Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation
Québec

Laboratoire de diagnostic en phytoprotection

Système Biolog GEN III
Identification de bactéries aérobies Gram négatif et positif

Ann-Marie Breton, Agronome phytopathologiste
Marion Berrouard, Technicienne de laboratoire
Lise Vézina, Technicienne spécialiste

Direction de la phytoprotection – MAPAQ

INTRODUCTION

Les systèmes développés par la compagnie Biolog visent l'identification de bactéries, levures et champignons. Au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ), nous utilisons le système permettant l'identification des bactéries aérobies Gram négatif et positif. Il nous est particulièrement utile pour identifier les *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Acidovorax* et tous autres genres bactériens répertoriés par le système Biolog (entre 1500-1600 espèces de bactéries). Ces bactéries sont habituellement responsables des symptômes de taches, brûlures et pourritures molles. Les images suivantes permettent de visualiser des symptômes d'origine bactérienne sur diverses plantes cultivées.



Pseudomonas syringae pv. *apii* sur le céleri



Xanthomonas campestris pv. *campestris* sur le chou

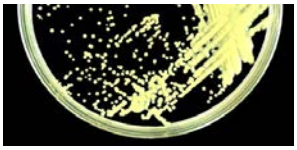
ISOLEMENT

Pour le diagnostic des maladies bactériennes, la première étape consiste à isoler la bactérie des tissus végétaux. Les isolements sont réalisés sur des milieux de culture gélosés soit B de King pour les *Pseudomonas* (King, E.O., M.K. Ward et D.E. Raney. 1954), MS pour les *Pectobacterium* (Miller-Schroth medium) et LPGA (Levure Peptone Glucose Agar) pour les autres genres bactériens. À la suite du trempage des tissus végétaux dans une solution saline (NaCl 0,85 %) pendant 30 minutes, la suspension est étalée par épuisement sur les milieux de culture. L'incubation se fait à 26°C et elle est généralement de 48 à 72 heures afin d'obtenir des colonies de 1 à 2 mm de diamètre.



Xanthomonas campestris pv. *vitians* sur la laitue

Les colonies de *Xanthomonas* sur le milieu LPGA ont une coloration jaune pâle à jaune citron. Elles sont légèrement convexes, luisantes, avec une marge bien définie.









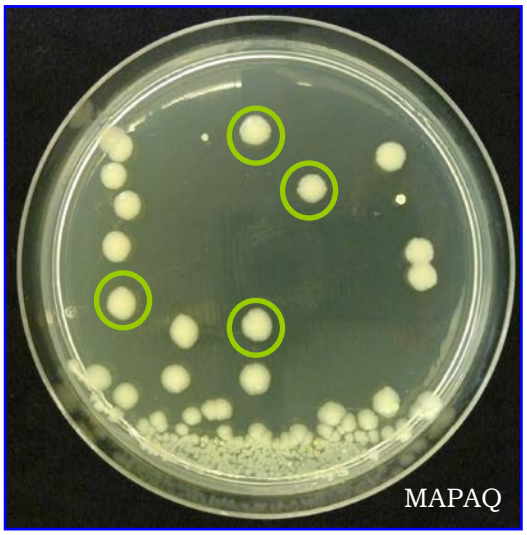
Les colonies de *Pseudomonas* sur le milieu B de King ont une coloration blanchâtre à crème avec ou sans la présence d'une fluorescence lorsque les colonies sont soumises à une lumière ultraviolette.

IDENTIFICATION

L'identification des bactéries aérobies Gram négatif et positif par le système Biolog est possible grâce à l'utilisation de plaques GEN III. Elles permettent de vérifier simultanément la réaction métabolique des bactéries en regard de 94 réactions phénotypiques (71 sources de carbone et 23 tests de sensibilité aux inhibiteurs chimiques). À la suite de l'inoculation d'une plaque GEN III avec une bactérie inconnue, un profil métabolique est obtenu.

INOCULATION DE LA PLAQUE BIOLOG

Les colonies bactériennes isolées des tissus végétaux présentant les caractéristiques morphologiques des bactéries recherchées sont mises en culture pure sur le milieu TSA (Tryptic Soy Agar).



La première étape est la préparation d'une suspension bactérienne dans un tube de liquide d'inoculation (IF) de type A (Vert). La suspension bactérienne doit avoir une transmittance de 90 à 98 %.

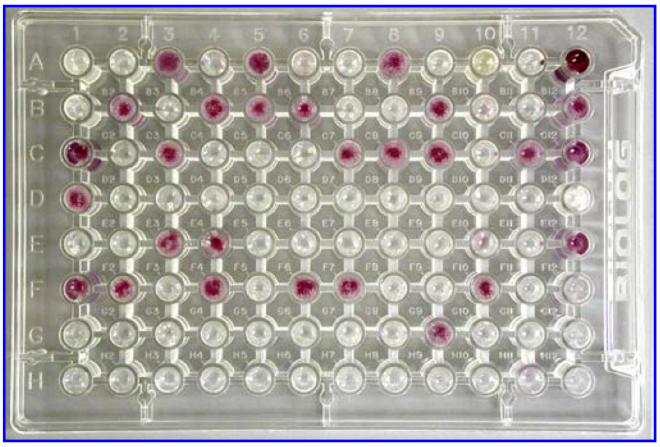
La turbidité de la suspension bactérienne est mesurée par un électrophotomètre ou un turbidimètre.



L'inoculation de la plaque GEN III se fait en déposant 100 µl de la suspension bactérienne dans chacun des puits. L'incubation se fait dans une chambre humide à 30°C pour une durée de 24 à 48 heures.

LECTURE DE LA PLAQUE BIOLOG

L'identification des bactéries par le système Biolog est réalisée grâce à un lecteur de plaque automatique jumelé à une banque de données informatique contenant le profil de bactéries de référence. Le puits A1 doit être incolore. L'utilisation des substrats ou la résistance aux inhibiteurs chimiques par la bactérie se traduit par l'apparition dans les puits d'une couleur pourpre. Cette coloration pourpre est produite par la réduction de l'indicateur, le tétrazolium, en un composé coloré le formazan. En l'absence de l'utilisation du substrat ou si la bactérie est sensible au produit, le puits demeure incolore.



Plaque GEN III inoculée avec une bactérie inconnue et incubée 24 heures à 30°C.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Suite à la lecture des résultats des tests biochimiques obtenus pour la bactérie inconnue, le système d'identification Biolog compare ce profil métabolique à ceux des bactéries de référence de sa base de données. L'identification est donc réalisée en jumelant le profil de la bactérie à identifier à celui de l'espèce bactérienne présentant le plus de similarité. L'identification s'appuie principalement sur deux valeurs (figure 2) :

- La **similarité** est un indice reflétant le degré d'appariement entre le profil métabolique de la bactérie à identifier et celui de la bactérie proposée par le système Biolog. Plus la valeur se rapproche de 1, meilleure est considérée l'identification.
- La **distance** indique le nombre de puits dont les résultats sont différents entre la bactérie inconnue et celle proposée par le système Biolog. Plus cette différence se rapproche de zéro, meilleure est considérée l'identification.

Mise en page du document par Alexia Lavigne, étudiante en technique de Bureautique – Cégep Garneau et Carolle Fortin, technicienne en administration – Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ

Québec, le 21 juillet 2014

Vous retrouverez ce document sur le site Agrireseau.qc.ca