

## KIT DE TP : BIOREMEDIATION PAR DES BACTERIES MANGEUSE D'HUILES

Réf. 910 139

### 1. Objet :

Ce kit aborde les méthodes de bioremédiation utilisées dans les stations d'épuration pour éliminer les huiles évacuées dans les eaux usées. Il permet aux étudiants de faire varier plusieurs paramètres pour déterminer les conditions optimales dans lesquelles les bactéries transforment les huiles en eau et dioxyde de carbone.

### 2. Composition du kit :

Ce kit est conçu pour 10 groupes d'élèves.

Tous les composants doivent être conservés à température ambiante.

- Micro-organismes « mangeurs » d'huile (en poudre)
- Milieux nutritif
- Boîtes de pétri
- Solution de HCL 1N
- Solution de NaOH 1M
- Papier pH

Matériel complémentaire requis :

- Dispositif d'agitation (agitateur magnétique)
- Verrerie de laboratoire
- Différentes huiles de cuisine (colza, olive, arachide...)

### 3. Précautions d'utilisation :

- Portez des gants et des lunettes lors des manipulations
- Bien que les Micro-organismes « mangeurs » d'huile utilisés dans cette expérience ne sont pas considérés pathogène, il est préférable de suivre les directives de sécurité simples de manipulation et de l'élimination des matériaux contaminés par des bactéries.
- Après avoir terminé l'expérience jeter les matériaux et essuyer la paillasse avec une solution d'eau de Javel à 10% ou un désinfectant de laboratoire.
- Tout le matériel, y compris les boîtes de Pétri, les pipettes, tubes, qui entrent en contact avec les bactéries doit être désinfecté avant d'être jeté à la poubelle. Désinfecter le matériel dès que possible après utilisation en procédant d'une des manières suivantes:
  - Bander plusieurs boîtes de Pétri ensemble et fermer les bouchons des tubes avant de les jeter. Mettre tous le matériel contaminé dans un sac autoclavable, jetable puis le fermer.
  - Faire tremper dans une solution d'eau de Javel à 10%.
  - Plongez plaques de Pétri, tubes ouverts et tout le matériel contaminés dans une cuve contenant une solution d'eau de javel à 10%. Laisser tremper le matériel toute la nuit puis le jeter. Portez des gants et des lunettes de protection lorsque vous travaillez avec l'eau de Javel.
- Porter des gants, et à la fin de l'expérience, se laver les mains avec du savon et de l'eau.

### 4. Expériences :

#### 1) Expérience de base

Cette expérience peut être réalisée sur plusieurs semaines.

#### **Mise en place d'une culture de bactéries mangeuse d'huiles dans un ballon (étape 1)**

Le nombre de ballons de cultures initiales nécessaires dépend du nombre de groupes d'étudiants par classe et de la façon dont est conçu l'expérience. Nous vous recommandons de commencer avec au moins un de quatre à cinq ballons, de sorte que chaque ballon puisse être testé avec un paramètre différent (pH, température...).

-Mettre 125mL d'eau dans les ballons de 250mL

-Ajouter 1,3g de poudre de micro-organismes « mangeurs » d'huile

-Mettre sous agitation.

-Laisser les cellules croître pendant une nuit à température ambiante jusqu'à observation d'une suspension laiteuse.

### **Après la mise en évidence de la suspension laiteuse les contrôles peuvent être effectués**

Ballon de contrôle des eaux :

Il contient 1,3g de poudre dans 125mL d'eau. Aucune huile n'est ajoutée à ce ballon.

Ballon de contrôle de l'huile :

Mettre 125mL d'eau dans un ballon de 250mL. Ajouter environ 7-10mL d'huile alimentaire (huile végétale, huile d'olive, huile d'arachide...).

Ballon expérimental des micro-organismes « mangeurs » d'huile : (étape 2)

Suivre le protocole de l'étape 1.

Ajouter 7-10mL d'huile alimentaire dans les ballons. Les groupes peuvent expérimenter différentes huiles et comparer les résultats.

Après l'ajout d'huile laisser les bactéries à température ambiante pendant 2-3 jours. Au cours de ces jours comparer les ballons expérimentaux aux ballons de contrôles (noter le niveau d'huile à chaque fois).

## **2) Expériences réalisables**

Les expériences sont à réaliser avec les mélanges obtenus en a). Les étudiants devront chercher les conditions optimales à la croissance des cellules.

## **3) Température optimale de croissance**

Réaliser le mélange de l'étape 1 à différentes températures : 4, 20, 37 et 50°C. Observer au cours des jours la croissance des cellules.

## **4) pH optimal de croissance**

Les étudiants devront utiliser les solutions de NaOH et HCl diluées pour ajuster le pH (5, 7 et 9). Ajouter des gouttes de NaOH ou HCl et vérifier le pH avec du papier pH pour ajuster à la valeur voulue.

Laisser les cellules se développer sur plusieurs jours et comparer leur croissance en fonction de la valeur du pH.

## **5) Dégradation optimale de l'huile**

Utiliser des quantités variables du mélange de l'étape 1 (5, 10 et 15mL). Dans chaque volume ajouter 2-3mL d'huile alimentaire. Puis laisser les cellules se développer pendant quelques jours. Observer alors quel mélange montre dégrade le plus l'huile.

## 6) Effet de l'ajout de nutriments

Ajouter au mélange de l'étape 1 une petite quantité de glucose ou de sucre de table (1/4 ou 1/2 cuillère à café. Les éléments nutritifs de microbes tels que l'extrait de levure peuvent aussi être testés.

Puis laisser les cellules se développer pendant quelques jours. Observer pour quel mélange la dégradation est la plus importante (avec ou sans nutriment).

## 7) Numération des bactéries par étalement sur plaque

Cette manipulation permet aux élèves de mesurer la dégradation de l'huile. Un plus grand nombre de colonies indiquent une meilleure croissance des microbes, qui est une mesure directe de plus de biodégradation.

-Verser 5  $\mu$ L de chaque culture sur une plaque de gélose marquée. Répartir de manière uniforme sur toute la plaque.

-Empiler la plaque d'un groupe sur le dessus de celle d'un autre groupe et coller les ensembles (mettre les initiales du groupe sur l'ensemble de plaques).

-Les plaques doivent être laissées en position verticale pour permettre aux échantillons d'être absorbés par l'agar.

-Après absorption complète des échantillons par l'agar, placer les plaques (côté gélose au-dessus) dans un four à incubation à 37°C pendant une nuit.

-Après incubation enlever les plaques de l'incubateur, compter et enregistrer le nombre de colonies sur chaque plaque.

Remarque : Il est important de conserver un milieu stérile pour éviter toute contamination des cultures. Pour cela porter des gants et des lunettes de protection. Veiller aussi à garder les plaques d'agar fermées autant que possible.

## 8) Préparation des plaques d'agar

Les plaques peuvent être préparées plusieurs jours avant l'expérience.

-Equilibrer le bain marie à 55°C

-Desserrer mais ne pas enlever le bouchon de la bouteille media ReadyPour pour permettre l'évacuation de la vapeur au cours du chauffage.

**Attention :** Ne pas desserrer le bouchon avant de chauffer par micro-onde risque d'explosion.

-Chauffer la bouteille d'une des manières suivantes :

- Par micro-onde : Chauffer la bouteille à température élevée pendant deux intervalles de 30 secondes. Tout doit être dissous. Pour accélérer la fusion agiter le flacon.
- Par plaque chauffante : Placer le flacon dans un bécher rempli partiellement d'eau. Chauffer le bécher à ébullition sur une plaque chauffante. Pour accélérer la fusion agiter le flacon.
- Refroidir la bouteille à 55°C environ.
- Placer la bouteille au bain marie à 55°C pour empêcher l'agar de se solidifier.
- Verser, à l'aide d'une pipette stérile 10mL, 5mL d'agar dans une boîte de pétri. Recouvrir la boîte de pétri pour permettre la solidification.

## 5. Nous contacter :

Ce matériel est garanti 2 ans. Pour toutes questions, veuillez contacter :

**sav@sciencethic.com**

[www.sciencethic.com](http://www.sciencethic.com)