**MISE EN CULTURE EN MILIEU SOLIDE DE CELLULES EN CONDITIONS STERILES**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Matériel** | 1. **Préparer la paillasse pour la manipulation en champs stérile**
 | 1. **Couler la gélose dans une boîte de Pétri**
 | 1. **Mettre les cellules / ensemencer une boîte de Pétri gélosée**
 | 1. **Faire diffuser des substances dans une boîte de Pétri gélosée**
 |
| - boite(s) de Pétri - erlenmeyer- pipettes stériles et poires à pipeter si nécessaire, - étaleur stérile, disques stériles- tube contenant la suspension de cellules à mettre en culture - flacon de milieu nutritif liquide- bec électrique - eau de Javel diluée dans un récipient, savon, papier absorbant, poubelle de table, plaque froide, marqueur- agar-agar et sa spatule - pince en bois, pince stérile et cure dent- eau distillée stérile - balance et son verre de montre - solution(s) à faire diffuser si nécessaire  | - **S’attacher** les cheveux si nécessaire, **se laver** les mains avec du savon et nettoyer la paillasse avec de l’eau de javel diluée. - **placer** le bec électrique au centre de la paillasse. **- Veiller** à placer tout le matériel nécessaire dans la zone de travail stérile crée par le bac électrique.  | **- Dissoudre** …… g d’agar dans …… mL d’eau distillée. - **Compléter** avec …… mL de milieu nutritif pour les cellules. **- Chauffer** le mélange jusqu’à apparition de l’ébullition. - **Attendre** quelques secondes que la solution refroidisse à peine et verser-la dans …… boîte(s) de Pétri. **- Fermer** la/les boite(s) et **Laisser** refroidir sur une plaque froide. | - Avec une pipette stérile, **déposer** …… mL/ gouttes de suspension de cellules par boîte de Pétri. - Avec l’étaleur, **répartir** la suspensionsur toute la surface de la gélose.  | - Avec une pince stérile, **imbiber** un disque stérile de la solution à faire diffuser et le **déposer** sur la gélose.**- Renouveler** l’opération autant de fois que nécessaire avec d’autre(s) disque(s) stérile(s).*Penser à annoter le positionnement des disques dans la boîte.*  |
| **Sécurité**  | **Précautions de manipulation**  |  |
| http://bip.cnrs-mrs.fr/acmo/img/pollut.jpgLe matériel contaminé par des microorganismes peut présenter un risque pour l’environnement.L’eau de Javel est corrosive à fortes concentrations  | - **Veiller** à réaliser toutes les manipulations dans la zone de travail stérile autour du bec électrique.- **Veiller** à allumer un peu à l’avance le bec électrique afin d’optimiser la zone stérile.- **Veiller** à agiter les suspensions de cellules avant la mise en culture - Une fois utilisé, **placer** le matériel contaminé hors dans un récipient contenant de l’eau de Javel diluée. blouselunettes |