



HAL
open science

Milieu de culture sélectif pour la détection de **Pseudomonas protegens**

Sylvie Pages, Jean-Claude Ogier, Sophie Gaudriault

► **To cite this version:**

Sylvie Pages, Jean-Claude Ogier, Sophie Gaudriault. Milieu de culture sélectif pour la détection de *Pseudomonas protegens*. 9. Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM), Nov 2019, Bussang, France. hal-02476714

HAL Id: hal-02476714

<https://hal.science/hal-02476714>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

INTRODUCTION

Diverses substances sont utilisées pour rendre un milieu sélectif, antibiotiques, produits chimiques, colorants ou combinaison de produits. Le choix est orienté par rapport aux besoins nutritionnels des bactéries à isoler. Il est donc nécessaire de déterminer quelles substances sont adéquates afin d'isoler sélectivement le candidat. **Aujourd'hui, l'intérêt d'isoler des microorganismes à partir de différentes matrices complexes est devenu nécessaire. La métagénomique et la culturomique sont des approches complémentaires afin d'étudier la biologie fonctionnelle des micro-organismes dans les écosystèmes (1).**

OBJECTIF : création d'un milieu de culture afin d'isoler spécifiquement et sélectivement l'espèce *Pseudomonas protegens*

1/ TESTS PRELIMINAIRES à l'élaboration du milieu

Assimilation des sucres : API 20NE System

	GLU	AR	MIN	MA	NA	MA	GN	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
	D-glucose	L-arabinose	D-mannose	D-mannitol	N-acetyl-	D-maltose	Potassium	Capric acid	Adipic acid	Malic acid	Trisodium	Phenyl/acetic
Espèces (Nombre de souches)												
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (5)	+	v	+	+	+	v	+	+	-	+	+	v
<i>Pseudomonas protegens</i> (12)	+	-	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas putida</i> (3)	+	-	+	v	-	v	+	+	-	+	+	v
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (6)	+	-	+	-	+	+	v	v	-	+	+	-
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (4)	v	-	v	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (3)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	v	-
<i>Ochrobactrum anthropi</i> (4)	+	+	v	-	+	v	v	v	-	+	v	-
<i>Ochrobactrum intermedium</i> (1)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>Photobacterium luminescens</i> (1)	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	v	-
<i>Variovorax paradoxus</i> (5)	+	+	+	+	v	-	+	v	+	+	v	+
<i>Xenorhabdus nematophila</i> (1)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-

+: assimilation, -: absence d'assimilation, v: variable

Assimilation de l'acide adipique (ADI) par *P. protegens* : utilisation comme source de carbone

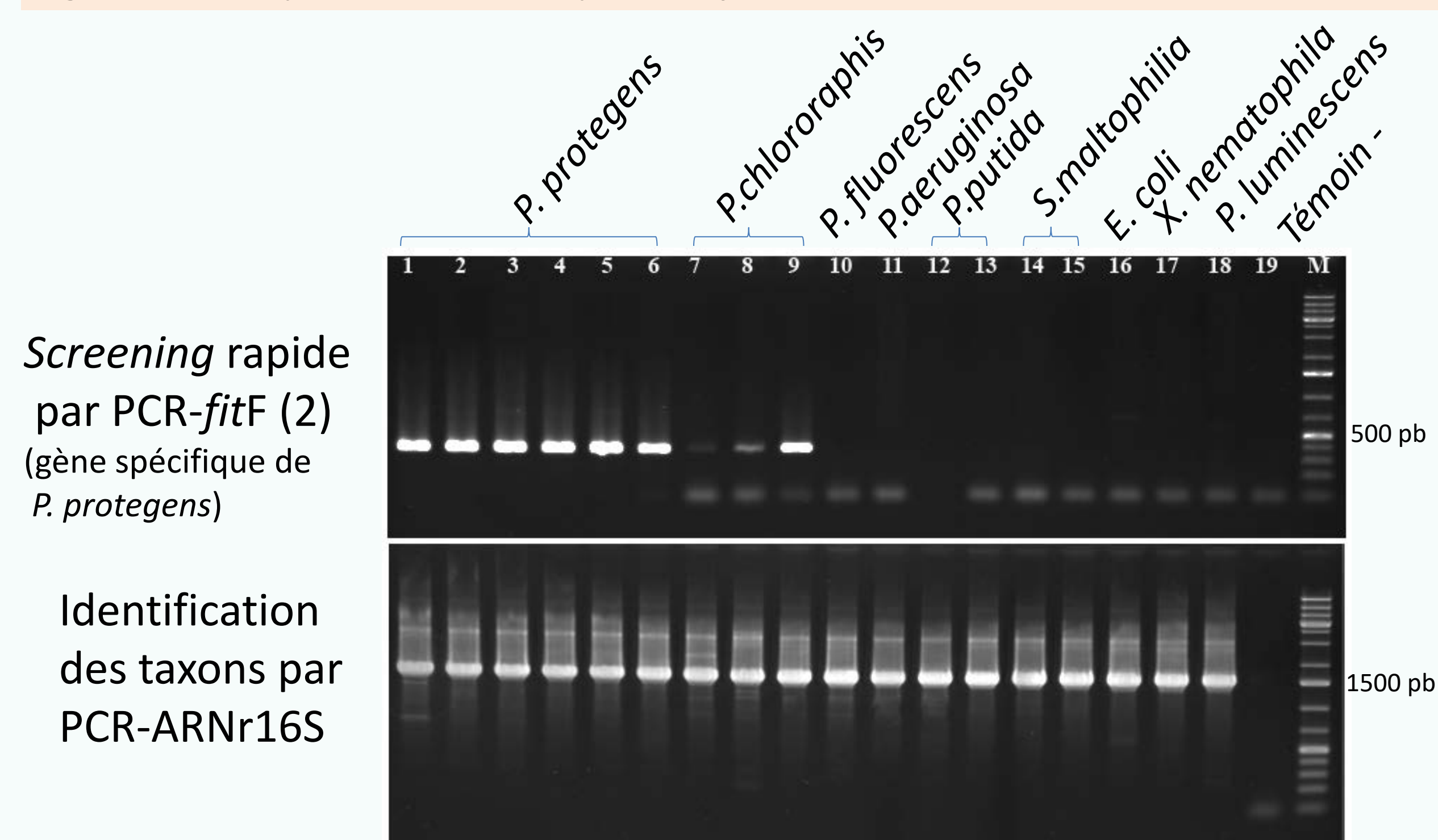
Concentration Minimal Inhibitrice Irgasan®

Espèces	CMI Irgasan® µg/mL
<i>P. aeruginosa</i>	1000
<i>P. protegens</i>	1000
<i>P. putida</i>	250
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	250
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1000
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	< 100
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	< 1
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	< 1
<i>Photobacterium luminescens</i>	< 1
<i>Variovorax paradoxus</i>	< 10
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	< 1
<i>E. coli</i>	< 1

***Pseudomonas protegens* est résistant à l'Irgasan®
CMI à 1 mg/mL**

5/ CONTRÔLES des CFU sur milieu M9-PP-Agar

Figure 3 : exemple de validation par PCR-*fitF* (2) et PCR-ARNr16S des taxons sur M9-PP-Agar



Taxons identifiés cultivant sur M9-PP-Agar

- *Pseudomonas protegens* : colonies brunes

- *Pseudomonas aeruginosa* et *P. putida*
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- *Agrobacterium tumefaciens*
- *Achromobacter xylosoxidans*
- *Variovorax paradoxus*
- *Serratia liquefaciens* et *S. marcescens*

pas de brunissement des colonies

2/ PROCEDURE DE PREPARATION du milieu

	Ingrédients (concentrations finales utilisées)
M9-PP 2X	M9 Base.....2X
	Stérilisation de la sol. mère 5X par autoclavage 20 min à 120°C
	Irgasan® *20 µg/mL
	Stérilisation par filtration 0.2µ
	Conservation de la sol. mère à 20 mg/mL à -20°C
Agar 2X	Acide adipique.....20 mM
	Stérilisation de la sol.mère à 0.1M par filtration 0.2µ
	MgSO4, 7H2O.....4 mM
	Stérilisation de la sol.mère à 1M par autoclavage 20 min à 120 °C
	CaCl2, 2H2O.....0.2 mM
Mode opératoire	125 mL de M9-PP 2X et 125 mL de Agar 2X sont mélangés extemporanément puis le mélange est distribué en boîte de Petri
	125 mL de M9-PP 2X et 125 mL de Agar 2X sont mélangés extemporanément puis le mélange est distribué en boîte de Petri
Culture	Aérobiose, températures 28°C - 37°C

* Dissolution de l'Irgasan® dans l'éthanol 100 %

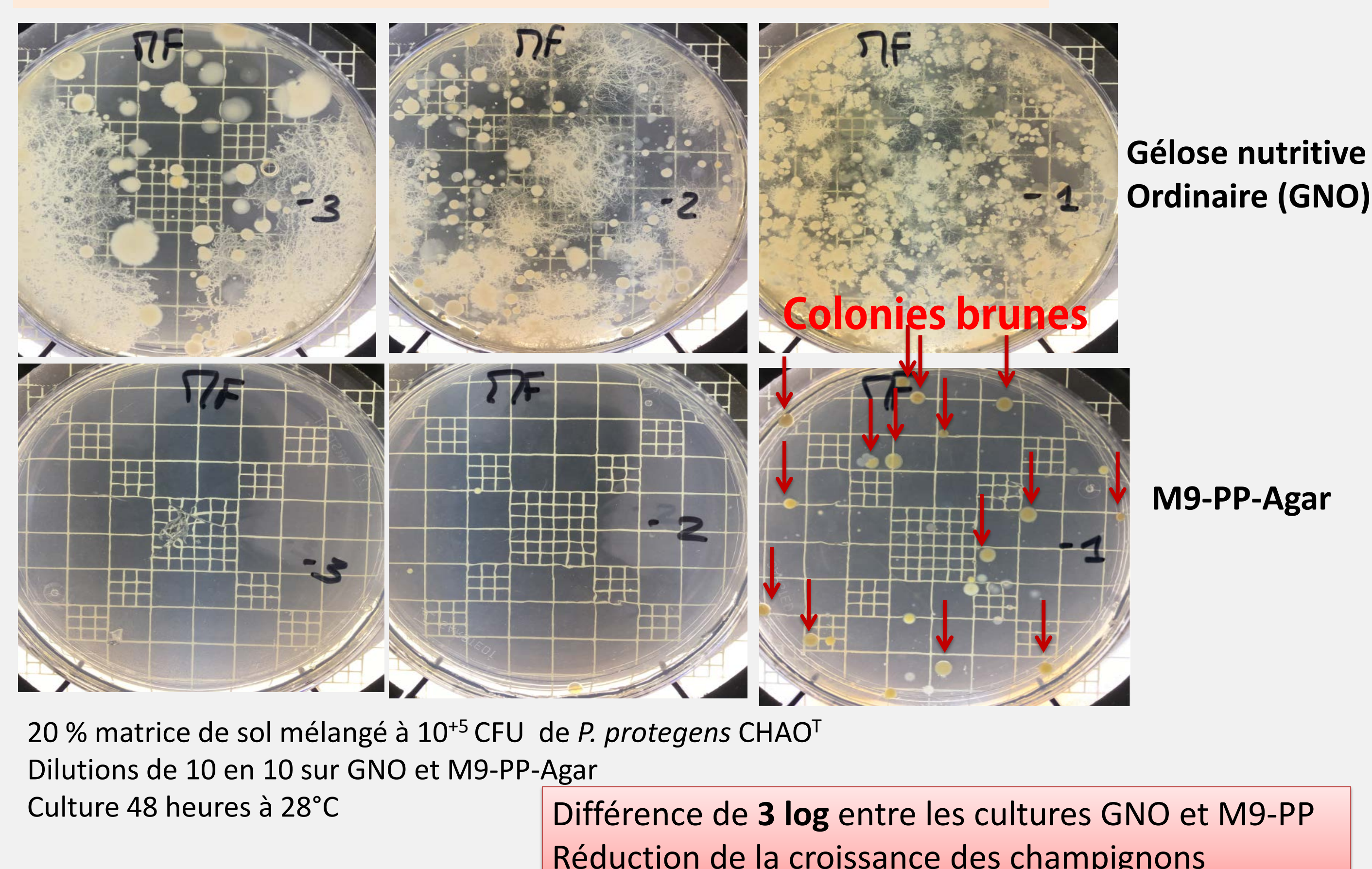
3/ VALIDATION du milieu M9-PP-Agar sur cultures isolées

Figure 1 : exemples de croissance bactérienne observée sur milieu M9-PP-Agar



4/ PERFORMANCE du milieu M9-PP-Agar en matrice complexe

Figure 2 : croissance bactérienne à partir d'un échantillon de sol



CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

- 75 % de spécificité et 100 % de sensibilité pour isoler *Pseudomonas protegens* (68 souches testées et 23 espèces représentées) : croissance
- 100 % de spécificité : croissance + couleur brune des colonies, caractère différentiel pour sélectionner *P. protegens* d'autres taxons
- M9-PP-Agar utilisable à partir de matrices complexes pour la recherche de l'espèce *P. protegens*, agent de bio-contrôle (3), bio stimulant, associée à des macro organismes comme les nématodes entomopathogènes (4)
- Publication en cours (*Journal of Microbiological Methods*)

Références :

(1) Carini P. mSystems. 2019; (2) Péchy-Tarr et al Environ Microbiol. 2008; (3) Keel et al. Environ Microbiol. 2016; (4) Ogier, Pagès et al submitted to Microbiome.