

# Isolement des microorganismes du sol

---

## Atelier pratique à l'intention à l'âge secondaire

Titre : Isolement des microorganismes du sol.

But : Isoler et dénombrer des microorganismes qui se trouvent dans un échantillon de sol par la méthode des dilutions tout en maintenant le plan de travail aseptique.

### Matériel:

- 1 flacon Erlenmeyer contenant 50 ml d'agar (0,1%) stérile
- 1 nacelle contenant 0,5 g de sol
- 4 petites fioles contenant 4,5 ml d'agar (0,1%) stérile
- 5 pipettes stériles de 1 ml
- 1 bâtonnet de verre stérile ("hockey")
- 6 plats de Petri contenant environ 10 ml du milieu de culture PDA (Potato dextrose agar)
- 6 languettes de ruban Parafilm
- papier absorbant
- désinfectant
- crayons

### Méthodes:

1. Identifier les dilutions sur les fioles ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) et les plats de Petri ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ).
2. Ajouter le 0,5 g sol à l'Erlenmeyer contenant 50 ml d'agar (Ceci est la dilution  $10^{-2}$ ).
3. Agiter pendants au moins un minute.
4. Prélever 0,5 ml à l'aide d'une pipette stérile et déposer dans une fiole contenant 4,5 ml d'agar 0,1 %. (Ceci est la dilution  $10^{-3}$ ).
5. Agiter pendant au moins une minute.
6. Répéter les étapes 4 et 5 pour les trois autres dilutions ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ).
7. En commençant par la dilution la plus faible ( $10^{-6}$ ), pipetter 1 ml sur chacun des 2 plats de Petri contenant le milieu PDA. Étendre sur toute la surface avec le bâtonnet (hockey) stérile. (La dilution  $10^{-6}$  en premier.) Effectuer les mêmes étapes pour les dilutions de  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ .
8. Sceller les plats de Petri à l'aide du Ruban Parafilm.
9. Incuber les plats de Petri à la température de la pièce.
10. Observer après 24, 48 et 72 heures.

### Resultats:

- Noter le nombre de colonies/plat de Petri/dilution.
- Calculez le nombre de microorganismes par gramme de sol selon la formule suivante : # de colonies/plat  $\times$  le facteur de dilution = # organismes / 1 gramme de sol
- Noter la morphologie des colonies.

### Questions:

1. Pourquoi faut-il agiter avant de pipetter?
2. À l'étape 7 pourquoi commence-t-on par la dilution la plus faible?
3. Pouvez-vous distinguer les colonies bactériennes des colonies fongiques?

4. Comment pouvons-nous avoir uniquement des colonies bactériennes ou des colonies fongiques?
5. Si vous renversent la fiole contenant la dilution  $10^{-6}$ , qu'est-ce que vous pouvez faire pour obtenir cette dilution, quand même, sur plat de Petri?

**Instructions aux moniteurs:**

- Prenez votre temps – on devrait avoir environ 1 heure et les manipulations durent à peu près 30 min.
- En entrant demander aux élèves de se laver les mains et prendre une place.
- Demandez leur à LIRE les instructions et à poser des questions si quelque chose n'est pas claire.
- Si les élèves aimeraient pratiquer à pipetter il y a des pipettes NON-STÉRILES disponibles avec de l'eau.
- Les fioles et les plats de Petri sont déjà identifiées, demandez leur à écrire leurs initiales sur les plats de Petri.
- La première chose qu'ils ont à faire c'est de nettoyer leur place de travail avec le désinfectant, mouiller la serviette et travailler dessus.
- Rappelez leur que lorsqu'ils ont fini de ramasser les fioles, etc., de les mettre dans l'évier. De nettoyer leur place de travail si dégâts et ensuite de retourner à la salle de conférence. Là, ils pourront regarder la démonstration et poser toutes les questions auxquelles ils aimeraient avoir une réponse.
- Aussitôt que tout le monde est parti, retournez à la salle de conférence pour aider à répondre aux questions.