

TECHNIQUES D'ESTIMATION DES POPULATIONS MICROBIENNES :

1. TECHNIQUES DE NUMÉRATION :

LE TERME « DÉNOMBREMENT D'UNE FLORE » SIGNIFIE QUE L'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DOIT PERMETTRE DE QUANTIFIER DANS L'ÉCHANTILLON UNE FLORE PARTICULIÈRE.

Numération microscopique

IL S'AGIT D'UN DÉNOMBREMENT PAR OBSERVATION DIRECTE ; LA NUMÉRATION CELLULAIRE EST RÉALISÉE PAR COMPTAGE AU MICROSCOPE, À L'AIDE D'UNE LAME DE COMPTAGE SPÉCIALE OU CELLULE DE NUMÉRATION OU HÉMATIMÈTRE (CELLULE DE MALASSEZ).

Numération en milieu solide

LES BACTÉRIES À DÉNOMBRER PRÉSENTENT 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 surface : Le dénombrement en surface s'effectue sur 0,1 mL de dilution.

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

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

2. Techniques d'estimation de la quantité de biomasse.

Il existe plusieurs facteurs qui influencent le choix d'une méthode :

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.

2.1. Techniques de dilution

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.

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.

2.2. Techniques de concentration

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 flocculation-décantation (après enrichissement éventuel).
- La séparation par interaction de surface : interaction hydrophile-hydrophobe, interaction de charge, anticorps, lectine (après enrichissement éventuel).