

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. Mesure de biomasse sèche. Masse moyenne d'une bactérie.

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 : 60 mL de culture de *E. coli* K12 (souche de 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.

Note : milieu LB = milieu Luria Broth.

0. Travail préalable pour un prochain TP

Régler le spectrophotomètre à 600 nm et faire un zéro contre de l'eau. Mesurer l'atténuation (densité optique, optical density, OD) du milieu de culture stérile (OD_m). Et travailler selon les indications du tableau ci-dessous à compléter.

Cuve pour spectrophotométrie (macro cuve 1*1 cm ²)	ND	D10
culture Ec en mL	x	0,2
Milieu stérile en mL	0	1,8
Fermer à l'aide film paraffiné et homogénéiser juste avant lecture		
Dilution réalisée (d) = [X] en unités arbitraires	1	1/10
Densité optique lue = OD_{lue}		
$OD_{lue} - OD_m$		

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 bactéries par 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 sur milieu de culture LB gélosé 0,1 mL de 3 des dilutions réalisées qui permettent d'espérer 15 à 200 colonies par boîte. Doubler la manipulation (6 boîtes de Pétri nécessaires). Pour ce faire utiliser un étaleur de verre ou des billes de verre stériles.

Remarque : attention, les *E. coli* sédimentent vite !

Conseils pour le compte-rendu :

- Gamme réalisée, justification des choix de dilutions à l'aide d'un tableau convenablement annoté.
- 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 biomasse sèche

(En binômes)

- Tarer un bécher de 100 mL.
- Récupérer 2 fois 45 mL de culture. Centrifuger et laver 2 fois à l'eau distillée.
- Transférer quantitativement (les 2 culots) dans le bécher préalablement taré puis peser après dessiccation à 105 °C jusqu'à masse constante.

3) Correspondance entre concentration en UFC et biomasse sèche

Donner la(les) règle(s) de correspondance entre concentration en UFC et biomasse sèche pour la souche testée, dans le cadre d'une culture « jeune ». Calculer la masse sèche moyenne d'une bactérie *E. coli*.

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.

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

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)