

PRÉPARATION DU TP MUTAGENÈSE

avec des produits de substitution.



Ce TP ne permet pas d'obtenir les mêmes résultats que le TP original ; il se concentre principalement sur l'observation du nombre et de l'aspect des levures.

ATTENTION ! Ce TP nécessite **beaucoup** de préparation en amont.

2 jours avant le TP : nettoyer et/ou stériliser le matériel.

Etape 1 : Préparer le milieu de culture.

❖ Liste du matériel (pour 10 binômes) :

- Un grand bécher PYREX de 1L
- Une balance + 2 sabots de pesée
- 2 spatules
- Une plaque chauffante
- Une paire de gants anti-chaleur
- 5g de levures fraîches de boulanger
- 1 cube de bouillon de boeuf
- 20g de glucose
- 1L d'eau
- 2 grands béciers + grands entonnoirs avec papier filtre (ou plus si vous avez le matériel nécessaire, cela permettra d'accélérer la filtration).
- Agar-Agar (1%)
- Des boîtes de pétri stériles*

**Si vous ne disposez pas de boîtes stériles, vous pouvez prendre d'anciennes boîtes de Pétri préalablement nettoyées à l'eau de javel.*

❖ Préparation des géloses :

LA VEILLE DU TP:

Faire chauffer 100 mL d'eau dans un grand bécher PYREX d'1 L.

Peser et ajouter 5g de levures fraîches de boulanger puis le cube de bouillon de boeuf.

Mélanger à l'aide de la spatule et **porter à ébullition** pendant quelques minutes.

Peser et ajouter 20g de glucose, **mélanger** et **compléter** à 1L avec de l'eau. **Remettre à chauffer** jusqu'à ébullition pendant quelques minutes. (si nécessaire - **Retirer** les particules de gras qui baignent en surface).

Préparer les 2 (ou +) grands béciers avec un grand entonnoir tapissé de papier filtre qui vont servir à filtrer le milieu.

Répartir la solution dans les béciers et laisser **filtrer**. **ATTENTION : Cette étape prend beaucoup de temps !** (pour une classe, récupérer 500 mL de filtrat : env. 20 boîtes)

Récupérer les filtrats obtenus dans le becher PYREX. **Chauffer** de nouveau la solution.

Peser et ajouter de l'Agar-Agar à raison d' 1g pour 100mL de solution (en fonction du volume de filtrat que vous avez obtenu) et **porter à ébullition**.

S'équiper des gants anti-chaleur et **retirer** le bécher de la plaque chauffante.

Laisser refroidir légèrement. **Couler** environ 20-25 mL par boîte de Pétri, **laisser refroidir** avant de les **conserver** au frigo (boîtes retournées).

Etape 2 : Préparer la solution de levures.

❖ Liste du matériel (pour 10 binômes) :

- 1 bécher PYREX de 200 mL
- 150 mL d'eau
- 1 petit bécher de 50 mL
- 1 plaque chauffante
- un morceau d'aluminium
- 10 tubes en verre à hémolyse
- 1 étuve*
- 1 balance + 2 sabots de pesée
- 2 spatules
- 0,5g de levures fraîches de boulanger
- 0,5g de glucose
- 2 pipettes plastiques de 1 ou 3 mL (stérile ou nettoyée à l'eau de javel)
- Coton cardé + Aluminium

** Si vous ne disposez pas d'étuve, vous pouvez préalablement nettoyer la verrerie à l'eau de javel et remplacer le bec bunsen par une bougie.*

❖ Préparation des tubes contenant la solution de levures:

LA VEILLE DU TP :

Faire bouillir env. 100mL d'eau dans un bécher PYREX, sur une plaque chauffante. Une fois, le bécher retiré de la plaque, **couvrir** d'un papier aluminium et **laisser refroidir**.

Stériliser le petit bécher et les tubes à hémolyses : boucher les tubes avec un peu de coton cardé et les emballer dans de l'aluminium avant de les mettre à l'étuve pendant 1H30 à 170°C.

Si vous ne disposez pas d'étuve, vous pouvez aussi nettoyer ces tubes à l'eau de javel, les faire sécher "tête en bas" sur un portoir propre puis les boucher à l'aide d'un coton.

Peser 0,5g de levures fraîches et 0,5g de glucose.

Ajouter les levures et le glucose dans l'eau stérile, **mélanger** à l'aide de la spatule. **Laisser décanter** la solution pendant 1H. Avec la deuxième pipette stérile, **prélever** le surnageant et **verser** 5 gouttes dans un petit bécher, **ajouter** 10mL d'eau stérile et **mélanger**.

Nettoyer la paillasse avec de l'eau de javel et un sopalin.

Placer tout le matériel nécessaire (porte-tube avec tubes - pipettes stériles - bécher contenant la solution de levures) près du bec bunsen ou de la bougie.

Déballer la pipette stérile (ou une pipette préalablement nettoyée à l'eau de javel).

Prélever et **verser** 1mL de la solution de levures dans chaque tube en pensant bien à reboucher chaque tube avec le coton cardé avant de les déposer sur le porte-tube.

Réserver les tubes au frigo.

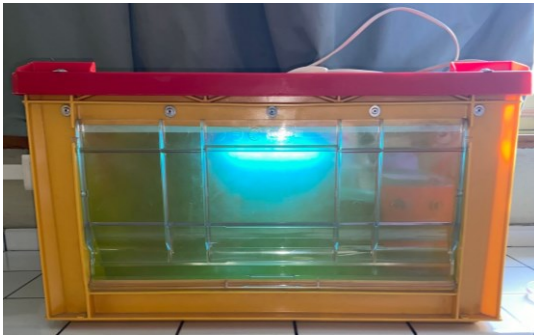
Etape 3 : Préparer le matériel pour les élèves.

❖ Liste du matériel (par binôme) :

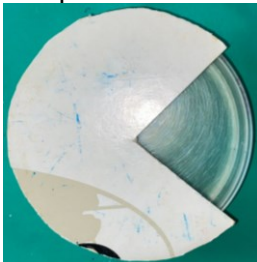
- 1 râteau à ensemer (stérile ou passé à l'eau de javel avec un petit coton) OU 4 billes en verre d'ensemencement qu'il faut **préalablement stérilisées dans des petites boîtes de Pétri en verre (en même temps que les tubes à hémolyse dans l'étape 2)**
- 1 pipette plastique (stérile ou nettoyée à l'eau de javel)
- 1 gélose contenant le milieu de culture
- 1 porte-tube avec un tube contenant les levures à ensemer
- 1 bec bunsen (ou bougie) pour la manipulation en condition stérile
- 1 feutre pour annoter leur boîte
- 1 savon + chiffon propre (pour le lavage des mains)
- 1 pissette d'eau de javel + sopalin pour nettoyer leur paillasse avant manipulation
- 1 petit coton avec alcool pour le rateau.

Au bureau prof ou au fond de la salle :

- 1 boîte à UV



- des patrons en carton adaptés à la dimension des boîtes de Pétri



- 1 chronomètre

❖ La manip' élève :



Penser à allumer la boîte à UV (avec les patrons en carton éparpillés dedans) au moins 30min avant la manip'.

Nettoyer la paillasse à l'aide d'un sopalin et d'eau de javel.

Allumer le bec bunsen (ou la bougie).

Placer le matériel (porte-tube + tube, la pipette encore emballée, le râteau ou la boîte contenant les billes d'ensemencement, la gélose contenant le milieu de culture) autour du bec bunsen (ou de la bougie).

Imbiber un petit coton d'eau de javel pour **nettoyer** le rateau. **Placer** le râteau près du bec bunsen (ou de la bougie).

Se laver les mains et **s'installer**.

Déballer la pipette plastique.

Agiter la solution de levures par petites aspirations avec la pipette avant de **prélever** une petite quantité.

Ouvrir la boîte de Pétri contenant le milieu de culture et **déposer** 1 goutte de solution au centre de la gélose.

Verser les billes d'ensemencement sur la gélose, **refermer** la boîte et **agiter** en gardant bien la boîte de Pétri à plat sur la paillasse OU **déballer** le râteau et **étaler** les levures délicatement partout sur la gélose puis **refermer** la boîte.

Éteindre le bec bunsen ou la bougie.

Faire un repère sur la base de la boîte et sur son couvercle puis annoter les temps d'exposition aux UV (sur le couvercle) sur chaque $\frac{1}{4}$.

Eteindre la boîte à UV.

Y **insérer** sa boîte de Pétri ensemencée. **Oter** le couvercle, le **déposer** à côté de sa boîte.

Placer un patron au-dessus de la boîte de Pétri, de façon à exposer le premier quart de gélose (en bas à droite) aux UV.

Refermer la boîte à UV et **allumer** la lampe à UV, **lancer** le chronomètre pour 90s, **éteindre** la lampe.

Déplacer le patron en carton d'un quart de tour (dans le sens des aiguilles d'une montre; le patron sera donc placé de façon à exposer aux UV le quart en bas à gauche).

Refermer la boîte et **allumer** la lampe, **lancer** le chronomètre pour 60s, **éteindre** la lampe.

Déplacer à nouveau le patron d'un quart de tour. (On exposera donc le quart en haut à gauche).

Refermer la boîte et **allumer** la lampe, **lancer** le chronomètre pour 30s, **éteindre** la lampe.

Vous pouvez modifier le temps d'exposition aux UV selon votre protocole.

Oter le patron en carton, **refermer** sa boîte de Pétri. **Retirer** la boîte et la **placer** dans l'étuve* à 25-28°C pendant 2 jours.

Si vous ne disposez pas d'étuve, vous pouvez tout aussi bien laisser les boîtes à températures ambiante ou proche d'un radiateur (en hiver).

Mettre les boîtes au frigo pour stopper la croissance et les **conserver** jusqu'à interprétation des résultats.

Résultats attendus :

