

# Culture de *Dunaliella*

Mortain-Bertrand, Anne, et al. « A METHOD FOR THE CRYOCONSERVATION OF *DUNALIELLA SALINA* (CHLOROPHYCEAE): EFFECT OF GLYCEROL AND COLD ADAPTATION<sup>1</sup> ». *Journal of Phycology*, vol. 32, n° 2, avril 1996, p. 346-52. *DOI.org (Crossref)*,

<https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00346.x>.

Source: Chat GPT et article

Voici un **protocole détaillé de cryoconservation de *Dunaliella salina*** en laboratoire, adapté aux moyens standards (congélation à -80 °C ou azote liquide si disponible).

---

## ☐☐ Protocole de cryoconservation de *Dunaliella salina*

### ☐☐ Matériel nécessaire

- 

Culture saine et exponentielle de *D. salina*

-

Milieu de culture (ex. : F/2 ou Johnson avec 20–25 % NaCl)

- 

**Cryoprotecteur** : Glycérol (10 %) ou DMSO (5–10 %)

- 

Tubes cryogéniques stériles (1,8 ou 2 mL)

- 

Glace ou bain de refroidissement (alcool + glace carbonique)

- 

Congélateur à -80 °C ou cuve d'azote liquide (-196 °C)

- 

Pipettes stériles

- 

Boîte isotherme si transport entre étapes

---

## ☐ Étapes du protocole

### 1. Préparation de la culture

- 

Prélever une culture saine de *Dunaliella salina* en phase exponentielle (dense, bien verte/rosée selon la souche).

- 

Centrifuger doucement si nécessaire (ex. : 2500 g, 5 min) pour concentrer la biomasse, puis resuspendre dans un volume réduit de milieu.

## 2. Ajout du cryoprotecteur

- 

Mélanger le cryoprotecteur au milieu de culture :

- 

**Exemple** : 900  $\mu$ L de culture + 100  $\mu$ L de glycérol pur (pour atteindre 10 %)

- 

Bien homogénéiser (éviter la formation de bulles).

*Travailler rapidement pour éviter un choc osmotique prolongé.*

---

## 3. Aliquotage

- 

Distribuer dans des tubes cryogéniques stériles (1,5 à 2 mL max/tube).

- 

Fermer hermétiquement.

---

## 4. Refroidissement progressif

- 

Placer les tubes dans un système de refroidissement contrôlé :

- 

Idéal : **boîte de congélation progressive** (ex. : Nalgene™ Mr. Frosty) → -1 °C/min

- 

Alternatif : refroidir les tubes dans un bloc de polystyrène au congélateur -80 °C  
pendant 2-4 h

---

## 5. Stockage

- 

Une fois à -80 °C, transférer :

- 

Soit dans un congélateur -80 °C (conservation correcte jusqu'à 2-3 ans)

- 

Soit dans de l'azote liquide pour stockage long terme (>10 ans)

---

## ☐☐ Décongélation et reprise

1.

Sortir le tube et le **plonger rapidement dans un bain-marie à 37 °C** (30–60 s).

2.

Dès que la glace est fondue, transférer immédiatement dans un tube contenant du milieu frais à température ambiante.

3.

Laisser se réacclimater à la lumière faible et température douce (20–25 °C) pendant quelques jours.

4.

Observer la reprise de la croissance (microscopie ou turbidité visuelle).

---

## □ Notes importantes

- 

Toujours **étiqueter clairement** chaque tube (nom de souche, date, cryoprotecteur utilisé).

- 

Ne jamais recongeler un échantillon déjà décongelé.

- 

Pour chaque souche, garder **au moins 3 tubes de secours**.

---

Revision #4

Created 18 June 2025 14:50:51 by Kogan Mikhail

Updated 18 June 2025 14:56:24 by Perez Guerrero Rafael