est recueillie par un tube photomultiplicateur qui l'amplifie et la transforme en courant électrique dont l'intensité est mesurée et exprimée en unités arbitraires ou Unités Relatives de Lumière (RLU).

La vitesse de la réaction est maximale à 24°C, et très peu modifiée entre 18°C et 28°C. La sensibilité du fluorimètre permet de doser 10^{-13} g d'ATP, donc théoriquement 100 bactéries dans le volume prélevé de l'échantillon. La quantité d'ATP dans un milieu est en relation directe avec l'activité et le nombre des microorganismes.

ATP-mètre

Valise de transport

Écouvillon
dans son tube
de stockage
stérile



Compartiment de mesure

Écouvillon

Bouchon hermétique

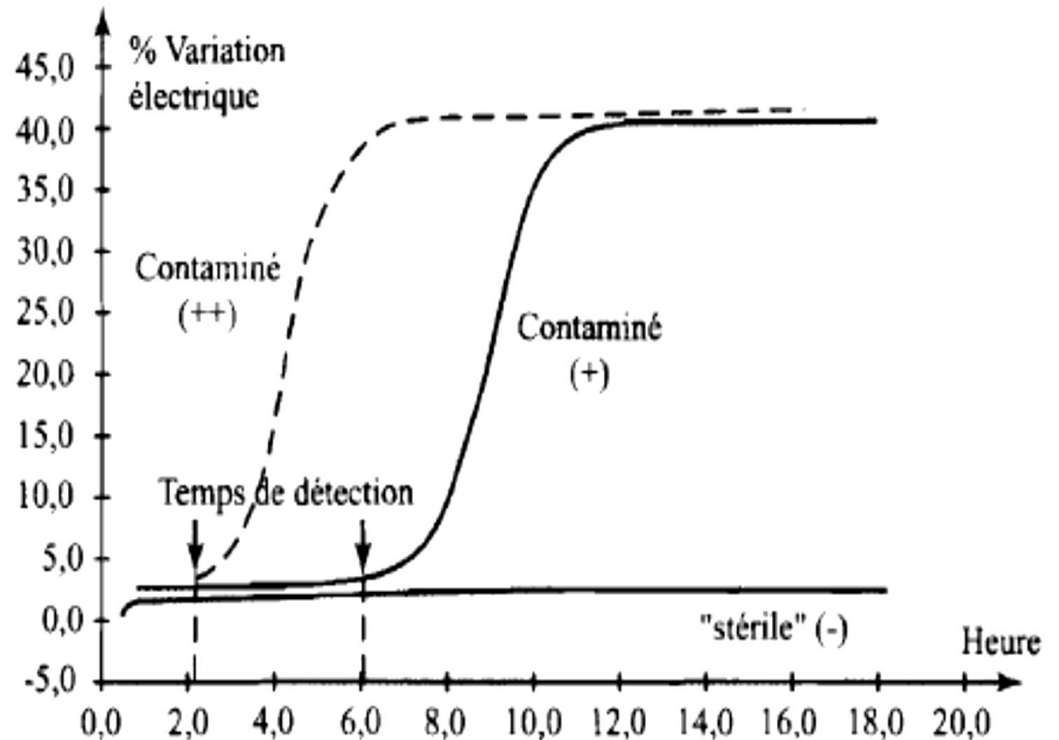
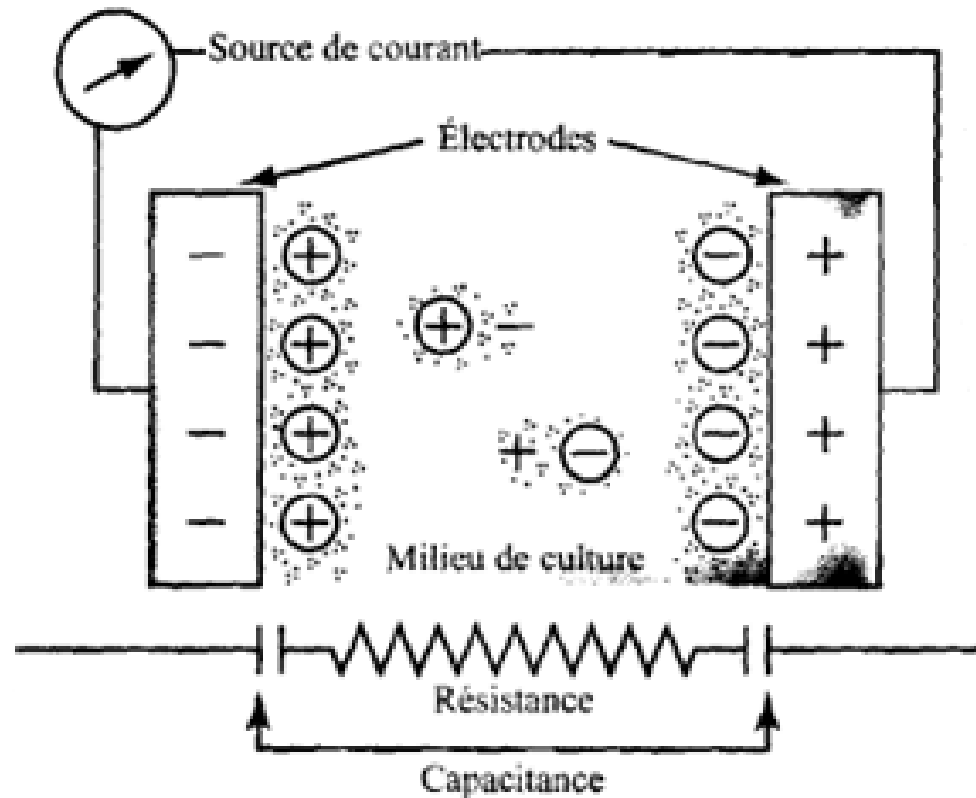
Tige plastique

Ouate (partie mise
en contact avec
les microorganismes)



Évaluation de l'activité globale

Impédancemétrie



- Généralement, après un certain temps de culture appelé délai ou temps de détection, l'augmentation de la **concentration ionique** devient suffisante pour entraîner une augmentation importante de la **conductance du milieu**, et donc un abaissement de l'**impédance** correspondant au seuil de détection.