

1 : Dénombrement de levures

La nature microscopique de la levure peut être facilement illustrée par l'estimation du nombre de cellules dans un cube de levure boulangère acheté dans le commerce et par comparaison du nombre obtenu avec la population humaine sur terre. Pour y arriver nous allons diluer les cellules de levure dans de l'eau, afin de pouvoir déposer des nombres mesurables de cellules sur des boîtes de pétri. Après incubation à 30°C, chaque cellule viable donnera lieu à une colonie sur une boîte.

Thème : Diverses méthodes de mesure, travail en conditions stériles, petits organismes, grands nombres, formation de colonies sur boîtes de pétri.

L'EXPERIENCE :

- Prélevez d'un cube de levure boulangère un petit morceau d'environ 1g et pesez-le sur une balance.
Il n'est pas important qu'il fasse exactement 1g, mais il faut en noter le poids exact. Resuspendre le petit morceau dans 10 ml d'eau stérile.
- Faites une série de dilutions en série dans de l'eau stérile (voir figure 1).

A titre indicatif, une suspension de levure un peu trouble correspond à environ 10^7 cellules/ml, ou une absorption (OD600) de 0.5. Il est aussi possible de compter les cellules dans la chambre de Thoma (figure2), ou plus facilement avec les cellules Kovas (figure 3). Ces méthodes n'indiquent toutefois pas le nombre de cellules vivantes. Pour avoir le nombre de cellules vivantes, il faut les étaler sur une boîte de Pétri.

- A l'aide d'un râteau, étalez 100 μ l des deux dernières dilutions sur deux boîtes YPD et incubez les pendant deux jours à 30°C.

Attention: marquez les boîtes sur le fond (et non sur le couvercle) avec votre nom, le numéro de l'expérience et le point que vous avez étalé. Mettez les boîtes à l'envers dans l'étuve à 30°C pour éviter que les gouttes de condensation ne tombent sur les colonies.

Par exemple :

0.25 g de levure dans 10 ml d'eau stérile. On effectue des dilutions en série ($\rightarrow 10^{-2} \rightarrow 10^{-4} \rightarrow 10^{-6}$) et on étale 0.1 ml sur une boîte.

Après 2 jours à 30°C on compte 30 colonies. Cela correspond à environ 5×10^{11} cellules vivantes par cube ($30 \text{ colonies} \times 10 \text{ ml} \times 10^7 \text{ dilutions} \times 42 \text{ g (le poids d'un cube)} \times 4$)

Figure 1 :

Principe des dilutions en série

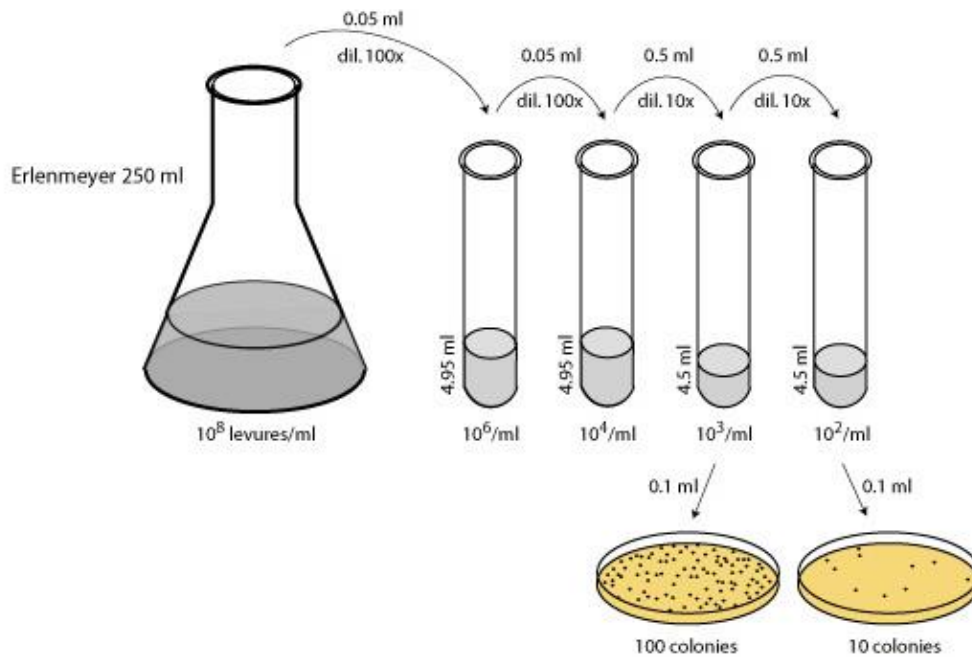
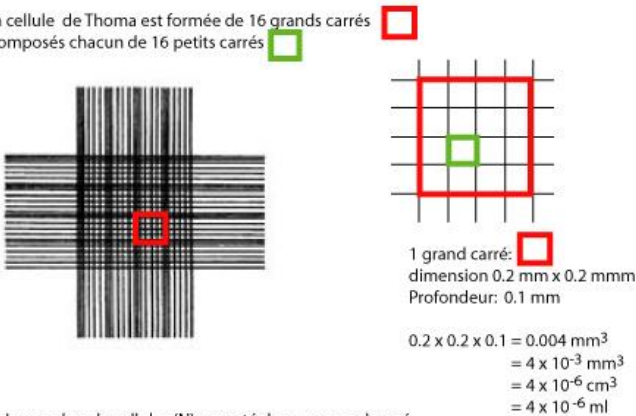


Figure 2 :

Cellule à numération de Thoma

La cellule de Thoma est formée de 16 grands carrés composés chacun de 16 petits carrés



Le nombre de cellules (N) compté dans un grand carré correspond au nombre de cellule dans 4×10^{-6} ml.
Donc $N \times (1/4 \times 10^{-6}) = N \times 2.5 \times 10^5 =$ nombre de cellules / ml
N'oubliez pas de multiplier par le facteur de dilution si besoin.
En principe on compte 4 grands carrés.

On compte les cellules à l'intérieur et celles qui touchent les bords en haut et à droite.
On ne compte pas celles qui touchent les bords en bas et à gauche.

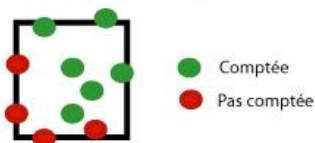
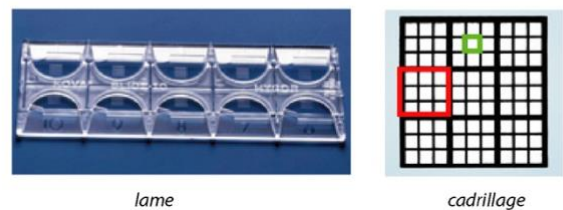


Figure 3 :

Lame de Kovas :

cellule de numération jetable constituée de dix cupules individuelles avec grilles à quadrillage pour le comptage.

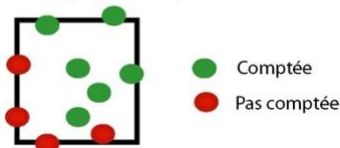
Le quadrillage est composé de 9 grands carrés, contenant chacun 9 petits carrés



Le nombre de cellules (N) comptée dans 1 grand carré multiplié par 10^4 correspond au nombre de cellule par ml.

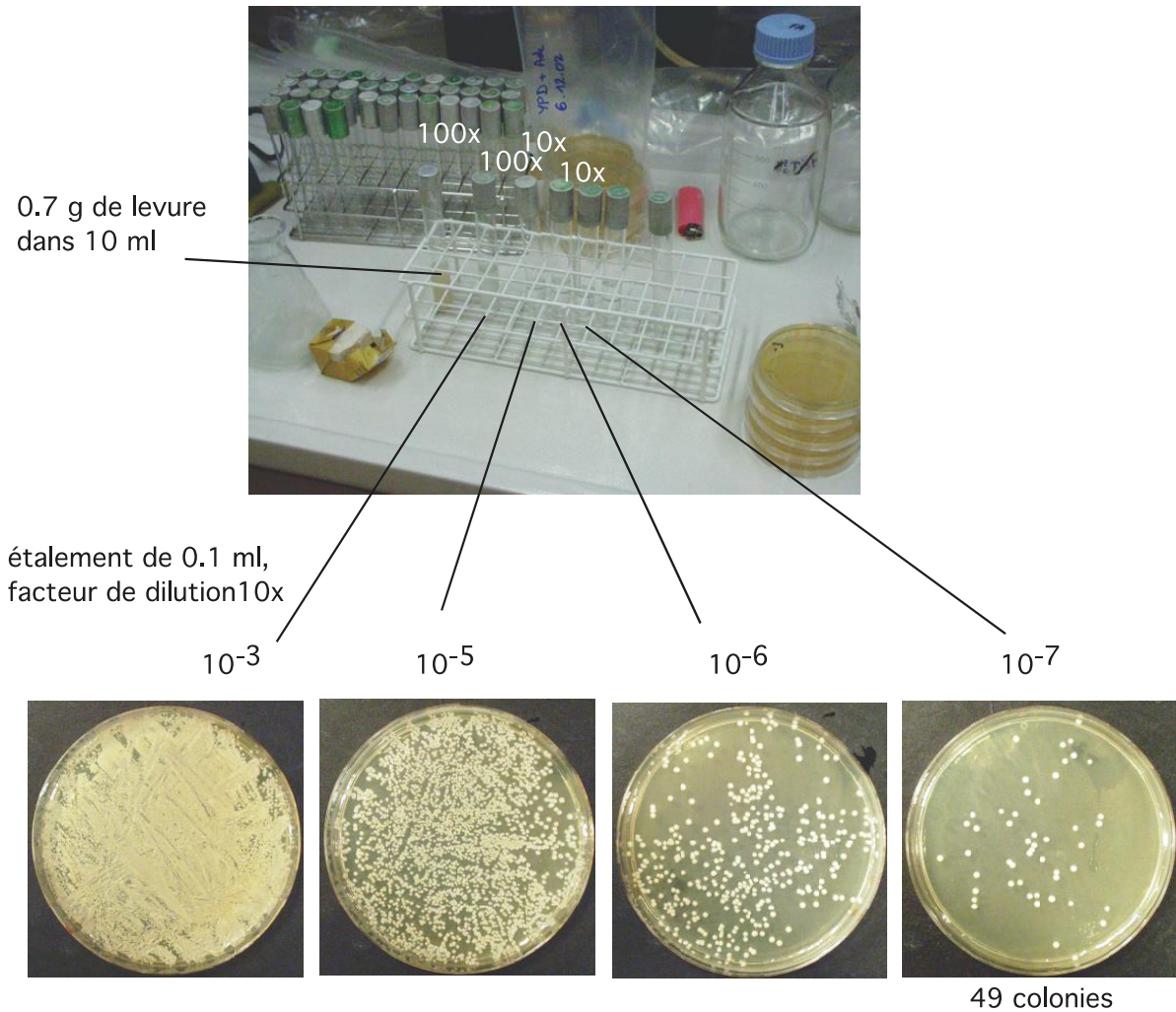
En principe on compte 4 grands carrés.

On compte les cellules à l'intérieur et celles qui touchent les bords en haut et à droite.
On ne compte pas celles qui touchent les bords en bas et à gauche.



Exemple d'expérience :

Combien de cellules dans un cube de levure pour faire une tresse dimanche matin?



$49 \times 10 \times 10 \times 10 \times 100 \times 100 / \text{ml}$ de liquide

$\times 10$ (pour 10ml)

$\times 60$ (0.7 gramme du cube de 42g)

$29.4 \times 10^{10} = 2.9 \times 10^{11}$ cellules par cube

290'000'000'000

Nous sommes, en 2007, environ 7'000'000'000 d'êtres humains sur terre!