

### 3. Numération après culture en milieu solide

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

##### - Inoculation dans la masse

Dans cette technique 1 ml de chaque dilution est placé dans des boîtes de Pétri. Ensuite 10 à 15 ml de milieu gélosé 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.

##### - Inoculation en surface

Dans cette technique, 0,1 ml de chaque dilution est déposé à la surface d'un milieu gélose coulé en boîte 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.

## - 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 »

Une goutte de milieu (50  $\mu$ l) 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.

## - 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.

- 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 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 :  $N = \sum C / 1,1 d$ , 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  $300 \cdot 10^x$  germes par gramme ou par mL »,  $10^x$  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 CIII (New Brunswick), Biomatic (Foss electric), BACC630 (3M), Colony counter (Fisher/ OSI), Spiral. Scan 500, CCL 500 (Intersciences), Protos (AES), Casba (Spiral Biotech), etc.

#### 4. Numération après culture en milieu liquide

Cette 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.

#### 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.

# Techniques d'étude et d'identification microbiennes :

## Etude microscopique

L'observation microscopique permet d'étudier la morphologie des cellules d'une espèce microbienne.

### *Examen à l'état frais*

En microbiologie, une préparation à l'état frais consiste à enfermer entre lame et lamelle une suspension de microorganismes vivants ( observation microscopique  $G \times 40$ ). Il permet alors d'observer : la forme des cellules, leur mode de groupement, leur mobilité et le nombre approximatif des bactéries par champ microscopique. Certains organites colorés peuvent être visibles par cet examen tel que les chloroplastes chez les cyanobactéries.

### *Examen après coloration*

Cet examen permet l'étude microscopique des bactéries mortes après fixation et coloration. Cette dernière est réalisée sur des frottis séchés et fixés, et peut être simple (1 seul colorant) ou double (deux colorants).



## Coloration simple

L'exemple le plus étudié de la coloration simple est celle au bleu de méthylène. Le frottis est recouvert pendant trois minutes au bleu de méthylène, puis rincé à l'eau distillée et enfin séché au-dessus de la flamme du bec Bunsen. Comme toute coloration, l'observation se fait à l'aide d'une goutte d'huile d'immersion avec une forte luminosité avec l'objectif ayant le grossissement  $\times 100$ .

## Coloration spécifique

La ciliature : la coloration des cils est réalisée sous l'action d'un mordant et d'un colorant. Les cils s'épaississent et deviennent visibles

Les spores : Leur mise en évidence se fait grâce à la coloration au vert de malachite.

## *Coloration différentielle*

La coloration de Gram est la coloration double différentielle, réalisée lors d'un examen microscopique de bactéries. Elle permet non seulement d'observer la forme des cellules mais aussi de diviser les bactéries en deux grands groupes taxonomiquement différents : bactéries Gram-positif bactéries Gram-négatif.

Quelle que soit le colorant utilisé la technique reste sensiblement la même comme suite:

1. Inonder le frottis séché à l'air et fixé à la chaleur pendant 1 minute avec le réactif de coloration au cristal violet.
2. Laver la lame dans un jet doux et indirect d'eau du robinet pendant 2 secondes.
3. Inondation avec le mordant : iode ou lugol. Attendez 1 minute.
4. Laver la lame dans un jet doux et indirect d'eau du robinet pendant 2 secondes.
5. Inondation la lame avec agent décolorant. Attendre 15 secondes ou ajouter goutte à goutte pour faire sortir l'agent de décoloration.
6. Inondation la lame avec contre-colorant, 'safranine'. Patienter 30 secondes à 1 minute.
7. Laver la lame dans un jet d'eau douce et indirecte de l'eau du robinet jusqu'à ce qu'aucune couleur n'apparaisse dans l'effluent, puis sécher avec du papier absorbant.
8. Observez les résultats de la procédure de coloration sous immersion dans l'huile. Examiner au microscope, objectif x100.