

TP2 : Techniques d'identification

Introduction :

Afin d'arriver à déterminer telle ou telle espèce, il est impératif de passer par l'étape d'identification. Celle sollicitée dans ce TP est l'identification phénotypique.

Les méthodes choisies dans ce cas, doivent être rapides et informatives afin d'assurer une identification la plus rapide possible. On y utilise comme matériel ; des tubes avec bouchons, des boîtes des Pétri, des pipettes Pasteur, une anse de platine, et une galerie biochimique API 20E pour l'identification automatisée.

La démarche diagnostique se fait généralement en deux étapes :

- ✚ Test d'orientation ;
- ✚ Identification d'espèce.

Le but de ce TP étant, l'initiation aux différents tests d'identification, et à l'interprétation de leurs résultats.

Tests sur milieux de culture en tubes :

Milieu KIA ou Kligler :

Principe ;

Ce milieu est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des *Entérobactéries*. Il permet la mise en

- L'utilisation du [lactose](#) ;
- La fermentation du [glucose](#) ;
- La production d'[H₂S](#) ;
- La production de [gaz](#) ;
- La [lysine décarboxylase](#).
- La [B-galactosidase](#) pour les bactéries [lactose](#) - (test [ONPG](#)).

Milieu citrate de Simmon

est un milieu de culture pour la différenciation des bactéries gram-négatives sur la base de l'**utilisation du citrate**. Le milieu teste la capacité des organismes à utiliser le citrate comme la seule source de carbone par la bactérie. Il contient du bleu de bromothymol comme indicateur de pH.

On a ensemencé le milieu avec la suspension bactérienne, par des stries et on a incubé 24h à 48h à 37°C. Les résultats seront comme suit :

- ✓ virage de l'indicateur au bleu ; il y a eu alcalinisation du milieu donc la bactérie est citrate de Simmon+ ;
- ✓ pas de virage au bleu ; il n'y a pas eu alcalinisation, donc elle est citrate de Simmon-.

Résultat obtenu :

- ✓ Pas de virage au bleu pour notre bactérie, donc elle est dite ; cit-.

Milieu Clark et Lubs :

Principe :

Il permet de mettre en évidence les voies de fermentation des acides mixtes, et l'acétone.

On a fait un ensemencement tube à tube, et on a incubé pendant 24h à température optimale. Après on a divisé le tube en deux. On a ajouté au premier le réactif Vp1 (NaOH) et le Vp2 (α -naphthol) et on a attendu quelques minutes. Au deuxième, on a ajouté du rouge de méthyle. La réaction dans ce cas est immédiate. Les résultats seront :

- ✓ pour le test Vp ; rouge = Vp+, jaune = Vp- ;
- ✓ Pour le test RM ; rouge = RM+, et jaune = RM-.

Résultats obtenus :

- ✓ Vp coloration rouge donc c'est VP+ ;
- ✓ RM coloration rouge donc c'est RM+.

Milieu mannitol-mobilité :

Principe :

Ce milieu permet d'étudier la fermentation du mannitol, et la mobilité de la bactérie. Le colorant utilisé est le rouge de phénol.

L'ensemencement a été fait par piqûre centrale à l'aide d'une anse de platine dont la boucle est ouverte. Il a été incubé 24 h à Température optimale. Les résultats apparaitront comme tels :

- ✓ milieu jaune veut dire que c'est mannitol+ ;
- ✓ milieu rouge, mannitol- ;
- ✓ si un fil blanc se forme au niveau de la piqure centrale, donc la bactérie est immobile ;
- ✓ s'il y a apparition d'une couche blanche sur toute la surface donc la bactérie est mobile.

Résultats obtenus :

- ✓ milieu rouge = $\bar{m}an-$;
- ✓ pas de fil au niveau de la piqure et pas de pas de couche à la surface = mob-.

Milieu eau peptonnée :

Principe :

Permet de mettre en évidence la tryptophanase, où la dégradation du tryptophane donne de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac. L'indole est révélé par l'ajout du réactif de Kovac.

Cela se fait par ensemencement d'un bouillon riche en tryptophane, avec la suspension bactérienne, tube à tube. On incube pendant 24h à 37°C, après on ajoute le réactif. Comme résultat positif pour la présence d'indole on a la formation d'un anneau rouge à la surface du milieu.

Résultat obtenu :

- ✓ Présence de l'anneau rouge: ind+
- ✓ Absence de l'anneaurouge : ind-

Tests sur milieux de culture en boîtes de Pétri :

Milieu Hektoen :

Principe :

C'est un milieu sélectif, d'isolement des salmonelles et des shigelles, bien que des bactéries à Gram- puissent s'y développer. Ce milieu contient deux indicateurs colorés ; le Bleu de bromothymol et la fuschine acide. Il permet de mettre en évidence trois glucides ; silicine, saccharose, et lactose, aussi la production d'H₂S.

On a fait pour ce test un ensemencement par stries, puis on a incubé pendant 24h à 37°C. Les résultats positifs sont soit :

- ✓ des colonies rouges saumon ;
- ✓ des colonies bleus-vert à centre noir ;
- ✓ des colonies bleus-vert ou vertes.

Résultat obtenu :

- ✓ colonies rouges saumon.

Milieu Chapman :

Principe :

Permet la croissance des germes halophiles, et permet également d'étudier la fermentation du mannitol par l'indicateur coloré, le rouge de phénol présent dans le milieu.

On a ensemencé la boîte par des stries, et on la mise à incuber pendant 24h à 37°C. Et on ya également fait le test de catalase par l'ajout de H₂O₂. Les résultats de ce test seront :

- ✓ un virage au jaune des colonies donc c'est mannitol+ ;
- ✓ pas de virage donc c'est mannitol- ;
- ✓ s'il y a une effervescence immédiate après l'ajout de H₂O₂ cela voudrait dire que c'est catalase+ ;
- ✓ Sinon ça sera un catalase-

Résultats obtenus :

- ✓ colonies jaunes = man+ ;
- ✓ effervescence immédiate = cat+.

Milieu EMB :

Principe :

Milieu Eosine Bleu de Méthylène, milieu d'isolement des bacilles à Gram-. Il contient un critère de différenciation, le lactose et deux colorant ; le Bleu de méthylène et l'éosine.

On l'ensemence avec la méthode des cadrans et on fait une incubation durant 24h à 37°C. Les résultats sont comme suit :

- ✓ colonies violettes = lactose+, et semi bombées à reflet métallique donc c'est *E. coli*.
- ✓ colonies transparentes grisâtres = lactose-.

Résultat obtenu :

- ✓ colonies transparentes grisâtres = lact-.

Milieu gélose nutritive :

Principe :

Ce milieu permet la culture des bactéries peu exigeantes.

Pour ce milieu, on a fait un ensemencement par isolement, et on l'a mis à l'étuve durant 24h à 37°C. Comme résultat pour ce test certaines colonies peuvent avoir des couleurs et des formes caractéristiques.

Résultat obtenu :

- ✓ nos colonies sont apparues blanches et de forme ronde.

Techniques d'identification automatisées (la galerie API 20E) :

Principe :

La galerie API 20E est un ensemble de 23 tests biochimiques spécifiques à l'identification des *Entérobactérie*. Elle compte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanées ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification.

Technique :

- **Préparation de la galerie :** réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Ensuite déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

- **Préparation de l'inoculum :** préparer une suspension bactérienne dans un tube d'eau distillée stérile, avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.

- **Inoculation de la galerie :** remplir à l'aide d'une pipette Pasteur les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne, et remplir uniquement les tubes des autres tests. Puis créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine. Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture et réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs

Identification :

- **Avec le tableau d'identification :** comparer les réactions notées sur la fiche de résultats

Identification :

8

- Avec le tableau d'identification : comparer les réactions notées sur la fiche de résultats

Domaine SNV : Biologie, Agronomie, Science Alimentaire, Ecologie

avec celle du tableau ;

- Avec le catalogue analytique : les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2, 4) est notée dans un tableau.

On obtient un nombre 7 chiffres qui sert de code d'identification.

NB : le microtube ODC n'a pas été ensemencé lors du TP, mais on l'a considéré comme positif

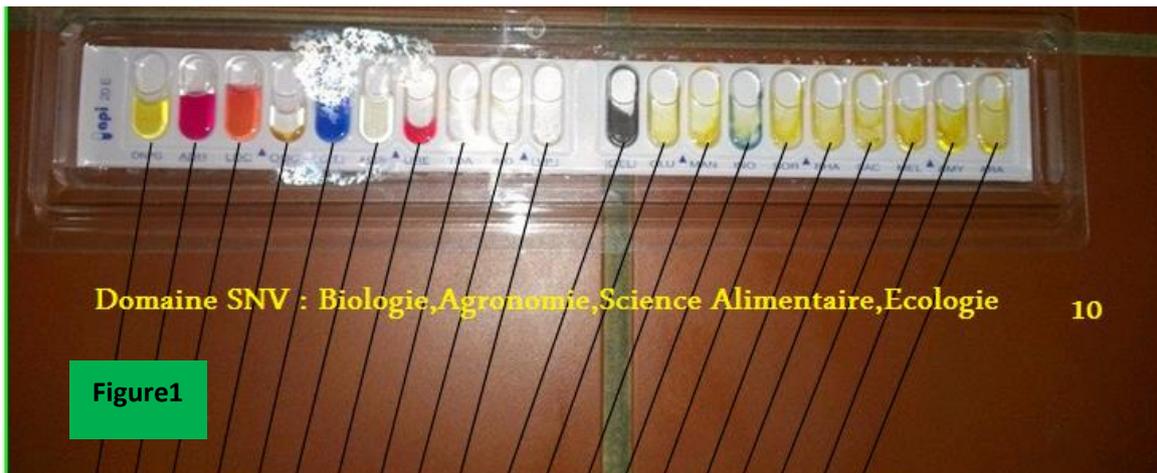


Figure1

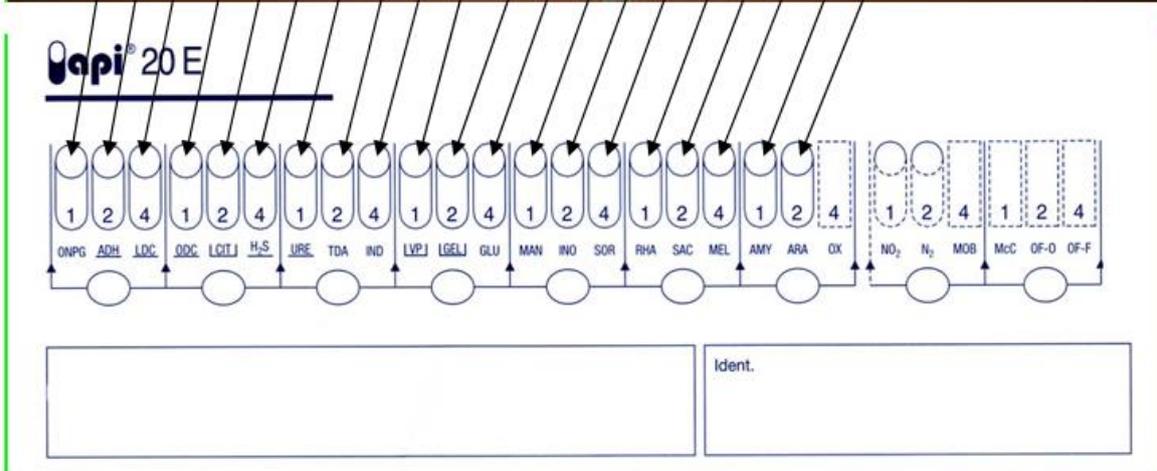


Figure 2: résultats de la galerie Api 20E après ensemencement et incubation

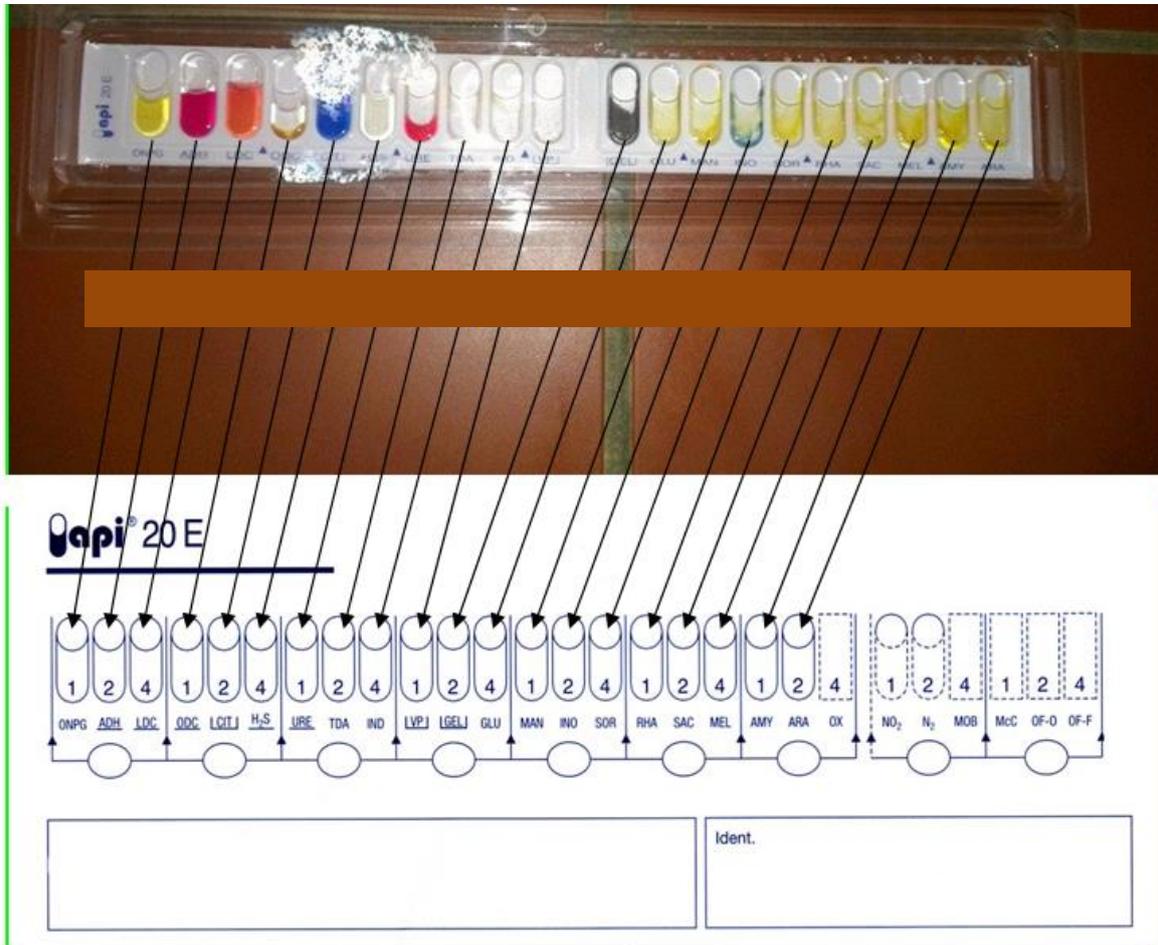


Figure2 résultats de la galerie Api 20E après ensemencement et incubation

Conclusion :

Après interprétation de nos résultats, on a pu conclure que la souche inconnue, sur laquelle on a effectué nos tests, appartient au groupe des *Entérobactéries*. Cependant, ces résultats ne nous permettent pas l'identification directe de notre espèce. Donc des tests supplémentaires seront requis.

D'autre part, la lecture de la galerie API 20E a permis d'aboutir à un code à 07 chiffres qui est « 7 316 573 ». Pour avoir confirmation que la souche est une *Entérobactérie* et arriver à définir l'espèce précise, on doit se référer au logiciel informatique spécialisé.