

JEAN-NOËL
JOFFIN

Construire sa propre galerie «Api» : rêve de tout professeur de microbiologie admiratif devant le trait de génie de l'inventeur! Mais ce n'est pas aussi simple qu'il paraît et il m'a fallu quelques expérimentations pour arriver à réaliser en microplaque quelque chose qui ressemble, de loin, à une galerie API 20E.

L'intérêt de l'opération est multiple si l'on veut bien exclure la satisfaction de l'égo :

- **introduction de la miniaturisation** après les études de métabolisme en tubes pour les élèves débutant en microbiologie
- **réduction du coût financier** de la manipulation
- possibilité de tester, pour chaque élève, un nombre de souches important : on peut ainsi montrer différentes Entérobactéries sans recourir à un nombre démesuré de tubes ou de galeries API20E.
- tester les capacités des étudiants dans l'organisation de leur travail pour un TP inhabituel.

JEAN-NOËL JOFFIN,
LYCÉE PAUL ÉLUARD
93206 SAINT-DENIS

LA GALERIE ET LES MILIEUX

La microplaque utilisée est une microplaque à fond plat. J'ai choisi, pour diminuer les coûts

une microplaque stérile machine et non garantie stérile. Mieux vaut un emballage unitaire, mais j'ai été amené à utiliser des microplaques emballées par 5 qu'il a fallu recouvrir à l'aide d'un papier aluminium passé rapidement à la flamme... Aucune contamination observée sur 17 galeries. Une telle microplaque vaut aux environs de 3 F.

Pour cette première galerie, le but pédagogique étant l'introduction aux Entérobactéries, les tests seront classiques : on utilisera les premiers caractères de API20E à l'exclusion de ONPG et Gélatinase. La microplaque comprenant 12 microtubes, on complètera par des glucides (Glucose, Saccharose, Mannitol par exemple). Il va de soi que l'on peut modifier sans problèmes les tests réalisés, en particulier

ajouter 12 caractères en utilisant deux lignes. L'ONPG pourrait être facilement ajouté à l'aide de la solution ou d'une fraction de disque placé dans un microtube.

Les milieux utilisés sont les suivants :

1, 2, 3.

Le milieu de base pour l'étude des **décarboxylases** est classiquement un bouillon au BCP. Un premier test montre que ce milieu, recouvert de vaseline, reste systématiquement violet. Or, API20E utilise manifestement une autre méthode avec un indicateur de pH différent, le rouge de phénol. Il semble donc qu'il faut utiliser cette composition plutôt que la traditionnelle. L'expérience montre la justesse de l'inventeur. Il est possible d'ajouter de l'agar au milieu.

composition :

Acide aminé (sous forme L)	5 g
Extrait de levure	3 g
NaCl (éventuellement)	3 g
Glucose	1 g
Rouge de phénol	qsp coloration suffisante
Eau distillée	qsp 1 dm ³
ajuster à pH 6	

4.

Pour le **Citrate de Simmons**, le milieu classique sera utilisé.

5.

La mise en évidence de **H₂S** utilisera une gélose au thiosulfate et au citrate de fer III.

composition :

gélose nutritive ordinaire	dose classique
thiosulfate de sodium	0,3 g
citrate de fer III	0,3 g

6, 7, 8.

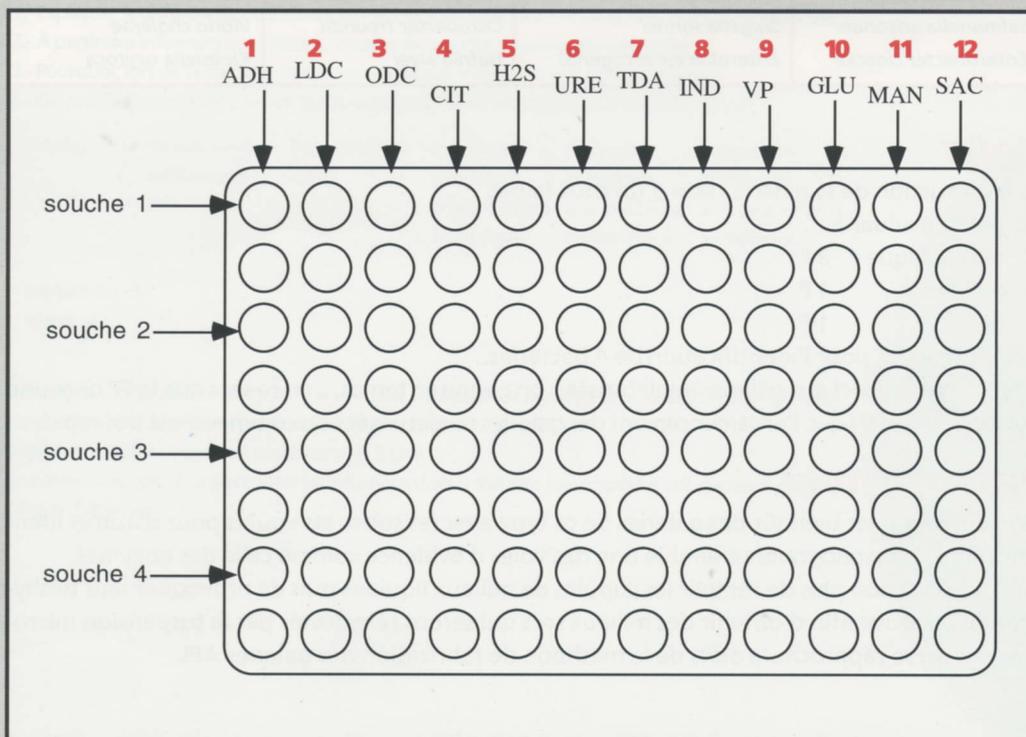
Le milieu classique Urée Tryptophane (Indole) permettra dans trois microtubes la mise en évidence de l'**Uréase**, de la **TDA** et de la **Tryptophanase** (Indole). Petite question : pourquoi doit-on recouvrir la cupule URÉ d'API20E de vaseline stérile ? Encore une fois l'expérience montre qu'en microtubes il faut la mettre pour un résultat juste... sans qu'une explication évidente s'impose.

9.

Le milieu classique Clark et Lubs permettra la réaction du Voges Proskauer.

10, 11, 12.

Le milieu classique Hugh et Leifson additionné de glucides révélera leur utilisation.



MODE D'EMPLOI

préparation de la galerie

Avant l'ensemencement, la galerie doit être préparée par les étudiants. Pour minimiser le nombre de pipettes Pasteur utilisé, il est nécessaire de procéder avec ordre. On peut par exemple, pour chaque milieu, faire circuler le tube contenant le milieu avec sa pipette sur une paillasse de quatre. On économise alors 3 pipettes et la stérilité est, si chacun prend ses précautions (en particulier en ne parlant pas), assurée. On peut aussi fixer un poste pour l'addition du milieu X et faire circuler alors les microplaques recouvertes du papier aluminium. Les milieux fondus devront être conservés liquides...

Chaque milieu est placé dans une série de tubes d'une colonne. Je propose de sauter une ligne car j'ai constaté des contaminations d'une ligne vers la ligne voisine quand toute la microplaque est ensemencée. Le volume nécessaire est de trois gouttes (à adapter en fonction des microplaques) de façon à laisser un espace au dessus du milieu, espace permettant l'addition de vaseline stérile ou de réactifs, évitant les débordements.

inoculation de la galerie

Là encore, l'économie sera réalisée par un ensemencement à l'anse. De plus, la richesse alors possible permettra de voir très vite les réactions rapides (uréase des *Proteus*) mais suppose que l'on ne travaille pas avec une seule colonie. Je n'ai pas testé un ensemencement avec une suspension réalisée à l'aide d'une colonie.

L'anse rechargée à chaque fois pourra permettre l'ensemencement d'une ligne sans qu'il soit nécessaire de la stériliser, la quantité de milieu transporté étant infime.

Recouvrir de vaseline les milieux ADH, LDC, ODC, URE, H₂S

Recouvrir de papier aluminium. Incuber 24 heures à 35-37°C.

choix des souches

Les souches choisies ont été les suivantes pour une paillasse de quatre :

1° étudiant	2° étudiant	3° étudiant	4° étudiant
<i>Proteus vulgaris</i> 1	<i>Proteus mirabilis</i> 1	<i>Proteus vulgaris</i> 2	<i>Proteus mirabilis</i> 3
<i>Morganella morganii</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Salmonella arizonae</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>

COÛT

La construction de la galerie reste d'un coût faible.

On peut l'évaluer à :

microplaque 3 F

milieux 1 F

pipettes 1 F

soit environ 5 F pour l'identification de 4 bactéries.

De plus, par rapport aux galeries miniaturisées, on gagne en temps... en ce sens que le TP dure une bonne heure alors que l'ensemencement des galeries miniaturisées du commerce est très rapide...

PERSPECTIVES

On peut imaginer bien sûr des galeries de ce type avec les substrats voulus pour d'autres identifications. L'auxanogramme semble une des voies d'évidence comme celle des enzymes.

Rien n'exclut non plus de remplir les cupules de milieux liquides puis de provoquer leur déshydratation à l'étuve afin d'obtenir des milieux secs qui seront réhydratés par la suspension microbienne. On se rapprochera alors de la méthode de fabrication des galeries API.