**CHAPITRE 5 : Techniques d'étude et d'identification des microorganismes**

L'identification d'un microorganisme ne peut se faire qu'après son isolement et sa purification. Elle peut être réalisée à partir des caractères culturaux, morphologiques, biochimiques, physiologiques, immunologiques, lysotypiques, génétiques et des facteurs de pathogénicité.

# Caractères culturaux

La culture en boites de Pétri sur milieu gélosé ou en tube de gélose inclinée, permet de déterminer la forme (Figure 01 a, b et c), l'aspect et la couleur des colonies. L'examen des colonies peut être effectué à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire.

La culture en tube de milieu liquide permet de déterminer la zone de culture (surface ou profondeur) et son aspect en surface (voile ou anneau) (Figure 01 e).

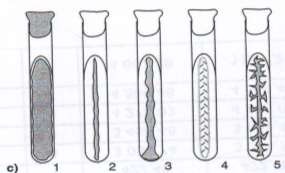
Dans certains cas, la culture par piqure sur culot de gélatine permet d'étudier le type de liquéfaction (Figure 01 d).



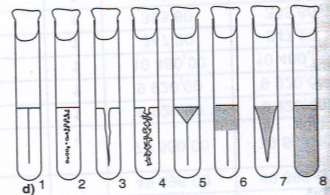
* 1. **Forme des colonies :** punctiforme **(1)**, circulaire **(2)**, ondulée **(3)**, lobée **(4)**, érodée **(5)**, filamenteuse ou duveteuse **(6)**, rhizoïde **(7)**, plissée à striation radiale **(8)**, plissée a striation concentrée **(9)**, en fuseau dans la masse de la gélose **(10)**.



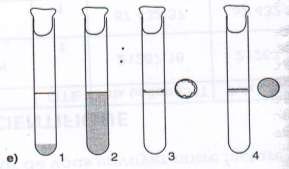
* 1. **Coupe des colonies :** plate **(1)**, élevée **(2)**, convexe **(3)**, en dôme **(4)**, ombiliquée **(5)**



* 1. **Culture en gélose inclinée (ensemencement linéaire) :** envahissante **(1)**, filiforme **(2)**, ondulée **(3)**, diffuse **(4)**, rhizoïde ou arborescente **(5)**.



* 1. **Culture sur gélatine en culot (ensemencement par piqûre) :** filiforme **(1)**, perlée **(2)**, ondulée **(3)**, arborescente **(4)**, liquéfaction cratériforme **(5)**, liquéfaction stratiforme **(6)**, liquéfaction sacculaire**(7)**, liquéfaction totale **(8)**.



* 1. **Culture sur milieu liquide (avec aspect en surface) :** culot **(1)**, trouble **(2)**, **anneau (3)**, voile **(4)**.

**Figure 01 : Caractères culturaux**

# Caractères morphologiques et structuraux

Il s'agit de déterminer : la forme, la taille, le type de regroupement des cellules, le type de Gram ainsi que la mobilité ou non des microorganismes. Les différentes formes des cellules bactériennes sont :

* La forme sphérique : coque ou cocci;
* La forme bâtonnet : bacille;
* La forme intermédiaire entre le cocci et le bacille : coccobacille;
* Le bâtonnet incurvé en virgule : vibrion;
* Le bâtonnet spiralé : spirille.

Concernant le regroupement, les cellules bactériennes peuvent se retrouver à l'état isolé ou groupés d'une manière pouvant être caractéristique de l'espèce. Les assemblements bactériens peuvent être :

* en paires (diplocoques par exemple *Neisseria*, ou diplobacilles),
* en chaines (courtes ou longues chainettes comme les streptocoques),
* en amas anarchiques (grappe de raisin comme les staphylocoques),
* ou ordonnés (tétrades comme *Sarcina*).

L’étude des caractères morphologiques nécessite l'utilisation du microscope. Les différentes techniques utilisées sont :

**2.1. Coloration de Gram**

La coloration de Gram (le premier test à réaliser) permet de diviser les bactéries en deux grands groupes :

* celles à paroi type Gram+ (qui retiennent le violet de gentiane) et
* celles à paroi type Gram- (qui prennent la couleur de la safranine après lavage par l’alcool).

Cette méthode est basée sur la structure et la composition de la paroi. Les lipides assez forts chez les Gram- que les Gram+, sont extraits par l’action de l’alcool entraînant, ensuite, une augmentation de la perméabilité et l’extraction du complexe violet de gentiane-iode, ceci lui permettant de prendre la couleur de la safranine (fuschine).

Aussi, ce test permet de diviser les bactéries selon leurs forme en deux grands groupes : cocci et bacille, et il fournit de précieuses informations en ce qui concerne le mode de groupement qui peut être en : diplocoques, chainettes, tétrades, amas, et palissades. Il est à noter que même sans ce type de coloration (coloration complexe et / ou double), à l’état frais la forme, le groupement et la mobilité pouvons être observés.

**Application:**

- Étaler aseptiquement la suspension bactérienne sur 2 cm2 environ d’une lame propre, sèche et stérile ; - Fixer de la suspension par passage au-dessus du la flamme du bec Mecker (pendant quelques minutes) - Placer la lame sur le bac de coloration ;

- Inonder le frottis par le violet de gentiane (1 min) ;

- Laver avec de l’eau distillée stérile ;

- Additionner lugol (1 min) ;

- Laver avec de l’eau ;

- Décolorer pendant 15 secondes par de l’éthanol à 95° ;

- Inonder par la fuschine de Ziehl diluée au 15ième pendant (1 min) ;

- Laver avec de l’eau ;

- Sécher la lame avec du papier absorbant et examiner au grandissement x100 (à immersion).

**2.2. Coloration de Ziehl-Neelsen (acid-fast stain)**

La coloration de Ziehl-Neelsen est spécialement désignée pour les Mycobactéries qui sont caractérisées par leur aptitude à ne pas être décolorées par les acides dilués et l’alcool, après avoir été colorées par la safranine ou la fuchsine.

Ils sont dits bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR), exemple : Mycobacterium tuberculosis, qui apparait rose- rouge, souvent parlé et légèrement incurvée.

**Application :**

- Étaler aseptiquement la suspension bactérienne sur la lame propre, sèche et stérile ;

- Sécher et fixer la suspension bactérienne au-dessus du la flamme du bec ;

- Placer la lame sur le bac de coloration ;

- Inonder la suspension bactérienne par de la fuchsine phéniquée et chauffer jusqu’à émission (5 min) de vapeur, laisser pendant (10 min) ;

- Laver avec de l’eau distillée stérile ;

- Double décoloration par addition d'acide nitrique dilué au 1/3 (30 s), rinçage, ensuite addition d'alcool éthylique à 95° (30 s) ;

- Laver avec de l’eau ; - Inonder par le bleu de méthylène (2 min) ;

- Laver avec de l’eau ;

- Sécher la lame avec du papier absorbant et examiner au grandissement x 100 (à immersion)

**2.3. Coloration de la capsule**

La présence d'une capsule est révélée par la coloration à l'encre de Chine, sa mise en évidence est un indice important pour identifier les microorganismes en deux groupes : les capsulés et ceux acapsulés, exemple : des diplocoques Gram+ entourés d'une capsule importante, ceci évoque Streptococcus pneumoniae.

**Application :**

- Déposer aseptiquement la culture bactérienne sur la lame propre, sèche et stérile ;

- Laissez la lame sécher à l'air libre ;

- Placez la lame sur une grille de coloration ;

- Inonder la suspension bactérienne par le cristal violet ;

- Laisser reposer environ 7 min ;

- Rincer soigneusement la suspension bactérienne avec du sulfate de cuivre à 20% ;

- Sécher la lame avec du papier absorbant et examiner au grandissement x100 (à immersion).

Interprétation Les capsules apparaissent comme de légers halos autour des cellules bactériennes.

**2.4. Coloration des endospores (sporulation)**

La sporulation permet de diviser les bactéries en deux groupes : sporulées et asporulées, ce test est réalisé soit par coloration au vert de malachite solution à 5 %, soit tout simplement par essai de culture après pasteurisation. La position de la spore permet l’identification des bactéries en groupes à l'intérieur de la même famille.

**Application :**

- Déposer aseptiquement la culture bactérienne sur la lame propre, sèche et stérile ;

- Laissez la lame sécher à l'air libre, puis fixer à la chaleur au-dessus du la flamme du bec ;

- Placer la lame sur le bac de de coloration (équipé d’un bain-marie) ;

- Couvrir la lame avec de papier ;

- Inonder la lame avec le vert de malachite à 5% ;

- Chauffer pendant environ 6 min ;

- Retirez le papier à l'aide d'une pincette ;

- Laissez la lame refroidir et rincer là avec de l'eau pendant 30 s ;

- Inonder la lame avec de la safranine ou au mercurochrome à 5% pendant 1 min ;

- Laver la lame avec de l'eau pendant 30 s ;

- Sécher la lame avec du papier absorbant et examiner au grandissement x100 (à immersion).

Interprétation Les spores (que ce soit endospores ou libres) se colorent en vert, alors que les cellules bactériennes (végétatives) se colorent en rouge.

# Caractères biochimiques et physiologiques

# 3.1. Demande en O2

# Ce caractère permet de classer les bactéries, selon leurs réponses de croissance en présence et en absence d'oxygène, en 5 groupes :

# Aérobie strict : l’accepteur final de l’hydrogène est obligatoirement l’O2 de l’air, exemple : Pseudomonas aeruginosa ;

# Anaérobie strict : l’accepteur est de nature différente et l’O2 est toxique ;

# Anaérobie aérotolérant : sont capables de croître en présence ou en l'absence d’O2, l’accepteur est de nature différente et l’O2 n’est pas toxique, exemple : Campylobacter jejuni ;

# Anaérobie facultatif (aéroanaérobie) : la bactérie se développe indifféremment dans des conditions d’aérobie ou d’anaérobiose mais se développe mieux en sa présence, exemple : Entérobactéries ;

# Microaérophile : ont besoin d’O2 mais à un niveau acceptable.

# Application :

# - Régénérer la gélose viande foie (VF) par ébullition au bain-marie ;

# - Ensemencer, à l’aide de la pipette Pasteur boutonnée, la gélose suffusion (45°C) ;

# - Ensemencer en introduisant la pipette Pasteur au fond du tube et en remontant en spirale ;

# - Refroidir à l’eau courante ;

# - Placer ensuite le tube à l'étuve (à 37°C) pendant 24 heures.

# - Interprétation

# Croissance : en surface (aérobie strict), sur toute la gélose (anaérobie aérotolérant, aéroanaérobie), en bas de la gélose (anaérobie strict), en dessous de la surface (microaérophile). Caractères biochimiques et physiologiques.

# 3.2. Oxydation-fermentation est assimilation des sucres

# La détermination de l’oxydation-fermentation et la possibilité que d’autres sucres soient assimilés comme seule source de carbone sont importantes à des fins taxinomiques. Les bactéries assimilent le (s) sucre (s) en produisant de l’acide et fréquemment du CO2 en présence ou en absence d’O2. L’acidification du milieu est détectée par changement de couleur du milieu dû à la présence d’un indicateur coloré (BCPL, rouge de phénol, bleu de bromothymol, etc.). Le CO2 est révélé par l’élévation de la cloche du durham car il est libéré au fond du tube (cas de la voie oxydative il est produit en surface donc n’y a pas élévation de la cloche). Plusieurs techniques utilisant différents milieux (MEVAG, TSI, bouillon divers…) sont pratiquées.

# 3.3. Types fermentaires (tests RM / VP)

# Ces deux tests sont de grande utilité en identification. La réaction au Rouge de Méthyle caractérise le type fermentaire acide mixte de la fermentation butylène glycolique chez les Entérobactéries. La réaction de Voges Proskauer caractérise la voie d’acétoïne chez les Entérobactéries et autres groupes. Les deux sont réalisés sur milieu glucosé Clark et Lubs.

## 3.4. Accepteurs de l’H2

## La sulfito-réduction : les anaérobies sulfito-réducteurs sont capables d’utiliser les sulfites comme accepteurs d’H2 en les réduisant en sulfures. Ce test est réalisé sur milieux solides (VF) ou bien semi-solide contenant de sulfite de sodium et l’alun de fer. Après incubation la réduction se traduit par un noircissement (la production d’ H2S) ;

## La réduction des nitrates : les anaérobies sont, aussi, capables d’utiliser les nitrates comme accepteurs d’H2 en les réduisant en nitrites. Ce test est réalisé sur milieux solides ou bouillons à 1 ‰ de nitrate de potassium. Après incubation, la réduction nitrates en nitrites est révélée par l’ajout de 0.1 ml du réactif NiT1 et NiT2. Une coloration instantanée rouge ou rose indique la réduction des nitrates. Un résultat négatif doit être vérifié par l’addition de poudre de zinc.

## 3.5. Enzymes respiratoire

## Catalase : une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d’hydrogène (H2O2) en eau et en oxygène (un dégagement de bulles d’air, instantanément, indique sa présence). Ce test réalisé, généralement par deux techniques, constitue un bon élément de différenciation et divise les bactéries en deux groupes celles à catalase+ et à celles catalase-. La catalase est un test clé communément utilisé pour l’identification des bactéries à Gram+. Exemple : Staphylocoques ; Listeria monocytogène sont catalase+ / Streptocoques est catalase- ;

## Cytochrome oxydase : la dernière enzyme de la chaîne respiratoire, elle catalyse le transfert de l’H2 sur L’O2, elle est mise en évidence par la réaction d’oxydation de l’oxalte de diméthyl-paraphénylène-diamine, ce substrat est incolore sous forme réduite est rouge sous forme oxydée. Inversement à son précédant, l’oxydase est un test clé communément utilisé pour l’identification des bactéries à Gram-. Exemple : Pseudomonas spp. et Neisseria spp. sont oxydase+ / Acinetobacter spp. est oxydase-.

## Application (catalase) :

## - Mettre en contact la colonie bactérienne avec de l’eau oxygénée 10V (H2O2) sur une lame ; ou

## - Ajouter à une culture bactérienne jeune quelques gouttes de l’eau oxygénée 10V (culture dans un tube à essai) ;

## - La réaction est positive si on observe un dégagement gazeux dû à la libération de l’oxygène (O2).

## Interprétation

## catalase+ : effervescence / catalase - : pas d'effervescence

## Application (oxydase):

## - Déposer un disque d'oxydase imprégné de diméthyl-para-phénylène-diamine sur un papierfiltre stérile ;

## - Humidifier le disque avec quelques gouttes d'eau distillée stérile ;

## - Déposer une suspension bactérienne sur le disque.

## Interprétation

## oxydase+ : coloration rouge / oxydase- : incolore.

## 3.6. Dégradation des acides aminés

## TDA, Tryptophanase et PDA : enzymes utilisées en identification bactérienne. Le tryptophane-désaminase (TDA) catalyse la réaction de la désamination du tryptophane en acide indole-pyruvique et ammoniac. Tandis que la tryptophanase catalyse la réaction de dégradation du tryptophane en indole, acide pyruvique, et ammoniac. L’addition de chlorure de fer III (FeCl3) réagit avec l’acide indole-pyruvique en donnant un précipité de couleur marron et l’addition de réactif de Kovacs réagit avec l’indole en donnant un anneau rouge en surface. Exemple : E. coli est Indole+. Alors que, la phényl-alanine-désaminase (PDA) catalyse la réaction de la désamination de la phénylalanine en acide phénylpyruvique et ammoniac. L’activité de la phényl-alanine-désaminase (PDA) est réalisée sur gélose inclinée à la phényl-alanine. L’acide phényl pyruvique (APP) donne une teinte verte en présence de chlorure de fer III.

## l’ornithine-décarboxylase (ODC), la lysine-décarboxylase (LDC) et l’arginine-déhydrolase (ADH) : la possession de ces enzymes est un caractère souvent étudié en identification des bacilles Gram- notamment les Entérobactéries et les Pseudomonas. Les milieux les plus utilisés, en anaérobiose, sont ceux de Falkow (dont la technique a été étendue par Möller), ces milieux contiennent, le glucose, un indicateur coloré (généralement le BCPL) et ne renferment qu'un seul acide aminé, celui dont on veut étudier l'utilisation.

## 3.7. Dégradation du lactose

## ONPG : la possession de la ß galactosidase est un caractère couramment utilisé pour l'identification des bactéries, il est particulièrement pratiqué pour les Entérobactéries uniquement ceux à lactose-. Cette enzyme hydrolyse un analogue du lactose : l’ortho-nitro-phényl-galactopyraniside (ONPG) en galactose et ortho-nitro-phénol qui présente une couleur jaune.

## 3.8. Dégradation de l’urée

## Uréase : hydrolyse l’urée en ammoniac et carbonate d’ammonium aboutit à l’alcalinisation du milieu, qui est décelable par changement de couleur du milieu dû à la présence d’un indicateur coloré (généralement le rouge de phénol). Ce test permet d'identifier certaines espèces d'entérobactéries, Corynebacterium urealyticum, et Helicobacter pylori.

## 3.9.Caractères biochimiques et physiologiques divers

## Mobilité : est recherchée sur milieu semi-solide (en culot). L’ensemencement est réalisé par piqûre centrale, après incubation la mobilité se traduit par l’envahissement du milieu.

## Températures de croissance, halophilie-osmophilie et pH : l’évaluation de l’habilité de croissance dans des conditions hostiles, présente parfois un grand intérêt en identification. L’habilité à croître à différentes températures, à différentes concentrations en NaCl ou en saccharose et à différentes valeurs de pH est réalisée sur milieux liquides ou solides.

## Résistance aux antibiotiques et aux inhibiteurs : l’habilitée à croitre en présence de certains antibiotiques ou agents inhibiteurs est largement utilisée en taxinomie. La présence ou l’absence de multiplication indique la sensibilité ou la résistance de la bactérie.

## Ce test est réalisé sur milieux liquide ou solide. Il est important de souligner que, contrairement aux Gram-, les Gram+ sont sensibles avec exception (Entérococci, Lactobacilli, Leuconostoc et Pediococcus spp.) à la vancomycine. En revanche, les Gram- sont sensibles aux colistine et polymyxine, alors que les Gram+ ne le sont pas.

## Caractères immunologiques (sérologique)

## Les réactions sérologiques : de type bactérie-anticorps (réaction d’agglutination) ou de type antigène-anticorps (réaction de précipitation) sont utilisées en taxinomie essentiellement pour les Entérobactéries dont contiennent trois types d’antigènes : H, O, et K ; et les streptocoques dont le plus important est le type C : A, B, C, D, N. Ces tests sérologiques se font principalement suivant la technique de Lancefield basée sur l'utilisation de polysaccharides (notamment la polyoside C) de l'enveloppe cellulaire en tant qu'antigène.

## 5.Pouvoir pathogène

## Coagulase : ce caractère permet seul d'affirmer la présence de St. aureus qui est coagulase+ des autres Staphylococcus qui sont à coagulase- (St. epidermidis, St. saprophyticus). St. aureus produit deux types de coagulase :

## coagulase libre (enzyme extracellulaire) et

## la coagulase liée (protéine associée à la paroi).

## Les deux enzymes sont capables in vitro de coaguler le plasma de lapin (la formation d'un caillot de fibrine insoluble).

## Hémolysines α, ß et γ : enzymes responsables de la lyse des hématies, ils sont mises en évidence par culture sur gélose au sang. Hémolysines α (zone verdâtre due à la metmyoglobine, exemple : S. pneumonia ; Hémolysines ß (auréole claire due à la libération de l’hémoglobine, exemple : St. aureus) ; Hémolysines γ (pas de modification, pas d’hémolyse autour des colonies, exemple : E. faecalis).

## ADNase : enzyme qui détruit le noyau des cellules, elle est mise en évidence sur milieux contenant de l’ADN. L’hydrolyse de l’ADN est caractérisée par une zone claire, exemple : St. aureus+ et St. Epidermidis.

## 6.Etudes biochimiques multiples (galeries miniaturisées/ microméthodes)

Les galeries miniaturisées se présentent sous forme de plaquettes réunissant les milieux nécessaires à l’identification des différents groupes bactériens, en quantité réduite. L’emploi de ces galeries permet de gagner du temps, de la place à l’étuve et de réduire le travail de préparation.

***Exemple :* la galerie API 20**E (**A**nalytical **p**rofile **i**ndex 20E, E : Entérobactéries)

C’est une galerie destinée à l’identification des différentes espèces appartenant au groupe des entérobactéries.

## Description de la galerie

La galerie comporte 20 microtubes contenant chacun une petite quantité d’un milieu déshydraté diffèrent, chaque microtube est partagé en deux parties : le tubule (en bas) et la cupule (en haut). Cette galerie permettant de réaliser 20 tests biochimiques.

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 spontanés ou révélés par l’addition de réactif. La lecture de ces réactions se fait à l’aide du tableau de lecture et l’identification est obtenue à l’aide d’un logiciel**.**

## Technique

* Réunir fond et couvercle d’une boîte d’incubation et répartir de l’eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide ;
* Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boite;
* Sortir la galerie de son emballage;
* Déposer stérilement la galerie dans la boîte d’incubation **;**
* Préparer une suspension bactérienne dense dans 10 ml d’eau physiologique stérile à partir d’une culture pure et jeune de 18 à 24 h.
* Ensemencer la galerie à l’aide d’une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l’intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d’air :
  + Pour les caractères soulignés ADH, LDC, ODC, ensemencer le tubule par la suspension et la cupule par la vaseline ou la paraffine stérile ;
  + Pour les caractères encadrés ce qui est le cas des tests VP et GEL, ensemencer le tubule et la cupule par la suspension bactérienne ;
  + Pour les caractères non encadrés, non soulignés, ensemencer uniquement le tubule par la suspension ;
* Refermer la boîte d’incubation et incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

## Lecture

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (tableau 01).

Si trois tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l’addition de réactifs.

Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à trois, réincuber la galerie 24 heures (plus ou moins 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.

Pour révéler les tests nécessitant l’ajout des réactifs :

* **Test TDA :** ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
* **Test IND :** ajouter une goutte de réactif de Kovacs, attendre 2 minutes. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
* **Test VP :** ajouter une goutte des réactifs VP1 et VP2. Attendre 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.
* **Test NO 2 :** ajouter 2 gouttes de réactifs NIT1 et NIT2 dans le tube GLU. Attendre 2 à

3 mn. Une coloration rouge indique une réaction positive. Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote, ajouter 2 à 3 mg de la poudre de Zn dans la cupule GLU. Après 5 minutes, Un tube resté jaune indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule est rose-rouge, la réaction est négative, les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zinc.

**Remarque :** le test de la recherche de production d’indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d’altérer l’interprétation d’autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d’incubation après l’ajout du réactif.

## Interprétation

L’identification est obtenue selon trois méthodes :

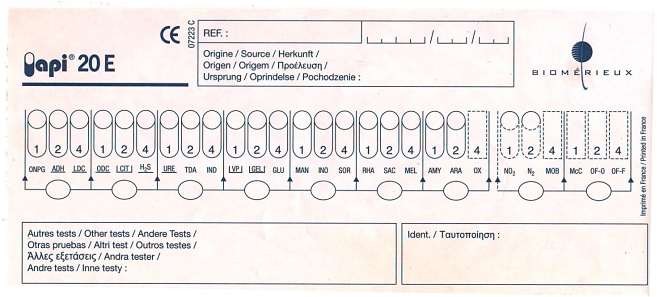
* A l’aide d’un logiciel d’identification (feuille Excel pour l’identification microbienne).
* A l’aide du tableau d’identification : comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau : chaque cellule de ce tableau contient les pourcentages de positivité (Tableau 02).
* Par la détermination du profil numérique: chaque trois caractères seront regroupés, dont chacun d’eux convient à un numéro, dans l’ordre 1, 2, 4. Selon que la réaction est positive ou négative, on attribuera un nombre composé de 7 chiffres, le profil numérique, et ce nombre correspond à une espèce précise (Figure 05). Exemple : 5144572 correspond à E. coli, 7716773 correspond à *Salmonella arizonae.*

***Remarque :*** dans certains cas, le profil numérique étant insuffisamment discriminant, les tests complémentaires suivants sont nécessaires : réduction des nitrates en nitrites (NO2) et en azote (N2), mobilité (MOB), culture sur gélose Mac Conkey (McC), oxydation du glucose (OF-O) et fermentation du glucose (OF-F).

Ces tests complémentaires peuvent être utilisés pour constituer un profil numérique de 9 chiffres, identifiable avec le logiciel d’identification (exemple 5315173 (57) correspond à *Enterobacter gergoviae*).

## Tableau 01 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20E.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tests** | **Substrat** | **Caractère recherché** | **Résultats** | | |
| **Négatif** | **Positif** | |
| **ONPG** | Ortho-nitro-phenyl- galactosidase | Beta- galactosidase | Incolore | Jaune | |
| **ADH** | L-arginine | Arginine dihydrolase | Jaune | Rouge/orangé | |
| **LDC** | L-lysine | Lysine décarboxylase | Jaune | Rouge/orangé | |
| **ODC** | L-ornithine | Ornithine décarboxylase | Jaune | Rouge/orangé | |
| **CIT** | Citrate de sodium | Utilisation du citrate | Vert pâle/jaune | Bleu-vert/vert | |
| **H2S** | Thiosulfate de sodium | Production d’H2S | Incolore/grisâtre | Dépôt noir/fin liseré | |
| **URE** | Urée | Uréase | Jaune | Rouge/orangé | |
| **TDA** | L-tryptophane | Tryptophane désaminase | TDA / immédiat | | |
| Jaune | | Marron foncé |
| **IND** | L-tryptophane | Production d’indole | James/ 2 mn  Jaune Anneau rouge | | |
|  | |  |
| **VP** | Pyruvate de sodium | Production d’acétoine | VP 1 + VP 2/ 10mn | | |
| Incolore | | Rosé-rouge |
| **GEL** | Gélatine de kohn | Gélatinase | Non diffusion | | Diffusion du pigment noir |
| **GLU** | D-glucose | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | | Jaune |
| **MAN** | D-mannitol | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | | Jaune |
| **INO** | Inositol | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | | Jaune |
| **SOR** | D-sorbitol | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | | Jaune |
| **RHA** | L-rhamnose | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | | Jaune |
| **SAC** | D-saccharose | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | | Jaune |
| **MEL** | D-melibiose | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | | Jaune |
| **AMY** | Amygdaline | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | | Jaune |
| **ARA** | L-arabinose | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | | Jaune |
| **Nitrate réductase Tube GLU** | Potassium nitrate | Production de NO2 Réduction au stade N2 | NIT1 + NIT2 / 2-3 mn | | |
| Jaune | | Rouge |
| Zinc / 5mn | | |
| Rouge/orangé | | Jaune |



**Figure 05 : Fiche du profil numérique**