

TD n°2

Méthode de dénombrement

Exercice 1 :

On veut déterminer le nombre de bactéries vivantes dans l'urine d'un malade atteint d'une infection bactérienne et suivant un traitement antibiotique. Les dénombrements avant le traitement ont montré que l'urine du patient contient une concentration de 106 cellules bactériennes vivantes par ml d'urine. Après un jour de traitement au Bactrim (trimethoprim + sulphamethoxazol), le pharmacien biologiste dépose un volume de 0,01 ml à la surface d'une cellule de Thoma. Après 30 minutes de repos permettant la décantation des cellules, la lame est examinée au microscope, au fort grossissement.

- Calculer la concentration des cellules par ml dans cette urine sachant qu'on a compté 350 cellules dans 10 petits carrés dans une solution d'urine.

Rappel : La cellule de Thoma est une lame creuse au centre avec un quadrillage d'environ 400 petits carrés. Chaque petit carré a une surface de $1/400 \text{ mm}^2$. La distance entre la grille et la lamelle est de $1/10 \text{ mm}$.

Exercice 2 :

Le dénombrement des bactéries ammonifiantes dans des suspensions de trois sols différents a été réalisé par la méthode du MPN.

A partir de chaque sol une suspension de 1g de sol broyé dans 10 ml d'eau physiologique stérile a été préparée. Des séries de dilutions de 10^{-1} à 10^{-7} ont été préparées dans l'eau physiologique à partir de chaque suspension de sol. Ensuite, 1 ml de chaque dilution préparée (10^{-1} à 10^{-7}) a étéensemencé dans un milieu de culture spécifique, à raison de trois répétitions pour chaque dilution. Après incubation à 28°C pendant 15 jours, les tubes positifs sont détectés par une coloration orange, après addition du réactif de Nessler. Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous :

1-Qu'est-ce qu'un tube « positif », qu'est-ce qu'un tube négatif ?

2- Calculez pour chaque type de sol, le nombre de germes par gramme de sol.

3- quel serait le résultat si le volumeensemencé était de 0,1 ml.

Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Sol 1	+++	+++	+++	+++	++-	+-	---
Sol 2	+++	+++	++-	---	---	---	---
Sol 3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Tableau de Mc Crady (3 tubes par dilution)

Nombre caractéristique	MPN	Nombre caractéristique	MPN	Nombre caractéristique	MPN
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,5	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		

Correction**Exercice 1 :**

Volume d'un petit carré = surface x hauteur = $1/400 \times 1/10 = 1/4000 \text{ mm}^3 = 0,25 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3 = 0,25 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3 \text{ (ml)}$

Le volume de 10 petits carrés = $0,25 \cdot 10^{-6} \times 10 = 0,25 \cdot 10^{-5} \text{ ml}$

Nous avons 350 cellules dans 10 petits carrés donc

Le nombre total = 350 divisé par $0,25 \cdot 10^{-5} = 14 \cdot 10^7$ cellules / ml de l'échantillon analysé.

Exercice 2 :

1- Un tube positif signifie qu'il y a au moins un micro-organisme recherché dans le volume initial d'inoculum.

Un tube négatif signifie qu'il y a moins un micro-organisme recherché dans le volume initial d'inoculum.

2- La méthode de dénombrement par MPN sur milieu de culture liquide est utilisée dans le cas où on n'a pas la possibilité d'utiliser le milieu de culture solide.

Dans le cas d'échantillons solides, comme le sol, on doit passer par une étape de préparation de l'échantillon (ici broyage de 1g de sol et sa dissolution dans 10 ml d'eau physiologique stérile) avant de passer aux dilutions.

Cette étape est à considérer lors des calculs pour ramener au gramme de sol. Cette étape correspond à une sorte de dilution au 1/10 de l'échantillon de sol.

Pour le sol 1 :

Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Sol 1	+++	+++	+++	+++	++-	+--	---
Nombre caractéristique	3	3	3	3	2	1	0
Combinaison 1					2	1	0
Combinaison 2				3	2	1	
Combinaison 3			3	3	2		
Combinaison 4		3	3	3			
Combinaison 5	3	3	3				

D'après le tableau, on choisit 321 (car < 330) pour la dilution 10^{-4} .

Le nombre le plus probable (NPP) correspondant à 321 dans la table de Mac Grady est 15.

Donc le nombre de bactéries :

On a $N = NPP / "V_{\text{inoculum}} \times F_d = 15 \times 10^4 / 1 = 1,5 \cdot 10^4$ germes/ml.

Pour exprimer le résultat par gramme de sol, on considère que la préparation de la suspension initiale (1g dans 10 ml) est équivalente à une dilution au 1/10 du sol étudié. Ainsi le nombre trouvé ci-dessus sera multiplié par 10 (facteur de dilution). **Donc Nombre de germes = $1,5 \cdot 10^6$ germes/g de sol.**

Pour le sol 2 :

Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Sol 2	+++	+++	++-	---	---	---	---
Nombre caractéristique	3	3	2	0	0	0	0
Combinaison 1					0	0	0
Combinaison 2				0	0	0	
Combinaison 3			2	0	0		
Combinaison 4		3	2	0			
Combinaison 5	3	3	2				

D'après le tableau, on choisit 320 (car < 330) pour la dilution 10^{-2} .

Le MPN correspondant à 320 dans la table de Mac Grady est : 9,5.

Donc le nombre de bactéries :

On a $N = NPP / \text{"Vinoculum"} \times Fd = 9,5 \times 10^2 / 1 = 9,5 \cdot 10^2$ germes/ml.

Le nombre de bactérie = $9,5 \cdot 10^2 \times 10 = 9,5 \times 10^3$ germes/g de sol

Pour le sol 3 :

Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Sol 3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Nombre caractéristique	3	3	3	3	3	3	3

Ce résultat montre que la dilution n'était pas suffisante. Il a fallu diluer davantage l'échantillon jusqu'à ce qu'on trouve des tubes négatifs.

2) Si le volumeensemencé (V inoculum) était de 0,1ml au lieu de 1ml, le nombre trouvé doit être divisé par 0.1.