

## Identification des actinomycètes antagonistes de champignons et n'affectant pas le *Rhizobium meliloti*

H. ANTOUN, L. M. BORDELEAU, C. GAGNON ET R. A. LACHANCE

*Station de Recherche, Agriculture Canada, 2560 chemin Gomin, Sainte-Foy, (Qué.), Canada G1V 2J3*

et

*Département de Phytologie, Faculté des Sciences de l'agriculture et de l'Alimentation, Université Laval, Sainte-Foy, (Qué.), Canada G1K 7P4*

Approuvé le 31 mai 1978

ANTOUN, H., L. M. BORDELEAU, C. GAGNON ET R. A. LACHANCE. 1978. Identification des actinomycètes antagonistes de champignons et n'affectant pas le *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* 24: 1073-1075.

L'identification de 13 isolats d'actinomycètes à grande activité antifongique et n'affectant pas deux souches efficaces de *Rhizobium meliloti* a révélé que ces isolats appartiennent aux espèces: *Nocardia autotrophica*, *Streptomyces antimycoticus*, *S. anulatus*, *S. capoamus*, *S. lydicus*, *S. murinus*, *S. roseo-luteus* et *S. thermotolerans*.

ANTOUN, H., L. M. BORDELEAU, C. GAGNON, and R. A. LACHANCE. 1978. Identification des actinomycètes antagonistes de champignons et n'affectant pas le *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* 24: 1073-1075.

Thirteen isolates of actinomycetes that have broad antifungal activity and do not affect two efficient strains of *Rhizobium meliloti* were identified as: *Nocardia autotrophica*, *Streptomyces antimycoticus*, *S. anulatus*, *S. capoamus*, *S. lydicus*, *S. murinus*, *S. roseo-luteus*, and *S. thermotolerans*.

### Introduction

Suite à un tamisage des actinomycètes issus de sols agricoles portant une bonne croissance de luzerne ou de trèfle et une bonne nodulation, nous avons retenu 13 actinomycètes ayant une grande activité antifongique et n'affectant pas deux souches efficaces de *Rhizobium meliloti* (Antoun *et al.* 1978).

Dans ce travail, l'identification de ces 13 isolats d'actinomycètes a été décrite.

### Matériel et méthodes

Les 13 isolats d'actinomycètes utilisés ont été les isolats No 28, 71, 88, 107, 132, 133, 154, 181, 183, 184, 191, 261, 305. Les caractères microscopiques (morphologie et sporulation), la pigmentation des mycélium aériens, l'utilisation des sources de carbone et la formation de pigments solubles et de la mélanine ont été déterminés selon le protocole de Shirling et Gottlieb (1966). Ces caractères ont été décrits, tel que suggéré par Nonomura (1974). Tous les milieux de cultures décrits par Shirling et Gottlieb (1966) sont préparés et vendus par la compagnie Difco (Difco Laboratoires, Detroit, Michigan). Les couleurs des mycélium aériens ont été déterminées par la méthode de Tresner et Backus (1963), avec une série de couleurs que le Dr. Tresner (Am. Cyanamid Co. Lederle Lab., NY) nous a gracieusement prêtée. La morphologie des chaînes de spores a été déterminée à l'aide d'un microscope Reichert (Autriche) muni d'une caméra, en utilisant un film "Kodak Photomicrography Monochrome Film SO-410" (Eastman Kodak Co., NY). La surface des spores a été étudiée selon la méthode de Tresner *et al.* (1961) en utilisant un microscope électronique "Philips 200" à 60 kV.

<sup>1</sup>Contribution No 123 de la Station de Recherche d'Agriculture Canada.

La caractérisation de l'acide diaminopimélique dans les hydrolysats des cellules a été faite selon la méthode de Becker *et al.* (1964) modifiée comme suit. Des fioles Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml d'un bouillon à base de tryptone et d'extrait de levure (milieu ISP1, Difco) ont été inoculées avec des spores des isolats d'actinomycètes à tester, prélevées de culture sur gélose à base d'extrait de levure et d'extrait de malt (ISP2, Difco), en tubes inclinés. Les fioles ont été incubées à 26°C sur un agitateur rotatif, jusqu'à l'obtention de cultures denses. Les cellules ont été recueillies et lavées deux fois en eau distillée stérile et une fois dans l'éthanol à 95% par centrifugation à 8000g durant 30 min à 4°C. Les cellules séchées (10mg) à la température de la pièce ont été hydrolysées durant 18 h à 100°C avec 1ml d'une solution de HCl, 6N, dans des tubes en Pyrex hermétiquement fermés. Après refroidissement, les tubes ont été centrifugés à 1000 g durant 40 min à la température de la chambre et décantés. Le liquide obtenu a été évaporé à sec sur un bain de vapeur. Les cellules ont été suspendues de nouveau dans 1 ml d'eau distillée puis soumises à une nouvelle évaporation. Ce processus a été répété trois fois afin d'éliminer tout le HCl. Le résidu a été dissout dans 0.3 ml d'eau distillée et 20 µl ont été chromatographiés sur du papier Whatman No 1. Le solvant utilisé a été un mélange de méthanol, eau distillée, 10 N HCl et pyridine (80:17.5:2.5:10 en volume). Les papiers ont été développés durant 16 à 18 h par chromatographie descendante. L'acide DL- $\alpha$ , $\epsilon$ -diaminopimélique (Sigma) qui est un mélange des isomères LL, DD et meso a été utilisé comme standard en chromatographie 10 µl d'une solution à 0.01M. Cette méthode de chromatographie ne différencie pas les formes meso des formes DD de l'acide diaminopimélique, mais comme la forme DD est relativement rare on assume qu'elle est négligeable (Gottlieb 1974). Les papiers secs ont été pulvérisés avec une solution de 0.2% de ninhydrine dans l'acétone (poids/volume) et chauffés durant 2 min au four à 100°C. Les taches de l'acide diaminopimélique sont de couleur vert pâle alors que les autres acides aminés ont une couleur pourpre. Dans ce système la forme LL de l'acide diaminopimélique migre plus rapidement

TABLEAU 1. Utilisation des sources de carbone par les isolats d'actinomycètes

Isolat No	Arabinose	Xylose	Inositol	Mannitol	Fructose	Rhamnose	Sucrose	Raffinose	Cellulose	Salicine
28	+	+	+	+	+	+	+	+	-	±
71	+	+	+	+	+	±	+	+	-	-
88	-	±	-	+	±	-	±	+	-	-
107	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
132	+	+	+	+	+	+	+	+	-	±
133	+	+	+	+	+	+	+	+	-	±
154	+	+	±	+	+	+	±	+	-	±
181	+	+	±	+	+	+	+	+	-	+
183	+	+	±	+	+	+	+	+	±	±
184	+	±	±	+	+	+	±	+	-	±
191	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
261	-	±	-	±	+	-	-	-	-	+
305	-	+	-	-	±	-	±	-	-	±

NOTE: Utilisation: +, positive; -, négative; ±, variable ou douteuse.

que la forme *meso*. La caractérisation des sucres présents dans les cellules de l'isolat No 28 d'actinomycète a été faite par la méthode de Lechevalier (1968) légèrement modifiée comme suit. Dans des tubes en Pyrex contenant 50 mg des cellules séchées à l'air, 2 ml d'une solution *N* de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ont été ajoutés. Les tubes hermétiquement fermés ont été gardés à 100°C durant 1 h. Le pH de la suspension a ensuite été ajusté à 5.0-5.5 en ajoutant une solution saturée d'hydroxide de baryum. Le précipité blanc qui se forme a été séparé par centrifugation à 1000 g durant 40 min à la température de la chambre. Le liquide ainsi obtenu a été évaporé à sec dans un four maintenu à 40°C et le résidu a été dissout dans 0.3 ml d'eau distillée. On a chromatographié 20 µl sur papier Whatman No 1, en utilisant comme solvant la partie supérieure d'un mélange composé de *n*-butanol, eau distillée, pyridine et toluène (5:3:3:4 en volume). Les papiers ont été développés durant 48 à 56 h par chromatographie descendante. On a utilisé comme standards 10 ou 20 µl de solutions à 0.1% des sucres galactose, glucose, mannose, arabinose et ribose (Sigma). Les sucres ont été localisés sur le papier en pulvérisant une solution acide de phtalate d'aniline (3.25 g d'acide phtalique dissout dans 100 ml d'eau distillée saturée au *n*-butanol plus 2 ml d'aniline) et en chauffant dans un four à 100°C durant 5 min.

### Résultats et discussion

En déterminant les formes de l'acide diaminopimélique présentes dans les hydrolysats des cellules il est possible de séparer rapidement le genre *Nocardia* du genre *Streptomyces*. En effet, on retrouve l'isomère *meso* de l'acide diaminopimélique chez les *Nocardia* et l'isomère LL chez les *Streptomyces* (Becker *et al.* 1964, Lechevalier et Lechevalier 1970).

L'analyse de l'acide diaminopimélique a indiqué que seul l'isolat No 28 contient l'isomère *meso*. Les autres isolats contiennent tous l'isomère LL. L'analyse des sucres de l'isolat No 28 a indiqué que les cellules contiennent de l'arabinose et du galactose. L'isolat No 28 a une paroi cellulaire du type IV (Lechevalier et Lechevalier 1970). Comme cet isolat produit un vrai mycélium qui se ramifie et se fragmente, il appartiendrait donc à la famille des Nocardiaceae (Gottlieb 1974). Les autres isolats

ont une paroi cellulaire du type I (Lechevalier et Lechevalier 1970), forment un vrai mycélium qui ne fragmente pas et produisent de longues chaînes de spores. Ces isolats appartiennent donc à la famille des Streptomycetaceae. Aucun des 12 isolats contenant l'isomère LL de l'acide diaminopimélique n'a produit de vésicule ressemblant à un sporangium et les spores n'étaient pas produites sur des sporophores verticillés. Ces 12 isolats appartiennent donc au genre *Streptomyces* (Gottlieb 1974). L'utilisation des sources de carbone par les 13 isolats d'actinomycètes est décrite dans le Tableau 1. Le Tableau 2 indique les couleurs des mycélium aériens et montre la production de pigments, la morphologie des chaînes de spores et la nature de la surface des spores des 12 isolats appartenant au genre *Streptomyces*. L'isolat No 28 forme des spores qui ont une surface lisse et une forme cylindrique, les mycélium se ramifient et se fragmentent en formant une forme sphérique (coque). Cet isolat appartient vraisemblablement à l'espèce *Nocardia autotrophica* (Gordon *et al.* 1974). L'isolat No 71 ressemble au *S. lydicus* De Boer, Dietz, Silver et Savage. Il y a contradiction dans la littérature sur l'utilisation de l'inositol par cette espèce, car Nonomura (1974) rapporte qu'il est utilisé pour la croissance, ce qui est le cas pour notre isolat 71, alors que Gottlieb (1974) rapporte qu'il ne l'est pas. L'isolat No 88 est proche du *S. roseo-luteus* Bessell à l'exception que cette espèce produit des pigments sur le côté opposé des colonies, ainsi que des pigments solubles et ne produit pas de mélanine (Nonomura 1974), caractéristiques non présentées par notre isolat.

L'isolat No 107 ressemble au *S. capoamus* Goncalves de Lima, Albert et Goncalves de Lima. Cependant, il y a aussi contradiction dans la littérature car Nonomura (1974) rapporte que cette espèce n'utilise ni l'inositol ni le sucrose pour sa

TABLEAU 2. Couleurs des mycélium aériens, production de pigments, morphologie des chaînes de spores et nature de la surface des spores des isolats de *Streptomyces*

Isolat No	Couleurs des mycélium aériens <sup>a</sup>	Pigments <sup>b</sup>			Forme de la chaîne des spores <sup>c</sup>	Surface des spores <sup>d</sup>
		Mélanine	Sur le côté opposé des colonies	Solubles		
71	GY	0	0	0	S	Sm
88	R	1	0	0	S	Sm
107	GY (R)	1	1	1	RA	Sm
132	GY	0	0	0	S	Sp, Wa
133	GY	0	0	0	S	Sp, Wa
154	GY	1	0	0	RA, S	Sp
181	GY	0	0	0	S	Sp, Wa
183	GY	0	0	0	S	Sp, Wa
184	GY, R	0	0	0	S	Sp, Wa
191	Y	0	0	0	RF	Sm
261	R (GY)	1	0	0	S	Sm
305	R	1	0	0	RF	Sm

<sup>a</sup>GY, gris; Y, jaune; W, blanc; R, rouge, décrite d'une croissance sur le milieu ISP3, gélose à base d'avoine (Difco) et ( ) sur d'autres milieux.

<sup>b</sup>Production de pigments: 1, produit; 0, non produit.

<sup>c</sup>RF, rectiflexibles; RA, retinaculiaperti; S, spirales.

<sup>d</sup>Sm, lisse; Sp, épineuses; Wa, rugueuses.

croissance alors que Gottlieb (1974) rapporte qu'elle les utilise. L'isolat No 107 n'utilise pas l'inositol et utilise le sucrose. Contrairement à notre isolat, cette espèce utilise aussi la salicine (Gottlieb 1974). Les isolats No 132, 133, 181, 183 et 184 appartiennent à l'espèce *S. antimycoticus* Waksman qui produit le complexe endomycine formé d'un mélange d'antibiotiques antifongiques et qui a une activité antibactérienne (Gottlieb 1974). L'isolat No 154 est similaire au *S. thermotolerans* Pagano, Donovan, Dutcher et Heuser et l'isolat No 191 est similaire au *S. anulatus* (Beijerinck) Waksman. Cette dernière espèce a des activités antibactériennes et antifongiques (Gottlieb 1974). L'isolat No 261 ressemble au *S. murinus* Frommer à l'exception que cette espèce ne produit pas de mélanine et produit des pigments sur le côté opposé des colonies ainsi que des pigments solubles. Gottlieb (1974) rapporte que le raffinose n'est pas utilisé alors que Nonomura (1974) rapporte qu'il l'est. Cette espèce produit le complexe X d'actinomycine et a une activité antifongique. L'isolat No 305 ne ressemble à aucune des espèces de *Streptomyces* décrites par le "International *Streptomyces* Project" (Nonomura 1974), ni dans le *Bergey's Manual of determinative bacteriology* (Gottlieb 1974) et pourrait être une nouvelle espèce du genre *Streptomyces*, ou une espèce décrite ailleurs.

#### Remerciements

Les auteurs remercient le Dr. H. A. Lechevalier et madame M. P. Lechevalier pour leur aide à

l'identification des isolats d'actinomycètes ainsi que le Dr. R. Bolduc pour les photographies au microscope électronique. Une partie de ce projet a été financée par le C.R.E.S.A.Q.; Octroi No LA-73-553 à R. A. Lachance.

ANTOUN, H., L. M. BORDELEAU, C. GAGNON et R. A. LACHANCE. 1978. Actinomycètes antagonistes de champignons et n'affectant pas le *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* **24**: 558-562.

BECKER, B., M. P. LECHEVALIER, R. E. GORDON et H. A. LECHEVALIER. 1964. Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.* **12**: 421-423.

GORDON, R. E., D. A. BARNETT, J. E. HANDEHAM et C. H-N. PANG. 1974. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and the Nocardin strain. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**: 54-63.

GOTTLIEB, D. 1974. Actinomycetales Buchanan 1917. Dans *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 8th ed. R. E. Buchanan et N. E. Gibbons, co-éditeurs. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

LECHEVALIER, M. P. 1968. Identification of aerobic actinomycetes of clinical importance. *J. Lab. Clin. Med.* **71**: 934-944.

LECHEVALIER, M. P., et H. A. LECHEVALIER. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 435-443.

NONOMURA, H. 1974. Key for classification and identification of 458 species of the *Streptomyces* included in the ISP. *J. Ferment. Technol.* **52**: 78-92.

SHIRLING, E. B., et D. GOTTLIEB. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.

TRESNER, H. D., et E. J. BACKUS. 1963. System of color wheels for Streptomyces taxonomy. *Appl. Microbiol.* **11**: 335-338.

TRESNER, H. D., M. C. DAVIES et E. J. BACKUS. 1961. Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. *J. Bacteriol.* **81**: 70-80.