

NUMÉRATION DES GERMES TELLURIQUES SUR MILIEUX ÉLECTIFS AU SILICO-GEL

par
Y. DOMMERGUES

I. — Description de la méthode.

La technique de numération des grains de terre positifs sur milieux électifs au silico-gel de Winogradsky (4) est assez peu précise. A ce point de vue la modification proposée par O. Martre-Coppier (3) améliore très sensiblement la méthode; celle-ci n'en reste pas moins très longue. Aussi avons-nous mis au point l'ensemencement par saupoudrage avec un poids connu de terre.

Pour chaque échantillon de sol nous effectuons l'ensemencement sur 4 séries de 4 boîtes de Pétri de 12 cm de diamètre. Sur la première série de 4 boîtes nous répartissons par saupoudrage m_1 mg de sol à l'aide d'une petite languette de carton stérile de $2,5 \times 8$ cm. Sur les deuxième, troisième et quatrième séries de 4 boîtes nous répartissons respectivement m_2 , m_3 , m_4 mg de sol. Si N_1 est le nombre de colonies comptées sur la première série de boîtes, N_2 , N_3 , N_4 le nombre de celles qui correspondent respectivement à la deuxième, troisième et quatrième séries de boîtes, on obtient le nombre de Bactéries par gramme en faisant la moyenne des 4 résultats obtenus sur chaque série de 4 boîtes.

$$\text{Densité moyenne} = \frac{1}{4} \left[\frac{N_1}{m_1} \times 1000 + \frac{N_2}{m_2} \times 1000 + \frac{N_3}{m_3} \times 1000 + \frac{N_4}{m_4} \times 1000 \right]$$

Le poids m de terre qu'il convient de répartir sur chaque série de 4 boîtes de Pétri oscille entre 50 et 250 mg suivant la richesse présumée de l'échantillon.

En réalité le chiffre obtenu représente le nombre de *microcolonies* bactériennes existant dans le sol plutôt que le nombre de germes.

II. — Etude statistique de la méthode.

Avant d'étudier le coefficient de variation il est nécessaire de vérifier si la distribution des résultats observés s'effectue suivant la loi normale.

A) Ajustement de la distribution observée à la distribution normale.

L'étude de la distribution a porté sur la numération des *Azotobacter chroococcum*, celle des Bactéries nitreuses et celle de *Cytophaga* sp.

1^{re} expérience. Numération d'*Azotobacter chroococcum*.

L'échantillon de sol utilisé a été prélevé dans un sol beige ferrugineux tropical lessivé de Séfa (Casamance) qui avait reçu un apport de

chaux à la dose de 2 tonnes par hectare (SO — 140). On a effectué l'ensemencement sur 125 séries de 4 boîtes de Pétri. La densité moyenne des microcolonies a été de 772 avec un écart-type $\sigma = 236,4$.

Les résultats de l'analyse statistique sont résumés dans le Tableau 1 ci-dessous :

TABLEAU 1

AJUSTEMENT DE LA DISTRIBUTION OBSERVEE A LA DISTRIBUTION NORMALE THEORIQUE DANS LE CAS D'UNE NUMERATION D'AZOTOBACTER CHROOCOCCUM SUR SILICO-GEL

Centre des classes	Moins de 500	500	600	700	800	900	1 000	1 100	Au-dessus de 1 100	TOTAUX
Fréquences observées O	10	10	18	20	29	13	12	6	7	125
Fréquences calculées C	8,4	9,4	14,7	19,3	21,1	19,3	14,7	9,6	8,4	124,7
$\frac{(C - O)^2}{C}$	0,305	0,038	0,741	0,025	2,958	2,056	0,496	1,230	0,233	$\chi^2 = 8,082$

La table de χ^2 pour $n = 6$ donne une probabilité comprise entre 0,20 et 0,30. L'ajustement de la distribution observée à la distribution normale est donc significatif.

2^e expérience. Numération de Bactéries nitreuses.

L'échantillon de sol utilisé provenait d'un sol ferrugineux tropical lessivé de Séfa sous jachère herbacée (SR). On a effectué l'ensemencement sur 104 séries de 4 boîtes de Pétri. Le nombre moyen des microcolonies par gramme de sol a été de 197 avec un écart-type $\sigma = 64,8$.

Les résultats de l'analyse statistique sont résumés dans le tableau 2 ci-dessous :

TABLEAU 2

AJUSTEMENT DE LA DISTRIBUTION OBSERVEE A LA DISTRIBUTION NORMALE THEORIQUE DANS LE CAS D'UNE NUMERATION DES BACTERIES NITREUSES SUR SILICO-GEL

Centre des classes	Au-dessous de 100	100	150	200	250	300	Au-dessus de 300	TOTAUX
Fréquences observées O	2	10	28	35	14	12	3	104
Fréquences calculées C	2,5	9,7	23,7	32	23,7	9,7	2,5	103,8
$\frac{(C - O)^2}{C}$	0,100	0,009	0,780	0,281	3,970	0,545	0,100	$\chi^2 = 5,785$

La table de χ^2 pour $n = 4$ donne une probabilité comprise entre 0,20 et 0,30. L'ajustement de la distribution observée à la distribution normale est donc significatif.

3^e expérience. Numération de *Cytophaga*.

Le sol utilisé ici a été récolté sur une dune de formation récente sous jachère herbacée à Hann-Dakar (N^o H6). On a effectué l'ensemencement sur 116 séries de boîtes de Pétri.

La densité moyenne des microcolonies de *Cytophaga* s'est élevée à 750 avec un écart-type $\sigma = 179,5$.

Les résultats de l'analyse statistique sont résumés dans le tableau 3 ci-dessous.

TABLEAU 3

AJUSTEMENT DE LA DISTRIBUTION OBSERVÉE A LA DISTRIBUTION NORMALE THÉORIQUE DANS LE CAS DE LA NUMÉRATION DES *CYTOPHAGA* SUR SILICO-GEL

Centre des classes	Moins de 550	550	650	750	850	950	Plus de 950	TOTAUX
Fréquences observées O	7	19	23	26	17	14	10	116
Fréquences calculées C	9,2	13,9	22,0	25,8	22,0	13,9	9,2	116
$\frac{(C - O)^2}{C}$	0,526	1,871	0,045	0,002	1,136	0,001	0,069	$\chi^2 = 3,650$

La table de χ^2 pour $n = 4$ donne une probabilité comprise entre 0,30 et 0,50. L'ajustement de la distribution observée à la distribution théorique est donc significatif.

Il résulte des trois expériences décrites ci-dessus que la *distribution des résultats des numérations s'effectue suivant la loi normale*.

B) Etude du coefficient de variation.

Les résultats concernant cinq déterminations de coefficients de variation figurent au tableau 4.

Le calcul de l'écart-type a été fait à partir des chiffres de densité déterminés sur des séries uniques de 4 boîtes de Pétri. Or pour chaque échantillon nous effectuons normalement nos lectures sur 4 séries de 4 plaques et nous faisons la moyenne des 4 chiffres obtenus ainsi que nous l'avons indiqué au début de cette note. L'écart-type de la moyenne de 4 séries de boîtes σ_m est donc égal à la moitié de l'écart-type correspondant aux numérations sur une seule série de 4 boîtes de Pétri.

Il ressort du tableau 4 que le *coefficient de variation oscille entre 8 et 16 %*, ce qui, pour des numérations bactériennes est excellent. Compte tenu de l'hétérogénéité du sol, cette précision est largement suffisante.

TABLEAU 4
ANALYSE STATISTIQUE DE DIFFERENTES NUMERATIONS
DE BACTERIES SUR MILIEUX SOLIDES AU SILICO-GEL

Numéro de l'échantillon de sol et date du prélèvement	Type de sol	Espèces ou groupes de bactériens étudiés	Nombre de séries (+) de boîtes de Pétri utilisées	Densité moyenne des micro-colonies bactériennes	Ecart-type σ (numération sur une série de quatre boîtes de Pétri)	Ecart-type de la moyenne de quatre séries de boîtes de Pétri σ_m	Coefficient de variation correspondant à la numération sur quatre séries de quatre boîtes de Pétri
SO - 140 15-9-1955	Sol ferrugineux tropical SEFA chaulé, cultivé en Sorgho, engrais vert.	<i>Azotobacter chroococcum</i>	125	772	236	118	15,3 %
SR 15-9-1955	Sol ferrugineux tropical SEFA, sous jachère herbacée.	Bactéries nitreuses	104	197	65	32	16,4 %
H 1 - A 31-1-1955	Dune récente HANN, sous jachère herbacée.	Bactéries nitreuses	28	580	156	78	13,4 %
H 6 - A 9-1-1956	Dune récente HANN, sous jachère herbacée.	<i>Cytophaga</i> sp.	116	750	179	90	12,0 %
H 1 - F 31-1-1955	Dune récente HANN, sous filasos.	<i>Cytophaga</i> sp. et <i>Vibrio</i> sp.	19	3.170	531	265	8,4 %
H 1 - A 31-1-1955	Dune récente HANN, sous jachère herbacée.	<i>Cytophaga</i> sp.	14	275	42	21	7,6 %

(+) Chaque série est composée de quatre boîtes de Pétri.

III. — Conclusion.

La numération des colonies de germes telluriques sur milieux électifs au silico-gel après ensemencement de ces derniers par saupoudrage est une méthode particulièrement sûre et précise.

Il existe cependant une limite à cette technique; celle-ci n'est en effet applicable qu'aux Bactéries dont la densité est inférieure à environ 100.000 au grammé si les colonies qui apparaissent sur le silico-gel ne sont pas extensives (Bactéries nitreuses *Beijerinckia indica*, *Cytophaga* par exemple). Cette limite est abaissée à environ 10.000 dans les autres cas.

En ce qui concerne le temps nécessité par l'ensemencement, on peut admettre qu'un préparateur moyennement habile met environ 15 minutes pour saupoudrer les 4 séries de 4 boîtes qui correspondent à un échantillon.

Cette technique est beaucoup plus rapide que celle des dilutions. Il faut en effet consacrer plus d'une demi-heure à chaque échantillon dans le cas de 8 dilutions avec ensemencement de 5 tubes par dilution. Comme il est, en général, nécessaire de faire l'analyse en quadruple exemplaire pour obtenir une précision correcte, l'ensemencement d'un échantillon par la méthode des dilutions dure environ deux heures soit huit fois plus de temps que l'ensemencement par saupoudrage.

Ajoutons enfin qu'au point de vue agronomique les résultats des numérations sur silico-gel ensemencés par saupoudrage sont particulièrement satisfaisants.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) POCHON J. et TCHAN Y.T. (1948). Précis de Microbiologie du sol, Masson, Paris.
- (2) POCHON J. (1954). Manuel technique d'analyse microbiologique du sol.
- (3) MARTRE-COPPIER O. (1954). Essai sur l'évaluation de l'activité des Azotobacter dans les sols. Actes et comptes rendus du V^e Congrès de la Science du Sol, III, 5 p. 38-42.
- (4) WINOGRADSKY S. (1949). Microbiologie du sol. Masson, Paris.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verteilung der Kolonien von tellurischen Keimen im gewählten Nährboden entsprechen dem normalen Gesetz. Der Variations-Koeffizient bei Zählungen von *Azotobacter chroococcum*, salpetrigen Bakterien, zellulolytischen Bakterien schwankt zwischen 8 und 16 %, wenn das Impfen auf vier Serien von vier Petri-Platten unternommen wird.

Die Methode des Aussäens auf gallertartigen Kieselgerden-Platten durch Bestreuen ist ein schnelles und genaues Verfahren, das zweifellos grossen Dienst leisten wird für das Studium agronomischer Probleme.

SUMMARY

The distribution of colonies of telluric germs on elective silica-gel medium is in accordance with the Normal Law.

The variation coefficient for *Azotobacter chroococcum*, nitrous

Bacteria and cellulolytic Bacteria counts wavers between 8 and 16% when the seeding is effected on 4 sets of 4 Petri dishes.

The method of seeding silica-gel plates by way of sprinkling is quick and accurate and liable to be of great use in the study of agronomic problems.

RÉSUMÉ

La distribution des colonies des germes telluriques se développant sur milieux électifs au silico-gel ensemencés par saupoudrage est conforme à la loi normale.

Le coefficient de variation pour des numérations d'*Azotobacter chroococcum*, Bactéries nitreuses et *Cytophaga* oscille entre 8 et 16 %, lorsque l'ensemencement est effectué sur 4 séries de 4 boîtes de Pétri.

La méthode décrite est rapide et précise. Elle est susceptible de rendre de très grands services pour l'étude des problèmes agronomiques.