

Initiation à l'identification d'une souche pure cultivable à l'aide d'une galerie de tests sur milieux de culture

1) Introduction

Identifier une culture pure isolée, c'est lui donner son nom d'espèce. En bactériologie, la définition de chaque espèce est une définition consensuelle basée sur des critères génotypes et phénotypiques (il ne peut en effet y avoir de définition fondée sur le critère d'interfécondité des individus au sein de la même espèce). La classification des espèces - y compris pour les bactéries - est une classification hiérarchisée emboîtée qui s'attache à être phylogénétique.

En pratique de laboratoire, l'identification d'une souche pure à une espèce utilise différents moyens : contexte d'origine de la culture, caractéristiques phénotypiques à l'observation microscopique, caractéristiques phénotypiques lors de cultures, analyses du génome, analyse de métabolites, analyse du protéome (ainsi par spectrométrie de masse maldi-tof on obtient des profils de protéines ribosomales, qui par confrontation à des bases de données conduisent à des identifications rapides et pour un coût très faible).

Dans la suite, il ne sera pas question des identifications par spectrométrie de masse maldi-tof mais des très classiques identifications par galerie de tests phénotypiques métaboliques. Ces tests sont liés à une culture et chaque test conduit à réponse de type binaire (+ ou -). Ces identifications par galerie de tests utilisent la démarche suivante :

- 1) Une culture pure est isolée dans un contexte donné (médical, vétérinaire ...) à l'aide de milieux d'isolements donnés. Un certain nombre de caractéristiques fondamentales sont déterminées : allure des colonies (taille, texture, pigmentation ...), morphologie des bactéries et aspect de la coloration au gram, type respiratoire, présence d'une chaîne respiratoire à cytochrome c, test catalase. Cette première étape permet d'**orienter l'identification vers un genre ou un groupement de genres bactériens**.
- 2) Une fois cette orientation vers un genre ou un groupement de genres réalisée, une batterie de tests métaboliques sur milieux de cultures (galerie d'identification) adaptée à l'identification est réalisée. L'identification à l'espèce est en général fondée sur un **calcul de probabilité mettant en regard le profil de la souche à l'étude et une base de données de profils**.

Exemple

Etape 1. Contexte, tests et critères d'orientation, choix de la galerie	
<p><u>ORIENTATION</u> Contexte agro-alimentaire d'un bassin d'élevage de larves de poissons. Une culture pure isolée a été orientée Enterobacteriaceae grâce aux critères suivants :</p> <p>bacilles droits à Gram négatif, environ 0,5 µm de diamètre sur 2 µm de longueur, aéro-anaérobies, catalase positive, oxydase négative, nitrate réductase positive, capables de croître sur des milieux ordinaires à base de peptone ou d'extraits de viande et sur milieu sélectif avec détergent lauryl sulfate. (A comparer avec la définition complète figurant à droite.)</p> <p>On choisit alors une galerie de tests dédiée aux Enterobactéries, par exemple les systèmes commerciaux API20E ou équivalent.</p>	<p>Une définition classique de la famille des Enterobacteriaceae</p> <p>« Traditionnellement, la définition de la famille des Enterobacteriaceae est la suivante : bacilles droits à Gram négatif, non acido-résistants, de 0,3 à 1,0 µm de diamètre sur 1,0 à 6,0 µm de longueur, non sporulés, parfois capsulés, possédant une ciliature péritriche pour les espèces mobiles, aéro-anaérobies, chimio-organotrophes, possédant à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif, fermentant le glucose (avec ou sans production de gaz), catalase positive, oxydase négative, nitrate réductase positive, capables de croître sur des milieux ordinaires à base de peptone ou d'extraits de viande, non halophiles, possédant l'antigène de Kunin (également appelé ECA pour Enterobacterial Common Antigen) et ayant un G + C p. cent compris entre 38 et 60. »</p> <p>Repris de J.P. Euzéby, http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ee/enterobacteriaceae.html, 2013</p>

Etape 2. Identification sur galerie dédiée

<p>On applique le mode opératoire de la galerie choisie. On détermine les caractéristiques phénotypiques de la souche. On en déduit l'espèce de la souche grâce à la base de données de la galerie.</p>	
---	--

L'utilisateur gère l'identification finale à l'aide de calculs de probabilités fondés sur une base de données d'identification construite sur des statistiques de réponse (+ ou -) aux différents tests. C'est par exemple le système utilisé par la galerie commerciale API20E (galerie dédiée aux Enterobactéries et au genre *Vibrio*).

Remarque : Les « orientations » sont généralement facilement gérables par approche dichotomiques. En revanche, Les galeries à systèmes d'identification dichotomique sont peu fréquentes.

2) Travail pratique : identification d'une souche pure isolée orientée Enterobacteriaceae

La souche pure fournie a été orientée Enterobacteriaceae selon les données de l'exemple proposé dans le tableau du paragraphe d'introduction.

On demande de :

- Vérifier l'étape 1 d'orientation : type respiratoire, caractères oxydase et catalase et nitrate réductase, mobilité (milieu mannitol-mobilité-nitrate disponible, voir document annexe), culture sur milieu Drigalski (rechercher une documentation via internet) ;
- Identifier sur galerie API20E (ne pas oublier l'isolement de contrôle).

A disposition, l'ensemble de la documentation API20E. On peut aussi lire la fiche technique de Stéphanie Mas à http://mas.stephanie.free.fr/microbiologie_bio1/fiches%20pdf/galerieAPI20E.pdf

Compte- rendu

Il est exigé d'organiser le compte-rendu selon le plan suivant : isolement de contrôle, vérification d'orientation et justification de la galerie choisie, analyse des résultats de la galerie, conclusion (avec remarques concernant la typicité de la souche identifiée en regard de l'espèce).

- Confirmation (ou pas) des tests d'orientation à vérifier (gram, type respiratoire, catalase, oxydase, nitrate réductase).
- Résultats expérimentaux bruts de la galerie API20E.
- Profil numérique de la souche à identifier, recherche de l'existence de ce profil dans le catalogue (base de données) API, identification et qualité de l'identification (cf. données catalogue API).
- Calcul de probabilité d'identification et de la qualité de l'identification à l'aide de la feuille de calculs fournie (qui reprend les données statistiques de réponse aux tests fournies par API20E) .

Bibliographie

- J.P. Euzéby , Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire , index alphabétique des taxons, rubrique Enterobacteriaceae, <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ee/enterobacteriaceae.html>
- <https://pro.anses.fr/euroreference/numero5/index.htm> (consultation janvier 2017)

Annexe : Milieu mannitol-mobilité-nitrates : composition, ensemencement, lecture

Le milieu mannitol mobilité nitrate est utilisé pour l'orientation et/ou la différenciation des Entérobactéries par les tests simultanés de la mobilité, de l'utilisation du mannitol et de la réduction des nitrates en nitrites.

Composition en g/L : Hydrolysate tryptique de caséine 10,00 ; Nitrate de potassium 1,00 ; Mannitol 7,50 ; Rouge de phénol 0,04 ; Agar 3,50 ; pH final : 7,6 à 25°C

Ensemencement : Régénérer le milieu (100°C), refroidir. Ensemencer les tubes par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit, jusqu'au fond du milieu. Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Lectures

- 1) **Mobilité.** Compte-tenu de la faible charge en agar, les bactéries mobiles nagent à partir de la piqûre centrale d'inoculation en troublant le milieu.
- 2) **Utilisation du mannitol.** Si le mannitol est utilisé, il est la source principale d'énergie du milieu. Pour une souche vérifiée aéro-anaérobie type Entérobactérie : la fermentation du mannitol entraîne l'apparition de produits terminaux de fermentations acides qui entraînent l'acidification et le virage au jaune de l'indicateur de pH. Les entérobactéries ne fermentant pas le mannitol cultiveront sur les seuls acides aminés issus de la caséine et n'acidifieront pas le milieu. Il y a même alcalinisation lors de l'utilisation respiratoire des acides aminés en raison de leur désamination et de l'acidité très faible du CO₂ produit.
- 3) **Réduction des nitrates.** L'ajout de réactif de Griess (1 goutte de chacun des composants du réactif global) en surface du milieu révèle la présence éventuelle de nitrites (couleur rouge dense) qui signe une activité nitrate-réductase (qui peut être liée à la simple assimilation d'azote et/ou à une activité respiration nitrate anaérobie). Si le test au réactif de Griess est négatif, on peut alors ajouter de la poudre de zinc, métal capable de réduire les nitrates en nitrites. Le milieu contient alors déjà le réactif de Griess précédemment ajouté, si aucune coloration rouge n'apparaît, c'est qu'aucun nitrite n'a été formé et donc que le milieu était déchargé de ses nitrates. Le milieu ne contenait donc plus ni nitrates ni nitrites, preuve d'une activité nitrate réductase élevée (par exemple une respiration dénitrifiante avec production de N₂ dans la zone anaérobie du milieu).

Remarque : La production de bulles de gaz n'est pas un bon indice de production de diazote par respiration anaérobie dénitrifiante sur ce milieu car le gaz des bulles pourrait aussi bien être du CO₂ ou du H₂ d'origine fermentaire.

La réaction de Griess : L'ion nitrite forme avec l'acide sulfanilique sel de diazonium. Ce sel est révélé par une coloration rouge par adjonction d'alpha-naphthylamine. Réactions visualisables à <http://chimieorganique.jeanlouis.migot.over-blog.com/article-5-d-ou-vient-ce-nom-le-reactif-de-griess-88604487.html>

Annexe : les défauts de l'identification sur galerie de tests phénotypiques liés à une culture



Strictement empirique et réservée aux espèces les plus fréquentes



Pas toujours cohérente avec la taxonomie microbiologique actuelle



Nécessite une présélection (orientation) pour la réalisation d'une batterie de tests appropriés



Nécessite une incubation de plusieurs heures avant résultat