

**Protocole 5.2 : Isolement direct**

**Objectif** **:** Extraire des phages d'un échantillon environnemental

**But** **:** Cette méthode permet d’extraire des phages à partir de microbes et de particules de matières d’un échantillon environnemental solide ou liquide. L'échantillon extrait est ensuite utilisé pour infecter vos bactéries hôtes en utilisant le test de plages de lyse. Cette méthode offre un « instantané » de tous les phages présents dans votre échantillon environnemental qui peuvent infecter votre hôte.

**Matériel requis :**

* Échantillon environnemental
* Milieu de culture liquide\* (5 ml / échantillon)
* Seringue stérile de 3 ml ou 5 ml
* Filtre pour seringue de 0.22 μm
* Pipettes sérologiques de 5 ml
* Microtubes
* Tube conique de 15 ml

**Protocole :**

1. Préparez votre paillasse pour travailler dans des conditions aseptiques et assemblez le matériel requis.
2. Vous aurez besoin d'un échantillon environnemental prélevé à l'aide du protocole 5.1: **Collecte d'échantillons environnementaux.**
3. Extrayez des phages à partir d'échantillons solides, tels que le sol ou le compost. Si vous avez prélevé un échantillon liquide, passez directement à l'étape D.
4. Remplissez environ du tiers à la moitié un tube conique de 15 ml avec l’échantillon.
5. Ajoutez le milieu de culture liquide jusqu'à ce que l'échantillon soit immergé sous 2 à 3 ml de liquide.
6. Bouchez le tube et inversez plusieurs fois pour bien mélanger.
7. Incubez le tube dans un incubateur avec agitation à 250 RPM pendant 1 à 2 heures.
8. Laissez l'échantillon reposer jusqu'à ce que les particules de matières se soient déposées au fond. Cela peut prendre aussi peu que 2 minutes ou jusqu'à 20 minutes.
9. Préparez un filtrat de phages de façon stérile.
10. Ouvrez l'emballage d'un filtre à seringue (0.22 μm), en laissant le filtre dans l'emballage.
11. À l'aide d'une seringue, aspirez environ 2 ml de la surface de l’échantillon liquide. Évitez d’aspirer des particules solides du fond du tube pour éviter de boucher le filtre pendant la filtration.
12. Fixez la seringue au filtre, puis retirez le filtre de l'emballage. Veillez à ne pas contaminer le filtre au cours du processus.
13. Assurez-vous que le filtre est vissé fermement en place.
14. En appuyant sur le piston de la seringue, versez au moins 0.5 ml de filtrat dans un microtube identifié.
15. Si des débris obstruent le filtre, vous pourriez rencontrer une résistance. Ne forcez pas le liquide à travers le filtre ou il se brisera. Si votre filtre se bouche, retirez-le, remplacez-le par un nouveau et continuez la filtration.
16. Fermez immédiatement le microtube.

5. Jetez la seringue et le filtre.

6. Passez directement au protocole de **Test de plages de lyse** (5.3).

**Conseils utiles :**

* Les sols sont composés de différents types de particules, chacune avec sa propre charge de surface. Les phages adhèrent à ces particules de sol chargées par le biais d'interactions électrostatiques. Agiter vigoureusement votre échantillon de sol dans les milieux de culture pendant 1 à 2 heures aidera à rompre ces interactions, libérant les phages du sol. Si votre échantillon est secoué pendant la nuit, assurez-vous d'utiliser un tampon de phage au lieu d'un milieu afin de ne pas développer accidentellement des microbes pathogènes du sol.
* Cette méthode fonctionnera également bien avec des échantillons liquides.
* Après avoir été agitées, certaines particules de votre échantillon de sol peuvent ne jamais se déposer (l'écorce flotte !). Évitez d'ajouter les particules flottantes à votre seringue avant de filtrer.
* Ces échantillons ne peuvent pas être conservés plus de 24 heures à 4°C. La concentration de phages infectieux diminue rapidement lorsqu'ils sont entreposés à de faibles concentrations.
* Vous pouvez effectuer un isolement direct en même temps qu'un isolement après enrichissement sans avoir à effectuer les deux expériences séparément. Voir le protocole **Isolement après enrichissement** (5.5) pour plus de détails.

\*Si vous utilisez *M*. *smegmatis* comme hôte pour l'isolement des phages, vous pouvez utiliser le milieu enrichi comme milieu liquide dans cette expérience, au lieu du milieu 7H9.