
GELOSE DE KLIGLER

IDENTIFICATION DES ENTEROBACTERIES

1 DOMAINE D'UTILISATION

Le milieu de Kligler permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose et du glucose (avec ou sans production de gaz), ainsi que de la production de sulfure d'hydrogène.

2 HISTORIQUE

En 1911, Russell décrit un milieu à deux sucres pour l'isolement de bacilles typhiques dans les urines.

Six ans plus tard, Kligler développa un milieu nutritif avec glucose, indicateur d'Andrade et acétate de plomb pour la différenciation des bactéries des groupes Typhi et Paratyphi. Alors qu'il expérimentait ce milieu avec d'autres combinaisons d'ingrédients, Kligler se rendit compte que le milieu de Russell, avec indicateur d'Andrade et acétate de plomb, permettait une excellente différenciation des salmonelles.

Par la suite, Bailey et Lacey préconisèrent l'utilisation de rouge de phénol comme indicateur pH, qui se substituait ainsi à l'indicateur d'Andrade, moins adapté à ce type de réaction.

Sulkin et Willett utilisèrent le thiosulfate de sodium et le sulfate ferreux pour mettre en évidence la production de sulfure d'hydrogène.

3 PRINCIPES

Les fermentations du lactose et du glucose, qui permettent la différenciation des entérobactéries, se traduisent par une acidification qui fait virer au jaune le rouge de phénol (indicateur pH).

Les microorganismes qui fermentent le glucose, mais pas le lactose (salmonelles ou shigelles), produisent initialement une pente jaune due à l'acidification obtenue par fermentation du glucose présent en faible quantité. Lorsque le glucose est complètement utilisé dans l'environnement aérobie de la pente, la réaction s'alcalinise par oxydation des acides produits, phénomène aboutissant à l'apparition d'une coloration rouge en surface. Cette alcalinisation n'apparaît pas en profondeur dans le culot, où la coloration se maintient au jaune.

Les germes fermentant le lactose et le glucose font virer au jaune la pente et le culot par une production importante d'acide, ce qui suffit à maintenir un pH acide en surface.

Les microorganismes ne fermentant aucun des deux glucides ne modifient pas la couleur du milieu.

La production d'H₂S se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique.

La production de gaz (H₂, CO₂), résultant des fermentations sucrées, se traduit par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.

4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone	20,0 g
- Extrait autolytique de levure.....	3,0 g
- Extrait de viande	3,0 g
- Glucose	1,0 g
- Lactose.....	10,0 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g
- Thiosulfate de sodium	0,5 g
- Citrate ferrique ammoniacal.....	0,5 g
- Rouge de phénol.....	25,0 mg
- Agar agar bactériologique.....	15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,4 ± 0,2.

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 58,0 g de milieu déshydraté (BK034) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.
- Répartir en tubes.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Incliner les tubes de manière à obtenir un culot de 3 cm de hauteur et une pente oblique.

✓ **Reconstitution :**
58,0 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

6 MODE D'EMPLOI

- A partir d'une colonie prélevée sur un milieu d'isolement sélectif, ensemercer le culot par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées.
- Il est nécessaire d'utiliser des cultures pures prélevées au centre de colonies bien isolées, sinon les réactions croisées rendent l'identification impossible à réaliser.
- Incuber à 37 °C pendant 24 heures, capsules desserrées, de manière à favoriser les échanges gazeux.

✓ **Ensemencement :**
Piqûre centrale et stries en surface

✓ **Incubation :**
24 h à 37 °C

7 LECTURE

Le milieu de Kligler fournit quatre renseignements principaux :

Fermentation du glucose :

- Culot rouge : glucose non fermenté
- Culot jaune : glucose fermenté

Fermentation du lactose :

- Pente rouge : lactose non fermenté
- Pente jaune : lactose fermenté

Production de gaz :

- Apparition de bulles de gaz dans le culot

Formation d'H₂S :

- Production d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.

Les réactions typiques obtenues sont présentées dans le tableau suivant :

Espèce	Fermentation du lactose	Fermentation du glucose	Production de gaz	Formation de H ₂ S
<i>Salmonella</i> Typhi ⁽²⁾	-	+	-	+
<i>Salmonella</i> Paratyphi A ⁽²⁾	-	+	+	-
<i>Salmonella</i> Choleraesuis ⁽²⁾	-	+	+	-
<i>Salmonella</i> Pullorum ⁽²⁾	-	+	+	+
<i>Salmonella</i> Paratyphi B ⁽²⁾	-	+	+	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium ⁽²⁾	-	+	+	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis ⁽²⁾	-	+	+	+
<i>Salmonella</i> Gallinarum ⁽²⁾	-	+	-	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	+	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	+	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	+	-	-
<i>Shigella boydii</i>	-	+	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	+	[+]	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	+	+
<i>Proteus morgani</i>	-	+	+	-
<i>Proteus rettgeri</i>	-	+	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	-	-

Espèce	Fermentation du lactose	Fermentation du glucose	Production de gaz	Formation de H ₂ S
<i>Enterobacter hafniae</i>	-	+	+	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i> ⁽¹⁾	+	+	+	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-

⁽¹⁾ Certaines souches d'*Escherichia coli* ne fermentent le lactose que très tardivement.

⁽²⁾ Au cas où l'interprétation peut laisser suspecter la présence de salmonelles, il est possible d'effectuer, à partir des cultures sur milieu de Kligler, la recherche de la β -galactosidase, de l'uréase et de la lysine-décarboxylase.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre rosée, fluide et homogène.

Milieu préparé : gélose rouge-orangé.

Réponse culturale après 24 heures d'incubation à 37 °C :

Microorganismes		Croissance	Fermentation lactose	Fermentation glucose	Formation H ₂ S	Production Gaz
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00179	Bonne	+	+	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00026	Bonne	-	-	-	-

9 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30 °C.

La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.

Milieu préparé en tubes non inclinés (*) : 180 jours à 2-8 °C.

Milieu préparé en tubes inclinés (*) : 8 jours à 2-8 °C.

(*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

Note : Il est recommandé, lorsque le milieu n'est pas utilisé dans les 8 jours qui suivent sa préparation, de le régénérer au bain-marie bouillant et de le solidifier à nouveau en bonne position.

10 PRESENTATION

Milieu déshydraté :

Flacon de 500 g BK034HA

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Russel, F.F.. 1911. The isolation of typhoid bacilli from urine and feces with the description of a new double sugar tube medium. J. Med. Res., **25** : 217-229.

Kligler, I.J.. 1917. A simple medium for the differentiation of the members of the typhoid-paratyphoid group. American Journal of Public Health, **7** : 1042-1044.

Kligler, I.J.. 1918. Modifications of culture media used in the isolation and differentiation of typhoid, dysentery, and allied bacilli. Journal of Experimental Medicine, **28** : 319-322.

Buttiaux, R.. 1951. L'Analyse bactériologique des eaux de consommation. Editions médicales Flammarion, Paris.

Buttiaux, R., Beerens, H., et Tacquet, A.. 1962. Manuel de techniques bactériologiques. Editions médicales Flammarion, Paris.

NF U47-100. Juillet 2007. Méthodes d'analyse en santé animale. Recherche par l'isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles dans l'environnement des productions animales.

NF U47-101. Novembre 2007. Méthodes d'analyse en santé animale. Isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles chez les oiseaux.

NF U47-102. Janvier 2008. Méthodes d'analyse en santé animale. Isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles chez les mammifères.

12 AUTRES INFORMATIONS

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : KLIGLER_FR_V11.

Date création : 04-2001

Date de révision : 01-2018

Motif de révision : Bibliographie.