

TP 1 : identification et classification de souches bactériennes appartenant à la famille des enterobactéries à l'aide d'une macrogalerie

Introduction

Les entérobactéries constituent une famille bactérienne hétérogène regroupant un grand nombre d'espèces. Au niveau phénotypique, ce sont des bacilles Gram négatif droits ; mobiles par flagelles péritriches, ou immobiles ; non sporulés ; aérobies facultatifs, produisant de l'acide à partir du glucose ; pas de besoin en sodium, ni de stimulation ; catalase positive ; oxydase négative ; réduisent habituellement les nitrates en nitrite (pas en N₂) ; ARNr 16S de gammaprotéobactéries.

Principaux genres :

- Salmonella, Citrobacter, (Edwardsiella) - Escherichia, Shigella - Klebsiella, Enterobacter, Serratia, (Hafnia)
- Proteus, Morganella, Providencia- Yersinia

➤ **Objectifs de TP :**

- * Mettre en évidence les caractères **biochimiques** pour **identifier** et **classifier** des souches appartenant à la famille des Enterobacteriaceae.
- * Réaliser l'ensemencement d'une galerie traditionnelle d'identification en tubes (= macrogalerie) pour identifier les souches.
- * A l'aide des tableaux identifier le genre voire l'espèce de la bactérie donnée.

➤ **Manipulation :** Par groupe, vous disposez d'une **souche pure** présentée sur GN.

➤ **La mise en évidence des différents caractères.**

▪ **Recherche de la production d'indole, TDA et l'urease** (milieu urée-indole).

Ensemencer avec quelques gouttes de suspension bactérienne ou avec une colonie prélevée à l'anse sur un milieu solide.

Présence d'une uréase : Milieu rouge

présence d'une tryptophanase (indole) : Ajouter 3 gouttes du **réactif de Kovacs** et effectuer la lecture sans agiter le milieu.

Présence d'une tryptophane désaminase (TDA) : Ajouter 3 gouttes du réactif (= chlorure de fer III en solution acide) et effectuer la lecture.

▪ **Recherche de la production d'H₂S, dégradation du glucose ou lactose et production du gaz (milieu TSI ou KLIGLER-Hajna).**

Technique d'ensemencement : A partir d'une suspension bactérienne, ensemencer à l'aide d'une pipette Pasteur fermée :

La pente par stries serrées.

Le culot par piqûre centrale.

▪ **Recherche de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone (milieu citrate de simons).**

Ensemencement : Par stries sur la pente à l'aide d'une pipette Pasteur fermée.

Incuber 24 heures à 37° C, **bouchon dévissé.**

Interprétation : voir fiche technique.

▪ **Recherche de Mannitol- mobilité**

Technique d'ensemencement : Par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur fermée.

Lecture et interprétation : voir fiche technique .

▪ **Recherche de LDC, ODC et ADH**

Ensemencer le milieu avec une goutte de suspension bactérienne dense. Agiter

Si le tube n'est pas plein, le recouvrir par de la vaseline stérile afin de placer le milieu en **anaérobiose**.

Le bouchon vissé complètement.

Lecture et interprétation : voir fiche technique.

▪ **Recherche de la formation d'acétoïne et fermentation des acides mixtes (test RM-VP) milieu CLARK et LUBS.**

Ensemencer avec 2-3 gouttes de suspension bactérienne ou avec une colonie prélevée à l'anse sur un milieu solide. Incubation 24 heures à 37° C, **bouchon dévissé**. Partager le milieu en deux tubes pour pratiquer les deux tests :

- **Réaction de Voges-Proskauer :**

Transférer 2,5 ml de culture dans un nouveau tube de culture stérile.

ajouter 10 gouttes d' α -naphtol et 10 gouttes de NaOH (ou KOH) (vp1 et vp 2).

Agiter soigneusement le tube pendant 30 secondes à 1 minute pour exposer le milieu à l'oxygène de l'air (nécessaire à l'oxydation de l'acétoïne pour obtenir une réaction de couleur).

Laisser le tube reposer pendant au moins 30 minutes.

- **Réaction rouge de méthyle :**

Utilisez les 2,5 ml de culture restants

Ajoutez 5 gouttes du réactif rouge de méthyle. La lecture est immédiate.

NB.

- incubation à 37° C pd 24-48 heures

-Lecture et interprétation des résultats : voir les fiches techniques.

Milieu	urée- indole			CLARK et LUBS		TSI					Manito- mobilité		Citrate de simons	LDC	ODC	ADH	
	uréase	indole	TDA	RM	VP	Gaz	H ₂ S	Glu	Lac	sacch	manitol	mobilité					
souche																	
1																	
2																	
3																	