

Obtention de souches *Streptomyces*. Criblage de souches *Streptomyces* pour la sécrétion d'exo-amylases, d'exo-protéases et d'antibiotiques

Le matériel de départ est de la terre (les bactéries du genre *Streptomyces* sont des bactéries du sol), prélevée vers 5 à 10 cm en dessous de la surface du sol, en zone aérobie. On ne réalise pas d'enrichissement puisque la population de *Streptomyces* dans les échantillons de sol proposés est importante. Mais, en préalable à l'isolement sur milieu Kuster - amidon, on sèche l'échantillon de sol pendant quelques jours à 30°C et on l'incube à 50°C (chaleur sèche) pendant quelques heures afin d'abaisser de nombreuses espèces bactériennes et fongiques concurrentes.

Préalable : analyse des risques liés aux manipulations proposées .

1. Mode opératoire pour le primo isolement

A partir de terre séchée à 30°C puis incubée à 50°C. Broyer à l'aide d'un pilon dans un mortier. Mélanger environ 1g de broyat à 9 mL de solution stérile de NaCl à 9g/L. Décanter quelques instants et utiliser le « surnageant » pour « isoler » les *Streptomyces*. Isoler sur milieu de Kuster-amidon : isolement classique, étalement de 100 µL, étalement de 10 µL. Incuber les 3 boîtes de 7 à 15 jours à 25-28°C.

Note : composition du milieu de Kuster-amidon : amidon 5g ; caséine ou peptone de caséine 0,3g ; KNO₃ 2g ; NaCl 2g ; K₂HPO₄ 2g ; mix minéraux 1 mL ; agar 18 g qsp 1 L. Le mix minéraux = MgSO₄ 5g ; CaCO₃ 2g ; FeSO₄ 1g qsp 1 L. *Note* : on peut rajouter un antifongique pour inhiber la flore fongique.

2. Souches candidates - criblages

2.1 Choix de souches candidates, culture de stockage

Repérer 4 colonies à « allure *Streptomyces* » différentes (vérifier éventuellement l'allure microscopique par coloration de Gram, voir les caractères à observer en §3 ci-dessous). Prélever un peu des colonies repérées et les ensemercer à la touche sur gélose Kuster-amidon (voir aussi 2.2, 2.3 et 2.4 pour les cultures images nécessaires aux criblages). Cultiver quelques jours. Stocker à 0-4°C.

2.2 Criblage pour la production d'antibiotique

Prélever un peu des colonies repérées en 2.1 et les ensemercer à la touche sur 2 géloses Kuster-amidon. Bien repérer les ensemencements, bien s'assurer que les boîtes ensemencées sont des copies identiques à la boîte de stockage. Cultiver quelques jours.

Note : les colonies de *Streptomyces* sont très difficilement dissociables. Une solution consiste à prélever une colonie entière et à la vortexer avec 2 ou 3 billes de verre stériles en présence d'une ou deux gouttes d'eau.

2.1 Criblage direct sur boîte

Préparer en double 4 mL de « top-agar nutritif » en surfusion à 45°C (par exemple du milieu LB + agar 6g/L). Ensemercer chaque « top-agar nutritif » avec 1 goutte d'une souche pure test (*E. coli* ou *Bacillus subtilis*, culture de la nuit en bouillon). Couler sur une des 2 boîtes de culture de *Streptomyces* en prenant soin de ne pas disperser les colonies *Streptomyces*. Incuber 24 à 48 heures à 30°C. Observer les éventuelles zones d'inhibition. A partir de la boîte de stockage du §2.1, isoler sur milieu trypticase-soja les colonies ayant conduit à des zones d'inhibition contre l'une ou les 2 des 2 souches testées à l'encontre. Incuber 7 jours à 25-28°C.

2.2 Criblage par analyse du pouvoir bactériostatique de surnageants de culture

(Utiliser éventuellement une souche fournie par un autre étudiant).

A partir des isolats du §2.1 :

- Ensemercer chaque souche un bouillon trypticase - soja.
- Incuber 96 heures à 25-28°C. Filtrer sur filtre 0,45 µm.
- Préparer une boîte de Pétri d'agar de Müller-Hinton. Ensemercer par inondation ou à l'écouvillon avec une souche pure test de *E. coli* ou *Bacillus subtilis* (culture de la nuit diluée au 1/200). Sécher 20 minutes à l'étuve à 37°C. Déposer un disque de papier buvard imprégné de 15 µL de filtrat.
- Incuber 24 heures à 37°C. Observer les résultats.

2.2 Criblage pour la production d'exo-amylases

Prélever un peu des colonies repérées en 2.1 et les ensemercer à la touche sur gélose Kuster-amidon. Bien repérer les ensemencements, bien s'assurer que la boîtes ensemencée est une copie identique à la boîte de stockage. Cultiver quelques jours.

Révélation avec une solution iodée (solution de lugol pour coloration de Gram par exemple).

2.3 Criblage pour la production d'exo-protéases

Prélever un peu des colonies repérées en 2.1 et les ensemercer à la touche sur gélose gélatine en boîte de Pétri. Bien repérer les ensemencements, bien s'assurer que la boîte ensemencée est une copie identique à la boîte de stockage. Cultiver quelques jours.

Révélation par recouvrement quelques minutes avec une solution aqueuse saturée en sulfate d'ammonium (principe du relargage par les sels à haute concentration).

Composition de la gélose gélatine proposée : peptone 0,5g, extrait de levure 0,5g, gélatine 15g, agar 15g, qsp 1L.

3. Vérification d'appartenance au genre *Streptomyces*

On peut vérifier l'appartenance au genre *Streptomyces* : bactéries gram positives s'organisant en filaments de diamètre de l'ordre du μm formant un abondant « mycelium » aérien ; colonies micellaires peu étalées, opaques et rugueuses, nombreuses colorations possibles ; germes non mobiles, chimio-organotrophes, aérobies à métabolisme respiratoire, catalase +, hydrolysant l'amidon en glucose ; formation d'exospores en chaîne par septation et fragmentation des hyphes (les spores sont assez résistantes à la chaleur sèche, résistantes à la dessiccation mais peu résistantes à la chaleur humide). Les milieux nécessaires sont à disposition. Les souches pures sont alors conservables, par exemple à l'état de spores ou à -70°C en glycérol à 15%.

4. Compte rendu

- Organigramme des manipulations. Préalable aux manipulations
- Compte rendu de l'ensemble des résultats obtenus
- Quels sont les aspects sélectifs dans le protocole du paragraphe 1 ?
- Analyser la composition du milieu Kuster - amidon.
- Principe du criblage exo-amylases ? Principe du criblage exo-protéases ?

5. Bibliographie

Bactériologie, Paul Singleton, 4^e édition française, Dunod (1999) ;

<http://www-micro.msb.le.ac.uk/video/Streptomyces.html>

<http://www.science.widener.edu/~stjohn/page2.html>.