

MISE EN EVIDENCE DES CRISTAUX DE TOXINE DE BACILLUS THURINGIENSIS

Coloration 1

Principe :

Les *Bacillus* sont des germes sporulés aérobies strictes ou aéro-anaérobies facultatifs. Seule la présence du cristal de toxine protéique parasporal permet de distinguer *Bacillus thuringiensis* des autres membres du groupe de *Bacillus cereus*.

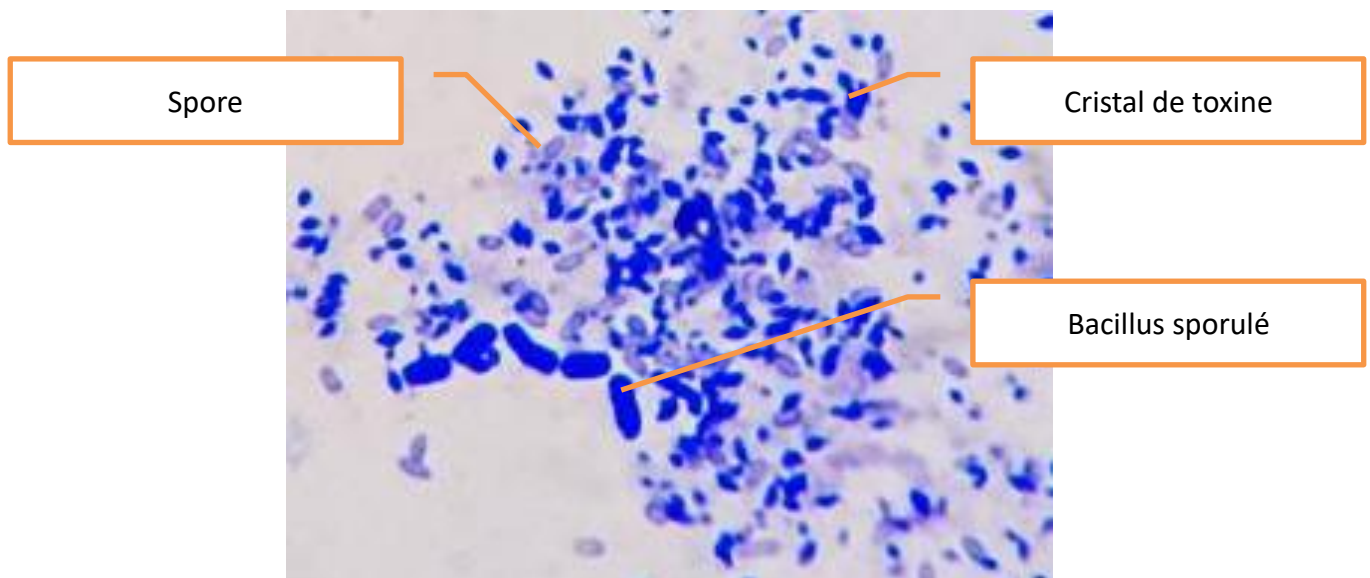
Matériel et réactifs :

- souche isolée du bioinsecticide sur gélose BCP de 48H
- solution de bleu de Coomassie (0.25% Coomassie brillant blue R 250 ; 50% ethanol ; 7% acetic acid)

Protocole opératoire :

- A partir d'une souche isolée du bioinsecticide et fournie sur gélose BCP, préparer un frottis dans de l'eau distillée stérile
- Laisser sécher à l'air
- Fixer à la chaleur
- Placer la lame sur le support de coloration
- Colorer 5 minutes avec la solution de bleu de Coomassie
- Rincer à l'eau du robinet
- Laisser sécher le frottis ainsi coloré.
- Examiner sous l'huile à immersion pour la présence de spores libres peu colorées et de cristaux de toxines tétraonaux colorés en violet foncé. Les cristaux sont généralement plus petits que les spores.

Le test de recherche des cristaux de toxines protéiques permet de différencier B. cereus de B. thuringiensis. Les cristaux de toxines abondent normalement dans une culture de 3 ou 4 jours de B. thuringiensis, mais ils ne peuvent être détectés par la technique de coloration avant que la lyse du sporange n'ait eu lieu. B. cereus et les autres membres du groupe B. cereus ne produisent pas de cristaux de toxines protéiques.



Coloration 2

Coloration des spores et mise en évidence des cristaux de toxine

Les *Bacillus* sont des germes sporulés aérobies strictes ou aéro-anaérobies facultatifs. Seule la présence du cristal de toxine protéique parasporal permet de distinguer *Bacillus thuringiensis* des autres membres du groupe de *Bacillus cereus*.

Procédure de coloration

- Souche isolée du bioinsecticide sur gélose BCP de 48H
- préparer un frottis avec de l'eau distillée stérile.
- Laisser sécher à l'air et fixer légèrement à la chaleur.
- Placer la lame sur le support de coloration et recouvrir avec de l'éthanol.
- Laisser reposer 30 s, enlever l'éthanol et laisser la lame sécher à l'air.
- Sous une hotte d'extraction, mettre la lame sur la platine chauffante et recouvrir complètement avec un mélange à parties égales de fuchsine phénatée et de vert de malachite à 5 %.
- Chauffer les lames jusqu'à ce qu'il se forme de la vapeur.
- Attendre 1 à 2 min et répéter cette dernière étape.
- Laisser reposer 30 s, enlever le colorant et rincer à fond avec de l'eau du robinet.
- Laisser sécher le frottis ainsi coloré.
- Examiner sous l'huile à immersion pour la présence de spores libres colorées en vert et de cristaux de toxines tétraogonaux colorés en violet foncé. Les cristaux sont généralement plus petits que les spores.

