

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

Introduction

L'identification des microorganismes est une étape clé dans plusieurs domaines tels que la santé, l'industrie et l'environnement.

Objectifs de l'identification des microorganismes :

- **La santé** : Permet de diagnostiquer les infections et de choisir les traitements appropriés. Par exemple, l'identification des bactéries responsables de maladies comme la tuberculose ou les infections urinaires permet de traiter efficacement les patients.
- **L'industrie** : Utilisée dans le contrôle de la qualité des aliments, des produits pharmaceutiques et des cosmétiques. La détection de microorganismes pathogènes dans des produits alimentaires, comme la présence de *Salmonella* dans la viande, est essentielle pour garantir la sécurité des produits.
- **L'environnement** : Permet de surveiller les microorganismes présents dans l'eau et le sol, afin de protéger les écosystèmes. Par exemple, la détection de *Escherichia coli* dans l'eau peut être utilisée comme indicateur de contamination.

L'identification des microorganismes est donc essentielle pour assurer la sécurité des populations et des environnements, et pour garantir la qualité des produits industriels.

1. Caractères cultureux

L'observation des microorganismes sur des milieux de culture spécifiques permet d'étudier leurs propriétés de croissance et de les identifier. Les caractères cultureux comprennent plusieurs critères visibles qui varient en fonction du type de microbe.

Principaux points observés :

- **Forme des colonies** : Les colonies bactériennes peuvent être circulaires, irrégulières ou filamenteuses.
- **Couleur** : Certaines bactéries produisent des pigments spécifiques qui permettent leur identification. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* produit un pigment vert.

- **Taille des colonies** : Les colonies peuvent être petites ou grandes, en fonction de l'espèce et du milieu de culture.
- **Aspect de la surface** : Les colonies peuvent être lisses, rugueuses, muqueuses ou sèches.
- **Vitesse de croissance** : Certaines bactéries croissent rapidement (comme *Escherichia coli*), tandis que d'autres sont plus lentes, comme *Mycobacterium tuberculosis*.

Exemples de milieux de culture :

- **Milieux gélosés** : Par exemple, la **gélose au sang** permet d'observer l'hémolyse (destruction des globules rouges). *Streptococcus pyogenes*, par exemple, provoque une hémolyse complète (β -hémolyse).
- **Milieux liquides** : Par exemple, le **bouillon nutritif**, utilisé pour la croissance générale des bactéries. L'observation peut révéler un trouble uniforme ou un dépôt au fond du tube, selon la bactérie.

2. Caractères morphologiques et structuraux

Les caractères morphologiques et structuraux permettent de différencier les bactéries en observant leurs caractéristiques cellulaires à l'aide de diverses colorations.

2.1. Coloration de Gram

La **coloration de Gram** est une méthode de coloration différentiation qui permet de diviser les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi cellulaire : les **Gram positives** et les **Gram négatives**.

Principe de la coloration de Gram :

- **Gram positif** : Les bactéries Gram positives ont une paroi cellulaire épaisse, riche en peptidoglycane, qui retient le violet de cristal.
- **Gram négatif** : Les bactéries Gram négatives ont une paroi cellulaire mince et une membrane externe, qui ne retient pas le violet de cristal, mais prend la couleur rose de la safranine après décoloration.

Étapes de la coloration de Gram :

1. **Violet de cristal** : Application sur les bactéries, ce qui les colore en violet.
2. **Fixation à l'iode** : Renforce l'ancrage du colorant dans les cellules Gram positives.
3. **Décoloration à l'alcool** : L'alcool élimine le violet de cristal des cellules Gram négatives.
4. **Safranine** : Appliqué pour colorer en rose les bactéries Gram négatives.

Résultats :

- **Gram positif** : Les bactéries apparaissent violettes (par exemple, *Staphylococcus*, *Bacillus*).
- **Gram négatif** : Les bactéries apparaissent roses (par exemple, *Escherichia coli*, *Salmonella*).

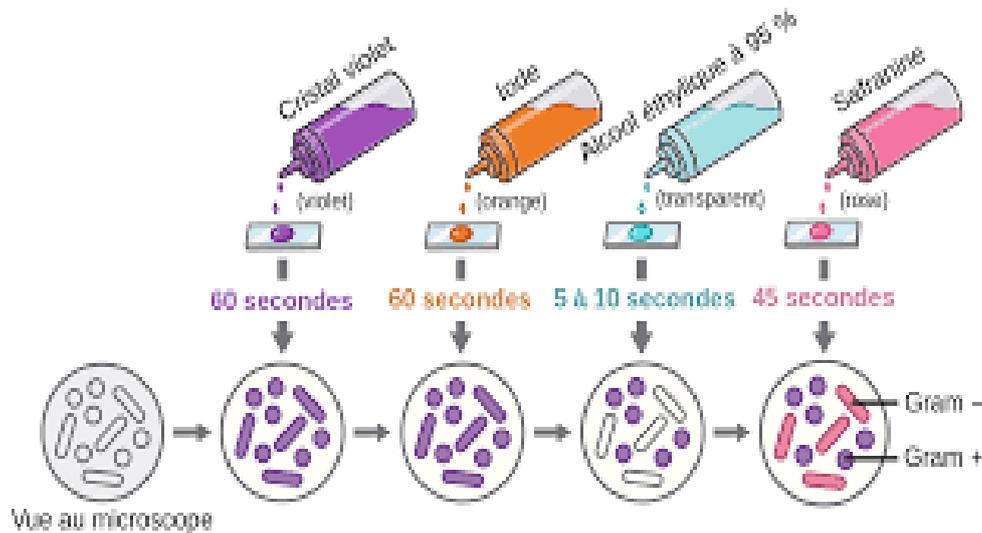


Figure 1 : Les étapes de la coloration de Gram.

2.2. Coloration des endospores

Certains microorganismes forment des **endospores** lorsqu'ils sont confrontés à des conditions environnementales difficiles. Ces structures sont très résistantes et permettent à la bactérie de survivre.

Principe de la coloration des endospores :

- Le **vert de malachite** est utilisé pour colorer les endospores, tandis que les cellules végétatives se colorent avec de la **safranine**.
- Cette coloration permet de différencier les bactéries sporulées des bactéries non sporulées.

Exemple : *Bacillus subtilis* est une bactérie sporulée qui forme des spores lorsqu'elle est exposée à des conditions défavorables.

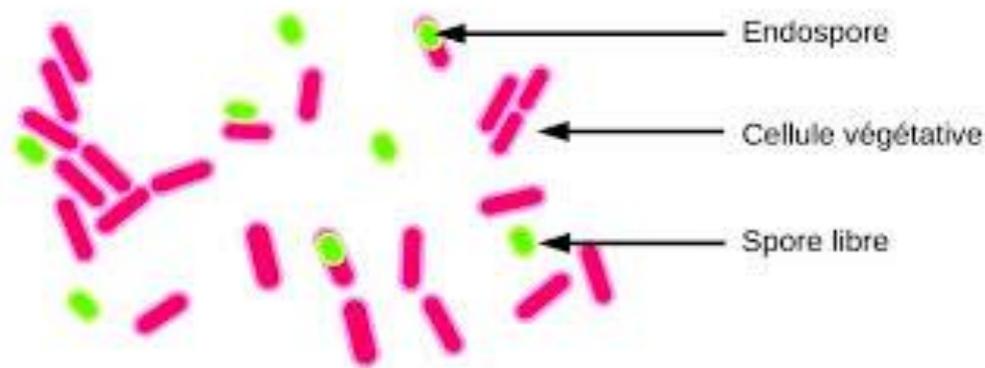


Figure 2 : cellule sporulée (spore libre) et cellule non sporulée (végétative).

3. Caractères biochimiques et physiologiques

Les tests biochimiques et physiologiques sont utilisés pour observer les réactions des bactéries face à divers réactifs et conditions. Ces tests permettent de déterminer les enzymes présentes et les capacités métaboliques des bactéries.

3.1. Tests enzymatiques clés

- **Test catalase :**

Le test de **catalase** permet de détecter l'enzyme **catalase**, qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et oxygène. Si la bactérie est positive, des bulles d'oxygène apparaissent.

- **Exemple :** *Staphylococcus* est catalase positif, tandis que *Streptococcus* est catalase négatif.

- **Test oxydase :**

Le test **oxydase** détecte l'enzyme cytochrome c oxydase. La réaction entraîne un changement de couleur en bleu.

- **Exemple :** *Pseudomonas* est oxydase positif, tandis que *Escherichia coli* est oxydase négatif.



Figure 3 : Résultats typiques des tests catalase et oxydase.

3.2. Fermentation des sucres et mobilité

- **Fermentation des sucres :**

Ce test permet de vérifier si une bactérie peut fermenter certains sucres pour produire des acides ou des gaz. Un test positif montre un changement de couleur (par exemple, le tube devient jaune en présence d'acides).

- **Exemple :** Si *Escherichia coli* fermente le glucose, le tube devient jaune.

- **Mobilité**

Le test de mobilité est réalisé dans un milieu semi-solide. Les bactéries mobiles se propagent dans tout le milieu, tandis que les bactéries immobiles restent localisées à l'endroit d'inoculation.



Figure 4 : test de mobilité et de fermentation des sucres.

3.3. Dégradation de l'urée

Le test de **dégradation de l'urée** permet de détecter l'enzyme **uréase**, qui décompose l'urée en ammoniac, augmentant ainsi le pH du milieu, ce qui entraîne un changement de couleur vers le rose.

- **Exemple** : *Klebsiella* est positive au test de l'urée (le milieu devient rose), tandis que *Escherichia coli* est négatif.



Figure 6 : Résultats du test de l'urée.

4. Études biochimiques multiples (galerie API)

La galerie API (Analytical Profile Index ou Indice de Profil Analytique) est un outil utilisé en microbiologie pour l'identification rapide et standardisée des microorganismes, notamment des bactéries et des levures. Chaque galerie API contient une série de tests biochimiques miniaturisés, organisés sous forme de microtubes, permettant de caractériser un microorganisme en fonction de son profil métabolique.

Utilisation :

1. **Inoculation** : Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne.
2. **Incubation** : La galerie est incubée pour permettre les réactions enzymatiques ou biochimiques.
3. **Lecture des résultats** : Les réactions positives ou négatives sont observées (changement de couleur, précipitation, etc.).

4. **Identification** : Le profil biochimique est comparé à une base de données pour identifier l'organisme.

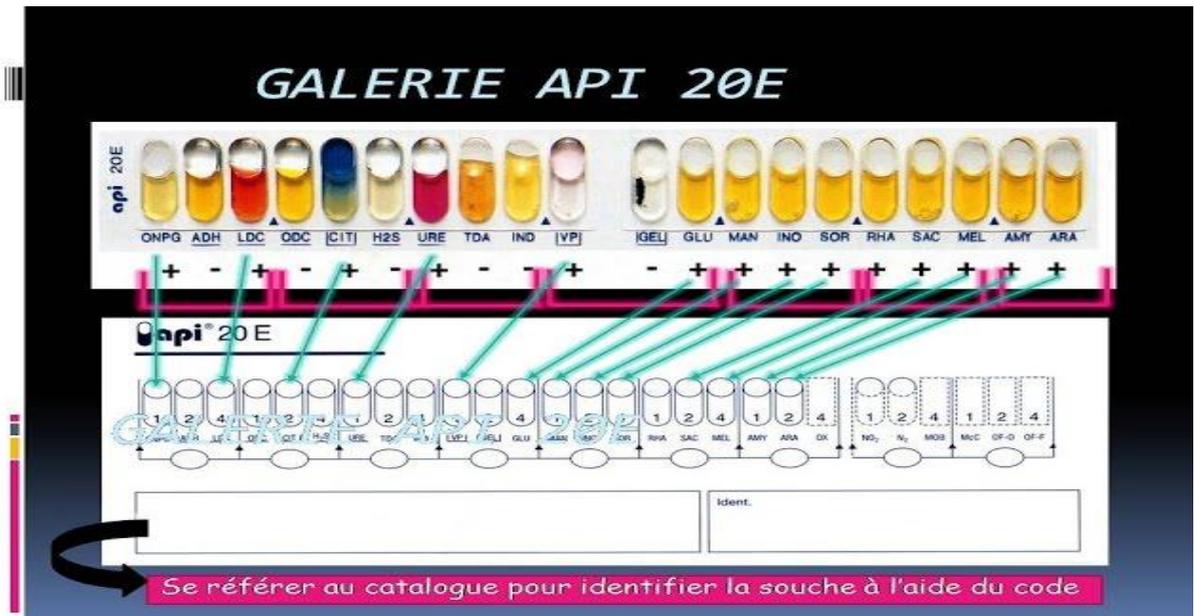


Figure 7 : Exemple de résultats typiques d'une galerie AP

Pour conclure, l'identification des microorganismes repose sur l'analyse de leurs caractéristiques culturaux, morphologiques, structuraux, biochimiques et physiologiques. Ces techniques permettent non seulement de distinguer les différents types de bactéries, mais aussi d'orienter le diagnostic en médecine, le contrôle qualité en industrie, et la surveillance en environnement.

Ces méthodes classiques d'identification sont souvent combinées avec des techniques moléculaires plus avancées, telles que la PCR et le séquençage de l'ADN, qui permettent une identification encore plus précise des microorganismes.

Références bibliographiques :

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021).

Brock Biology of Microorganisms. 16th Edition. Pearson.

Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2020).

Microbiology. 12th Edition. McGraw-Hill.

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2022).

Microbiology: An Introduction. 14th Edition. Pearson.

Collee, J. G., Duguid, J. P., Fraser, A. G., & Marmion, B. P. (1996).

Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology. 14th Edition. Churchill Livingstone.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., & Winn, W. C. (2006).

Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins.