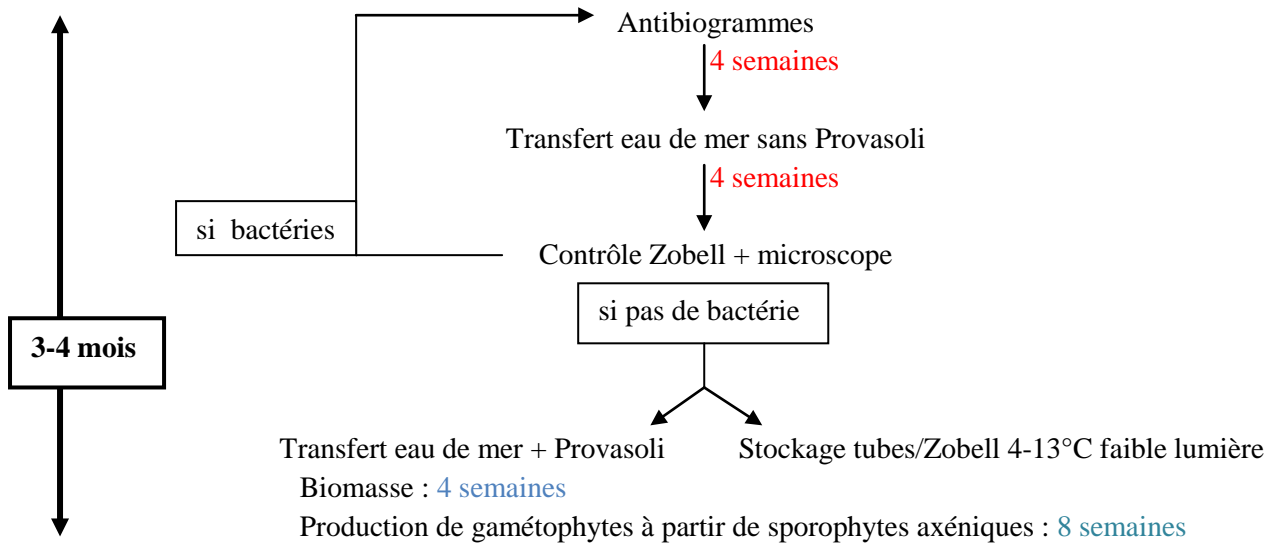


CULTURES AXENIQUES D'ECTOCARPUS SP



Travail effectué sous la hotte à flux laminaire :

- mettre les UV sous la hotte avant toute manipulation,
- utiliser des pinces flambées passées à l'alcool (réserver des pinces pour les cultures axéniques),
- laver les mains à l'alcool et faire attention qu'elles soient sèches avant de flamber les pinces.

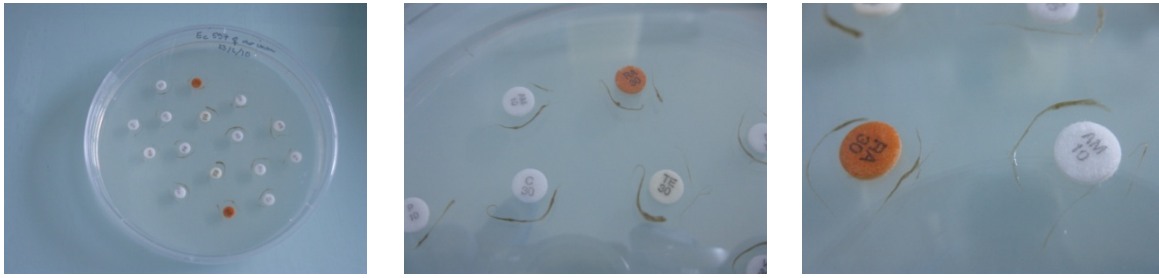
• **Préparation du milieu Zobell** (milieu solide bactériologique) :

Pour 500 ml :

- mélanger 2.5 g Bactotryptone (Triptone caséine triptone) avec 0.5 g extrait de levure (Yeast extract) dans 400 ml eau de mer naturelle filtrée,
- ajuster à 500 ml avec de l'eau milliQ,
- ajouter 5 g d'agar pour milieu solide (l'agar se dissout à l'autoclavage),
- mettre dans une bouteille en verre d'un litre,
- autoclaver (20 mn – 120°C),
- couler le milieu dans des boîtes de Pétri sous la hotte,
- laisser refroidir sous la hotte avec le couvercle ouvert en partie (évite l'humidité dans les boîtes),
- parafilmer et stocker les boîtes à l'envers à 13°C.

• **Antibiogrammes** : (à partir de disques d'antibiotiques)

- mettre les disques d'antibiotiques sur le milieu Zobell,
- déposer des filaments ou fragments de la souche autour et entre les disques,
- parafilmer,
- incuber à 18°C et 13°C jusqu'à 4 semaines et contrôler tous les jours (développement bactérien différent avec la température et la durée d'incubation).



Remarques :

- faire un 1^{er} antibiogramme avec la totalité des antibiotiques et noter ceux qui sont les plus actifs contre les bactéries et tolérés par les algues,
d'après « Axenic clonal cultures of filamentous brown algae : initiation and maintenance » DG Müller, CMM Gachon, FC Küpper- Cah. Biol. Mar. (2008) 49 : 59-65 , les antibiotiques les plus efficaces pour les algues brunes sont : ciprofloxacine, chloramphenicol, rifampicine, polymyxine B et kanamycine,
- si pas de bactérie autour d'un disque => peut-être morte ou en dormance,
- conservation des disques à 4°C dans un réfrigérateur (avant ouverture, conservation entre -20 et 8°C / après ouverture, conservation entre 2 et 8°C),
- avant chaque utilisation, laisser la cartouche de disques à température ambiante 10 mn.

Antibiotique	Concentration par disque	Référence Biorad
Ampicilline (AM)	10µg	66128
Ciprofloxacine (CIP)	5µg	68648
Chloramphenicol (C)	30µg	66278
Erythromycine (E)	15UI/15µg	66448
Kanamycine (K)	30µg/30UI	66618
Penicilline (P)	6µg/10UI	67218
Polymixine (PB)	50µg/300UI	67248
Rifampicine (RA)	30µg	67308
Streptomycine (STR)	10UI/µg	67418
Tetracycline (TE)	30UI/30µg	67448

Antibiodisques Biorad - Pack 4 x 50 disques / prix HT 2014 24,90 €le pack.

• **Transfert dans de l'eau de mer sans Provasoli :**

- à l'endroit où il n'y a pas de développement de bactéries, récupérer les filaments ou fragments et les transférer dans une boîte de Pétri avec de l'eau de mer naturelle sans Provasoli (pour limiter les contaminations),
- laisser les boîtes de Pétri 3-4 semaines à 13°C dans un cristalliseur avec couvercle ou autre boîte (pour limiter les contacts avec d'autres boîtes de Pétri).

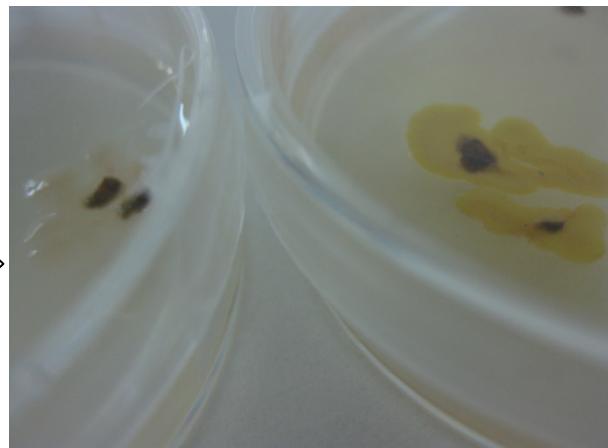
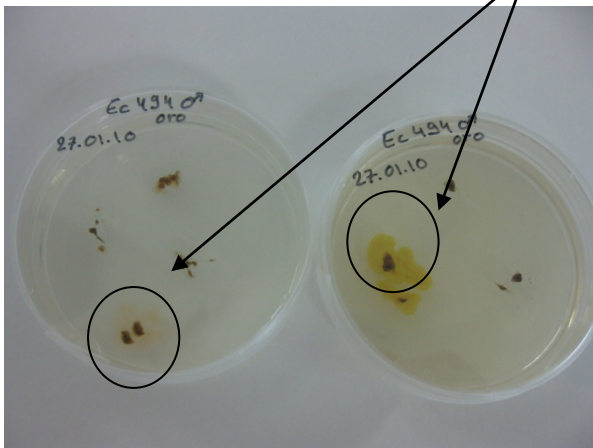
- **Contrôle de l'axénicité de la souche : au moment du transfert dans des boîtes de Pétri avec de l'eau de mer + Provasoli.**

- Sur boîtes de Pétri avec milieu Zobell :
 - déposer la souche prélevée dans les boîtes de Pétri avec eau de mer naturelle sans Provasoli sur le milieu gélosé,
 - parafilmer et incuber à 18 °C et 13°C pendant 4 semaines,
 - observer le développement à l'œil nu : dépôt autour de la souche (blanc, jaune, rose ... selon le type de bactéries),
 - contrôler avec la loupe.
- Au microscope :
 - déposer sur une lame un petit fragment de la souche avec 20 µl de milieu de culture,
 - recouvrir avec une lamelle et observer au microscope la présence de bactéries.

- **Résultats :**

- si absences de bactéries avec les 2 contrôles et selon les besoins :
 - laisser la souche sur le milieu Zobell pour conservation à 13°C ou 4°C faible lumière,
 - transférer dans des tubes ou boîtes avec de l'eau de mer sans Provasoli pour conservation à 13°C ou 4°C faible lumière,
 - transférer dans des boîtes ou bidons avec de l'eau de mer + Provasoli pour production de biomasse,
- si présence de bactéries, refaire des antibiogrammes.

Souches contaminées



Contamination bactérienne observée au microscope