

## TP 03 : Dénombrement des microorganismes du sol

Cette manipulation a pour but de caractériser et de dénombrer les différents groupes taxonomiques se trouvant dans un échantillon de sol.

### I. Matériel

- Flacon stérile
- Une série de tubes contenant 9 ml d'eau physiologique stérile
- Pipettes graduées stériles.
- Spatule stérile
- Boîtes de Pétri
- Milieux de culture : Gélose nutritive (GN), Potatos Dextrose Agar (PDA)
- Ruban Parafilm

### II. Mode opératoire

#### II.1. Echantillonnage

- Avant de procéder au prélèvement, écarter les 05 premiers centimètres du sol environ
- Prélever environ 500 g du sol dans des flacons stériles avec une spatule stérile

#### II.2. Préparation des dilutions

- Dans un erlenmeyer, dissoudre 10 g de sol dans 90 ml d'eau physiologique.
- Homogénéiser l'échantillon mère (dilution  $10^{-1}$ ) pendant 10 min
- Transférer 1 ml de la suspension mère dans un deuxième tube contenant 9 ml d'eau physiologique pour obtenir la dilution  $10^{-2}$
- Refaire la même technique jusqu'à l'obtention 7 dilutions.

#### II.2. Dénombrement

##### II.2.1. Dénombrement des FTAM

- Ensemencer 0.1 ml de chaque dilution (de  $10^{-5}$  à  $10^{-7}$ ) dans une boîte de GN
- Bien étaler avec la pipette râteau
- Réaliser trois répétitions pour chaque dilution.
- Incuber à 30°C pendant 48h jusqu'à 07 jours,

- Dénumbrer le nombre de colonies pour chaque dilution (les 03 répétions) et calculer la moyenne de colonies/dilution.

Dénombrer les bactéries sporulées par la même technique mais en chauffant les dilutions  $10^{-5}$  à  $10^{-7}$  pendant 10 min à  $80^{\circ}\text{C}$  avant l'ensemencement. L'incubation se fait à  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **II.2.2. Dénombrement des champignons :**

- Ensemencer 0.1 ml de chaque dilution (de  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ ) dans une boite contenant le milieu PDA (trois répétions par dilution)
- Sceller les boites de Petri à l'aide du Ruban Parafilm.
- Incuber à en position non retournée pendant 7 à 12 jours.