Pour des questions de sécurité, des cultures de microorganismes réalisées au lycée ne peuvent pas être réouvertes. Articles R.1335-1 et suivants du code de la santé publique

**Respect des conditions de stérilité**

**Matériel**

* Bec électrique
* Eau de javel diluée

**20 cm**

**10 cm**

**20 cm**

* papier absorbant
* savon
* poubelle de table
* cristallisoir avec eau de javel

**Protocole**

1. Oter vos bijoux (bagues et bracelets)
2. Attacher vos cheveux si nécessaire
3. Laver vos mains au savon
4. Nettoyer la paillasse à l’eau de javel diluée
5. Allumer le bec électrique pour créer la zone de stérilité

La zone de stérilité dans laquelle vous devez manipuler est définie par la **zone rouge** présentée sur le schéma. Veiller à ce que tout le matériel soit situé dans cette zone de stérilité.

**Le matériel contaminé par des microorganismes présente un risque pour l’environnement !**

Agiter toutes les suspensions avant de les utiliser.

Tout le matériel utilisé pour la mise en culture (écouvillon…) sera déposé dans le cristallisoir contenant de l’eau de javel.

**Mise en culture sur milieu solide d’une suspension de levures ou de bactéries**

***Faire pousser des levures de bière n’est pas un acte dangereux, cependant, il faut savoir que le milieu utilisé et que les conditions de culture des levures peuvent convenir à d’autres microorganismes moins sympathiques. Il est nécessaire de fermer toutes les boîtes de Pétri après ensemencement à l’aide de ruban adhésif ou bien de film étirable paraffiné.***



Avant chaque prélèvement, si plusieurs utilisations d’un même tube

* Flamber l'orifice débouché du tube contenant la suspension avant et après chaque prélèvement ou ensemencement.
* Pendant ce flambage garder le bouchon dans la main, entre le petit doigt et la paume ; ne jamais le poser sur la paillasse.
* Après flambage, reboucher immédiatement
* Opérer rapidement et toujours dans la zone de stérilité du bec électrique pour restreindre les possibilités de contamination.

Ecouvillonnage en cadrant

1. Tremper l’écouvillon dans la suspension, égoutter
2. Fermer le tube
3. Ouvrir le couvercle de la boîte de Pétri
4. Etaler votre prélèvement entièrement sur la gélose de la totalité de la boîte (1).
5. Tourner la boîte d’un quart de tour, étaler à nouveau (2).
6. Recommencer 2 autres fois (3, 4) en tournant toujours dans le même sens (un tour complet réalisé par la boîte)
7. Fermer la boîte
8. Jeter l’écouvillon dans la poubelle et refermer le couvercle en tournant.

Dépôt des disques :

1. Flamber la pince de prélèvement
2. Positionner la boîte contenant les disques dans la zone de stérilité
3. Prélever un disque et fermer la boîte
4. Ouvrir la boîte de Pétri et déposer le disque
5. Fermer le couvercle de la boîte de Pétri
6. Recommencer cette manipulation pour chaque disque en les éloignant les uns des autres

**Mise en culture de levures de boulanger**

*Saccharomyces cerevisiae*

**Préparation du milieu de culture SOLIDE « maison »**

Si possible faire un milieu de culture de type YPG, mais un on peut aussi préparer un milieu « maison ».

**Matériel :**

|  |  |
| --- | --- |
| * Levure de boulanger : 5 g
* Cube de bouillon de bœuf
* 20 g de sucre en poudre (saccharose)
* Filtre (à café)
* Agar ou gélatine (2g)
 | * Boîtes de Pétri
* Compte-goutte : 2
* Oese ou écouvillon d’ensemencement
* Eau distillée
 |

1. **Mélanger** en agitant longuement 5 g de levure fraîche de boulangerie avec 100ml d’eau distillée et un cube de bouillon de bœuf. **Porter à ébullition** pendant quelques minutes.
2. **Ajouter** 20 g de sucre en poudre et compléter à 1 litre avec de l’eau. Bien mélanger. Reporter à ébullition pendant quelques minutes. **Filtrer** avec un filtre café.
3. **Prélever** 100 ml de ce bouillon et y mélanger une feuille de gélatine alimentaire (2 grammes) découpée en petits morceaux mais le résultat est meilleur si on utilise l’Agar à raison de 1 g pour 100 cm3. **Porter** à ébullition jusqu’à dissolution complète de la gélatine ou de l’Agar et laisser refroidir un peu.
4. **Verser** le milieu dans les boites de Pétri 20 cm3 par boite et placer au réfrigérateur jusqu’à gélification du milieu.

**Préparation d’une suspension de levures**

1. **Mélanger** 1 g de levure fraîche de boulanger avec 100 cm3 d’eau tiède et 1 g de glucose, bien agiter et laisser reposer 1 heure.
2. **Répartir** cette suspension dans des tubes stériles

Chaque binôme doit disposer d'un tube stérile.

**Mise en culture de bactéries du yaourt**

*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*

**Préparation d’un milieu de culture LIQUIDE :** YEAST **1 gr** +PEPTONE **0,7 gr** + LACTOSE **1 gr** le tout dans 100 ml d'eau distillée, puis stériliser.

Répartir ce milieu dans des tubes stériles et boucher

**Ensemencement  fait au laboratoire uniquement :**

* Tremper un écouvillon stérile dans du Yaourt
* Le plonger dans le milieu liquide
* Laisser au bain marie à 42°C développement en 5 heures au moins.