

Mesure de la concentration en bactéries d'une suspension d'une souche pure *E. coli* K12 par comptage d'unités formant colonie (UFC) sur milieu solide. Étude de la correspondance entre le trouble du à la biomasse (densité optique à 600 nm) et la concentration en micro-organismes.

Préalable. Après lecture du document, il faudra, dans un premier temps, examiner les éventuelles contraintes particulières de gestion des risques chimiques ou biologiques et de gestion des déchets liées aux manipulations proposées.

A disposition : 15 ml de culture de *E. coli* K12 (souche du groupe de risque 1) de 18 heures sur milieu LB (= culture Ec). Culture aérée, agitée, à 37°C. La croissance de la culture est terminée.

Il s'agit de mesurer la concentration en bactéries de Ec par comptage d'unités formant colonie (UFC) sur milieu solide et d'étudier la correspondance entre le trouble du à la biomasse (par mesure de densité optique à 600 nm) et la concentration en micro-organismes.

Note : milieu LB = milieu Luria Broth.

1. Concentration en bactéries par comptage d'unités formant colonie (UFC) sur milieu solide

Le principe est le suivant. Les bactéries *E. coli* sont des cellules isolées, si elles sont dispersées sur un milieu de culture convenable, après incubation, chaque cellule isolée revivifiable donnera naissance à une colonie observable.

On choisit la technique de dispersion des bactéries en surface d'un milieu de culture agarosé en boîte de Pétri (« surface count »). On décide d'inoculer de 0,1 mL. On fait l'hypothèse que la suspension de bactéries proposée (Ec) est aux environs de 10^9 /mL.

Réaliser une gamme de dilutions de l'échantillon (dilutions en série de raison 1/10 en eau physiologique stérile) qui permettra d'obtenir des boîtes de culture avec 15 à 200 colonies. Ensemencer en surface, en double, 0,1 mL de 3 des dilutions réalisées (sur milieu de culture LB gélosé, 6 boîtes de Pétri nécessaires) qui permettent d'espérer 15 à 200 colonies par boîte. Pour ce faire utiliser un étaleur de verre ou des billes de verre stériles.

Remarque : attention, les E. coli sédimentent vite !

Compte-rendu :

- Gamme réalisée, justification des choix de dilutions.
- Résultats expérimentaux. Le résultat final de concentration en bactéries dans Ec sera établi en utilisant le document fourni en annexe.
- Analyse critique de la méthode (travail de groupe avec l'enseignant).

2. Mesure de la concentration en biomasse ([X]) par mesure du trouble (T), établissement expérimental de la fonction $T = f([X])$. Conclusion sur la correspondance entre trouble et concentration en micro-organismes.

2.1 Mise en évidence d'une relation linéaire $T = K [X]$ et limite de linéarité

T : mesure du trouble du à la biomasse pour $\lambda = 600$ nm par mesure de la lumière transmise puis évaluation d'une densité optique (DO) de turbidité. Utilisation d'un spectrophotomètre mono-faisceau pour les mesures. [X] : concentration en biomasse. K : coefficient

Régler le spectrophotomètre à 600 nm et faire un zéro contre de l'eau. Mesurer la densité optique du milieu de culture stérile (DO_m). Et travailler selon les indications du tableau ci-dessous à compléter :

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|-----|---|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-------|
| tube | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| culture Ec en mL | 2 | 1 | 1 | 0,5 | 0,5 | 0,25 | 0,25 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,075 |
| eau en mL | 0 | 1 | 2 | 1,5 | 2 | 1,75 | 2,25 | 1,9 | 2,8 | 2,9 | 2,925 |
| Dilution réalisée (d) = [X] en unités arbitraires | 1 | 0,5 | | | | | | | | | |
| densité optique lue = DO_{lue} | | | | | | | | | | | |
| densité optique de biomasse = $T = DO_{lue} - (DO_m * d)$ | | | | | | | | | | | |

Compte rendu :

- Construire un schéma expliquant la nature exacte de la mesure de trouble réalisée (travail en groupe avec l'enseignant)
- Pour la souche, étudier la linéarité de la fonction $T = f([X])$ sous forme graphique. [X] sera exprimé en unités arbitraires (avec, par exemple, la valeur 1 pour la suspension non diluée). Annoter le graphe.

2.2 Conclusion sur la correspondance entre trouble T (par densité optique à 600 nm) et concentration en micro-organismes.

Donner la(les) règle(s) de correspondance entre trouble T (par densité optique à 600 nm) et concentration en micro-organismes pour la souche testée, dans le cadre d'une culture « jeune », avec le spectrophotomètre utilisé.

Risques, sécurité, gestion des déchets

Les manipulations proposées mettent en œuvre une souche du groupe 1. Les procédures classiques en usage dans le laboratoire (adapté aux bactéries du groupe 2) – et qu'il faut absolument connaître - sont donc plus qu'adaptées et suffisantes (par exemple la gestion des pointes de pipettes, des pipettes plastiques, des cuves pour photométrie chargées en micro-organismes, des milieux après incubation ...).

Lors de la manipulation du paragraphe 1, il convient de protéger la manipulation des contaminations (travail aseptique). La manipulation du paragraphe 2 n'exige pas une manipulation aseptique.

Document annexe Concernant les numérations par comptage de colonies

Après la période d'incubation nécessaire, procéder au comptage des colonies pour chaque boîte contenant moins de 200 à 300 colonies (selon la taille des colonies ; plus la surface occupée par les colonies sur la boîte est grande, plus la probabilité de colonies superposées est élevée et conduit à une erreur par défaut).

1. Calcul standard après simple comptage

Le calcul de la concentration en micro-organismes [N] présents dans l'échantillon essai est une moyenne pondérée à partir des résultats de 2 dilutions successives.

Pour le calcul standard, il est nécessaire de compter sur au moins une boîte contenant au moins 15 colonies.

Soit Σc la somme de toutes les colonies comptées sur toutes les boîtes retenues (et tel que au moins une des boîtes comptées contenait au moins 15 colonies).

Soit V le volume inoculum appliqué à chaque boîte (en général exprimé en mL).

Soit n_1 le nombre de boîtes retenues à la première dilution (par exemple 2).

Soit n_2 le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution (par exemple 2).

Soit d le taux de dilution de la première dilution retenue pour les comptages sur boîte.

$$[N] = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) V} \cdot \frac{1}{d} \quad \text{Et arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs.}$$

Remarque. Pour des manipulations conduites avec du matériel de laboratoire standard, l'incertitude-type est essentiellement due à l'effet « aléa loi de Poisson ». On aura donc une assez bonne estimation de l'incertitude-type en utilisant la propriété de la loi de Poisson suivante : moyenne = variance.

----suite---->

2. Estimation des petits nombres

2.1 Si aucune boîte ne contient au moins 15 colonies, faire la moyenne arithmétique des colonies comptées sur les boîtes de la plus petite dilution d et tenir compte de cette dilution.

Bien préciser dans l'expression du résultat qu'il s'agit alors d'une estimation en rédigeant ainsi :

« nombre estimé de micro-organismes par millilitre = ... »

Les 2 tableaux ci-dessous peuvent aussi être utilisés :

| Dénombrement à partir de 2 boîtes de Petri | | | | | |
|--|---------------------------|---------------------------|-------|---|-------|
| Nombre total de colonies comptées sur 2 boîtes | Nombre de microorganismes | Limite de confiance à 95% | | Erreur en % par rapport à la limite ¹⁾ | |
| | | basse | haute | basse | haute |
| 1 | 1 | <1 | 3 | -97 | +457 |
| 2 | 1 | <1 | 4 | -88 | +261 |
| 3 | 2 | <1 | 4 | -79 | +192 |
| 4 | 2 | 1 | 5 | -73 | +156 |
| 5 | 2 | 1 | 6 | -68 | +133 |
| 6 | 3 | 1 | 6 | -63 | +118 |
| 7 | 4 | 2 | 7 | -60 | +106 |
| 8 | 4 | 2 | 8 | -57 | +97 |
| 9 | 4 | 2 | 9 | -54 | +90 |
| 10 | 5 | 2 | 9 | -52 | +84 |
| 11 | 6 | 3 | 10 | -50 | +79 |
| 12 | 6 | 3 | 10 | -48 | +75 |
| 13 | 6 | 3 | 11 | -47 | +71 |
| 14 | 7 | 4 | 12 | -45 | +68 |
| 15 | 8 | 4 | 12 | -44 | +65 |
| 16 | 8 | 5 | 13 | -43 | +62 |
| 17 | 8 | 5 | 14 | -42 | +60 |
| 18 | 9 | 5 | 14 | -41 | +58 |
| 19 | 10 | 6 | 15 | -40 | +56 |
| 20 | 10 | 6 | 15 | -39 | +54 |
| 21 | 10 | 6 | 16 | -38 | +53 |
| 22 | 11 | 7 | 17 | -37 | +51 |
| 23 | 12 | 7 | 17 | -36 | +50 |
| 24 | 12 | 8 | 18 | -36 | +49 |
| 25 | 12 | 8 | 18 | -35 | +48 |
| 26 | 13 | 8 | 19 | -35 | +47 |
| 27 | 14 | 9 | 20 | -34 | +46 |
| 28 | 14 | 9 | 20 | -34 | +45 |
| 29 | 14 | 9 | 21 | -33 | +44 |
| 30 | 15 | 10 | 21 | -32 | +43 |

| Dénombrement à partir d'une seule boîte de Petri | | | | |
|--|---------------------------|-------|---|-------|
| Nombre de colonies comptées | Limite de confiance à 95% | | Erreur en % par rapport à la limite ¹⁾ | |
| | basse | haute | basse | haute |
| 1 | <1 | 6 | -97 | +457 |
| 2 | <1 | 7 | -88 | +261 |
| 3 | <1 | 9 | -79 | +192 |
| 4 | 1 | 10 | -73 | +156 |
| 5 | 2 | 12 | -68 | +133 |
| 6 | 2 | 13 | -63 | +118 |
| 7 | 3 | 14 | -60 | +106 |
| 8 | 3 | 16 | -57 | +97 |
| 9 | 4 | 17 | -54 | +90 |
| 10 | 5 | 18 | -52 | +84 |
| 11 | 6 | 20 | -50 | +79 |
| 12 | 6 | 21 | -48 | +75 |
| 13 | 7 | 22 | -47 | +71 |
| 14 | 8 | 24 | -45 | +68 |
| 15 | 8 | 25 | -44 | +65 |

1) L'erreur en % est calculé entre chaque limite haute et basse et la valeur de la 2° colonne.

2.2 Aucune colonie apparue même à la plus petite dilution d

Exprimer le résultat comme suit :

« moins de x micro-organisme par g ou par mL..... »

Bibliographie

- Norme ISO 7218 :1996(F) et norme ISO 7218 :1996(F)
- Uncertainty of quantitative determination derived by cultivation of microorganisms; Seppo I. Niemelä ; Centre for metrology and accreditation MIKES Publication J4/2003 ; Helsinki Finland (disponible au format pdf sur internet)