ANNEXE

Annexe 1

Les milieux de culture

I. Les milieux liquides (bouillons)

I.1. Bouillon nutritif

Composition g/l

Extrait de viande.....1,0
Extrait de levure.....2,5
Peptone.....5,0
Chlorure de sodium.....5.0

Préparation

-Dissoudre 25 g de poudre de gélose nutritif dans un litre d'eau distillée.
- Auto-claver a 121 C° pendant 15 minutes.
-Repartir dans des tubes stériles.
- PH final 7,4 ± 0,2.

I.2. Milieu Rothe (Biokar)

Composition g/l

Tryptose.....15,0
Chlorure de sodium.....7,50
Azide de sodium.....0,20
Extrait de bœuf.....4,50
Glucose.....7,50

Préparation

- Mettre en suspension 34,8 grammes dans 1 litre d'eau pure.
- Agiter jusqu'a dissolution complète.

- Repartir 10 ml par tubes.
- Auto-claver a 121°C pendant 15 minutes.
- pH final a 25°C : 7,2 ± 0,2.

I.3.Milieu litsky (biokar)

Composition g/l

Peptone de viande.....10,0
Peptone de caséine.....10.0
Glucose.....5,00
Phosphate dipotassique.....2,70
Phosphate mono potassique.....2,70
Chlorure de sodium.....5, 0
Azide de sodium.....0,30
Ethyle violet..... 0,0005

Préparation

-Mettre en solution 35,7 g de milieu déshydraté (BK061) dans 1 litre d'eau distillée.
-Agiter lentement jusqu'a dissolution complète.
-pH du milieu prêt a-l'emploi a 25°C : 6,8 ± 0,2. Ajusté le ph de milieu.
-Repartir en tubes a raison de 10 ml par tube.
- Stériliser a l'autoclave a 121°C pendant 15 minutes.

II. Les milieux solides

II.1.Gélosé nutritive

Composition g/l

Extrait de viande.....1,0
Extrait de levure.....2,5
Peptone.....5,0
Chlorure de sodium.....5.0
Agar..... .15

Préparation

-Dissoudre 25 g de poudre de gélosé nutritif dans un litre d'eau distillée.

- Auto-claver a 121 C° pendant 15 minutes.

-Repartir dans des tubes stériles.

- PH final 7,4 ± 0,2.

II.2 EMB (éosine bleu de méthylène)

Composition g/l

Peptone..... 10
Lactose..... 10
Eosine..... 0,4
Bleu de méthylène.....5,0
Hydrogenophosphate de potassium.....2
Agar.....15

Préparation

-Mettre en suspension 37,5 g du milieu dans un litre d'eau distillée.

- Bien mélanger.

- Auto-claver a 121C° pendant 15 mn.

- PH final 6,8 ± 0,1

II.3.Cétrimide

Composition g/l

Peptone de gélatine.....16
Peptone de caséine.....10
Bromure de tetradonium (cétrimide).....0,2
Acide nalidixique..... 15
Sulfate de potassium.....10
Chlorure de magnésium.....1.4
Agar.....10

Préparation

- Dissoudre 45,3 g de milieu de base déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu a ébullition sous agitation et température constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire a sa dissolution (recouvrir le bicher par un papier aluminium pour éviter l'évaporation de la suspension).
- Repartir dans les flacons.
- Stériliser a l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

II.4.Mac conkey (flukar)

Composition g/l

Peptone ……..20, 0
Lactose.....10,0
Cristal violet.....0,001
Rouge neutre.....0,05
Chlorure de sodium.....5,0
Sels biliaires.....15,0
Agar.....15,0

Préparation

-Mettre en suspension 52 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
-Porter lentement le milieu a ébullition sous agitation et une température constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire a sa dissolution (Recouvrir le bicher par un papier aluminium pour éviter l'évaporation de la suspension).
-Repartir en tubes ou en flacons.
-Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

II.5.PCA (Plate Count Agar) (biokar)

Composition g/l

Digéré enzymatique de caséine.....5,0
Extrait de levure.....2.5
Glucose..... 1,0
Agar.....15

Préparation

-Dissoudre 23,5 g de milieu de base déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.

-Porter lentement le milieu a ébullition sous agitation et température constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire a sa dissolution (recouvrir le bicher par un papier aluminium pour éviter l'évaporation de la suspension).

- Repartir en tubes (ou chaque tube contient 12 ml de notre milieu liquide).

- Auto-claver à 121 °C pendant 15 minutes

II.6.Hektoen

Composition g/l

Protéose peptone.....12
Extrait de levure.....3
Chlorure de sodium.....5
Thiosulfate de sodium.....5
Sels biliaires.....9
Citrate de fer et d'ammonium.....1,5
Salicine..... 2
Lactose..... 12
Saccharose..... 12
Fuschine acide..... 0,1
Bleu de bromothymol.....0,065
Agar..... 14
Eau distillée.....1L

Préparation

-Suspendre 75,1 g de milieu déshydraté (BK067) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Porter lentement à ébullition, en remuant avec une agitation constante jusqu'à dissolution complète.

- Maintenir l'ébullition pendant 2 minutes.

- Ne pas stériliser.

II.7.Chapman

Composition g/l

Peptone.....10
Extrait de viande bœuf.....1,0
Chlorure de sodium.....75,0
Mannitol.....10
Rouge de phénol.....0,025
Agar.....15,0

Préparation

-Mettre en suspension 111,0 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée.
-Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire a sa dissolution.
-Repartir le milieu dans des flacons.
-Stériliser a l'autoclave a 121 °C pendant 15 minutes.

Annexe 02

Les réactifs et les produits chimiques

Réactifs et colorants	Compositions
Cristal violet	**-Solution 1** -Cristal violet..... 20g Ethanol.....0,95200 **Solution 2** : -Oxalate d'ammonium...20g Eau distillée.....800 cm^3
Fuchine	- Fuchine basique.....10g -Phénol.....50g -Ethanol a 0,95100.....cm^3 -Eau distillée.....1dm^3
Kovacs	-P-dimethylamino-benzaldéhyde.5 g - Alcool amylique.....75 ml - HCl pur.....25 ml
Lugol	-Iode..... 1 g -Iodure de potassium …. 2g -Eau distillée qsp..... 1dm^3
NIT 1 (5 ml)	-Acide sulfurique.....0.4 g -Acide acétique..... 30 g -H2O..... 70 ml
NIT 2 (5 ml)	-N,N-diméthyl-1 –naphthylamine….0.6g -Acide acétique.....30 g -H2O.....70 ml
VP 1 (5 ml)	-Potassium hydroxyde…. 40 g -H2O.....100 ml
VP 2 (5 ml)	-a-naphtol.....6 g -Ethanol..... 100 ml

TDA (5 ml)	Ferric chloride (iron content) ….3.4 g H_2O ..... 100 ml

Annexe 03

Tableau de caractère de la galerie API20E

Caractère	Substrat	Enzyme	Produit(s) formé(s)	indicateur	Réactif(s) ajouté(s)	Lecture +	Lecture –
ONPG	ONPG	ONPG-hydrolase ---------- β-galactosidase	ONP (jaune) galactose			Jaune	Incolore (1)
ADH	Arginine	Arginine Dihydrolase (ADH)	Ornithine NH_3 CO_2	RP		Rouge - orange	Jaune (2)
LDC	Lysine	Lysine Décarboxylase (LDC)	Cadavérine CO_2	RP		Rouge - orange	Jaune (2)
ODC	Ornithine	Ornithine Décarboxylase (ODC)	Putréscine CO_2	RP		Rouge - orange	Jaune (2)
CIT	Citrate		CO_2 H_2O	BBT		Bleu	Vert (3)
H_2S	$S_2O_3^{2-}$	(Thiosulfate Réductase)	S^{2-} (H_2S)	Fer III		Noir	Incolore (jaune pâle)
URE	Urée	Uréase	NH_4^+ (HCO_3^-)	RP		Rouge	Jaune
TDA	Tryptophane	Tryptophane Désaminase (TDA)	Acide indole pyruvique NH_3		TDA / immédiat (Fer III)	Marron Brun	Jaune
IND	Tryptophane	Tryptophanase	Indole A. pyruvique NH_3		James / immédiat ou Kovacs / 2min	Rouge	Incolore Jaune
VP	Pyruvate		Acétoïne		VP1 (KOH) + VP2 (α-naphtol) / 10min	Rouge	Incolore (5)
GEL	Gélatine	Gélatinase	Acides Aminés			Noir	Incolore (+particules intactes)
GLU	Glucose		Acides	BBT		Jaune	Bleu ou bleu-vert (4)
SUCRES (AUXAN.)	Man, Ino, Sor, Rha, Sac, Mel, Amy, Ara		Acides	BBT		Jaune	Bleu ou bleu vert (4)
NO_2^-/ N_2	NO_3^- (*cupule GLU*)	Nitrate Réductase	NO_2^- ---------- N_2		Nit1 + Nit2 / 2min ---------- (Zinc)	Rouge ---------- Incolore	Incolore ---------- Rouge

(1) une très légère couleur jaune est positive
(2) une couleur orange après 48H D'INCUBATION doit être considérée comme négative
(3) le résultat se lit dans la cupule (zone aérobie)
(4) la fermentation commence dans la partie inférieure des tubes et l'oxydation dans la cupule
(5) une légère coloration rose après 10 minutes doit être considérée comme négative

Annexe 04

La lecture des parametres de tableau se transformée dans logicielle d'identification

Annexe 05 Etapes de l'utilisation de l'API20E

Annexe 06

Appareillage