

Préparation de milieu de culture solide

- 1) Suivre les instructions sur la bouteille renfermant la poudre.
- 2) Peser la quantité de poudre requise.
- 3) Déposer la poudre dans une chaudière métallique et y insérer un barreau magnétique.
- 4) Si la poudre ne contient pas d'agar, y ajouter de l'agar afin de solidifier le milieu (15 g d'agar dans 1 l).
- 5) Déposer la chaudière sur une plaque agitatrice. Allumer l'agitation (à 5), ainsi que la chaleur.
- 6) Faire chauffer le milieu jusqu'à l'obtention d'une dilution complète et d'une ébullition, pendant un minimum d'une minute.
- 7) À l'aide des gants isothermes, verser le milieu dans un ballon (ne pas dépasser la moitié du contenu de ballon).
- 8) Identifier le milieu avec un ruban gommé. Apposer un petit morceau de ruban à autoclave.
- 9) Autoclaver le milieu (cycle liquide). S'assurer d'insérer le ballon ou les tubes dans un bac pour autoclave afin d'éviter les débordements.
- 10) Lors des temps d'attentes de la stérilisation, identifier les géloses (type de gélose, date de préparation). Il est important d'inscrire ceux-ci sur la plaque de Petri renfermant la gélose, et non sur son couvercle.
- 11) Une fois la stérilisation terminée, couler les géloses dès qu'il est possible d'apposer les mains sur le ballon sans se brûler. Ne pas oublier d'insérer environ 25 ml de liquide dans les plaques de Petri.
- 12) Laisser les plaques entrouvertes, jusqu'à ce qu'elles soient solidifiées. Cette technique évitera le dépôt de condensation sur la gélose.
- 13) Lorsque les plaques sont solidifiées, fermer le couvercle et déposer les géloses dans un support (le couvercle vers le bas). Entreposer celles-ci à 4 °C.

*** Pour éviter les contaminations, couler les géloses le plus rapidement possibles et éviter les mouvements d'air autour des géloses. De plus, il est possible de couler les géloses dans une hotte à flux laminaire stérile.***

Préparation de milieu de culture solide – Calcul

Un plat de Petri contient environ 25 ml de liquide. Calculer toujours un volume de 10 % supplémentaire afin de compenser l'évaporation. Vérifier toujours les recettes inscrites sur la bouteille du produit. Ajuster le pH du milieu (avant l'autoclave) au besoin.

Exemple avec agar dans la recette originale

Préparation pour 20 géloses, recette du manufacturier (gélose) : 10 g de poudre dans 1 l de liquide.

Étape 1 : Déterminer la quantité de liquide (ml) nécessaire pour fabriquer 20 géloses.

$$\frac{1 \text{ gélose}}{20 \text{ géloses}} = \frac{25 \text{ ml}}{X}$$

$$X = \frac{20 \text{ géloses} \times 25 \text{ ml}}{1 \text{ gélose}}$$

$$X = 500 \text{ ml}$$

Préparation d'un milieu de 550 ml (incluant le 10 % du volume total, afin de compenser pour les pertes).

Étape 2 : Convertir les litres en millilitres.

$$1 \text{ l} = 1\,000 \text{ ml}$$

Donc 10 g de poudre dans 1 000 ml

Étape 3 : Déterminer le nombre de poudre nécessaire pour un volume de 550 ml.

$$\frac{10 \text{ g}}{X \text{ g}} = \frac{1\,000 \text{ ml}}{550 \text{ ml}}$$

$$X = \frac{10 \text{ g} \times 550 \text{ ml}}{1\,000 \text{ ml}}$$

$$X = 5,5 \text{ g}$$

Il faudra donc peser 5,5 g de poudre et ajouter 550 ml d'eau.

Exemple sans agar dans la recette originale

Pour l'utilisation d'un milieu sur lequel il n'est pas inscrit gélose ni agar, le milieu sera liquide. Pour solidifier ce milieu pour préparer des géloses, il faudra ajouter de l'agar au milieu liquide.

Préparation pour 20 géloses, recette du manufacturier (milieu liquide) : 8 g de poudre dans 1 l de liquide.

Étape 1 : Déterminer la quantité de liquide (ml) nécessaire pour fabriquer 20 géloses.

$$\frac{1 \text{ gélose} = 25 \text{ ml}}{20 \text{ géloses} \quad X}$$

$$X = \frac{20 \text{ géloses} \times 25 \text{ ml}}{1 \text{ gélose}}$$

$$X = 500 \text{ ml}$$

Préparation d'un milieu de 550 ml (incluant le 10 % du volume total, afin de compenser pour les pertes).

Étape 2 : Convertir les litres en millilitres.

$$1 \text{ l} = 1\,000 \text{ ml}$$

Donc 8 g de poudre dans 1 000 ml

Étape 3 : Déterminer le nombre de poudre nécessaire pour un volume de 550 ml.

$$\frac{8 \text{ g} = 1\,000 \text{ ml}}{X \text{ g} \quad 550 \text{ ml}}$$

$$X = \frac{8 \text{ g} \times 550 \text{ ml}}{1\,000 \text{ ml}}$$

$$X = 4,4 \text{ g}$$

Il faudra donc peser 4,4 g de poudre et ajouter 550 ml d'eau. À ce moment, le milieu sera liquide.

Étape 4 : Déterminer la quantité d'agar à ajouter pour solidifier le liquide afin de fabriquer des géloses.

Pour solidifier un liquide il faut 15 g dans 1 000 ml.

$$\frac{15 \text{ g} = 1\,000 \text{ ml}}{X \quad 550 \text{ ml}}$$

$$X = \frac{15 \text{ g} \times 550 \text{ ml}}{1\,000 \text{ ml}}$$

$$X = 8,25 \text{ g}$$

Il faudra donc peser 8,25 g d'agar et l'ajouter dans le milieu liquide lorsque celui-ci sera chaud. Il faudra par la suite placer le milieu à l'autoclave.