

I- Introduction

Les manipulations de cultures microbiennes ou des produits susceptibles de contenir des microorganismes s'effectuent selon des techniques évitant les contaminations par le manipulateur ou l'environnement. La destruction des microorganismes ou stérilisation est indispensable lors de la préparation du matériel et des milieux de cultures.

L'**identification** d'un microorganisme ne peut avoir lieu que lorsqu'il a été isolé à l'**état pur**. Ces deux étapes exigent l'utilisation de milieux de cultures stériles et de conditions adéquates permettant la croissance du microorganisme. Quant aux techniques d'identifications, elles sont nombreuses et varient en fonction de la nature du germe étudié : bactérie, levure, moisissure. Elles incluent les caractéristiques **phénotypiques** (ou phénétiques) et **génotypiques**.

II- Stérilisation

II-1- Généralités

La stérilisation est une opération qui a pour objet de tuer les microorganismes contenus dans une préparation. Les agents utilisés pour assurer la stérilisation sont physiques (température, radiations) ou chimiques.

II-2- Agents chimiques

- **désinfectants** : agents chimiques capables de détruire les germes pathogènes dans les milieux extérieurs à l'homme : l'eau, l'air, le sol, les objets et les matériaux les plus divers.

- **antiseptiques** : un milieu est dit septique lorsqu'à son niveau, des microorganismes pathogènes peuvent être présents ou se développer. Il est dit aseptique dans le cas contraire.

Les antiseptiques sont les substances chimiques capables de détruire les microorganismes ou d'arrêter leur croissance. On réserve l'usage du terme antiseptique pour désigner les agents qui exercent une action locale chez les êtres vivants, au niveau d'une plaie, sur une muqueuse, etc.

La désinfection et l'antisepsie sont des opérations momentanées, permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus supportés.

- **antibiotiques** : substances chimiques exerçant un pouvoir destructeur sur les microorganismes mais dépourvues de toxicité pour les cellules humaines ou animales. Ces substances sont qualifiées de chimiothérapeutiques. Les antibiotiques sont élaborés par des microorganismes vivants (champignons et bactéries). Ces substances peuvent avoir un effet bactériostatique ou fongistatique lorsqu'elles empêchent la multiplication et bactéricide ou fongicide lorsqu'elles détruisent totalement les bactéries et les champignons.

II-3- Agents physiques

Les moyens physiques les plus utilisés sont les températures élevées et les radiations.

II-3-1- Température : son action dépend de l'environnement, de l'état physico-chimique des cellules et de leur nombre.

En solution aqueuse, généralement, les formes végétatives des bactéries sont tuées à 100°C alors qu'en milieu déshydraté, elles résistent mieux. C'est également le cas des solutions huileuses où les suspensions lipidiques thermostables protègent les germes.

Les procédés pratiques de stérilisation utilisent la **chaleur humide** ou **sèche**. L'autoclave est un appareil qui fournit une chaleur humide. La stérilisation atteindra son but lorsqu'une température de

120°C sera maintenue durant 15 à 20 minutes (ex. milieux de cultures liquides et solides). Cependant, de nombreux milieux de culture et substances ne peuvent pas supporter des températures de stérilisation élevées (cas des solutions concentrées de glucides, substances hydrolysables), on procède à leur **tyndallisation**. Technique décrite par Tyndall qui consiste à chauffer le milieu de culture à 60°C ou 70°C durant 30 minutes ou 1 heure, trois fois consécutives, en ménageant un intervalle de 24 heures entre chaque chauffage. A cette température, toutes les formes végétatives sont détruites. Les spores thermorésistantes peuvent germer entre chaque intervalle de temps et se transforment en formes végétatives qui seront par la suite éliminées.

La stérilisation par ébullition à une température proche de 100°C est utilisée pour la préparation de certains milieux de culture qui ne supportent pas l'autoclavage (lait, solutions de glucides...).

La **pasteurisation** n'est pas une réelle méthode de stérilisation. Elle est appliquée à certains produits naturels pour pouvoir les conserver momentanément sans les altérer (ex. lait, vin...). Cette méthode permet l'inactivation des microorganismes pathogènes.

Pour les matériels qui ne peuvent pas être stérilisés par la chaleur humide, on utilise la chaleur sèche. Les objets seront maintenus à 180°C durant 1 heure ou à 160°C pour 2 heures.

On peut également maintenir un objet à stériliser sur une flamme chauffante (bec Bunsen), cas des anses de platines.

II-3-2- Radiations

Les rayonnements peuvent avoir des effets bactéricides. Les principaux types sont les radiations électromagnétiques, électroniques.

II-3-3- Filtration

Elle est utilisée dans la stérilisation des solutions renfermant des substances thermolabiles (cas des protéines, sérum, solution de glucides...). Elle consiste à faire passer un liquide à travers une paroi poreuse ou une membrane qui retient les éléments solides et les microorganismes.

III- Milieux de culture

Tous les milieux de culture utilisés en bactériologie peuvent être classés selon plusieurs critères :

1. Leur consistance : liquide ou solide.
2. Le mode de stérilisation : autoclavage, filtration ou tyndallisation.
3. Leur utilisation : isolement, entretien, identification ou conservation.
4. Leur mode de préparation et leur composition : milieux synthétiques et semi-synthétiques et milieux empiriques.

III-1- Milieux synthétiques et semi-synthétiques

III-1-1- Milieux synthétiques ou définis

Ils ne comprennent que des corps chimiquement définis et dissous dans l'eau distillée en proportions déterminées de façon à constituer une solution tamponnée. Ils doivent contenir une source de carbone (glucide, alcool, acide organique, un acide aminé et parfois un carbonate), des composés minéraux dont les oligoéléments, du nitrate ou de l'ammoniaque comme source d'azote et des facteurs de croissance (vitamines, bases puriques et pyrimidiques ou des acides aminés) pour les bactéries exigeantes.

La composition des milieux synthétiques est très variable selon le germe que l'on veut y cultiver.

Exemples :

Milieu 1. Milieu minimum minéral : N_4HCl , 1g ; KH_2PO_4 , 1,2g ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8,6 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 200 mg ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 mg ; CaCl_2 ; 10 mg ; Traces de Mn, Mo, Cu, Zn, 0,02-0,5 mg ; Eau distillée ; 1000 ml.

Seules les bactéries autotrophes pourront se cultiver sur ce milieu, en assimilant le CO_2 atmosphérique et en tirant leur énergie de l'oxydation du chlorure d'ammonium : bactéries nitrifiantes.

Milieu 2. La même solution minérale + glucose 5 g. Il convient à la croissance de nombreuses bactéries hétérotrophes, non exigeantes en facteurs de croissance, ex. *E. coli*.

III-1-2- Milieux semi- synthétiques

Certains germes exigent beaucoup de facteurs de croissance rendant l'utilisation des milieux synthétiques difficiles, on apporte alors ces derniers sous forme d'un extrait organique complexe (extraits de levure très riches en vitamines).

Exemple. Milieu minéral minimum supplémenté de 5 g de glucose et 5 g d'extraits de levure.

III-1-3- Milieux empiriques complexes

Ces milieux contiennent des ingrédients de composition chimique indéterminée. Ils contiennent des composants indéfinis comme des peptones, des extraits de viande et des extraits de levure. Les peptones sont des hydrolysats de protéines préparés par digestion protéolytique partielle de viande, caséine, soja, gélatine et autres protéines. Elles servent de sources de carbone, d'énergie et d'azote. L'extrait de bœuf contient des acides aminés, peptides, nucléotides, acides organiques, vitamines et minéraux. Alors que l'extrait de levure est une excellente source de vitamines B et de composés azotés et carbonés.

On obtient les milieux solides en ajoutant un agent gélifiant à un milieu liquide. Le gélifiant le plus utilisé est **l'agar-agar ou gélose** : il s'agit d'un polygalactoside sulfaté présentant la propriété de former avec l'eau un gel solide à une température inférieure à environ 60°C tout en étant liquéfiable par ébullition, auquel cas, il reste en surfusion (liquide) jusqu'aux environs de 45°C .

IV- Principales techniques d'isolement et de purification

IV-1- But de l'isolement

L'isolement permet d'obtenir les cultures pures nécessaires à toute étude et identification bactériologique. Il permet une séparation et une purification des bactéries présentes dans un produit en colonies distinctes.

Il est essentiel de définir les termes suivants :

- Ensemencement : opération qui consiste à déposer des bactéries sur ou dans un milieu de culture.
- Repiquage : transplantation d'une culture pure sur milieu neuf.
- Isolement : ensemencement effectué dans un but de séparation, ce qui permet l'obtention de colonies nettement distinctes et en culture pure.

IV-2- Principaux procédés d'ensemencement

- Ensemencement dans la masse

Ce type d'ensemencement exige l'utilisation de milieux solides en surfusion (gélosé liquéfié et

ramenée à une température de 45-50°C). Dans le cas des géloses destinées à la numération des bactéries, le liquide à ensemercer est introduit sous un volume déterminé d'une gélose en surfusion à l'aide d'une pipette. Après homogénéisation, le milieu est coulé en boîte de Pétri et après refroidissement, cette dernière est retournée et mise à l'étuve.

- Ensemencement par des stries transversales

L'ensemencement par stries sur boîtes de Pétri est pratiquée souvent dans le but d'un isolement. L'inoculum est déposé sur un point périphérique du milieu et disséminé par l'anse de platine ou par la pipette boutonnée.

- Ensemencement en nappe ou par étalement

o Pipette râteau : l'inoculum est étalé à l'aide d'une pipette râteau que l'on glisse sur la surface du milieu tout en faisant tourner la boîte.

o Par touches : l'inoculum riche est ensemené par touches circulaires (1 à 2 cm de diamètre) ou par petites stries épaisses (2 cm de long environ). Cette technique permet de faire plusieurs essais de culture sur la même boîte de Pétri.

- Inoculation par piquûre

- en culot : la piquûre est réalisée au centre du culot à partir d'une culture en milieu liquide ou solide. Elle est faite soit avec l'anse de platine parfaitement rectiligne, soit avec la pipette Pasteur rescellée sans formation de perle.

IV-3- Incubation et lecture

- Marquage des boîtes et des tubes

Le marquage comprend le jour et parfois l'heure de l'ensemencement, le repérage de l'étude (nom ou N° d'inscription du malade par exemple), nature du produit étudié (souche bactérienne, produit pathologique, etc.) et nature du milieu utilisé.

- Vérification du bouchage

Les capsules à vis qui bouchent la majorité des tubes utilisés, doivent être serrées à fond ou simplement posées ou enclenchées d'un quart de tour ; cette variation d'aération qui doit être respectée.

- Conditions d'incubation

Les températures, les durées d'incubations ainsi que les exigences atmosphériques particulières (CO₂, anaérobie, etc.) doivent être respectées. La boîte de Pétri ensemenée doit toujours reposer couvercle en bas, que ce soit à l'étuve ou sur la paillasse. L'eau condensée retombera à la surface du milieu et transformant l'isolement en une nappe inutilisable.

IV-3- Purification

- Les colonies de taille moyenne : prélever à l'anse ou à la pipette effilée, totalement ou partiellement, une colonie bien isolée et mettre en suspension dans quelques gouttes de bouillon. Faire des isollements sur 2 ou 3 tubes de gélose inclinée, après dilution.

- Petites colonies : purifiées sans dilution préalable.

La pureté d'une colonie doit être vérifiée avant toute identification ; une colonie peut en cacher une autre plus petite correspondant à une autre espèce : colonie mixte.

V- Techniques d'identification des microorganismes

L'identification des microorganismes doit s'effectuer sur des souches en culture pure. Elle

comprend les étapes suivantes :

- Détermination des caractères culturels ;
- Caractérisation morphologique ;
- Caractérisations biochimique, physiologique, immunologique et détermination du pouvoir pathogène et de la lysotypie ;
- Caractérisation génétique.

V-1- Détermination de la morphologie cellulaire

La morphologie et l'association cellulaire sont déterminées par microscopie et comprend:

- Un examen à l'état frais entre lame et lamelle des bactéries vivantes.
- Un examen après coloration généralement sur des frottis séchés et fixés. Les colorations sont classées en :
 - Colorations usuelles : colorations simples et colorations différentielles type Gram.
 - Colorations spéciales de la structure bactérienne : flagelles, capsules, spores, inclusions cytoplasmiques, etc.

V- 1-1- Observation à l'état frais

L'examen à l'état frais est une observation des bactéries vivantes sans fixation et coloration. Il permet d'observer la morphologie des bactéries, leur mode de groupement et leur mobilité.

Exemple. Examen de cultures en milieu liquide

Une goutte de culture est prélevée à la pipette Pasteur remplie par capillarité ou à l'anse de platine et déposée au milieu d'une lame propre. Le volume de la goutte doit être proportionné aux dimensions de la lamelle de façon à ce que le produit ne déborde pas de cette dernière et tout en évitant de créer des bulles d'air. L'observation se fera à $\times 10$ et $\times 40$.

V-1-2- Observation après coloration

Les microorganismes doivent souvent être fixés et colorés pour augmenter la visibilité et accentuer les particularités morphologiques spécifiques.

Technique :

- Préparation des frottis

On étale une petite goutte de culture en milieu liquide ou de suspension bactérienne en un mince film sur une lame propre. Après séchage de la lame, le frottis est fixé par la flamme du bec bunsen. Ce procédé consiste à tuer les bactéries sans en altérer la structure.

- Colorations

Elles sont indispensables à l'étude de la structure de la bactérie.

- Colorations simples

Utilisation des colorants comme bleu de méthylène phénique et le bleu de toluidine.

Technique :

Recouvrir le frottis séché et fixé, du colorant choisi. Laisser agir de 1 à 2 minutes, laver et sécher délicatement avec un papier filtre. Examiner en immersion.

- Coloration de Gram

Cette technique est l'une des bases de la classification des bactéries. Elle a été découverte par le

savant Danois Hans Christian Gram en 1884 ; puis elle a été appliquée par Roux à l'identification des espèces bactériennes.

- Technique :

Après la fixation et le refroidissement, lavage de la lame à l'eau qui débarrasse la préparation des impuretés et sources d'artéfacts.

- Recouvrir la lame de violet de gentiane filtré et laisser agir pendant 1 minute.

- Rejeter le violet en l'entraînant avec la solution de lugol. La lame ne doit jamais rester découverte. Ce temps de mordantage doit être égal ou supérieur à celui du violet.

- Décoloration par l'alcool par l'alcool absolu ou à 90°, versé goutte à goutte sur la lame inclinée jusqu'à ce que l'alcool n'entraîne plus de colorant.

- Laver abondamment à l'eau

- Recouvrir la lame d'eau et y verser quelques gouttes de fuchsine de Ziehl filtrée à chaque extrémité et non au centre, ce qui aurait pour effet de colorer par la fuchsine pure. Les lames sont examinées à l'immersion.

- Résultats

Cette coloration différentielle permet de diviser les bactéries en deux groupes : les bactéries à Gram positif gardent leur coloration violette après décoloration par l'alcool alors que les bactéries à Gram négatif sont décolorées par l'alcool et teintées par la fuchsine en rose ou rouge.

Cette distinction est basée sur des différences de structure pariétale. La positivité ou négativité de Gram dépend également pour une même espèce de l'âge de la culture.

V-2- Détermination des caractères cultureux

Les aspects caractéristiques des cultures bactériennes sur les milieux usuels sont des indices d'orientation :

- Cultures en milieu liquide : on note

1- Présence de trouble important ou pas du milieu

2- Présence de dépôt et dont l'aspect peut être muqueux, granuleux, etc.

3- Présence de voile, observé avec des bactéries aérobies strictes ou facultatives.

- Culture en milieu solide, on note l'abondance

1- Abondance de la culture et son délai d'apparition

2- Aspect des colonies : qui est observé à l'œil nu ou avec une loupe binoculaire qui permet des examens sous différents angles d'éclairages (transparence, réflexion..). Les caractéristiques d'une bactérie sont les suivantes :

La taille : le diamètre varie selon les espèces bactériennes (petites colonies, diamètre 1 mm ; colonies moyennes, diamètre de 1,5 à 3 mm ; grandes colonies, diamètre 3 mm).

La forme générale caractérisée par : l'allure des contours (bords réguliers, irréguliers, déchiquetés), la forme du relief (colonies bombées, plates, centre surélevé ou ombiliqué).

La transparence : certaines colonies sont parfaitement transparentes, d'autres translucides, lactescentes ou opaques). La transparence doit être appréciée en lumière naturelle et artificielle.

L'aspect de la surface : colonies lisses parfois brillantes, colonies rugueuses à surface mate, colonies muqueuses qui ont un aspect en coulée de miel.

La consistance appréciée au moment du prélèvement : colonies muqueuses (filantes), grasses, crémeuses, sèches...

V-3- Caractérisation physiologique et biochimique

V-3-1- Influence des paramètres physico-chimiques

L'influence sur la croissance de la température, du pH et de la concentration en sel (NaCl) est déterminée en variant un des paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants.

V-3-2- Etude du type respiratoire et mise en évidence des enzymes

Elle consiste à déterminer le caractère aérobie-anaérobie en utilisant une gélose viande-foie (VF)ensemencée en profondeur répartie en culot. La gélosé est régénérée et après son refroidissement, la pipette contenant la culture est introduite jusqu'au fond du tube puis ramenée à la surface en décrivant une spirale.

Les tubes sont ensuite incubés après refroidissement à T° optimale. Selon leur comportement vis-à-vis de l'O₂, les germes peuvent être classés en aérobies stricts, anaérobies stricts, aéro-anaérobies et microaérophiles.

- **Recherche de la catalase** : la catalase empêche l'accumulation de H₂O₂ (produit issu de l'oxydation de substrat).

La présence de la catalase est mise en évidence en dissociant à l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur une quantité suffisante de la culture sur une lame de verre contenant une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène

- **La recherche de la cytochrome-oxydase** : elle est effectuée à l'aide de disques « Ox » dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N,N-diméthyl-1,4- phénylène diaminedichlorure. Une partie de la colonie est prélevée à l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur et dissociée sur le papier filtre imbibé d'eau distillée. La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé.

V-3-3- Etude du métabolisme oxydatif ou fermentaire

Le milieu de culture Hugh et Leifson est utilisé lors de l'étude du métabolisme du glucose qui peut se faire par voie oxydative ou fermentaire.

Aux milieux précédents stériles en surfusion, on rajoute une solution de sucre stérile à une concentration finale de 1%. Homogénéisation et régénération du milieu de culture. Ensemencement (2 tubes par germe) par piqure centrale par le biais d'un fil de platine chargée d'une culture pure. Sur un des tubes, ajouter une couche de 1cm environ d'huile de paraffine stérile et incubation à T° optimale.

La production d'acide se manifeste par un virage au jaune de l'indicateur coloré (bleu de bromothymol) au jaune pour le cas du milieu d'Hugh et Leifson. Si elle a lieu dans les deux tubes, il s'agit d'une fermentation (Bactéries fermentatives). Si l'acidification a lieu uniquement dans le tube non recouvert d'huile de paraffine, implique une oxydation (bactéries oxydatives). Dans le cas où aucun des deux tubes ne vire au jaune, le germe est dit inerte ou inactif.

V-3-4- Etude du métabolisme glucidique

Elle permet de suivre l'attaque des glucides. Plusieurs milieux de culture liquides (bouillons) ou solides peuvent être utilisés.

- **Réactions de Vogues Proskauer (VP) et au Rouge de Méthyle**

Ensemencement du milieu de Clark et Lubs et après incubation, la lecture se fait en ajoutant 0,5 ml de KOH à 40% (p/v) (réactif VP1) et 0,5 ml d'alpha-naphtol (v/p) (réactif VP2) pour la mise en évidence de la présence d'acétoïne (souche VP positive) qui se traduit par une coloration rose.

La production d'acides mixtes est recherchée sur le même milieu. La lecture se fait par addition de quelques gouttes de réactif au rouge méthyle, une réaction positive se traduit par le virage de la couleur du bouillon au rouge.

- **Utilisation du milieu mannitol-mobilité**

La mobilité bactérienne ainsi que la fermentation du mannitol ont été étudiées en ensemençant le milieu semi-solide mannitol-mobilité par piqure centrale à l'aide d'un fil droit. La présence de mobilité est révélée par un envahissement plus ou moins grand du milieu à partir de la piqure d'inoculation, l'utilisation du mannitol est traduite par un virage de la couleur du rouge au jaune.

- **Utilisation des sucres sur le milieu *Triple Sugar Iron* (TSI)**

La gélose Triple Sugar Iron permet la mise en évidence de la fermentation du glucose (avec ou sans production de CO₂), l'oxydation du lactose et/ou du saccharose et la production de sulfure d'hydrogène.

L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification, jaunissement du culot dans le cas de glucose et de la pente dans le cas du lactose et/ou du saccharose. La production de sulfure d'hydrogène à partir du thiosulfate est mise en évidence par la formation d'une coloration noire et le dégagement de CO₂ est révélé par l'apparition de bulles d'air dans le culot ou le décollement de la gélose

- **Recherche de la β -galactosidase**

Des suspensions denses de culture sont préparées dans des solutions salines optimales correspondantes à chaque souche puis un disque imprégné d'Ortho-Nitro-Phényl- β -Galactoside (ONPG) est ajouté à chaque suspension. Après incubation pendant 18 à 24 heures, l'apparition d'une coloration jaune indique l'hydrolyse de l'ONPG et en conséquence la présence de cette enzyme.

V-3-5- Etude du métabolisme protéique

- **Recherche de la gélatinase**

La gélatine est une protéine des tissus de soutien animaux. Plusieurs méthodes sont utilisés pour sa mise en évidence.

- Un milieu à la gélatine (gélatine nutritive...), réparti en culot et ensemencé par piqure centrale. Le tube est observé après 48h à 2 semaines. La liquéfaction de la gélatine traduit la présence d'une gélatinase.

- L'ensemencement se fait par touche sur milieu de base supplémenté de 1% (p/v) de gélatine. L'hydrolyse est révélée par addition de 1 à 2ml du réactif suivant : HgCl₂ 15g, HCl concentré : 20 ml, complété à 100 ml. Une zone claire indique la production d'une gélatinase.

- **Recherche de la caséinase**

Le milieu de base est modifié par addition de 1% (p/v) de caséine. Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées. La présence de cette activité est détectée par un halo clair autour des colonies indiquant une hydrolyse de la caséine.

- **Recherche des décarboxylases** (lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et l'arginine

dihydrolase)

Ces enzymes, dont l'action est favorisée en milieu acide, forment des substances alcalines à partir des acides aminés.

Les milieux utilisés ne contiennent qu'un seul acide aminé, lysine, ornithine ou arginine respectivement. Quatre tubes dont un est un témoin sont inoculés avec une suspension bactérienne ou archéenne.

Après incubation, une réaction négative se traduit par une coloration jaune (acidification du milieu) alors que l'apparition d'une coloration violette (alcalinisation du milieu) révèle une réaction positive

- **Production d'indole**

Certaines bactéries désaminent puis hydrolysent le tryptophane pour donner une molécule d'indole. L'indole réagit avec la fonction aldéhyde du paradiméthyl amino benzaldéhyde pour donner un composé coloré en rouge.

L'ensemencement des souches est réalisé sur un milieu de culture liquide supplémenté de 0,5% (p/v) d'extrait de levure. Après incubation, la production d'indole est mise en évidence par l'ajout de quelques gouttes du réactif de Kovacs. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge à la surface

- **Recherche de l'uréase**

L'enzyme hydrolysant l'urée est recherchée sur le milieu synthétique à l'urée de Christensen. Les souches sont ensemencées sur gélose inclinée puis incubées.

La réaction positive se traduit par une coloration rouge violacée ou orange foncée par contre une teinte jaune du milieu indique que la réaction est négative

V-3-6- Etude du métabolisme lipidique

Cette activité est recherchée sur milieu de base contenant 1% (v/v) de Tween 80 ou de Tween 20, soit 2,5% (v/v) d'huile d'olive. L'ensemencement des souches est effectué par touches. Après incubation, le développement d'un précipité autour des stries témoigne la présence d'une lipase.

V-4- Chimiotaxonomie

Étude de molécules qui résultent d'une série de réactions enzymatiques et donc de l'expression de plusieurs gènes. Détermination de la composition en acides gras et en acides aminés de la paroi ; des lipides polaires membranaires et des profils électrophorétique de l'ensemble des protéines.

V-5- Identification génétique

Utilisation d'approches permettant une étude complète ou partielle du génome :

- Étude du génome complet:
 - G+C %
 - hybridation ADN/ADN total
 - polymorphisme de restriction de l'ADN total
 - Séquençage du génome
- Étude d'une portion du génome
 - Polymorphisme de restriction d'une portion d'ADN
 - Séquençage de gènes...