



isaralyon

Une école d'ingénieurs au coeur de la vie

Identification bactérienne sur ordinateur

**Mener une démarche complète de façon autonome (la pratique)
tout en révisant les concepts (la théorie)**

***Nanou BLACHIER - Alain
GAY***

Calendrier

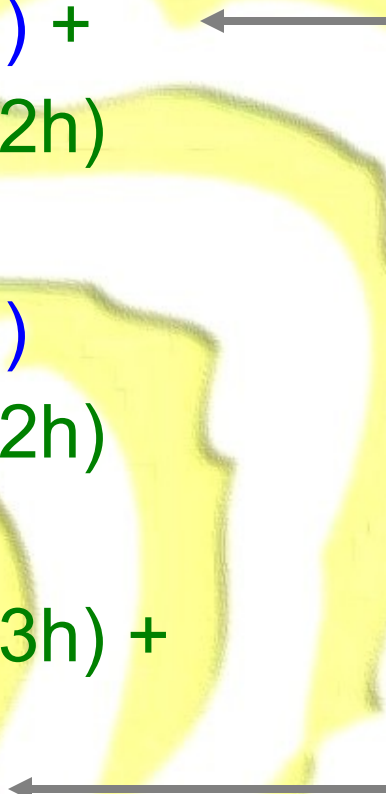
Octobre - Cours (6h) +
2 TP (2 x 2h)

Février - Cours (4h)

Mars - 3 TP (2 x 2h)

Mai - 1 TP (2 x 3h) +
Examen

5 mois =
nécessité de
révisions



6 TP micro-organismes

ensemencement

lecture

1	Caract. morphol. et culturaux	2h	2h		
2	Métabolisme énergétique	2h	2h		
3	Métabolisme glucidique	2h	2h		
4	Métabolisme protidique	2h	2h		
5	Métabolisme lipidique	2h	2h		
6	Identification de 2 espèces	3h	3h		   

1. Identification de la famille ou du genre

- Observations (morphologie, métabolismes)
- Recherche dichotomique (arbre)
→ confirmation de la galerie

2. Identification de l'espèce

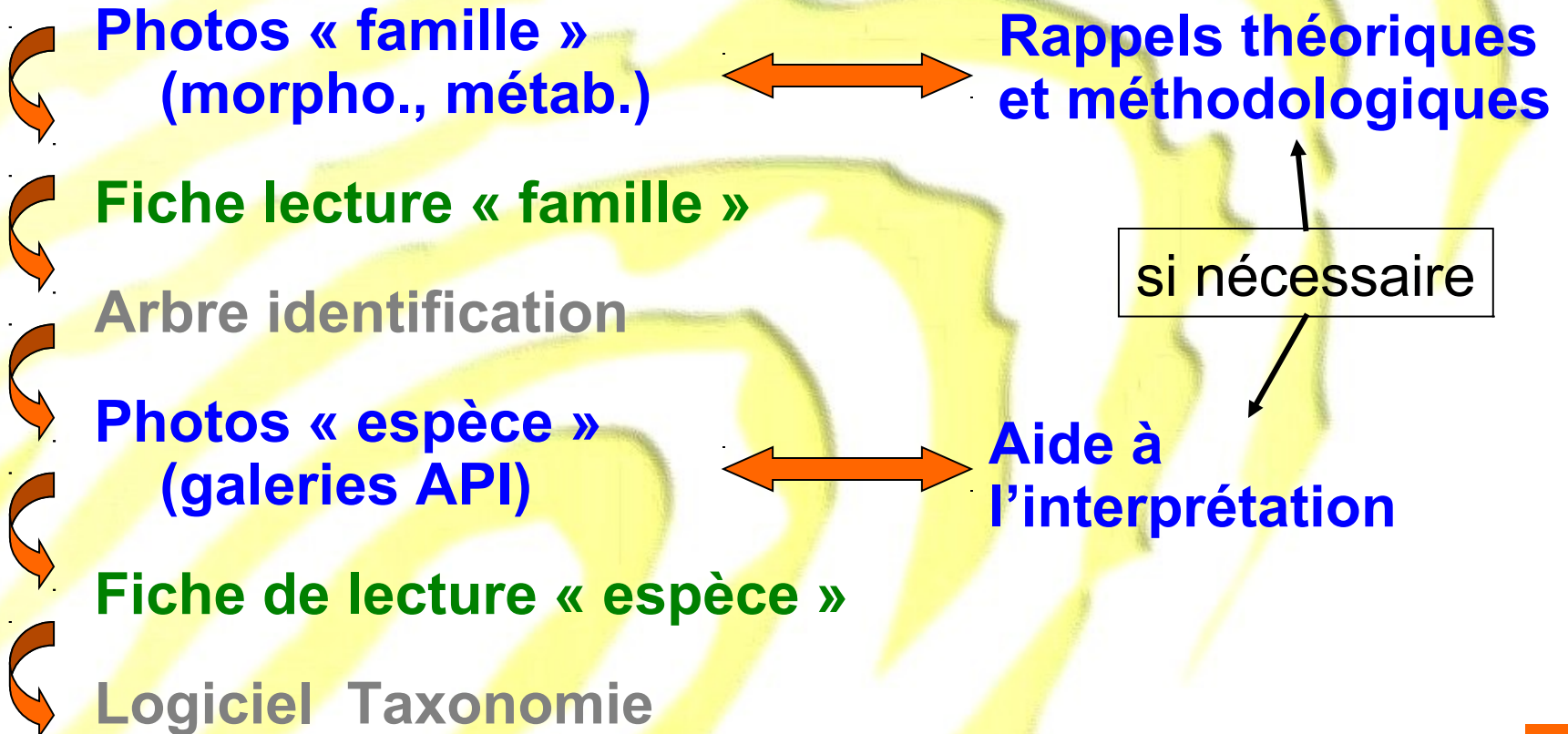
- Lecture de la galerie
- Interprétation des résultats
→ taxonomie

3. Rédaction d'un compte-rendu

Avant	Après
<u>6h de face à face</u> , dont <ul style="list-style-type: none">- 3h ensemencement- 3h lecture	<ul style="list-style-type: none">- <u>2h face à face</u> en salle info : présentation/G- <u>4h travail autonome</u>
laboratoire microbio.	plateforme eCampus
cultures +/- hétérogènes	photos standardisées
révision « papier »	révision / lien hypertexte
manipulations	pas de manipulations

ressources sur eCampus : **PDF** **PowerPoint** **Site Web**

Fiche de consignes



Identification d'une bactérie

TP sur machine

Consignes

Généralités

L'identification porte sur 4 familles, nommées de F1 à F4

Pour chaque famille, il y a 2 espèces à identifier

Procédure

1. imprimer la fiche d'identification des familles *Ident_famille.pdf*
2. pour remplir cette fiche et identifier la famille, utiliser les présentations *FamilleF1.pps*, *FamilleF2.pps*, etc., et suivre les instructions pour l'utilisation du site internet indiqué
3. Lancer le test correspondant : *TestFamilleF1.htm*, *TestFamilleF2.htm*, etc. pour connaître le mot

ressources sur eCampus : **PDF** **PowerPoint** **Site Web**

Fiche de consignes

**Photos « famille »
(morpho., métab.)**



**Rappels théoriques
et méthodologiques**

Fiche lecture « famille »

Arbre identification

**Photos « espèce »
(galeries API)**

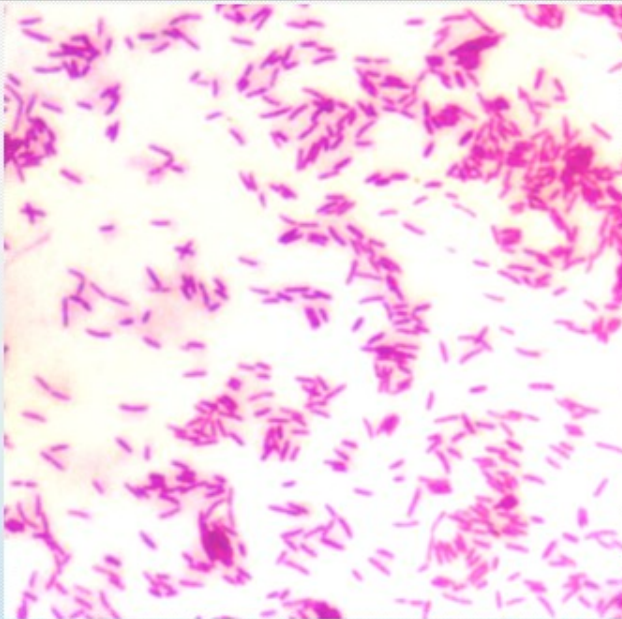
Fiche de lecture « espèce »

Logiciel Taxonomie

si nécessaire



1 - coloration de GRAM



Observer la couleur des bactéries pour en déduire le type de Gram

Photo prise au microscope oculaire X10 Objectif x 100 avec huile à immersion

vidéo [technique de coloration de gram](#)

4 - culture en aérobiose et aspect des colonies sur gélose TSA



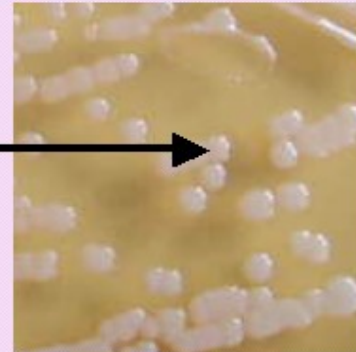
Noter le développement éventuel en aérobiose sur milieu ordinaire et le type de colonies



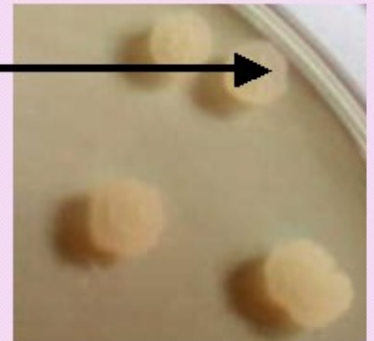
Rappels des différents types de colonies
S, R, M

3 types de colonies

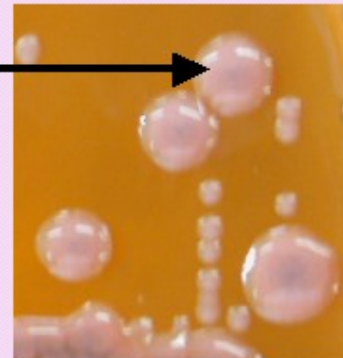
- Colonies de type "S"



- Colonies de type "R"



- Colonies de type "M"



Colonies M

- **M = Mucous (muqueuse)**
 - grosses colonies muqueuses, bombées, opaques, coulantes

bactéries ayant une capsule

Exemple: *Klebsiella pneumoniae*



8 - type métabolique



Gélose HL
avant incubation



Après incubation
24h 37°C

Indiquer le type
métabolique et la
mobilité

Rappel sur la mise
en évidence
des types
métaboliques et de
la mobilité

Etude du type métabolique

- Définition :

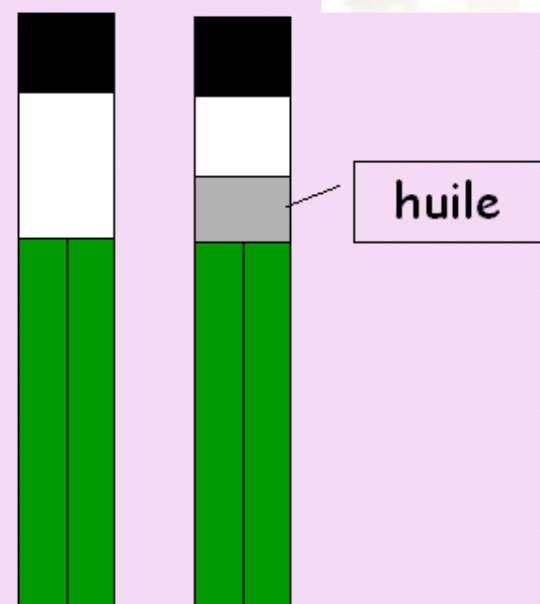
comportement des bactéries vis à vis du **glucose**

- Mise en évidence sur un milieu renfermant :

- du **glucose**
- un **indicateur de pH**
- un gradient d'**oxygène**
- aucun autre accepteur d'électrons : **absence** de
nitrate, sulfate ou thiosulfate ...

Mise en évidence du type métabolique sur Hugh et Leifson

- Milieux semi-solides :
 - 2 Milieux de Hugh et Leifson
 - semi-solide 2g/l + glucose 1%
 - bleu de bromothymol
- Création d'un gradient de rH
 - régénération du milieu
 - refroidissement : gélification
- Ensemencement de 2 milieux
 - par piqûre centrale au fil droit
 - couvrir 1 tube d'huile de paraffine



Exemples de types métaboliques



1

Inerte



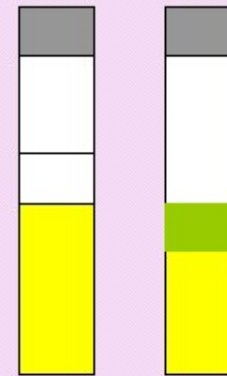
2

Strictement
oxydatif



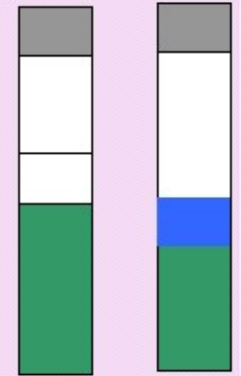
3

Fermentaire
mixte



4

Strictement
fermentaire



5

Alcalinisant

Remarque: sur milieu MEVAG, le milieu vire du violet au jaune

ressources sur eCampus : **PDF** **PowerPoint** **Site Web**

Fiche de consignes



**Photos « famille »
(morpho., métab.)**



Fiche lecture « famille »



Arbre identification



**Photos « espèce »
(galeries API)**



Fiche de lecture « espèce »



Logiciel Taxonomie

Famille F_____

ETAPE	CRITERE	CHOIX	LECTURE
1	GRAM	+ / -	
2	Forme et arrangement	bacilles ou colibacilles / coques	
3	Culture sur milieu ordinaire	si développement : - type de trouble - voile ou dépôt	
4	Culture en aérobiose	si développement : type colonie S / R / M	
5	Oxydase	oui / non	
6	Catalase (oui / non)	oui / non	
7	Type respiratoire	AS / AAF / ANS / micro	
8	Type métabolique	SO / SF / OF / I	

Identification

Famille	
Genre	

ressources sur eCampus : **PDF** **PowerPoint** **Site Web**

Fiche de consignes



**Photos « famille »
(morpho., métab.)**



Fiche lecture « famille »



Arbre identification



**Photos « espèce »
(galeries API)**



Fiche de lecture « espèce »



Logiciel Taxonomie

ressources sur eCampus : **PDF** **PowerPoint** **Site Web**

Fiche de consignes

**Photos « famille »
(morpho., métab.)**

Fiche lecture « famille »

Arbre identification

**Photos « espèce »
(galeries API)**

Fiche de lecture « espèce »

Logiciel Taxonomie

si nécessaire

**Aide à
l'interprétation**



Résultats de la galerie miniaturisée

Famille 1 - Espèce 1



OX -
NO₂ +
N₂ -
MOB +
McC +
OF/O +
OF/F +

Aide en cas de
doute :
ex de résultats
possibles

- Imprimez la fiche de lecture API 20 E
- traduisez les résultats de chaque caractère par + ou -
- remplissez le bulletin correspondant
- utilisez le logiciel taxonomie pour identifier l'espèce et imprimez le résultat donné par le logiciel

API 20 E

GLU \rightarrow ARA



+



+/-



-

Confirmation sur galerie classique



Kligler



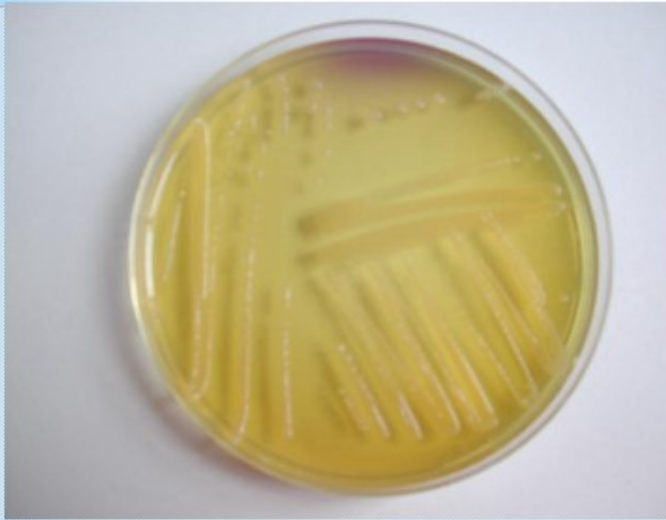
Simmons



Lysine fer

Lire:
glucose , gaz
lactose
H₂S
citrate
LDC, LDA

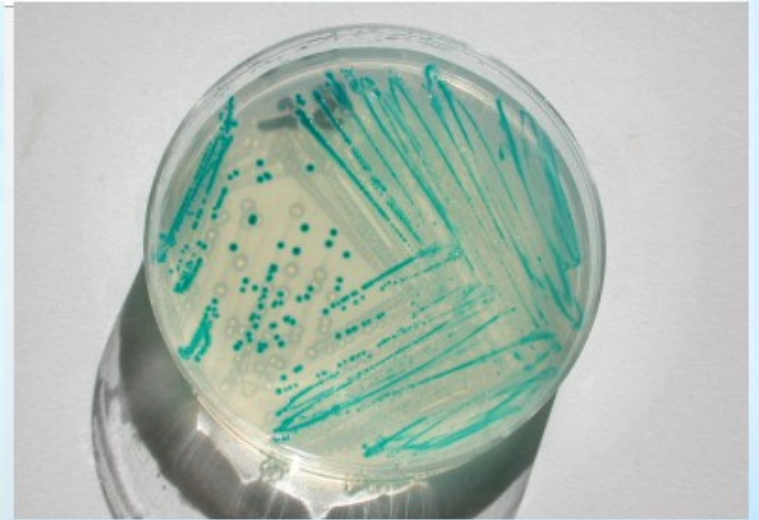
Caractères complémentaires



**gélose lactosée au
désoxycholate et
bromocrésol pourpre**



**Bouillon lactosé
bilié au vert
brillant avec
cloche à 44°C**



**Gélose au BCIG
44°C**

**Lire: lactose , gaz
résistance au désoxycholate, à la bile et au vert brillant
production de bêta-glucuronidase**

ressources sur eCampus : **PDF** **PowerPoint** **Site Web**

Fiche de consignes



**Photos « famille »
(morpho., métab.)**



Fiche lecture « famille »



Arbre identification



**Photos « espèce »
(galeries API)**



Fiche de lecture « espèce »



Logiciel Taxonomie

Galerie API 20 E

TEST	SUBSTRAT	REACTION ENZIME	RESULTAT		LECTURE
			NEGATIF	POSITIF	
ONPG	ortho-nitro-phenyl-galactoside	beta-galactosidase	incolore	jaune (1)	
<u>ADH</u>	arginine	arginine dihydrolase	jaune	rouge/ orangé (2)	
<u>LDC</u>	lysine	lysine décarboxylase	jaune	orangé	
<u>ODC</u>	ornithine	ornithine décarboxilase	jaune	rouge/ orangé (2)	
<u>CIT</u>	citrate de sodium	utilisation du citrate	vert pâle/ jaune	bleu vert/ vert (3)	
<u>H₂S</u>	thiosulfate de sodium	production d'H ₂ S	incolore/grisâtre	dépôt noir/ fin liseré	
<u>URE</u>	urée	uréase	jaune	rouge/orangé	
TDA	tryptophane	tryptophane desaminase	<u>TDA / immédiat</u> jaune marron foncé		
IND	tryptophane	production d'indole	<u>JAMES / immédiat ou IND / 2 mn</u> JAMES incolore vert pâle-jaune IND		JAMES rose IND

Identification

Famille	
Genre	
Espèce	

ressources sur eCampus : **PDF** **PowerPoint** **Site Web**

Fiche de consignes



**Photos « famille »
(morpho., métab.)**



Fiche lecture « famille »



Arbre identification



**Photos « espèce »
(galeries API)**



Fiche de lecture « espèce »



Logiciel Taxonomie

Choix des bases de données.

API 20 E 3.1 (Bacilles gram négatifs)

afficher les caracteres

lancer le calcul de probabilités

liste des caractères	valeurs des car.	Taxons dans l'ordre des probabilités	Valeurs des probabilités en pour 1000
ONPG	+	Escherichia coli 1	954
ADH	-	Citrobacter freundii	22
LDC	-	Leclercia adercarboxylata	17
ODC	-	Kluyvera spp	4
CIT	-	Citrobacter diversus ou	1
H2S	-	amalonaticus	1
URE	-	Enterobacter agglomerans 1	1
TDA	-	Escherichia coli 2	0
IND	+	Enterobacter agglomerans 5	
VP	-		
GEL	-		
GLU	+		
MAN	+		
INO	-		
SOR	+		
RHA	+		
SAC	+		
MEL	+		
AMY	-		
ARA	+		
OX	-		
NO2	+		
N2	-		
MOB	+		
McC	+		

CONCLUSION

excellente identification de Escherichia coli 1 /

Bénéfices escomptés

- meilleure articulation entre pratique (démarche d'identification) et théorie (révision des concepts et de la méthodologie)
- tout le monde travaille sur des situations « typiques » conformes (mêmes supports visuels)
- réduction du face à face (66%) et augmentation de l'autonomie et de la responsabilisation des étudiants

Limites :

- Moindre maîtrise des techniques de manipulation (ensemencements, tests)
- Dépendance vis à vis du dispositif informatique (salle informatique, imprimante, plateforme, accès web)

Perspectives d'évolution :

- Constitution d'une base de données sur notre collection de souches
- Tests d'auto-évaluation complémentaires