**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 | | | | |