

La photométrie des milieux troubles

Avertissement : ce travail résulte d'une synthèse de données bibliographiques et de travaux d'enseignants de biotechnologie que l'inspection générale remercie vivement.

Les solutions hétérogènes telles que les solutions macromoléculaires dispersées (anciennement appelée solutions colloïdales) ou les suspensions de fines particules ou de cellules développent avec la lumière des interactions complexes que l'œil interprète par la vision d'un trouble.

Dans un milieu trouble, chaque particule se comporte comme une source secondaire de lumière.

Au sein d'un milieu trouble, la lumière subit trois catégories de phénomènes principaux :

- des **diffusions** fonctions de la forme, la taille, la composition des particules ;
- des **réflexions** (phénomène mineur qui sera négligé ici) en lien avec la nature de leur surface ;
- une **absorption** selon le taux d'opacité des particules.

Le reste de la lumière est simplement **transmis dans l'axe** de la lumière incidente.

Les phénomènes sont bien plus complexes encore mais on considère qu'ils obéissent à la loi de Rayleigh dont l'expression, elle aussi complexe, peut être simplifiée sous la forme (avec I = intensité de lumière, exprimée en candela (cd) selon le système international, ou en lumen (lm) pour l'unité dérivée du flux lumineux) :

$$I_{\text{incidente}} = I_{\text{absorbée}} + I_{\text{transmise}} + I_{\text{diffusée}}$$

Les principales méthodes de mesure des interactions entre la lumière et un milieu trouble sont :

- la **TURBIDIMÉTRIE** ;
- l'**OPACIMÉTRIE** ;
- la **NEPHELEMÉTRIE** ou **NEPHELOMÉTRIE**.

Alerte sémantique :

Dans les ouvrages de référence, la **turbidimétrie** est définie comme la mesure du degré de **turbidité d'une suspension**, c'est-à-dire l'évaluation de la quantité de substances insolubles ou en suspension dans un liquide.

L'**opacimétrie** est définie comme la « mesure de l'opacité d'une substance par mesure de l'**atténuation** du rayonnement transmis. » On peut utiliser maintenant le terme « **atténuation** » ⁽¹⁾, notée « D », pour exprimer le résultat en opacimétrie ([Source IUPAC^{\(2\)} Gold Book 2012](#)).

Le terme absorbance ⁽³⁾ est réservé à la photométrie d'absorption moléculaire en milieu homogène et transparent, couramment appelée spectrophotométrie d'absorption moléculaire.

Le terme « DO » (densité optique) n'a plus d'existence officielle : il est recommandé de ne plus l'utiliser depuis 1996 ([source IUPAC](#)).

Il semblerait même que le terme **turbidimétrie** soit très générique (mesure du trouble) et englobe en fait les différentes techniques (notamment **opacimétrie** et **néphélémétrie**).

Afin d'harmoniser les contenus d'enseignement et nuancer ces concepts complexes, les repères du tableau ci-dessous peuvent être apportés aux élèves du cycle terminal STL-biotechnologies et des sections post-baccalauréat (CPGE-TB & STS).

Cycle terminal					Notions complémentaires post-baccalauréat
méthodologie	définition	Appareil de mesure	Application	Expression du résultat	
Turbidimétrie	Appréciation visuelle, parfois mesurée, de la concentration ou de l'épaisseur d'un milieu selon son trouble en comparaison à des suspensions étalon.	Lecture visuelle, parfois mesurée.	- Préparation de suspension microbienne par comparaison avec les étalons Mac Farland - Test de séropositivité au virus Ebola par PCR	En repère avec l'étalon correspondant. Présence ou non d'un trouble.	En fonction des laboratoires d'analyses, les appellations des méthodologies utilisant la photométrie des milieux troubles peuvent être différentes. La turbidimétrie effectuée dans les laboratoires d'analyses biologiques sur des prélèvements de liquides biologiques est essentiellement réalisée avec des appareils optiques de haute précision, reliés à un ordinateur ; ainsi, dans la plupart des ouvrages techniques médicaux les deux termes turbidimétrie et néphélémétrie sont utilisés de façon équivalente.
Opacimétrie ⁽⁶⁾	Mesure la lumière transmise dans la même direction que la lumière incidente.	Spectrophotomètre à une longueur d'onde proche de 600 nm le plus souvent ⁽⁷⁾ .	Estimation de la concentration cellulaire d'une suspension (bactéries, levures, ...).	On utilise aussi le terme atténuation (<i>D</i>). Dans certaines conditions ⁽⁶⁾ on peut appliquer une loi de proportionnalité du type : $D = k \cdot C_N \cdot l$ <i>D</i> : atténuation <i>k</i> : coefficient de proportionnalité <i>l</i> : trajet optique de la lumière (épaisseur de la cuve) <i>C_N</i> ⁽⁵⁾ : concentration des macromolécules ou particules à l'origine du trouble	Dans de nombreux ouvrages, les termes opacimétrie ou turbidimétrie sont utilisés sans distinction : « mesure de la lumière transmise dans le même sens que la lumière incidente, à l'aide d'un appareil, par exemple un spectrophotomètre. ». Limites du concept d'atténuation ⁽¹⁾

Néphélométrie ⁽⁸⁾ ou néphélogétrie	Technique de mesure de la lumière diffusée par les macromolécules ou particules à l'origine du trouble. Particulièrement sensible ⁽⁴⁾ et présentant une meilleure déteçtabilité ⁽⁵⁾ , elle est utilisée pour le dosage de substances à l'état de traces.	Néphélomètre ou néphélogétrie.	Dosage de molécules ou de particules à l'état de trace. <ul style="list-style-type: none"> - Particules en suspension dans un gaz, un liquide (pureté de l'eau), - antigènes, - anticorps, - mesure de concentrations de certaines protéines sériques par immuno-précipitation... 	Elle s'exprime le plus souvent en UTN (Unité de Turbidité Néphélogétrie), en anglais NTU (<i>Nephelometric Turbidity Unit</i>).	Encore appelée néphélogétrie. On mesure la lumière diffusée, le plus souvent à 90 ° mais c'est variable selon la complexité des appareils de mesure (certains prenant une mesure plusieurs angles de diffusion différents). On peut construire la même définition que pour l'opacimétrie (cf ci-avant) : « mesure du trouble (turbidité) par mesure de du rayonnement diffusé. » Dans le domaine de l'eau, on trouve également des FNU (<i>Formazine Nephelometric Unit</i>) ou FTU (<i>Formazine Turbidity Unit</i>), car la référence-étalon était la formazine (substance synthétique). D'autres unités existent (notamment aux USA et en Europe) pour mesure la turbidité des boissons (dans le domaine alimentaire). Elles sont reliées aux unités officielles de référence (UTN, FNU).
--	--	--------------------------------	---	---	---

- (1) Le terme **atténuation** est moins spécifique et plutôt employé dans les cas où la diminution de la transmittance (de l'intensité transmise) n'est pas seulement due à l'absorption mais aussi à d'autres phénomènes (notamment la diffusion, « *scattering* » en anglais)... ; mais atténuation et absorbance ont bien la même définition mathématique ($D = -\log T = \log \frac{I_0}{I_T} = A$), et c'est donc strictement la même grandeur qui est rendue par le spectrophotomètre (qui mesure seulement le flux transmis dans l'axe et qui le compare au flux incident avant la cuve : le spectrophotomètre ne mesure pas vraiment la lumière absorbée, il mesure ce qu'il reste après tous les phénomènes qui ont pu se passer dans la cuve, sans préjuger du phénomène majoritaire responsable de l'atténuation de l'intensité du rayonnement lumineux). Le terme atténuation a aussi ses limites : il implique juste que la lumière incidente est « atténuée » sans préciser les mécanismes mis en jeu.

- (2) IUPAC : *International Union of Pure and Applied Chemistry*.

- (3) Le terme **absorbance** (A), sans dimension ou exprimé arbitrairement en UA (unité d'absorbance) est toujours utilisable (puisque c'est l'indication rendue par le spectrophotomètre). Mais il est plutôt réservé à l'expression de la photométrie d'absorption moléculaire dans les **milieux homogènes isotropes** (solutions vraies, limpides), alors que le terme **atténuation** (D) est réservé aux cas où il y a aussi prise en compte des effets de diffusion, donc typiquement le cas des **milieux troubles**.
- (4) Ne pas confondre la **sensibilité** (capacité à distinguer deux concentrations proches) et la **détectabilité** (capacité à détecter voire doser des concentrations faibles).
- (5) Pour les concentrations en nombre (donc les concentrations de cellules ou de particules), le symbole officiel (IUPAC) est C_N (C majuscule, N en indice) ; alors que pour une concentration d'une espèce en solution, le symbole est un c minuscule.

(6) **CONDITIONS ET LIMITES D'UTILISATION DE L'OPACIMÉTRIE :**

Le tracé $D = f(C_N)$ donne une courbe croissante à concavité dirigée vers le bas ; pour les faibles concentrations, la courbe peut se confondre avec sa tangente : il existe alors une relation de proportionnalité directe entre D et C_N , comme définie dans le tableau ci-avant.

Cette loi de proportionnalité entre l'atténuation D en milieu trouble et la concentration C_N n'est pas la loi de Beer-Lambert (réservée à l'absorption moléculaire). Dans ce cas, il est possible d'utiliser le terme « coefficient d'atténuation » (plutôt que seulement de « proportionnalité », qui est trop générique, mais c'est la même idée). Il n'y a pas de symbole officiel recommandé pour le coefficient d'atténuation (on peut donc utiliser un symbole au choix, par exemple un k minuscule ...).

Cette proportionnalité entre D et la concentration C_N en particules (macromolécules, ou plus souvent cellules microbiennes) s'observe dans **certaines conditions pour un appareil donné** :

- lumière monochromatique ;
- concentration faible en microorganismes (donc au « début » de la courbe) ;
- suspension homogène (d'où l'importance des étapes d'homogénéisation) ;
- taille des particules voisine de la longueur d'onde de la lumière incidente.

De plus, le coefficient d'atténuation (k) dépend de nombreux facteurs :

- la nature de la souche (bacille, coque, levure...) : il est donc à établir pour chaque souche, mais on peut prendre des valeurs globales ;
- la nature du milieu de culture : un milieu riche peut permettre la constitution de réserve (glycogène ou PHB) qui changent l'absorbance de la suspension ;
- la présence ou non d'une spore, vacuole ou autres inclusions ;
- la présence ou non de ciliature : la ciliature peut avoir un effet très important car elle va contribuer à une forte diffusion de la lumière.

L'opacimétrie présente d'autre part des **limites**, en particulier, la relation linéaire entre D et C_N n'est valable que dans une zone limitée de valeurs d'atténuation, comprises entre :

- un **seuil de détection**, en dessous duquel les valeurs n'ont pas de valeur significative (ce seuil de détection dépend notamment de l'appareil de mesure) : ainsi, de trop faibles concentrations cellulaires ne seront pas correctement détectées par le spectrophotomètre ;
- une **limite de linéarité**, au-delà de laquelle la proportionnalité n'est plus valable : cette limite dépend de la valeur du coefficient d'atténuation, qui dépend en partie de la forme des bactéries étudiées. En effet, s'il y a trop de bactéries (concentrations élevées), la lumière déviée une première fois par une cellule (et qui ne devrait alors pas être prise en compte car non transmise), peut être déviée une seconde fois par une autre cellule et être alors transmise (donc la valeur du flux transmis ne sera pas « correcte »).
Ainsi, la **zone de linéarité** de la relation de proportionnalité est plus ou moins étendue : il suffira alors de diluer un échantillon trop concentré pour l'amener dans cette zone et effectuer une mesure correcte.

Hormis ces limites de linéarité, il existe d'autres **contraintes** à prendre en compte :

- le milieu utilisé doit être **liquide**, et **exempt de particules** autres que les microorganismes (donc méthode peu adaptée à l'eau de rivière ou au lait, ou encore à un broyat d'aliment) ;
- le milieu ne doit **pas absorber aux longueurs d'onde utilisées** : cela peut se compenser par le réglage du zéro de l'appareil sur du milieu stérile, mais privilégier les suspensions en eau et/ou effectuer un choix judicieux de longueur d'onde (*voir ci-dessous*) ;
- le milieu doit contenir **suffisamment de microorganismes** pour être détectés ;
- la technique ne permet **pas de distinguer les microorganismes vivants des morts** : elle évalue la biomasse totale.

(7) **CHOIX DE LA LONGUEUR D'ONDE** (*extrait d'un document de JP Perré*) :

Il n'y a **aucun pic dû à la suspension bactérienne** : son absorbance diminue régulièrement lorsque la longueur d'onde augmente.

Plus la longueur d'onde est élevée, plus le flux transmis est fort et plus l'absorbance est petite (et inversement)... Si on veut augmenter la sensibilité en opacimétrie (c'est-à-dire obtenir une absorbance plus grande pour une concentration donnée), on peut diminuer la longueur d'onde utilisée.

Dans le rouge (vers 700-800 nm), le flux transmis par une suspension de particules sera plus grand et donc l'absorbance plus petite. Inversement, l'absorbance dans le bleu (vers 400 nm) sera plus grande. **L'opacimétrie aura donc une meilleure sensibilité dans le bleu que dans le rouge et donc aussi une meilleure détectabilité dans le bleu.**

Ceci dit, on n'a pas souvent des problèmes de détectabilité avec les suspensions bactériennes, et de plus, le milieu utilisé (jaunâtre) absorbe aussi dans le bas du visible (vers le violet) : il ne faut donc pas aller dans les régions spectrales où le milieu absorbe

Il vaut mieux dans ce cas **rester vers le rouge, entre 550 et 700 nm** (les absorbances seront d'autant plus petites que la longueur d'onde augmente). De plus c'est aussi cohérent avec le fait que la taille des particules ne doit pas « dépasser » la longueur d'onde des radiations utilisées (ou du moins, être du même ordre de grandeur). A partir du spectre d'absorption d'un milieu stérile et celui du même milieu ensemencé, on réalise un choix le plus judicieux possible.

(8) NOTIONS FONDAMENTALES SUR LA NÉPHÉLOMÉTRIE (extrait d'un document de JP Perré) :

Il est facile d'observer la diffusion d'un rayonnement par des particules en suspension: c'est l'**EFFET TYNDALL**. Si la concentration C en particules dans une suspension est faible, le flux Φ_D du rayonnement diffusé selon un angle θ est relié à la concentration par la **LOI DE RAYLEIGH** :

$$\Phi_{D(\theta)} = K_{(n,\theta)} \cdot \Phi_0 \cdot V^2 \cdot \frac{1}{\lambda_0^4} \cdot C = k' \cdot C$$

Φ_0	flux du rayonnement incident
V	volume moyen des particules
$K_{(n,\theta)}$	facteur qui dépend de θ et des indices de réfraction du milieu et de la particule

On remarque que :

- Φ_D dépend de l'angle de mesure θ , via le facteur K .
- Φ_D dépend de Φ_0 : une source lumineuse puissante permettra d'augmenter la sensibilité.
- Φ_D augmente comme le carré du volume des particules.
- Φ_D augmente quand λ_0 diminue : la diffusion est plus importante aux faibles longueurs d'onde. Par exemple, la diffusion est environ **10 fois** plus grande dans le bleu que dans le rouge : $(710 / 400)^4 = 9,9$.
En conséquence, **pour augmenter la sensibilité en néphélogétrie, on pourra utiliser des longueurs d'onde plus petites**, mais attention aux interférences d'absorption (qu'il est facile de déceler en traçant le spectre d'absorption du milieu nonensemencé utilisé).
- Φ_D augmente avec C : la proportionnalité entre ces deux termes existe pour des suspensions de **particules homogènes**, dont le **volume et l'indice de réfraction sont constants**.
Si ces conditions ne sont pas respectées, la proportionnalité risque de ne plus exister, mais le flux diffusé augmentera quand même avec la concentration. C'est le cas avec les suspensions de microorganismes.